



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ:
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ, ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΕΣ
ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**

ΣΟΦΙΑ ΖΗΚΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

Ημερομηνία αίτησης της κας. Ζήκου Σοφίας: 29-11-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.: 652^Α/8-12-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Μέλη:

Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Καθηγήτρια

Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Ημερομηνία ορισμού θέματος: Γ.Σ. 667^Α/11-05-2007

Θέμα: «Ανάπτυξη Αντιμικροβιακών Πεπτιδίων: Σχεδιασμός, Σύνθεση, Διαμορφωτικές και Βιολογικές Μελέτες»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.: 779^Α/19-02-2010

1. Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
2. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Καθηγήτρια
3. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
4. Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής
5. Κωνσταντίνος Δραΐνας, Καθηγητής
6. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής
7. Δημόκριτος Τσουκάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό: «Άριστα» στις 10-03-2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
45110 ΙΩΑΝΝΙΝΑ

Ιωάννινα, 10 Μαρτίου 2010

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευγενία Πάνου-Πομόνη

E-mail: epanou@cc.uoi.gr

Τηλ.: +2651098393 FAX: +2651098799, Γραμματεία: +2651098388

Προς το Τμήμα Χημείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Θέμα: «Απονομή του τίτλου του Διδάκτορα στην κ. Σοφία Ζήκου»

Η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κ. Σοφίας Ζήκου, Χημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων στις 10 Μαρτίου 2010, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της εργασίας με τίτλο: «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ, ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ».

Η Επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η εργασία είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης. Κατόπιν αυτού η επιτροπή αποφάσισε να απονείμει τον τίτλο του Διδάκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στην κ. Σοφία Ζήκου με βαθμό *Άριστα*

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

1. Ευγενία Πάνου-Πομόνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

2. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Καθηγήτρια

3. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

4. Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής

5. Κωνσταντίνος Δραΐνας, Καθηγητής

6. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής

7. Δημόκριτος Τσουκάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ -ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων και στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα Δεκέβριος 2006-Φεβρουάριος 2010.

Κατ'αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου-Πομόνη για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και την καταλυτική ενθάρρυνση στις όποιες δυσκολίες προέκυψαν.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθηγήτρια κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου (μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής) και τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο, οι οποίοι με δέχτηκαν στο εργαστήριό τους και μου δώσανε τη δυνατότητα να εκπονήσω την παρούσα διατριβή. Καθώς και για την ουσιαστική βοήθεια και το συνεχές ενδιαφέρον τους όλα αυτά τα χρόνια.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα-Ειρήνη Κούκκου (μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής), για τη μετάδοση όλων των απαιτούμενων γνώσεων και τη σημαντική συμβολή της στη διεξαγωγή και ανάλυση των βιολογικών πειραμάτων.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη για το άμεσο ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται σε όλους τους συναδέλφους που συνεργαστήκαμε, αλλά και μοιραστήκαμε τις ίδιες ανησυχίες.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πολύτιμη βοήθεια, την ενθάρρυνση, τη συμπαράσταση και την υπομονή τους. Χωρίς αυτούς τίποτα από όλα αυτά δε θα είχε πραγματοποιηθεί.

Ζήκου Σοφία

Ιωάννινα 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο. ΜΙΚΡΟΒΙΑ-ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</u>	1-24
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΕΣ ΡΙΖΕΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	1-2
1.2 ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	2-5
1.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΦΑΚΕΛΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	6-15
1.3.1 Χρώση κατά GRAM	6-7
1.3.2 Δομή του Κυτταρικού Τοιχώματος των Gram-αρνητικών βακτηρίων	7-11
1.3.3 Δομή του Κυτταρικού Τοιχώματος των Gram-θετικών βακτηρίων	12-15
1.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ	15-24
1.4.1 Θρεπτικά Μέσα	15-16
1.4.2 Κύκλος Ζωής Βακτηρίων	17-20
1.4.3 Τεχνικές Διασποράς Μικροοργανισμών στην Επιφάνεια Στερεού Υποστρώματος	20
1.4.4 Μέθοδοι Μέτρησης της Ανάπτυξης των Βακτηρίων	21-24
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο. ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ</u>	27-47
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
2.2 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ Η ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	28-31
2.2.1 Τα πρώτα σημάδια της αντίστασης στα αντιβιοτικά	29-30
2.2.2 Μηχανισμοί αντίστασης των βακτηρίων στα κοινά αντιβιοτικά	30-31
2.3 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ	31-32
2.4 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΚΑΤΙΟΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ (AMPs)	33-36
2.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ (AMPs)	36-40
2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ AMPs	40-42
2.7 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ AMPs ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΕΣΑ	42-45
2.8 ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΤΗΣ IN VIVO ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ AMPs	45-47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο. ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ 51-78

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	51
3.2 ΑΜΙΝΟΞΕΑ	51-55
3.3 ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ	55-56
3.4 ΣΤΕΡΕΟΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ	57-58
3.5 ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ	58-59
3.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΗ ΦΑΣΗ	59-60
3.7 ΣΤΕΡΕΟ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (ΡΗΤΙΝΗ)	61-63
3.7.1 ΡΗΤΙΝΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΒΟΣ-ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ	61-62
3.7.2 ΡΗΤΙΝΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΦΜΟC-ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ	62-63
3.8 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ Ν ^α -ΑΜΙΝΟΜΑΔΑΣ	64-65
3.9 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ-ΟΡΘΟΓΩΝΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ	65-66
3.10 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ	66-72
3.11 ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΡΗΤΙΝΗ	73-74
3.12 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ	74-78
3.12.1 <i>Υγρή Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης και Υψηλής Διαχωριστικής Ικανότητας RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography)</i>	74-75
3.12.2 <i>Φασματοσκοπία μάζας (ESI-MS)</i>	76-78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο. ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΑΤΙΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ 81-88

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	81
4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ (CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY, CD)	81-88
4.2.1 <i>Βασικές Αρχές-Ηλεκτρομαγνητικά Κύματα</i>	82-84
4.2.2 <i>Αλληλεπίδραση ύλης και φωτός</i>	84-85
4.2.3 <i>Φάσματα CD πεπτιδίων</i>	86-87
4.2.4 <i>Οργανολογία</i>	87-88

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

91

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο. ΣΥΝΘΕΣΗ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

95-117

6.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

95-96

6.2 ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

96-99

6.3 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂

100-101

6.4 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂

102-103

6.5 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂

104-105

6.6 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂

106-107

6.7 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂

108-109

6.8 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂

110-111

6.9 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂

112-113

6.10 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂

114-115

6.11 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂

116-117

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

121-133

7.1 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

121-124

7.1.1 Στελέχη-Θρεπτικά υλικά

121

7.1.2 Μελέτη ανθεκτικότητας των μικροβιακών στελεχών στα πεπτίδια Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH₂, όπου n = 2 ή 3, X = Leu ή Phe και Y= H- ή Ac- ή Ahx

122-124

7.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΜΟΛΥΣΗΣ

124-126

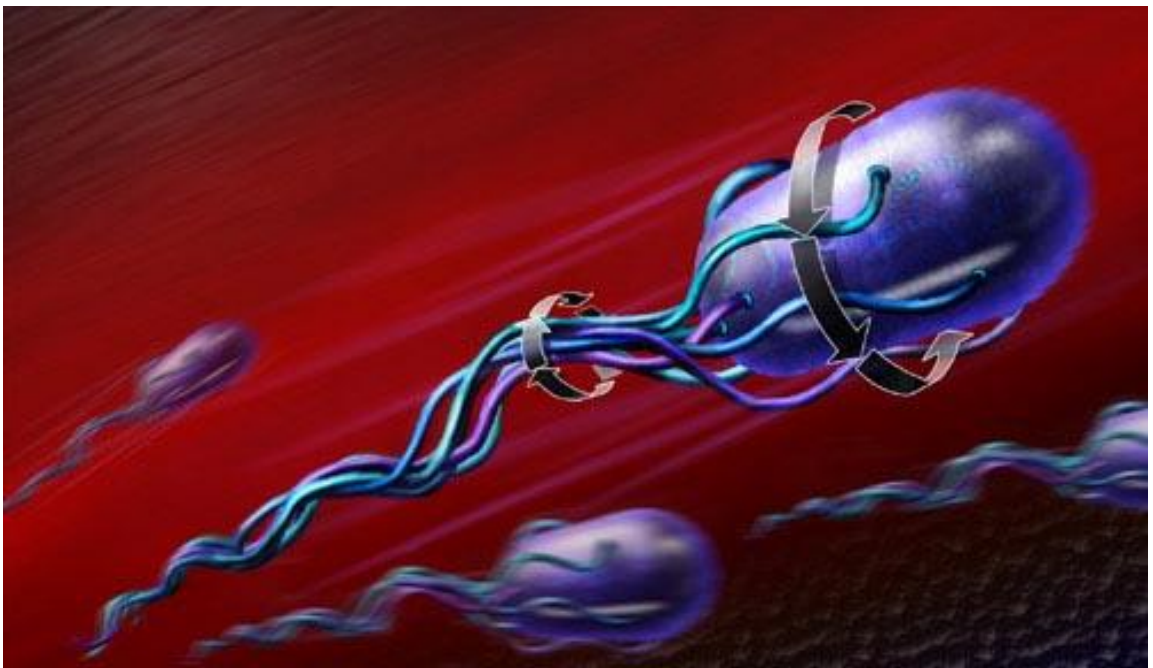
7.3 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

126-133

<i>7.3.1 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης πεπτιδίων ύστερα από επώαση με θρυψίνη</i>	127-128
<i>7.3.2 Μελέτη πρωτεολυτικής σταθερότητας με θρυψίνη χρησιμοποιώντας αναλυτική RP-HPLC</i>	128-133
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο. ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ	137-156
8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	137
8.2 Φάσματα CD των πεπτιδίων Y-(Aib-Arg-Aib-X)₂-NH₂ (Y= H, Ac-, Ahx- και X= Leu-, Phe-)	138-142
8.3 Φάσματα CD των πεπτιδίων Y-(Aib-Arg-Aib-X)₃-NH₂ (Y= H, Ac-, Ahx- και X= Leu-, Phe-)	142-145
8.4 Φάσματα CD των πεπτιδίων H-(Aib-Arg-Aib-Leu)_n-NH₂ και Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)_n-NH₂ όπου n= 2 ή 3	146-149
8.5 Φάσματα CD των πεπτιδίων H-(Aib-Arg-Aib-Phe)_n-NH₂, Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)_n-NH₂ και Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)_n-NH₂ όπου n = 2 ή 3	150-154
8.6 Ανάλυση φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού	155-156
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	159-164
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	167-168
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11^ο. ΠΕΡΙΛΗΨΗ-SUMMARY	171-173
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12^ο. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	177-179
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13^ο. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	183-190

*Αφιερώνεται
Σε όσους με στήριξαν*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο. ΜΙΚΡΟΒΙΑ - ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ



1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΕΣ ΡΙΖΕΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η μικροβιολογία είναι η επιστήμη που μελετά τα ζωντανά κύτταρα και τον τρόπο με τον οποίο αυτά λειτουργούν. Εστιάζει το ενδιαφέρον της στους μικροοργανισμούς και ιδιαίτερα στα βακτήρια, μία μεγάλη ομάδα κυττάρων με τεράστια θεωρητική και πρακτική σημασία. Η επιστήμη της μικροβιολογίας άρχισε να αναπτύσσεται μόλις τον 19^ο αιώνα και έκτοτε γνώρισε εκρηκτική ανάπτυξη, γονιμοποιώντας παράλληλα αρκετά άλλα νέα συγγενικά πεδία.

Υποψίες για την ύπαρξη οντοτήτων τόσο μικρών ώστε να μην γίνονται ορατές με γυμνό μάτι υπήρχαν από παλιά. Η ανακάλυψη των οντοτήτων αυτών όμως συνδέθηκε με την εφεύρεση του μικροσκοπίου. Ο πρώτος άνθρωπος που παρατήρησε μικροοργανισμούς σχετικά λεπτομερώς ήταν ο Ολλανδός **Antoni van Leeuwenhoek**, το 1684, ένας ερασιτέχνης κατασκευαστής μικροσκοπίων. Αν και τα μικροσκόπια του ήταν πολύ άτεχνα σε σύγκριση με τα σημερινά, ο Leeuwenhoek μπόρεσε να δει μικροοργανισμούς μεγέθους βακτηρίων, ο οποίος τα ονόμασε απειροελάχιστα ζωομόρια. Οι παρατηρήσεις του επιβεβαιώθηκαν και από άλλους ερευνητές, αλλά χρειάστηκε να έρθει ο 19^{ος} αιώνας, όταν βελτιώθηκαν σημαντικά τα μικροσκόπια, για να αναγνωριστεί η σημασία αυτών των μικρότατων οργανισμών.

Το 1864, ο Γάλλος χημικός **Louis Pasteur**, κατέρριψε τη θεωρία της *αυθόρμητης γένεσης* (υπόθεση που δίχαζε τους στοχαστές επί αιώνες, σύμφωνα με την οποία ζωντανοί οργανισμοί μπορούν να προκύψουν από μη ζωντανή ύλη). Ο Pasteur απέδειξε ότι οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε αποσυντιθέμενα τρόφιμα προέρχονται από μικροβιακά κύτταρα που βρίσκονται στον αέρα και εναποτίθενται διαρκώς πάνω σε όλα τα αντικείμενα. Ο Pasteur προχώρησε και σε άλλα ιατρικά και μικροβιολογικά επιτεύγματα, ιδιαίτερα τη δεκαετία 1880-1890, όπως την ανάπτυξη εμβολίων κατά του άνθρακα, της λύσσας και της χολέρας των πουλερικών.

Αποφασιστικότερη ώθηση στην ανάπτυξη της μικροβιολογίας ως επιστήμης έδωσε η απόδειξη συμμετοχής των μικροοργανισμών στην πρόκληση ανθρωπονόσων, από έναν εκπαιδευόμενο γιατρό, τον **Robert Koch**. Ο Koch κατάφερε να απομονώνει οργανισμούς και να τους καλλιεργεί εργαστηριακά χρησιμοποιώντας ομοιογενή θρεπτικά μέσα και ένα στερεοποιητικό παράγοντα, αρχικά ζελατίνη (μειονέκτημα: δεν παρέμενε σταθερή στους 37^ο C, τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των περισσότερων παθογόνων μικροοργανισμών) και αργότερα άγαρ, έναν πολυσακχαρίτη που παράγουν τα ερυθρά φύκη. Με αυτά τα πειράματα, ο Koch διατύπωσε τα ακόλουθα κριτήρια, γνωστά σήμερα ως **αξιώματα του Koch**, που είναι

απαραίτητο να ισχύουν αν θέλουμε να αποδείξουμε ότι μια συγκεκριμένη ασθένεια προκαλείται από συγκεκριμένο είδος μικροοργανισμού:

Τα αξιώματα του Koch

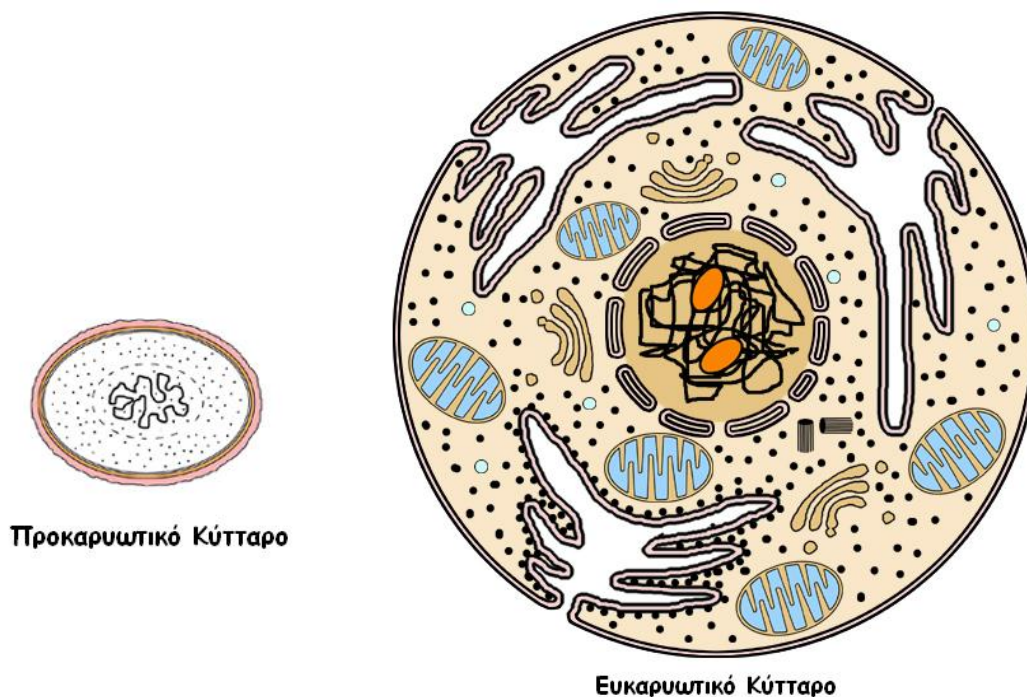
- 1.** Ο παθογόνος μικροοργανισμός πρέπει να ανιχνεύεται σε όλα τα ζώα που υποφέρουν από τη νόσο, αλλά να απουσιάζει από τα υγιή.
- 2.** Ο μικροοργανισμός πρέπει να μπορεί να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί σε αμιγή καλλιέργεια εκτός του σώματος του ζώου.
- 3.** Όταν μια τέτοια καλλιέργεια του οργανισμού ενοφθαλμιστεί σε υγιή ζώα, πρέπει να προκαλεί την εμφάνιση των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων της ασθένειας.
- 4.** Ο μικροοργανισμός πρέπει να απομονώνεται εκ νέου από το δεύτερο πειραματόζωο, να καλλιεργείται ξανά στο εργαστήριο και να εξακολουθεί να είναι όμοιος με τον αρχικό οργανισμό[1].

1.2 ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Για να αποδοθεί ένας σωστός ορισμός τι είναι Ζωή, θα πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι όλα τα έμβια όντα προέρχονται από κύτταρα και παράγωγα αυτών. Με άλλα λόγια, θα πρέπει να θεωρήσουμε τα κύτταρα σαν τις βασικές, δομικές και λειτουργικές μονάδες της ζωής.

Τα κύτταρα εμφανίζονται ανάλογα με τη δομή τους, σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα (**prokaryotic, eukaryotic**). Η ονομασία τους προέρχεται από την ελληνική λέξη κάρυο, που σημαίνει καρπός δημητριακού («karyose-kernel»). Στη βιολογία, χρησιμοποιούμε το συνθετικό αυτό για να αναφερθούμε στον πυρήνα του κυττάρου, ενώ τα προθέματα «pro» και «eu» σημαίνουν «πριν» και «αληθής» ή «καλός» αντίστοιχα. Επομένως, «προκαρυωτικός» σημαίνει «πριν από πυρήνα» και «ευκαρυωτικός» σημαίνει «ύπαρξη αληθινού/καλού πυρήνα». Μεταξύ αυτών των δύο τύπων κυττάρων υπάρχει πληθώρα διαφορών, με πιο θεμελιώδη αυτή που αποκαλύπτεται και από την ονομασία τους, δηλαδή ότι τα προκαρυωτικά δεν έχουν πυρήνα σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά.

Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται μία απλή οπτική σύγκριση μεταξύ των δύο κυττάρων.



Σχήμα1.1 : Προκαρυωτικό κύτταρο (0-10μm) και ευκαρυωτικό κύτταρο (10-100μm).

- Παρόλες τις εμφανείς τους διαφορές, αυτοί οι δύο τύποι κυττάρων έχουν πολλά κοινά:
- επιτελούν σχεδόν τις ίδιες λειτουργίες και με τον ίδιο τρόπο,
 - περιβάλλονται από μεμβράνες πλάσματος,
 - το κυτταρόπλασμα τους περιέχει μικρές δομές, τα ριβοσώματα
 - διαθέτουν DNA που μεταφέρει όλες τις πληροφορίες για τη λειτουργία τους.

Οι ομοιότητες αυτές επεκτείνονται πέραν του ορατού. Για παράδειγμα, το DNA στους δύο κυτταρικούς τύπους είναι ακριβώς το ίδιο, καθώς και ο γενετικός κώδικας του προκαρυωτικού κυττάρου είναι ακριβώς ο ίδιος γενετικός κώδικας που χρησιμοποιείται στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

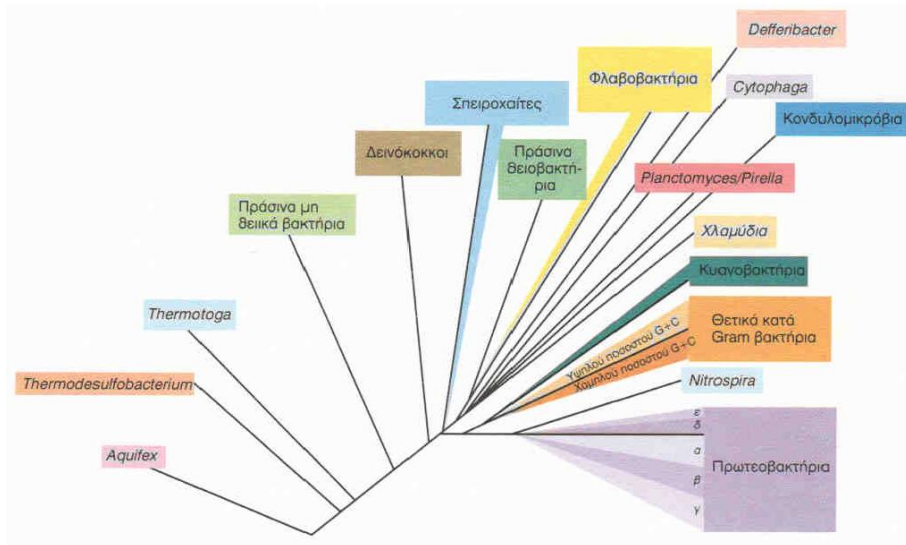
Παρόλες τις ομοιότητες, υπάρχουν μεταξύ των δύο κυττάρων και πολλές ευδιάκριτες διαφορές. Συγκρίνοντας τις δύο παραπάνω εικόνες μπορούμε να κατατάξουμε τις διαφορές τους σε δύο γενικές κατηγορίες: μέγεθος και πολυπλοκότητα. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι πολύ μεγαλύτερα και πολύ πιο πολύπλοκα από τα προκαρυωτικά. Αυτές οι δύο παρατηρήσεις συσχετίζονται μεταξύ τους. Αν εστιάσουμε καλύτερα, θα διακρίνουμε τις παρακάτω διαφορές:

1. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πυρήνα, που περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη. Αντίθετα, τα προκαρυωτικά κύτταρα δεν

έχουν πυρήνα. Ο σκοπός του πυρήνα είναι να διαχωρίζει τις λειτουργίες (σχετικές με το DNA) του μεγάλου ευκαρυωτικού κυττάρου σε μικρότερα τμήματα για αυξημένη αποδοτικότητα. Κάτι τέτοιο δεν είναι απαραίτητο σε ένα προκαρυωτικό κύτταρο εξαιτίας του μικρού του μεγέθους και συνεπώς της μικρής απόστασης που έχουν τα εσωκυτταρικά υλικά μεταξύ τους. Φυσικά, και τα προκαρυωτικά κύτταρα έχουν DNA, καθώς και λειτουργίες DNA. Οι βιολόγοι περιγράφουν την κεντρική περιοχή του προκαρυωτικού κυττάρου ως πυρηνοειδές, γιατί εκεί περίπου βρίσκεται το DNA. Όμως αυτό το πυρηνοειδές είναι ουσιαστικά μια φανταστική «δομή», αφού δεν υπάρχει κάποιο φυσικό όριο που να το εσωκλείει.

2. Το ευκαρυωτικό DNA είναι γραμμικό, ενώ το προκαρυωτικό είναι κυκλικό (δεν έχει αρχή και τέλος).
3. Το ευκαρυωτικό DNA είναι σύνθετο, περιέχει πρωτεΐνες, τις ιστόνες, και είναι οργανωμένο σε χρωμοσώματα. Αντίθετα, το προκαρυωτικό κύτταρο περιέχει μόνο ένα κυκλικό μόριο DNA και συνήθως κάποια μικρότερα κυκλικά μόρια, τα πλασμίδια.
4. Και οι δύο κυτταρικοί τύποι έχουν ριβοσώματα, αλλά στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι μεγαλύτερα και πιο πολύπλοκα.
5. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα δεν περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, αντίθετα με τα προκαρυωτικά κύτταρα.

Προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι τα **βακτήρια** και τα **αρχαία**, λόγω των κοινών χαρακτηριστικών ως προς το μέγεθος, την έλλειψη πυρήνα και ενδοκυτταρικών οργανιδίων, όπως και ως προς την παρουσία ενός κυκλικού χρωμοσώματος και πλασμιδίων. Από μελέτες καλλιέργειών στο εργαστήριο είναι γνωστές τουλάχιστον 17 μείζονες γενεαλογικές γραμμές (φύλα) *βακτηρίων*, ενώ πολλές άλλες έχουν ταυτοποιηθεί με την απομόνωση και την αλληλούχιση ριβοσωματικών βακτηριακών γονιδίων RNA από φυσικά ενδιαιτήματα. Αξίζει να σημειώσουμε τα θετικά κατά Gram βακτήρια, τα κυανοβακτήρια και τα πρωτεοβακτήρια. Σε κάθε φύλο (μεγάλη ομάδα η οποία διαθέτει πολλά γένη) ταξινομούμε τα βακτήρια σύμφωνα με τις φαινοτυπικές πληροφορίες που διαθέτουμε.



Σχήμα 1.2 : Λεπτομερές φυλογενετικό δέντρο των κυριότερων γενεαλογικών γραμμών (φύλων) των *βακτηρίων*, βασισμένο σε συγκρίσεις των αλληλουχιών του ριβοσωματικού 16S rRNA .

Τα τρία πιο κοινά σχήματα των βακτηρίων που έχουν παρατηρηθεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι : το σφαιρικό, το κυλινδρικό και το σπειροειδές (**Σχήμα 1.3**).

Ευκαρυωτικοί οργανισμοί είναι οι **μύκητες** (*fungi*), τα **πρωτόζωα** (*protozoa*) και τα **φύκη** (*algae*).





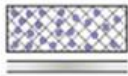




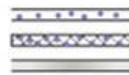







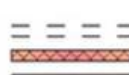
Σχήμα 1.3 : Τα βασικά σχήματα των κυττάρων των βακτηρίων.

1.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΦΑΚΕΛΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

1.3.1 Χρώση κατά GRAM

Το 1884 ο Hans Christian Gram ανακάλυψε μία τεχνική χρώσης που καθιστούσε τα βακτήρια πιο ορατά σε μολυσμένα δείγματα. Στην τεχνική του χρησιμοποίησε τις βαφές, κρυσταλλικό ιώδες, διάλυμα ιωδίου, αλκοόλη 95° (αποχρωματιστής) και σαφρανίνη. Στο τελικό προϊόν, τα βακτήρια που είχαν χρωματισθεί μωβ ονομάστηκαν **Gram θετικά**, ενώ αυτά που χρωματίστηκαν κόκκινα ονομάστηκαν **Gram αρνητικά** [2, 3].

Στο πρώτο βήμα, το κρυσταλλικό ιώδες χρωματίζει τα κύτταρα μωβ. Στο δεύτερο βήμα και το πιο καθοριστικό προστίθεται το διάλυμα ιωδίου, το οποίο ενώνεται με τη χρωστική σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο χρωστικής-ιωδίου, που βοηθάει τη βαφή να σχηματίσει μεγάλους κρυστάλλους στο πλέγμα της πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα. Επειδή το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης στα Gram θετικά κύτταρα είναι πιο παχύ από ότι στα Gram αρνητικά, ο εγκλωβισμός της βαφής είναι πιο εκτεταμένος στα πρώτα. Η εφαρμογή της αλκοόλης στο τρίτο στάδιο διαφοροποιεί τα κύτταρα, καθώς απομακρύνει τη βαφή μόνο από τα Gram-αρνητικά κύτταρα. Η απομάκρυνση της βαφής από το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης και του ίδιου του κυττάρου πραγματοποιείται με διαλυτοποίηση των λιπιδίων της εξωτερικής μεμβράνης. Αντίθετα, οι κρύσταλλοι της βαφής που είναι ενσωματωμένοι στην πεπτιδογλυκάνη των Gram-θετικών βακτηρίων είναι σχετικά απρόσιτοι και αντιστέκονται στην απομάκρυνση. Μετά τον αποχρωματισμό των Gram-αρνητικών κυττάρων, η παρουσία τους επισημαίνεται με εφαρμογή της βαφής σαφρανίνης στο τελικό στάδιο, που τα χρωματίζει ροζ (**Σχήμα 1.4**). Αυτή η παλιά μέθοδος χρώσης παραμένει παγκοσμίως η βάση για την ταξινόμηση και ταυτοποίηση των βακτηρίων.

	Μικροσκοπική εμφάνιση του κυτάρου		Χημική αντίδραση στο κυτταρικό τοίχωμα	
Βήματα:	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)
1. Κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet)				
2. Ιώδιο του Gram				
3. Αλκοόλη (αποχρωματιστής)				
4. Σαφρανίνη (κόκκινη χρωστική)				

Σχήμα 1.4 : Διαδικασία χρώσης κατά Gram.

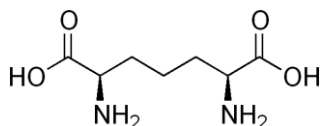
1.3.2 Δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-αρνητικών βακτηρίων

Το εξαιρετικά πολύπλοκο κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων συνίσταται από μια εξωτερική μεμβράνη και ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης (1 έως 3 nm).

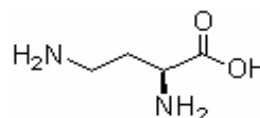
Η πεπτιδογλυκάνη ή μουρεΐνη, η οποία καθορίζει την ισχύ και την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος, αποτελείται από αλυσίδες γλυκάνης που συνδέονται μεταξύ τους με πεπτίδια. Η γλυκάνη αποτελείται από εναλλασόμενα στρώματα N-ακετυλογλυκοζαμίνης (NAG) και N-ακετυλομουραμινικού οξέος (NAM, από το murus που σημαίνει τοίχος), τα οποία συνδέονται μέσω β-1,4 δεσμών (Σχήμα 1.5). Τα εναλλασόμενα μόρια NAG και NAM σχηματίζουν αλυσίδες 10-65 μονομερών και έτσι διαμορφώνουν τον υδατανθρακικό σκελετό. Οι παρακείμενες αλυσίδες συνδέονται μέσω ενός τετραπεπτιδίου που είναι προσαρτημένο στα μόρια NAM. Αυτό το τετραπεπτίδιο, που συντίθεται ενζυμικά, είναι αρκετά ασυνήθιστο,

καθώς συνίσταται από D- και L- αμινοξέα (τα D- αμινοξέα δεν χρησιμοποιούνται κανονικά στη φύση). Τα δύο πρώτα αμινοξέα που συνδέονται με το μόριο NAM ποικίλουν από οργανισμό σε οργανισμό.

Τα δι-άμινο αμινοξέα που βρίσκονται στην τρίτη θέση κατέχουν βασική θέση στη διασταυρωτή σύνδεση της αλυσίδας της πεπτιδογλυκάνης (PG). Συνήθη δι-άμινο αμινοξέα που εμφανίζονται είναι η λυσίνη, το δι-αμινοπιμελικό οξύ και το δι-αμινοβουτυρικό.



δι-αμινοπιμελικό οξύ

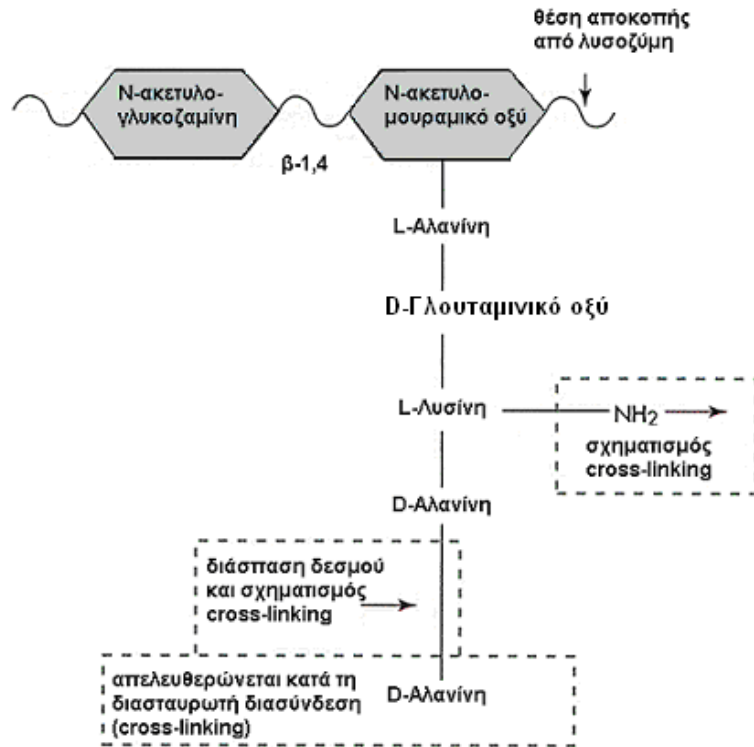


δι-αμινοβουτυρικό

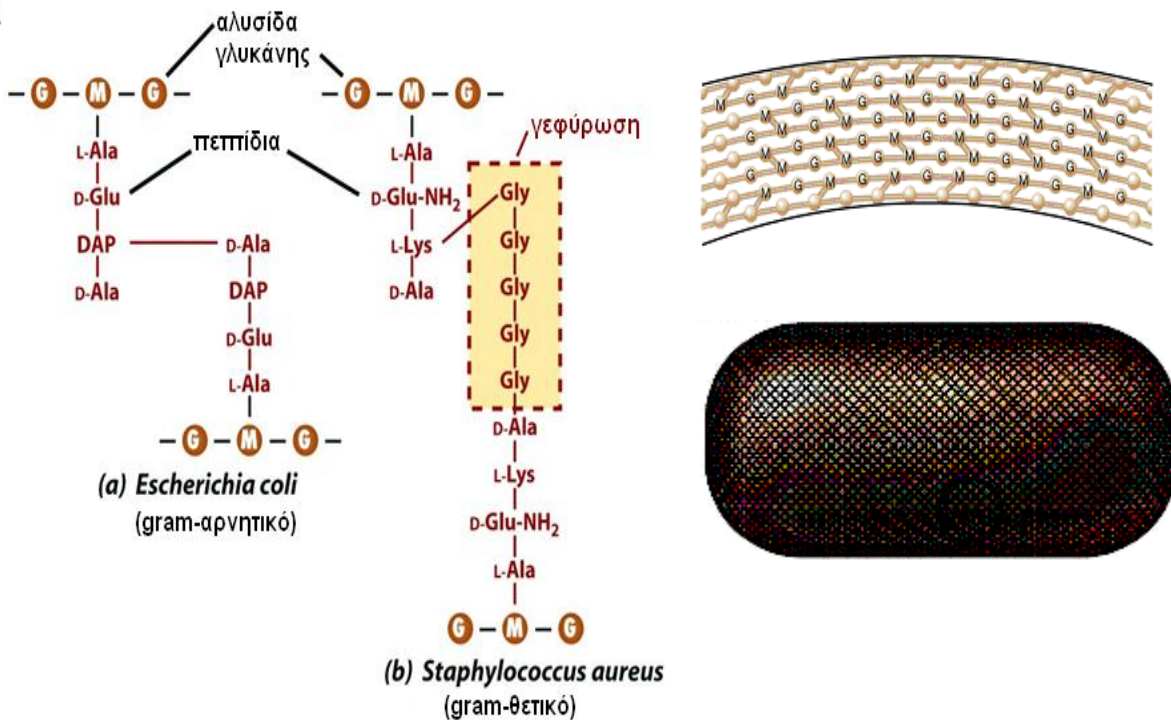
Η διασύνδεση πραγματοποιείται μεταξύ της ελεύθερης αμινομάδας του δι-αμινο αμινοξέος του πεπτιδίου στην τρίτη θέση με την η αλανίνη της τέταρτης θέσης του πεπτιδίου μιας άλλης αλυσίδας. Στο *S. aureus* και σε άλλα Gram θετικά βακτήρια χρησιμοποιείται μια εσωτερική γέφυρα αμινοξέος (π.χ. γλυκίνη) ανάμεσα στα πεπτίδια δύο αλυσίδων για να επιμηκυνθεί ο διασταυρωτός σύνδεσμος (cross-link). Η πρόδρομη μορφή αυτού του πεπτιδίου έχει μία επιπλέον D-αλανίνη, η οποία αποδεσμεύεται κατά το σχηματισμό της διασύνδεσης.

Η πεπτιδογλυκάνη σχηματίζει ένα τρισδιάστατο πλέγμα που περιβάλλει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Με επίδραση του ενζύμου λυσοζύμη, που υδρολύει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ NAG και NAM, καθώς και με επίδραση αντιβιοτικών που αναστέλλουν τη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, το κυτταρικό τοίχωμα αδυνατεί να συγκρατήσει την εσωτερική υδροστατική πίεση, με συνέπεια τη λύση του κυττάρου (απόπτωση).

A.



B.



Σχήμα 1.6 : A. Πρόδρομη μορφή πεπτιδογλυκάνης. Η πεπτιδογλυκάνη συντίθεται από επαναλαμβανόμενες μονάδες που περιλαμβάνουν ένα πενταπεπίδιο προσαρτημένο στο μόριο NAM. Το διπεπίδιο D-Ala-D-Ala απαιτείται για τη διασταυρωτή σύνδεση (cross-linking) της πεπτιδογλυκάνης και αποτελεί τη βάση για τη δράση των αντιβιοτικών β-

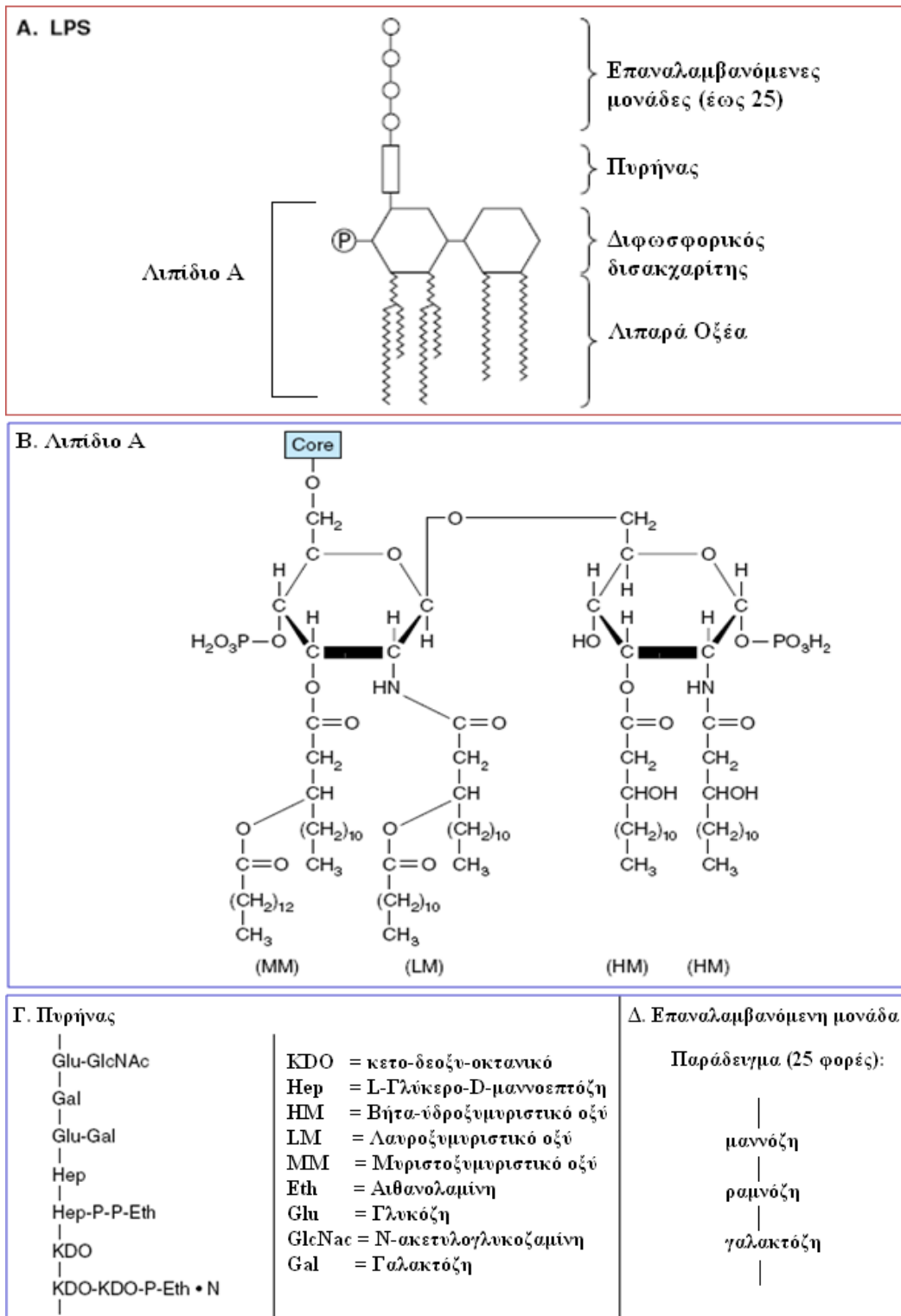
λακτάμης και βανκομυκίνης. **B.** Τρόποι συνδυασμού των μονάδων πεπτιδίων και γλυκάνης κατά το σχηματισμό του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης. (α) Χωρίς πρόσθετες γεφυρώσεις (στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια). (β) Με πρόσθετες γεφυρώσεις γλυκινών (στο θετικό κατά Gram βακτήριο *Staphylococcus aureus*).

Το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης συνδέεται ομοιοπολικά με την εξωτερική μεμβράνη μέσω των λιποπρωτεϊνών. Ο τρόπος σύνδεσης με την εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Παρόλα αυτά, το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης μπορεί να απομονωθεί ως ένας ενιαίος σάκος καθαρής πεπτιδογλυκάνης, που καλείται μуреϊνικός σάκος (murein saculus).

Η **εξωτερική μεμβράνη** συνίσταται από λιποπολυσακχαρίτες (ενδοτοξίνη ή **LPS**), φωσφολιπίδια (**PL**) και πρωτεΐνες. Οι λιποπολυσακχαρίτες βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα της μεμβράνης και αποτελούνται από τρεις περιοχές: το *λιπίδιο A*, τον *πυρήνα πολυσακχαρίτη* και τους επαναλαμβανόμενους ολιγοσακχαρίτες (*O-αντιγόνο*) (**Σχήμα 1.7**). Το *λιπίδιο A* είναι βασικό συστατικό της ενδοτοξίνης, και συνεπώς της βιωσιμότητας του βακτηρίου. Έχει ένα φωσφορυλιωμένο δισακχαρίτη γλυκοζαμίνης με λιπαρά οξέα προσαρτημένα στην εξωτερική μεμβράνη. Ο *πυρήνας πολυσακχαρίτη* είναι ένας διακλαδωμένος πολυσακχαρίτης που αποτελείται από 9-12 σάκχαρα. Διαδραματίζει, επίσης, ουσιαστικό ρόλο στη βιωσιμότητα του βακτηρίου και το μεγαλύτερο τμήμα του πυρήνα το καταλαμβάνει ένα ασυνήθιστο φωσφορυλιωμένο σάκχαρο, το 2-κετο-3-δεοξυ-οκτανικό (**KDO**). Το *O αντιγόνο* είναι προσαρτημένο στον πυρήνα και εκτείνεται μακριά από το βακτήριο. Είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από 50-100 επαναλαμβανόμενες μονάδες σακχαριδίου των 4 με 7 σακχάρων ανά μονάδα.

Η δομή του *λιπιδίου A* είναι πανομοιότυπη για συγγενικά βακτήρια και για όλα τα Gram αρνητικά εντεροβακτήρια, καθώς και η περιοχή του *πυρήνα* είναι ίδια για όλα τα είδη των βακτηρίων. Η δομή όμως, του *O αντιγόνου* του LPS είναι αυτή που διαχωρίζει τα στελέχη των διαφόρων ειδών των βακτηρίων. Η εξωτερική μεμβράνη λειτουργεί σαν ένα μερικώς μοριακό 'κόσκινο' που επιτρέπει να διεισδύσουν μόνο σχετικά μικρά μόρια. Η πρόσβαση επιτυγχάνεται μέσω ειδικών διαμεμβρανικών καναλιών που σχηματίζονται από τις πορίνες. Το μέγεθος των πορινών μπορεί να διαμορφωθεί ανάλογα έτσι ώστε να μπλοκάρεται η είσοδος βλαβερών χημικών ουσιών, ιδιότητα που τις καθιστά ένα καλό αμυντικό σύστημα των Gram-αρνητικών βακτηρίων απέναντι σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά.

Η περιοχή μεταξύ εξωτερικής και εσωτερικής κυτταρικής μεμβράνης καλείται **περιπλαστική περιοχή ή περίπλασμα**.

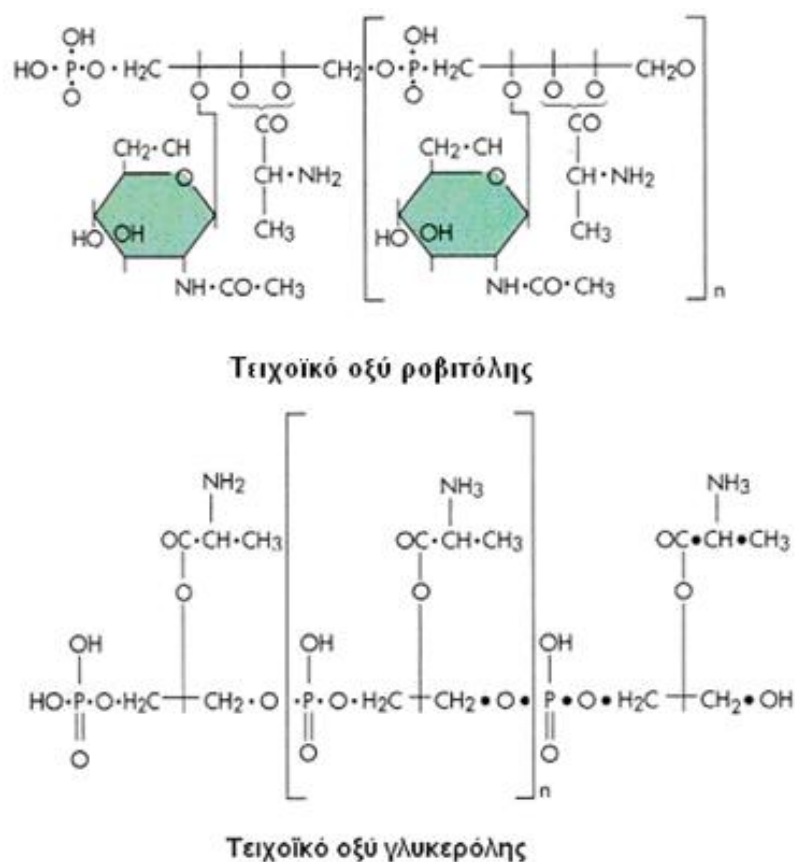


Σχήμα 1.7 : Δομή λιποπολυσακχαρίτη (LPS) του κυτταρικού φακέλου ενός Gram αρνητικού βακτηρίου. A, διευθέτηση του πολυμερικού τμήματος. B, δομή του λιπιδίου A του

Salmonella typhimurim. Γ, πυρήνας πολυσακχαρίτη. Δ, τυπική επαναλαμβανόμενη μονάδα (*S. typhimurim*).

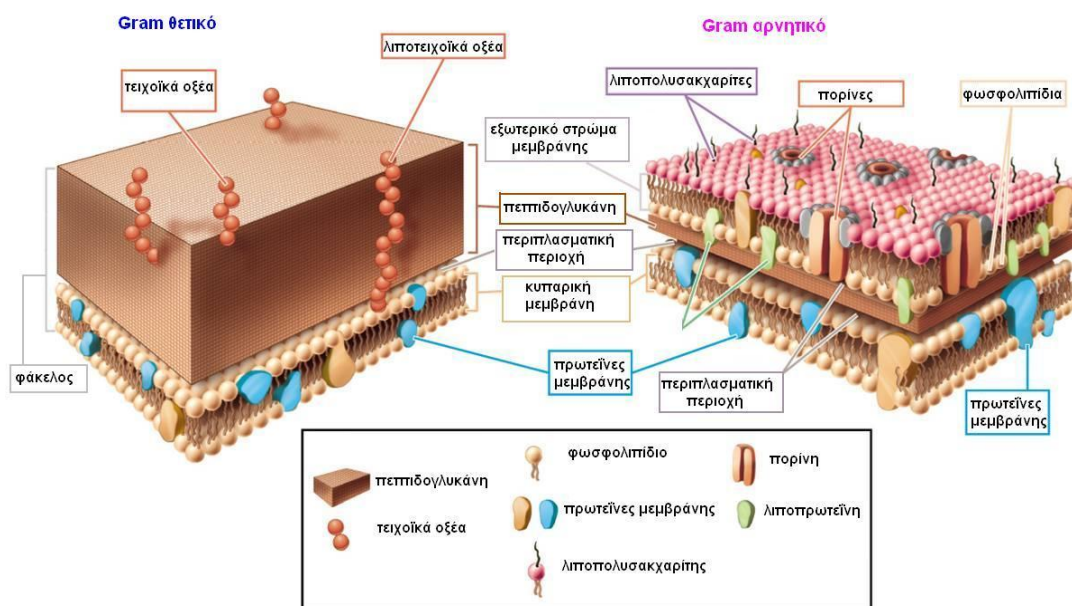
1.3. Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-θετικών βακτηρίων

Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-θετικών βακτηρίων διαφέρει σημαντικά από το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Σε αυτή την περίπτωση, το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται κυρίως από ένα παχύ, ομογενοποιημένο περίβλημα **πεπτιδογλυκάνης** (20 έως 80 nm), ενώ δε διαθέτει εξωτερική μεμβράνη, ούτε περιπλασμική περιοχή. Προσαρτημένοι σε αυτό το στρώμα είναι όξινοι πολυσακχαρίτες, που περιλαμβάνουν **τειχοϊκά** και **λιποτειχοϊκά οξέα** (Σχήμα 1.8). Τα **τειχοϊκά οξέα** είναι πολυμερή της ροβιτόλης ή γλυκερόλης και φωσφορικού άλατος, τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό της πεπτιδογλυκάνης. Τα **λιποτειχοϊκά οξέα** έχουν παρόμοια δομή, αλλά είναι προσκολλημένα στα λιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτά τα μόρια διατηρούν και μεγεθύνουν το κυτταρικό τοίχωμα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, ενώ παράλληλα συνεισφέρουν στο όξινο φορτίο που εμφανίζει η κυτταρική επιφάνεια.



Σχήμα 1.8 : Τειχοϊκά οξέα.

Στο **Σχήμα 1.9** παρουσιάζονται οι διαφορές στο κυτταρικό τοίχωμα των δύο τάξεων των βακτηρίων.



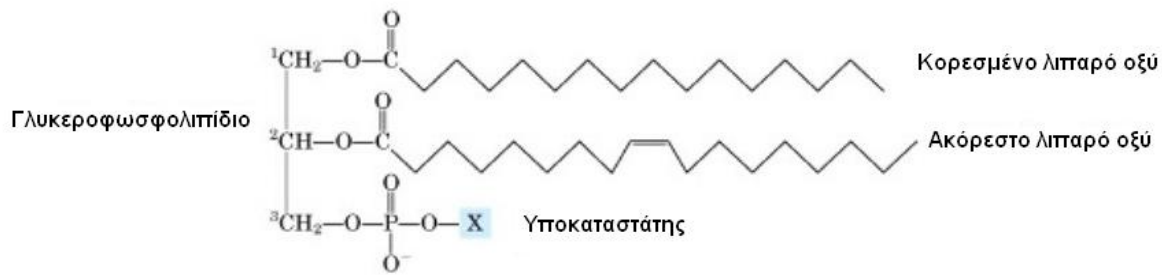
Σχήμα 1.9 : Διαφορές Gram-θετικού με Gram-αρνητικό κύτταρο.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημάνουμε ότι η κυτταρική μεμβράνη, η μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρόπλασμα, εμφανίζεται ίδια τόσο στα Gram-θετικά όσο και στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Ο S.J.Singer και C.K.Nicolson, έπειτα από μικροσκοπική και χημική ανάλυση πρότειναν για τη δομή της μεμβράνης τη θεωρία του μωσαϊκού μοντέλου. Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτή τη θεωρία, η μεμβράνη είναι μία διπλοστοιβάδα που σχηματίζεται από λιπίδια, προσανατολισμένα κατά τέτοιο τρόπο, ώστε οι πολικές τους κεφαλές να βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα της μεμβράνης, ενώ οι μη πολικές κεφαλές στο εσωτερικό τμήμα. Προσκολλημένες σε αρκετές θέσεις αυτής της διπλοστοιβάδας βρίσκονται σφαιρικές πρωτεΐνες διαφόρου μεγέθους. Κάποιες πρωτεΐνες είναι μόνο επιφανειακές, ενώ άλλες είναι διαμεμβρανικές. Η σύνθεση της εσωτερικής πλευράς της μεμβράνης μπορεί να είναι αρκετά διαφορετική από αυτή της εξωτερικής εξαιτίας των διαφορών στη θέση και το σχήμα των πρωτεϊνών.

Οι μεμβράνες είναι αρκετά ευμετάβλητες, δηλαδή αλλάζουν συνεχώς το σχήμα τους εξαιτίας της κινητικότητας της λιπιδικής τους φάσης και της ελεύθερης μετανάστευσης πολλών πρωτεϊνών. Αυτή η ρευστότητα που παρουσιάζει η μεμβράνη είναι βασική για λειτουργίες όπως η πρόσληψη της τροφής και η έκκριση από τα κύτταρα, ενώ η λιπιδική

φάση αποτελεί ένα αδιάβλητο φράγμα για πολλές ουσίες. Η ιδιότητα αυτή εξηγεί την εκλεκτική διαπερατότητα και την ικανότητα μεταφοράς μορίων, καθώς επίσης εξυπηρετεί το διαχωρισμό μέσα στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, οι πρωτεΐνες των μεμβρανών λειτουργούν ως υποδοχείς για τη δέσμευση και μεταφορά θρεπτικών υλικών και ως ένζυμα [4].

Μία τυπική βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη συνίσταται από λιπίδια (30%-40% της συνολικής μάζας) και πρωτεΐνες (60%-70%). Τα λιπίδια αυτά ταξινομούνται σε φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια. Τα φωσφολιπίδια και πιο συγκεκριμένα τα γλυκεροφωσφολιπίδια, καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της μεμβράνης σε σχέση με τα υπόλοιπα λιπίδια. Διαθέτουν ένα υδρόφοβο τμήμα που αποτελείται από δύο υδατανθρακικές αλυσίδες και ένα πολικό τμήμα, μια αλκοόλη εστεροποιημένη στο τρίτο ΟΗ του μορίου της γλυκερόλης μέσω μιας φωσφορο-ομάδας. Διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς την πολική κεφαλή, με πιο συνηθισμένα μόρια τη χολίνη, αιθανολαμίνη, σερίνη, γλυκερόλη και ινοσιτόλη (**Σχήμα 1.10**).



Όνομασία γλυκεροφωσfolιπίδιου	Όνομασία του X	Τύπος του X	Καθαρό φορτίο (pH=7)
Φωσφατιδικό οξύ	—	— H	-1
Φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη	Αιθανολαμίνη	— CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ ⁺	0
Φωσφατιδυλοχολίνη	Χολίνη	— CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃	0
Φωσφατιδυλοσερίνη	Σερίνη	— CH ₂ —CH—NH ₃ ⁺ COO ⁻	-1
Φωσφατιδυλογλυκερόλη	Γλυκερόλη	— CH ₂ —CH—CH ₂ —OH OH	-1
Φωσφατιδυλοϊνoσπολή-4,5 διφωσφορικό άλας	Ινoσπολή-4,5 διφωσφορικό άλας		-4
Καρδιολιπίνη	Φωσφατιδυλο-γλυκερόλη	— CH ₂ — CHOH CH ₂ —O—P(=O)(O ⁻)—O—CH ₂ — CH—O—C(=O)—R ¹ CH ₂ —O—C(=O)—R ²	-2

Σχήμα 1.10 : Συνήθη φωσfolιπίδια βακτηριακών μεμβρανών.

1.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

1.4.1 Θρεπτικά Μέσα

Η άνθιση της μικροβιολογίας πραγματοποιήθηκε πριν από 100 χρόνια με την ανάπτυξη τεχνικών για την καλλιέργεια μικροβίων σε καθαρή μορφή στο εργαστήριο, μακριά από το

φυσικό τους περιβάλλον. Για μια πετυχημένη όμως καλλιέργεια θα έπρεπε κάθε μικροοργανισμός να προμηθευτεί με όλα τα απαραίτητα θρεπτικά υλικά σε ένα τεχνητό μέσο. Παρόλο που οι θρεπτικές απαιτήσεις των μικροβίων ποικίλουν σε ανόργανα και οργανικά συστατικά, γενικά ένα μέσο ανάπτυξης θα πρέπει να περιέχει οξυγόνο (ή κάποιον άλλο δέκτη ηλεκτρονίων), νερό, πηγή αζώτου, πηγή άνθρακα, πηγή ενέργειας, μεταλλικά στοιχεία, βιταμίνες και ίχνη βιοχημικών ουσιών.

Πηγή άνθρακα για πολλά βακτήρια (ετερότροφα) αποτελούν οι οργανικές ενώσεις του άνθρακα και ιδιαίτερα οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊνικά οξέα. Άλλα πάλι βακτήρια που ζουν ελεύθερα στη φύση (αυτότροφα), μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας στα οργανικά συστατικά που χρειάζονται. Η γλυκόζη χρησιμοποιείται από πολλά βακτήρια και κυρίως από αυτά που δε μπορούν εύκολα να αποικοδομήσουν άλλους υδρογονάνθρακες. Κάποια βακτήρια χρησιμοποιούν το φως ως **πηγή ενέργειας**, ενώ κάποια άλλα οξειδώνουν το θείο. Τα βακτήρια επίσης απαιτούν **άζωτο** για να σχηματίσουν πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα. Ορισμένα από αυτά μπορούν να χρησιμοποιήσουν ελεύθερα μόρια αζώτου από την ατμόσφαιρα, κάποια άλλα ανόργανα μόρια αζώτου, όπως είναι τα νιτρικά άλατα και η αμμωνία, αλλά τα περισσότερα απαιτούν άζωτο σε οργανική μορφή π.χ αμινοξέα, πεπτίδια, πεπτόνες, ή πρωτεΐνες [5]. Επιπλέον το **κάλιο** είναι απαραίτητο στην πρωτεϊνική σύνθεση και στη μεμβρανική λειτουργία, το **νάτριο** είναι απαραίτητο σε μερικούς, αλλά όχι σε όλους τους οργανισμούς, ανάλογα με το ενδιαίτημά τους, ενώ το **ασβέστιο** αποτελεί σταθεροποιητή του κυτταρικού τοιχώματος και των ενδοσπορίων των βακτηρίων. Το **μαγνήσιο** είναι συστατικό της χλωροφύλλης και σταθεροποιητής των μεμβρανών και των ριβοσωμάτων, ενώ ο **σίδηρος** αποτελεί βασικό συστατικό των κυτοχρωμάτων της κυτταρικής αναπνοής. Τέλος, ο **φωσφόρος** είναι απαραίτητος στο κύτταρο για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και φωσφολιπιδίων, ενώ ο **ψευδάργυρος** είναι απαραίτητο στοιχείο για τη γενετική των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης παρουσιάζουν μία ποικιλία ως προς τη φυσική τους κατάσταση, τη χημική τους σύσταση και τον τύπο λειτουργίας τους. Ως προς τη φυσική τους κατάσταση τα κατατάσσουμε σε υγρά και σε στερεά. Ιδιαίτερης σημασίας είναι τα στερεά, γιατί παρέχουν μία σταθερή επιφάνεια στην οποία τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες. Ο πιο διαδομένος και αποτελεσματικός, στερεοποιητικός παράγοντας είναι το **άγαρ**, ένας πολύπλοκος πολυσακχαρίτης που έχει απομονωθεί από τα φύκη *Gelidium*. Το άγαρ είναι στερεό σε θερμοκρασία δωματίου και στις περισσότερες θερμοκρασίες επώασης των κυττάρων, ενώ λιώνει, υγροποιείται στο σημείο βρασμού του

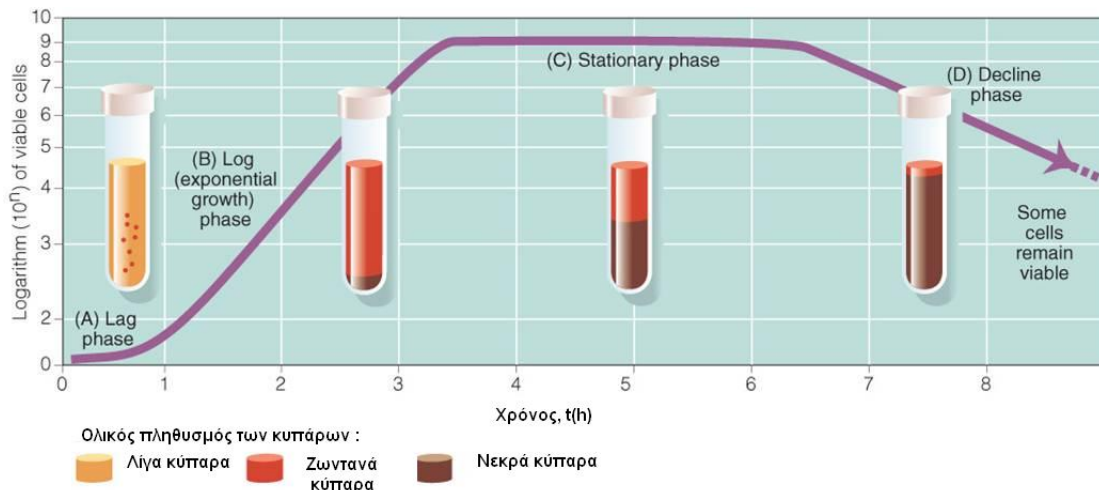
νερού (100°C). Παρέχει ένα κατάλληλο υπόστρωμα ανάπτυξης, καθώς συγκρατεί την υγρασία και τις θρεπτικές ουσίες.

