

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265328



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

37

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΜΑΓΕ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ  
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ**

**ΔΗΜΗΤΡΑ Σ. ΔΗΜΤΣΟΥΔΗ**  
ΧΗΜΙΚΟΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΗΜΤΣΟΥΔΗ Σ. ΔΗΜΗΤΡΑ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ MAGE ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ**  
**ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

που εκπονήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καθηγητής Κωνσταντίνος Σακαρέλλος-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Επιβλέπων Καθηγητής

Καθηγήτρια Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής

Επίκουρος Καθηγήτρια Ευγενία Πάνου-Πομόνη-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής

Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Μέλος εξεταστικής επιτροπής

Καθηγητής Αλέξανδρος Τσελέπης-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Μέλος εξεταστικής επιτροπής

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαριλένα Λέκκα-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Μέλος εξεταστικής επιτροπής

Αναπληρωτής Καθηγητής Δημόκριτος Τσουκάτος-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Μέλος εξεταστικής επιτροπής

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008**





Καθηγητής Κωνσταντίνος ΣΑΚΑΡΕΛΛΟΣ

E-mail: [ksakarel@cc.uoi.gr](mailto:ksakarel@cc.uoi.gr)

Τηλ.: 26510-98390 ή 98386 FAX: 26510-98770

Γραμματεία: 26510-98388 ή 98387 ή 98398 FAX: 26510-98799

Προς το Τμήμα Χημείας  
του Παν/ου Ιωαννίνων

Θέμα : « Απονομή του τίτλου του Διδάκτορα στην κ. Δήμητρα Δημητσούδη»

Η κ. Δήμητρα Δημητσούδη παρουσίασε τα αποτελέσματα της Διδακτορικής της Διατριβής με τίτλο « Μελέτη αντιγόνων MAGE για την ανάπτυξη αντικαρκινικών εμβολίων» ενώπιον της Εξεταστικής Επιτροπής. Μετά την ανταλλαγή απόψεων μεταξύ των μελών της Επιτροπής αποφασίστηκε να της απονεμηθεί ο τίτλος του Διδάκτορα με βαθμό "Άριστα"

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

1. Κωνσταντίνος Σακαρέλλος Καθηγητής, Επιβλέπων Καθηγητής

2. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Καθηγήτρια

3. Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια

4. Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής

5. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής

6. Μαρίλενα Λέκκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

7. Δημόκριτος Τσουκάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής





Στους γονείς μου Σιδέρη και Ελένη  
και στις αδελφές μου Μαρία και Αγγελική



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Επιβλέποντα Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο για την ανάθεση του θέματος και για την καθοδήγησή του κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την Καθηγήτρια κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου και την Επίκουρο Καθηγήτρια Ευγενία Πάνου-Πομώνη, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την άμεση επίβλεψη, το συνεχές ενδιαφέρον και για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη για το ενδιαφέρον του κατά την πορεία της εργασίας και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ευχαριστίες εκφράζονται για την καλή συνεργασία στους συναδέλφους μου στο εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων, όπως επίσης και στην Μαρκάκη Γιολάντα για την πολύτιμη και συνεχή βοήθειά της στη διεξαγωγή των πειραμάτων της Συνεστιακής Μικροσκοπίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου. Η οικονομική και κυρίως η ηθική υποστήριξή τους ήταν καταλυτική για την προσπάθειά μου να διευρύνω τις γνώσεις μου και να εκπληρώσω τις προσδοκίες μου.

Δήμητρα Δημτσούδη

Ιωάννινα, 2008



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## Θεωρητικό Μέρος

<b>1. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΕΜΒΟΛΙΑ</b>	<b>3</b>	
1.1	Εισαγωγή	5
1.2	Ανοσοποιητικό σύστημα	5
1.2.1	Φυσική και επίκτητη ανοσία	6
1.2.2	Κύτταρα ανοσοποιητικού συστήματος	7
1.2.3	Σύμπλεγμα του υποδοχέα του T κυττάρου	12
1.2.4	Μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας	13
1.3	Επίτοποι	15
1.4	Ανοσολογική απόκριση	16
1.4.1	Επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνου στα CD8 και CD4 T κύτταρα	16
1.4.2	Αποτελεσματική παρουσίαση αντιγόνου στην επιφάνεια του κυττάρου	20
1.4.3	Ενεργοποίηση CD4 T κυττάρων	22
1.4.4	Ενεργοποίηση CD8 T κυττάρων	23
1.4.5	Συνεργασία T και B κυττάρων στην παραγωγή αντισωμάτων	25
1.5	Καρκίνος	27
1.6	Καρκίνος και ανοσοποιητικό σύστημα	28
1.7	Μηχανισμοί διαφυγής καρκινικού κυττάρου από την καταστροφή του	30
1.8	Καρκινικά αντιγόνα	31
1.9	MAGE 3 καρκινικό αντιγόνο	32
1.10	Εμβόλια για την καταπολέμηση του καρκίνου	36
1.11	Προϋποθέσεις για την ανάπτυξη πεπτιδικών εμβολίων	36
1.11.1	Ταυτοποίηση πεπτιδικών επιτόπων T καρκινικών κυττάρων	37
1.11.2	Επιλογή των καταλληλότερων T κυτταρικών επιτόπων καρκινικών αντιγόνων	37
1.11.3	Ανοσογονικότητα ή απουσία αυτής-Ρόλος ανοσοενισχυτικών	38
1.11.4	Ανοχή έναντι αυτοανοσίας	39
1.11.5	Εξειδίκευση MHC μορίων	40
1.11.6	Εμβόλια με πολλούς επιτόπους	40
1.11.7	Κλινική αξιολόγηση του εμβολίου	41



---

## 2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ 45

---

2.1	Εισαγωγή	47
2.2	Πρωτεϊνικοί φορείς	47
2.3	Συνθετικοί φορείς	48
2.3.1	Φορέας πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων ( Multiple Antigenic Peptides, MAPs)	48
2.3.2	Μεθοδολογία TASP ( Template Assembled Synthetic Protein )	51
2.3.3	Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς ( Sequential Oligopeptide Carriers, SOCn )	53

---

## 3. ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ 57

---

3.1	Εισαγωγή	59
3.2	Αμινοξέα	60
3.3	Πεπτιδικός δεσμός	61
3.4	Χαρακτηριστικά του πεπτιδικού δεσμού	63
3.5	Αρχές πεπτιδικής σύνθεσης	65
3.6	Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση	66
3.6.1	Το στερεό πολυμερές	70
3.6.2	Προστασία-Αποπροστασία α-αμινομάδας	74
3.6.3	Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων	75
3.6.4	Ορθογωνική προστασία	77
3.6.5	Σχηματισμός αμιδικού δεσμού – Αντιδραστήρια σύζευξης	78
3.6.6	Δοκιμές χρωματομέτρησης της ρητίνης	82
3.6.7	Ρόλος διαλυτών κατά την πεπτιδική σύνθεση	83
3.6.8	Αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές	83

---

## 4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ 87

---

4.1	Εισαγωγή	89
4.2	Καθαρισμός και έλεγχος καθαρότητας πεπτιδίων	89
4.3	Ταυτοποίηση πεπτιδίων ESI-MS	92



<b>5. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ ( CD )</b>	<b>99</b>	
<hr/>		
5.1	Εισαγωγή	101
5.2	Φυσικές αρχές κυκλικού διχρωισμού	102
5.3	Οργανολογία	105
5.4	Μελέτη διαμόρφωσης πεπτιδίων με φασματοσκοπία CD	105
5.4.1	α-έλικα	108
5.4.2	β-διάταξη πτυχωτού φύλλου	109
5.4.3	β-στροφή	110
5.4.4	Τυχαία διαμόρφωση	110
<b>6. ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ</b>	<b>113</b>	
<hr/>		
6.1	Εισαγωγή	115
6.2	Φθορισμός-Μικροσκοπία φθορισμού	115
6.3	Αρχή λειτουργίας της Συνεστιακής Μικροσκοπίας	117
6.4	Πλεονεκτήματα της τεχνικής της Συνεστιακής Μικροσκοπίας	118
<b>7. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ</b>	<b>121</b>	
<hr/>		
7.1	Εισαγωγή	123
7.2	Αρχή λειτουργίας οργάνου	123
7.3	Τρόποι παρουσίασης αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής	126
<b>8. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ</b>	<b>129</b>	
<hr/>		
8.1	Εισαγωγή	131
8.2	Ανοσοενζυμικές μέθοδοι	131
<b>9. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>137</b>	
<hr/>		



## Πειραματικό Μέρος

### 10. ΣΥΝΘΕΣΗ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

145

10.1	Εισαγωγή	147
10.2	Μεθοδολογία	150
10.3	Μείωση αρχικής υποκατάστασης της ρητίνης	154
10.4	Ιχνηθέτηση με NHS-φλουορεσκεΐνη	155
10.5	Πειραματική πορεία σύνθεσης	157
10.5.1	Σύνθεση του πεπτιδίου MAGE 3 CD8 (212-220): EGDC(Acm)APEEK (1)	157
10.5.2	Σύνθεση του πεπτιδίου MAGE 3 CD8 (114-122): AELVHFLLL (2)	159
10.5.3	Σύνθεση του πεπτιδίου MAGE 3 CD4 (243-258): KKLLTQHFVQENYLEY(3)	161
10.5.4	Σύνθεση του πεπτιδίου Ac-SOC <sub>3</sub> -II (4)	163
10.5.5	Σύνθεση του πεπτιδίου Pal-SOC <sub>3</sub> -II (5)	165
10.5.6	Σύνθεση του πεπτιδίου Ac-SOC <sub>3</sub> -II[MAGE 3 CD8 (212-220)] <sub>2</sub> (6)	167
10.5.7	Σύνθεση του πεπτιδίου Ac-SOC <sub>3</sub> -II[MAGE 3 CD8 (114-122)] <sub>2</sub> (7)	172
10.5.8	Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου Ac-SOC <sub>3</sub> -II[MAGE 3 CD8 (212-220)] <sub>2</sub> (8)	178
10.5.9	Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου Ac-SOC <sub>3</sub> -II[MAGE 3 CD8 (114-122)] <sub>2</sub> (9)	178
10.5.10	Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου Ac-SOC <sub>4</sub> -I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] <sub>2</sub> (10)	179
10.5.11	Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου Ac-SOC <sub>4</sub> -I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] (11)	179
10.5.12	Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου Pal -SOC <sub>4</sub> -I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] (12)	180

### 11. ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ

183

11.1	Εισαγωγή	185
11.2	Απεικόνιση φασμάτων	186
11.3	Ανάλυση φασμάτων κυκλικού διχρωισμού	193



<b>12. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ</b>	<b>215</b>
12.1 Εισαγωγή	217
12.2 Αποτελέσματα	218
<b>13. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ</b>	<b>233</b>
13.1 Εισαγωγή	235
13.2 Πειράματα κυτταρομετρίας ροής (FACS)	237
13.3 Πειράματα ELISA μη ανταγωνιστική τύπου sandwich	242
<b>14. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>245</b>
<b>15. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>257</b>
<b>16. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>261</b>
<b>17. ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>269</b>
<b>18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>275</b>
<b>19. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>297</b>
19.1 Φυσικά αμινοξέα	299
19.2 Συντομογραφίες	300
19.3 Συμμετοχή σε συνέδρια	304



# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

# **ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΕΜΒΟΛΙΑ**



# 1. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΕΜΒΟΛΙΑ

## 1.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος είναι μία από τις τρεις αιτίες που οδηγούν σε θάνατο στις ανεπτυγμένες χώρες. Καθώς οι θεραπείες για τις μολυσματικές νόσους και η πρόληψη των καρδιαγγειακών νόσων συνεχίζουν να βελτιώνονται και ο μέσος όρος ζωής αυξάνεται, ο καρκίνος είναι πιθανό να γίνει η πιο κοινή θανατηφόρος νόσος σε αυτές τις χώρες. Οι καρκίνοι προκαλούνται από την προοδευτική ανάπτυξη του προγόνου ενός και μόνο μετασηματισμένου κυττάρου. Έτσι, η θεραπεία του καρκίνου απαιτεί την απομάκρυνση όλων των καρκινικών κυττάρων ή την καταστροφή τους χωρίς το θάνατο του ασθενή. Ένας ελκυστικός τρόπος λοιπόν για την αντιμετώπιση του καρκίνου θα ήταν η παραγωγή μιας ανοσολογικής απόκρισεως κατά του όγκου που θα διέκρινε τα κύτταρα που είναι προσβεβλημένα από τον καρκίνο από τα υγιή κύτταρα. Εδώ και ένα αιώνα γίνονται προσπάθειες δημιουργίας ανοσολογικών αποκρίσεων για τη θεραπεία του καρκίνου. Είναι τώρα σαφές ότι τα κύτταρα είναι ένας πολύ σημαντικός μεσολαβητής για την ανοσία στους όγκους και τα τελευταία χρόνια έχουν προωθηθεί νέες ανοσοθεραπευτικές στρατηγικές που βασίζονται σε μια καλύτερη μοριακή κατανόηση της ανοσολογικής απόκρισεως. Η χρησιμοποίηση πεπτιδικών εμβολίων για την καταπολέμηση του καρκίνου είναι μια πολλά υποσχόμενη ανοσοθεραπευτική μέθοδος.

## 1.2 Ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο από κύτταρα και συστατικά των κυττάρων, που είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της υγείας. Το σύστημα αυτό είναι υπεύθυνο για την άμυνα του οργανισμού απέναντι στα βλαβερά ερεθίσματα του περιβάλλοντος, προστατεύει δηλαδή τους ζωικούς οργανισμούς από άλλους μολυσματικούς οργανισμούς και τα τοξικά τους προϊόντα. Έτσι λοιπόν, η ανοσία είναι η αντίδραση του οργανισμού στις ξένες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων τόσο των μικροβίων, όσο και διαφόρων μακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες, ανεξάρτητα από τις προστατευτικές ή βλαπτικές συνέπειές της. Τα κύτταρα και τα μόρια που εμπλέκονται στις διάφορες ανοσολογικές λειτουργίες, αποτελούν το ανοσολογικό σύστημα, ενώ η συνδυασμένη αντίδρασή τους, την οποία συνεπάγεται η επαφή με τις ξένες ουσίες, συνιστά την ανοσολογική απόκριση.



### 1.2.1 Φυσική και επίκτητη ανοσία

Το περιβάλλον αποτελεί για τον οργανισμό μας μια συνεχή απειλή. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το ανοσοποιητικό σύστημα έχει αναπτύξει πολλούς ισχυρούς μηχανισμούς ώστε να εντοπίζει ξένα κύτταρα, ιούς και μακρομόρια καθώς επίσης, και να εξουδετερώνει και να απομακρύνει αυτούς τους εισβολείς. Μερικοί από αυτούς τους αμυντικούς μηχανισμούς υπάρχουν πριν από την έκθεση του οργανισμού στα ξένα μακρομόρια, στερούνται διακριτικής ικανότητας σε σχέση με αυτές τις ξένες ουσίες και η δράση τους δεν επιτείνεται κατά τις επανειλημμένες επαφές με αυτές. Αυτό το τμήμα της ανοσίας, κύρια στοιχεία του οποίου είναι τα επιθήλια, τα φαγοκύτταρα, τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer cells, NK-cells) και το συμπλήρωμα, ονομάζεται μη ειδική (φυσική) ανοσία.

Αν η φυσική ανοσία δεν κατορθώσει να εξουδετερώσει την απειλή κινητοποιούνται άλλοι μηχανισμοί που είναι εξαιρετικά ειδικοί και αυξάνουν σημαντικά την αμυντική ικανότητα του οργανισμού κατά τις τυχόν μελλοντικές επαφές του με την ίδια απειλή. Οι μηχανισμοί αυτοί συνιστούν την ειδική ή επίκτητη ανοσία, η οποία κατευθύνεται σε ειδικά μόρια και επαυξάνεται με τη συνεχή έκθεση. Η ειδική ανοσία ρυθμίζεται από κύτταρα που ονομάζονται λεμφοκύτταρα, τα οποία συνθέτουν κυτταρικούς υποδοχείς ή εκκρίνουν πρωτεΐνες (αντισώματα) που συνδέονται ειδικά με ξένα μόρια.

Ανάλογα με τα στοιχεία του ανοσολογικού συστήματος που συμμετέχουν στην εκδήλωση της ανοσολογικής απόκρισης, η ειδική ανοσία διακρίνεται σε χυμική (humoral immunity) και σε κυτταρική (cellular ή cell-mediated immunity).

Στη χυμική ανοσία συμμετέχουν μόρια του αίματος που εξυπηρετούν την ειδική αναγνώριση και την εξουδετέρωση των αντιγόνων και καλούνται αντισώματα. Τα αντισώματα παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα, τα οποία αφού συναντήσουν και αναγνωρίσουν το αντιγόνο, μετατρέπονται σε κύτταρα που παράγουν αντισώματα. Η χυμική ανοσία είναι ο κατ' εξοχήν προστατευτικός μηχανισμός έναντι των εξωκυττάρων μικροβίων και τοξινών τους. Τα αντισώματα συνδέονται με αυτά και συμβάλλουν στην καταστροφή τους.

Στην κυτταρική ανοσία συμμετέχουν τα Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία συνήθως συνεργάζονται με τα φαγοκύτταρα, προκειμένου να επιτευχθεί η καταστροφή των μικροβίων. Η κυτταρική ανοσία αποτελεί την άμυνα του οργανισμού έναντι των ενδοκυττάρων μικροοργανισμών, όπως είναι οι ιοί και ορισμένα βακτήρια, που πολλαπλασιάζονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή, όπου είναι απροσπέλαστα από τα αντισώματα που κυκλοφορούν



στον ορό. Έτσι, αυτό το είδος της ειδικής ανοσίας προκαλεί και προάγει την ενδοκυττάρια καταστροφή τους ή τη λύση των μολυσμένων κυττάρων.

### 1.2.2 Κύτταρα ανοσοποιητικού συστήματος

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παράγονται στον μυελό των οστών. Μερικά ωριμάζουν εκεί και μερικά στον θύμο αδένα, όπου μεταναστεύουν από τον μυελό των οστών. Τελικώς όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μεταναστεύουν στους ιστούς. Άλλα εγκαθίστανται εκεί και διαφοροποιούνται και άλλα αποικίζουν παροδικά τους λεμφαδένες και επανακυκλοφορούν στο αίμα και στη λέμφο.

Όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προέρχονται από το αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο (pluripotent stem cell) του μυελού των οστών. Διακρίνονται δύο κύριες οδοί διαφοροποίησης, προς τις οποίες κατευθύνεται το μητρικό κύτταρο υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων:

(α) Η λεμφική σειρά, που δίνει γένεση στα λεμφοκύτταρα.

(β) Η μυελική σειρά, από την οποία θα προέλθουν τα μονοκύτταρα (μονοκύρηνα) και τα κοκκιοκύτταρα (πολυμορφοκύρηνα).

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι εμπύρηνα κύτταρα που απαντώνται είτε ως κυκλοφορούντα κύτταρα του αίματος και της λέμφου, είτε συναθροισμένα στα λεμφικά όργανα, είτε διάσπαρτα σε όλους τους ιστούς του οργανισμού, με εξαίρεση το κεντρικό νευρικό σύστημα.

#### ◆ Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα είναι εξ ολοκλήρου υπεύθυνα για την ανοσολογική αναγνώριση των παθογόνων, προκαλώντας έτσι την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης. Τα λεμφοκύτταρα έχουν μεγάλο πυρήνα, στερούνται κυτταροπλασματικών κοκκίων και παρότι έχουν την ίδια μορφολογία, εξυπηρετούν πληθώρα διακεκριμένων λειτουργιών και διακρίνονται σε διάφορους υποπληθυσμούς. Η διάκριση των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων επιτυγχάνεται με την αναγνώριση συγκεκριμένων συνδυασμών πρωτεϊνών (clusters of differentiation), τις οποίες τις εκφράζουν στη μεμβράνη τους. Αυτές οι επιφανειακές πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως φαινοτυπικοί δείκτες για το διαχωρισμό των διαφόρων λειτουργικών υποπληθυσμών, στους οποίους διακρίνονται τα λεμφοκύτταρα. Οι τρεις

μεγάλοι υποπληθυσμοί στους οποίους διακρίνονται τα λεμφοκύτταρα, είναι τα φυσικά φονικά κύτταρα, τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα.

Τα φυσικά φονικά κύτταρα είναι μεγάλα λεμφοκύτταρα με διακριτά κυτταροπλασματικά κοκκία που προέρχονται από το μυελό των οστών και αποικίζουν το σπλήνα και τους λεμφαδένες, ενώ βρίσκονται και στο περιφερικό αίμα (λέγονται και μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα). Φυλογενετικά, θεωρούνται αρχέγονα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα και με όρους φαινοτύπου δεν είναι Β ούτε Τ λεμφοκύτταρα. Δεν έχουν Τ κυτταρικό υποδοχέα για την αναγνώριση αντιγόνου και δεν αναγνωρίζουν αντιγόνο που παρουσιάζεται μέσω των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Δεν είναι γνωστό ποιες δομές αναγνωρίζουν στα κύτταρα-στόχους αλλά τουλάχιστον είναι γνωστό ότι για να ενεργοποιηθούν δεν απαιτείται προηγουμένως επαφή με το αντιγόνο. Τα NK κύτταρα έχουν κυτταροτοξική δράση έναντι κυττάρων που έχουν τροποποιηθεί μέσω καρκινικών και ιικών αντιγόνων και η δράση τους αυτή είναι άμεση σε αντίθεση με τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα. Τα φυσικά φονικά κύτταρα φονεύουν τα κύτταρα-στόχους με προσχηματισμένες τοξίνες που εκκρίνονται με μορφή κοκκίων όπως είναι οι πρωτεάσες της σερίνης και οι πρωτεογλυκάνες. Επίσης, συνθέτουν τον παράγοντα νεκρώσεως των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) και την IFN- $\gamma$ .

Τα Β λεμφοκύτταρα (Β κύτταρα) παράγονται και ωριμάζουν στον μυελό των οστών, γι' αυτό και ονομάζονται έτσι (Bone marrow). Αποτελούν το 10-15% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και περίπου το 10% των λεμφοκυττάρων των λεμφαδένων και το 50% των κυττάρων του σπλήνα. Τα Β κύτταρα παράγονται καθ' όλη τη διάρκεια της ανθρώπινης ζωής, αν και βαθμιαία μειώνεται ο αριθμός με την ηλικία, παρέχοντας συνεχώς νέα Β κύτταρα τα οποία παράγουν αντισώματα κατά ενός μεγάλου εύρους πιθανών παθογόνων που πρέπει να αναγνωρισθούν και να απομακρυνθούν.

Τα ώριμα Β κύτταρα προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και η κύρια λειτουργία τους είναι η παραγωγή των ανοσοσφαιρινών. Διαφέρουν ωστόσο από τα άλλα κύτταρα που παράγονται από τον μυελό των οστών δεδομένου ότι τα Β κύτταρα έχουν δύο φάσεις ωρίμανσης τη μία ανεξάρτητη από την παρουσία αντιγόνου και την άλλη αντιγονοεξαρτώμενη. Τα πρόδρομα Β κύτταρα χαρακτηρίζονται από την παρουσία κυτταροπλασματικής IgM ανοσοσφαιρίνης. Σε μεταγενέστερο στάδιο εκφράζουν στην επιφάνειά τους την IgM ανοσοσφαιρίνη. Το ώριμο Β κύτταρο εκφράζει στην κυτταρική επιφάνεια IgD ανοσοσφαιρίνη. Στο στάδιο αυτό, τελειώνει η ωρίμανση του Β-κυττάρου. Η έκθεση των Β κυττάρων στα αντιγόνα διαφοροποιεί περαιτέρω τα κύτταρα αυτά ώστε να



τροποποιηθούν σε πλασματοκύτταρα και να παράγουν διαλυτά μόρια που στρέφονται κατά των αντιγόνων, δηλαδή, ανοσοσφαιρίνες. Ένας μικρός αριθμός των Β κυττάρων που στην πλειονότητά τους εκφράζουν στην επιφάνειά τους ανοσοσφαιρίνες IgM παραμένει μακροχρόνια στο λεμφικό ιστό και αποτελεί τα Β κύτταρα μνήμης.

Τα Τ λεμφοκύτταρα (Τ κύτταρα) παράγονται στον μυελό των οστών και μεταναστεύουν στον θύμο αδένα (Thymous) κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και νεογνικής ζωής του ατόμου. Εκεί, επέρχεται η ωρίμανση των κυττάρων αυτών και η διαφοροποίησή τους σε ώριμα Τ κύτταρα τα οποία υπάρχουν κυρίως στον περιφερικό λεμφικό ιστό και κυκλοφορούν στο αίμα και την λέμφο. Οι υποδοχείς των Τ κυττάρων για τα αντιγόνα (T Cell Receptors, TCR) είναι ειδικά μεμβρανικά μόρια, διαφορετικά αλλά δομικά ανάλογα προς τις ανοσοσφαιρίνες.

Η κύρια λειτουργία των Τ κυττάρων είναι η ρύθμιση της λειτουργίας τόσο των ίδιων όσο και των Β κυττάρων και των μακροφάγων δια μέσου ουσιών που δρουν αυτοκρινικά, παρακρινικά και ενδοκρινικά και λέγονται κυτταροκίνες. Επί πλέον τα Τ κύτταρα είναι δυνατόν να δρουν και σαν κύτταρα καταστροφής των αντιγόνων χωρίς τη συμμετοχή άλλων κυττάρων ενώ συμμετέχουν επίσης στην ωρίμανση των κυττάρων της ερυθράς σειράς.

Οι σημαντικότεροι υποπληθυσμοί των Τ κυττάρων είναι τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα, τα οποία διακρίνονται από το μόριο CD8 κυτταρικής επιφανείας και η λειτουργία τους εντοπίζεται στο να εξοντώνουν τα προσβεβλημένα κύτταρα και τα Τ κύτταρα που διακρίνονται από το μόριο CD4 κυτταρικής επιφανείας και εντοπίζουν τα παθογόνα και τα προϊόντα τους στα κυστικά διαμερίσματα των κυττάρων. Τα CD4 Τ κύτταρα είναι εξειδικευμένα στο να ενεργοποιούν άλλα κύτταρα και κατατάσσονται σε δύο λειτουργικές τάξεις: τα κύτταρα T<sub>H</sub>1 (ενίοτε γνωστά ως φλεγμονώδη Τ κύτταρα), τα οποία ενεργοποιούν τα μακροφάγα ώστε να εξοντώσουν τα ενδοκυστικά βακτηρίδια που φιλοξενούν, και τα T<sub>H</sub>2 ή βοηθητικά Τ κύτταρα, τα οποία ενεργοποιούν τα Β κύτταρα ώστε να δημιουργήσουν αντισώματα.

Μερικά από τα Β και Τ κύτταρα, μετά την επαφή τους με το αντιγόνο, δεν διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα. Άντ' αυτού διαφοροποιούνται προς λεμφοκύτταρα μνήμης, που επιβιώνουν για μεγάλες χρονικές περιόδους, απουσία εμφανούς αντιγονικού ερεθισμού. Τα λεμφοκύτταρα αυτά βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, δηλαδή δεν παράγουν δραστικά μόρια, μέχρι να ξαναέλθουν σε επαφή με το αντιγόνο. Τα ερεθίσματα που καθορίζουν τη διαφοροποίηση των πρόδρομων ενεργοποιημένων Β και Τ κυττάρων προς δραστικά κύτταρα ή προς κύτταρα μνήμης δεν είναι γνωστά. Η παραγωγή, πάντως,



λεμφοκυττάρων μνήμης είναι καθοριστικής σημασίας για την πρόκληση μακράς ανοσίας έναντι των λοιμώξεων, με τη χρήση των εμβολίων.

#### ● Μονοπύρηννα μακροφάγα (μονοκύτταρα)

Τα μονοπύρηννα μακροφάγα αποτελούν το δεύτερο μεγάλο κυτταρικό πληθυσμό του ανοσοποιητικού συστήματος και προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών. Τα μονοπύρηννα μακροφάγα αφού ωριμάσουν στο μυελό των οστών, μεταναστεύουν από το αίμα στους ιστούς, όπου μετατρέπονται σε ιστικά μακροφάγα (ιστιοκύτταρα). Ιστικά μακροφάγα υπάρχουν στο μυελό των οστών, στους λεμφαδένες, στο σπλήνα, στο περιτόναιο, στον περιαγγειακό ιστό, στους πνεύμονες (κυψελιδικά μακροφάγα), στο ήπαρ (κύτταρα Kupffer), στο νευρικό ιστό (μικρογλοία) και στα οστά (οστεοκλάστες).

Τα μακροφάγα παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη μη ειδική (φυσική) όσο και στην ειδική (επίκτητη) ανοσία. Η ικανότητα των μακροφάγων να φαγοκυτταρώνουν ξένες ουσίες (μικρόβια, μακρομόρια) καθιστά αυτόν τον πληθυσμό τον κυριότερο κυτταρικό μεσολαβητή της φυσικής ανοσίας. Η διάσπαση των φαγοκυτταροθέντων ουσιών σε αμινοξέα, σάκχαρα ή και άλλα συστατικά έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των βακτηρίων και των παρασίτων από την κυκλοφορία. Όσον αφορά στη συμμετοχή τους στην ειδική ανοσολογική απόκριση, τα μακροφάγα προσλαμβάνουν αντιγόνα, τα εκφράζουν στην επιφάνειά τους και τα εκθέτουν στα Τ κύτταρα με μορφή που μπορούν να αναγνωρίσουν. Στην περίπτωση αυτή, τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα ονομάζονται αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και μπορούν να διεγερθούν από διάφορες κυτταροκίνες. Επίσης, τα μακροφάγα είναι εξαιρετικά εκκριτικά κύτταρα, που εκκρίνουν ποικιλία ουσιών (κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες της αιμοποίησης, παράγοντες του συμπληρώματος, προσταγλανδίνες).

#### ● Πολυμορφοπύρηννα κύτταρα (κοκκιοκύτταρα)

Τα πολυμορφοπύρηννα κύτταρα αποτελούν το τελικό προϊόν της μυελικής διαφοροποίησης και δεν διαιρούνται περαιτέρω. Αποτελούν το 50-70% των κυττάρων του αίματος, απ' όπου μεταναστεύουν στους ιστούς κατά την εξέλιξη τυχόν ιστικής βλάβης ή λοίμωξης και παίζουν σημαντικό ρόλο στη βασική άμυνα του οργανισμού κατά των διαφόρων μικροοργανισμών. Μορφολογικά, χαρακτηρίζονται από πολύλοβο πυρήνα και άφθονη κυτταροπλασματική κοκκίωση. Τα κοκκία τους περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις διεργασίες της φλεγμονής και γενικότερα της φυσικής



ανοσίας, αποτελώντας τον κύριο πληθυσμό της οξείας φλεγμονώδους απόκρισης. Τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα, ανάλογα με τη χρώση των κοκκίων, διακρίνονται σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα.

Τα ουδετερόφιλα, τα οποία περιλαμβάνονται στα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αποτελούν την πλειονότητα των λευκοκυττάρων του αίματος και δημιουργούνται από τα ίδια προγονικά κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Τα ουδετερόφιλα, όπως τα μονοκύτταρα, μεταναστεύουν και αυτά στους ιστούς, ιδιαίτερος σε περιοχές φλεγμονής, αλλά είναι βραχύβια κύτταρα, τα οποία εγκολλώνουν υλικό, το καταστρέφουν και στη συνέχεια πεθαίνουν με απόπτωση. Κληρονομικές διαταραχές της λειτουργίας των ουδετερόφιλων οδηγούν σε καταιγισμό του οργανισμού από μικροβιακές λοιμώξεις, οι οποίες χωρίς κατάλληλη θεραπευτική αγωγή έχουν θανατηφόρα έκβαση.

Τα ηωσινόφιλα έχουν, όπως και τα ουδετερόφιλα, φαγοκυτταρική ικανότητα και μπορούν να δεσμεύουν και να βλάπτουν μεγάλα εξωκυττάρια παράσιτα. Συγκεκριμένα, έχουν ειδικότητα στην καταστροφή μικροοργανισμών (παράσιτα), που είναι ανθεκτικοί στα λυτικά ένζυμα των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων.

Τα βασεόφιλα δεν έχουν φαγοκυτταρική ικανότητα αλλά εκδηλώνουν τη λειτουργία τους με την έκκριση δραστικών ουσιών που περιέχονται στα κυτταροπλασματικά κοκκία τους. Οι λειτουργίες τους πιθανότατα είναι παρόμοιες με αυτές των σιτεντικών κυττάρων, τα οποία πιστεύεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των βλεννογόνων, ενώ επίσης είναι τα κύτταρα από τα οποία εκκρίνεται η ισταμίνη κατά τη διάρκεια των αλλεργικών αντιδράσεων.

#### ◆ Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APC) αποτελούν ετερογενή πληθυσμό λευκοκυττάρων με ιδιαίτερες ανοσοδιεγερτικές ικανότητες. Χαρακτηρίζονται από την δυνατότητα που έχουν να προσλαμβάνουν και να κατεργάζονται το αντιγόνο διασπώντας το σε πεπτίδια, τα οποία μέσω των μορίων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας φέρονται στην επιφάνεια του κυττάρου<sup>1</sup>. Μερικά παίζουν μοναδικό ρόλο στην επαγωγή των λειτουργικών δραστηριοτήτων των T<sub>H</sub> κυττάρων και μερικά επικοινωνούν με άλλα λευκοκύτταρα. Από τα πιο σημαντικά APCs θεωρούνται τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα B κύτταρα. Κύτταρα, εκτός των λευκοκυττάρων, όπως τα



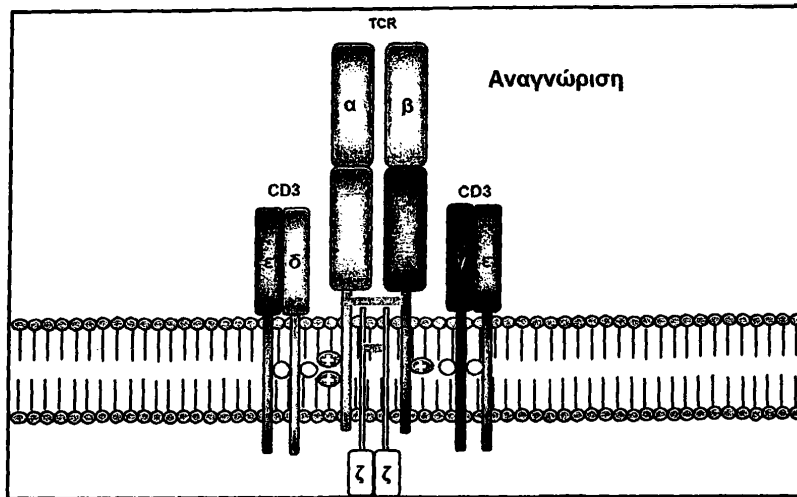
ενδοθηλιακά ή επιθηλιακά, μπορούν να αποκτήσουν την ικανότητα «παρουσίασης» αντιγόνων, όταν διεγείρονται από κυτταροκίνες.

### 1.2.3 Σύμπλεγμα υποδοχέα του T κυττάρου

Κάθε T κύτταρο φέρει περίπου 30000 μόρια υποδοχείς T κυττάρων στην επιφάνειά του. Κάθε υποδοχέας αποτελείται από δύο διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που ορίζονται ως αλυσίδες α και β υποδοχέα T κυττάρου, συνδεδεμένες μεταξύ τους με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Αμφότερες οι αλυσίδες του υποδοχέα T κυττάρου διαθέτουν μια μεταβλητή περιοχή αμινο-τελικού άκρου, μια σταθερή περιοχή και μια βραχεία περιοχή άρθρωσης με κυστεϊνικό κατάλοιπο που σχηματίζει το δισουλφιδικό δεσμό που ενώνει τις δύο αλυσίδες. Κάθε αλυσίδα συνδέεται με τη λιπιδική διπλοστιβάδα με μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή της οποίας αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό είναι η παρουσία θετικώς φορτισμένων αμινοξέων. Τέλος κάθε αλυσίδα καταλήγει σε μία βραχεία κυτταροπλασματική περιοχή.

Παρά το γεγονός ότι αυτά τα α:β ετεροδιμερή ευθύνονται για την αναγνώριση αντιγόνου από όλες τις τάξεις των T κυττάρων, καμία αλυσίδα του ετεροδιμερούς του υποδοχέα T κυττάρου δεν έχει μεγάλο κυτταροπλασματικό τμήμα που θα μπορούσε να χρησιμεύσει για να δώσει σήμα στο κύτταρο ότι ο υποδοχέας T κυττάρου έχει δεσμεύσει αντιγόνο. Αυτή η λειτουργία εκτελείται από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών γνωστό ως σύμπλεγμα CD3 το οποίο είναι σταθερά συνδεδεμένο με τον υποδοχέα T κυττάρου στην επιφάνεια των T κυττάρων<sup>2,3</sup>. Το σύμπλεγμα περιλαμβάνει τρεις ξεχωριστές πρωτεΐνες μερικώς ομόλογες προς τις ανοσοσφαιρίνες, γνωστές ως CD3γ, CD3δ, CD3ε, και δύο άλλες πρωτεΐνες μη ομόλογες προς τις ανοσοσφαιρίνες αλλά με στενή σχέση μεταξύ τους, γνωστές ως ζ. Οι CD3 πρωτεΐνες περιλαμβάνουν εξωκυττάριας περιοχές, διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες χαρακτηρίζονται από ένα όξινο κατάλοιπο στην κατάλληλη θέση ώστε να σχηματίζει μία γέφυρα άλατος με τα βασικά αμινοξέα στη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα T κυττάρου και κυτταροπλασματικές περιοχές οι οποίες τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες μεταγωγής σημάτων. Η πρωτεΐνη ζ σχηματίζει επίσης μέρος αυτού του συμπλέγματος ως διμερές συνδεδεμένο με δισουλφιδικό δεσμό (Σχήμα 1).



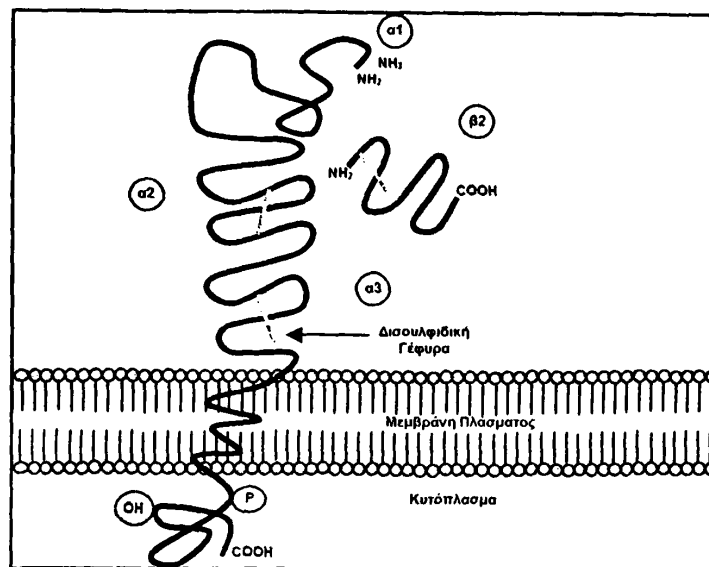


Σχήμα 1: Η δομή του συμπλέγματος του T κυτταρικού υποδοχέα (TCR)

#### 1.2.4 Μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας

Τα μόρια των τάξεων I και II του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) είναι γλυκοπρωτεΐνες κυτταρικής επιφανείας με μεγάλες ομοιότητες στη γενική τους δομή και λειτουργία, αλλά με σαφώς διαφορετικές δομές υπομονάδων. Οι δομές αμφοτέρων των γλυκοπρωτεϊνών MHC τάξεως I και II έχουν καθορισθεί μέσω κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X<sup>4</sup>.

Η βασική λειτουργία των μορίων αυτών είναι η μεταφορά πεπτιδίων στην επιφάνεια του κυττάρου από διαφορετικά ενδοκυττάρια διαμερίσματα, με σκοπό την παρουσίαση αυτών στα T κύτταρα. Τα μόρια των MHC τάξεως I μεταφέρουν πεπτίδια από το κυτταρόπλασμα στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου το σύμπλεγμα πεπτιδίου MHC I αναγνωρίζεται από τα CD8 T κύτταρα. Τα μόρια των MHC τάξεως II μεταφέρουν πεπτίδια από το κυστικό σύστημα στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου αναγνωρίζονται από τα CD4 T κύτταρα<sup>5</sup>. Επειδή η δημιουργία πεπτιδίων προϋποθέτει τροποποιήσεις της φυσικής πρωτεΐνης, αποκαλείται συνήθως επεξεργασία αντιγόνου, ενώ η έκθεση του πεπτιδίου στην επιφάνεια του κυττάρου από το μόριο MHC καλείται παρουσίαση αντιγόνου<sup>6</sup>.

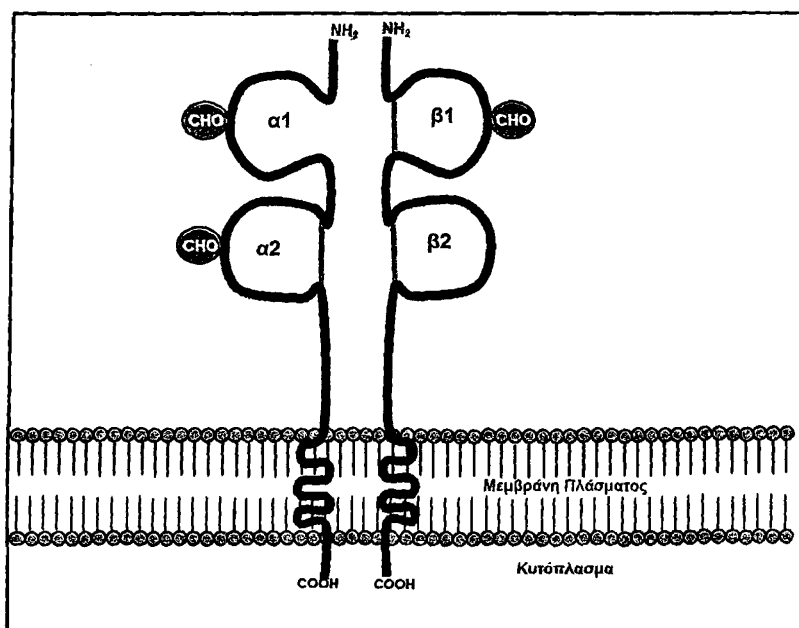


**Σχήμα 2: Η δομή του μορίου μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας I**

Τα μόρια MHC τάξεως I περιλαμβάνουν δύο αλυσίδες πολυπεπτιδίων, την α ή βαριά αλυσίδα (43 kDa) και μια μικρότερη μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη αλυσίδα την β2-μικροσφαιρίνη (12 kDa) (Σχήμα 2). Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από τρεις εξωκυττάρια περιοχές πρωτεΐνης, που προσδιορίζονται ως α1 (N-τελικό άκρο), α2 και α3, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική ουρά. Μόνο η αλυσίδα α3 των μορίων MHC τάξεως I συνδέεται με τη μεμβράνη. Η περιοχή α3 και η β2-μικροσφαιρίνη έχουν πτυχωτή δομή που έχει μεγάλη ομοιότητα με εκείνη της ανοσοσφαιρίνης. Το πιο αξιοθαύμαστο χαρακτηριστικό των μορίων MHC είναι η δομή των περιοχών α1 και α2, οι οποίες ενώνονται για να δημιουργήσουν μία σχισμή στην επιφάνεια του μορίου που είναι το σημείο συνδέσεως των πεπτιδίων. Τα πεπτίδια που δεσμεύονται σε μόρια MHC τάξεως I έχουν συνήθως μήκος οκτώ έως δέκα αμινοξέα.

Τα μόρια MHC τάξεως II περιλαμβάνουν ένα μη ομοιοπολικό σύμπλεγμα δύο αλυσίδων, των α (35 kDa) και β (28 kDa), οι οποίες συνδέονται και οι δύο με τη μεμβράνη (Σχήμα 3). Τα εξωκυττάρια τμήματα των α και β αλυσίδων αποτελούνται από δύο περιοχές, α1, α2 και β1, β2. Η σχισμή συνδέσεως πεπτιδίου της τάξης II των MHC μορίων σχηματίζεται από τις περιοχές α1 και β1, περιοχές δηλαδή που προέρχονται από διαφορετικές αλυσίδες, και κατά συνέπεια δεν ενώνονται με ομοιοπολικό δεσμό. Η κρυσταλλική δομή του μορίου MHC τάξεως II δείχνει ότι αυτό έχει πτυχωτή δομή πολύ συναφή με εκείνη του μορίου MHC τάξεως I. Οι κυριότερες διαφορές στις πτυχωτές δομές των δύο μορίων έγκειται στα άκρα της σχισμής συνδέσεως των πεπτιδίων, τα οποία είναι πιο ανοιχτά στα μόρια

MHC τάξεως II<sup>7</sup>. Η κύρια συνέπεια αυτών των διαφορών είναι ότι τα άκρα ενός πεπτιδίου δεσμευμένου σε μόριο MHC τάξεως I είναι ουσιαστικώς βυθισμένα εντός του μορίου, ενώ τα άκρα των πεπτιδίων των δεσμευμένων σε μόρια MHC τάξεως II προεξέχουν της σχισμής. Τα πεπτίδια που συνδέονται με μόρια MHC τάξεως II έχουν μήκος τουλάχιστον από 13 έως 25 αμινοξέα.



*Σχήμα 3: Η δομή του μορίου μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας II*

### 1.3 Επίτοποι

Η επαγωγή της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης από τα αντιγόνα προϋποθέτει την ειδική αναγνώρισή τους από τα T ή τα B κύτταρα. Τα μόρια, όμως, των περισσότερων αντιγόνων είναι μεγάλα και πολύπλοκα, με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζονται ολόκληρα από τους ειδικούς για τα αντιγόνα μεμβρανικούς υποδοχείς των λεμφοκυττάρων. Αντίθετα οι τελευταίοι αναγνωρίζουν μόνο μια μικρή περιοχή του αντιγονικού μορίου, η οποία ονομάζεται αντιγονικός καθοριστής ή επίτοπος. Δηλαδή, ο όρος επίτοπος εκφράζει τις ανοσοδραστικές περιοχές του μορίου του αντιγόνου που στην πραγματικότητα συνδέονται με τα διαλυτά αντισώματα, τις επιφανειακές ανοσοσφαιρίνες των B κυττάρων (υποδοχείς των B κυττάρων για το αντιγόνο) ή τους υποδοχείς των T κυττάρων. Δυνητικά, κάθε περιοχή της επιφάνειας ενός μακρομορίου μπορεί να λειτουργήσει ως επίτοπος και, κατά συνέπεια, κάθε μακρομόριο περιέχει μεγάλο αριθμό επιτόπων.

## 1.4 Ανοσολογική απόκριση

Σε μια ειδική ανοσολογική απόκριση, το αντιγόνο αναγνωρίζεται από δύο διαφορετικά σύνολα μεταβλητών μορίων υποδοχέων: τις ανοσοσφαιρίνες που λειτουργούν ως αντιγονικοί υποδοχείς στα Β κύτταρα, και τους ειδικούς για αντιγόνα υποδοχείς των Τ κυττάρων. Οι ανοσοσφαιρίνες εκκρίνονται ως αντισώματα από ενεργοποιημένα Β κύτταρα, και δεσμεύουν τα παθογόνα ή τα τοξικά προϊόντα τους στους εξωκυττάριους χώρους του σώματος. Η δέσμευση από το αντίσωμα εξουδετερώνει τους ιούς, και σημαδεύει τα παθογόνα που πρέπει να οδηγηθούν προς καταστροφή από τα φαγοκύτταρα. Εν αντιθέσει, τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν μόνο τα αντιγόνα που δημιουργήθηκαν εντός των κυττάρων του σώματος και παρουσιάζονται επί των κυτταρικών επιφανειών μέσω των μορίων MHC. Αυτά τα αντιγόνα είναι πιθανόν να προέρχονται από παθογόνα, όπως ιούς και ενδοκυττάρια βακτηρίδια, τα οποία πολλαπλασιάζονται εντός των κυττάρων, είτε από παθογόνα ή τα προϊόντα τους που τα κύτταρα εσωτερικεύουν με ενδοκυττάρωση από το εξωκυττάριο υγρό.

### 1.4.1 Επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνου στα CD8 και CD4 T κύτταρα

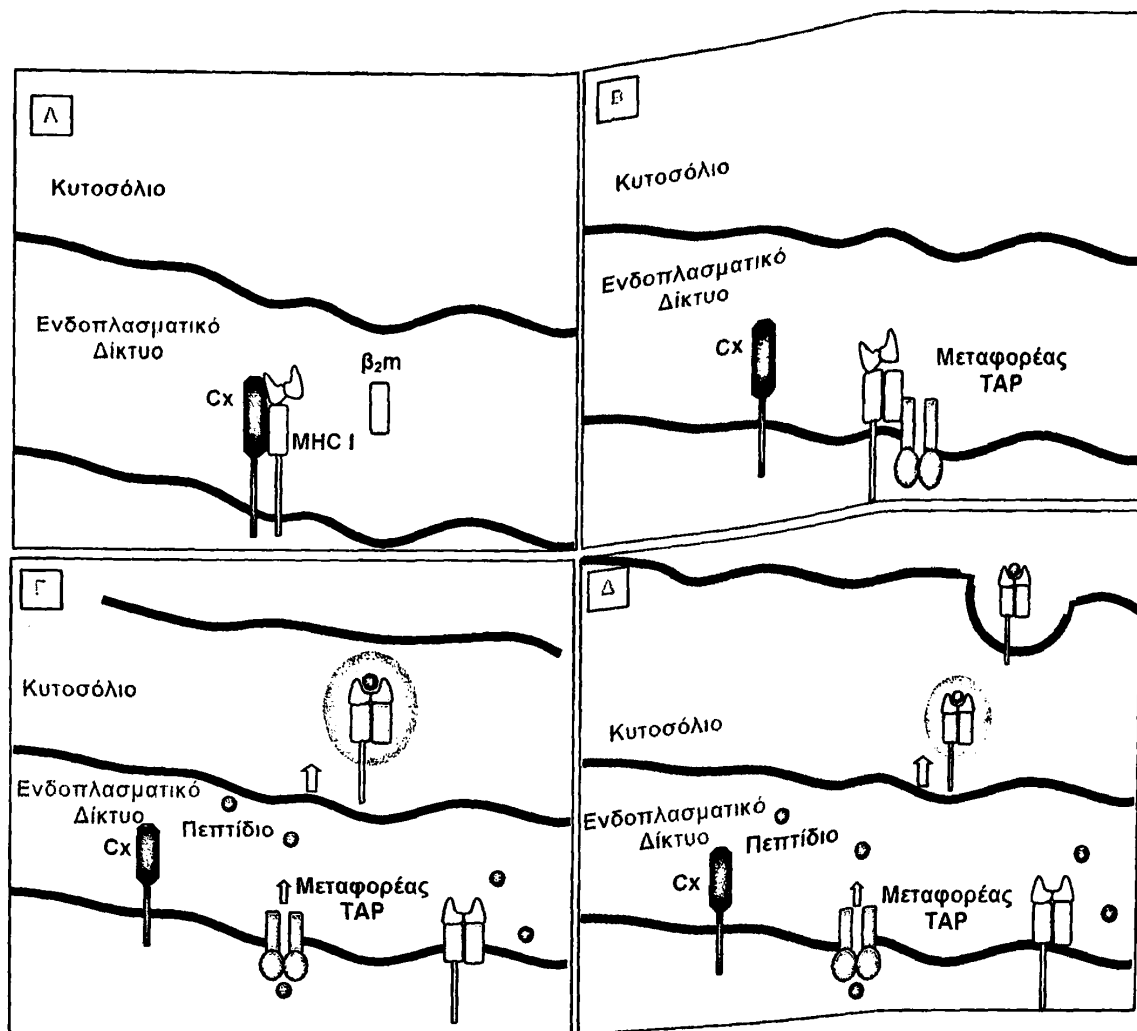
Η τάξη του μορίου MHC, με το οποίο συνδέεται το επεξεργασμένο από το APC αντιγόνο και παρουσιάζεται στη μεμβράνη του, καθορίζει τον υποπληθυσμό των Τ κυττάρων που θα κινητοποιηθούν για την καταστροφή του αντιγόνου<sup>8</sup>. Τα αντιγονικά τμήματα που συνδέονται με μόρια MHC τάξεως I για παρουσίαση στα CD8 T κύτταρα προέρχονται από ιούς ή από ορισμένα βακτήρια που πολλαπλασιάζονται στο κυτοσόλιο<sup>9,10</sup>. Η μοναδική προϋπόθεση, την οποία πρέπει να πληρεί ένα πρωτεϊνικό αντιγόνο, για να ακολουθήσει την οδό επεξεργασίας που θα το οδηγήσει στη σύνδεση με το μόριο MHC τάξης I, είναι η παρουσία του στο κυτοσόλιο. Οι ιοί καταλαμβάνουν τους βιοσυνθετικούς μηχανισμούς του κυττάρου προκειμένου να δημιουργήσουν τις δικές τους πρωτεΐνες στο κυτοσόλιο, όπου λαμβάνει συνεχώς χώρα πρωτεϊνική αποικοδόμηση και εκ νέου σύνθεση πρωτεϊνών. Τον κυριότερο ρόλο στην αποικοδόμηση των κυτοσολιακών πρωτεϊνών διαδραματίζει ένα μεγάλο σύμπλεγμα πολυκαταλυτικών πρωτεασών αποτελούμενο από 20 υπομονάδες, το πρωτεόσωμα. Τα πεπτιδικά τμήματα που δημιουργούνται από το πρωτεόσωμα μεταφέρονται μέσα στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου, με τη βοήθεια ετεροδιμερών πρωτεϊνών, που ονομάζονται μεταφορείς συνδεδεμένοι με την επεξεργασία αντιγόνου 1 και 2 (Transporters associated with



Antigen Processing 1 and 2, TAP 1 and TAP 2)<sup>11</sup>. Έχει βρεθεί πως μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε γονίδιο TAP εμποδίζουν την παρουσίαση αντιγόνου μέσω μορίων MHC I.

Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οι αλυσίδες  $\alpha$  των νεο-συντεθέντων μορίων MHC τάξεως I δεσμεύουν ταχύτατα μια πρωτεΐνη συνδεδεμένη με μεμβράνη 88 kDa γνωστή ως καλνεξίνη (calnexin), η οποία περιορίζει το μόριο MHC τάξεως I σε κατάσταση μερικής πτύχωσης εντός του ενδοπλασματικού δικτύου. Η καλνεξίνη συνδέεται επίσης με μερικώς πτυχωμένους υποδοχείς T κυττάρων, ανοσοσφαιρίνες και μόρια MHC τάξεως II, συνεπώς έχει τον κεντρικό ρόλο στη συγκέντρωση πολλών μορίων σημαντικών στην ανοσολογία. Όταν η  $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη συνδέεται με μια αλυσίδα  $\alpha$ , το σύμπλεγμα  $\alpha:\beta 2$ -μικροσφαιρίνη αποσυνδέεται από την καλνεξίνη και συνδέεται με την υπομονάδα TAP-1 του μεταφορέα αναμένοντας τη μεταφορά ενός κατάλληλου πεπτιδίου από το κυτταρόπλασμα. Τέλος, η σύνδεση ενός πεπτιδίου στο μερικώς πτυχωμένο μόριο MHC τάξεως I το απελευθερώνει από τον TAP και επιτρέπει στο ολοκληρωτικά πτυχωμένο πλέον μόριο MHC τάξεως I να εγκαταλείψει το ενδοπλασματικό δίκτυο και να μεταφερθεί στην επιφάνεια του κυττάρου<sup>12,13</sup>. Τα περισσότερα πεπτίδια που μεταφέρονται μέσω του μεταφορέα TAP δεν συνδέονται με τα μόρια MHC αυτού του κυττάρου και εκκενώνουν το ενδοπλασματικό δίκτυο ταχέως. Υπάρχουν στοιχεία ότι τα πεπτίδια αυτά μεταφέρονται πίσω στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός μηχανισμού μεταφοράς εξαρτώμενου από ATP και ξεχωριστού από τον μεταφορέα TAP (Σχήμα 4).

Δεν είναι ακόμα σαφές εάν ο μεταφορέας TAP διαδραματίζει άμεσο ρόλο στην επιφόρτιση των μορίων τάξεως I με πεπτίδια ή εάν η σύνδεση με τον μεταφορέα TAP απλώς επιτρέπει στο μόριο τάξεως I να αντιλαμβάνεται την υψηλή τοπική συγκέντρωση πεπτιδίων πριν τα πεπτίδια διαχυθούν από την κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου και μεταφερθούν πίσω στο κυτταρόπλασμα. Μια συνέπεια της σύνδεσης των μορίων MHC τάξεως I με τον μεταφορέα TAP είναι ότι επιτρέπει αποτελεσματικά στα μόρια MHC τάξεως I να ανιχνεύσουν κάθε πεπτίδιο που μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και να επιλέξουν εκείνα που συνδέονται για μεταφορά στην επιφάνεια του κυττάρου.



Σχήμα 4: Επεξεργασία αντιγόνων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και παρουσίασή τους μέσω των MHC I στα CD8 T κύτταρα

Ενώ οι ιοί και ορισμένα βακτηρίδια αναδιπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα, πολλές τάξεις παθογόνων αναδιπλασιάζονται σε ενδοκυττάρια κυστίδια στα μακροφάγα. Καθώς διαμένουν σε κυστίδια κλεισμένα σε μεμβράνες, οι πρωτεΐνες αυτών των παθογόνων δεν είναι δεκτικές σε πρωτεώματα. Αντιθέτως, οι πρωτεΐνες σε αυτά τα σημεία διασπώνται από κυστικές πρωτεάσες σε πεπτίδια που συνδέονται σε μόρια MHC τάξεως II, τα οποία τα μεταφέρουν στην επιφάνεια του κυττάρου. Εκεί αναγνωρίζονται μέσω των CD4 T κυττάρων. Τα CD4 T κύτταρα αναγνωρίζουν επίσης τμήματα πεπτιδίων προερχόμενα από εξωκυττάρια παθογόνα και πρωτεΐνες που εσωτερικεύονται εντός ομοίων ενδοκυττάρων κυστιδίων<sup>14</sup>.

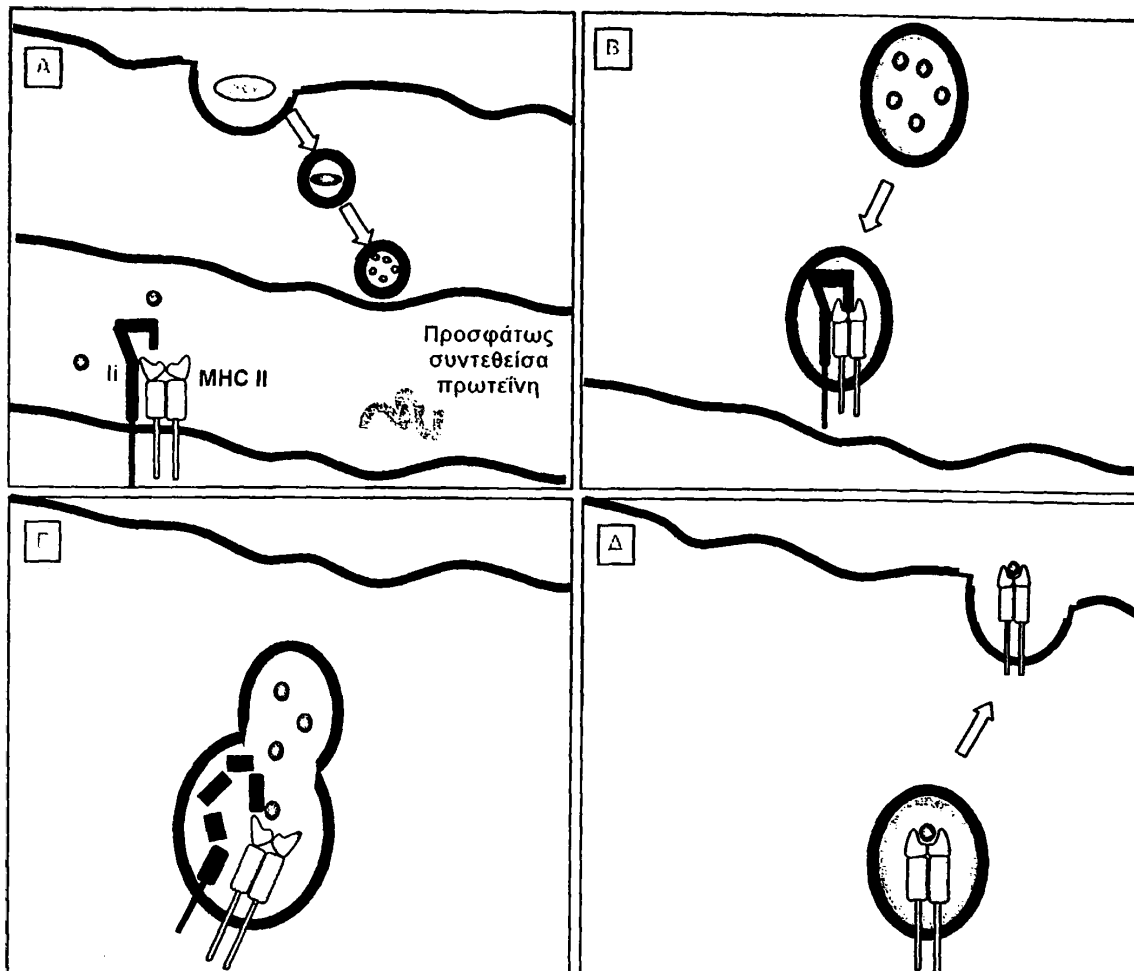
Όπως έχει αναφερθεί, η λειτουργία των μορίων MHC τάξεως II είναι να παρουσιάσουν πεπτίδια δημιουργημένα στα ενδοκυττάρια κυστίδια των B κυττάρων, των μακροφάγων και άλλων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στα CD4 T κύτταρα. Εν τούτοις, η βιοσυνθετική οδός των μορίων MHC τάξεως II, ξεκινά με τη μετατόπιση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο,



και ως εκ τούτου πρέπει να εμποδιστεί η πρόωρη σύνδεσή τους με πεπτίδια που έχουν μεταφερθεί στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω του μεταφορέα TAP. Επίσης, θα πρέπει να αποφευχθεί η σύνδεση με πολυπεπτίδια που παράγονται από το ίδιο το κύτταρο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σύνδεση νεο-συντεθειμένων μορίων MHC τάξεως II με μία εξειδικευμένη πρωτεΐνη γνωστή ως συνδεμένη με MHC τάξεως II μη-μεταβλητή αλυσίδα (invariant chain-Ii). Η μη-μεταβλητή αλυσίδα σχηματίζει τριμερή, με κάθε υπομονάδα που συνδέεται μη-ομοιοπολικά με ένα τάξεως II ετεροδιμερές  $\alpha:\beta$ . Ενώ αυτό το σύμπλεγμα σχηματίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα συστατικά του μέρη συνδέονται με καλνεξίνη. Μόνο αφού ολοκληρωθεί ο σχηματισμός ώστε να παραχθεί ένα σύμπλεγμα εννέα αλυσίδων απελευθερώνεται από την καλνεξίνη για επακόλουθη μεταφορά από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Σ' αυτό το σύμπλεγμα εννέα αλυσίδων, τα μόρια MHC τάξεως II δεν είναι δυνατόν να συνδεθούν με πεπτίδια, ώστε τα πεπτίδια που υπάρχουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο δεν παρουσιάζονται συνήθως από μόρια MHC τάξεως II.

Η ενδοκυττάρια θέση στην οποία διασπάται η μη-μεταβλητή αλυσίδα και τα μόρια MHC τάξεως II συναντούν τα πεπτίδια δεν είναι σαφώς καθορισμένα. Θεωρείται ότι τα περισσότερα νεο-συντεθειμένα μόρια MHC τάξεως II μεταβαίνουν στην επιφάνεια του κυττάρου εντός κυστιδίων τα οποία, σε κάποιο σημείο αφότου εγκαταλείψουν το δίκτυο Golgi, συγχωνεύονται με τα εισερχόμενα ενδοσώματα. Εν τούτοις υπάρχουν επίσης δεδομένα ότι ορισμένα συμπλέγματα MHC τάξεως II: Ii μεταφέρονται αρχικά στην επιφάνεια του κυττάρου και έπειτα εσωτερικεύονται εκ νέου στα ενδοσώματα. Και στις δύο περιπτώσεις όμως, τα συμπλέγματα MHC τάξεως II: Ii εισέρχονται στην ενδοσωματική οδό και εκτίθενται σε όξινο, πρωτεολυτικό περιβάλλον στο οποίο διασπάται η μη-μεταβλητή αλυσίδα αλλά και τα παθογόνα και οι πρωτεΐνες τους διασπώνται σε πεπτίδια διαθέσιμα για σύνδεση με το μόριο MHC τάξεως II (Σχήμα 5).





**Σχήμα 5: Επεξεργασία αντιγόνων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και παρουσίασή τους μέσω των MHC II στα CD4 T κύτταρα**

#### 1.4.2 Αποτελεσματική παρουσίαση αντιγόνου στην επιφάνεια του κυττάρου

Η ικανότητα των μορίων MHC να δεσμεύουν ευρύ φάσμα διαφορετικών πεπτιδίων είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό ενδοκυττάρων παθογόνων από τα T κύτταρα. Είναι σημαντικό το σύμπλεγμα πεπτιδίου: MHC μορίου να είναι σταθερό στην επιφάνεια του κυττάρου. Αν το σύμπλεγμα διαλυόταν με μεγάλη ευκολία, το παθογόνο στο προσβεβλημένο κύτταρο θα μπορούσε να ξεφύγει και να μην εντοπισθεί. Επίσης, τα μόρια MHC των απρόσβλητων κυττάρων θα μπορούσαν να συγκεντρώσουν πεπτίδια απελευθερωμένα από διαλυμένα μόρια MHC σε προσβεβλημένα κύτταρα. Κάτι τέτοιο θα έστελνε, εσφαλμένα, σήμα στα κυτταροτοξικά T κύτταρα ότι ένα υγιές κύτταρο έχει προσβληθεί, με αποτέλεσμα την ανεπιθύμητη καταστροφή του. Η σταθερή δέσμευση πεπτιδίου από μόρια MHC καθιστά και τα δύο ανεπιθύμητα αυτά αποτελέσματα απίθανα.

Στο σύμπλεγμα πεπτιδίου: MHC μορίου, το πεπτίδιο είναι στην πραγματικότητα κλεισμένο εντός της τρισδιάστατης δομής του μορίου MHC. Επιπλέον, τα συμπλέγματα πεπτιδίου: MHC μορίου που εκφράζονται σε ζώντα κύτταρα χάνονται με τον ίδιο ρυθμό που χάνεται και το ίδιο μόριο MHC, δείχνοντας ότι η δέσμευση πεπτιδίου είναι ουσιαστικώς αμετάκλητη. Αυτή η σταθερότητα δεσμεύσεως επιτρέπει ακόμη και σε σπάνια πεπτίδια να μεταφερθούν σωστά στην επιφάνεια του κυττάρου από μόρια MHC, καθώς επίσης και την μακροχρόνια έκθεση αυτών των συμπλεγμάτων στην επιφάνεια του προσβεβλημένου κυττάρου, πληρώντας κατ' αυτόν τον τρόπο την πρώτη των προϋποθέσεων για αποτελεσματική παρουσίαση αντιγόνου.

Το δεύτερο κριτήριο για αποτελεσματική παρουσίαση αντιγόνου είναι σε περίπτωση διαχωρισμού ενός πεπτιδίου από ένα μόριο MHC να μην μπορούν τα νέα πεπτίδια να δεσμευθούν στον κενό πλέον θύλακα δέσμευσης πεπτιδίου. Η αφαίρεση ενός πεπτιδίου από ένα μόριο MHC τάξεως I αποδιατάσσει το μόριο. Όταν το πεπτίδιο διαχωριστεί στην επιφάνεια του κυττάρου, το μόριο MHC τάξεως I αλλάζει διαμόρφωση, το τμήμα β2-μικροσφαιρίνης διαλύεται, και η αλυσίδα α εσωτερικεύεται και διασπάται ταχέως. Συνεπώς, τα κενά μόρια MHC τάξεως I σύντομα χάνονται από την επιφάνεια του κυττάρου.

Σε ουδέτερο pH, τα κενά μόρια MHC τάξεως II είναι σταθερότερα από τα κενά μόρια MHC τάξεως I, αλλά μετακινούνται και αυτά (MHC II) από την επιφάνεια του κυττάρου. Η απώλεια πεπτιδίων από τα μόρια MHC τάξεως II είναι πιθανότερη όταν τα μόρια τάξεως II ανακυκλώνονται μέσα από τα όξινα ενδοκυττάρια κυστιδία. Στο όξινο pH αυτών των ενδοκυτταρικών κυστιδίων, τα μόρια MHC τάξεως II που δε συνδέονται με πεπτίδια συγκεντρώνονται και διασπώνται ταχέως, ώστε η απώλεια πεπτιδίων οδηγεί εκ νέου στην ταχεία απώλεια του μορίου MHC. Αυτό το χαρακτηριστικό δέσμευσης πεπτιδίων είναι σημαντικό στη λειτουργία των μορίων MHC ως προς την παρουσίαση αντιγόνου, αφού βοηθά στην παρεμπόδιση των μορίων MHC της επιφάνειας ενός κυττάρου να αποκτήσουν πεπτίδια από το περιβάλλον εξωκυττάριο υγρό. Αυτό διασφαλίζει ότι τα T κύτταρα δρουν επιλεκτικά σε προσβεβλημένα κύτταρα που εκθέτουν επαρκώς ξένα πεπτίδια δεσμευμένα από μόρια MHC στις επιφάνειές τους, ενώ δεν επηρεάζουν τα περιβάλλοντα υγιή κύτταρα.

### 1.4.3 Ενεργοποίηση CD4 T κυττάρων

Η αλληλεπίδραση πεπτιδίου: MHC II: TCR παρά το γεγονός ότι είναι απαραίτητη δεν επαρκεί για να γίνει η ενεργοποίηση των T κυττάρων. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η αλληλεπίδραση πολλών άλλων μορίων επιφανείας που βρίσκονται στα κύτταρα,<sup>15-18</sup> τα οποία αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

Το CD28 είναι ένα διαμεμβρανικό μόριο που σε μεγάλο ποσοστό εκφράζεται στα ανθρώπινα περιφερικά T κύτταρα. Αλληλεπιδρά με τα μόρια B7.1 και B7.2 που βρίσκονται αποκλειστικά στην επιφάνεια κυττάρων ικανών να διεγείρουν την ωρίμανση των T κυττάρων. Η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ των CD28 και των B7 μορίων έχει ως αποτέλεσμα τη συνδιέγερση στην ωρίμανση των T κυττάρων.

Το CTLA-4 είναι ένα μόριο επιφανείας που εκφράζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T κυττάρων και αλληλεπιδρά επίσης με τα μόρια B7.1 και B7.2. Το CTLA-4 δεσμεύει τα B7 μόρια με δεσμό ισχυρότερης συγγένειας από ό,τι το CD28. Το CTLA-4 φαίνεται να παίζει αρνητικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T κυττάρων που το εκφράζουν. Συγκεκριμένα, ο ενεργοποιημένος απόγονος ενός αθώου T κυττάρου γίνεται λιγότερο ευαίσθητος στη διέγερση από το αντιγόνο από ότι τα ίδια τα αθώα T κύτταρα. Αυτό μπορεί να βοηθήσει να περιορισθεί ο πρώιμος πολλαπλασιασμός των T κυττάρων σαν απάντηση στο αντιγόνο και στα μόρια B7 στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων.

Τα μόρια CD4 και CD8 βρίσκονται στην επιφάνεια των T κυττάρων και όπως έχει ήδη αναφερθεί λειτουργούν ως δείκτες διαφορετικών λειτουργικών υποομάδων των T κυττάρων. Τα μόρια CD4 συνδέονται με μη μεταβλητά μέρη του μορίου MHC τάξεως II και τα μόρια CD8 συνδέονται με μη μεταβλητά μέρη του μορίου MHC τάξεως I. Επίσης, κατά την αναγνώριση αντιγόνου, τα μόρια CD4 και CD8 συνδέονται στην επιφάνεια του T κυττάρου με συστατικά του υποδοχέα του T κυττάρου. Η σύνδεση αυτή των μορίων CD4 και CD8 με τα μόρια MHC τάξεως II και I αντιστοίχως, καθώς και με συστατικά του T κυτταρικού υποδοχέα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη στενή σύνδεση του συμπλέγματος πεπτιδίου:MHC μορίου με τον T κυτταρικό υποδοχέα.

Τα μόρια CD2 βρίσκονται στην επιφάνεια κυρίως των T κυττάρων και είναι ένα από τα πρώτα μόρια επιφανείας που εκφράζονται στα T κύτταρα. Συνδέονται με μόρια που ονομάζονται LFA-3 (Leukocyte Function-associated Antigen-3) και βρίσκονται στην



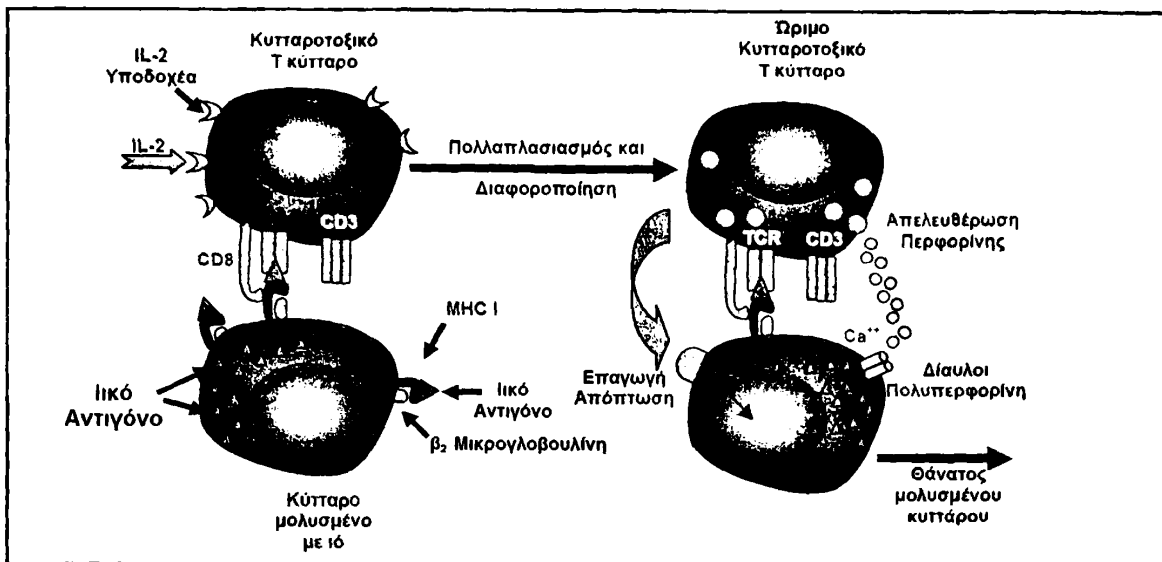
επιφάνεια πολλών κυττάρων. Η αλληλεπίδραση των μορίων CD2 με τα μόρια LFA-3 ενισχύει τη σύνδεση των T κυττάρων με άλλα κύτταρα.

Ένα εξίσου σημαντικό προσκολλητικό μόριο για τη λευκοκυτταρική ενεργοποίηση που βρίσκεται στην επιφάνεια των T κυττάρων είναι το μόριο LFA-1<sup>19</sup> (Leukocyte Function-associated Antigen-1). Το μόριο LFA-1 είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο αλυσίδες και δεσμεύει τρία παρόμοια διακυτταρικά προσκολλητικά μόρια, τα ICAM-1, ICAM-2 και ICAM-3 (Inter Cellular Adhesion Molecules). Τα ICAM-1 και ICAM-2 εκφράζονται από το ενδοθήλιο καθώς επίσης και από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η δέσμευση σ' αυτά τα μόρια καθιστά ικανά τα λεμφοκύτταρα να μεταναστεύσουν μέσω των αγγειακών τοιχωμάτων. Το ICAM-3 εκφράζεται μόνο στα λευκοκύτταρα και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση ανάμεσα στα T κύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Η ενεργοποίηση των T κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση κυτταροκινών. Κάθε κυτταροκίνη έχει έναν εξειδικευμένο υποδοχέα, που εκφράζεται στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων. Έτσι, η έκκριση κυτταροκινών μετά από την ενεργοποίηση των CD4 T κυττάρων, επιδρά στη λειτουργία διάφορων κυττάρων. Μερικές από τις κυτταροκίνες που παράγονται, όπως η IL-2 και η IL-4 παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των T κυττάρων, καθώς επίσης και των B κυττάρων, των μακροφάγων και άλλων κυττάρων.

#### 1.4.4 Ενεργοποίηση CD8 T κυττάρων

Τα ακριβή βήματα που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των CD8 T κυττάρων δεν είναι πλήρως καθορισμένα<sup>20</sup>. Παρόλα αυτά, μια βασική προϋπόθεση είναι ότι μόνο αντιγόνα που βρίσκονται στο κυτοσόλιο είναι δυνατόν να προκαλέσουν CD8 T κυτταρική απόκριση. Επίσης, είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση της IL-2 με τους υποδοχείς IL-2 που εκφράζονται στην επιφάνεια των CD8 T κυττάρων, η οποία οδηγεί στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων<sup>21</sup> (Σχήμα 6). Δεν είναι σαφές εάν η απαιτούμενη IL-2 για την ενεργοποίηση των CD8 T κυττάρων προέρχεται από τα CD8 T κύτταρα ή από τα CD4 T κύτταρα.



**Σχήμα 6: Ενεργοποίηση και κυτταροτοξική δράση των CD8 T κυττάρων: επαγωγή απόπτωσης**

Η σύνδεση των CD8 T κυττάρων με κύτταρα στόχους μέσω των T κυτταρικών υποδοχέων τους και μέσω των μορίων προσκόλλησης έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων. Η καταστροφή αυτή είναι δυνατόν να γίνει μέσω δύο μηχανισμών. Ο πρώτος μηχανισμός και ίσως ο πιο βασικός, περιλαμβάνει την απελευθέρωση των εκκριτικών κοκκίων κατά την αναγνώριση του αντιγόνου στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου. Αυτά τα κοκκία περιέχουν κυτταροτοξικές ουσίες, οι οποίες απελευθερώνονται σχεδόν αμέσως μετά τη σύνδεση του υποδοχέα με το σύμπλεγμα πεπτιδίου:MHC I μορίου. Επίσης, τα CD8 T κύτταρα απελευθερώνουν την IFN- $\gamma$  και τον TNF- $\alpha$ . Η IFN- $\gamma$  εμποδίζει την ιική αντιγραφή και προκαλεί αυξημένη έκφραση των μορίων MHC τάξεως I και του πεπτιδικού μεταφορέα των μορίων στα μολυσμένα κύτταρα, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα τα μολυσμένα κύτταρα να αναγνωρισθούν ως κύτταρα στόχοι για κυτταροτοξική επίθεση. Η IFN- $\gamma$  επίσης ενεργοποιεί τα μακροφάγα, οδηγώντας τα στις εστίες μόλυνσεως, και ως δραστικά κύτταρα και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Ο TNF- $\alpha$  μπορεί να συνεργήσει με την IFN- $\gamma$  για να σκοτώσει μερικά κύτταρα στόχους με έναν, μέσω κυτταροκίνης, επαγόμενο μηχανισμό όπως συμβαίνει και στην ενεργοποίηση των μακροφάγων.

Ο δεύτερος μηχανισμός για την καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων περιλαμβάνει την επαγωγή της απόπτωσης. Οι πρώτες αλλαγές που φαίνονται στον αποπτωτικό θάνατο είναι ο ~~α~~εμαχισμός του DNA, η καταστροφή των πυρήνων του κυττάρου και αλλαγές στην

μορφολογία του κυττάρου. Το κύτταρο τότε αυτοκαταστρέφεται, συρρικνώνοντας και τεμαχίζοντας τον εαυτό του μέχρι να καταστραφεί πλήρως.

#### 1.4.5 Συνεργασία T και B κυττάρων στην παραγωγή αντισωμάτων

Μια βασική λειτουργία των CD4 T κυττάρων είναι η συνεργασία τους με τα B κύτταρα για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι θυμοεξαρτώμενων αντιγόνων. Για το λόγο αυτό τα CD4 T κύτταρα που συμμετέχουν στην παραγωγή αντισωμάτων ονομάζονται βοηθητικά T κύτταρα. Η παραγωγή αντισωμάτων έναντι θυμοεξαρτώμενων αντιγόνων απαιτεί την ενεργοποίηση των T και B κυττάρων και την αλληλεπίδραση μεταξύ τους<sup>22</sup>.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ενεργοποίηση των CD4 T κυττάρων απαιτεί την αλληλεπίδραση του T κυτταρικού υποδοχέα των CD4 T κυττάρων με το σύμπλεγμα πεπτιδίου: MHC II μορίου, καθώς επίσης και την αλληλεπίδραση των μορίων επιφανείας των κυττάρων. Τα ενεργοποιημένα CD4 T κύτταρα πολλαπλασιάζονται και εκκρίνουν κυτταροκίνες, πολλές από τις οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ενεργοποίηση των B κυττάρων.

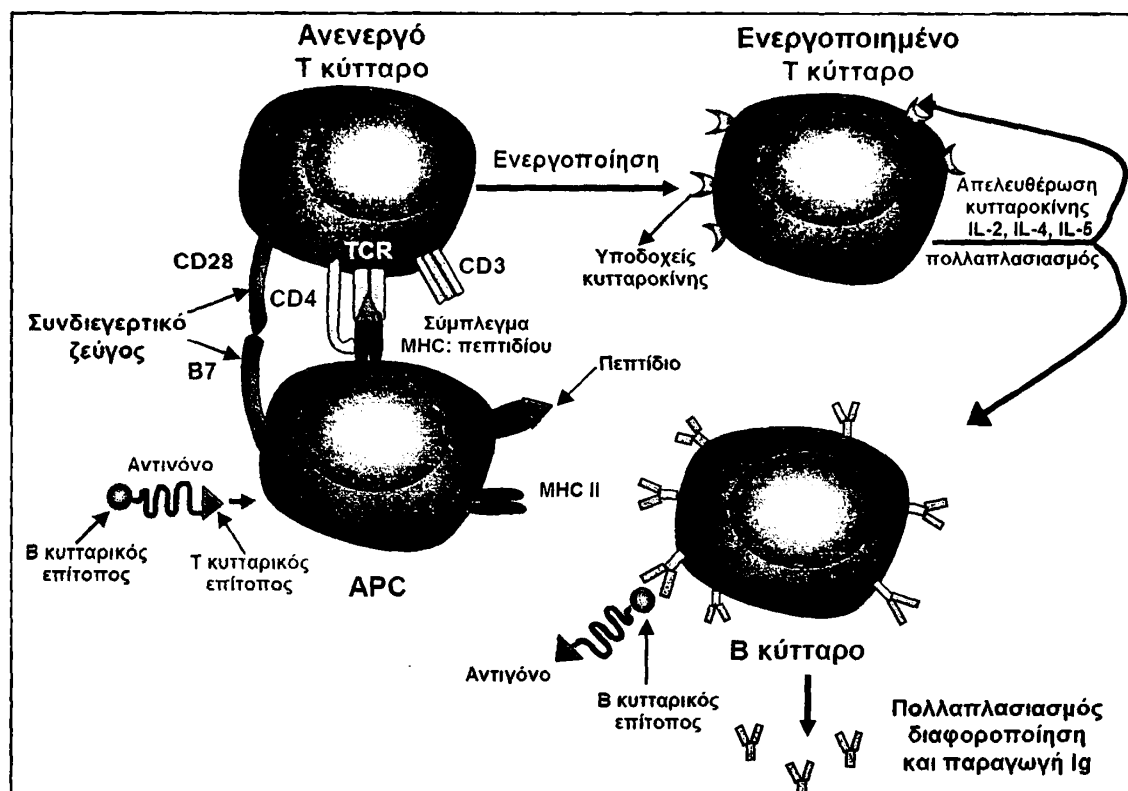
Για τη συνεργασία T και B κυττάρων, τα T και B κύτταρα είναι απαραίτητο να αναγνωρίζουν επιτόπους από το ίδιο αντιγόνο. Οι επίτοποι αυτοί είναι δυνατόν να είναι διαφορετικοί, αλλά πρέπει να προέρχονται από το ίδιο αντιγόνο. Τα B κύτταρα, ύστερα από την απευθείας σύνδεση του αντιγόνου και την επίδραση των κυτταροκινών που εκκρίνονται από τα T κύτταρα, ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται ώστε να είναι ικανά να παράγουν αντισώματα (Σχήμα 7).

Στην πρωτογενή απόκριση τα T κύτταρα ενεργοποιούνται από αντιγόνα που επεξεργάζονται και παρουσιάζονται από δενδριτικά κύτταρα ή άλλα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως είναι τα μακροφάγα. Η ενεργοποίηση των T κυττάρων οδηγεί στη σύνθεση της IL-2, η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων IgM από τα B κύτταρα.

Στη δευτερογενή απόκριση, τα B και T κύτταρα έχουν ήδη εκτεθεί στα αντιγόνα και ενεργοποιηθεί, και σ' αντίθεση με την πρωτογενή απόκριση, πραγματοποιείται δραστική αλληλεπίδραση μεταξύ των B και των T κυττάρων μόνο, χωρίς τη συμμετοχή δενδριτικών κυττάρων ή μακροφάγων. Σ' αυτό το είδος απόκρισης, τα B κύτταρα δεσμεύουν το αντιγόνο σε εξειδικευμένους ανοσοσφαιρικούς υποδοχείς. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα



αντιγόνου: ανοσοσφαιρίνης εσωτερικεύεται στο κύτταρο και αποικοδομείται. Μερικά από τα πεπτίδια που προκύπτουν από την αποικοδόμηση των αντιγόνων συνδέονται στα μόρια MHC τάξεως II και επιστρέφουν στην επιφάνεια των B κυττάρων, όπου το σύμπλεγμα πεπτιδίου: MHC II μορίου παρουσιάζεται στα CD4 T κύτταρα που φέρουν τον κατάλληλο T κυτταρικό υποδοχέα. Κατά τη δευτερογενή απόκριση παράγονται IgG, IgA και IgE αντισώματα.



**Σχήμα 7: Συνεργασία T και B κυττάρων για την παραγωγή αντισωμάτων**

Η παραγωγή αντισωμάτων από τα B κύτταρα συνοδεύεται από αλληλεπιδράσεις μορίων επιφανείας των B και T κυττάρων και την έκκριση κυτταροκινών από τα T κύτταρα. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρούν τα συνδεδειγμένα μόρια B7 που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων B κυττάρων, με τα μόρια CD28 των T κυττάρων. Η έκφραση των B7 μορίων ενισχύει την ικανότητα των B κυττάρων να λειτουργούν ως αποτελεσματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στα T κύτταρα. Η αλληλεπίδραση μορίων προσκόλλησης όπως των LFA-1 με τα ICAM-1, συμβάλλει στην ενίσχυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ T και B κυττάρων. Μια εξίσου σημαντική αλληλεπίδραση είναι αυτή ανάμεσα στα μόρια CD40 των B κυττάρων και των προσδετών τους CD40L που βρίσκονται στα ενεργοποιημένα

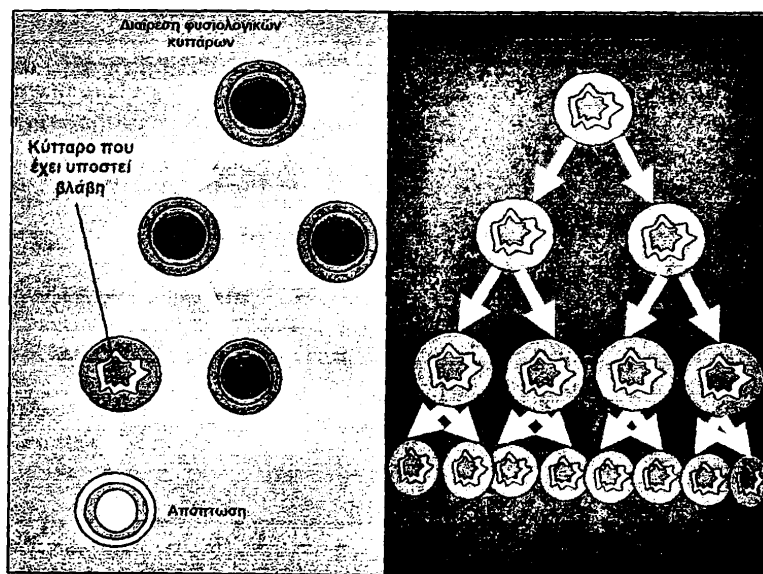


T κύτταρα<sup>23</sup>. Η αλληλεπίδραση αυτή επάγει την έκφραση των μορίων B7 που καθοδηγούν την T κυτταρική απόκριση, προάγει τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο είδος της ανοσοσφαιρίνης που θα παραχθεί. Έλλειψη της αλληλεπίδρασης CD40-CD40L έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μόνο IgM ανοσοσφαιρινών.

Το είδος των ανοσοσφαιρινών που παράγονται κατά τη δευτερογενή απόκριση εξαρτάται και από τις κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα T κύτταρα. Έτσι, εάν παράγεται IL-4, τα B κύτταρα παράγουν κυρίως IgE ανοσοσφαιρίνη, εάν παράγεται IFN- $\gamma$ , τα B κύτταρα παράγουν IgG ανοσοσφαιρίνη.

### 1.5 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μία σοβαρή ασθένεια η συχνότητα της οποίας τα τελευταία χρόνια αυξάνεται ραγδαία και οδηγεί στο θάνατο πολλούς ανθρώπους. Υπάρχουν διάφοροι τύποι καρκίνου. Τα καρκινώματα είναι καρκίνοι του δέρματος ή των οργάνων, τα σαρκώματα είναι καρκίνοι του μυϊκού ιστού ή των οστών, τα λεμφώματα είναι καρκίνοι του λεμφικού συστήματος και τέλος οι λευχαιμίες είναι καρκίνοι του μυελού των οστών.



Σχήμα 8: Κυτταρική διαίρεση φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων



Ο καρκίνος είναι ασθένεια που προκύπτει από μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό κυττάρων<sup>24</sup> (Σχήμα 8). Τα κύτταρα αυτά έχουν υποστεί κάποια γονιδιακή μετάλλαξη και πολλαπλασιάζονται συνεχώς, άλλοτε με μεγάλο ρυθμό και άλλοτε με μικρό. Επίσης, έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται σ' άλλα σημεία του σώματος όπου επιβιώνουν και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων γίνεται κυρίως μέσω του λεμφικού συστήματος και αποτελεί συνήθως την αιτία θανάτου των περισσότερων ασθενών με καρκίνο. Τέλος, τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν ελάχιστα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα του ιστού στον οποίο αναπτύσσονται.