1.4.2 Κύκλος Ζωής Βακτηρίων

Η ανάπτυξη των βακτηρίων αποτελεί μια μεθοδική αύξηση της ποσότητας των κυτταρικών συστατικών. Βασίζεται στην ικανότητα του κυττάρου να σχηματίζει καινούργιο πρωτόπλασμα από τα θρεπτικά μέσα που είναι διαθέσιμα στο περιβάλλον. Στα περισσότερα βακτήρια, ο όρος ανάπτυξη περιλαμβάνει αύξηση στην κυτταρική μάζα και στον αριθμό των ριβοσωμάτων, διπλασιασμό των βακτηριακών χρωμοσωμάτων, σύνθεση νέου κυτταρικού τοιχώματος και κυτταροπλασματικής μεμβράνης, διαχωρισμό των δύο χρωμοσωμάτων, σχηματισμό διαφράγματος και τελικώς κυτταρική διαίρεση. Αυτή η αγενής διαδικασία αναπαραγωγής ονομάζεται **διχοτόμηση (binary fission) (Σχήμα 1.12)**.

Στο χώρο του εργαστηρίου, κάτω από ιδανικές συνθήκες, ο υπό ανάπτυξη βακτηριακός πληθυσμός διπλασιάζεται σε τακτά διαστήματα με γεωμετρική πρόοδο: 1, 2, 4, 8, κτλ. ή $2^0, 2^1, 2^2, 2^3, \dots, 2^n$ (όπου $n =$ ο αριθμός των γενεών). Αυτό ονομάζεται **εκθετική ανάπτυξη**. Στην πραγματικότητα, η εκθετική ανάπτυξη είναι ένα μέρος μόνο του κύκλου ζωής των βακτηρίων και όχι αντιπροσωπευτικό δείγμα της ανάπτυξης των βακτηρίων που διαδραματίζεται στη φύση.

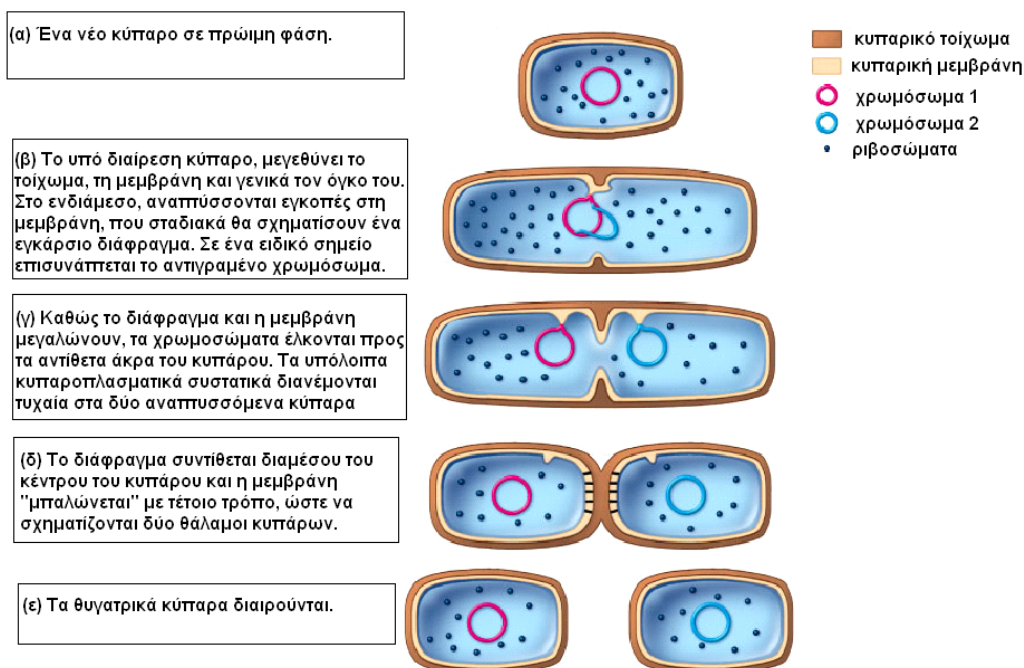
Όταν ένα φρέσκο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης εμβολιαστεί με έναν αριθμό κυττάρων, και η ανάπτυξη του πληθυσμού παρακολουθείται για ένα χρονικό διάστημα, η γραφική παράσταση των δεδομένων θα αποδώσει την καμπύλη τυπικής βακτηριακής ανάπτυξης (**Σχήμα 1.11**) [6]. Σε ένα κλειστό σύστημα, π.χ. σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, τα κύτταρα εμφανίζουν σχεδόν πάντα την ίδια συμπεριφορά: αρχικά προσαρμόζονται στο νέο θρεπτικό μέσο (lag phase), έως ότου μπορέσουν να διαιρεθούν με τη διαδικασία της διχοτόμησης (exponential growth). Όταν αρχίσει να περιορίζεται η ανάπτυξη, τα κύτταρα σταματάνε να διαιρούνται (stationary phase), όπου σταδιακά εμφανίζουν απώλεια βιωσιμότητας (death phase).



Σχήμα 1.11 : Καμπύλη τυπικής βακτηριακής ανάπτυξης.

➤ **Λανθάνουσα Φάση ή φάση υστέρησης (lag phase).** Είναι η πρώτη φάση, η οποία παρατηρείται όταν φρέσκα κύτταρα εμβολιάζονται σε ένα καινούργιο μέσο ανάπτυξης. Σε αυτή τη φάση ο αριθμός των κυττάρων δεν αυξάνεται, αλλά παρόλα αυτά μεταβολίζονται ενεργά, έτσι ώστε να προετοιμαστούν για την κυτταρική διαίρεση. Η **λανθάνουσα** φάση ανάλογα με το μέσο ανάπτυξης μπορεί να είναι είτε σύντομη, είτε αρκετά χρονοβόρα. Για παράδειγμα, αν το μέσο ανάπτυξης στο οποίο έχει εμβολιαστεί μία καλλιέργεια δεν καλύπτει τις θρεπτικές απαιτήσεις της, τότε τα κύτταρα θα πρέπει να συνθέσουν από μόνα τους τα αμινοξέα και τις βιταμίνες που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους και η **λανθάνουσα** φάση θα διαρκέσει περισσότερο. Στην αντίθετη περίπτωση που τα κύτταρα απλώς αραιώνονται στο ίδιο μέσο ανάπτυξης, η φάση αυτή δεν υπάρχει ουσιαστικά, καθώς δεν πραγματοποιείται καμιά αλλαγή στον μεταβολισμό τους.

➤ **Εκθετική φάση (exponential phase).** Μόλις τα κύτταρα μεταβολιστούν, αρχίζει η αντιγραφή του DNA και μετά από λίγο διαιρούνται. Αυτό σηματοδοτεί την αρχή της δεύτερης φάσης που ονομάζεται **εκθετική φάση**. Κατά τη διάρκειά της, τα κύτταρα μεγαλώνουν γρήγορα και διπλασιάζονται με σταθερό ρυθμό με τη διαδικασία της διχοτόμησης (binary fission) (**Σχήμα 1.12**). Ο ρυθμός της εκθετικής ανάπτυξης μιας μικροβιακής καλλιέργειας εκφράζεται ως χρόνος γενεάς (**generation time, G**) ή χρόνος διπλασιασμού (**doubling time**), όπου $G = t/n$ και $n =$ ο αριθμός των γενεών.



Σχήμα 1.12 : Στάδια κυτταρικής διχοτόμησης (**binary fission**).

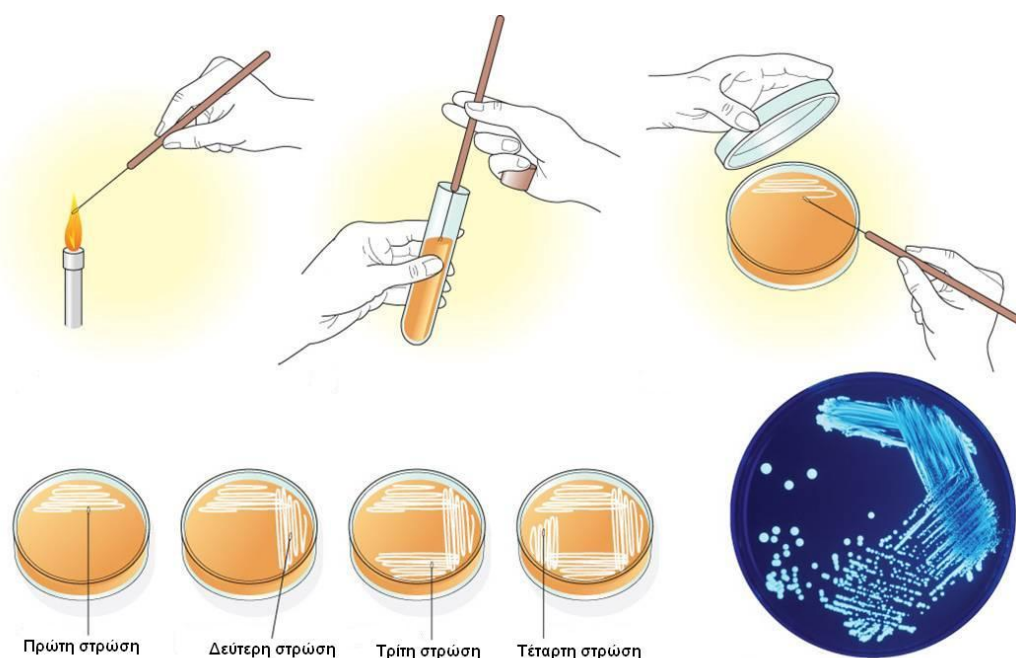
➤ **Στατική φάση (stationary phase).** Είναι η τρίτη φάση στην ανάπτυξη των κυττάρων κατά την οποία ο μεταβολισμός πραγματοποιείται με αργό ρυθμό και τα κύτταρα σταματούν να διαιρούνται. Παρόλα αυτά, είναι ακόμη ζωντανά και διατηρούν μία μικρή δραστηριότητα μεταβολισμού. Τα κύτταρα εισέρχονται στη **στατική φάση** όταν το περιβάλλον τους αλλάζει, δηλαδή όταν τα θρεπτικά τους υλικά αρχίζουν να ελαττώνονται και τα παραπροϊόντα συσσωρεύονται, λόγω αύξησης της κυτταρικής πυκνότητας. Αν τα κύτταρα αυτά αραιωθούν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο, είναι ικανά να ξαναρχίσουν την εκθετική τους ανάπτυξη (exponential phase). Σε ένα κλειστό κύκλωμα όμως, η ανάπτυξη είναι περιορισμένη λόγω της εξάντλησης των διαθέσιμων θρεπτικών μέσων, της συσσώρευσης ανασταλτικών μεταβολιτών και τέλος λόγω έλλειψης «βιολογικού χώρου».

➤ **Φάση θανάτου (death phase).** Είναι η τελική φάση του κύκλου ανάπτυξης. Σε αυτό το σημείο, τα κύτταρα χάνουν την ικανότητά τους να διαιρούνται, ακόμα και αν μεταφερθούν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Και αυτή η φάση είναι εκθετική, με συνέπεια τα κύτταρα να «θανατώνονται» γρήγορα και μέσα σε ώρες η καλλιέργεια να μην διαθέτει κανένα «ζωντανό» κύτταρο. Όλες οι φάσεις μπορούν να διαρκέσουν αρκετή ώρα, εάν ελαττώσουμε τη θερμοκρασία. Έτσι, για να επιτύχουμε τη μέγιστη βιωσιμότητα των κυττάρων είναι σκόπιμο να σταματάμε τις βακτηριακές καλλιέργειες αρκετά νωρίς, πριν ακόμα εισέλθουν στη

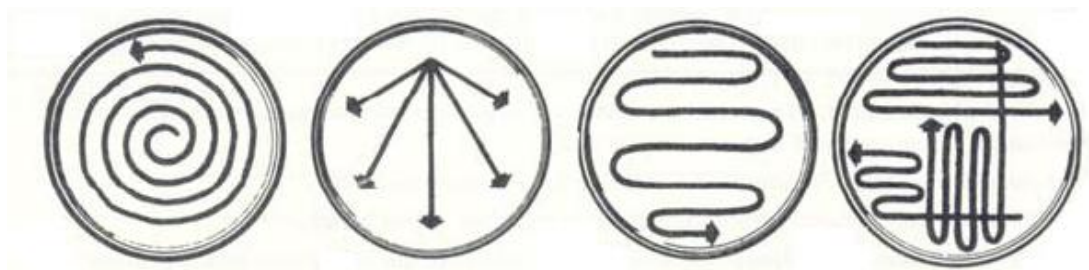
στατική φάση (μέσο εκθετικής ανάπτυξης). Στην αντίθετη περίπτωση, απλώς, επιταχύνουμε τον κυτταρικό θάνατο. Τα περισσότερα νεκρά κύτταρα δεν ξεχωρίζουν από τα ενεργά, οπότε η εμφάνιση μιας υγρής καλλιέργειας ή μιας αποικίας δεν αποτελεί ένδειξη της βιωσιμότητάς τους.

1.4.3 Τεχνικές Διασποράς Μικροοργανισμών στην Επιφάνεια Στερεού Υποστρώματος

Προκειμένου να μελετηθούν οι μικροοργανισμοί ή να απομονωθούν από πληθώρα άλλων, πολλές φορές είναι αναγκαία η ανάπτυξή τους με τη μορφή αποικιών στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος.



Σχήμα 1.13 : Τρόπος διασποράς μικροοργανισμών στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος.



Σχήμα 1.14 : Απεικόνιση διαφορετικών μορφών διασποράς μικροοργανισμών στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος.

1.4.4 Μέθοδοι Μέτρησης της Ανάπτυξης των Βακτηρίων

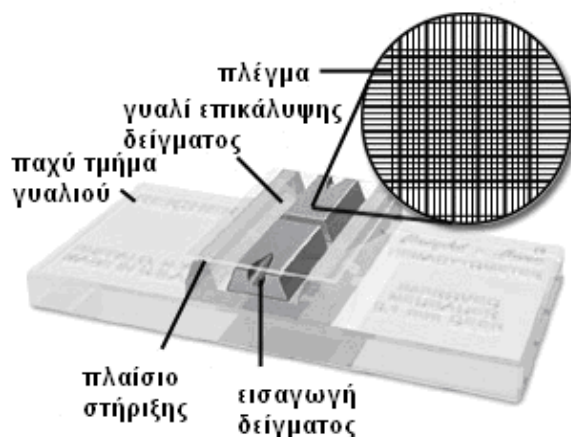
Για μονοκύτταρους οργανισμούς, όπως είναι τα βακτήρια, η ανάπτυξη μπορεί να μετρηθεί με δύο τρόπους: είτε με αλλαγές στην κυτταρική μάζα, είτε με αλλαγές στον αριθμό των κυττάρων.

Μέθοδοι μέτρησης της κυτταρικής μάζας. Περιλαμβάνουν και άμεσες και έμμεσες τεχνικές.

1. Άμεση **φυσική μέθοδο μέτρησης** του ξηρού ή υγρού βάρους ή του όγκου των κυττάρων μετά από φυγοκέντρηση.
2. Άμεση **χημική μέθοδο μέτρησης** των χημικών συστατικών των κυττάρων, όπως είναι το ολικό άζωτο, ολική πρωτεΐνη, ή το ολικό ποσοστό του DNA.
3. Έμμεση **μέθοδος μέτρησης της χημικής δραστηριότητας**, δηλαδή του ρυθμού παραγωγής ή κατανάλωσης του οξυγόνου O₂ ή του διοξειδίου του άνθρακα CO₂ κτλ.
4. **Μετρήσεις θολερότητας.** Τα βακτήρια διασκορπίζουν το φως αναλογικά με τον αριθμό τους. Η θολερότητα ή **οπτική πυκνότητα** ενός αιωρήματος κυττάρων είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη μάζα ή τον αριθμό των κυττάρων. Αυτή η μέθοδος είναι απλή, αλλά παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία, περίπου 10⁷ κύτταρα ανά ml.

Μέθοδοι μέτρησης του αριθμού των κυττάρων. Περιλαμβάνουν άμεσες τεχνικές μέτρησης, οπτικά ή με τη βοήθεια οργάνων, και έμμεσες τεχνικές μέτρησης βιώσιμων κυττάρων.

1. **Άμεσες μικροσκοπικές μετρήσεις** μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη βοήθεια ειδικών πλακιδίων, που ονομάζονται θάλαμοι μέτρησης (**counting chambers**) (**Σχήμα 1.14**). Τα νεκρά κύτταρα δεν μπορούν να διαχωριστούν από τα ζωντανά. Μόνο πυκνά αιωρήματα (>10⁷ ανά ml) μετρούνται, αλλά τα προς ανάλυση δείγματα μπορούν να συμπυκνωθούν με φυγοκέντρηση ή διήθηση, ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία. Μία παραλλαγή της μεθόδου έχει χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί και μετρηθεί η ανάπτυξη των βακτηρίων σε φυσικό περιβάλλον. Έτσι, για να ανιχνευθεί και αποδειχθεί ότι θερμοφιλα βακτήρια αναπτύσσονται σε θερμές πηγές, ο T.D Brock βύθισε μικροσκοπικά πλακίδια, όπου τα απέσυρε περιοδικά για μικροσκοπική παρατήρηση. Τα βακτήρια στο ζεστό νερό προσκολλήθηκαν στα γυάλινα πλακίδια και αναπτύχθηκαν στην επιφάνεια μικροαποικίες.

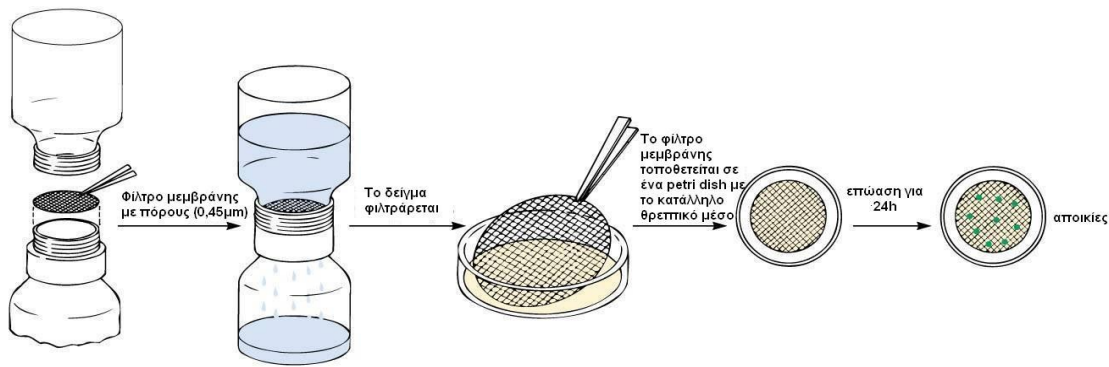


Σχήμα 1.14 : Πλακίδια μέτρησης κυττάρων (**counting chambers**).

2. **Ηλεκτρονικοί θάλαμοι μέτρησης (electronic counting chambers)** υπολογίζουν τον αριθμό των κυττάρων και μετρούν το μέγεθος της κατανομής τους. Κυρίως χρησιμοποιούνται για να μετρήσουν ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως είναι τα ερυθροκύτταρα.

3. **Μέθοδος μέτρησης τρυβλίου (plate count method)**, επιτρέπει τον προσδιορισμό των κυττάρων που θα πολλαπλασιαστούν κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Συγκεκριμένη ποσότητα αιωρήματος βακτηρίου τοποθετείται σε ένα τρυβλίο (Petri dish), στο οποίο το άγαρ διατηρείται σε υγρή μορφή στους 45 °C. Το τρυβλίο περιστρέφεται καθώς το άγαρ στερεοποιείται, εγκλωβίζοντας τους οργανισμούς στην πηκτή. Κάθε οργανισμός αναπαράγεται μόνος του μέχρις ότου αναπτυχθούν αποικίες, ο αριθμός των οποίων παρέχει τον βιώσιμο μικροβιακό πληθυσμό του εμβολιασμού. Το αρχικό δείγμα αραιώνεται, ώστε ο αριθμός των αποικιών που θα αναπτυχθούν στο τρυβλίο να κυμαίνεται στο 30-300 (μέσα σε αυτό το εύρος η μέτρηση είναι ακριβής).

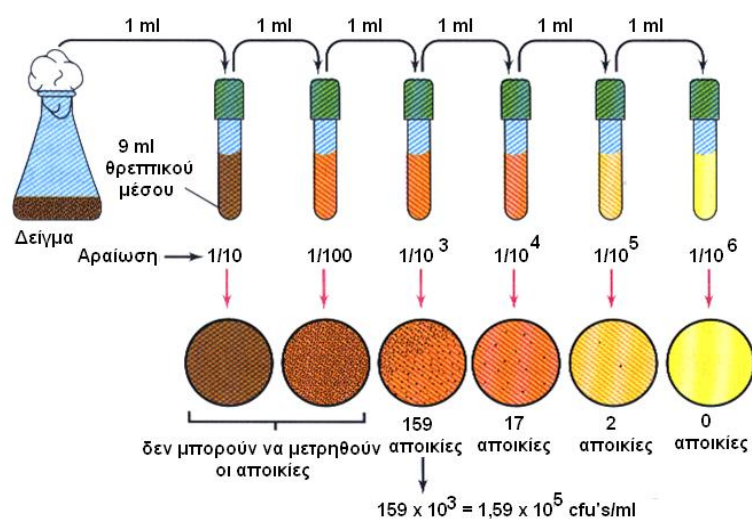
4. **Μέθοδος μέτρησης με φίλτρα μεμβρανών (membrane filters count)**, μια παραλλαγή της plate count τεχνικής. Χρησιμοποιείται για να υπολογίσουμε τον αριθμό των βακτηρίων σε μεγάλα δείγματα, που έχουν όμως μικρό αριθμό βιώσιμων κυττάρων. Βασίζεται στη διήθηση του δείγματος με φίλτρο μεμβράνης που συγκρατεί στους πόρους του τα βακτήρια. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετείται σε ένα τρυβλίο ανάπτυξης που περιέχει το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και ειδικές βαφές για ευκολότερη ανίχνευση των οργανισμών. Ακολουθεί επώαση και οι αποικίες των βακτηρίων εμφανίζονται στη μεμβράνη.



5. Έμμεση μέθοδος μέτρησης βιώσιμων κυττάρων (plate count). Προϋποθέτει την αραίωση του δείγματος καλλιέργειας ή του εναιωρήματος κυττάρων σε έναν μη τοξικό διαλύτη και τον εμβολιασμό του σε μια θρεπτική επιφάνεια από άγαρ. Στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο, κάθε ζωντανό, βιώσιμο κύτταρο/μονάδα αναπτύσσεται και σχηματίζει αποικία. Κάθε αποικία που μπορεί να μετρηθεί, ονομάζεται **μονάδα σχηματισμού αποικίας (colony forming unit, cfu)** και ο αριθμός των cfu's σχετίζεται με τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων στο δείγμα.

Πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η ευαισθησία (θεωρητικά μπορεί να ανιχνευθεί ένα μόνο κύτταρο), η διερεύνηση, και η ταυτοποίηση του οργανισμού που μετρείται. Τα μειονεκτήματα είναι:

- (1) μόνο ζωντανά κύτταρα σχηματίζουν τις αποικίες που προσμετρούνται,
- (2) οι αλυσίδες ή τα συσσωρεύματα των κυττάρων παρέχουν μία μόνο αποικία,
- (3) αποικίες σχηματίζουν μόνο οι οργανισμοί που βρίσκονται στις κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης.



Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να μετρηθεί η βακτηριακή ανάπτυξη.

Πίνακας 1. Μέθοδοι μέτρησης της ανάπτυξης των βακτηρίων.

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΕΦΑΡΜΟΓΗ	ΣΧΟΛΙΑ
Άμεση μικροσκοπική μέτρηση	Απαρίθμηση των βακτηρίων σε γάλα ή κυτταρικά εμβόλια	Δεν γίνεται διαχωρισμός των ζωντανών από τα μη-ζωντανά κύτταρα
Μετρήσεις ζωντανών κυττάρων (μετρήσεις αποικιών)	Απαρίθμηση των βακτηρίων σε γάλα, τρόφιμα, νερό, καλλιέργειες εργαστηρίου, κτλ.	Πολύ ευαίσθητη αν οι συνθήκες εμβολιασμού είναι κατάλληλες
Μετρήσεις Θολερότητας	Εκτίμηση μεγάλου αριθμού βακτηρίων σε υγρά μέσα και ζωμούς	Γρήγορη και μη καταστροφική, αλλά δεν μπορεί να ανιχνεύσει κυτταρική πυκνότητα $< 10^7$ κύτταρα ανά ml
Μετρήσεις τρυβλίου	Απαρίθμηση των βακτηρίων σε γάλα, νερό, τρόφιμα, έδαφος και καλλιέργειες κτλ	Μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά ml
Φίλτρα μεμβρανών	Ομοίως με μετρήσεις τρυβλίου	Ομοίως με μετρήσεις τρυβλίου
Μετρήσεις ολικού N ή πρωτεΐνης	Μέτρηση όλων των κυττάρων που προέρχονται από πολύ πυκνές καλλιέργειες	Πρακτική εφαρμογή σε ερευνητικό εργαστήριο
Μετρήσεις βιοχημικής δραστηριότητας	Μικροβιολογικοί προσδιορισμοί	Απαιτεί συσχέτισμό της χημικής δραστηριότητας με τον αριθμό των κυττάρων και ή την κυτταρική μάζα
Μετρήσεις του «ξηρού» ή «υγρού» βάρους ή όγκου των κυττάρων μετά από φυγοκέντρηση	Μέτρηση όλων των κυττάρων που προέρχονται από καλλιέργειες	Πιθανόν πιο ευαίσθητη από μετρήσεις ολικού N ή πρωτεΐνης

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο. ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**



2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία 60 χρόνια, τα αντιβιοτικά διαδραμάτισαν αποφασιστικό ρόλο στη μάχη εναντίον μολυσματικών ασθενειών που προκλήθηκαν από βακτήρια και άλλα μικρόβια. Η αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία οδήγησε στη δραματική αύξηση του μέσου όρου ζωής τον εικοστό αιώνα. Παρόλα αυτά, μικρόβια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά έχουν κάνει την εμφάνιση τους και αποτελούν ένα ολοένα αυξανόμενο δημόσιο πρόβλημα υγείας.

Λοιμώξεις, όπως η βλεννόρροια, η πνευμονία, η σηψαιμία και η παιδική ωτίτιδα είναι μερικές από τις ασθένειες που δύσκολα μπορούν να θεραπευτούν με τη χρήση αντιβιοτικών. Ένα μέρος του προβλήματος είναι ότι τα βακτήρια και άλλα μικρόβια είναι αρκετά ανθεκτικά και έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντίστασης στα **αντιβιοτικά** (χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και σε μορφή διαλύματος αναστέλλουν την ανάπτυξη ή ακόμα καταστρέφουν άλλους μικροοργανισμούς) και σε άλλους **αντιμικροβιακούς παράγοντες** (οποιοσδήποτε ουσίες εναντίον της ζωής των μικροοργανισμών). Ένα άλλο μέρος του προβλήματος, είναι η συνεχώς αυξανόμενη χρήση και, πολλές φορές η κατάχρηση των υπάρχοντων αντιβιοτικών στον άνθρωπο, στην κτηνιατρική και στη γεωργία.

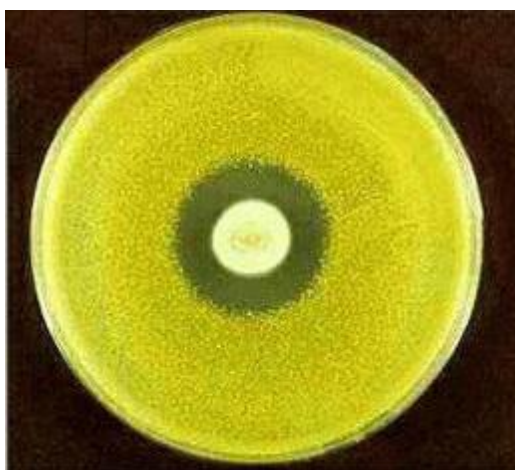
Το 1998, μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, 80 εκατομμύρια συνταγές για αντιβιοτικά συμπληρώθηκαν για ανθρώπινη χρήση, ενώ το 60% της παραγωγής των αντιβιοτικών χρησιμοποιούνται στη γεωργία. Αυτό ισοδυναμεί με 30.500 τόνους σε ένα χρόνο.

Σήμερα, το 70% των βακτηρίων που προκαλούν λοιμώξεις στα νοσοκομεία είναι ανθεκτικά σε τουλάχιστον ένα από τα πιο κοινά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για θεραπεία. Ορισμένοι οργανισμοί είναι ανθεκτικοί σε όλα τα εγκεκριμένα αντιβιοτικά και η μόνη αγωγή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι με πειραματικά και ενδεχομένως τοξικά φάρμακα. Έχει καταγραφεί μια ανησυχητική αύξηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων, κυρίως στο σταφυλόκοκκο και πνευμονόκοκκο, τους δύο επικρατέστερους λόγους ασθενειών και θνησιμότητας. Σε μια πρόσφατη έρευνα, το 25% των περιπτώσεων των βακτηρίων της πνευμονίας ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη, ενώ ένα επιπλέον 25% των περιπτώσεων ήταν ανθεκτικά σε περισσότερα από ένα αντιβιοτικά.

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων, καθώς και οικονομικά κίνητρα, καθιστούν επιτακτική την ανάγκη για ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών. Αν δεν περιοριστούν τα προβλήματα της αντίστασης, ασθένειες εύκολα ιάσιμες δε θα μπορούν να θεραπευτούν, όπως στην εποχή πριν αναπτυχθούν τα αντιβιοτικά.

2.2 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ Η ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Το πρώτο αντιβιοτικό, η πενικιλίνη, ανακαλύφθηκε από τον Sir Alexander Fleming το 1929, ο οποίος παρατήρησε αναστολή της ανάπτυξης του σταφυλόκοκκου σε τρυβλίο με άγαρ, όταν επιμολύνθηκε με μύκητα πενικιλίνης. Ο Fleming ονόμασε την ενεργή ουσία πενικιλίνη, αλλά δεν μπόρεσε να την απομονώσει.



Σχήμα 2.1 : Στο κέντρο του τρυβλίου βρίσκεται μια αποικία του μύκητα *Penicillium notatum*. Μετά την εμφάνιση της αποικίας, εμβολιάζεται στο τρυβλίο μια βακτηριακή καλλιέργεια του *Micrococcus luteus*, που σχηματίζει μια κίτρινη επίστρωση ανάπτυξης. Μια ζώνη αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης περιβάλλει την αποικία του μύκητα, όπου η πενικιλίνη έχει διαχυθεί στο μέσο.

Πολλά χρόνια αργότερα, το 1939, ο Chain και Florey, ανέπτυξαν μια μέθοδο απομόνωσης της πενικιλίνης που τη χρησιμοποίησαν για να θεραπεύουν βακτηριακές λοιμώξεις κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου. Το νέο φάρμακο χρησιμοποιήθηκε κλινικά το 1946 και είχε μεγάλο αντίκτυπο στη δημόσια υγεία. Για αυτές τις ανακαλύψεις απονεμήθηκε το βραβείο Nobel στους Fleming, Chain και Florey το 1945. Η ανακάλυψή τους επέφερε επανάσταση στη σύγχρονη ιατρική και έστρωσε το δρόμο για την ανάπτυξη πολλών νέων φυσικών αντιβιοτικών.

Κατά τη διάρκεια που ο Fleming ερευνούσε την πενικιλίνη, ένας γερμανός γιατρός, ο Gerhard Domagk, ανακοίνωσε την ανακάλυψη ενός συνθετικού μορίου με αντιβακτηριακές

ιδιότητες. Το ονόμασε Prontosil, και αποτέλεσε το πρώτο συνθετικό αντιβιοτικό της σειράς των σουλφοναμιδίων ή σουλφανιλαμιδίων. Το Prontosil χρησιμοποιήθηκε το 1930, για την καταπολέμηση λοιμώξεων της ουροδόχου κύστης, της πνευμονίας και άλλων περιστατικών. Τα συνθετικά σουλφανιλαμίδια, αν και δεν είναι τόσο αποτελεσματικά όσο τα φυσικά αντιβιοτικά, είναι ευρέως διαδεδομένα. Ο Gerhard Domagk, για την ανακάλυψη του Prontosil, τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1939.

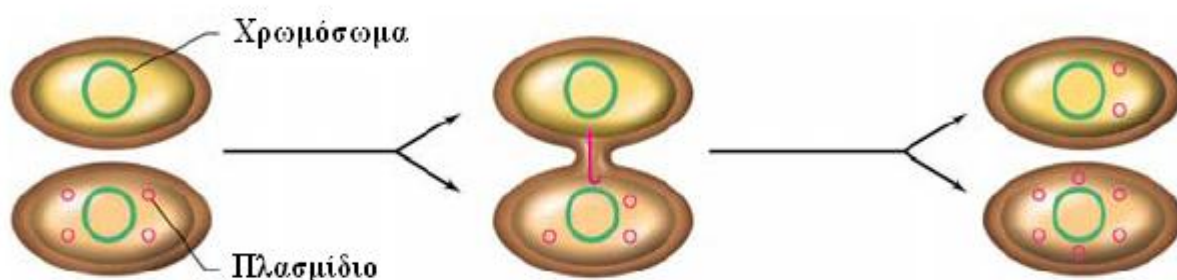
Το 1946, η πενικιλίνη αποτέλεσε το μόνο αποτελεσματικό αντιβιοτικό για την αντιμετώπιση όλων των ειδών των λοιμώξεων που μπορούν να προκληθούν από τα Gram θετικά βακτήρια, το σταφυλόκοκκο και το στρεπτόκοκκο (π.χ. πνευμονία, φαρυγγίτιδα, οστρακιά, σηψαιμία, δερματικές μολύνσεις, κτλ). Στα τέλη της δεκαετίας του 1940, νέα αντιβιοτικά εμφανίστηκαν όπως η στρεπτομυκίνη, η χλωραμφαινικόλη και η τετρακυκλίνη, ενώ ξεκίνησε η εποχή της χημειοθεραπείας. Τα αντιβιοτικά αυτά ήταν δραστικά για μια μεγάλη ομάδα παθογόνων, Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, για ενδοκυτταρικά παράσιτα, καθώς και για το βακτήριο της φυματίωσης. Επίσης, συνθετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες, όπως τα σουλφοναμίδια και τα φάρμακα κατά της φυματίωσης (π.χ. παρα-αμινοσαλικυλικό οξύ, «PAS») είχαν εκτεταμένη χρήση.

2.2.1 Τα πρώτα σημάδια της αντίστασης στα αντιβιοτικά

Πιθανότατα στη φύση υπάρχει ένα γονιδιακό απόθεμα τόσο για την παραγωγή των αντιβιοτικών όσο και για την αντίσταση σε αυτά, καθώς τα περισσότερα μικρόβια-παραγωγοί αντιβιοτικών είναι ανθεκτικά στο δικό τους αντιβιοτικό. Με μια μικρή ανασκόπηση στο παρελθόν διαπιστώνουμε ότι κάποια στελέχη σταφυλόκοκκου εμφάνισαν αντίσταση στην πενικιλίνη σχεδόν αμέσως μετά την παραγωγή του φαρμάκου το 1946. Παρομοίως, σημειώθηκε αντίσταση στη στρεπτομυκίνη, χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη. Το 1953, απομονώθηκε στην Ιαπωνία ένα πολυανθεκτικό στέλεχος βακτηριακής δυσεντερίας (*Shigella dysenteriae*), το οποίο εμφάνιζε αντίσταση στη χλωραμφαινικόλη, τετρακυκλίνη, στρεπτομυκίνη και στα σουλφοναμίδια. Με το πέρασμα των χρόνων και μέχρι σήμερα, σχεδόν κάθε γνωστό παθογόνο βακτήριο έχει αναπτύξει αντίσταση σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά κλινικής χρήσης.

Μελέτες έδειξαν ότι τα βακτήρια μπορούν να μεταφέρουν τα γονίδια ανθεκτικότητάς τους στα αντιβιοτικά σε διαφορετικά στελέχη, ή ακόμη και σε διαφορετικά είδη. Παραδείγματος χάριν, τα γονίδια ανθεκτικότητας των αντιβιοτικών του σταφυλόκοκκου

μεταφέρονται με τη βοήθεια των πλασμιδίων στο στρεπτόκοκκο και εντερόκοκκο σχηματίζοντας νέους συνδυασμούς γονιδίων. Η διαδικασία αυτή μεταφοράς γονιδίων μεταξύ βακτηριακών στελεχών ονομάζεται **οριζόντια γονιδιακή μεταφορά- *horizontal gene transmission (HGT)***, η οποία γίνεται με το μηχανισμό της σύζευξης [1].

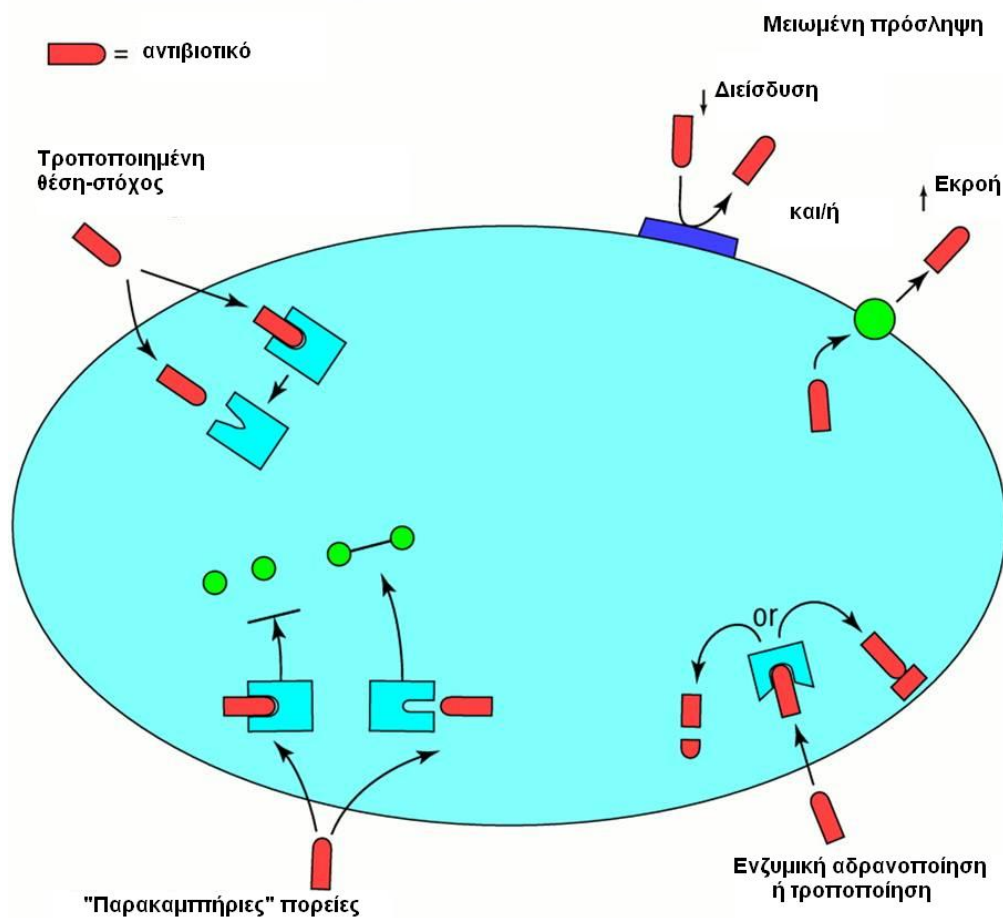


Σχήμα 2.2 : Διακυτταρική μεταφορά πλασμιδίων κατά τη σύζευξη.

2.2.2 Μηχανισμοί αντίστασης των βακτηρίων στα κοινά αντιβιοτικά

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς άμυνας, ώστε να μην επηρεάζονται από την επίδραση των αντιβιοτικών. Σύμφωνα με αυτούς τους μηχανισμούς, το αντιβιοτικό μπορεί να μετατραπεί χημικά σε μη-ενεργή ουσία και να απομακρυνθεί από το κύτταρο ή να τροποποιηθεί η θέση-στόχος (target site) και να μην αναγνωριστεί από το αντιβιοτικό.

Ο πιο κοινός τρόπος αντίστασης των βακτηρίων είναι η **ενζυμική αδρανοποίηση** του αντιβιοτικού. Ένα προϋπάρχον κυτταρικό ένζυμο διαφοροποιείται, αλληλεπιδρά με το αντιβιοτικό και τελικώς το καθιστά ανίκανο να επηρεάσει το μικροοργανισμό. Μια εναλλακτική στρατηγική που χρησιμοποιείται από πολλά βακτήρια είναι η **διαφοροποίηση του στόχου – μορίου** του αντιβιοτικού. Είναι εφικτό να τροποποιηθεί δομικά η θέση που στοχεύει το φάρμακο, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προσδεθεί στο κύτταρο και να χάσει την αντιβακτηριακή του ιδιότητα. Επίσης, τα βακτήρια χρησιμοποιούν έναν ενεργειακά-εξαρτώμενο μηχανισμό για να αποβάλλουν μεταβολίτες και άγνωστες τοξικές ενώσεις, συμπεριλαμβάνοντας και τα φάρμακα. Ο μηχανισμός αυτός αποτελείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, γνωστές ως **αντλίες εκροής (efflux pump)** (Σχήμα 2.2) [2].



Σχήμα 2.3 : Αναπαράσταση των μηχανισμών αντίστασης των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

2.3 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

Ένας από τους λόγους που η ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά έχει διαδοθεί τόσο πολύ είναι η ανεξέλεγκτη χρήση τους στις τροφές ζώων ως προληπτικά μέτρα κατά των μολύνσεων, καθώς και ως ενισχυτικά ανάπτυξης. Η αυξανόμενη αντίσταση λοιπόν, καθιστά επιτακτική την ανάγκη για ανάπτυξη νέων μορίων, νέων ιατρικών τεχνικών και διαγνωστικών εργαλείων σε μία προσπάθεια επίλυσης του προβλήματος. Τέτοιους θεραπευτικούς παράγοντες αποτελούν τα αντιμικροβιακά πεπτίδια. Παράγονται κυρίως στους πιο εκτεθειμένους ιστούς των ζώων (π.χ δέρμα, μάτια και πνεύμονες) που είναι πιο πιθανό να έρθουν σε επαφή με μικροοργανισμούς. Σε ανώτερους οργανισμούς παράγονται κυρίως σε επιθηλιακές επιφάνειες και στα φαγοκύτταρα. Συντίθενται γρήγορα με χαμηλό ενεργειακό κόστος, αποθηκεύονται εύκολα σε μεγάλες ποσότητες και είναι άμεσα διαθέσιμα μετά τη μικροβιακή εισβολή να εξοντώσουν ένα ευρύ φάσμα μικροβίων [3].

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια αποτελούν ένα δημοφιλές θέμα έρευνας και πάνω από 750 ευκαρυωτικά αντιμικροβιακά πεπτίδια έχουν αναφερθεί (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag5.htm>). Αυτά τα πεπτίδια έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με ομοιότητες στο φορτίο, στην ομολογία αλληλουχίας, στη λειτουργία και στην τρισδιάστατη δομή σε τρεις τύπους : τα **ανιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια**, τα **κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια** και τα **πεπτίδια που αποτελούν τμήματα μεγαλύτερων πρωτεϊνών**.

➤ Τα **ανιονικά πεπτίδια** είναι πλούσια σε ασπαρτικά και γλουταμινικά αμινοξέα. Ο μηχανισμός δράσης τους απέναντι στα βακτήρια δεν είναι γνωστός, αλλά επειδή απαιτούν για αυτή τη δράση ψευδάργυρο και μάλιστα σχηματίζουν σύμπλοκο μαζί του, υποθέτουμε ότι ο ψευδάργυρος δημιουργεί μια κατιονική γέφυρα άλατος που επιτρέπει στο πεπτίδιο να αλληλεπιδράσει με την αρνητικά φορτισμένη μικροβιακή επιφάνεια. Στη συνέχεια διαρρηγνύει την εξωτερική μεμβράνη, χωρίς να επάγει καμία μορφολογική αλλαγή, ενώ καθώς βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα προσκολλάται στα ριβοσώματα και αναστέλλει τη δράση των ριβονουκλεασών. Τελικώς, οι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος καθιζάνουν, οδηγώντας στην απενεργοποίησή τους. Ο κυτταρικός θάνατος επέρχεται σε 30 min [4].

➤ **Κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs)** ονομάζονται τα πεπτίδια που απαρτίζονται από λιγότερα από 50 αμινοξέα, διαθέτουν θετικό φορτίο, εξαιτίας της παρουσίας λυσίνης και αργινίνης και επίσης έχουν ένα σημαντικό ποσοστό (50% και πάνω) υδρόφοβων αμινοξέων. Εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση απέναντι στα Gram-θετικά, Gram-αρνητικά βακτήρια, στους μύκητες και στα πρωτόζωα. Ορισμένα από αυτά αναστέλλουν την αντιγραφή ιών, όπως είναι ο ιός της γρίπης, ο ιός της στοματίτιδας με φλύκταινες (VSV) και ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1). Επίσης, ορισμένα από τα κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια κατέχουν αντικαρκινική δράση και προκαλούν επούλωση τραυμάτων. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσοαπόκριση [5].

➤ Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε τα **πεπτίδια που προκύπτουν από αντιμικροβιακές περιοχές μεγαλύτερων πρωτεϊνών**, τα οποία αποτελούν φυσικά προϊόντα ενζυμικής αποικοδόμησης πρωτεϊνών της εντερικής περιοχής.

2.4 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΚΑΤΙΟΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Ένας μεγάλος αριθμός κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από διάφορες πηγές, όπως είναι το αίμα των εντόμων, το δέρμα των αμφιβίων και τα φαγοκύτταρα των θηλαστικών. Σύμφωνα με τα φυσικοχημικά-δομικά χαρακτηριστικά τους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα γραμμικά και τα κυκλικά πεπτίδια. Τα γραμμικά πεπτίδια διακρίνονται με τη σειρά τους σε πεπτίδια που εμφανίζουν την τάση να προσλαμβάνουν αμφιπαθητικές α-έλικες και εκτεταμένα πεπτίδια που η αλληλουχία τους είναι πλούσια σε ορισμένα αμινοξέα, π.χ Pro, Arg, Trp (πίνακας 1) [5].

Πίνακας 1. Αντιπροσωπευτικά γραμμικά αντιμικροβιακά πεπτίδια.

πεπτίδια	πηγή	αλληλουχία
A-ελικοειδή πεπτίδια		
Cecropin A	<i>Hyalophora cecropia</i>	KWKLFFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVV-GQATQIAK-NH ₂
Cecropin B	<i>Hyalophora cecropia</i>	KWKVFFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVL-GEAKAL-NH ₂
Magainin I	<i>Xenopus laevis</i>	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
Magainin II	<i>Xenopus laevis</i>	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS
LL-37	Human epididymis and neutrophils	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNL-VPRT ES
Andropin	<i>Drosophila ejaculatory duct</i>	VFIDILDKVENAIHNAAQVGIGFAKPFKLI-INPK
Melittin	<i>Apis mellifera</i> venom	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂
Buforin II	<i>Bufo bufo</i>	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK
Εκτεταμένα πεπτίδια, πλούσια σε P, G, R και W		
Parasin I	<i>Parasilurus astotus</i>	KGRGKQGGKVRKAKTRSS
Indolicidin	Bovine neutrophils	ILPWKWPWWPWR-NH ₂
Apidaecin	<i>Apis mellifera</i>	GNNRPVYIPQRPHPRI
Drosocin	<i>Drosophila melanogaster</i>	GKPRPYSPRPT*SHPRPIRV

Pyrrhocoricin	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	VDKGSYLPRPT*PPRIYNRN
---------------	----------------------------	----------------------

* γλυκοζυλιωμένο

Η δεύτερη ομάδα, τα κυκλικά πεπτίδια διακρίνονται σε αυτά με μία ή περισσότερες δισουλφιδικές γέφυρες (πίνακας II).

Πίνακας II. Αντιμικροβιακά πεπτίδια με μία ή περισσότερες δισουλφιδικές γέφυρες

πεπτίδια	πηγή	αλληλουχία
Τρεις δισουλφιδικές γέφυρες		
Defensins		
HNP-1	Human(α) (1-30)	AC1YC2RIPAC3 IAGERRYGTC4IYQGRLW AFC5C6
HNP-2	Human(α) (1-29)	C1YC2RIPAC3IAGERRYGTC4IYQGRLW AFC5C6
HNP-3	Human(α) (1-30)	DC1YC2RIPAC3IAGERRYGTC4IYQGRLW AFC5C6
NP-1	Rabbit(α) (1-33)	VVC1AC2RRALC3LPRERRAGFC4RIRGRIHPLC5C6-RR
NP-5	Rabbit(α) (1-33)	VFC1TC2RGFLC3GSGERASGSC4TINGVRHTLC5C6-RR
HBD-2	Human(β) (1-41)	GIGDPVTC1LKSGAIC2HPVFC3PRRYKQIGTC4GLP-GTKC5C6KKP
BNBD-12	Bovine(β)	GPLSC1GRNGGVC2IPIRC3PVPMRQIGTC4FGRPVK-C5C6RSW
Insect defensin		ATC1DLLSGTGINHSAC2AAHC3LLRGNRGGYC4NG-KVC5VC6RN
Δύο δισουλφιδικές γέφυρες		
Tachyplesin hemocytes of <i>T. tridentatus</i>		KWCFRVCYRGICYRRCR
Protegrin-1	neutrophils porcine	RGGRLCYCRRRFCVCVGR

Μία δισουλφιδική γέφυρα		
Brevinin-1	<i>R. esculenta</i>	FLPLLAGLAANFLPKIFCKITRKC
Bactenecin	bovine neutrophils	RLCRIVVIRVCR

Οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι μεταξύ C1-C6, C2-C4, C3-C5 στις α-ντεφενσίνες (defensins) και β-ντεφενσίνες. Στις ντεφενσίνες των εντόμων οι δεσμοί είναι μεταξύ C1-C4, C2-C5, C3-C6.

Έτσι, λοιπόν, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια κατατάσσονται με βάση τη δομή τους σε τέσσερις κατηγορίες :

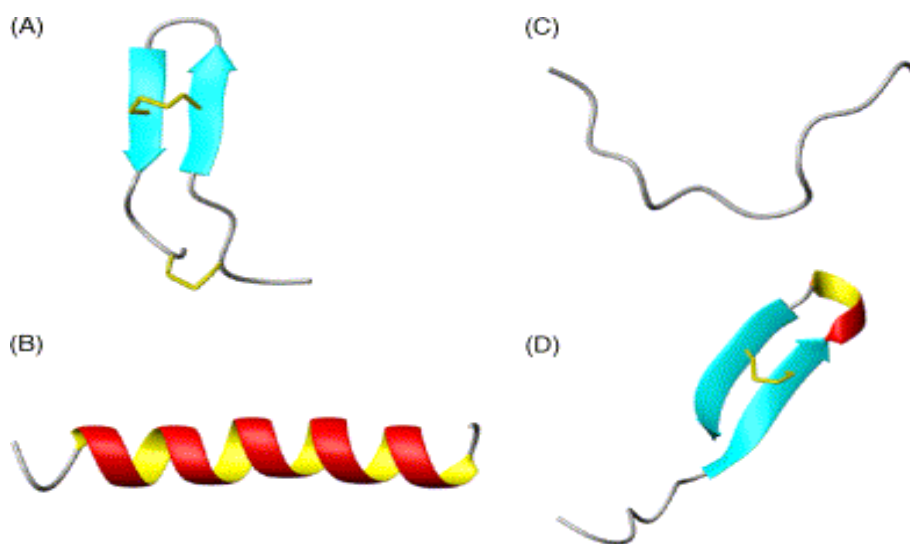
(A) **Πεπτίδια β-πτυχωτού φύλλου.** Τα πεπτίδια αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία αντιπαράλληλου β-φύλλου, που σταθεροποιείται από δισουλφιδικούς δεσμούς. Μεγαλύτερα πεπτίδια αυτής της τάξης μπορεί να περιέχουν επίσης μικρά ελικοειδή τμήματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ένα μικρό πεπτίδιο, 17-18 αμινοξέων, η ταχυπλεσίνη, της οποίας το αντιπαράλληλο β-φύλλο αποτελείται από μία β-στροφή τύπου I και σταθεροποιείται με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ το C-τελικό της άκρο έχει τη μορφή αμιδίου.

(B) **Α-Ελικοειδή Πεπτίδια.** Γραμμικά πεπτίδια μήκους 13-40 αμινοξέων, χωρίς παρουσία Cys, τα οποία έχουν την τάση να σχηματίζουν αμφιπαθητικές α-έλικες, όταν αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες των βακτηρίων και τις διαρρυγνύουν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ένα πεπτίδιο 23 αμινοξέων, η μαγγαϊνίνη, που υιοθετεί μια διαμόρφωση αμφιπαθητικής α-έλικας με μια ελαφριά κάμψη στο κέντρο του μορίου (μεταξύ των αμινοξέων 12 και 13).

(C) **Εκτεταμένα Πεπτίδια.** Η τάξη αυτή πεπτιδίων στερείται των κλασσικών διαμορφώσεων, κυρίως λόγω του υψηλού ποσοστού σε Pro, Gly και Trp. Πράγματι, αυτά τα πεπτίδια σχηματίζουν τις τελικές δομές τους όχι μέσω ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, αλλά μέσω δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων με τα μεμβρανικά λιπίδια. Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι η πλούσια σε τρυπτοφάνη και προλίνη ινδολικιδίνη. Είναι ένα πεπτίδιο 13 αμινοξέων, του οποίου η διαμόρφωση καθορίζεται από το περιβάλλον της.

(D) **Loop πεπτίδια (πεπτίδια με δομή θηλιάς).** Τα πεπτίδια αυτά αποκτούν δομή θηλιάς με ουρά, η οποία σταθεροποιείται με ένα δισουλφιδικό δεσμό. Το μόνο μέλος που ανήκει σε

αυτή την κατηγορία πεπτιδίων είναι η θανατίνη, ένα πεπτίδιο 13-αμινοξέων που σχηματίζει ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο, το οποίο σταθεροποιείται από ένα δισουλφιδικό δεσμό [6].



Σχήμα 2.4 : Χαρακτηριστικές δομές αντιμικροβιακών πεπτιδίων.
(A) ταχυπλεσίνη, (B) μαγγαϊνίνη, (C) ινδολικιδίνη, (D) θανατίνη.

2.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ (AMPs)

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι πλήρως γνωστός, επί του παρόντος, για όλα τα AMPs. Διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί για να επεξηγήσουν τις μοριακές διεργασίες που προκαλούν τα AMPs, αλλά δεν μπορεί ακόμα να εξακριβωθεί ποιος από τους πιθανούς μηχανισμούς είναι πιο προσιτός στην πραγματικότητα. Τα μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί για τη δράση των γραμμικών αμφιπαθητικών κατιονικών πεπτιδίων, προτείνουν το σχηματισμό διαύλων (channels) διαμέσου των μεμβρανών και τη διάρρηξή τους [7, 8].

Σχηματισμός πόρου

Η καταστροφή των βακτηριακών κυττάρων με σχηματισμό πόρων στη μεμβράνη τους, προϋποθέτει τρία κύρια βήματα: 1) πρόσδεση στη μεμβράνη των βακτηρίων, 2) συσσωμάτωση μέσα στη μεμβράνη, και τέλος 3) σχηματισμό διαύλων (channels). Ο σχηματισμός διαύλων οδηγεί στη διαρροή των εσωτερικών συστατικών του κυττάρου και τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Αρχικά, όμως, ένα AMP πριν αλληλεπιδράσει με την βακτηριακή μεμβράνη, πρέπει να διασχίσει το αρνητικά φορτισμένο κυτταρικό τοίχωμα των

Gram-αρνητικών βακτηρίων, το οποίο αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες (LPS), ή το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-θετικών βακτηρίων, το οποίο περιλαμβάνει όξινους πολυσακχαρίτες [9]. Τα τρία μοντέλα σχηματισμού πόρου που έχουν αναπτυχθεί είναι το μοντέλο τύπου **barrel-stave**, το μοντέλο **τάπητα (carpet)** και το μοντέλο **toroidal** [10].

► **Μοντέλο Barrel-Stave**

Στο μοντέλο τύπου barrel-stave, πραγματοποιείται σχηματισμός διαμεμβρανικών πόρων από συστοιχίες αμφιπαθητικών α-ελίκων, που προσανατολίζονται κάθετα προς τη μεμβράνη, με τέτοιο τρόπο ώστε οι υδρόφοβες παράπλευρες αλυσίδες να αλληλεπιδρούν με το λιπιδικό περιβάλλον των μεμβρανών, ενώ οι πολικές παράπλευρες αλυσίδες της αμφιπαθητικής α-έλικας να σχηματίζουν διαμεμβρανικούς πόρους. Οι πόροι αυτοί επιτρέπουν τη διαρροή κυτταροπλασματικών συστατικών και διαταράσσουν το μεμβρανικό δυναμικό. Το κρίσιμο σημείο στο μηχανισμό αυτό είναι η συνάθροιση των μονομερών στην επιφάνεια της μεμβράνης πριν την εισχώρηση του πεπτιδίου, αφού δεν ευνοείται ενεργειακά η εισχώρηση μιας αμφιπαθητικής έλικας ως μονομερούς. Λίγο πριν την εισχώρηση του πεπτιδίου, οι αμφιπαθητικές έλικες συσσωματώνονται (αφού αλληλεπιδράσουν τα υδρόφιλα τμήματά τους) και η αλληλεπίδραση της συνάθροισης με τη μεμβράνη καθορίζεται κυρίως από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 2.2Α).

► **Μοντέλο Τάπητα (Carpet)**

Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια δεν εισέρχονται στη μεμβράνη, αλλά προσανατολίζονται παράλληλα στη διπλοστοιβάδα και αλληλεπιδρούν με την πολική κεφαλή των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Η επιφάνεια της μεμβράνης καλύπτεται σιγά σιγά από το πεπτίδιο και εισχώρηση εντός αυτής πραγματοποιείται μόνο όταν υπάρχει μια υψηλή τοπική συγκέντρωση πεπτιδίου στην επιφάνειά της. Στο μοντέλο του τύπου carpet, τα πεπτίδια δεν εισέρχονται στην υδρόφοβη περιοχή της μεμβράνης, ούτε συσσωματώνονται με τις υδρόφιλες περιοχές τους αντικριστά προς σχηματισμό πόρου, όπως συμβαίνει στο μοντέλο του τύπου barrel-stave. Επιπλέον, ένα πεπτίδιο που διαρρηγνύει τη μεμβράνη με το μηχανισμό του τύπου carpet δεν είναι απαραίτητο να προσλαμβάνει ειδική διαμόρφωση κατά την πρόσδεσή του στη μεμβράνη, αφού αρχικά οι αλληλεπιδράσεις με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη είναι ηλεκτροστατικής φύσης (Σχήμα 2.2Β).

► **Μοντέλο Toroidal (κρικοειδές μοντέλο)**

Ο μηχανισμός του μοντέλου toroidal πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιείται ο μηχανισμός του μοντέλου barrel-stave, με τη μόνη διαφορά ότι το AMP

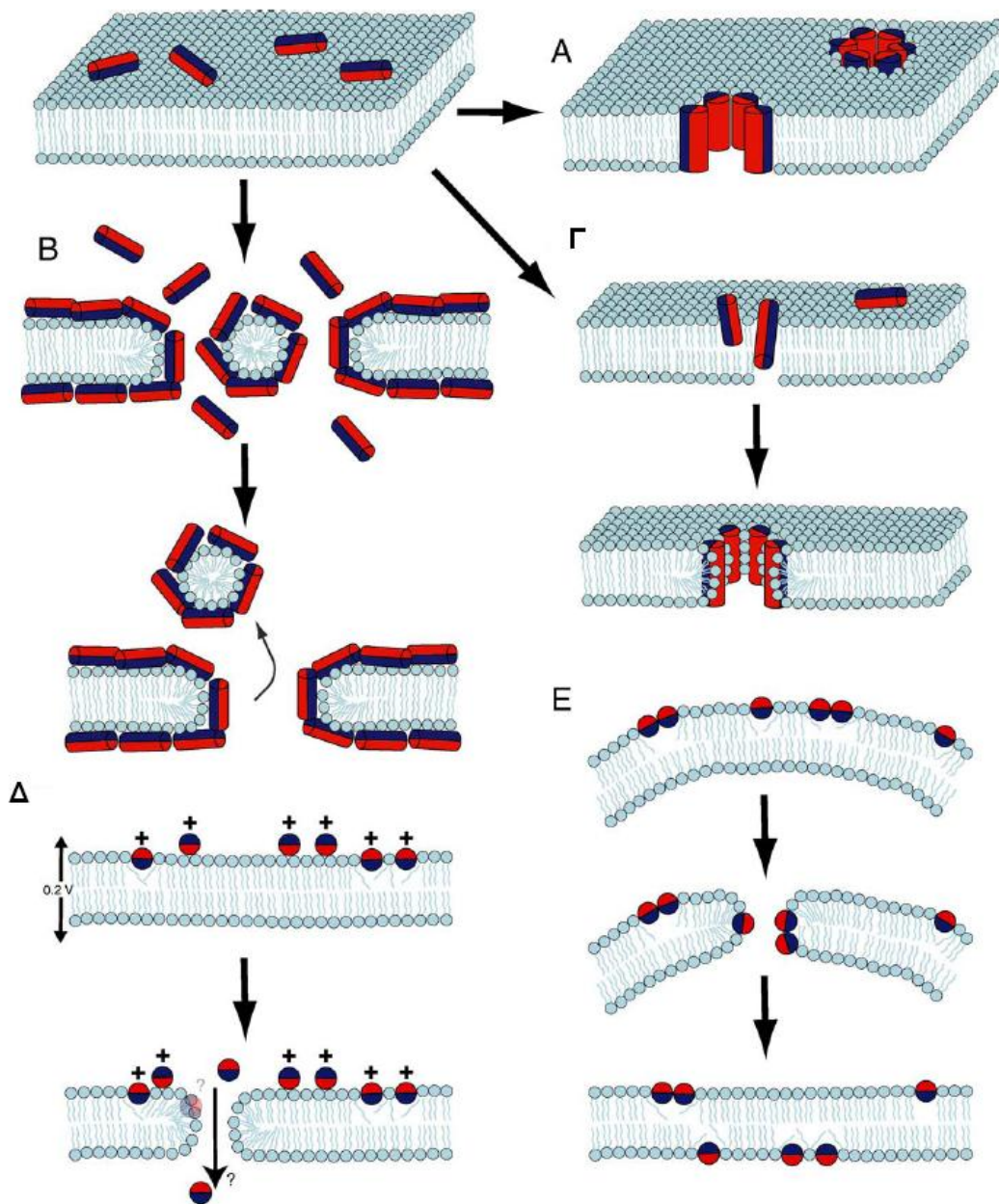
σχηματίζει μια μονοστοιβάδα, συνδέοντας τα εξωτερικά με τα εσωτερικά λιπιδικά στρώματα του πόρου (Σχήμα 2.2Γ).

Μοριακή ηλεκτροδιάτρηση (molecular electroporation)

Κάποια πεπτίδια μπορούν να δημιουργήσουν διαφορά ηλεκτροστατικού δυναμικού εγκάρσια της μεμβράνης, ικανή για σχηματισμό πόρων με τη βοήθεια της ηλεκτροδιάτρησης. Για να γίνει εφικτός, όμως αυτός ο σχηματισμός, πρέπει να υπάρχει επαρκής πυκνότητα φορτίου, που αντιπροσωπεύεται από το υψηλό ποσοστό των κατιονικών αμινοξέων στα AMPs.

Μοντέλο καταβύθισης (sinking-raft model)

Τα αμφιπαθητικά πεπτίδια κατά την πρόσδεσή τους στην λιπιδική διπλοστοιβάδα δημιουργούν μια ανισορροπία, με αποτέλεσμα να βυθίζονται σε αυτή. Αυτά τα πεπτίδια μπορούν να δημιουργήσουν παροδικούς πόρους θανάσιμους για τα μικρόβια.



Σχήμα 2.5 : Μοντέλα της αντιμικροβιακής δράσης των πεπτιδίων. Το κόκκινο τμήμα του πεπτιδίου αντιπροσωπεύει την υδρόφιλη επιφάνεια, ενώ το μπλε την υδρόφοβη. (Α) Στο μοντέλο τύπου barrel-stave, τα πεπτίδια εισέρχονται κάθετα στη μεμβράνη και σχηματίζουν πόρο. (Β) Στο μοντέλο τύπου carpet, τα πεπτίδια τοποθετούνται παράλληλα προς την επιφάνεια της μεμβράνης και σχηματίζουν ένα τάπητα, όπως υποδηλώνει και η ονομασία του. Τα πεπτίδια σχηματίζουν τον πόρο ακολουθώντας τη συμπεριφορά απορρυπαντικού. (Γ) Το μοντέλο τύπου toroidal, δημιουργεί πόρους που περιλαμβάνουν πεπτίδια καθώς και λιπιδικά μόρια, τα οποία κυρτώνονται από την επιφάνεια της μεμβράνης προς το εσωτερικό των πόρων κατά ένα συνεχόμενο τρόπο. Η διάρκεια ζωής αυτών των πόρων ποικίλλει. Μετά τον

παροδικό σχηματισμό πόρων, τα πεπτίδια καταλήγουν και στα δύο φύλλα της διπλοστοιβάδας. Οι toroidal πόροι μεγαλύτερης διάρκειας εμφανίζουν θανάσιμα αποτελέσματα όμοια με αυτά των barrel-stave πόρων. (Δ) Στο μοντέλο της ηλεκτρικής ηλεκτροδιάτρησης τα κατιονικά πεπτίδια αλληλεπιδρούν με τη βακτηριακή μεμβράνη και δημιουργούν μια διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού εγκάρσια της μεμβράνης. Όταν η διαφορά του δυναμικού φθάσει τα 0.2 V, θεωρείται ότι παράγονται πόροι διαμέσου της ηλεκτροδιάτρησης. (Ε) Το μοντέλο της καταβύθισης προτείνει ότι κατά την πρόσδεση των αμφιπαθητικών πεπτιδίων προκαλείται μαζική ανισοροπία και συνεπώς μια αύξηση στην τοπική καμπυλότητα της μεμβράνης. Καθώς τα πεπτίδια συνδέονται μεταξύ τους, καταβυθίζονται στη μεμβράνη, δημιουργώντας παροδικούς πόρους, με συνέπεια τα πεπτίδια να τοποθετούνται και στα δύο φύλλα της διπλοστοιβάδας μετά το διαχωρισμό τους [11, 12].

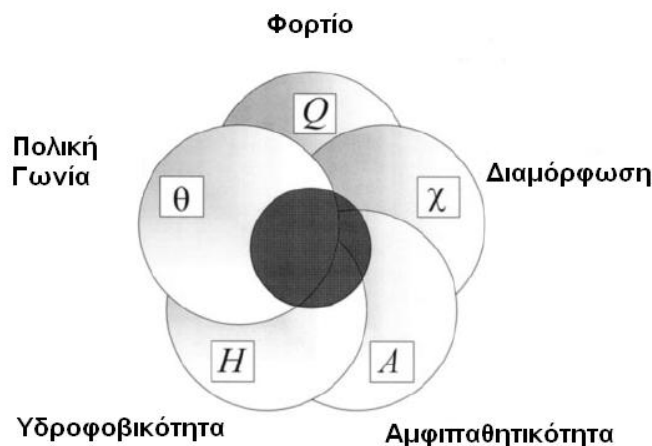
2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ AMPs

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αντιμικροβιακή δράση των AMPs είναι η διαμόρφωση, το φορτίο, η υδροφοβικότητα, η αμφιπαθητικότητα και η πολική γωνία (polar angle).

Όσον αναφορά τη *διαμόρφωση* (χ), οι δύο μεγαλύτερες ομάδες των AMPs είναι τα α -ελικοειδή και β -πτυχωτού φύλλου πεπτίδια, όπου τα περισσότερα από αυτά διαθέτουν ένα ή περισσότερα από τα συγκεκριμένα αμινοξέα: προλίνη, αργινίνη ή τρυπτοφάνη. Τα α -ελικοειδή αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι άφθονα στα εξωκυττάρια υγρά των εντόμων και βατράχων και συχνά υπάρχουν ως εκτεταμένα ή μη δομημένα διαμορφωμερή σε διάλυμα. Πολλά από αυτά αποκτούν ελικοειδή διαμόρφωση όταν αλληλεπιδρούν με τις αμφιπαθητικές, φωσφολιπιδικές μεμβράνες.

Το *φορτίο* (Q) των περισσότερων AMPs κυμαίνεται από +2 έως +9. Η κατιονικότητα είναι αδιαμφισβήτητα σημαντική για την αρχική ηλεκτροστατική έλξη των αντιμικροβιακών πεπτιδίων στις αρνητικά φορτισμένες φωσφολιπιδικές μεμβράνες των βακτηρίων (**Σχήμα 2.3**). Εντός ενός συγκεκριμένου εύρους, η αύξηση της κατιονικότητας συνδέεται γενικά με την αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης, αν και έχει παρατηρηθεί επίσης και η αντίστροφη σχέση. Υπάρχει ένα συγκεκριμένο όριο, που όταν ξεπεραστεί, περαιτέρω αύξηση στο φορτίο δεν βελτιώνει την αντιμικροβιακή δράση. Μελέτες σε ανάλογα μαγγαϊνίνης (α -ελικοειδές αντιμικροβιακό πεπτίδιο που απομονώνεται από αμφίβια), έδειξαν ότι αυξάνοντας το φορτίο

από +3 σε +5, αυξάνεται η αντιβακτηριακή δράση στα Gram-αρνητικά και Gram-θετικά παθογόνα. Όμως, όταν το φορτίο γίνεται +6 ή +7 παρατηρήθηκε αυξημένη αιμόλυση και απώλεια της αντιμικροβιακής δράσης. Αυτή η μείωση της αντιμικροβιακής δράσης μπορεί να οφείλεται στις πολύ ισχυρές αλληλεπιδράσεις του πεπτιδίου με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων, ως εκ τούτου να παρεμποδίζεται η μετατόπιση του πεπτιδίου μέσα στο εσωτερικό του κυττάρου.



Σχήμα 2.3 : Συσχετισμός ανάμεσα στους καθοριστικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη δομή των αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Η αλληλουχία των πεπτιδίων επηρεάζει όχι μόνο τις βιοχημικές του ιδιότητες (π.χ. *Q*, *A*, *H*), αλλά και την τρισδιάστατη διαμόρφωσή του (π.χ. *χ*, *θ*). Επομένως, αλλαγές στη σύσταση,

στην αλληλουχία και στους ενδομοριακούς δεσμούς μπορούν να επιδράσουν στις σχέσεις δομής με τη δράση.

Υδροφοβικότητα (H) ορίζεται ως το ποσοστό των υδρόφοβων αμινοξέων σε ένα πεπτίδιο και για τα περισσότερα AMPs προσεγγίζει το 50%. Είναι βασικό χαρακτηριστικό για τις αλληλεπιδράσεις του πεπτιδίου με τη μεμβράνη, καθώς καθορίζει το βαθμό που θα εισχωρήσει το πεπτίδιο στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Παρόλο που η υδροφοβικότητα απαιτείται για την αποτελεσματική διαπερατότητα της μεμβράνης, σε υψηλά επίπεδα συσχετίζεται έντονα με την τοξικότητα έναντι κυττάρων των θηλαστικών και απώλεια της αντιμικροβιακής εξειδίκευσης. Για αυτό το λόγο, πολλά AMPs είναι μέτρια υδρόφοβα, έτσι ώστε να βελτιστοποιείται η δράση έναντι των μικροβιακών μεμβρανών.

Η **αμφιπαθητικότητα (A)** μπορεί να επιτευχθεί μέσω μιας πληθώρας διαμορφώσεων, όμως η πιο απλή και ίσως η πιο «κομψή» είναι η διαμόρφωση της αμφιπαθητικής έλικας. Η αμφιπαθητική α-έλικα εμφανίζει μια περιοδικότητα κάθε 3 με 4 αμινοξέα και είναι η καταλληλότερη για τις αλληλεπιδράσεις με τις αμφιπαθητικές βιομεμβράνες. Ενώ, το μέγεθος της αμφιπαθητικής ελλειπτικότητας (**helicity**) επηρεάζει τη δράση του πεπτιδίου με τις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες, παράλληλα το καθιστά αιμολυτικό έναντι στις διπολικές ή ουδέτερες μεμβράνες.

Η **πολική γωνία (θ)** είναι μια μέτρηση της σχετικής αναλογίας των πολικών έναντι των μη-πολικών πλευρών της α -έλικας που σχηματίζει ένα AMP. Σε ένα υποθετικά α -ελικοειδές πεπτίδιο που η μια πλευρά του συνίσταται αποκλειστικά από υδρόφοβα αμινοξέα και η άλλη μόνο από φορτισμένα, τότε $\theta = 180^\circ$. Μικρότερη πολική γωνία, και συνεπώς μεγαλύτερη υδρόφοβη επιφάνεια, σχετίζεται με αυξημένη διαπερατότητα. Γενικά, ακραίες τιμές των συγκεκριμένων χαρακτηριστικών, όπως το φορτίο, η αμφιπαθητικότητα ή η πολική γωνία μπορεί να μην ευνοούν την αντιμικροβιακή δράση και την επιλεκτική τοξικότητα [13].

2.7 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ AMPs ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΕΣΑ [14]

● **Σταθερότητα**

Για να είναι τα AMPs χρήσιμα σε κλινικές εφαρμογές, πρέπει να μπορούν να διατηρηθούν σταθερά σε φυσιολογικό περιβάλλον για αρκετά ικανοποιητικό χρόνο, ώστε να αναπτύξουν την αντιμικροβιακή τους δράση. Παράλληλα πρέπει να μην είναι τοξικά σε κύτταρα θηλαστικών (γίνεται αναφορά στην επόμενη παράγραφο). Παρόλο που πολλά AMPs εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση σε μεγάλο ποσοστό σε υγρές *in vitro* καλλιέργειες μικροβίων, η δράση αυτή χάνεται σε *in vivo* φυσιολογικές συνθήκες, οι οποίες περιλαμβάνουν υψηλές συγκεντρώσεις μονοσθενών ή δισθενών κατιόντων, ορό αίματος, πρωτεάσες, πολυσθενή ανιόντα και χαμηλές τοπικές συγκεντρώσεις πεπτιδίων [15]. Μια στρατηγική που έχει υιοθετηθεί από πολλά εργαστήρια και εταιρίες για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της αποικοδόμησης, είναι ο σχεδιασμός μικρών αντιμικροβιακών πεπτιδίων που θα συμπεριλαμβάνουν στην αλληλουχία τους προστατευτικές ομάδες ή ασυνήθιστα αμινοξέα.

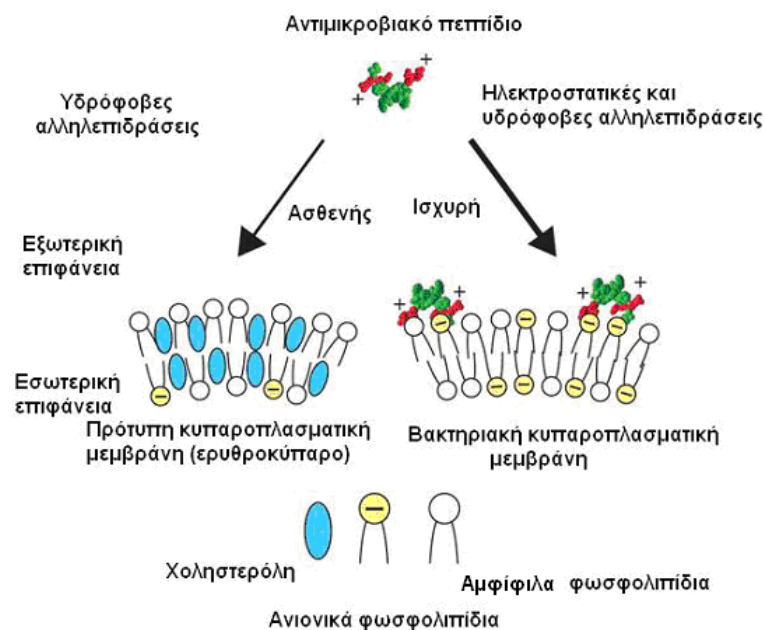
● **Αιμολυτική δράση και Κυτταροτοξικότητα**

Ο βαθμός με τον οποίο τα AMPs διαπερνούν ή λύουν τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα δεν αντανakλά τη δυνητική κυτταροτοξικότητά τους *in vivo*. Υπάρχουν αποδείξεις ότι τα πεπτίδια που η αλληλουχία τους απαρτίζεται από L-αμινοξέα είναι πολύ αιμολυτικά. Αντίθετα, τα D-διαστερεοϊσομερή εμφανίζονται μη τοξικά. Πολλές μελέτες επιδεικνύουν μια άμεση σχέση ανάμεσα στο βαθμό της αμφιπαθητικότητας και αιμολυτικής δράσης. Έχει βρεθεί ότι πεπτιδικά ανάλογα με πολύ υψηλές υδροφοβικότητες εμφανίζονται πολύ ενεργά, αλλά χάνουν την εξιδείκευσή τους ανάμεσα στις μεμβράνες των μικροβίων και των

ευκαρυωτικών κυττάρων. Αντίθετα, πεπτιδικά ανάλογα με χαμηλές τιμές υδροφοβικότητας εμφανίζουν και χαμηλή δράση έναντι των μικροοργανισμών και των ερυθροκυττάρων.

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των θηλαστικών κυττάρων συνίσταται αποκλειστικά από ουδέτερα φωσφολιπίδια, όπως είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και η σφιγγομυελίνη. Αντίθετα, οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες των βακτηρίων περιέχουν ένα μεγάλο ποσοστό αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων, φωσφατιδυλογλυκερόλης (PG) και καρδιολιπίνης (CL) (Σχήμα 2.4). Τα κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια επιλέγουν να προσδεθούν στις αρνητικά φορτισμένες βακτηριακές μεμβάνες και κατά συνέπεια να τις διαπεράσουν. Η πρόσδεση αυτή, πραγματοποιείται μέσω υδρόφωβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μη-πολικών αμινοξέων του πεπτιδίου και της υδρόφοβης περιοχής της μεμβάνης, καθώς και μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο θετικό φορτίο του πεπτιδίου και το αρνητικό φορτίο της μεμβράνης. Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πεπτιδίου και των φωσφολιπιδίων από τα οποία αποτελείται η μεμβράνη των θηλαστικών κυττάρων είναι αρκετά ασθενείς έτσι ώστε να επιτευχθεί πρόσδεση, με αποτέλεσμα το πεπτίδιο να μην παρουσιάζει τοξικότητα απέναντι στον ξενιστή.

Μεταγενέστερες προσπάθειες για να μειωθεί η αιμολυτική δράση πραγματοποιήθηκαν με τροποποιήσεις των AMPs. Μια προσέγγιση ήταν η σύνθεση υβριδίων πεπτιδίων από τμήματα της αλληλουχίας διαφορετικών πεπτιδίων με διαφορετικές ιδιότητες.



Σχήμα 2.6 : Μοριακή βάση διάκρισης μεμβρανών από τα αντιμικροβιακά πεπτίδια.

● **Ανθεκτικότητα**

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιμικροβιακά πεπτίδια θεωρούνταν μη εφικτή, εξαιτίας της ανικανότητας των βακτηρίων να αλλάξουν τη σύσταση της κυτταρικής τους μεμβράνης και του τρόπου διείσδυσης των AMPs σε αυτή. Ωστόσο, διάφορα παθογόνα βακτήρια εμφανίζονται να αντιστέκονται στα AMPs μέσω διάφορων μηχανισμών [16].

A. Παραγωγή μορίων που δεσμεύουν εξωκυτταρικά τα AMPs

Κάποια βακτηριακά είδη εκκρίνουν ή έχουν προσαρτημένες στην επιφάνειά τους πρωτεΐνες που δεσμεύουν συγκεκριμένα κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια και επομένως εμποδίζουν την πρόσβασή τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

B. Πρωτεολυτική αποικοδόμηση

Η πιο άμεση μέθοδος των βακτηρίων για να αδρανοποιήσουν τα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι η παραγωγή πεπτιδασών και πρωτεασών, πρωτεολυτικά ένζυμα που αποικοδομούν τα AMPs.

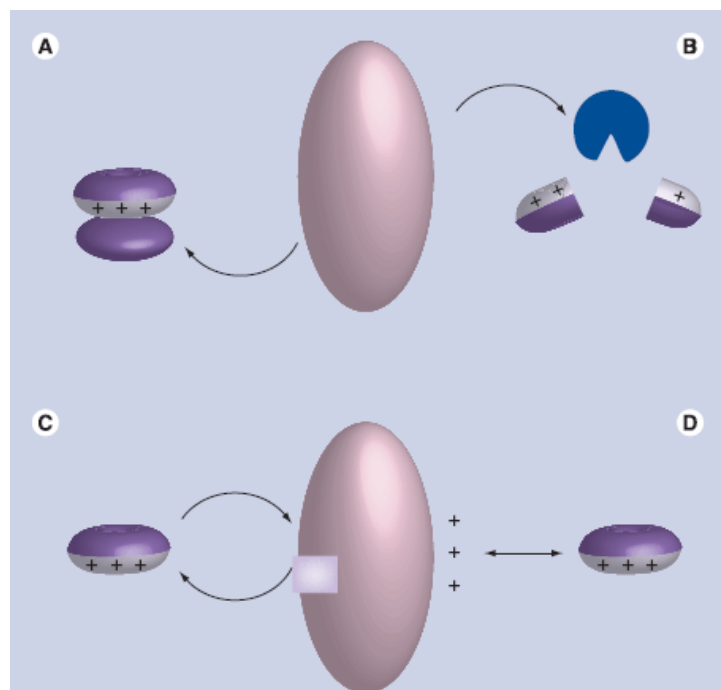
C. Εξαγωγείς συγκεκριμένων φαρμάκων-AMPs

Η προστασία από τα μικρά, αμφιπαθητικά φάρμακα διαμεσολαβείται με εξώθηση των μορίων από ενεργειακά-εξαρτώμενες πρωτεΐνες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Εξαιτίας της μεγάλης εξειδίκευσης του υποστρώματος, αυτά τα συστήματα ονομάζονται εξαγωγείς αντίστασης πολλαπλών φαρμάκων (*multiple drug resistance exporters, MDRs*). Τα AMPs επίσης, είναι αμφιπαθητικά και στοχεύουν στην καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, επομένως μπορούν να εξαχθούν από γνωστά MDRs.

D. Αντίσταση στα AMPs με τροποποίηση του φορτίου της κυτταρικής επιφάνειας

Τα AMPs, καθώς και άλλα αντιμικροβιακά μόρια (λυσοζύμη, φωσφολιπάση A₂ και Rnase5), έχουν θετικό φορτίο. Σε αντίθεση με την επιφάνεια των ανθρώπινων κυττάρων, που κυρίως αποτελούνται από μη φορτισμένα ή διπολικά λιπίδια, η επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων διαθέτει ανιονικές ιδιότητες. Αυτό οφείλεται στην παρουσία ανιονικών συστατικών όπως είναι η πεπτιδογλυκάνη, τα περισσότερα φωσφολιπίδια, το λιπίδιο A (φωσφορυλιωμένος δισακχαρίτης γλυκοζαμίνης με λιπαρά οξέα προσαρτημένα στην εξωτερική μεμβράνη) και τα τειχοϊκά οξέα. Μπορεί να θεωρηθεί λοιπόν, ότι οι αντιμικροβιακοί παράγοντες έχουν αναπτύξει κατιονικές ιδιότητες για να επιτύχουν υψηλή και επιλεκτική πρόσδεση στις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες των βακτηρίων. Εφόσον αυτές οι δομές, είναι αρκετά αρχαίες και σταθερές, φαίνεται πραγματικά αδύνατον για τα βακτήρια να τις αντικαταστήσουν με άλλες δομές λιγότερο ευνοϊκές για την αλληλεπίδραση

με τα AMPs. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ορισμένα βακτηριακά είδη που κατορθώνουν να ελαττώνουν το αρνητικό φορτίο της κυτταρικής του επιφάνειας, και συνεπώς να αποκτούν προστασία, αδρανοποιώντας τους κατιονικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες. Τα βακτήρια αυτά, μπορεί είτε να εισάγουν D-αλανίνη στα πολυμερή της ροβιτόλης και γλυκερόλης με το φωσφορικό άλας που απαρτίζουν τα τειχοϊκά οξέα, με αποτέλεσμα να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων, είτε να αντικαταστήσουν τον υποκαταστάτη X στα αρνητικά φωσφολιπίδια (φωσφατιδυλογλυκερόλη, καρδιολιπίνη) της βακτηριακής μεμβράνης με τη θετικά φορτισμένη L-λυσίνη.



Σχήμα 2.7 : (A) παραγωγή εξωκυτταρικών μορίων-παγίδων των αντιμικροβιακών πεπτιδίων, (B) πρωτεολυτική διάσπαση, (C) εξαγωγείς φαρμάκων-αντιμικροβιακών πεπτιδίων, (D) ηλεκτροστατική απόθεση με διαφοροποίηση του φορτίου της κυτταρικής επιφάνειας.

2.8 ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΤΗΣ IN VIVO ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ AMPs

Μέχρι σήμερα, η πλειοψηφία των κλινικών δοκιμών των πεπτιδίων έχει επικεντρωθεί στην τοπική χρήση, δηλαδή στην απευθείας εφαρμογή του θεραπευτικού μέσου σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος. Για οποιαδήποτε άλλη χορήγηση, όπως είναι η στοματική δόση, πρέπει να ληφθεί υπόψη ένας αριθμός προκλήσεων. Η σημαντικότερη πρόκληση είναι η βελτίωση της σταθερότητάς τους και η αποφυγή αποικοδόμησής τους από τις πρωτεάσες

(πεπτιδάσες) του εντέρου, του ορού και των ιστών. Υπάρχουν διάφορες παραδοσιακές μέθοδοι για να μπορέσουν τα πεπτίδια να αναπτύξουν αντίσταση στις πρωτεάσες, μεταξύ αυτών είναι η διαφοροποίηση του N-τελικού και C-τελικού άκρου των πεπτιδίων με ακετυλίωση και σχηματισμό αμιδίου αντίστοιχα ή αντικατάσταση των αμινοξέων της προβλεπόμενης θέσης αποκοπής από μη φυσικά αμινοξέα (π.χ. D-αμινοξέα). Οι μέθοδοι αυτοί έχουν αποδειχθεί επιτυχημένες και χρησιμοποιούνται κατά κόρον από εταιρίες σύνθεσης εμπορικών πεπτιδίων.

Σε συνδυασμό με τις παραπάνω μεθόδους, μια άλλη στρατηγική που έχει υιοθετηθεί για τη βελτίωση της πρωτεολυτικής σταθερότητας είναι η μείωση του μεγέθους του πεπτιδίου στις βιολογικά ενεργές περιοχές. Μια εναλλακτική στρατηγική αποτελεί και ο σχηματισμός κυκλικών πεπτιδίων, που διαθέτουν μια έμφυτη αντίσταση στην ενζυμική αποικοδόμηση, με τη συνένωση του άμινο- με το καρβόξυ-άκρο της πεπτιδικής αλληλουχίας. Αυτή η τροποποίηση παρουσιάζει σταθερότητα στο πλάσμα για 24h, σε αντίθεση με την γραμμική μορφή του που αποικοδομείται μέσα σε λίγα λεπτά.

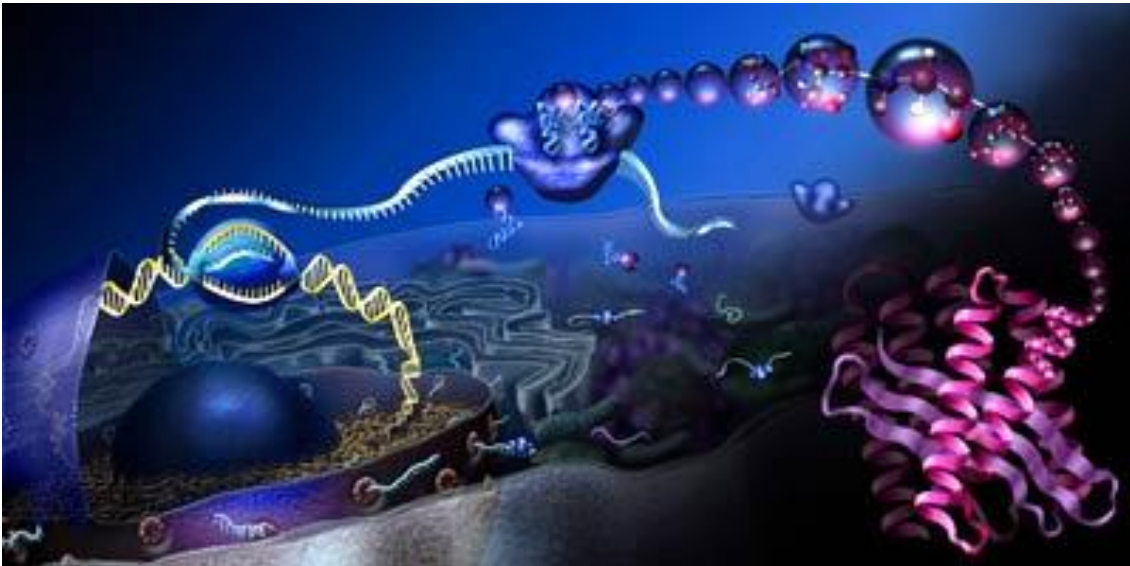
Η βιοδιαθεσιμότητα αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη στην ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπευτικών μέσων. Η αποδοτική στόχευση και η αργή απελευθέρωση του θεραπευτικού πεπτιδίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με ενθυλάκωσή του σε λιποσώματα (τεχνική που βρίσκεται ακόμα στο στάδιο της έρευνας) ή με την προσάρτηση του πεπτιδίου σε τμήματα πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Με την προσάρτηση αυτή αυξάνεται η ολική μοριακή μάζα του πεπτιδίου, η οποία μπορεί να μειώσει τη νεφρική κάθαρση από το κυκλοφορικό σύστημα. Όμως, πρέπει να μελετηθεί σοβαρά το μέγεθος των τμημάτων PEG, γιατί επηρεάζουν αρνητικά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του πεπτιδίου.

Η χρήση μικροσφαιρών που συντίθενται από πολυμερή γαλακτικού οξέος μπορεί να έχουν κάποια χρησιμότητα στη διατήρηση του χρόνου κυκλοφορίας του πεπτιδίου στο αίμα. Αυτή η προσέγγιση έχει παράγει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στην έρευνα των εμβολίων και στη μείωση της συχνότητας της δοσολογίας των θεραπευτικών πεπτιδίων. Τα πολυμερή αυτά απελευθερώνουν το φορτίο τους αργά κάτω από συγκεκριμένες φυσιολογικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, pH).

Εν συντομία, ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο για να θεραπεύσει αποτελεσματικά μια μόλυνση, είναι πιθανό να απαιτεί φυσικές (δομικές), χημικές ή τροποποιήσεις της σύστασής του, για να βελτιωθούν οι φαρμακοκινητικές του ιδιότητες. Όταν χρησιμοποιηθεί με το κατάλληλο σύστημα διανομής που θα βοηθήσει στη μακροζωία του και/ή βελτιώσει τη

στόχευση της θέσης της μόλυνσης, τότε το θεραπευτικό πεπτίδιο μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικό **in vivo**. Μέχρι να ταυτοποιηθούν τα κατάλληλα συστήματα διανομής, είναι πιθανόν η εφαρμογή των πεπτιδίων να είναι περιορισμένη στη θεραπεία τοπικών μολύνσεων. Παρόλα αυτά, οι έρευνες που λαμβάνουν χώρα σε αυτό το πεδίο είναι ενθαρρυντικές και η χρήση των θεραπευτικών πεπτιδίων μπορεί να επεκταθεί σε ένα μεγαλύτερο εύρος μολύνσεων [17].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο. ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ



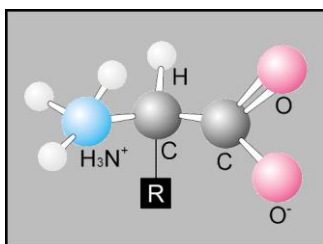
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρωτεΐνες αποτελούν απαραίτητα συστατικά όλων των ζωντανών οργανισμών. Εάν εξαιρέσουμε ορισμένα φυσικοχημικά φαινόμενα όπως π.χ. τη διάχυση και τη διάσταση των ηλεκτρολυτών, καμία διεργασία δε γίνεται τόσο στο επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού όσο και στο επίπεδο του κυττάρου και του υποκυτταρικού ακόμα στοιχείου, χωρίς την παρεμβολή κάποιας πρωτεΐνης. Η κίνηση, η αναπνοή, η θρέψη, η αναπαραγωγή, η άμυνα του οργανισμού και όλα γενικά τα φαινόμενα που χαρακτηρίζουν τη ζωή, χρειάζονται πρωτεΐνες. Δεν είναι λοιπόν περίεργο ότι δίνουμε ιδιαίτερη προσοχή στη μελέτη των πρωτεϊνών τόσο από χημικής όσο και από λειτουργικής σκοπιάς, ιδιαίτερα από τότε που συνειδητοποιήσαμε ότι υπάρχει άμεση σχέση, εξάρτηση θα λέγαμε, μεταξύ διαμόρφωσης και λειτουργικότητας.

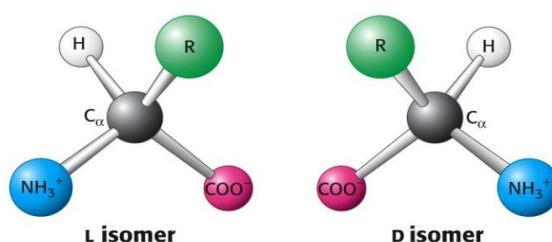
Αν υδρολύσουμε μία απλή πρωτεΐνη θα δούμε ότι το υδρόλυμα αποτελείται αποκλειστικά από αμινοξέα. Μάλιστα δε, οποιαδήποτε πρωτεΐνη και να αναλύσουμε, θα βρούμε το πολύ είκοσι διαφορετικά αμινοξέα. Ο λόγος για τον οποίο τα ίδια είκοσι αμινοξέα (τροποποιημένα καμιά φορά) βρίσκονται σε όλες τις πρωτεΐνες οφείλεται στο μηχανισμό σύνθεσης πρωτεϊνών ο οποίος δεν έχει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης στις πρωτεΐνες άλλων αμινοξέων εκτός από τα συγκεκριμένα είκοσι. Παρενθετικά πρέπει να αναφέρουμε ότι στη ζωντανή φύση υπάρχουν πάνω από εφτακόσια αμινοξέα τα οποία δεν τα βρίσκουμε σε πρωτεΐνες.

3.2 ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Τα αμινοξέα, όπως λέει και το όνομά τους, είναι οργανικά οξέα με μία τουλάχιστον αμινομάδα. Η καρβοξυλική ομάδα και η αμινομάδα είναι συνδεδεμένες στο ίδιο άτομο άνθρακα. Εξαίρεση όπως θα δούμε αποτελεί η προλίνη που αντί για αμινομάδα έχει ιμινομάδα. Έτσι, ο γενικός τύπος των αμινοξέων είναι ο εξής:



Στον τύπο αυτόν είναι φανερό ότι υπάρχει ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα με αποτέλεσμα τα αμινοξέα να είναι οπτικώς ενεργές ενώσεις. Εξάιρεση αποτελεί η γλυκίνη όπου R είναι H. Ανάλογα εάν το οπτικώς ενεργό κέντρο των αμινοξέων συγγενεύει στερεοχημικά με το οπτικώς ενεργό κέντρο της L-γλυκεριναλδεύδης ή της D-γλυκεριναλδεύδης, τα αμινοξέα είναι της L- ή της D-διαμόρφωσης αντίστοιχα. Τα περισσότερα αμινοξέα που βρίσκονται στη φύση και όλα που απαντούνται σε πρωτεΐνες είναι της L-διαμόρφωσης (Σχήμα 3.1).



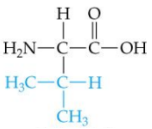
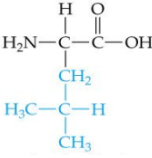
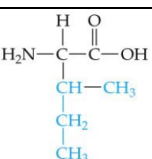
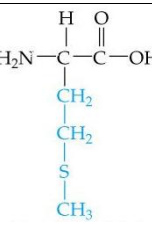
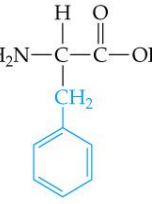
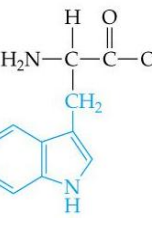
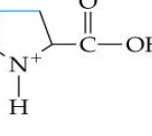
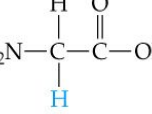
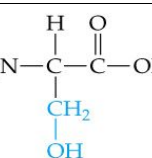
Σχήμα 3.1 : Τα δύο στερεοϊσομερή των αμινοξέων.

Επειδή οι καρβοξυλομάδες και οι αμινομάδες των αμινοξέων στις πρωτεΐνες (με εξαίρεση τα δύο που βρίσκονται στα άκρα) εξουδετερώνονται δημιουργώντας μεταξύ τους αμιδικούς (πεπτιδικούς) δεσμούς, η φύση και οι ιδιότητες των ομάδων R των αμινοξέων έχουν ιδιαίτερη σημασία. Ανάλογα, λοιπόν, εάν τα αμινοξέα έχουν πολικές ή μη πολικές ομάδες R κατατάσσονται σε **υδρόφιλα** ή **υδρόφοβα** αντίστοιχα, ενώ εάν και πώς ιονίζονται σε pH 6-7 τα πολικά κατατάσσονται σε **ουδέτερα**, σε **όξινα** ή σε **βασικά**. Όσων πολικών αμινοξέων οι ομάδες R- δεν ιονίζονται σε pH 6-7 καθώς βέβαια και όλα τα υδρόφοβα αμινοξέα, από οξεοβασικής σκοπιάς είναι ουδέτερα.

Στις πρωτεΐνες, λοιπόν, ενσωματώνονται τα εξής αμινοξέα [1] :

Πίνακας 3.1. Τα 20 φυσικά αμινοξέα που υπάρχουν στις πρωτεΐνες.

Όνομα	Παράπλευρη αλυσίδα R	Συντομογραφία	Συμβολισμός
<i>A. Αμινοξέα με μη πολικές υδρόφοβες ομάδες R</i>			
Αλανίνη	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Ala	A

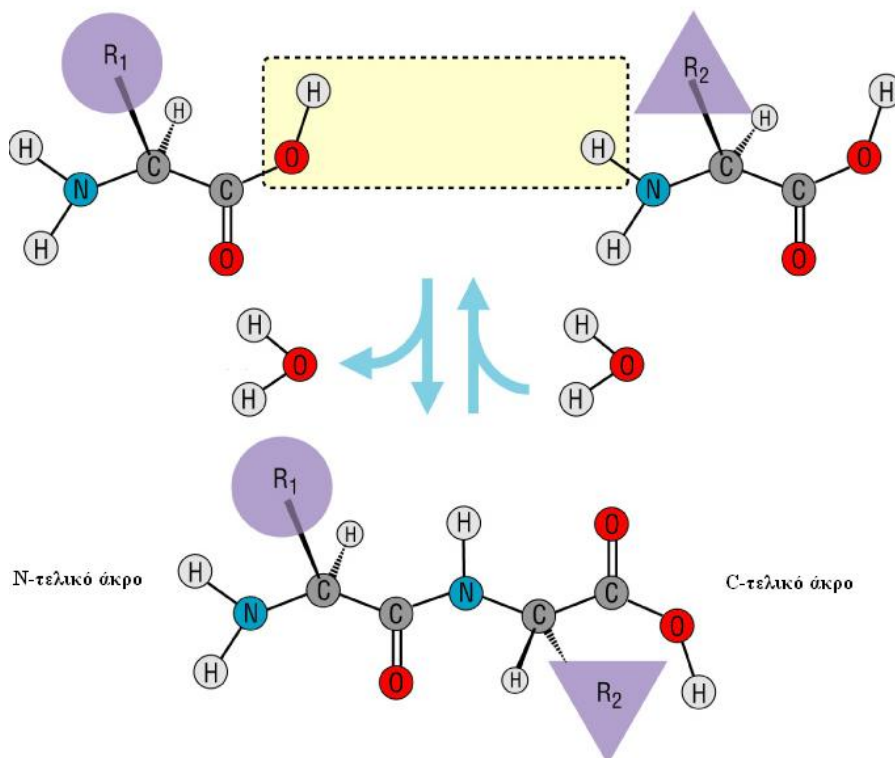
Βαλίνη		Val	V
Λευκίνη		Leu	L
Ισολευκίνη		Ile	I
Μεθειονίνη		Met	M
Φαινυλαλανίνη		Phe	F
Τρυπτοφάνη		Trp	W
Προλίνη		Pro	P
B. Αμινοξέα με μη φορτισμένες πολικές ή υδρόφιλες ομάδες R			
Γλυκίνη		Gly	G
Σερίνη		Ser	S

Θρεονίνη	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	Thr	T
Κυστεΐνη	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $	Cys	C
Ασπαραγίνη	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	Asn	N
Γλουταμίνη	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	Gln	Q
Τυροσίνη	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array} $	Tyr	Y
<i>Γ. Αμινοξέα με αρνητικά φορτισμένη ομάδα R σε pH 6-7 (όξινα αμινοξέα)</i>			
Γλουταμινικό οξύ	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	Glu	E
Ασπαραγινικό οξύ	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	Asp	D
<i>Γ. Αμινοξέα με θετικά φορτισμένη ομάδα R σε pH 6-7 (βασικά αμινοξέα)</i>			
Λυσίνη	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	Lys	K

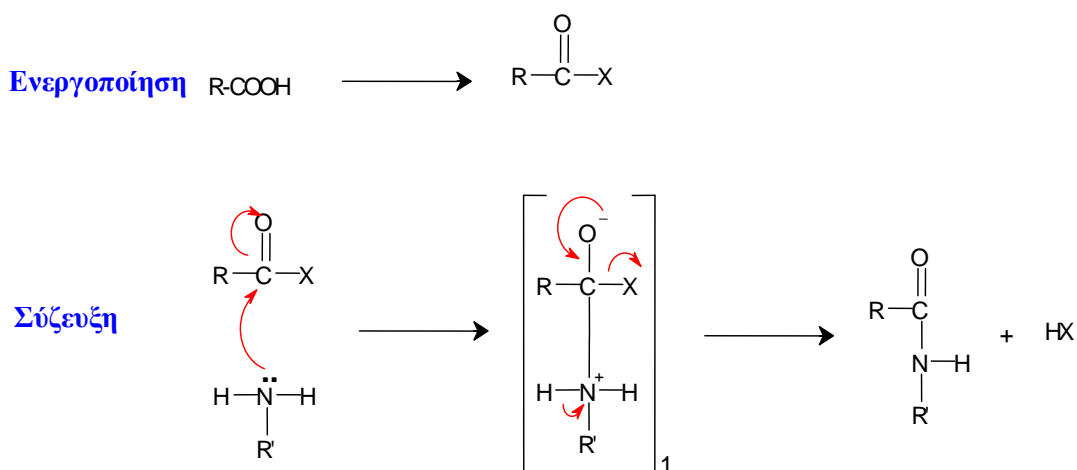
Αργινίνη	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	Arg	R
Ιστιδίνη	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Imidazole ring} \end{array} $	His	H

3.3 ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ

Ο πεπτιδικός δεσμός [2] είναι ένας αμιδικός δεσμός και σχηματίζεται από την καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέος και την αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέος μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης προσβολής με την ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου H_2O .



Η ισορροπία της παραπάνω αντίδρασης είναι μετατοπισμένη προς την πλευρά της υδρόλυσης κατά την οποία έχουμε απελευθέρωση ενέργειας. Προς την πλευρά σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού απαιτείται κατανάλωση ενέργειας (ενδόθερμη αντίδραση, περίπου 4Kcal/mol). Με την ανάμιξη δύο αμινοξέων σε διάλυμα, σε θερμοκρασία δωματίου, ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού είναι θερμοδυναμικά ανέφικτος, καθώς απαιτούνται πολύ δραστικές συνθήκες (υψηλές θερμοκρασίες). Κάτι τέτοιο όμως δεν ενδείκνυται καθώς τα αμινοξέα είναι πολύ ευαίσθητες ενώσεις και σε τέτοιες συνθήκες καταστρέφονται. Συνήθως γίνεται ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του άμινο-τελικού αμινοξέος. Για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου το υδροξύλιο αντικαθίσταται με μία ομάδα δέκτη (-X) ηλεκτρονίων. Αποτέλεσμα της αντικατάστασης αυτής είναι η αύξηση του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του ατόμου του άνθρακα του καρβονυλίου και η διευκόλυνση της πυρηνόφιλης αντίδρασης [3].

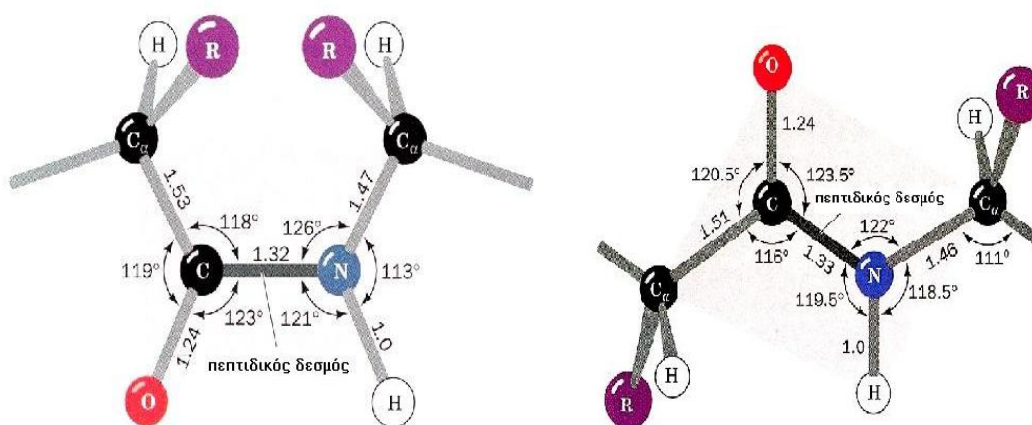


Όπως είναι φανερό, η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου δεν επαρκεί αφού στην παραπάνω αντίδραση θα μπορούσαν να συμμετέχουν διάφορες ομάδες, όπως η α-αμινομάδα του N-τελικού αμινοξέος και η α-καρβοξυλομάδα του C-τελικού αμινοξέος, καθώς επίσης και οι δραστικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων. Το γεγονός αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη παράλληλα και ανεπιθύμητων προϊόντων. Το παραπάνω πρόβλημα λύνεται με τη χρήση κατάλληλων παραγώγων των αμινοξέων, προστατευμένων με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει μόνο ένας τρόπος αντίδρασης, αυτός για το σχηματισμό του επιθυμητού πεπτιδίου. Τέλος ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην αποφυγή της ρακεμίσωσης κατά τη διάρκεια της σύζευξης καθώς όλα τα αμινοξέα, εκτός της Gly, περιέχουν ένα ασύμμετρο α-άτομο άνθρακα.

Είναι φανερό λοιπόν πως η πεπτιδική σύνθεση αποτελεί μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, όπου πολλοί παράγοντες πρέπει να ρυθμίζονται και να λαμβάνονται υπόψη.

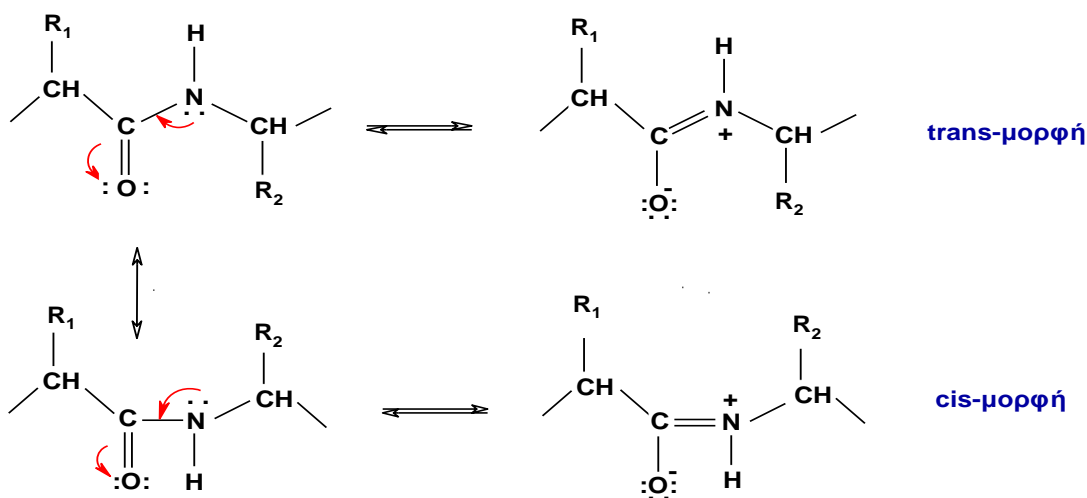
3.4 ΣΤΕΡΕΟΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ

Κρυσταλλογραφικές μελέτες από τους Linus Pauling και Robert Corey έδειξαν ότι το μήκος του δεσμού C-N είναι αισθητά μικρότερο στον πεπτιδικό δεσμό, 1.32Å, από ότι σε έναν απλό δεσμό C-N, 1.47Å [4], γεγονός που υποδεικνύει πως ο πεπτιδικός δεσμός συμπεριφέρεται κατά το ήμισυ ως διπλός δεσμός.



Σχήμα 3.2 : Cis και trans διαμόρφωση του πεπτιδικού δεσμού από κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Τα μήκη των δεσμών δίνονται σε Å και οι γωνίες σε μοίρες.

Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μεσομέρεια του πεπτιδικού δεσμού, η οποία περιορίζει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον δεσμό C-N και διαμορφώνει δύο ισομερείς μορφές.



Σχήμα 3.3 : Μεσομέρεια των cis και trans μορφών του πεπτιδικού δεσμού.

Στα φυσικά πεπτίδια και πρωτεΐνες προτιμάται η trans διαμόρφωση καθώς είναι και η πιο σταθερή θερμοδυναμικά δομή. Εξαιρέσεις αποτελούν το αμινοξύ της προλίνης, όπου ο πεπτιδικός δεσμός μπορεί να πάρει εξίσου τη cis και trans μορφή, καθώς και ορισμένα μη φυσικά αμινοξέα (π.χ. σαρκοσίνη).

3.5 ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

Η σύνθεση πεπτιδίων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη πολλές παράμετροι, όπως η επιλογή των συνθηκών καθώς και η χρησιμοποίηση των κατάλληλων αντιδραστηρίων. Μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε στερεή είτε σε υγρή φάση. Η σύνθεση σε υγρή φάση παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα και δυσκολίες και αποτελεί μια από τις πρώτες μεθόδους που αναπτύχθηκε. Σε κάθε βήμα της είναι αναγκαία η απομόνωση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων προϊόντων καθιστώντας την όλη διαδικασία αρκετά επίπονη και χρονοβόρα, ακόμα και στην περίπτωση σύνθεσης μικρών πεπτιδίων. Με την εισαγωγή από τον Merrifield της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση (solid phase peptide synthesis, SPPS) τα παραπάνω προβλήματα ξεπεράστηκαν.

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

- **Παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος** με κατάλληλη ομάδα X. Αυτή η ομάδα θα πρέπει να μειώνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της αμινομάδας, να την αδρανοποιεί κατά τη διάρκεια της σύζευξης και να είναι σταθερή στις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται. Επίσης πρέπει να απομακρύνεται εκλεκτικά και εύκολα μετά το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, σε κατάλληλες συνθήκες που να μην τον επηρεάζουν. Επιπλέον οι ομάδες αυτές θα πρέπει να μην ευνοούν τη ρακεμίσωση του αμινοξέος. Οι κυριότερες ομάδες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την προστασία των α-αμινομάδων είναι η t-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc) [5, 6], η 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc) [7], η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z) [8] από τους Bergman και Ζέρβα το 1932 που αποτέλεσε σταθμό στην εξέλιξη της πεπτιδικής σύνθεσης, η τριφαινυλομάδα (Tft) [9-11], η διφαινυλοϊσοπροπυλοξυκαρβονυλομάδα (Bpsc) [12, 13] κ.λ.π.
- **Παροδική προστασία του α-καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος** με κατάλληλη ομάδα Y. Η προστασία αυτή γίνεται συνήθως με εστεροποίηση της καρβοξυλομάδας (μεθυλ-,

αιθυλ-, t-βουτυλ-, ή βενζυλ-εστέρας). Η προστασία αυτή είναι απαραίτητη στη σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα, ενώ στην περίπτωση σύνθεσης σε στερεή φάση, το καρβοξύλιο του C-τελικού αμινοξέος είναι συζευγμένο με το στερεό πολυμερές.

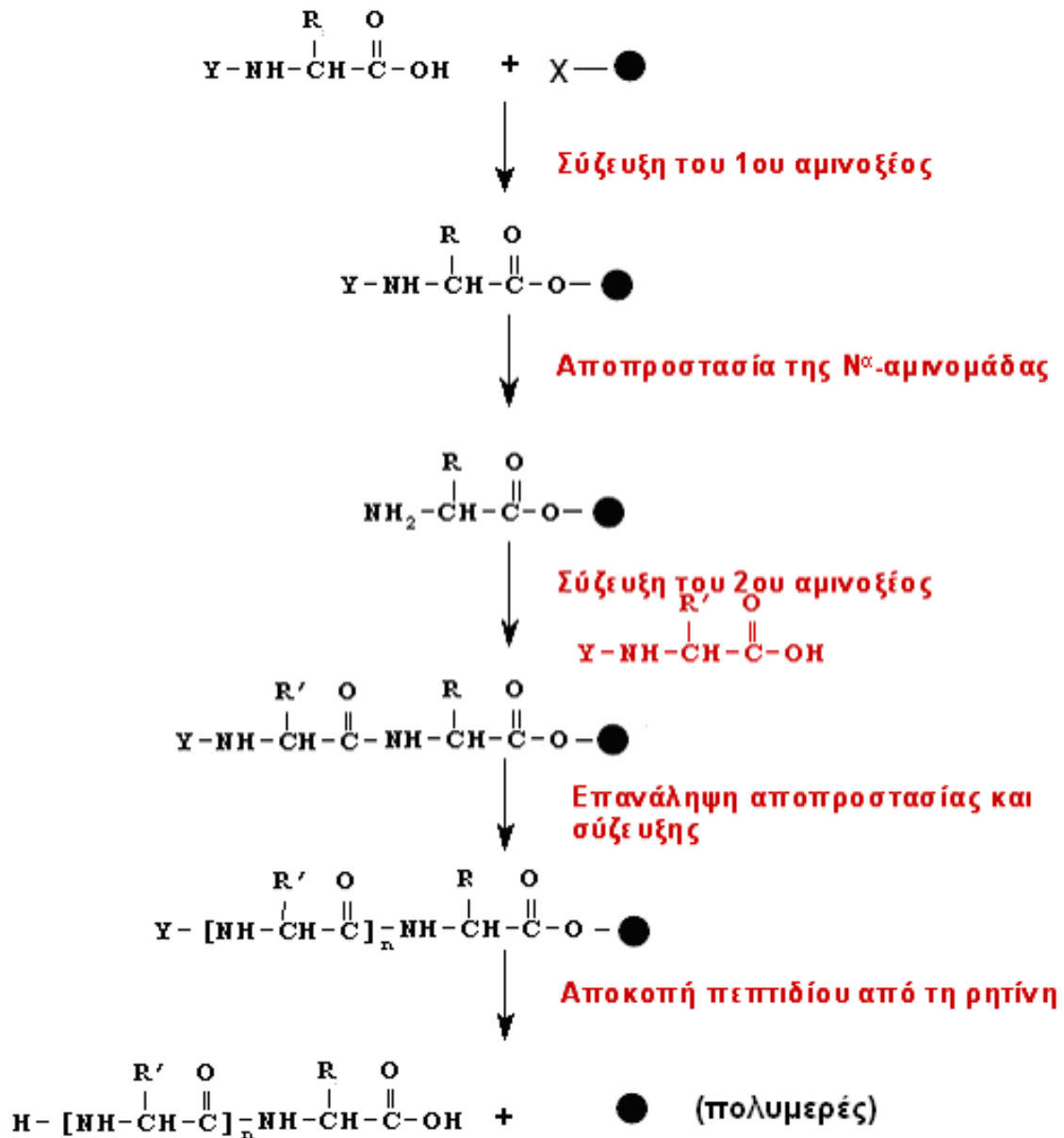
- **Παροδική προστασία των δραστικών ομάδων** που πιθανόν να υπάρχουν στις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων. Τέτοιες δραστικές ομάδες είναι η ε-NH₂ της Lys, το β-COOH του Asp, η γουανιδομάδα της Arg, η -SH της Cys, η -OH της Ser, Tyr και Thr κ.λ.π.

- **Σχηματισμός του αμιδικού δεσμού.** Ο σχηματισμός του επιτυγχάνεται με την **ενεργοποίηση** του καρβοξυλίου του N-τελικού αμινοξέος και **σύζευξη** με την αμινομάδα του άλλου αμινοξέος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου είναι: μέθοδος χλωριδίων, των αζιδίων, των μικτών ανυδριτών, των ενεργών εστέρων, καθώς επίσης και η μέθοδος με τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων σύζευξης.

- **Απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων**, μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, με κατάλληλο τρόπο ώστε να μην καταστρέφονται οι πεπτιδικοί δεσμοί και να λαμβάνεται το πεπτίδιο στην ελεύθερη μορφή του.

3.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ

Σταθμό στην εξέλιξη της πεπτιδικής σύνθεσης αποτέλεσε η ανάπτυξη της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεό υπόστρωμα (solid phase peptide synthesis, SPPS) [14-16] από τον R. B. Merrifield (1963). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο η καρβοξυλομάδα του N-προστατευμένου C-τελικού αμινοξέος, του πεπτιδίου που πρόκειται να συντεθεί, προσδένεται ομοιοπολικά σε ένα αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα (ρητίνη). Η συνεχής αποπροστασία της α-αμινομάδας και εισαγωγή του επόμενου N-προστατευμένου αμινοξέος με ενεργοποιημένο το καρβοξύλιο του οδηγεί στη σύνθεση της επιθυμητής πεπτιδικής αλληλουχίας (από το C-τελικό προς το N-τελικό άκρο). Η περίσσεια των αντιδρώντων, καθώς και τα παραπροϊόντα σε κάθε στάδιο αποπροστασίας και σύζευξης απομακρύνονται με εκπλύσεις του πεπτιδίου-πολυμερούς με κατάλληλους οργανικούς διαλύτες και διηθήσεις. Όταν η σύνθεση ολοκληρωθεί με επεξεργασία με κατάλληλο αντιδραστήριο γίνεται η απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη με παράλληλη απομάκρυνση τυχόν προστατευτικών ομάδων (ημιμόνιμη προστασία) των πλευρικών αλυσίδων. Η γενική πορεία της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση παρουσιάζεται στο (Σχήμα 3.4).



● : πολυμερικό υπόστρωμα

X : linker

Y : προστατευτική ομάδα N^α-αμινομάδας

Σχήμα 3.4 : Διάγραμμα πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση.

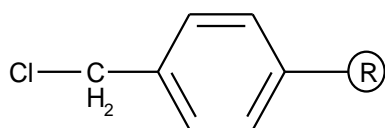
3.7 ΣΤΕΡΕΟ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (ΡΗΤΙΝΗ)

Το στερεό πολυμερικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (SPPS) πρέπει να πληρεί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- Να αποτελείται από σωματίδια κατάλληλου σχήματος και μεγέθους, τα οποία να φέρουν δραστικές ομάδες, στις οποίες η πεπτιδική αλυσίδα να μπορεί να προσκολληθεί εύκολα με σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού και στο τέλος της σύνθεσης να μπορεί να αποκοπεί εξίσου εύκολα.
- Πρέπει να έχει αρκετά σημεία πρόσδεσης έτσι ώστε να λαμβάνονται ικανοποιητικές αποδόσεις και να ελαχιστοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων που είναι προσκολλημένα στα σημεία αυτά.
- Ένα επίσης σημαντικό στοιχείο είναι ότι η ρητίνη πρέπει να είναι αδιάλυτη στους διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην SPPS καθώς επίσης και να μην αντιδρά με αυτά.
- Να διογκώνεται με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην SPPS και να επιτρέπει την εύκολη διείσδυση των αντιδραστηρίων στα σωματίδια καθώς και την εύκολη απομάκρυνση της περίσσειας αυτών και των παραπροϊόντων της αντίδρασης με απλή έκπλυση και διήθηση.

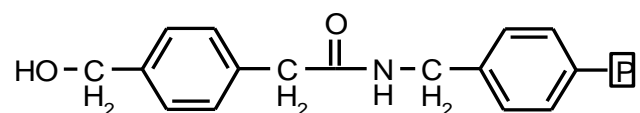
3.7.1 Ρητίνες για τη σύνθεση πεπτιδίων με την Boc-στρατηγική

1. Ρητίνη Merrifield



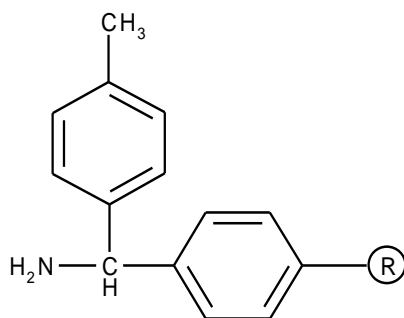
Η ρητίνη του Merrifield [17,18] αποτελεί ένα χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων μικρού ή μεσαίου μεγέθους, καθώς ο εστερικός δεσμός του πεπτιδίου με την ρητίνη δεν είναι πολύ σταθερός σε επαναλαμβανόμενη κατεργασία με TFA. Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο μετά την αποκοπή του από τη ρητίνη με κατεργασία με ισχυρά οξέα (συνήθως HF).