Μόνο ένα μικρό ποσοστό καρκίνων θεωρείται ότι κληρονομείται μέσω μεταλλάξεων που μεταφέρονται από τη μία γενιά στην άλλη μέσω των κυττάρων αναπαραγωγής. Οι περισσότεροι καρκίνοι οφείλονται σε τυχαίες μεταλλάξεις κυττάρων του σώματος<sup>24</sup>. Οι μεταλλάξεις αυτές προκύπτουν είτε από ενδογενείς παράγοντες όπως είναι λάθη κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, είτε από εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η ραδιενέργεια ή τα χημικά. Οι γονιδιακές μεταλλάξεις των καρκινικών κυττάρων αναφέρονται σε γονίδια που ενισχύουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού αυτών των κυττάρων (ογκογονίδια, oncogenes), σε γονίδια που προκαλούν την παύση των λειτουργιών του κύκλου του κυττάρου (tumor suppressor genes) και σε γονίδια που είναι δυνατόν να επιδιορθώσουν οποιαδήποτε βλάβη έχει υποστεί το κύτταρο (DNA repair genes).

Η καταπολέμηση του καρκίνου γίνεται με χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Όταν όμως ο καρκίνος έχει προσβάλει ζωτικά όργανα η αφαίρεση του είναι αδύνατη και η θεραπεία του γίνεται είτε με χημειοθεραπεία, είτε με ακτινοβολία. Οι θεραπείες όμως αυτές επηρεάζουν εκτός από τα καρκινικά και τα φυσιολογικά κύτταρα και προκαλούν σοβαρές παρενέργειες στους ασθενείς. Μια νέα προσέγγιση για την καταπολέμηση του καρκίνου, δίχως σοβαρές παρενέργειες κατά την οποία καταστρέφονται μόνο τα καρκινικά κύτταρα είναι η ανοσοθεραπεία.

## 1.6 Καρκίνος και ανοσοποιητικό σύστημα

Το σκεπτικό της ανοσοθεραπείας του καρκίνου εισήχθηκε πρώτη φορά από τον William Coley πριν ένα αιώνα περίπου<sup>25</sup>. Παρόλα αυτά χρειάστηκε να περάσουν πολλά χρόνια ώστε να γίνει εφικτή η κατανόηση της αλληλεπίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος με τα καρκινικά κύτταρα. Πρόσφατες ανακαλύψεις στην κυτταρική και μοριακή ανοσολογία έφεραν στην επιφάνεια σημαντικές ενδείξεις για την ικανότητα του ανοσοποιητικού



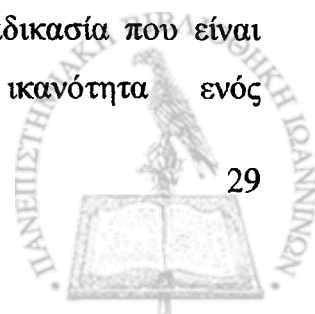
συστήματος να αναγνωρίζει τα καρκινικά κύτταρα ως ξένα και να επάγει ανοσολογική απόκριση που οδηγεί στη μείωση τους<sup>26,27</sup>.

Η ιδανική θεραπεία για την καταπολέμηση του καρκίνου θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα να καταπολεμά όγκους σε διάφορα σημεία του σώματος και να καθιστά ικανή τη διάκριση καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων. Η ανοσοθεραπεία πληρεί και τις δύο προϋποθέσεις. Το ανοσοποιητικό σύστημα όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια περιλαμβάνει κύτταρα, τα οποία όταν ενεργοποιηθούν είναι δυνατόν να προκαλέσουν την καταστροφή κυττάρων στόχων και χαρακτηρίζεται από εξαιρετική εξειδίκευση. Τόσο τα T όσο και τα B κύτταρα φέρουν υποδοχείς που επιτρέπουν στο ανοσολογικό σύστημα να αναγνωρίζει ένα μεγάλο αριθμό αντιγόνων.

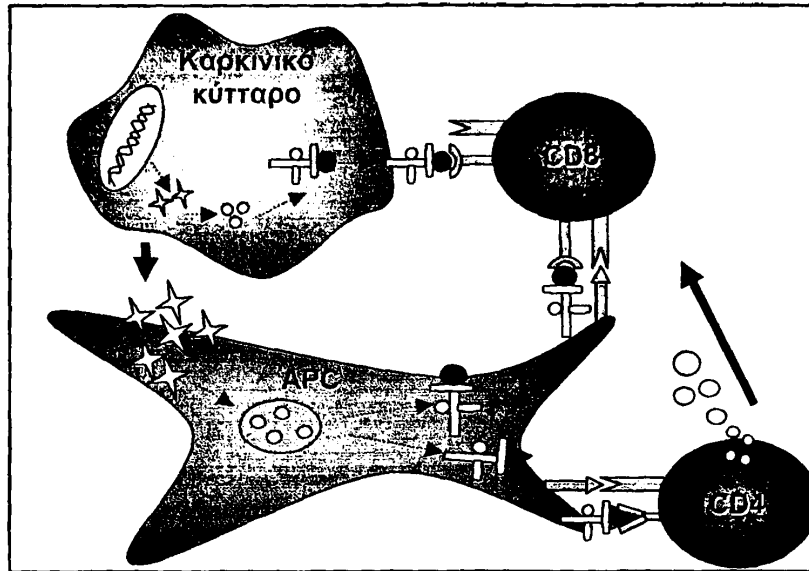
Η αντικαρκινική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος εντοπίζεται κυρίως στην κυτταρική ανοσία. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μηχανισμών ικανών να προκαλούν την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και οι περισσότεροι από αυτούς τους μηχανισμούς εξαρτώνται από τη δράση των T κυττάρων. Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα είναι δυνατόν να δράσουν απευθείας ως δραστικά κύτταρα, παρέχοντας αντικαρκινική ανοσία μέσω της λύσης των καρκινικών κυττάρων ή μέσω της απελευθέρωσης κυτταροκινών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων. Αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση είναι δυνατόν να επιτευχθεί και μέσω της επίδρασης των κυτταροκινών που παράγονται από τα T κύτταρα σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης η λειτουργία των μακροφάγων, των φυσικών φονικών κυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων κοκκιοκυττάρων ρυθμίζεται σημαντικά από τα T κύτταρα.

Είναι γνωστό πως τα CD8 T κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν λύση των καρκινικών κυττάρων και γι' αυτόν τον λόγο η ανοσοθεραπεία του καρκίνου είχε στραφεί μέχρι σήμερα στη δράση των CD8 T κυττάρων. Όμως, πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως για την επαγωγή αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση τόσο των CD8 T κυττάρων όσο και των CD4 T κυττάρων<sup>28,29</sup> (Σχήμα 9).

Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν τα αντιγόνα τους στα CD8 T κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν τη λύση των καρκινικών κυττάρων ή απελευθερώνουν τα αντιγόνα τους, τα οποία ενδοκυτταρώνονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Έρευνες σε ζώα έδειξαν πως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών έχουν την ικανότητα να ενδοκυτταρώνουν καρκινικά αντιγόνα, να τα επεξεργάζονται και να τα παρουσιάζουν τόσο στα CD4 όσο και στα CD8 T κύτταρα, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως διασταυρωτή διέγερση (cross-priming)<sup>30,31</sup>. Η ικανότητα ενός



αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου να παρουσιάζει αντιγονικούς επιτόπους στα CD8 και CD4 T κύτταρα φαίνεται πως διευκολύνει τα CD4 T κύτταρα να δρουν βοηθητικά στην κυτταροτοξική δράση των CD8 T κυττάρων. Η βοηθητική δράση των CD4 T κυττάρων πραγματοποιείται μέσω απελευθέρωσης κυτταροκινών, καθώς επίσης και μέσω της αλληλεπίδρασης των CD40 προσδετών των T κυττάρων με τα μόρια CD40 που βρίσκονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων<sup>32-34</sup>.



**Σχήμα 9: Συνεργιστική δράση των CD8 και CD4 T κυττάρων στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων**

### 1.7 Μηχανισμοί διαφυγής καρκινικού κυττάρου από την καταστροφή του

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί οι οποίοι μπορούν να βοηθήσουν ώστε τα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ένας ιδιαίτερα σημαντικός μηχανισμός αποφυγής είναι η απώλεια των αντιγόνων MHC, γεγονός που οδηγεί σε ανικανότητα έκθεσης των ογκο-ειδικών αντιγόνων. Περισσότερα από το 50% των νεοπλασμάτων μπορεί να χάσουν ένα ή περισσότερα αλληλόμορφα της τάξης I του MHC, ορισμένες δε φορές χάνεται ολόκληρη η τάξη I. Έχει προσδιοριστεί μια ποικιλία μοριακών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων μεταλλαγών στη β2-μικροσφαιρίνη και σε μεταφορείς πεπτιδίων. Η συχνή απώλεια των MHC από όγκους υποδηλώνει με έμφαση ότι παρατηρείται επιλογή αυτού, πιθανώς από κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα.

Η επαγωγή ανοσοποιητικών αποκρίσεων απαιτεί συν-διεγέρτες, όπως ακριβώς και η άριστη λειτουργικότητα των εκτελεστικών κυττάρων. Τα μόρια CD86 (B7) και CD40, τα οποία βρίσκονται σε εξειδικευμένα APCs, είναι πλέον γνωστό ότι αποτελούν σημαντικούς

συνδιεγέρτες οι οποίοι δρουν μέσω των υποδοχέων τους CD28 και CD40L επάνω στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων. Σε πειραματικές συνθήκες, η έκθεση των συμπλεγμάτων MHC-πεπτιδίων προς τον υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων απουσία συνδιέγερσης από το CD86 μπορεί να οδηγήσει σε ανέργεια. Αυτό μπορεί να αποτελεί τμήμα μιας πιο γενικευμένης βλάβης στην ανοσιακή απόκριση των καρκινοπαθών, επειδή, ακόμη και τα T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος των καρκινοπαθών συχνά εκδηλώνουν διαταραχές στη σηματοδότηση του TCR, *in vitro*<sup>35</sup>.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί επίσης να μη διαθέτουν άλλα μόρια που απαιτούνται για την πρόσφυση των λεμφοκυττάρων, όπως είναι τα LFA-1, LFA-3 ή το ICAM-1, ή ίσως να εκφράζουν μόρια, όπως είναι οι βλεννίνες, οι οποίες μπορεί να παρεμποδίζουν την πρόσφυση. Ακόμη, μπορεί να εκκρίνουν ανοσοκατασταλτικές κυτταροκίνες, όπως είναι ο TGFβ, ο οποίος εκκρίνεται σε μεγάλη ποσότητα από πολλούς όγκους και αναστέλλει διάφορες λειτουργίες λεμφοκυττάρων και μακροφάγων.

### 1.8 Καρκινικά αντιγόνα

Σημαντικό ρόλο στην κατανόηση της ανοσολογίας του καρκίνου διαδραμάτισε ο καθορισμός πολλών αντιγόνων καρκινικών κυττάρων που αναγνωρίζονται από T κύτταρα<sup>36</sup>. Η φύση αυτών των αντιγόνων και κυρίως το γεγονός ότι εκφράζονται σε διάφορα είδη καρκίνου τα καθιστά σημαντικά για την ανάπτυξη αντικαρκινικών εμβολίων. Τα καρκινικά αντιγόνα είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες<sup>37,38</sup>.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αντιγόνα που προκύπτουν από μεταλλάξεις σημείου (*unique antigens*). Οι μεταλλάξεις συνήθως επηρεάζουν τις περιοχές κωδικοποίησης του γονιδίου και είναι εξειδικευμένες για λίγους μόνο ασθενείς. Τα αντιγόνα αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση, αλλά τα περισσότερα από αυτά δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν εύκολα στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου καθώς δεν εκφράζονται σε όγκους διαφορετικών ασθενών.

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα αντιγόνα τα οποία εκφράζονται σε διάφορα είδη καρκίνου (*shared antigens*). Τα αντιγόνα αυτά είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε τρεις υποκατηγορίες: στα διαφοροποιημένα αντιγόνα (*differentiation antigens*), στα υπερεκφρασμένα αντιγόνα (*overexpressed antigens*) και στα εξειδικευμένα αντιγόνα (*tumor specific antigens*).

Τα διαφοροποιημένα αντιγόνα εκφράζονται σε μελανώματα και φυσιολογικά μελανοκύτταρα και δεν είναι εξειδικευμένα. Η χρησιμοποίησή τους στην ανοσολογική θεραπεία του καρκίνου είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αυτοανοσία ενάντια των αντίστοιχων φυσιολογικών ιστών, εκτός και αν οι φυσιολογικοί ιστοί στους οποίους εκφράζονται είναι δυνατόν να αφαιρεθούν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα διαφοροποιημένου αντιγόνου είναι η γλυκοπρωτεΐνη 100 (Glycoprotein 100, gp100)<sup>39-41</sup>.

Τα υπερεκφρασμένα αντιγόνα υπερεκφράζονται σε διάφορα είδη καρκίνου, αλλά εκφράζονται και σε μικρό ποσοστό σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοση καταστροφή των φυσιολογικών ιστών. Παρ' όλα αυτά έχει βρεθεί πως για την επαγωγή κυτταροτοξικής απόκρισης απαιτείται ένας ελάχιστος αριθμός πεπτιδίων<sup>42</sup> πράγμα που σημαίνει πως το μικρό ποσοστό έκφρασης των υπερεκφρασμένων αντιγόνων στους φυσιολογικούς ιστούς δεν οδηγεί πάντα σε αυτοανοσία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα υπερεκφρασμένου αντιγόνου είναι το HER-2/neu<sup>43</sup>, το οποίο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών.

Τέλος, τα εξειδικευμένα αντιγόνα εκφράζονται σε πολλά είδη καρκίνου, αλλά δεν εκφράζονται σε φυσιολογικούς ιστούς. Τα μόνα φυσιολογικά κύτταρα στα οποία εκφράζονται αυτά τα αντιγόνα είναι οι πλακούντιοι τροφοβλάστες και τα ορχικά γενετικά κύτταρα, στα οποία δεν εκφράζονται τα μόρια MHC τάξεως I. Έτσι, δεν υπάρχει ο κίνδυνος της αυτοανοσίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξειδικευμένου αντιγόνου είναι το αντιγόνο MAGE 3 (Melanoma-associated antigen 3).

### 1.9 MAGE 3 καρκινικό αντιγόνο

Η οικογένεια γονιδίων MAGE αποτελείται από δώδεκα διαφορετικά γονίδια, τα οποία είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες: MAGE-A, MAGE-B και MAGE-C<sup>44-46</sup>. Το αντιγόνο MAGE 3 ανήκει στην ομάδα MAGE-A και η αλληλουχία του παρουσιάζει 73% ομοιότητα με το γονίδιο MAGE 1. Εκφράζεται σε υψηλή αναλογία στο μελάνωμα και σε διάφορα άλλα είδη καρκίνου όπως του μαστού, των πνευμόνων, του θυρεοειδούς αδένου και του εντέρου<sup>47-49</sup>. Σε μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με διάφορες μορφές καρκίνου, έχει βρεθεί πως η χρησιμοποίηση επιτόπων του MAGE 3 καρκινικού αντιγόνου οδηγεί στην επαγωγή κυτταροτοξικής ανοσολογικής απόκρισης<sup>50-56</sup>.

Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για την ανίχνευση CTL αποκρίσεων στο MAGE-3 και έχουν προσδιοριστεί MHC I εξειδικευμένοι επίτοποι. Ο Celis και οι συνεργάτες του

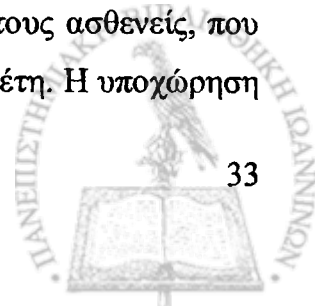


αναζήτησαν αλληλουχίες MAGE 3 που αναγνωρίζονται από τα κατάλληλα MHC (HLA-A1) και επέλεξαν πιθανά πεπτιδικά αντιγόνα από την ικανότητά τους να δεσμεύονται με καλή συγγένεια στο μόριο HLA II. Μόνο ένα εννεαπεπτιδίο (168-176) EVDPIGHLY, το οποίο έχει υψηλότερο βαθμό σύνδεσης με MHC, ήταν σε θέση να προκαλέσει αρχικά *in vitro* CTL αποκρίσεις σε αίμα που ελήφθη από φυσιολογικά άτομα<sup>56</sup>. Οι κυτταροτοξικές αποκρίσεις που προκλήθηκαν από το πεπτιδίο MAGE 3 βρέθηκαν να σκοτώνουν αποτελεσματικά αρκετές MAGE 3 θετικές σειρές καρκινικών κυττάρων (μελάνωμα, μαστός και προστάτης), δείχνοντας ότι αυτό το πεπτιδίο εκφράζεται σε σχέση με το HLA-A1 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας του προϊόντος του γονιδίου MAGE 3.

Το πεπτιδίο EVDPIGHLY προσδιορίστηκε επίσης ως επίτοπος MAGE 3 που αναγνωρίστηκε στα μόρια HLA-A\*0101 από έναν κλώνο CTL που απομονώθηκε από έναν ασθενή με μελάνωμα. Αυτό το εννεαπεπτιδίο κωδικοποιείται από την αλληλουχία MAGE 3 που είναι ομόλογη με κωδικοποιημένη αλληλουχία MAGE 1 για τον αντίστοιχο CTL επίτοπο<sup>57</sup>. Τα πειράματα ανταγωνισμού με πεπτιδία υποκατεστημένα με Ala στις θέσεις 3 (Asp) και 9 (Tyr) ήταν σημαντικά για τη σύνδεση του πεπτιδίου MAGE 3 στο HLA-A1<sup>57</sup>. Ο ίδιος CTL επίτοπος με μια πρόσθετη Met που συνδέθηκε στο N-τελικό άκρο βρέθηκε ότι είναι ένας HLA-B44 περιορισμένος CTL επίτοπος MAGE 3 ακολουθώντας την ίδια στρατηγική. CTL κλώνοι ελήφθησαν από κανονικούς HLA-B44 δότες που αναγνώριζαν όχι μόνο HLA-B44 κύτταρα ευσισητοποιημένα με το πεπτιδίο αλλά και HLA-B44 καρκινικές σειρές που εκφράζουν το MAGE 3<sup>58</sup>.

Σε μια άλλη μελέτη απομονώθηκε ένας κυτταροτοξικός T λεμφοκυτταρικός κλώνος (CTL), που είναι ειδικός για HLA-B\*3501<sup>59</sup>, ο οποίος αναγνωρίζει επίσης το ίδιο πεπτιδίο και λύει καρκινικά κύτταρα HLA-B\*3501 που εκφράζουν το MAGE 3. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η σημερινή κλινική χρήση του πεπτιδίου EVDPIGHLY μπορεί τώρα να επεκταθεί σε ασθενείς HLA-B\*3501.

Κλινικές δοκιμές, που περιλαμβάνουν εμβολιασμό με MAGE 3 πεπτιδία, έχουν εφαρμοσθεί σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα. Σε μια δοκιμή που περιλαμβάνει τρεις μηνιαίους εμβολιασμούς με χορήγηση ενός πεπτιδίου MAGE 3 που παρουσιάζεται από HLA-A1 ελλείψει οποιουδήποτε ανοσοενισχυτικού, παρατηρήθηκε ότι 7 από τους 25 ασθενείς που ολοκλήρωσαν τη δοκιμή παρουσίασαν σημαντική υποχώρηση των όγκων, σε τρεις από τους οποίους η υποχώρηση ήταν πλήρης<sup>60,61</sup>. Δύο από αυτούς τους ασθενείς, που είχαν μελάνωμα περιορισμένης μορφής, παρέμειναν υγιείς για πάνω από 3 έτη. Η υποχώρηση



των όγκων που παρατηρήθηκε άρχισε λίγους μήνες μετά το πρώτο εμβολιασμό και πέρασαν αρκετοί μήνες ώσπου να γίνει πλήρης υποχώρηση των όγκων. Η υποχώρηση των δερματικών κονδύλων (nodules) εμφανίστηκε απουσία φλεγμονής.

Ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα ανοσοποιήθηκαν επίσης με δενδριτικά κύτταρα που έχουν προεπωαστεί με MAGE πεπτίδια. Σε μια πρώτη μελέτη, μερική υποχώρηση αναφέρθηκε για 1 από τους 4 ασθενείς που εμβολιάστηκαν<sup>62</sup>. Σε μια δεύτερη μελέτη που περιλαμβάνει ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα, σημαντική εξάπλωση του MAGE 3A1 ειδικού CD8 κυτταροτοξικών κλώνων (CTL) προκλήθηκε σε 8/11 ασθενείς. Όλοι είχαν συνολική επιδείνωση, αλλά 6 από τους 11 ασθενείς παρουσίασαν υποχώρηση σε μερικές μεταστάσεις. Η υποχώρηση των μεταστάσεων του δέρματος σε δύο από τους ασθενείς συνοδεύτηκε από ερύθημα και διήθηση CD8 T κυττάρων<sup>54</sup>.

Ο Schultz και οι συνεργάτες του<sup>63</sup>, με την ενεργοποίηση ανθρωπίνων CD8 T λεμφοκυττάρων με αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα μολυσμένα με έναν αδενόϊό που κωδικοποιεί το MAGE 3, έλαβε έναν κυτταροτοξικό T λεμφοκυτταρικό κλώνο (CTL) που αναγνώρισε ένα νέο αντιγονικό πεπτίδιο MAGE 3, AELVHFLLL (114-122), το οποίο παρουσιάζεται από HLA-B4 και αναγνωρίζεται από CTLs αποκλειστικά στα κύτταρα μελανώματος που διαθέτουν πρωτεόσωμα, που σημαίνει ότι ο κλώνος CTL αναγνώρισε το MAGE 3 που εκφράζει καρκινικά κύτταρα μόνο όταν κατεργάστηκε με την IFN-γ. Επομένως τα CTLs ενάντια σε αυτό το αντιγόνο είναι χρήσιμα μετά την έναρξη της ανοσοαπόκρισης στην περιοχή των όγκων.

Επίσης, ο Breckpot και οι συνεργάτες του σε μια έρευνα που έκαναν<sup>64</sup> κατόρθωσαν να εντοπίσουν ένα νέο αντιγονικό πεπτίδιο κλινικού ενδιαφέροντος. Απομόνωσαν έναν CTL κλώνο ο οποίος είχε την ικανότητα να αναγνωρίζει το πεπτίδιο EGDCAPEEK, το οποίο παρουσιάζεται από HLA-Cw7 μόρια. Τα μόρια αυτά εκφράζονται στο 40% των Καυκάσιων. Το πεπτίδιο αυτό εντοπίζεται στην περιοχή (212-220) των MAGE-2, -3, -6 και -12. Ο CTL κλώνος είχε την ικανότητα να προκαλέσει την λύση HLA-Cw7 καρκινικών σειρών, οι οποίες είχαν τη δυνατότητα να εκφράζουν ένα από τα παραπάνω MAGE γονίδια.

Σε μια έρευνα που έγινε βρέθηκαν δύο ακόμη κυτταροτοξικοί επίτοποι<sup>65</sup>. Τα πεπτίδια TFPDLESEF και IMPKAGLLI μπορούν να εκφραστούν στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων μέσω των HLA-A24 μορίων, τα οποία είναι και τα πιο συχνά εμφανιζόμενα HLA I μόρια στους Ασιάτες. Σε δύο από τους τέσσερις δότες παρήχθησαν CTL κλώνοι ειδικοί για τα πεπτίδια. Επίσης, ο Bruggen και οι συνεργάτες απέδειξαν ότι CTL κλώνους είναι δυνατόν να παράγει και το πεπτίδιο FLWGPRALV<sup>53</sup>. Το πεπτίδιο αυτό παρουσιάζεται στην επιφάνεια



των καρκινικών κυττάρων μέσω του μορίου HLA-A2, το οποίο εντοπίζεται στο 32% των Καυκάσιων.

Δεδομένου ότι υπάρχουν σημαντικά στοιχεία για το ρόλο των CD4 T κυττάρων στην αντικαρκινική ανοσία από τη μελέτη των διηθούντων τον όγκο λεμφοκυττάρων<sup>66,67</sup> και από την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι καρκινικών αντιγόνων στους ορούς νεοπλασματικών ασθενών<sup>68</sup>, το MAGE 3 είναι μια άριστη πρωτεΐνη για τη μελέτη CD4 T κυτταρικών αντικαρκινικών αποκρίσεων.

Ο Manici και οι συνεργάτες του<sup>69</sup> χρησιμοποίησαν το TERITOPE, ένα λογισμικό πρόβλεψης επιτόπων, για να προσδιορίσουν τμήματα αλληλουχίας στην MAGE 3 πρωτεΐνη με ικανότητα πρόσδεσης σε πολλά HLA-DR αλληλία. Τα συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν στις προσδιορισμένες αλληλουχίες συντέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε HLA-DR δοκιμές πρόσδεσης, όπως και για να πολλαπλασιάσουν CD4 T κύτταρα από το αίμα υγιούς δότη. Τα CD4 T κύτταρα αναγνώρισαν κυρίως το MAGE 3 (281-295) και, σε μικρότερο βαθμό, το MAGE 3 (141-155) και το MAGE 3 (146-160). Τα CD4 T κύτταρα, κυρίως των T βοηθητικών κυττάρων τύπου 1, παρουσίασαν συγκεκριμένη ικανότητα λύσης των θετικών HLA-DR11/MAGE 3 κυττάρων του μελανώματος.

Σε μια άλλη μελέτη ο Chauk και οι συνεργάτες του, με τη χρησιμοποίηση δενδριτικών κυττάρων που φέρουν ανασυνδιασμένη MAGE 3 πρωτεΐνη για να υποκινήσει αυτόλογα CD4 T κύτταρα, απομόνωσαν CD4 T κυτταρικούς κλώνους από ασθενείς με αιμοχρωμάτωση που αναγνώρισαν δύο διαφορετικούς MAGE 3 επιτόπους, τον MAGE 3 (114-127) και τον MAGE 3 (121-134), που και οι δύο παρουσιάζονται από το μόριο HLA-DR13, το οποίο εκφράζεται στο 20% των Καυκάσιων<sup>70</sup>.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από μια πρόσφατη μελέτη που έγινε από τον Consogno και τους συνεργάτες του<sup>71</sup> χρησιμοποιώντας την ίδια στρατηγική (λογισμικό TERITOPE, HLA-DR δοκιμές πρόσδεσης). Τα συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν στις 11 προβλεφθείσες αλληλουχίες δεσμεύτηκαν από τουλάχιστον 3 διαφορετικά HLA-DR αλληλόμορφα γονίδια. Εννέα από τα 11 πεπτίδια προκάλεσαν πολλαπλασιασμό CD4 T κυττάρων τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς που έπασχαν από μελάνωμα. Τέσσερις επικρατούσες αντιγονικές περιοχές (111-125, 146-160, 191-205 και 281-295), που περιέχουν φυσικούς επιτόπους, αναγνωρίστηκαν από τους περισσότερους δότες, σε συνδιασμό με 3 έως 4 διαφορετικά HLA-DR αλληλόμορφα γονίδια, καλύπτοντας κατά συνέπεια μέχρι 94% των αλληλόμορφων γονιδίων που εκφράζονται στους Καυκάσιους.



Τέλος, ο Yi Zhang και οι συνεργάτες του από μελέτες που έκαναν<sup>72</sup> πρότειναν έναν νέο CD4 T κυτταρικό επίτοπο. Ο επίτοπος αυτός αναγνωρίστηκε από τρεις διαφορετικούς CD4 T κλώνους που απομονώθηκαν από έναν ασθενή με μελάνωμα που είχε εμβολιαστεί με την πρωτεΐνη MAGE 3. Οι κλώνοι αυτοί μέσω του HLA-DR1 αναγνωρίζουν το πεπτιδίο ACYEFLLWGPRLVETS, το οποίο αντιστοιχεί στην περιοχή (267-282) του MAGE 3 και MAGE 12 καρκινικού αντιγόνου. Ένας από τους T κυτταρικούς κλώνους, ο οποίος εξέφραζε LFA-1 σε υψηλά επίπεδα, προκάλεσε τη λύση καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν τόσο το HLA-DR1 μόριο όσο και το MAGE 3 καρκινικό αντιγόνο. Ανάλογα αποτελέσματα έδωσε και ο επίτοπος MAGE 3 (243-258) σε έρευνα που έγινε από τον Schultz και τους συνεργάτες του<sup>73</sup>.

### **1.10 Εμβόλια για την καταπολέμηση του καρκίνου**

Η αρχή στην οποία βασίζονται τα αντικαρκινικά εμβόλια είναι ότι το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ικανό να επάγει αντικαρκινική απόκριση και να ενεργοποιεί μια σειρά αμυντικών μηχανισμών ενάντια στα καρκινικά κύτταρα. Η θεραπεία του καρκίνου μέσω αντικαρκινικών εμβολίων είναι δυνατόν να γίνει είτε με ενίσχυση της ικανότητας του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει τα καρκινικά κύτταρα ως ξένα, είτε με ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης μέσω της αύξησης της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων.

Γενικά, ο στόχος των αντικαρκινικών εμβολίων είναι να εισάγουν το ανοσογόνο/αντιγόνο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και να επάγουν μακράς διάρκειας ανοσία. Τα αντιγόνα είναι δυνατόν να εισαχθούν στα αντιγονοπαρουσιαστικά με διάφορες μεθόδους όπως είναι η εξωγενής μεταφορά των αντιγόνων (κυτταρικά και πρωτεϊνικά εμβόλια) ή η απευθείας μεταγωγή τους (εμβόλια ανασυνδυασμένων ιών και βακτηρίων) και τέλος η απευθείας μεταφορά πεπτιδικών τμημάτων (πεπτιδικά εμβόλια)<sup>74</sup>.

### **1.11 Προϋποθέσεις για την ανάπτυξη πεπτιδικών εμβολίων**

Ο σχεδιασμός πεπτιδικών εμβολίων για την επαγωγή αντικαρκινικής T κυτταρικής απόκρισης παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα<sup>75</sup>. Είναι δυνατή η σύνδεση διαφορετικών πεπτιδίων στο ίδιο μόριο φορέα επιτρέποντας έτσι την παρασκευή πολυδύναμων συνθετικών εμβολίων. Επίσης, υπάρχει περιορισμός στην ανάπτυξη μη ειδικών αντισωμάτων από αντιγόνα-προσμίξεις λόγω της υψηλής καθαρότητας των συνθετικών πεπτιδίων. Επιπλέον, τα εμβόλια αυτά έχουν ενδογενή ανοσοενισχυτική δράση. Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα



σύνθεσης πεπτιδίων που να ξεπερνά γενετικούς περιορισμούς στην παραγωγή αντισωμάτων. Παρόλα αυτά, για την ανάπτυξη ενός ιδανικού πεπτιδικού εμβολίου είναι απαραίτητο να εκπληρωθούν κάποιοι βασικοί στόχοι<sup>76</sup> που αναφέρονται παρακάτω.

### **1.11.1 Ταυτοποίηση πεπτιδικών επιτόπων T καρκινικών κυττάρων**

Τα τελευταία χρόνια, με τη βοήθεια μοριακών και βιοχημικών μεθόδων, έχει καθοριστεί ένας μεγάλος αριθμός πεπτιδικών επιτόπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη πεπτιδικών εμβολίων<sup>77,78</sup>. Μία από τις μεθόδους για τον καθορισμό των T κυτταρικών επιτόπων βασίζεται στη χαρτογράφηση καρκινικών αντιγόνων που αναγνωρίζουν T κύτταρα μέσω έκφρασης συμπληρωματικών DNA βιβλιοθηκών<sup>79,80</sup>. Επίσης, ο καθορισμός πεπτιδικών επιτόπων γίνεται και με χαρτογράφηση πεπτιδίων που εκλούνται από τα MHC μόρια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Η ταυτοποίηση των επιτόπων αυτών γίνεται με φασματοσκοπία μάζας<sup>81</sup>.

Η τρίτη και εξίσου σημαντική μέθοδος για τον καθορισμό πεπτιδικών επιτόπων είναι η μέθοδος πρόβλεψης<sup>82,83</sup>. Η σπουδαιότητα αυτής της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι σε αντίθεση με τις άλλες δύο μεθόδους δεν απαιτεί τη χρησιμοποίηση καρκινικών T κυττάρων που προέρχονται από ασθενείς. Στη μέθοδο αυτή αρχικά επιλέγεται ένα καρκινικό αντιγόνο το οποίο πιθανόν να αναγνωρίζεται από τους T κυτταρικούς υποδοχείς. Η επιλεγμένη πρωτεΐνη θα πρέπει να υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με την έκφρασή της στους φυσιολογικούς ιστούς και η αλληλουχία του πιθανού καρκινικού αντιγόνου θα πρέπει να είναι γνωστή. Η μέθοδος αυτή ουσιαστικά αποσκοπεί στην εύρεση μικρών πεπτιδικών αλληλουχιών που εμπεριέχονται στην επιλεγμένη πρωτεΐνη και οι οποίες θα μπορούσαν να συνδεθούν με τα μόρια MHC τάξεως I και II.

### **1.11.2 Επιλογή των καταλληλότερων T κυτταρικών επιτόπων καρκινικών αντιγόνων**

Η χρησιμοποίηση των τριών μεθόδων που αναφέρθηκαν παραπάνω είχε ως αποτέλεσμα τον καθορισμό ενός μεγάλου αριθμού κυτταροτοξικών CD8 επιτόπων. Η επιλογή των καταλληλότερων από αυτούς για τη χρησιμοποίησή τους στην ανάπτυξη εμβολίων βασίζεται κυρίως στη συχνότητα έκφρασης του καρκινικού αντιγόνου, από το οποίο προέρχεται ο επίτοπος, στους υπό μελέτη καρκίνους αλλά και στους φυσιολογικούς ιστούς. Επίσης, οι επιλεγμένοι επίτοποι θα πρέπει να συνδέονται σε ένα ευρύ φάσμα MHC αλληλόμορφων. Η ικανότητα των επιτόπων να συνδέονται σε συγκεκριμένα MHC αλληλόμορφα σχετίζεται με



τη θέση συγκεκριμένων αμινοξέων, η οποία επιτρέπει στα πεπτίδια να αλληλεπιδρούν με τις θέσεις πρόσδεσης πεπτιδίων στα μόρια MHC<sup>84,85</sup>.

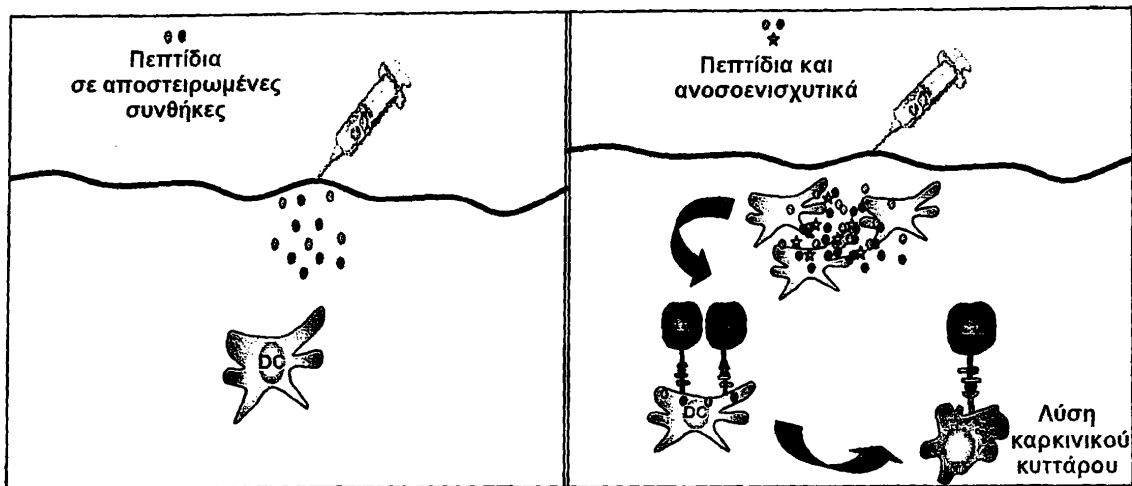
Επίσης, είναι απαραίτητο να επιλέγονται επίτοποι που αναγνωρίζονται τόσο από CD8 όσο και από CD4 T κύτταρα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ενεργοποιημένα CD4 T κύτταρα ενισχύουν την κυτταροτοξική απόκριση κάνοντας τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα πιο δραστικά στο να ενεργοποιούν τα CD8 T κύτταρα και παράγοντας κυτταροκίνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και στον πολλαπλασιασμό των CD8 T κυττάρων. Έτσι, για την επαγωγή αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση τόσο των CD8 T κυττάρων όσο και των CD4 T κυττάρων.

### 1.11.3 Ανοσογονικότητα ή απουσία αυτής-Ρόλος ανοσοενισχυτικών

Τα πρώτα πεπτιδικά αντικαρκινικά εμβόλια που περιείχαν συνθετικά πεπτίδια χορηγήθηκαν στους ασθενείς μέσω υποδόριας ή επιδερμικής ένεσης<sup>86-90</sup> και δεν υπήρξε καμία σαφής ένδειξη T κυτταρικής απόκρισης. Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος επιτυγχάνεται μόνο όταν το πεπτίδιο παρουσιαστεί στα δενδριτικά κύτταρα. Επίσης είναι απαραίτητη και η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων και η μεταφορά τους στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα όπου παρουσιάζουν τα πεπτίδια στα T κύτταρα.

Τα δενδριτικά κύτταρα ενεργοποιούνται από μικροοργανισμούς που αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα ως ξένοι, όπως είναι βακτηριακό DNA και RNA και βακτηριακοί λιποπολυσακχαρίτες<sup>91</sup>. Επίσης, τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως IL-1, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  καθώς και από νεκρά κύτταρα που απελευθερώνουν DNA, μιτοχόνδρια και άλλα συστατικά τους<sup>92,93</sup>. Είναι φανερό, λοιπόν, πως για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, τα πεπτίδια πρέπει να χορηγηθούν με ανοσοενισχυτικά<sup>94-96</sup> που δεν αποικοδομούνται εύκολα και προκαλούν τοπική φλεγμονή ώστε να προσελκύσουν τα δενδριτικά κύτταρα, καθώς επίσης και με IL-2, IL-12 και GM-CSF ώστε τα δενδριτικά κύτταρα να αναγνωρίσουν τα πεπτίδια ως απειλή<sup>97-102</sup> (Σχήμα 10).





Σχήμα 10: Επίδραση ανοσοενισχυτικών στην επαγωγή κυτταροτοξικής απόκρισης

#### 1.11.4 Ανοχή έναντι αυτοανοσίας

Πολλά καρκινικά αντιγόνα εκφράζονται και σε φυσιολογικούς ιστούς, με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος να αναπτυχθεί ανοχή. Παρόλα αυτά η ύπαρξη αυτοάνοσων διαταραχών δείχνει ότι η ανοχή δεν λειτουργεί πάντα τέλεια. Επίσης, το μέγεθος και η ποιότητα της T κυτταρικής απόκρισης των περισσότερων αυτοαντιγόνων δεν είναι τόσο υψηλό όσο της T κυτταρικής απόκρισης που επάγεται από ξένα παθογόνα που σχετίζονται με τα αντιγόνα και στην οποία δεν υπάρχει το φαινόμενο της ανοχής. Οι περισσότεροι T κυτταρικοί επίτοποι που προέρχονται από καρκινικά αντιγόνα είναι ασθενή ανοσογόνα σε σχέση με τους επίτοπους που προέρχονται από τυπικούς μολυσματικούς παράγοντες. Από πειράματα που έγιναν παρατηρήθηκε πως υποκατάσταση μερικών αμινοξέων των πεπτιδικών επιτόπων μπορεί να αυξήσει την αντιγονικότητά και την ανοσογονικότητά τους.

Υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους τα ανάλογα είναι δυνατόν να γίνουν ισχυρότερα από τα αρχικά πεπτίδια. Σε πολλές περιπτώσεις, η υποκατάσταση αμινοξέων που βρίσκονται στις θέσεις πρόσδεσης των MHC μορίων μπορεί να βελτιώσει δραστικά τη συγγένεια σύνδεσης του πεπτιδίου στα MHC μόρια<sup>103,104</sup>. Έρευνες που έγιναν σε ζώα έδειξαν πως η ανοσογονικότητα των πεπτιδίων σχετίζεται στενά με τη συγγένεια σύνδεσής τους με τα μόρια MHC<sup>105</sup>. Η άλλη προσέγγιση σχετίζεται με τη δημιουργία πεπτιδίων με υποκατάσταση αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με τους T κυτταρικούς υποδοχείς, ώστε να βελτιωθεί η ικανότητα του συμπλέγματος πεπτιδίου: MHC μορίου να επάγει T κυτταρική απόκριση<sup>106-108</sup>. Βέβαια υπάρχει ένα βασικό μειονέκτημα όσον αφορά στα πεπτιδικά ανάλογα. Είναι δυνατόν τα τροποποιημένα πεπτίδια να επάγουν T κυτταρική απόκριση κατά την οποία οι μη

τροποποιημένοι επίτοποι που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα να μην αναγνωρίζονται από τους T κυτταρικούς υποδοχείς<sup>109</sup>.

### 1.11.5 Εξειδίκευση MHC μορίων

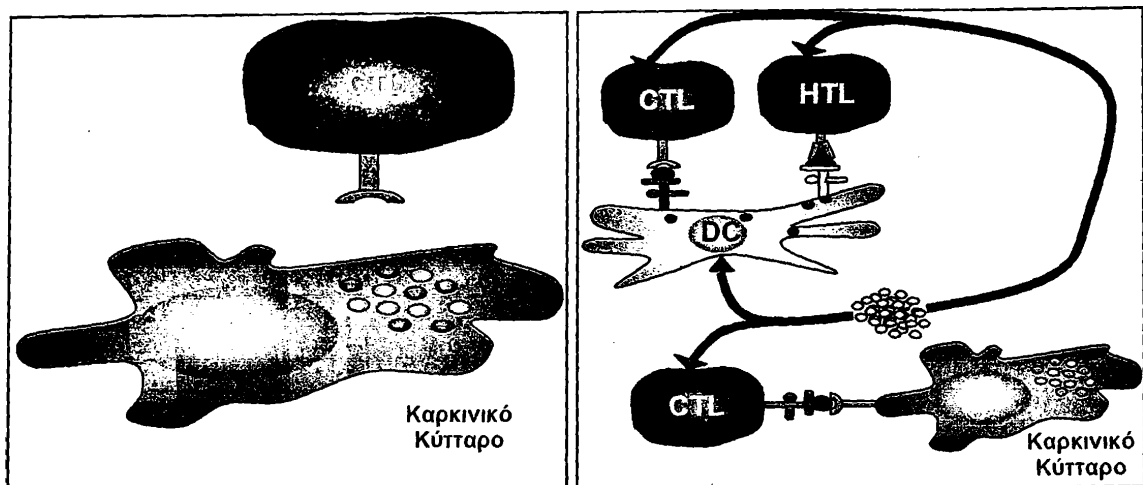
Εκτός από την ανοσογονικότητα, για την ανάπτυξη ενός δραστικού πεπτιδικού αντικαρκινικού εμβολίου θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν και οι περιορισμοί που εισάγονται λόγω της εξαιρετικής εξειδίκευσης των MHC μορίων<sup>110</sup>. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένας πεπτιδικός επίτοπος θα είναι χρήσιμος για τη θεραπεία ενός μικρού αριθμού ασθενών, οι οποίοι εκφράζουν τα MHC αλληλόμορφα που είναι ικανά να συνδεθούν με αυτά τα πεπτίδια. Γι' αυτόν το λόγο, προτιμώνται πεπτιδικοί επίτοποι που είναι εξειδικευμένοι στα πιο συχνά εμφανιζόμενα MHC αλληλόμορφα. Έτσι, για την ανάπτυξη αντικαρκινικών εμβολίων χρησιμοποιούνται πεπτιδικοί επίτοποι που μπορούν να συνδέονται στα πιο συχνά εμφανιζόμενα MHC I αλληλόμορφα, όπως είναι τα HLA-A1,-A2,-A3,-A24,-B7<sup>111</sup> και στα πιο συχνά εμφανιζόμενα MHC II αλληλόμορφα, όπως είναι τα HLA-DR1,-DR3,-DR4 και -DR7<sup>112</sup>.

### 1.11.6 Εμβόλια με πολλούς επιτόπους

Για να είναι εφικτό ένα πεπτιδικό εμβόλιο να είναι χρήσιμο για την καταπολέμηση διάφορων τύπων καρκίνου (ειδικότερα στην ανάπτυξη προφυλακτικής ανοσίας) θα πρέπει να εμπεριέχει περισσότερα από ένα καρκινικά αντιγόνα για κάθε τύπο καρκίνου. Τα εμβόλια αυτά με τους πολλαπλούς επιτόπους είναι δυνατό να αποτελούνται από μίγμα πεπτιδίων ή από ένα μόνο πεπτίδιο που αποτελείται από επιτόπους συνδεδεμένους γραμμικά.

Με τη χρησιμοποίηση πολλών επιτόπων από περισσότερα από ένα καρκινικά αντιγόνα είναι δυνατόν να αντιμετωπισθεί και το πρόβλημα της διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την καταστροφή τους. Μερικοί όγκοι παράγουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες, οι οποίοι είτε σταματούν την αντικαρκινική δράση των CD8 T κυττάρων, είτε προκαλούν το θάνατό τους (Σχήμα 11). Μεταξύ αυτών των παραγόντων, οι TGF- $\beta$  και IL-10 είναι πιθανοί αναστολείς της επαγωγής και της διατήρησης της κυτταροτοξικής δράσης<sup>113-116</sup>.





**Σχήμα 11: Μηχανισμοί διαφυγής καρκινικού κυττάρου από την καταστροφή του**

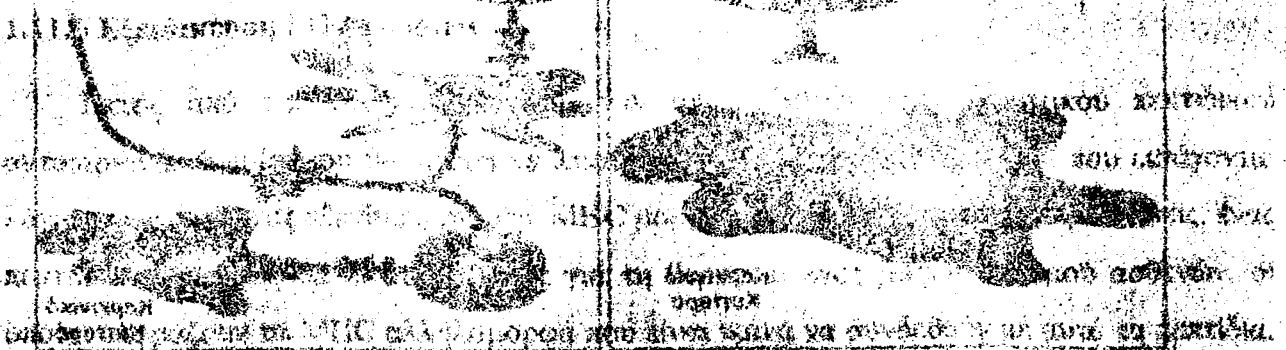
Ένας εξίσου σημαντικός μηχανισμός ανοσολογικής διαφυγής που χρησιμοποιείται από τους όγκους είναι η μείωση της έκφρασης των αντιγονικών επιτόπων τους που αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα είναι δυνατόν να διαφύγουν από την κυτταροτοξική δράση των T κυττάρων μειώνοντας την έκφραση των MHC μόριων στην επιφάνεια των κυττάρων και την παραγωγή πεπτιδικών επιτόπων ή και σταματώντας την έκφραση της πρωτεΐνης του καρκινικού αντιγόνου<sup>117,118</sup>.

### 1.11.7 Κλινική αξιολόγηση του εμβολίου

Εκτός από τις βασικές προϋποθέσεις για την ανάπτυξη αντικαρκινικών πεπτιδικών εμβολίων, υπάρχουν και πολλές προϋποθέσεις που σχετίζονται με την ασφάλεια αυτών των εμβολίων σε κλινικές μελέτες.

Όσον αφορά στην ασφάλεια των αντικαρκινικών εμβολίων, τα συνθετικά πεπτίδια που χρησιμοποιούνται σε τέτοιου είδους εμβόλια θα πρέπει να συντεθούν με καλές παρασκευαστικές μεθόδους (Good Manufacturing Practices, GMP) πριν τη χορήγησή τους σε ανθρώπους. Επίσης, είναι απαραίτητο να υποβληθούν σε εκτεταμένους ελέγχους ποιότητας και να γίνει αξιολόγηση της ασφάλειάς τους, ώστε να επιβεβαιωθεί η ταυτότητά τους, η καθαρότητα, η ποσότητά τους και η απουσία ενδοτοξινών. Το προϊόν που περνάει από αυτούς τους ελέγχους, στη συνέχεια δοκιμάζεται σε ασθενείς για την ασφάλειά του, δηλαδή για το αν είναι τοξικό ή όχι και αργότερα για τη δραστηρότητά του. Στο τελικό στάδιο, το εμβόλιο αξιολογείται κλινικά για την ικανότητά του να βελτιώνει ή να

σταθεροποιεί την κλινική κατάσταση του ασθενούς. Επίσης, είναι διαθέσιμες συμπληρωματικές εργαστηριακές δοκιμές για τον καθορισμό της ανοσογονικότητας του εμβολίου.



Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.

Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.

Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.

Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.

Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.

Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.

Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.

Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.

Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.

Το εμβόλιο αυτό αποτελείται από κλασικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα ήτοι για την ουσία που περιγράφεται για την ασθένεια που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ**





## 2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

### 2.1 Εισαγωγή

Η ανάγκη της δημιουργίας ενός συνθετικού αντιγόνου/ανοσογόνου με αυξημένη εξειδίκευση οδήγησε στη χρησιμοποίηση μόνο των κύριων επιτόπων και τον αποκλεισμό των υπόλοιπων τμημάτων του αντιγόνου/ανοσογόνου<sup>1</sup>. Όμως, επειδή τα πεπτίδια, λόγω του μικρού μεγέθους τους, δεν είναι ισχυρές ανοσογόνες ουσίες είναι απαραίτητη η πρόσδεσή τους σε πρωτεϊνικούς φορείς. Μ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ενίσχυση της ανοσογονικότητας/αντιγονικότητας και της σταθερότητάς τους.

### 2.2 Πρωτεϊνικοί φορείς

Οι πρωτεϊνικοί φορείς έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για την πρόσδεση των αντιγονικών πεπτιδίων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της ανοσογονικότητας και της σταθερότητάς τους έναντι μηχανισμών αποικοδόμησης. Ένα βασικό χαρακτηριστικό που πρέπει να διαθέτουν οι πρωτεϊνικοί φορείς, είναι η ικανότητα να εισάγουν την επιθυμητή διαμόρφωση στον Β επίτοπο, η οποία και θα προσομοιάζει αυτή της αρχικής πρωτεΐνης. Επίσης, θα πρέπει να διαθέτουν Τ βοηθητικούς επιτόπους, ώστε να αναγνωρίζονται από τους Τ κυτταρικούς υποδοχείς.

Ένα βασικό μειονέκτημα των πρωτεϊνικών φορέων είναι το μεγάλο μέγεθός τους σε σχέση μ' αυτό του αντιγονικού πεπτιδίου. Έτσι, ο επίτοπος δεν αντιπροσωπεύει παρά μόνο ένα μικρό κλάσμα του μακρομορίου πρωτεϊνικός φορέας-αντιγονικό πεπτίδιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα επιθυμητά αντισώματα να αντιπροσωπεύουν ένα μικρό κλάσμα του συνολικού αριθμού των παραγόμενων αντισωμάτων και κατά συνέπεια να προκαλείται μη επιθυμητή ανοσολογική απόκριση έναντι του μορίου του φορέα.

Επίσης, ένα σημαντικό μειονέκτημα της πρόσδεσης ενός αντιγονικού πεπτιδίου σε πρωτεϊνικό φορέα, είναι η τροποποίηση των αντιγονικών πεπτιδίων, καθώς και το γεγονός ότι δεν είναι δυνατό να υπολογιστεί επακριβώς ο αριθμός των moles του πεπτιδίου που προσδέθηκε στο μόριο του πρωτεϊνικού φορέα. Η πρόσδεση του πεπτιδίου με μια σειρά μεθόδων πρόσδεσης στον πρωτεϊνικό φορέα, μεταβάλλει την αντιγονική συμπεριφορά του πεπτιδίου. Επίσης, η ακριβής δομή του πεπτιδίου μετά την πρόσδεσή του στον πρωτεϊνικό φορέα, παραμένει άγνωστη και επομένως η διαμόρφωση του αντιγονικού πεπτιδίου δεν μπορεί να προσδιοριστεί.

Τα κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου πρωτεϊνικού φορέα είναι η διαλυτότητά του, ο ικανοποιητικός αριθμός δραστικών ομάδων στις παράπλευρες αλυσίδες, ώστε να επιτευχθεί η πρόσδεση του συνθετικού αντιγονικού πεπτιδίου και η μικρή διασταυρωτή δράση με άλλες πρωτεΐνες. Οι κυριότεροι πρωτεϊνικοί φορείς που χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση συνθετικών αντιγονικών πεπτιδίων είναι οι: KLH (Keyhole Limpet Haemocyanin), BSA (Bovine Serum Albumin), TT (Tetanus Toxoid), DT (Diphtheria Toxoid) κ.λ.π.

### 2.3 Συνθετικοί φορείς

Τα προαναφερθέντα μειονεκτήματα των πρωτεϊνικών φορέων έδωσαν το έναυσμα για την ανάπτυξη των συνθετικών φορέων. Οι συνθετικοί φορείς αντιγονικών πεπτιδίων είναι συνθετικά μόρια πεπτιδικής φύσης που έχουν βιοχημικές και βιοϊατρικές εφαρμογές στα συνθετικά εμβόλια, στις ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές ορών, όπως επίσης και στην ενδοκυττάρια φαγοκυττάρωση. Σήμερα, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός συνθετικών φορέων, οι γνωστότεροι από τους οποίους είναι τα MAPs (Multiple Antigenic Peptides)<sup>2,4</sup>, τα TASP (Template Assembled Synthetic Proteins)<sup>3,5</sup> και οι Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς SOC<sub>n</sub> (Sequential Oligopeptide Carriers)<sup>3,4,6-13</sup> που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό μας.

#### 2.3.1 Φορέας πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (MAPs)

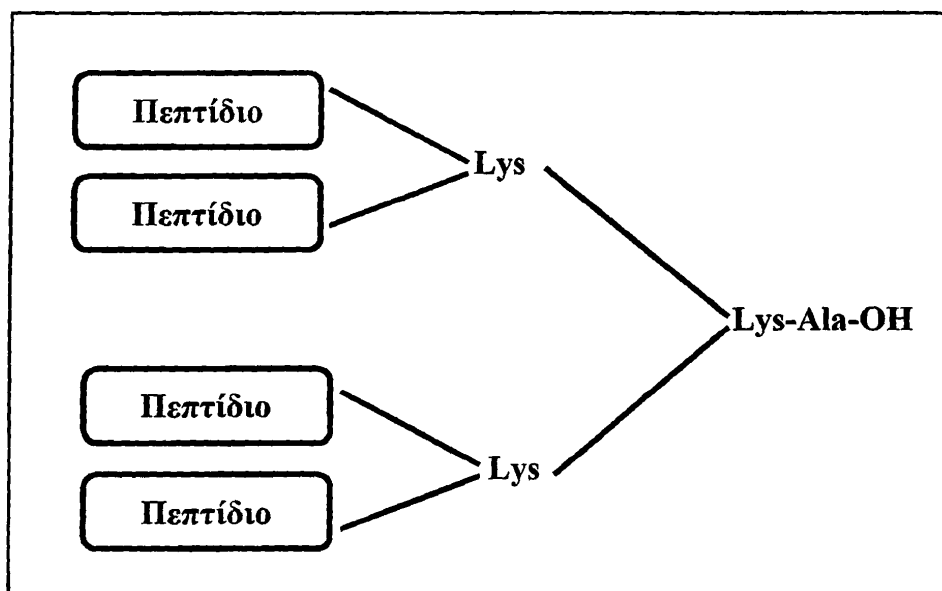
Στα MAPs<sup>2</sup>, σε αντίθεση με τους πρωτεϊνικούς φορείς, υπάρχει μια μικρή δομική μονάδα η οποία έχει τη δυνατότητα να φέρει πολλά αντίγραφα του αντιγονικού πεπτιδίου. Αρχικά το σύστημα MAP είχε σχεδιαστεί για να δράσει ως ισχυρό ανοσογόνο<sup>14</sup> και αντιγόνο<sup>15</sup>, πολύ γρήγορα όμως οι εφαρμογές του εξαπλώθηκαν και σε άλλα επίπεδα, όπως ο σχεδιασμός αναστολέων<sup>16</sup> και τεχνητών ενζύμων<sup>17</sup>, ο καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας και ενδοκυτταρική μεταφορά<sup>18</sup>.

Ο σχεδιασμός των MAPs έγινε με βάση τις παρακάτω ιδιότητες που πρέπει να ικανοποιούν οι συνθετικοί φορείς:

- ◆ Έλλειψη ανοσογονικότητας
- ◆ Πολλαπλότητα αντιγράφων του ίδιου επιτόπου
- ◆ Δυνατότητα πρόσδεσης πολλαπλών διαφορετικών επιτόπων
- ◆ Ευκολία στη σύνθεση του φορέα



Μια δομική μονάδα αποτελούμενη από διακλαδισμένα αμινοξέα, όπως π.χ. λυσίνη (Lys), ικανοποιεί τις παραπάνω ιδιότητες. Κάθε λυσίνη περιέχει δύο ελεύθερες-διαθέσιμες αμινομάδες ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub> και  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>), οπότε κάθε επίπεδο διακλάδωσης θα περιέχει  $2^n - 1$  μόρια λυσίνης και  $2^n$  δραστικές ομάδες. Έτσι το πρώτο επίπεδο της μήτρας προσφέρει τη δυνατότητα πρόσδεσης δύο επιτόπων, το δεύτερο επίπεδο αποτελείται από τρεις λυσίνες με αποτέλεσμα ο αριθμός των διαθέσιμων αμινομάδων να αυξάνεται σε τέσσερις κ.λ.π. (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των MAPs (δεύτερο επίπεδο διακλάδωσης, τέσσερις διαθέσιμες αμινομάδες)

Ο βέλτιστος αριθμός των διακλαδώσεων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνεται, μεταξύ των άλλων, η στερική παρεμπόδιση που δημιουργείται κατά την πρόσδεση των αντιγονικών πεπτιδίων στο μόριο του φορέα, το μήκος και η διαμόρφωση των αντιγονικών πεπτιδίων, καθώς και το μοριακό βάρος του μακρομορίου. Συνήθως το δεύτερο και το τρίτο επίπεδο διακλάδωσης είναι ικανοποιητικά για να σχηματίσουν μια μήτρα μικρού μοριακού βάρους απαραίτητου για ικανοποιητική ανοσολογική απόκριση. Τα αντιγονικά πεπτίδια προσδέονται ομοιοπολικά στις αμινομάδες της μήτρας (του δέντρου) της λυσίνης, έτσι ώστε το μακρομόριο που προκύπτει να εμφανίζει υψηλή πυκνότητα των κατανεμημένων στην επιφάνεια αντιγονικών πεπτιδίων.

Για τη σύνθεση των MAPs, υπάρχουν δύο διαθέσιμες στρατηγικές: (α) η άμεση και (β) η έμμεση μεθοδολογία. Κατά την άμεση μεθοδολογία, το αντιγονικό πεπτίδιο και το δέντρο της λυσίνης, συντίθενται ενιαία πάνω στο πολυμερικό υπόστρωμα (ρητίνη), σύμφωνα με τη βήμα προς βήμα στρατηγική της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Το προϊόν που προκύπτει, αφού καθαριστεί με την τεχνική της διαπίδυσης ή τις συνήθεις χρωματογραφικές τεχνικές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για ανοσοποιήσεις ή άλλες κλινικές εφαρμογές. Σύμφωνα με την έμμεση μεθοδολογία, ο φορέας και τα αντιγονικά πεπτίδια παρασκευάζονται και καθαρίζονται χωριστά και στη συνέχεια συνδυάζονται και σχηματίζεται το μακρομόριο MAP. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι χρησιμοποιούνται ελεύθερα και καθαρισμένα πεπτίδια. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα, είναι ότι ο προσανατολισμός του αντιγονικού πεπτιδίου μπορεί να διευθετηθεί κατά παρόμοιο τρόπο, όπως στο αρχικό μόριο της πρωτεΐνης.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης του δέντρου της λυσίνης είναι τα εξής:

- ◆ Η στοιχειομετρική αναλογία του πεπτιδίου πάνω στη μήτρα μπορεί να προσδιοριστεί πλήρως.
- ◆ Η πρωτοταγής δομή των MAPs, μπορεί να επιβεβαιωθεί με μεγάλη ακρίβεια χρησιμοποιώντας αναλυτικές μεθόδους, όπως ανάλυση αμινοξέων, εύρεση αλληλουχίας και φασματομετρία μάζας.
- ◆ Δεν είναι απαραίτητη η πρόσδεση σε πρωτεϊνικό φορέα, που προκαλεί μερικές φορές ανεπιθύμητες ανοσολογικές αποκρίσεις.
- ◆ Το μοντέλο αυτό, μας δίνει τη δυνατότητα του σχεδιασμού ενός φορέα, που να συνδυάζει επιτόπους Β και Τ κυττάρων ή φορέα στον οποίο έχει προσδεθεί μια ανοσοενισχυτική ομάδα. Αυτή η δυνατότητα, προκύπτει από το γεγονός ότι μπορούν να διακριθούν εκλεκτικά οι α- από τις ε-αμινομάδες των λυσινών, και έτσι, διαφορετικοί επίτοποι μπορούν να προσδεθούν στις διαθέσιμες αμινομάδες.

Παρά τα γεγονότα ότι τα MAPs παρουσιάζουν πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα, υπάρχουν και κάποια βασικά μειονεκτήματα, τα οποία περιορίζουν τη χρήση τους. Ενώ τα MAPs είναι αποτελεσματικά ως αντιγονικά υποστρώματα για τη διεξαγωγή πειραμάτων αναγνώρισης αντισωμάτων σε ορούς (π.χ πειράματα ELISA), εν τούτοις παρουσιάζουν ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα, όταν χρησιμοποιούνται ως ανοσογόνα.

Τα MAPs δεν δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε πειράματα ανοσοποιήσεων, όταν ο επίτοπος βρίσκεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της αρχικής πρωτεΐνης, γιατί το τμήμα του



αντιγονικού πεπτιδίου το οποίο προσδένεται στο δέντρο της Lys υφίσταται παρεμπόδιση. Σε ένα τέτοιο δέντρο της Lys, τα αμινοξέα του καρβοξυ-τελικού άκρου του αντιγονικού πεπτιδίου δεν αναμένεται να είναι διαθέσιμα για την πρόσδεση με το αντίσωμα. Έτσι, τα αντισώματα που προκύπτουν από τις ανοσοποιήσεις με MAPs, σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν αναγνωρίζουν την αρχική πρωτεΐνη. Από την άλλη πλευρά, τα αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου έχει βρεθεί ότι είναι τα περισσότερο αντιγονικά στην αλληλουχία του αντιγονικού πεπτιδίου και αυτό γιατί είναι εκτεθειμένα στην επιφάνεια ενός MAP μακρομορίου και επομένως είναι περισσότερο ευκίνητα.

Ορισμένα από τα συστήματα MAPs στα οποία έχουν προσδεθεί αντιγονικά εικοσαπεπτιδία εμφανίζουν ευρείες κορυφές στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC)<sup>19,20</sup>, πράγμα που καθιστά τον παραπέρα καθαρισμό τους ιδιαίτερα επίπονο. Προβλήματα προέκυψαν και κατά το χαρακτηρισμό των MAPs με φασματομετρία μάζας (electron spray ionization), που αποδίδονται στο γεγονός ότι ορισμένες προστατευτικές ομάδες είναι στερικά παρεμποδισμένες, μη εκτεθειμένες στο διαλύτη και επομένως δεν απομακρύνονται ποσοτικά κατά την αντίδραση αποπροστασίας. Τα συνολικά προβλήματα, μπορεί να οφείλονται στη γεωμετρική πολυπλοκότητα του μακρομορίου, στον υψηλό βαθμό διακλάδωσης των MAPs ή στην ανομοιογένεια του επιθυμητού προϊόντος, οφειλόμενη σε προσμίξεις MAPs μικρότερου επιπέδου διακλάδωσης που δεν απομακρύνθηκαν κατά την πορεία. Τα προβλήματα αυτά μπορούν να ξεπεραστούν κατά την εφαρμογή της έμμεσης μεθοδολογίας πρόσδεσης ήδη καθαρισμένων πεπτιδικών τμημάτων.

Τέλος, σε ορισμένα συστήματα MAPs στα οποία έχει προσδεθεί σημαντικός αριθμός υδρόφοβων αμινοξέων εμφανίζονται σοβαρά προβλήματα διαλυτότητας, που δυσκολεύουν αφάνταστα τις παραπάνω τεχνικές καθαρισμού.

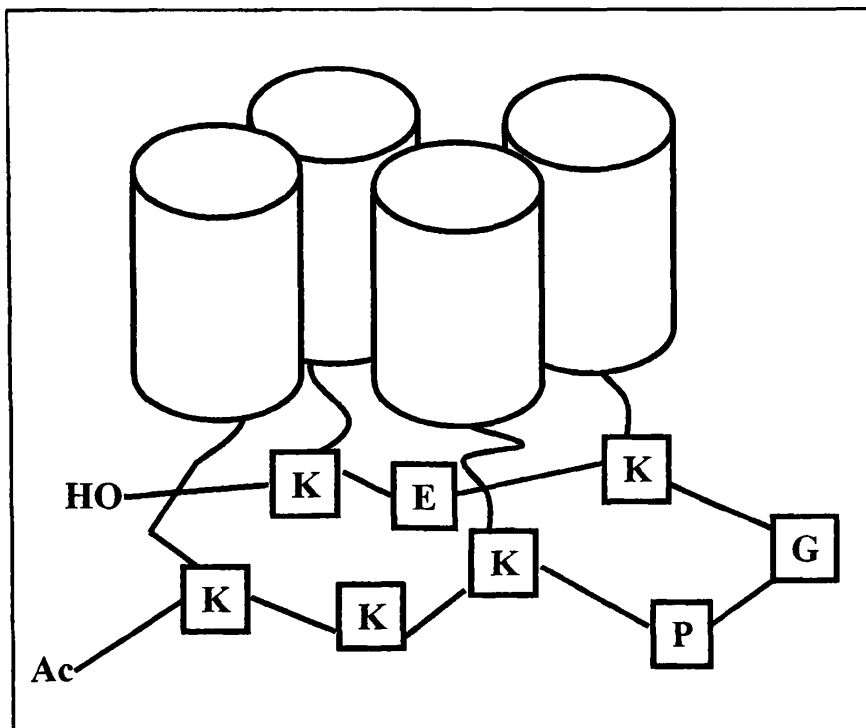
### 2.3.2 Μεθοδολογία TASP (Template Assembled Synthetic Protein)

Μια ενδιαφέρουσα μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό των πρωτεϊνών, είναι η εισαγωγή και η σταθεροποίηση μικρών δευτεροταγών δομών με κατάλληλη συνθετική πορεία. Αυτή η διαφορετική μεθοδολογία για τη σχεδίαση πρωτεϊνών, ώστε να ξεπεραστούν οι αναδιπλώσεις του μορίου, είναι το μοντέλο TASP<sup>3</sup> (Σχήμα 2). Ο τοπολογικός φορέας TASP κατευθύνει την ενδομοριακή αναδίπλωση των ομοιοπολικά προσδεδεμένων πεπτιδικών τμημάτων σε μια προκαθορισμένη τριτοταγή διαμόρφωση, η οποία μιμείται αυτήν

της επιλεγμένης πρωτεΐνης. Η εισαγωγή αυτής της μεθοδολογίας έγινε αναγκαία ύστερα από τις σύγχρονες απαιτήσεις για τη σύνθεση μορίων που να μιμούνται τις πρωτεΐνες.

Τέτοια μόρια διαθέτουν ομάδες με κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να μπορούν να μιμηθούν (δομικά και διαμορφωτικά) πεπτιδία και πρωτεΐνες σε διάφορα πειράματα μοριακής αναγνώρισης. Η προσομοίωση πεπτιδίων και πρωτεϊνών έχει σαν σκοπό, την παρασκευή πιο απλοποιημένων και από συνθετικής πλευράς πιο προσιτών, μορίων. Η μεθοδολογία TASP οδηγεί στη σύνθεση δομικών μοτίβων προκαθορισμένης διαμόρφωσης στο χώρο, που μιμούνται βιοδραστικές διαμορφώσεις πεπτιδίων.

Τα TASPs αποτελούνται από μια δομική μονάδα η οποία φέρει δραστικές ομάδες πάνω στις οποίες προσδένονται ομοιοπολικά οι πρωτεΐνες. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ο φορέας TASP κατευθύνει την ενδομοριακή αναδίπλωση των ομοιοπολικά προσδεδωμένων πεπτιδικών τμημάτων σε μια προκαθορισμένη δευτεροταγή διαμόρφωση, η οποία μιμείται την αρχική πρωτεΐνη. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αρκετές εφαρμογές των TASPs, τα οποία μιμούνται πρωτεΐνες, καταλυτικά κέντρα και το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας τάξεως I (MHC I), κ.λ.π.



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση ενός μακρομορίου TASP

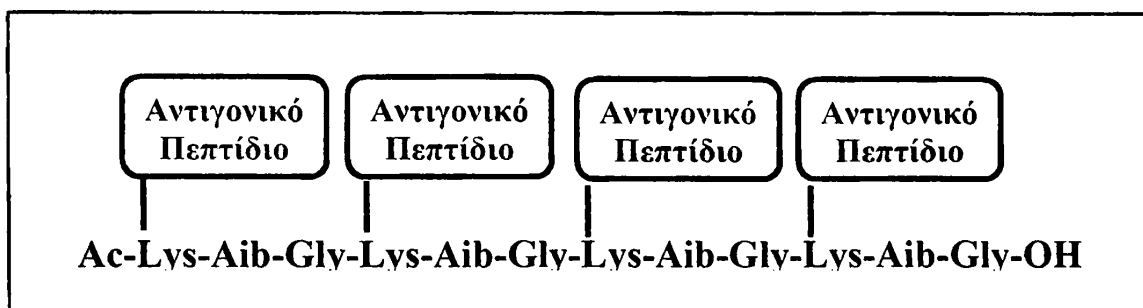
Δύο μεθοδολογίες έχουν εφαρμοστεί για τη σύνθεση των πρωτεϊνών: η βήμα προς βήμα στρατηγική σύνθεσης της πρωτεΐνης πάνω σε πολυμερικό υπόστρωμα (ρητίνη) ή η σύζευξη πεπτιδικών τμημάτων σε διάλυμα (συμπύκνωση πεπτιδικών τμημάτων). Μολονότι τα τελευταία χρόνια η πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση έχει παρουσιάσει σημαντικά βήματα ανάπτυξης και πρωτεΐνες με μήκος 100 αμινοξέων μπορούν να παρασκευαστούν, η συσσώρευση των παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια των πολλαπλών βημάτων σύζευξης καθιστούν τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος μια επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία. Η συμπύκνωση πεπτιδικών τμημάτων, έχει το πλεονέκτημα ότι τα πεπτιδικά τμήματα καθαρίζονται στην προστατευμένη τους μορφή, χαρακτηρίζεται όμως από τη μικρή διαλυτότητα των προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων και από τη μεγάλη τάση για ρακεμοποίηση που εμφανίζουν τα α-καρβοξυ-ενεργοποιημένα πεπτίδια. Πολλές από τις παραπάνω δυσκολίες μπορούν να αντιμετωπιστούν χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης.

### 2.3.3 Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers, SOC<sub>n</sub>)

Για την επίτευξη αποτελεσματικής ανοσοποίησης, όσον αφορά στη χρήση συνθετικών πεπτιδίων (επιτόπων) μικρού μοριακού βάρους έναντι της φυσικής πρωτεΐνης, απαιτείται η πρόσδεση του αντιγονικού πεπτιδίου σε ένα μόριο μεγάλου μοριακού βάρους. Αν και αντιγόνα προσδεδεμένα σε φυσικές πρωτεΐνες (BSA) ή σε MAPs προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων μετά από ανοσοποίηση, εν τούτοις εμφανίζουν σοβαρά μειονεκτήματα, όπως η παραγωγή αντισωμάτων έναντι του φορέα ή του μακρομορίου αντιγόνου-φορέα, καθώς και μεταβολές της αντιγονικής συμπεριφοράς του επιτόπου λόγω αλλαγής της ενεργού διαμόρφωσής του κατά την πρόσδεσή του στο φορέα. Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών συντέθηκαν φορείς αντιγονικών πεπτιδίων με επαναλαμβανόμενη πεπτιδική αλληλουχία, SOC<sub>s</sub>, επιδιώκοντας τη σταθεροποίηση της δευτεροταγούς δομής αυτών, για την καλύτερη δυνατή παρουσίαση και αντιγονική έκφραση του επιτόπου.

Ο συνθετικός φορέας πολλαπλών αντιγόνων SOC<sub>n</sub>-I, είναι αντιγονικά αδρανής, με προκαθορισμένη διαμόρφωση, τέτοια ώστε να επιβάλλει τον κατάλληλο για την αντιγονική έκφραση προσανατολισμό των συνδεδεμένων αντιγόνων στο χώρο. Ο φορέας SOC<sub>n</sub>-I αποτελείται από μια επαναλαμβανόμενη ακολουθία αμινοξέων, Lys-Aib-Gly (Σχήμα 3). Η εισαγωγή της Lys κρίθηκε αναγκαία για την ομοιοπολική πρόσδεση του επιτόπου στην ε-NH<sub>2</sub>

αυτής, η συμμετοχή του Aib είναι καθοριστική για την εισαγωγή της ελικοειδούς δομής του πεπτιδικού σκελετού και τέλος η Gly επιλέχθηκε λόγω του μικρού στερεοχημικού της όγκου. Οι επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς SOCn, βρέθηκαν ότι λαμβάνουν μια κανονική δευτεροταγή δομή επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο στα αντιγονικά ή/και ανοσογονικά πεπτίδια να διατηρούν τη φυσική «ενεργό» διαμόρφωσή τους, χωρίς να αλληλεπιδρούν ούτε μεταξύ τους, ούτε με το μόριο του φορέα.

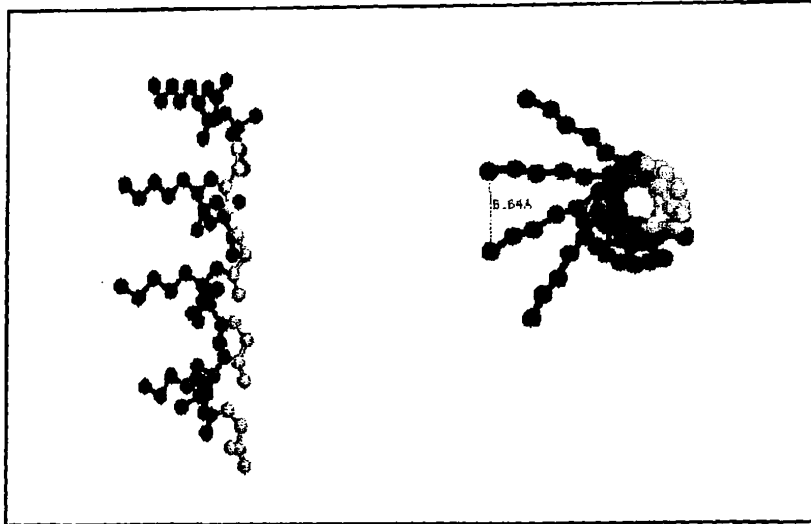


*Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση ενός μακρομορίου SOC<sub>4</sub>-I*

Η σύνθεση των SOCn γίνεται με τις αρχές της βήμα προς βήμα στρατηγικής σε στερεά φάση. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του φορέα (επιθυμητό μήκος), τα αντιγόνα εισάγονται στις ε-αμινομάδες των λυσινών, οι οποίες έχουν εισαχθεί στον φορέα σαν Boc-Lys(Fmoc)-OH ή σαν Fmoc-Lys(Mtt)-OH, σύμφωνα με την Boc- και Fmoc-μεθοδολογία της στερεάς φάσης αντίστοιχα. Το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη ρητίνη και αφού κατεργαστεί κατάλληλα, εξασφαλίζεται η μέγιστη δυνατή καθαρότητά του με RP-HPLC. Η πιστοποίηση της καθαρότητας αλλά και η ταυτοποίηση (χαρακτηρισμός) του προϊόντος γίνεται με αναλυτική HPLC, φασματομετρία μάζας και φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR.

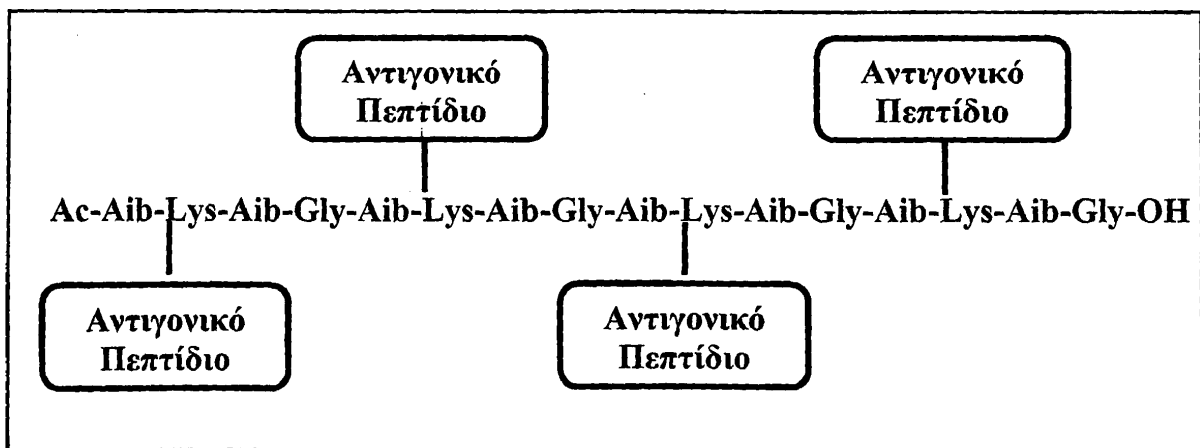
Διαμορφωτικές μελέτες με <sup>1</sup>H-NMR έδειξαν ότι ο φορέας προσλαμβάνει δομή 3<sub>10</sub>-κεκαμένης έλικας<sup>8,9</sup> (Σχήμα 4), καθώς επίσης και ότι οι παράπλευρες αλυσίδες των λυσινών κατευθύνονται προς την ίδια πλευρά της έλικας. Η δομή αυτή του φορέα διευκολύνει τα αντιγονικά ή/και ανοσογονικά πεπτίδια να διατηρούν την αρχική, φυσική " ενεργό " διαμόρφωσή τους, χωρίς να αλληλεπιδρούν ούτε μεταξύ τους ούτε με το μόριο του φορέα. Η κανονικότητα της δομής του μορίου του φορέα, καθώς και η απουσία διαμορφωτικών περιορισμών και στερικών παρεμποδίσεων<sup>8,9</sup>, ευνοούν μια βέλτιστη αναγνώριση από αντισώματα και δημιουργούν ισχυρά ανοσογόνα<sup>21,22</sup>.





**Σχήμα 4: Το  $SOC_4-I$  από δεδομένα NMR και Μοριακής Δυναμικής**

Ύστερα από μικρή τροποποίηση του φορέα  $SOC_n-I$  προέκυψε ο φορέας  $SOC_n-II$ , ο οποίος έχει βελτιωμένο ελικοειδή χαρακτήρα και οι παράπλευρες αλυσίδες των λυσινών προσανατολίζονται σε αντίθετες κατευθύνσεις στο χώρο, σε σύγκριση με τον φορέα  $SOC_n-I$ . Ο νέος αυτός φορέας αποτελείται από το επαναλαμβανόμενο τετραπεπτιδίο Aib-Lys-Aib-Gly και έχει αυξημένο ελικοειδή χαρακτήρα, που σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα αποδίδεται στη μεγάλη περιεκτικότητα της πεπτιδικής αλληλουχίας σε Aib, το οποίο ως γνωστό σταθεροποιεί ελικοειδείς δομές λόγω της διαμορφωτικής ακαμψίας που προκύπτει από την παρουσία δύο μεθυλενομάδων στο  $\alpha$ -άτομο του άνθρακα (Σχήμα 5). Η διαμορφωτική μελέτη του νέου αυτού φορέα έδειξε ότι λαμβάνει δομή κανονικής  $3_{10}$  έλικας λόγω αυξημένου ποσοστού Aib στην πεπτιδική αλληλουχία<sup>23</sup>.



**Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση ενός μακρομορίου  $SOC_4-II$**

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ**



### 3. ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

#### 3.1 Εισαγωγή

Ο όρος "πρωτεΐνη" προέρχεται από την ελληνική λέξη πρώτος ή πρωταρχικός, γεγονός που φανερώνει τη σημασία αυτής της ομάδας των μορίων. Οι πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τις πρωταρχικές λειτουργίες ενός ζωντανού κυττάρου.

Ο όρος «πεπτίδιο» προέρχεται από τη λέξη πέψη ή πεπτόνη (προϊόντα πέψης των πρωτεϊνών) και αναφέρεται σε μικρές ενώσεις, οι οποίες είναι αρκετά όμοιες με τις πρωτεΐνες, εκτός του ότι οι τελευταίες είναι ενώσεις με μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολυάριθμες βιολογικές και φυσιολογικές πορείες στους ζωντανούς οργανισμούς: συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία ως ορμόνες και νευροδιαβιβαστές, δρουν ως αντισώματα στο ανοσοποιητικό σύστημα και συμμετέχουν στη μεταφορά ποικίλων ουσιών διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών.

Η σύνθεση του διπεπτιδίου γλυκίνη-γλυκίνη (Gly-Gly) με υδρόλυση της δικετοπιπεραζίνης της γλυκίνης από τον E. Fischer<sup>1</sup> το 1901, θεωρείται ότι είναι η αρχή της χημείας των πεπτιδίων. Όμως, η πεπτιδική σύνθεση οδηγήθηκε σε ένα άλλο επίπεδο με την εισαγωγή της καρβοβενζόξυ ομάδας για την παροδική προστασία της αμινομάδας, το 1931 από τους M.Bergmann και L. Zerva. Στη συνέχεια ακολούθησε η ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού προστατευτικών ομάδων<sup>2,3</sup>, ενώ παράλληλα γίνονταν έρευνες για την ανακάλυψη νέων μεθόδων σύζευξης. Η σημαντικότερη καινοτομία σ' αυτή την κατεύθυνση ήταν η εισαγωγή της μεθόδου του καρβοδιϊμιδίου το 1955 από τους J.C.Sheehan και G.P.Hess<sup>4</sup> καθώς επίσης και από τον H.G.Khorana<sup>5</sup>.

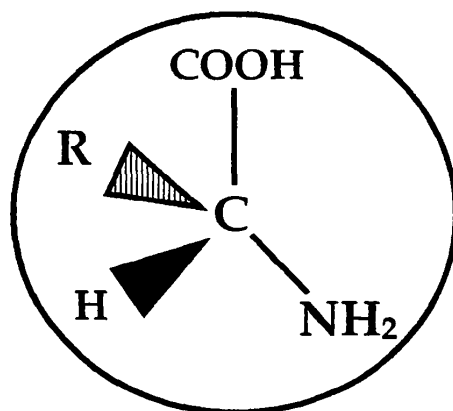
Η σημαντικότερη ανακάλυψη στην πεπτιδική σύνθεση έγινε το 1963, όταν ο B.Merrifield εισήγαγε τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)<sup>6</sup>. Σε αντίθεση με τη μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων σε υγρή φάση<sup>7-10</sup>, όπου μετά από κάθε αντίδραση το προϊόν είναι απαραίτητο να απομονωθεί και να καθαριστεί πριν από το επόμενο βήμα, στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση το πεπτίδιο συντίθεται πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερές βάσει μιας σειράς προσθετικών κύκλων. Έτσι, μετά από κάθε αντίδραση τα παραπροϊόντα απομακρύνονται εύκολα με έκπλυση και διήθηση. Λόγω της ταχύτητας και της απλότητας των επαναλαμβανομένων βημάτων, το μεγαλύτερο τμήμα της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση υπόκειται σε αυτοματοποίηση.



### 3.2 Αμινοξέα

Τα αμινοξέα (α-αμινοκαρβονικά οξέα), αποτελούν τα δομικά συστατικά των πρωτεϊνών, και είναι ιδιαίτερα σημαντικά ενδιάμεσα του μεταβολισμού. Πολλές από τις βιολογικές λειτουργίες του ζωντανού κυττάρου όπως, η πρωτεϊνόςύνθεση, η αναπαραγωγή, ο μεταβολισμός της γλυκόζης κ.α, ρυθμίζονται κυρίως από τη δράση των αμινοξέων και κατ' επέκταση των πεπτιδίων.

Τα αμινοξέα, όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, περιέχουν δύο λειτουργικές ομάδες: τη βασική αμινομάδα και την όξινη καρβοξυλομάδα. Και τα 20 είναι α-αμινοξέα, που σημαίνει ότι σε όλα η αμινομάδα αποτελεί υποκαταστάτη στο άτομο άνθρακα που βρίσκεται σε θέση α ως προς το καρβοξύλιο. Όλα τα φυσικά αμινοξέα, εκτός της προλίνης (Pro), είναι πρωτοταγείς αμίνες,  $RNH_2$ , και διαφέρουν μεταξύ τους μόνον ως προς τη φύση των υποκαταστατών στην πλευρική αλυσίδα. Η γενική σύνταξη των αμινοξέων φαίνεται στο Σχήμα 1.



*Σχήμα 1: Γενική σύνταξη των αμινοξέων*

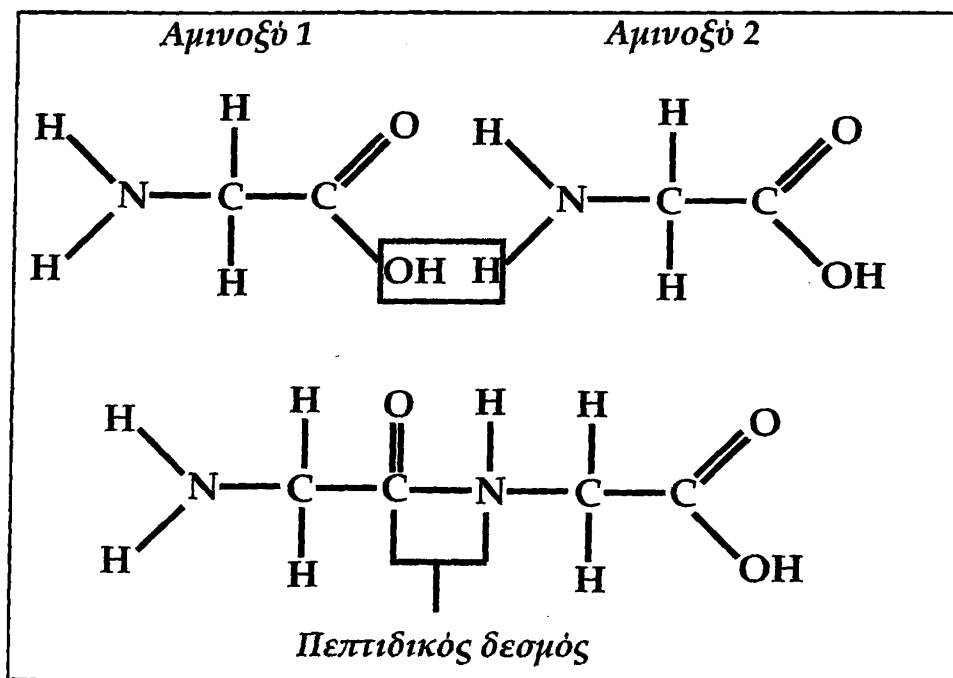
Η Pro είναι το μόνο κυκλικό αμινοξύ με δευτεροταγή αμινομάδα και στην οποία το άζωτο και τα α-άτομα άνθρακα αποτελούν τμήμα ενός πυρρολιδινικού δακτυλίου. Με εξαίρεση τη γλυκίνη (Gly), όλοι οι α-άνθρακες των αμινοξέων είναι ασύμμετρα κέντρα. Παρόλο που τα αμινοξέα μπορούν να υπάρξουν σε δύο εναντιομερείς μορφές, η φύση χρησιμοποιεί στη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών μόνο το ένα εναντιομερές. Λόγω της στερεοχημικής τους ομοιότητας με τα L σακχαρα, τα φυσικά αμινοξέα αναφέρονται και ως L-αμινοξέα.

Τα 20 συνήθη αμινοξέα μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω, ως ουδέτερα, όξινα ή βασικά, ανάλογα με τη δομή της πλευρικής αλυσίδας τους. Δεκαπέντε από τα 20 αμινοξέα έχουν ουδέτερες πλευρικές αλυσίδες, δύο διαθέτουν μια επιπλέον καρβοξυλική ομάδα (ασπαρτικό οξύ και γλουταμικό οξύ), ενώ τρία φέρουν στις πλευρικές αλυσίδες βασικές αμινομάδες (λυσίνη, αργινίνη και ιστιδίνη).

Και τα 20 αμινοξέα είναι απαραίτητα στην πρωτεϊνική σύνθεση, όμως ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να βιοσυνθέσει μόνο τα 10 από αυτά. Τα υπόλοιπα 10 ονομάζονται απαραίτητα αμινοξέα, γιατί ο οργανισμός πρέπει να τα αποκτήσει με τη διατροφή.

### 3.3 Πεπτιδικός δεσμός

Ο πεπτιδικός δεσμός<sup>11</sup> 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 νερού (Σχήμα 2) :

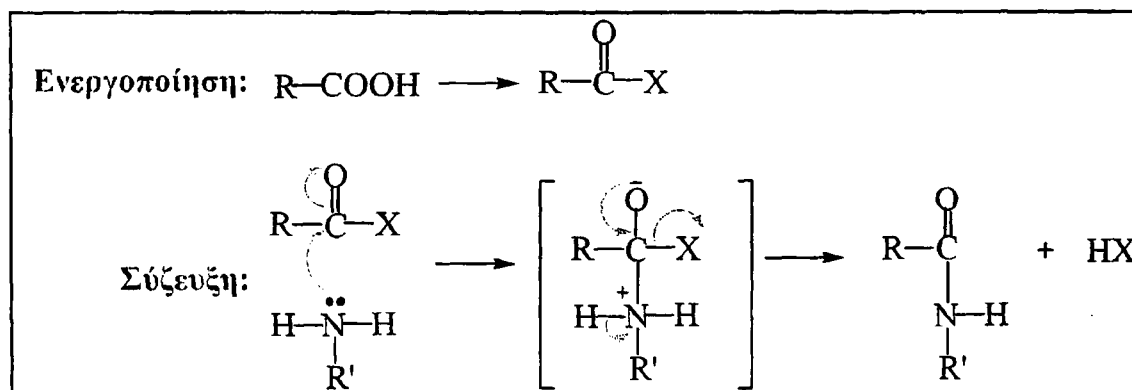


Σχήμα 2: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού

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 4 Kcal/mol).