2. PAM ρητίνη



Για τη σύνθεση μεγαλύτερων πεπτιδίων χρησιμοποιείται η Pam ρητίνη [19, 20], γνωστή και ως φαινυλοακεταμιδομεθυλ-ρητίνη. Η παρουσία μιας ηλεκτρονιοελκτικής ακεταμιδοομάδας σε παρα-θέση στο βενζολικό δακτύλιο, αυξάνει τη σταθερότητα του εστερικού δεσμού περισσότερο από 100 φορές σε σύγκριση με τη ρητίνη Merrifield. Η αποκοπή γίνεται με HF και το πεπτίδιο λαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο.

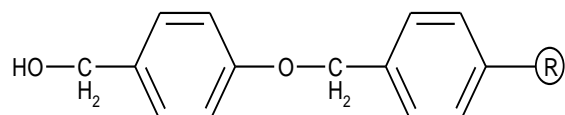
3. MBHA ρητίνη



Για τη σύνθεση πεπτιδίων στην αμιδική μορφή (-CONH₂) χρησιμοποιείται ευρύτατα η 4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη (MBHA) ρητίνη [21]. Η αποκοπή του πεπτιδίου γίνεται με άνυδρο HF.

3.7.2 Ρητίνες για τη σύνθεση πεπτιδίων με την Fmoc-στρατηγική

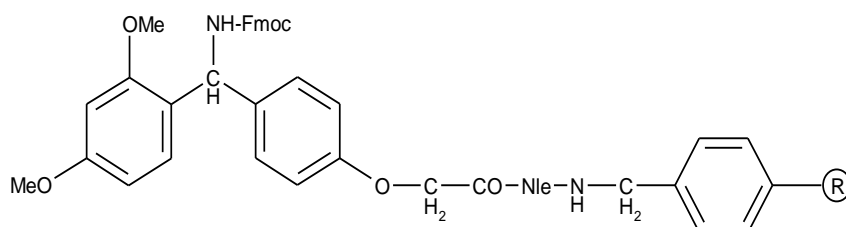
1. Wang ρητίνη



Στην Wang ρητίνη (p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη) [22, 23] τα πεπτίδια που λαμβάνονται έχουν ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο. Η πρόσδεση του πεπτιδίου με τη ρητίνη γίνεται μέσω ενός εστερικού δεσμού που έχει έναν άλκοξυ ηλεκτρονιοδότη υποκαταστάτη στην

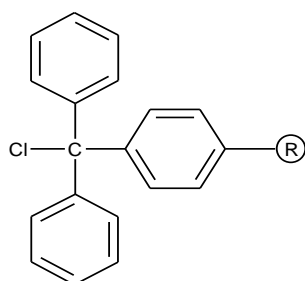
πάρα-θέση, για αυτό η αποκοπή του από το στερεό πολυμερές γίνεται κάτω από ήπιες συνθήκες (χρήση TFA).

2. Rink amide AM ρητίνη



Η Rink Amide ρητίνη {4-(2',4'-διμεθοξυφαινυλ-9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο-αμινομεθυλο)-φαινοξυακεταμιδο-μεθυλο ρητίνη} [24] χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων στην αμιδική μορφή τους. Η ρητίνη φέρει μια πρόσθετη ομάδα (linker), η οποία είναι ευαίσθητη στα οξέα, οπότε η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη μπορεί να γίνει με TFA.

3. 2-χλωροτριτυλο ρητίνη

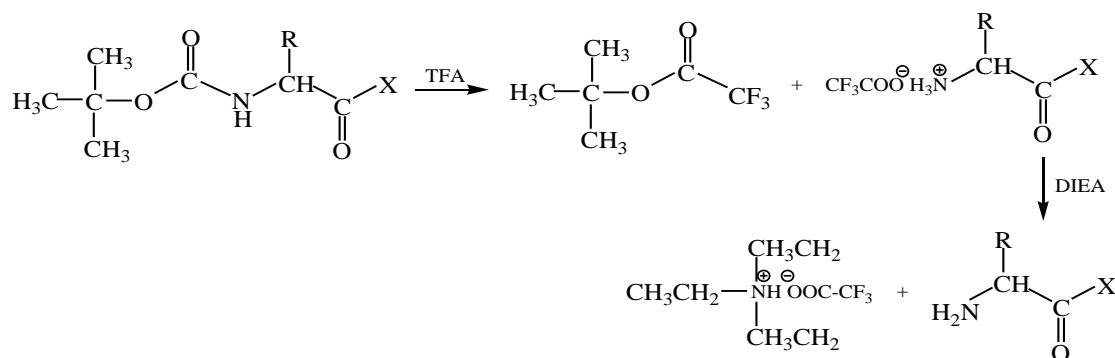


Η 2-χλωροτριτυλο ρητίνη [25, 26] λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της στα οξέα, επιτρέπει την αποκοπή του πεπτιδίου από αυτή με κατεργασία με 0.5-1% TFA ή AcOH/TFE/DCM (2:6:6). Τα πεπτίδια που λαμβάνονται έχουν το C-τελικό αμινοξύ με ελεύθερο το καρβοξύλιο. Το συνδεδεμένο στο πολυστυρόλιο, 2-χλωρο-τριφαινύλιο μεθυλοχλωρίδιο παρουσιάζει στερεοχημική παρεμπόδιση αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό το σχηματισμό δικετοπιπεραζίνης [27]. Επιπρόσθετα η σύνδεση του πρώτου αμινοξέος με τη ρητίνη γίνεται πολύ εύκολα σε ήπιες συνθήκες (DIEA/DCM) και σε πολύ μικρό χρόνο. Το γεγονός αυτό αποτρέπει τη ρακεμίωση αμινοξέων όπως η His και η Cys.

3.8 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ N^α-ΑΜΙΝΟΜΑΔΑΣ

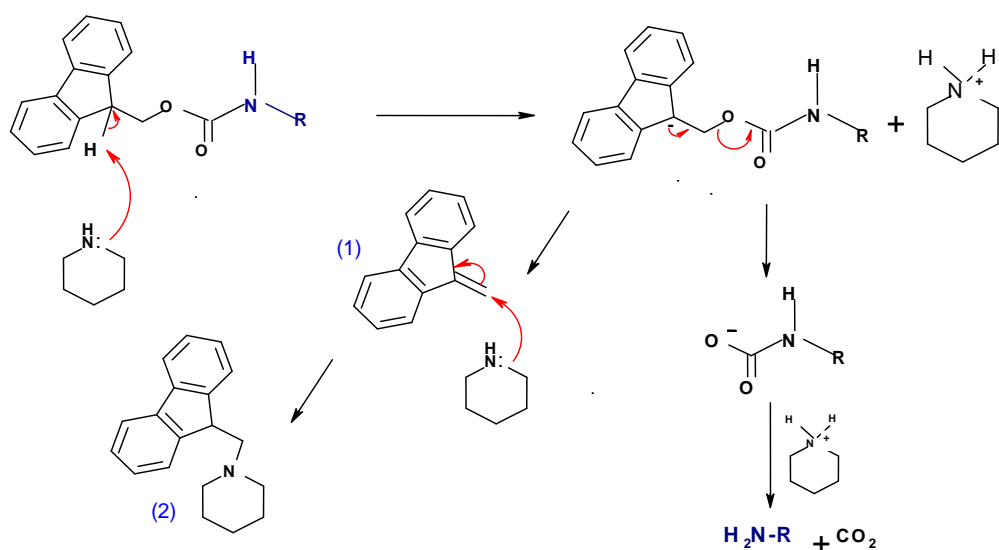
Για την παροδική προστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης χρησιμοποιούνται συνήθως η tert-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc-ομάδα) [28, 29] και η 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc-ομάδα) [30].

Η Boc-ομάδα είναι ευαίσθητη στα οξέα και η απομάκρυνσή της γίνεται με τριφθοροξικό οξύ (TFA) σε διχλωρομεθάνιο (DCM) (40% v/v). Με αυτή την κατεργασία, η α-αμινομάδα λαμβάνεται ως άλας του τριφθοροξικού οξέος το οποίο εξουδετερώνεται με διάλυμα διϊσοπροπυλαιθυλαμίνης (DIEA) σε διχλωρομεθάνιο (DCM) (7-10% v/v) (Σχήμα 3.5). Οι προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων απομακρύνονται στο τέλος της σύνθεσης με χρήση πολύ ισχυρών οξέων πχ. υγρό υδροφθόριο (HF).



Σχήμα 3.5 : Αντίδραση απομάκρυνσης της Boc-προστατευτικής ομάδας.

Η Fmoc ομάδα είναι ασταθής σε διαλύματα δευτεροταγών αμινών και για την απομάκρυνσή της χρησιμοποιείται διάλυμα πιπεριδίνης 20% σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Ο μηχανισμός της απομάκρυνσής της φαίνεται στο (Σχήμα 3.6). Το διφαινυλοφουλβένιο (1) αντιδρά με τη δευτεροταγή αμίνη και δίνει σταθερή τριτοταγή βάση (2).



Σχήμα 3.6 : Αντίδραση απομάκρυνσης της Fmoc-προστατευτικής ομάδας.

Οι προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων απομακρύνονται με ήπια οξέα, όπως είναι το τριφθοροξικό οξύ (περίπου 95%) κατά την διάρκεια της αποκοπής του πεπτιδίου από την ρητίνη.

3.9 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ-ΟΡΘΟΓΩΝΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως η επιλογή των κατάλληλων προστατευτικών ομάδων διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην πεπτιδική σύνθεση. Η N^{α} προστατευτική ομάδα θα πρέπει να απομακρύνεται εκλεκτικά σε συνθήκες τέτοιες, ώστε να μην επηρεάζονται οι παράπλευρες προστασίες (ορθογωνική προστασία). Για παράδειγμα ο βενζυλεστέρας στο β -καρβοξύλιο του Asp και ο t-βουτυλοξυκαρβονυλο καρβαμιδικός εστέρας της α -αμινομάδας του ίδιου αμινοξέος αποτελούν ορθογωνική προστασία γιατί η κάθε μία μπορεί να απομακρυνθεί από το Asp χωρίς να επηρεάζεται η άλλη.

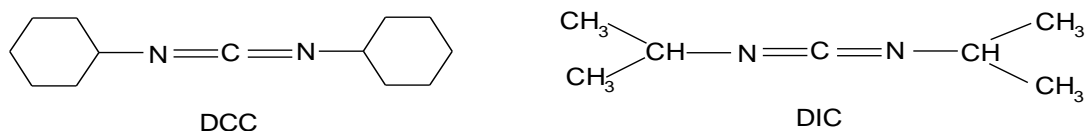
Πίνακας 3.2. Οι συνηθέστερες ορθογωνικές προστασίες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης.

Αμινοξύ	Boc-στρατηγική	Fmoc-στρατηγική
Arg	Mts[31], Tos[32]	Mtr[44], Pbf[45], Pmc[46], Trt
Asn Gln	Trt[9-11], Xan[33]	Trt
Asp Glu	Obzl[34], Alloc, OcHx[35]	OtBu[47], Oallyl[48]
Cys	Acm[36], Trt, pMe-Bzl[37]	Acm, tBu, Trt
His	Bom[38], Tos[39], Dnp[40], Z	Boc, Trt
Lys	Fmoc, Z[8], 2Cl-Z[41]	Boc, Fmoc, Alloc[49], ivDde[50]
Ser Thr	Bzl[42]	tBu, Trt
Trp	For[43], Mts	Boc
Tyr	Bzl, 2,6-di-Cl-Bzl, 2-Br-Z	tBu

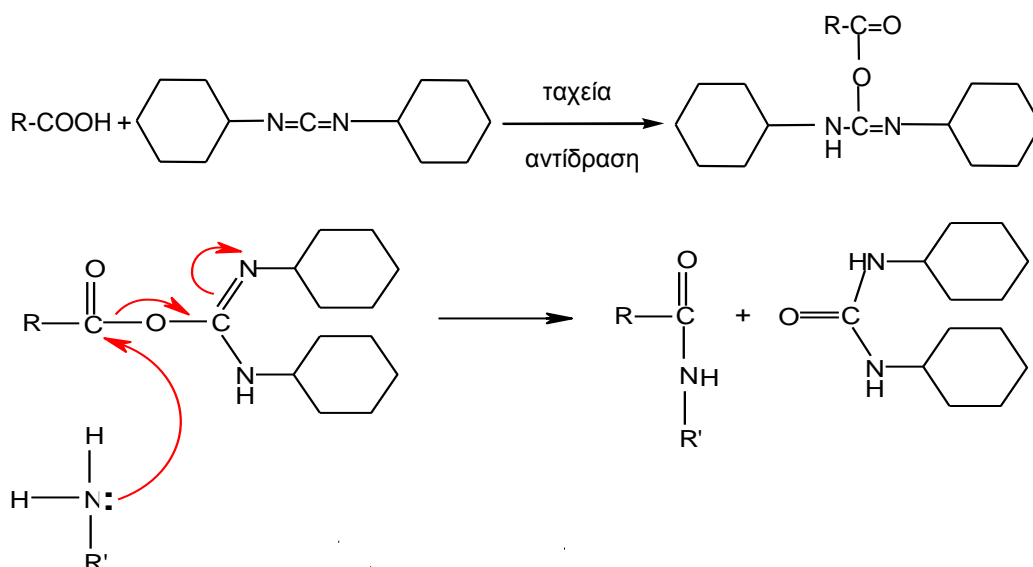
3.10 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ

Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους, όπως είναι αυτή των χλωριδίων, των αζιδίων, των μικτών ανυδριτών, των ενεργών εστέρων και των αντιδραστηρίων σύζευξης. Η περισσότερο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η τελευταία λόγω της απλότητάς της και της ταχύτητάς της εφόσον ενεργοποίηση και σύζευξη λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα (in situ coupling reagents). Τα κυριότερα αντιδραστήρια σύζευξης είναι τα καρβοδιϊμίδια. Τα καρβοδιϊμίδια εισήχθησαν από τον Sheehan και Hess το 1955. Ιδιαίτερα η εισαγωγή του N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου

(DCC) [51,52] ως αντιδραστήριο σύζευξης για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, ήταν ένα σημαντικό γεγονός στην ιστορία της πεπτιδικής σύνθεσης. Πρόσφατα χρησιμοποιείται ένα νέο βελτιωμένο καρβοδιμίδιο, το διϊσοπροπυλοκαρβοδιμίδιο (DIC) [53] που πλεονεκτεί έναντι του DCC επειδή δίνει υδατοδιαλυτό παραπροϊόν και όχι δυσδιάλυτη ουρία.



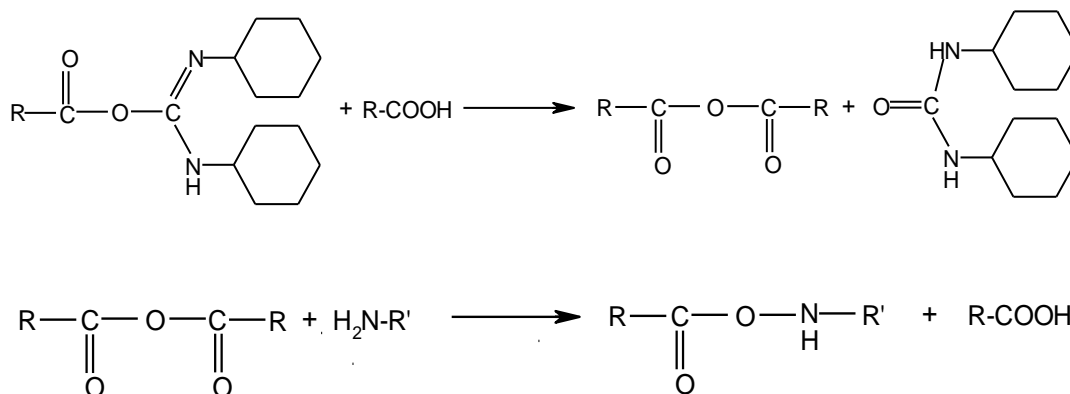
Ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης με το DCC φαίνεται στο **Σχήμα 3.7**.



Σχήμα 3.7 : Πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας του αμινοξέος που θα ακυλωθεί στον καρβονυλικό άνθρακα της O-ακυλο-ισοουρίας και σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού.

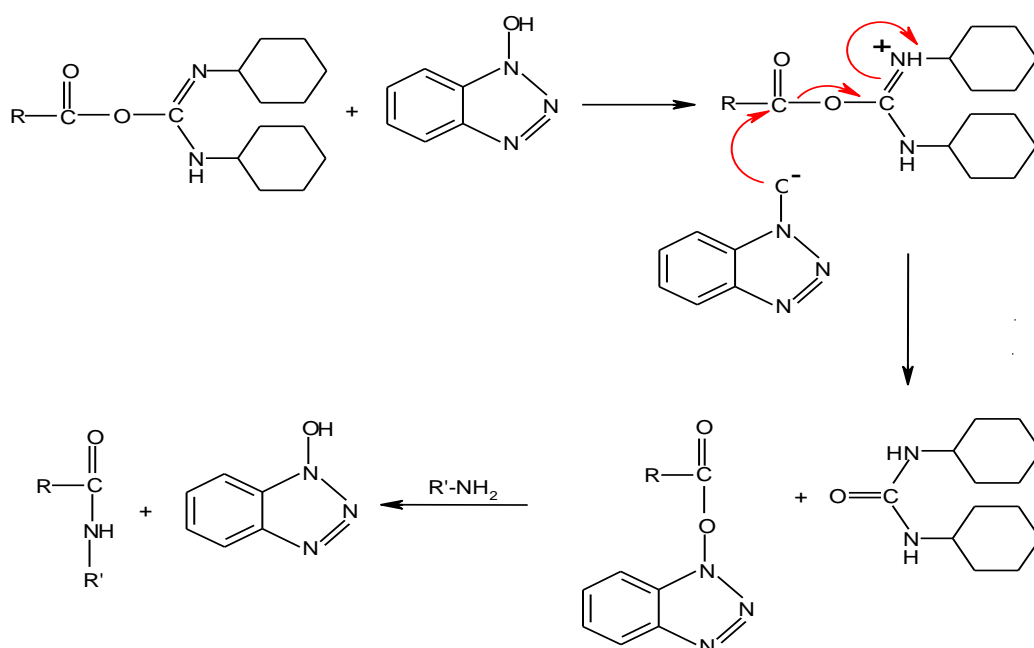
Στο πρώτο στάδιο, το καρβοξύλιο του N^α-προστατευμένου αμινοξέος προσβάλλει τον δεσμό N=C του DCC και προκύπτει το ενδιάμεσο O-ακυλο-ισοουρία. Στην συνέχεια, πυρηνόφιλη προσβολή του αμινο-συστατικού στο ενδιάμεσο αυτό οδηγεί στο σχηματισμό του πεπτιδίου και στην παραγωγή του παραπροϊόντος N,N-δικυκλοεξυλοουρία. Η O-ακυλο-ισοουρία μπορεί να αντιδράσει με ένα ακόμα μόριο καρβοξυλικού οξέος σχηματίζοντας ένα συμμετρικό ανυδρίτη (**Σχήμα 3.8**), ο οποίος στη συνέχεια αντιδρά με το άμινο συστατικό προς σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η πιθανή ρακεμοποίηση λόγω της μεγάλης ενεργοποίησης του δραστικού ενδιάμεσου παραγώγου καθώς και ο σχηματισμός της μη δραστικής N-ακυλοουρίας μέσω ενδομοριακής O→N μετάθεσης στην O-ακυλο-ισοουρία.



Σχήμα 3.8 : Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού, χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης DCC, μέσω συμμετρικών ανυδριτών.

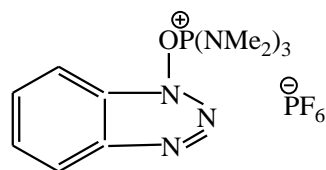
Η ρακεμοποίηση και ο σχηματισμός της N-ακυλοουρίας μπορούν να ελαττωθούν με την προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων, όπως το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο (HOBt) [54]. Η προσβολή της πρόσθετης αυτής ουσίας επί του ενεργού ενδιάμεσου παραγώγου, οδηγεί στο σχηματισμό του O-ακυλο-1-υδροξυβενζοτριάζολιου, το οποίο είναι ένα ισχυρό ακυλιωτικό μέσο (Σχήμα 3.9).



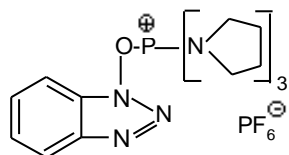
Σχήμα 3.9 : Προσθήκη 1-HOBt στο μίγμα της αντίδρασης οδηγεί στο σχηματισμό του Ο-ακυλο-HOBt, ενός πολύ ισχυρού ακυλιωτικού μέσου.

Η παρουσία ενός δεύτερου πυρηνόφιλου στο μίγμα της αντίδρασης, μειώνει τη συγκέντρωση και το χρόνο ζωής της Ο-ακυλο-ισουουρίας, περιορίζοντας κατά συνέπεια την έκταση της Ο→Ν ακυλο-μετατόπισης που οδηγεί στο σχηματισμό των παραγώγων της Ν-ακυλοουρίας και ως εκ τούτου την έκταση της ρακεμοποίησης. Ακόμα το HOBt σαν ασθενές οξύ εμποδίζει την αφαίρεση πρωτονίου από το οπτικώς ενεργό άτομο άνθρακα και έτσι συμβάλλει με ένα δεύτερο τρόπο στη διατήρηση της οπτικής καθαρότητας. Το HOBt αναγεννάται κατά τη διάρκεια της ακυλίωσης και έτσι η συγκέντρωσή του παραμένει σχεδόν σταθερή κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Εκτός από τα καρβοδιϊμίδια, στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση χρησιμοποιούνται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια φωσφονικά ή ουρονικά παράγωγα ως αντιδραστήρια σύζευξης.

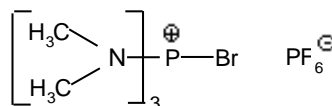
Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα BOP [55], PyBOP [56] και BroP [57]. Το BOP, παρά τα πλεονεκτήματά του, όπως μικρό ποσοστό ρακεμοποίησης και σύντομος χρόνος σύζευξης, είναι πολύ τοξικό οπότε και αντικαταστάθηκε από το PyBOP.



BOP

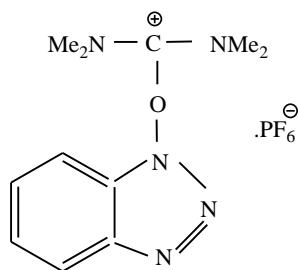


PyBOP

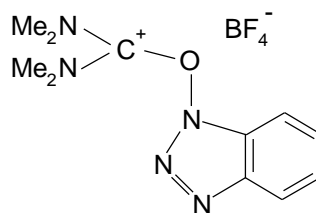


BroP

Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν το ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (HBTU) [58] και το ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραφθοροβορικό άλας (TBTU) [59].



HBTU

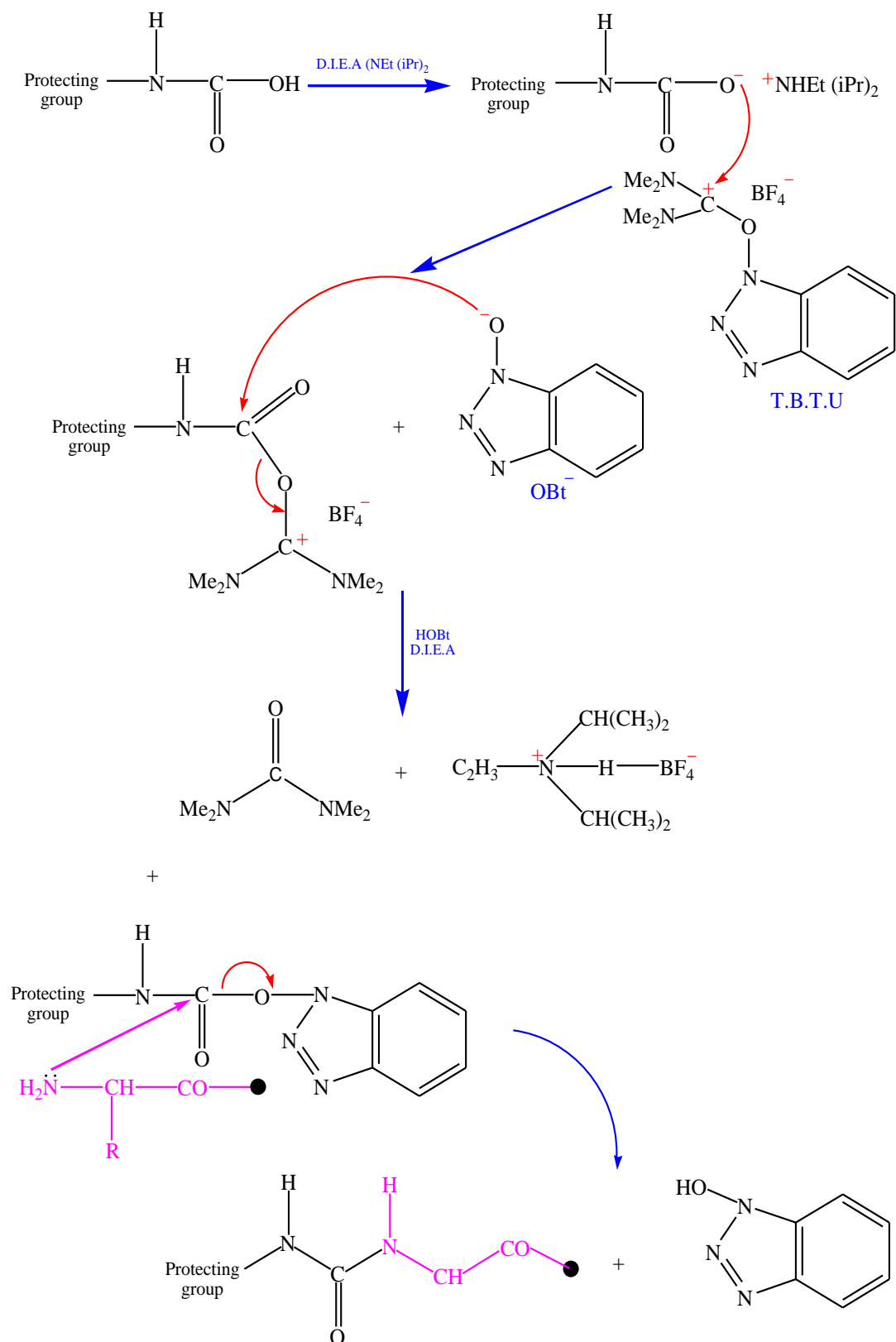


TBTU

Πλεονεκτήματα αυτών των νέων, βελτιωμένων αντιδραστηρίων σύζευξης είναι το πολύ μικρό ποσοστό ρακεμοποίησης, ο μικρός χρόνος της αντίδρασης (~15min) και οι υψηλές αποδόσεις. Στο **Σχήμα 3.10** φαίνεται ένας προτεινόμενος μηχανισμός για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού με τη χρήση των αντιδραστηρίων TBTU και HOBt.

Αντίθετα με τα καρβοδιίμια και τα φωσφορικά άλατα, τα ουρονικά παράγωγα αντιδρούν με την αμινομάδα στις συνθήκες που διεξάγεται συνήθως η πεπτιδική σύνθεση σχηματίζοντας τετραμεθυλογουανιδίνο παράγωγα. Μη αντιστρεπτή δέσμευση του αμινο-συστατικού έχουμε όταν το αντιδραστήριο προστίθεται απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης. Για να αποφευχθεί αυτό, η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου με τα ουρονικά αντιδραστήρια

πρέπει να λαμβάνει χώρα πριν από την προσθήκη αυτού στο μίγμα της αντίδρασης για την πραγματοποίηση της σύζευξης.



Σχήμα 3.10 : Προτεινόμενος μηχανισμός για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού με τη χρήση των αντιδραστηρίων TBTU, HOBT.

3.11 ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΡΗΤΙΝΗ

Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση του πεπτιδίου πάνω στο στερεό πολυμερές ακολουθεί η αποκοπή αυτού με τη χρήση κατάλληλου αντιδραστηρίου. Οι συνθήκες πρέπει να είναι τέτοιες που να επιτρέπουν την αποκοπή του πεπτιδίου, χωρίς την καταστροφή του. Η χημική μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως, είναι η επεξεργασία της πεπτιδορητίνης με ισχυρά οξέα. Η επιλογή ενός τέτοιου οξέος εξαρτάται από το είδος της ρητίνης, από τον τρόπο σύνδεσης του C-τελικού αμινοξέος με το πολυμερές καθώς και από το αν θέλουμε το πεπτίδιο να είναι πλήρως, μερικώς ή καθόλου προστατευμένο.

Για την αποκοπή πεπτιδίων που συντίθενται με την Boc-στρατηγική απαιτείται η χρησιμοποίηση πολύ ισχυρών οξέων όπως είναι το υγρό υδροφθόριο (HF), ή το τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ (TFMSA). Για τα πεπτίδια που συντίθενται με την Fmoc-στρατηγική χρησιμοποιούνται για την αποκοπή τους πιο ήπια οξέα όπως είναι το τριφθοροξικό οξύ (TFA). Κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη, γίνεται και η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Ως συνέπεια αυτού, το μίγμα της αντίδρασης αποκοπής είναι πλούσιο σε ηλεκτρονιόφιλες αλκυλιωτικές ομάδες. Για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων του πεπτιδίου με αυτές τις ομάδες, η αποκοπή γίνεται πάντα παρουσία μορίων-παγίδων (scavengers) που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ομάδες αυτές. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μόρια παγίδες είναι η ανισόλη, η φαινόλη και παράγωγα θειολών.

Αποκοπή με τη χρήση υγρού HF: Το HF είναι πολύ τοξικό και ισχυρά διαβρωτικό. Για τους λόγους αυτούς, η διαδικασία πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή και σε ειδική συσκευή. Για την αποκοπή 1g πεπτιδορητίνης απαιτούνται 10ml HF, 1ml ανισόλης και 0,5 g φαινόλης. Ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων του πεπτιδίου προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης και κάποια άλλα μόρια παγίδες [60]. Όταν υπάρχει Met προστίθεται διμεθυλοσουλφίδιο (DMS) για την αποφυγή της οξειδωσης της σε σουλφοξείδιο (MetO). Στην περίπτωση της Tyr, για την αποφυγή C-αλκυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου χρησιμοποιείται θειοανισόλη. Η αντίδραση αφήνεται αρχικά στους -7 έως -10 °C για 30 λεπτά. Αυτό γίνεται για την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων και τη δέσμευσή τους ευκολότερα από τα μόρια παγίδες. Στην συνέχεια, η αντίδραση αφήνεται για 1 ώρα στους 0 °C όπου έχουμε τη αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη. Εάν στο πεπτίδιο υπάρχει Arg(Tos), τότε η αντίδραση αφήνεται για 2 ώρες για την πλήρη απομάκρυνση της Tos-ομάδας.

Αποκοπή με τη χρήση TFA: Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το TFA είναι λιγότερο τοξικό και ισχυρό οξύ από το HF, με αποτέλεσμα η διαδικασία αποκοπής του πεπτιδίου από την ρητίνη να γίνεται εύκολα και γρήγορα. Και σε αυτή την μέθοδο ανάλογα με τα αμινοξέα του πεπτιδίου απαιτείται η χρήση μορίων-παγίδων όπως: ανισόλη, p-κρεζόλη, θειόλες, H₂O, τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS) [61]. Πριν την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη πρέπει να γίνεται η απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας. Ο χρόνος της αντίδρασης αποκοπής ποικίλει ανάλογα με τα αμινοξέα και τις προστατευτικές ομάδες αυτών, από 2 έως 6 ώρες.

3.12 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

3.12.1 Υγρή Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης και Υψηλής Διαχωριστικής ικανότητας RP-HPLC (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography)

Πρόκειται για μια χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό συστατικών ενός μίγματος. Το μίγμα διαλυτοποιείται στον κατάλληλο διαλύτη, εισάγεται σε μια χρωματογραφική στήλη, η οποία περιέχει το κατάλληλο υλικό, ανάλογα με τη φύση των ουσιών που πρόκειται να διαχωριστούν και με τη βοήθεια αντλίας τα συστατικά του μίγματος εκλούνται με κατάλληλο σύστημα έκλουσης (μίγμα διαλυτών) από τη στήλη υπό υψηλή πίεση. Τα συστατικά του μίγματος καθώς εξέρχονται από τη στήλη, διέρχονται στη συνέχεια από τον κατάλληλο ανιχνευτή, οπότε και ανιχνεύονται ως προς κάποια χαρακτηριστική τους ιδιότητα, ενώ τέλος αποτυπώνονται στο καταγραφικό σύστημα ως καμπύλες του Gauss. Η ταυτοποίηση των συστατικών του μίγματος γίνεται με βάση το χρόνο συγκράτησής τους (R_i), ενώ η ποσοτική τους αποτίμηση γίνεται με βάση την καμπύλη αναφοράς.

Τα διάφορα συστατικά του μίγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετική ταχύτητα, εξαιτίας της διαφορετικής αλληλεπίδρασής τους με τη στατική φάση. Ως στατική φάση ορίζεται το υλικό πλήρωσης της στήλης, ενώ ως κινητή φάση το σύστημα των διαλυτών έκλουσης. Με την κατάλληλη επιλογή συστήματος διαλυτών και υλικού πλήρωσης μπορούμε να επέμβουμε στην έκταση αλληλεπίδρασης της διαλυμένης ουσίας με τη στατική ή την κινητή φάση.

Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας ανάμεσα στις δύο φάσεις διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας HPLC : 1) **κανονικής φάσης (NP)** και 2) **αντίστροφης φάσης (RP)**, στα οποία η πολικότητα του διαλύτη είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη από αυτή της στατικής φάσης

αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση διαχωρίζονται πρώτα οι λιγότερο πολικές ενώσεις, καθώς κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα, λόγω μικρότερης έκτασης αλληλεπιδράσεων με τη στατική φάση και εξέρχονται πρώτες από τη στήλη. Το αντίθετο λαμβάνει χώρα στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, όπου πρώτα εξέρχονται από τη στήλη οι περισσότερο πολικές [62].

Η **RP-HPLC** είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική καθαρισμού για πεπτίδια και πρωτεΐνες, εξαιτίας της μεγάλης ανάλυσης που προσφέρει, δηλαδή της μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας που διαθέτει. Αντίθετα με τα μικρά οργανικά μόρια που επιτυγχάνεται μια ισορροπία μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης, τα πεπτίδια απορροφούνται από τη στατική φάση και εκλούνται μόνο όταν η ισχύς της κινητής φάσης υπερνικήσει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που τα συγκρατούν εκεί. Για αυτό το λόγο η σύσταση του συστήματος έκλυσης μεταβάλλεται με το χρόνο, **βαθμωτή έκλυση** (gradient elution).

Η **στατική της φάση** αποτελείται από αλειφατικές αλυσίδες συνήθως 18 ή 8 ατόμων άνθρακα (C_{18} ή C_8) ομοιοπολικά προσδεσμένες σε παράγωγα του διοξειδίου του πυριτίου (silica). Ανάλογα λοιπόν, με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας προστίθεται στην εμπορική ονομασία της στήλης ο συμβολισμός C-8 ή C-18. Όσο πιο υδρόφοβη είναι η σταθερή φάση (μεγάλη ανθρακική αλυσίδα) τόσο πιο ισχυρά συγκρατούνται οι λιπόφιλες ουσίες. Συνεπώς οι υδρόφιλες ουσίες θα εκλούνται πιο γρήγορα από τις λιπόφιλες.

Στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα μεγάλο εύρος οργανικών διαλυτών και υδατικών διαλυμάτων (διαφορετικής ιοντικής ισχύος και pH) με την προϋπόθεση ότι είναι υψηλής καθαρότητας και δεν επηρεάζουν τη χημική σταθερότητα της σταθερής φάσης. Στα πεπτίδια χρησιμοποιούνται συνήθως όξινες συνθήκες μίγματος ακετονιτρίλιου/νερού. Οι όξινες συνθήκες επιτυγχάνονται με την προσθήκη 0,1% (v/v) TFA στο μίγμα της κινητής φάσης. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η χρήση του TFA σε σύγκριση με τα υπόλοιπα οξέα είναι τα εξής:

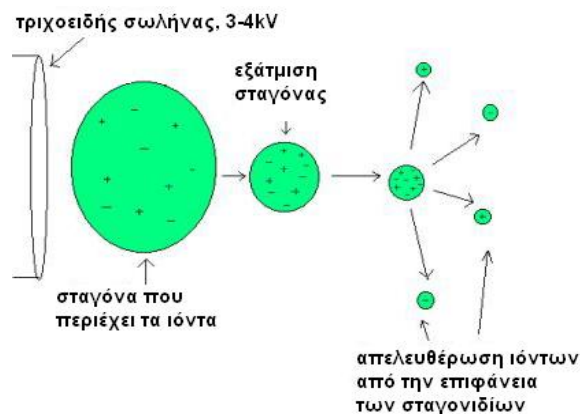
- έχει χαμηλό σημείο ζέση και εύκολα απομακρύνεται,
- απορροφάει σε χαμηλά μήκη κύματος και
- είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο οξύ στην HPLC με πολύ καλά αποτελέσματα.

Για την ανίχνευση των ουσιών του μίγματος χρησιμοποιούνται διάφορων τύπων ανιχνευτές όπως UV, διάθλασης, κλπ. Στη περίπτωση των πεπτιδίων χρησιμοποιείται ευρύτατα ο ανιχνευτής UV στα μήκη κύματος 214-220 nm.

3.12.2 Φασματοσκοπία μάζας (ElectroSpray Ionization Mass Spectroscopy, ESI-MS)

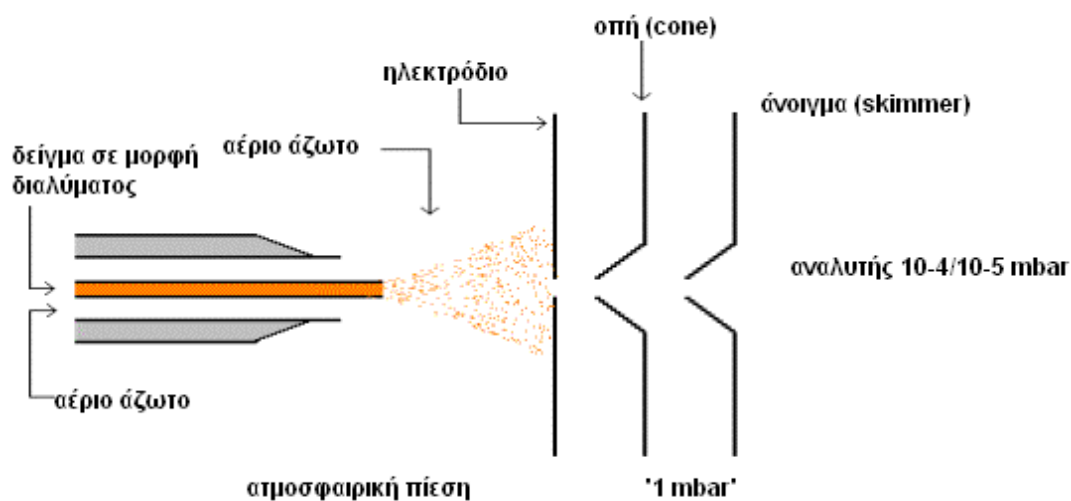
Οι φασματογράφοι μάζας μπορούν να διαιρεθούν σε τρία θεμελιώδη τμήματα: την πηγή ιοντισμού, τον αναλυτή και τον ανιχνευτή. Αρχικά, το υπό εξέταση δείγμα εισάγεται στην πηγή ιοντισμού του οργάνου, όπου τα μόριά του ιονίζονται. Όταν τα ιόντα εισέρχονται στην περιοχή του αναλυτή, διαχωρίζονται σύμφωνα με την αναλογία της μάζας (m) ως προς το φορτίο τους (z), (m/z). Στη συνέχεια, τα διαχωρισμένα ιόντα ανιχνεύονται και καταγράφονται στη μορφή φάσματος. Ο αναλυτής και ο ανιχνευτής του φασματογράφου, και πολύ συχνά η πηγή ιοντισμού, βρίσκονται σε υψηλό κενό για να αποφευχθεί η σύγκρουση των ιόντων με τα μόρια του αέρα κατά μήκος της διαδρομής τους μέσα στο όργανο.

Ανάλογα με τη μέθοδο ιοντισμού του δείγματος που χρησιμοποιείται υπάρχουν διάφοροι τύποι φασματοσκοπίας μάζας. Για την πλειονότητα των βιοχημικών αναλύσεων χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (**ElectroSpray Ionization spectroscopy, ESI-MS**). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το δείγμα σε μορφή διαλύματος, εισέρχεται σε ένα μικρού μήκους ανοξείδωτο σωλήνα, στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται υψηλό θετικό ή αρνητικό ηλεκτρικό πεδίο, 3-5 kV. Κατά την έξοδό του από το σωλήνα, το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί σχεδόν ακαριαία ατμοποίηση και το δείγμα μετατρέπεται σε ένα νέφος μικρών φορτισμένων σταγόνων. Το νέφος αυτό διέρχεται μέσω ενός αγωγού που τα τοιχώματά του θερμαίνονται ελαφρώς για να αποφευχθεί η συμπύκνωσή του. Με τη βοήθεια ενός αερίου, συνήθως αζώτου, ο διαλύτης εξατμίζεται εύκολα και τα σταγονίδια μικραίνουν σε μέγεθος. Εξαιτίας της αρκετά γρήγορης διαδικασίας, δεν επιτυγχάνεται ισορροπία και μια περίσσεια θετικού ή αρνητικού φορτίου διανέμεται στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Έτσι, καθώς τα σταγονίδια γίνονται μικρότερα, η ηλεκτρική πυκνότητα στην επιφάνειά τους αυξάνεται έως ότου οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις Coulomb που επικρατούν να απελευθερώνουν τα ιόντα (**Σχήμα 3.11**).



Σχήμα 3.11 : Διαδικασία ιοντισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού.

Τελικά, τα φορτισμένα ιόντα του δείγματος διέρχονται μέσω μιας οπής (**cone**) σε μια περιοχή διάμεσου κενού, και από εκεί μέσω ενός άλλου ανοίγματος (**skimmer**) στον αναλυτή του φασματογράφου μάζας, που βρίσκεται σε υψηλό κενό. Οι δύο αυτές κωνικές οπές βελτιστοποιούν το διαχωρισμό των ιόντων του δείγματος από τα πολύ ελαφρύτερα ιόντα του διαλύτη, τα οποία διαχέονται στο γύρω χώρο.



Σχήμα 3.12 : Πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.

Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιείται η εξίσωση :

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

όπου,

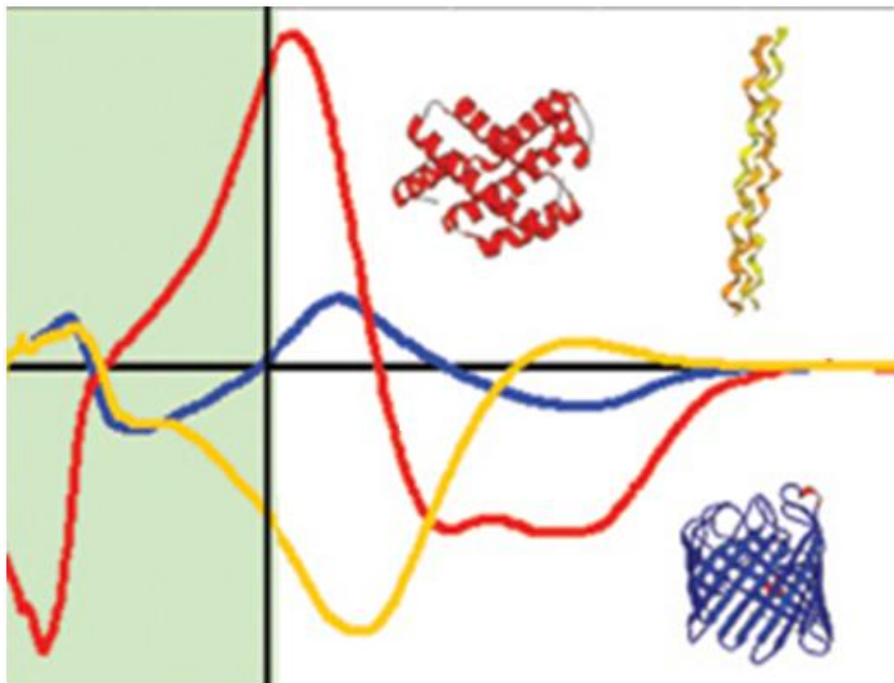
m/z = η αναλογία μάζας/φορτίου στην τετμημένη του φάσματος,

MW = η μοριακή μάζα του δείγματος

n = ο ακέραιος αριθμός των φορτίων

H^+ = η μάζα του πρωτονίου = 1.008 Da

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο. ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΚΑΙ
ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΑΤΙΟΝΙΚΩΝ
ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ**



4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα AMPs, όπως αναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, αλληλεπιδρούν με τα λιπιδικά συστατικά των βακτηριακών μεμβρανών και προκαλούν τη διάσπασή τους. Ο μηχανισμός δράσης των αντιμικροβιακών πεπτιδίων, καθώς και ο τρόπος που η σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζει την εξειδίκευσή τους ως προς το συγκεκριμένο οργανισμό παραμένει ένα σοβαρό θέμα υπό συζήτηση. Η δυσκολία στη μελέτη αυτής της αλληλεπίδρασης έγκειται στην έλλειψη λιπιδικών συστημάτων που μιμούνται τις πολύπλοκες βιομεμβράνες και είναι συμβατά με τις φασματοσκοπικές μετρήσεις.

Οι βιομεμβράνες αποτελούνται κυρίως από λιπίδια, πρωτεΐνες και υδρογονάνθρακες που συνδέονται με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς. Παρόλο που η λιπιδική διπλοστιβάδα αποτελεί τη βάση για τις μεμβράνες όλων των οργανισμών, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη δομή και στην πολυπλοκότητα των μεμβρανών ανάμεσα στα ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα. Επιπλέον, η δομή και η οργάνωση του κυτταρικού φακέλου διαφέρει ξεκάθαρα στα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, ενώ η σύσταση των φωσfolιπιδίων ποικίλλει ανάμεσα στα στελέχη, καθώς εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης. Εξαιτίας αυτών των διαφορών και κυρίως της πολυπλοκότητας αυτών των συστημάτων, δεν έχει αναπτυχθεί έως σήμερα καμία τεχνική που να επιτρέπει την άμεση συσχέτιση μεταξύ των χαρακτηριστικών της μεμβράνης και της επίδρασής τους στην ικανότητα δράσης των πεπτιδίων.

Παρόλα αυτά, μεγάλη πρόοδος έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στον τρόπο που επηρεάζει η σύσταση και η δομή της λιπιδικής μεμβράνης τις επαγόμενες διαμορφώσεις των πεπτιδίων και τις συγγένειες πρόσδεσής τους. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη νέων τεχνικών ή νέων εφαρμογών σε υπάρχουσες τεχνικές (μια από αυτές περιγράφεται παρακάτω). Η χρήση καθαρών συνθετικών λιπιδίων παρέχει επίσης σπουδαία πλεονεκτήματα, καθώς και η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, η ιονική ισχύς και ο οργανικός διαλύτης.

4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ (CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY, CD)

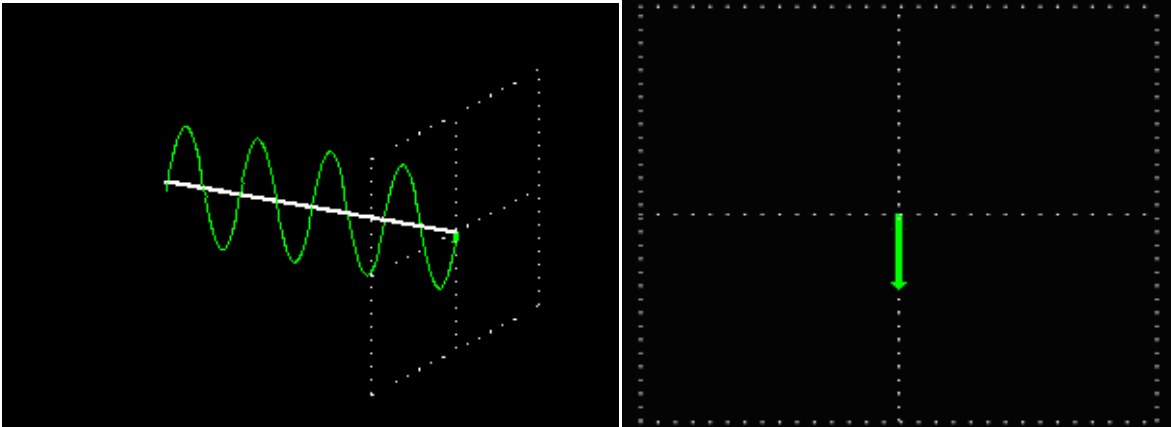
Στη φασματοσκοπία CD χρησιμοποιούνται πολλές προσεγγίσεις που προσομοιάζουν την επίδραση των μεμβρανών στις διαμορφώσεις των πεπτιδίων. **Οργανικοί διαλύτες** και

απορρυπαντικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από την *κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικυλλίων* (cmc) χρησιμοποιούνται συχνά για να μιμηθούν τον υδρόφοβο πυρήνα της μεμβράνης, ενώ μικύλλια και κυστίδια λιπιδίων (lipid vesicles) χρησιμοποιούνται ως μοντέλα μεμβρανών. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες-μιμητές μεμβρανών είναι οι μεθανόλη, αιθανόλη, ακετονιτρίλιο, 1,1,1,3,3,3-εξαφθοροϊσοπροπανόλη και τριφθοροαιθανόλη (trifluoroethanol, **TFE**), οι οποίοι σταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή που η πεπτιδική αλληλουχία έχει τη τάση να αποκτήσει.

Το άλας του δωδεκυλο-θειϊκού νατρίου (sodium dodecyl sulfate, **SDS**) είναι ένα απορρυπαντικό-λιπιδικό μοντέλο (επιφανειοδραστικός παράγοντας) που παρέχει το κατάλληλο υδρόφοβο περιβάλλον για τα πολυπεπίδια. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, π.χ 2-4 mM (τιμή μικρότερη από τη cmc) το SDS βρίσκεται σε κατάσταση μονομερούς και έχει περιγραφεί ότι μιμείται το εσωτερικό των πρωτεϊνών. Σε μικρά πεπίδια επάγει και σταθεροποιεί διαμόρφωση β-φύλλου, καθώς παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός μονομερούς πεπτιδίου και ενός μονομερούς SDS. Σε υψηλές συγκεντρώσεις (>4 mM, τιμή μεγαλύτερη από τη cmc) το SDS σχηματίζει μικύλλια, τα οποία μιμούνται τις αρνητικά φορτισμένες διπλοστιβάδες, παρέχοντας έτσι ένα ανισοτροπικό περιβάλλον παρόμοιο των κυστιδικών λιπιδίων (lipid vesicles), ενώ παράλληλα σταθεροποιούν τις ελικοειδείς διαμορφώσεις [1].

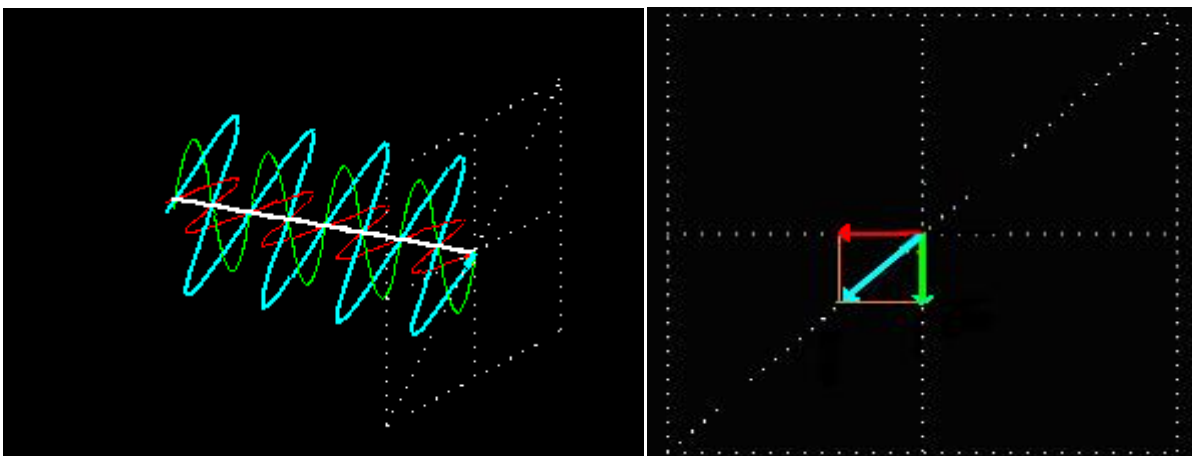
4.2.1 Βασικές αρχές - Ηλεκτρομαγνητικά κύματα

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα είναι περιοδικές μεταβολές ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων στο χώρο και το χρόνο, τα οποία διαδίδονται με την ταχύτητα του φωτός. Σε οποιοδήποτε σημείο μιας δέσμης φωτός, το μαγνητικό πεδίο είναι πάντα κάθετο ως προς το ηλεκτρικό και τα δύο μαζί ταλαντώνονται σε επίπεδο κάθετο ως προς τη διεύθυνση διάδοσης του φωτός. Αν θεωρήσουμε ότι αυτή η δέσμη φωτός τέμνεται με ένα συγκεκριμένο σημείο στο χώρο, το οποίο βρίσκεται σε επίπεδο κάθετο ως προς την κατεύθυνση διάδοσής της, τότε το ηλεκτρικό της πεδίο (αντίστοιχα και το μαγνητικό) μπορεί να αναπαρασταθεί με ένα διάνυσμα. Το μήκος και η διεύθυνση του διανύσματος αντιπροσωπεύουν την ισχύ και τη διεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου στο συγκεκριμένο σημείο. Αν το διάνυσμα του ηλεκτρικού πεδίου ταλαντώνεται κατά μήκος μιας ευθείας γραμμής, τότε τα κύματα ονομάζονται **επίπεδα πολωμένα** ή **γραμμικά πολωμένα** κύματα.



Σχήμα 4.1 : Αναπαράσταση επίπεδου πολωμένου φωτός (πράσινη γραμμή) που ταλαντώνεται στην κατεύθυνση του φωτός (άσπρη γραμμή) σε κάθετο επίπεδο και το διάνυσμά του (βέλος) στο σημείο τομής τους.

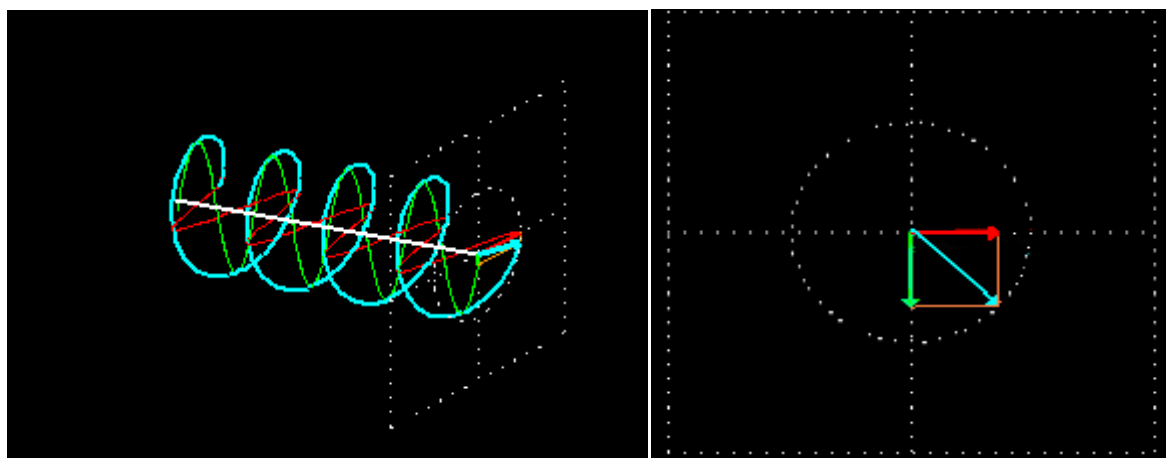
Στην περίπτωση που δύο ευθύγραμμα πολωμένα ηλεκτρομαγνητικά κύματα με το ίδιο πλάτος και μήκος κύματος ταλαντώνονται κάθετα και στην ίδια φάση (φθάνουν στο μέγιστο και τέμνουν τη γραμμή μηδέν στον ίδιο χρόνο), τότε προκύπτει ένα τρίτο γραμμικό πολωμένο κύμα που σχηματίζει γωνία 45° με τα αρχικά κύματα. Το διάνυσμα του τρίτου κύματος αποτελεί τη συνισταμένη των διανυσμάτων των δύο αρχικών κυμάτων.



Σχήμα 4.2 : Αναπαράσταση του γραμμικού πολωμένου κύματος (γαλάζια γραμμή) και το διάνυσμά του.

Όταν τα δύο γραμμικά πολωμένα κύματα εμφανίζουν μια διαφορά φάσης 90° (το ένα κύμα βρίσκεται στο μέγιστό του, ενώ το άλλο τέμνει τη γραμμή μηδέν), τότε προκύπτει ένα ειδικό ηλεκτρομαγνητικό κύμα, το **κυκλικά πολωμένο**. Σε μια τρισδιάστατη εικόνα, το κύμα

αυτό σχηματίζει σπειροειδή γραμμή και το διάνυσμα του ηλεκτρικού του πεδίου περιστρέφεται σε κύκλο δεξιόστροφα, διατηρώντας το μήκος του σταθερό.



Σχήμα 4.3 : Αναπαράσταση του κυκλικά πολωμένου κύματος (γαλάζια γραμμή) και το διάνυσμά του.

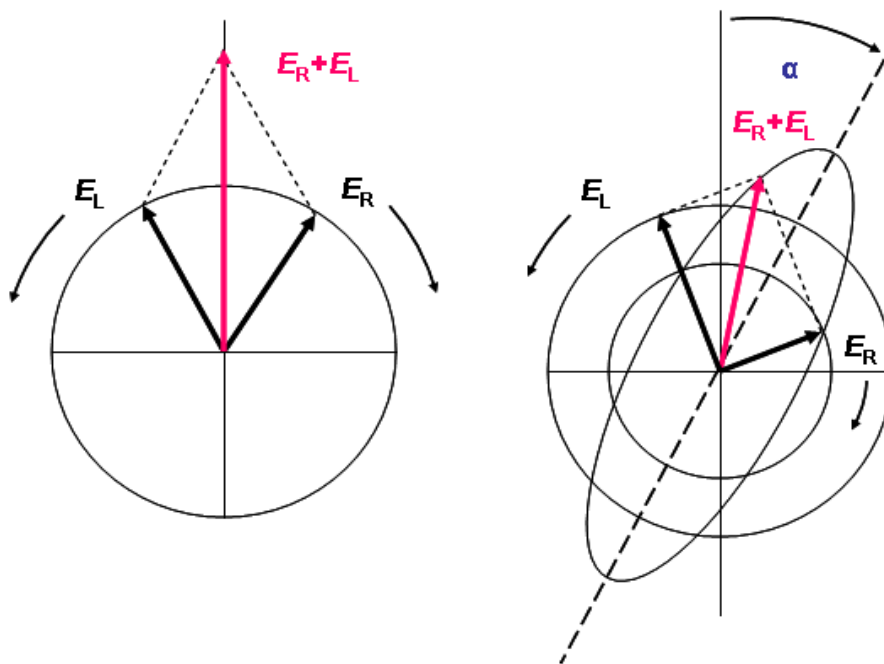
Κατά τον ίδιο τρόπο, όταν τα δύο κύματα εμφανίζουν διαφορά φάσης -90° , τότε προκύπτει ένα κυκλικά πολωμένο κύμα, που σχηματίζει μια αριστερόστροφη σπείρα και το διάνυσμα του ηλεκτρικού του πεδίου περιστρέφεται αντίστροφα από τους δείκτες του ρολογιού. Έτσι λοιπόν, μπορούμε να διαχωρίσουμε το **δεξιόστροφο** και το **αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως**. Η εναπόθεση των δύο αυτών κυμάτων με το ίδιο πλάτος το ένα πάνω στο άλλο θα οδηγήσει σε ένα **επίπεδο πολωμένο** φως [2].

4.2.2 Αλληλεπίδραση ύλης και φωτός

Όταν το φως διαπερνά την ύλη, τότε οι ιδιότητές του, π.χ. ένταση (πλάτος), πόλωση, ταχύτητα, μήκος κύματος κτλ. μεταβάλλονται. Δύο βασικά φαινόμενα που παρατηρούνται από την αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη είναι η **απορρόφηση** και η **μείωση της ταχύτητας**. Στο πρώτο φαινόμενο η ένταση (πλάτος) του φωτός ελαττώνεται, γιατί η ύλη απορροφά ένα μέρος του, ενώ η μείωση της ταχύτητάς του οφείλεται στη διάθλαση που υφίσταται το φως από οποιοδήποτε υλικό, ακόμα και από αυτά που δεν απορροφούν.

Κάποια υλικά παρουσιάζουν μια ειδική ιδιότητα: απορροφούν διαφορετικά το αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως (**LCPL**) σε σχέση με το δεξιόστροφο κυκλικά πολωμένο (**RCPL**). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **κυκλικός διχρωϊσμός (circular dichroism)**, $CD = Abs(LCPL) - Abs(RCPL)$. Όπως έχουμε αναφέρει και προηγουμένως,

κάθε γραμμικό πολωμένο φως μπορεί να αποκτηθεί από την εναπόθεση ενός αριστερόστροφου πάνω σε ένα δεξιόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Επομένως, αν ένα γραμμικό πολωμένο φως διαπεράσει μέσα από ένα υλικό που εμφανίζει κυκλικό διχρωϊσμό, τότε οι ιδιότητές του θα αλλάξουν επειδή το υλικό αυτό απορροφά τα δύο κυκλικά πολωμένα συστατικά σε διαφορετικό βαθμό. Όταν συμβαίνει κάτι τέτοιο, το προκύπτον κύμα δεν είναι πια γραμμικό πολωμένο και το διάνυσμα του ηλεκτρικού του πεδίου δεν ταλαντώνεται κατά μήκος μιας ευθείας γραμμής, αλλά αντίθετα περιστρέφεται σε μια ελλειπτική τροχιά. Τέτοια κύματα χαρακτηρίζονται **ελλειπτικά πολωμένα**.



Σχήμα 4.5 : Φαινόμενο κυκλικού διχρωϊσμού. E_R , E_L τα διανύσματα των ηλεκτρικών πεδίων που αντιστοιχούν στο δεξιόστροφο και αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως αντίστοιχα.

Ο κυκλικός διχρωϊσμός μετράται σε μονάδες απορρόφησης ή ελλειπτικότητας. Η **ελλειπτικότητα θ** (millidegrees ή m°) συνδέεται με την απορρόφηση με τη σχέση :

$$\theta = 32.98 \Delta A$$

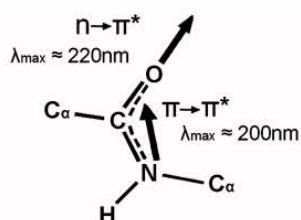
Για να εξαλειφθούν οι επιδράσεις του μήκους της κυψελίδας και της συγκέντρωσης, ορίζεται η **μοριακή ελλειπτικότητα $[\theta]$** (degrees $cm^2 / dmol$), όπου

$$[\theta] = 100 \theta / cl = 3298 \Delta \epsilon \quad (\Delta \epsilon = \Delta Abs/cl)$$

4.2.3 Φάσματα CD πεπτιδίων

Ένα μόριο για να μελετηθεί με φασματοσκοπία CD θα πρέπει να διαθέτει χρωμοφόρες ομάδες, δηλαδή ομάδες ατόμων οι οποίες απορροφούν ενέργεια μιας ορισμένης ακτινοβολίας. Υπάρχουν δύο κατηγορίες τέτοιων ομάδων : οι ασύμμετρες χρωμοφόρες ομάδες και οι συμμετρικές που βρίσκονται σε ασύμμετρο περιβάλλον.

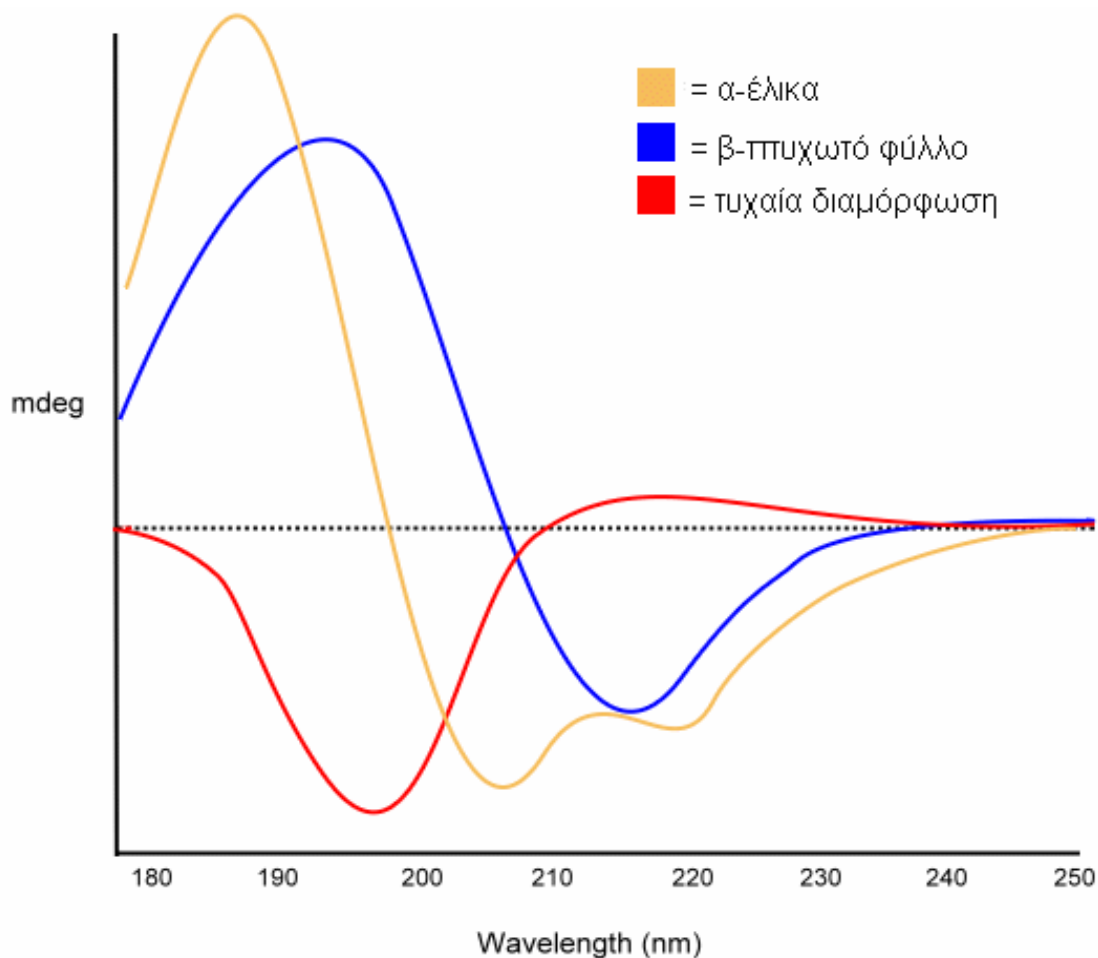
Στην περίπτωση των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών υπάρχουν τρεις τάξεις χρωμοφόρων ομάδων : ο πεπτιδικός δεσμός, οι παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων και οι προσθετικές ομάδες. Η μετάπτωση χαμηλότερης ενέργειας σε ένα χρωμοφόρο πεπτιδίο είναι η $n \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση, η οποία παρατηρείται γύρω στα 222 nm και οφείλεται στη μεταφορά



του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του καρβονυλικού οξυγόνου από το n τροχιακό στο κάθετο p τροχιακό. Είναι μικρής έντασης και εμφανίζεται στη διαμόρφωση της α -έλικας δίπλα σε μια επίσης ευρεία κορυφή γύρω στα 208 nm. Η ευρεία αυτή κορυφή, καθώς και μια οξεία θετική κορυφή στα 190 nm, είναι υπεύθυνες

για την απορρόφηση του πεπτιδικού δεσμού και αποδίδονται σε μια $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση.

Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού είναι πολύ ευαίσθητο στη δευτεροταγή δομή πεπτιδίων και πρωτεϊνών, δίνοντας φάσματα χαρακτηριστικά για διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής. Επομένως, η ανάλυση ενός φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή βιολογικών μακρομορίων. Στο **Σχήμα 4.6** παρουσιάζονται πρότυπες καμπύλες που αντιστοιχούν στις δευτεροταγείς δομές: α -έλικα, β -πτυχωτό φύλλο και τυχαία διαμόρφωση [3].



Σχήμα 4.6 : Χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού για διάφορες δευτεροταγείς δομές.

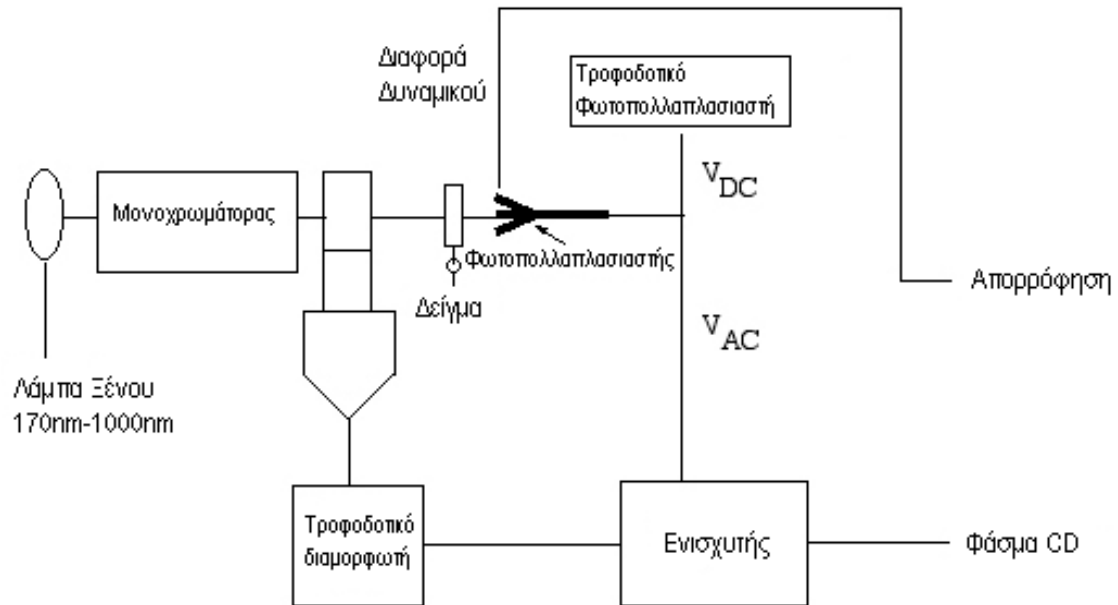
4.2.4 Οργανολογία

Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού, που παρατηρείται όταν μια οπτικώς ενεργή ουσία απορροφά σε διαφορετικό βαθμό το αριστερά και δεξιά πολωμένο φως, καταγράφεται με την βοήθεια ενός CD φασματοφωτομέτρου (**Σχήμα 4.7**)

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

- Λάμπα ξένου υψηλής πίεσης

- Μονοχρωμάτορας
- Τμήμα ηλεκτρονικού ελέγχου



Σχήμα 4.7 : Τυπική διάταξη CD φασματοφωτομέτρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα τελευταία χρόνια η ευρεία και πολλές φορές η κακή χρήση των αντιβιοτικών οδήγησε στην εμφάνιση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, με επιτακτική την ανάγκη για εύρεση νέας γενιάς θεραπευτικών μέσων. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του κάθε οργανισμού απέναντι στις επιθέσεις των μικροβίων. Κατέχουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης ως προς Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα. Τα περισσότερα αντιμικροβιακά πεπτίδια διαθέτουν θετικό φορτίο, ώστε να αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις βακτηριακές μεμβράνες και μπορούν να σχηματίζουν αμφιπαθητικές α -έλικες, ώστε να διευκολύνεται έτσι η διάρρηξη των μεμβρανών των παθογόνων μικροβίων. Για να χρησιμοποιηθούν τα αντιμικροβιακά πεπτίδια ως θεραπευτικοί παράγοντες πρέπει εκτός από υψηλή αντιμικροβιακή δράση, να διαθέτουν πρωτεολυτική σταθερότητα και χαμηλή τοξικότητα.

Για το σκοπό αυτό στην παρούσα εργασία συντέθηκαν κατιονικά α -ελικοειδή πεπτιδικά μοντέλα του τύπου $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH_2$, όπου $n = 2$ ή 3 , $X = Leu$ ή Phe και $Y = H-$ ή $Ac-$ ή $Ahx-$, τα οποία λόγω της εισαγωγής του αμινοϊσοβουτυρικού οξέος (Aib), που επάγει και σταθεροποιεί ελικοειδείς δομές, αναμένεται να έχουν αυξημένη σταθερότητα σε πρωτεολυτικά ένζυμα και επομένως υψηλή βιοδιαθεσιμότητα. Τα θετικά φορτία της αργινίνης είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια των μικροβιακών μεμβρανών. Η διαμόρφωση των πεπτιδίων μελετήθηκε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD) σε διάφορες συνθήκες. Τα πεπτίδια δοκιμάστηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση, καθώς επίσης ως προς την ενζυμική αποικοδόμησή τους και την αιμολυτική τους δράση.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο. ΣΥΝΘΕΣΗ - ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ -
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ**

6.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στην παρούσα διατριβή συντέθηκαν, απομονώθηκαν και μελετήθηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση τα παρακάτω πεπτίδια :

- 1) **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂**, με MB=895,12 και MT=C₄₀H₇₅N₁₅O₈
- 2) **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂**, με MB=1008,28 και MT=C₄₆H₈₆N₁₆O₉
- 3) **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂**, με MB=1336,63 και MT=C₆₀H₁₁₄N₂₂O₁₂
- 4) **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂**, με MB=1449,85 και MT=C₆₆H₁₂₅N₂₃O₁₃
- 5) **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂**, με MB=965,16 και MT=C₄₆H₇₃N₁₅O₈
- 6) **Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂**, με MB=1007,22 και MT=C₄₈H₇₅N₁₅O₉
- 7) **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂**, με MB=1078,33 και MT=C₅₂H₈₄N₁₆O₉
- 8) **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂**, με MB=1438,73 και MT=C₆₉H₁₀₈N₂₂O₁₂
- 9) **Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂**, με MB=1480,77 και MT=C₇₁H₁₁₀N₂₂O₁₃

Η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield. Ως πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η 4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)αμινομεθυλ]-φαινοξυ-ρητίνη (Rink Amide AM Resin, Neosystem) και τα πεπτίδια ελήφθησαν ως αμύδια.

Για τη σύνθεση των ανωτέρω πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες :

- α) Μεθανόλη (MeOH) (LABSCAN),
- β) Διχλωρομεθάνιο (DCM) (LABSCAN),
- γ) Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) (Fluka) έπειτα από κατεργασία με molecular sieves 0,4nm (Riedel-de Haen) για τη δέσμευση των δευτεροταγών αμινών, που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της διάσπασής του,
- δ) Τριφθοροξικό οξύ (TFA) (MERCK-Schuchardt) για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη, καθώς και για απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων,
- ε) Διίσοπροπυλαιθυλαμίνη (DIEA) (MERCK-Schuchardt) για την πραγματοποίηση της σύζευξης,

- στ) Πιπεριδίνη (Fluka) για την απομάκρυνση της Fmoc- ομάδας,
 ζ) Οξικός ανυδρίτης (MERCCK-Schuchardt) για την ακετυλίωση της N^α-αμινομάδας του αμινοϊσοβουτυρικού οξέος (Aib).
 η) Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS) (ALDRICH) ως μόριο παγίδα των καρβοκατιόντων.

Για τη σύζευξη των αμινοξέων στην πεπτιδορητίνη, χρησιμοποιήθηκαν ως αντιδραστήρια σύζευξης τα HBTU (βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό εξαφθοροφωσφορικό) (GL Biochem, Shanghai και Neosystem), TFFH (φθορο-N,N,N',N'-τετραμεθυλο-φορμαμίδιο εξαφθοροφωσφορικό) (GL Biochem, Shanghai) για την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας και το HOBt (1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο) (GL Biochem, Shanghai και Neosystem) ως βοηθητικό πυρηνόφιλο. Τα Fmoc-προστατευμένα αμινοξέα (Neosystem, GL Biochem, Shanghai και CBL Patras-Barlos) που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται παρακάτω :

Fmoc-Aib-OH	MB=325,4
Fmoc-Leu-OH	MB=353,4
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	MB=648,8
Fmoc-Phe-OH	MB=387,4
Fmoc-Ahx-OH	MB=353,4

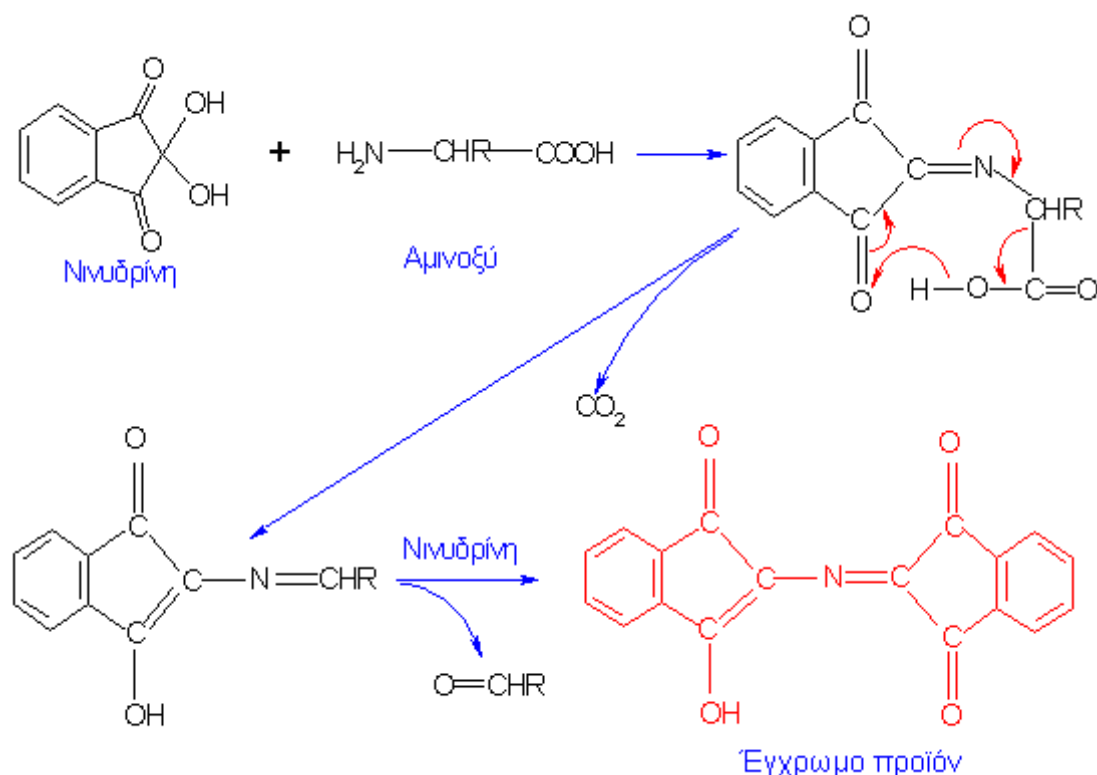
6.2 ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με την Fmoc μεθοδολογία, χρησιμοποιώντας ως στερεό υπόστρωμα την Rink Amide AM ρητίνη (GL Biochem, Shanghai). Η σύζευξη των αμινοξέων έγινε χρησιμοποιώντας την αναλογία 3/3/3/1 αμινοξύ/HOBt/HBTU/ρητίνη, ενώ ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα DCM:DMF σε αναλογία 1:1. Το HOBt χρησιμοποιήθηκε ως βοηθητικό πυρηνόφιλο, αφού συμβάλλει στη δημιουργία ενός ισχυρού και δραστικού ακυλιωτικού μέσου και ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο της ρακεμοποίησης. Προστέθηκαν 9 ισοδύναμα της βάσης DIEA, 3 ισοδύναμα για τη δημιουργία του καρβοξυλικού άλατος, 3 ισοδύναμα για τον ιοντισμό του HOBt και 3 ισοδύναμα ως περίσσεια, καθώς η κινητική της αντίδρασης σύζευξης και η απόδοσή της εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση της βάσης. Η διάρκεια της αντίδρασης σύζευξης ήταν 2-3 ώρες.

Η αποπροστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων έγινε με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε διμεθυλοφορμαμίδιο. Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης της σύζευξης (απουσία ελεύθερων αμινομάδων στην πεπτιδορητίνη) έγινε με το test Kaiser (Σχήμα 6.1). Πιο συγκεκριμένα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται μερικοί κόκκοι πεπτιδορητίνης και 3 σταγόνες από τα παρακάτω διαλύματα:

- α) 2 ml KCN 0,001M σε 100 ml πυριδίνη,
- β) 5 g νινυδρίνης σε 100 ml αιθανόλη,
- γ) 400 mg φαινόλης σε 100 ml αιθανόλη.

Έπειτα ο δοκιμαστικός σωλήνας θερμαίνεται σε υδρόλουτρο για 30 δευτερόλεπτα περίπου. Η εμφάνιση μπλε κόκκων είναι ενδεικτική της ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων (θετικό (+) test Kaiser), ενώ αν οι κόκκοι παραμείνουν λευκοί (αρνητικό (-) test Kaiser) θεωρείται ποιοτικά ότι δεν υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες στην πεπτιδορητίνη, η σύζευξη του αμινοξέος έχει ολοκληρωθεί και μπορούμε έτσι να προχωρήσουμε στη σύζευξη του επόμενου αμινοξέος. Η ακρίβεια του test Kaiser κυμαίνεται στο 99,9%.

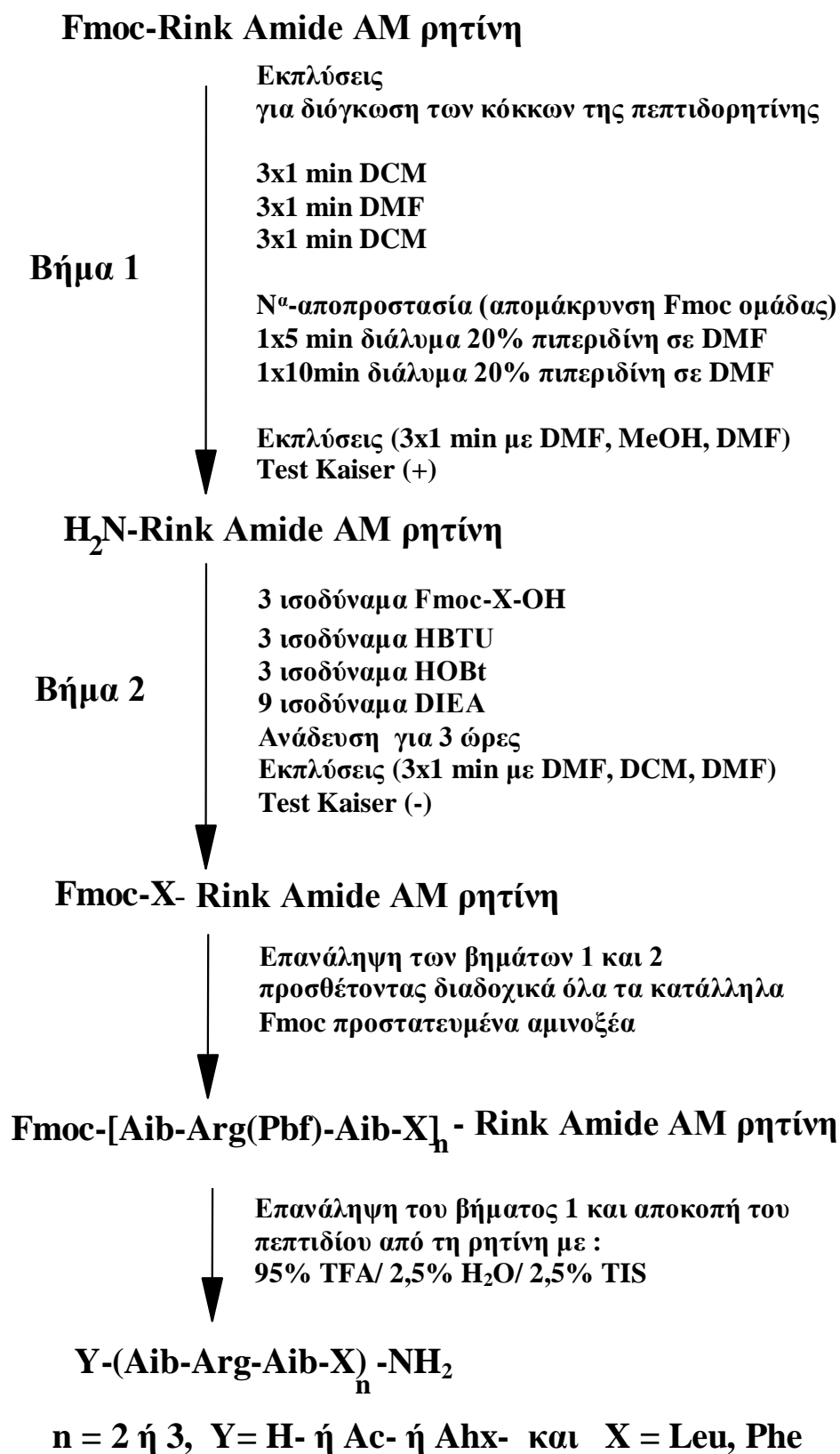


Σχήμα 6.1 : Αντίδραση νινυδρίνης.

Η αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων επιτυγχάνεται με

κατεργασία με τριφθοροξικό οξύ (TFA) παρουσία νερού και τριϊσοπροπυλοσιλανίου (TIS) ως μόριο παγίδα των καρβοκατιόντων, σε αναλογία TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v). Μετά από χρονικό διάστημα 4 ωρών το TFA εξατμίζεται υπό κενό στο flash evaporator, ενώ στο υπόλειμμα προστίθεται DCM/εξάνιο (1/1) και ακολουθεί πάλι συμπύκνωση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 5-6 φορές προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απομάκρυνση του TFA. Στην συνέχεια το πεπτίδιο καταβυθίζεται με διαιθυλαιθέρα σε πάγο. Διηθείται υπό κενό και κατεργάζεται με αιθέρα για την απομάκρυνση των μορίων παγίδων (scavenger) (TIS). Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται με διάλυση σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2 N και λυοφιλιοποιείται.

Ο καθαρισμός, ο έλεγχος της καθαρότητας των πεπτιδίων και η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκαν με ημιπαρασκευαστική και αναλυτική υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας RP-HPLC (Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography) (LC-10 A VP, SHIMADZU) και φασματοσκοπία μάζας ESI (Electrospray Ionization) (Micromass Platform LC Quandrupole) αντίστοιχα.



Σχήμα 6.2 : Πορεία σύνθεσης των πεπτιδίων σε στερεή φάση με την Fmoc/tBu μεθοδολογία, σε Rink Amide AM ρητίνη.

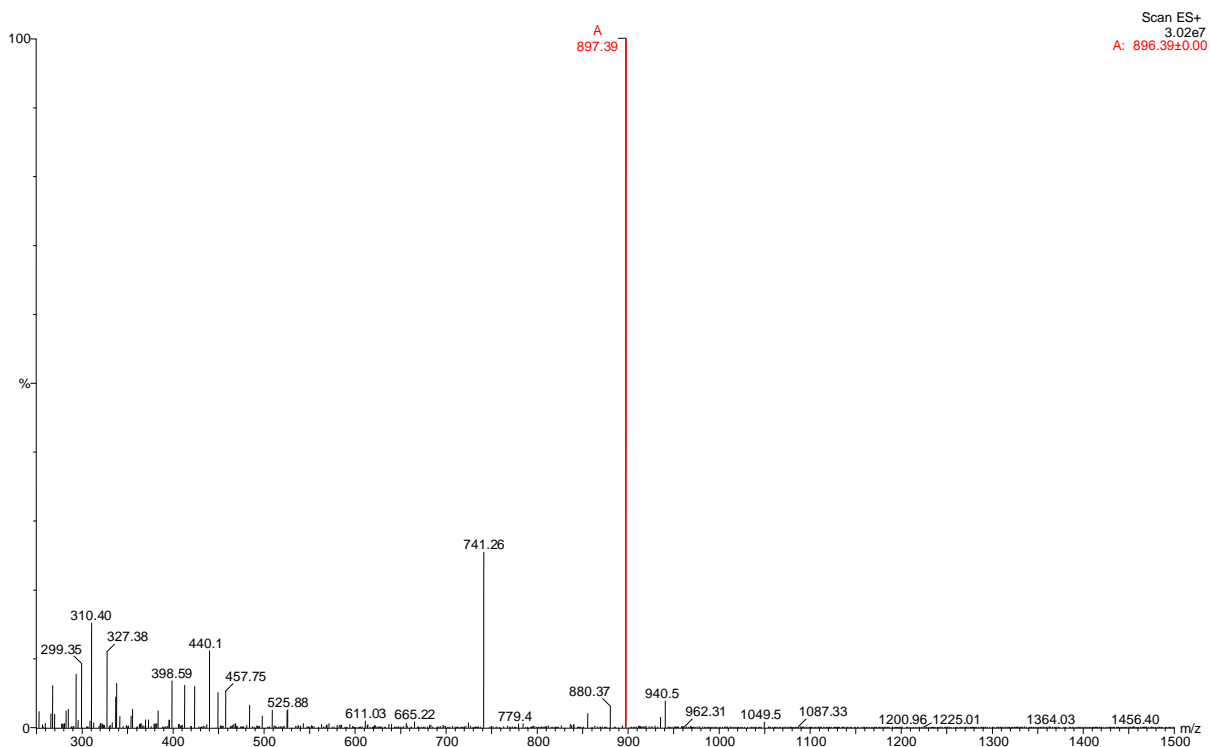
6.3 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου

H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂ με MB=895,12 και MT=C₄₀H₇₅N₁₅O₈ (1)

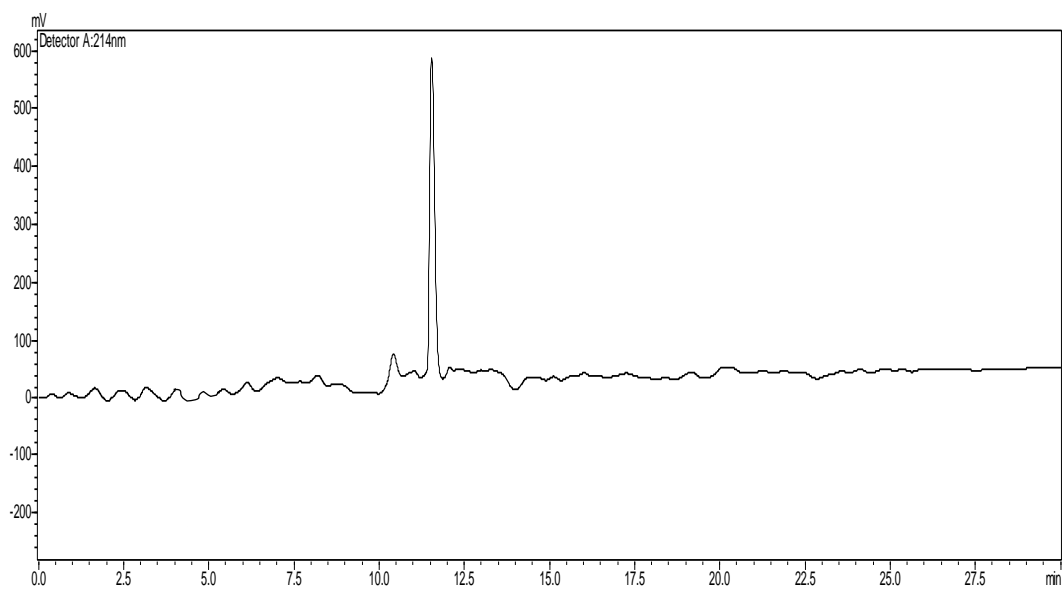
Η σύνθεση του παραπάνω πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με τη ρητίνη 4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)αμινομεθυλ]-φαινοξυ-ρητίνη, (Rink Amide AM) ακολουθώντας τη γενική πορεία του **Σχήματος 6.2**. Για τη σύνθεση 2 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 3 g ρητίνης με υποκατάσταση 0,67 mmol/g. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως Fmoc-παράγωγα, η αντίδραση σύζευξης έγινε με HBTU παρουσία του HOBt και της DIEA. Η προστασία της γουανιδινομάδας της αργινίνης έγινε με την 2, 2, 5, 7, 8- πενταμεθυλοδιυδροφουρανο-5-σουλφόνυλο ομάδα (Pbf). Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Aib-Leu]₂-R, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅ και ελήφθησαν 4,2g (απόδοση σύνθεσης 72%). Στη συνέχεια, στο ένα τρίτο της ποσότητας (1,4g και 0,66mmol) απομακρύνθηκε η Fmoc προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας του N-τελικού άκρου.

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με μίγμα TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5) για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η επεξεργασία και η παραλαβή του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη γενική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 5.2. Μετά τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 407mg πεπτιδίου (απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 68,7%).

Για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 min. Η βαθμίδωση των διαλυτών ήταν γραμμική από A/B:80/20 σε A/B:40/60. Η ταχύτητα ροής καθορίστηκε στα 4,7ml/min και η ανίχνευση έγινε στα 214nm. Μετά τη λυοφιλοποίηση λαμβάνεται το καθαρό προϊόν (απόδοση καθαρισμού 12%). Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (**Σχήμα 6.3**). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=894,12, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=897,39, ενώ η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 6.4**).



Σχήμα 6.3 : Φάσμα μάζας ESI-MS του H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂ (1).



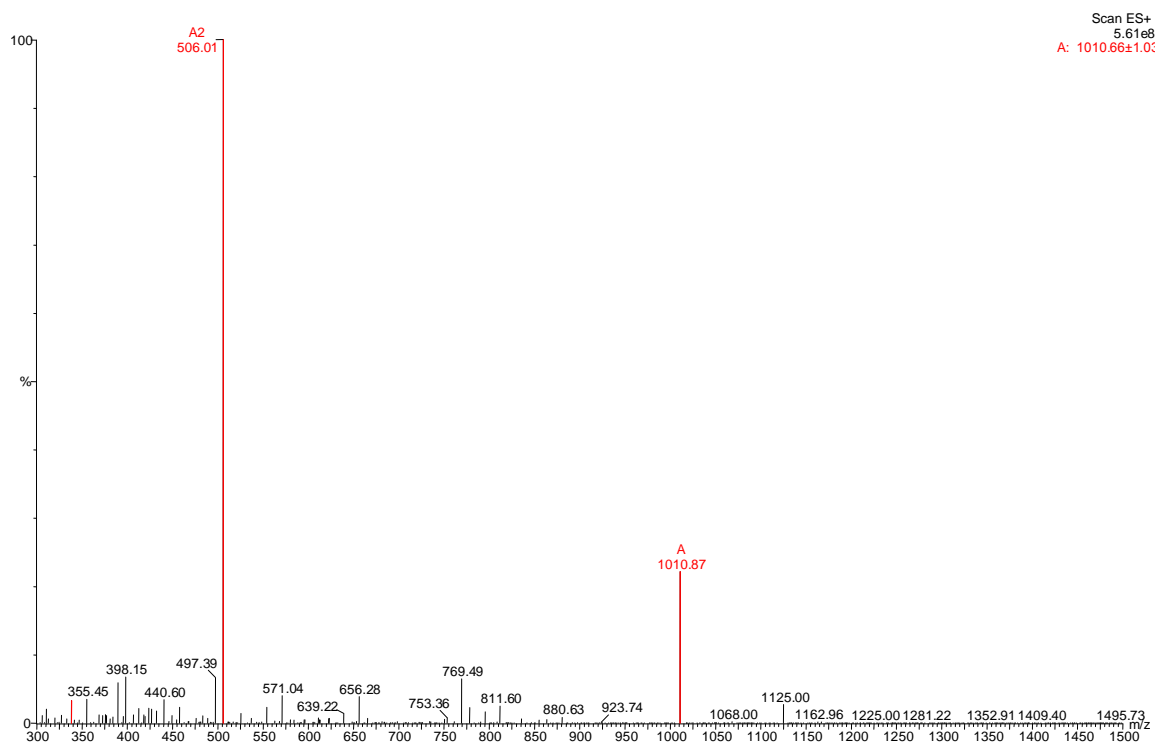
Σχήμα 6.4 : Αναλυτική RP-HPLC του H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:80/20 σε A/B:40/60, ταχύτητα ροής 4,7ml/min, ανίχνευση στα 214nm.

6.4 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου

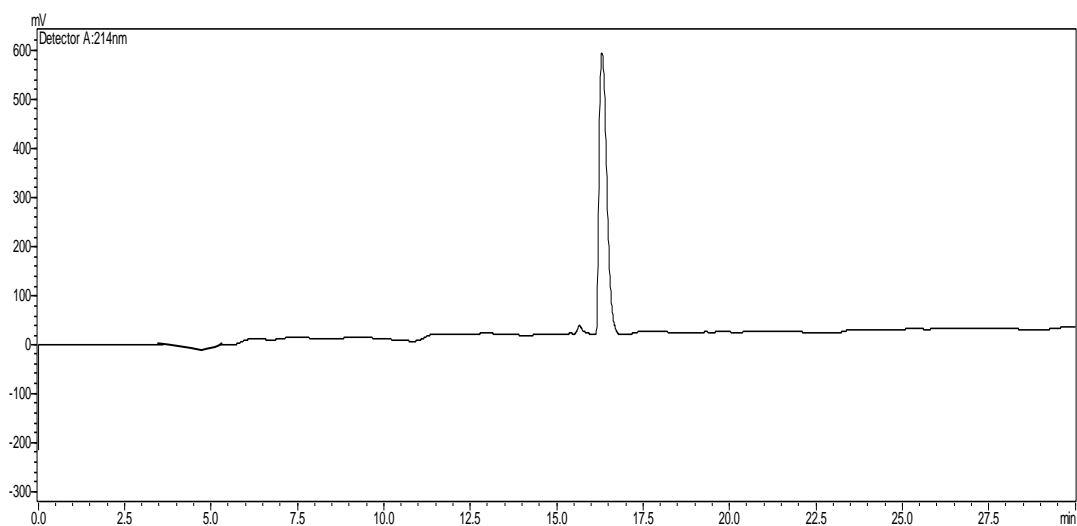


Για τη σύνθεση του παραπάνω πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το άλλο 1/3 της πεπτιδορητίνης Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Aib-Leu]₂-R (1,4g και 0,66mmol). Αρχικά απομακρύνθηκε η Fmoc προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας του N-τελικού άκρου και προστέθηκε το προστατευμένο λιπαρό οξύ (Fmoc-Ahx-OH: αμινοκαπροϊκό οξύ), ακολουθώντας τη γενική Fmoc μεθοδολογία του **Σχήματος 6.2**. Η πεπτιδορητίνη κατεργάστηκε με μίγμα TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 v/v) για την αποπροστασία και την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη (απόδοση αποκοπής 71%).

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε όπως και στο πεπτίδιο (1), με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 min. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:80/20 σε A/B:50/50. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 12,7%. Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (**Σχήμα 6.5**). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB = 1008,28, ευρεθέν μοριακό βάρος MB = 1010,87, ενώ η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 6.6**).



Σχήμα 6.5 : Φάσμα μάζας ESI-MS του Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂ (2).



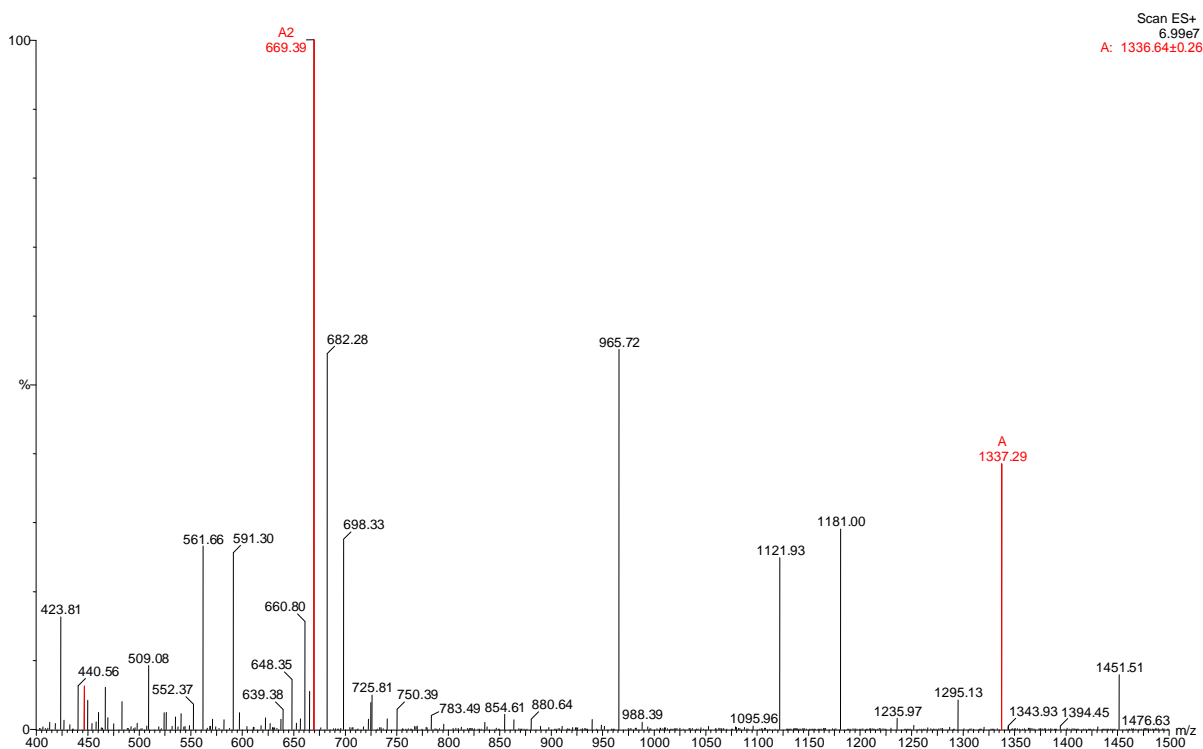
Σχήμα 6.6 : Αναλυτική RP-HPLC του Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:80/20 σε A/B:50/50, ταχύτητα ροής 4,7 ml/min, ανίχνευση στα 214nm.

6.5 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου

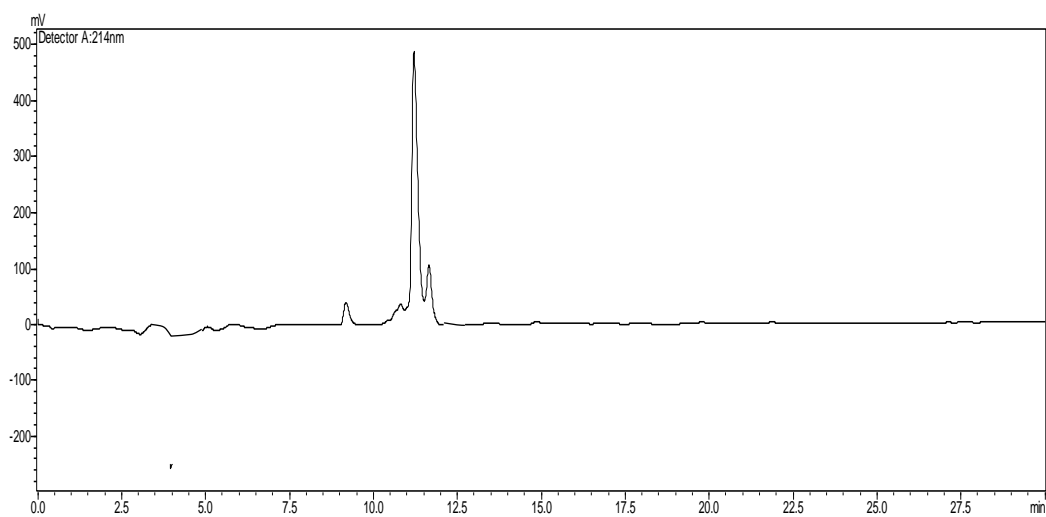
H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂ με MB=1336,63 και MT=C₆₀H₁₁₄N₂₂O₁₂ (3)

Για τη σύνθεση του παραπάνω πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το υπόλοιπο 1/3 της πεπτιδορητίνης Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Aib-Leu]₂-R (1,4g και 0,66mmol), ακολουθώντας τη γενική Fmoc μεθοδολογία του **Σχήματος 6.2**. Μετά τη σύζευξη των επόμενων τεσσάρων αμινοξέων ακολούθησε ξήρανση υπό κενό και ελήφθησαν 1,62 g Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Aib-Leu]₃-R (απόδοση σύνθεσης 83%). Στη συνέχεια, στο 1/2 της ποσότητας της πεπτιδορητίνης απομακρύνθηκε η Fmoc προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας του N-τελικού άκρου και ακολούθησε η αποκοπή του από τη ρητίνη (απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 70%).

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε όπως και στο πεπτίδιο (1), με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 min. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:70/30 σε A/B:40/60. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 8%. Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (**Σχήμα 6.7**). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1336,63, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1337,29, ενώ η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 6.8**).

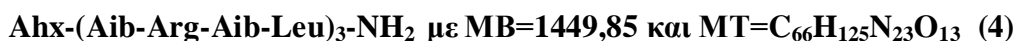


Σχήμα 6.7 : Φάσμα μάζας ESI-MS του H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂ (3).



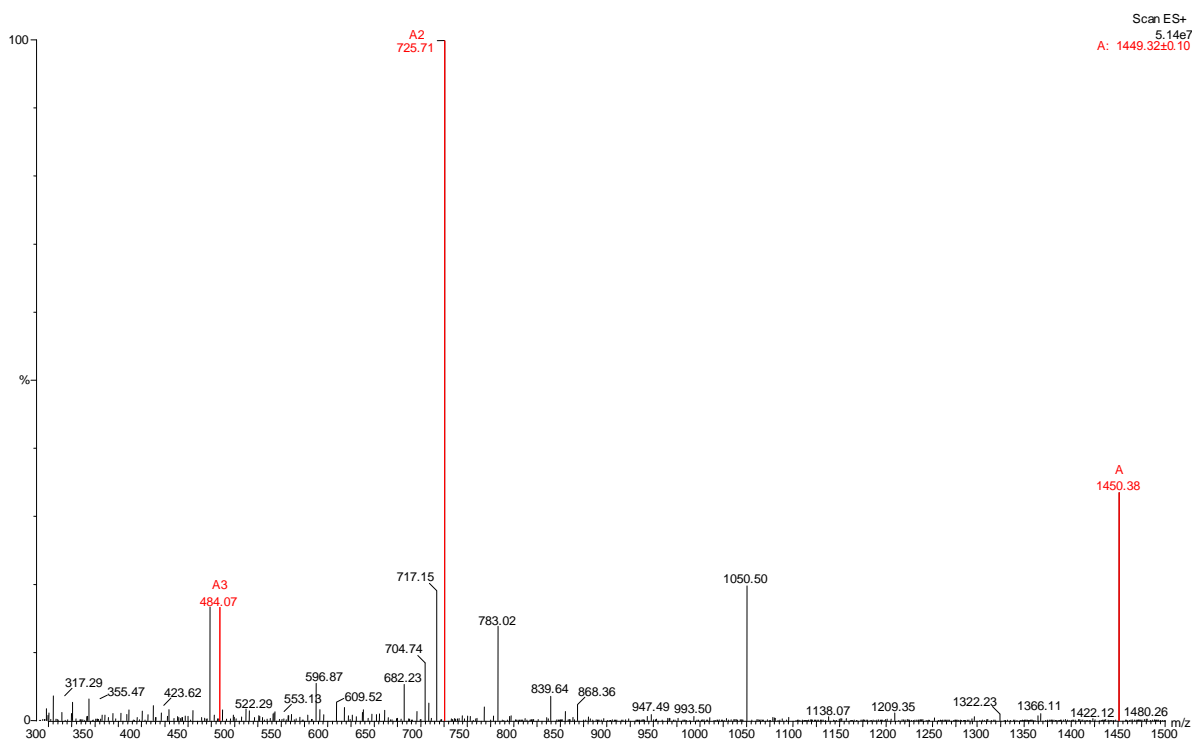
Σχήμα 6.8 : Αναλυτική RP-HPLC του H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂. Σύστημα έκλυσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, χρόνος έκλυσης 30 min από A/B:70/30 σε A/B:40/60, ταχύτητα ροής 4,7ml/min, ανίχνευση στα 214nm.

6.6 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου

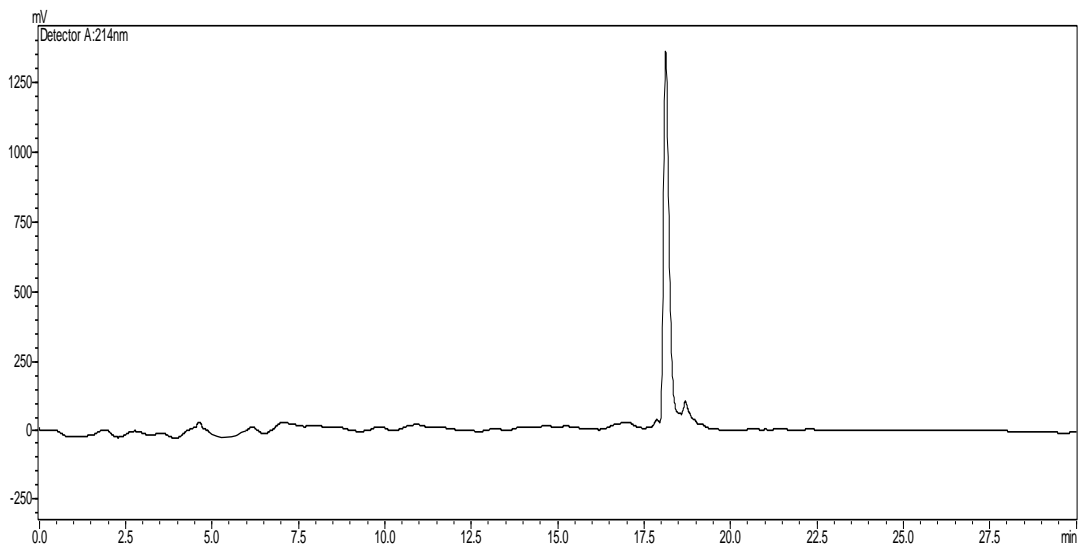


Για τη σύνθεση του παραπάνω πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το υπόλοιπο 1/2 της πεπτιδορητίνης Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Aib-Leu]₃-R (0,81g και 0,33mmol), ακολουθώντας τη γενική Fmoc μεθοδολογία του **Σχήματος 6.2**. Πραγματοποιήθηκε αποπροστασία της N^α-αμινομάδας του αμινοϊσοβουτυρικού οξέος, σύζευξη του Fmoc-Ahx-OH και στη συνέχεια ακολούθησε η αποκοπή του από τη ρητίνη (απόδοση αποκοπής 63%).

Ο καθαρισμός του πραγματοποιήθηκε με τις εξής συνθήκες: A/B:80/20 έως A/B:30/70, όπου (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 min. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 4,8%. Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (**Σχήμα 6.9**). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1449,85, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1450,38, ενώ η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 6.10**).



Σχήμα 6.9 : Φάσμα μάζας ESI-MS του Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂ (**4**).



Σχήμα 6.10 : Αναλυτική RP-HPLC του Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:80/20 σε A/B:30/70, ταχύτητα ροής 4,7 ml/min, ανίχνευση στα 214 nm.

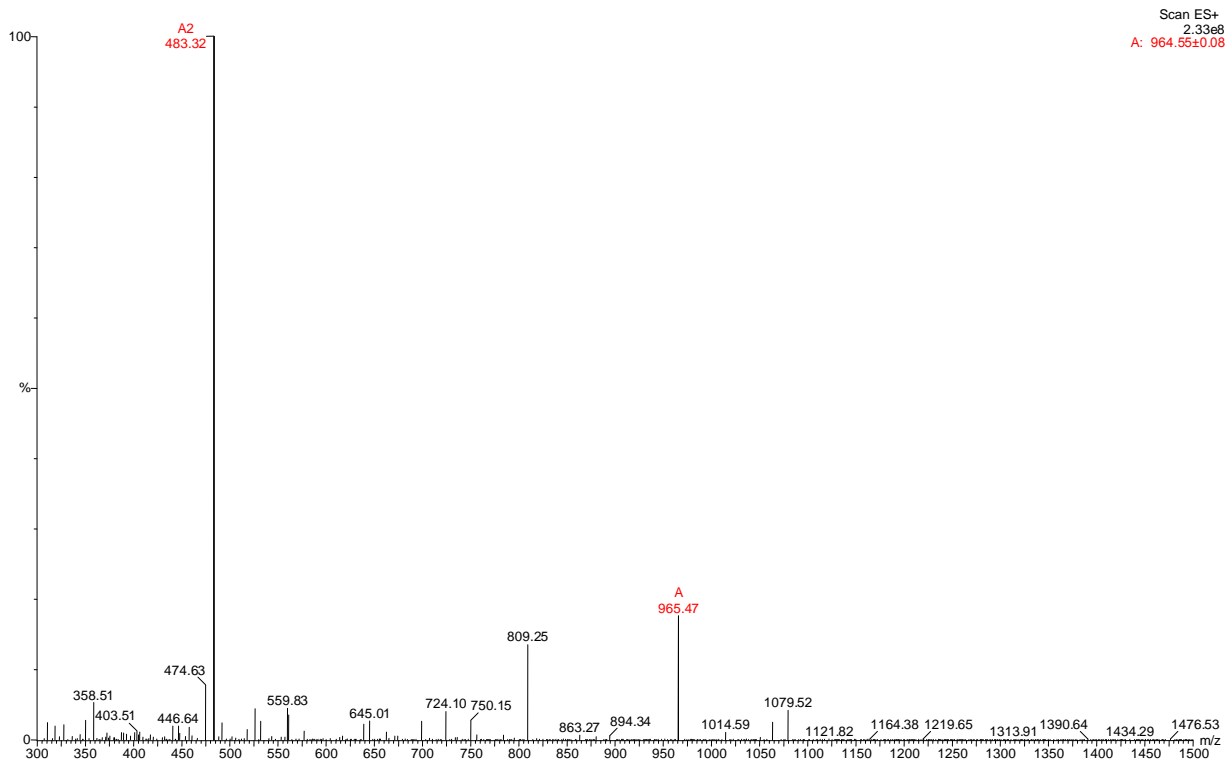
6.7 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου

H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂ με MB=965,16 και MT=C₄₆H₇₃N₁₅O₈ (5)

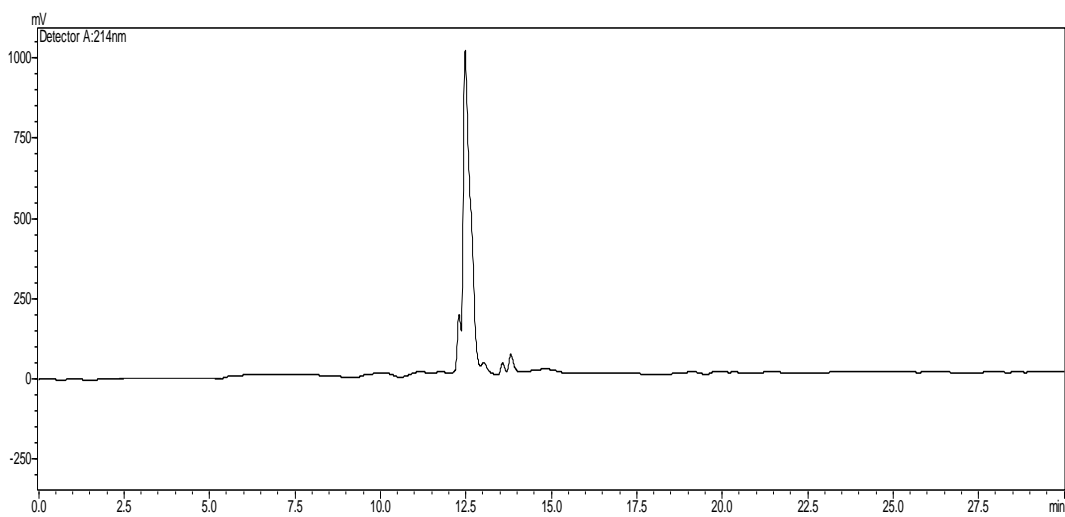
Η σύνθεση του παραπάνω πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με την ίδια ρητίνη Rink Amide AM ακολουθώντας την ίδια γενική πορεία του **Σχήματος 6.2**. Για τη σύνθεση 2mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 3g ρητίνης με υποκατάσταση 0,67mmol/g. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως Fmoc-παράγωγα, και για την αντίδραση σύζευξης δοκιμάστηκε ένα άλλο αντιδραστήριο, το οποίο εμφανίζει καλύτερες αποδόσεις σε δύσκολες συνθέσεις, το τετραμέθυλ-φθοροφορμαμίδιο-εξαφθοροφωσφορικό άλας (TFFH) παρουσία της DIEA. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Aib-Phe]₂-R, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅ και ελήφθησαν 5,02g (απόδοση σύνθεσης 85%). Στη συνέχεια, η πεπτιδορητίνη μοιράστηκε σε δύο ίσα μέρη. Το ένα τμήμα χρησιμοποιήθηκε για τη συνέχιση της σύνθεσης και την παραλαβή των τριμερών παραγώγων του Aib, ενώ το άλλο μοιράστηκε εξίσου σε τρία μέρη. Στο ένα τρίτο αυτής της ποσότητας (0,83g και 0,3mmol) απομακρύνθηκε η Fmoc προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας του N-τελικού άκρου.

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με μίγμα TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5) για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η επεξεργασία και η παραλαβή του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη γενική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 5.2. Μετά τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 768mg πεπτιδίου (απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 99%).

Για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 min. Η βαθμίδωση των διαλυτών ήταν γραμμική από A/B:80/20 σε A/B:40/60. Η ταχύτητα ροής καθορίστηκε στα 4,7ml/min και η ανίχνευση έγινε στα 214nm. Μετά τη λυοφιλοποίηση λαμβάνεται το καθαρό προϊόν (απόδοση καθαρισμού 15%). Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (**Σχήμα 6.11**). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=965,16, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=965,47 ενώ η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 6.12**).



Σχήμα 6.11 : Φάσμα μάζας ESI-MS του H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂ (5).



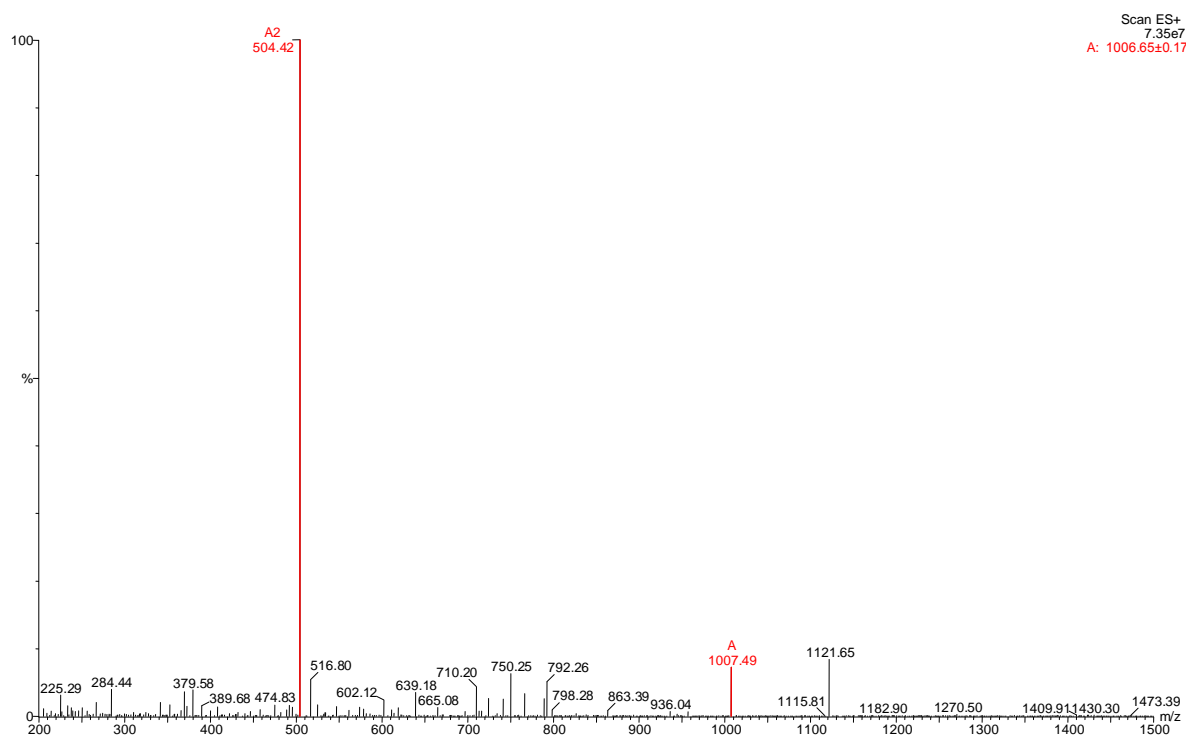
Σχήμα 6.12 : Αναλυτική RP-HPLC του H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:80/20 σε A/B:40/60, ταχύτητα ροής 4,7ml/min, ανίχνευση στα 214nm.