Τα καρβοξυλικά οξέα αντιδρούν με αμίνες σε υψηλές θερμοκρασίες και μπορούν να παραχθούν αμίδια. Οι θερμοκρασίες όμως στις οποίες γίνονται τέτοιες αντιδράσεις δεν είναι κατάλληλες για τα πεπτίδια τα οποία είναι γενικά θερμοευαίσθητες ενώσεις. Επειδή, λοιπόν, η πεπτιδική σύνθεση απαιτεί ήπιες συνθήκες είναι απαραίτητο να ενεργοποιηθεί μια τουλάχιστον από τις δραστικές ομάδες των αμινοξέων. Κατά κύριο λόγο ενεργοποιείται το καρβοξύλιο του αμινοξέος με τη μετατροπή σε κάποιο παράγωγο καρβοξυλικού οξέος.

Η μετατροπή της καρβοξυλομάδας σε ένα ενδιάμεσο μεγάλης δραστικότητας (υψηλής ενέργειας) επιτυγχάνεται με υποκατάσταση του υδροξυλίου από έναν υποκαταστάτη (X) δέκτη ηλεκτρονίων (Σχήμα 3). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πολικότητας της καρβονυλικής ομάδας και επομένως του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του ατόμου άνθρακα. Έτσι γίνεται ευκολότερη η πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να ακυλιωθεί<sup>11</sup>.



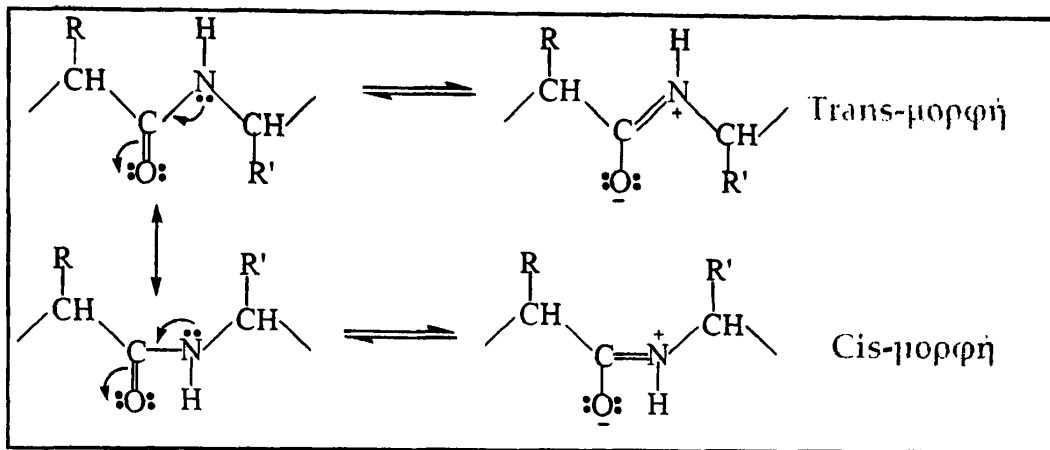
**Σχήμα 3:** Ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του N-τελικού αμινοξέος και πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας του αμινοξέος που θα ακυλιωθεί στην ενεργοποιημένη καρβονυλομάδα

Η σύνθεση, λοιπόν, ενός πεπτιδίου αποδεικνύεται μια σύνθετη και πολύπλοκη διαδικασία, αφού πρέπει να ληφθούν υπόψη σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα. Έτσι, λοιπόν, δεν αρκεί η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου για να πάρουμε το επιθυμητό προϊόν, καθώς οι πλευρικές δραστικές ομάδες είναι δυνατόν να λάβουν μέρος σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις και να οδηγήσουν στο σχηματισμό παραπροϊόντων και γι' αυτό πρέπει να προστατεύονται. Επίσης, απαιτείται παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος καθώς και του α-καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος. Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η επιλογή των μεθόδων που θα εφαρμοστούν για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού. Δεδομένου ότι τα αμινοξέα (εκτός από τη γλυκίνη) περιέχουν ένα ασύμμετρο α-άτομο άνθρακα θα πρέπει να ληφθούν μέτρα ώστε να αποφευχθεί κατά τη σύζευξη η ρακεμίωση, η οποία οδηγεί στη δημιουργία ανεπιθύμητων προϊόντων, που δύσκολα μπορούν να διαχωρισθούν με τις συνήθεις μεθόδους καθαρισμού. Είναι φανερό λοιπόν πως η σύνθεση των πεπτιδίων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και απαιτείται μεγάλη προσοχή στο σχεδιασμό και στη διεξαγωγή της.

### 3.4 Χαρακτηριστικά του πεπτιδικού δεσμού

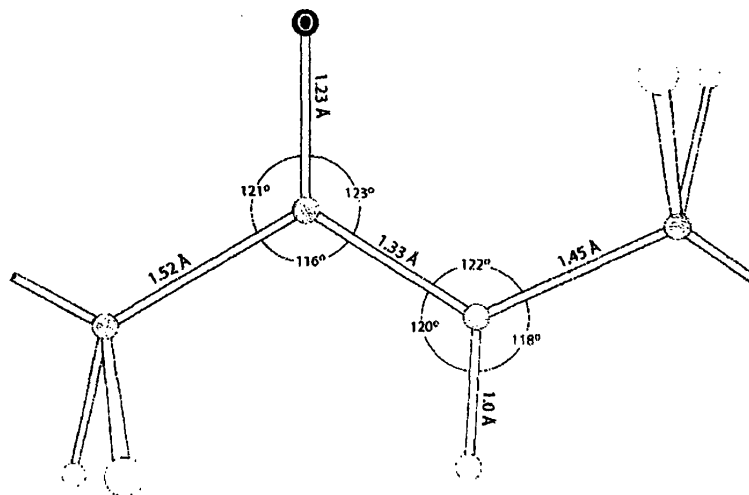
Στα τέλη της δεκαετίας του 1930 οι Linus Pauling και Robert Corey ξεκίνησαν κρυσταλλογραφικές μελέτες με ακτίνες X για τον προσδιορισμό της λεπτομερούς δομής των αμινοξέων και των πεπτιδίων. Μια σημαντική ανακάλυψη ήταν ότι η πεπτιδική ομάδα αποτελεί μια *άκαμπτη και επίπεδη μονάδα*. Δεν υπάρχει ελεύθερη περιστροφή γύρω από το δεσμό του καρβονυλικού ατόμου του άνθρακα και του αζώτου (πεπτιδικός δεσμός), καθώς ο αμιδικός δεσμός έχει μερικώς χαρακτήρα διπλού δεσμού, ο οποίος οφείλεται στον παρακάτω συντονισμό (Σχήμα 4):

Ο περιορισμός της ελεύθερης περιστροφής γύρω από τον πεπτιδικό δεσμό C-N είναι αποτέλεσμα της μεσομέρειάς του, η οποία οδηγεί στην ύπαρξη δύο ισομερών μορφών, των *cis* και *trans*. Περισσότερο σταθερή είναι η *trans*-μορφή, καθότι υπάρχει ένα αξιοσημείωτα υψηλό ενεργειακό φράγμα μεταξύ των δύο μορφών. Στα πεπτίδια και στις πρωτεΐνες υπερισχύει γενικά η *trans*-μορφή με εξαίρεση την προλίνη και τα N-μεθυλιωμένα αμινοξέα (πχ. σαρκοσίνη), για τα οποία ο πεπτιδικός δεσμός, στον οποίο συμμετέχει η δευτεροταγής αμινομάδα, είναι δυνατόν να έχει την *cis* ή την *trans* διαμόρφωση<sup>12,13</sup>. Επίσης, *cis* ισομερείς μορφές απαντώνται κατά ανάγκη στις δικετοπιπεραζίνες, οι οποίες είναι τα απλούστερα κυκλικά πεπτίδια που σχηματίζονται από δύο αμινοξέα.



**Σχήμα 4: Μεσομέρεια των cis και trans μορφών του πεπτιδικού δεσμού**

Στον πεπτιδικό δεσμό, το μήκος του δεσμού C-N είναι  $1.32 \text{ \AA}$ , δηλαδή μεταξύ ενός απλού δεσμού C-N και ενός διπλού δεσμού C=N ( $1.27 \text{ \AA}$ ). Αντίθετα, ο δεσμός μεταξύ ενός ατόμου α-άνθρακα και του άνθρακα του καρβονυλίου είναι καθαρά απλός δεσμός. Ο δεσμός μεταξύ ατόμου α-άνθρακα και του αζώτου του πεπτιδίου είναι επίσης απλός δεσμός (Σχήμα 5).



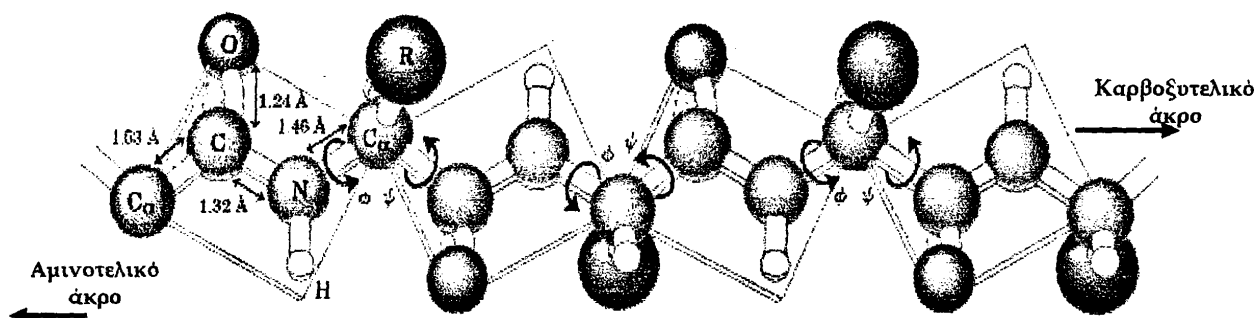
**Σχήμα 5: Μήκη δεσμών σε ένα διπεπτίδιο**

Αντίθετα με τον πεπτιδικό δεσμό, υπάρχει πλήρης (θεωρητικά) ελευθερία περιστροφής γύρω από τους δύο απλούς δεσμούς του α-άνθρακα με το άζωτο της α-αμινομάδας και τον άνθρακα της καρβοξυλομάδας. Η κύρια αλυσίδα, λοιπόν, μπορεί να περιστραφεί από τη μία ή από την άλλη πλευρά της άκαμπτης πεπτιδικής ομάδας. Η στροφή του δεσμού μεταξύ του





αζώτου και του α-άνθρακα στην κύρια αλυσίδα ονομάζεται διεδρη γωνία  $\phi$  και η στροφή μεταξύ του α-άνθρακα και του καρβονυλικού ατόμου άνθρακα λέγεται γωνία  $\psi$ . Όταν είναι γνωστές οι τιμές των γωνιών στρέψης  $\phi$  και  $\psi$ , είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με απόλυτη ακρίβεια η στερεοδιάταξη της κύριας πεπτιδικής αλυσίδας (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Οι γωνίες  $\phi$  και  $\psi$  ενός πεπτιδίου

### 3.5 Αρχές πεπτιδικής σύνθεσης

Η σύνθεση πεπτιδίων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και απαιτεί μεγάλη προσοχή στο σχεδιασμό της, όσον αφορά στην επιλογή κατάλληλων προστατευτικών ομάδων και συνθηκών, ώστε να είναι επιτυχές το αποτέλεσμα. Μια επιτυχής, λοιπόν, πεπτιδική σύνθεση προϋποθέτει:

1) Παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος με κατάλληλη ομάδα X που μειώνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της ομάδας πρέπει να είναι η σταθερότητα της κατά τη διάρκεια της σύζευξης και η ευκολία απομάκρυνσής της κάτω από συνθήκες που δεν καταστρέφουν τον πεπτιδικό δεσμό. Επίσης, οι προστατευτικές αυτές ομάδες X πρέπει να μην αλλοιώνουν τη στερεοχημεία του αμινοξέος ή του πεπτιδίου. Κοινό στοιχείο όλων των α-αμινοπροστατευτικών ομάδων είναι ότι ανήκουν στην τάξη των καρβαμιδικών εστέρων – ουρεθάνες. Αυτό συμβαίνει γιατί έχει παρατηρηθεί ότι τέτοιου είδους ομάδες ελαχιστοποιούν τη ρακεμίσωση. Οι κυριότερες α-αμινοπροστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται ευρέως στην πεπτιδική σύνθεση είναι:

- η t-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc)<sup>2,14</sup>,
- η 9-φλουορενυλο-μεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc)<sup>3</sup>,
- η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z)<sup>15</sup>,
- η τριφαινυλμεθυλομάδα (Ttt)<sup>16-18</sup>,
- η αλλυλοξυκαρβονυλομάδα (Alloc)<sup>19,20</sup> κ.λ.π.

2) Παροδική προστασία του α-καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος με τη χρήση κατάλληλης ομάδας. Ο γενικός τρόπος για την προστασία της καρβοξυλομάδας είναι η μετατροπή της σε εστερομάδα (μεθυλ, αιθυλ, βενζυλ ή t-βουτυλ-εστέρας). Η προστασία της α-καρβοξυλομάδας δεν είναι απαραίτητη κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση αφού η καρβοξυλομάδα του C-τελικού αμινοξέος είναι συζευγμένη πάνω στο πολυμερές, χρησιμοποιείται όμως ευρύτατα στη σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση.

3) Παροδική προστασία των δραστικών ομάδων στις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων. Τέτοιες δραστικές ομάδες είναι: η ε-NH<sub>2</sub> της λυσίνης, το β-COOH του ασπαρτικού, η -SH της κυστεΐνης, η -OH της σερίνης και της τυροσίνης, η γουανιδινομάδα της αργινίνης, κ.λ.π.

4) Σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού. Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού απαιτεί την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του N-τελικού αμινοξέος και την ακόλουθη σύζευξη με την αμινομάδα του άλλου αμινοξέος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κυρίως για αυτήν την ενεργοποίηση είναι: η χρήση των αντιδραστηρίων σύζευξης, η μέθοδος των ενεργών εστέρων, η μέθοδος των ανυδριτών, των αζιδίων και των χλωριδίων.

5) Απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης απομακρύνονται οι προστατευτικές ομάδες σε συνθήκες που δεν καταστρέφονται οι πεπτιδικοί δεσμοί και το πεπτίδιο λαμβάνεται σε ελεύθερη μορφή.

Η σύνθεση των πεπτιδίων μπορεί να επιτευχθεί είτε σε υγρή, είτε σε στερεή φάση. Η σύνθεση μεγάλων πεπτιδικών αλυσίδων σε υγρή φάση με προσθήκη ενός αμινοξέος κάθε φορά αποτελεί μία χρονοβόρα και ιδιαίτερα επίπονη διαδικασία, ενώ παράλληλα παρουσιάζει και προβλήματα διαλυτότητας και μικρής απόδοσης. Η πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης εισήχθη από τον Bruce Merrifield<sup>6,15</sup> με στόχο να ξεπεραστούν πολλά από τα προβλήματα της σύνθεσης πεπτιδίων σε υγρή φάση.

### 3.6 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση

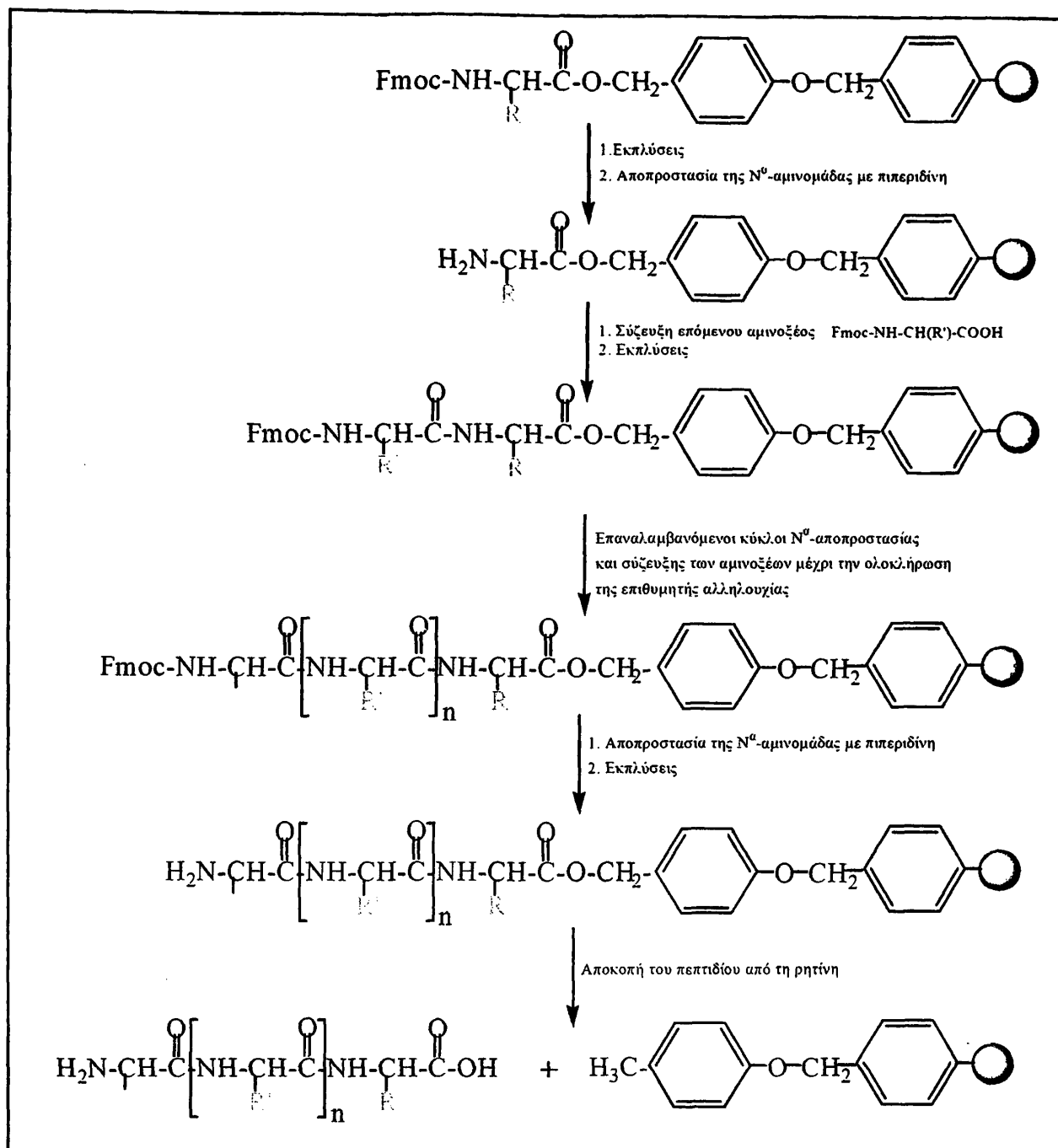
Κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεή φάση (κατά Merrifield) το πεπτίδιο συντίθεται πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερές υπόστρωμα (ρητίνη). Το C-τελικό αμινοξύ προσδένεται πάνω στην ρητίνη, ενώ η N<sup>α</sup>-αμινομάδα του και η παράπλευρη αλυσίδα του, αν αυτό είναι απαραίτητο, είναι κατάλληλα προστατευμένες. Η πεπτιδική σύνθεση από το σημείο αυτό και μετά συνεχίζεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους αποπροστασίας της N<sup>α</sup>-αμινομάδας και σύζευξης του επόμενου κατάλληλα προστατευμένου αμινοξέος. Με τον τρόπο αυτό το επιθυμητό πεπτίδιο συντίθεται πάνω στη ρητίνη από το C-τελικό προς το



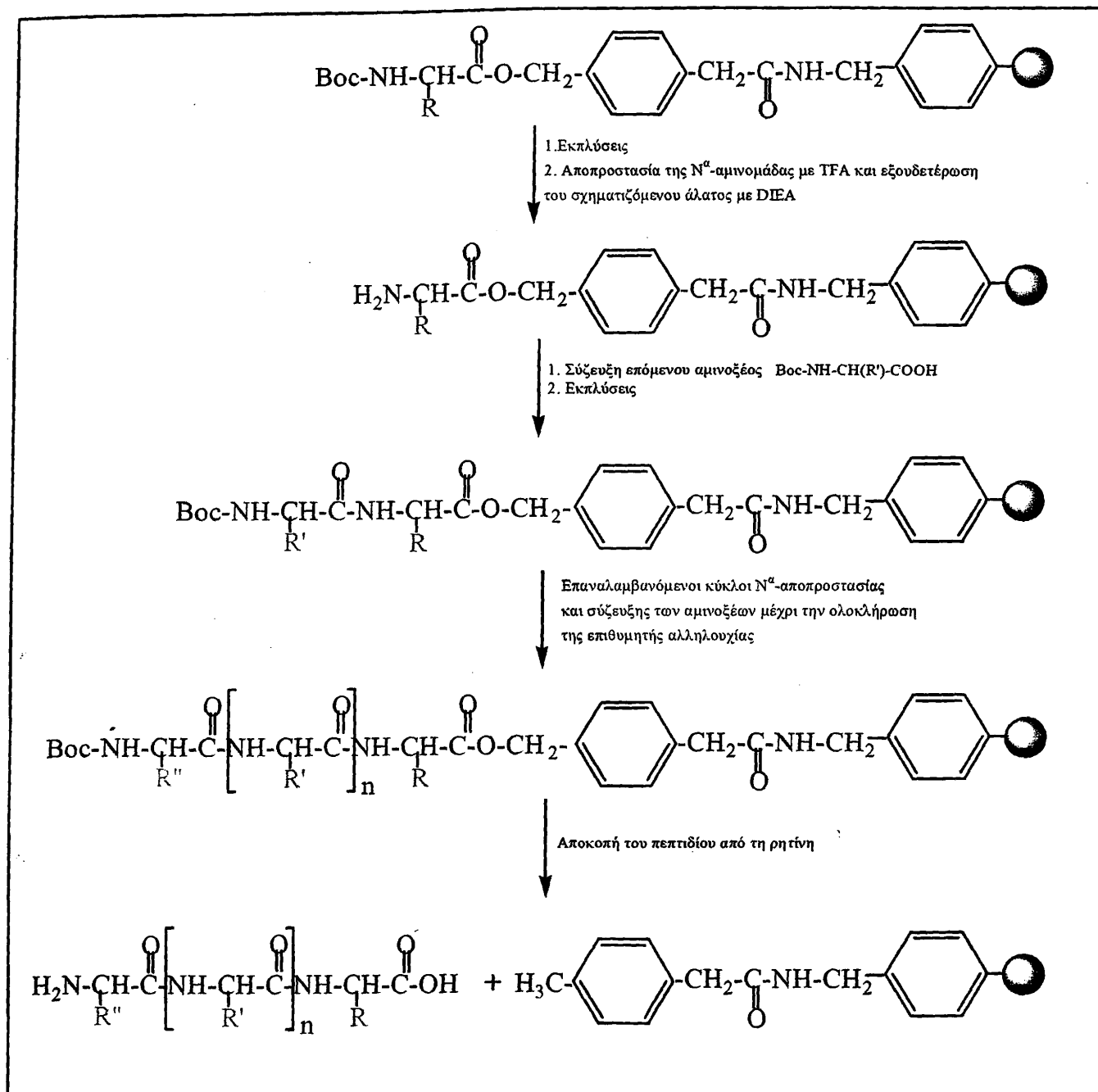
N-τελικό άκρο (C→N στρατηγική). Επειδή το πεπτίδιο μένει συνδεδεμένο πάνω στην αδιάλυτη ρητίνη, η περίσσεια των αντιδραστηρίων σύζευξης και τα παραπροϊόντα απομακρύνονται εύκολα με έκπλυση της ρητίνης με κατάλληλους διαλύτες και διήθηση αυτών. Όταν η σύνθεση ολοκληρωθεί το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη ρητίνη με τη χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται υψηλή απόδοση του επιθυμητού προϊόντος και ελάχιστη ή καθόλου ρακεμοποίηση αυτού.

Για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν δύο ειδών στρατηγικές. Η Fmoc (Σχήμα 7) και η Boc (Σχήμα 8) στρατηγική. Εφόσον ολοκληρωθεί η σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου και αφού επιλεγεί το κατάλληλο αντιδραστήριο αποκοπής από την ρητίνη επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων και η αποκοπή του πεπτιδίου από το πολυμερές.

Με τη μεθοδολογία αυτή είναι δυνατόν να συντεθούν μεγάλα πεπτίδια σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα και σε ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας, ενώ δεν προκύπτουν προβλήματα διαλυτότητας ενδιάμεσων προϊόντων, καθότι το πεπτίδιο παραμένει προσδεδεμένο στη ρητίνη καθόλη τη διάρκεια της σύνθεσης.



**Σχήμα 7:** Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με την Fmoc-στρατηγική σε ρητίνη Wang (p-αλκοξυβενζολοξοβενζυλ-ρητίνη) με προσδεμένο το πρώτο αμινοξύ στο στερεό πολυμερές



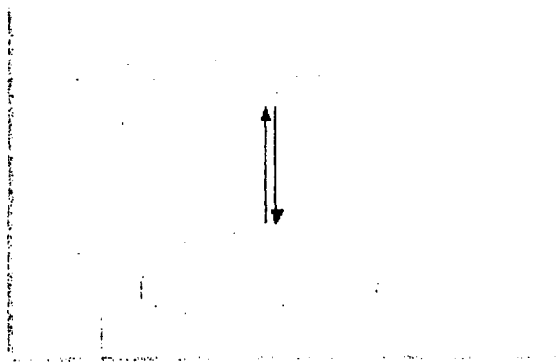
**Σχήμα 8:** Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με την Boc-στρατηγική σε ρητίνη Pam (φαινολοακεταμιδομεθολ-ρητίνη)

### 3.6.1 Το στερεό πολυμερές

Για να χρησιμοποιηθεί ένα στερεό πολυμερές στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- 1) Πρέπει να είναι χημικώς αδρανές σ' όλον τον κύκλο της σύνθεσης και να μην αλληλεπιδρά με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και διαλύτες.
- 2) Τα σωματίδια του πολυμερούς να είναι κατάλληλου σχήματος και μεγέθους ώστε να επιτρέπουν τη διόγκωσή του με κατάλληλους διαλύτες για την ευκολότερη διάχυση των αντιδραστηρίων και την εύκολη απομάκρυνση της περίσσειας αυτών και των παραπροϊόντων με απλή έκπλυση και διήθηση.
- 3) Να είναι αδιάλυτο σε όλα τα αντιδραστήρια και τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης.
- 4) Να φέρει δραστική ομάδα που θα επιτρέπει την ποσοτική σύζευξη του πρώτου αμινοξέος μέσω ομοιοπολικού δεσμού και τέλος να αποσπάται εύκολα στο τέλος της σύνθεσης.

Η διόγκωση του πολυμερούς είναι αναγκαία, έτσι ώστε τα σημεία στα οποία ανοικοδομείται η πεπτιδική αλυσίδα να είναι εύκολα προσβάσιμα (Σχήμα 9).

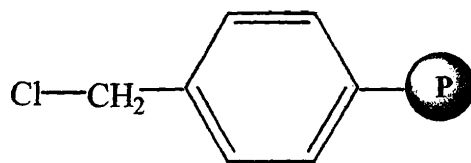


**Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση διόγκωσης και συρρίκνωσης ρητίνης με εφαρμογή κατάλληλου διαλύτη**

Η πρώτη ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση ήταν η ρητίνη του Merrifield, η οποία αποτελεί ακόμη ένα από τα κύρια πολυμερικά υποστρώματα για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση. Η ρητίνη Merrifield αποτελεί τη βάση για περαιτέρω ανάπτυξη με αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να έχουν παραχθεί πολλές νέες ρητίνες με ποικίλες ιδιότητες.

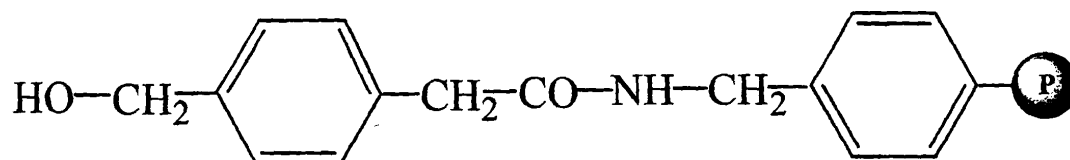
Παρακάτω αναφέρονται τα κυριότερα πολυμερικά υποστρώματα που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση.

### ● Ρητίνη του Merrifield



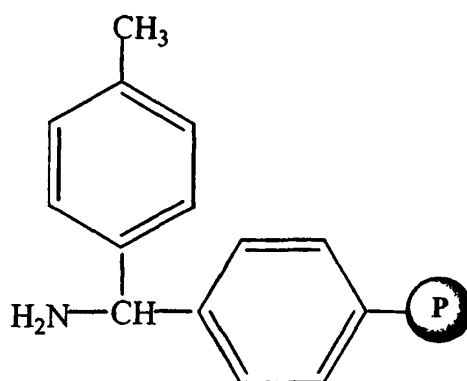
Η ρητίνη του Merrifield<sup>21,22</sup> είναι ένα χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου που φέρει ομάδες βενζυλο-χλωριδίου. Χρησιμοποιείται σύμφωνα με την Boc-στρατηγική για τη σύνθεση μικρού ή μεσαίου μεγέθους πεπτιδίων καθώς ο εστερικός δεσμός του πεπτιδίου με τη ρητίνη δεν είναι πολύ σταθερός σε επαναλαμβανόμενη κατεργασία με TFA. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη γίνεται με τη χρήση ισχυρών οξέων (συνήθως HF) και το πεπτίδιο λαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο. Ένα βασικό μειονέκτημα της ρητίνης Merrifield είναι η δυσκολία στην προσκόλληση του C-τελικού αμινοξέος.

### ● Pam Ρητίνη



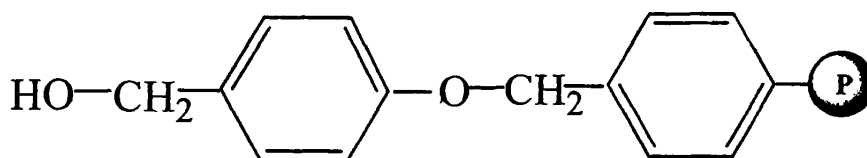
Η Pam ρητίνη<sup>23,24</sup> (φαινυλοακεταμιδομεθυλ-ρητίνη) χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων. Η παρουσία της ηλεκτρονιοελκτικής ακεταμιδομάδας στην πάρα θέση του βενζολικού δακτυλίου αυξάνει τη σταθερότητα του εστερικού δεσμού<sup>25</sup> σχεδόν 100 φορές περισσότερο από την ρητίνη του Merrifield. Κατά συνέπεια μειώνονται οι απώλειες κατά το στάδια της αποπροστασίας. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη γίνεται με HF και το C-τελικό αμινοξύ του πεπτιδίου λαμβάνεται στην καρβοξυλική του μορφή.

### ● MBHA Ρητίνη



Η MBHA (4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη) ρητίνη<sup>26</sup> χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη σύνθεση πεπτιδίων με την Boc-στρατηγική. Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από την MBHA ρητίνη είναι δυνατή χρησιμοποιώντας άνυδρο HF, ενώ το C-τελικό άκρο του πεπτιδίου λαμβάνεται στην αμιδική του μορφή.

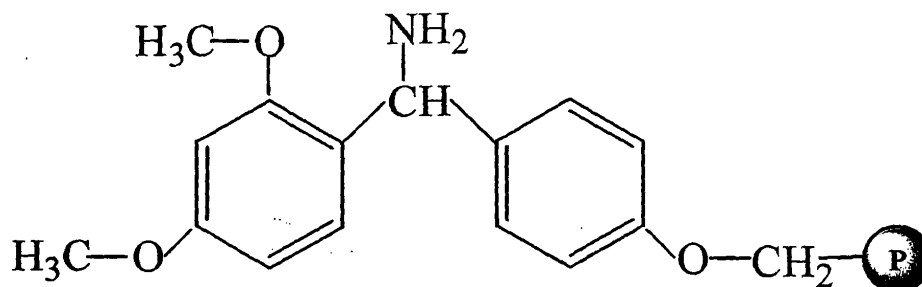
### ● Wang ρητίνη



Η Wang ρητίνη (p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη)<sup>27-29</sup> χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων με την Fmoc-στρατηγική. Το πεπτίδιο προσδένεται στο στερεό πολυμερές μέσω εστερικού δεσμού που έχει έναν αλκόξυ ηλεκτρονιοδότη υποκαταστάτη στην πάρα θέση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η αποκοπή του πεπτιδίου να λαμβάνει χώρα κάτω από ήπιες συνθήκες (κατεργασία με TFA) και στο τέλος το πεπτίδιο παραλαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο.

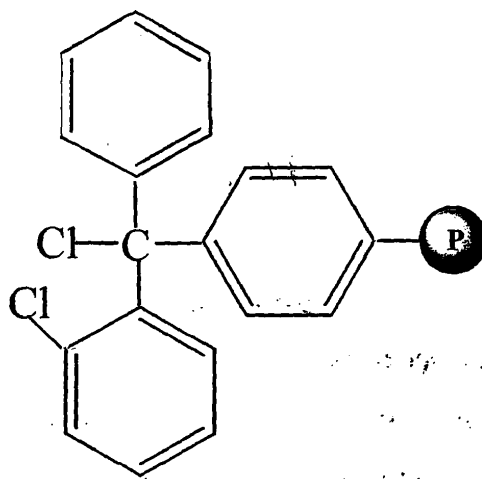


● Rink amide ρητίνη



Η Rink amide {4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ) αμινομεθυλ]-φαινοξυ} ρητίνη<sup>30,31</sup> χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδικών αμιδίων με την Fmoc-στρατηγική. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη γίνεται με χαμηλές συγκεντρώσεις TFA.

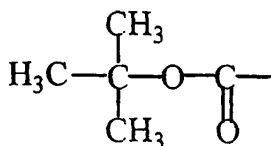
● 2-χλωροτρίτυλο ρητίνη



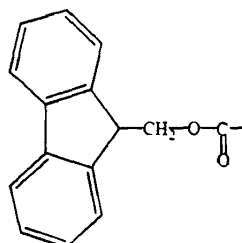
Η 2-χλωροτρίτυλο ρητίνη<sup>32,33</sup> χρησιμοποιείται στην Fmoc-στρατηγική. Η μεγάλη ευαισθησία της στα οξέα, επιτρέπει την απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη με κατεργασία με 1 % TFA ή AcOH/TFE/DCM (1:2:7) δίνοντας πεπτίδια με το C-τελικό αμινοξύ στην καρβοξυλική του μορφή. Το συνδεδεμένο στο πολυστυρόλιο 2-χλωρο-τριφαινυλο μεθυλοχλωρίδιο παρουσιάζει μεγάλη στερεοχημική παρεμπόδιση αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό δικετοπιπεραζίνης<sup>34</sup>. Ένα επιπλέον προτέρημα αυτής της ρητίνης είναι η απευθείας σύνδεση του πρώτου αμινοξέος με ήπιες συνθήκες (DIEA/DCM) και ο μικρός χρόνος σύζευξης. Οι συνθήκες αυτές αποτρέπουν τη ρακεμίσωση αμινοξέων όπως της ιστιδίνης και της κυστεΐνης και καθιστούν τη χρήση της ρητίνης απλή και εύκολη.

### 3.6.2 Προστασία-Αποπροστασία α-αμινομάδας

Η προστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων και των πεπτιδίων που θα αντιδράσουν για να σχηματίσουν τον πεπτιδικό δεσμό κρίνεται απαραίτητη ώστε να αποφεύγεται η εμπλοκή της ομάδας αυτής σε παράπλευρες αντιδράσεις και στη δημιουργία παραπροϊόντων. Όλα αυτά τα χρόνια που μελετάται η πεπτιδική σύνθεση, έχει προταθεί μια πληθώρα προστατευτικών ομάδων. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιημένες ομάδες για την προστασία των α-αμινομάδων είναι η tert-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc) και η 9-φλουορενυλομεθυλοκαρβονυλομάδα (Fmoc).

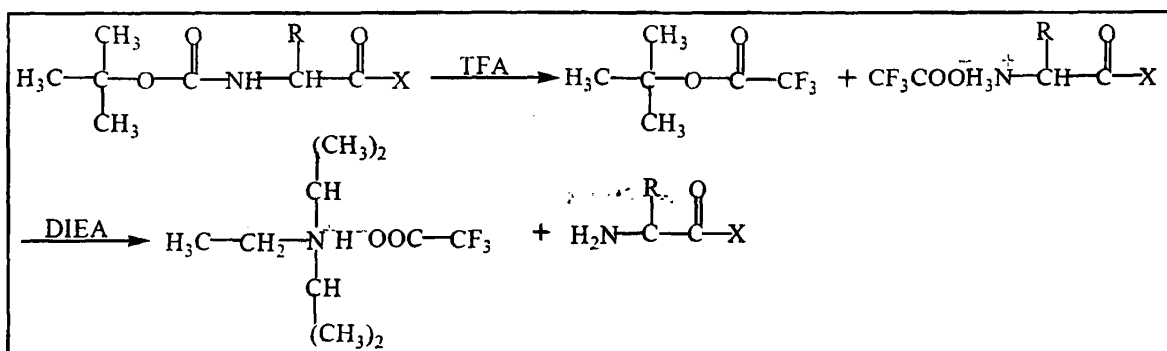


Boc



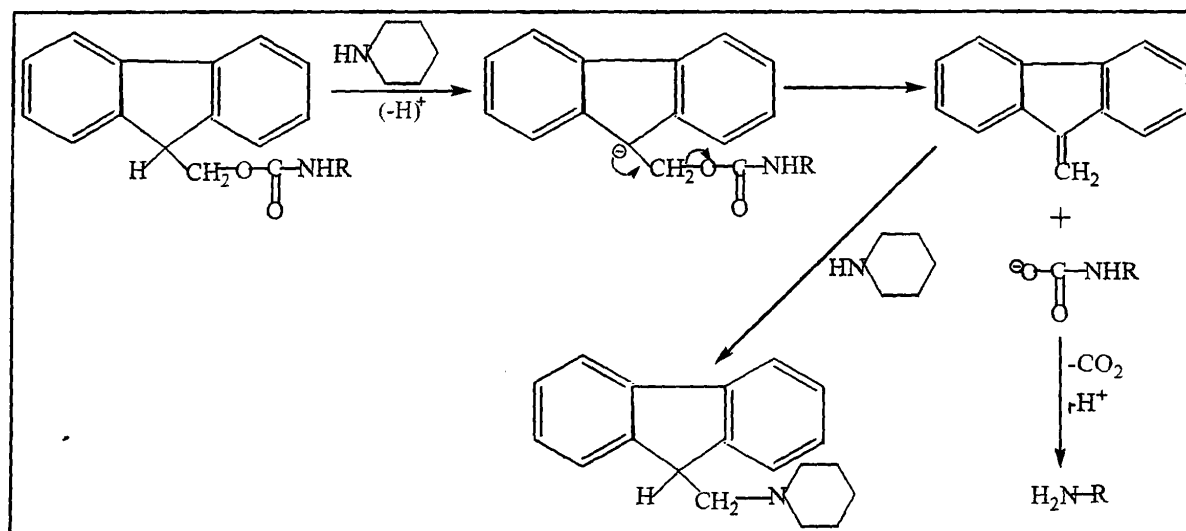
Fmoc

Η Boc ομάδα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στα οξέα με συνέπεια η απομάκρυνση της να γίνεται με κατεργασία με ασθενή οξέα όπως το τριφθοροξικό οξύ. Αρχικά, γίνεται κατεργασία για 3 λεπτά για την απομάκρυνση των μεγαλύτερων ποσοτήτων των καρβοκατιόντων που σχηματίζονται και στη συνέχεια για 12 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί η ποσοτική απομάκρυνση της Boc-ομάδας. Η αποπροστασία της N<sup>α</sup>-αμινομάδας με τις παραπάνω συνθήκες έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία τριφθοροξικού άλατος. Για την εξουδετέρωση του σχηματιζόμενου άλατος του τριφθοροξικού χρησιμοποιείται διάλυμα δύσοπροπυλαιθυλαμίνης (DIEA) σε DCM (7-10% v/v) (Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Αντίδραση απομάκρυνσης της Boc-προστατευτικής ομάδας

Αντίστοιχα, η απομάκρυνση της Fmoc ομάδας είναι εφικτή παρουσία ασθενών βάσεων σε ήπιες συνθήκες, συνήθως με κατεργασία με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF. Η Fmoc ομάδα απομακρύνεται από την αμινο ομάδα με απόσπαση πρωτονίου παρουσία δευτεροταγών αμινών (Σχήμα 11). Δημιουργείται ένα καρβαμδικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια απελευθερώνει διοξείδιο του άνθρακα και παρέχει την ελεύθερη αμίνη. Το κυριότερο πλεονέκτημα της Fmoc προστατευτικής ομάδας είναι το γεγονός ότι οι αμινομάδες λαμβάνονται στην αποπρωτονιωμένη μορφή και όχι πρωτονιωμένες όπως συμβαίνει κατά την αποπροστασία ομάδων με επίδραση οξέων.



Σχήμα 11: Αντίδραση απομάκρυνσης της Fmoc-προστατευτικής ομάδας

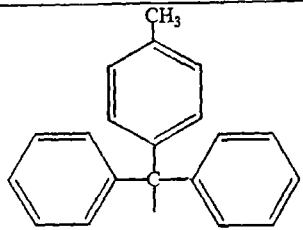
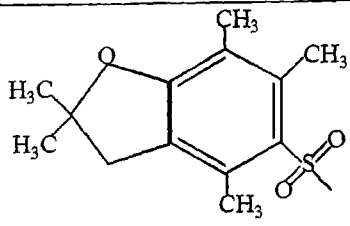
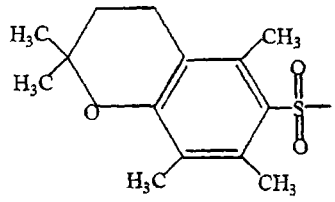
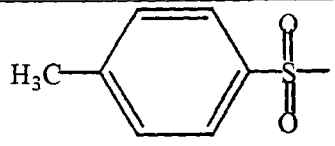
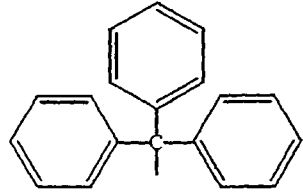
### 3.6.3 Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων

Κατά την πεπτιδική σύνθεση πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η σωστή επιλογή της προστασίας των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων που θα χρησιμοποιηθούν, ώστε να αποφευχθούν παράπλευρες ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Η επιλογή αυτών βασίζεται στη στρατηγική που θα ακολουθηθεί, στη μέθοδο σύζευξης, στη διαλυτότητα του αμινοξέος καθώς επίσης και στην αλληλουχία του σχηματιζόμενου πεπτιδίου. Οι ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων θα πρέπει να είναι σταθερές κατά την πορεία επιμήκυνσης της αλυσίδας, επομένως θα πρέπει να μην είναι ευαίσθητες στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την αποπροστασία των α-αμινομάδων και να απομακρύνονται μόνο στο τέλος της πεπτιδικής σύνθεσης.

Οι συνηθέστερες προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση φαίνονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Οι συνηθέστερες προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση

Προστατευτική ομάδα	Συντομογραφία	Τύπος
Acetamidomethyl Ακεταμιδομάδα	Acn	
Allyloxycarbonyl Αλλυλοξυκαρβόνυλο	Alloc	
Benzyl Βενζυλομάδα	Bzl	
Benzyloxy Βενζυλοξυομάδα	OBzl	
Benzyloxycarbonyl Βενζυλοξυκαρβονυλο	Z	
t-Butoxycarbonyl t-Βουτοξυκαρβονυλο	Boc	
t-Butoxy t-Βουτοξυ	t-BuO	
Benzyloxymethyl Βενζυλοξυμεθυλο	Bom	
2,4-Dinitrophenyl 2,4-Δινιτροφαινυλομάδα	Dnp	
Fluorenylmethoxycarbonyl Φλουορενυλμεθοξυκαρβόνυλο	Fmoc	

<p>4-Methyltrityl 4-Μεθυλοτριτυλο</p>	Mtt	
<p>2,2,4,6,7-Pentamethyl- dihydrobenzofurane-5-sulfonyl 2,2,4,6,7-Πενταμεθυλο- διϋδροφουράνο-5-σουλφόνυλο</p>	Pbf	
<p>2,2,5,7,8-Pentamethyl- chromane-6-sulfonyl 2,2,5,7,8 Πενταμεθυλο- χρωμανο-6-σουλφόνυλο</p>	Pmc	
<p>Tosyl Τοζυλ</p>	Tos	
<p>Trityl Τριτυλο</p>	Trt	

### 3.6.4 Ορθογωνική προστασία

Η ορθογωνική προστασία αναφέρεται στην ύπαρξη πολλών προστατευτικών δραστικών ομάδων στο ίδιο μόριο όπου η αποπροστασία της κάθε μίας γίνεται ανεξάρτητα της άλλης<sup>35,36</sup>. Για παράδειγμα, η αλλυλοξυκαρβονυλομάδα (Alloc) στην ε-NH<sub>2</sub> της λυσίνης και η tert-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc) στην α-NH<sub>2</sub>, όπως και ο βενζυλεστέρας στο β-καρβοξύλιο του ασπαρτικού οξέος και ο t-βουτυλόξυκαρβονυλο καρβαμιδικός εστέρας της α-αμινομάδας του ίδιου αμινοξέος, αποτελούν ορθογωνική προστασία γιατί η κάθε μία μπορεί να αποχωριστεί από το ασπαρτικό οξύ χωρίς να επηρεάζεται η άλλη. Οι συνηθέστερες ορθογωνικές προστασίες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης δίνονται στο παράρτημα (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2: Οι συνηθέστερες ορθογωνικές προστασίες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης**

Αμινοξύ	Boc-στρατηγική	Fmoc-στρατηγική
Arg	Mts <sup>37</sup> , Tos <sup>38</sup>	Mtr <sup>39,40</sup> , Pbf <sup>41</sup> , Pmc <sup>42</sup>
Asn, Gln	Trt <sup>43-45</sup> , Xan <sup>46</sup>	Trt
Asp, Glu	OBzl <sup>47</sup> , Alloc, OcHx <sup>48</sup>	OtBu <sup>49</sup> , OAllyl <sup>50</sup>
Cys	Acm <sup>51</sup> , Trt, pMeBzl <sup>52</sup>	Acm, tBu, Trt <sup>53</sup>
His	Bom <sup>54</sup> , Tos <sup>55</sup> , Dnp <sup>56</sup> , Trt	Boc <sup>57</sup> , Trt <sup>58</sup>
Lys	Fmoc, Z <sup>59</sup> , 2-Cl-Z <sup>60</sup>	Boc, Alloc <sup>60</sup> , ivDde <sup>61</sup>
Ser, Thr	Bzl <sup>62</sup>	TBu
Trp	For <sup>63</sup> , Mts	Boc
Tyr	Bzl, 2,6-Di-Cl-Bzl, 2-Br-Z	TBu

### 3.6.5 Σχηματισμός αμιδικού δεσμού-Αντιδραστήρια σύζευξης

Ένα από τα σημαντικότερα βήματα στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση είναι η σύζευξη, δηλαδή η αντίδραση μεταξύ δύο αμινοξέων και ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού. Οι κύριες μέθοδοι για τη δημιουργία πεπτιδικού δεσμού είναι η μέθοδος των αζιδίων, των καρβοδιμιδίων, των ανυδριτών και των αντιδραστηρίων σύζευξης. Οι κυριότεροι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή της μεθόδου σύζευξης κατά τη σύνθεση πεπτιδίων είναι:

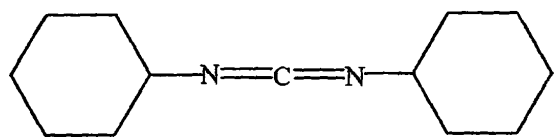
- α) ο γρήγορος σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού
- β) η υψηλή απόδοση
- γ) η απουσία παράπλευρων αντιδράσεων
- δ) η απλή διαδικασία καθαρισμού του προϊόντος και
- ε) ο περιορισμός της ρακεμίσωσης.

Μια ευρέως χρησιμοποιημένη τεχνική για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού είναι η χρήση των αντιδραστηρίων σύζευξης. Τα αντιδραστήρια σύζευξης είναι ενώσεις που προστίθενται στο μίγμα ενός N<sup>α</sup>-προστατευμένου αμινοξέος με ελεύθερη καρβοξυλομάδα και ενός δεύτερου αμινοξέος με ελεύθερη αμινομάδα. Η χρήση τους είναι ευρύτατη λόγω της απλότητάς τους και της μεγάλης ταχύτητας δράσης τους στην αντίδραση σύζευξης. Παρακάτω αναφέρονται συγκεντρωτικά οι κυριότερες κατηγορίες αντιδραστηρίων σύζευξης:

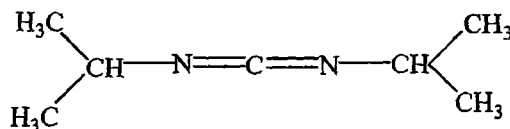


## ● Καρβοδιϊμίδια

Το N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο, γνωστό ως DCC<sup>4,64</sup> αποτελεί ένα κλασικό αντιδραστήριο σύζευξης για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού. Πρόσφατα, για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το διίσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC)<sup>65</sup> που πλεονεκτεί έναντι του DCC λόγω του υδατοδιαλυτού παραπροϊόντος που δίνει.



DCC

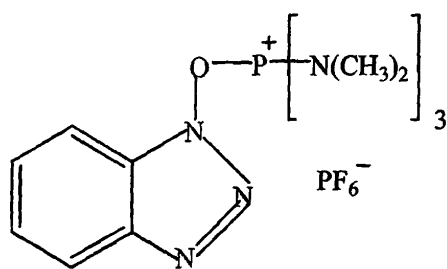


DIC

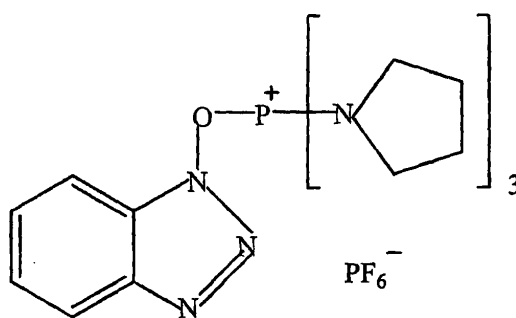
## ● Νέα βελτιωμένα αντιδραστήρια σύζευξης

Στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως αντιδραστήρια σύζευξης, φωσφονικά ή ουρονικά παράγωγα. Αυτά τα παράγωγα βρήκαν εφαρμογή στη σύνθεση αρκετά πολύπλοκων πεπτιδίων. Ένα ιδιαίτερα σημαντικό αντιδραστήριο που ανήκει σ' αυτήν την κατηγορία είναι το εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτρίαζολυλ-τρις(διμεθυλοαμινο)φωσφονικού (BOP)<sup>66,67</sup>.

Το BOP είναι σταθερό, κατά τη σύζευξη δίνει λιγότερες παράπλευρες αντιδράσεις, αντιδρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ελαχιστοποιεί τη ρακεμοποίηση. Λόγω όμως της τοξικότητάς του προτιμάται το PyBOP<sup>68,69</sup>.



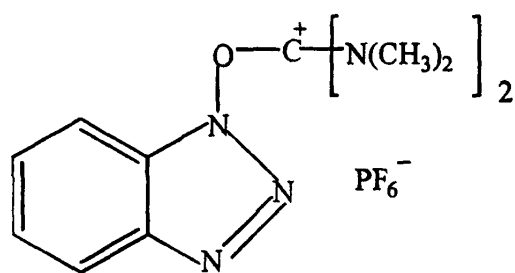
BOP



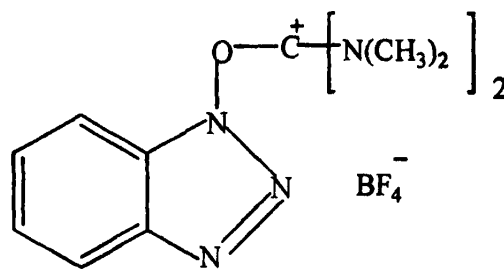
PyBOP

Επίσης, στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση χρησιμοποιούνται πολύ συχνά ως αντιδραστήρια σύζευξης το TBTU (βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό-τετραφθοροβορικό άλας)<sup>70,71</sup> και το HBTU (βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό-εξαφθοροφωσφορικό

άλας)<sup>72,73</sup>. Τα αντιδραστήρια αυτά διακρίνονται από χαμηλό βαθμό ρακεμοποίησης κατά τη χρήση τους όπως επίσης και από μικρό απαιτούμενο χρόνο αντίδρασης.



**HBTU**

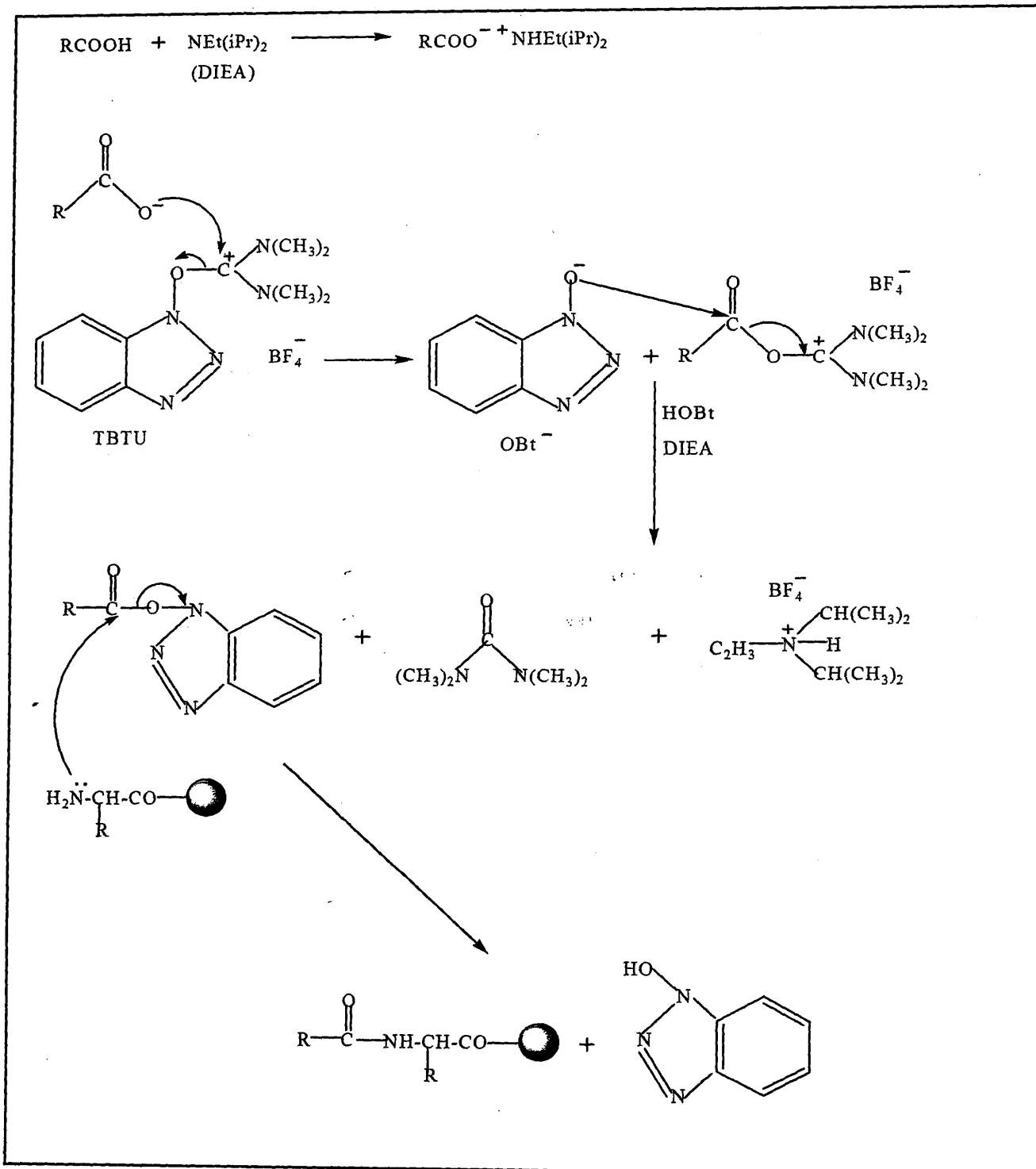


**TBTU**

Ο πιθανός μηχανισμός δράσης του TBTU και των συγγενικών μ' αυτό ενώσεων φαίνεται στο Σχήμα 12.

Τα μειονεκτήματα των διαφόρων μεθόδων σύζευξης (ρακεμοποίηση) είναι δυνατόν να αντιμετωπισθούν με προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων, όπως το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο HOBT<sup>74-76</sup>, καθώς επίσης και του αζαβενζοτρίαζολίου HOAt<sup>77,78</sup>.





**Σχήμα 12: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του TBTU**

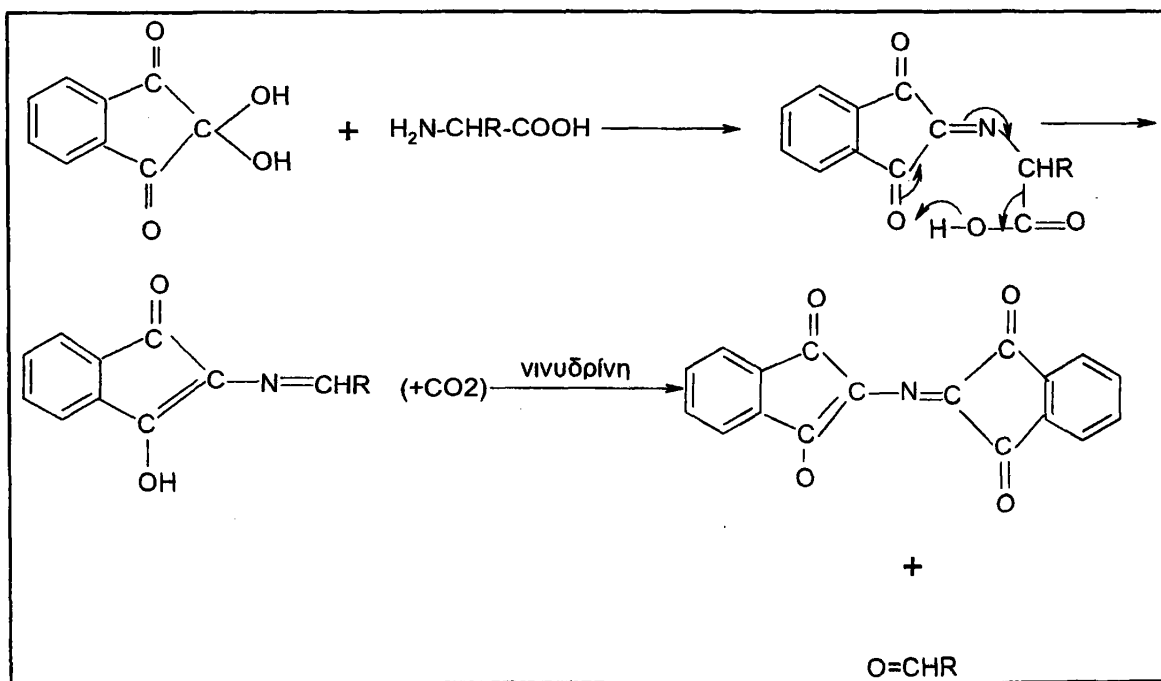
### 3.6.6 Δοκιμές χρωματομέτρησης της ρητίνης

Οι δοκιμές αυτού του είδους είναι γρήγορες, απαιτούν μικρή ποσότητα ρητίνης (μερικοί κόκκοι είναι αρκετοί) και είναι αρκετά ικανές να δείξουν μικρές ποσότητες δραστικών ομάδων στο υπόστρωμα. Υπάρχουν αρκετές δραστικές ομάδες οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με αυτού του είδους τις δοκιμές, ωστόσο οι πιο συχνά ανιχνεύσιμες είναι οι αμινομάδες. Κάποιες από τις πλέον χρησιμοποιούμενες δοκιμές για την ανίχνευση πρωτοταγών ή δευτεροταγών αμινομάδων είναι:

- ♦ δοκιμή Νινυδρίνης (Kaiser Test)
- ♦ δοκιμή του Μπλε της Βρωμοφαινόλης (Bromophenol Blue)
- ♦ δοκιμή χλωρανίλης (Chloranil Test)

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη δοκιμή είναι δοκιμή Kaiser<sup>79</sup> (Ninhydrin Color Test), η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση των πρωτοταγών αμινών (Σχήμα 13). Η κατεργασία της ρητίνης η οποία φέρει την αμινομάδα με νινυδρίνη, δίνει το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα του Ruhemann. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη η δοκιμή αυτή για τις πρωτοταγείς αμίνες είναι λιγότερο χρήσιμη για την ανίχνευση των δευτεροταγών αμινών.

Κατά το τεστ αυτό η νινυδρίνη αντιδρά με τα αμινοξέα με μια αντίδραση τρανσαμίνωσης-αποκαρβοξυλίωσης (Σχήμα 13).



Σχήμα 13: Αντίδραση νινυδρίνης

### 3.6.7 Ρόλος διαλυτών κατά την πεπτιδική σύνθεση

Οι διαλύτες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πεπτιδική σύνθεση, ειδικά όταν αυτή γίνεται στη στερεή φάση<sup>80,81</sup>. Οι περισσότερο συχνά χρησιμοποιούμενοι είναι το διχλωρομεθάνιο και το διμεθυλοφορμαμίδιο.

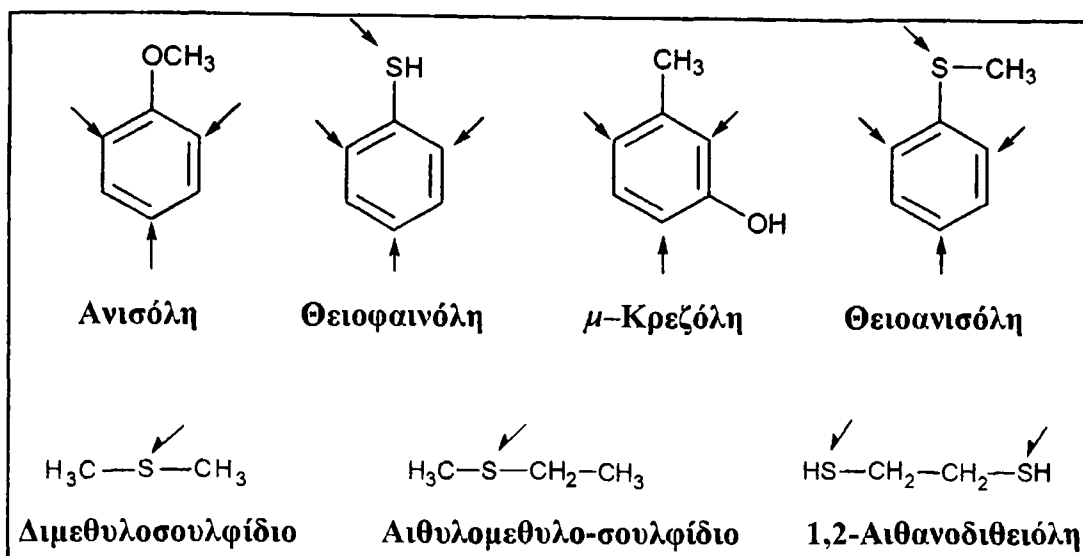
Οι ιδιότητες που πρέπει να έχει ένας διαλύτης ώστε να είναι κατάλληλος για χρήση, στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση είναι:

- ◆ να διογκώνει αρκετά τη ρητίνη,
- ◆ να βοηθάει στην έκθεση της N-τελικής αμινομάδας στο ακυλιωτικό αντιδραστήριο,
- ◆ να αυξάνει τη ταχύτητα των αντιδράσεων ενεργοποίησης και ακυλίωσης, και
- ◆ να μη διευκολύνει τη ρακεμίσωση (πολικοί διαλύτες συνήθως ευνοούν τη ρακεμίσωση).

### 3.6.8 Αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου πάνω στο στερεό πολυμερές ακολουθεί αποκοπή του με χρήση κατάλληλου αντιδραστηρίου. Οι συνθήκες πρέπει να είναι τέτοιες που να επιτρέπουν την αποκοπή του πεπτιδίου χωρίς όμως να το καταστρέψουν. Η χημική μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η επεξεργασία της πεπτιδορητίνης με οξέα. Η επιλογή του 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.

Στην Boc-στρατηγική για την αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές γίνεται χρήση πολύ ισχυρών οξέων όπως είναι το υγρό υδροφθόριο (HF) ή το τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ (TFMSA). Για την αποκοπή πεπτιδίων που συντίθενται με τη Fmoc-στρατηγική χρησιμοποιούνται πιο ήπια οξέα, όπως το τριφθοροξικό οξύ (TFA). Με την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έχουμε και ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Αυτό έχει ως συνέπεια, το μίγμα της αντίδρασης αποκοπής να είναι πλούσιο σε ηλεκτρονιόφιλα ακυλιωτικά σωματίδια. Για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων του πεπτιδίου με αυτά τα σωματίδια, το διάλυμα αποκοπής είναι απαραίτητο να περιέχει μόρια παγίδες (scavengers) (Σχήμα 14) που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τα σωματίδια αυτά. Τα μόρια παγίδες που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι η ανισόλη, η φαινόλη και παράγωγα θειολών.



Σχήμα 14: Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι scavengers για την απομάκρυνση κατιόντων (οι θέσεις δέσμευσης των κατιόντων δείχνονται με βέλος)

#### ● Αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με χρήση υγρού HF

Η διαδικασία αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη με χρήση HF πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή και σε ειδική συσκευή, καθώς το HF είναι πολύ τοξικό και διαβρωτικό. Για την αποκοπή 1 g πεπτιδορητίνης απαιτούνται 10 ml HF, 1 ml ανισόλης και 0.5 g φαινόλης. Ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων του πεπτιδίου προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης και άλλου είδους μόρια-παγίδες. Για παράδειγμα, όταν υπάρχει μεθειονίνη (Met) προστίθεται διμεθυλοσουλφίδιο (DMS) για την αποφυγή της οξειδωσής της σε σουλφοξείδιο (MetO). Στην περίπτωση της τυροσίνης (Tyr) για την αποφυγή C-αλκυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου χρησιμοποιείται θειοανισόλη. Η αντίδραση αφείνεται αρχικά στους  $-7$  έως  $-10$  °C για 30 λεπτά. Στο διάστημα αυτό απομακρύνονται οι προστατευτικές ομάδες και δεσμεύονται πιο εύκολα από τα μόρια-παγίδες. Στη συνέχεια, η αντίδραση αφήνεται για 1 ώρα στους 0 °C όπου έχουμε την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Εάν στο πεπτίδιο υπάρχει Arg (Tos) τότε η αντίδραση αφήνεται για δύο ώρες για την πλήρη απομάκρυνση της Tos ομάδας.

### ● Αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με χρήση TFA

Η διαδικασία αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη με χρήση τριφθοροξικού οξέος (TFA)<sup>82</sup>, είναι εύκολη και γρήγορη. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η αποκοπή του πεπτιδίου είναι δυνατόν να λάβει χώρα σε λιγότερο όξινες συνθήκες. Και εδώ είναι απαραίτητη η προσθήκη μορίων-παγίδων, όπως είναι η ανισόλη, η p-κρεζόλη, οι θειόλες, το H<sub>2</sub>O, παράγωγα σιλανίου π.χ. τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS)<sup>82,83</sup> κ.α., για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Πριν την αποκοπή του πεπτιδίου είναι απαραίτητο να γίνεται απομάκρυνση της Fmoc προστατευτικής ομάδας από το N<sup>α</sup>-τελικό άκρο. Ο χρόνος που αφήνεται η αντίδραση ποικίλει από 2 έως 6 ώρες ανάλογα με τα αμινοξέα και τις προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ**



## **4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ**

### **4.1 Εισαγωγή**

Η πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης εισήχθη όπως αναφέρθηκε από τον Bruce Merrifield το 1963 σε μια προσπάθεια να ξεπεραστούν πολλά από τα προβλήματα της σύνθεσης πεπτιδίων σε υγρή φάση. Παρόλα αυτά εξακολουθούν να υπάρχουν βασικά προβλήματα. Για παράδειγμα, παρόλο που χρησιμοποιούνται προστατευτικές ομάδες στις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων παρατηρούνται προβλήματα που οφείλονται κυρίως στις ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να λαμβάνεται μίγμα πεπτιδίων και η απόκτηση του επιθυμητού προϊόντος πρέπει να εξασφαλισθεί με καθαρισμό που μπορεί να απαιτεί αρκετά βήματα και μερικές φορές επίπονες και χρονοβόρες επεξεργασίες. Επίσης, μετά τον καθαρισμό των πεπτιδίων, είναι απαραίτητο να γίνει και η ταυτοποίησή τους, έτσι ώστε να πιστοποιηθεί η σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου.

### **4.2 Καθαρισμός και έλεγχος καθαρότητας πεπτιδίων**

Τα πεπτίδια αφού συντεθούν είναι απαραίτητο να καθαρισθούν (μεμβράνες διαπίδυσης, ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC), καθώς συνήθως εκτός από το επιθυμητό προϊόν, παράγονται και παραπροϊόντα που οφείλονται σε παράπλευρες αντιδράσεις και στην προσθήκη επιπλέον αμινοξέων ή στη μη σύζευξη κάποιων αμινοξέων. Επιπλέον, είναι απαραίτητο να γίνει και έλεγχος της καθαρότητάς τους (αναλυτική RP-HPLC).

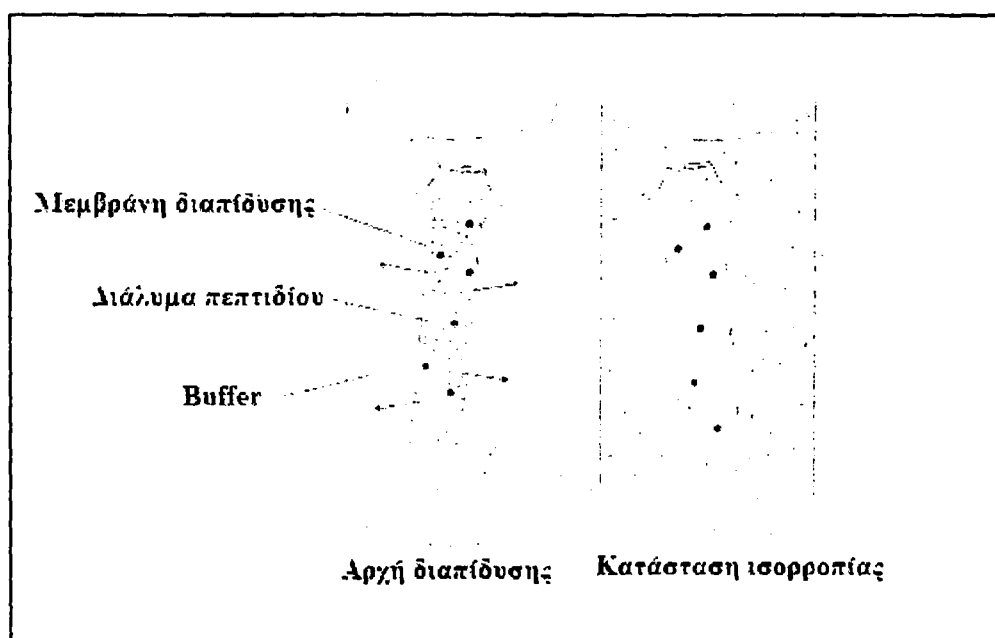
#### **◆ Μέθοδος Διαπίδυσης**

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή λαμβάνει χώρα μετακίνηση μορίων, με το φαινόμενο της διάχυσης, από ένα διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης σ' ένα διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης διαμέσου ημιπερατής μεμβράνης (Dialysis Tubing). Μόνο τα μόρια εκείνα που είναι αρκετά μικρά ώστε να μπορούν να περάσουν μέσα από τους πόρους της μεμβράνης, μπορούν να διαπεράσουν τη μεμβράνη και να φτάσουν σε κατάσταση ισορροπίας. Μόλις επέλθει η κατάσταση ισορροπίας δεν πραγματοποιείται περαιτέρω κίνηση της ουσίας, καθώς τα μόρια στην κατάσταση αυτή, μετακινούνται μέσω των πόρων μέσα και έξω από τη μεμβράνη

διαπίδυσης με τον ίδιο ρυθμό. Εν αντιθέσει, τα μεγάλα μόρια που δεν μπορούν να περάσουν μέσω των πόρων της μεμβράνης παραμένουν μέσα στη μεμβράνη.

Έτσι, στην περίπτωση μεγάλου μοριακού βάρους πεπτιδίων χρησιμοποιείται αρχικά η μέθοδος της διαπίδυσης. Σύμφωνα με τη μέθοδο της διαπίδυσης, παραπροϊόντα μικρού μοριακού βάρους απομακρύνονται από το μακρομόριο διαμέσου της ημιπερατής μεμβράνης. Μετά από εκπλύσεις της μεμβράνης με απιονισμένο νερό, μεταφέρεται σε αυτή το ακάθαρτο προϊόν διαλυμένο στον ελάχιστο δυνατό όγκο νερού. Η μεμβράνη με το περιεχόμενο διάλυμα αναδεύεται και τα εκπλύματα ανανεώνονται συχνά. Στο τέλος, το περιεχόμενο διάλυμα της μεμβράνης λυοφιλοποιείται, η ποσότητα του πεπτιδίου που ανακτάται ζυγίζεται και υπολογίζεται η απόδοση (Σχήμα 1).

Μετά το πέρας της διαπίδυσης, είναι δυνατόν να υπάρχουν και άλλα παραπροϊόντα ως αποτέλεσμα είτε της παράλειψης κάποιου αμινοξέως από το τελικό πεπτίδιο, είτε του πρόωρου τερματισμού της πεπτιδικής αλυσίδας. Ανάμεσα στα παραπροϊόντα, συγκαταλέγονται και πεπτίδια που έχουν υποστεί κάποιες χημικές μετατροπές, κυρίως κατά την αποπροστασία των παράπλευρων ομάδων ή της οξείδωσης κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον τελικό καθαρισμό του προϊόντος είναι η υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας.



Σχήμα 1: Αναπαράσταση της τεχνικής καθαρισμού με διαπίδυση

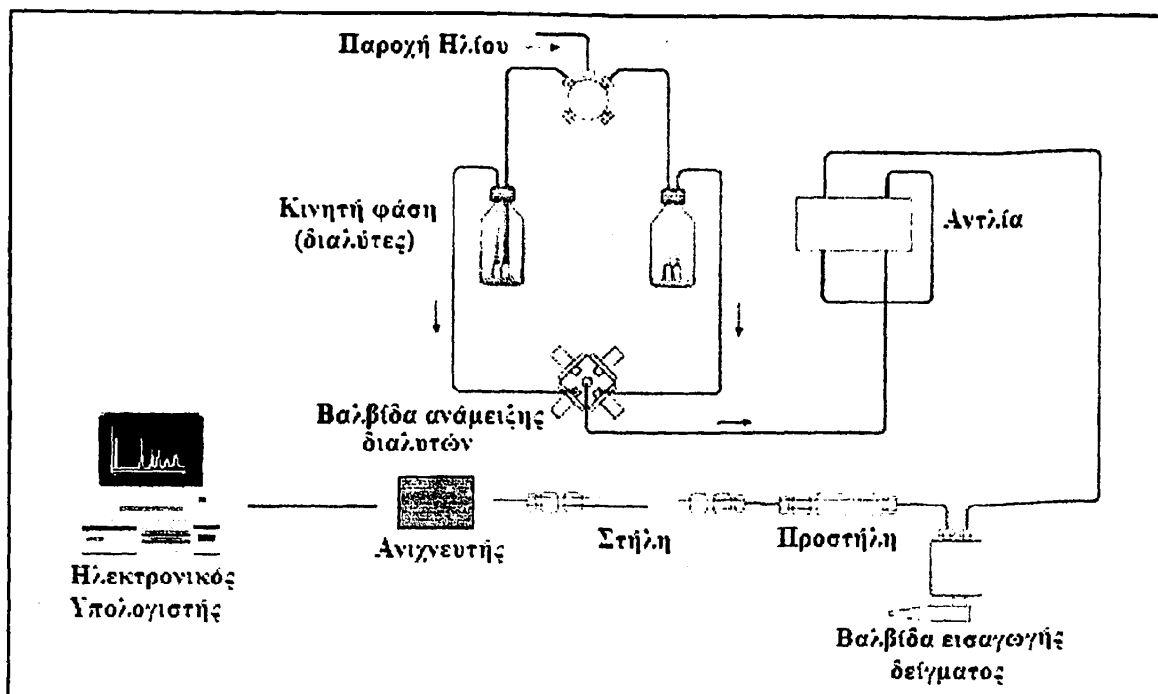


## ◆ Υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography)

- ◆ Αναλυτική RP-HPLC
- ◆ Ημιπαρασκευαστική RP-HPLC
- ◆ Παρασκευαστική RP-HPLC

Οι τεχνικές ανάστροφης φάσης έχουν εφαρμοστεί παραδοσιακά στην ανάλυση χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων χρησιμοποιώντας HPLC<sup>1,2</sup>. Η χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (Reverse Phase, RP) είναι η ευρύτερα χρησιμοποιημένη στην HPLC μέθοδο. Η RP χρωματογραφία ονομάζεται έτσι επειδή συμπεριφέρεται αντίστροφα από ότι η χρωματογραφία κανονικής φάσης (NP)<sup>3</sup> στην οποία χρησιμοποιείται μια πολική στατική φάση και μια οργανική κινητή φάση. Οι ουσίες διαλυμένες εκλύονται με σειρά αυξανόμενης πολικότητας και η κατακράτηση μειώνεται με αυξανόμενη πολικότητα του διαλύτη.

Η χρωματογραφία ανάστροφης φάσης στηρίζεται στην αρχή της υδροφιλικότητας και λιποφιλικότητας<sup>3,4</sup>. Ο διαχωρισμός των διαλυμένων ουσιών γίνεται βάση την κατανομή μεταξύ μιας πολικής κινητής φάσης και μιας οργανικής φάσης που είναι σταθεροποιημένη σε μία μήτρα. Στην RPC η στατική φάση είναι συνήθως αλειφατικές αλυσίδες μέχρι 18 άτομα άνθρακα (C<sub>18</sub>), χημικά συνδεδεμένες σε διοξείδιο του πυριτίου (silica). Διατίθενται επίσης silica με C<sub>22</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>2</sub> και C<sub>1</sub> ομάδες συνδεδεμένες. Η κινητή φάση είναι πολική, αποτελούμενη κυρίως από νερό αναμεμιγμένο με οργανικούς διαλύτες, όπως μεθανόλη, προπανόλη, αιθανόλη και ακετονιτρίλιο για την επίτευξη της έκλουσης. Στα πεπτίδια χρησιμοποιούνται συνήθως όξινες συνθήκες μίγματος ακετονιτριλίου/νερού. Οι όξινες συνθήκες επιτυγχάνονται με την προσθήκη 0.1% (v/v) TFA στο μίγμα της κινητής φάσης. Η κατακράτηση των διαλυμένων ουσιών στην RPC οφείλεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ουσιών και της υδρογονανθρακικής επιφάνειας της στατικής φάσης. Η έκλουση των ουσιών που διαχωρίζονται γίνεται με σειρά μειούμενης πολικότητας (αυξανόμενης υδροφοβικότητας) αυξάνοντας το οργανικό συστατικό της κινητής φάσης. Στο Σχήμα 2 δίνονται διαγραμματικά τα μέρη ενός τυπικού οργάνου HPLC.

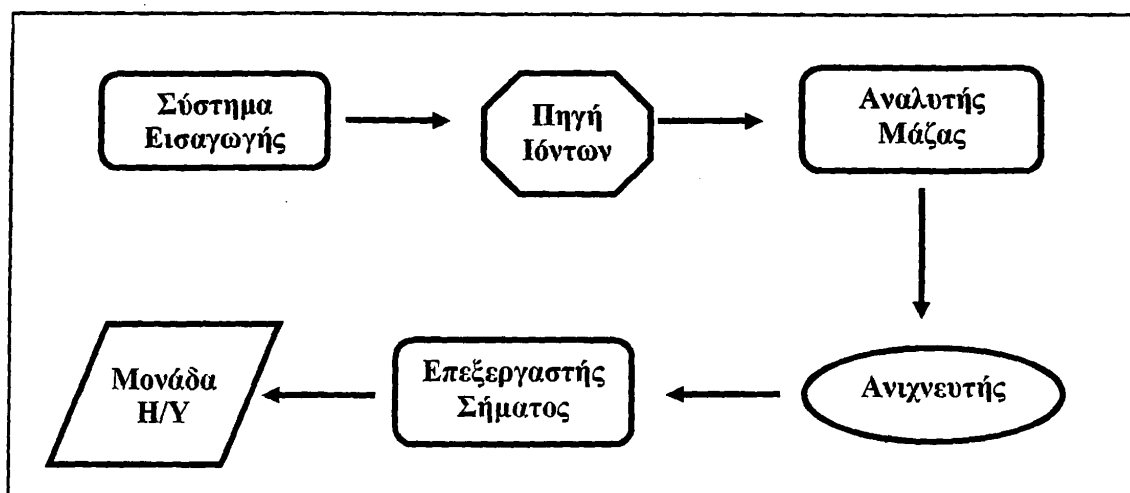


Σχήμα 2: Διαγραμματική αναπαράσταση ενός τοπικού οργάνου HPLC

#### 4.3 Ταυτοποίηση πεπτιδίων με ESI-MS

Μετά τον καθαρισμό των πεπτιδίων ακολουθεί η ταυτοποίηση τους καθώς έτσι πιστοποιείται η σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου. Η ταυτοποίηση των πεπτιδίων συνήθως γίνεται με φασματοσκοπία μάζας. Η φασματοσκοπία μάζας έχειδειχθεί ότι παρέχει εξειδίκευση, ευαισθησία και ταχύτητα στην ανάλυση μορίων και συμπλόκων<sup>5</sup>. Η φασματοσκοπία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry ESI-MS)<sup>6</sup> καθιστά δυνατή την εισαγωγή υγρών δειγμάτων σε ένα φασματόμετρο μάζας και το σημαντικότερο, επιτρέπει την ανάλυση υψηλά πολικών και μη πτητικών βιολογικών συστατικών<sup>5</sup>. Ένας ηλεκτροψεκασμός<sup>7</sup> παράγεται με την εφαρμογή ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, υπό ατμοσφαιρική πίεση, σε ένα υγρό το οποίο διέρχεται διαμέσου ενός τριχοειδούς σωλήνα με μια χαμηλή ροή (συνήθως 1-10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Το ηλεκτρικό πεδίο λαμβάνεται με την εφαρμογή μιας διαφοράς δυναμικού της τάξης των 3-4 kV μεταξύ του τριχοειδούς και του βοηθητικού ηλεκτροδίου (counter electrode).

Τα βασικά τμήματα από τα οποία αποτελείται ένα φασματοόμετρο μάζας παρατίθενται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Τυπική διάταξη φασματογράφου μάζας

Τα επιμέρους τμήματα είναι συνδεδεμένα με ένα σύστημα δημιουργίας υψηλού κενού. Η αρχή λειτουργίας για καθένα από τα τμήματα του φασματογράφου μάζας παρουσιάζεται συνοπτικά:

#### ● Σύστημα εισαγωγής

Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής είναι η προετοιμασία του δείγματος για την εισαγωγή του στον χώρο ιοντισμού (πηγή ιόντων), κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντοτε κατάσταση. Η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται ποικίλλει από μερικά mg σε λιγότερο από 1 mg εξαρτώμενη από τον τύπο του φασματομέτρου που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

#### ● Πηγή Ιόντων

Το δείγμα μετά την εισαγωγή του και πριν φτάσει στον αναλυτή μάζας και εν συνεχεία στον ανιχνευτή, υφίσταται διαδικασίες που έχουν σαν αποτέλεσμα τον ιοντισμό του. Οι κυριότερες μέθοδοι Ιοντισμού είναι οι εξής:

- *Ιοντισμός με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impact: E-I)*<sup>8-10</sup>

Είναι η κλασική μέθοδος ιοντισμού η οποία χρησιμοποιεί δέσμη e<sup>-</sup> τα οποία επιταχύνονται με εφαρμογή ενός δυναμικού και συγκρούονται με τα μόρια του δείγματος τα οποία βρίσκονται στην αέρια κατάσταση.

- *Χημικός Ιοντισμός (Chemical Ionization) (C.I)*<sup>8-10</sup>

Κατά το χημικό ιοντισμό, ο ιοντισμός του μορίου επέρχεται μέσω μιας χημικής αντίδρασης π.χ. αντίδραση πρωτονίωσης.

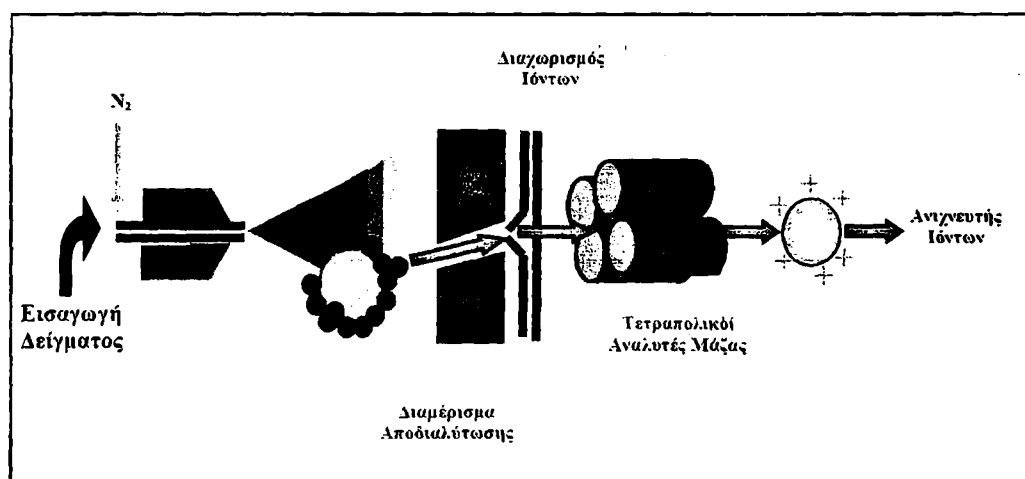


- *Ιοντισμός Πεδίου: (Field Ionization)*

Στην περίπτωση αυτή μόρια δείγματος στην αέρια κατάσταση αναγκάζονται να διέλθουν μέσα από ένα ηλεκτρικό πεδίο. Μεταξύ ανόδου και καθόδου εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού. Τα μόρια ιοντίζονται χάνοντας 1e<sup>-</sup> λόγω της ισχυρής έλξης των ηλεκτρονίων από την άνοδο. Έτσι σχηματίζονται μοριακά ιόντα.

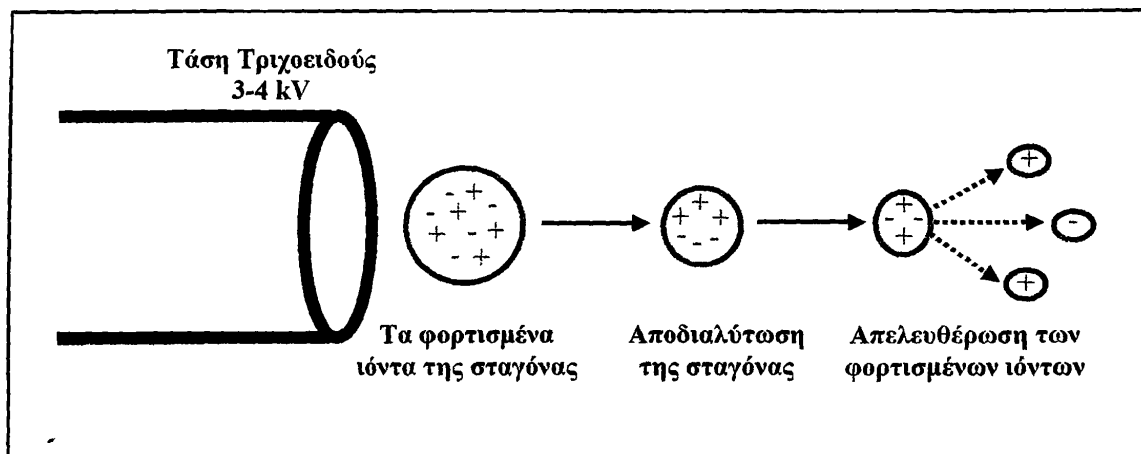
- *Ιοντισμός με δέσμη ταχέως κινουμένων ατόμων (Fast Atom Bombardment).*
- *Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI – MS)*<sup>11,12</sup>.
- *Electrospray Ionization (E.S.I. – M.S.)*<sup>7,12</sup>.

Το φασματοφωτόμετρο μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry ESI-MS) χαρακτηρίζεται ως ήπια μέθοδος ιοντισμού για βιομόρια και μεγάλου μοριακού βάρους ενώσεις. Στο Σχήμα 4 δίνεται μια τυπική διάταξη ενός φασματογράφου μάζας ESI-MS.



**Σχήμα 4: Σχηματική διάταξη ενός φασματογράφου μάζας ESI-MS**

Κατά την τεχνική αυτή τα σταγονίδια διέρχονται από ένα διαμέρισμα «αποδιαλύτωσης», ο διαλύτης εξατμίζεται και η πυκνότητα φορτίου αυξάνεται σημαντικά. Έτσι το φορτίο της σταγόνας κατανέμεται σε μικρότερη επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διασπάται λόγω απωστικών δυνάμεων που δημιουργούνται στην επιφάνειά της εξαιτίας της ελάττωσης της ακτίνας και έτσι έχουμε την απελευθέρωση των φορτισμένων ιόντων, τα οποία μεταφέρονται στον αναλυτή μαζών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5. Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί έναντι των άλλων τεχνικών διότι δεν παράγει ιόντα από το προς ανάλυση δείγμα, αλλά εξάγει τα ήδη υπάρχοντα ιόντα.