6.8 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου

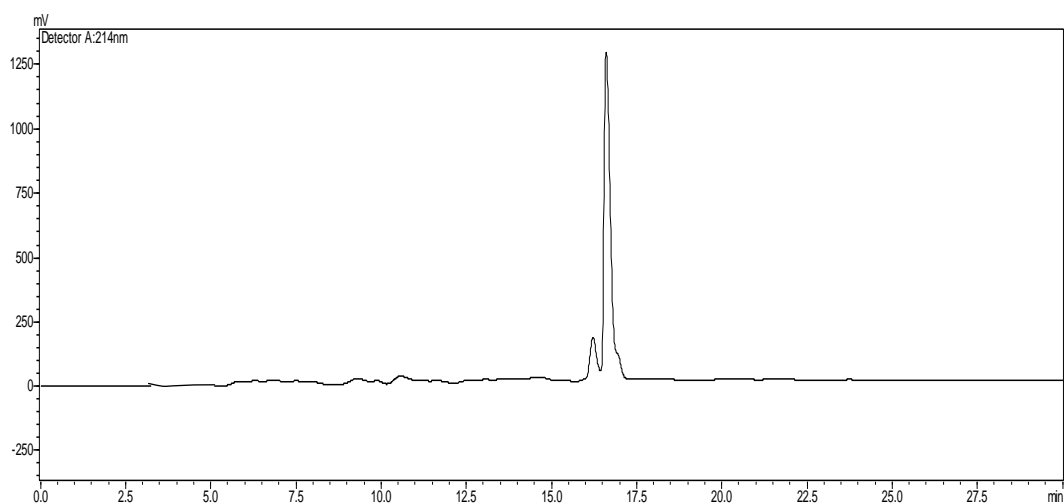
Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂ με MB=1007,22 και MT=C₄₈H₇₅N₁₅O₉ (6)

Το πεπτίδιο αυτό προκύπτει από το 1/3 της πεπτιδορητίνης Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Arg-Phe]₂-NH₂ (0,83g και 0,3mmol), έπειτα από απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας του N-τελικού άκρου και ακετυλίωση με διάλυμα οξικού ανυδρίτη (CH₃CO)₂O (30 φορές σε περίσσεια έναντι των συνολικών mmoles των αμινομάδων) σε πυριδίνη (απόδοση ακετυλίωσης 90%). Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με μίγμα TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5). Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη ήταν 98%.

Για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 min. Η βαθμίδωση των διαλυτών ήταν γραμμική από A/B:80/20 σε A/B:30/70 και η απόδοση καθαρισμού 8%. Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (Σχήμα 6.13). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1007,22, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1007,49, ενώ η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6.14).



Σχήμα 6.13 : Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂ (6).



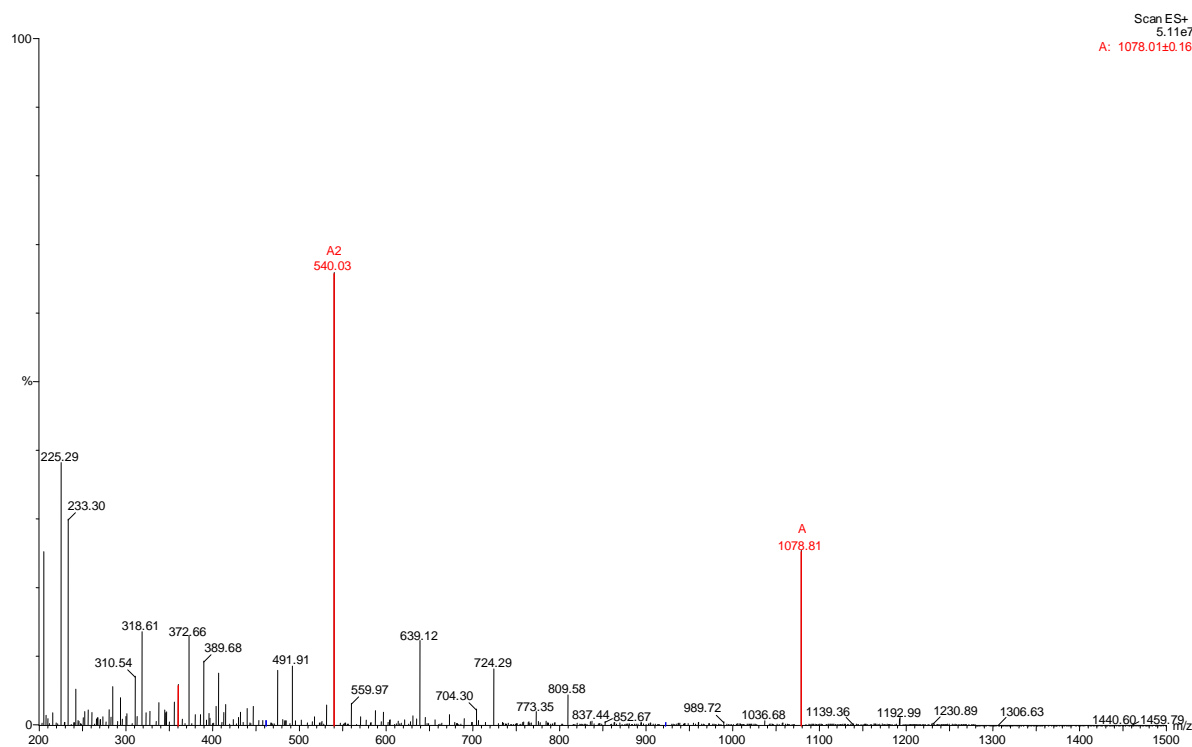
Σχήμα 6.14 : Αναλυτική RP-HPLC του Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:80/20 σε A/B:30/70, ταχύτητα ροής 4,7 ml/min, ανίχνευση στα 214nm.

6.9 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου

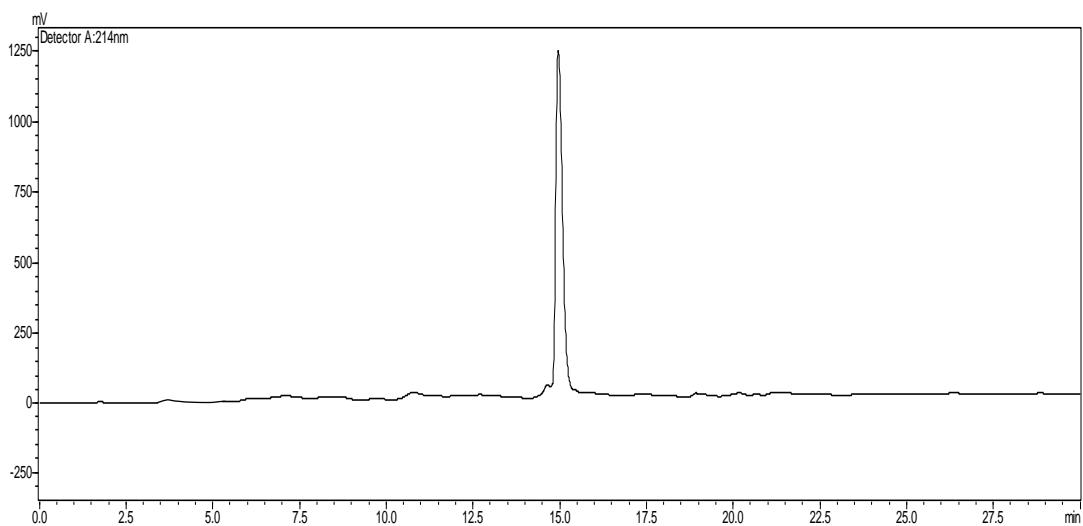
Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂ με MB=1078,33 και MT=C₅₂H₈₄N₁₆O₉ (7)

Ομοίως, το πεπτίδιο αυτό προκύπτει από το 1/3 της μισής ποσότητας της πεπτιδορρητίνης Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Arg-Phe]₂-NH₂ (0,83g και 0,3mmol), έπειτα από απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας του N-τελικού άκρου και προσθήκη του αμινοκαπροϊκού οξέος, Fmoc-Ahx-OH (απόδοση σύνθεσης 86,3%). Στη συνέχεια, απομακρύνεται η προστατευτική Fmoc-ομάδα του αμινοκαπροϊκού οξέος και ακολουθεί αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη, χρησιμοποιώντας το μίγμα TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5). Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη ήταν 96%.

Ακολουθεί καθαρισμός με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και τις εξής συνθήκες: A/B:80/20 έως A/B:40/60, όπου (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 min. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 4,5%. Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (Σχήμα 6.15). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1078,33, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1078,81, ενώ η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6.16).



Σχήμα 6.15 : Φάσμα μάζας ESI-MS του Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂ (7).

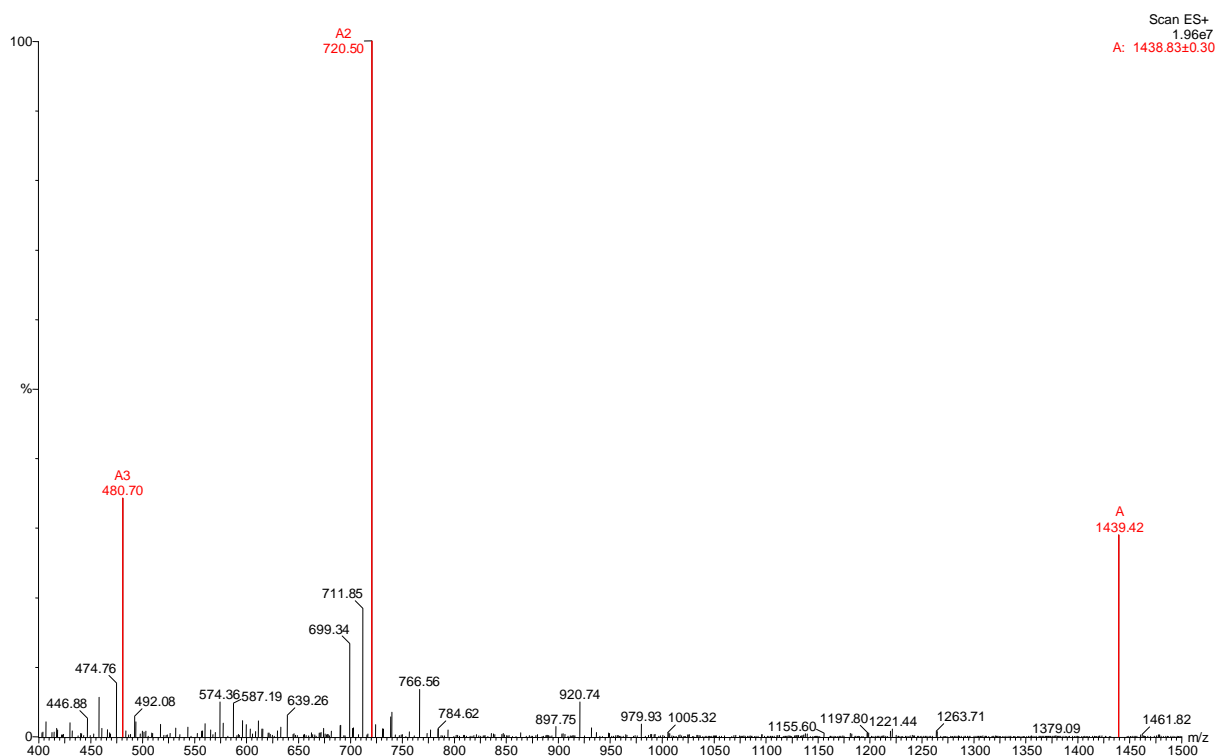


Σχήμα 6.16 : Αναλυτική RP-HPLC του Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:80/20 σε A/B:40/60, ταχύτητα ροής 4,7 ml/min, αντίχνευση στα 214nm.

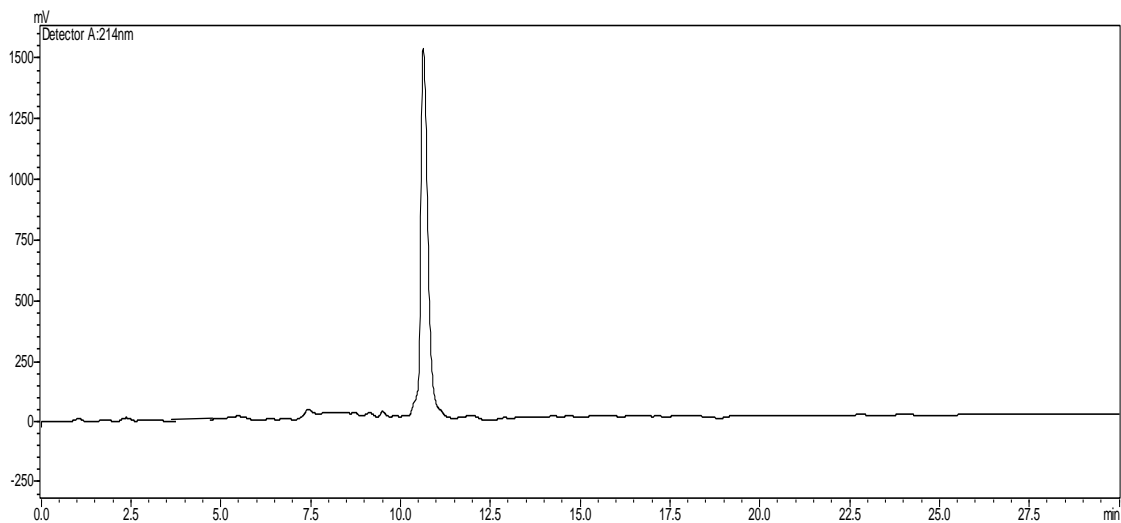
6.10 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου

H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂ με MB=1438,73 και MT=C₆₉H₁₀₈N₂₂O₁₂ (8)

Το παραπάνω πεπτίδιο προκύπτει μετά από τη σύζευξη τεσσάρων αμινοξέων σύμφωνα με την Fmoc μεθοδολογία στο υπόλοιπο 1/2 της πεπτιδορητίνης Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Arg-Phe]₂-NH₂ (2,5g και 0,85mmol). Η απόδοση σύνθεσης του Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Arg-Phe]₃-NH₂ ήταν 51,5%. Στο ένα τρίτο αυτής της ποσότητας (0,8g και 0,27mmol) απομακρύνθηκε η Fmoc προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας του N-τελικού άκρου. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη πραγματοποιήθηκε με το μίγμα TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5) με απόδοση 99%, ενώ ο καθαρισμός με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και σύστημα έκλουσης A/B:70/30 έως A/B:40/60 (απόδοση καθαρισμού 5%). Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (Σχήμα 6.17). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1438,73, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1439,42, ενώ η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6.18).



Σχήμα 6.17 : Φάσμα μάζας ESI-MS του H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂ (8).



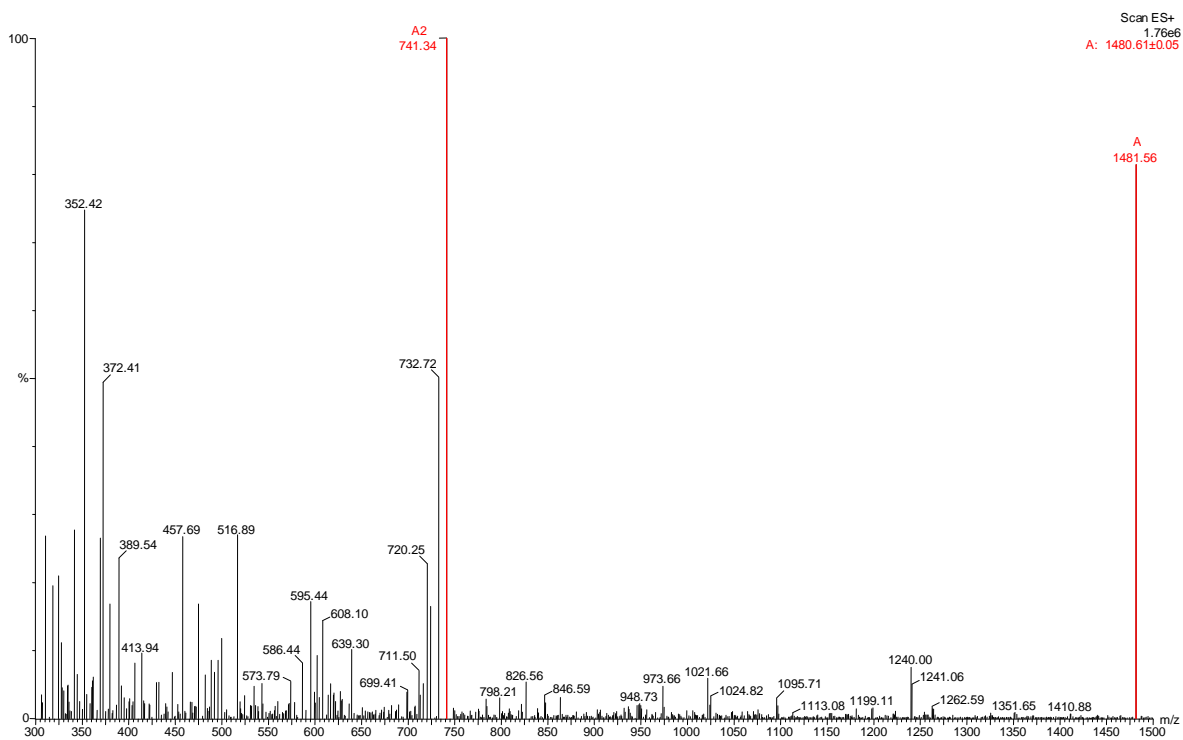
Σχήμα 6.18 : Αναλυτική RP-HPLC του H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂. Σύστημα έκλυσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, χρόνος έκλυσης 30 min από A/B:70/30 σε A/B:40/60, ταχύτητα ροής 4,7ml/min, ανίχνευση στα 214nm.

6.11 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου

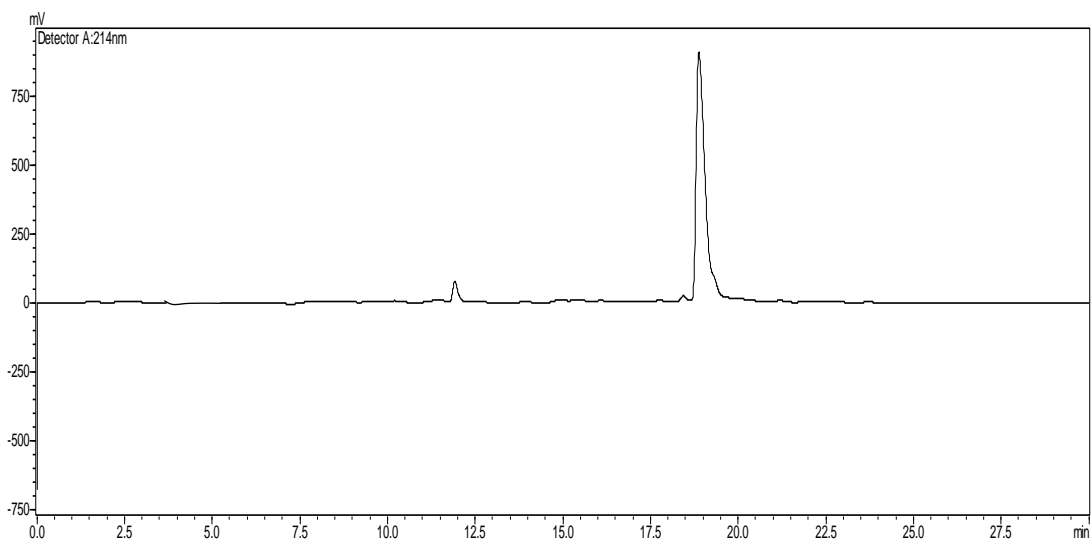
Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂ με MB=1480,77 και MT=C₇₁H₁₁₀N₂₂O₁₃ (9)

Στο ένα τρίτο της ποσότητας του Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Arg-Phe]₃-NH₂ (0,8g και 0,27mmol) απομακρύνθηκε η Fmoc προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας του N-τελικού άκρου και πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση (απόδοση ακετυλίωσης 88%). Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη πραγματοποιήθηκε όπως και προηγουμένως με απόδοση 95%, ενώ ο καθαρισμός με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και σύστημα έκλυσης A/B:70/30 έως A/B:40/60. Η απόδοση καθαρισμού του πεπτιδίου ήταν 4,7%. Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (Σχήμα 6.19). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1480,77, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1481,56, ενώ η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6.20).

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρουμε ότι το υπόλοιπο 1/3 του Fmoc-[Aib-Arg(Pbf)-Arg-Phe]₃-NH₂ χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂ με MB=1550,89 και MT=C₇₅H₁₁₉N₂₃O₁₃. Λόγω της δυσκολίας της σύνθεσης και της πληθώρας των παραπροϊόντων, το παραπάνω πεπτίδιο δεν ήταν εφικτό ούτε να ταυτοποιηθεί, ούτε να απομονωθεί.



Σχήμα 6.19 : Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂ (**9**).



Σχήμα 6.20 : Αναλυτική RP-HPLC του Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:70/30 σε A/B:40/60, ταχύτητα ροής 4,7ml/min, ανίχνευση στα 214nm.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΙ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

7.1 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

7.1.1 Στελέχη-Θρεπτικά υλικά

Για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκαν τα Gram-θετικά βακτήρια *Mycobacterium smegmatis* mc²155, *Bacillus subtilis* DELTA, τα Gram-αρνητικά *Escherichia coli* DH5a, *Pseudomonas aeruginosa* PAO και ο μύκητας *Candida parapsilosis*. Για τα Gram-θετικά, το *E. coli* DH5a και το *P.aeruginosa* PAO χρησιμοποιήθηκε ως στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης το Luria agar με σύσταση :

1% τρυπτόνη,

0,5% εκχύλισμα ζύμης,

1% NaCl,

0,15 ml NaOH 1N

και 2% άγαρ,

με μόνη διαφορά στο *Mycobacterium smegmatis* mc²155 που χρησιμοποιείται επιπλέον 0,1% Tween, ένα απορρυπαντικό για την αποφυγή της δημιουργίας συσσωματωμάτων.

Για το μύκητα *C. parapsilosis* χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο με σύσταση :

1% γλυκόζη,

0,5% πεπτόνη,

0,3% εκχύλισμα ζύμης,

0,3% εκχύλισμα μαλτόζης

και 2% άγαρ.

Παρατηρούμε ότι και τα τρία θρεπτικά μέσα περιέχουν 2% άγαρ, απαραίτητο συστατικό για τη δομή gel που πρέπει να διαθέτουν.

Μετά την παρασκευή των υλικών ακολούθησε αποστείρωσή τους για 20 min στους 121° C υπό πίεση 1,5 bar. Το θρεπτικό μέσο μοιράστηκε σε στείρα τρυβλία (25ml/τρυβλίο) σε θάλαμο νηματικής ροής και με τη χρήση λύχνου BUNSEN και μετά τη στερεοποίηση του άγαρ πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός. Τα *E. coli* DH5a και *P.aeruginosa* PAO επώστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες, τα *M. smegmatis* mc²155 και *B. subtilis* DELTA στους 37 °C για 12 ώρες, ενώ ο *C. parapsilosis* στους 30 °C για 48 ώρες.

7.1.2 Μελέτη ανθεκτικότητας των μικροβιακών στελεχών στα πεπτίδια

Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH₂, όπου n = 2 ή 3, X = Leu ή Phe και Y = H- ή Ac- ή Ahx [1]

Με τη βοήθεια κρικοφόρου στελλεού μεταφέρθηκε ποσότητα κυττάρων από το τρυβλίο ανάπτυξης του κάθε στελέχους σε αποστειρωμένο σωληνάριο που περιέχει 3 ml του κατάλληλου υγρού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης (της ίδιας σύστασης με το στερεό, χωρίς την παρουσία του άγαρ) κάτω από στείρες συνθήκες. Έπειτα από καλή ανάδευση, οι προκαλλιέργειες επώαστηκαν στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για το κάθε στέλεχος. Χρησιμοποιώντας φωτόμετρο SHIMADZU UV-1201 μετρήθηκε η τιμή της απορρόφησης της προκαλλιέργειας στα 600 nm, αφού πρώτα αραιώθηκε με 3 ml απεσταγμένο H₂O (αποστειρωμένο). Στη συνέχεια συγκεκριμένη ποσότητα της προκαλλιέργειας μεταφέρθηκε σε νέο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (2 ml), ώστε η τελική απορρόφηση να είναι περίπου 0.05 στα 600 nm. Σε 96-well plates (microplates) με καπάκι τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγαδάκι 100 μl από τη νέα καλλιέργεια και 100 μl από αραιωμένα διαλύματα πεπτιδίων συγκεντρώσεων 50-500 μg/ml και επώαστηκαν για άλλες 24 ώρες στην αντίστοιχη θερμοκρασία. Ως δείγμα αναφοράς (control) για την πλήρη ανάπτυξη του στελέχους ορίστηκε το δείγμα που επώαστηκε χωρίς το πεπτίδιο. Η αναστολή της ανάπτυξης καθορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης σε ELISA Reader και διαπιστώθηκε από την πολύ μικρή τιμή απορρόφησης του δείγματος σε σχέση με αυτή του δείγματος αναφοράς (control). Τα πεπτίδια που εμφάνισαν αναστολή δοκιμάστηκαν και σε μικρότερες συγκεντρώσεις (15-50 μg/ml) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής, MIC (minimal inhibitory concentration). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνονται στους δύο παρακάτω πίνακες για τα Gram-αρνητικά και τα Gram-θετικά βακτήρια.

Πίνακας 7.1 : Ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC, µg/ml) των πεπτιδίων ως προς τα Gram-αρνητικά βακτήρια και το μύκητα.

ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΕΠΤΙΔΙΑ	<i>E. coli</i> DH5a	<i>P. aeruginosa</i> PAO	<i>Candida</i> <i>parapsilosis</i>
H -(Aib-Arg-Aib- Leu) ₂ -NH ₂	150µg/ml	500µg/ml	—
Ahx -(Aib-Arg-Aib- Leu) ₂ -NH ₂	50µg/ml	200µg/ml	200µg/ml
H -(Aib-Arg-Aib- Leu) ₃ -NH ₂	15µg/ml	100µg/ml	500µg/ml
Ahx -(Aib-Arg-Aib- Leu) ₃ -NH ₂	15µg/ml	150µg/ml	500µg/ml
H -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₂ -NH ₂	50µg/ml	200µg/ml	—
Ac -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₂ -NH ₂	50µg/ml	300µg/ml	400µg/ml
Ahx -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₂ -NH ₂	50µg/ml	150µg/ml	200µg/ml
H -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₃ -NH ₂	50µg/ml	50µg/ml	500µg/ml
Ac -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₃ -NH ₂	200µg/ml	200µg/ml	500µg/ml

(—): δεν παρουσίασε αναστολή

Πίνακας 7.2 : Ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC, µg/ml) των πεπτιδίων ως προς τα Gram-θετικά βακτήρια.

ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΕΠΤΙΔΙΑ	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	<i>B. subtilis</i> DELTA
H -(Aib-Arg-Aib- Leu) ₂ -NH ₂	500µg/ml	500µg/ml
Ahx -(Aib-Arg-Aib- Leu) ₂ -NH ₂	50µg/ml	200µg/ml
H -(Aib-Arg-Aib- Leu) ₃ -NH ₂	150µg/ml	50µg/ml
Ahx -(Aib-Arg-Aib- Leu) ₃ -NH ₂	150µg/ml	150µg/ml
H -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₂ -NH ₂	300µg/ml	200µg/ml
Ac -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₂ -NH ₂	200µg/ml	300µg/ml
Ahx -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₂ -NH ₂	200µg/ml	150µg/ml
H -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₃ -NH ₂	200µg/ml	50µg/ml
Ac -(Aib-Arg-Aib- Phe) ₃ -NH ₂	—	—

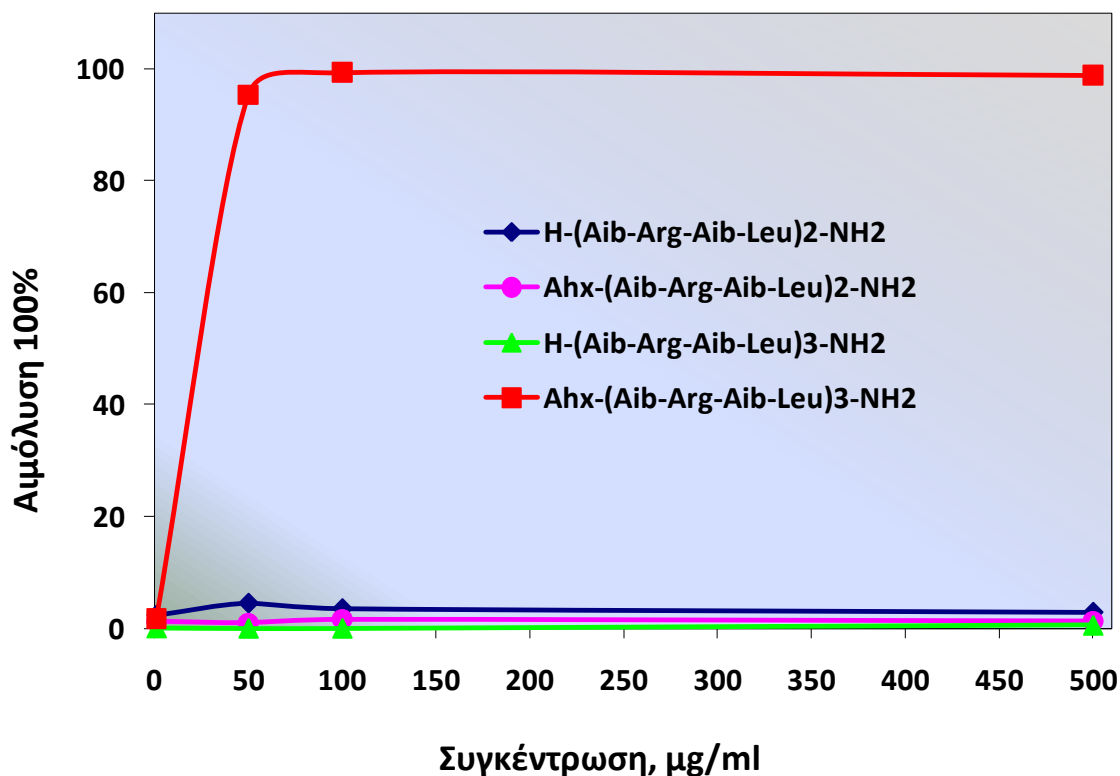
(—): δεν παρουσίασε αναστολή

Σύμφωνα λοιπόν με τους πίνακες, παρατηρούμε αρχικά ότι σχεδόν όλα τα πεπτίδια αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ακόμα και του μύκητα *Candida parapsilosis*. Από τα παράγωγα του Aib, τα τριμερή εμφανίζουν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από τα διμερή και πιο συγκεκριμένα αυτά που έχουν στην αλληλουχία τους το αμινοξύ της λευκίνης. Πιο αναλυτικά, παρατηρούμε ότι τα ανάλογα αυτά έχουν συγκεντρώσεις MIC πολύ χαμηλότερες στο Gram-αρνητικό βακτήριο *Escherichia coli* DH5a σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, με τιμές MIC να προσεγγίζουν τα 15μg/ml. Επίσης, αξίζει να αναφέρουμε ότι καθώς αυξάνεται το ποσοστό της υδροφοβικότητας των πεπτιδίων, είτε με αντικατάσταση του ελεύθερου αμινο-άκρο του Aib με την ακέτυλο-ομάδα και το λιπαρό αμινοκαπροϊκό οξύ, είτε με αντικατάσταση της λευκίνης από την πιο υδρόφοβη φαινυλαλανίνη, βελτιώνεται και η δράση. Βέβαια, από ένα σημείο και μετά, περαιτέρω αύξηση στην τιμή της υδροφοβικότητας καθιστά ανίκανα τα πεπτίδια να αναστείλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, όπως συμβαίνει με το ακετυλιωμένο παράγωγο Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂.

7.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΜΟΛΥΣΗΣ [2, 3]

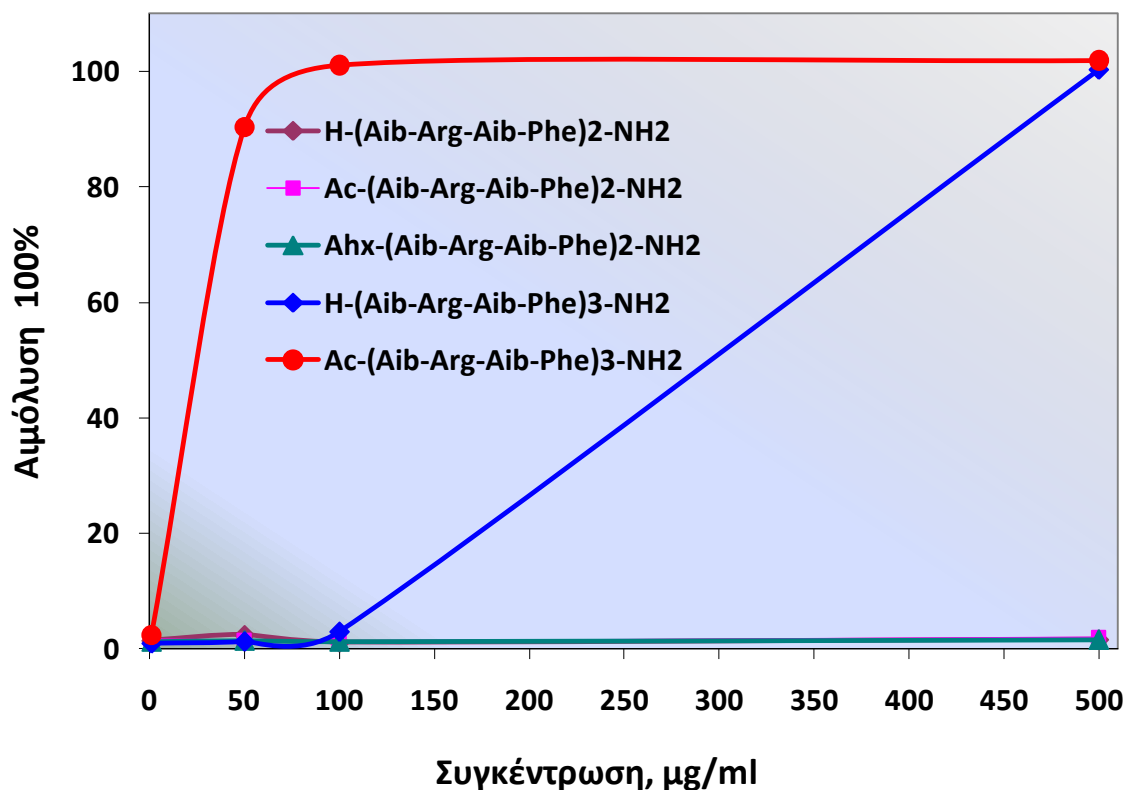
Τα πεπτίδια που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση μελετήθηκαν και ως προς την τοξικότητά τους σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα (**RBC**, *red blood cells*). Αρχικά, παρελήφθη φρέσκο αίμα από τέσσερις διαφορετικούς ανθρώπους σε ηπαρίνη που χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό. Για την απομόνωση των ερυθροκυττάρων από τα άλλα κύτταρα του αίματος, όπως είναι π.χ τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια, έγινε φυγοκέντρηση για 10 min στις 3000 στροφές. Τα ερυθροκύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο, **Tris buffer** (10mM Tris, 150mM NaCl, pH = 7,4). Στη συνέχεια, 200μl από το αιώρημα των κυττάρων και διάφορες ποσότητες από stock διάλυμα πεπτιδίου (συγκεντρώσεις 1-500μg/ml) και ρυθμιστικό διάλυμα τοποθετήθηκαν σε erpendorf με τελικό όγκο 1500μl. Ως τυφλό (0% αιμόλυση) χρησιμοποιήθηκε το δείγμα που δεν περιείχε πεπτίδιο, αλλά 200μl από το αιώρημα των κυττάρων και 1300μl buffer, ενώ ως δείγμα αναφοράς, *control* (100% αιμόλυση), χρησιμοποιήθηκε το δείγμα που περιείχε 200μl από το αιώρημα των κυττάρων και 1300μl από διάλυμα 0,5% NH₄OH. Ακολούθησε επώαση για 30 min σε Eppendorf thermomixer στους 37° C με ήπια ανακίνηση, ψύξη και φυγοκέντρηση στα 2000g, στους 4° C για 5 min. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση για κάθε δείγμα στα 540 nm σε φωτόμετρο SHIMADZU UV-1201, χρησιμοποιώντας κυψελίδα του ενός ml. Η αιμόλυση εκφράζεται με τον όρο EC₅₀, που υποδηλώνει τη συγκέντρωση του

πεπτιδίου (μg/ml) που προκαλεί λύση στο 50% του πληθυσμού των ερυθροκυττάρων και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε γραφική παράσταση της αιμόλυσης (%) σε σχέση με τη συγκέντρωση του πεπτιδίου.



Σχήμα 7.1 : Διάγραμμα αιμόλυσης των παραγώγων του αμινοϊσοβουτυρικού οξέος, Y-(Aib-Arg-Aib-Leu)_n-NH₂, όπου Y = H-, Ahx- και n = 2, 3.

Παρατηρούμε ότι, όλα τα παράγωγα του Aib που έχουν στην αλληλουχία τους το αμινοξύ της λευκίνης, δεν προκαλούν αιμόλυση των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων. Εξαιρεση αποτελεί το τριμερές παράγωγο Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂, το οποίο εμφανίζει τοξικότητα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (EC₅₀=25 μg/ml).



Σχήμα 7.2 : Διάγραμμα αιμόλυσης των παραγώγων του αμινοϊσοβουτυρικού οξέος, $Y-(Aib-Arg-Aib-Phe)_n-NH_2$, όπου $Y = H-, Ahx-$ και $n = 2, 3$.

Ομοίως, τα διμερή παράγωγα του Aib που στην αλληλουχία τους έχουν τη φαινυλαλανίνη, δεν εμφανίζουν τοξικότητα ακόμα και σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις (500µg/ml). Αντίθετα, τα τριμερή παράγωγα, το ελεύθερο και το ακετυλιωμένο, όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα, αιμολύουν τα ερυθροκύτταρα με τιμές EC_{50} 25µg/ml και 300µg/ml αντίστοιχα.

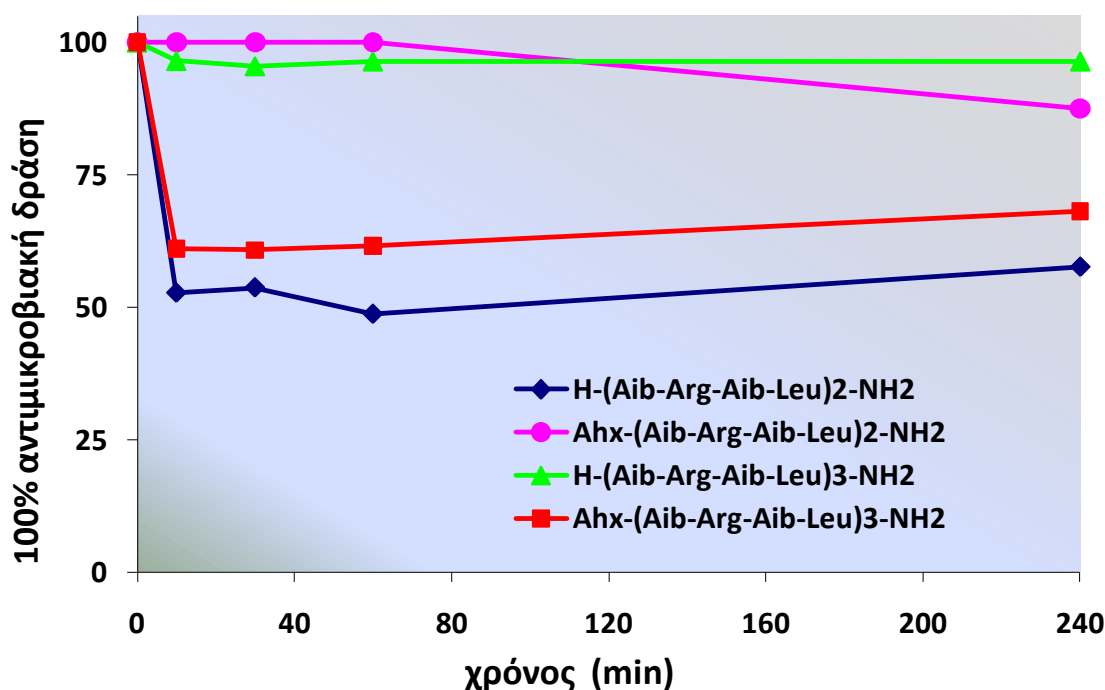
7.3 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Η ενζυμική αποικοδόμηση των πεπτιδίων $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH_2$, όπου $n = 2$ ή 3 , $X = Leu$ ή Phe και $Y = H-$ ή $Ac-$ ή Ahx πραγματοποιήθηκε με θρυψίνη και μελετήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους:

- α)** με μελέτη διατήρησης της αντιμικροβιακής δράσης και
- β)** με παρακολούθηση της υδρόλυσης των πεπτιδίων με αναλυτική RP-HPLC σε διάφορους χρόνους.

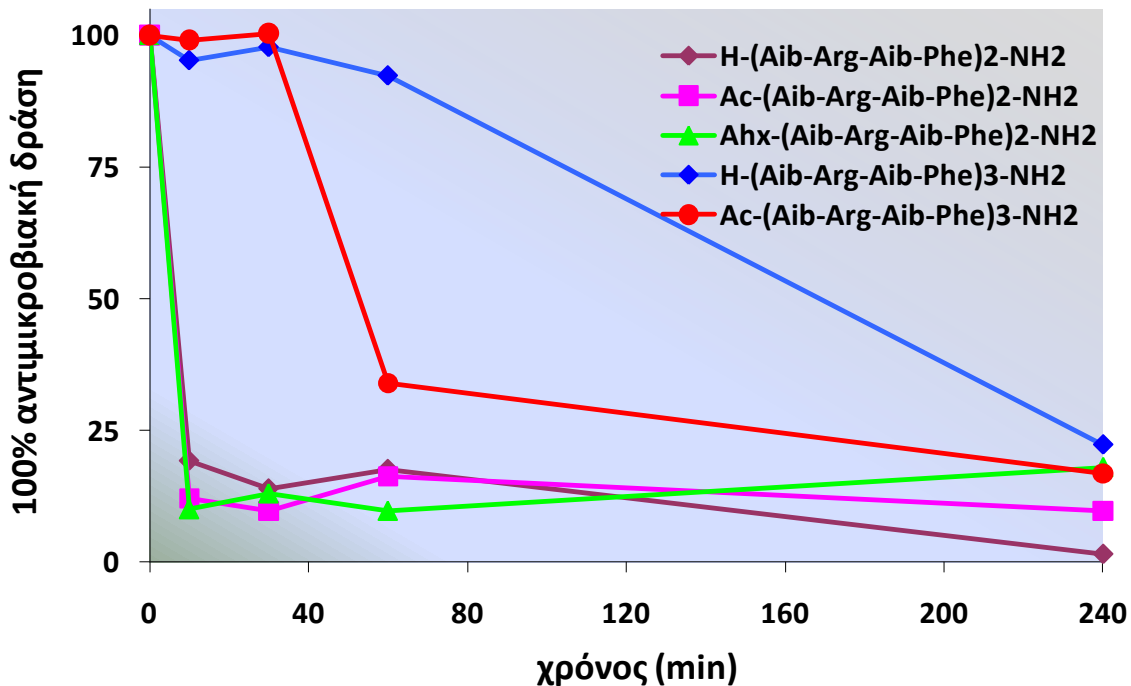
7.3.1 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης πεπτιδίων ύστερα από επώαση με θρυψίνη

Τα πεπτίδια επώαστηκαν μαζί με θρυψίνη σε μια αναλογία **ενζύμου/πεπτιδίου : 1/250** (%^{w/w}) στους 37°C. Η αντίδραση διακόπηκε με προσθήκη κατάλληλου αναστολέα θρυψίνης σε διάφορους χρόνους 10, 30, 60, 240 min και τα δείγματα δοκιμάστηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση. Ποσότητα από το κάθε δείγμα που αντιστοιχεί στην τιμή MIC των πεπτιδίων για το στέλεχος *Escherichia coli* DH5a (σε αυτό το βακτήριο επέδειξαν την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση όλα τα πεπτίδια) επώαστηκε με προκαλλιέργεια στους 37° C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα μετρήθηκε η απορρόφηση στα 600nm και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα **Σχήματα 7.3** και **7.4**.



Σχήμα 7.3 : Αντιμικροβιακή δράση των πεπτιδίων $Y-(Aib-Arg-Aib-Leu)_n-NH_2$, όπου $Y = H, Ahx-$ και $n = 2$ ή 3 παρουσία θρυψίνης.

Παρατηρούμε ότι, το τριμερές $H-(Aib-Arg-Aib-Leu)_3-NH_2$ και το διμερές πεπτίδιο $Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)_2-NH_2$ δεν επηρεάζονται από την επώασή τους με τη θρυψίνη και διατηρούν την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι του βακτηριακού στελέχους *Escherichia coli* DH5a. Ενώ, και τα πεπτίδια $H-(Aib-Arg-Aib-Leu)_2-NH_2$, $Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)_3-NH_2$ εξακολουθούν να διαθέτουν το 50-60% της δράσης τους.



Σχήμα 7.4 : Αντιμικροβιακή δράση των πεπτιδίων $Y-(Aib-Arg-Aib-Phe)_n-NH_2$, όπου $Y = H-, Ahx-$ και $n = 2$ ή 3 παρουσία θρυψίνης.

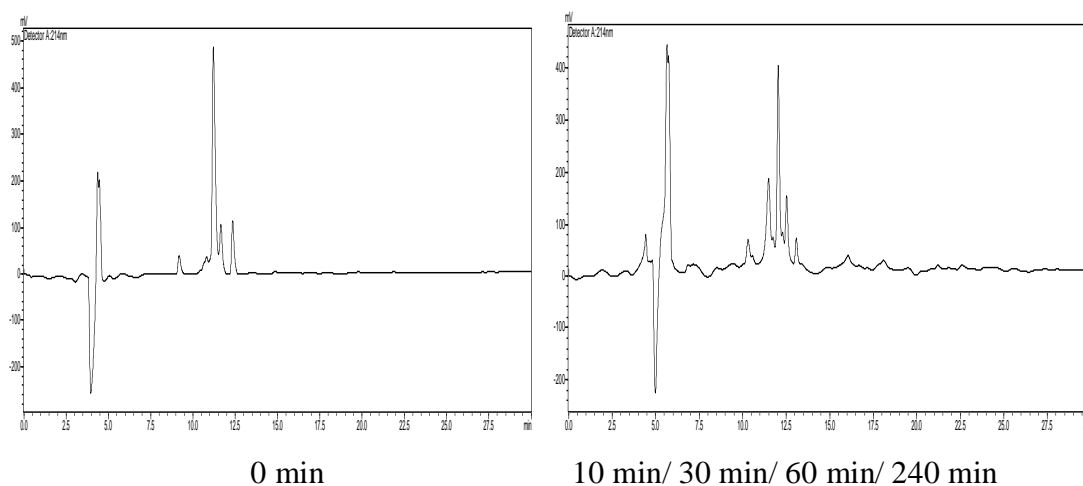
Στην περίπτωση των παραγώγων με τη φαινυλαλανίνη στην αλληλουχία τους, τα διμερή χάνουν εξολοκλήρου τη δράση τους από την αρχή της επώασής τους με τη θρυψίνη, ενώ τα τριμερή εμφανίζουν μια σταδιακή εξασθένιση της δραστηριότητάς τους έπειτα από 40min επώασης.

7.3.2 Μελέτη πρωτεολυτικής σταθερότητας με θρυψίνη χρησιμοποιώντας αναλυτική RP-HPLC [4]

Μία πιο άμεση μελέτη της πρωτεολυτικής σταθερότητας των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων παρουσία θρυψίνης, πραγματοποιείται με τη χρήση της αναλυτικής RP-HPLC. Τα πεπτίδια επωάζονται ξανά στην ίδια αναλογία με το ένζυμο στους $37^{\circ}C$ και στους ίδιους χρόνους. Ποσότητα πεπτιδίου διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS ($pH=7.4$) χρησιμοποιείται ως control, ενώ το σύστημα έκλουσης [(H₂O-0.1%TFA) : CH₃CN-0.1%TFA] παραμένει το ίδιο με τις συνθήκες καθαρισμού στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC για το κάθε παράγωγο του Aib.

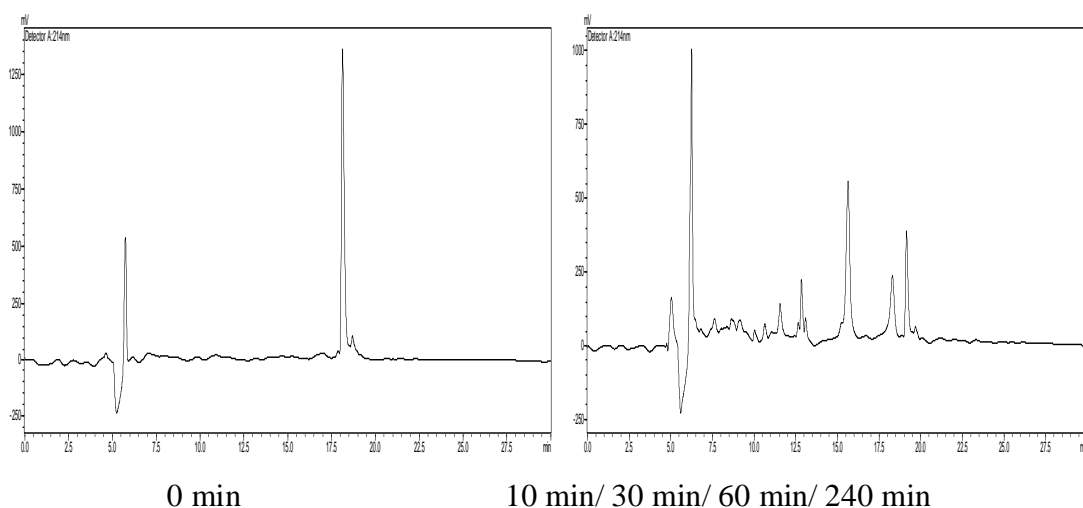
❖ H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂

Ένα μικρό ποσοστό του πεπτιδίου υφίσταται υδρόλυση, αλλά μπορούμε να θεωρήσουμε το τριμερές παράγωγο του Aib αρκετά σταθερό παρουσία θρυψίνης.



❖ Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂

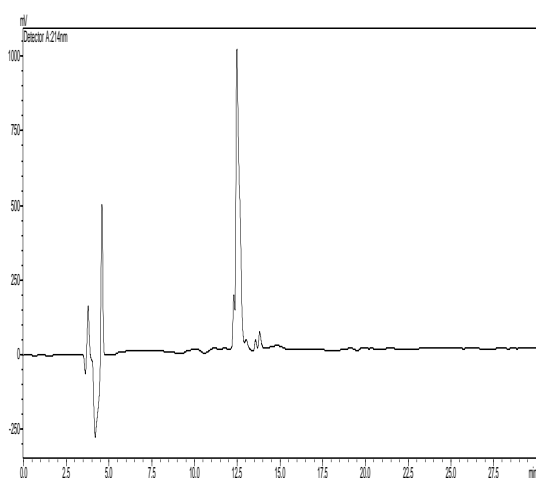
Παρόμοια συμπεριφορά με το H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂, δηλαδή πραγματοποιείται μερική υδρόλυση αρχικά στα δέκα λεπτά επώασης με τη θρυψίνη και καμία άλλη μεταβολή έως και τις 4 ώρες.



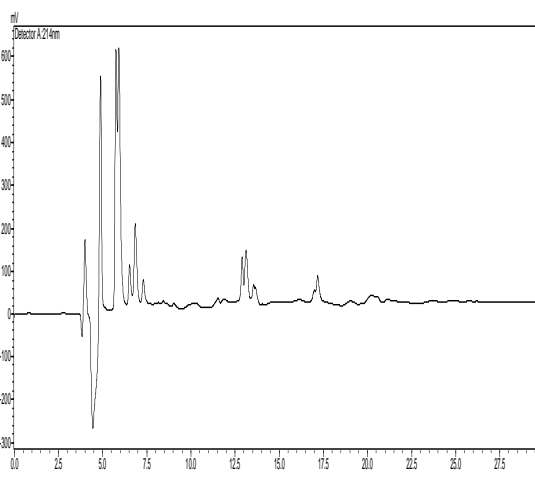
Σε αυτό το σημείο θα ήταν σκόπιμο να επισημάνουμε ότι τα ακετυλιωμένα παράγωγα του Aib που διαθέτουν την λευκίνη στην αλληλουχία τους και συντέθηκαν στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διατριβής επέδειξαν πρωτεολυτική σταθερότητα.

Αντίθετα, τα διμερή και τριμερή παράγωγα του Aib που η λευκίνη στην αλληλουχία τους έχει αντικατασταθεί από τη φαινυλαλανίνη, υδρολύονται πλήρως σχεδόν από τα 10 λεπτά επώασης με τη θρυψίνη, όπως φαίνεται στα παρακάτω φάσματα.

❖ **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂**

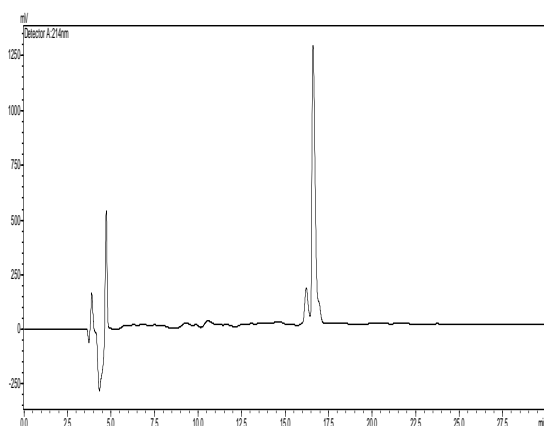


0 min

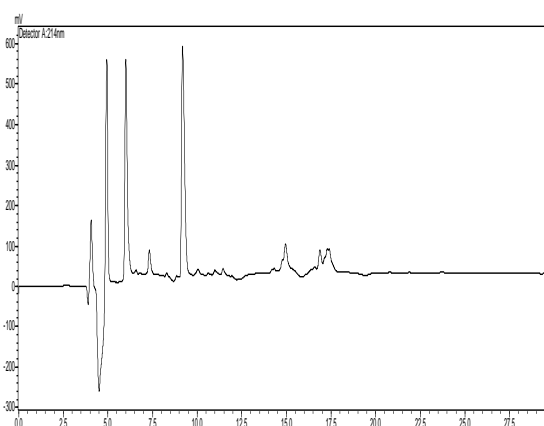


10 min/ 30 min/ 60 min/ 240 min

❖ **Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂**

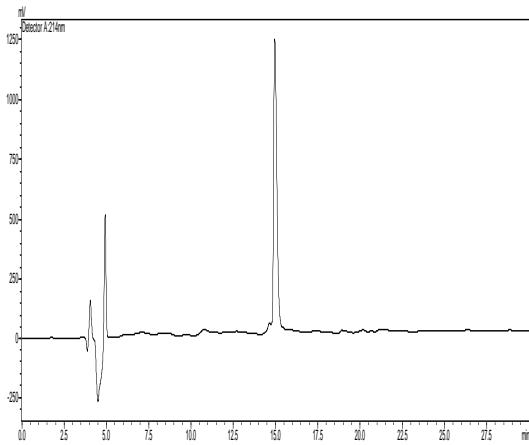


0 min

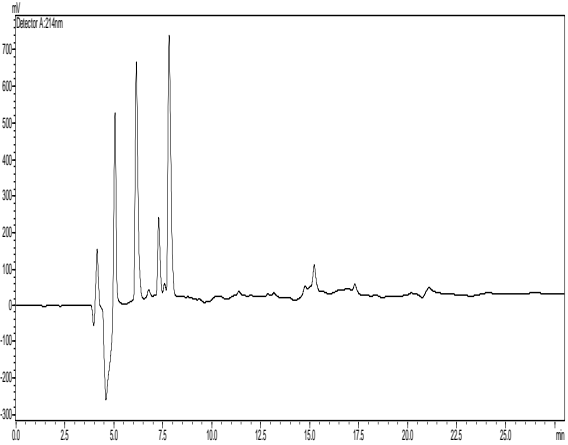


10 min/ 30 min/ 60 min/ 240 min

❖ **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂**

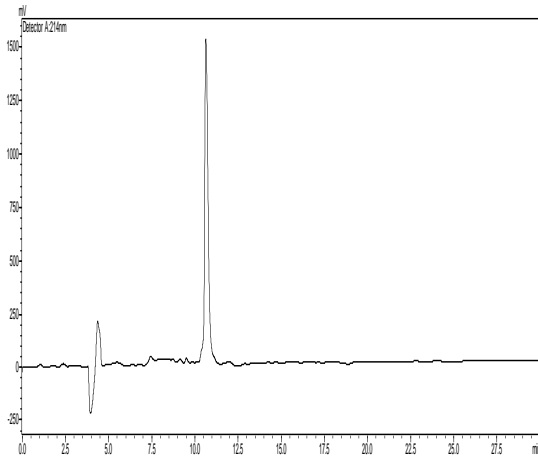


0 min

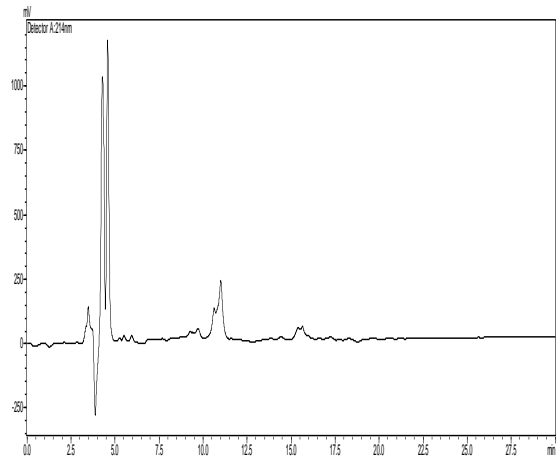


10 min/ 30 min/ 60 min/ 240 min

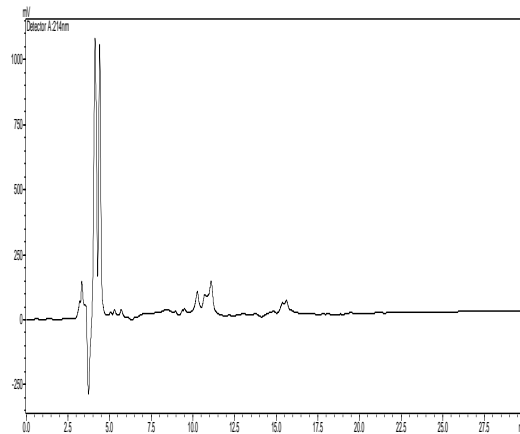
❖ **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂**



0 min

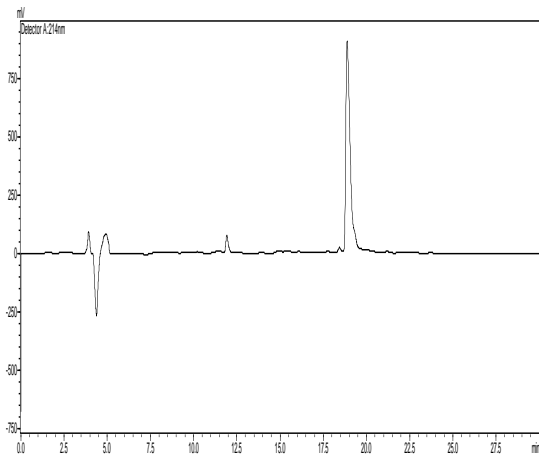


10 min/ 30 min/ 60 min

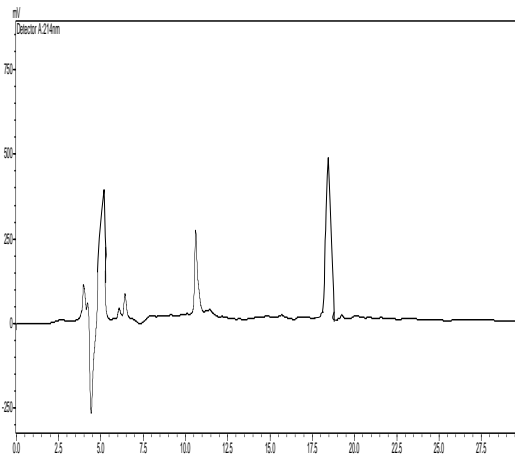


240 min

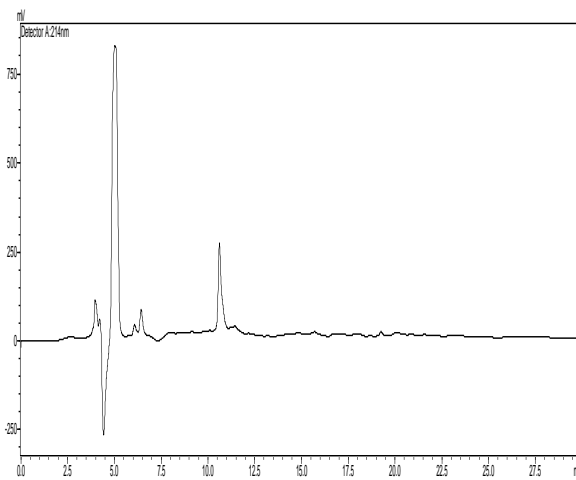
❖ **Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂**



0 min



10 min/ 30 min



60 min/ 240 min

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο. ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ**

8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα πεπτίδια $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH_2$ (όπου $Y = H-, Ac-, Ahx-$, $X = Leu-, Phe-$ και $n = 2$ ή 3) μελετήθηκαν ως προς τη διαμόρφωση που αποκτούν σε διάφορους διαλύτες με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου των Ιωαννίνων, σε φασματοφωτόμετρο Jasco J-815. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω διαλύτες :

- Μίγμα τριφθοροαιθανόλης/νερού, TFE/H₂O 50/50 (v/v)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, PBS buffer (pH=7.4)
- Διάλυμα δωδεκυλοθειϊκού νατρίου, SDS (sodium dodecyl sulfate) σε συγκέντρωση 8mM.
- Διάλυμα δεκατετραφωσφορυλογολίνης C₁₄PC σε συγκέντρωση 5mM.