Σχήμα 5: Διαδικασία εξαγωγής ιόντων στο ESI-MS

#### ◆ Αναλυτής μαζών

Η βασική λειτουργία του αναλυτή μαζών είναι να διαχωρίζει τα ιόντα που παράγονται στην πηγή ιόντων ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων  $M/Z$ .

Οι αναλυτές μάζας χωρίζονται σε 4 κατηγορίες:

- α) Αναλυτές απλής εστίασεως με μαγνητική εκτροπή
- β) Διπλής εστίασεως αναλυτές
- γ) Αναλυτές 'χρόνου πτήσεως'
- δ) Τετραπολικοί αναλυτές

Στα τετραπολικά φασματόμετρα μαζών (Quadrupole Mass Spectrometer)<sup>8</sup> τα δημιουργούμενα ιόντα υποχρεώνονται να κινηθούν μεταξύ τεσσάρων κυλινδρικών ηλεκτροδίων, τα οποία τροφοδοτούνται διαγωνίως με μια εναλλασσόμενη τάση υψηλής συχνότητας και μια συνεχή τάση. Η εφαρμογή των δύο παραπάνω τάσεων υποχρεώνει τα ιόντα σε ταλαντώσεις. Ανάλογα με τον λόγο  $m/z$  του κάθε ιόντος μερικά ιόντα θα είναι ικανά

να εξέλθουν από το 'τετραπολικό φίλτρο', ενώ τα υπόλοιπα θα προσκρούσουν στους πόλους του και θα χάσουν το φορτίο τους.

#### ◆ Ανιχνευτής Ιόντων

Ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα) ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα. Οι συνηθέστεροι τύποι ανιχνευτών είναι:

- το φαρανταϊκό κύπελλο,
- ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής,
- η φωτογραφική πλάκα (ή φιλμ).

Μετά τον ανιχνευτή ιόντων το σήμα ενισχύεται και καταγράφεται στον καταγραφέα.

Για τον υπολογισμό του λόγου  $M/Z$  χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$M/Z = (M + nH^+) / n$$

όπου:  $M$ : η Μοριακή Μάζα του δείγματος

$n$ : ο αριθμός των θετικών φορτίων

$H^+$ : η μάζα του πρωτονίου



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ**



## 5. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ (CD)

### 5.1 Εισαγωγή

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (Circular Dichroism, CD) είναι μια μορφή φασματοσκοπίας, η οποία βασίζεται στις διαφορετικές απορροφήσεις του δεξιόστροφου και αριστερόστροφου κυκλικά πολωμένου φωτός. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της δευτεροταγούς δομής μακρομορίων ( $\alpha$ -έλικα, παράλληλο και αντιπαράλληλο φύλο,  $\beta$ -στροφή κτλ.). Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού μοιάζει με τη μέθοδο οπτικής στροφικής διασποράς (Optical Rotatory Dispersion, ORD).

Η γραφική παράσταση της εξάρτησης της στροφικής ικανότητας από το μήκος κύματος αποτελεί το φάσμα ORD. Το φάσμα ORD είναι φάσμα διάχυσης, ενώ το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού είναι φάσμα απορρόφησης. Τα δύο φαινόμενα σχετίζονται μεταξύ τους με την επονομαζόμενη μετατροπή K<sub>önig-Kramers</sub>.

Η μέθοδος του κυκλικού διχρωϊσμού παρέμενε μια σχετικά απρόσιτη και μη δημοφιλής τεχνική, μέχρι τη δεκαετία του 1970, οπότε και ξεκίνησε η διάθεση των οργάνων CD στο εμπόριο. Υπάρχουν πολλά σημαντικά πλεονεκτήματα που ανέδειξαν τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού ως την πιο δημοφιλή μέθοδο στο χώρο και εκτόπισαν τη μέθοδο της οπτικής στροφικής διασποράς. Οι βασικές διαφορές προκύπτουν από το σχετικά μικρό εύρος και οξύ προφίλ των CD κορυφών σε αντίθεση με τις περισσότερο ευρείες κορυφές που εμφανίζονται στη μέθοδο ORD. Αυτή ακριβώς η διαφορά οδηγεί σε βελτιωμένη ανάλυση και επεξεργασία των CD κορυφών σε σχέση με τις αντίστοιχες της ORD.

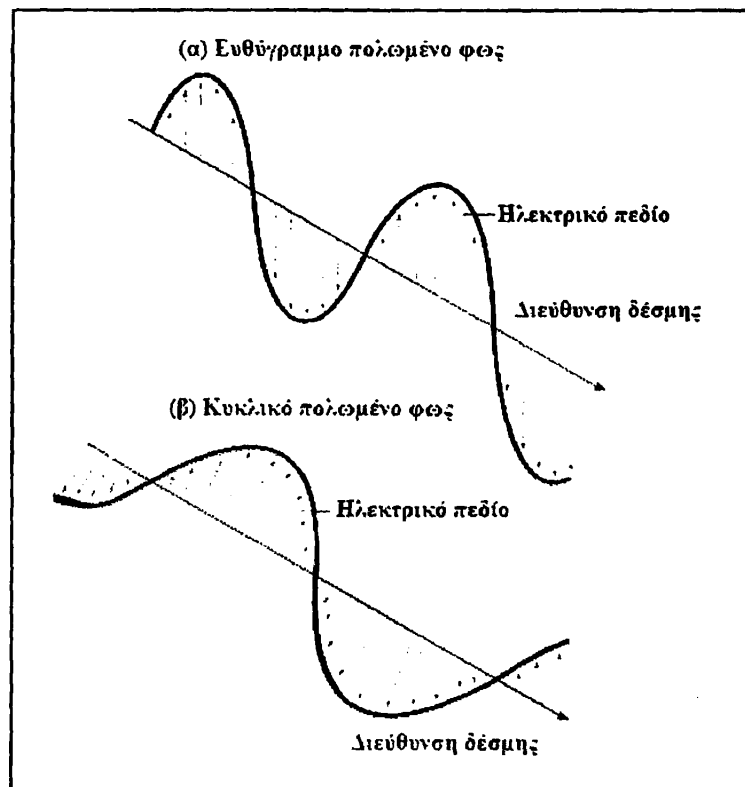
Συγκεκριμένα η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για:

- ◆ Να βρεθεί η δευτεροταγής δομή πρωτεϊνών.
- ◆ Να γίνει σύγκριση των δομών πρωτεϊνών που προέρχονται από διαφορετικές πηγές (είδη ή συστήματα έκφρασης) ή σύγκριση των δομών διαφορετικών μεταλλάξεων της ίδιας πρωτεΐνης.
- ◆ Να γίνει μελέτη της διαμορφωτικής σταθερότητας μιας πρωτεΐνης κάτω από διάφορες συνθήκες (pH, θερμοκρασία κτλ.)
- ◆ Να καθοριστεί το κατά πόσο οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης αλλάζουν τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης.



## 5.2 Φυσικές αρχές κυκλικού διχρωϊσμού

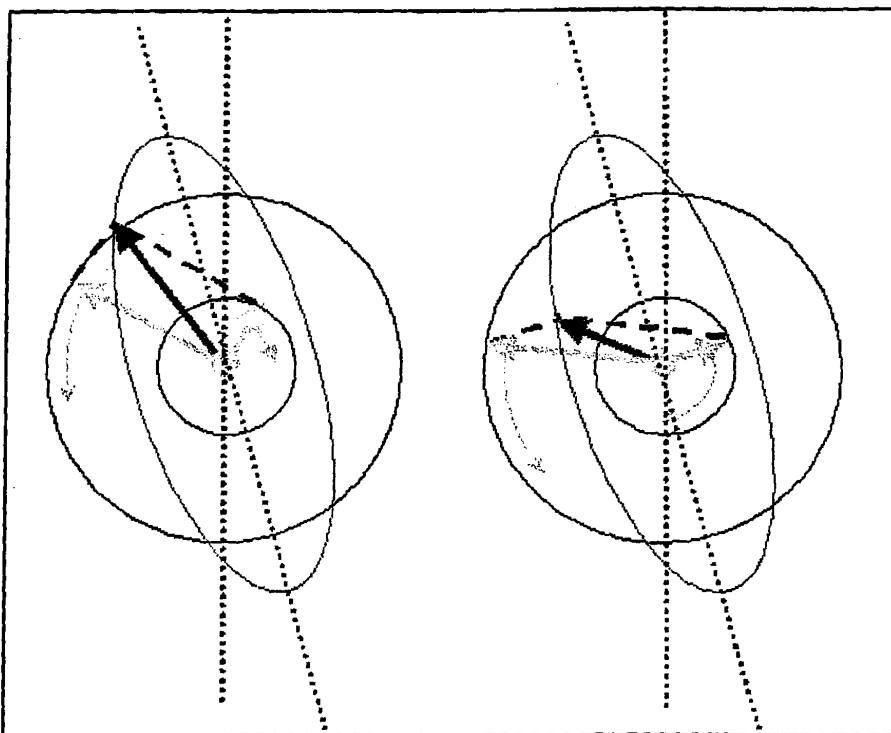
Το επίπεδο ημιτονοειδές κύμα του πολωμένου φωτός είναι δυνατόν να παρασταθεί γραφικά με το διάνυσμα  $E$  του ηλεκτρικού πεδίου. Σύμφωνα με τις αρχές της διανυσματικής ανάλυσης το διάνυσμα  $E$  της έντασης του πολωμένου φωτός μπορεί να θεωρηθεί ως το άθροισμα δύο ακτίνων κυκλικά πολωμένου φωτός και να αναλυθεί σε δυο συνιστώσες  $E_L$  και  $E_R$  (αριστερόστροφη και δεξιόστροφη αντίστοιχα). Οι συνιστώσες αυτές είναι ίδιας συχνότητας, ίσου μέτρου, αντίθετης φοράς διάδοσης και διαγράφουν μια ελλειπτική τροχιά με αντίθετη φορά. Κατά συνέπεια, το επίπεδο πολωμένο φως μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα των δυο αυτών κυκλικά πολωμένων ακτινών φωτός.



Σχήμα 1: Ευθύγραμμο και κυκλικό πολωμένο φως

Όταν το πολωμένο φως διέρχεται από συμμετρικές ουσίες ή διαλύματα αυτών, τα ανύσματα  $E_L$  και  $E_R$  έχουν ίδιο μήκος κύματος, ίδια ένταση, αντίθετη φορά και το άθροισμά τους δίνει το επίπεδο πολωμένο φως. Όταν το υλικό διαμέσου του οποίου διέρχεται το επίπεδα πολωμένο φως είναι μια οπτικά ενεργή ουσία ή διάλυμα αυτής, τότε οι δύο κυκλικές συνιστώσες  $E_L$  και  $E_R$  διαδίδονται με διαφορετική ταχύτητα και τους αντιστοιχούν διαφορετικοί δείκτες διάθλασης  $n_L$  και  $n_R$ , με αποτέλεσμα να στραφεί το επίπεδο πόλωσης

κατά μια γωνία  $\alpha$ . Στην περίπτωση αυτή το υλικό μέσο παρουσιάζει το φαινόμενο της κυκλικής διάθλασης (Σχήμα 2).

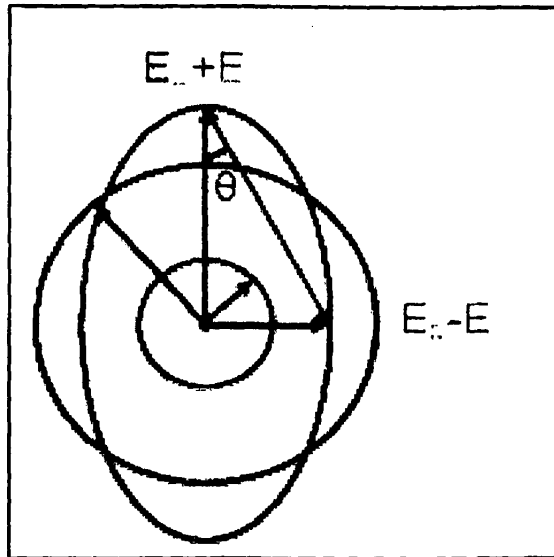


**Σχήμα 2: Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού σε ένα οπτικά ενεργό μέσο**

Στην περιοχή απορρόφησης, οι ακτίνες του προς τα δεξιά ( $E_R$ ) και προς τα αριστερά ( $E_L$ ) κυκλικά πολωμένου φωτός δεν διαδίδονται μόνο με διαφορετικές ταχύτητες ( $n_R \neq n_L$ ) μέσα στα ασύμμετρα μόρια, αλλά απορροφώνται και διαφορετικά. Τα ανύσματα  $E_L$  και  $E_R$  γίνονται συγχρόνως και άνισα, οπότε η συνισταμένη  $E$  διαγράφει μια έλλειψη γωνίας  $\theta$  (Σχήμα 3). Η διαφορά αυτή απορρόφησης  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$  συναρτηθεί του μήκους κύματος  $\lambda$  ονομάζεται κυκλικός διχρωϊσμός και δίνεται από τη σχέση :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = (A_L - A_R) / cl \quad (1)$$

Όπου  $\varepsilon$ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης,  $A$ : η απορρόφηση φωτός από το μόριο,  $c$ : η μοριακή συγκέντρωση ( $M$ ) και  $l$ : η απόσταση που διανύει το φως.



**Σχήμα 3: Ελλειπτικά πολωμένο φως που προκύπτει από τον συνδυασμό δεξιόστροφου και αριστερόστροφου πολωμένου φωτός**

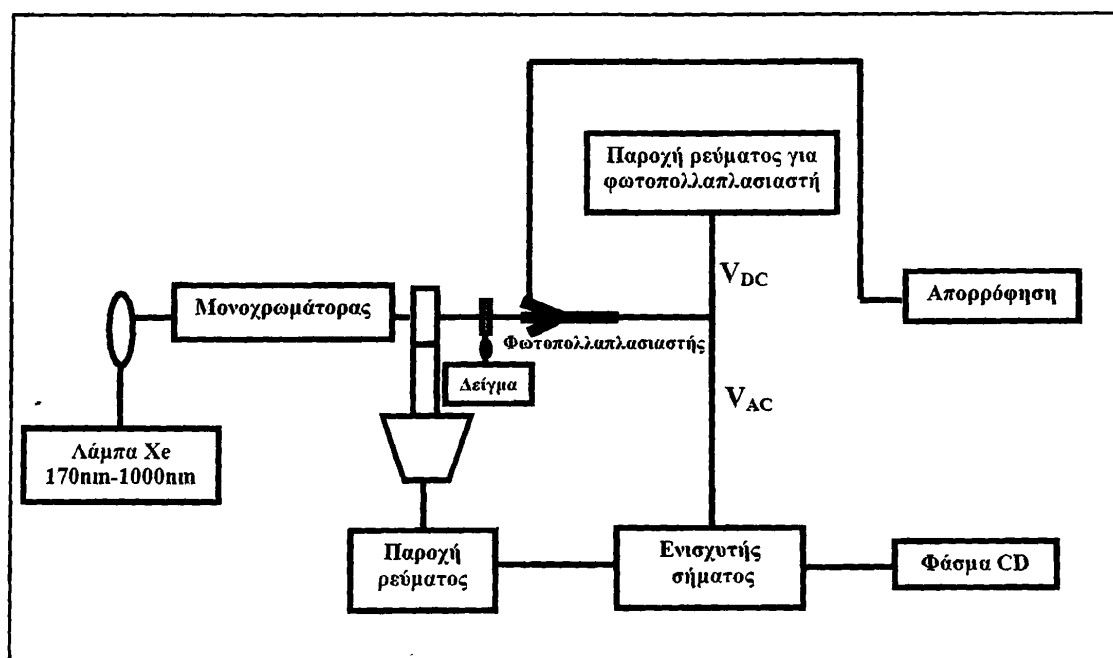
Τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα όργανα μέτρησης κυκλικού διχρωϊσμού μετρούν τη διαφορά απορρόφησης  $\Delta A = A_L - A_R$  η οποία μετατρέπεται εύκολα σε μοριακή διχρωϊκή απορρόφηση  $\Delta \epsilon$  από τη σχέση (1). Επίσης, τα περισσότερα όργανα είναι βαθμονομημένα με όρους μοριακής ελλειπτικότητας. Η μοριακή ελλειπτικότητα, η οποία έχει μονάδες  $\text{degrees cm}^2 / \text{d mol}$ , δίνεται από τη σχέση:

$$[\theta] = 100 \theta / cl = 3298 \Delta \epsilon \quad \text{εφ}\theta = (E_R - E_L) / (E_R + E_L) \quad (3)$$

Όπου  $\theta$ : η ελλειπτικότητα, η οποία είναι μέτρο γωνίας (angular measure) και οι μονάδες της είναι οι βαθμοί (degrees).

### 5.3 Οργανολογία

Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού καταγράφεται με τη βοήθεια CD φασματοφωτόμετρου (Σχήμα 4). Το όργανο πρέπει να είναι ικανό να μετρά με ακρίβεια στο μακρινό UV (200-300nm), σε μήκη κύματος μεγαλύτερα της περιοχής 190-170nm. Στον οπτικό θάλαμο διοχετεύεται ξηρό άζωτο, απαλλαγμένο από οξυγόνο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός όζοντος σε μικρά μήκη κύματος. Τα βασικά τμήματα ενός CD φασματοφωτόμετρου είναι η λάμπα ξένου υψηλής πίεσης, ο μονοχρωμάτορας και το τμήμα ηλεκτρονικού ελέγχου.



Σχήμα 4: Απεικόνιση τυπικής διάταξης ενός CD φασματοφωτόμετρου

### 5.4 Μελέτη διαμόρφωσης πεπτιδίων με φασματοσκοπία CD

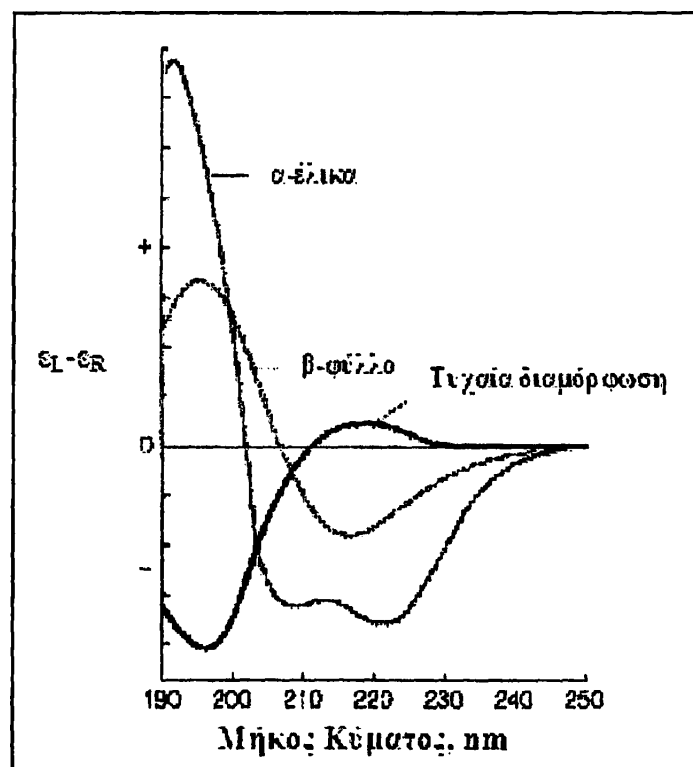
Η μελέτη μιας ουσίας με φασματοσκοπία CD προϋποθέτει την ύπαρξη χρωμοφόρων ομάδων. Ως χρωμοφόρες χαρακτηρίζονται οι ομάδες ατόμων που βρίσκονται μέσα σε ένα μόριο και οι οποίες απορροφούν ενέργεια μιας ορισμένης ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται εύκολα με κάποια φασματοσκοπική μέθοδο. Μια πρωτεΐνη περιλαμβάνει πολλές χρωμοφόρες ομάδες. Στη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού το αποτέλεσμα εξαρτάται από τη σχετική θέση των διαφόρων χρωμοφόρων ομάδων.

Οι χρωμοφόρες ομάδες μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής δύο κατηγορίες:

- 1) Αυτές που είναι από μόνες τους ασύμμετρες
- 2) Αυτές που είναι συμμετρικές αλλά τοποθετούνται σε ένα ασύμμετρο περιβάλλον.

Η καρβονυλομάδα των α-αμινοξέων αποτελεί το πιο γνωστό παράδειγμα της δεύτερης κατηγορίας χρωμοφόρων. Στην περίπτωση ενός αμιδικού δεσμού, η παρουσία ενός ασύμμετρου κέντρου (α-άτομο άνθρακα) εισάγει μια ασυμμετρία στην ηλεκτρονιακή κατανομή. Μια άλλη χρωμοφόρος ομάδα, η οποία είναι συμμετρική, αλλά συχνά βρίσκεται σε ασύμμετρο περιβάλλον, είναι ο φαινολικός δακτύλιος της τυροσίνης. Στα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες η χρωμοφόρος ομάδα που συνήθως μελετάται με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού είναι ο αμιδικός δεσμός.

Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωισμού και τα φάσματα που λαμβάνουμε ως συνάρτησή του με το μήκος κύματος όταν μια δέσμη φωτός διαπερνά το προς ανάλυση διάλυμα, μπορούν να μας δώσουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη δευτεροταγή δομή των πεπτιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων. Τα φάσματα που προκύπτουν είναι χαρακτηριστικά για διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής των βιολογικών μακρομορίων<sup>1</sup> (Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Χαρακτηριστικά φάσματα CD για τις δευτεροταγείς δομές της α-έλικας, του β-φύλλου και της τυχαίας διαμόρφωση

Οι Chou και Fasman<sup>2,3</sup> στηριζόμενοι σε κρυσταλλογραφικές μελέτες διατύπωσαν μια απλή μέθοδο για την πρόβλεψη της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών και προσδιόρισαν τις παραμέτρους  $P_{\alpha}$ ,  $P_{\beta}$  και  $P_t$  των φυσικών αμινοξέων που εκφράζουν την τάση τους να σχηματίζουν ή να αποσταθεροποιούν την  $\alpha$ -έλικα, το  $\beta$ -πτυχωτό φύλλο και τη  $\beta$ -στροφή, αντίστοιχα. Υψηλή τιμή των παραμέτρων αυτών σημαίνει και αυξημένη δυνατότητα των αμινοξέων να ευνοούν την  $\alpha$ -έλικα, το  $\beta$ -πτυχωτό φύλλο ή τη  $\beta$ -στροφή. Τα συμπεράσματα των Chou και Fasman έρχονται σε συμφωνία με αυτά που προκύπτουν από μελέτες διαμόρφωσης<sup>4,5</sup> με την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού. Επειδή υπάρχει σχεδόν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των παραμέτρων  $P_t$  και  $P_{\alpha}$ , όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά  $\langle P_t \rangle - \langle P_{\alpha} \rangle$  τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να ευνοηθεί η  $\beta$ -στροφή.

**Πίνακας 1: Τιμές Chou-Fasman των αμινοξέων που υποδηλώνουν την τάση του να συμμετέχουν σε  $\alpha$ -έλικα,  $\beta$ -πτυχωτό φύλλο και  $\beta$ -στροφή**

<i>Αμινοξέα</i>	<i><math>P_{\alpha}</math></i>	<i>Αμινοξέα</i>	<i><math>P_{\beta}</math></i>	<i>Αμινοξέα</i>	<i><math>P_t</math></i>
<i>Glu</i>	1.53	<i>Met</i>	1.67	<i>Gly</i>	1.68
<i>Ala</i>	1.45	<i>Val</i>	1.65	<i>Asn</i>	1.68
<i>Leu</i>	1.34	<i>Ile</i>	1.60	<i>Ser</i>	1.56
<i>His</i>	1.24	<i>Cys</i>	1.30	<i>Pro</i>	1.54
<i>Met</i>	1.20	<i>Tyr</i>	1.29	<i>Asp</i>	1.26
<i>Gln</i>	1.17	<i>Phe</i>	1.28	<i>Tyr</i>	1.25
<i>Trp</i>	1.14	<i>Gln</i>	1.23	<i>Cys</i>	1.17
<i>Val</i>	1.14	<i>Leu</i>	1.22	<i>Trp</i>	1.11
<i>Phe</i>	1.12	<i>Thr</i>	1.20	<i>Lys</i>	1.01
<i>Lys</i>	1.07	<i>Trp</i>	1.19	<i>Arg</i>	1.00
<i>Ile</i>	1.00	<i>Ala</i>	0.97	<i>Thr</i>	1.00
<i>Asp</i>	0.98	<i>Arg</i>	0.90	<i>Phe</i>	0.71
<i>Thr</i>	0.82	<i>Gly</i>	0.81	<i>His</i>	0.69
<i>Ser</i>	0.79	<i>Asp</i>	0.80	<i>Met</i>	0.67
<i>Arg</i>	0.79	<i>Lys</i>	0.74	<i>Ile</i>	0.58
<i>Cys</i>	0.77	<i>Ser</i>	0.72	<i>Ala</i>	0.57
<i>Asn</i>	0.73	<i>His</i>	0.71	<i>Gln</i>	0.56
<i>Tyr</i>	0.61	<i>Asn</i>	0.65	<i>Leu</i>	0.53
<i>Pro</i>	0.59	<i>Pro</i>	0.62	<i>Glu</i>	0.44
<i>Gly</i>	0.53	<i>Glu</i>	0.26	<i>Val</i>	0.30

### 5.4.1 α-έλικα

Η α-έλικα έχει δομή ράβδου. Η σφιχτά ελιγμένη πολυπεπτιδική κύρια αλυσίδα σχηματίζει το εσωτερικό μέρος της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς τα έξω σε μία ελικοειδή διαμόρφωση<sup>6</sup>. Σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και CO της κύριας αλυσίδας. Η ομάδα CO κάθε αμινοξέος είναι ενωμένη με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH του αμινοξέος που βρίσκεται τέσσερις μονάδες μπροστά από αυτή στη γραμμική αλληλουχία. Έτσι, όλες οι ομάδες NH και CO της κύριας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Κάθε κατάλοιπο απέχει από το προηγούμενο 1.5 Å κατά μήκος της έλικας και έχει περιστραφεί σε σχέση μ' αυτό κατά 100°, γεγονός που οδηγεί στην ύπαρξη 3.6 αμινοξέων ανά στροφή της έλικας. Το βήμα της α-έλικας, δηλαδή το γινόμενο της μετατόπισης (1.5 Å) και του αριθμού των καταλοίπων ανά στροφή (3.6), είναι 5.4 Å. Η φορά στροφής μπορεί να είναι προς τα δεξιά ή προς τα αριστερά. Η δεξιόστροφη α-έλικα αποτελεί μια κανονική δευτεροταγή δομή που απαντάται συχνά σε πρωτεϊνικά μόρια.

Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού πεπτιδίων με διαμόρφωση α-έλικας είναι αρκετά χαρακτηριστικό<sup>7,8</sup>. Διακρίνονται τρεις ξεχωριστές κορυφές. Μια ευρεία αρνητική κορυφή με ελάχιστο στα 222nm, μια αρνητική κορυφή στα 208nm και μια θετική κορυφή με μέγιστο στα 192nm. Όμως, αν και τα φάσματα για πεπτίδια με δομή α-έλικας είναι ποιοτικά παρόμοια, οι τιμές των κορυφών ποικίλουν σημαντικά, π.χ. μελέτες<sup>9-11</sup> ελικοειδών πεπτιδίων και πρωτεϊνών με ελικοειδές περιεχόμενο που προσανατολίζονται σε μεμβράνες, έδειξαν ότι όταν η α-έλικα είναι προσανατολισμένη ώστε το φως να διέρχεται κατά μήκος του άξονα της έλικας, η κορυφή στα 208nm εξαφανίζεται και η θετική κορυφή που εμφανίζεται σε μικρότερο μήκος κύματος, γίνεται ασθενέστερη και μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Αυτό οφείλεται στην επίδραση των διαλυτών, στις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων από τα οποία αποτελείται το πεπτίδιο και στο μήκος της αλυσίδας.

Οι μη αρωματικές παράπλευρες ομάδες επιφέρουν αλλαγές στη γεωμετρία του σκελετού της έλικας, ενώ οι αρωματικές παράπλευρες ομάδες διαταράσσουν το φάσμα λόγω αλληλεπιδράσεων των αρωματικών και αμιδικών διεγέρσεων. Το μήκος της αλυσίδας επηρεάζει σημαντικά τις κορυφές στα 208nm και 192nm, ενώ αφήνει σχετικά ανεπηρέαστη την κορυφή στα 222nm<sup>8,12,13</sup>.



#### 5.4.2 β-διάταξη πτυχωτού φύλλου

Η β-διάταξη πτυχωτού φύλλου έχει δομή μιας επίπεδης επιφάνειας. Μια πολυπεπτιδική αλυσίδα στη β-πτυχωτή επιφάνεια είναι σχεδόν τελείως ανοικτή και όχι σφικτά περιελιγμένη όπως στην α-έλικα. Η διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου σταθεροποιείται μέσω διαμοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ όλων των ομάδων NH και CO. Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 3.5 Å. Οι παράπλευρες αλυσίδες είναι πάνω και κάτω από το επίπεδο της πτυχωτής επιφάνειας. Γειτονικές αλυσίδες σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες).

Σε ένα τυπικό φάσμα μιας ένωσης που λαμβάνει διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου παρατηρείται μια αρνητική κορυφή με ελάχιστο κοντά στα 215nm και μια θετική κορυφή κοντά στα 198nm<sup>14</sup>. Βέβαια, η μορφή του φάσματος<sup>15</sup>, δηλαδή το εύρος, η αναλογία και το ακριβές μήκος κύματος των κορυφών, ποικίλει σημαντικά για τα διάφορα πεπτίδια καθώς εξαρτάται από πλήθος παραγόντων. Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται ο διαλύτης, οι παράπλευρες ομάδες και το μήκος και πλάτος του φύλλου.

Είναι γεγονός ότι το φάσμα CD ενός β-πτυχωτού φύλλου, είναι περισσότερο ευμετάβλητο, ως προς τις θέσεις και το μέγεθος των κορυφών, σε σχέση με το αντίστοιχο της α-έλικας. Η μεταβλητότητα αυτή, είναι αποτέλεσμα των πολλαπλών δυνατοτήτων σχηματισμού β-πτυχωτού φύλλου (παράλληλου, αντιπαράλληλου ή μίγμα αυτών) σε σύγκριση με την α-έλικα.

Θεωρητικοί υπολογισμοί έχουν γενικά προβλέψει όμοια φάσματα CD για το παράλληλο και αντιπαράλληλο β-πτυχωτό φύλλο. Ποιοτικά τα φάσματα CD που προβλέπονται για τους δύο τύπους β-πτυχωτού φύλλου είναι παρόμοια. Το κριτήριο<sup>16</sup> για διάκριση μεταξύ των δύο τύπων είναι η διαφορά στο  $\lambda_{\max}$  ανάμεσα στον κυκλικό διχρωισμό και την απορρόφηση. Αυτή, προβλέπεται να είναι ~5nm για πεπλατυσμένα αντιπαράλληλα πτυχωτά φύλλα και ~13nm για παράλληλα πτυχωτά φύλλα. Για στενά πτυχωτά φύλλα, το παραπάνω κριτήριο αποτυγχάνει, γιατί η διαφορά αυξάνει με μείωση του πλάτους στην περίπτωση του αντιπαράλληλου β-πτυχωτού φύλλου.



### 5.4.3 β-στροφή

Η β-στροφή απαντάται πολύ συχνά στις πρωτεΐνες και συμβάλει στην αλλαγή κατεύθυνσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Είναι μια διαμόρφωση στην οποία συμμετέχουν τέσσερα αμινοξέα και η οποία υποχρεώνει την πεπτιδική αλυσίδα να κάνει στροφή  $180^\circ$  γύρω από το κεντρικό τμήμα των δύο εκ των τεσσάρων αμινοξέων. Η διάταξη αυτή σταθεροποιείται από έναν δεσμό υδρογόνου μεταξύ της ομάδας CO του αμινοξέος στη θέση  $i$  και της ομάδας NH του αμινοξέος στη θέση  $i + 3$ . Έτσι, σχηματίζεται ένας δεκαμελής δακτύλιος. Οι β-στροφές συχνά συνδέουν αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, γι' αυτό και πήραν αυτό το όνομα.

Το φάσμα CD της β-στροφής τύπου I, μοιάζει ποιοτικά με αυτό της α-έλικας στα μεγαλύτερα μήκη κύματος, με τη διαφορά ότι η θετική κορυφή στα μικρότερα μήκη κύματος είναι ασθενέστερη στα φάσματα των στροφών. Η β-στροφή τύπου II, δίνει φάσμα παρόμοιο με ενός β-πτυχωτού φύλλου, με τη διαφορά ότι είναι μετατοπισμένο προς το ερυθρό κατά  $5-10\text{nm}^{17}$ .

### 5.4.4 Τυχαία διαμόρφωση

Τα πεπτίδια των οποίων η διαμόρφωση δεν παρουσιάζει κάποια κανονικότητα, θα ήταν αναμενόμενο να έχουν αρκετά μεταβλητό φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού. Παρόλα αυτά, η τυχαία διαμόρφωση παρουσιάζει ένα συγκεκριμένο τύπο φάσματος με μια αρκετά μεγάλη κορυφή κοντά στα  $200\text{ nm}$  και μια δεύτερη χαρακτηριστική σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, κοντά στα  $220\text{ nm}$ , η οποία μπορεί να είναι είτε θετική είτε αρνητική<sup>18</sup>.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ**



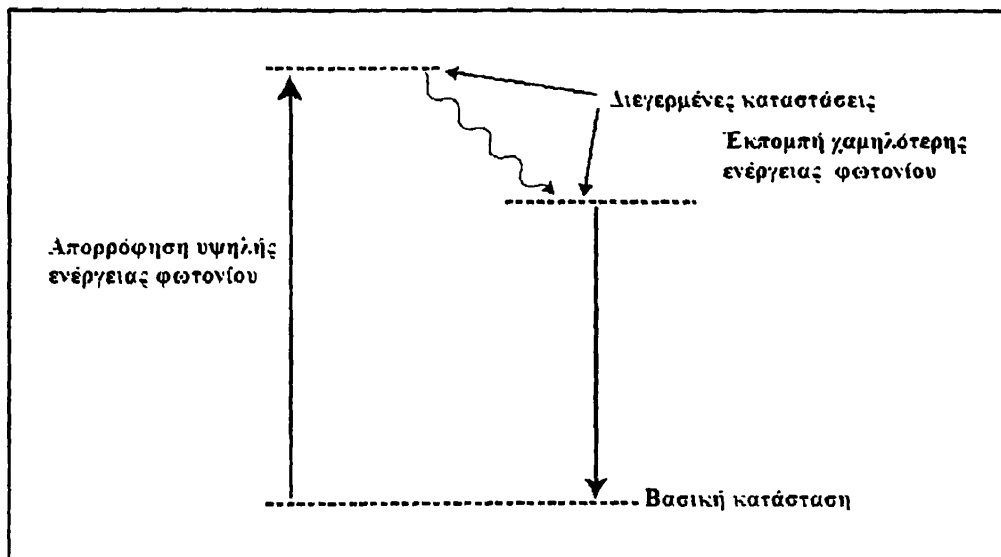
## 6. ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

### 6.1 Εισαγωγή

Η αρχική ιδέα για τη συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) αναπτύχθηκε από τον Marvin Minsky στα μέσα της δεκαετίας του 1950<sup>1</sup>. Σήμερα, η μέθοδος αυτή αποτελεί μια από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές μελέτης τόσο «ζωντανών» όσο και μονιμοποιημένων «fixed» συστημάτων (καλλιέργεια κυττάρων). Η τεχνική αυτή απορρίπτει τις πληροφορίες που υπάρχουν εκτός του σημείου εστιασμού, καθώς μια μικρή οπή βρίσκεται μπροστά από τον ανιχνευτή, ώστε να ανιχνεύεται μόνο η περιοχή του δείγματος στην οποία εστιάζει το μηχάνημα. Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ανιχνεύονται αποκλειστικά και μόνο συγκεκριμένα σημεία φωτεινότητας.

### 6.2 Φθορισμός-Μικροσκόπιο φθορισμού

Η ακτινοβόληση ενός μορίου μπορεί να οδηγήσει στην εκπομπή φωτός από αυτό, σε διαφορετικό μήκος κύματος. Η παραπάνω ιδιότητα ονομάζονται φθορισμός. Σε κανονική θερμοκρασία τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στη χαμηλότερη στάθμη ενέργειας, την βασική κατάσταση. Εντούτοις, τα μόρια μπορούν να απορροφήσουν ένα φωτόνιο με αποτέλεσμα να αυξηθεί η ενέργειά τους και ένα ηλεκτρόνιό τους να μεταπηδήσει σε μια διεγερμένη κατάσταση<sup>2</sup>. Το μόριο μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα ( $10^{-8}$  sec) διοχετεύει κάποια ενέργειά που έχει απορροφήσει μέσω συγκρούσεων με τα γύρω μόρια, αναγκάζοντας το ηλεκτρόνιο να μεταπέσει σε χαμηλότερης ενέργειας στάθμη. Στην περίπτωση που τα γύρω μόρια δεν μπορούν να δεχτούν την υπόλοιπη ενέργεια που χρειάζεται για να φτάσει το μόριο στη βασική κατάσταση, είναι δυνατόν να γίνει αυθόρμητη εκπομπή ενέργειας, εκπέμποντας φως μεγαλύτερου μήκους κύματος<sup>3</sup> (Σχήμα 1).

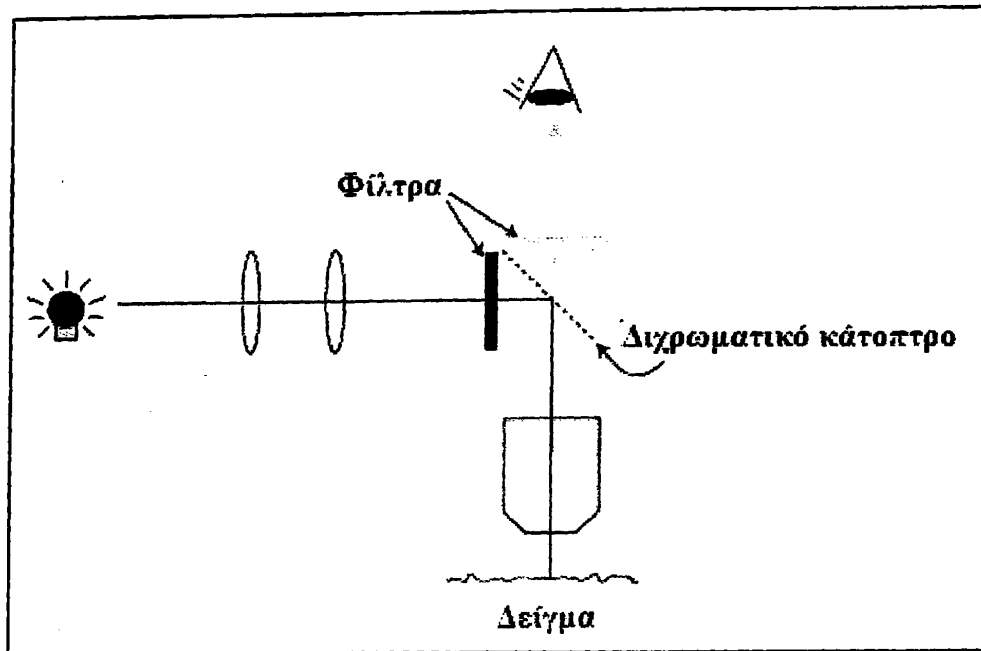


**Σχήμα 1:** Διάγραμμα αναπαράστασης της εκπομπής ακτινοβολίας κατά τη διαδικασία του φθορισμού

Η φλουορεσκεΐνη είναι μια συνήθης φθορίζουσα ουσία, η οποία λειτουργεί με τον προαναφερθέντα τρόπο, εκπέμποντας πράσινο φως όταν διεγείρεται από φως excitation. Το μήκος κύματος που εκπέμπεται καθώς και το μήκος κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας εξαρτώνται από το υλικό.

Το πλεονέκτημα του φθορισμού στη μικροσκοπία είναι η ικανότητα πρόσδεσης κατάλληλης φθορίζουσας ουσίας σε συγκεκριμένες περιοχές του δείγματος, έτσι ώστε μόνο αυτές οι περιοχές να ανιχνεύονται. Επιπλέον είναι δυνατή η χρήση περισσότερων της μιας φθορίζουσας ουσίας<sup>4</sup>. Με τη χρήση κατάλληλης διεγείρουσας ακτινοβολίας είναι δυνατός ο φθορισμός της κάθε φθορίζουσας ομάδας ξεχωριστά ώστε να επιτευχθεί η ανίχνευση διαφορετικών περιοχών.

Στην φθορίζουσα μικροσκοπία ένα δείγμα που έχει υποστεί χρώση, φωτίζεται με φως κατάλληλου μήκους κύματος και στη συνέχεια προκύπτει μια εικόνα από το παραγόμενο φθορίζον φως (Σχήμα 2). Το μικροσκόπιο διαθέτει ένα διχρωματικό κάτοπτρο το οποίο ανακλά φως χαμηλότερου μήκους κύματος και εκπέμπει φως υψηλότερου μήκους κύματος. Έτσι, το φως της κύριας πηγής ανακλάται στο διχρωματικό κάτοπτρο και φτάνει στο δείγμα, ενώ το υψηλότερου μήκους κύματος φως από το φθορίζον δείγμα περνά μέσα από το διχρωματικό κάτοπτρο και τελικά φτάνει στον παρατηρητή<sup>5</sup>.

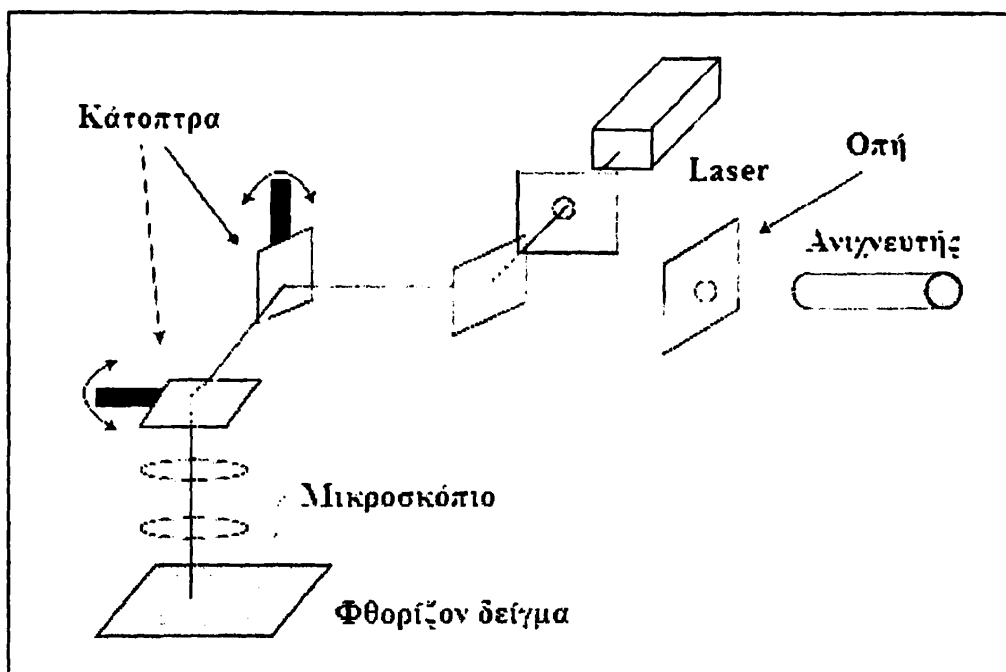


Σχήμα 2: Αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας της Φθορίζουσας Μικροσκοπίας

### 6.3 Αρχή λειτουργίας της Συνεστιακής Μικροσκοπίας

Στη συνεστιακή μικροσκοπία το διεγείρον φως υψηλής έντασης (μπλε) παράγεται από μια πηγή laser. Το φως αυτό ανακλάται από ένα διχρωματικό κάτοπτρο και στη συνέχεια κατευθύνεται προς το δείγμα με τη βοήθεια δύο κατόπτρων. Η χρωστική του δείγματος διεγείρεται από το διεγείρον φως και φθορίζει. Το φθορίζον φως (πράσινο) που εκπέμπεται από το δείγμα, κατευθύνεται από τα ίδια κάτοπτρα που έστειλαν το διεγείρον φως στο δείγμα.

Το φθορίζον φως περνάει από το διχρωματικό κάτοπτρο και στη συνέχεια εστιάζεται σε μια μικρή οπή. Το φως που διαπερνάει την οπή φτάνει στον ανιχνευτή (Σχήμα 3). Κάθε χρονική στιγμή ένα μόνο σημείο του δείγματος παρατηρείται, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η σύνδεση του ανιχνευτή με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, ώστε να οπτικοποιείται το σήμα που φτάνει στον ανιχνευτή.



Σχήμα 3: Αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας της Συνεστιακής Μικροσκοπίας

#### 6.4 Πλεονεκτήματα της τεχνικής της Συνεστιακής Μικροσκοπίας

Η δημοτικότητα της τεχνικής της συνεστιακής μικροσκοπίας πηγάζει από το γεγονός ότι συγκεντρώνει ένα μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων<sup>6</sup>. Συγκεκριμένα, λόγω του μικρού βάθους εστίασης της τεχνικής (0.5nm-1.5nm), οι πληροφορίες λαμβάνονται από μία πολύ καλά καθορισμένη περιοχή του δείγματος. Επίσης, οι αλλαγές στην εστίαση δεν δημιουργούν συσκότιση, αλλά βαθμιαία απορρίπτουν περιοχές του δείγματος που απομακρύνονται από το επίπεδο του εστιασμού, έτσι ώστε να επέρχεται οπτικός διαχωρισμός. Ο εκτός εστιασμού φθορισμός ουσιαστικά εξαλείφεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της οπτικής καθαρότητας και του βαθμού διαφοράς φωτεινότητας/σκουροχρωμίας. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι με τη συνεστιακή μικροσκοπία είναι δυνατή η μελέτη «ζωντανών» αλλά και μονιμοποιημένων «fixed» συστημάτων. Τέλος η τεχνική αυτή επιτρέπει τη μελέτη των συστημάτων στο xy επίπεδο (κάθετα στον οπτικό άξονα του μικροσκοπίου), αλλά και στο κάθετο επίπεδο (παράλληλα στον οπτικό άξονα του μικροσκοπίου), στο xz ή yz επίπεδο. Πραγματοποιείται σάρωση και στις τρεις διαστάσεις x, y, z και λαμβάνοντας εικόνες των επιπέδων σε διάφορα βάθη (τομές) του δείγματος, είναι δυνατόν να γίνει γενικότερη τρισδιάστατη εκτίμηση του συστήματος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ



## 7. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

### 7.1 Εισαγωγή

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην ανοσολογία. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να προσδιοριστεί το στάδιο του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης ή της ενεργοποίησης των διάφορων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Το κυτταρόμετρο ροής εντοπίζει και μετρά μεμονωμένα κύτταρα, ενώ διέρχονται το ένα μετά το άλλο, σαν ένα ρεύμα μπροστά του. Ένα κυτταρόμετρο ροής εξοπλισμένο για να διαχωρίζει τα αναγνωρισμένα κύτταρα ονομάζεται διαλογέας κυττάρων, ενεργοποιημένος με φθορισμό (Fluorescence Activated Cell Sorter, **FACS**). Αυτά τα όργανα χρησιμοποιούνται στη μελέτη των ιδιοτήτων υποσειρών κυττάρων αναγνωρισμένων με μονοκλωνικά αντισώματα που στρέφονται κατά πρωτεϊνών της επιφάνειας του κυττάρου.

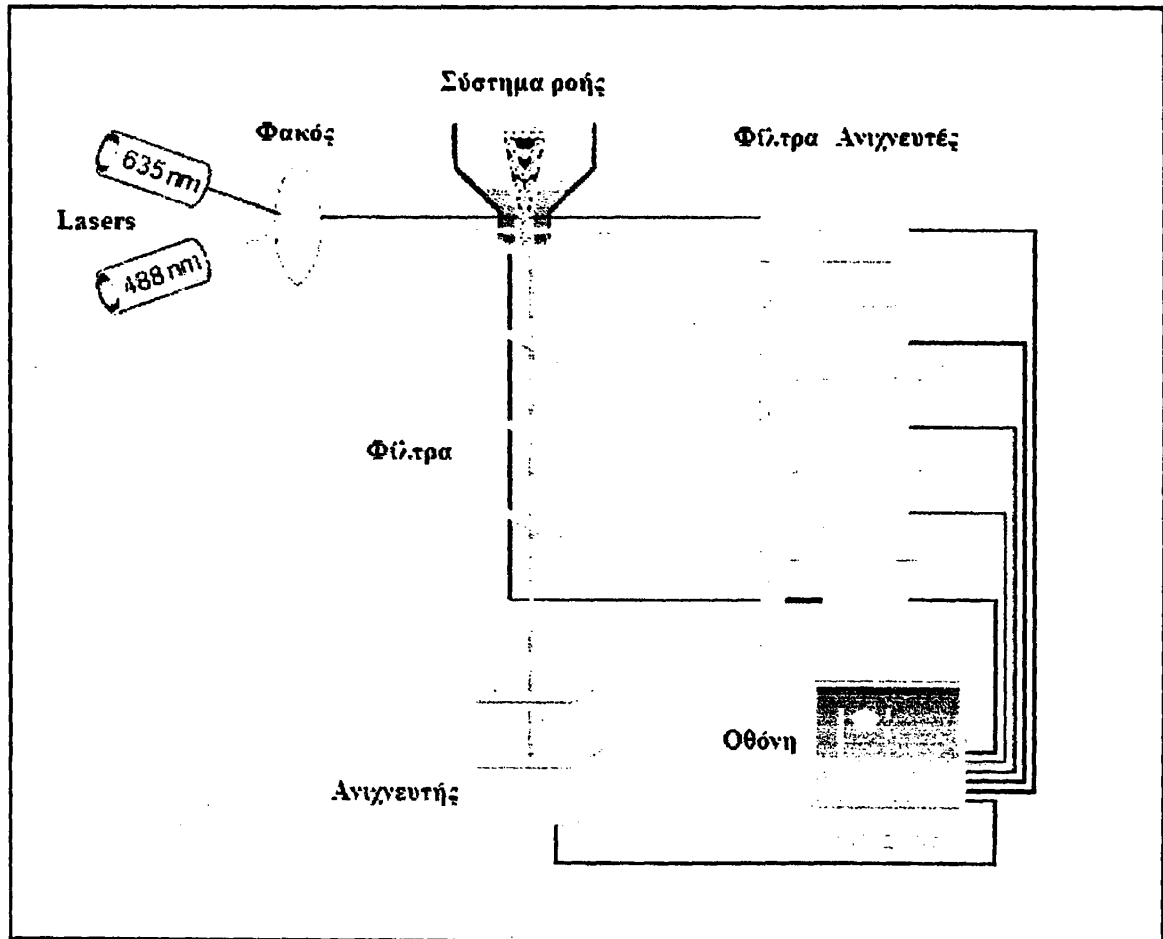
Γενικά η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνολογία με τεράστιες εφαρμογές όπως διάγνωση νοσημάτων, παρακολούθηση καρκινικής θεραπείας, κυτταρική κινητική, ανάλυση κυτταρικής λειτουργίας, ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων, κυτταρογεννητική και θεμελιώδης κυτταρική βιολογία. Ο κυτταρομετρητής μπορεί να αναλύσει οποιοδήποτε κυτταρικό υλικό στο οποίο μπορούν να προσδεθούν χρωστικές. Εάν η σύνδεση της χρωστικής είναι στοιχειομετρική (δηλαδή η ποσότητα της δέσμευσης της χρωστικής είναι ανάλογη της ποσότητας του κυτταρικού συστατικού), η μέτρηση είναι ποσοτική και υψηλής ακρίβειας.

### 7.2 Αρχή λειτουργίας οργάνου

Στο κυτταρόμετρο ροής, μεμονωμένα κύτταρα εντός ενός μικτού πληθυσμού σημαίνονται αρχικώς μέσω επεξεργασίας με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν σημανθεί με φθορίζουσες χρωστικές. Κατόπιν, το μείγμα των κυττάρων που έχουν σημανθεί, δέχεται ισχυρή ώθηση από αρκετά μεγαλύτερο όγκο αλατούχου διαλύματος και περνά διαμέσου ενός ακροφυσίου, δημιουργώντας ένα λεπτό στρώμα υγρού, που περιέχει κύτταρα τοποθετημένα ένα ένα κατά διαστήματα. Καθώς κάθε κύτταρο περνά μπροστά από μία ακτίνα Laser, διαθλά την ακτινοβολία Laser και τα μόρια της χρωστικής που είναι δεσμευμένα στο κύτταρο διεγείρονται και φθορίζουν. Ευαίσθητοι σωλήνες φωτοπολλαπλασιασμού εντοπίζουν αφενός τη διαχεόμενη ακτινοβολία, η οποία παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος (πρόσθια σκεδαζόμενη ακτινοβολία, **Forward Light Scatter, FSC**) και την κοκκώδη υφή του κυττάρου (κάθετη ή πλάγια σκεδαζόμενη ακτινοβολία, **Right**

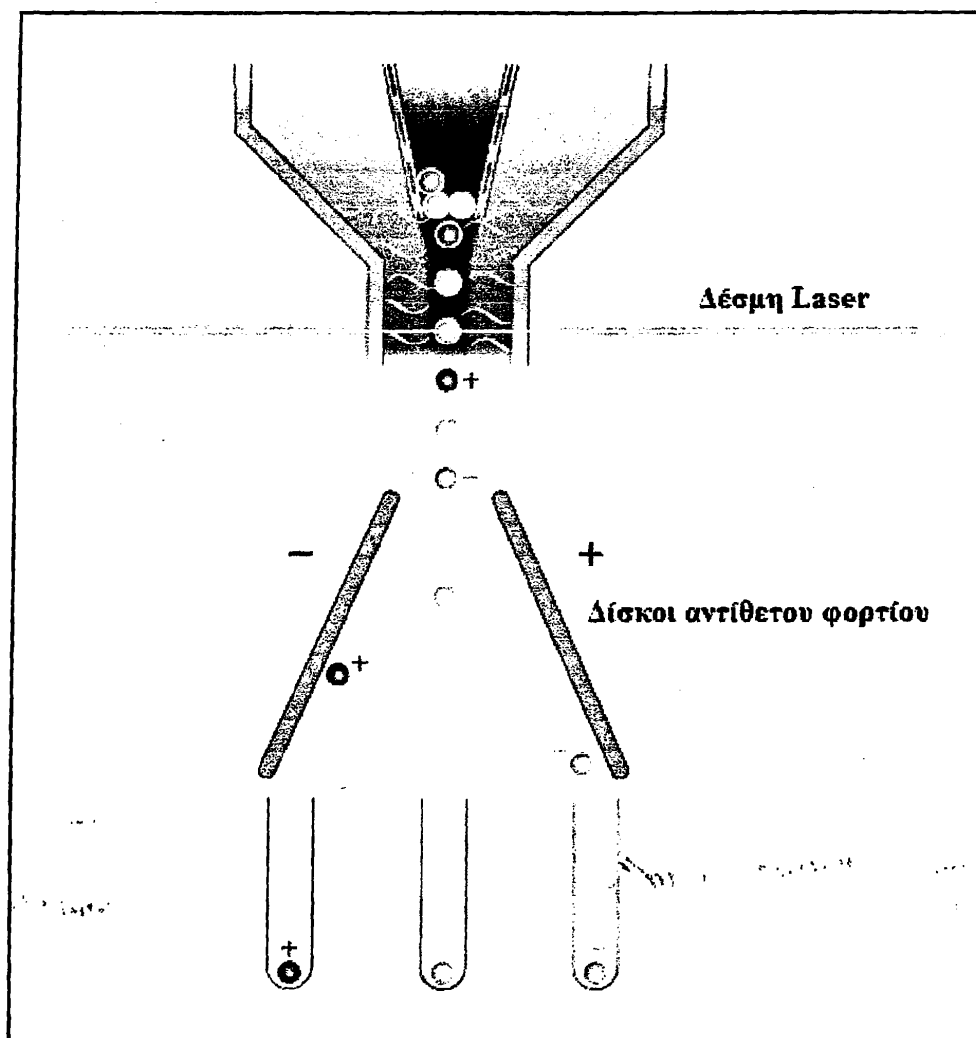


Angle Scatter, RSC), αφετέρου τις εκπομπές φθορισμού οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για τη σύνδεση των μονοκλωνικών αντισωμάτων που έχουν σημανθεί, οπότε και για την έκφραση των πρωτεϊνών της επιφάνειας των κυττάρων μεμονωμένα<sup>1</sup> (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας ενός κυτταρόμετρου ροής

Στον διαλογέα κυττάρων, τα σήματα που επιστρέφονται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή δημιουργούν και αυτά ηλεκτρικό φορτίο, το οποίο περνά από το ακροφύσιο μέσω του υγρού κύματος στο κύτταρο, φορτίζοντας το. Αφού περάσει ένα ορισμένο σημείο το στρώμα διαλύεται σε σταγονίδια, που το καθένα περιέχει ένα μόνο κύτταρο. Τα σταγονίδια που περιέχουν φορτισμένα κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να απομακρυνθούν από το κυρίως ρεύμα σταγονιδίων, ενώ αυτό διέρχεται μέσω δίσκων αντίθετου φορτίου<sup>1</sup> (Σχήμα 2).

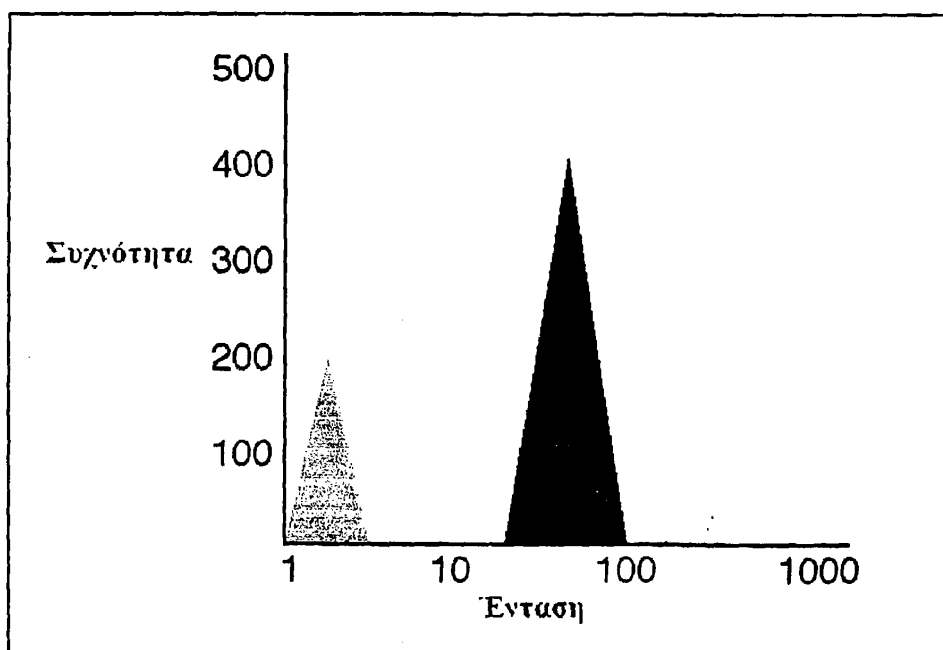


Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας ενός διαλογέα κυττάρων ενεργοποιημένου με φορτισμό

### 7.3 Τρόποι παρουσίασης αποτελεσμάτων κυτταρόμετρου ροής

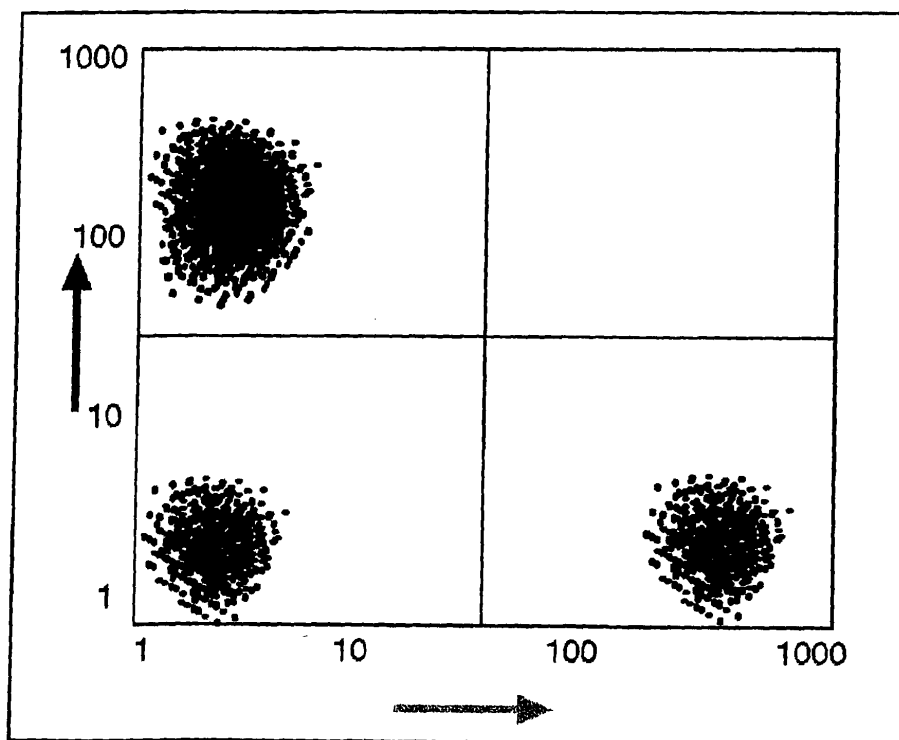
Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρουσίασης των αποτελεσμάτων που δίνει ένα κυτταρόμετρο ροής. Οι πιο συνηθισμένοι από αυτούς είναι τα ιστογράμματα έντασης φθορισμού ως προς τον αριθμό των κυττάρων και τα διαγράμματα διασποράς δύο διαστάσεων<sup>2</sup>.

Όταν τα κύτταρα σημαίνονται με ένα μεμονωμένο φθορίζον αντίσωμα, τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής εκτίθενται συνήθως με τη μορφή ιστογράμματος έντασης φθορισμού ως προς τον αριθμό των κυττάρων. Η χρήση ενός μόνο αντισώματος μπορεί να καταδείξει το ποσοστό ενός κυτταρικού πληθυσμού που φέρει το μόριο που ανιχνεύθηκε απ' αυτό το αντίσωμα καθώς και την ποσότητα αυτού του μορίου που εκφράστηκε πάνω σε κάθε κύτταρο. Για παράδειγμα στο Σχήμα 3 φαίνεται ότι υπάρχει σχεδόν διπλάσιος αριθμός κυττάρων που έχουν επισημανθεί με κόκκινη χρωστική σε σχέση με τα κύτταρα που έχουν επισημανθεί με πράσινη χρωστική και με τα κύτταρα που δεν έχουν επισημανθεί, ενώ η ένταση φθορισμού είναι μεγαλύτερη για τα κύτταρα που ήταν επισημασμένα πράσινα.



Σχήμα 3: Ιστόγραμμα έντασης φθορισμού ως προς τον αριθμό των κυττάρων

Όταν τα κύτταρα σημαίνονται με δύο ή και περισσότερα φθορίζοντα αντισώματα, τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής εκτίθενται συνήθως με τη μορφή των διαγραμμάτων διασποράς δύο διαστάσεων. Η χρήση δύο αντισωμάτων μπορεί να προσδιορίσει τέσσερις πληθυσμούς κυττάρων: αυτούς που εκφράζουν το κάθε μόριο χωριστά (πράσινο:κάτω δεξιά, κόκκινο:πάνω αριστερά), αυτούς που εκφράζουν και τα δύο (πάνω δεξιά) και αυτούς που δεν εκφράζουν κανένα (κάτω αριστερά) (Σχήμα 4). Στα διαγράμματα αυτά κάθε κηλίδα αντιπροσωπεύει και ένα κύτταρο και το μέγεθος, η ένταση και η πυκνότητα κάθε κύκλου κηλίδων υποδηλώνουν τον αριθμό των κυττάρων με αυτά τα χαρακτηριστικά.



Σχήμα 4: Διάγραμμα διασποράς δύο διαστάσεων

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8**

### **ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**



## 8. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

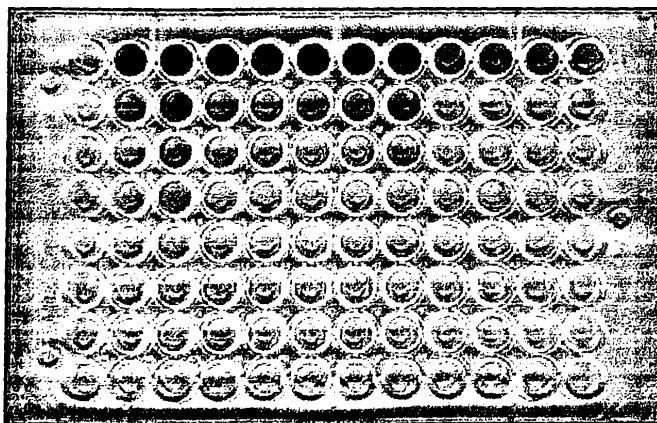
### 8.1 Εισαγωγή

Η μέτρηση διαφόρων ουσιών με φαρμακευτική, διαγνωστική και γενικότερη ιατρική σημασία με χρήση ανοσολογικών τεχνικών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον και βρίσκει ολοένα και περισσότερες εφαρμογές. Η μεγάλη εκλεκτικότητα της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος οδήγησε στην ανάπτυξη ευαίσθητων και υψηλής ακρίβειας τεχνικών μετρήσεως (ποσοτικού προσδιορισμού) που βασίζονται στο σχηματισμό τέτοιων συμπλόκων. Οι τεχνικές αυτές στις μέρες μας έχουν αυξηθεί σημαντικά σε αριθμό ενώ παράλληλα έχουν βελτιωθεί σε ευαισθησία. Οι περισσότερο διαδεδομένες είναι: η ιζηματοαντίδραση, η ανοσοδιάχυση, η ανοσοηλεκτροφόρηση, ο ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός, οι ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί και η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών.

### 8.2 Ανοσοενζυμικές μέθοδοι

Μια από τις γνωστότερες ανοσολογικές τεχνικές είναι η μέθοδος του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ELISA<sup>1,2</sup> (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) την πρόσδεση αντιγόνου ή αντισώματος στην στερεή επιφάνεια κατάλληλα διαμορφωμένων πλακιδίων (Σχήμα 1)
- 2) την αντίδραση αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος και
- 3) τη μέτρηση της ενζυμικής δράσης του επισημασμένου με ένζυμο αντισώματος ή αντιγόνου πάνω σε κατάλληλο υπόστρωμα.



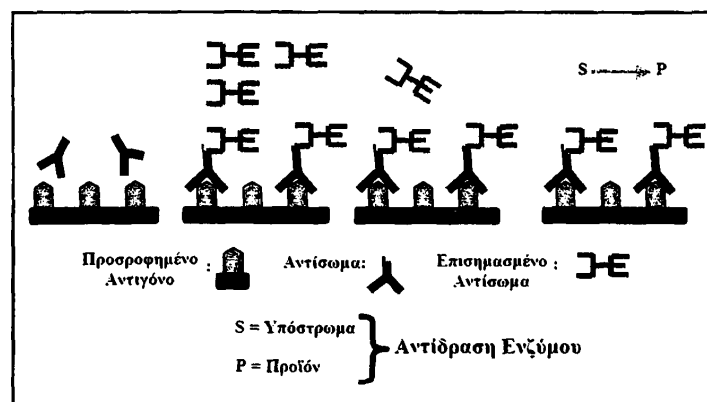
Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση ενός πλακιδίου ELISA

Τα ένζυμα που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η υπεροξειδάση και η αλκαλική φωσφατάση. Η προσθήκη κατάλληλων ενζυμικών υποστρωμάτων στο τελικό στάδιο της τεχνικής οδηγεί, λόγω της παρουσίας επισημασμένων με ένζυμο αντισωμάτων, στην ανάπτυξη χρώματος, το οποίο φωτομετρείται, παρέχοντας τη δυνατότητα ακριβούς ποσοτικού προσδιορισμού.

Οι μέθοδοι ELISA μπορεί να είναι είτε μη ανταγωνιστικού είτε ανταγωνιστικού τύπου. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο εάν η τεχνική έχει κάποιο στάδιο όπου το μη επισημασμένο και το επισημασμένο αντιγόνο συναγωνίζεται για περιορισμένο αριθμό θέσεων δέσμησης στο αντίσωμα ή αν το αντιγόνο (ή αντίσωμα) που πρόκειται να μελετηθεί αντιδρά κατ' αρχήν με το αντίσωμα (ή το αντιγόνο) σε στερεή φάση με ακόλουθη μέτρηση της δέσμησης του επισημασμένου με ένζυμο αντι-αντισώματος.

### ◆ ELISA μη ανταγωνιστικού τύπου

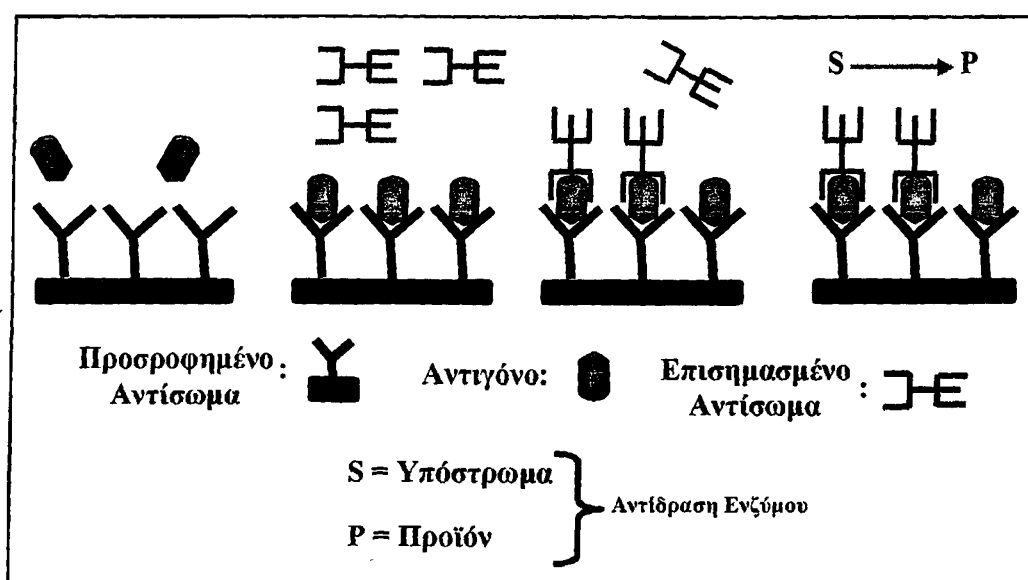
Η ELISA μη ανταγωνιστικού<sup>3</sup> τύπου περιλαμβάνει τόσο τον προσδιορισμό αντισώματος, όσο και τον προσδιορισμό αντιγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, το αντίσωμα που πρόκειται να προσδιοριστεί συνδέεται αρχικά με το αντιγόνο το οποίο είναι ήδη ακινητοποιημένο στη στερεή επιφάνεια. Ένα δεύτερο αντίσωμα (αντί-αντίσωμα), το οποίο είναι ιχνηθετημένο με ένζυμο, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ποσότητας του αντισώματος που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντιγόνο. Οτιδήποτε δεν προσκολλάται στο πλακίδιο, αποβάλλεται με εκπλύσεις. Η ενζυμική δράση είναι ανάλογη της ποσότητας του αντισώματος που συνδέθηκε με το αντιγόνο. Η όλη διαδικασία ονομάζεται μη ανταγωνιστική έμμεση ELISA για τον προσδιορισμό αντισώματος<sup>4-6</sup> (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση τεχνικής ELISA μη ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό αντισώματος



Στη δεύτερη περίπτωση, για τον προσδιορισμό αντιγόνου, η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά την πρόσδεση του προς μελέτη αντιγόνου με το ακινητοποιημένο στη στερεή επιφάνεια αντίσωμα. Με την προσθήκη και δεύτερου αντισώματος της ίδιας ειδικότητας, επισημασμένο όμως με ένζυμο, μετρείται η ποσότητα του αντιγόνου που συνδέεται με το αντίσωμα. Για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση, είναι απαραίτητο το αντιγόνο να διαθέτει πολλούς αντιγονικούς καθοριστές (ίδιους ή μη) ώστε να μπορέσει μετά την αντίδρασή του με το ακινητοποιημένο αντίσωμα, να αντιδράσει και με το ιχνηθετημένο με ένζυμο αντίσωμα. Η ενζυμική δράση που παρατηρείται, είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Η όλη διαδικασία ονομάζεται μη ανταγωνιστική ELISA τύπου sandwich για τον προσδιορισμό αντιγόνου<sup>4,5,7</sup> (Σχήμα 3).



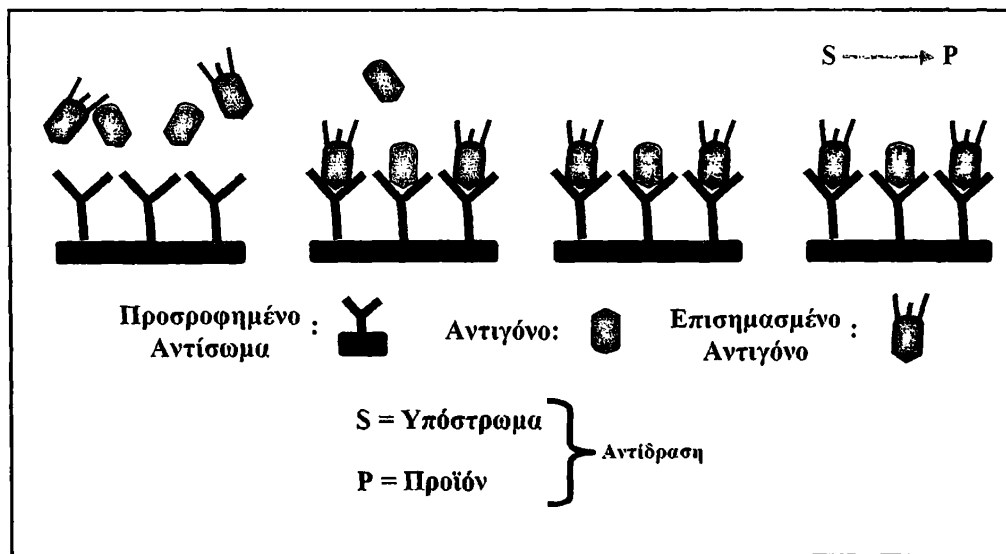
Σχήμα 3: Σχηματική απεικόνιση τεχνικής ELISA μη ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό αντιγόνου



◆ ELISA ανταγωνιστικού τύπου

Οι προσδιορισμοί με την ELISA ανταγωνιστικού τύπου μπορούν να διεξαχθούν είτε με τη χρήση επισημασμένου με ένζυμο αντιγόνου ή επισημασμένου με ένζυμο αντισώματος. Στην πρώτη περίπτωση, το αντιγόνο που πρόκειται να προσδιορισθεί αναμιγνύεται με καθορισμένη ποσότητα αντιγόνου επισημασμένου με ένζυμο σε συνθήκες τέτοιες, ώστε να υπάρχει ανταγωνισμός ανάμεσα στο προς μέτρηση αντιγόνο και το επισημασμένο αντιγόνο, για την πρόσδεσή τους στο ακινητοποιημένο αντίσωμα (Σχήμα 4). Η ενζυμική δράση είναι μέγιστη, απουσία αντιγόνου στο προς εξέταση διάλυμα ενώ μειώνεται, αυξανόμενης της συγκέντρωσής του. Επομένως, η ενζυμική δράση είναι αντιστρόφως ανάλογη του προς μέτρηση αντιγόνου.

Στη δεύτερη περίπτωση, ουσιαστικό ρόλο διαδραματίζει το αντιγόνο, το οποίο πρέπει να είναι συνδεδεμένο με φυσικές ή χημικές δυνάμεις με τη στερεή επιφάνεια. Η δέσμευση του επισημασμένου με ένζυμο αντισώματος στο ακινητοποιημένο αντιγόνο αναστέλλεται συναγωνιστικά με την προσθήκη πρότυπου αντιγόνου ή του προς μελέτη αντιγόνου.



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση τεχνικής ELISA ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό αντιγόνου



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9**

### **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**



## 9. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο καρκίνος είναι μια σοβαρή ασθένεια η συχνότητα της οποίας τα τελευταία χρόνια αυξάνεται ραγδαία και οδηγεί στο θάνατο πολλούς ανθρώπους. Προκαλείται από την προοδευτική ανάπτυξη του προγόνου ενός και μόνο μετασχηματισμένου κυττάρου.

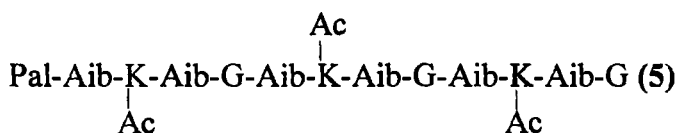
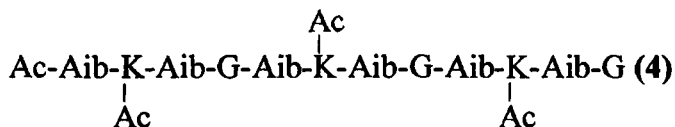
Η ιδανική θεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα να καταπολεμάει όγκους σε διάφορα σημεία του σώματος και να καθιστά ικανή τη διάκριση καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων. Η ανοσοθεραπεία πληρεί και τις δύο προϋποθέσεις, ώστε να παρασκευασθούν αντικαρκινικά εμβόλια που θα έχουν εκτός από θεραπευτικό σκοπό και προφυλακτικό για ομάδες υψηλού κινδύνου.

Η αντικαρκινική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος εντοπίζεται κυρίως στην κυτταρική ανοσία. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μηχανισμών ικανών να προκαλούν την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και οι περισσότεροι από αυτούς τους μηχανισμούς εξαρτώνται από τη δράση των T κυττάρων. Ανοσολογική απόκριση κατά καρκινικών αντιγόνων έχει αναφερθεί σε πολλούς ασθενείς με καρκίνο. Έχουν ταυτοποιηθεί CD4 και CD8 επίτοποι, χωρίς όμως η ανοσολογική τους απόκριση να επιφέρει υποχώρηση του καρκίνου. Παρ' όλα αυτά, από προηγούμενες μελέτες που έγιναν έχει βρεθεί πως συνδυασμός επιτόπων τάξεως I και τάξεως II (CD8 και CD4) που προέρχονται από το ίδιο καρκινικό αντιγόνο ενισχύουν την ποιότητα της ανοσολογικής απόκρισης και επάγουν μακράς διάρκειας ανοσία.

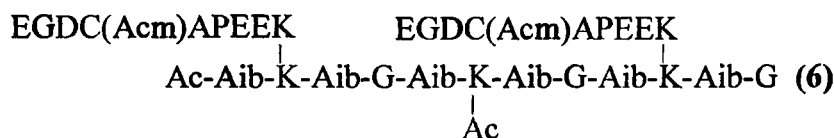
Όμως, επειδή τα πεπτίδια, λόγω του μικρού μεγέθους τους δεν είναι ισχυρές ανοσογόνες ουσίες είναι απαραίτητη η πρόσδεσή τους σε πρωτεϊνικούς φορείς. Μ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ενίσχυση της ανοσογονικότητας/ αντιγονικότητας και της σταθερότητάς τους.

Έχοντας ως στόχο τη βελτίωση της στρατηγικής για την ανάπτυξη αντικαρκινικών εμβολίων, έγινε ο σχεδιασμός και η σύνθεση μακρομορίων που ενσωματώνουν CD8 επιτόπους από το ίδιο καρκινικό αντιγόνο, το MAGE 3, στον επαναλαμβανόμενο ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC<sub>3</sub>-II. Τα ελικοειδή χαρακτηριστικά του φορέα αναμένεται ότι θα συμβάλουν στην όσο το δυνατόν καλύτερη έκθεση των CD8 επιτόπων, ώστε να αναγνωρισθούν από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, και στη διατήρηση των δομικών χαρακτηριστικών τους ώστε να μιμούνται το αρχικό καρκινικό αντιγόνο. Οι επίτοποι CD8 έχουν τοποθετηθεί στην πρώτη και τρίτη παράπλευρη ομάδα της λυσίνης του φορέα SOC<sub>3</sub>-II, (η δεύτερη Lys-N<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> ακετυλιώθηκε) ώστε να αποφευχθεί κάθε πιθανή αλληλεπίδρασή τους.

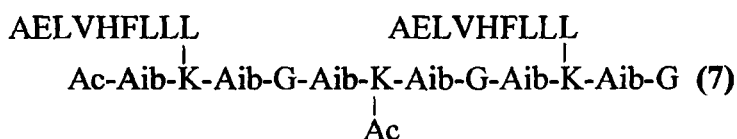
Στα πλαίσια της παρούσης μελέτης παρασκευάστηκαν οι επίτοποι CD8 (212-220): EGDC(Acm)APEEK (1), CD8 (114-122): AELVHFLLL (2) και CD4 (281-295): KKLLTQHFVQENYLEY (3) του MAGE 3 καρκινικού αντιγόνου, ο φορέας SOC<sub>3</sub>-II ακετυλιωμένος και παλμιτοϋλιωμένος (4, 5) ως μάρτυρες για τις δομικές και βιολογικές μελέτες:



Επίσης, συντέθηκε ο φορέας SOC<sub>3</sub>-II με τον επίτοπο CD8 (212-220) συνδεδεμένο στις Lys-N<sup>6</sup>H<sub>2</sub> των θέσεων ένα και τρία:

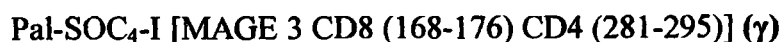
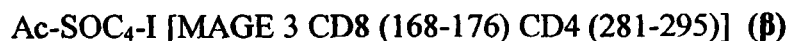
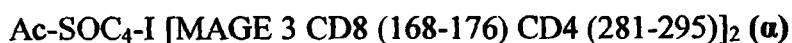


και ο φορέας SOC<sub>3</sub>-II με τον επίτοπο CD8 (114-122) συνδεδεμένο στις Lys-N<sup>6</sup>H<sub>2</sub> των θέσεων ένα και τρία:



για τη μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών τους με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού.

Στα Ac-SOC<sub>3</sub>-II-παράγωγα (6),(7), Ac-SOC<sub>4</sub>-I-παράγωγα (α),(β) και στο Pal-SOC<sub>4</sub>-I-παράγωγο (γ), προσδέθηκε ομοιοπολικά η ομάδα της φλουορεσκεΐνης (8)-(12) ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση της θέσης των μορίων εντός του κυττάρου με συνεστιακή μικροσκοπία.



Τέλος έγιναν βιολογικά πειράματα, για το Pal-SOC<sub>4</sub>-I-παραγώγου (γ) ώστε να μελετηθεί η δυνατότητα ενεργοποίησης των CD8 T λεμφοκυττάρων.

Τελικός στόχος της μελέτης είναι η ανάπτυξη προφυλακτικής ανοσίας έναντι του καρκίνου σε ομάδες υψηλού κινδύνου.

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10**

### **ΣΥΝΘΕΣΗ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ**



## 10. ΣΥΝΘΕΣΗ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

### 10.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία τα πεπτίδια που συντέθηκαν και αναλύονται είναι: οι επίτοποι CD8 (212-220) (1), CD8 (114-122) (2) και CD4 (243-258) (3) του καρκινικού αντιγόνου MAGE 3. Επίσης, συντέθηκε ο ακετυλιωμένος και ο παλμιτοϋλιωμένος επαναλαμβανόμενος ολιγοπεπτιδικός φορέας SOC<sub>3</sub> II (4), (5), καθώς επίσης και τα SOC<sub>3</sub>-II-παράγωγα στα οποία οι επίτοποι CD8 (212-220) και (114-122) είναι συνδεδεμένοι στις Lys-N<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> των θέσεων ένα και τρία. Τέλος έγινε ιχνηθέτηση των πεπτιδίων (6), (7), Ac-SOC<sub>4</sub> I [MAGE 3 CD8 (168-176)CD4 (281-295)]<sub>2</sub>, Ac-SOC<sub>4</sub> I [MAGE 3 CD8 (168-176)CD4 (281-295)] και Pal-SOC<sub>4</sub> I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] με φλουορεσκεΐνη (8), (9), (10), (11), (12).

#### 1) MAGE 3 CD8 (212-220)



MB=1048.10

MT=C<sub>41</sub>H<sub>65</sub>N<sub>11</sub>O<sub>19</sub>S

#### 2) MAGE 3 CD8 (114-122)



MB=1054.31

MT=C<sub>52</sub>H<sub>83</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>

#### 3) MAGE 3 CD4 (243-258)



MB=2054.70

MT=C<sub>96</sub>H<sub>145</sub>N<sub>23</sub>O<sub>27</sub>





- 8) Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του *Ac-SOC<sub>3</sub> - II* [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub>
- 9) Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του *Ac-SOC<sub>3</sub> - II* [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub>
- 10) Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του *Ac-SOC<sub>4</sub>-I* [MAGE 3 CD8 (168-176)CD4 (281-295)]<sub>2</sub>
- 11) Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του *Ac-SOC<sub>4</sub>-I* [MAGE 3 CD8 (168-176)CD4 (281-295)]
- 12) Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του *Pal-SOC<sub>4</sub>-I* [MAGE 3 CD8 (168-176)CD4 (281-295)]

Η επιλογή των πεπτιδίων που προτείνονται στην παρούσα εργασία, βασίστηκε στην ιδέα της ανάπτυξης πεπτιδικών εμβολίων για την καταπολέμηση του καρκίνου, ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα.

Η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield. Για τη σύνθεση των πεπτιδίων (1)-(5) χρησιμοποιήθηκε ως πολυμερικό υπόστρωμα η *p*-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη (Wang ρητίνη, G.L Biochem, China) με το πρώτο αμινοξύ συνδεδεμένο. Για τη σύνθεση των πεπτιδίων (6), (7) χρησιμοποιήθηκε ως πολυμερικό υπόστρωμα το 4-υδροξυ-μεθυλο-φαινυλακεταμιδο-μεθυλιωμένο πολυστυρένιο (PAM ρητίνη, Neosystem, France) με το πρώτο αμινοξύ συνδεδεμένο. Η ιχνηθέτηση των πεπτιδίων με φλουορεσκεΐνη [(8),(9),(10),(11),(12)] έγινε σε διάλυμα.

Για τις συνθέσεις των πεπτιδίων σε στερεή φάση, χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες διχλωρομεθάνιο (DCM, LAB-SCAN, Ireland), μεθανόλη (MeOH, LAB-SCAN, Ireland) και διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF Fluka, Germany). Για τη σύζευξη των αμινοξέων στην πεπτιδορητίνη χρησιμοποιήθηκαν το βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό τετραφθοροβορικό άλας (TBTU, G.L. Biochem, China) ως αντιδραστήριο σύζευξης, το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBT, G.L. Biochem, China) ως βοηθητικό πυρηνόφιλο για τη μείωση της ρακεμοποίησης και η δισοπροπυλοαιθυλαμίνη (DIEA, Merck, Germany) ως τριτοταγής βάση. Για την απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας χρησιμοποιήθηκε τριφθοροξικό οξύ (TFA, Merck, Germany), ενώ για την απομάκρυνση της Fmoc προστατευτικής ομάδας χρησιμοποιήθηκε πιπεριδίνη (Fluka, Germany). Για την ακετυλίωση και παλμιτοϋλίωση των αμινομάδων χρησιμοποιήθηκε ο οξικός (Merck, Germany) και ο παλμιτικός ανυδρίτης (Fluka, Germany) αντίστοιχα. Επίσης, για την ιχνηθέτηση με φλουορεσκεΐνη χρησιμοποιήθηκε NHS-Fluorescein [5-(6)-carboxyfluorescein, succinimidyl ester, Pierce, USA]. Τέλος χρησιμοποιήθηκε διμεθυλοσουλφίδιο (DMS, Fluka, Germany) για την προστασία της Met από οξείδωση.

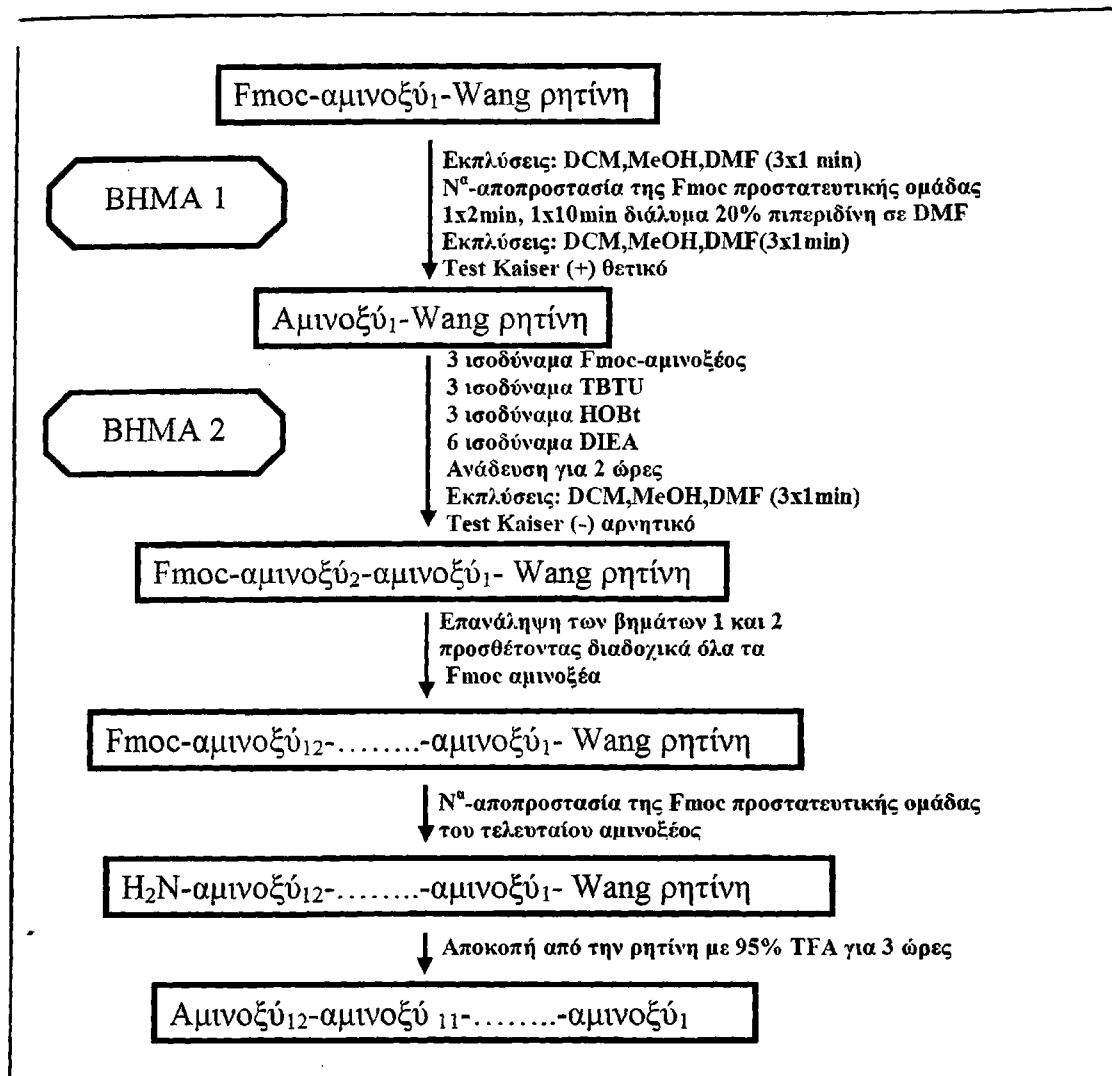
Τα προστατευμένα αμινοξέα (Neosystem, France ή G.L. Biochem) που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των παραπάνω πεπτιδίων είναι τα εξής:

Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH,  
Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH,  
Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Lys(Ac)-OH,  
Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH,  
Fmoc-Phe-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Lys(Ac)-OH, Boc-Phe-OH,  
Boc-Lys(Fmoc)-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Cys(Acm)-OH, Boc-His(Tos)-OH,  
Boc-Pro-OH, , Boc-Val-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Lys(2,6-Cl<sub>2</sub>-Bzl)-OH,  
Boc-Asp(OcHx)-OH.

## 10.2 Μεθοδολογία

Η σύνθεση των πεπτιδίων (1)-(5) έγινε σε στερεή φάση<sup>1-3</sup> με την Fmoc-μεθοδολογία<sup>4-6</sup> (Σχήμα 1), ενώ τα πεπτίδια (6), (7) συντέθηκαν με τη Boc-μεθοδολογία (Σχήμα 2). Η σύζευξη των αμινοξέων έγινε χρησιμοποιώντας την αναλογία 3/3/3/1 αμινοξύ/HOBt/TBTU/ρητίνη και διαλύτη το μίγμα DCM:DMF=1:1. Η χρήση του HOBt<sup>7,8</sup>, ως βοηθητικού πυρηνόφιλου είναι απαραίτητη, αφού συμβάλλει στη δημιουργία ενός ισχυρού και δραστικού ακυλιωτικού μέσου και ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο της ρακεμοποίησης. Για τις εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες DCM, MeOH και DMF.

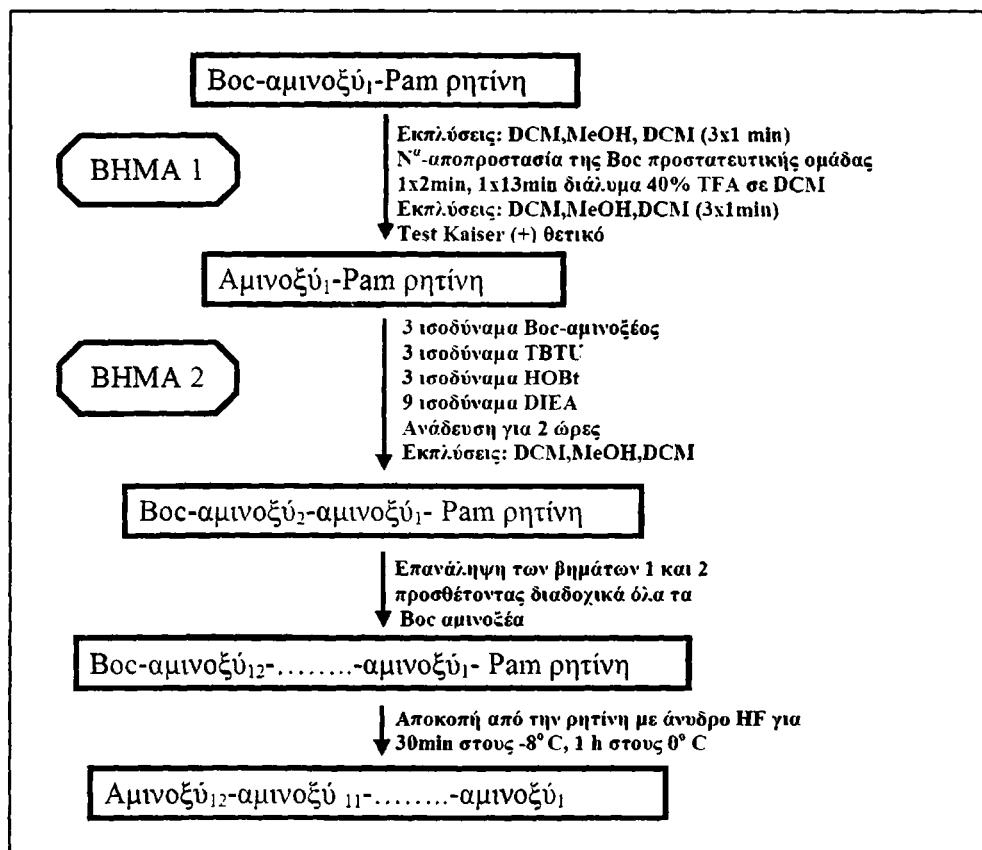




**Σχήμα 1: Πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με την Fmoc-μεθοδολογία. (Το πεπτίδιο μετά από την αποκοπή του από τη ρητίνη με TFA, είναι υπό τη μορφή άλατος TFA)**

Στην Fmoc-στρατηγική η Fmoc-προστατευτική ομάδα, που χρησιμοποιήθηκε για την παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος, απομακρύνεται με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF, αρχικά για δύο λεπτά και στη συνέχεια για δέκα λεπτά. Στη Boc-στρατηγική η Boc-προστατευτική ομάδα<sup>9,10</sup>, που χρησιμοποιήθηκε για την παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος, απομακρύνεται με διάλυμα 40% TFA σε DCM, αρχικά για δύο λεπτά ώστε να απομακρυνθεί η πλειοψηφία των καρβοκατιόντων που σχηματίζονται από το μίγμα της αντίδρασης και στη συνέχεια με άλλη μία κατεργασία με TFA για δεκατρία λεπτά για να εξασφαλιστεί η ποσοτική απομάκρυνση της Boc-προστατευτικής ομάδας. Για να αποφευχθεί ο κίνδυνος αλκυλίωσης των παράπλευρων

αλυσίδων ορισμένων αμινοξέων κατά την απομάκρυνση της Boc-ομάδας από τα δραστικά καρβοκατιόντα που σχηματίζονται ως παραπροϊόντα, χρησιμοποιούνται ουσίες που ονομάζονται "παγίδες" (scavengers)<sup>11</sup> όπως είναι η ανισόλη (Fluka, Germany), όπου σε αναλογία 1-2 % στο διάλυμα του TFA δεσμεύουν αυτά τα σχηματιζόμενα καρβοκατιόντα. Τέλος, για την εξουδετέρωση του σχηματιζόμενου άλατος του τριφθοροξικού οξέος χρησιμοποιείται διάλυμα 7 % DIEA σε DCM.



**Σχήμα 2:** Πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με τη Boc-μεθοδολογία ( Η χρήση διαλύματος 40% TFA σε DCM για την αποκοπή της Boc-προστατευτικής ομάδας έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άλατος TFA)

Η πιστοποίηση της αποπροστασίας των αμινομάδων της πεπτιδορητίνης και ο έλεγχος της ολοκλήρωσης της σύζευξης (απουσία ελεύθερων αμινομάδων στην πεπτιδορητίνη) έγινε με το τεστ Kaiser<sup>12</sup>. Κατά το τεστ αυτό η νινυδρίνη αντιδρά με τα αμινοξέα με μια αντίδραση τρανσαμίνωσης-αποκαρβοξυλίωσης.



Το τεστ Kaiser γίνεται σε δοκιμαστικό σωλήνα, που περιέχει μερικούς κόκκους πεπτιδορρητίνης. Σε αυτό το δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται τρεις σταγόνες από τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- ◆ 2 ml KCN 0.001 M σε 100 ml πυριδίνης
- ◆ 5 g νινυδρίνης σε 100 ml αιθανόλης
- ◆ 400 mg φαινόλης σε 100 ml αιθανόλης

Στη συνέχεια, ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται σε ζέον υδρόλουτρο για 30 sec, οπότε είτε έχουμε χρωματισμό των κόκκων, γεγονός που πιστοποιεί την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων [θετικό (+) test Kaiser], είτε οι κόκκοι παραμένουν λευκοί, οπότε πιστοποιείται ότι η σύζευξη του αμινοξέος έχει ολοκληρωθεί και δεν υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες στην πεπτιδορρητίνη [αρνητικό (-) test Kaiser]. Συνήθως το χρώμα που παίρνουν οι κόκκοι όταν το τεστ Kaiser είναι θετικό είναι μπλε. Πρέπει, όμως, να αναφερθεί ότι ορισμένα αμινοξέα όπως η γλυκίνη και η προλίνη εμφανίζουν καφέ χρώμα κατά την αποπροστασία των αμινομάδων, ενώ μετά την απομάκρυνση της Boc- ή της Fmoc-ομάδας από το αμινοϊσοβουτυρικό οι κόκκοι της πεπτιδορρητίνης συνήθως δε φέρουν χρώμα. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η αμινομάδα του αμινοϊσοβουτυρικού είναι στερικά παρεμπόδισμένη, λόγω των δύο μεθυλίων που φέρει το C<sup>α</sup> άτομο του άνθρακα.

Στη Boc-στρατηγική η αποκοπή του τελικού προϊόντος από το πολυμερικό υπόστρωμα και η ταυτόχρονη αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων επιτυγχάνεται με κατεργασία της πεπτιδορρητίνης με άνυδρο υδροφθόριο (HF, Fluka, Germany)<sup>13,14</sup>. Μετά την απόσταξη του υδροφθορίου γίνεται αρχικά επεξεργασία με αιθέρα για την απομάκρυνση των μορίων-παγίδων που χρησιμοποιήθηκαν. Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται με εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2 N και λυοφιλοποιείται.

Στην Fmoc-στρατηγική η απομάκρυνση των πεπτιδίων από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων επιτυγχάνεται με κατεργασία σε τριφθοροξικό οξύ παρουσία ομάδων-παγίδων. Στη συνέχεια ακολουθεί εξάτμιση του τριφθοροξικού οξέος και καταβύθιση του πεπτιδίου με τη βοήθεια διαιθυλαιθέρα. Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται με διάλυση σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2 N και λυοφιλοποιείται.

Ο καθαρισμός, έλεγχος καθαρότητας και η ταυτοποίηση των πεπτιδίων που συντέθηκαν έγινε με τις εξής τεχνικές:

- Υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας RP-HPLC (Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography)

(α) Ημιπαρασκευαστική RP-HPLC

(β) Αναλυτική RP-HPLC , Waters 600s

- Φασματοσκοπία μάζας ESI (Electrospray Ionization) Micromass Platform LC Quandrupole.

### 10.3 Μείωση αρχικής υποκατάστασης της ρητίνης

Στα πεπτίδια (6) και (7) πραγματοποιήθηκε μείωση της αρχικής υποκατάστασης της ρητίνης, με σκοπό την ελάττωση των στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Χρησιμοποιήθηκε ρητίνη με το πρώτο αμινοξύ προσδεμένο. Στη συνέχεια έγινε πρόσδεση του επόμενου αμινοξέος, χρησιμοποιώντας την κατάλληλη ποσότητα αυτού, η οποία υπολογίστηκε ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή υποκατάσταση. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η νέα υποκατάσταση σε ένα μικρό δείγμα πεπτιδορητίνης. Ζυγίστηκαν περίπου 10-12mg πεπτιδορητίνης σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες και σημειώθηκε ακριβώς η ποσότητα αυτής. Έπειτα προστέθηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες 5 ml διαλύματος 20% πιπεριδίνης σε DMF και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 30 min. Τέλος τα δείγματα παρέμειναν σε ηρεμία 30 min. Η κατεργασία της πεπτιδορητίνης με το διάλυμα πιπεριδίνης είχε ως αποτέλεσμα την αποκοπή της Fmoc ομάδας και το σχηματισμό φουλβενίου. Η συνολική ποσότητά αυτού προσδιορίζεται με φασματοσκοπία UV στα 300.6nm όπου και απορροφά. Η υποκατάσταση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Υποκατάσταση (mmoles NH}_2\text{/g)} = (\alpha \times V) / (\epsilon \times m \times l)$$

Όπου  $\alpha$  : η μέγιστη απορρόφηση στα 300.6 nm

$V$  : ο όγκος κατά την τελική αραίωση (ml)

$\epsilon$  : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης

$m$  : το βάρος της πεπτιδορητίνης σε γραμμάρια (g)

$l$  : το μήκος της κυψελίδας σε εκατοστά (cm)



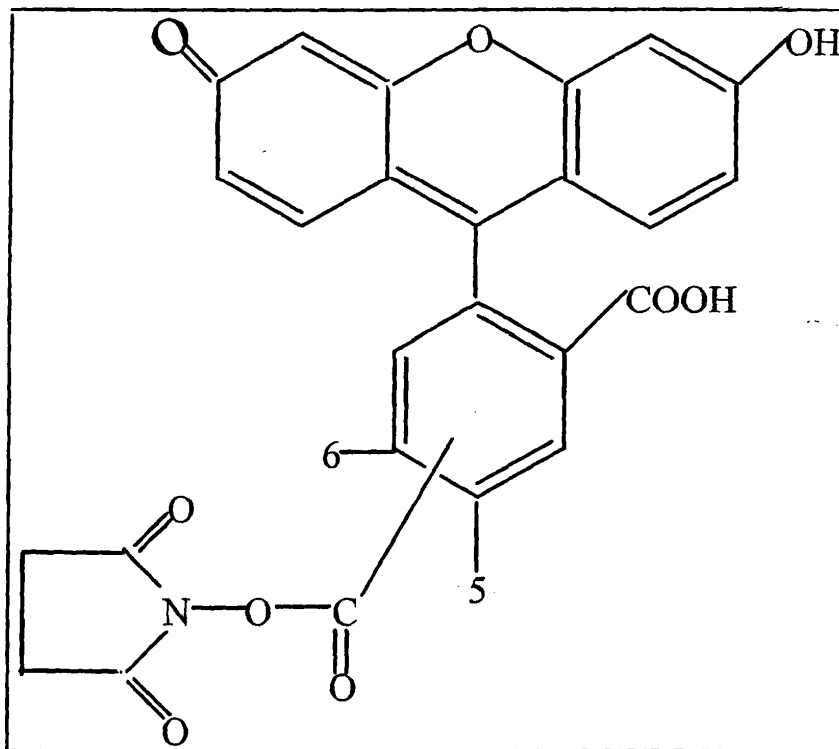
Μετά την επίτευξη της επιθυμητής τελικής υποκατάστασης έγινε ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων της πεπτιδορηνίνης που απέμειναν, χρησιμοποιώντας τριάντα ισοδύναμα οξικού ανυδρίτη ( $Ac_2O$ ) σε πυριδίνη για 30 λεπτά.

Το επόμενο αμινοξύ προστέθηκε στην πεπτιδορηνίνη, αφού πρώτα η καρβοξυλομάδα του ενεργοποιήθηκε με κατάλληλο αντιδραστήριο σύζευξης, TBTU ή HBTU, παρουσία του βοηθητικού πυρηνόφιλου HOBt και της τριτοταγούς βάσης DIEA σε αναλογία 3/3/3/6 αμινοξύ/ HOBt/ TBTU/ DIEA. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για δύο ώρες, και η ολοκλήρωσή της πιστοποιήθηκε στο τέλος με test Kaiser. Με ανάλογα βήματα αποπροστασίας-σύζευξης, επιμηκύνθηκε η πεπτιδική αλυσίδα έως την ολοκλήρωσή της.

#### 10.4 Ιχνηθέτηση με NHS- φλουορεσκεΐνη

Η φλουορεσκεΐνη είναι ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιημένους ιχνηθέτες σε πρωτεΐνες και πεπτίδια. Η αποτελεσματικότητα της φλουορεσκεΐνης είναι περίπου 75%, όμως η ένταση φθορισμού της χάνεται όταν η φλουορεσκεΐνη βρίσκεται υπό μορφή διαλύματος, όταν εκτίθεται στο φως ή όταν διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Υπάρχουν διάφορα παράγωγα της φλουορεσκεΐνης που χρησιμοποιούνται για την ιχνηθέτηση ουσιών. Το πιο συνηθισμένο είναι ο εστέρας της NHS-φλουορεσκεΐνης (N-HydroxySuccinimide, NHS)

(Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Συντακτικός τύπος της NHS-φλουορεσκεΐνης



Ο εστέρας της NHS-φλουορεσκεΐνης αντιδρά με τις ε-αμινομάδες των λυσινών και με την α-αμινομάδα του τελικού αμινοξέος, αν αυτή είναι διαθέσιμη. Γενικά, ο ιχνηθέτης αυτός μπορεί να αντιδράσει κυρίως με πρωτοταγείς αμίνες, καθώς και με κάποιες δραστικές ομάδες. Για παράδειγμα, μη κυκλικές δευτεροταγείς αμίνες είναι δυνατόν να αντιδράσουν με μεγάλη περίσσεια εστέρα της NHS- φλουορεσκεΐνης σε μεγάλο χρονικό διάστημα. Έχει αναφερθεί πως ο εστέρας της NHS-φλουορεσκεΐνης δεν αντιδρά με το θείο της μεθιονίνης ή με την κυκλική δευτεροταγή αμινομάδα της τρυπτοφάνης. Άλλα αμινοξέα που περιέχουν άζωτο στην παράπλευρη αλυσίδα, όπως αμΐδια (ασπαραγΐνη, γλουταμΐνη) και γουανιδινομάδα (αργΐνΐνη), δεν αντιδρούν με τον εστέρα της NHS- φλουορεσκεΐνης. Με την σερίνη και την τυροσΐνη υπάρχει μικρή δραστικότητα λόγω των στερεοχημικών παρεμποδΐσεων που οφείλονται στην υδροξυλομάδα τους. Για μεγάλη συγκέντρωση κυστεΐνης, υπάρχει μεγάλο ποσοστό δραστικότητας που οφείλεται στον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της σουλφιδρυλομάδας της κυστεΐνης. Η αντίδραση της ιμιδαζολικής ομάδας της ιστιδΐνης με τον εστέρα της NHS- φλουορεσκεΐνης δεν δΐνει σταθερό προϊόν. Τα προϊόντα που προκύπτουν με το ιμιδαζόλιο δεν ΐναι σταθερά και υδρολύονται ταχέως. Η ιμιδαζολική ομάδα της ιστιδΐνης επιταχΐνει τον ρυθμό υδρόλυσης του εστέρα της NHS- φλουορεσκεΐνης και για το λόγο αυτό όταν υπάρχει ιστιδΐνη στο πεπτΐδιο που ιχνηθετείται, ΐναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες ποσότητες του ιχνηθέτη.



## 10.5 Πειραματική πορεία σύνθεσης

### 10.5.1 Σύνθεση του πεπτιδίου **MAGE 3 CD8 (212-220): EGDC(Acm)APEEK (1)**

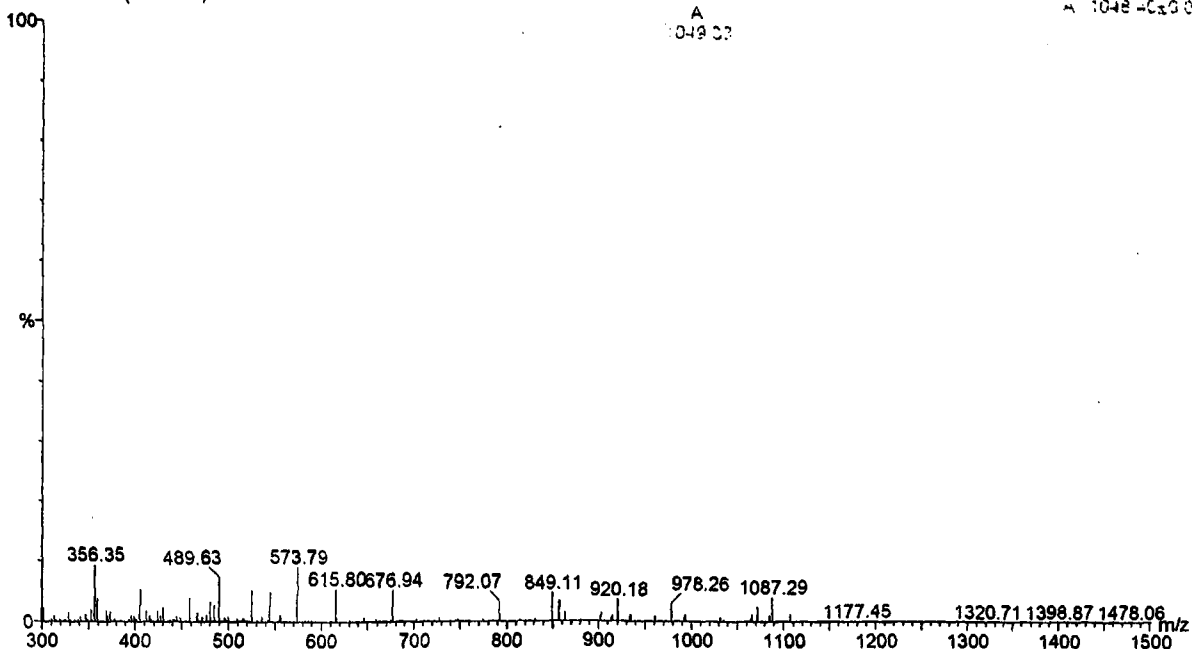
**MB= 1048.10**

**MT=C<sub>41</sub>H<sub>65</sub>N<sub>11</sub>O<sub>19</sub>S**

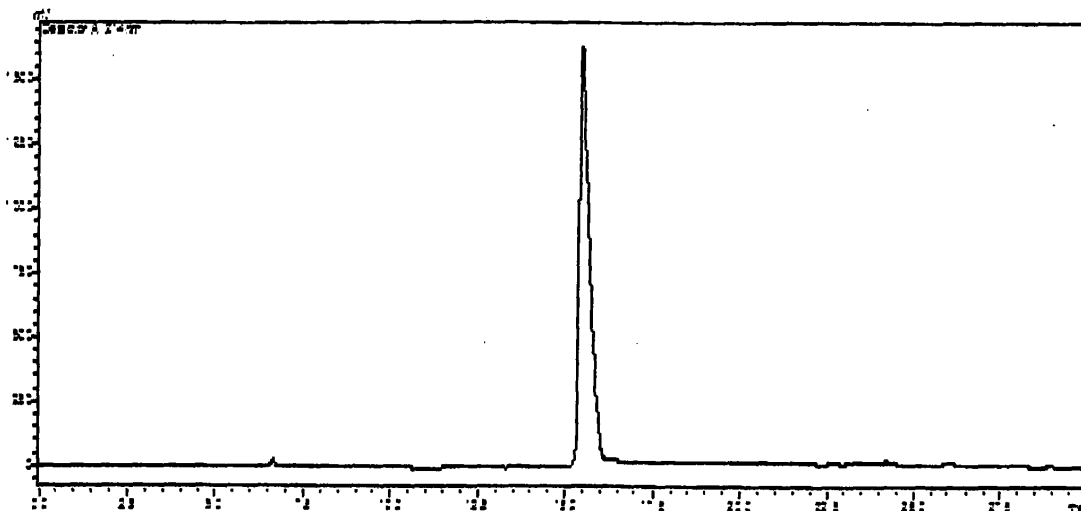
Η σύνθεση του πεπτιδίου (1) έγινε με Fmoc-στρατηγική σε Wang ρητίνη με το πρώτο αμινοξύ συνδεδεμένο στη ρητίνη, ακολουθώντας τη γενική πορεία που φαίνεται στο Σχήμα 1. Χρησιμοποιήθηκαν 1.10 g ρητίνης με υποκατάσταση 0.37 mmole/g ρητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως Fmoc-παράγωγα: Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH. Η αντίδραση σύζευξης έγινε με TBTU παρουσία HOBT<sup>15-17</sup>. Η Acm επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για την προστασία της παράπλευρης ομάδας της κυστεΐνης καθώς μετά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη, η Acm δεν απομακρύνεται και έτσι δεν υπάρχει φόβος σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών. Η ύπαρξη της ομάδας αυτής δεν επηρεάζει τη σύνδεση του επιτόπου στα HLA-Cw0701 μόρια. Η κυστεΐνη δε βρίσκεται σε καμία από τις σημαντικές θέσεις για την πρόσδεση του επιτόπου σε ένα μόριο HLA-Cw0701 (P1, P2, P3)<sup>18</sup>. Μετά το τέλος της σύνθεσης, ακολούθησε ξήρανση της πεπτιδορητίνης και ζύγισή της. Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε 94.64 %. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με TFA παρουσία τρισοπροπολσιλανίου (TIS, Aldrich, Germany) ως μόριο παγίδα των καρβοκατιόντων. Στη συνέχεια η επεξεργασία και η παραλαβή του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη γενική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 8.2. Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη υπολογίστηκε 94.65% .

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον καθαρισμό του πεπτιδίου. Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Σύστημα έκλουσης (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:100/0 σε A/B:50/50, ταχύτητα ροής 4.7 ml/min, ανίχνευση στα 214nm. Η απόδοση καθαρισμού με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης υπολογίστηκε 46.20%.

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου έγινε με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (Σχήμα 4) και η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 5).



**Σχήμα 4:** Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου MAGE 3 (212-220) (1). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1048.10, ερευθέν μοριακό βάρος MB=1048.40.



**Σχήμα 5:** Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου MAGE 3 (212-220) (1). Σύστημα έκλουσης: (A)  $H_2O/0.1\%$  TFA, (B)  $CH_3CN/0.1\%$  TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:100/0 σε A/B:50/50, ταχύτητα ροής 1ml/min, ανίχνευση στα 214 nm.

### 10.5.2 Σύνθεση του πεπτιδίου **MAGE 3 CD8 (114-122): AELVHFLLL (2)**

**MB= 1054.31**

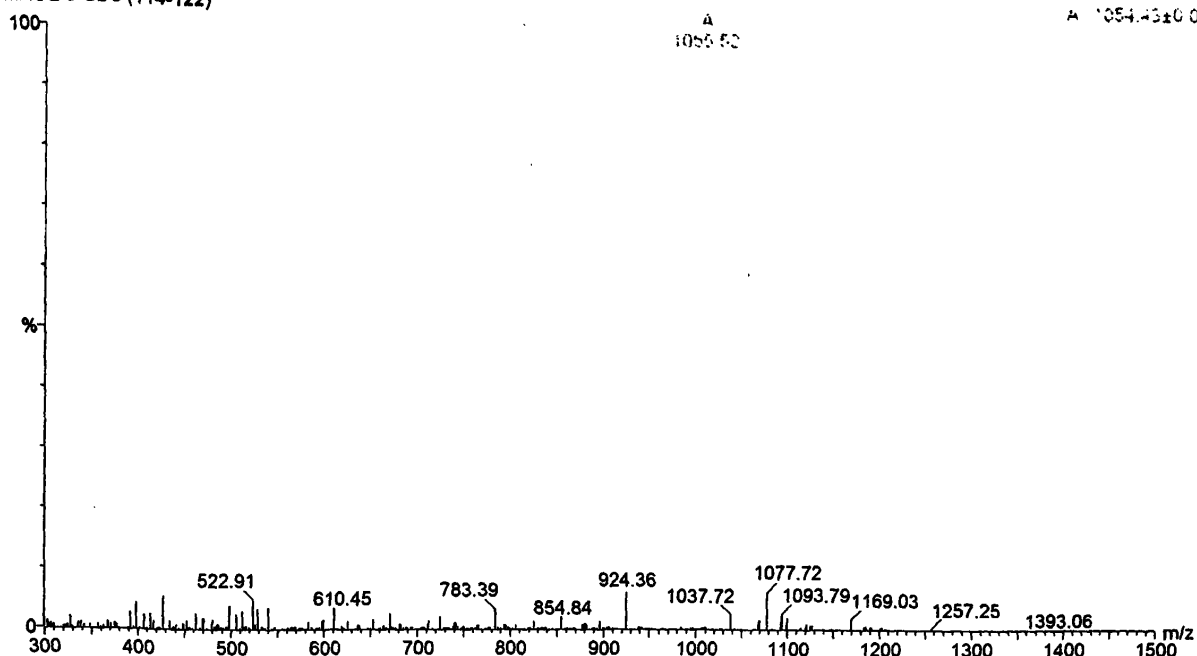
**MT=C<sub>52</sub>H<sub>83</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>**

Η σύνθεση του πεπτιδίου (2) έγινε με Fmoc-στρατηγική σε Wang ρητίνη με το πρώτο αμινοξύ συνδεδεμένο στη ρητίνη, ακολουθώντας τη γενική πορεία που φαίνεται στο Σχήμα 1. Χρησιμοποιήθηκαν 0.52 g ρητίνης με υποκατάσταση 0.78 mmole/g ρητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως Fmoc-παράγωγα: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, . Η αντίδραση σύζευξης έγινε με TBTU παρουσία HOBt. Μετά το τέλος της σύνθεσης, ακολούθησε ξήρανση της πεπτιδορητίνης και ζύγισή της. Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε 98.92 %. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με TFA παρουσία τρισοπροπυλσιλανίου (TIS, Aldrich, Germany) ως μόριο παγίδα των καρβοκατιόντων. Στη συνέχεια η επεξεργασία και η παραλαβή του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη γενική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 8.2. Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη υπολογίστηκε 92.89 % .

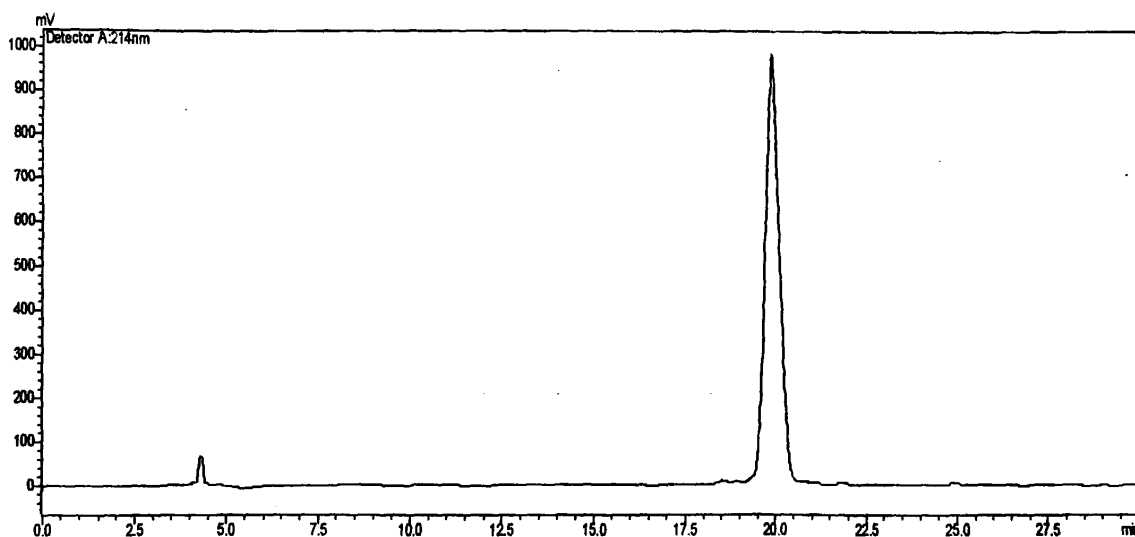
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον καθαρισμό του πεπτιδίου. Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Σύστημα έκλουσης (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:95/05 σε A/B:20/80, ταχύτητα ροής 4.7 ml/min, ανίχνευση στα 214nm. Η απόδοση καθαρισμού με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης υπολογίστηκε 50.77%.

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου έγινε με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (Σχήμα 6) και η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 7).

MAGE 3 CD8 (114-122)



Σχήμα 6: Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου MAGE 3 (114-122) (2). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1054.31, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1054.43.



Σχήμα 7: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου MAGE 3 (114-122) (2). Σύστημα έκλουσης: (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:95/05 σε A/B:20/80, ταχύτητα ροής 1ml/min, ανίχνευση στα 214 nm.



### 10.5.3 Σύνθεση του πεπτιδίου **MAGE 3 (243-258): KKLLTQHVFVQENYLEY (3)**

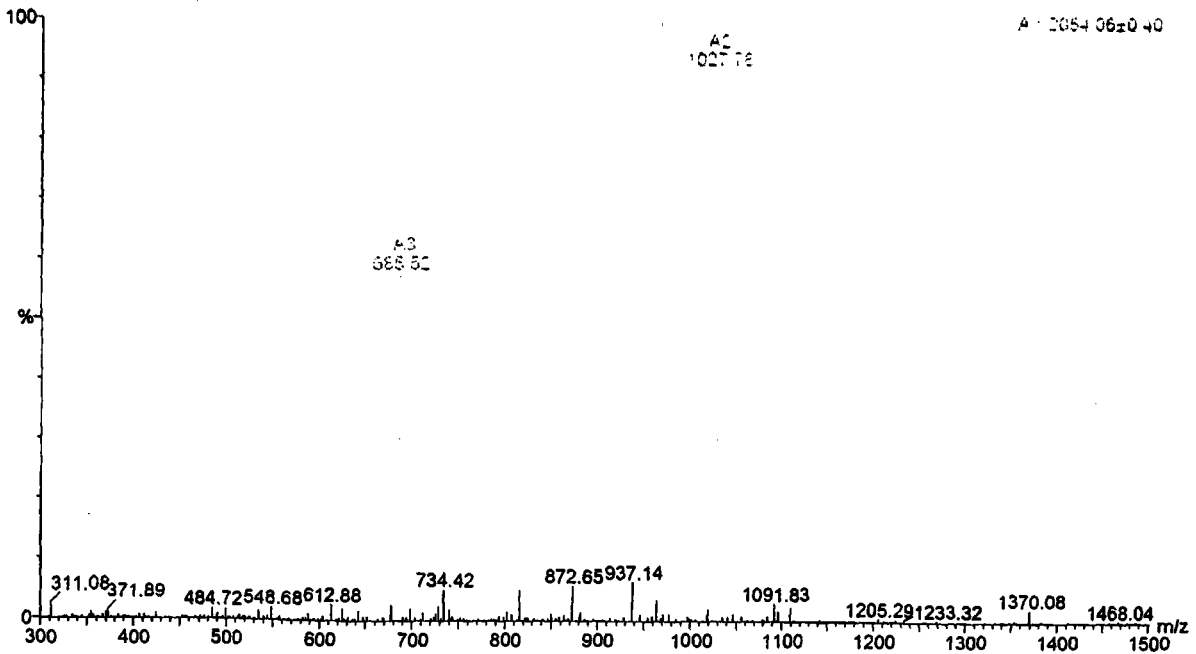
**MB= 2054.70**

**MT=C96H145N23O27**

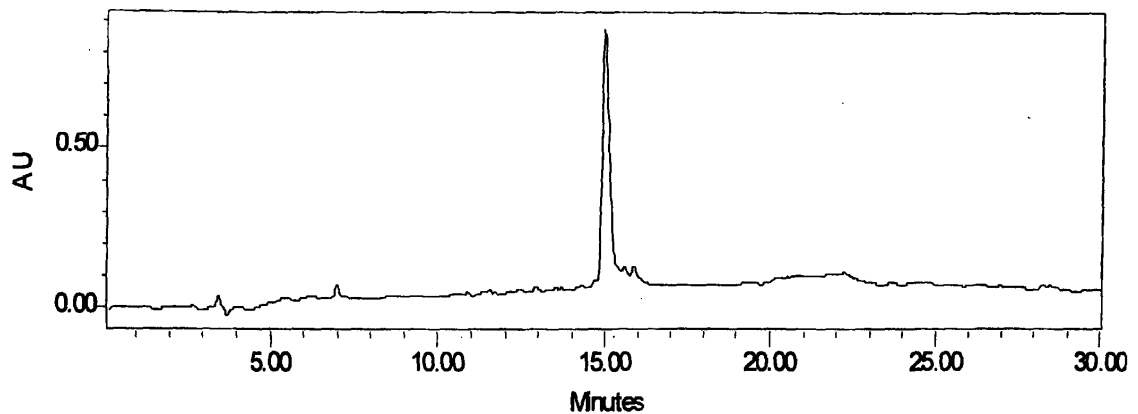
Η σύνθεση του πεπτιδίου (3) έγινε με Fmoc-στρατηγική σε Wang ρητίνη με το πρώτο αμινοξύ συνδεδεμένο στη ρητίνη, ακολουθώντας τη γενική πορεία που φαίνεται στο Σχήμα 1. Χρησιμοποιήθηκαν 0.82 g ρητίνης με υποκατάσταση 0.6 mmole/g ρητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως Fmoc-παράγωγα: Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Lys(Boc)-OH. Η αντίδραση σύζευξης έγινε με TBTU παρουσία HOBt. Μετά το τέλος της σύνθεσης, ακολούθησε ξήρανση της πεπτιδορητίνης και ζύγισή της. Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε 83.96%. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με TFA παρουσία τρισοπροπυλσιλανίου (TIS, Aldrich, Germany) ως μόριο παγίδα των καρβοκατιόντων. Στη συνέχεια η επεξεργασία και η παραλαβή του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη γενική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 8.2. Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη υπολογίστηκε 97.13%.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον καθαρισμό του πεπτιδίου. Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Σύστημα έκλουσης (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:70/30 σε A/B:10/90, ταχύτητα ροής 4.7 ml/min, ανίχνευση στα 214nm. Η απόδοση καθαρισμού με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης υπολογίστηκε 77.84 %.

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου έγινε με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (Σχήμα 8) και η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 9).



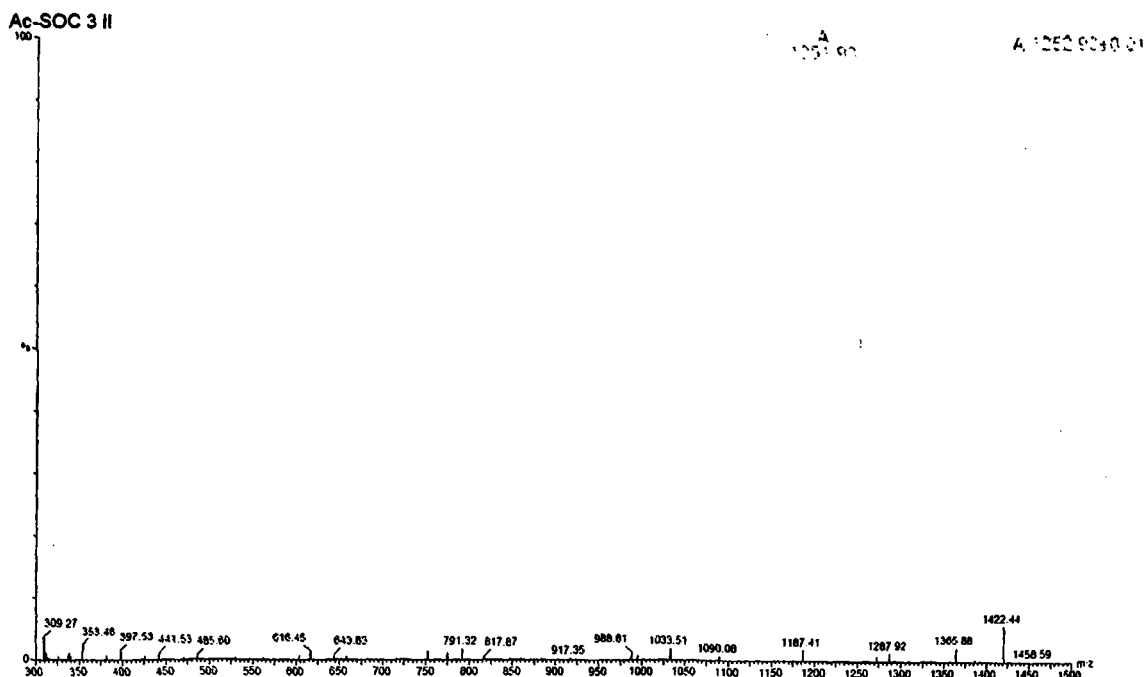
Σχήμα 8: Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου MAGE 3 (243-258) (3). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=2054.70, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=2054.06.



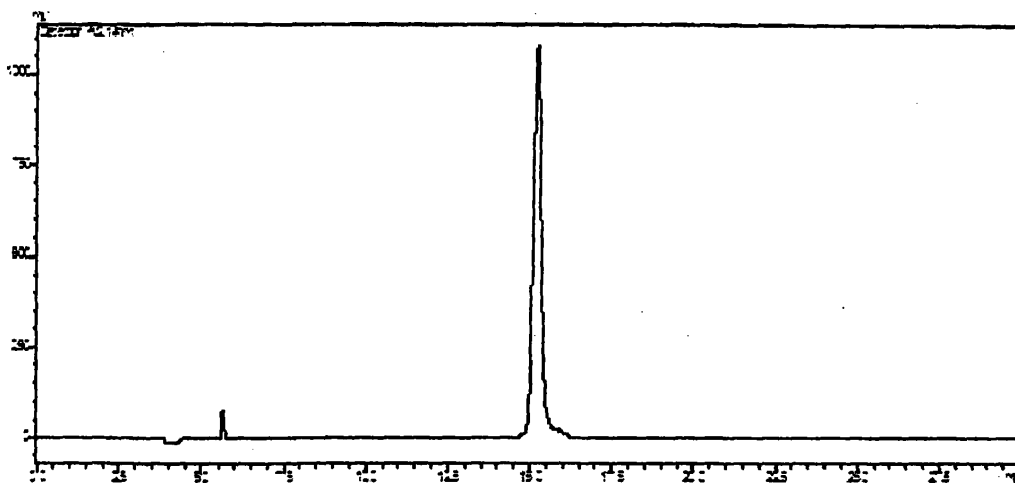
Σχήμα 9: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου MAGE 3 (243-258) (3). Σύστημα έκλουσης: (A)  $H_2O/0.1\%$  TFA, (B)  $CH_3CN/0.1\%$  TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:70/30 σε A/B:10/90, ταχύτητα ροής 1ml/min, ανίχνευση στα 214 nm.





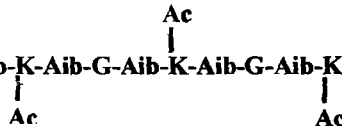


**Σχήμα 10:** Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II (4). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1252.29, ερρεθέν μοριακό βάρος MB=1252.93.



**Σχήμα 11:** Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II (4). Σύστημα έκλουσης: (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:10/90 σε A/B:50/50, ταχύτητα ροής 1ml/min, ανίχνευση στα 214 nm.

**10.5.5 Σύνθεση του πεπτιδίου Pal-SOC<sub>3</sub> II: Pal-Aib-K-Aib-G-Aib-K-Aib-G-Aib-K-Aib-G (5)**



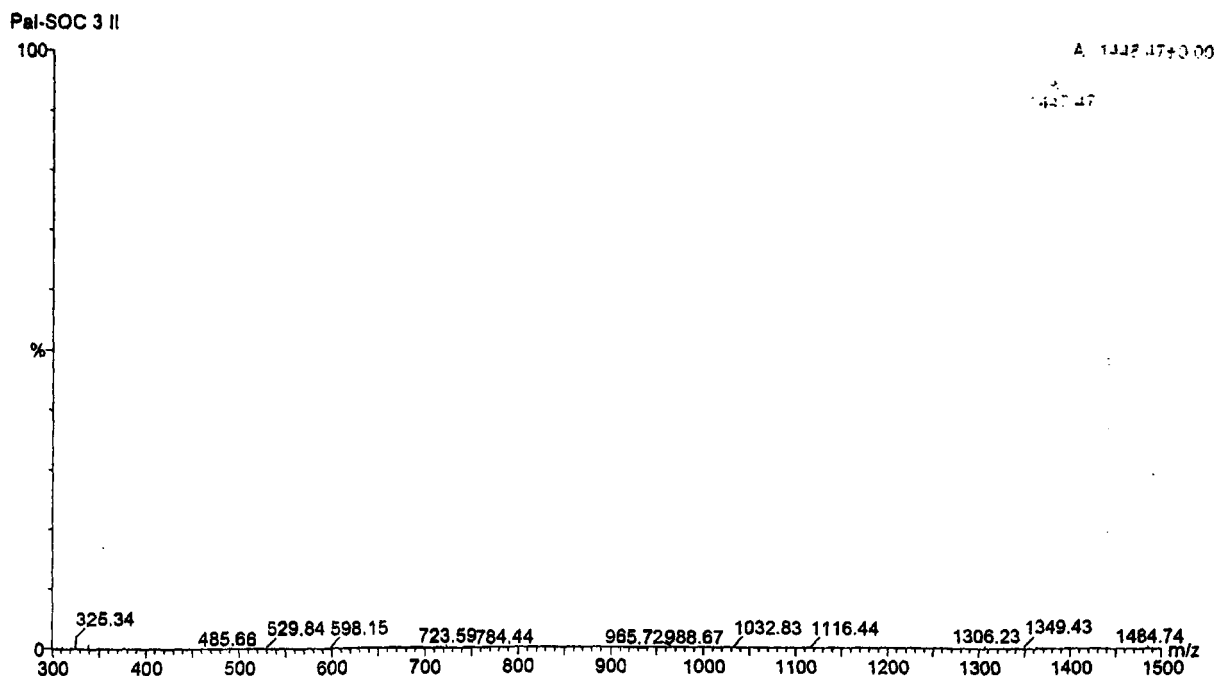
MB=1448.89

MT= C70H125N15O17

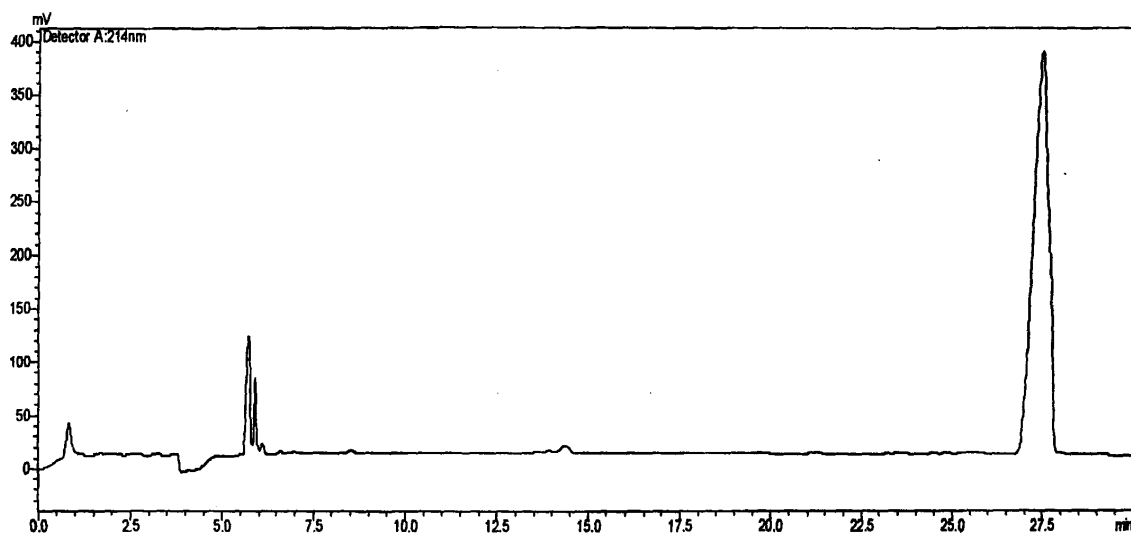
Η σύνθεση του πεπτιδίου (5) έγινε με Fmoc-στρατηγική σε Wang ρητίνη με το πρώτο αμινοξύ συνδεδεμένο στη ρητίνη, ακολουθώντας τη γενική πορεία που φαίνεται στο Σχήμα 1. Χρησιμοποιήθηκαν 0.5 g ρητίνης με υποκατάσταση 0.6 mmole/g ρητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως Fmoc-παράγωγα: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Lys(Ac)-OH. Η αντίδραση σύζευξης έγινε με TBTU παρουσία HOBT. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του φορέα, έγινε αποκοπή της Fmoc-ομάδας της N<sup>α</sup>-αμινομάδας της τελικής λυσίνης και παλμιτοϋλίωση αυτής με διάλυμα παλμιτικού ανυδρίτη σε πυριδίνη (3 φορές περίσσεια παλμιτικού ανυδρίτη, έναντι των mmole της αμινομάδας). Έπειτα, ακολούθησε ξήρανση της πεπτιδορητίνης και ζύγισή της. Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε 93.69 %. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με TFA. Στη συνέχεια η επεξεργασία και η παραλαβή του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη γενική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 8.2. Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη υπολογίστηκε 92.61 %.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον καθαρισμό του πεπτιδίου. Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Σύστημα έκλουσης (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:80/20 σε A/B: 0/100, ταχύτητα ροής 4.7 ml/min, ανίχνευση στα 214 nm. Η απόδοση καθαρισμού με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης υπολογίστηκε 20.71 %.

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου έγινε με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (Σχήμα 12) και η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 13).



**Σχήμα 12:** Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου Pal-SOC<sub>3</sub> II (5). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1448.89, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1448.47.



**Σχήμα 13:** Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου Pal-SOC<sub>3</sub> II (5). Σύστημα έκλουσης: (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:80/20 σε A/B:0/100, ταχύτητα ροής 1ml/min, ανίχνευση στα 214 nm.

### 10.5.6 Σύνθεση του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6)

MB=3228.54

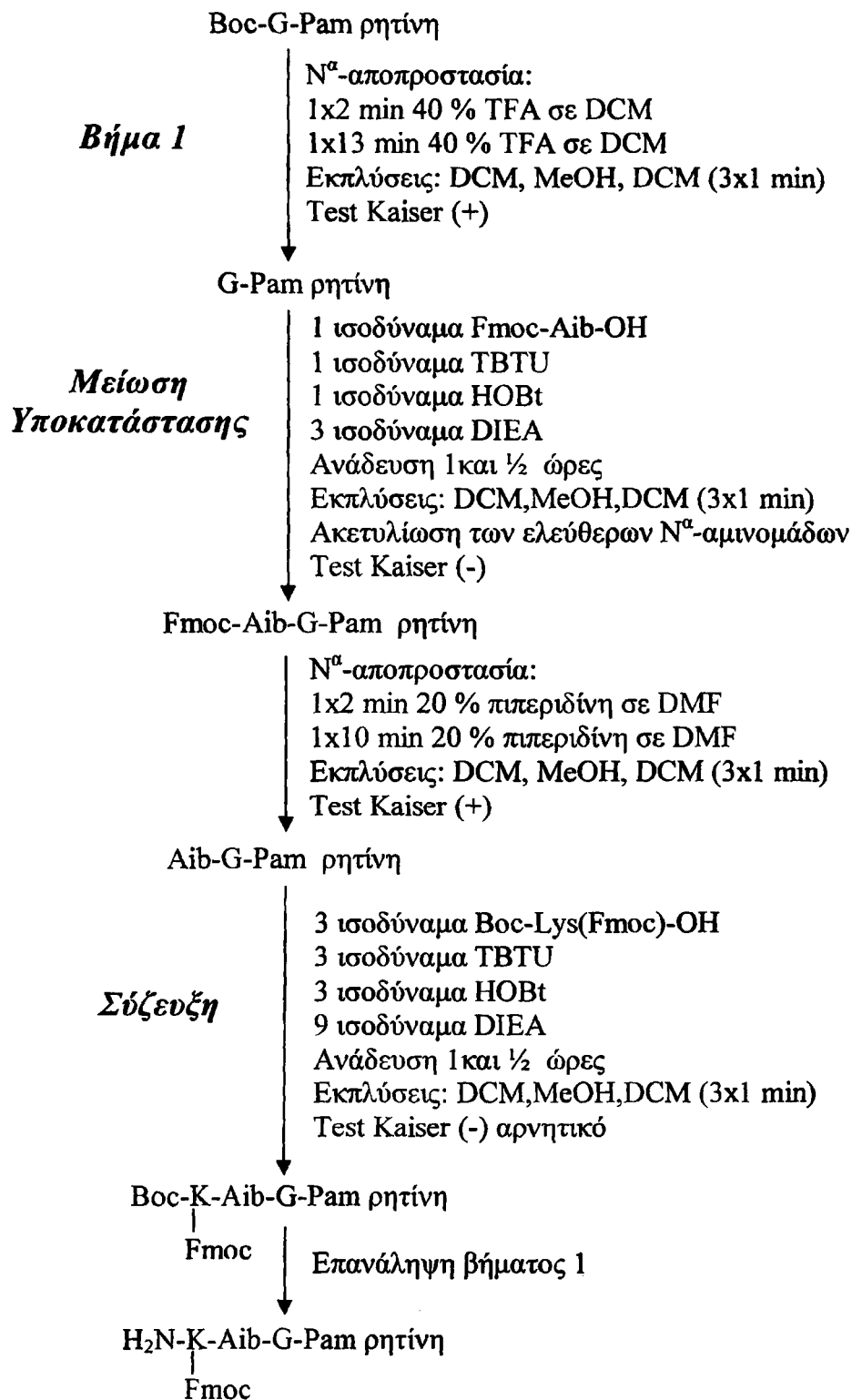
MT= C<sub>134</sub>H<sub>219</sub>N<sub>37</sub>O<sub>51</sub>S<sub>2</sub>

Η σύνθεση του πεπτιδίου (6) έγινε με Boc-στρατηγική σε PAM ρητίνη με το πρώτο αμινοξύ συνδεδεμένο στη ρητίνη, ακολουθώντας τη πορεία που φαίνεται στο Σχήμα 15. Χρησιμοποιήθηκε 1 g ρητίνης με υποκατάσταση 0.74 mmole/g ρητίνης. Έγινε μείωση της υποκατάστασης της ρητίνης και η τελική υποκατάσταση βρέθηκε 0,35 mmol/g. Αναλυτικά η διαδικασία μείωσης της υποκατάστασης περιγράφεται στην παράγραφο 8.3. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως Boc-παράγωγα: Boc-Aib-OH, Boc-Lys(Ac)-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Lys(2,6-Cl<sub>2</sub>-Bzl)-OH, Boc-Cys(Acm)-OH. Η αντίδραση σύζευξης έγινε με TBTU παρουσία HOBt. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του φορέα SOC<sub>3</sub> II, έγινε αποκοπή της Boc-ομάδας της N<sup>α</sup>-αμινομάδας του τελικού Aib του φορέα και πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση με διάλυμα οξικού ανυδρίτη σε πυριδίνη (30 φορές περίσσεια οξικού ανυδρίτη, έναντι των mmole της αμινομάδας). Στη συνέχεια, ακολούθησε αποκοπή της Fmoc προστατευτικής ομάδας των παράπλευρων αμινομάδων των Lys του φορέα και σύνθεση των επιτόπων MAGE 3 CD8 (212-220). Έπειτα, ακολούθησε ξήρανση της πεπτιδορητίνης και ζύγισή της. Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε 68.40%. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με άνυδρο HF. Ως μόρια παγίδες χρησιμοποιήθηκαν θειοκρεσόλη (Fluka, Germany) και διμέθυλοσουλφίδιο. Στη συνέχεια η επεξεργασία και η παραλαβή του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη γενική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 8.2. Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη υπολογίστηκε 89.16%.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον καθαρισμό του πεπτιδίου. Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Σύστημα έκλουσης (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:90/10 σε A/B: 40/60, ταχύτητα ροής 4.7 ml/min, ανίχνευση στα 214 nm. Η απόδοση καθαρισμού με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης υπολογίστηκε 14.10%.

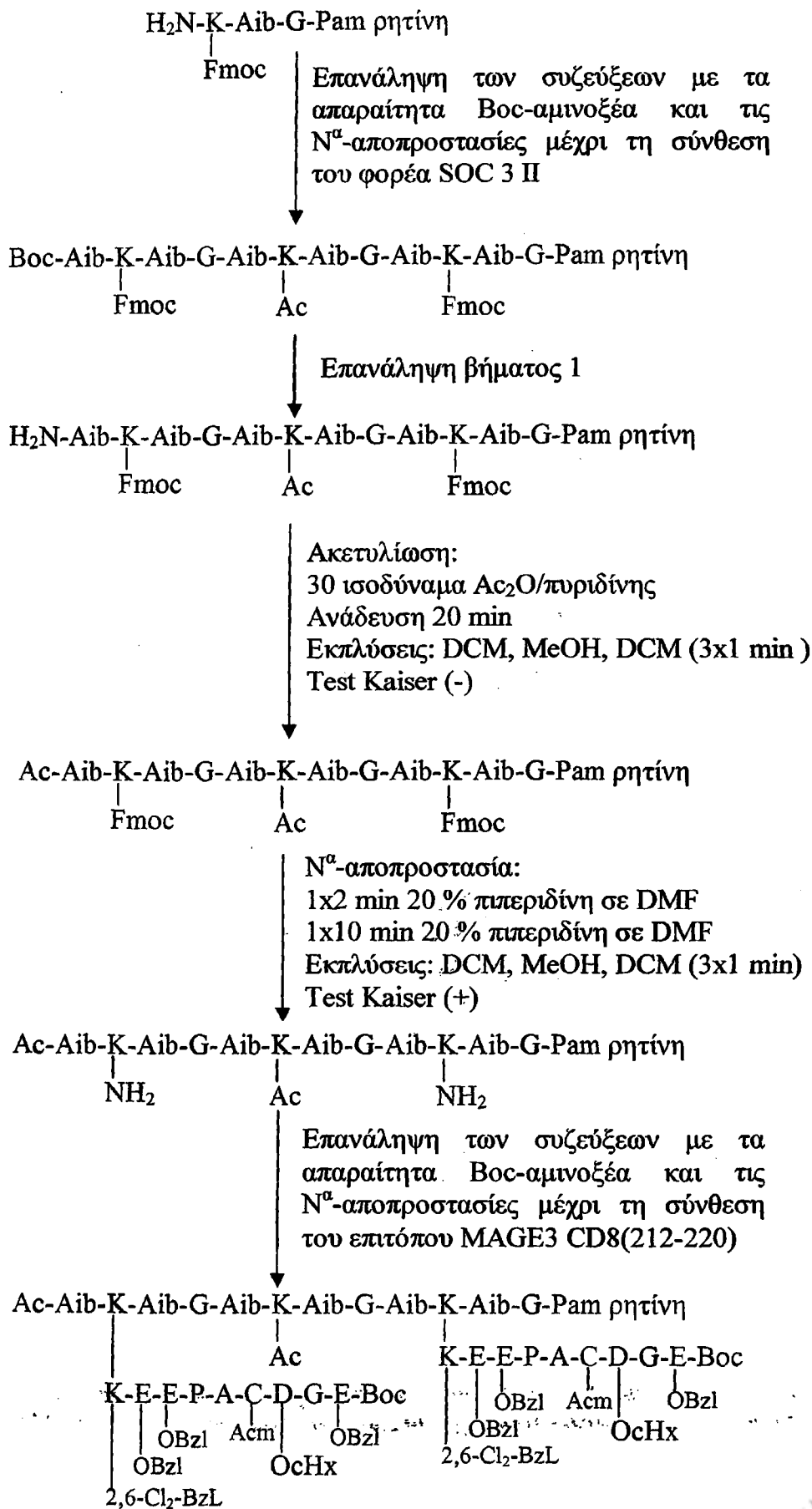
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου έγινε με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (Σχήμα 15) και η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 16).





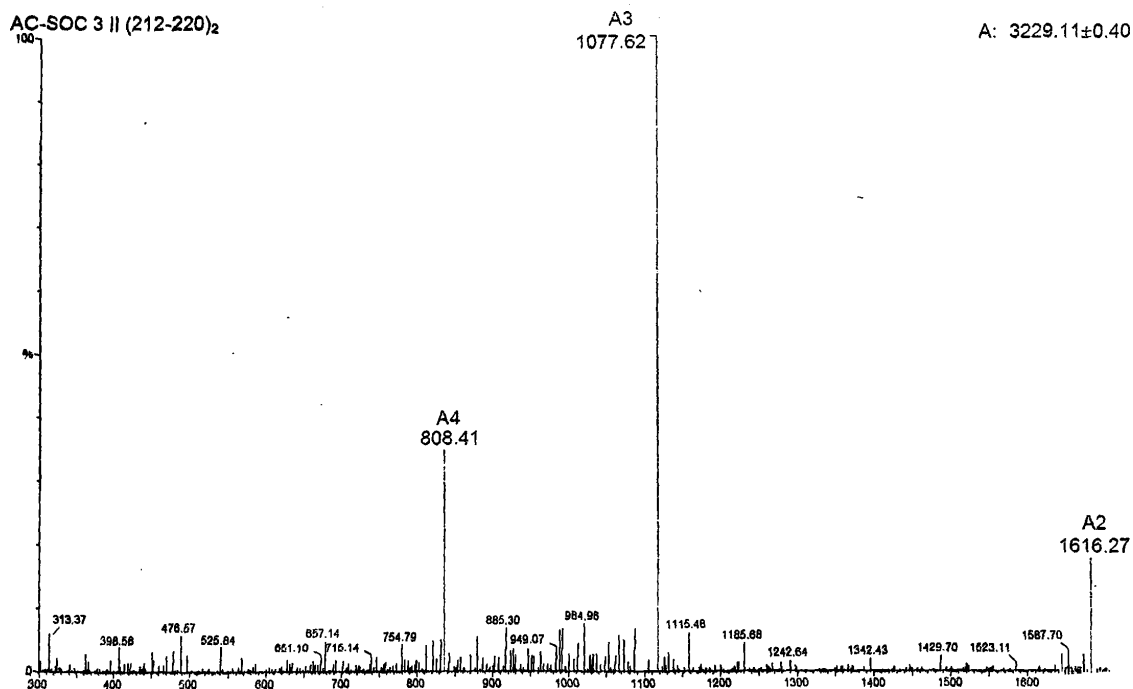
**Σχήμα 14 :** Πορεία σύνθεσης του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6) (Κατά την αποκοπή της Boc-προστατευτικής ομάδας με διάλυμα 40% TFA σε DCM παίρνοντας άλας TFA)



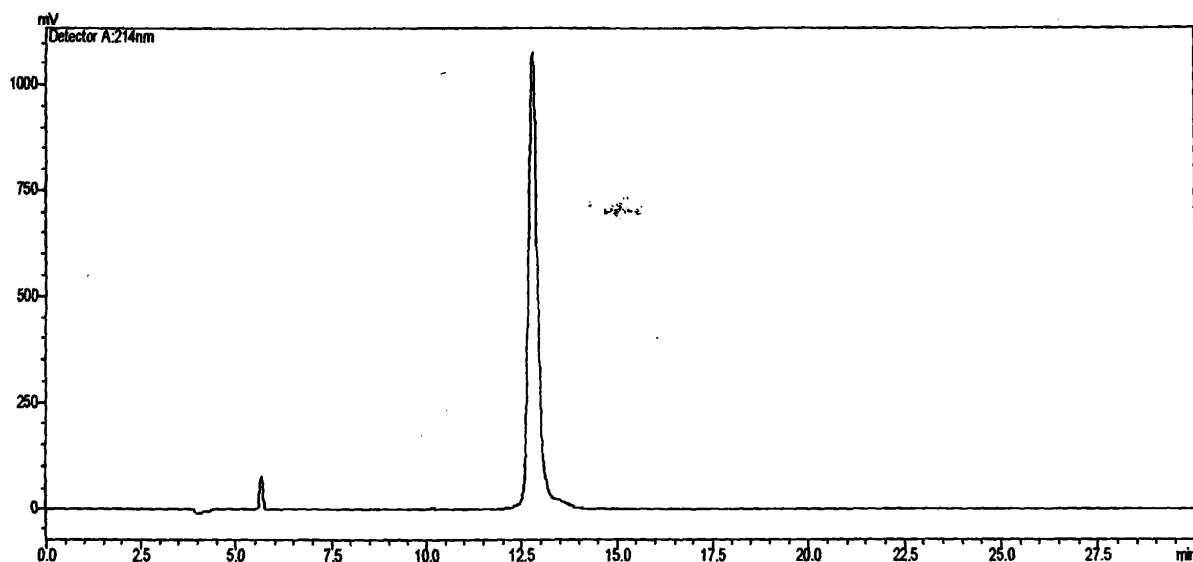


*Σχήμα 14 (συνέχεια)*





Σχήμα 15: Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=3228.54, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=3229.11.



Σχήμα 16: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6). Σύστημα έκλουσης: (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:90/10 σε A/B:40/60, ταχύτητα ροής 1ml/min, ανίχνευση στα 214 nm.



### 10.5.7 Σύνθεση του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7)

MB=3240.96

MT= C<sub>156</sub>H<sub>255</sub>N<sub>37</sub>O<sub>37</sub>

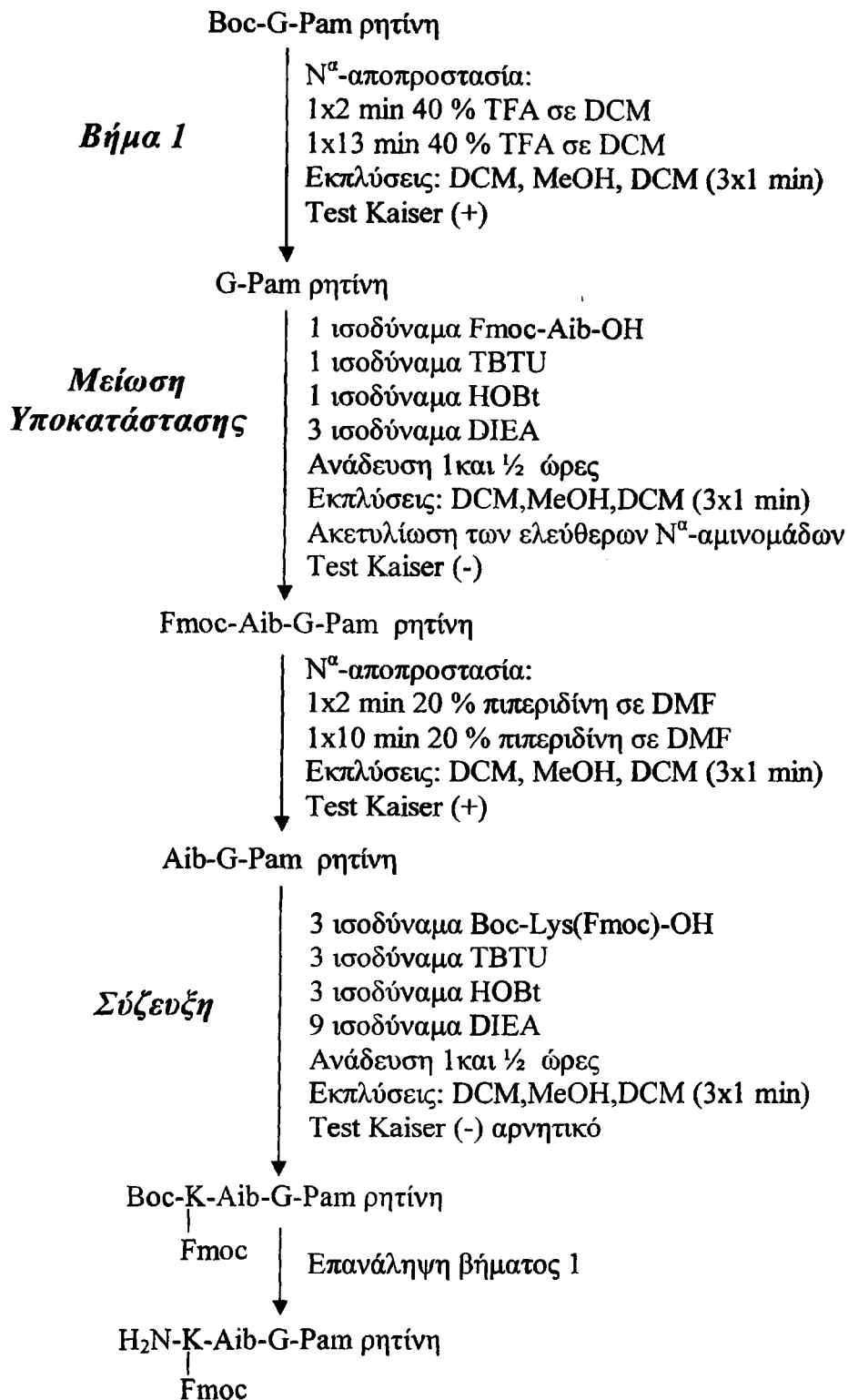
Η σύνθεση του πεπτιδίου (7) έγινε με Boc-στρατηγική σε PAM ρητίνη με το πρώτο αμινοξύ συνδεδεμένο στη ρητίνη, ακολουθώντας την πορεία που φαίνεται στο Σχήμα 18. Χρησιμοποιήθηκε 1 g ρητίνης με υποκατάσταση 0.74 mmole/g ρητίνης. Έγινε μείωση της υποκατάστασης της ρητίνης και η τελική υποκατάσταση βρέθηκε 0,35 mmol/g. Αναλυτικά η διαδικασία μείωσης της υποκατάστασης περιγράφεται στην παράγραφο 8.3. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως Boc-παράγωγα: Boc-Aib-OH, Boc-Lys(Ac)-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Phe-OH, Boc-His(Tos)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH. Η αντίδραση σύζευξης έγινε με TBTU παρουσία HOBt. Κατά τη σύζευξη της Boc-His(Tos)-OH<sup>21-23</sup> δεν προστέθηκε HOBt επειδή είναι δυνατόν να αποκοπεί σταδιακά η Tos-ομάδα και να προστεθεί στις ελεύθερες αμινομάδες<sup>24-26</sup>. Για το λόγο αυτό μετά τη σύζευξη της Boc-His(Tos)-OH ακολουθεί αποκοπή της Tos-ομάδα με διάλυμα 1 M HOBt. Τα επόμενα αμινοξέα προστέθηκαν σε μεγαλύτερη περίσσεια αντιδραστηρίων καθώς αντιδρούσαν και με το ιμιδαζόλιο της His (το αμινοξύ φεύγει από το ιμιδαζόλιο με την επόμενη κατεργασία με TFA). Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του φορέα SOC<sub>3</sub> II, έγινε αποκοπή της Boc-ομάδας της N<sup>α</sup>-αμινομάδας του τελικού Aib του φορέα και πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση με διάλυμα οξικού ανυδρίτη σε πυριδίνη (30 φορές περίσσεια οξικού ανυδρίτη, έναντι των mmole της αμινομάδας). Ακολούθησε αποκοπή της Fmoc προστατευτικής ομάδας των παράπλευρων αμινομάδων των Lys του φορέα και σύνθεση των επιτόπων MAGE 3 CD8 (114-122). Έπειτα, ακολούθησε ξήρανση της πεπτιδορητίνης και ζύγιση της. Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε 62.62%. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με άνυδρο HF. Ως μόρια παγίδες χρησιμοποιήθηκαν θειοκρεσόλη (Fluka, Germany) και διμέθυλοσουλφίδιο<sup>11</sup>. Η επεξεργασία και η παραλαβή του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη γενική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 8.2. Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη υπολογίστηκε 83.31%.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον καθαρισμό του πεπτιδίου. Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Σύστημα έκλουσης (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από



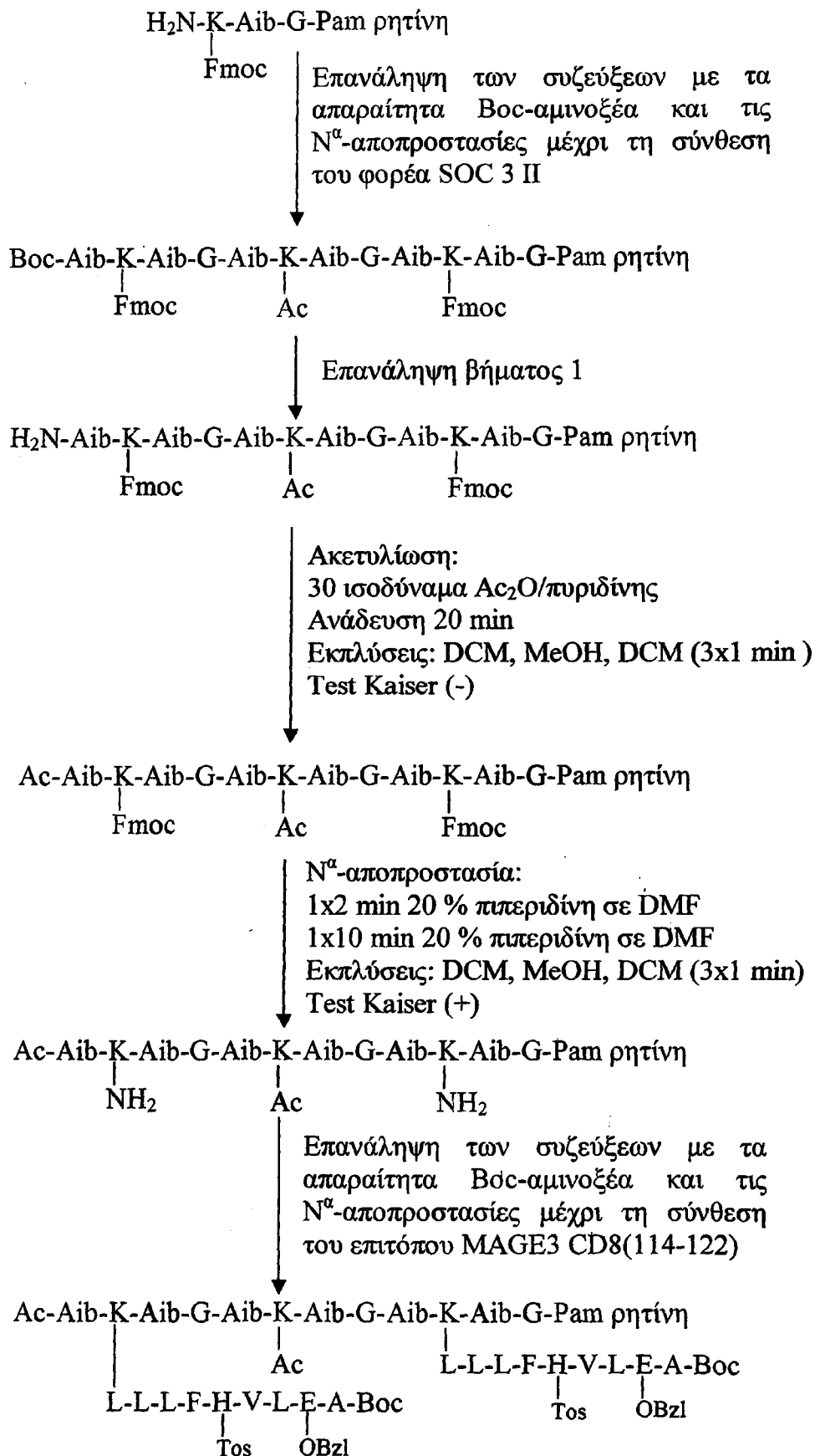
A/B:90/10 σε A/B: 0/100, ταχύτητα ροής 4.7 ml/min, ανίχνευση στα 214 nm. Η απόδοση καθαρισμού με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης υπολογίστηκε 16.86 %.

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου έγινε με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (Σχήμα 18) και η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα19).

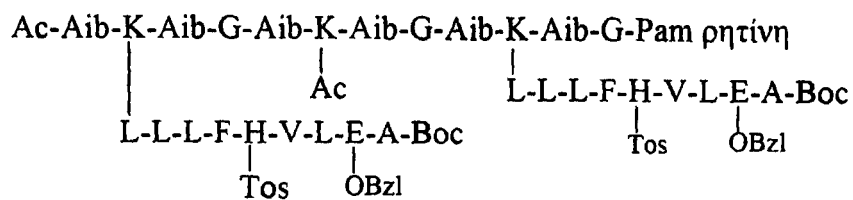


**Σχήμα 17:** Πορεία σύνθεσης του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7) (Κατά την αποκοπή της Boc-προστατευτικής ομάδας με διάλυμα 40% TFA σε DCM παίρνοντας άλας TFA)

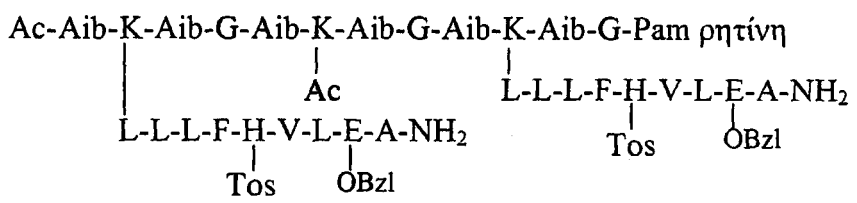




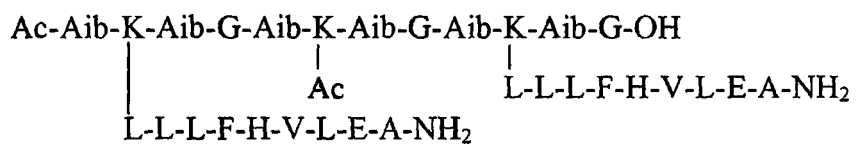
Σχήμα 17 (συνέχεια)



↓ N<sup>α</sup>-αποπροστασία:  
 1x2 min 40 % TFA σε DCM  
 1x13 min 40 % TFA σε DCM  
 Εκπλύσεις: DCM, MeOH, DCM (3x1 min)  
 Test Kaiser (+)



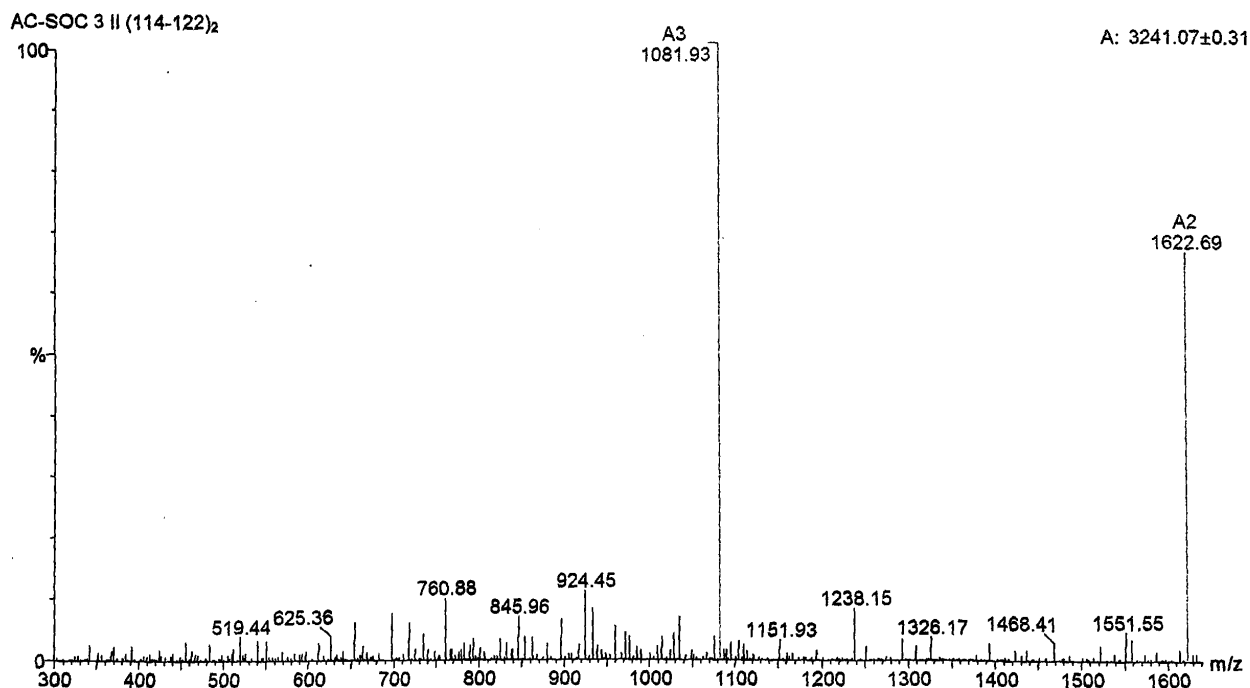
↓ Αποκοπή από την ρητίνη με άνυδρο HF  
 για 30min στους -8° C, 1 h στους 0° C



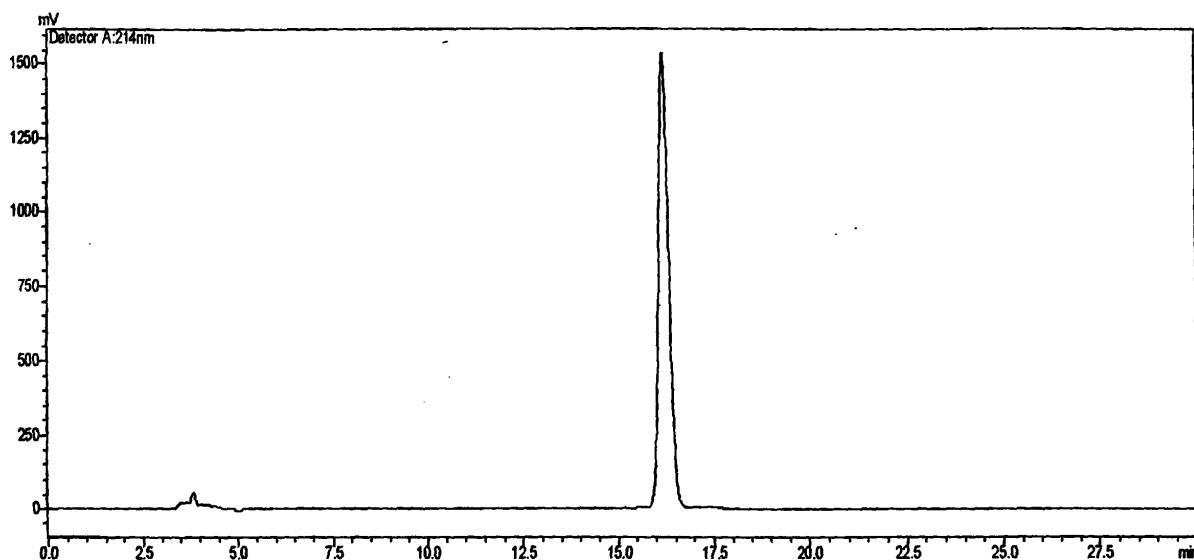
Σχήμα 17 (συνέχεια)



Σχ  
Ac  
CH  
A/B



**Σχήμα 18:** Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7). Υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=3240.96, ερρεθέν μοριακό βάρος MB=3241.07.



**Σχήμα 19:** Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7). Σύστημα έκλουσης: (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA, χρόνος έκλουσης 30 min από A/B:90/10 σε A/B:0/100, ταχύτητα ροής 1ml/min, ανίχνευση στα 214 nm.

#### 10.5.8 Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub>* (8)

50 ml διαλύματος PBS 10mM (pH 7.4) ρυθμίστηκαν σε pH 9 με προσθήκη διαλύματος 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 4.5mg NHS-φλουορεσκεΐνης (0.009mM) διαλύθηκαν σε 1ml διαλύματος PBS- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε Vortex. Για την καλύτερη διάλυση της NHS-φλουορεσκεΐνης προστέθηκε και μικρή ποσότητα ακετονιτριλίου. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε σφαιρική φιάλη όπου είχαν διαλυθεί 5mg (0.0015 mmole) του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub>* (6) σε 2ml διαλύματος PBS-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9). Έγινε ανάδευση για τρεις ώρες σε συνθήκες φωτοπροφύλαξης (φλουορεσκεΐνη) και ακολούθησε λυοφιλοποίηση. Το στερεό αφού διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι H<sub>2</sub>O για 48 ώρες και το τελικό προϊόν ελήφθη με λυοφιλοποίηση.

#### 10.5.9 Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub>* (9)

50 ml διαλύματος PBS 10mM (pH 7.4) ρυθμίστηκαν σε pH 9 με προσθήκη διαλύματος 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 3.6mg NHS-φλουορεσκεΐνης (0.0075mM) διαλύθηκαν σε 1ml διαλύματος PBS- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε Vortex. Για την καλύτερη διάλυση της NHS-φλουορεσκεΐνης προστέθηκε και μικρή ποσότητα ακετονιτριλίου. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε σφαιρική φιάλη όπου είχαν διαλυθεί 5mg (0.0015 mmole) του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>3</sub> II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub>* (7) σε 2ml διαλύματος PBS-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9). Έγινε ανάδευση για τρεις ώρες σε συνθήκες φωτοπροφύλαξης (φλουορεσκεΐνη), ακολούθησε λυοφιλοποίηση. Το στερεό αφού διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι H<sub>2</sub>O για 72 ώρες και το τελικό προϊόν ελήφθη με λυοφιλοποίηση.



#### 10.5.10 Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>4</sub> I [MAGE 3(168-176) (281-295)]<sub>2</sub> (10)*

50 ml διαλύματος PBS 10mM (pH 7.4) ρυθμίστηκαν σε pH 9 με προσθήκη διαλύματος 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 3.6 mg NHS-φλουορεσκεΐνης (0.0075mM) διαλύθηκαν σε 1ml διαλύματος PBS- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε Vortex. Για την καλύτερη διάλυση της NHS-φλουορεσκεΐνης προστέθηκε και μικρή ποσότητα ακετονιτριλίου. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε σφαιρική φιάλη όπου είχαν διαλυθεί 3mg (0.0005 mmole) του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>4</sub> I [MAGE 3(168-176) (281-295)]<sub>2</sub> (α)* σε 2ml διαλύματος PBS-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9). Έγινε ανάδευση για τρεις ώρες σε συνθήκες φωτοπροφύλαξης (φλουορεσκεΐνη), ακολούθησε λυοφιλοποίηση. Το στερεό αφού διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι H<sub>2</sub>O για 72 ώρες και το τελικό προϊόν ελήφθη με λυοφιλοποίηση.

#### 10.5.11 Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>4</sub> II [MAGE 3(168-176) (281-295)] (11)*

50 ml διαλύματος PBS 10mM (pH 7.4) ρυθμίστηκαν σε pH 9 με προσθήκη διαλύματος 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 4 mg NHS-φλουορεσκεΐνης (0.0077mM) διαλύθηκαν σε 1ml διαλύματος PBS- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε Vortex. Για την καλύτερη διάλυση της NHS-φλουορεσκεΐνης προστέθηκε και μικρή ποσότητα ακετονιτριλίου. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε σφαιρική φιάλη όπου είχαν διαλυθεί 4.5mg (0.0011 mmole) του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>4</sub> I [MAGE 3(168-176) (281-295)] (β)* σε 2ml διαλύματος PBS-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9). Έγινε ανάδευση για τρεις ώρες σε συνθήκες φωτοπροφύλαξης (φλουορεσκεΐνη), ακολούθησε λυοφιλοποίηση. Το στερεό αφού διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι H<sub>2</sub>O για 48 ώρες και το τελικό προϊόν ελήφθη με λυοφιλοποίηση.



#### 10.5.12 Σύνθεση του παραγώγου με φλουορεσκεΐνη του πεπτιδίου *Pal-SOC<sub>4</sub> I [MAGE 3(168-176) (281-295)] (12)*

50 ml διαλύματος PBS 10mM (pH 7.4) ρυθμίστηκαν σε pH 9 με προσθήκη διαλύματος 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 5mg NHS-φλουορεσκεΐνης (0.01mM) διαλύθηκαν σε 1ml διαλύματος PBS-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε Vortex. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε σφαιρική φιάλη όπου είχαν διαλυθεί 10mg (0.0024 mmole) του πεπτιδίου *Pal-SOC<sub>4</sub> I [MAGE 3(168-176) (281-295)] (γ)* σε 2ml διαλύματος PBS-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9). Έγινε ανάδευση για τρεις ώρες σε συνθήκες φωτοπροφύλαξης (φλουορεσκεΐνη), ακολούθησε διήθηση και το διήθημα υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι H<sub>2</sub>O για 48 ώρες και το τελικό προϊόν ελήφθη με λυοφιλοποίηση.



Π.Δ. 198/83

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

### ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ



## 11. ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ

### 11.1 Εισαγωγή

Τα πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) των πεπτιδίων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία έγιναν σε φασματοφωτόμετρο Jasco J-815 στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, στο Τμήμα Ιατρικής, στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας.

Τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS), δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) που προσομοιάζει με λιπιδικό περιβάλλον, τριφθοροαιθανόλη (Trifluoroethanol, TFE) που συμβάλλει στην ανάπτυξη ελικοειδών διαμορφώσεων και δεκατετρακυλοφωσφοχολίνη (tetradecylphosphocholine, C<sub>14</sub>PC) για τη μελέτη της επίδρασης του φωσφολιπιδικού περιβάλλοντος στη διαμόρφωση των πεπτιδίων.