Το TFE χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί η τάση των πεπτιδίων να σχηματίζουν έλικα, ενώ το SDS και το C₁₄PC επειδή προσομοιάζουν το λιπιδικό περιβάλλον των μεμβρανών. Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων σε όλους τους διαλύτες ήταν 100μM. Οι μετρήσεις έγιναν σε κυψελίδα διαμέτρου 0.1cm και σε θερμοκρασία 20°-25° C. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε στην περιοχή 190-260nm υπό συνεχή ροή αερίου αζώτου (6.5 l/min) υψηλής καθαρότητας (>99,99%) στο τμήμα του οπτικού θαλάμου.

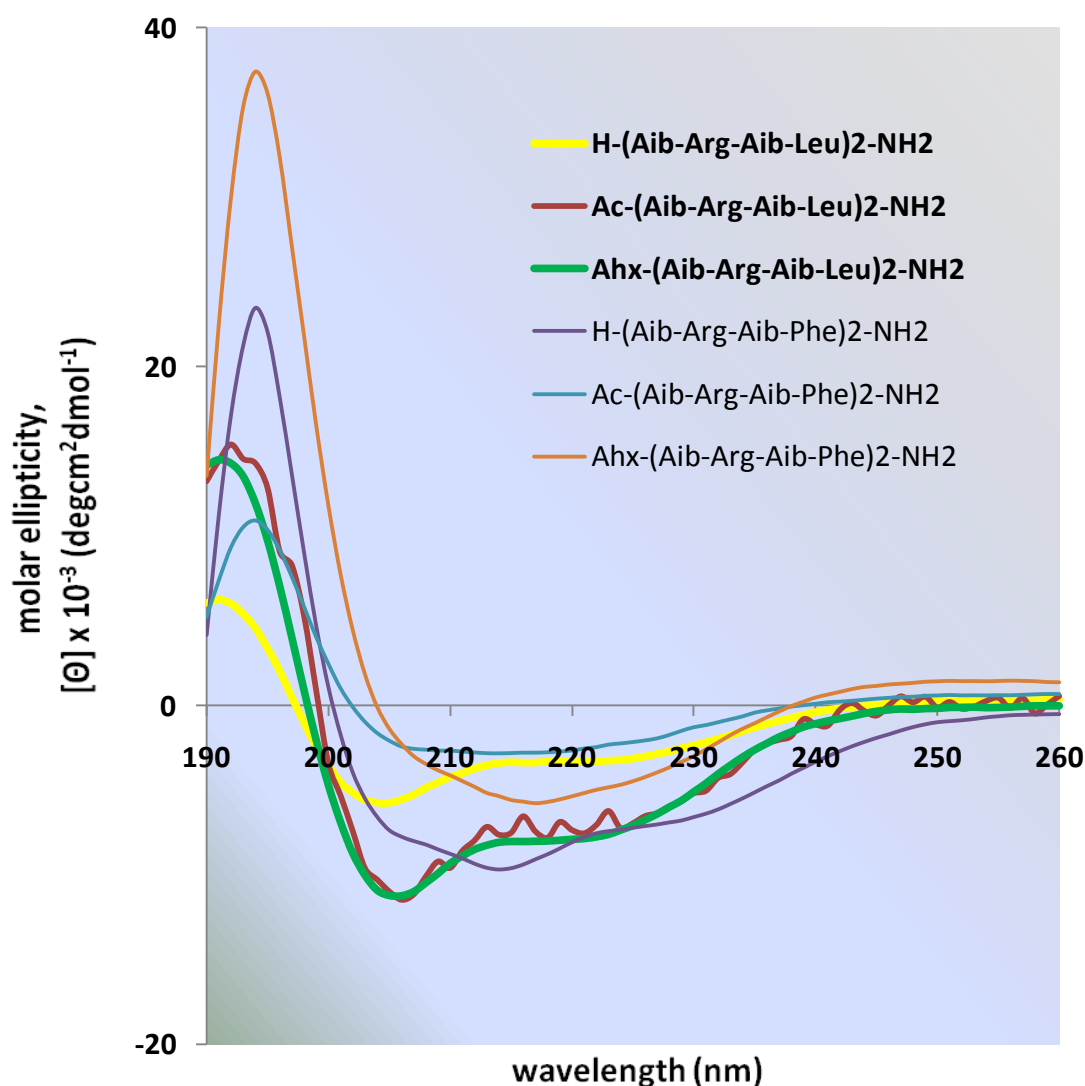
Η ρύθμιση των παραμέτρων του οργάνου για τη λήψη των φασμάτων έγινε ως εξής:

1. Περιοχή (range): 190-260nm
2. Ευαισθησία (sensitivity): 100mdeg
3. Ανάλυση (resolution): 0.2nm
4. Επιρροή συσσώρευσης (accumulation): 2
5. Εύρος ζώνης (bandwidth): 2.0nm
6. Ταχύτητα σάρωσης (scan speed): 50nm/min

8.2 Φάσματα CD των πεπτιδίων $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_2-NH_2$ ($Y = H-, Ac-, Ahx-$ και $X = Leu-, Phe-$)

▪ Μίγμα TFE/H₂O 50:50 (v/v)

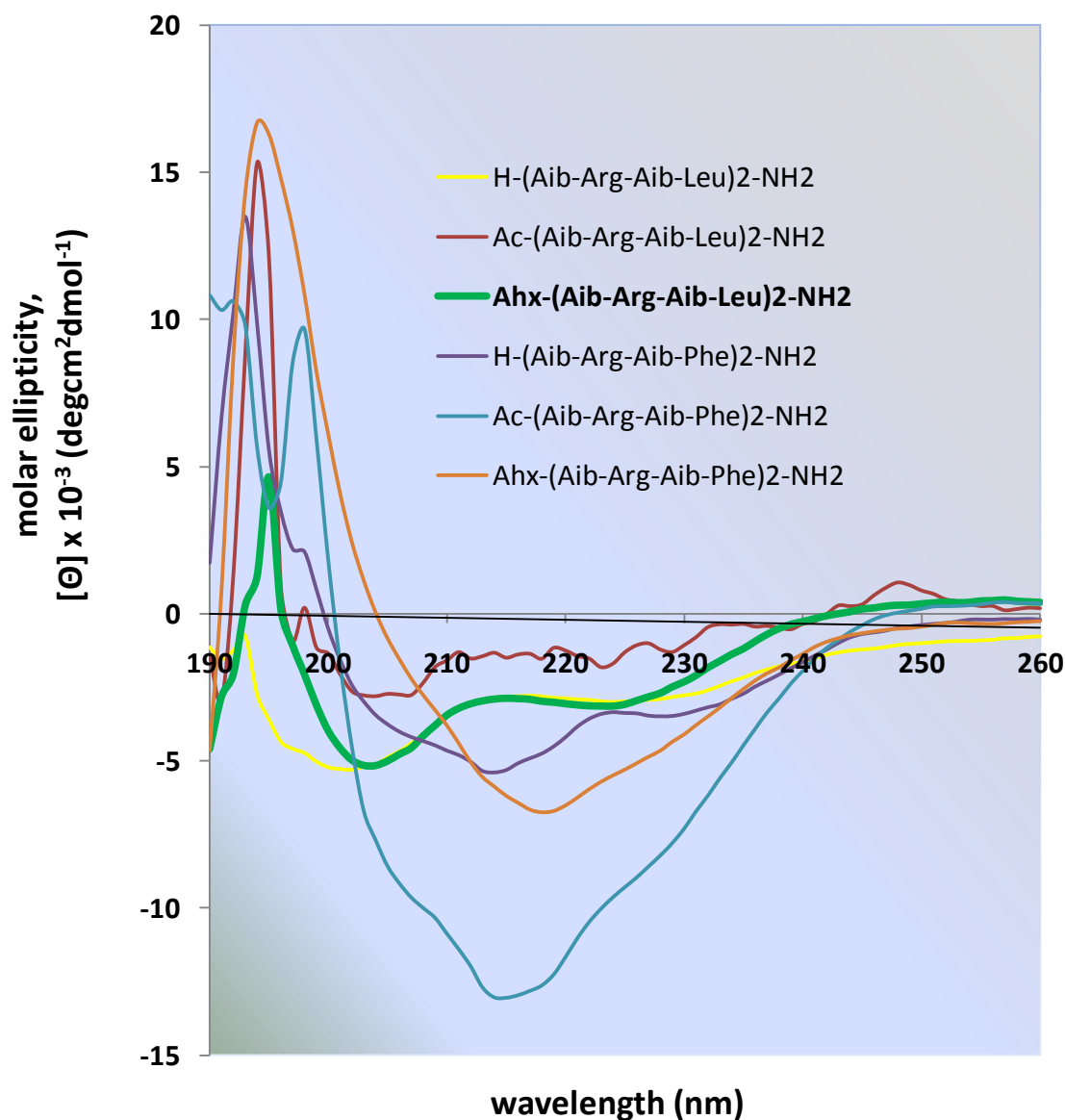
Τα διμερή παράγωγα του Aib με το αμινοξύ λευκίνη στην αλληλουχία τους (*έντονη γραφή*), εμφανίζουν στο μίγμα TFE/H₂O ένα μέγιστο στα 195nm και δύο ελάχιστα στα 208 και 222nm, χαρακτηριστικές κορυφές της α-ελικοειδούς διαμόρφωσης. Το ακετυλιωμένο παράγωγο Ac-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂ είχε συντεθεί στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης και η μελέτη της διαμόρφωσής του είχε πραγματοποιηθεί σε φασματοφωτόμετρο Jasco J-710.



Σχήμα 8.1 : Φάσματα CD των $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_2-NH_2$ συγκέντρωσης 100μM στο μίγμα TFE/H₂O.

Αντίθετα, τα διμερή παράγωγα του Aib με το αμινοξύ φαινυλαλανίνη στην αλληλουχία τους, εμφανίζουν ένα ελάχιστο στα 218nm και ένα μέγιστο στα 196nm, χαρακτηριστικές κορυφές του β-πτυχωτού φύλλου.

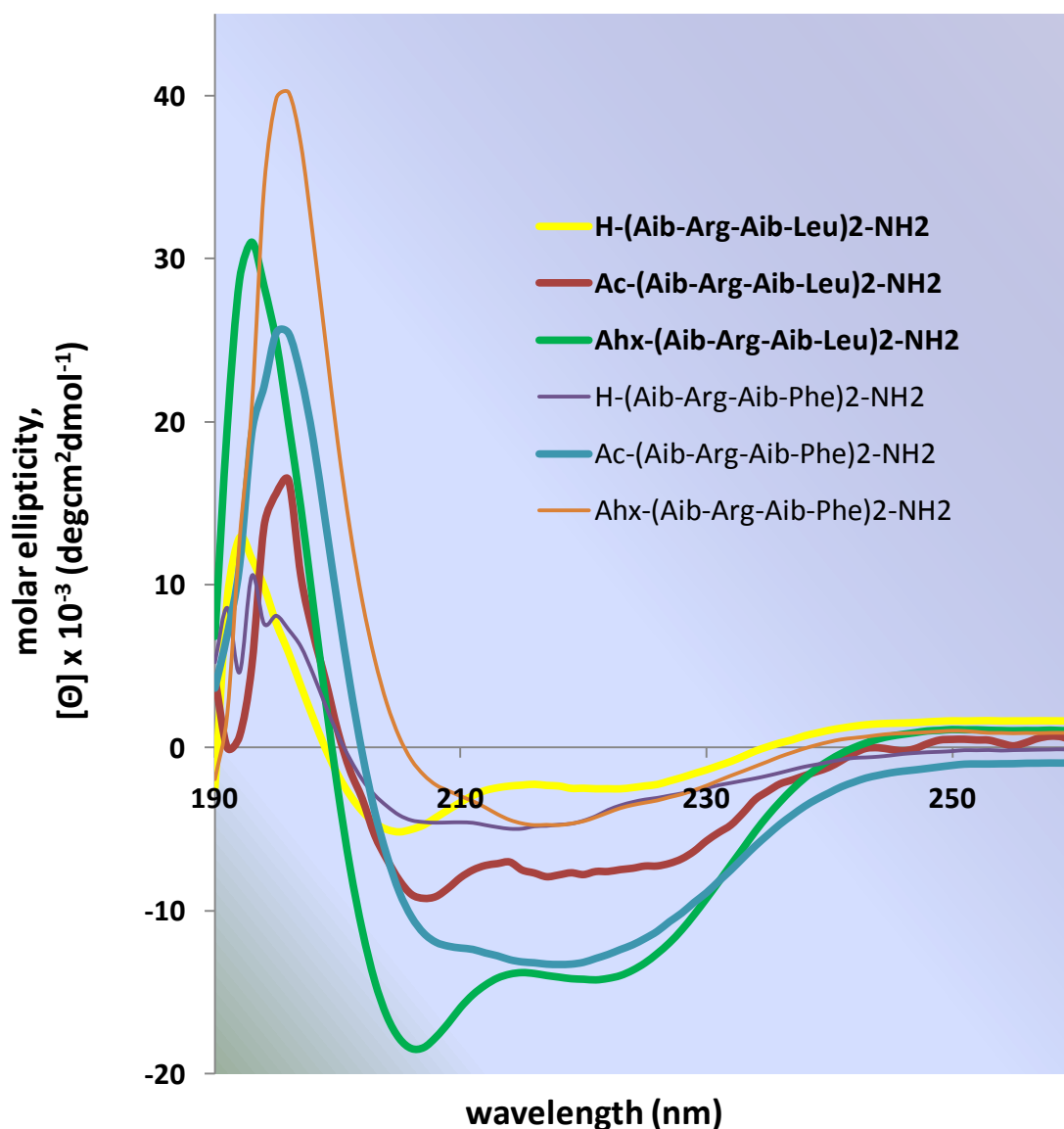
▪ *Διάλυμα φωσφορικών PBS (pH= 7,4)*



Σχήμα 8.2 : Φάσματα CD των Y-(Aib-Arg-Aib-X)₂-NH₂ συγκέντρωσης 100μM σε διάλυμα PBS (pH= 7,4).

Στο συγκεκριμένο διαλύτη, διακρίνουμε μια μικρή τάση σχηματισμού έλικας μόνο για το Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂ από τα διμερή του Aib με τη λευκίνη, ενώ ξεχωρίζει αρκετά η διαμόρφωση του β-φύλλου που υιοθετούν τα παράγωγα του Aib με τη φαινυλαλανίνη.

- *Διάλυμα SDS συγκέντρωσης 8μM*

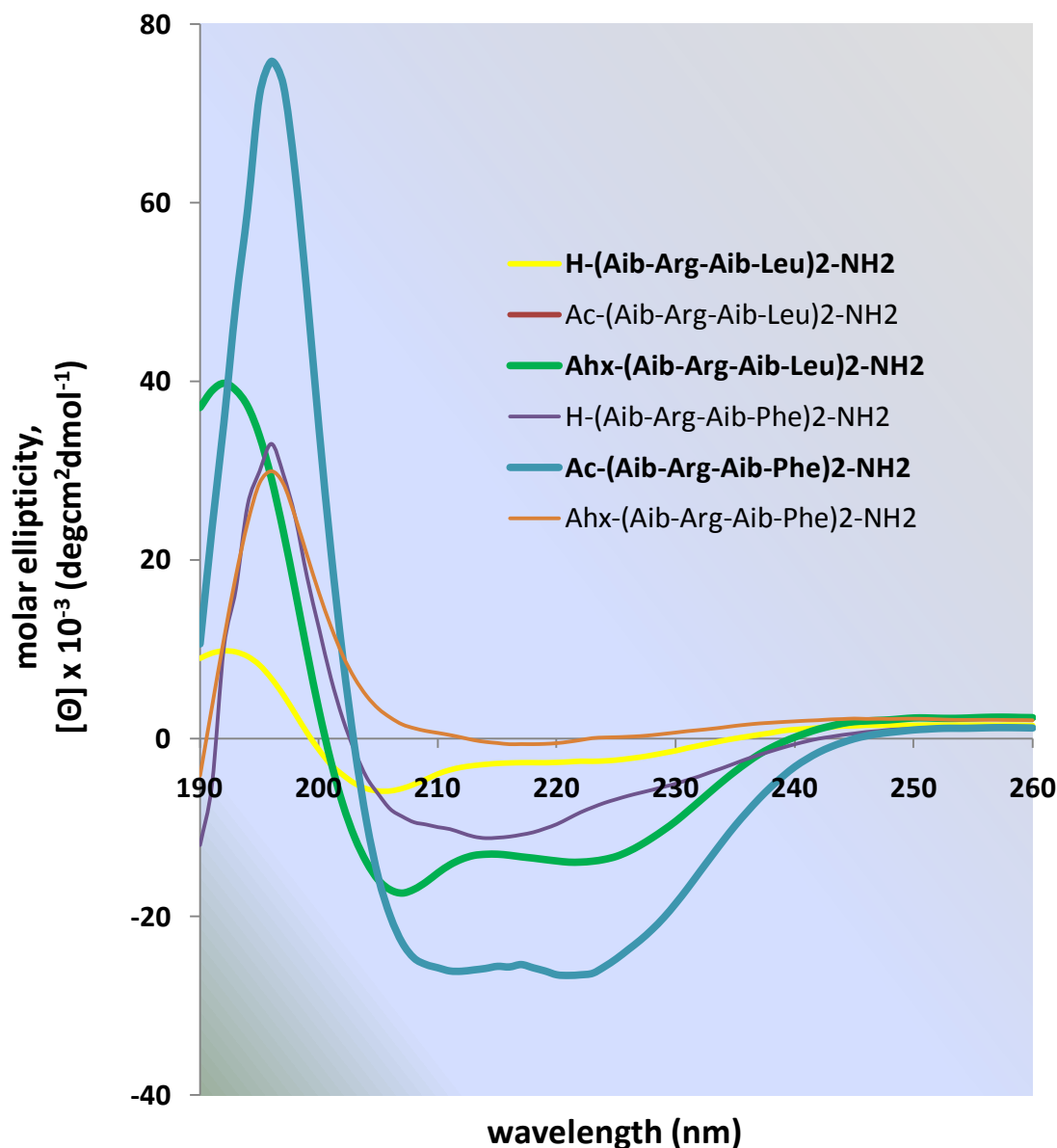


Σχήμα 8.3 : Φάσματα CD των Y-(Aib-Arg-Aib-X)₂-NH₂ συγκέντρωσης 100μM σε διάλυμα SDS (8μM).

Στο διαλύτη SDS, οι ελικοειδείς διαμορφώσεις των παραγώγων του Aib με τη λευκίνη είναι πιο ευδιάκριτες. Μάλιστα, παρατηρούμε ότι η έλικα αυξάνεται με την αύξηση της

υδροφοβικότητας του ελεύθερου άκρου των πεπτιδίων (Ahx>Ac>H). Ενώ, από τα διμερή παράγωγα του Aib με τη φαινυλαλανίνη, αρχίζει να διαφαίνεται σχηματισμός έλικας στο ακετυλιωμένο παράγωγο Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂.

▪ *Διάλυμα C₁₄PC 5mM*



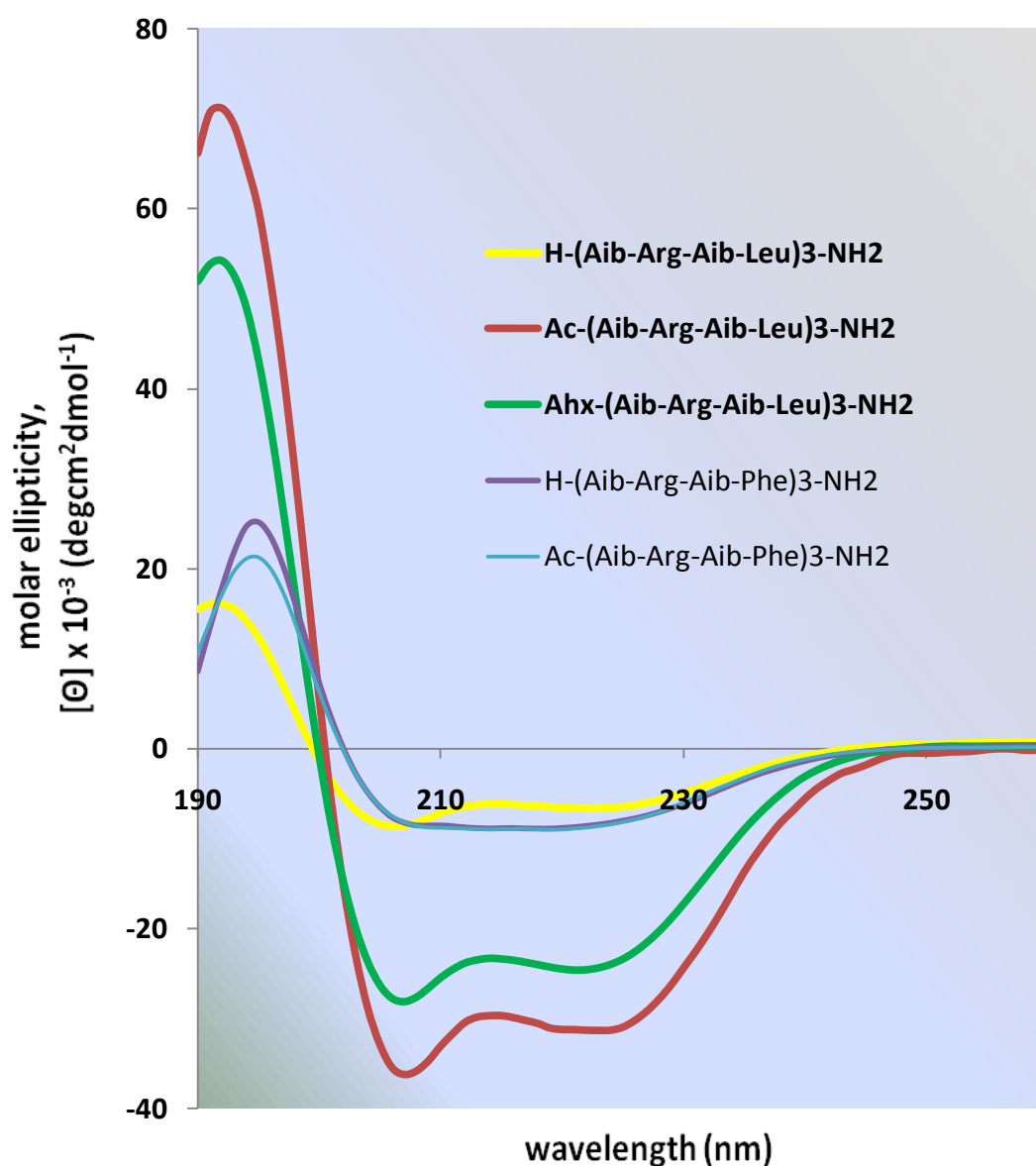
Σχήμα 8.4 : Φάσματα CD των Y-(Aib-Arg-Aib-X)₂-NH₂ συγκέντρωσης 100μM σε διάλυμα C₁₄PC.

Στο συγκεκριμένο διαλύτη, παρατηρούμε πάλι μια μικρή τάση σχηματισμού έλικας στα πεπτίδια H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂ και Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂ (παραλείπεται το

ακετυλιωμένο παράγωγο με τη λευκίνη γιατί δεν είχε μελετηθεί σε διάλυμα C₁₄PC στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διατριβής), ενώ ευνοείται περισσότερο ο σχηματισμός έλικας στο παράγωγο Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂.

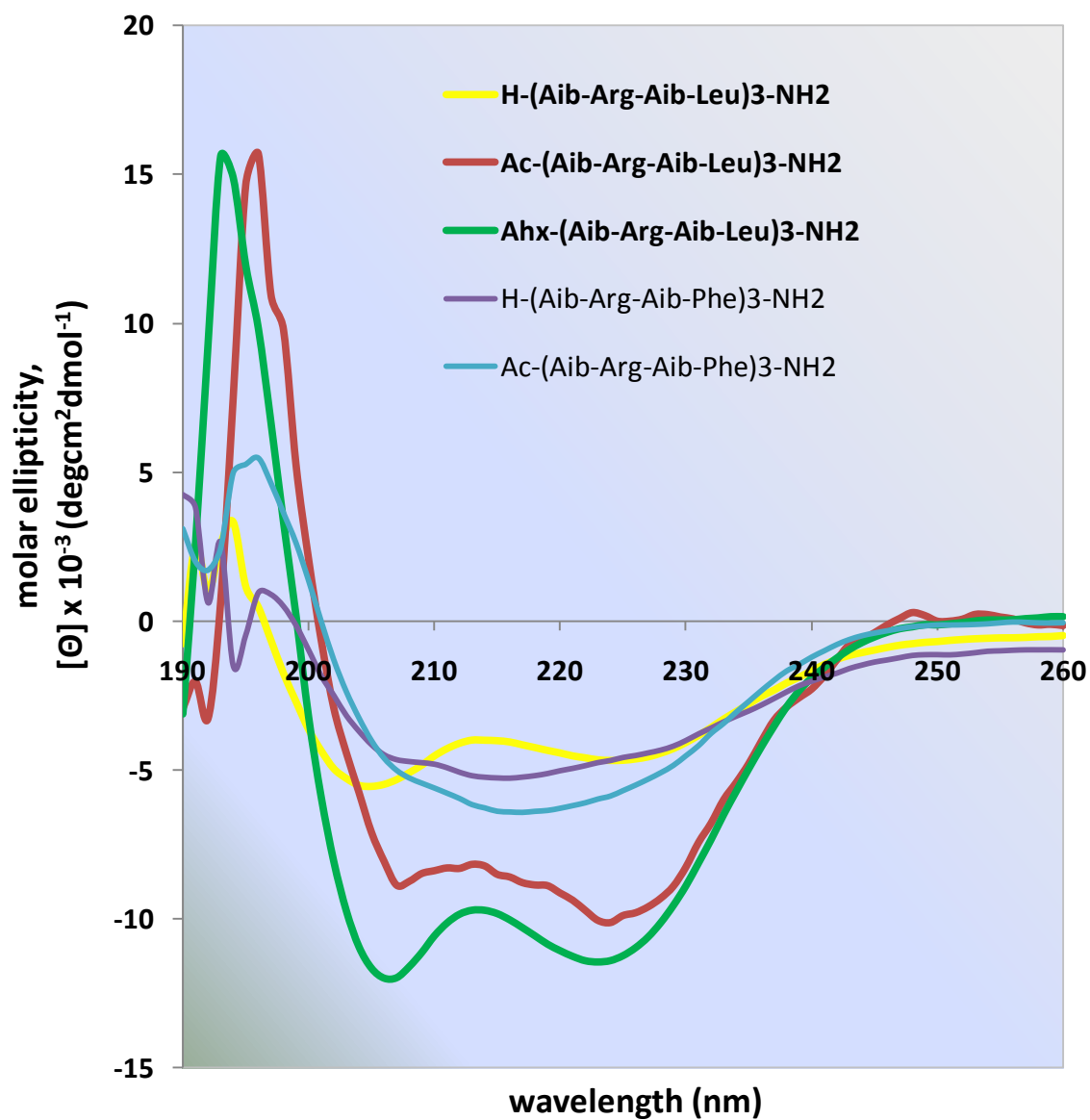
8.3 Φάσματα CD των πεπτιδίων Y-(Aib-Arg-Aib-X)₃-NH₂ (Y = H-, Ac-, Ahx- και X = Leu-, Phe-)

- *Μίγμα TFE/H₂O 50:50 (v/v)*



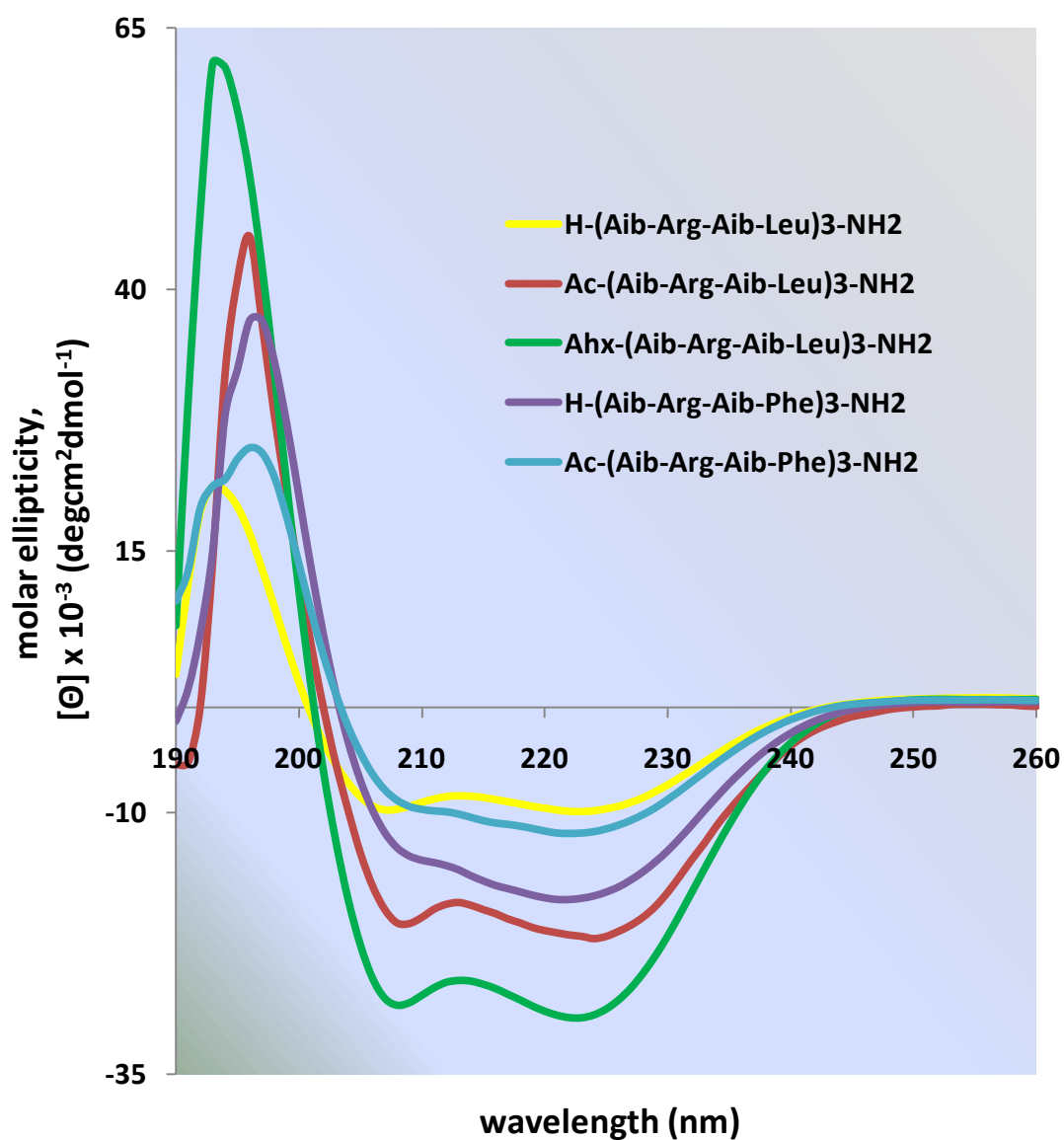
Σχήμα 8.5 : Φάσματα CD των Y-(Aib-Arg-Aib-X)₃-NH₂ συγκέντρωσης 100μM στο μίγμα TFE/H₂O.

- *Διάλυμα φωσφορικών PBS (pH= 7,4)*



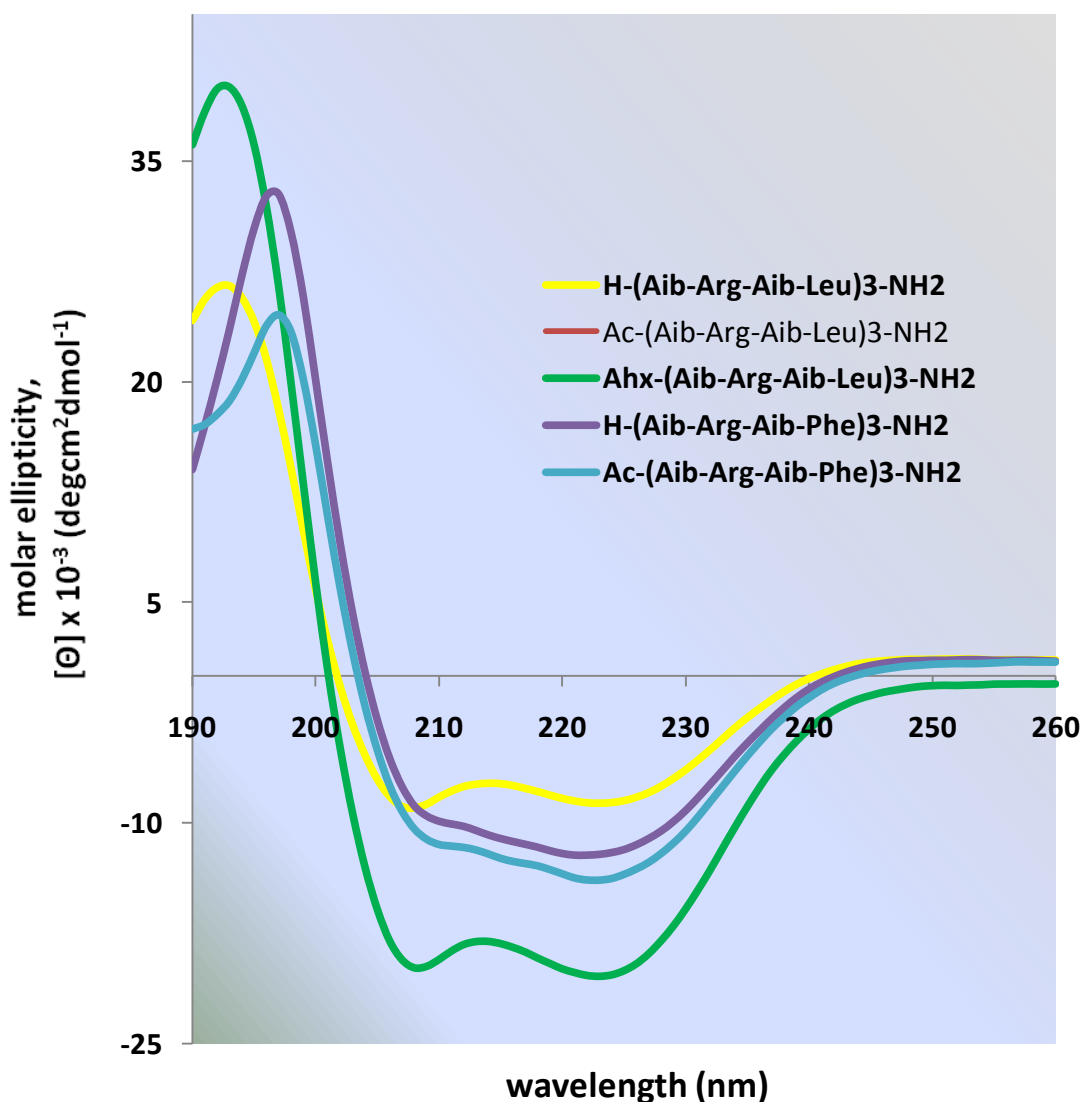
Σχήμα 8.6 : Φάσματα CD των γ -(Aib-Arg-Aib-X)₃-NH₂ συγκέντρωσης 100μM σε διάλυμα PBS (pH= 7,4).

- *Διάλυμα SDS συγκέντρωσης 8μM*



Σχήμα 8.7 : Φάσματα CD των Y-(Aib-Arg-Aib-X)₃-NH₂ συγκέντρωσης 100μM σε διάλυμα SDS (8μM).

■ Διάλυμα C₁₄PC 5mM



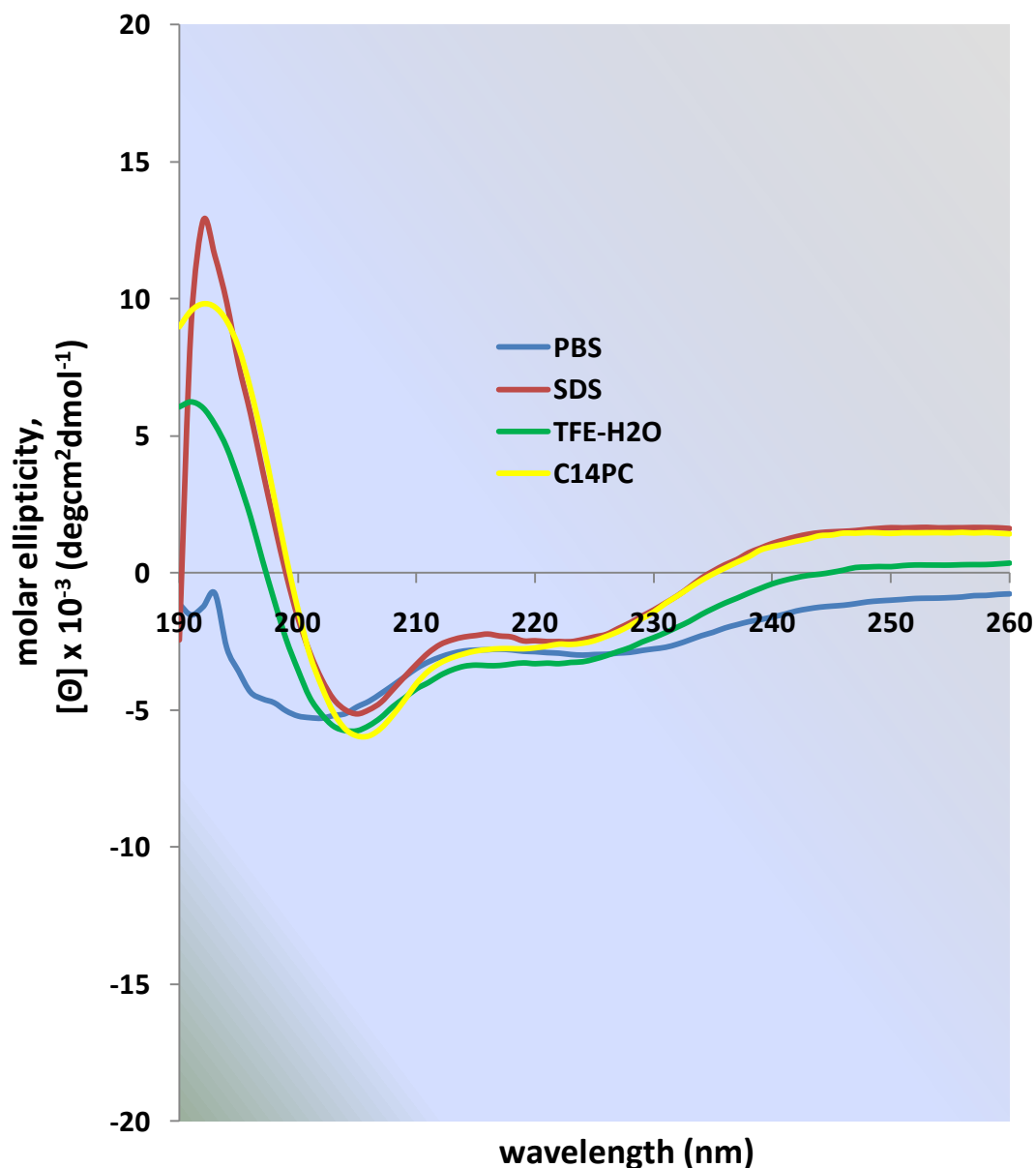
Σχήμα 8.8 : Φάσματα CD των Y-(Aib-Arg-Aib-X)₃-NH₂ συγκέντρωσης 100μM σε διάλυμα C₁₄PC.

Παρατηρούμε ότι τα τριμερή παράγωγα του Aib με τη λευκίνη στην αλληλουχία τους αποκτούν ελικοειδή διαμόρφωση σε όλους τους διαλύτες που μελετήθηκαν, και επιπλέον, το ποσοστό της έλικας που σχηματίζουν είναι μεγαλύτερο από αυτό των διμερών παραγώγων. Ενώ τα τριμερή παράγωγα του Aib με τη φαινυλαλανίνη στην αλληλουχία τους, εμφανίζουν να αποκτούν ελικοειδή διαμόρφωση μόνο στους διαλύτες SDS και C₁₄PC.

8.4 Φάσματα CD των πεπτιδίων $H-(Aib-Arg-Aib-Leu)_n-NH_2$ και $Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)_n-NH_2$ όπου $n = 2$ ή 3

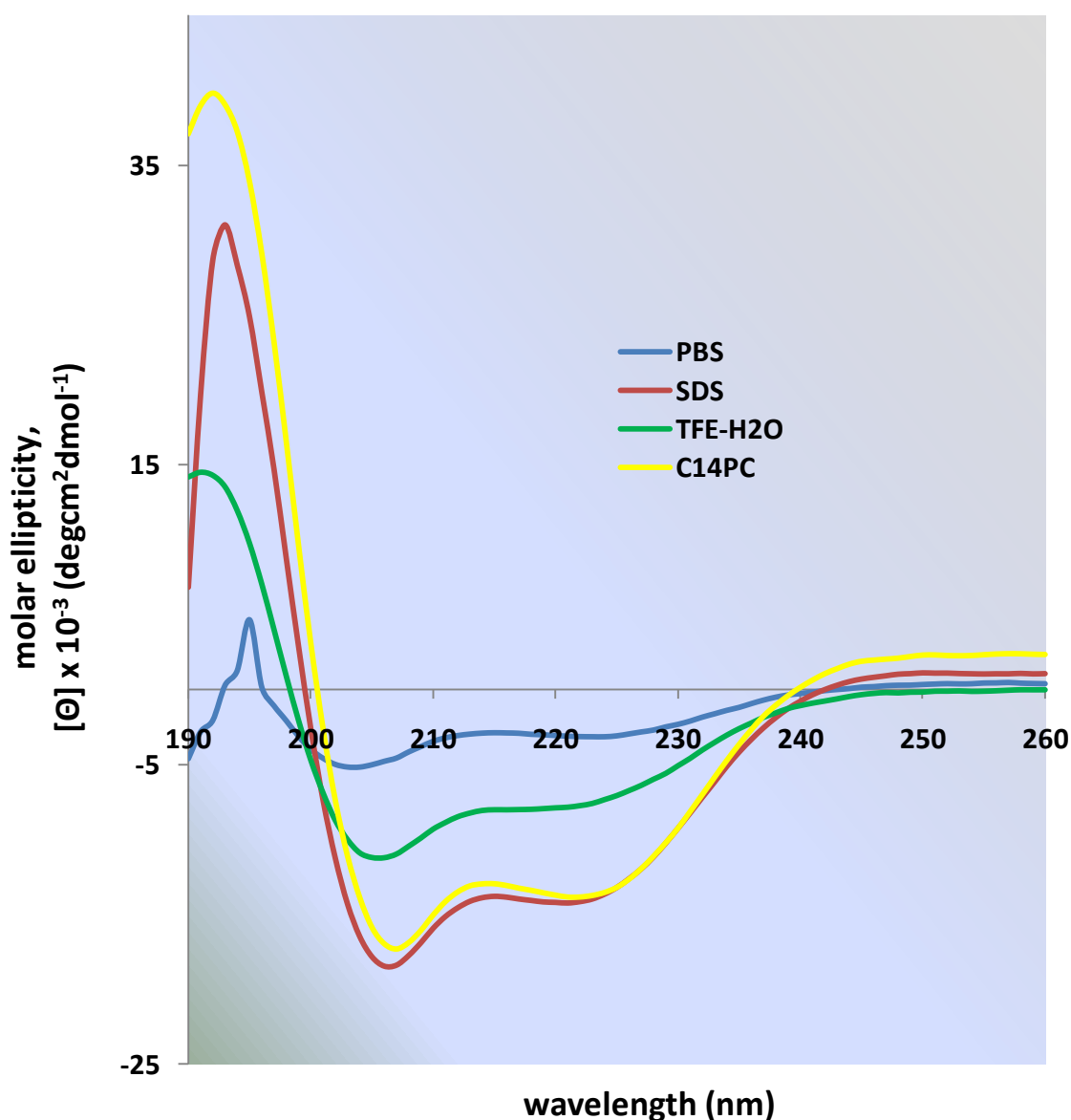
Τα παρακάτω φάσματα παρουσιάζουν τη διαμόρφωση που λαμβάνουν τα διμερή και τριμερή παράγωγα του Aib (που στην αλληλουχία τους περιλαμβάνεται η λευκίνη), σε όλους τους διαλύτες που μελετήθηκαν.

- $H-(Aib-Arg-Aib-Leu)_2-NH_2$



Σχήμα 8.9 : Φάσματα CD του $H-(Aib-Arg-Aib-Leu)_2-NH_2$ συγκέντρωσης 100 μM στους διαλύτες PBS, SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC.

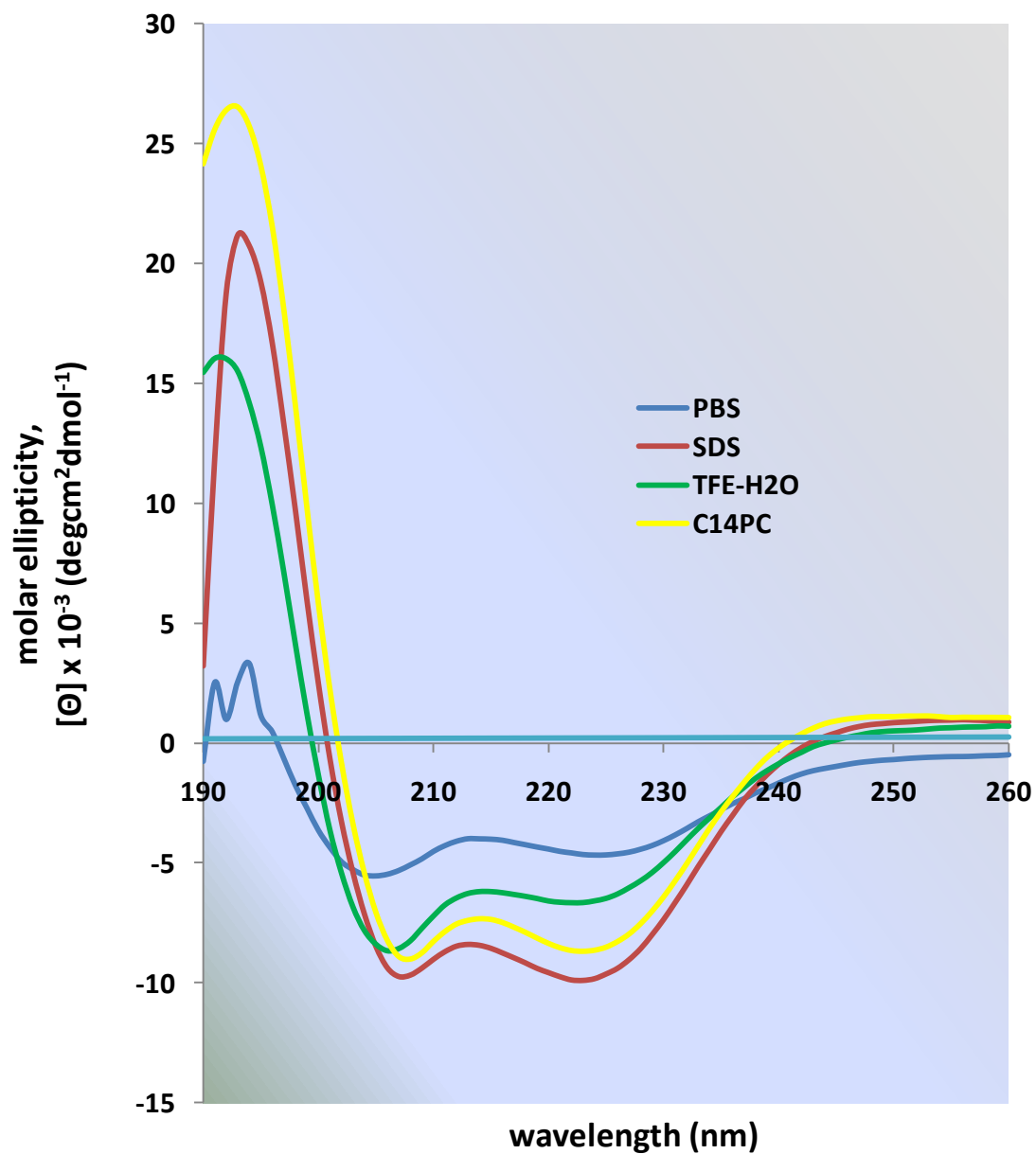
▪ *Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂*



Σχήμα 8.10 : Φάσματα CD του *Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂* συγκέντρωσης 100μM στους διαλύτες PBS, SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC.

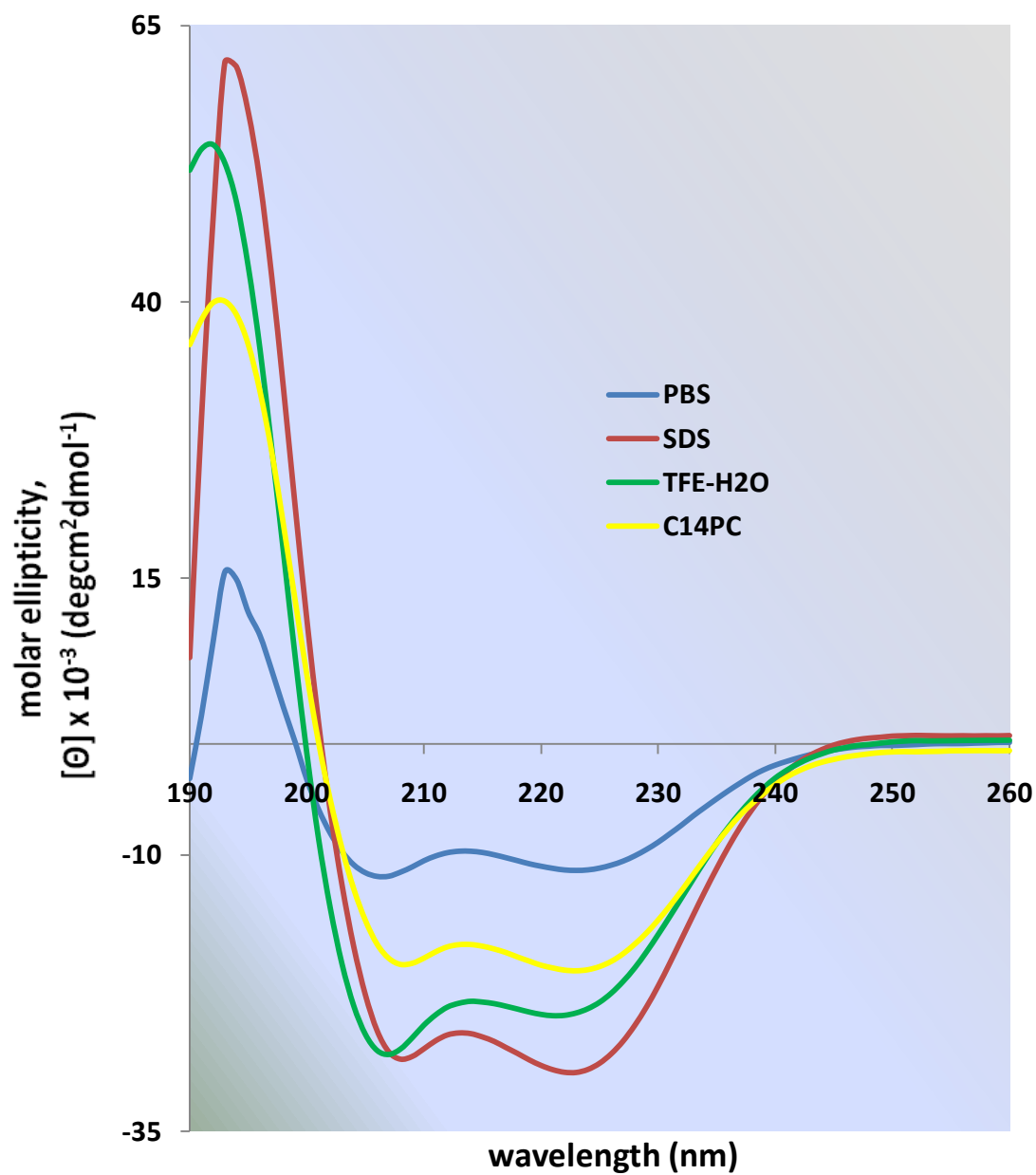
Ο λόγος R των δύο ελαχίστων στα 208 και 222nm που οφείλονται στις π→π* και n→π* μεταπτώσεις αντίστοιχα, αποτελεί έναν γενικά αποδεκτό παράγοντα διαχωρισμού της 3₁₀-έλικας με την α-έλικα. Για την α-έλικα ισχύει $R = [\theta]_{n \rightarrow \pi^*} / [\theta]_{\pi \rightarrow \pi^*} \approx 1$, ενώ για την 3₁₀-έλικα ισχύει $R \leq 0.4$. Παρατηρούμε, λοιπόν ότι, τα διμερή παράγωγα του Aib με τη λευκίνη στην αλληλουχία τους υιοθετούν 3₁₀-ελικοειδή διαμόρφωση.

▪ *H*-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂



Σχήμα 8.11 : Φάσματα CD του H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂ συγκέντρωσης 100μM στους διαλύτες PBS, SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC.

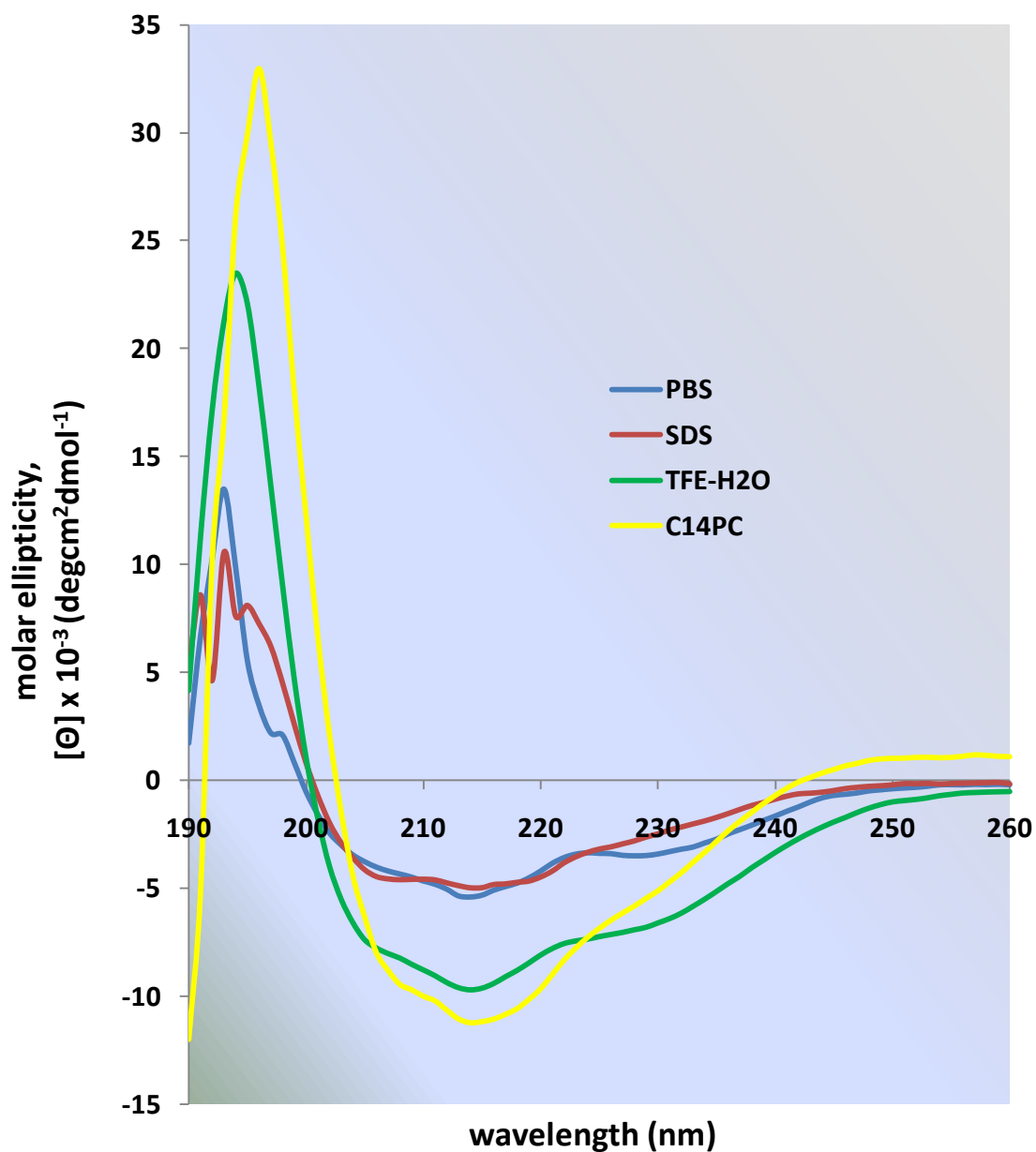
■ *Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂*



Σχήμα 8.12 : Φάσματα CD του *Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂* συγκέντρωσης 100μM στους διαλύτες PBS, SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC.

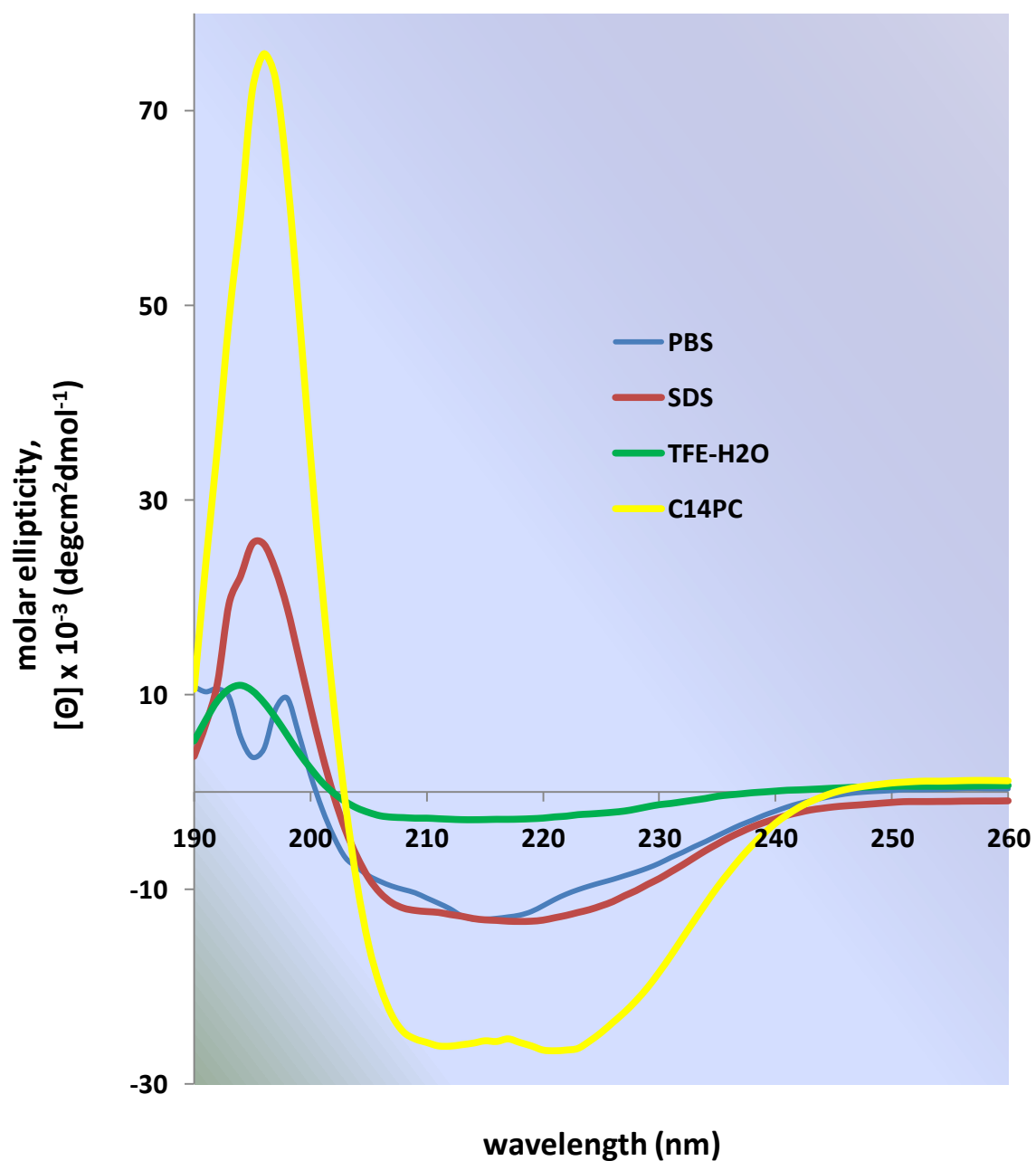
8.5 Φάσματα CD των πεπτιδίων $H-(Aib-Arg-Aib-Phe)_n-NH_2$, $Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)_n-NH_2$ και $\Delta h\chi-(Aib-Arg-Aib-Phe)_n-NH_2$ όπου $n = 2$ ή 3

▪ $H-(Aib-Arg-Aib-Phe)_2-NH_2$



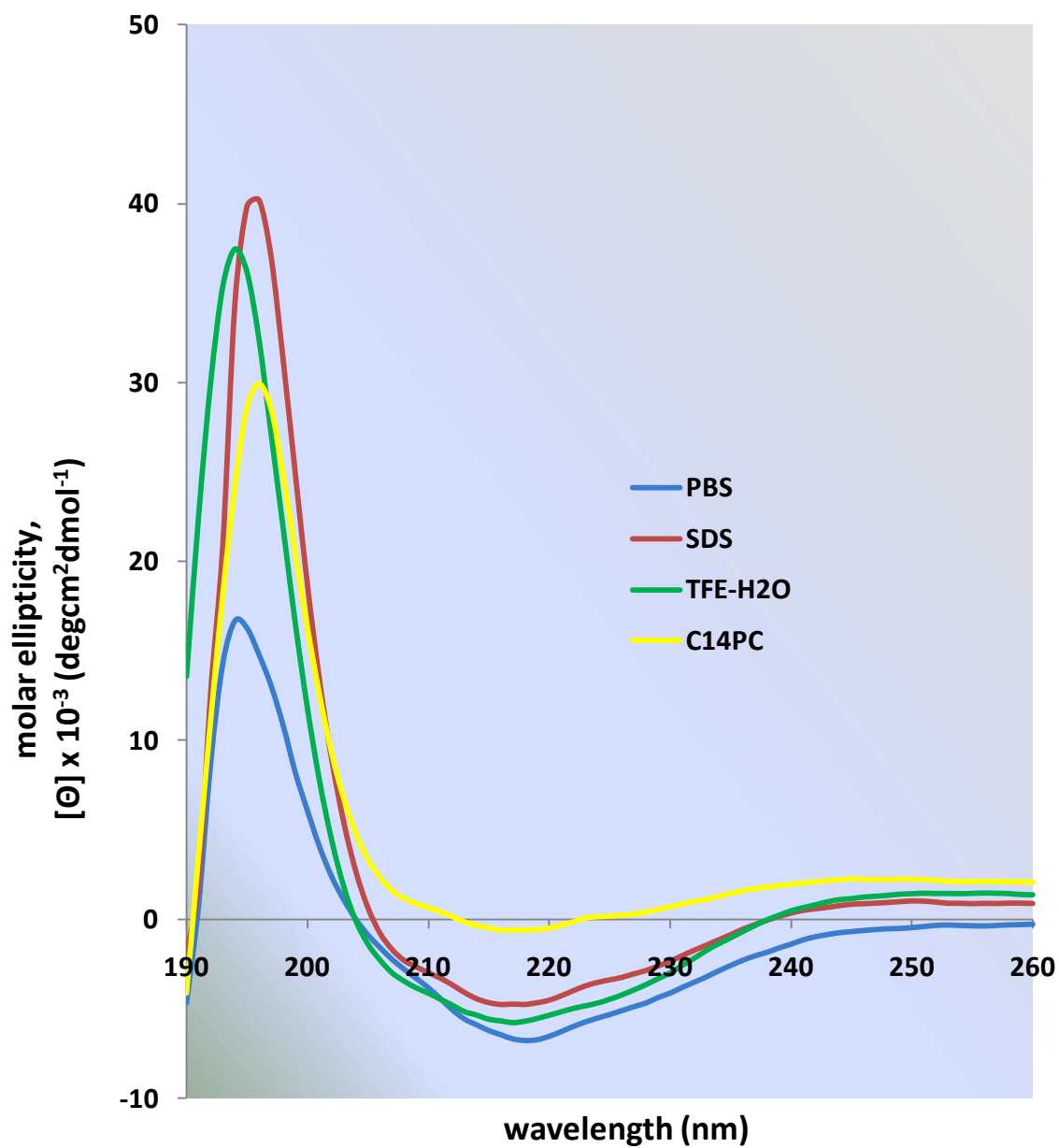
Σχήμα 8.13 : Φάσματα CD του $H-(Aib-Arg-Aib-Phe)_2-NH_2$ συγκέντρωσης 100 μM στους διαλύτες PBS, SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC.

■ *Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂*



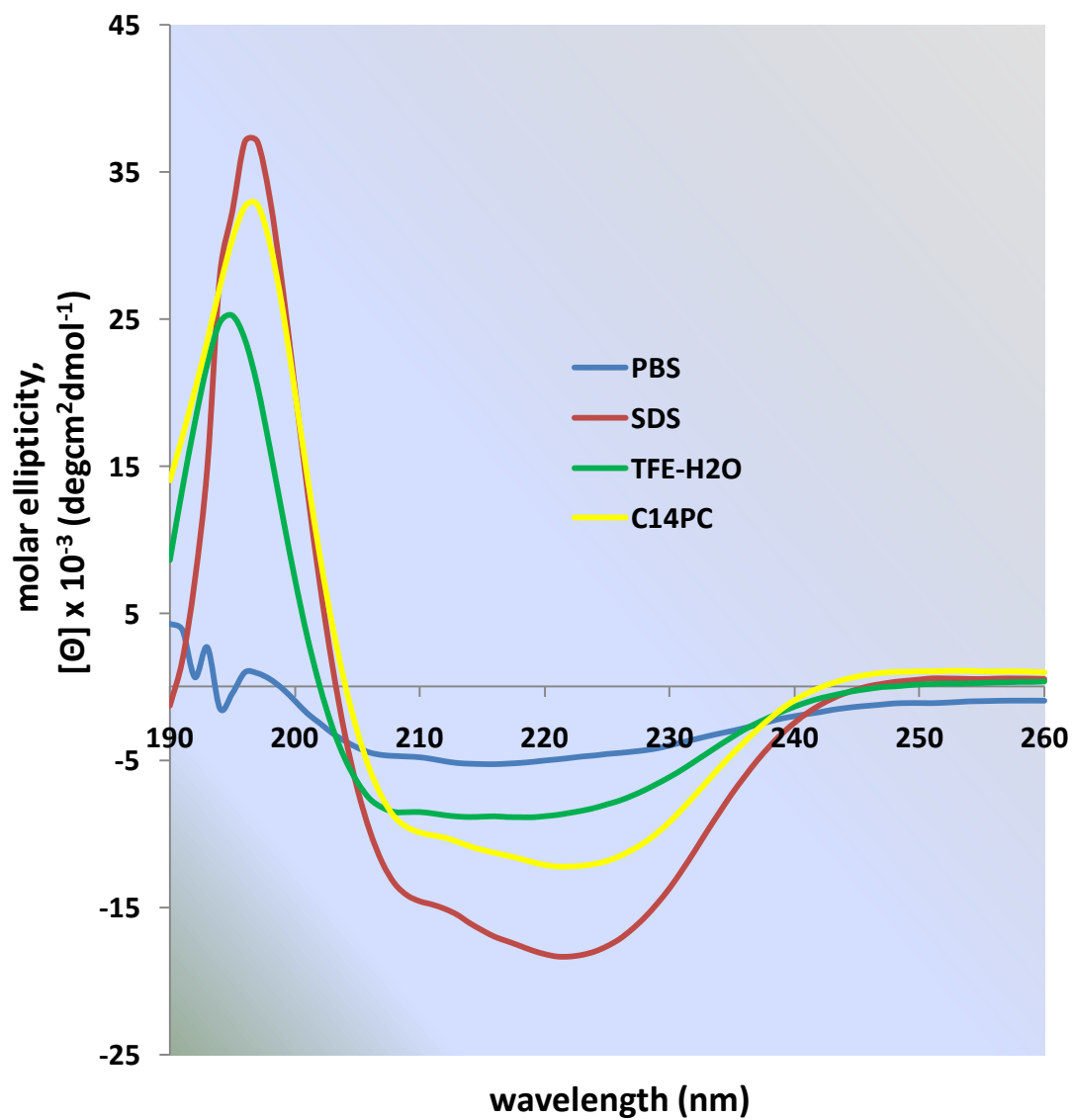
Σχήμα 8.14 : Φάσματα CD του *Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂* συγκέντρωσης 100μM στους διαλύτες PBS, SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC.

■ *Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂*



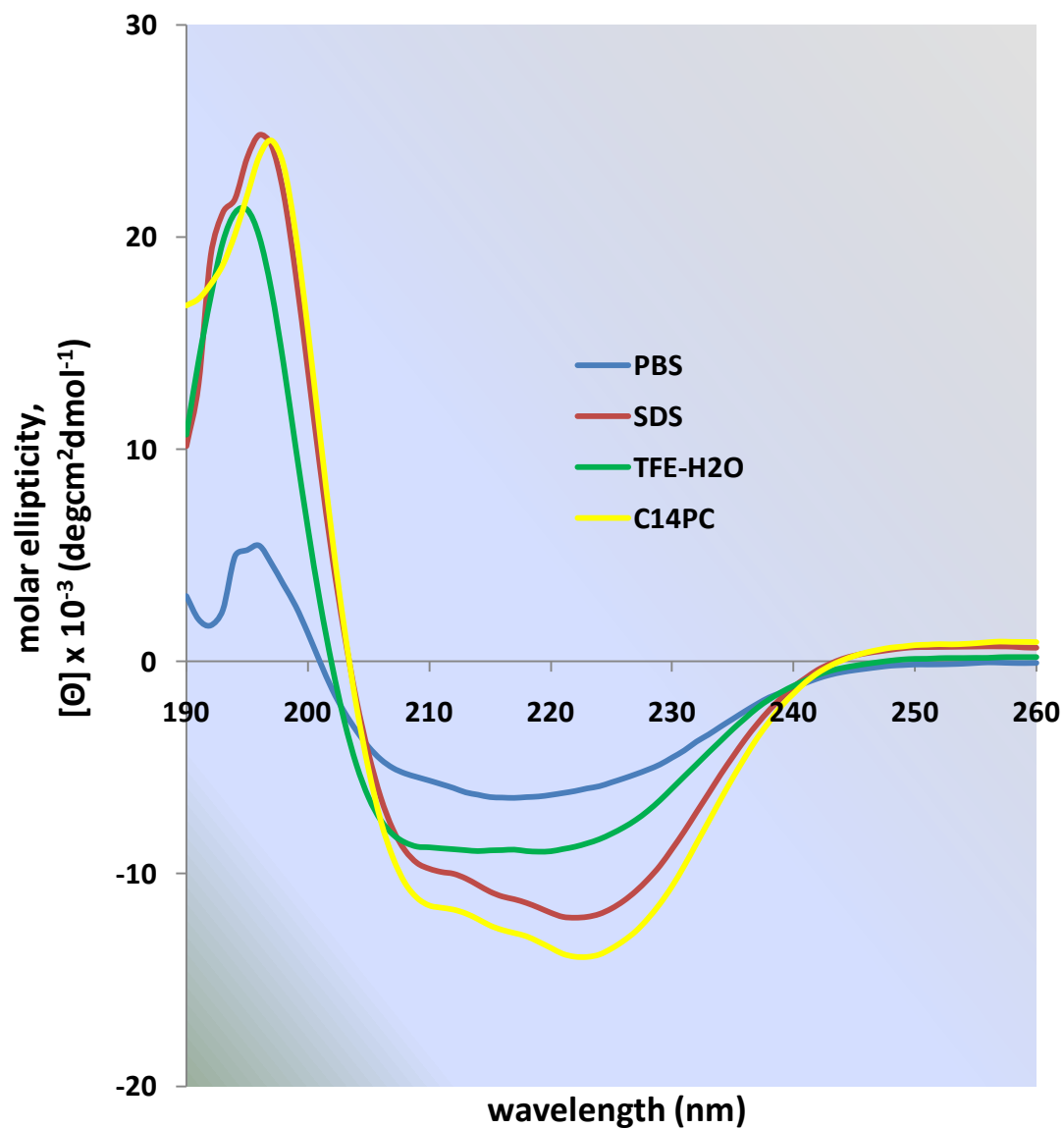
Σχήμα 8.15 : Φάσματα CD του *Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂* συγκέντρωσης 100μM στους διαλύτες PBS, SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC.

▪ *H*-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂



Σχήμα 8.16 : Φάσματα CD του *H*-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂ συγκέντρωσης 100μM στους διαλύτες PBS, SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC.

■ *Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂*



Σχήμα 8.17 : Φάσματα CD του *Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂* συγκέντρωσης 100 μM στους διαλύτες PBS, SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC.

8.6 Ανάλυση φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού

Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού αναλύθηκαν, ώστε να υπολογιστούν τα ποσοστά της ελικοειδούς διαμόρφωσης των πεπτιδίων (**Πίνακας 8.1**), χρησιμοποιώντας τον εμπειρικό τύπο,

$$\% \text{ ελικοειδούς δομής} = \frac{[\theta]}{[\theta]^\infty (1 - k/n)}$$

Όπου,

- k = σταθερά ίση με 2,57
 - n ο αριθμός των αμινοξέων που απαρτίζουν το πεπτίδιο
 - $[\theta]$ η μοριακή ελλειπτικότητα στα 222nm, σε $\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}$ και
 - $[\theta]^\infty = -39500$ η μοριακή ελλειπτικότητα στα 222nm για 100% έλικα, σε $\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}$
- [1].

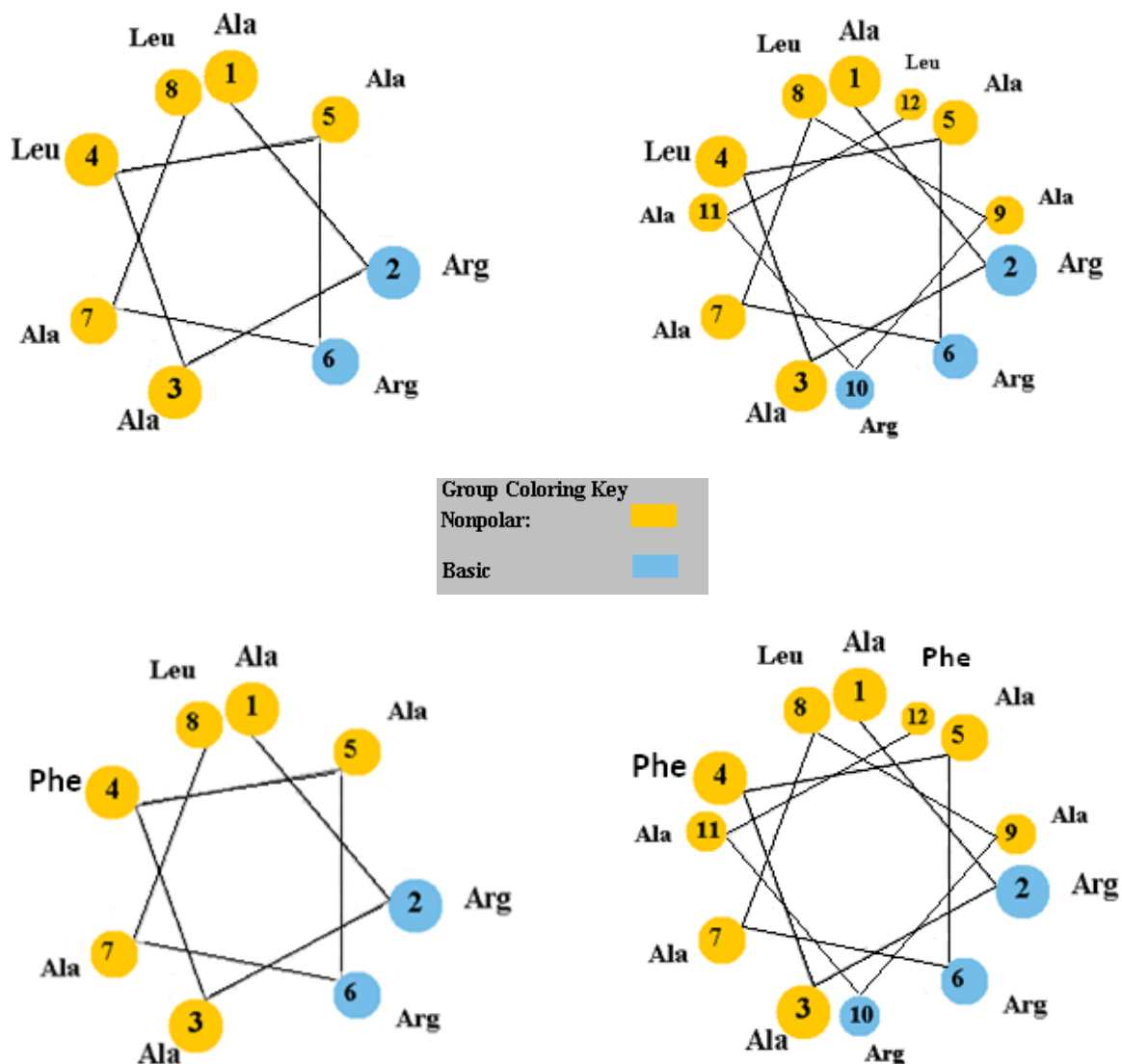
Πίνακας 8.1 : Ποσοστά ελικοειδούς διαμόρφωσης των πεπτιδίων $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH_2$, όπου $n = 2$ ή 3 , $X = Leu$ ή Phe και $Y = H-$ ή $Ac-$ ή $Ahx-$ σε όλους τους διαλύτες.

	PBS	TFE/H ₂ O 50/50	SDS (8mM)	C ₁₄ PC (5mM)
H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂	—	12.3%	9.7%	9.7%
Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂	—	28.9%	51.6%	51.6%
H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂	15.0%	21.4%	32.0%	28.0%
Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂	37.0%	79.1%	95.5%	66.0%
H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂	—	—	—	—
Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂	—	9.2%	48.3%	98.8%
Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂	—	—	—	—
H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂	—	27.7%	59.1%	39.4%
Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂	—	28.1%	38.8%	44.8%

Παρατηρούμε ότι στα παράγωγα του Aib που διαθέτουν τη λευκίνη στην αλληλουχία τους επικρατεί η δομή της έλικας, ενώ στα παράγωγα του Aib με τη φαινυλαλανίνη τα ποσοστά της ελικοειδούς διαμόρφωσης ελαττώνονται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε η σύνθεση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση πεπτιδίων του γενικού τύπου, $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH_2$, όπου $n = 2$ ή 3 , $X = Leu$ ή Phe και $Y = H-$ ή $Ac-$ ή $Ahx-$ (η αναλυτική πορεία σύνθεσης περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 5**) με στόχο την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών. Ο σχεδιασμός των πεπτιδίων έγινε χρησιμοποιώντας τις προβολές κατά Schiffer-Edmundson, ώστε να σχηματίζουν αμφιπαθητική ελικοειδή διαμόρφωση, με τις υδρόφοβες και θετικά φορτισμένες ομάδες σε αντίθετες θέσεις, η οποία ευνοεί τη διάρρηξη των βακτηριακών μεμβρανών, σύμφωνα με το μοντέλο δράσης «barrel-stave» (**Σχήμα 9.1**).



Σχήμα 9.1 : Προβολές Schiffer-Edmundson των πεπτιδίων $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH_2$, όπου $n = 2$ ή 3 , $X = Leu$ ή Phe και $Y = H-$ ή $Ac-$ ή $Ahx-$. Το μη πρωτεϊνογενές αμινοξύ

αμινοϊσοβουτυρικό (Aib), έχει αντικατασταθεί από το πλησιέστερο φυσικό ανάλογο, την αλανίνη (Ala), όσον αφορά το μέγεθος και τις φυσικο-χημικές ιδιοότητες.

Τα πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση, την πρωτεολυτική τους σταθερότητα και την τοξικότητά τους σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα, ενώ διαμορφωτικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού.

I. Διαμορφωτική μελέτη με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

Τα παραπάνω πεπτίδια εξετάστηκαν ως προς τη διαμόρφωση που προσλαμβάνουν σε διάφορους διαλύτες με φασματοσκοπία CD. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μίγμα τριφθοροαιθανόλης/νερού (TFE/H₂O) 50/50 (v/v), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS buffer) pH 7.4, διάλυμα δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS) σε συγκέντρωση 8mM και διάλυμα δεκατετραφωσφορυλοχολίνης C₁₄PC σε συγκέντρωση 5mM.

Στα **Σχήματα 8.1** έως **8.8** απεικονίζονται συγκεντρωτικά τα φάσματα όλων των πεπτιδίων στην ίδια συγκέντρωση σε κάθε διαλύτη, ενώ στα **Σχήματα 8.9** έως **8.17** απεικονίζονται τα φάσματα CD του κάθε πεπτιδίου σε διάφορους διαλύτες. Παρατηρούμε ότι:

- Τα φάσματα εμφανίζουν μια θετική κορυφή στα 195 nm και δύο ευρείες αρνητικές κορυφές στα 208 nm και 225 nm, που είναι τα τυπικά χαρακτηριστικά της ελικοειδούς δομής.
- Τα τριμερή παράγωγα εμφανίζουν μεγαλύτερη έλικα από τα διμερή, συνεπώς καθώς αυξάνεται το μήκος της πεπτιδικής αλυσίδας, αυξάνεται και το ποσοστό της ελικοειδούς διαμόρφωσης.
- Στα διμερή παράγωγα του Aib με τη λευκίνη (**Leu**) φαίνεται να συνυπάρχει η 3₁₀-έλικα με την α-έλικα.
- Η εισαγωγή του αμινοκαπροϊκού οξέος (**Ahx**) στα παράγωγα του Aib με τη λευκίνη (**Leu**) βελτιώνει την ελικοειδή δομή.
- Τα παράγωγα του Aib που στην αλληλουχία τους περιέχουν τη λευκίνη (**Leu**) παρουσιάζουν καλύτερη ελικοειδή δομή στους περισσότερους διαλύτες σε σχέση με τα παράγωγα στα οποία η Leu έχει αντικατασταθεί από τη φαινυλαλανίνη (**Phe**).
- Οι ελικοειδείς διαμορφώσεις των πεπτιδίων βελτιώνονται στους διαλύτες SDS και C₁₄PC.

Χρησιμοποιώντας τον εμπειρικό τύπο, % ελικοειδούς δομής = $[\theta] / [\theta]^\circ (1-k/n)$, τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού αναλύθηκαν, ώστε να προσδιοριστούν τα ποσοστά της ελικοειδούς δομής. Στον **Πίνακα 8.1** παρουσιάζονται τα ποσοστά (επί της %) της ελικοειδούς διαμόρφωσης του κάθε πεπτιδίου σε όλους τους διαλύτες.

Συγκρίνοντας τα πεπτίδια, παρατηρούμε ότι:

- Το τριμερές παράγωγο **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂** σχηματίζει έλικα σε όλους τους διαλύτες με υψηλότερα ποσοστά στο SDS (**98.9%**), στο TFE/H₂O (**83.5%**) και στο C₁₄PC (**71.1%**).
- Από τα παράγωγα του Aib με τη φαινυλαλανίνη, υψηλότερα ποσοστά ελικοειδούς διαμόρφωσης εμφανίζουν το διμερές **Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂** στο διαλύτη C₁₄PC (**95.0%**) και το τριμερές **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂** στο SDS (**64.7%**).
- Ο σχηματισμός της ελικοειδούς διαμόρφωσης επηρεάζεται από το ποσοστό της υδροφοβικότητας.
- Τα ποσοστά της έλικας αυξάνονται στα περισσότερα πεπτίδια σύμφωνα με τη σειρά διαλυτών PBS < TFE/H₂O < SDS ≈ C₁₄PC.

II. Αντιμικροβιακή δράση

Τα πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη Gram αρνητικών, Gram θετικών βακτηρίων και μυκήτων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο **Κεφάλαιο 7**, και συμπεραίνουμε τα εξής:

- Όλα τα παράγωγα του Aib παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση ως προς σχεδόν όλους τους μικροοργανισμούς που δοκιμάστηκαν.
- Τα τριμερή εμφανίζουν μικρότερες τιμές MIC από ότι τα διμερή, δηλαδή η αντιμικροβιακή δράση αυξάνεται καθώς αυξάνεται το μήκος και η ελικοειδής δομή τους.
- Τα παράγωγα του Aib που στην αλληλουχία τους περιέχουν τη λευκίνη (**Leu**) παρουσιάζουν καλύτερη δράση (οφείλεται στην ελικοειδή δομή τους) σε σχέση με τα παράγωγα στα οποία η Leu έχει αντικατασταθεί από τη φαινυλαλανίνη (**Phe**).
- Μεγαλύτερη αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε στο βακτηριακό στέλεχος *E. coli* DH5a από τα πεπτίδια **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂** και **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂** με τιμές **MIC=15μg/ml**.
- Η αντικατάσταση του **H** του ελεύθερου N-τελικού άκρου του διμερούς παραγώγου **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂** από το αμινοκαπροϊκό οξύ (**Ahx**), διατηρεί τη δράση στα ίδια επίπεδα σχεδόν σε όλα τα βακτηριακά στελέχη.

- Αντίθετα, στα διμερή παράγωγα του Aib που περιέχουν τη Phe, η αντικατάσταση του **H** του ελεύθερου N-τελικού άκρου, αρχικά από την ακετυλο-ομάδα (**Ac**) και στη συνέχεια από το λιπαρό οξύ (**Ahx**), εμφανίζει σταδιακή βελτίωση της δράσης σχεδόν σε όλα τα βακτηριακά στελέχη.
- Στα τριμερή παράγωγα του Aib που περιέχουν τη Phe, η αντικατάσταση του **H** του ελεύθερου N-τελικού άκρου από την ακετυλο-ομάδα (**Ac**), μειώνει την αντιμικροβιακή δράση, ενώ σε κάποια στελέχη χάνεται τελείως.
- Η υδροφοβικότητα των πεπτιδίων επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση. Μάλιστα, όταν αυξηθεί αυτή πάνω από ένα σημείο, καθιστά τα πεπτίδια μη δραστικά ως προς τους συγκεκριμένους οργανισμούς.

III. Μελέτη τοξικότητας

Τα πεπτίδια που είχαν αντιμικροβιακή δράση μελετήθηκαν ως προς την τοξικότητά τους σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τον όρο EC₅₀, που υποδηλώνει τη συγκέντρωση πεπτιδίου η οποία προκαλεί αιμόλυση στο 50% του πληθυσμού των ερυθροκυττάρων. Όπως παρουσιάζονται στα **Σχήματα 7.1** και **7.2**:

- Τα διμερή παράγωγα του Aib που στην αλληλουχία τους έχουν είτε τη λευκίνη (**Leu**), είτε τη φαινυλαλανίνη (**Phe**), δεν προκαλούν αιμόλυση στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα ακόμα και σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις (500μg/ml).
- Από τα τριμερή παράγωγα του Aib με τη λευκίνη στην αλληλουχία τους, τα οποία εμφανίζουν και την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση, μόνο το ελεύθερο **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂** δεν εμφανίζει τοξικότητα. Καθώς, αυξάνεται η υδροφοβικότητα με την εισαγωγή του αμινοκαπροϊκού οξέος στο N-τελικό άκρο, **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂**, προκαλείται πλήρης αιμόλυση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 50μg/ml (EC₅₀=25μg/ml).
- Αντίστοιχα, και τα τριμερή παράγωγα του Aib με τη φαινυλαλανίνη στην αλληλουχία τους, παρουσιάζονται τοξικά για τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Το μεν ακετυλιωμένο παράγωγο **Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂**, το οποίο εμφανίζει μια μέτρια αντιμικροβιακή δράση (MIC=200μg/ml), προκαλεί αιμόλυση σε μικρές συγκεντρώσεις, EC₅₀=25μg/ml. Ενώ, αντίθετα το πιο δραστικό ελεύθερο παράγωγο **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂** (με τιμή MIC=50μg/ml), προκαλεί αιμόλυση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (EC₅₀= 300μg/ml).

IV. Πρωτεολυτική σταθερότητα

Τα πεπτίδια που παρουσίασαν την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση, δοκιμάστηκαν και ως προς την πρωτεολυτική τους σταθερότητα. Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο θρυψίνη, μια ενδοπεπτιδάση που υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό μετά την αργινίνη (Arg), ενώ η ενζυμική αποικοδόμηση εξετάστηκε με μέτρηση διατήρησης της αντιμικροβιακής δράσης, αλλά και με παρακολούθηση της υδρόλυσης των πεπτιδίων με αναλυτική HPLC σε διάφορους χρόνους έως 4 ώρες. Στα **Σχήματα 7.3** και **7.4** παρατηρούμε ότι:

- Από τα παράγωγα του Aib με τη λευκίνη, η παρουσία της θρυψίνης δεν επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση του διμερούς **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂** και του τριμερούς **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂**.
- Στο διμερές **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂** και στο τριμερές **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂**, η αντιμικροβιακή δράση ελαττώνεται περίπου στο 60% ήδη από τα πρώτα 10 λεπτά επώασης με τη θρυψίνη, ωστόσο διατηρείται σταθερή έως και για 4 ώρες.
- Στα παράγωγα του Aib με τη φαινυλαλανίνη, τα διμερή χάνουν την αντιμικροβιακή τους δράση αμέσως,
- ενώ τα τριμερή εμφανίζουν μια σταδιακή μείωση. Πιο συγκεκριμένα, το ελεύθερο **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂** διατηρεί το 80-90% της δράσης του για μία ώρα παραμονής της θρυψίνης και το ακετυλιωμένο **Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂** διατηρεί το 90-100% της δράσης του για 30 λεπτά.

Στα χρωματογραφήματα της αναλυτικής HPLC (**Κεφάλαιο 7^ο**) επιβεβαιώνεται ότι:

- το τριμερές **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂** δεν υδρολύεται παρουσία θρυψίνης.
- Τα **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂** και **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂**, τα οποία διατηρούν το 60% της αντιμικροβιακής τους δράσης, υφίστανται μερική υδρόλυση.
- Τα διμερή παράγωγα του Aib με τη φαινυλαλανίνη υδρολύονται πλήρως.
- Μικρό ποσοστό του **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂**, που διατηρεί το 80-90% της δράσης του για μία ώρα, αποικοδομείται στο ίδιο χρονικό διάστημα, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό μετά από 4 ώρες.
- Και τέλος, το **Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂**, το οποίο διατηρεί το 90-100% της δράσης του για 30 λεπτά, υφίσταται μια μικρή υδρόλυση στο ίδιο χρονικό διάστημα, ενώ γίνεται πλήρης μετά από 1h επώασης με τη θρυψίνη.

Όμως, παρατηρούμε επίσης, ότι:

- Το διμερές **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂**, το οποίο διατηρεί την αντιμικροβιακή του δράση, υφίσταται μια μικρή ενζυμική αποικοδόμηση.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα πεπτίδια που διατηρούν πλήρως ή σε κάποιο ποσοστό την αντιμικροβιακή τους δράση παρουσία θρυψίνης, δεν υδρολύονται ή έστω υφίστανται μια μικρή υδρόλυση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Παρασκευάστηκαν αμφίφιλα πεπτίδια του τύπου $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH_2$, όπου $n = 2$ ή 3 , $X = Leu$ ή Phe και $Y = H-$ ή $Ac-$ ή $Ahx-$ με στόχο την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών πεπτιδίων, ως θεραπευτικά μέσα. Η διαμορφωτική τους μελέτη έδειξε ότι όλα σχεδόν τα πεπτίδια προσλαμβάνουν, στις συνθήκες που μελετήθηκαν, υψηλά ποσοστά ελικοειδών διαμορφώσεων.
2. Οι μελέτες αντιμικροβιακής δράσης, τοξικότητας και πρωτεολυτικής σταθερότητας των πεπτιδίων έδειξαν τα εξής :
 - I. Το τριμερές πεπτίδιο **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂** παρουσιάζει υψηλή αντιμικροβιακή δράση ως προς το Gram-αρνητικό βακτήριο *Escherichia coli* DH5a (MIC = 15μg/ml) και το Gram-θετικό βακτήριο *Bacillus subtilis* DELTA (MIC = 50μg/ml). Δεν εμφανίζει τοξικότητα και είναι σταθερό στην πρωτεόλυση.
 - II. Το τριμερές πεπτίδιο **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂** εμφανίζει επίσης υψηλή αντιμικροβιακή δράση ως προς το ίδιο Gram-αρνητικό βακτήριο *Escherichia coli* DH5a (MIC = 15μg/ml), η οποία μπορεί να αποδοθεί στο υψηλό ποσοστό ελικοειδούς διαμόρφωσης που υιοθετεί (95.5% στο διαλύτη SDS). Διατηρεί το 60% της αντιμικροβιακής του δράσης παρουσία θρυψίνης και εμφανίζει τοξικότητα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την τιμή MIC (EC₅₀ ~ 25μg/ml).
 - III. Το διμερές πεπτίδιο **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂** παρουσιάζει καλή αντιμικροβιακή δράση στο ίδιο βακτηριακό στέλεχος με τα υπόλοιπα πεπτίδια με τιμή MIC = 50μg/ml, καθώς και στο Gram-θετικό βακτήριο *Mycobacterium smegmatis* mc²155 (MIC = 50μg/ml). Σχηματίζει αμφιπαθητικές έλικες σε ποσοστό 51.6% στους διαλύτες SDS και C₁₄PC. Επώασή του με τη θρυψίνη έως και 4h δεν επηρεάζει την αντιμικροβιακή του δράση, αφού δεν υφίσταται καμία υδρόλυση έπειτα από παρακολούθηση με αναλυτική RP-HPLC και δεν προκαλεί καθόλου αιμόλυση ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (500μg/ml).
 - IV. Τα διμερή παράγωγα του Aib με τη φαινυλαλανίνη [**H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂**, **Ac-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂** και **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Phe)₂-NH₂**] αναστέλλουν την ανάπτυξη του *E.coli* DH5a σε συγκέντρωση MIC = 50μg/ml, δεν είναι τοξικά στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα, αλλά υδρολύονται σχεδόν πλήρως παρουσία θρυψίνης και συνεπώς χάνουν την αντιμικροβιακή τους δράση.
 - V. Το τριμερές παράγωγο **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂** είναι δραστικό έναντι στα βακτηριακά στελέχη *E.coli* DH5a, *P.aeruginosa* PAO και *B. subtilis* DELTA (MIC = 50μg/ml). Εμφανίζει EC₅₀= 300μg/ml, δηλαδή προκαλεί αιμόλυση σε συγκεντρώσεις

μεγαλύτερες από αυτή που δρά και διατηρεί το 50% της αντιμικροβιακής του δράσης παρουσία θρυψίνης σχεδόν πάνω από 2.5 ώρες.

3. Επιβεβαιώνεται ότι οι αμφιπαθητικές ελικοειδείς διαμορφώσεις διευκολύνουν τη διάρρηξη των βακτηριακών μεμβρανών και επομένως ευνοούν την αντιμικροβιακή δράση των πεπτιδίων.
4. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η παρουσία του Aib σε μια πεπτιδική αλυσίδα ευνοεί το σχηματισμό ελικοειδών δομών και ενισχύει την πρωτεολυτική σταθερότητα των πεπτιδίων.
5. Τέλος, συμπεραίνεται ότι μικρά κατιονικά πεπτίδια που περιέχουν αμινοϊσοβουτυρικό (Aib) μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη θεραπευτικών μέσων με υψηλή αντιμικροβιακή δράση, χαμηλή τοξικότητα και πρωτεολυτική σταθερότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11^ο. ΠΕΡΙΛΗΨΗ-SUMMARY

Τα τελευταία χρόνια η ευρεία και πολλές φορές η κακή χρήση των αντιβιοτικών οδήγησε στην εμφάνιση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, με επιτακτική την ανάγκη για εύρεση νέας γενιάς θεραπευτικών μέσων. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs) αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του κάθε οργανισμού απέναντι στις επιθέσεις των μικροβίων. Κατέχουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης ως προς Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα. Τα περισσότερα αντιμικροβιακά πεπτίδια διαθέτουν θετικό φορτίο, ώστε να αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις βακτηριακές μεμβράνες και μπορούν να σχηματίζουν αμφιπαθητικές α-έλικες, ώστε να διευκολύνεται έτσι η διάρρηξη των μεμβρανών των παθογόνων μικροβίων. Για να χρησιμοποιηθούν τα αντιμικροβιακά πεπτίδια ως θεραπευτικοί παράγοντες πρέπει εκτός από υψηλή αντιμικροβιακή δράση, να διαθέτουν πρωτεολυτική σταθερότητα και χαμηλή τοξικότητα.

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν κατιονικά α-ελικοειδή πεπτιδικά μοντέλα του τύπου $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH_2$, όπου $n = 2$ ή 3 , $X = Leu$ ή Phe και $Y = H-$ ή $Ac-$ ή $Ahx-$, σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield και χρησιμοποιώντας ως στερεό πολυμερικό υπόστρωμα τη ρητίνη Rink Amide AM. Τα πεπτίδια καθαρίστηκαν με το σύστημα έκλουσης (A) $H_2O/0.1\%TFA$, (B) $CH_3CN/0.1\%TFA$ σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Η καθαρότητά τους ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC και η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Διαμορφωτικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD) και έδειξαν υψηλά ποσοστά ελικοειδών διαμορφώσεων για όλα σχεδόν τα πεπτίδια.

Τα πεπτίδια δοκιμάστηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση στα Gram αρνητικά βακτήρια, *E. coli* DH5a και *P. aeruginosa* PAO, στα Gram θετικά βακτήρια, *B. subtilis* DELTA και *M. smegmatis* mc²155, καθώς και στο ζυμομύκητα *C. parapsilosis*. Τα πεπτίδια που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση μελετήθηκαν ως προς την τοξικότητά τους σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα, ενώ η πρωτεολυτική τους σταθερότητα διαπιστώθηκε με διατήρηση της αντιμικροβιακής τους δράσης έπειτα από επώασή τους με το ένζυμο θρυψίνη, καθώς και με παρακολούθηση της υδρόλυσής τους σε διάφορους χρόνους, χρησιμοποιώντας αναλυτική RP-HPLC. Οι μελέτες αντιμικροβιακής δράσης, τοξικότητας και πρωτεολυτικής σταθερότητας των πεπτιδίων έδειξαν ότι τα τριμερή πεπτίδια **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂**, **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂** και **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂**, καθώς και το διμερές **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂** παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές αντιμικροβιακής δράσης ως προς το Gram-αρνητικό βακτήριο *Escherichia coli* DH5a. Δεν προκαλούν αιμόλυση στη συγκέντρωση που αναστέλλουν την ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους και διατηρούν την

αντιμικροβιακή τους δράση για μεγάλο χρονικό διάστημα έπειτα από επώασή τους με θρυψίνη.

The excessive use of antibiotics, which has led to multi-resistant bacteria, makes it necessary to develop new therapeutic agents. Antimicrobial peptides (AMPs) are used as the first defensive barrier of the organism against microbial infection. They possess a broad spectrum of antimicrobial activity against Gram negative and Gram positive bacteria, as well as against fungi and protozoa. Most of antimicrobial peptides have positive charge, in order to interact electrostatically with the negatively charged bacterial membranes and can adopt amphipathic helical conformations, which facilitates the disruption of the bacterial membranes. Elements desirable for therapeutics include antimicrobial activity, as well as low toxicity and proteolytic stability.

In the present study, cationic helical peptides of type $Y-(Aib-Arg-Aib-X)_n-NH_2$, where $n = 2 \text{ ή } 3$, $X = Leu \text{ ή } Phe$ και $Y = H- \text{ ή } Ac- \text{ ή } Ahx$, were synthesized by the conventional stepwise Fmoc/tBu solid-phase method on a Rink-Amide AM resin. The peptides were purified by RP-HPLC and identified by ESI-MS. Conformational studies of the peptides were evaluated by CD spectroscopy and indicated high helical conformations. The above peptides were tested for their antimicrobial activity against Gram negative bacteria, *E. coli* DH5a, *P. aeruginosa* PAO and Gram positive bacteria, *M. smegmatis* mc²155 and *B. subtilis* DELTA, as well as against fungi *C. parapsilosis*. The peptides with the best activity against bacteria were tested for their hemolytic activity, whereas proteolytic stability assays were performed.

The peptides **H-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂**, **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₃-NH₂**, **H-(Aib-Arg-Aib-Phe)₃-NH₂** and **Ahx-(Aib-Arg-Aib-Leu)₂-NH₂** exhibits the best antimicrobial activities (lowest MIC) against Gram negative bacterial strain *E. coli* DH5a. They are not toxic at this concentration and retain their activity for a long time after incubation with the proteolytic enzyme trypsin.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12^ο. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

2-Br-Z: (2--Bromobenzyloxycarbonyl), 2-Βρώμοβενζυλοξυκαρβονυλο

Ac: ακέτυλο-ομάδα

AcM: (Acetamidomethyl), Ακεταμιδομεθυλομάδα

Ahx: αμινοκαπροϊκό οξύ, αμινοεξανοϊκό

Ala (A): (Alanine), Αλανίνη

Alloc: (Allyloxycarbonyl), Αλλυλοξυκαρβονυλο

AMPs: αντιμικροβιακά πεπτίδια

Arg (R): (Arginine), Αργινίνη

Boc: (tert-Butoxycarbonyl), tert-Βουτυλοξυκαρβόνυλο

Bom: (Benzyloxymethyl), Βενζυλοξυμεθυλο

BOP: [Benzotriazole-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate],
Εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτριαζολυλ-τρις(διμεθυλαμινο) φωσφωνίου.

Bzl: (Benzyl), Βενζυλο

BzIO: (Benzyloxy), Βενζυλοξυομάδα

CD: Circular Dichroism, Κυκλικός Διχρωϊσμός

C₁₄PC: δεκατετραφωσφορυλοχολίνη

Cys (C): (Cysteine), Κυστεΐνη

DAP: διαμινοπιμελικό οξύ

DBF: Διφαινυλοφουλβένιο

DCC: (N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide), N, N'-Δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο

DCM: (Dichloromethane), Διχλωρομεθάνιο

DIC: (N, N'-Diisopropylcarbodiimide), N, N'-Δισοπροπυλκαρβοδιιμίδιο

DIEA: (Diisopropylhlylamine), Διϊσοπροπυλοαιθυλαμίνη

DMF: (Dimethylformamide), Διμεθυλοφορμαμίδιο

EC50: συγκέντρωση που προκαλεί λύση στο 50% του πληθυσμού των ερυθροκυττάρων

ESI-MS: (Electrospray Ionization- Mass Spectroscopy), Φασματοσκοπία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό

Fmoc: (9-Fluorenylmethoxycarbonyl), 9-φλουορενελμεθοξυκαρβονυλο

HBTU: βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφθοροφωσφορικό άλας

HF: (Hydrogen Fluoride), Υγρό Υδροφθόριο

His (H): (Histidine), Ιστιδίνη

HOBt: (N-Hydroxybenzotriazole), N-Υδροξυβενζοτριαζόλιο

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Διαχωριστικής Ικανότητας

KDO: κετοδεοξυοκτονικ

Leu (L): (Leucine), Λευκίνη

Lys (K): (Lysine), Λυσίνη

LPS: λιποπολυσακχαρίτες

MBHA: (4-methylbenzylamine), 4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη

MeOH: (Methanol), Μεθανόλη

Met (M): (Methionine), Μεθειονίνη

MIC: (Minimal Inhibitory Concentration), Ελάχιστη Συγκέντρωση Αναστολής

Mtr: (4-methoxy-2, 3, 6-trimethylbenzenesulfonyl),
4-μεθοξυ-2, 3, 6-τριμεθυλοβενζενοςουλφονυλο

Mtt: (4-Methyltrityl), 4-μεθυλοτριτυλο

NAG: N-ακετυλογλυκοζαμίνης

NAM: N-ακετυλομουραμινικό οξύ

PAM: Φαινυλοακεταμιδομεθυλ-ρητίνη

Pbf: (2, 2, 4, 6,7 -Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl),
2, 2, 4, 6, 7-πενταμεθυλοδωδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλο

PG: πεπτιδογλυκάνη

Phe (F): (Phenylalanine), Φαινυλαλανίνη

Pmc: (2, 2, 5, 7, 8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl),
2, 2, 5, 7, 8-πενταμεθυλοχρωμανο-6-σουλφονυλο

pMeBzl: (p-MethylBenzyl), p-ΜεθυλοΒενζυλο

Pro (P): (Proline), Προλίνη

PyBOP: (Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate), εξαφθοροφωσφορικό αλας του βενζοτριαζολυλ-τρις-πυρρολιδινο φωσφονίου.

PyBrop : Βρωμο-τρις-πυρολιδινο-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας

RBCs: ερυθροκύτταρα

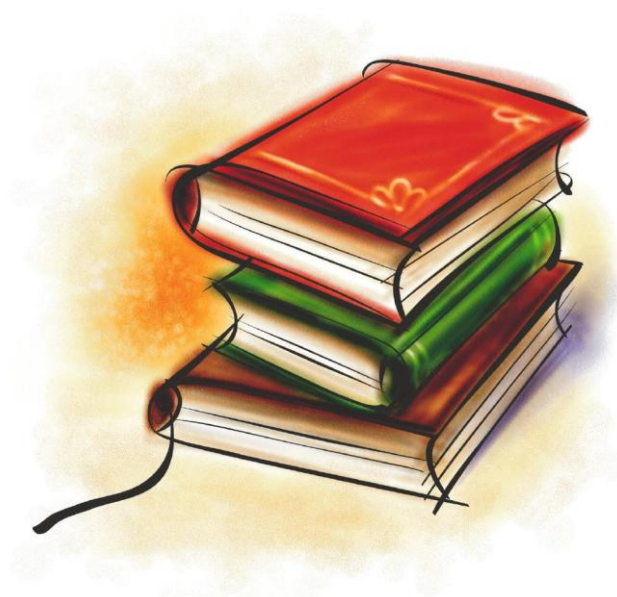
RP-HPLC: Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης και Υψηλής Διαχωριστικής Ικανότητας

SDS: δωδεκυλο-θειικό νάτριο

Ser (S): (Serine), Σερίνη

SPPS: Solid Phase Peptide Synthesis, Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση
TBTU: [2-(1H-Benzotriazole-1-yl)1, 1, 3, 3-tetramethyluroniu
tetrafluoroborate], βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό άλας
tBu: (tert-Butyl), tert-Βουτυλο
TFA: (Trifluoroacetic acid), Τριφθοροξικό οξύ
TFE: τριφθοροαιθανόλη
Thr (T): (Threonine), Θρεονίνη
TIS: Τρίσοπρόπυλοσιλάνιο
TFFH: τετραμέθυλ-φθοροφορμαμίδιο-εξαφθοροφωσφορικό άλας
Tos: (Tosyl), Τοζυλ
Trp (W): (Tryptophane), Τρυπτοφάνη
Trt: (Trityl), Τριτυλο
Tyr (Y): (Tyrosine), Τυροσίνη
Val (V): (Valine), Βαλίνη
Wang: (p-Benzyloxybenzyl Alcohol resin), (p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη)
Xan: (Xantyl), Ξανθενυλο
Z: (Benzyloxycarbonyl), Βενζυλοξυκαρβονυλο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13^ο. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 1^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

1. **Talaro P.K., Talaro A.** *Foundation in Microbiology*, 3rd edition, Prokaryotic Profiles, 98-99.
2. **Kruczak-Filipov P, Shively R.** in Isenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol 1. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1992; 1.5.1-1.5.18.
3. **E. Nester, C. Roberts, M. Nester.** *Microbiology*, Functional Anatomy of Prokaryotes and Eukaryotes, 52-54
4. **Δραΐνας Κ.** *Σημειώσεις Μικροβιακής Βιοχημείας*, 2001, 18-24.
5. **Harold Eddleman.** Ingredients for Microbiology Media, Indiana Biolab.
6. **Teresa Thiel.** Introduction to Bacteria, University of Missouri.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 2^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

1. <http://www.textbookofbacteriology.net>
2. **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin.** Edited by Frank M. Aarestrup. 2006 ASM Press, Washington, D.C.
3. **Niv Papo, Yechiel Shai.** Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipids membranes? 2003, *Peptides*, 24, 1693-1703.
4. **Kim A. Brogden, Mark Ackermann, Paul B. McCray, Jr., Brian F. Tack.** Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. 2003, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 465-478.
5. **Jon-Paul S. Powers, Robert E.W. Hancock.** The relationship between peptide structure and antibacterial activity. 2003, *Peptides*, 24, 1681-1691.
6. **N. Siyaram and R. Nagaraj.** Host-defense Antimicrobial Peptides: Importance of Structure for Activity. 2002, *Current Pharmaceutical Design*, 8, 727-742.
7. **Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ.** Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. 2006, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 1184-202.
8. **Dawson RM, Liu CQ.** Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefence against biological warfare threat agents. 2008, *Critical Reviews in Microbiology*, 34, 89-107.

9. **Hancock RE.** Antibacterial peptides and the outer membrane of gram-negative bacilli. 1997, *Journal of Medical Microbiology*, 46, 1-3.
10. **Ehrenstein G, Lecar H.** Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. 1977, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 10, 1-34.
11. **David I. Chan, Elmar J. Prenner, Hans J. Vogel.** Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. 2006, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 1184-1202.
12. **Palfy et al.** On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. 2009, *Molecular Medicine*, 15, 51-59.
13. **Yeaman M. and Yount N.** Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. 2003, *Pharmacological Reviews*, 55, 27-55.
14. **Dawson R.M and Liu C.Q.** Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. 2008, *Critical Reviews in Microbiology*, 34, 89-107.
15. **Jenssen H., Hamill P. and Hancock R.E.W.** Peptide antimicrobial agents. 2006, *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 491-511.
16. **Kraus D. and Peschel A.** Staphylococcus aureus evasion of innate antimicrobial defense. 2008, *Future Microbiology*, 3(4), 437-451.
17. **Oyston P.C.F., Fox M.A., Richards S.J. and Clark G.C.** Novel peptide therapeutics for treatment of infections. 2009, *Journal of Medical Microbiology*, 58, 977-987.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 3^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

1. **Γεωργιάτσου, Ι. Γ.** (2001) Δομή και λειτουργίες πρωτεϊνών. *Εισαγωγή στη Βιοχημεία*. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπουλή.
2. **McMurry, J.** (1999) Βιομόρια: αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες. *Οργανική Χημεία*. Τόμος II. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
3. **Miklos Bodanzsky,** (1993) “*Peptide Chemistry: A Practical Textbook*”, 2nd Rev. Edition. Springer Verlag, New York.
4. **Jones, M.Jr.** (1997) Introduction to amino acids and polyamino acids (Peptides and Proteins). *Organic Chemistry*. New York.

5. **Carpino, L.A.** (1957) New amine-masking groups for peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4686-4960.
6. **Anderson, G.W. and Mc Gregor, A.C.** (1957) t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 6180-6183.
7. **Carpino, L.A. and Han, G.A.** (1970) The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J. Org. Chem.* 92, 5748-5756.
8. **Bergman, M. and Zervas, L.** (1932) Max Bergmann and Leonidas Zervas: Uber ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 65, 1192-1201.
9. **Munson, M. and Barany, G.** (1993) Synthesis of a-conotixin, a bicyclic tridecapeptide amide with two disulfide bridges: illustration of novel protection schemes and oxidation strategies. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 10203-10210.
10. **Zervas, L. and Theodoropoulos, D.M.** (1956) N-tritylamino acids and Peptides. A new method of Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1359-1363.
11. **Kamber, B. and Rittel, W.** (1968) Eine neue, einfache methode zur synthese von cystinpeptiden. *Helv. Chim. Acta.* 51, 2061-2064.
12. **Kamber, B.** (1971) Die Synthese von insulinfragmenten mit intakter interchenarer disulfidbrucke A²⁰-B¹⁹. *Helv. Chim. Acta.* 54, 398-422.
13. **Sieber, P. and Iselin, B.** (1968) Peptide synthesis under application of the 2-(p-diphenyl)-isopropylloxycarbonyn (Dpoc)-amino protection groups *Helv. Chim. Acta.* 51, 622-632.
14. **Bodanzsky, M.**, "Peptide Chemistry: A Practical Textbook", (1993) 2nd Rev. Edition. Springer Verlag, New York.
15. **Barany, G., and Merrifield, R. B.**, in: *Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2, *Special Methods in Peptide Synthesis*, Part A, Gross, E., and Meienhofer, J., Eds., Academic Press, New York, (1979) 1.
16. **Merrifield, R. B.**, in: *Peptides. Synthesis, Structures and Applications*, Gutte, B., Ed., Academic Press, New York, (1995) 93.
17. **Anuradha, V.M. and Ravindranath, B.** (1995) Ultrasound in Peptide Synthesis. 3¹ Zinc-Salt assisted anchoring of carboxylic acids to Merrifield resin. *Tetrahedron*, 51, 5671-5674.
18. **Loffet, A.** (1967) Synthesis of a pentapeptide by the Merrifield method. *Experientia.* 23, 406-407.
19. **Mitchell, A.R., Kent, S.B.H., Engelhard, M. and Merrifield, R.B.** (1978) A new synthetic route to tert - butyloxycarbonylaminoacyl - 4 - (oxymethyl)

- phenylacetamidomethyl-resin, an improved support for solid phase peptide synthesis. *J. Org. Chem.* 43, 2845-2852.
20. **Mitchell, A.R., Erickson, B.W., Ryabtsev, M.V., Hodges, R.S. and Merrifield, R.B.** (1976) tert – Butoxycarbonylaminoacyl – 4 - (oxymethyl) - phenylacetamidomethyl-resin, a more acid resistant support for solid phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 7357-7362.
21. **Matsueda, R.G. and Stewart, J.M.** (1981) A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides*. 2, 45-50.
22. **Wang, W.S.** (1973) P-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxy carbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 1328-1333.
23. **Lu, G., Mosjov, S., Tam, P.J. and Merrifield, R.B.** (1981) Improved synthesis of 4-alkoxybenzyl alcohol resin. *J. Org. Chem.* 46, 3433-3436.
24. **Pimm, M.V., Clegg, J.A., Hudecz, F., and Baldwin, R.W.,** (1992), *Int. J. Pharmaceutics*, 79, 77-80.
25. **Bernatowicz, M.S., Daniels, S.B. and Koster, H.** (1989) A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides. *Tetrahedron Lett.* 30, 4645-4648.
26. **Barlos, K., Gatos, D., Kapos, S., Poulos, E., Schafer, W. And Wenqing, Y.** (1991) Solid phase synthesis of partially protected and free peptides containing disulphide bonds by simultaneous cysteine oxidation-release from 2-chlorotrityl resin. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 38, 555-561.
27. **Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, G. and Stavropoulos, G.** (1991) 2-Chlorotritylchloride resin. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 37, 513-520.
28. **Carpino, L.A.** "Oxidative Reactions of Hydrazines. IV. Elimination of Nitrogen from 1, I-Disubstituted-2-arenesulfinhydrazides", (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 4427-4431.
29. **Anderson, G.H, and McGregor, A.C.,** "t-Butyloxycarbonylamino Acids and Their Use in Peptides Synthesis", (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 6180-6183.
30. **Carpino, L.A., and Han, G.A.,** "The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group", (1972), *J. Org. Chem.*, 37, 3404-3409.
31. **Yajima, H., Sasaki, T., Ogawa, H., Juji, N., Segawa, T. and Nakata, Y.** (1978) Studies on peptides. LXXVI. Synthesis of kassinin, a new frog skin peptide. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 1231-1235.

32. **Ramachandram, J. and Li, C.H.** (1962) *J. Org. Chem.* 27, 4006-4009.
33. **Shimonishi, Y., Sakakibara, S. and Akabori, S.** (1962) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 35, 1966-1970.
34. **Hong, Z., Yali, W. And Voelter, W.** (1995) A New Strategy for the Synthesis of Asp-Gly Units-Containing Glycopeptides Using Fmoc/Bzl Protection. *Tetrahedron Lett.* 36, 8767-8770.
35. **Nicolás, E., Pedroso, E. and Giraldo, E.** (1989) Formation of aspartimide peptides in Asp-Gly sequences *Tetrahedron Lett.* 30, 497-500.
36. **Bodanzsky, M. and Bednarek, M.A.** (1982) Derivatives of S-9-fluorenylmethyl-L-cysteine. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 20, 434-437.
37. **Akabori, S., Sakakibara, S., Shimomishi, Y. and Nobuhara, Y.** (1964) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 37, 1964-1972.
38. **Brown, T. and Jones, J.H.** (1981) Protection of histidine side chains with π -benzylomethyl or π -bromobenzyloxymethyl groups. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 648-649.
39. **Van der Eijik, J.M., Nolte, R.J.M. and Zwikker, J.W.** (1980) Simple and mild method for the removal of N^{im}-Tosyl protecting group. *J. Org. Chem.* 45, 547-548.
40. **Chillemi, F. and Merrifield, R.B.** (1969) Use of N^{im}-Dinitrophenylhistidine in the solid phase synthesis of tricosapeptides 124-146 of human hemoglobin β -chain. *Biochemistry.* 8, 4344-4346.
41. **Erickson, B.W. and Merrifield, R.B.** (1973) Use of chlorinated benzyloxycarbonyl protecting groups to eliminate N^c-branching at lysine during solid phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 3757-3763.
42. **Adamson, J.G., Blaskowitch, M.A., Groenveld, H. and Lajoie, G.A.** (1991) Simple and convenient synthesis of tert-butyl ethers of Fmoc-serine, Fmoc-threonine, Fmoc-tyrosine. *J. Org. Chem.* 56, 3447-3449.
43. **Yamashiro, D. and Li, C.H.** (1973) Protection of tryptophan with the formyl group in peptide synthesis. *J. Org. Chem.* 38, 2594-2597.
44. **Green, J., Ogunjobi, O. M., Ramage, R., Stewart, S. McCurdy, A. S. J. and Noble, R.** (1988) Application of the N^G-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl) derivative of Fmoc-arginine to peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 29, 4341-4344.

45. **Carpino, L.A., Schroff, H., Triolo, S.A., El-Sayed Mansour, M.E., Wenschuh, H. and Albericio, F.** (1993) The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. *Tetrahedron Lett.* 34, 7829-7832.
46. **Ramage, R., Green, J. and Blake, A.J.** (1991) An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: N^G- 2, 2, 5, 7, 8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine. *Tetrahedron*, 47, 6353-6370.
47. **Chang, C.D., Waki, M., Ahmad, M., Meienhorer, J., Lundell, E.O. and Haug, J.D.** (1980) Preparation and properties of N^α-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert-butyl side chain protection. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 15, 59-66.
48. **Kates, S.A., Solé, N.A., Johnson, C.R., Hudson, D., Barany, G. and Albericio, F.** (1993) A novel, convenient, three-dimensional orthogonal strategy for solid-phase synthesis of cyclic peptides. *Tetrahedron Lett.* 34, 1549-1552.
49. **Loffet, A. and Zhang, H.X.** (1993) Allyl-based groups for side-chain protection of amino acids. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 42, 346-351.
50. **Chhabra, S.R., Hothi, B., Evans, D.J., White, P.D., Bycroft B.W. and Chan, W.C.** (1998) An Appraisal of New Variants of Dde Amine Protecting Group for Solid Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* 39, 1603-1606.
51. **Sheeman, J.C. and Hess, G.P.** (1955) A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1067-1068.
52. **Kalir, R., Warshawsky, A., Fridkin, M. and Patchornik, A.** (1975) New useful reagents for peptide synthesis. Insoluble active esters of polystyrene-bound 1-hydroxybenzotriazole. *Eur. J. Biochem.* 59, 55-61.
53. **Izdebski, J., Pachulska, M. and Orłowska, A.** (1994) N-cyclohexyl-N'-isopropylcarbodiimide: a hybrid that combines the structural features of DCC and DIC. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 45, 414-419. König, W., and Geiger, R., "Racemization in peptide syntheses", (1970), *Chem. Ber.*, **103(7)**, 2024-2034.
54. **König, W., and Geiger, R.**, "Racemization in peptide syntheses", (1970), *Chem. Ber.*, 103(7), 2024-2034.
55. **Castro, B., Dormoy, J.R., Evin, G., and Selve, C.,** *Tetrahedron Lett.*, **1975, 14, 1219-1222.**
56. **Coste, J., Le-Nguyen, D., and Castro, B.,** "PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product", (1990), *Tetrahedron Lett.*, 31(2), 205-208.

57. Coste, J., Dufour, M-N., Pantaloni, A., and Castro, B., "Brop: A new reagent for coupling N-methylated amino acids", (1990), *Tetrahedron Lett.*, 31(5), 669-672.
58. Dourtoglou, V., Ziegler, J.C., and Gross, B., "Hexafluorophosphate of O-Benzotriazole-N,N-tetramethyurea – New and effective reagent of coupling peptide", (1978), *Tetrahedron Lett.*, 19(15), 1269-1272.
59. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., and Gillessen, D., "New coupling reagents in peptide chemistry", (1989), *Tetrahedron Lett.*, 30(15), 1927-1930.
60. Blake, J., and Li, C.H., "Adrenocorticotropins. XXXIX. The solid phase synthesis of methion-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycine", (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, 90(21), 5882-5884.
61. Solé, N.A., and Barany, G., "Optimization of solid-phase synthesis of [Ala⁸]-dynorphin A.", (1992), *J. Org. Chem.*, 57, 5399.
62. Ι.Ν.Παπαδογιάννης. Εργαστηριακές ασκήσεις ενόργανης χημικής ανάλυσης. *Εκδόσεις Πήγασος 2000.*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 4^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

1. Blondelle S.E., Lohner K., Aguilar M. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. 1999, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 89-108.
2. Electromagnetic waves and circular dichroism : a demonstration using animations.
3. http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 7^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

1. Jolanta Janiszewska, Joanna Swieton, Andrzej W. Lipkowski, Zofia Urbanczyk-Lipkowska. Low molecular mass peptide dedrimers that express antimicrobial properties. 2003, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13, 3711-3713.
2. Magitta Dathe, Michael Schumann, Torsten Wieprecht, Anett Winkler, Michael Beyermann, Eberhard Krause, Katsumi Matsuzaki, Osamu Murase, Michael Bienert. 1996, *Biochemistry*, 35, 12612-12622.
3. Eva J. Helmerhorst, Ingrid M. Reijnders, Wim van't Hof, Enno C.I Veerman, Arie V. Nieuw Amerongen. 1999, *FEBS Letters*, 449, 105-110.

4. Annett Rozek, Jon-Paul S. Powers, Carol L. Friedrich, Robert E. W. Hancock. 2003, *Biochemistry*, 42, 14130-14138.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 8^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

1. Yee H. Chen, Jen T. Yang and Kue H. Chau. 1974, *Biochemistry*, 13, 3350-3359.