Τα πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) έγιναν σε συγκεντρώσεις πεπτιδίων που δίδονται αναλυτικά παρακάτω:

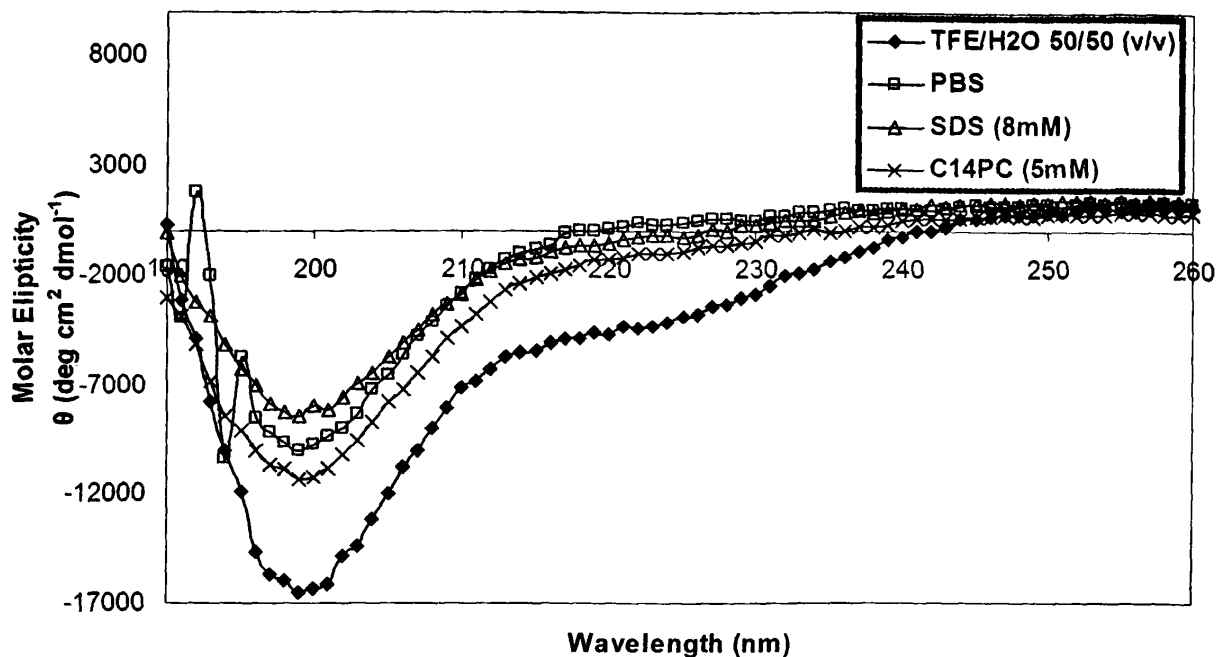
- ♦ Συγκεντρώσεις πεπτιδίων  $1 \times 10^{-4}$  M σε PBS (pH 7.4)
- ♦ Συγκέντρωση πεπτιδίων  $1 \times 10^{-4}$  M σε SDS: 8mM [Συγκέντρωση ίση με την κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων]
- ♦ Συγκέντρωση πεπτιδίων  $1 \times 10^{-4}$  M σε C<sub>14</sub>PC: 5mM
- ♦ Συγκέντρωση πεπτιδίων  $1 \times 10^{-4}$  M σε μίγμα TFE / H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v)

Οι λήψεις των φασμάτων πραγματοποιήθηκαν υπό συνεχή ροή (6,5 l/min) αέριου αζώτου στο τμήμα του οπτικού θαλάμου, υψηλής καθαρότητας (>99,999 vol%). Ο χειρισμός του οργάνου έγινε μέσω του προγράμματος Hardware Manager J-815 και η πρώτη επεξεργασία και αποθήκευση των φασμάτων με το πρόγραμμα Spectra Manager J-815. Η ρύθμιση των παραμέτρων του οργάνου για τη λήψη των φασμάτων έγινε ως εξής:

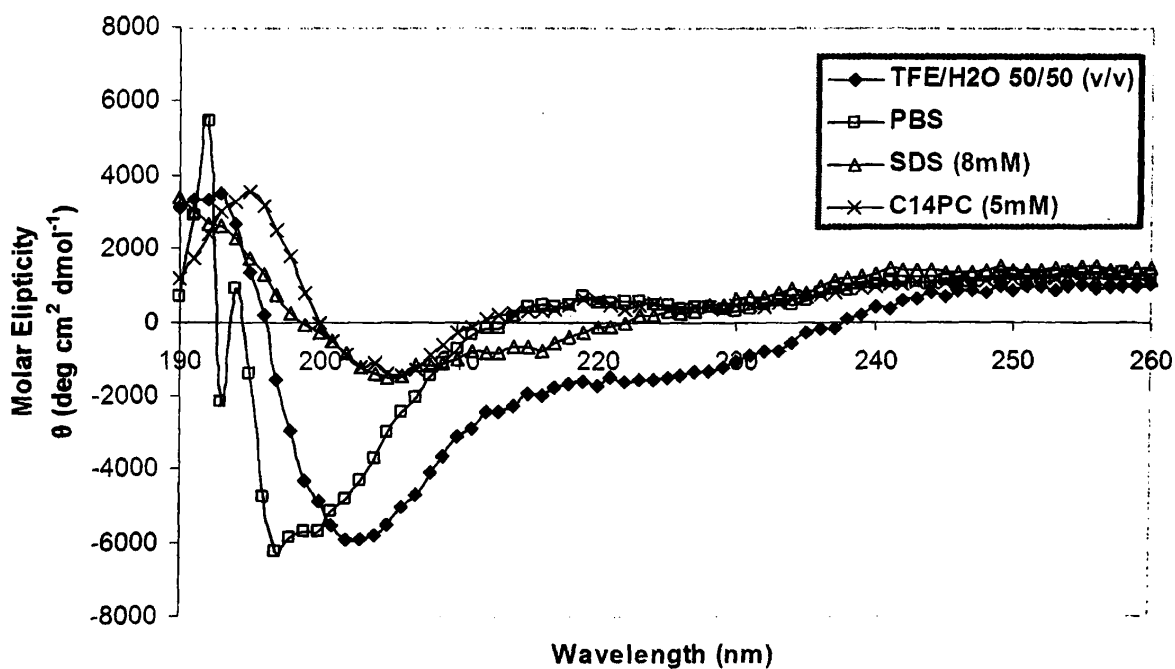
- ⊕ Περιοχή (range): 260-180nm
- ⊕ Ευαισθησία (sensitivity): 100mdeg
- ⊕ Ανάλυση (resolution): 0,2 nm
- ⊕ Επισώρευση (accumulation): 2
- ⊕ Εύρος ζώνης (bandwidth): 1.0 nm
- ⊕ Ταχύτητα σάρωσης (scan speed): 50 nm/min

## 11.2 Απεικόνιση φασμάτων

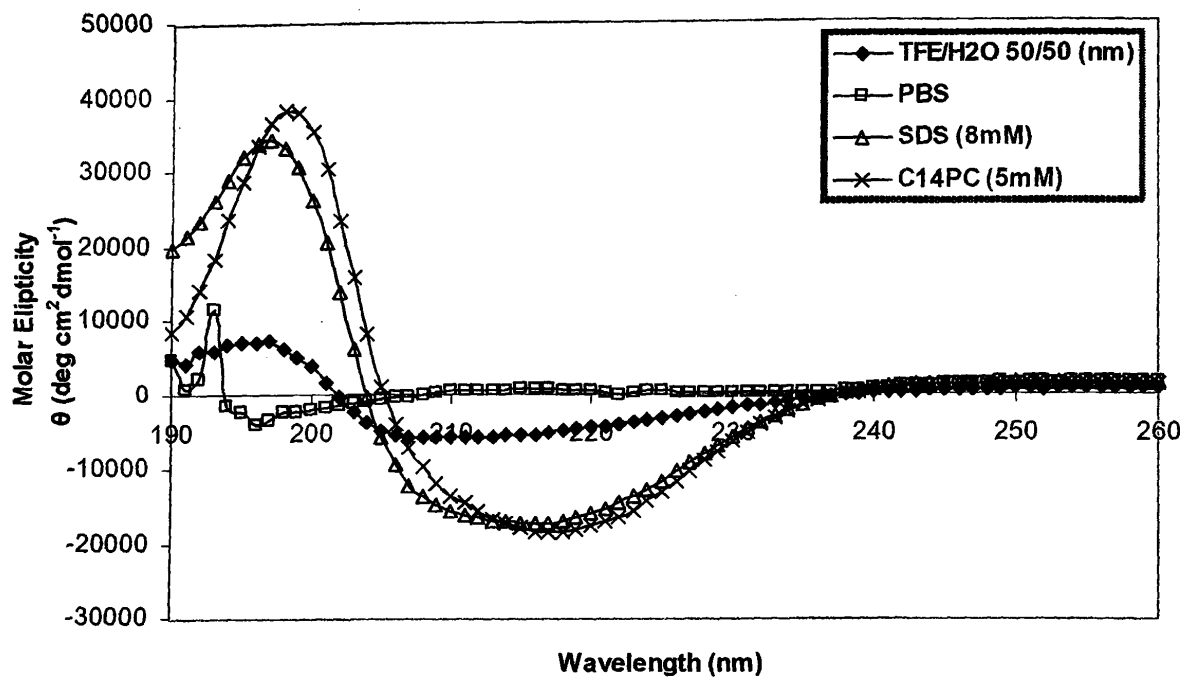
Στα Σχήματα 1 –7 απεικονίζονται τα CD φάσματα των πεπτιδίων (1)-(7) στους διαλύτες που προαναφέρθηκαν.



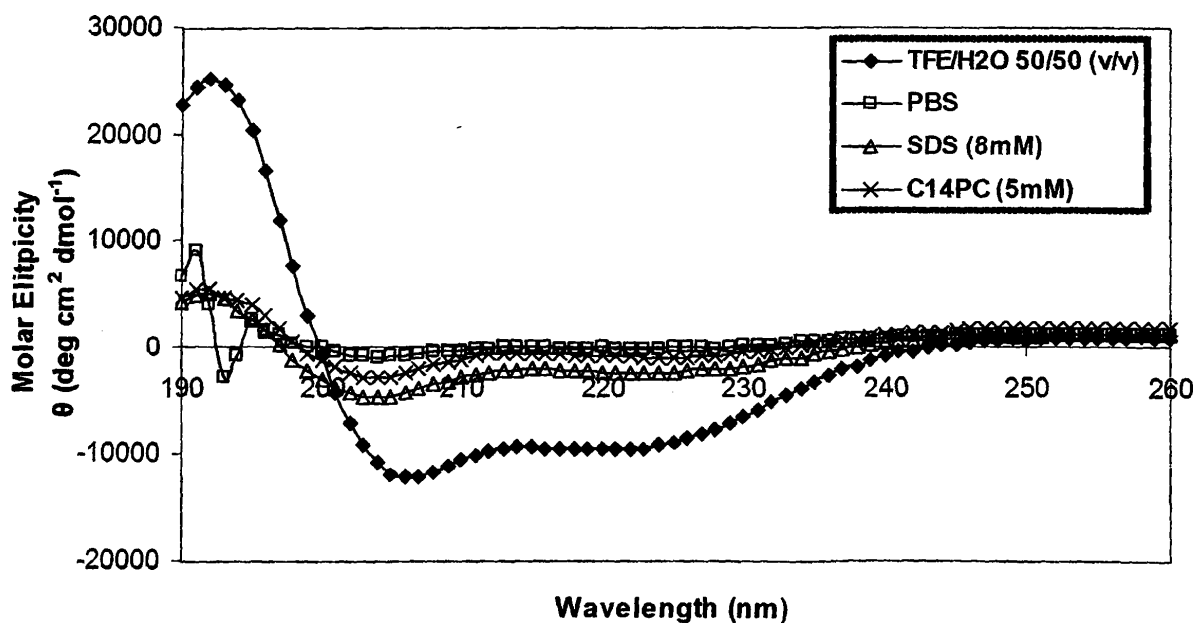
Σχήμα 1: CD φάσματα του πεπτιδίου *MAGE 3 CD8* (212-220) (1)  $10^{-4}$  M σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v), PBS, SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM



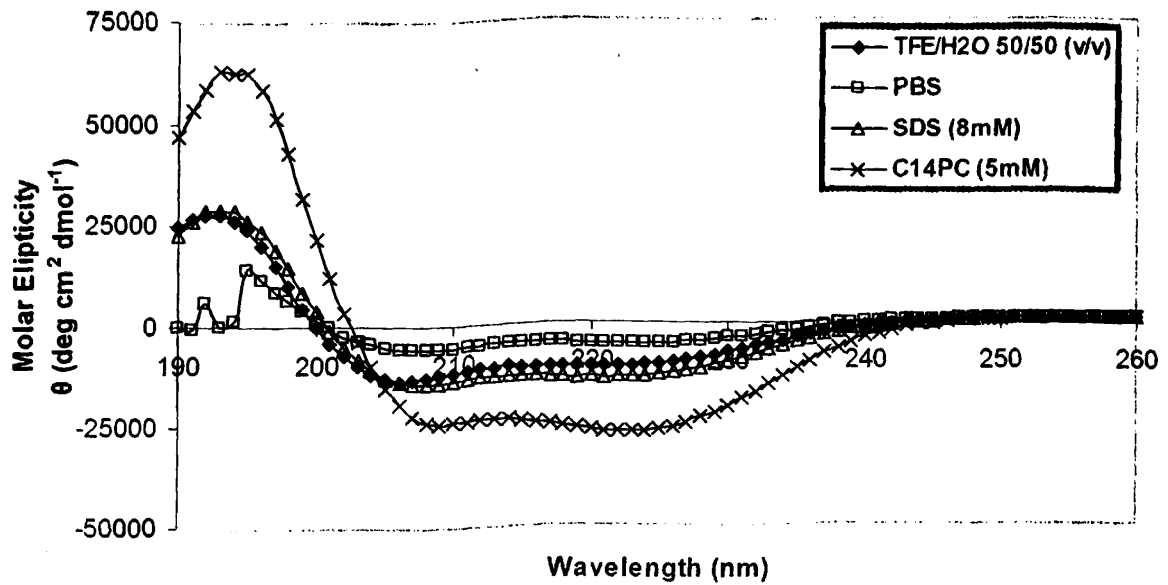
Σχήμα 2: CD φάσματα του πεπτιδίου *MAGE 3 CD8* (114-122) (2)  $10^{-4}$  M σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v), PBS, SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM



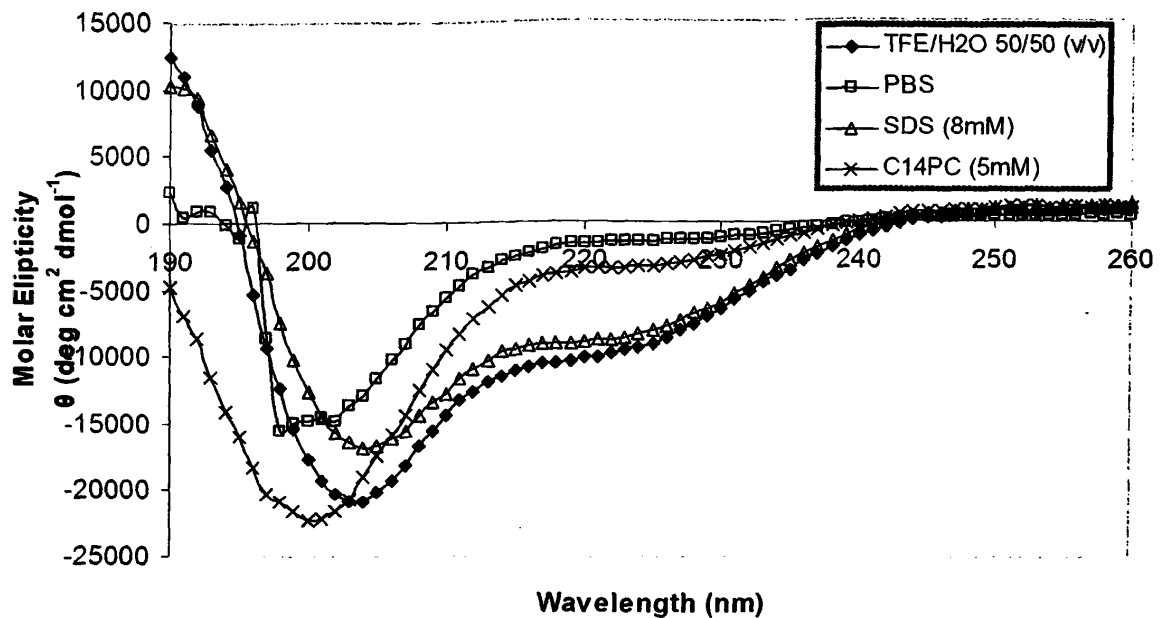
Σχήμα 3: CD φάσματα του πεπτιδίου MAGE 3 CD4 (243-258) ( $3 \cdot 10^{-4} M$  σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v), PBS, SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM



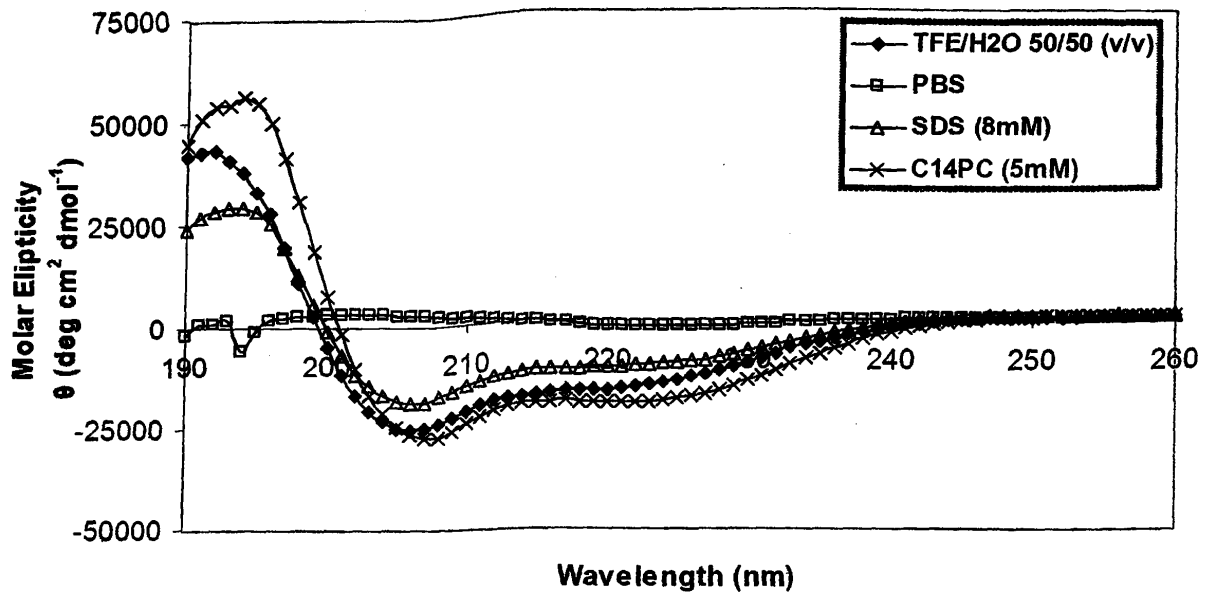
Σχήμα 4: CD φάσματα του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II (4) ( $4 \cdot 10^{-4} M$  σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v), PBS, SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM



Σχήμα 5: CD φάσματα του πεπτιδίου *Pal-SOC<sub>3</sub>-II (5)*  $10^{-4} M$  σε *TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v)*, *PBS*, *SDS 8mM* και *C<sub>14</sub>PC 5mM*



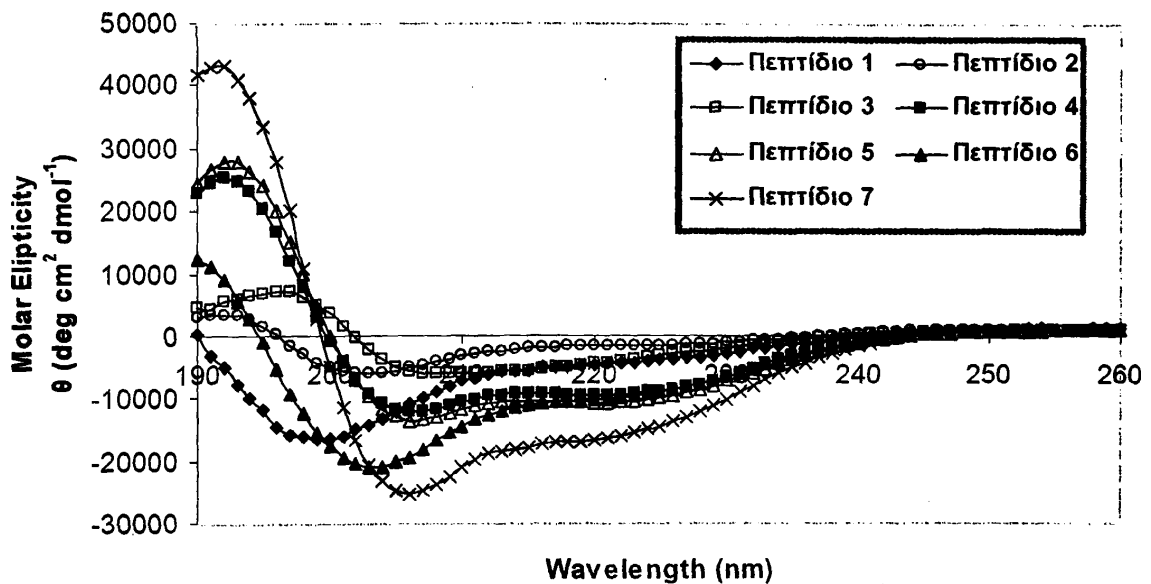
Σχήμα 6: CD φάσματα του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE3CD8(212-220)]<sub>2</sub> (6)*  $10^{-4} M$  σε *TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v)*, *PBS*, *SDS 8mM* και *C<sub>14</sub>PC 5mM*



Σχήμα 7: CD φάσματα του πεπτιδίου  $Ac-SOC_3-P[MAGE3CD8(114-122)]_2$  ( $7$ )  $10^{-4}M$  σε  $TFE/H_2O$  50/50 (v/v),  $PBS$ ,  $SDS$  8mM και  $C_{14}PC$  5mM

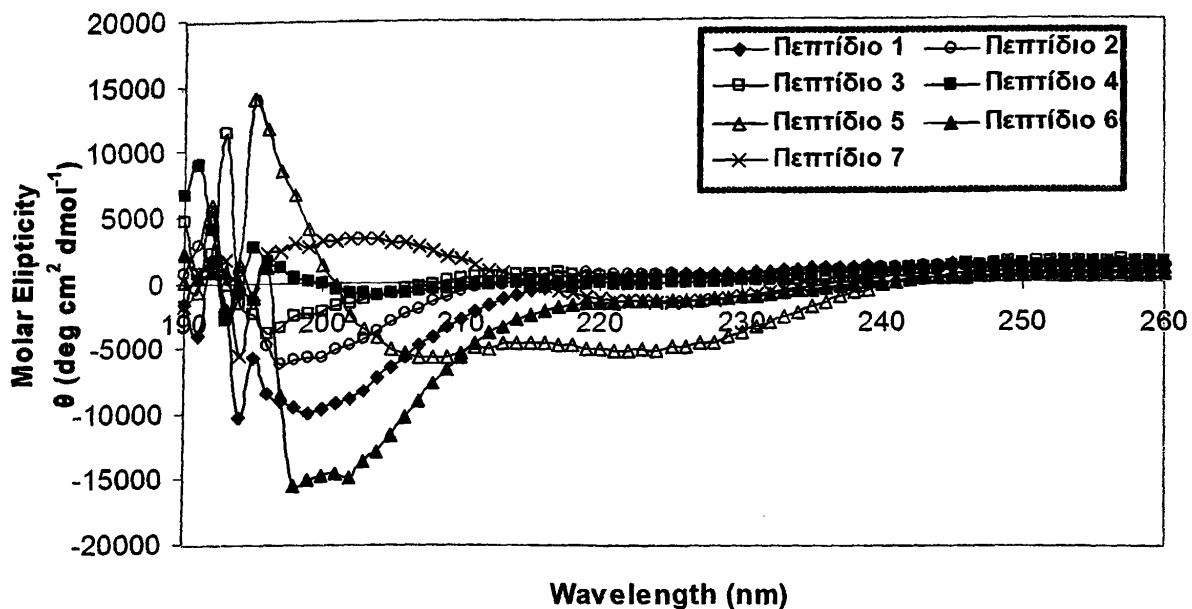
Στα Σχήματα 8 –11 απεικονίζονται τα CD φάσματα των πεπτιδίων (1)-(7) στον ίδιο διαλύτη.

- Πεπτίδιο 1: Πεπτίδιο MAGE 3 CD8 (212-220)
- Πεπτίδιο 2: Πεπτίδιο MAGE 3 CD8 (114-122)
- Πεπτίδιο 3: Πεπτίδιο MAGE 3 CD4 (243-258)
- Πεπτίδιο 4: Πεπτίδιο Ac-SOC<sub>3</sub>-II
- Πεπτίδιο 5: Πεπτίδιο Pal-SOC<sub>3</sub>-II
- Πεπτίδιο 6: Πεπτίδιο Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE-3 CD8(212-220)]<sub>2</sub>
- Πεπτίδιο 7: Πεπτίδιο Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE-3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub>

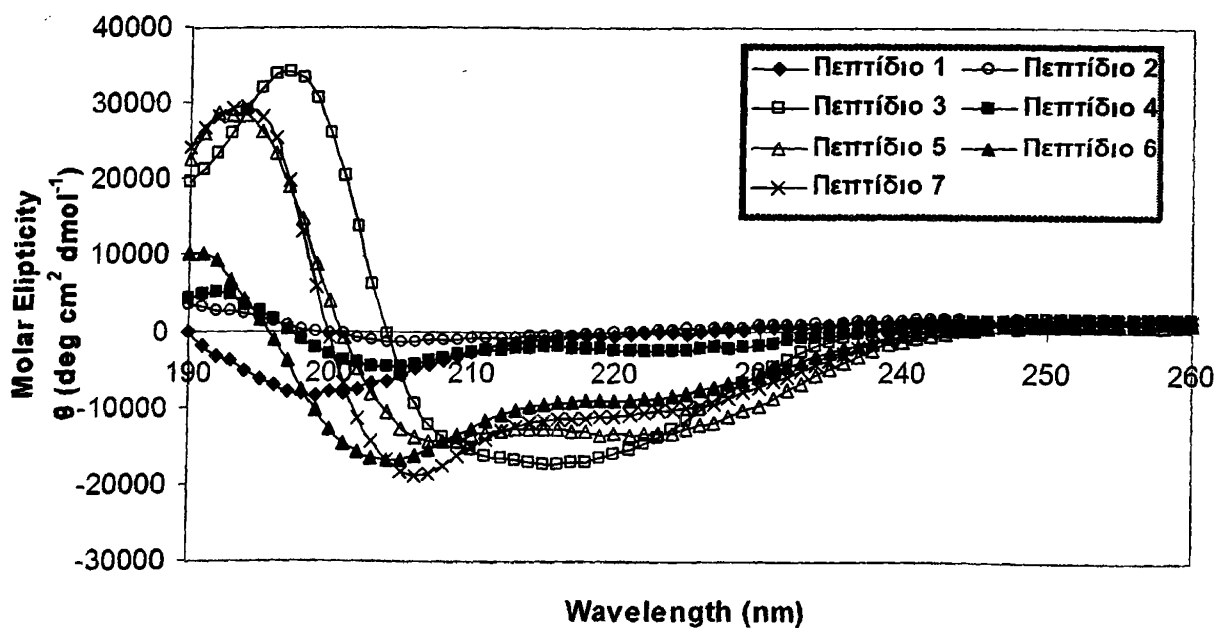


Σχήμα 8: Φάσματα CD των πεπτιδίων (1)-(7) συγκέντρωσης  $10^{-4}M$  σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v)

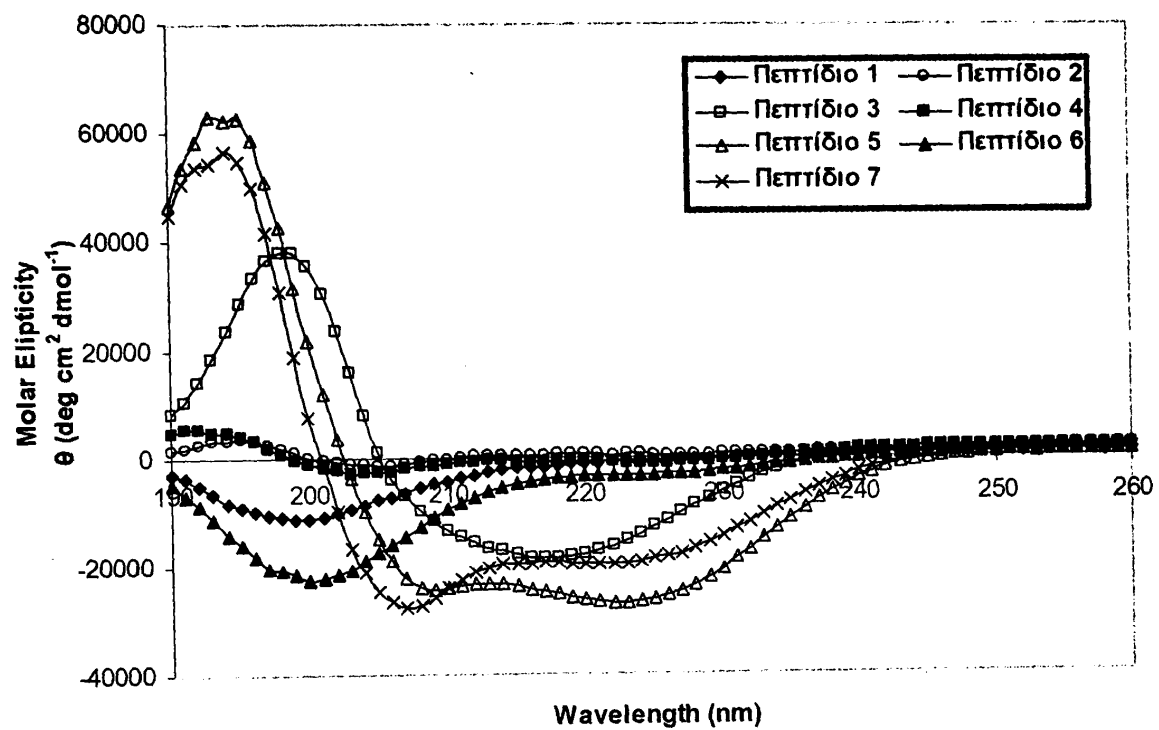




Σχήμα 9: Φάσματα CD των πεπτιδίων (1)-(7) συγκέντρωσης  $10^{-4}M$  σε PBS



Σχήμα 10: Φάσματα CD των πεπτιδίων (1)-(7) συγκέντρωσης  $10^{-4}M$  σε SDS 8mM



Σχήμα 11: Φάσματα CD των πεπτιδίων (1)-(7) συγκέντρωσης  $10^{-4} M$  σε  $C_{14}PC$   $5mM$

### 11.3 Ανάλυση φασμάτων κυκλικού διχρωισμού

Τα δεδομένα των ληφθέντων φασμάτων αναλύθηκαν με το πρόγραμμα CDNN. Επιλέχτηκε η ομάδα με το μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνικών φασμάτων CD αναφοράς – επιλογή “Net using 33 basespectra (complex CD spectra).

Τα τελικά δεδομένα των αναλύσεων των φασμάτων από το πρόγραμμα CDNN αφορούν στο επί τοις εκατό ποσοστό της κάθε δομής (έλικα, αντιπαράλληλο φύλλο, παράλληλο φύλλο, β-στροφή, τυχαία διαμόρφωση) που λαμβάνει το πεπτίδιο, οι οποίες συνεισφέρουν στην τελική του διαμόρφωση, όπως φαίνεται στους Πίνακες 1-15 για τα πεπτίδια (1)- (7), συγκέντρωσης  $10^{-4}$  σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v), PBS, SDS (8mM) και C<sub>14</sub>PC (5mM).

Ως πλέον αξιόπιστες αναλύσεις θεωρούνται αυτές των οποίων το άθροισμα των ποσοστών των επιμέρους δομών είναι πλησιέστερα στο 100%, ή έχουν απόκλιση το πολύ  $\pm 5-10\%$ . Τέτοια αποτελέσματα βρέθηκε ότι λαμβάνονται στην περιοχή 190-260nm (μετά από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων όλων των αναλύσεων), και αυτά θεωρούνται ως τα τελικά αποτελέσματα (Πίνακας 29).

*Πίνακας 1: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *MAGE 3 CD8 (212-220) (1)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v) με το πρόγραμμα CDNN*

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	7.2%	8.0%	8.7%	10.7%	11.8%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	16.9%	20.3%	23.5%	24.7%	27.6%
Παράλληλο Φύλλο	2.6%	3.3%	4.2%	5.4%	5.6%
β-στροφή	30.4%	29.7%	31.1%	24.7%	19.4%
Τυχαία Διαμόρφωση	45.0%	41.5%	40.1%	35.9%	35.3%
Άθροισμα	102.1%	102.8%	107.6%	101.3%	99.6%

**Πίνακας 2: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *MAGE 3 CD8 (114-122) (2)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	9.1 %	9.4 %	8.0 %	5.7 %	6.1 %
Αντιπαράλληλο Φύλλο	44.3 %	33.8 %	33.2 %	35.8 %	38.3 %
Παράλληλο Φύλλο	4.0 %	5.0 %	5.1 %	5.3 %	5.4 %
β-στροφή	21.0 %	21.8%	23.4 %	22.0 %	19.6 %
Τυχαία Διαμόρφωση	28.2 %	33.4 %	37.7 %	35.9 %	35.7 %
Άθροισμα	106.6 %	103.4 %	107.4 %	104.7 %	105.2 %

**Πίνακας 3: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *MAGE 3 CD4 (243-258) (3)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	13.1 %	13.9 %	13.9 %	9.8 %	10.4 %
Αντιπαράλληλο Φύλλο	42.5 %	30.9 %	27.0 %	28.2 %	29.3 %
Παράλληλο Φύλλο	5.0 %	6.1 %	5.8 %	5.4 %	5.5 %
β-στροφή	18.3 %	18.5 %	18.5 %	21.2 %	19.4 %
Τυχαία Διαμόρφωση	26.9 %	31.9 %	34.5 %	35.5 %	35.4 %
Άθροισμα	105.8 %	101.3 %	99.7 %	100.2 %	100.1 %

**Πίνακας 4: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>3</sub>-II (4)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	34.4 %	29.7 %	24.6 %	25.7 %	27.0 %
Αντιπαράλληλο Φύλλο	6.9 %	13.5 %	12.8 %	14.1 %	15.2 %
Παράλληλο Φύλλο	8.7 %	6.3 %	5.0 %	5.6 %	5.7 %
β-στροφή	19.7 %	20.2 %	21.5 %	21.5 %	18.2 %
Τυχαία Διαμόρφωση	28.3 %	29.7 %	33.1 %	33.2 %	32.8 %
Άθροισμα	97.9 %	99.5 %	97.0 %	100.2 %	98.9 %

**Πίνακας 5: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Pal-SOC<sub>3</sub>-II (5), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	38.5 %	34.9 %	28.3 %	29.9 %	31.6 %
Αντιπαράλληλο Φύλλο	3.5 %	10.8 %	10.7 %	12.0 %	13.0 %
Παράλληλο Φύλλο	8.8 %	6.4 %	5.0 %	5.6 %	5.7 %
β-στροφή	18.8 %	19.4 %	20.9 %	21.1 %	17.7 %
Τυχαία Διαμόρφωση	28.1 %	28.1 %	32.0 %	32.1 %	32.8 %
Άθροισμα	97.8 %	99.7 %	97.0 %	100.7 %	99.8 %

**Πίνακας 6: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE-3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	22.5%	19.1 %	18.7%	26.8%	31.7%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	12.4%	9.5%	10.0%	10.9%	12.8%
Παράλληλο Φύλλο	4.6%	3.7%	3.8%	5.3%	5.7%
β-στροφή	34.2%	32.1%	32.7%	25.7%	17.9%
Τυχαία Διαμόρφωση	37.5%	40.1%	37.1%	32.1%	32.0%
Άθροισμα	111.3%	104.5%	102.4%	100.8%	100.1%

**Πίνακας 7: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE-3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε TFE/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	57.2%	57.8%	46.1%	46.8%	56.5%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	0.3%	2.1%	3.4%	4.2%	5.0%
Παράλληλο Φύλλο	6.7%	5.1%	4.0%	4.9%	5.4%
β-στροφή	16.4%	19.0%	22.5%	20.8%	14.3%
Τυχαία Διαμόρφωση	16.6%	20.5%	26.6%	23.0%	24.1%
Άθροισμα	97.2%	104.6%	102.5%	99.7%	105.3%

**Πίνακας 8: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *MAGE 3 CD8 (212-220) (1)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε PBS με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	5.6%	6.5%	5.7%	4.0%	4.5%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	31.1%	34.7%	37.1%	39.8%	43.4%
Παράλληλο Φύλλο	2.8%	4.1%	4.8%	5.1%	5.3%
β-στροφή	23.4%	24.3%	26.4%	23.6%	19.8%
Τυχαία Διαμόρφωση	36.5%	35.3%	39.4%	36.1%	36.1%
Άθροισμα	99.4%	104.8%	113.4%	108.5%	109.1%

**Πίνακας 9: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *MAGE 3 CD8 (114-122) (2)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε PBS με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	6.3%	6.7%	5.7%	3.5%	3.9%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	45.3%	39.2%	40.7%	43.6%	46.1%
Παράλληλο Φύλλο	3.5%	4.6%	5.1%	5.2%	5.3%
β-στροφή	19.8%	21.5%	23.4%	21.2%	19.7%
Τυχαία Διαμόρφωση	30.0%	33.8%	38.4%	35.7%	36.0%
Άθροισμα	105.0%	105.8%	113.2%	109.3%	110.9%

**Πίνακας 10: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *MAGE 3 CD4 (243-258) (3)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε PBS με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	6.5%	6.6%	6.1%	3.5%	3.8%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	51.3%	41.3%	42.1%	45.0%	46.6%
Παράλληλο Φύλλο	3.9%	4.9%	5.4%	5.3%	5.3%
β-στροφή	17.5%	19.7%	21.0%	19.7%	19.5%
Τυχαία Διαμόρφωση	28.0%	33.9%	37.3%	35.5%	35.8%
Άθροισμα	107.2%	106.3%	112.0%	109.0%	111.0%



**Πίνακας 11: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II (4), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε PBS με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	7.2%	8.1%	7.0%	4.0%	4.3%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	57.6%	41.5%	40.4%	43.2%	44.5%
Παράλληλο Φύλλο	4.3%	5.4%	5.6%	5.3%	5.3%
β-στροφή	16.5%	19.0%	20.2%	19.9%	19.6%
Τυχαία Διαμόρφωση	25.5%	32.2%	36.8%	35.7%	35.9%
Άθροισμα	111.1%	106.2%	110.0%	108.0%	109.6%

**Πίνακας 12: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Pal-SOC<sub>3</sub>-II (5), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε PBS με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	14.1 %	17.6 %	14.7 %	12.2 %	12.2 %
Αντιπαράλληλο Φύλλο	32.7 %	26.9 %	24.1 %	26.2 %	27.2 %
Παράλληλο Φύλλο	4.6 %	6.4 %	5.5 %	5.6 %	5.6 %
β-στροφή	20.3 %	19.0 %	20.0 %	20.5 %	19.3 %
Τυχαία Διαμόρφωση	30.0 %	31.0 %	35.0 %	35.5 %	35.1 %
Άθροισμα	101.7 %	100.9 %	99.3 %	99.9 %	99.4 %

**Πίνακας 13: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE-3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε PBS με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	9.3 %	9.4 %	6.6 %	5.7 %	6.5 %
Αντιπαράλληλο Φύλλο	32.5 %	27.7 %	29.4 %	32.4 %	37.1 %
Παράλληλο Φύλλο	3.3 %	4.2 %	4.3 %	5.1 %	5.4 %
β-στροφή	28.3 %	27.3 %	30.6 %	25.8 %	19.6 %
Τυχαία Διαμόρφωση	31.2 %	34.2 %	40.2 %	36.0 %	35.6 %
Άθροισμα	104.5 %	102.8 %	111.0 %	104.9 %	104.2 %

**Πίνακας 14: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE-3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7), σε συγκέντρωση 1 x 10<sup>-4</sup> M σε PBS με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	6.1 %	7.7 %	7.5 %	4.6 %	4.5 %
Αντιπαράλληλο Φύλλο	46.9 %	42.2 %	42.2 %	44.3 %	43.6 %
Παράλληλο Φύλλο	3.8 %	5.5 %	6.0 %	5.5 %	5.4 %
β-στροφή	15.2 %	17.1 %	17.6 %	16.8 %	19.3 %
Τυχαία Διαμόρφωση	31.5 %	33.9 %	35.8 %	35.2 %	35.4 %
Άθροισμα	103.5 %	106.4 %	109.0 %	106.3 %	108.3 %

**Πίνακας 15: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου MAGE 3 CD8 (212-220) (1), σε συγκέντρωση 1 x 10<sup>-4</sup> M σε SDS (8mM) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	5.8%	6.8%	6.3%	4.5%	5.0%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	32.0%	34.3%	36.1%	38.6%	41.6%
Παράλληλο Φύλλο	2.9%	4.2%	4.9%	5.2%	5.4%
β-στροφή	22.7%	23.6%	25.4%	22.9%	19.8%
Τυχαία Διαμόρφωση	36.3%	35.6%	39.0%	36.1%	36.1%
Άθροισμα	99.7%	104.5%	111.7%	107.4%	108.0%

**Πίνακας 16: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου MAGE 3 CD8 (114-122) (2), σε συγκέντρωση 1 x 10<sup>-4</sup> M σε SDS (8mM) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	7.3%	8.0%	7.1%	4.1%	4.5%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	51.0%	41.3%	39.9%	42.2%	43.6%
Παράλληλο Φύλλο	4.0%	5.4%	5.6%	5.3%	5.3%
β-στροφή	17.5%	19.2%	20.3%	20.5%	19.7%
Τυχαία Διαμόρφωση	27.3%	32.3%	36.9%	35.9%	36.1%
Άθροισμα	108.0%	106.2%	109.9%	108.0%	109.3%





**Πίνακας 17: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *MAGE 3 CD4 (243-258) (3)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε SDS (8mM) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	43.2%	50.4%	59.9%	49.3%	50.5%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	0.8%	6.3%	7.1%	6.9%	6.6%
Παράλληλο Φύλλο	8.6%	8.0%	7.2%	5.6%	5.6%
β-στροφή	11.3%	10.0%	8.4%	15.4%	15.9%
Τυχαία Διαμόρφωση	33.3%	22.7%	21.5%	26.9%	27.4%
Άθροισμα	97.2%	97.4%	104.0%	104.1%	105.9%

**Πίνακας 18: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>3</sub>-II (4)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε SDS (8mM) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	10.1%	10.2%	9.0%	6.7%	7.0%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	45.2%	32.9%	31.7%	34.5%	36.3%
Παράλληλο Φύλλο	4.3%	5.2%	5.2%	5.4%	5.5%
β-στροφή	20.2%	21.1%	22.4%	21.1%	19.5%
Τυχαία Διαμόρφωση	27.7%	33.6%	37.2%	35.9%	35.7%
Άθροισμα	107.4%	103.0%	105.6%	103.6%	103.9%

**Πίνακας 19: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *Ral-SOC<sub>3</sub>-II (5)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε SDS (8mM) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	43.2 %	43.4 %	39.0 %	42.4 %	43.0 %
Αντιπαράλληλο Φύλλο	1.2 %	6.7 %	7.5 %	8.4 %	8.8 %
Παράλληλο Φύλλο	8.2 %	6.4 %	5.1 %	5.6 %	5.7 %
β-στροφή	17.2 %	17.2 %	18.0 %	18.3 %	16.4 %
Τυχαία Διαμόρφωση	30.6 %	27.0 %	28.8 %	28.9 %	28.9 %
Άθροισμα	100.4 %	100.7 %	98.5 %	102.5 %	102.7 %

**Πίνακας 20:** Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE-3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε SDS(8mM) με το πρόγραμμα CDNN

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	21.4%	19.0%	18.6%	23.8%	27.1%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	16.1%	12.3%	12.2%	13.3%	15.1%
Παράλληλο Φύλλο	4.9%	4.3%	4.2%	5.4%	5.7%
β-στροφή	30.4%	28.5%	29.2%	24.9%	18.4%
Τυχαία Διαμόρφωση	35.1%	37.9%	36.6%	33.4%	33.1%
Άθροισμα	107.7%	102.0%	100.8%	100.9%	99.5%

**Πίνακας 21:** Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-III[MAGE-3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε SDS (8mM) με το πρόγραμμα CDNN

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	43.6%	43.3%	32.8%	31.3%	36.1%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	1.7%	7.6%	7.9%	9.6%	11.2%
6.5Παράλληλο Φύλλο	8.0%	6.4%	4.7%	5.3%	5.7%
β-στροφή	19.8%	19.7%	22.6%	24.2%	17.5%
Τυχαία Διαμόρφωση	25.0%	23.8%	31.1%	31.0%	31.2%
Άθροισμα	98.2%	100.8%	99.0%	101.4%	101.6%

**Πίνακας 22:** Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου MAGE 3 CD8 (212-220) (1), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε C<sub>14</sub>PC (5mM) με το πρόγραμμα CDNN

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	5.6%	6.8%	6.5%	5.2%	5.9%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	23.9%	30.5%	33.2%	35.3%	38.8%
Παράλληλο Φύλλο	2.6%	3.9%	4.6%	5.2%	5.4%
β-στροφή	25.2%	25.4%	27.2%	23.8%	19.7%
Τυχαία Διαμόρφωση	40.6%	37.0%	39.4%	36.0%	35.9%
Άθροισμα	98.0%	103.6%	111.0%	105.5%	105.6%



**Πίνακας 23: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *MAGE 3 CD8 (114-122) (2)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε *C<sub>14</sub>PC (5mM)* με το πρόγραμμα *CDNN***

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	7.3%	8.3%	6.7%	3.5%	3.8%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	52.7%	43.1%	41.1%	44.3%	46.3%
Παράλληλο Φύλλο	4.0%	5.6%	5.6%	5.2%	5.3%
β-στροφή	17.5%	18.9%	20.3%	20.5%	19.6%
Τυχαία Διαμόρφωση	26.3%	31.0%	36.8%	35.6%	35.9%
Άθροισμα	107.8%	106.9%	110.6%	109.1%	111.0%

**Πίνακας 24: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *MAGE 3 CD4 (243-258) (3)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε *C<sub>14</sub>PC (5mM)* με το πρόγραμμα *CDNN***

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	37.0%	48.7%	65.9%	56.8%	53.5%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	0.9%	6.8%	7.6%	6.8%	5.9%
Παράλληλο Φύλλο	8.3%	8.6%	8.3%	5.8%	5.5%
β-στροφή	9.9%	8.0%	5.9%	11.6%	15.2%
Τυχαία Διαμόρφωση	45.7%	25.6%	19.2%	25.9%	26.1%
Άθροισμα	101.8%	97.6%	106.9%	106.9%	106.1%

**Πίνακας 25: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>3</sub>-II (4)*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε *C<sub>14</sub>PC (5mM)* με το πρόγραμμα *CDNN***

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	9.1%	9.4%	8.0%	5.1%	5.4%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	51.7%	37.9%	35.9%	39.4%	40.9%
Παράλληλο Φύλλο	4.4%	5.5%	5.4%	5.4%	5.4%
β-στροφή	18.7%	20.0%	21.5%	20.8%	19.7%
Τυχαία Διαμόρφωση	26.0%	32.3%	37.2%	36.2%	36.2%
Άθροισμα	109.8%	105.1%	108.1%	106.9%	107.6%

**Πίνακας 26: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Pal-SOC<sub>3</sub>-II (5), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε C<sub>14</sub>PC (5mM) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	86.7 %	84.0 %	83.7 %	80.0 %	78.6 %
Αντιπαράλληλο Φύλλο	0.0 %	0.1 %	0.9 %	1.1 %	1.2 %
Παράλληλο Φύλλο	2.7 %	3.4 %	4.8 %	4.6 %	4.6 %
β-στροφή	6.6 %	4.6 %	6.5 %	6.4 %	7.6 %
Τυχαία Διαμόρφωση	4.5 %	6.0 %	11.1 %	10.2 %	10.5 %
Άθροισμα	100.6 %	98.1 %	106.9 %	102.2 %	102.6 %

**Πίνακας 27: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE-3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε C<sub>14</sub>PC (5mM) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	6.5%	7.6%	7.9%	9.7%	11.4%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	9.8%	17.5%	20.8%	23.1%	28.0%
Παράλληλο Φύλλο	2.0%	2.9%	3.7%	5.2%	5.6%
β-στροφή	37.7%	34.9%	37.2%	29.4%	19.6%
Τυχαία Διαμόρφωση	50.9%	42.1%	41.8%	36.3%	35.7%
Άθροισμα	106.9%	105.1%	111.3%	103.6%	100.3%

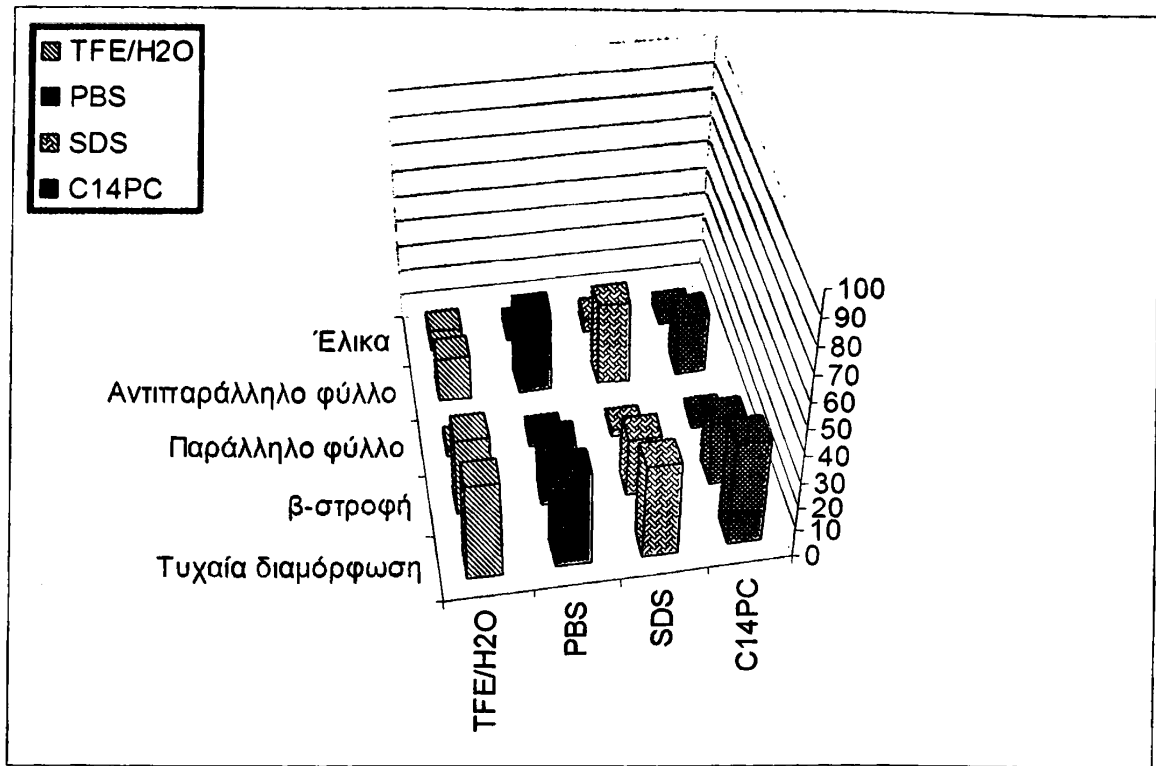
**Πίνακας 28: Αποτελέσματα ανάλυσης του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE-3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7), σε συγκέντρωση  $1 \times 10^{-4}$  M σε C<sub>14</sub>PC (5mM) με το πρόγραμμα CDNN**

	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Έλικα	78.2%	77.2%	68.1%	58.8%	66.9%
Αντιπαράλληλο Φύλλο	0.1%	0.4%	1.6%	2.4%	3.0%
Παράλληλο Φύλλο	3.9%	4.4%	4.3%	4.7%	5.2%
β-στροφή	10.3%	9.3%	14.0%	15.8%	11.7%
Τυχαία Διαμόρφωση	6.4%	8.4%	18.3%	17.3%	18.6%
Άθροισμα	98.9%	99.7%	106.4%	99.0%	105.2%

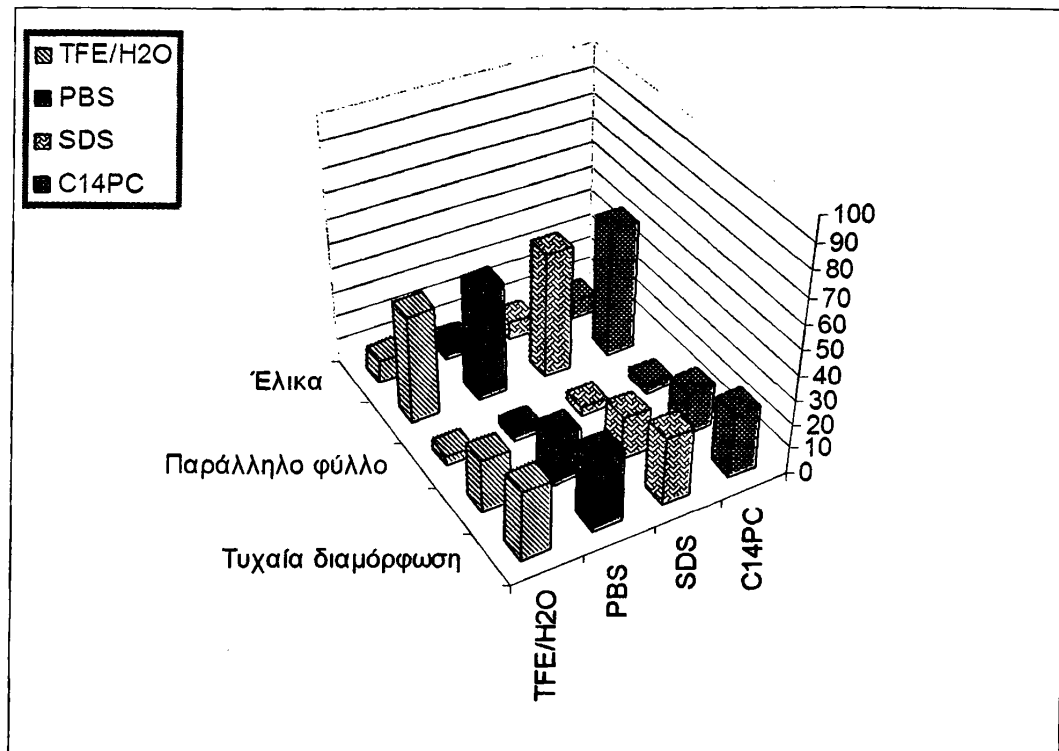


**Πίνακας 29: Ποσοστά των επιμέρους δομών που συνεισφέρουν στην τελική διαμόρφωση των πεπτιδίων, σύμφωνα με την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού από το πρόγραμμα CDNN για την περιοχή 190-260nm.**

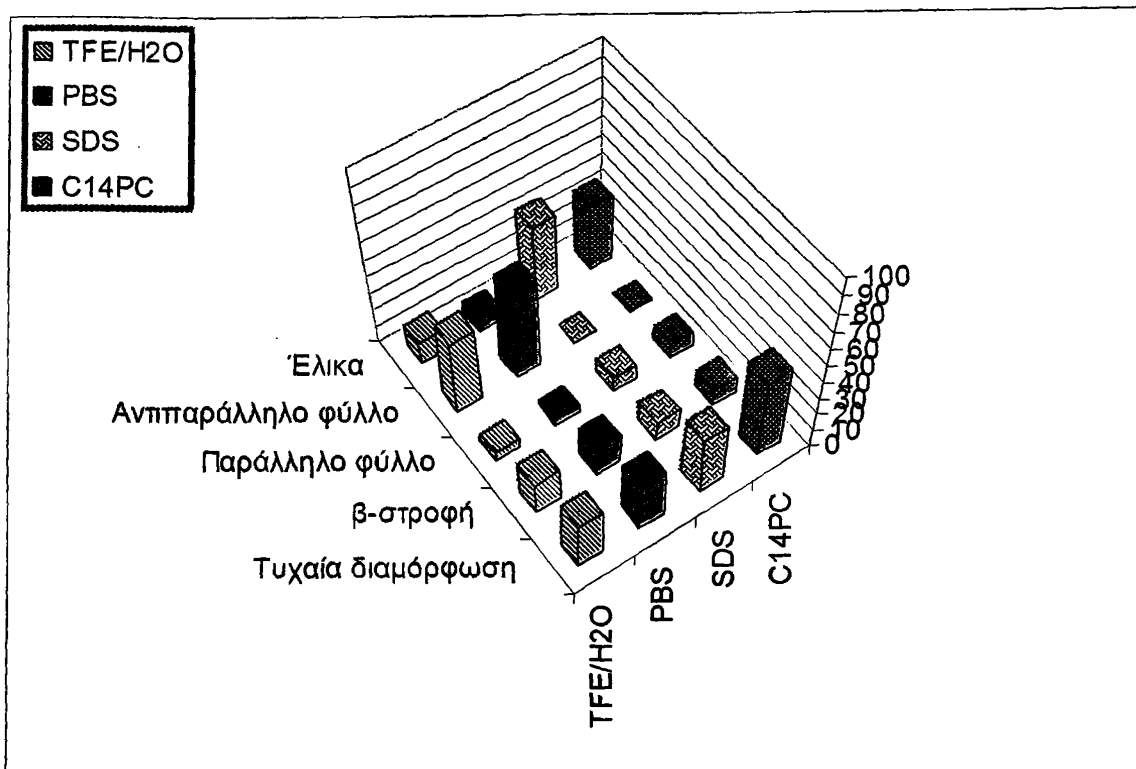
	Ελίκα	Αντιπαράλληλο Φύλλο	Παράλληλο Φύλλο	β-στροφή	Τυχαία Διαμόρφωση
<b>ΠΕΠΤΙΔΙΟ 1: MAGE-3 CD8 (212-220)</b>					
TFE/H <sub>2</sub> O (50/50)	7.2 %	16.9%	2.6%	30.4%	45.0%
PBS pH 7.4	5.6%	31.1%	2.8%	23.4%	36.5%
SDS 8 mM	5.8%	32.0%	2.9%	22.7%	36.3%
C <sub>14</sub> PC 5 mM	5.6%	23.9%	2.6%	25.2%	40.6%
<b>ΠΕΠΤΙΔΙΟ 2: MAGE-3 CD8 (114-122)</b>					
TFE/H <sub>2</sub> O (50/50)	9.1%	44.3%	4.0%	21.0%	28.2%
PBS pH 7.4	6.3%	45.3%	3.5%	19.8%	30.0%
SDS 8 mM	7.3%	51.0%	4.0%	17.5%	27.3%
C <sub>14</sub> PC 5 mM	7.3%	52.7%	4.0%	17.5%	26.3%
<b>ΠΕΠΤΙΔΙΟ 3: MAGE-3 CD4 (243-258)</b>					
TFE/H <sub>2</sub> O (50/50)	13.1%	42.5%	5.0%	18.3%	26.9%
PBS pH 7.4	6.5%	51.3%	3.9%	17.5%	28.0%
SDS 8 mM	43.2%	0.8%	8.6%	11.3%	33.3%
C <sub>14</sub> PC 5 mM	37.0%	0.9%	8.3%	9.9%	45.7%
<b>ΠΕΠΤΙΔΙΟ 4: Ac-SOC<sub>3</sub>-II</b>					
TFE/H <sub>2</sub> O (50/50)	34.4%	6.9%	8.7%	19.7%	28.3%
PBS pH 7.4	7.2%	57.6%	4.3%	16.5%	25.5%
SDS 8 mM	10.1%	45.2%	4.3%	20.2%	27.7%
C <sub>14</sub> PC 5 mM	9.1%	51.7%	4.4%	18.7%	26.0%
<b>ΠΕΠΤΙΔΙΟ 5: Pal-SOC<sub>3</sub>-II</b>					
TFE/H <sub>2</sub> O 50/50	38.5%	3.5%	8.8%	18.8%	28.1%
PBS pH 7.4	14.1%	32.7%	4.6%	20.3%	30.0%
SDS 8 mM	43.2%	1.2%	8.2%	17.2%	30.6%
C <sub>14</sub> PC 5 mM	86.7%	0.0%	2.7%	6.6%	4.5%
<b>ΠΕΠΤΙΔΙΟ 6: Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE-3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub></b>					
TFE/H <sub>2</sub> O 50/50	22.5%	12.4%	4.6%	34.2%	37.5%
PBS pH 7.4	9.3%	32.5%	3.3%	28.3%	31.2%
SDS 8 mM	21.4%	16.1%	4.9%	30.4%	35.1%
C <sub>14</sub> PC 5mM	6.5%	9.8%	2.0%	37.7%	50.9%
<b>ΠΕΠΤΙΔΙΟ 7: Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE-3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub></b>					
TFE/H <sub>2</sub> O 50/50	57.2%	0.3%	6.7%	16.4%	16.6%
PBS pH 7.4	6.1%	46.9%	3.8%	15.2%	31.5%
SDS 8 mM	43.6%	1.7%	8.0%	19.8%	25.0%
C <sub>14</sub> PC 5mM	78.2%	0.1%	3.9%	10.3%	6.4%



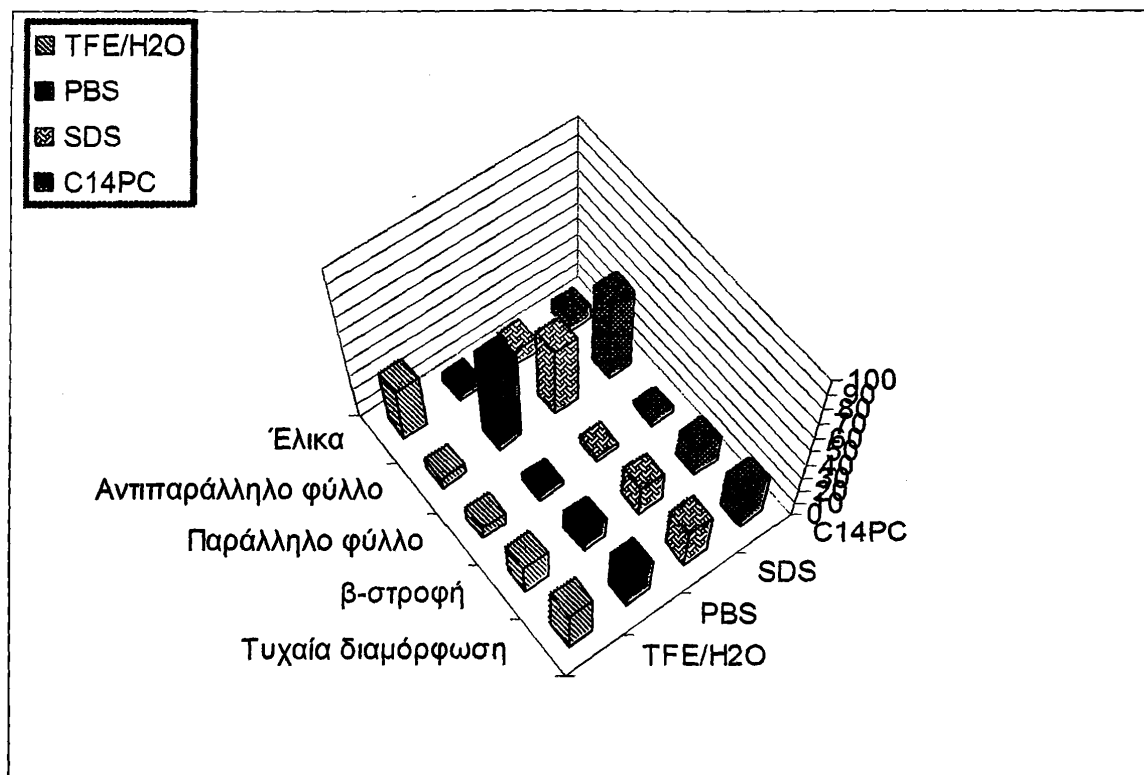
Σχήμα 12: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου *MAGE 3 CD8 (212-220)* ( $10^{-4}$  M σε TFE:H<sub>2</sub>O 50:50 v/v PBS, SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM



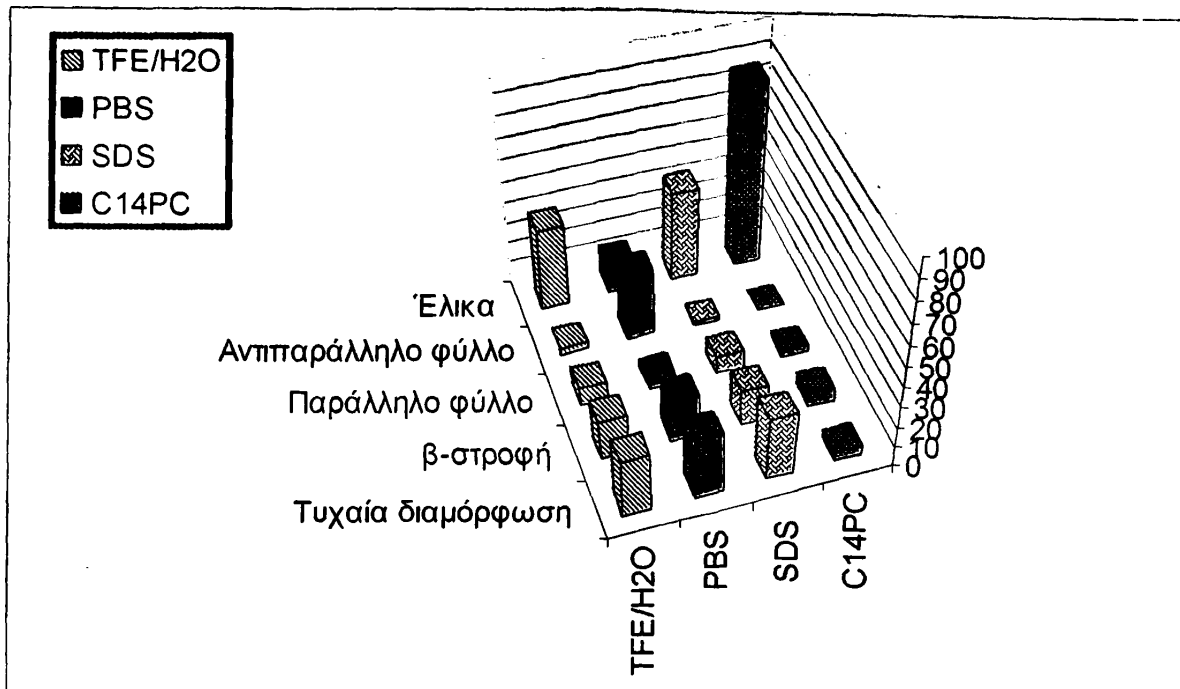
Σχήμα 13: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου *MAGE 3 CD8 (114-122)* ( $10^{-4}$  M σε TFE:H<sub>2</sub>O 50:50 v/v, PBS, SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM



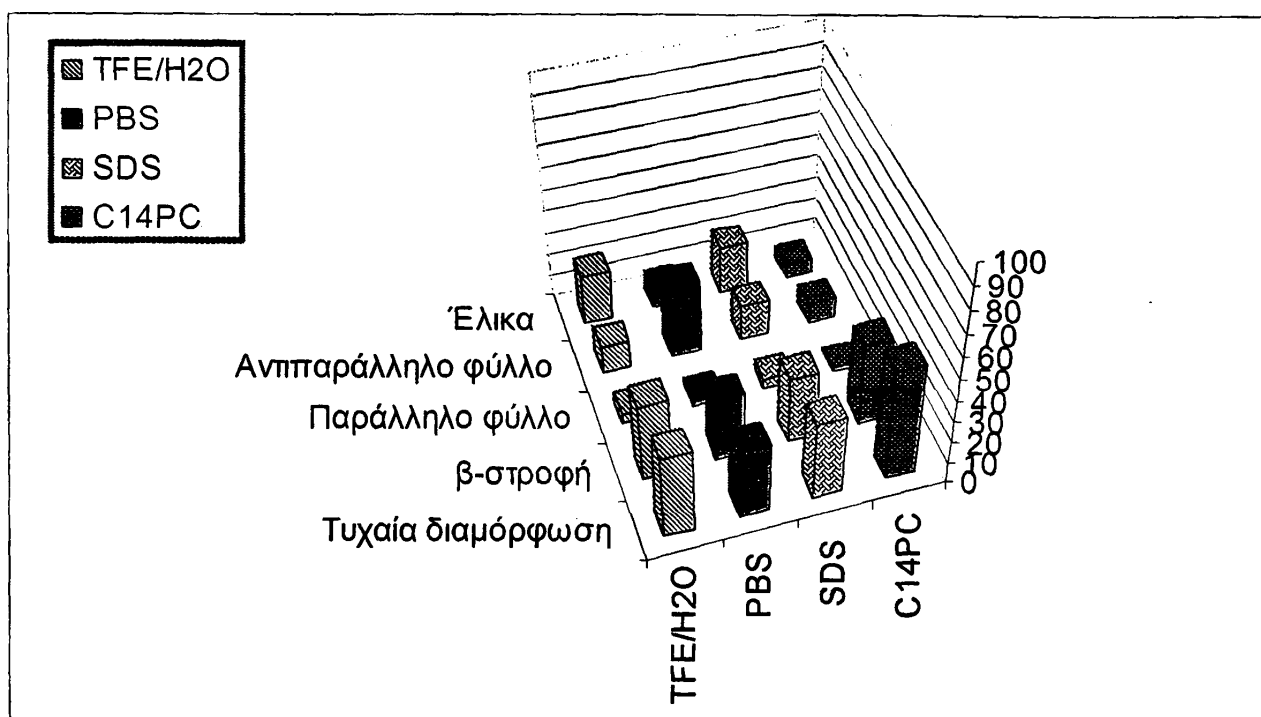
Σχήμα 14: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου MAGE 3 CD4 (243-258) ( $3 \cdot 10^{-4}$  M σε TFE:H<sub>2</sub>O 50:50 v/v, PBS, SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM



Σχήμα 15: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II ( $4 \cdot 10^{-4}$  M σε TFE:H<sub>2</sub>O 50:50 v/v, PBS, SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM

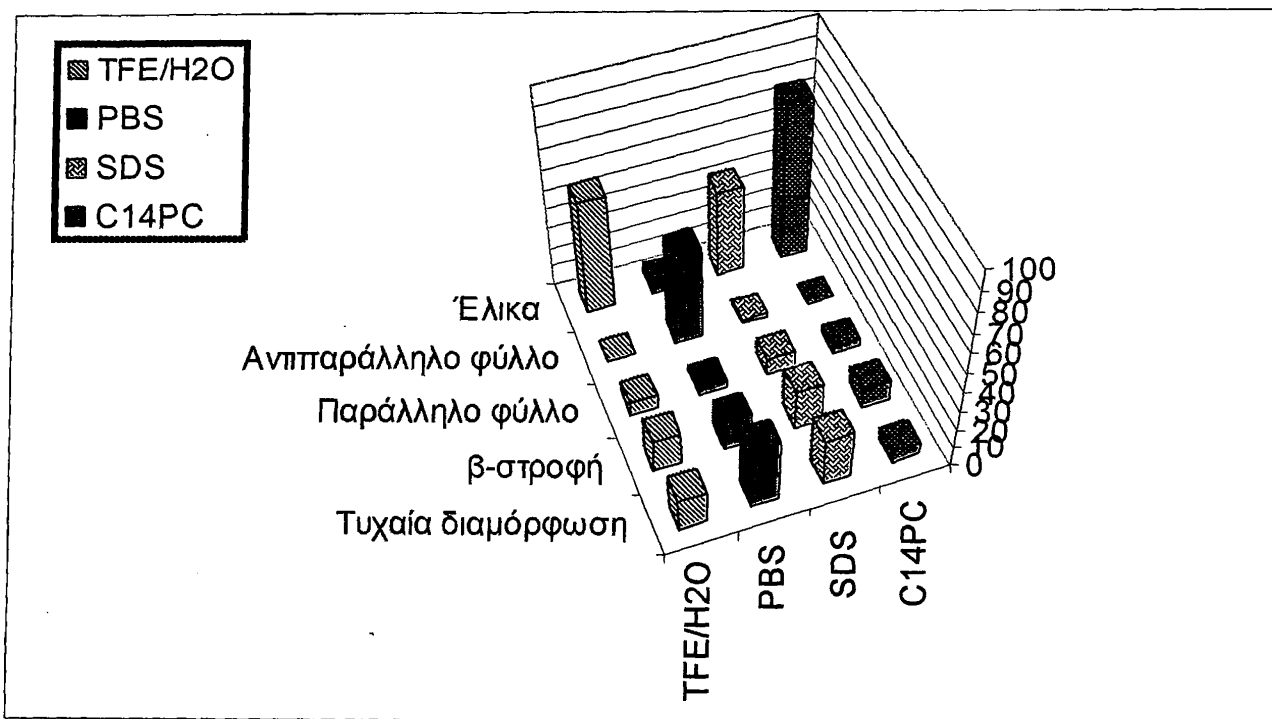


Σχήμα 16: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Pal-SOC<sub>3</sub>-II ( $5 \cdot 10^{-4}$  M σε TFE:H<sub>2</sub>O 50:50 v/v, PBS, SDS 8mM, και C<sub>14</sub>PC 5mM

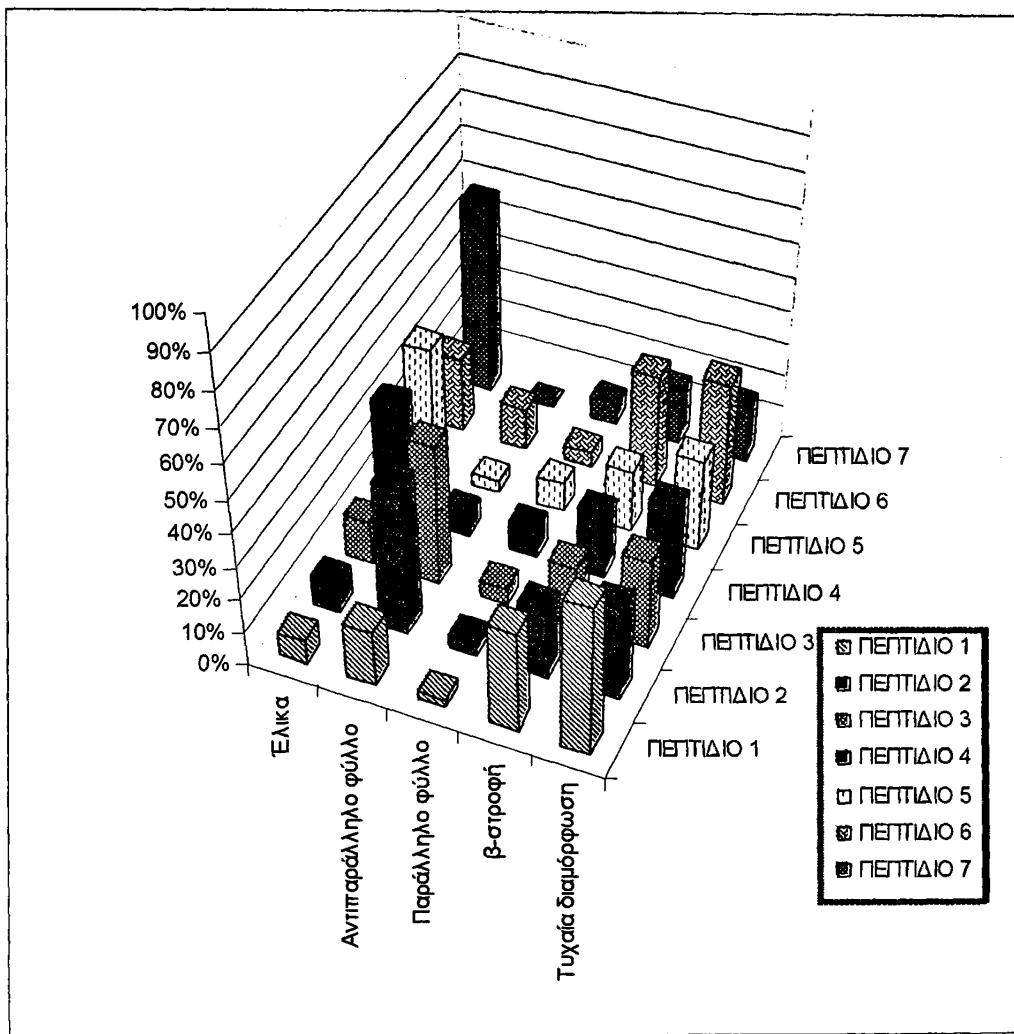


Σχήμα 17: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE-3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> ( $6 \cdot 10^{-4}$  M σε TFE:H<sub>2</sub>O 50:50 v/v, PBS, SDS 8mM, και C<sub>14</sub>PC 5mM

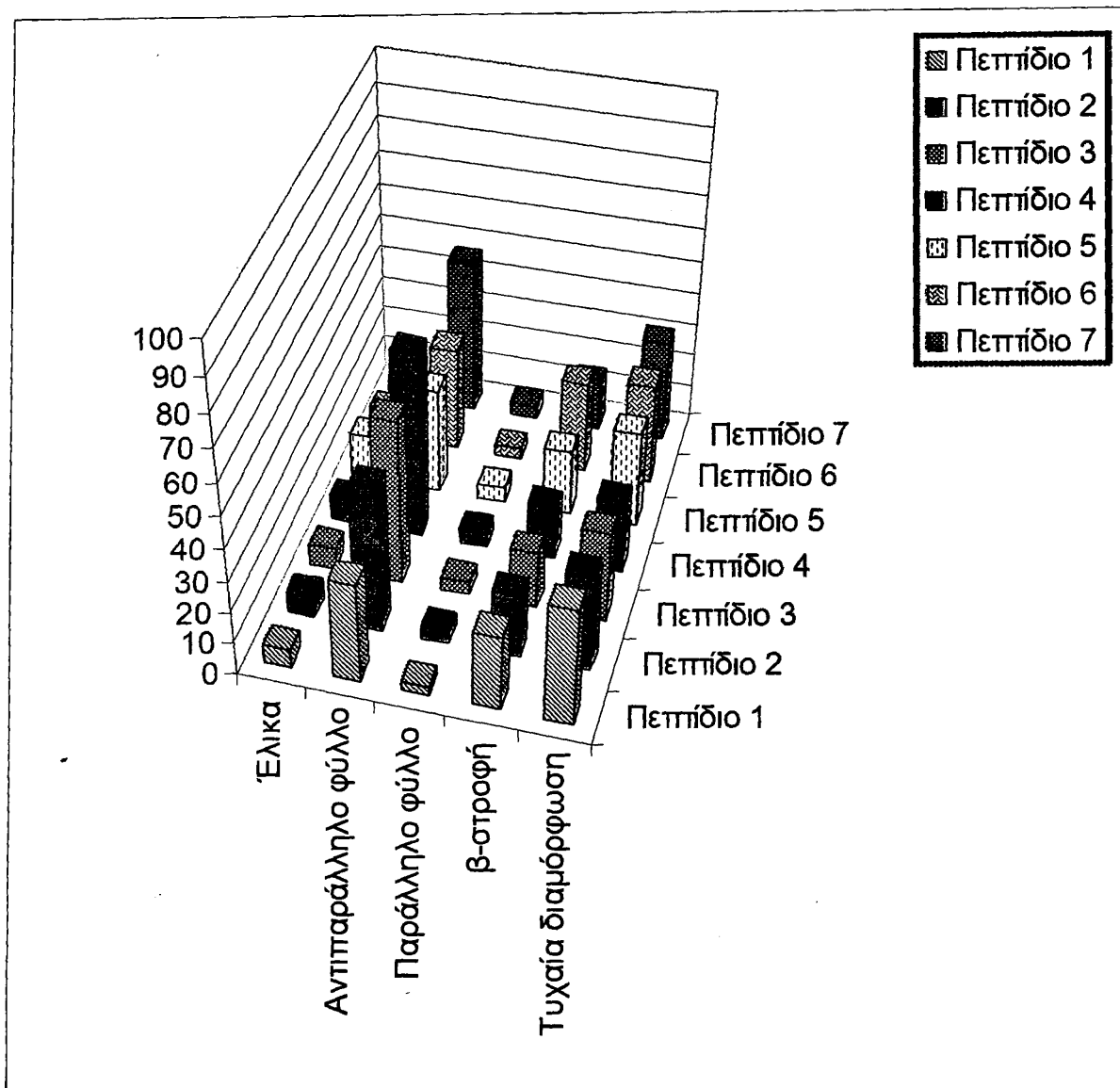




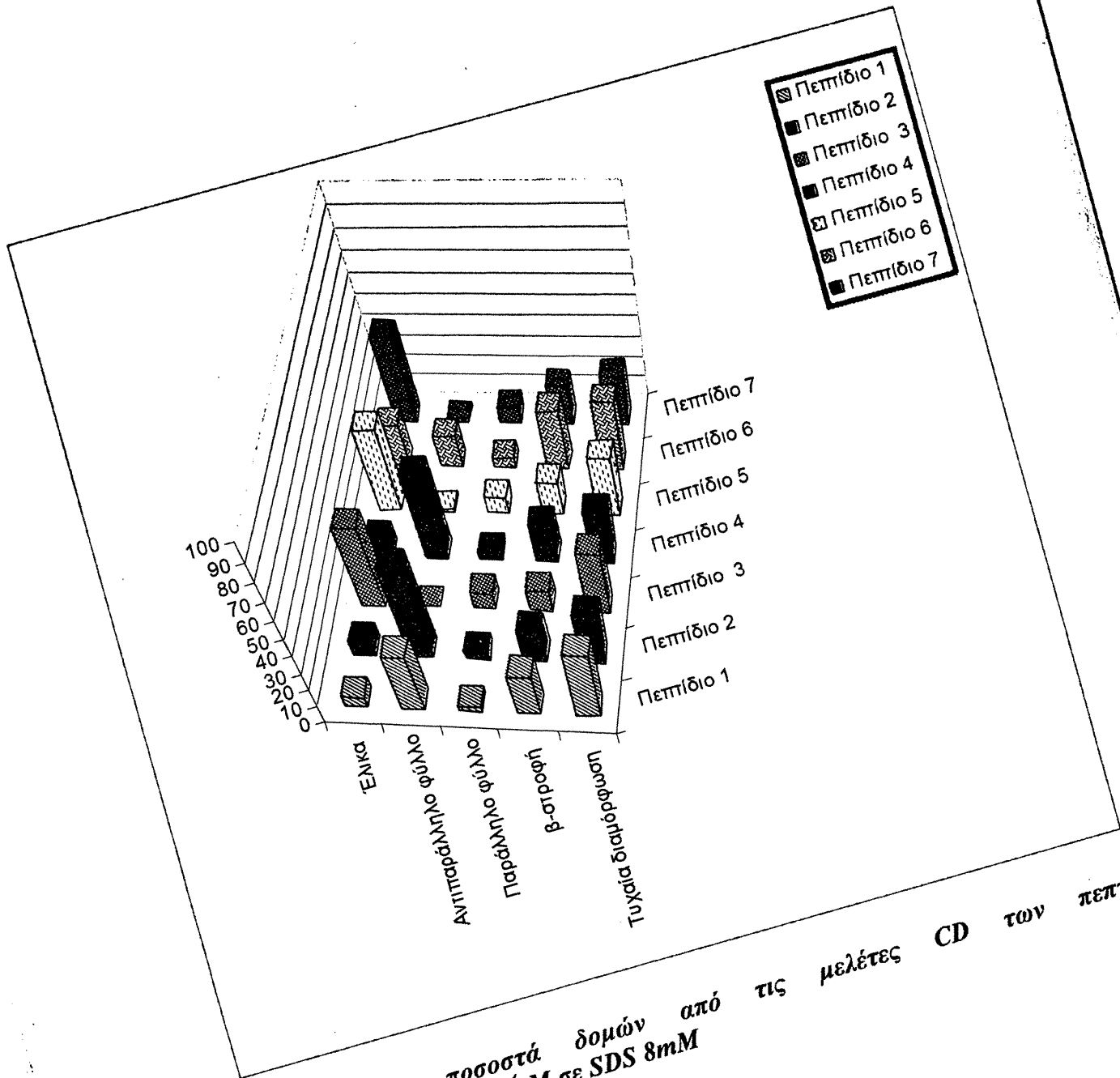
Σχήμα 18: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου *Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE-3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub>* ( $7 \cdot 10^{-4}$  M σε TFE:H<sub>2</sub>O 50:50 v/v, PBS, SDS 8mM, και C<sub>14</sub>PC 5mM



Σχήμα 19: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD των πεπτιδίων (1)-(7) σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M σε TFE:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v)

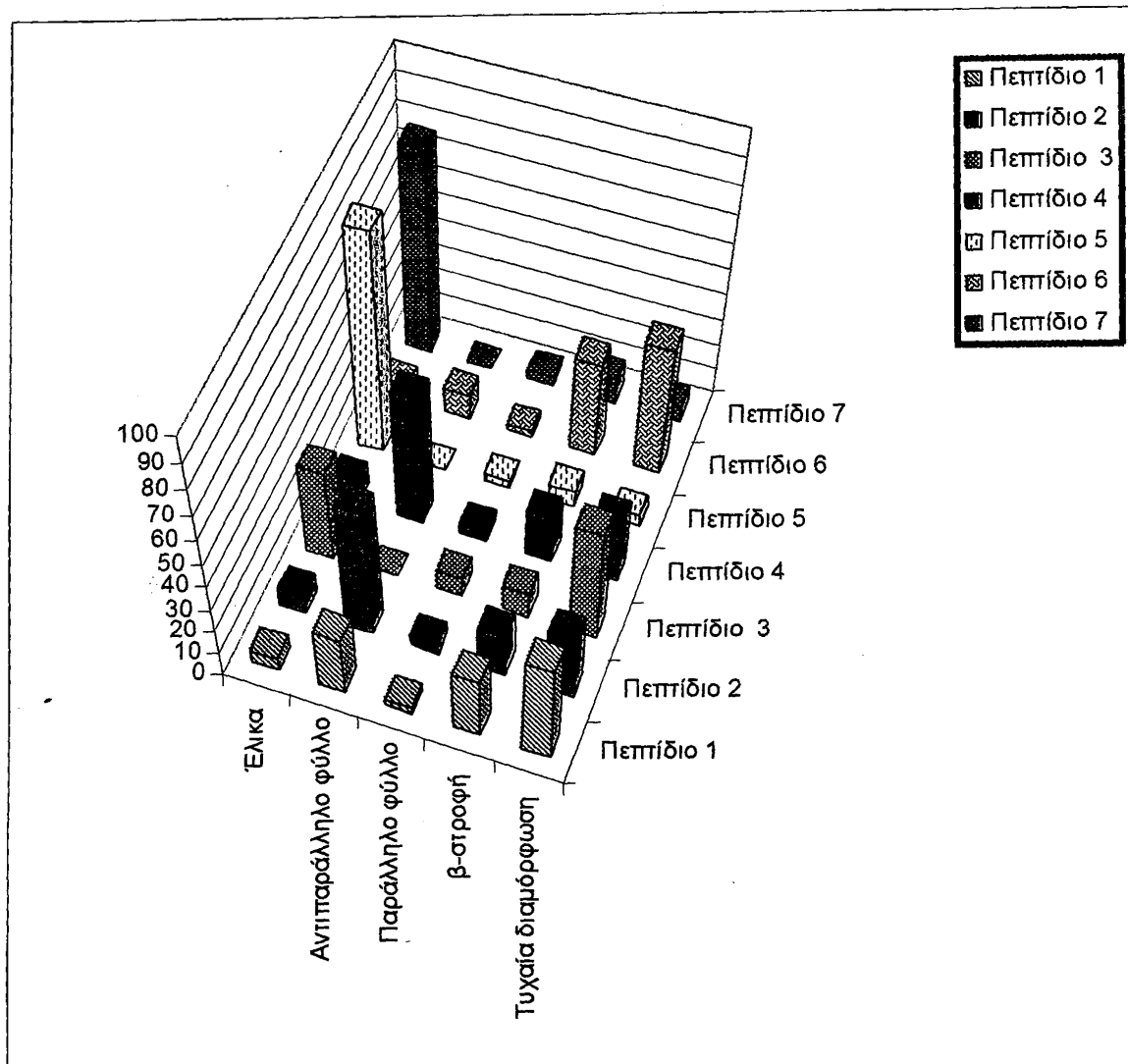


Σχήμα 20: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD των πεπτιδίων (1)-(7) σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M σε PBS pH 7.4



Σχήμα 21: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD των πεπτιδίων (1)-(7) σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M σε SDS 8mM





Σχήμα 22: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD των πεπτιδίων (1)-(7) σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M σε  $C_{14}PC$  5mM

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 29 τα πεπτίδια-επίτοποι **MAGE 3 CD8 (1-2)** χαρακτηρίζονται κυρίως από διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου και β-στροφής σε διαλύτη TFE/H<sub>2</sub>O (50/50), PBS pH 7.4, SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM, το δε υπόλοιπο είναι κυρίως τυχαία διάταξη. Το πεπτίδιο-επίτοπος **MAGE 3 CD4 (3)** χαρακτηρίζεται κυρίως από διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου και β-στροφής σε διαλύτη TFE/H<sub>2</sub>O (50/50), PBS pH 7.4, ενώ σε SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM χαρακτηρίζεται κυρίως από διαμόρφωση α-έλικας, το δε υπόλοιπο σε όλους τους διαλύτες είναι κυρίως τυχαία διαμόρφωση.

Στον ακέτυλο και παλμιτόυλο **SOC<sub>3</sub>-II** φορέα **(4,5)** κυριαρχεί η δομή της α-έλικας σε TFE/H<sub>2</sub>O (50/50). Πρόσδεση του επιτόπου **MAGE 3 CD8 (212-220)** στον **Ac-SOC<sub>3</sub>-II (6)** μειώνει την έλικα του φορέα προς όφελος του αντιπαράλληλου φύλλου και της β-στροφής. Ο επίτοπος **MAGE 3 CD8 (114-122)** συνδεδεμένος στον **Ac-SOC<sub>3</sub>-II (7)** αυξάνει τα ποσοστά έλικας του φορέα.

Σε PBS pH 7.4 τα δομικά χαρακτηριστικά του ακέτυλο και παλμιτόυλο **SOC<sub>3</sub>-II** φορέα **(4,5)** και των **Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6)**, **Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7)** είναι κυρίως αντιπαράλληλο φύλλο και β-στροφή.

Στην κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικυλίων 8mM του SDS ο **Ac-SOC<sub>3</sub>-II** φορέας **(4)** κυριαρχείται από τη δομή του αντιπαράλληλου φύλλου και της β-στροφής, ενώ ο **Pal-SOC<sub>3</sub>-II** φορέας **(5)** από την δομή της α-έλικας. Πρόσδεση του επιτόπου **MAGE 3 CD8 (212-220) (1)** και του επιτόπου **MAGE 3 CD8 (114-122) (2)** μειώνει σημαντικά το ποσοστό αντιπαράλληλου φύλλου προς όφελος της α-έλικας και της β-στροφής **(6,7)**.

Ο παλμιτόυλο φορέας **(5)** και το **Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub>** πεπτίδιο **(7)** προσλαμβάνουν τα μεγαλύτερα ποσοστά α-έλικας σε λιπιδικό περιβάλλον (C<sub>14</sub>PC) της τάξεως ~87% και ~79% αντίστοιχα. Αντίθετα, ο ακέτυλο φορέας **(4)** χαρακτηρίζεται κυρίως από διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου και β-στροφής, ενώ το πεπτίδιο **Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6)** χαρακτηρίζεται κυρίως από β-στροφή και τυχαία διαμόρφωση σε διαλύτη C<sub>14</sub>PC.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ**



## 12. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

### 12.1 Εισαγωγή

Τα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) των πεπτιδίων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία έγιναν στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, στο Τμήμα Ιατρικής, στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας.

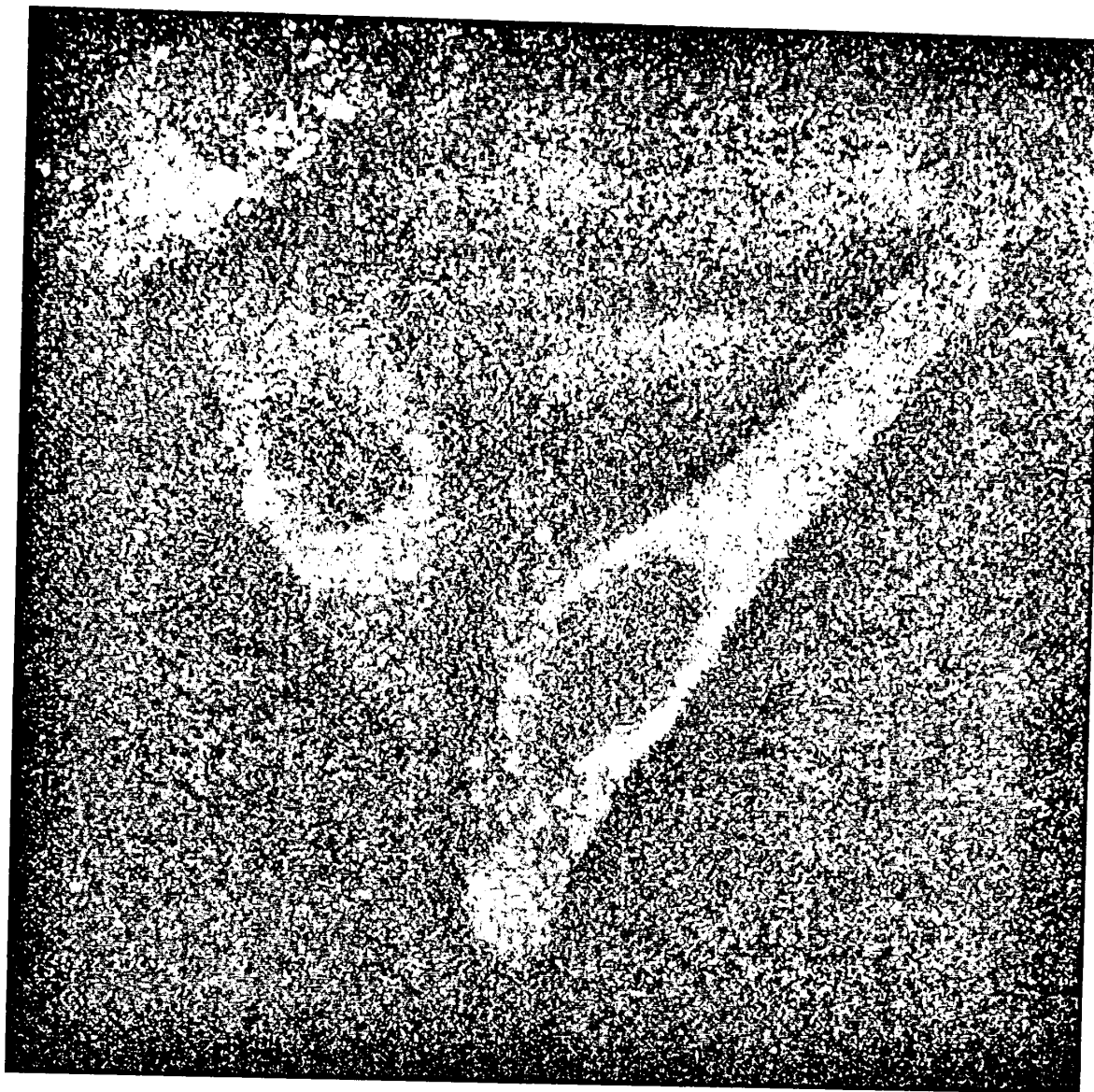
Με την τεχνική της συνεστιακής μικροσκοπίας μελετάται η υποκυτταρική κατανομή των επισημασμένων με φλουορεσκεΐνη πεπτιδίων που συντέθηκαν στην παρούσα έρευνα (πεπτίδια 8-12).

- *Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του Ac-SOC<sub>3</sub> -II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub>*
- *Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του Ac-SOC<sub>3</sub>- II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub>*
- *Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του Ac-SOC<sub>r</sub> I [MAGE 3 CD8 (168-176)CD4 (281-295)]<sub>2</sub>*
- *Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του Ac-SOC<sub>r</sub> I [MAGE 3 CD8 (168-176)CD4 (281-295)]*
- *Παράγωγο με Φλουορεσκεΐνη του Pal-SOC<sub>r</sub> I [MAGE 3 CD8 (168-176)CD4 (281-295)]*

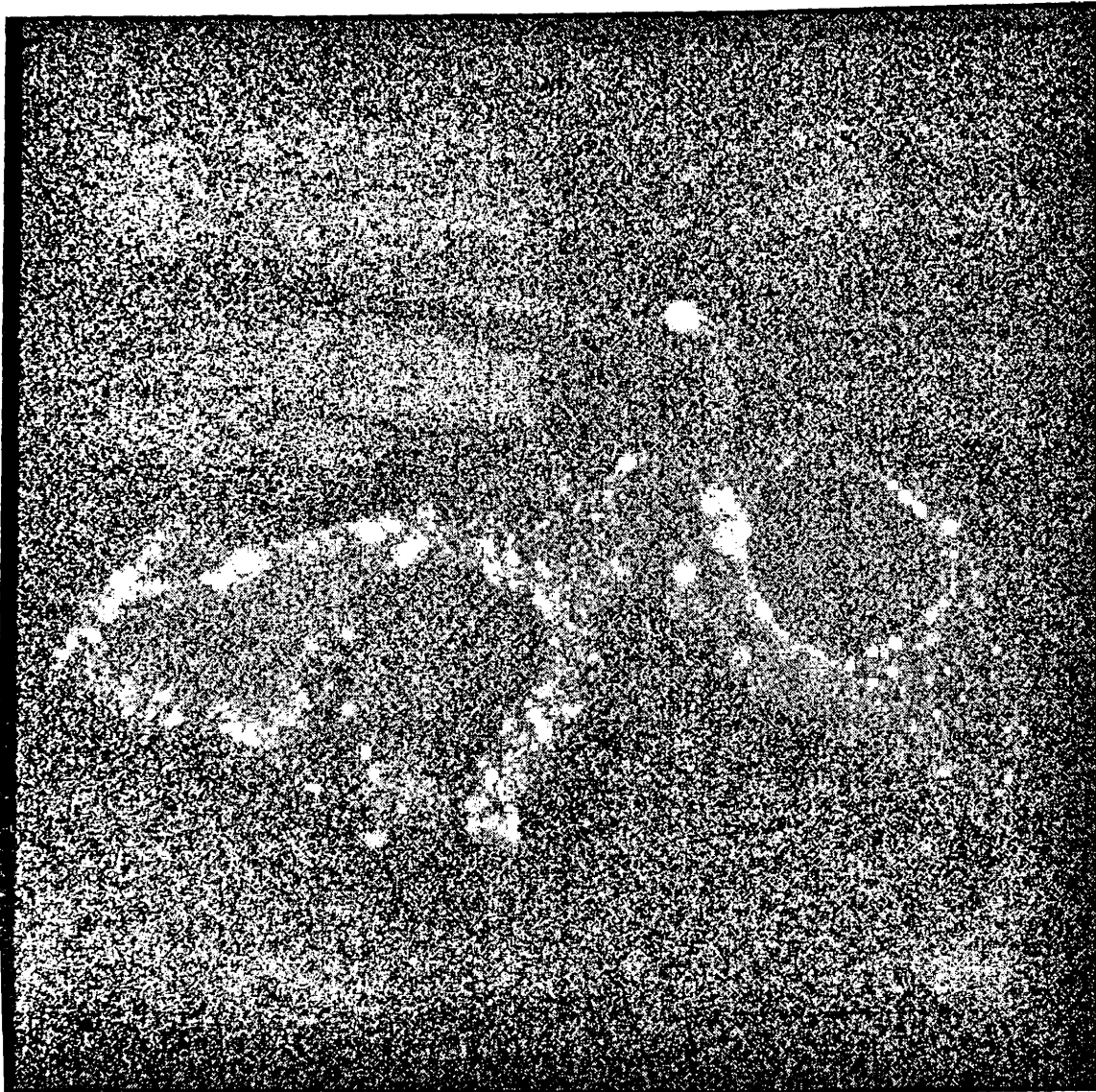
Η καλλιέργεια των HeLa κυττάρων<sup>1</sup> αναπτύχθηκε σε τριβλία 100/20 mm στα οποία είχαν τοποθετηθεί τετράγωνες αποστειρωμένες καλυπτρίδες 22x22 mm. Πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων για 45 min στους 37°C με διάλυμα δείγματος πεπτιδίου (5μM και 20μM/DMEM). Μετά από τέσσερις εκπλύσεις με παγωμένο διάλυμα PBS, το σήμα ενδοκυτταρικού φθορισμού μετρήθηκε άμεσα με την τεχνική της συνεστιακής μικροσκοπίας (CLSM) στα 515 nm (διεγείρουσα ακτινοβολία 488 nm). Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι όλα τα πεπτίδια διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα χωρίς όμως να εισέρχονται στον πυρήνα.



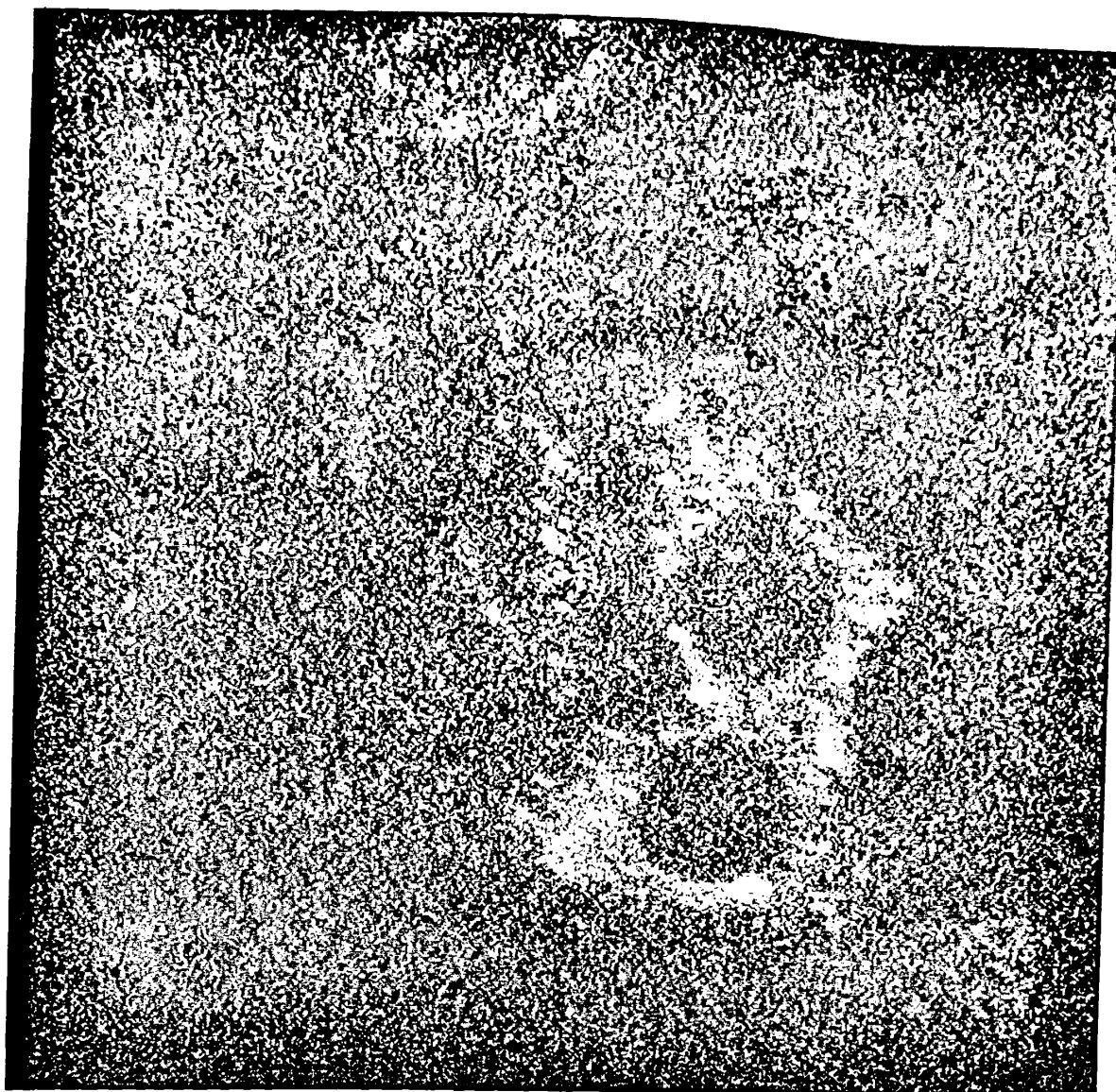
## 12.2 Αποτελέσματα



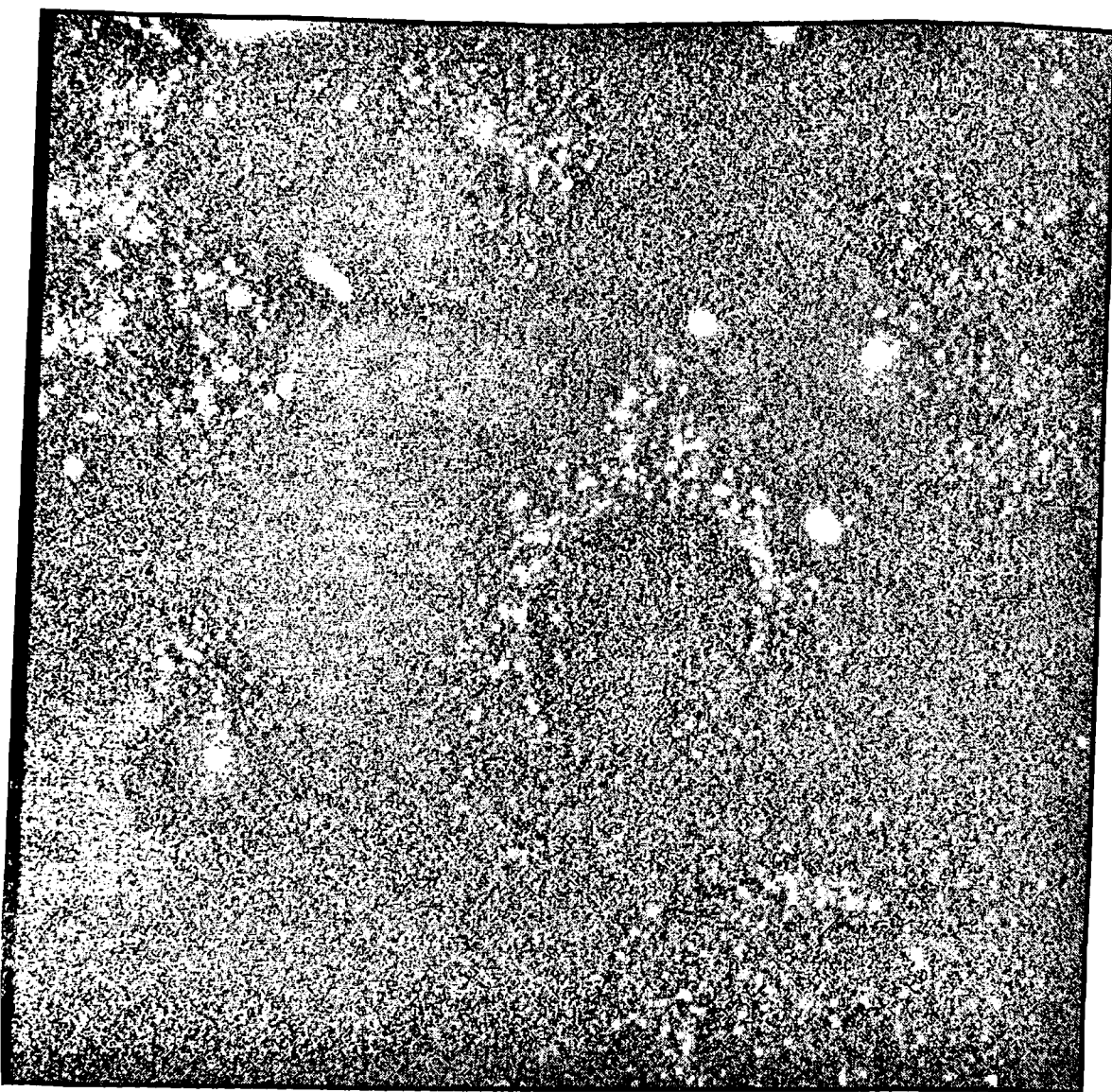
Σχήμα 1: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί το πεπτίδιο Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 5 μΜ



ει 2: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί με πείδιο Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 20 μΜ

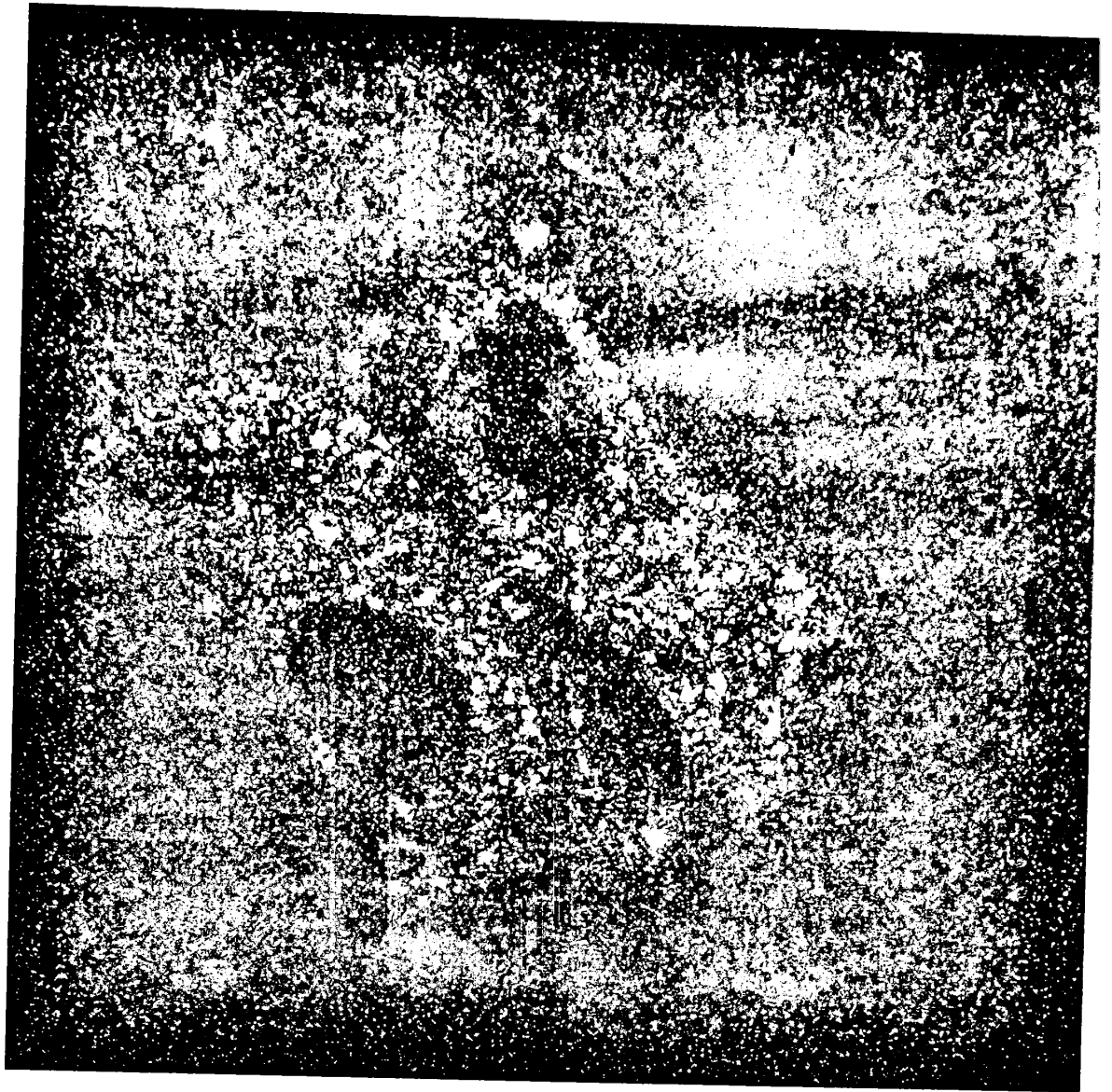


**Σχήμα 3:** Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί το πεπτίδιο Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 5 μΜ

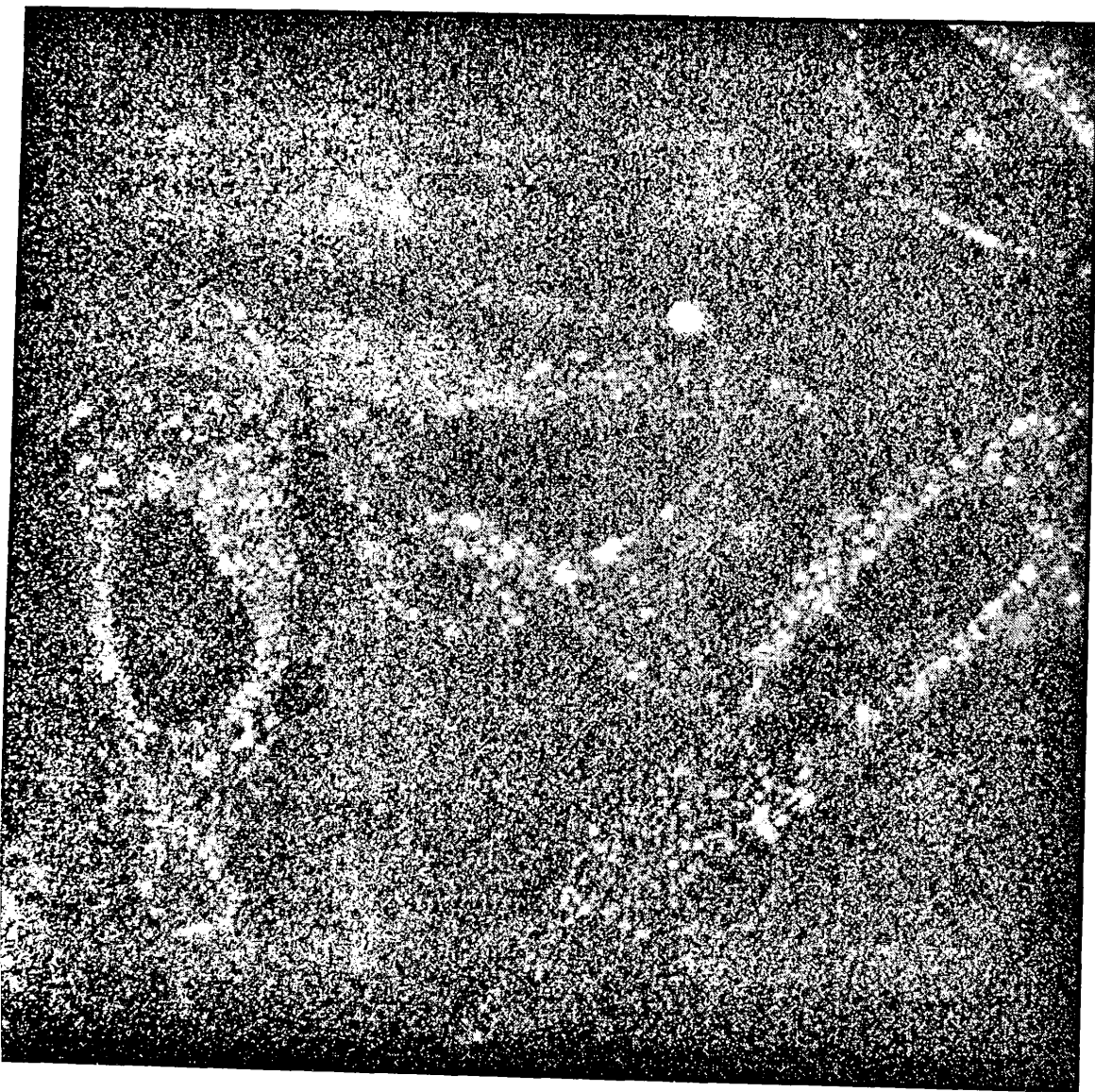


εικ. 4: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί με αντιγόνο Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 20 μΜ





Σχήμα 5: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστε το πεπτίδιο Ac-SOC<sub>4</sub>-I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)]<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 5μ



6: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί με αντιδίο  $\text{Ac-SOC}_4\text{-I}$  [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)]<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{M}$



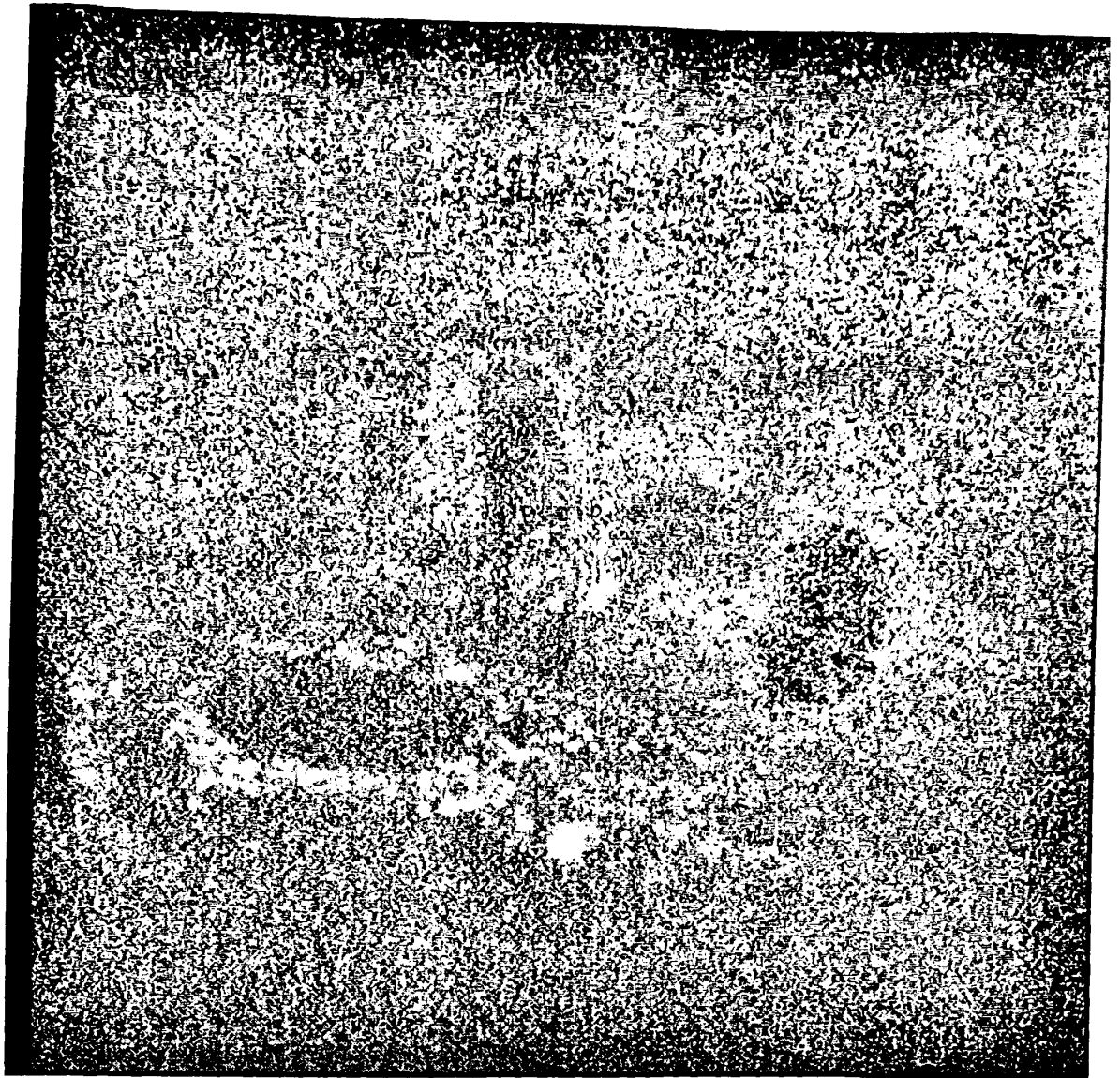


**Σχήμα 7:** Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστε το πεπτίδιο Ac-SOC<sub>4</sub>-I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] σε συγκέντρωση 5μM

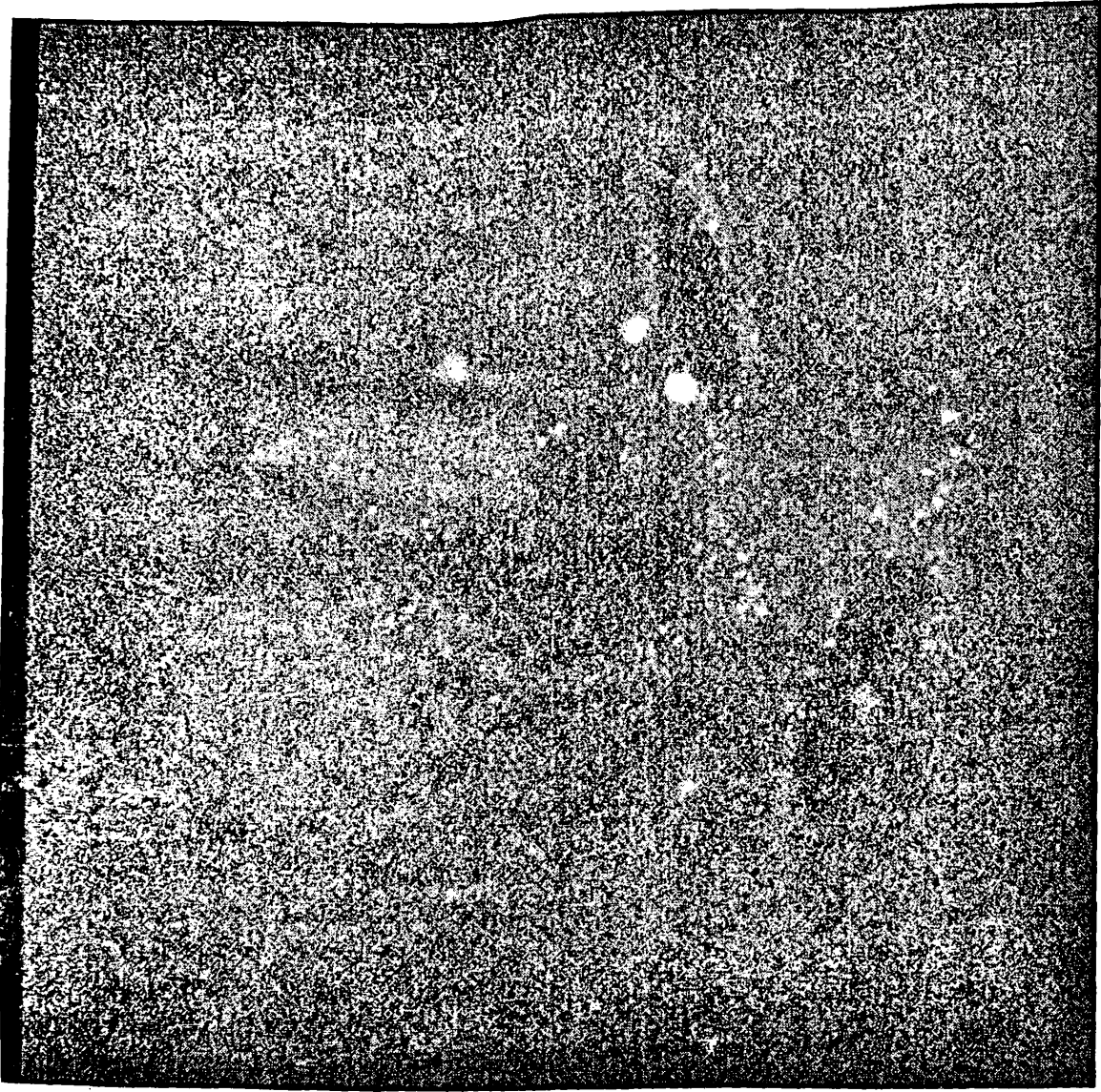


εικ 8: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί με αντιγόνο Ac-SOC<sub>4</sub>-I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] σε συγκέντρωση 20μM

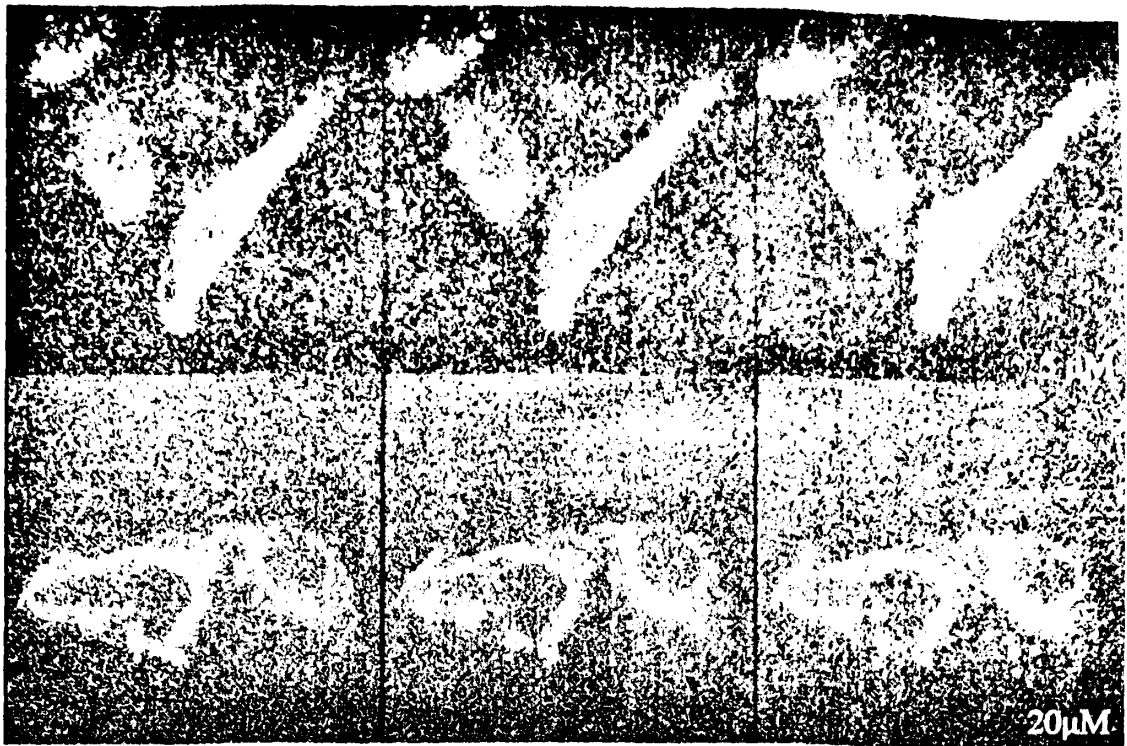




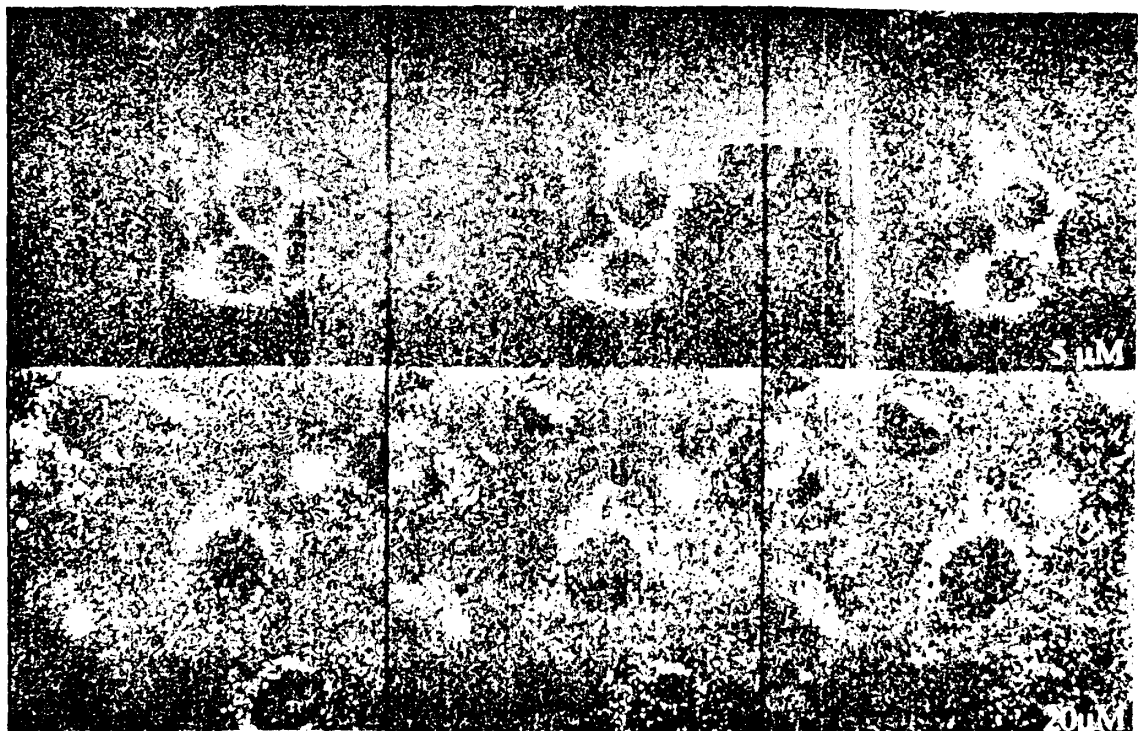
**Σχήμα 9:** Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί το πεπτίδιο Pal-SOC<sub>4</sub>-I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] σε συγκέντρωση 5 μ



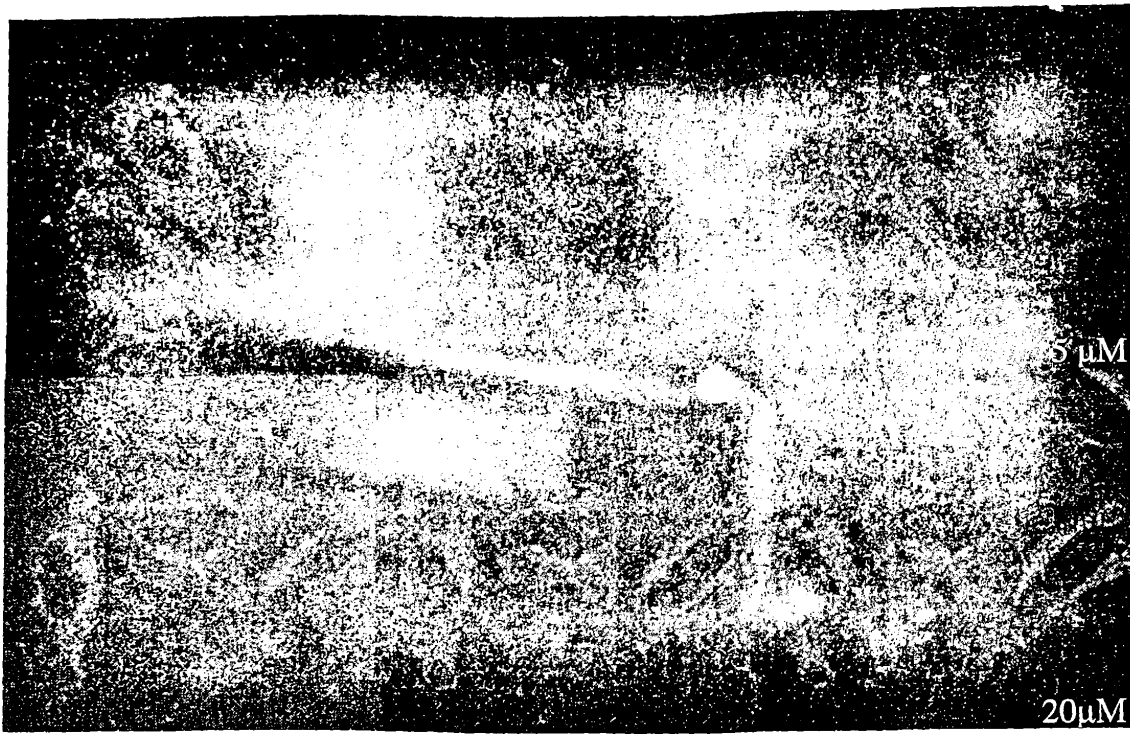
εικ 10: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί με αντιβιοτικό Pal-SOC<sub>4</sub>-I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] σε συγκέντρωση



Σχήμα 11: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωασ-  
 το πεπτιδίο Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> σε διαδοχικές τομές κυ-  
 (συγκεντρώσεις πεπτιδίου 5 μM, 20 μM)



Σχήμα 12: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωασ-  
 το πεπτιδίο Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> σε διαδοχικές τομές κυττ-  
 (συγκεντρώσεις πεπτιδίου 5 μM, 20 μM)

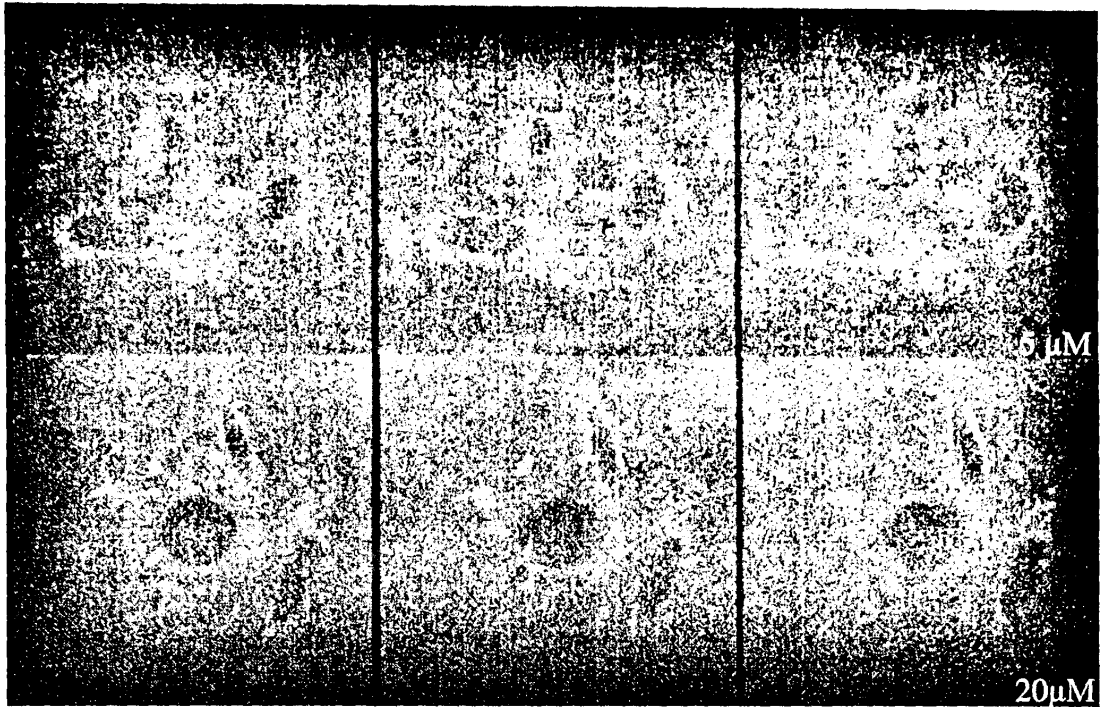


μα 13: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί με πεπτίδιο Ac-SOC<sub>4</sub>-I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)]<sub>2</sub> σε διαδοχικές τομές πάχους (συγκεντρώσεις πεπτιδίου 5 μM, 20 μM)



14: Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί με το Ac-SOC<sub>4</sub>-I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] σε διαδοχικές τομές πάχους (συγκεντρώσεις πεπτιδίου 5 μM, 20 μM)





**Σχήμα 15:** Πείραμα συνεστιακής μικροσκοπίας HeLa κυττάρων που έχουν επωαστεί με το πεπτιδίο Pal-SOC<sub>4</sub>-I [MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] σε διαδοχικές τομές κυττάρου (συγκεντρώσεις πεπτιδίου 5 μM, 20 μM)

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13**

**ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ**



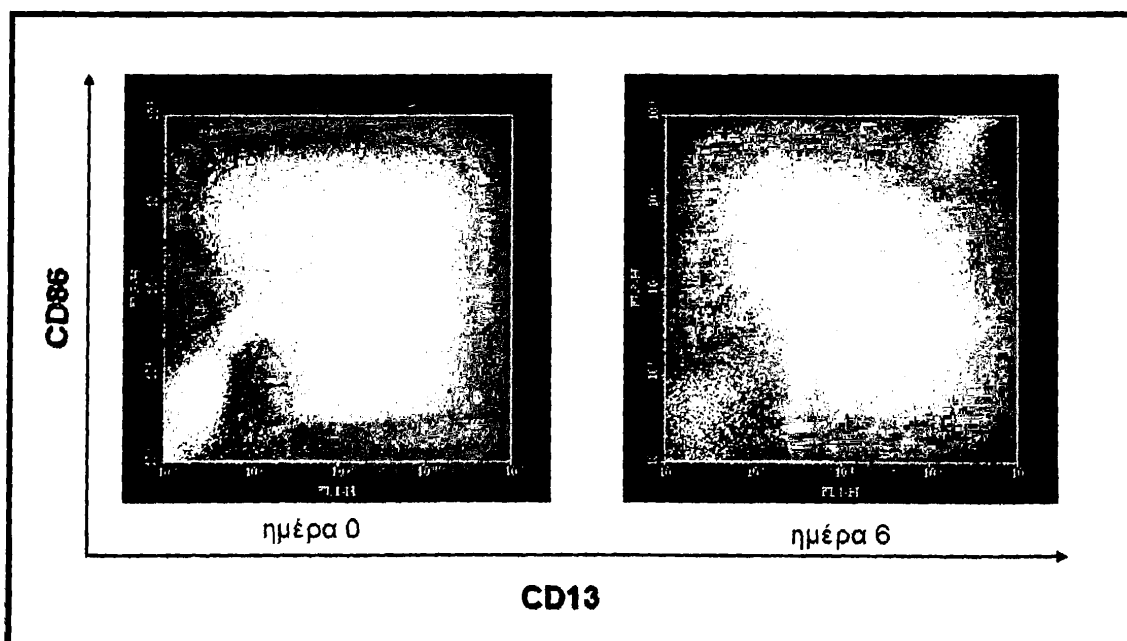
## 13. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

### 13.1 Εισαγωγή

Τα βιολογικά πειράματα της παρούσας εργασίας έγιναν στο Πανεπιστήμιο Πατρών, στην Ιατρική Σχολή, στο τμήμα Παθολογίας, στο εργαστήριο Αιματολογίας υπό την επίβλεψη της κ. Αθανασίας Μουζάκη, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας.

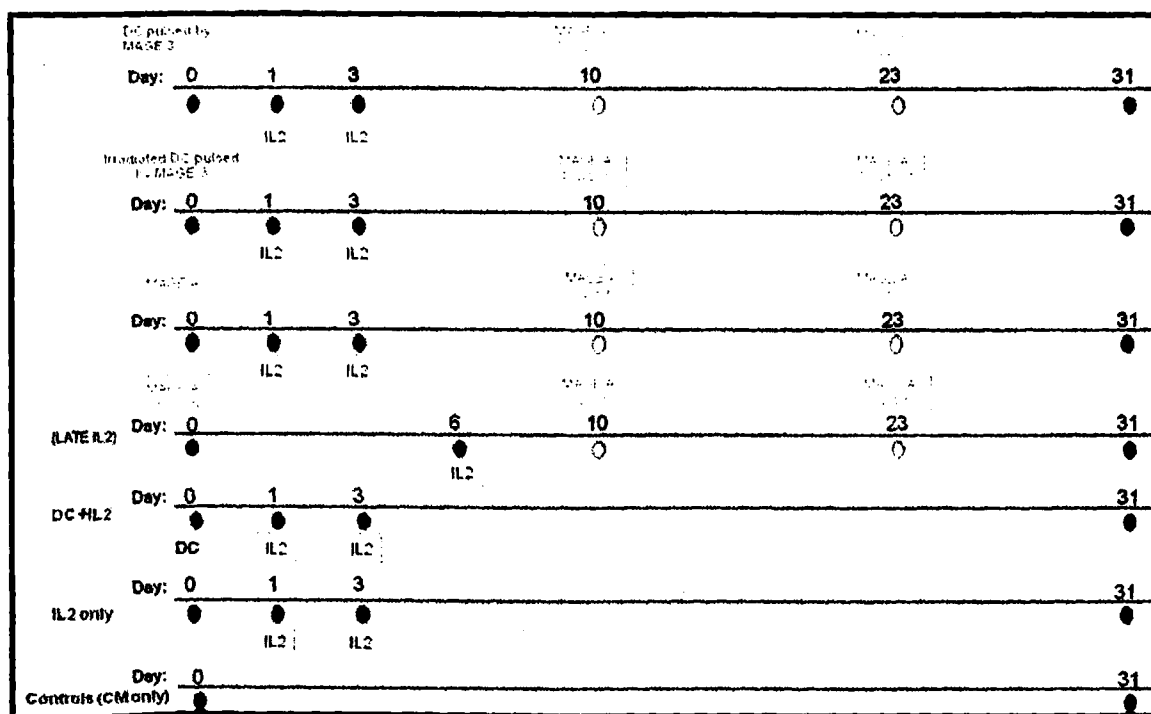
Στην παρούσα διατριβή έγιναν καλλιέργειες δενδριτικών κυττάρων<sup>1,2</sup> με το πεπτίδιο Pal-SOC<sub>4</sub>-I[MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] (γ) και ακολούθησε έλεγχος παρουσίας δεικτών ενεργοποίησης (CD69) με FACS ανάλυση και έλεγχος παραγωγής κυτταροκινών (IFN-γ, IL-4) με μη ανταγωνιστική ELISA τύπου sandwich.

Στην αρχική φάση της διαδικασίας έγινε λήψη περιφερικού αίματος από υγιείς εθελοντές και στη συνέχεια απομονώθηκαν μονοπύρηννα κύτταρα (Peripheral Blood Mononuclear Cells, **PBMS**). Τα μονοπύρηννα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία αυξητικών παραγόντων (IL-4, GM-CSF) για 8 ημέρες. Κατόπιν προσδιορίστηκε στις καλλιέργειες των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (FACS) η παρουσία των CD13, CD86 (Σχήμα 1). Το CD13 εκφράζεται σε όλα τα στάδια ωρίμανσης και διαφοροποίησης των δενδριτικών κυττάρων και το CD86 (B7.2) βρίσκεται αποκλειστικά στην επιφάνεια κυττάρων ικανών να διεγείρουν την ωρίμανση των T κυττάρων, όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα.



*Σχήμα 1: Συνέκφραση του CD13 και του CD86 σε καλλιέργειες μονοκυττάρων περιφερικού αίματος παρουσία IL-4 και GM-CSF*

Στη συνέχεια τα δενδριτικά κύτταρα συνεπωάστηκαν με το πεπτίδιο (25μg/ml) για 2 ώρες στους 37°C. Κατόπιν μέρος των δενδριτικών κυττάρων ακτινοβολήθηκε στα 20Gy. Τα δενδριτικά στη συνέχεια μπήκαν σε συνκαλλιέργεια με φρέσκα PBMC από τον ίδιο δότη σε αναλογία 1:20 (ημέρα 0). Προστέθηκε IL-2 σε συγκέντρωση 25 U/ml τις ημέρες 1 και 3. Ταυτόχρονα το πεπτίδιο προστέθηκε σε λεμφοκύτταρα χωρίς την παρουσία δενδριτικών (25μg/ml) και έγινε και πάλι προσθήκη IL-2 είτε τις ημέρες 1 και 3, είτε την ημέρα 6. Την ημέρα 10 και την ημέρα 23 έγιναν άλλες δύο επανενεργοποιήσεις με την προσθήκη πεπτιδίου στην καλλιέργεια (Σχήμα 2).



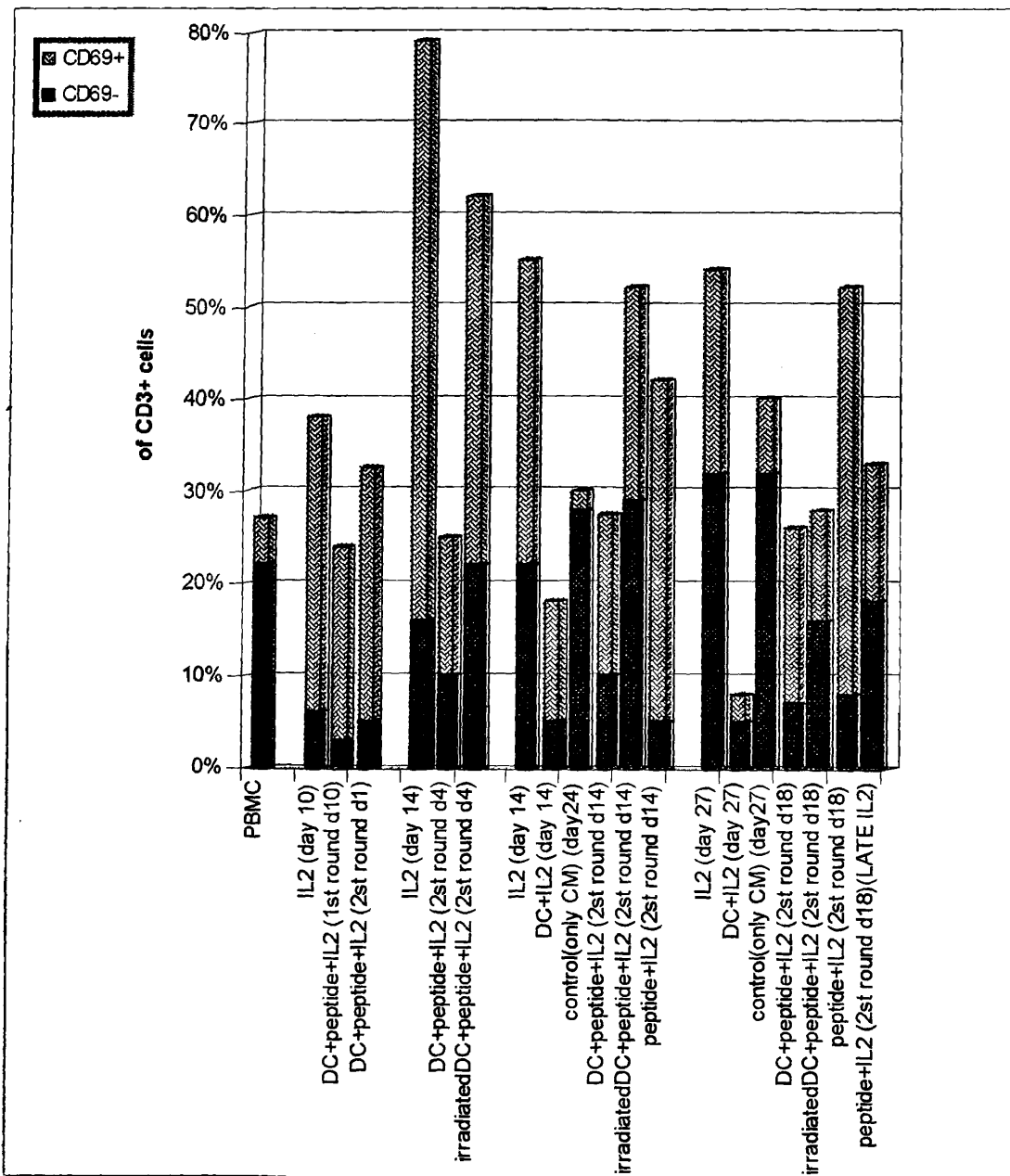
Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση της χρονικής πορείας των καλλιεργειών



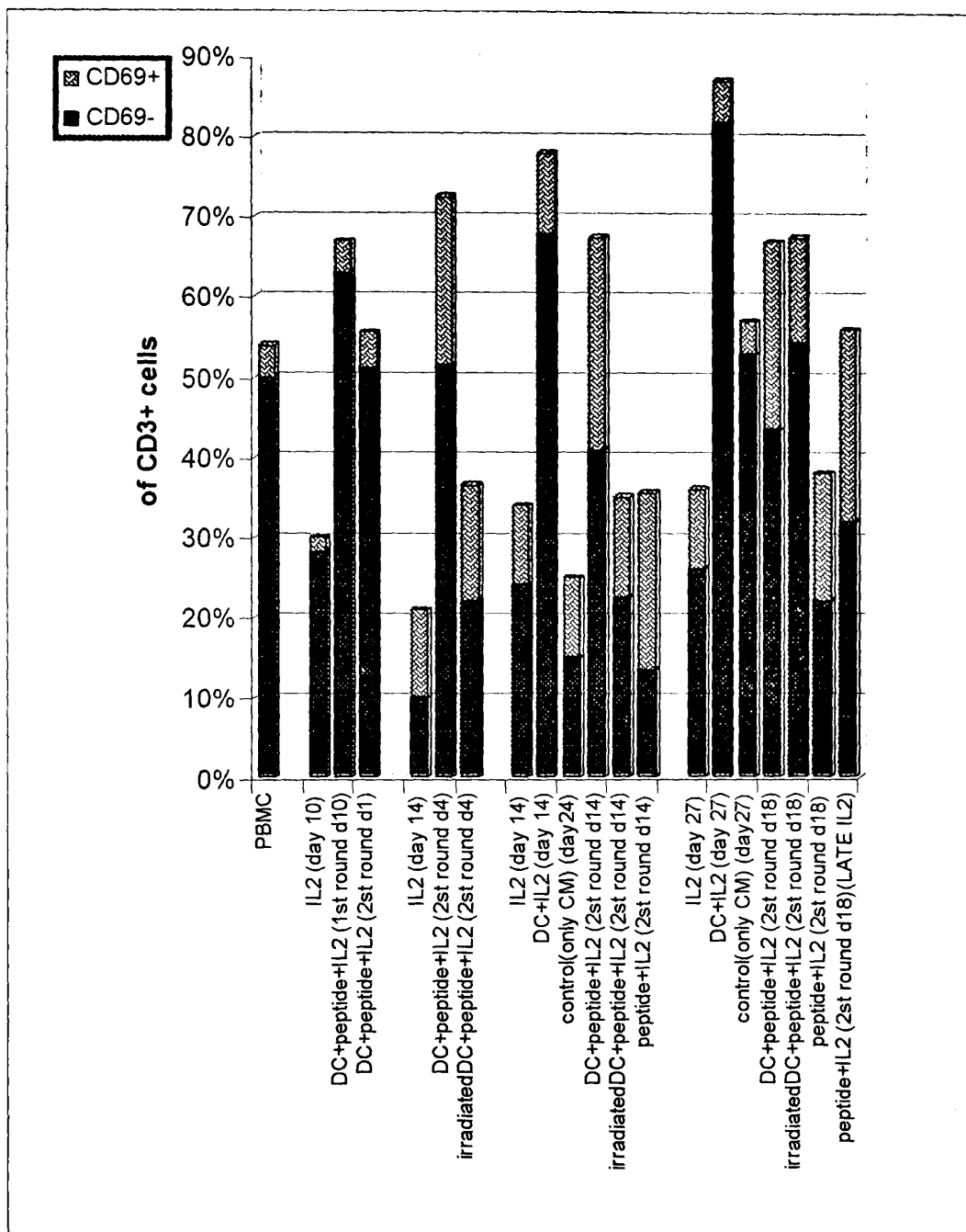


### 13.2 Πειράματα κυτταρομετρίας ροής (FACS)

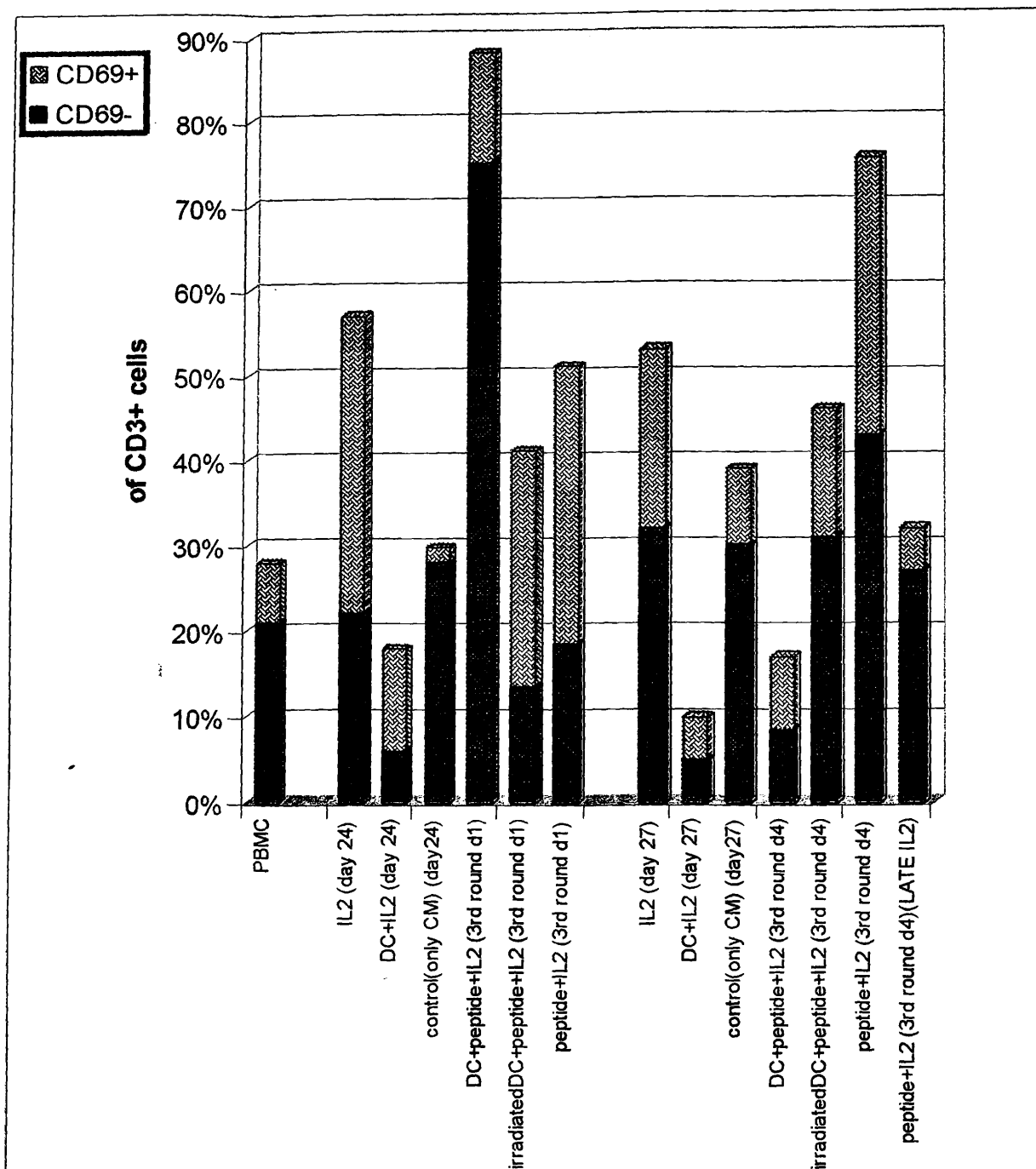
Για τον έλεγχο ύπαρξης δεικτών ενεργοποίησης με κυτταρομετρία ροής (FACS) χρησιμοποιήθηκε το CD69, το οποίο εκφράζεται σε ενεργοποιημένα T κύτταρα. Στα σχήματα 3-7 δίνονται τα αποτελέσματα της μέτρησης του CD69 ως δείκτη ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων σε πληθυσμούς CD8, CD4 και  $\gamma/\delta$  λεμφοκυττάρων μετά τον 2<sup>ο</sup> και τον 3<sup>ο</sup> γύρο ενεργοποίησης. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έχουμε παρουσία του CD69, το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων.



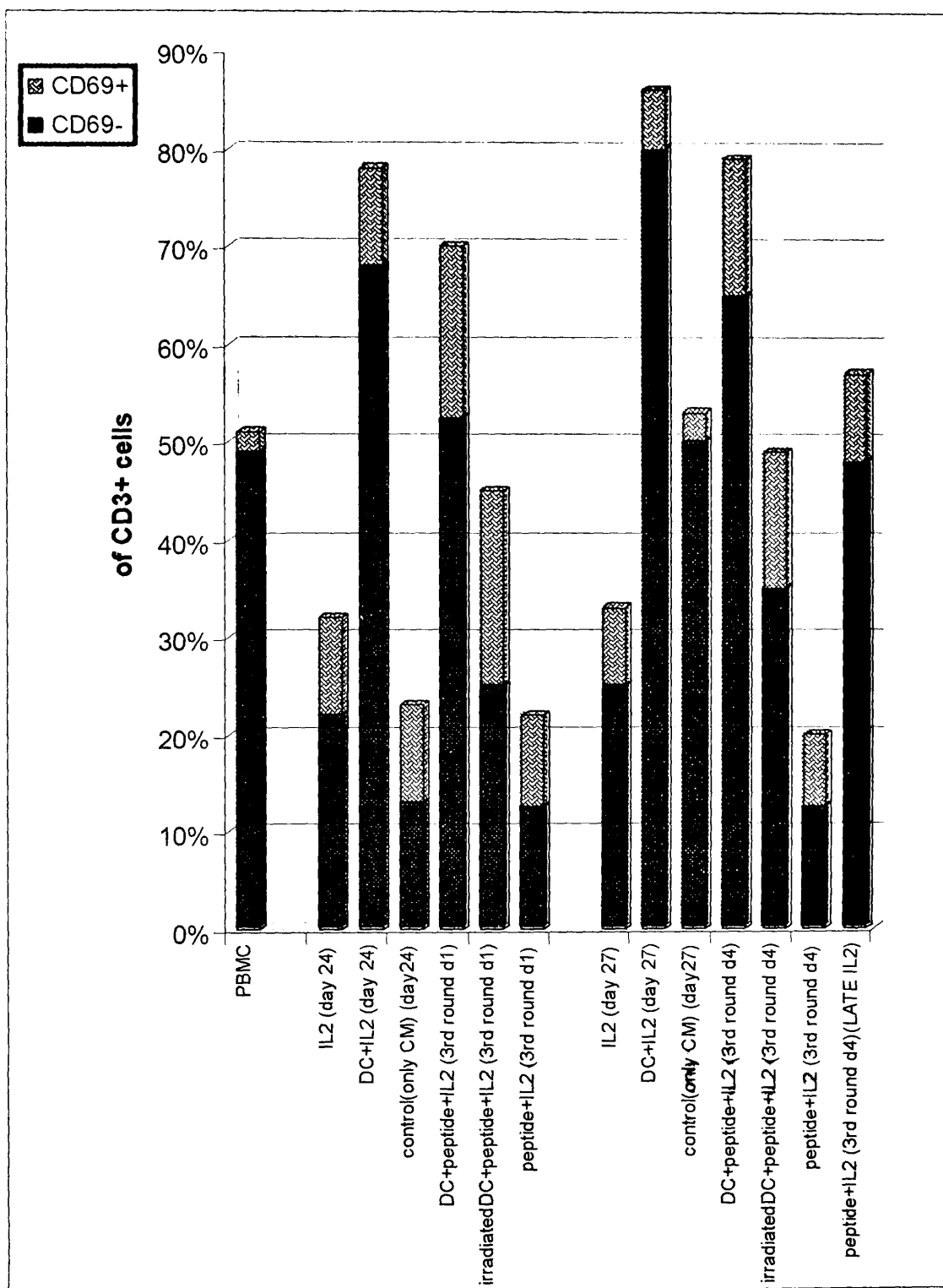
Σχήμα 3: Ποσοστά του CD69 ως δείκτη ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων σε πληθυσμό CD8 T λεμφοκυττάρων μετά το 2<sup>ο</sup> γύρο ενεργοποίησης



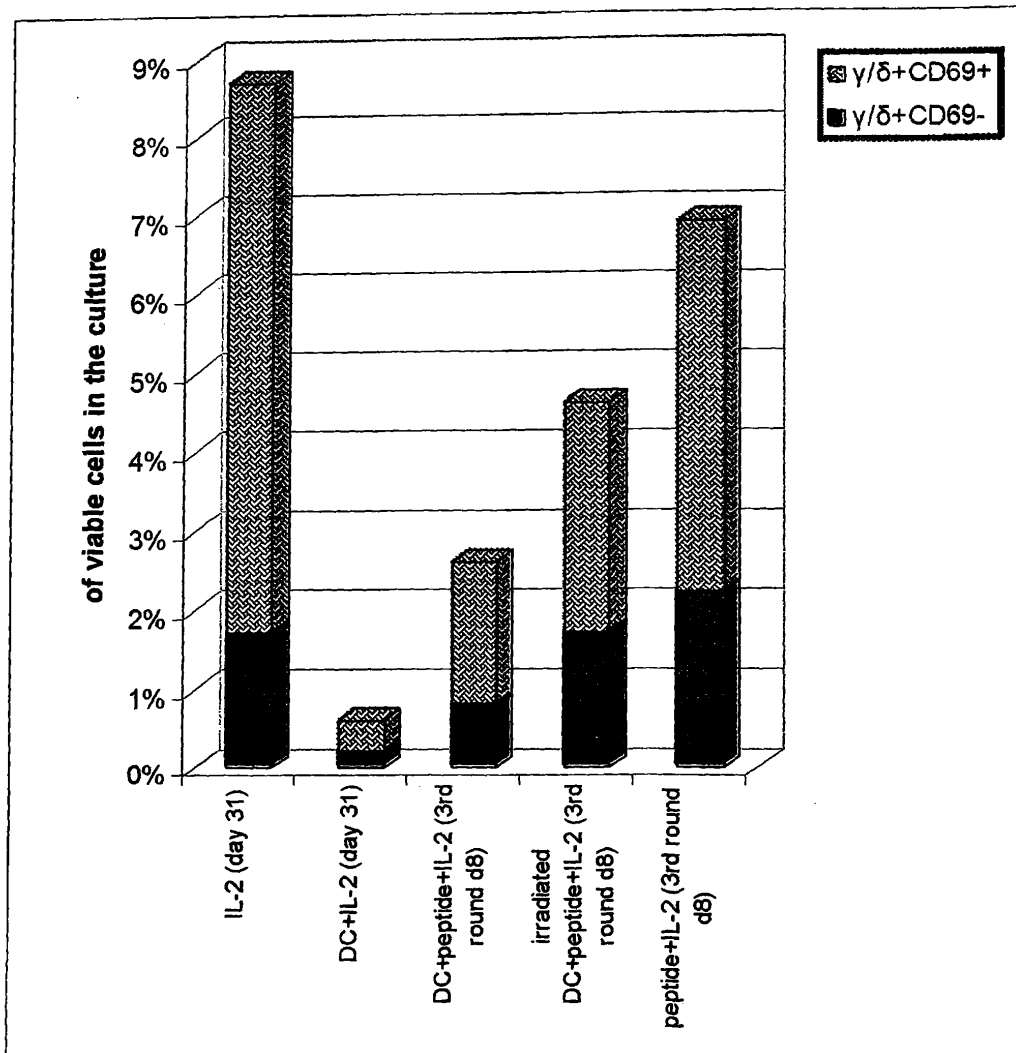
Σχήμα 4: Ποσοστά του CD69 ως δείκτη ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων σε πληθυσμό CD4 T λεμφοκυττάρων μετά το 2<sup>ο</sup> γύρο ενεργοποίησης



**Σχήμα 5: Ποσοστά του CD69 ως δείκτη ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων σε πληθυσμό CD8 T λεμφοκυττάρων μετά το 3<sup>ο</sup> γόρο ενεργοποίησης**



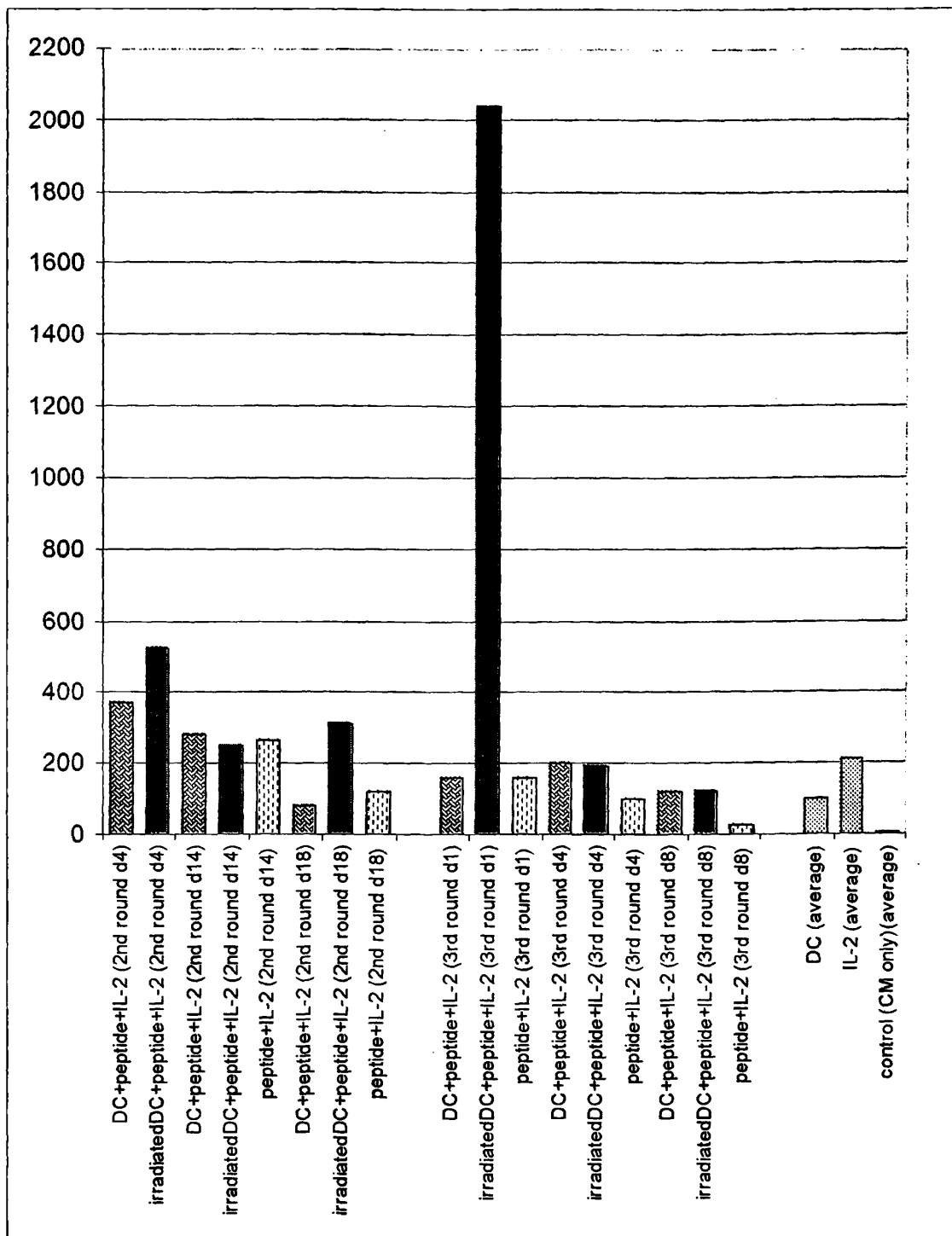
Σχήμα 6: Ποσοστά του CD69 ως δείκτη ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων σε πληθυσμό CD4 T λεμφοκυττάρων μετά το 3<sup>ο</sup> γύρο ενεργοποίησης



Σχήμα 7: Ποσοστά του CD69 ως δείκτη ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων σε πληθυσμό  $\gamma/\delta$  T λεμφοκυττάρων μετά το 3<sup>ο</sup> γύρο ενεργοποίησης (ημέρα 8)

### 13.3 Πειράματα ELISA μη ανταγωνιστική τύπου sandwich

Για τον έλεγχο παραγωγής των κυτταροκινών IFN- $\gamma$  και IL-4 έγινε ELISA μη ανταγωνιστική τύπου sandwich. IL-4 δεν εκκρίθηκε σε κανένα στάδιο της καλλιέργειας, ενώ τα αποτελέσματα έκκρισης IFN- $\gamma$  φαίνονται στο Σχήμα 8.



Σχήμα 8: Παραγωγή IFN- $\gamma$  από καλλιέργεια λεμφοκυττάρων μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους ενεργοποίησης



Η IFN- $\gamma$  αυξάνει την έκφραση των μορίων MHC και του πεπτιδικού μεταφορέα, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα τα μολυσμένα κύτταρα να αναγνωρισθούν ως κύτταρα στόχοι για κυτταροξική επίθεση. Επίσης, η IFN- $\gamma$  ενεργοποιεί τα μακροφάγα, οδηγώντας τα στις εστίες μόλυνσεως και ως δραστικά κύτταρα και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η IL-4 με τη σειρά της συμβάλει στην ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων και επάγει τη διαφοροποίηση των μονοπύρηνων κυττάρων σε δενδριτικά. Έκκριση IFN- $\gamma$  και μη έκκριση IL-4 υποδηλώνει την παρουσία Th1 αντιγονοειδικών κλώνων.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**





## 14. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, έχει γίνει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που εξετάζουν θεραπευτικές και προφυλακτικές στρατηγικές εμβολιασμού που εκθέτουν το ανοσοποιητικό σύστημα σε μοριακό επίπεδο ώστε να θεραπεύσει ή να αποτρέψει διάφορους τύπους καρκίνων. Οι ανοσοθεραπευτικές στρατηγικές γίνονται τώρα αποδεκτές λόγω της εξειδίκευσης που προσφέρουν στη στόχευση μόνο των καρκινικών κυττάρων σε αντιδιαστολή με την υπάρχουσα χημειοθεραπεία ή την ακτινοβολία που είναι λιγότερο εξειδικευμένες και σχετίζονται με πολλές παρενέργειες.

Ἡ αρχή στην οποία βασίζονται τα αντικαρκινικά εμβόλια είναι ότι το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ικανό να επάγει αντικαρκινική απόκριση και να ενεργοποιεί μια σειρά αμυντικών μηχανισμών ενάντια στα καρκινικά κύτταρα. Η ενίσχυση της ικανότητας του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει τα καρκινικά κύτταρα ως ξένα, είτε με ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης μέσω της αύξησης της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων. Γενικά, ο στόχος των αντικαρκινικών εμβολίων είναι να εισάγουν το αντιγόνο/ανοσογόνο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και να επάγουν μακράς διάρκειας ανοσία.

Ο σχεδιασμός πεπτιδικών εμβολίων για την επαγωγή αντικαρκινικής T κυτταρικής απόκρισης παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Είναι δυνατή η σύνδεση διαφορετικών πεπτιδίων στο ίδιο μόριο φορέα επιτρέποντας έτσι την παρασκευή πολυδύναμων συνθετικών εμβολίων. Επίσης, υπάρχει περιορισμός στην ανάπτυξη μη ειδικών αντισωμάτων από αντιγόνα-προσμίξεις λόγω της υψηλής καθαρότητας των συνθετικών πεπτιδίων. Επιπλέον, τα εμβόλια αυτά έχουν ενδογενή ανοσοενισχυτική δράση. Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα σύνθεσης πεπτιδίων που να ξεπερνά γενετικούς περιορισμούς στην παραγωγή αντισωμάτων.

Το σκεπτικό της ανοσοθεραπείας του καρκίνου εισήχθηκε πρώτη φορά από τον William Coley πριν ένα αιώνα περίπου. Παρόλα αυτά χρειάστηκε να περάσουν πολλά χρόνια ώστε να γίνει εφικτή η κατανόηση της αλληλεπίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος με τα καρκινικά κύτταρα. Πρόσφατες ανακαλύψεις στην κυτταρική και μοριακή ανοσολογία έφεραν στην επιφάνεια σημαντικές ενδείξεις για την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει τα καρκινικά κύτταρα ως ξένα και να επάγει ανοσολογική απόκριση που οδηγεί στη μείωσή τους.

Το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει κύτταρα τα οποία όταν ενεργοποιηθούν είναι δυνατόν να προκαλέσουν την καταστροφή κυττάρων στόχων, και χαρακτηρίζεται από

εξαιρετική εξειδίκευση. Τόσο τα T όσο και τα B κύτταρα φέρουν υποδοχείς που επιτρέπουν στο ανοσολογικό σύστημα να αναγνωρίζει ένα μεγάλο αριθμό αντιγόνων.

Η αντικαρκινική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος εντοπίζεται κυρίως στην κυτταρική ανοσία. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μηχανισμών ικανών να προκαλούν την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και οι περισσότεροι από αυτούς τους μηχανισμούς εξαρτώνται από τη δράση των T κυττάρων. Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα είναι δυνατόν να δράσουν απευθείας ως δραστικά κύτταρα, παρέχοντας αντικαρκινική ανοσία μέσω της λύσης των καρκινικών κυττάρων ή μέσω της απελευθέρωσης κυτταροκινών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων. Αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση είναι δυνατόν να επιτευχθεί και μέσω της επίδρασης των κυτταροκινών που παράγονται από τα T κύτταρα σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης η λειτουργία των μακροφάγων, των φυσικών φονικών κυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων κοκκιοκυττάρων ρυθμίζεται σημαντικά από τα T κύτταρα.

Μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους και σε ζώα έδειξαν πως η ανάπτυξη βέλτιστων αντικαρκινικών εμβολίων απαιτεί τόσο τη συμμετοχή των CD4 όσο και των CD8 κυττάρων. Τα CD4 T κύτταρα έχουν βοηθητική δράση για την επαγωγή και συντήρηση των αντικαρκινικών CD8 T κυττάρων.

Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν τα αντιγόνα τους στα CD8 T κύτταρα τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν τη λύση των καρκινικών κυττάρων ή απελευθερώνουν τα αντιγόνα τους, τα οποία ενδοκυτταρώνονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Έρευνες σε ζώα έδειξαν πως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών έχουν την ικανότητα να ενδοκυτταρώνουν καρκινικά αντιγόνα, να τα επεξεργάζονται και να τα παρουσιάζουν τόσο στα CD4 όσο και στα CD8 T κύτταρα, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως διασταυρωτή διέγερση (cross-priming). Η ικανότητα ενός αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου να παρουσιάζει αντιγονικούς επιτόπους στα CD8 και CD4 T κύτταρα φαίνεται πως διευκολύνει τα CD4 T κύτταρα να δρουν βοηθητικά στην κυτταροτοξική δράση των CD8 T κυττάρων. Η βοηθητική δράση των CD4 T κυττάρων πραγματοποιείται μέσω απελευθέρωσης κυτταροκινών, καθώς επίσης και μέσω της αλληλεπίδρασης των CD40 προσδετών των T κυττάρων με τα μόρια CD40 που βρίσκονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων.

Για να γίνει κατανοητή η μοριακή βάση της T κυτταρικής ανοσοθεραπείας κατά του καρκίνου, έχουν προσδιοριστεί διάφορα καρκινικά αντιγόνα που αναγνωρίζονται από



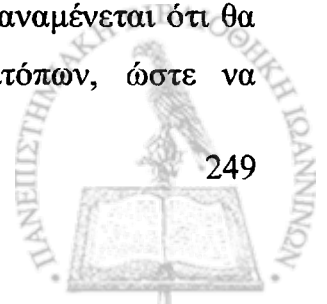
CD8 T κύτταρα. Οι μελέτες αυτές έχουν οδηγήσει σε διάφορες κλινικές δοκιμές χρησιμοποιώντας πεπτίδια που προέρχονται από μοριακά καθορισμένα καρκινικά αντιγόνα.

Τα MAGE αντιγόνα είναι εξειδικευμένα αντιγόνα (tumor specific antigens), δηλαδή εκφράζονται σε πολλά είδη καρκίνου, αλλά δεν εκφράζονται σε φυσιολογικούς ιστούς. Είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου λόγω της αυστηρής εξειδίκευσής τους και επειδή εντοπίζονται σε πολλά είδη καρκίνου. Η οικογένεια MAGE γονιδίων περιλαμβάνει 18 γονίδια που διαιρούνται σε τρεις συστάδες, οι οποίες ονομάζονται MAGE-A, -B και -C. Αυτά τα γονίδια εκφράζονται σε ανθρώπινους όγκους διαφορετικών ιστολογικών τύπων μελανώματος, στον καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού, αλλά δεν εκφράζονται σε φυσιολογικά κύτταρα εκτός από τους πλακούντιους τροφοβλάστες και τα ορχικά γενετικά κύτταρα, στα οποία δεν εκφράζονται τα μόρια MHC τάξεως I και έτσι δεν υπάρχει ο κίνδυνος της αυτοανοσίας. Σε μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με διάφορες μορφές καρκίνου, έχει βρεθεί πως η χρησιμοποίηση επιτόπων του MAGE καρκινικού αντιγόνου οδηγεί στην επαγωγή κυτταροτοξικής ανοσολογικής απόκρισης.

Όμως, επειδή τα πεπτίδια, λόγω του μικρού μεγέθους τους δεν είναι ισχυρές ανοσογόνες ουσίες είναι απαραίτητη η πρόσδεσή τους σε πρωτεϊνικούς φορείς. Μ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ενίσχυση της ανοσογονικότητας/ αντιγονικότητας και της σταθερότητάς τους.

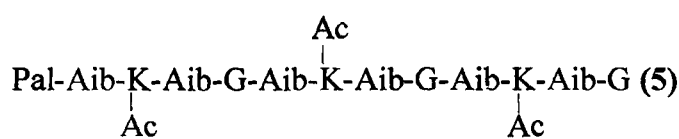
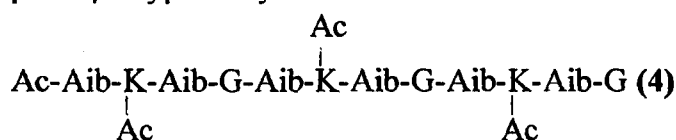
Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι ο SOC<sub>3</sub>-II, ο οποίος είναι ένας συνθετικός ολιγοπεπτιδικός φορέας που αποτελείται από μια επαναλαμβανόμενη τετραπεπτιδική μονάδα (Aib-Lys-Aib-Gly). Τα πλεονεκτήματα αυτού του φορέα σε σύγκριση με άλλους φορείς που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι ότι η ενσωμάτωση του Aib επιβάλλει ελικοειδείς δομές. Πράγματι, η λεπτομερής ανάλυση με <sup>1</sup>HNMR φασματοσκοπία και μοριακή δυναμική έχει δείξει ότι ο φορέας υιοθετεί μια <sub>310</sub> ελικοειδή διαμόρφωση. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα συνδεδεμένα πεπτίδια δεν αλληλεπιδρούν ούτε μεταξύ τους ούτε με το φορέα και διατηρούν επίσης τα αρχικά δομικά στοιχεία και τη βιοδραστικότητά τους. Είναι πολύ πιθανό ότι αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά των SOC<sub>3</sub>-II παρασκευασμάτων ευνοούν μια βέλτιστη επεξεργασία και παρουσίαση των συνδεδεμένων επιτόπων στο ανοσοποιητικό σύστημα έτσι ώστε να παράγονται συγκεκριμένες ανοσολογικές αποκρίσεις.

Έχοντας ως στόχο τη βελτίωση της στρατηγικής για την ανάπτυξη αντικαρκινικών εμβολίων, προτείνεται ο σχεδιασμός και η σύνθεση μακρομορίων που ενσωματώνουν CD8 επιτόπους από το ίδιο καρκινικό αντιγόνο, το MAGE 3, στον επαναλαμβανόμενο ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC<sub>3</sub>-II. Τα ελικοειδή χαρακτηριστικά του φορέα αναμένεται ότι θα συμβάλουν στην όσο το δυνατόν καλύτερη έκθεση των CD8 επιτόπων, ώστε να

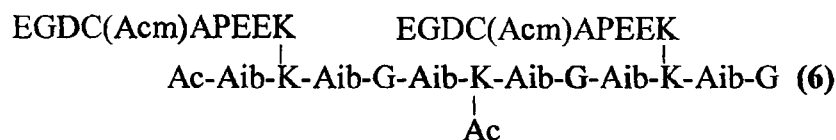


αναγνωρισθούν από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, και στη διατήρηση των δομικών χαρακτηριστικών τους ώστε να μιμούνται το αρχικό καρκινικό αντιγόνο. Οι επίτοποι CD8 έχουν τοποθετηθεί στην πρώτη και τρίτη παράπλευρη ομάδα της λυσίνης του φορέα SOC<sub>3</sub>-II, (η δεύτερη Lys-N<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> ακετυλιώθηκε) ώστε να αποφευχθεί κάθε πιθανή αλληλεπίδρασή τους.

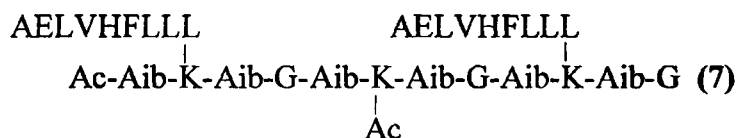
Για την επίτευξη του στόχου της παρούσας διατριβής συντέθηκαν οι επίτοποι CD8 (212-220): EGDC(Acm)APEEK (1), CD8 (114-122) AELVHFLLL (2) και CD4 (281-295) KKLLTQHFVQENYLEY (3) του MAGE 3 καρκινικού αντιγόνου, ο φορέας SOC<sub>3</sub>-II ακετυλιωμένος και παλμυτούλο φορέας (4, 5) ως μάρτυρες για τις δομικές και βιολογικές μελέτες:



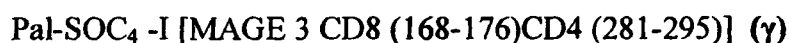
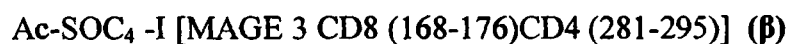
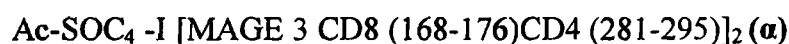
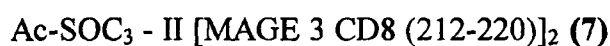
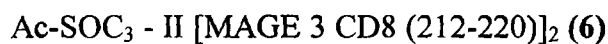
Επίσης, συντέθηκε ο φορέας SOC<sub>3</sub>-II με τον επίτοπο CD8 (212-220) συνδεδεμένο στις Lys-N<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> των θέσεων ένα και τρία:



και ο φορέας SOC<sub>3</sub>-II με τον επίτοπο CD8 (114-122) συνδεδεμένο στις Lys-N<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> των θέσεων ένα και τρία:



Επίσης, έγινε ομοιοπολική σύνδεση του μορίου της φλουορεσκεΐνης στα παρακάτω πεπτίδια, ώστε να γίνουν τα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας:



Η αναλυτική πορεία σύνθεσης των πεπτιδίων περιγράφεται στο Κεφάλαιο 10. Τόσο οι επίτοποι CD8 (212-220) και (114-122) και CD4 (243-258) του MAGE 3 καρκινικού αντιγόνου, που αντιστοιχούν σε πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους (1048.10, 1054.31 και 2054.70), όσο και τα SOC<sub>3</sub>-παράγωγα, που αντιστοιχούν σε σχετικά μεγάλα μοριακά βάρη (3228.54 και 3240.96) παρασκευάστηκαν σε καλές αποδόσεις και υψηλή καθαρότητα.

Η διαμορφωτική μελέτη των πεπτιδίων (1)-(7) έγινε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα TFE/H<sub>2</sub>O (50/50, v/v), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4), SDS (8mM) και C<sub>14</sub>PC (5mM). Η συγκέντρωση των πεπτιδίων ήταν 1 10<sup>-4</sup> M. Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού που ελήφθησαν φαίνονται στα σχήματα 1-11 του Κεφαλαίου 11.

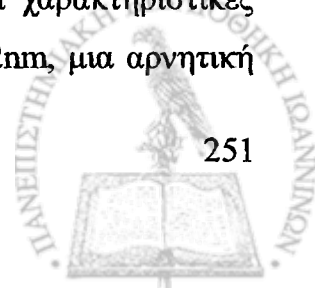
Από το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου MAGE 3 CD8 (212-220) (1) (Σχήμα 1 Κεφαλαίου 11) φαίνεται ότι ο επίτοπος σε TFE/H<sub>2</sub>O, PBS, SDS και C<sub>14</sub>PC εμφανίζει χαρακτηριστικές κορυφές της τυχαίας διαμόρφωσης: μια αρνητική κορυφή στα 200nm και μια αρνητική κορυφή στα 220nm.

Επίσης, έγινε ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού με τη χρήση του υπολογιστικού πακέτου CDNN ώστε να προσδιορισθούν τα ποσοστά άλλων δευτεροταγών δομών, που συνεισφέρουν στην τελική διαμόρφωση. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 29 του Κεφαλαίου 11 τα ποσοστά τυχαίας διαμόρφωσης για το πεπτίδιο (1) ανέρχονται στην τάξη του 40%, ενώ τα ποσοστά β-στροφής στη τάξη του 25% και αντιπαράλληλου φύλλου στην τάξη του 30%. Η ύπαρξη των διαμορφώσεων αυτών είναι αναμενόμενη καθώς ο επίτοπος αυτός αποτελείται από αμινοξέα που στην πλειοψηφία τους επάγουν τη διαμόρφωση του β-πτυχωτού φύλλου και της β-στροφής (Gly, Asp, Cys, Pro, Lys).

Υστερα από ανάλυση του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου MAGE 3 CD8 (114-122) (2) (Πίνακα 29 του Κεφαλαίου 11) βρέθηκε πως σε όλους τους διαλύτες (TFE/H<sub>2</sub>O, PBS, SDS, C<sub>14</sub>PC) υπερισχύει η διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου, ενώ υπάρχουν και σημαντικά ποσοστά β-στροφής.

Το πεπτίδιο MAGE 3 CD4 (243-258) (3) χαρακτηρίζεται κυρίως από διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου και β-στροφής σε TFE/H<sub>2</sub>O και PBS, ενώ σε SDS 8mM και C<sub>14</sub>PC 5mM χαρακτηρίζεται κυρίως από διαμόρφωση α-έλικας, το δε υπόλοιπο σε όλους τους διαλύτες είναι κυρίως τυχαία διαμόρφωση (Πίνακα 29 του Κεφαλαίου 11).

Από το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II (4) (Σχήμα 4 Κεφαλαίου 11) φαίνεται ότι ο φορέας σε TFE/H<sub>2</sub>O εμφανίζει χαρακτηριστικές κορυφές της α-έλικας: μια ευρεία αρνητική κορυφή με ελάχιστο στα 222nm, μια αρνητική



κορυφή στα 105nm και μια θετική κορυφή με μέγιστο στα 192nm. Τα φάσματα του ακέτυλο φορέα σε PBS, SDS και C<sub>14</sub>PC δε φαίνεται να έχουν χαρακτηριστικές κορυφές που αντιπροσωπεύουν κάποια διαμόρφωση. Ύστερα από ανάλυση του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του ακέτυλο φορέα βρέθηκε πως σε TFE/H<sub>2</sub>O υπερισχύει η διαμόρφωση α-έλικας, ενώ σε PBS, SDS και C<sub>14</sub>PC υπάρχει συνδυασμός αντιπαράλληλου φύλλου, β-στροφής και τυχαίας διαμόρφωσης (Πίνακα 29 του Κεφαλαίου 11).

Από το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Pal-SOC<sub>3</sub>-II (5) (Σχήμα 5 Κεφαλαίου 11) φαίνεται ότι ο φορέας σε TFE/H<sub>2</sub>O, SDS, C<sub>14</sub>PC εμφανίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές της α-έλικας. Τα φάσματα του παλμιτόυλο φορέα σε PBS, δε φαίνεται να έχουν χαρακτηριστικές κορυφές που αντιπροσωπεύουν κάποια διαμόρφωση. Ύστερα από ανάλυση του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού του παλμιτόυλο φορέα βρέθηκε πως σε TFE/H<sub>2</sub>O, SDS και C<sub>14</sub>PC υπερισχύει η διαμόρφωση α-έλικας, ενώ σε PBS υπάρχει συνδυασμός αντιπαράλληλου φύλλου, β-στροφής και τυχαίας διαμόρφωσης (Πίνακα 29 του Κεφαλαίου 11).

Το πεπτίδιο Ac-SOC<sub>3</sub>-II [MAGE 3 CD8 (212-220)]<sub>2</sub> (6) (Σχήμα 6 Κεφάλαιο 11) φαίνεται πως σε TFE/H<sub>2</sub>O και SDS εμφανίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές της α-έλικας. Τα φάσματα του πεπτιδίου (6) σε PBS και C<sub>14</sub>PC εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές κορυφές της τυχαίας διαμόρφωσης. Ύστερα από ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου (6) βρέθηκε πως σε TFE/H<sub>2</sub>O και SDS υπάρχει συνδυασμός α-έλικας, αντιπαράλληλου φύλλου και β-στροφής. Σε PBS και C<sub>14</sub>PC επικρατεί η διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου σε συνδυασμό β-στροφή και τυχαία διαμόρφωση (Πίνακα 29 του Κεφαλαίου 11).

Από το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου Ac-SOC<sub>3</sub>-II[MAGE 3 CD8 (114-122)]<sub>2</sub> (7) (Σχήμα 7 Κεφαλαίου 11) φαίνεται ότι το πεπτίδιο αυτό σε TFE/H<sub>2</sub>O, SDS, C<sub>14</sub>PC εμφανίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές της α-έλικας. Τα φάσματα του πεπτιδίου (7) σε PBS, δε φαίνεται να έχει χαρακτηριστικές κορυφές που αντιπροσωπεύουν κάποια διαμόρφωση. Ύστερα από ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού του πεπτιδίου (7) βρέθηκε πως σε TFE/H<sub>2</sub>O, SDS και C<sub>14</sub>PC υπερισχύει η διαμόρφωση α-έλικας, ενώ σε PBS υπάρχει συνδυασμός αντιπαράλληλου φύλλου, β-στροφής και τυχαίας διαμόρφωσης (Πίνακα 29 του Κεφαλαίου 11).

Σύγκριση των διαμορφωτικών χαρακτηριστικών των επιτόπων CD8 (212-220), CD8 (114-122) και CD4 (243-258) του καρκινικού αντιγόνου MAGE 3 και των SOC<sub>3</sub>-II παραγώγων δείχνει ότι ο ελικοειδής χαρακτήρας του φορέα Ac-SOC<sub>3</sub>-II, διατηρείται



και μετά την πρόσδεση των επιτόπων. Η παλμιτόυλο ομάδα στον Pal-SOC<sub>3</sub>-II (5) αυξάνει σε σημαντικό ποσοστό τη διαμόρφωση α-έλικας σε περιβάλλον μικυλλίων (SDS, C<sub>14</sub>PC) σε σχέση με τον Ac-SOC<sub>3</sub>-II.

Με την τεχνική της συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal laser scanning microscopy, CLSM) μελετήθηκε η υποκυτταρική κατανομή των SOC<sub>3</sub>-II και SOC<sub>4</sub>-I παρασκευασμάτων (Κεφάλαιο 12).

Διαπιστώθηκε ότι όλα τα πεπτίδια διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα χωρίς όμως να εισέρχονται στον πυρήνα (Σχήμα 1-15 Κεφάλαιο 12). Επειδή το πείραμα δεν πραγματοποιήθηκε με μονιμοποίηση των κυττάρων αλλά διεξήχθη σε «ζωντανά» κύτταρα, η μεταφορά τους στο κυτταρόπλασμα μπορεί να αποδοθεί, είτε στην ικανότητα των ίδιων των πεπτιδίων να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, είτε σε μηχανισμούς ενδοκύτωσης. Ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός των πεπτιδίων αυτών συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι τα πεπτίδια αυτά αφού εισέλθουν στο κύτταρο είναι δυνατόν να αποικοδομηθούν από το πρωτεόσωμα (το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα) και στη συνέχεια οι επίτοποι μπορούν να παρουσιαστούν μέσω των MHC μορίων στα CD8 και στα CD4 T κύτταρα.

Επίσης, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έγιναν καλλιέργειες δενδριτικών κυττάρων με το πεπτίδιο Pal-SOC<sub>4</sub>-I[MAGE 3 CD8 (168-176) CD4 (281-295)] και ακολούθησε έλεγχος παρουσίας δεικτών ενεργοποίησης (CD69) και έλεγχος παραγωγής κυτταροκινών (IFN- $\gamma$ , IL-4).

Ο έλεγχος για την παρουσία του δείκτη ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων CD69 έγινε με την κυτταρομετρία ροής (FACS). Όπως φαίνεται από τα Σχήματα 3-7 του Κεφαλαίου 13 έχουμε παρουσία του CD69 που υποδηλώνει την ύπαρξη ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων.

Στην περίπτωση της χρήσης των ακτινοβολημένων δενδριτικών κυττάρων παρατηρείται σχετική αύξηση του πληθυσμού των CD8<sup>+</sup> κυττάρων έναντι των CD4<sup>+</sup> στα χρονικά σημεία της καλλιέργειας: 4 και 14 ημέρες μετά το 2<sup>ο</sup> γύρο ενεργοποίησης καθώς και 1 και 4 ημέρες μετά τον 3<sup>ο</sup> γύρο ενεργοποίησης. Η αύξηση του σχετικού ποσοστού του κάθε πληθυσμού, όπως επίσης και η αύξηση του τμήματος αυτών που εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης ήταν πιο έντονη την 4<sup>η</sup> μέρα μετά από κάθε ενεργοποίηση.

Στην περίπτωση της χρήσης μη ακτινοβολημένων δενδριτικών κυττάρων παρατηρείται σχετική αύξηση του πληθυσμού των CD4<sup>+</sup> κυττάρων έναντι των CD8<sup>+</sup>.

Όσον αφορά στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε απευθείας πεπτίδιο χωρίς τη διαμεσολάβηση δενδριτικών κυττάρων, φαίνεται ότι το ποσοστό των CD8<sup>+</sup> κυττάρων είναι μεγαλύτερο σε σχέση με το ποσοστό CD4<sup>+</sup> και μεγάλο μέρος αυτών φαίνεται να είναι ενεργοποιημένα.

Επίσης, ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι τη χρονική στιγμή 8 ημέρες μετά την 3<sup>η</sup> ενεργοποίηση παρατηρείται αυξημένο ποσοστό στην καλλιέργεια των γ/δ κυττάρων, περισσότερο στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο απουσία δενδριτικών κυττάρων.

Για τον έλεγχο παραγωγής κυτταροκινών (IFN-γ, IL-4) χρησιμοποιήθηκε ELISA μη ανταγωνιστική τύπου sandwich. IL-4 δεν εκκρίθηκε σε κανένα στάδιο της καλλιέργειας. Στην περίπτωση της IFN-γ, όπως φαίνεται από το Σχήμα 8 του Κεφαλαίου 13, εκκρίνονται μεγαλύτερα ποσά από τα κύτταρα που συνεπιάστηκαν με ακτινοβολημένα δενδριτικά κύτταρα σε κάθε χρονική στιγμή. Η ποσότητα της IFN-γ είναι μεγαλύτερη αμέσως μετά την έκθεση στο πεπτίδιο και μετά μειώνεται γρήγορα.

Η έκκριση IFN-γ επάγει την ενεργοποίηση των CD8 T κυττάρων, των NK κυττάρων και των μακροφάγων, ενώ η έκκριση IL-4 ενεργοποιεί τα B κύτταρα και οδηγεί στην παραγωγή αντισωμάτων IgE. Έτσι, έκκριση IFN-γ και μη έκκριση IL-4 υποδηλώνει την παρουσία Th1 αντιγονοειδικών κλώνων.





**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15**  
**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



## 15. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία είναι τα εξής:

1. Παρασκευάσθηκαν CD8 επίτοποι του καρκινικού αντιγόνου MAGE 3 που ταυτοποιήθηκαν από ασθενείς στην ελεύθερη μορφή τους καθώς και προσδεδεμένοι στον φορέα SOC<sub>n</sub>, ώστε να βελτιωθεί η αντιγονική/ανοσολογική τους δράση.
2. Μελετήθηκαν τα διαμορφωτικά τους χαρακτηριστικά με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού και επιβεβαιώθηκε ότι προσλαμβάνουν συγκεκριμένες διαμορφώσεις σε υδατικό και μικκυλιακό περιβάλλον.
3. Έγινε ιχνηθέτηση των SOC<sub>n</sub>-παραγώγων με φλουορεσκεΐνη, και βρέθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία ότι διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.
4. Βιολογικά πειράματα σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών εθελοντών και σε δενδριτικά κύτταρα έδειξαν σημαντική ενεργοποίηση των CD8 κυττάρων, παραγωγή IFN- $\gamma$ , ενώ δεν παρήχθη IL-4. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τη δυνατότητα ανάπτυξης κυτταροτοξικής ανοσολογικής απόκρισης Th1.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 16**

**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ**



## 16. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρησιμοποίηση πεπτιδικών εμβολίων με σκοπό την επαγωγή αντικαρκινικής T-κυτταρικής απόκρισης πλεονεκτεί ως προς το ότι είναι δυνατόν να επιτευχθεί η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων χωρίς να επηρεαστούν οι φυσιολογικοί ιστοί. Επίσης, η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός τους είναι σχετικά εύκολος και όπως φαίνεται από κλινικές μελέτες που έγιναν τα εμβόλια αυτά είναι ασφαλή.

Η συνύπαρξη τάξης I και τάξης II επιτόπων που προέρχονται από το ίδιο καρκινικό αντιγόνο έχει βρεθεί ότι ενισχύει την ποιότητα της ανοσολογικής απόκρισης, προκαλεί μακράς διάρκειας ανοσία και ενδυναμώνει την αντικαρκινική δράση. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα CD4 T κύτταρα ενεργοποιούν τα αντιγονοπαρουσιαστικά (δενδριτικά) κύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης των CD40 και των προσδετών τους και με τη σειρά τους τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να παρουσιάσουν το αντιγόνο στα CD8 T κύτταρα.

Το MAGE 3 καρκινικό αντιγόνο αποτελεί ένα από τα περισσότερο μελετημένα καρκινικά αντιγόνα. Το αντιγόνο αυτό ανήκει στην κατηγορία των εξειδικευμένων αντιγόνων και εκφράζεται σε μεγάλο ποσοστό στο μελάνωμα. Επίσης, εκφράζεται και σε άλλα είδη καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος του στήθους, των πνευμόνων, του θυρεοειδούς αδένα και του εντέρου. Τα μόνα φυσιολογικά κύτταρα στα οποία εκφράζεται το MAGE 3 είναι οι πλακούντιοι τροφοβλάστες και τα οργικά γενετικά κύτταρα, στα οποία δεν εκφράζονται τα μόρια MHC.

Για την παρασκευή ισχυρών ανοσογόνων/αντιγόνων χρησιμοποιείται η τεχνική της πρόσδεσης των επιτόπων σε πρωτεϊνικούς φορείς. Στο εργαστήριο Πεπτιδοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σχεδιάστηκε και παρασκευάστηκε ένα συνθετικό υπόστρωμα με δομική σταθερότητα και κανονικότητα, έτσι ώστε οι πεπτιδικοί επίτοποι να προσδένονται χωρίς διαμορφωτικούς περιορισμούς ή στεरिकές παρεμποδίσεις. Το παρασκεύασμα αυτό είναι ο Επαναλαμβανόμενος Ολιγοπεπτιδικός Φορέας τύπου I ή τύπου II (Sequential Oligopeptide Carrier -I ,II , SOC<sub>n</sub> I,II). Ο SOC<sub>n</sub> I αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη ακολουθία αμινοξέων Lys-Aib-Gly, ενώ ο SOC<sub>n</sub> II αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη ακολουθία αμινοξέων Aib-Lys-Aib-Gly.

Η παρούσα εργασία αναφέρεται στη σύνθεση, τη διαμορφωτική μελέτη με την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού και τη μελέτη της διαμεμβρανικής μεταφοράς πεπτιδικών φορέων πολλαπλών αντιγονικών ή/και ανοσογονικών επιτόπων με τη συνεστιακή μικροσκοπία. Η

εργασία περιλαμβάνει επίσης βιολογικά πειράματα (FACS ανάλυση και ELISA) για τη μελέτη της ενεργοποίησης T κυττάρων με αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα που έχουν προεπωασθεί με τα SOC<sub>n</sub>-παράγωγα. Η εργασία περιλαμβάνει δύο τμήματα: το πρώτο (Κεφάλαια 1-9) είναι το θεωρητικό, ενώ το δεύτερο (Κεφάλαιο 10-19) είναι το πειραματικό μέρος, στο οποίο παρατίθενται η σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων και μακρομορίων, τα αποτελέσματα της μελέτης της διαμόρφωσης, τα αποτελέσματα της διαμεμβρανικής μεταφοράς των πεπτιδίων και τα αποτελέσματα των βιολογικών αποτελεσμάτων.

Στο Κεφάλαιο 1 γίνεται αναφορά στη μοριακή βάση της ανοσίας, δηλαδή στην ικανότητα του οργανισμού να αμύνεται στην επίδραση διαφόρων αντιγόνων. Το κεφάλαιο αυτό αναφέρεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στην ανοσολογική απόκριση που επάγεται από την ενεργοποίησή τους. Επισημαίνεται η σημαντικότητα του καθορισμού πολλών αντιγόνων καρκινικών κυττάρων που αναγνωρίζονται από T κύτταρα και συγκεκριμένα του καρκινικού αντιγόνου MAGE 3. Επίσης, γίνεται αναφορά στην ασθένεια του καρκίνου και στην καταπολέμηση αυτού μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς επίσης και στα αντικαρκινικά πεπτιδικά εμβόλια.

Στο Κεφάλαιο 2 περιγράφονται οι μέθοδοι ενίσχυσης της αντιγονικότητας/ανοσογονικότητας των πεπτιδίων. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στη χρήση συνθετικών φορέων και πιο συγκεκριμένα στους Επαναλαμβανόμενους Ολιγοπεπτιδικούς Φορείς SOC<sub>n</sub>, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η ενίσχυση της αντιγονικότητας/ανοσογονικότητας των επιτόπων.

Το Κεφάλαιο 3 αναφέρεται στην πεπτιδική σύνθεση και πιο συγκεκριμένα δίνεται λεπτομερής ιστορική αναδρομή στα αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδοχημεία. Επίσης, υπάρχει αναλυτική παρουσίαση των πολυμερικών υποστρωμάτων και των αμινοπροστατευτικών ομάδων που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεοφάση.

Στο Κεφάλαιο 4 περιγράφονται οι μέθοδοι ταυτοποίησης και καθαρισμού πεπτιδίων. Συγκεκριμένα, περιγράφονται η αρχή μεθόδου της διαπίδυσης, της υγρής χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και της φασματοσκοπίας μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.

Το Κεφάλαιο 5 αφορά την τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη διαμορφωτική ανάλυση των πεπτιδίων/μακρομορίων. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται αναλυτικά οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού και ο τρόπος μελέτης της δευτεροταγούς διαμόρφωσης των πεπτιδίων σε διάλυμα.



Στο Κεφάλαιο 6 περιγράφονται συνοπτικά οι βασικές αρχές της συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Microscopy), η οργανολογία που χρησιμοποιείται και τα πλεονεκτήματα της μεθόδου που την καθιστούν ως την πλέον διαδεδομένη τεχνική μελέτης τόσο «ζωντανών» αλλά και μονιμοποιημένων «fixed» συστημάτων.

Το Κεφάλαιο 7 αναφέρεται στην κυτταρομετρία ροής. Συγκεκριμένα περιγράφονται συνοπτικά οι βασικές αρχές της κυτταρομετρίας ροής και η οργανολογία που χρησιμοποιείται, καθώς επίσης και οι συνηθέστεροι τρόποι παρουσίασης των αποτελεσμάτων που προκύπτουν.

Στο Κεφάλαιο 8 περιγράφονται οι βασικές αρχές της ανοσοενζυμικής τεχνικής για την ανίχνευση αντισώματος ή αντιγόνου, η γνωστή τεχνική ELISA

Στο Κεφάλαιο 9 αναφέρεται ο σκοπός της παρούσας εργασίας.

Στο Κεφάλαιο 10 περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων της παρούσας εργασίας με την τεχνική της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield καθώς και ο τρόπος που έγινε η ομοιοπολική σύνδεση της φλουορεσκεΐνης στα πεπτίδια σε υγρή φάση. Ακόμη, παρατίθενται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος περιγράφεται ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των πεπτιδίων με υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και της φασματοσκοπίας μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό. Στη συνέχεια δίνονται οι αναλυτικές HPLC και τα φάσματα μάζας των καθαρών πεπτιδίων που παρασκευάστηκαν.

Στο Κεφάλαιο 11 περιγράφεται η CD ανάλυση και η διαμορφωτική μελέτη των πεπτιδίων που συντέθηκαν, σε διάφορους διαλύτες. Τέλος, γίνεται επεξεργασία των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού των πεπτιδίων με το πρόγραμμα CDNN.

Στο Κεφάλαιο 12 δίνεται η πορεία διεξαγωγής των πειραμάτων της διαμεμβρανικής μεταφοράς των πεπτιδίων με τη συνεστιακή μικροσκοπία και παράλληλα παρουσιάζονται οι φωτογραφίες των κυττάρων σε διάφορες τομές του.

Στο Κεφάλαιο 13 περιγράφεται το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων. Συγκεκριμένα περιγράφεται ο τρόπος με τον οποίο έγιναν οι καλλιέργειες δενδριτικών κυττάρων και παρατίθενται τα αποτελέσματα των πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής και ELISA.

Στο Κεφάλαιο 14 πραγματοποιείται μια σύντομη ανασκόπηση των βασικών αρχών και θεωριών στις οποίες βασίζεται η παρούσα εργασία με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία και παράλληλα σχολιάζεται το σύνολο των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής.

Στο Κεφάλαιο 15 αναφέρονται τα γενικά συμπεράσματα της παρούσας εργασίας, τα οποία είναι τα εξής:

- ◆ Παρασκευάστηκαν CD8 επίτοποι του καρκινικού αντιγόνου MAGE 3 που ταυτοποιήθηκαν από ασθενείς στην ελεύθερη μορφή τους καθώς και προσδεδεμένοι στον φορέα SOC<sub>n</sub>, ώστε να βελτιωθεί η αντιγονική/ανοσολογική τους δράση.
- ◆ Μελετήθηκαν τα διαμορφωτικά τους χαρακτηριστικά με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού και επιβεβαιώθηκε ότι προσλαμβάνουν συγκεκριμένες διαμορφώσεις σε υδατικό και μικκυλιακό περιβάλλον.
- ◆ Έγινε ιχνηθέτηση των SOC<sub>n</sub>-παραγώγων με φλουορεσκεΐνη, και βρέθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία ότι διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.
- ◆ Βιολογικά πειράματα σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών εθελοντών και σε δενδριτικά κύτταρα έδειξαν σημαντική ενεργοποίηση των CD8 κυττάρων, παραγωγή IFN-γ, ενώ δεν παρήχθη IL-4. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τη δυνατότητα ανάπτυξης κυτταροτοξικής ανοσολογικής απόκρισης Th1.

Στο Κεφάλαιο 16 παρουσιάζονται περιληπτικά το αντικείμενο και τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Στο Κεφάλαιο 17 παρουσιάζονται περιληπτικά το αντικείμενο και τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής στην Αγγλική γλώσσα.

Στο Κεφάλαιο 18 δίνεται λεπτομερείς βιβλιογραφία σχετικά με τα θέματα που αναλύονται στην παρούσα διατριβή.

Στο Κεφάλαιο 19 παρατίθενται τα 20 φυσικά αμινοξέα με τους συντακτικούς τους τύπους, οι συντομογραφίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς και δημοσιεύσεις σε πρακτικά συνεδρίων και ομιλίες.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 17**

**ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ**





## 17. ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Peptide anticancer vaccines is a valuable tool in inducing anticancer T cell response as they can harm cancer cells without destroying normal tissues. On the other hand anticancer vaccines are well characterized and can be produced in high quantities and purity.

T cells play an important role in controlling tumor growth and mediating tumor regression. Anti-cancer responses, as well as CD4 and CD8 epitopes of tumor antigens, have been detected in many patients, although these responses are not accompanied by tumor regression. On the other hand, human and animal studies have shown that the combined application of class I and class II epitopes, derived from the same tumor antigen, promotes the quality of the immune response and generates long term immunity.

MAGE antigens are cancer/testis antigens (expressed in tumors but silent in normal cells except for male germ line cells), shared by many tumors. These genes are of particular interest for cancer immunotherapy. Among the MAGE genes, MAGE 3 is one of the most frequently expressed in tumors (in 76% of metastatic melanomas). There have been various efforts to detect CTL responses to MAGE 3 and MHC-I restricted CTL epitopes have been identified.

Nowadays, the improved methods of peptide synthesis have allowed a greater availability of peptides in immunochemistry. To obtain potent antigens and-or effective immunogens, synthetic peptides (epitopes) have to be conjugated to a carrier molecule, either to a protein such as bovine serum albumin, either to a synthetic carrier. A new peptide carrier has been developed in our laboratory, named Sequential Oligopeptide Carriers I and II, SOC<sub>n</sub>-I and SOC<sub>n</sub>-II. The SOC<sub>n</sub>-I carrier is constructed by the repetitive moiety Lys-Aib-Gly and the SOC<sub>n</sub>-II carrier by the repetitive tetrapeptide Aib-Lys-Aib-Gly. Both carriers adopt 3<sub>10</sub>-helical conformation and the Lys-N<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> groups exhibit defined spatial orientations, so that the attached antigenic peptides do not interact with each other or with the carrier molecule. Thus, the structure regularity of the carrier, the absence of conformational restrictions and steric hindrances for the constructed conjugates favour an optimal antibody recognition and generate potent immunogens.

CD8 epitopes derived from MAGE 3 cancer antigens were anchored to the SOC<sub>n</sub> (I,II) carrier in order to improve their antigenic/immunogenic properties. Conformational studies by circular dichroism spectroscopy (CD) suggested the occurrence of well defined structures in aqueous and micellar microenvironment. Fluoresceine was covalently coupled to the SOC<sub>n</sub>-conjugates to confirm their membrane insertion by confocal microscopy.

Biological studies in PMBC cells and dendritic cells, by FACS analysis, pointed out CD8<sup>+</sup> T cell activation, production of IFN- $\gamma$  (ELISA assays), whereas IL-4 was not detected.

The reported findings evidence the generation of Th1 cytotoxic immune response derived from the SOC<sub>n</sub>-conjugates, which may lead to the development of protective immunity in anticancer vaccines.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 18**

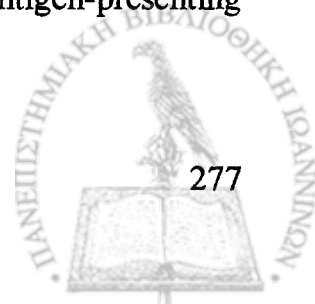
**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



## 18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 18.1 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 1

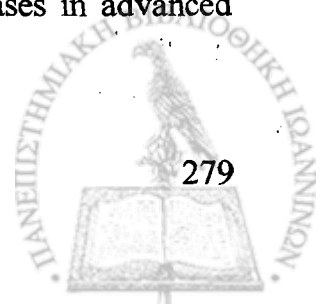
1. Knight, S.C., and Stagg, A.J., (1993), "Antigen presenting cell types.", *Curr. Opin. Immunol.*,**5**, 374.
2. Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., Terhorst, C., (1988), "The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble.", *Annu Rev Immunol* ,**6**, 629-662.
3. Weiss, A., and Stobo, J.D., (1984), "Requirement for the co-expression of T3 and T cell antigen on a malignant human T cell line.", *J. Exp. Med.*,**160**, 1284-1299.
4. Bjorkman, J.P., Saper, M.A, Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, C.O., (1987), "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2.", *Nature*,**329**, 506-512.
5. Rudensky, A.Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A., and Jeneway, C.A., (1991), "Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules.", *Nature*,**353**, 622-626.
6. Morrison, L.A., Lukacher, A.E., Braciale, V.L., Fan, D.P., Braciale, T.J., (1986), "Differences in antigen presentation on to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones.", *J. Exp. Med.*,**163**, 903-921.
7. Chicz, R.M., Urban, R.G., William, S.L., Gorga, C.J., Stern, L.J., Vignali, D.A., and Strominger, J.L., (1992), "Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size.", *Nature*,**358**, 764-768.
8. Van Bleek, G.M., and Nathenson, S.G., (1990), "Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecules.", *Nature*,**348**, 213-216.
9. Townsend, A.R.M., Bastin, J., Gould, K., and Brownlee, G.G., (1986), "Cytotoxic T lymphocytes recognize influenza haemagglutinin that lacks a signal sequence.", *Nature*,**324**, 575-577.
10. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H., (1991), "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules.", *Nature*,**324**, 575-577.
11. Shepherd, J.C., Schumacher, T.N.M., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A., and Tonegawa S., (1993), "TAP-1 dependent peptide translocation in vitro is ATP-dependent and peptide-selective.", *Cell*,**74**, 577-584.
12. Degen, E., and Williams, D.B.,(1991), "Participation of a novel 88kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules.", *J. Cell Biol.*,**112**, 1099-1155.
13. Ortman, B., Androlewicz, M.J., and Cresswell, P., (1994), "MHC class I isol b2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding.", *Nature*,**368**, 864-867.
14. Cresswell, P., (1994), "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules.", *Annu. Rev. Immunol.*,**12**, 259-293.
15. Steinman, R.M., Young, J.W., (1991), "Signals arising from antigen-presenting cells.", *Curr. Opin. Immunol.*,**3**, 361-372.



16. Hathcock, K.S., Laszlo G., Dickler, H.B., (1993), "Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation.", *Science*,**262**, 905-907.
17. Guinan, E.C., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., (1994), "Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity.", *Blood*,**84**, 3261-3282.
18. Schwartz, R.H., (1992), "Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy.", *Cell*,**71**, 1065-1068.
19. Shaw, A.S., and Dustin, M.L., (1997), "Making the T-cell receptor go the distance : a topological view of T-cell activation.", *Immunity*,**6**, 361-369.
20. Benjamini, E., Sunshine, G., and Leskowitz, S., "Immunology, a short course" (*Third edition*).
21. Smith, K.A., (1984), "Interleukin-2.", *Annu. Rev. Immunol*,**2**, 319-333.
22. Clark, E.A., and Ledbetter, J.A., (1994), "How B and T cells talk to each other.", *Nature*,**367**, 425.
23. Durie, F.H., Foy, T.M., Masters, S.R., Laman, J.D., Noelle, R.J., (1994), "The role of CD40 in the regulation of humoral and cell mediated immunity.", *Immunol Today*,**15**, 406.
24. Franks, L.M., and Teich, N.M., "Cellular and molecular biology of cancer", (*Third edition*)
25. Coley, W.B., (1893), "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas : With a report of ten original cases.", *Am. J. Med. Sci.*,**105**, 487-511.
26. Papac, R.J., (1996), "Spontaneous regression of cancer.", *Cancer Treat. Rev.*,**22**, 395-423.
27. Lokich, J., (1997), "Spontaneous regression of metastatic renal cancer. Case report and literature review.", *Am. J. Clin. Oncol.*,**20**, 416-418.
28. Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., et al., (1993), "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,**90**, 3539-3543.
29. Columbek, P.T., Lazenby, A.J., Levitsky, H.I., et al., (1991), "Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4.", *Science*,**254**, 713-716.
30. Huang, A.Y., Golumberk, P., Ahmadzadeh, M., et al., (1994), "Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens.", *Science*,**264**, 961-965.
31. Greten, T.F., and Jaffee, E.M., (1999), "Cancer Vaccines.", *J. Clin. Oncol.*,**17**, 1047-1060.
32. Schoenberger, S.P., Toes, R.E., et al., (1998), "T cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.", *Nature*,**393**, 480-483.
33. Ridge, J.P., Di Rosa F, Matzinger, P., (1998), "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4 T-helper and A T-killer cell.", *Nature*,**393**, 474-478.
34. Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., et al., (1998), "Help for cytotoxic T-cell responses is mediated by CD40 signalling.", *Nature*,**393**, 478-480.
35. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., "Immunology", (Second edition).
36. Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P.F., et al., (2001), "A listing of human tumor antigens recognized by T cells.", *Cancer Immunol. Immunother.*,**50**, 3-15.
37. Smith, C., and Cerundolo, V., (2001), "Immunotherapy of Melanoma.", *Immunology*,**104**, 1-7.



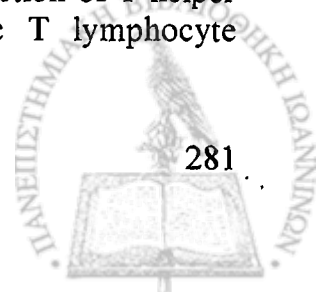
38. Coulie, P.G., Hanagiri, T., (2001), "From tumor antigens to immunotherapy.", *Int. J. Clin. Oncol.*,**6**, 163-170.
39. Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Kawakami, Y., (1996), "Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues.", *Jour. Immun.*, **157**, 2539-2548.
40. Slingluff, C.L., Yamshehikov, G., Neese, P., Galavotti, H., Eastham, S., et al., (2001), "Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100 280-288 peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: Immunologic and clinical outcomes.", *Clin. Cancer Res.*,**7**, 3012-3024.
41. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., et al., (1998), *Nature Med.*,**4**, 321-327.
42. Lethe, B., van der Bruggen, P., Brasseur, F., et al., (1997), "MAGE-1 expression threshold for the lysis of melanoma cell lines by a specific CTL.", *Melanoma*,**7**, S83-S88.
43. Disis, M.L., Smith, J.W., Murphy, A.E., et al., (1994), "In vitro generation of human cytolytic T-cells specific for peptides derived from the HER-2/neu protooncogene protein.", *Cancer Res.*,**54**, 1071-1076.
44. Van der Eynde, B.J., van der Bruggen, P., (1997), "T cell defined tumor antigens.", *Curr. Opin. Immunol.*,**9**, 684-693.
45. Lurquin, C., De Smet, C., Brasseur, F., et al., (1997), "Two members of the human MAGEB gene family located in Xp.21.3 are expressed in tumors of various histological origins.", *Genomics*,**46**, 397-408.
46. Lucas, S., De Smet, C., Arden, K.C., et al., (1998), "Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis.", *Cancer Res.*,**58**, 743-752.
47. Tahara, K., Mori, M., Sadanaga, N., Sakamoto, Y., Kitano, S., Makuuchi, M., (1999), "Expression of MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma.", *Cancer*, **85**, 1234-1240.
48. Brasseur, F., Ritmoldi, D., Lienard, D., Lethe, B., Carrel, S., Arienti, F., et al., (1995), "Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma.", *Int. J. Cancer.*,**63**, 375-380.
49. Patard, J.J., Brasseur, F., Gil-Diez, S., Radvanyi, F., Marchand, M., Franpois, P., et al., (1995), "Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder.", *Int. J. Cancer*,**64**, 60-64.
50. Atanackovic, D., Altorki, N.K., Stockert, E., et al., (2004), "Vaccine-Induced CD4 T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients.", *J. Immunol.*,**172**, 3289-3296.
51. Sadanaga, N., Nagashima, H., Mashino, K., et al., (2001), "Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas.", *Clin. Cancer Res.*,**7**, 2277-2284.
52. Valmori, D., Dutoit, W., et al., (2001), "Frequent cytolytic T cell responses to peptide MAGE-A10<sub>254-262</sub> in melanoma.", *Cancer research*, **61**, 509-512.
53. Russo, V., Tanzarella, S., Dalerba, P., Rigatti, D., et al., (2000), *PNAS*,**97**, 2185-2190.
54. Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., et al., (1999), "Vaccination with MAGE-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.", *J. Exp. Med.*,**190**, 1669-1678.



55. Reynolds, S.R., Oratz, R., Shapiro, R., Hao, P., Yun, Z. et al., (1997), *Int. J. Cancer*, **72**, 972-976.
56. Celis, E., Tsai, V., Crimi, C., Denars, R., et al., (1994), "Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2105-2109.
57. Gaugler, B., van den Eynde, B., van der Bruggen, P., et al., (1994), "Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes.", *J. Exp. Med.*, **179**, 921.
58. Herman, J., van der Bruggen, P., Luescher, I., et al., (1996), "A peptide encoded by the human MAGE 3 gene and presented by HLA-B44 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE 3." *Immunogenetics*, **43**, 377.
59. Schultz, E. S., Zhang, Y., Knowles, R., Tine, J., Traversari, T., Boon, P., van der Bruggen., 2001, " A MAGE-3 peptide recognized on HLA-B35 and HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes. " *Tissue Antigens*, **57**, 103.
60. Marchand, M., Weynants, P., Rankin, E., Arienti, F., Belli, F., Parmiani, G., Cascinelli, N., Bourlond, A., Vanwijck, R., Humblet, Y., et al., (1995), "Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3." *Int.J.Cancer.*, **63**, 883.
61. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M.H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., et al., (1999), "Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1." *Int. J. Cancer.*, **80**, 219.
62. Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D., (1998), "Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate- pulsed dendritic cells", *Nat. Med.*, **4**, 328.
63. Schultz, E.S., Chapiro, J., Lurquin, C., Claverol, S., Burlet-Schiltz, O., Warnier, G., Russo, V., Morel, S., Levy, F., Boon, T., van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P., (2002), "The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome." *J.Exp.Med.*, **18**, 391.
64. Karine Breckopt et al., (2004), "Identification of new antigenic peptide presented by HLA-Cw7 and encoded by several MAGE genes using dendritic cells transduced with Lentiviruses." *J.Immunol.*, **172**, 2232-2237.
65. Masatake Oiso et al., (1999), "A newly identified MAGE-3 derived epitope recognized by HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes." *Int.J.Cancer*, **81**, 387-394.
66. Goedegebuure, P.S., and Eberlein, T.J., (1995), "The role of CD4 tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumours." *Immunol. Res.*, **14**, 119.
67. Maccalli, C., Mortarini, R., Parmiani, G., and Anichini, A., (1994), "Multiple subsets of CD4 and CD8 cytotoxic T-cell clones directed to autologous human melanoma identified by cytokine profiles." *Int. J. Cancer.*, **57**, 56.
68. Sahin, U., Tureci, O., and Pfreundschuh, M., (1997), "Serological identification of human tumor antigens." *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 709.
69. Manici, S., Sturniolo, T., Imro, M.A., Hammer, J., Sinigaglia, T., Noppen, C., Spagnoli, G., Mazzi, B., Dellabona, P., and Protti, M.P., (1999), "Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4 cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11." *J. Exp. Med.*, **189**, 871.



9. Chaux, P., Vantomme, V., Stroobant, V., Thielemans, K., Corthals, J., Luiten, R., Eggermont, A.M.M., Boon, T., van der Bruggen, P., (1999), "Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4 T lymphocytes." *J. Exp. Med.*, **189**, 391.
71. Consogno, G., Manici, S., Facchinetti, V., Bachi, A., Hammer, J., Conti-Fine, B.M., Rugarli, C., Traversari, C., Protti, M.P., (2003), "Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4 T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3." *Blood.*, **101**, 1038.
72. Yi Zhang et al., (2003), "A MAGE-3 peptide presented by HLA-DR1 to CD4<sup>+</sup> T cells that were isolated from a melanoma patient vaccinated with a MAGE-3 protein." *J.Immunol.*, **171**, 219-225.
73. Ewrin S. Schultz et al., (2004), "Functional analysis of tumor-specific Th cell responses detected in melanoma patients after dendritic cell-based immunotherapy." *J.Immunol.*, **172**, 1304-1310.
74. Susanne Osanto, (1997), "Vaccine trials for the clinician: Prospects for tumor antigens.", *The Oncologist*, **2**, 284-299.
75. Berzofsky, J.A., Terabe, M., Oh S., Belyakov, I.M., Ahlers, J.D., Janik, J.E., and Morris, J.C., (2004), "Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer.", *J. Clin. Invest.* ,**113**, 1515-1525.
76. Buteau, C., Markovic, S.N., Celis, E., (2002), "Challenges in the development of effective peptide vaccines for cancer.", *Mayo Clin. Proc.* ,**77**, 339-349.
77. Renkvist, N., Castelli, C. Robbins, P.F., Parmiani, G., (2001), "A listing of human tumor antigens recognized by T cells." *Cancer Immunol. Immunother.* ,**50**, 3-15.
78. Rammense, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A., Stevanovic, S., "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs.", *Immunogenetics*,**50**, 213-219.
79. Boon, T., De Plaen, E., Lurquin, C., et al., (1992), "Identification of tumor rejection antigens recognized by T lymphocytes.", *Cancer Surv.*,**13**, 23-37.
80. Kawakami, Y., Nishimura, M.I., Restifo, N.P., et al.,(1993), "T cell recognition of human melanoma antigens.", *J. Immunoth.*,**14**, 88-93.
81. Slingluff, C.L., Hunt, D.F., Engelhard, V.H., (1994), "Direct analysis of tumor-associated peptide antigens.", *Curr. Opin. Immunol.*,**6**, 733-740.
82. Celis, E., Sette, A., Grey, H.M., (1995), "Epitope selection and development of peptide based vaccines to treat cancer.", *Semin. Cancer Biol.*,**6**, 329-336.
83. Tsai, V., Kawashima, I., Keogh, E., Daly, K., Sette, A., Celis, E., (1998), "In vitro immunization and expansion of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive immunotherapy using peptide-pulsed dendritic cells." *Crit. Rev. Immunol.*,**18**, 65-75.
84. Rammensee, H.G., Falk, K., Rotzschke, O., (1993), "Peptides naturally presented by MHC class I molecules.", *Annu. Rev. Immunol.* ,**11**, 213-244.
85. Rammensee, H.G., Falk, K., Rotzschke, O., (1993), "MHC molecules as peptide receptors.", *Curr. Opin. Immunol.*,**5**, 35-44.
86. Weber, J.S., Hua, F.L., Spears, L., Marty, V., Kuniyoshi, C., Celis, E., (1999), "A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected highriskmelanoma.", *J Immunother.*,**22**,431-440.
87. Rensing, M.E., van Driel, W.J., Brandt, R.M., et al., (2000), "Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte





- responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma.", *J Immunother.*,**23**,255-266.
88. Steller, M.A., Gurski, K.J., Murakami, M., et al., (1998), "Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7.", *Clin Cancer Res.*,**4**,2103-2109.
  89. Marchand, M., Weynants, P., Rankin, E., et al., (1995), "Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3 [letter].", *Int J Cancer.*,**63**,883-885.
  90. Zaks, T.Z., Rosenberg, S.A., (1998), "Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/*neu* leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/*neu*+ tumors.", *Cancer Res.*,**58**,4902-4908.
  91. Medzhitov, R., Janeway, C., (2000), "Innate immune recognition: mechanisms and pathways.", *Immunol Rev.*,**173**,89-97.
  92. Matzinger, P., (1994), "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol.*,**12**,991-1045.
  93. Gallucci, S., Lolkema, M., Matzinger, P., (1999), "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells.", *Nat Med.*,**5**,1249-1255.
  94. Lipford, G.B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H., Heeg, K., (1997), "CpGcontaining synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants.", *Eur J Immunol.*,**27**,2340-2344.
  95. Weiner, G.J., Liu, H.M., Wooldridge, J.E., Dahle, C.E., Krieg, A.M., (1997), "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*,**94**,10833-10837.
  96. Davila, E., Celis, E., (2000), "Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity.", *J Immunol.*,**165**,539-547.
  97. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., et al., (1998), "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma.", *Nat Med.*,**4**,321-327.
  98. McNeel, D.G., Schiffman, K., Disis, M.L., (1999), "Immunization with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a vaccine adjuvant elicits both a cellular and humoral response to recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.", *Blood.*,**93**,2653-2659.
  99. Disis, M.L., Grabstein, K.H., Sleath, P.R., Cheever, M.A., (1999), "Generation of immunity to the HER-2/*neu* oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine.", *Clin Cancer Res.*,**5**, 1289-1297.
  100. Jager, E., Ringhoffer, M., Dienes, H.P., et al., (1996), "Granulocyte-macrophagecolony- stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo." *Int J Cancer.*,**67**,54-62.
  101. Lee, P., Wang, F., Kuniyoshi, J., et al., (2001), "Effects of interleukin-12 on the immune response to a multi-peptide vaccine for resected metastatic melanoma.", *J Clin Oncol.*,**19**,3836-3847.
  102. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., et al., (1999), "Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine.", *J Immunol.*,**163**,1690-1695.



103. Kawashima, I., Hudson, S.J., Tsai, V., et al., (1998), "The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors.", *Hum Immunol.*,**59**, 1-14.
104. Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., et al., (1996), "Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues.", *J Immunol.*,**157**, 2539-2548.
105. Sette, A., Vitiello, A., Reherman, B., et al., (1994), "The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes.", *J Immunol.*,**153**, 5586-5592.
106. Zaremba, S., Barzaga, E., Zhu, M., Soares, N., Tsang, K.Y., Schlom, (1997), "Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen.", *Cancer Res.*,**57**,4570-4577.
107. Zugel, U., Wang, R., Shih, G., Sette, A., Alexander, J., Grey, H.M., (1998), "Termination of peripheral tolerance to a T cell epitope by heteroclitic antigen analogues.", *J Immunol.*,**161**,1705-1709.
108. Tangri, S., Ishioka, G.Y., Huang, X., et al., (2001), "Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide.", *J Exp Med.*,**194**,833-846.
109. Clay, T.M., Custer, M.C., McKee, M.D., et al., (1999), "Changes in the fine specificity of gp100(209-217)-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.1 anchor residue.", *J Immunol.*,**162**,1749-1755.
110. Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C., (1979), "MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness.", *Adv Immunol.*,**27**, 51-177.
111. Sette, A., Sidney, J., (1999), "Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism.", *Immunogenetics.*,**50**, 201-212.
112. Southwood, S., Sidney, J., Kondo, A., et al., (1998), "Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires.", *J Immunol.*,**160**,3363-3373.
113. Weiskirch, L.M., Bar-Dagan, Y., Mokyr, M.B., (1994), "Transforming growth factor-beta-mediated down-regulation of antitumor cytotoxicity of spleen cells from MOPC-315 tumor-bearing mice engaged in tumor eradication following low-dose melphalan therapy.", *Cancer Immunol. Immunother.*,**38**, 215-224.
114. Torre-Amione, G., Beauchamp, R.D., Koeppen, H., et al., (1990), "A highly immunogenic tumor transfected with murine transforming growth factor type beta1 cDNA escapes immune surveillance.", *Proc Natl Acad Sci US A.*,**87**,1486-1490.
115. Matsuda, M., Salazar, F., Petersson, M., et al., (1994), "Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression.", *J Exp Med.*,**180**,2371-2376.
116. Kim, J., Modlin, R.L., Moy, R.L., et al., (1995), "IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas: a mechanism for evading the local T cell immune response.", *J Immunol.*,**155**,2240-2247.
117. Ferrone, S., Marincola, F.M., (1995), "Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance.", *Immunol Today.*,**16**,487-494.

118. Melief, C.J., Kast, W.M., (1991), "Cytotoxic T lymphocyte therapy of cancer and tumor escape mechanisms.", *Semin Cancer Biol.*, **2**, 347-354.

## 18.2 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 2

1. Arnon, R., Maron, E., Sela, M., Anfinsen, C.B., (1971), "Antibodies reactive with native lysozyme elicited by a completely synthetic antigen.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **8**, 1450-1455.
2. Tam, J.P., (1996), "Recent advances in multiple antigen peptides.", *J. Immunol. Meth.*, **196**, 17-32.
3. Veprek, P., Jezek, J., (1999), "Peptide and glycopeptide dendrimers. Part I.", *J. Pept. Sci.*, **5**, 203-220.
4. Veprek, P., Jezek, J., (1999), "Peptide and glycopeptide dendrimers. Part II.", *J. Pept. Sci.*, **5**, 203-220.
5. Tuchscherer, G., Mutter, M., (1995), "Templates in protein de novo design.", *J. Biotechn.*, **41**, 197-210.
6. Sakarellos-Daitsiotis, M., Tsikaris, V., Vlachoyiannopoulos, P.G., Tzioufas, A.G., Moutsopoulos, H.M. and Sakarellos, C., (1999), "Peptide carriers: A helicoids-type sequential oligopeptide carrier (SOCn) for multiple anchoring of antigenic/immunogenic peptides.", *Methods (San Diego)*, **19**, 133-141.
7. Sakarellos-Daitsiotis, M., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Vlachoyiannopoulos, P.G., Tzioufas, A.G., and Moutsopoulos, H.M., (1999), "A new helicoids-type sequential oligopeptide carrier (SOCn) for developing potent antigens and immunogens.", *Vaccine*, **18**, 302-310.
8. Tsikaris, V., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., Orlewski, P., Marraud, M., Cung, M.T., Vatzaki, E. and Tzartos, S., (1996), "Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOCn) for multiple anchoring of antigenic peptides-application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region.", *Int. J. Biol. Macromol.*, **19**, 195-205.
9. Tsikaris, V., Sakarellos, C., Cung, M.T., Marraud, M., Sakarellos-Daitsiotis, M., (1996), "Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides.", *Biopolymers*, **38**, 291-293.
10. Vlachoyiannopoulos, P. G., Petrovas, C., Tzioufas, A.G., Alexopoulos. C., Tsikaris, V., Guialis, A., Nakopoulou, L., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Davaris et al., (2000), "No evidence of epitope spreading after immunization with the major Sm epitope P-P-G-M-R-P-P anchored to sequential oligopeptide carriers (SOCs).", *J. Autoimmun.*, **14**, 53-61.
11. Petrovas, C.J., Vlachoyiannopoulos, P. G., Tzioufas, A.G., Alexopoulos. C., Tsikaris, V., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Moutsopoulos, H.M., (1998), "A major Sm epitope anchored to sequential oligopeptide carriers is a suitable antigenic substrate to detect anti-Sm antibodies.", *J. Immunol. Meth.*, **220**, 59-68.
12. Alexopoulos. C., Tsikaris, V., Rizou, C., Panou-pomonis, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Vlachoyiannopoulos, P. G., Moutsopoulos, H.M., (2001), "A diepitopic sequential oligopeptide carrier (SOCn) as mimic of the Sm autoantigen; synthesis, conformation and biological assays.", *J. Pept. Sci.*, **7**, 105-114.
13. Yiannaki, E.E., Tzioufas, A.G., Bachmann, M., Hantoumi, J., Tsikaris, V., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Moutsopoulos, H.M., (1998), "The value of synthetic linear epitope analogues of La/SSB for the detection of autoantibodies to



- La/SSB ; specificity, sensitivity and comparison of methods.", *Clin. Exp. Immunol.*, **112**, 152-158.
14. Tam, J.P., (1988), "Synthetic peptide vaccine design; synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5409-5413.
  15. Tam, J.P., and Zavala, F.J., (1989), "Multiple antigen peptide. A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays.", *J. Immunol. Methods*, **124**, 53-61.
  16. Sinnis, P., Rose, K.A., Graham, S., Chan, S.W., McOmich F., Dow, B., Follet, E.A., Yap, P., and Marsden, H., (1994), "Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein.", *J. Exp. Med.*, **180**, 297-306.
  17. Hahn, K.W., Klis, W.A., and Stewart, J. M., (1990), "Design and synthesis of a peptide having chymotrypsin-like esterase activity.", *Science*, **248**, 1544-1547.
  18. Sheldon, K., Liu, D., Ferguson, J., and Garipey, J., (1995), "Lologomers: design of de novo peptide-based intracellular vehicles.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2056-2060.
  19. Tam, J.P., and Spetzler, J.C., (1997), "Multiple antigen peptide system.", *Methods Enzymol.* , **289**, 612-637.
  20. Basak, A., Boudreault, A., Chen, A., Chretien, M., Seidah, N.G., and Lazure, C., (1995), "Application of the multiple antigenic peptides ( MAP ) strategy to the production of prohormone convertases antibodies: synthesis, characterization and use of 8-branched immunogenic peptides.", *J. Pept. Sci.*, **1**, 385-395.
  21. Alexopoulos, C., Krikorian, D., Panou-Pomonis, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., and Sakarellos, C., (2005), "Innovative, multifunctional Sequential Oligopeptide Carriers SOCn-I and SOCn-II: Functions-Technology-Perspectives", *Protein and Peptide Letters*, **12**, 601-607.
  22. Sakarellos-Daitsiotis, M., Krikorian, D., Panou-Pomonis, E., and Sakarellos, C., (2006), "Artificial Carriers: A strategy for constructing antigenic/immunogenic conjugates" , *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **6**, 1715-1735.
  23. Alexopoulos. C., Tsikaris, V., Rizou, Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Cung, M.T., Marraud, M., Vlachoyiannopoulos, P.G., Moutsopoulos, H.M., (2000), "The position of the LysN epsilon H2-grafted antigens along the sequential oligopeptide carrier, Ac-( Aib-Lys-Aib-Gly)n ( SOCn-II), influences the antibody recognition: application to the Sm main autoimmune epitope.", *Biopolymers*, **54**, 1-10.

### 18.3 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 3

1. Ficher, E. & Fourneau, E., (1901), "Ueber einige Derivate des Glykokolls.", *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **34**, 2868-2879.
2. McKay, F.C. & Alberston, N.F., (1957), "New amine -masking groups for peptide synthesis.", *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4686-4690.
3. Carpino, L.A. & Han, G.Y., (1970), "The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group.", *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5748-5749.
4. Sheehan, J.C. & Hess, G.P., (1955), "A new method of forming peptide bonds.", *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1067-1068.
5. Khorana, H.G., (1955), "The use of dicyclohexylcarbodiimide in the synthesis of peptides.", *Chem. Ind. (London)*, **33**, 1087-1088.



6. Merrifield, R.B., (1963), "Solid phase peptide synthesis. I. the synthesis of a tetrapeptide.", *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154.
7. Wunsch, E., (1974), "Synthese von Peptide in Houben-Weyls Methoden Der Organischen Chemie, (muler, E., ed)." vol. 15, 4th edn, Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart.
8. Bodanszky, M., (1984), "Principles of Peptide Synthesis." Springer-Verlag, Heidelberg.
9. Bodanszky, M. and Bodanszky, A., (1984), "The Practice of Peptide Synthesis.", Springer-Verlag, Heidelberg.
10. Bodanszky, M., (1985), "In search on new methods in peptide synthesis. A review of the last three decades.", *Int.J.Pept.Protein Res.*, **25**, 449-474.
11. Miklos, Bodanzky, (1993), "Peptide Chemistry : A Practical Textbook , (*Second Rev. Edition*).", Springer Verlag, New York.
12. Sager, C., Mutter, M., and Dungs, P., (1999), "Influence of cis-trans isomerisation on pentapeptide cyclisation." , *Tetrahedron Lett.*, **40**, 7987-7991.
13. Pal, D., and Chakrabarti, P., (1999), "Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations." , *J. Mol. Biol.*, **194**, 271-288.
14. 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.
15. Barany, G. and Merrifield, R.B., (1979), "Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.", *Analysis, Synthesis, Biology.*, Vol.2 ,Academic Press, New York, 1.
16. Bergman, M. and Zervas, L., (1932), "Max Bergmann and Leonidas Zervas: Ueber ein allgemeines Verfahren der Peptide-Synthese." , *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* , **65**, 1192-1201.
17. Munson, M. And Barany, G., (1993), "Synthesis of a-conotoxin, a bicyclic tridecapeptide amide with two disulfide bridges: illustration of novel protection schemes and oxidation strategies.", *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10203-10210.
18. 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.
19. Kamber, B. and Rittel, W., (1968), "Eine neue, einfache methode zur synthese von cystinpeptiden." , *Helv. Chim. Acta.*, **51**, 2061-2064.
20. Kunz, H. And Unversagt, C., (1984), "The allyloxycarbonyl (Alloc) moiety-conversion of an unsuitable into a valuable amino protecting group for peptide synthesis." , *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* , **23**, 436-437
21. Anuradha, V.M. and Ravindranath, B., (1995), "Ultrasound in Peptide Synthesis 3<sup>1</sup> Zinc-Salt assisted anchoring of carboxylic acids to Merrifield resin." , *Tetrahedron*, **51**, 5671-5674.
22. Loffet, A., (1967), "Synthesis of a pentapeptide by the Merrifield method." , *Experientia*, **23**, 406-407.
23. 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.
24. Mitchell, A.R., Erickson, B.W., Ryabtsev, M.V., Hodges, R.S. and Merrifield, R.B., (1976), tert-butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl) phenylacetamidomethyl-resin, a more acid resistant support for solid phase peptide synthesis." , *J. Am. Chem. Soc.* , **98**, 7357-7362.
25. Nash I. A., et. al., (1996), *Tetrahedron Lett.*, **37**, p.2625.



26. Matsueda, R.G. and Stewart, J.M., (1981), "A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides.", *Peptides* ,**2**, 45-50.
27. 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.
28. 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.
29. Albericio, F. and Barany, G., (1984), "Application of N,N dimethylformamide dimeopentyl acetal for efficient anchoring of N<sup>α</sup>-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids as p-alkoxybenzyl esters in solid phase peptide synthesis.", *Int. J. Pept. Protein. Res.* ,**23**, 342-349.
30. Rink, H., (1987), "Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin.", *Tetrahedron Lett.* ,**28**, 3787-3790.
31. 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.
32. 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.
33. Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, G. and Stavropoulos, G., (1991) "2-Chlorotritylchloride resin.", *Int. J. Pep. Protein. Res.* ,**37**, 513-520.
34. Barlos, K., Gatos, D., Kapos, S., Papaphotiu G., Schafer W. And Wenqing Y., (1989), "Veresterung von partiell geschutzten peptid-fragmenten mit harzen. Einsatz von 2-chlortritylchlorid zur synthese von Leu-gastrin I.", *Tetrahedron Lett.* ,**30**, 3947-3950.
35. Barany, G. And Merrifield, R.B., (1977), "A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of dithiasuccinoyl (Dts) function." *J. Am. Chem. Soc.* ,**99**, 7363-7365.
36. Barany, G. and Albericio, F., (1985), "A three-dimensional orthogonal protection scheme for solid phase peptide synthesis under mild conditions.", *J. Am. Chem. Soc.* ,**107**, 4936-4962.
37. 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.
38. Ramachandram, J. and Li, C.H., (1962), *J. Org. Chem.* ,**27**, 4006-4009.
39. Fujino, M., Nishimura, O., Wakimasu. And Kitada, C., (1980), "4-methoxy-2,6-dimethylbenzenesulphonyl (Mds) : a new protecting group of guanidine function in peptide synthesis.", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* ,**2**, 668-671.
40. Green, J., Ogunjobi, O. M., Ramage, R., Stewart, S., McCurdy, A. S.J. and Noble, R., (1988), "Application of the N<sup>G</sup>-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl)derivative of Fmoc-arginine to peptide synthesis.", *Tetrahedron Lett.* ,**29**, 4341-4344.
41. 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.
42. Ramage, R., Green, J. and Blake, A.J., (1991), "An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: N<sup>G</sup>-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine.", *Tetrahedron* ,**47**, 6353-6370.

43. Munson, M. and Barany, G., (1993), "Synthesis of  $\alpha$ -conotoxin, a bicyclic tridecapeptide amide with two disulfide bridges: illustration of novel protection schemes and oxidation strategies.", *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10203-10210.
44. Zervas, L. and Theodoropoulos, D. M., (1956), "N-tritylamino acids and a-peptides. A new method of Peptide Synthesis." *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1359-1363.
45. Kamber, B. and Rittel, W., (1968), "Eine neue, einfache methode zur synthese von cystinpeptiden.", *Helv. Chim. Acta.*, **51**, 2061-2064.
46. Shimonishi, Y., Sakakibara, S. And Akabori, S., (1962), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **35**, 1966-1970.
47. 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.
48. Nicolas, E., Pedroso, E. and Giral, E., (1980), "Formation of aspartimide peptides in Asp-Gly sequences.", *Tetrahedron Lett.*, **30**, 497-500.
49. Chang, C.D., Waki, M., Ahmad, M., Meienhorner, J., Lundell, E.Q. and Hang, J.D., (1980), "Preparation and properties of N<sup>9</sup>-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert-butyl side chain protection .", *Int. J. Protein. Res.*, **15**, 59-66.
50. Kates, S.A., Sole, N.A., Johnson, C.R., Hudson, D., Barany, G. and Alberidio, F., (1993), "A novel, convenient , three-dimensional orthogonal strategy for solid-phase synthesis of cyclic peptides.", *Tetrahedron Lett.*, **34**, 1549-1552.
51. Bodanszky, M. and Bednarek, M.A., (1982), "Derivatives of S-9-fluorenylmethyl-L-cysteine.", *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **20**, 434-437.
52. Akabori, S., Sakakibara, S., Shimomishi, Y. and Nobuhara, Y., (1964), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **37**, 1964-1972.
53. Sieber, P. and Riniker, B., (1991), "Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis.", *Tetrahedron Lett.*, **32**, 739-742.
54. Brown, T. and Jones, J.H., (1981), "Protection of histidine side chains with p-benzylomethyl or p-bromobenzylomethyl groups.", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 648-649.
55. Van der Eijik, J.M., Nolte, R.J.M. and Zwicker, J.W., (1980), "Simple and mild method for the removal of N<sup>tm</sup>-Tosyl protecting group.", *J. Org. Chem.*, **45**, 547-548.
56. Chillemi, F. and Merrifield, R.B., (1969), "Use of N<sup>tm</sup>-Dinitrophenylhistidine in the solid phase synthesis of tricosapeptides 124-146 of human haemoglobin  $\beta$ -chain.", *Biochemistry.*, **8**, 4344-4346.
57. Pessi, A., Mancini, V., Filtri, P. and Chiappinelli, L., (1992), "Side reactions in solid phase synthesis of histidine-containing peptides. Characterization of two major impurities by sample displacement chromatography and FAB\_MS.", *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **39**, 58-62.
58. Sieber, P. and Riniker, B., (1987), "Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group.", *Tetrahedron Lett.*, **28**, 6031-6034.
59. Bergman, M. and Zervas, L., (1932), "Max Bergmann and Leonidas Zervas: Ueber ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese.", *Ber. Deutsc. Chem. Ges.*, **65**, 1192-1201.
60. Erickson, B.W. and Merrifield, R.B., (1973), "Use of chlorinated benzyloxycarbonyl protecting groups to eliminate N<sup>6</sup>-branching at lysine during solid phase peptide synthesis.", *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3757-3763.
61. 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.



62. Adamson, J.G., Blaskowitch, M.A., Groenvelt, 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.
63. Yamashiro, D. and Li, C.H., (1973), "Protection of tryptophan with the formyl group in peptide synthesis.", *J. Org. Chem.*, **38**, 2594-2597.
64. 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.
65. 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.
66. Castro, B., Dormoy, J.R., Evin, G. and Selve, C., (1975), "Reactifs de couplage peptidique I(1)-1' hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (BOP).", *Tetrahedron Lett.*, **16**, 1219-1222.
67. Castro, B., Dourtoglou, B., Dormay, J.R., Evin, G., Selve, C. and Ziegler, J.C., (1976), "Peptide coupling reagents. VI. A novel, cheaper preparation of benzotriazolylloxytris [diméthylamino] phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent).", *Synthesis*, **18**, 751-752.
68. Coste, J., Le Nguyen, D. and Castro, B., (1990), "PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product.", *Tetrahedron Lett.*, **31**, 205-208.
69. Hoeg-Jensen, T., Jakobsen, M.H., Olsen, C.E. and Holm, A., (1991), "Formation of peptide thioamides by use of Fmoc amino monothioacids and PyBOP.", *Tetrahedron Lett.*, **32**, 7617-7620.
70. Dourtoglou, V., Ziegler, Z.C. and Gross, B., (1979), "A new method of glycosylation: anomeric hydroxyl activation by iminium salts.", *Tetrahedron Lett.*, **45**, 4367-4370.
71. Bernatowiz, 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.
72. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannawarth, W. and Gillsen, D., (1989), "New coupling reagents in peptide chemistry.", *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1927-1930.
73. Dourtoglou, V., Gross, B., Lambropoulou, V. and Ziodrou, C., (1984), "O-Benzotriazolyl-N, N, N', N'-tetramethyloronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest.", *Synthesis*, 572-574.
74. König, W. and Greiger, R., (1970), "Eine neue methode zur synthese von peptiden: Aktivierung der carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen.", *Chem. Ber.*, **103**, 788-798.
75. König, W. And Greiger, R., (1973), "N-Hydroxyverbindungen als katalysatoren für die aminolyse aktivierter ester.", *Chem. Ber.*, **106**, 3626-3635.
76. Prasad, K.U., Iqbal, M.A. and Urry, D.W., (1985), "Utilization of 1-Hydroxybenzotriazole in mixed anhydride coupling reactions.", *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **25**, 408-413.
77. Carpino, L.A., (1993), "1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive.", *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397-4398.
78. Angell, Y.M., Garcia-Echeverria, C. and Rink, D.H., (1994), "Comparative studies of coupling of N-methylated, sterically hindered amino acids during solid-phase peptide synthesis.", *Tetrahedron Lett.*, **35**, 5981-5984.



79. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., *Anal. Biochem.*, **34** (1970) 595.
80. Fields G.B, Fields C.G. (1991) "Solvation effects in solid-phase peptide synthesis." *J. J. Amer. Chem. Soc.*, **113**, 4202-07.
81. Cilli E.M., Oliveira E., Marchetto R., Nakaie C.R. (1996) "Correlation between solvation of peptide resins and solvent properties." *J. Org. Chem.* **61**, 8992-9000.
82. Albericio, F., Kneib-Cordonier, N., Biancalana, S., Gera, L., Masada, R.I., Hudson, D. and Barany, G., (1990), "Preparation and application of the 5-(4-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl) aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy-valeric acid (PAL) handle for the synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions.", *J. Org. Chem.*, **55**, 3730-3743.
83. King D.S., et. al., (1990), *Iny. J. Peptide. Protein. Res.*, **36**, p255.

#### 18.4 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 4

1. Hearn, M., T., W., Grego, B., (1984) "High-Performance Liquid-Chromatography of amino-acids, Peptides and Proteins .56. Detergent-mediated Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography of polypeptides and proteins." *J. Chromatogr.*, **296**, 309-319.
2. Colin T. Mant and Robert S. Hodges, (1991) "High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and proteins: Separation, Analysis and Conformation" CRC Press, Inc., 2000 Corporate Blvd, N.W., Boca Rata, Florida.
3. ELV Harris and S Angal, (*First edition 1989, Reprinted 1990*), "Protein purification methods"
4. C K Lim, (1986) "HPLC of small molecules a practical approach"
5. Lightstone F.C., Prieto M.C., Singh A.K., Piqueras M.C., Whittal R.M., Knapp M.S., Balhorn R. and Roe D.C. (2000) "Identification of Novel Small Molecules Ligands That Bind to Tetanus Toxin" *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 356-362.
6. Caprioli, M.R., Malorni, A., and Sindona, G., (1993) "Mass Spectrometry in Biomolecular Sciences", Kluwer Academic Publishers.
7. Hoffmann E. De, Charette J., Stroobant V., (1996) "Mass Spectrometry-Principles and Applications"
8. Ashcroft, A.E., (2000) "Ionization Methods in Organic Mass Spectroscopy", RSC Analytical Spectroscopy Monographs, Series Editor: Neil W. Barnett.
9. Rose, M.E., Johnstone, R.A., (1982) "Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists" Cambridge University Press, Cambridge, UK.
10. Chapman, J.R., (1994) "Practical Organic Mass Spectroscopy", John Willey and Sons, Chichester, UK, 2<sup>nd</sup>.
11. Carrol, J.A., and Beavis, R.C., (1996) "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization", Laser Desorption and Ablation, eds: Miller, J.C., Haglund, R.F., 7
12. Iribane, J.V., and Thomas, B.A., (1976) "On the evaporation of small ions from charged droplets" *J. Chem. Phys.*, **64**, p.2287.



## 18.5 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 5

1. Adler, A.J., Greenfield, N.J., and Fasman, G.D., (1973), "Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides" *Meth. Enzymol.*, **27**, 675-735.
2. Chou, P., Y., and Fasman, G., D., (1974), "Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins" *Biochemistry*, **13**, 211
3. Chou, P., Y., and Fasman, G., D., (1974), "Prediction of protein conformation" *Biochemistry*, **13**, 222
4. Cernosek, S., F., Malin, Jr., M., and Weels, M., and Fasman, G., D., (1974), "Synthesis and conformational studies of model histones." Sequential and random polypeptides with the composition L-lysyl-L-alanyl-glycine *Biochemistry*, **13**, 1252"
5. Yamamoto, H., and Hayakawa, T., (1983), "Conformational studies of sequential polypeptides containing L- $\beta$ -(3,4-dihydroxyphenyl)- $\alpha$ -alanine (Dopa) and L-lysine" *Macromolecules*, **16**, 1058
6. Stryer, L., "Biochemistry", (Third edition).
7. Applequist, J., (1979), *J. Chem. Phys.*, **71**, 2297-2304.
8. Woody, R.W., and Tinoco, I., (1967), "Optical rotation of oriented helices.III. Calculation of the Rotatory dispersion and circular dichroism of the alpha-and  $3_{10}$ -helix" *J. Chem. Phys.*, **46**, 4927-4945.
9. Bazzi, M., D., and Woody, R., W., (1985), "Oriented secondary structure in integral membrane proteins. I. Circular dichroism and infrared spectroscopy of cytochrome oxidase in multilamellar films." *Biophys. J.*, **48**, 957-966.
10. Ólah, G., A., and Huang, H., W., (1988), "Circular dichroism of oriented  $\alpha$  helices.I. Proof of the exciton theory" *J. Chem. Phys.*, **89**, 2531-2538.
11. Olah, G., A., and Huang, H., W., (1988), "Circular dichroism of oriented  $\alpha$ -helices.II. Electric field oriented polypeptides" *J. Chem. Phys.*, **89**, 6956-6962.
12. Moffitt, W., (1956), "Optical Rotatory dispersion of helical polymers" *J. Chem. Phys.*, **25**, 467-478.
13. Madison, V., and Schellman, J.A., (1972), "Optical activity of polypeptides and proteins.", *Biopolymers*, **11**, 1041-1076.
14. Woody, R.W., (1993), "The circular dichroism of oriented  $\beta$  sheets : theoretical predictions" *Tetrahedr. Asymm.*, **4**, 529-544.
15. Woody, R.W., (1977), "Optical rotatory properties of biopolymers" *J. Polym. Sci. Macromol.*, **12**, 181-321.
16. Woody, R., W., (1996), "Optical properties of polypeptides in the  $\beta$ -conformation", *Biopolymers*, **8**, 669-683.
17. Woody, R.W., (1974), "Peptides, Polypeptides and Proteins.", *Wiley-Interscience, New York*, pp. 338-350.
18. Woody, R.W., (1992), "Circular dichroism and conformation of unordered polypeptides" *Adv. Biophys. Chem.*, **2**, 37-79.

## 18.6 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 6

1. Minsky, M., "Memoir on inventing the confocal microscopy", (1988), *Scanning*, **10**, 128-138.
2. Guilbault, G. "General aspects of luminescence spectroscopy. In *Practical Fluorescence*", (2<sup>nd</sup>) Ed, Inc.: New York, 1990; 1-40.
3. Atkins, P., "Spectroscopy 2: electronic transitions. " In *Physical Chemistry*, 5th Ed.; W. H. Freeman and Company: New York, 1994; 590-622.
4. Tsien, R.Y.; Waggoner, A., "Fluorophores for confocal microscopy. " In *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd Ed.; Pawley, J.B., Ed.; Plenum Press: New York, 1995; 267-280.
5. Semwogenere, D., and Weeks, E., "Confocal Microscopy", Emory University, Atlanta, Georgia, U.S.A., *Encyclopedia of Biomedical Engineering*.
6. Claxton, N., Fellers, T., and Davidson, M., "Laser Scanning Confocal Microscopy",

## 18.7 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 7

1. Janeway, C., Travers, P., " *Immunology Biology*", (second edition).
2. Alice L. Givan. Wiley "Flow Cytometry: First Principles", (second edition).

## 18.8 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 8

1. Engvall, E., (1980) " Enzyme immunoassay ELISA and EMIT". *Methods Enzymol.* **70(A)**, 419.
2. Engvall, E. and Perlmann, P., (1971) "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." *Immunochemistry.*, **8**, 871
3. Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. (1990). "Ανοσοενζυμικές Τεχνικές" Αβραμέας. Αθήνα. 61.
4. Perlmann, H. and Perlmann, P. (1994). "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. " *In: Cell Biology: A Laboratory Handbook. San Diego, CA, Academic Press, Inc.* 322.
5. Crowther, J.R. (1995). "ELISA: Theory and Practice. " *Methods in Molecular Biology*". Humana Press, Totowa, NJ. 42.
6. Harlow, E. and Lane, D. (1988). " *Antibodies: A Laboratory Manual.* " *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.* 553.
7. " *Introduction to Antibodies*" Copyright (1998) by CHEMICON International, Inc.

## 18.10 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 10

1. Stewart, J., and Young, J., (1994), "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.
2. Atherton, E., and Sheppard, R.C.,(1989), " Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", IRL Press, Oxford, England.
3. Merrifield, R.B., (1997), "Concept and early development of solid-phase peptide synthesis.", *Methods Enzymol.*, **289**,3-13.
4. Fields, G.B., and Noble, R.L., (1990), "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonylamino acids.", *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**,161-214.



5. Wellings, D.A., and Atherton, E., (1997), "Standard Fmoc Protocols.", *Methods Enzymol.*,**289**,44-67.
6. Atherton, E., and Sheppard, R.C.,(1987), The peptides: "Analysis, synthesis, biology.", *Undenfriend, S., and Meienhofer, J., (Eds)*, **9**, Academic Press, New York.
7. Konig, W., and Geiger, R., (1970), "Racemization in peptide synthesis.", *Chem. Ber.*,**103**,788-789.
8. Mojsov, S., Mitchell, A.R., and Merrifield, R.B., (1980), "A quantitative evaluation of methods for coupling asparagines.", *J. Org. Chem.*,**45**,555-560.
9. Fields, G.B., Tian, Z., and Barany, G.,(1992), "Synthetic Peptides: A user's guide." , Grant, G.A.,(Eds), Freeman, New York, 77-90.
10. Merrifield, R.B., (1995), "Peptides: synthesis, structures and applications.",Gutte, B., (Eds), Academic Press, San Diego, 93-118.
11. Blake, J., and Li, C.H., (1968), Adrenocorticotropins.XXXIX. The solid phase synthesis of methionylglutamylhistidylphenylalanylarginyltryptophylglycine.", *J.Am. Chem. Soc.*,**90**,5882-5884.
12. Kaiser, E., Collescott, R.L., Bossinger, P.D., and Look, P.E., (1970), "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. ", *Anal. Biochem.*,**34**,595-602.
13. Tam, J.P., Heath, W.F., and Merrifield, R.B., (1983), "An SN2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of hydrofluoric acid in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis.", *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6442-6455.
14. Stewart, J.M., (1997), "Cleavage methods following Boc-based solid-phase peptide synthesis.", *Methods enzymol.*,**289**, 29-44.
15. Sheehan, J.C., and Hess, G.P., (1955), "A new method of forming peptide bonds.", *J. Am. Chem. Soc.*,**77**,1067-1068.
16. Hudson, D., (1988), "Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. Comparison of different coupling procedures.", *J. Org. Chem.*, **53**,617-624.
17. Albericio, F., and Carpino, L.A., (1997), "Coupling reagents and activation.", *Methods Enzymol.*,**289**,788-789.
18. Sara O. Dionne, et al., (2004), "Identification of HLA-Cw701 alleles-specific binding motifs by screening synthetic peptide libraries." , *Immunogenetics*, **56**, 391-398.
19. Tsikaris, V., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., Orlewski, P., Marraud, M., Cung, M.T., Vatzaki, E. and Tzartos, S., (1996), "Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOCn) for multiple anchoring of antigenic peptides-application to the acetylcholine receptor (AchR) main immunogenic region.", *Int.J.Biol.Macromol.*,**19**, 195-205.
20. Tsikaris, V., Sakarellos, C., Cung, M.T., Marraud, M., Sakarellos-Daitsiotis, M., (1996), "Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides.", *Biopolymers*, **38**, 291-293.
21. Sakakibara, S., and Fujii, T., (1969), "Synthesis and use of N-im-tosyl-L-histidine" *Bull.Chem.Soc.Jpn.*,**42**,1466.
22. Fujii, T., and Sakakibara, S., (1970), *Bull. Chem.Soc.Jpn.*,**43**,3954.
23. Van der Eijk, J.M., Nolte, R.J.M., and Swikker, J.W., (1980), *J.Org.Chem.*,**45**,547.
24. Fujii, T., and Sakakibara, S., (1974), "Synthesis of histidine peptides. I. Nim-Tosylhistidine derivatives as starting materials *Bull." Chem.Soc.Jpn.*,**47**,3146.
25. Fujii, T., Kimura, T., and Sakakibara, S., (1976), *Bull. Chem.Soc.Jpn.*,**49**,648.

26. Ishiguro, T., and Eguchi, C., (1989), *Chem.Pharm.Bull.*,**37**,506.

### 18.12 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 12

1. Letoha, T., Gaal, S., Somlai, C., Venkei, Z., Glavinas, H., Kusz, E., Duda, E., Czajlik, A., Petak, F., and Penke, B., (2005), " Investigation of penetratin peptides. Part 2. In vitro uptake of penetratin and two of its derivatives" *J. Peptide Sci.*,**11**,805-811.

### 18.13 Βιβλιογραφία κεφαλαίου 13

1. Sallusto, F., and Lanzavecchia, A., (1994), "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Ffactor plus Interleukin 4 and downregulated by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ", *J. Exp. Med.*,**179**, 1109-1118.
2. Elkord, E., Williams, P., Kynaston, H., and Rowbottom, A., (2005), "Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells.", *Immunology*, **114**, 204-212.



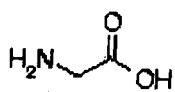
**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 19**

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

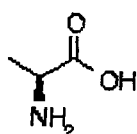


## 19. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

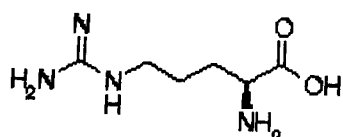
### 19.1 Φυσικά αμινοξέα



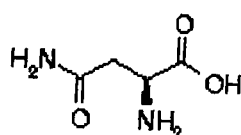
Gly (G)



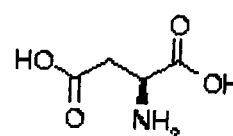
Ala (A)



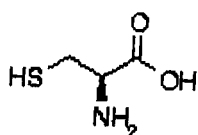
Arg (R)



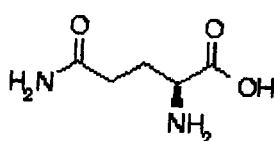
Asn (N)



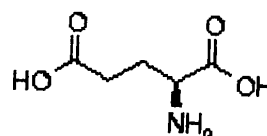
Asp (D)



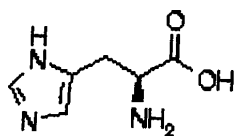
Cys (C)



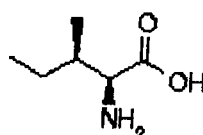
Gln (Q)



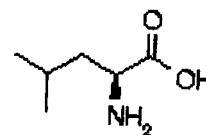
Glu (E)



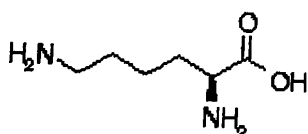
His (H)



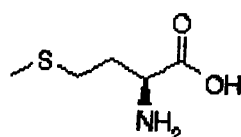
Ile (I)



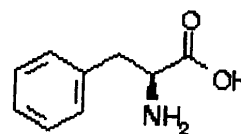
Leu (L)



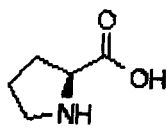
Lys (K)



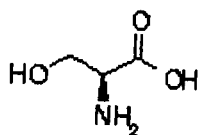
Met (M)



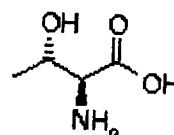
Phe (F)



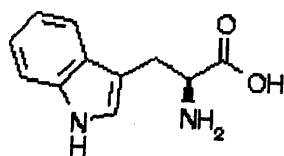
Pro (P)



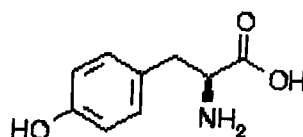
Ser (S)



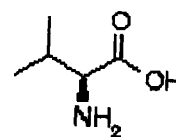
Thr (T)



Trp (W)



Tyr (Y)



Val (V)

## 19.2 Συντομογραφίες

- **2-Br-Z:** (*2-Bromobenzyloxycarbonyl*), 2-Χλωροβενζυλοξυκαρβονυλο
- **Acn:** (*Acetamidomethyl*), Ακεταμιδομεθυλομάδα
- **Ala (A):** (*Alanine*), Αλανίνη
- **Alloc:** (*Allyloxycarbonyl*), Αλλυλοξυκαρβονυλο.
- **APC:** (*Antigen Presenting Cells*), Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
- **Arg (R):** (*Arginine*), Αργινίνη
- **Asn (N):** (*Asparagine*), Ασπαραγίνη
- **Asp (D):** (*Aspartate*), Ασπαρτικό
- **Boc:** (*tert-Butoxycarbonyl*), tert-Βουτυλοξυκαρβόνυλο.
- **Bom:** (*Benzyloxymethyl*), Βενζυλοξυμεθυλο
- **BOP:** [*Benzotriazole-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate*], Εξαφθοροφωσφορικό αλας του βενζοτριαζολυλ-τρεις(διμεθυλαμινο) φωσφωνίου.
- **BSA:** (*Bovine Serum Albumin*),
- **Bzl:** (*Benzyl*), Βενζυλο
- **BzlO:** (*Benzyloxy*), Βενζυλοξυομάδα
- **CD:** (*Circular Dichroism*), Κυκλικός διχρωισμός
- **CLSM:** (*Confocal Laser Scanning Microscopy*)
- **C14PC:** (*tetradecylPhosphoCholine*), δεκατετρακυλοφωσφοχολίνη
- **CTL:** (*Cytotoxic T Lymphocytes*, Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα
- **CTLA:** (*Cytotoxic T Lymphocyte-Associated*), Παράγοντας που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών κυττάρων
- **Cys (C):** (*Cysteine*), Κυστεΐνη
- **DCC:** (*N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide*), N,N'-Δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο
- **DCM:** (*Dichloromethane*), Διχλωρομεθάνιο
- **DIC:** (*N,N'-Diisopropylcarbodiimide*), N,N'-Δισοπροπυλκαρβοδιμίδιο
- **DIEA:** (*Diisopropylamine*), Διϊσοπροπυλοαιθυλαμίνη
- **DMEM:** (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- **DMF:** (*Dimethylformamide*), Διμεθυλοφορμαμίδιο
- **DMS:** (*Dimethylsulfoxide*), Διμεθυλοσουλφίδιο
- **DT:** (*Diphtheria Toxoid*)





- **ELISA:** (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)
- **ESI-MS:** (*Electrospray Ionization- Mass Spectroscopy*), φασματοσκοπία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό
- **FACS:** (*Fluorescence Activated Cell Sorter*), διαλογέας κυττάρων ενεργοποιημένος με φθορισμό
- **Fmoc:** (*9-Fluorenylmethoxycarbonyl*), 9-φλουορενελμεθοξεκαρβονυλο
- **Gln (Q):** (*Glutamine*), Γλουταμίνη
- **Glu (E):** (*Glutamate*), Γλουταμινικό
- **Gly (G):** (*Glycine*), Γλυκίνη
- **GM-CSF:** (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), παράγοντας διέγερσης αποικίας μακροφάγων κοκκιοκυττάρων
- **GMP:** (*Good Manufacturing Practices*), καλές παρασκευαστικές μέθοδοι
- **Gp100:** (*Glycoprotein 100*), Γλυκοπρωτεΐνη 100
- **HF:** (*Hydrogen Fluoride*), Υγρό Υδροφθόριο
- **His (H):** (*Histidine*), Ιστιδίνη
- **HLA:** (*Human Leukocyte Antigen*), ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο
- **HOBt:** (*N-Hydroxybenzotriazole*), N-Υδροξυβενζοτρίαζόλιο
- **HPLC:** (*High Performance Liquid Chromatography*), Υγρή χρωματογραφία υψηλής διαχωριστικής ικανότητας
- **HTL:** (*Helper T Lymphocytes*), βοηθητικά T λεμφοκύτταρα
- **ICAM:** (*Intercellular Adhesion Molecule*), Διακυτταρικά μόρια πρόσδεσης
- **IFN-γ:** (*Interferon-γ*), Ιντερφερόνη-γ
- **IL:** (*Interleukine*), Ιντερλευκίνη
- **Ile (I):** (*Isoleucine*), Ισολευκίνη
- **KLH:** (*Keyhole Limpet Haemocyanin*)
- **LFA:** (*Leukocyte Function-associated Antigen*), Αντιγόνα που σχετίζονται με τη λειτουργία των λευκοκυττάρων
- **Leu (L):** (*Leucine*), Λευκίνη
- **Lys (K):** (*Lysine*), Λυσίνη
- **MAGE3:** (*Melanoma Associated Antigen*), Αντιγόνο που σχετίζεται με το μελάνωμα
- **MAPs:** (*Multiple Antigen Peptides*), Πολλαπλά αντιγονικά πεπτίδια
- **MBHA:** (*4-methylbenzylamine*), 4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη
- **MHC:** (*Major Histocompatibility Complex*), Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

- **MeOH:** (*Methanol*), Μεθανόλα,
- **Met (M):** (*Methionine*), Μεθειονίνη
- **Mtt:** (*4-Methyltrityl*), 4-μεθυλοτριτυλο
- **NK-cells:** (*Natural Killer Cells*), Φυσικά φονικά κύτταρα
- **NMR:** (*Nuclear Magnetic Resonance*), Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
- **ORD:** (*Optical Rotatory Dispersion*), οπτική στροφική διασπορά
- **PAM:** (*4-Hydroxymethylphenylacetamidomethyl polystyrene*), Φαινυλοακεταμιδομεθυλ-ρητίνη
- **Pbf:** (*2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl*), 2,2,4,6,7-πενταμεθυλοδιυδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλο.
- **PBMC:** (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος
- **PBS:** (*Phosphate Buffer Saline*), Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
- **Phe (F):** (*Phenylalanine*), Φαινυλαλανίνη
- **Pmc:** (*2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl*), 2,2,5,7,8-πενταμεθυλοχρωμανο-6-σουλφονυλο
- **Pro (P):** (*Proline*), Προλίνη
- **PyBOP:** (*Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate*), εξαφθοροφωσφορικό αλάς του βενζοτριαζολυλ-τρις-πυρρολικιδινο φωσφονίου.
- **PyBrop :** (*Bromotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphate*), Βρωμο-τρις-πυρρολικιδινο-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας
- **RP-HPLC:** (*Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography*), Υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας
- **SDS:** (*Sodium Dodecyl Sulfate*), Δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο
- **Ser (S):** (*Serine*), Σερίνη
- **SOCn:** (*Sequential Oligopeptide Carrier*), Επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς
- **SPPS:** (*Solid Phase Peptide Synthesis*), Πεπτιδική Σύνθεση σε Στερεή Φάση
- **TAP:** (*Transporters Associated with Antigen Processing*), Μεταφορείς συνδεδεμένοι με την επεξεργασία αντιγόνου
- **TASP:** (*Template Assembled Synthetic Protein*), Φόρμα συναρμολογημένων Συνθετικών Πρωτεϊνών



- **TBTU:** [*2-(1H-Benzotriazole-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate*], βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό αλας.
- **tBu:** (*tert-Butyl*), τερτ-Βουτυλο
- **TCR:** (*T Cell Receptor*), T κυτταρικός υποδοχέας
- **TFA:** (*Trifluoroacetic acid*), Τριφθοροξικό οξύ
- **TFE:** (*Trifluoroethanol*), Τριφθοροαιθανόλη
- **TGF-β:** (*Transforming Growth Factor-β*),
- **Thr (T):** (*Threonine*), Θρεονίνη
- **TIS:** Τριίσοπρόπυλοσιλάνιο
- **TNF-α:** (*Tumor Necrosis Factor*), Παράγοντας νέκρωσης των κυττάρων
- **Tos:** (*Tosyl*), Τοζυλ.
- **Trp (W):** (*Tryptophane*), Τρυπτοφάνη
- **Trt:** (*Trityl*), Τριτυλο.
- **TT:** (*Tetanus Toxoid*)
- **Tyr (Y):** (*Tyrosine*), Τυροσίνη
- **Val (V):** (*Valine*), Βαλίνη
- **Wang:** (*p-Benzyloxybenzyl Alcohol resin*), (p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη)
- **Z:** (*Benzyloxycarbonyl*), Βενζυλοξυκαρβονυλο.

### 19.3 Συμμετοχή σε συνέδρια

#### Ανακοινώσεις

- 4<sup>th</sup> Hellenic Forum on Bioactive Peptides, April 22-24 2004, Patras-Hellas  
" A NEW STRATEGY FOR ANTI-CANCER VACCINE DESIGN: COMBINED APPLICATION OF CD8 AND CD4 EPITOPES OF MAGE-3 TUMOR ANTIGEN" Caterina Rizou, Dimitra Dimtsoudi, Maria Sakarellos-Daitsiotis, Constantinos Sakarellos, and Chris Platsoukas
  
- 5<sup>th</sup> Hellenic Forum on Bioactive Peptides, May 14-16 2006, Patras-Hellas  
" THE SYNERGISTIC FUNCTION OF CD4 AND CD8 EPITOPES FOR ANTI-CANCER VACCINE DESIGN "  
Dimitra Dimtsoudi, Eugenia Panou-Pomonis, Dimitrios Krikorian, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos
  
- 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology, September 6-9 2006 Palais des Congres ,Paris-France  
" A MAGE-3 PEPTIDE VACCINE TARGETING BOTH CD4 AND CD8 T-CELLS"  
Al de Lastic, D. Dimtsoudi, M Rayevskaya, C Sakarellos, M Sakarellos-Daitsiotis, CD Platsoukas, A Mouzaki

#### Ομιλίες

- 6<sup>th</sup> Conference Medical Chemistry: Drug Discovery and Design, 10-12 March, 2005, Patra "BRIDGING CD4 AND CD8 EPITOPES FOR ANTI-CANCER VACCINE DESIGN."D. Dimtsoudi, M. Sakarellos-Daitsiotis and C. Sakarellos.
  
- 20<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, 20-24 Σεπτεμβρίου, 2005, Ιωάννινα."ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΠΙΤΟΠΩΝ CD4 ΚΑΙ CD8 ΓΙΑ ΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ."  
Δ. Δημτσούδη, Ε. Πάνου-Πομώνη, Δ. Κρικοριάν, Μ. Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Κ. Σακαρέλλος.

