

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Εργαστήριο Συνθετικών Βιοϋλικών και Υπερμοριακής Χημείας



### Διπλωματική Εργασία

Σύνθεση βιοϋβριδίων πρωτεΐνης-πολυμερούς μέσω εκλεκτικής  
αζω-βιοσύζευξης σε ομάδες πρωτεϊνικής τυροσίνης.

**Μανάι Γιούντι**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Κέλλυ Βελώνια

2020-2021

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επίκουρη καθηγήτρια του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, κ. Δρ. Κέλλυ Βελώνια για την ευκαιρία που μου έδωσε, ώστε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο της. Η ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας οφείλεται στην συνεχή ενθάρρυνση της, στη εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και στην αμέριστη υποστήριξη της. Χωρίς την βοήθεια της και την πληθώρα πληροφοριών που μου μετέδωσε θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση της εργασίας αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ' βαθέων τον μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Χάρη Γρυπάρη για το πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για την περάτωση της παρούσας εργασίας. Οι σημαντικές υποδείξεις και συμβουλές του με κατεύθυναν σε ένα σωστό τρόπο σκέψης πάνω απ' όλα και μου προσέφεραν σημαντικά εφόδια για την μετέπειτα ζωή μου. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Αλέξη Θεοδώρου που οποιαδήποτε στιγμή τον χρειάστηκα ήταν εκεί για να με καθοδηγήσει.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την ευχάριστη συνεργασία και πιο συγκεκριμένα τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Πέτρο Μανδριώτη, Γιάννη Ρεντούμη και Χρυσή Μπαλτζάκη, όπως επίσης και τους προπτυχιακούς φοιτητές Ειρήνη Σταυρακάκη, Δέσποινα Παπανικολάου, Δέσποινα Μέγγιου και Αθηνά Κανατά. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επιπρόσθετα, όλους του καθηγητές του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θέλω να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, για την στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου. Πέραν όμως από την πολύτιμη αυτή στήριξη, μου έδωσαν όλα τα εφόδια ώστε να γίνω ένας σωστός άνθρωπος και αυτό είναι κάτι που δεν μαθαίνεται, αλλά μεταδίδεται.

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς με πιθανές εφαρμογές σε τομείς της ιατρικής, της νανοτεχνολογίας, της βιοτεχνολογίας, της φωτονικής κ.ά. Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε εκλεκτικής σύζευξης ενός διαζωνιακού άλατος σε τυροσίνες πρωτεϊνών (όπως η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) ή η λυσοζύμη). Το διαζωνιακό άλας που χρησιμοποιήθηκε έφερε εκκινητή ριζικού πολυμερισμού. Στη μέσση μίας νέας, ανθεκτικής στη παρουσία οξυγόνου, μεθόδου ριζικού πολυμερισμού αντιστρεπτής απενεργοποίησης (RDRP) πραγματοποιήθηκε πολυμερισμός από την πρωτεΐνη. Ακολουθήθηκαν οι προσεγγίσεις RDRP φωτοεπαγώμενου πολυμερισμού με Cu(II) και της ανακατανομής με Cu(I). Ο χαρακτηρισμός των βιοεκκινητών και των παραγόμενων βιοπολυμερών πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρησης γέλης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και με φασματοφωτομετρία (UV-Vis).

## Summary

The purpose of this thesis was to synthesize amphiphilic protein-polymer conjugates, a class of synthetic biomaterials that have potential applications in biomedicine, nanotechnology, biotechnology and photonics. To achieve this, we synthesized a protein biomacroinitiator via covalent conjugation of an azo-functionalized-radical initiator to tyrosine residues of proteins such as bovine serum albumin (BSA) or lysozyme. A grafting from, oxygen tolerant RDRP approach, was applied to grow polymers from the biomacroinitiator following either a photoinduced, Cu(II) mediated, or a SET-LRP, Cu(I) mediated approach. The bioconjugates were characterized with gel electrophoresis (PAGE), Size Exclusion Chromatography (SEC) and UV-Vis spectrophotometric studies.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	3
Summary .....	3
Εισαγωγή.....	6
1. Θεωρητικό μέρος .....	7
1.1 .....	7
Αμφίφιλα μόρια .....	7
1.2. Πρωτεΐνες.....	7
1.3. Δομή και ιδιότητες αμφίφιλων βιοσυζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς.....	9
1.4. Μέθοδοι σύνθεσης αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς. ....	11
α) Μέθοδος «grafting to».....	12
β) Μέθοδος «grafting from» .....	12
γ) Μέθοδος «grafting through».....	13
1.5. Φωτοεπαγώμενος ριζικός πολυμερισμός με χρήση Cu(II) και ο μηχανισμός .....	13
1.6 Ριζικός πολυμερισμός αντιστρεπτής απενεργοποίησης μέσω ανακατανομής (SET-LRP) και ο μηχανισμός.....	14
1.7. Εκλεκτική πρόσδεση σε μονάδες πρωτεϊνικής τυροσίνης.....	16
Α) Αντίδραση τύπου Mannich .....	16
Β) Αντίδραση μέσω διαζωνικού άλατος.....	17
Γ) Αντίδραση μέσω διαζωδικαρβοξυαμιδίων.....	18
1.8 Εκλεκτική πρόσδεση σε μονάδες πρωτεϊνικής τυροσίνης μέσω σχηματισμού αζω δεσμού. ....	19
1.9 Στόχος διπλωματικής εργασίας .....	21
2.0. Αποτελέσματα .....	22
2.1. Σύνθεση BSA αζω εκκινητή.....	23
2.2. Σύνθεση λυσοζύμης αζω εκκινητή. ....	25
2.3. Σύνθεση λυσοζύμης-πολυστερενίου (Αντίδραση I). ....	27
2.4. Σύνθεση BSA- πολυστερένιο (Αντίδραση I).....	28
2.5. Σύνθεση βιοπολυμερούς λυσοζύμης-πολυστερένιο (Αντίδραση II). ....	29
2.6 Σύνθεση βιοπολυμερούς BSA-πολυστερένιο(Αντίδραση II).....	30
2.7. Σύνθεση βιοπολυμερούς λυσοζύμης- πολυστερένιο (Αντίδραση III).....	31
2.8. Σύνθεση βιοπολυμερούς BSA-πολυστερένιο(Αντίδραση III).....	32
3.0 Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	33
5.0. Πειραματικό μέρος.....	34

not corrected draft

## Εισαγωγή

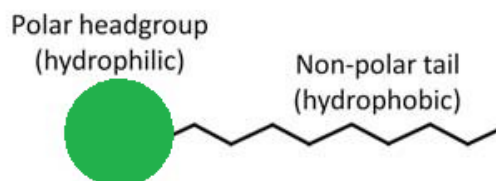
Τα τελευταία χρόνια στον τομέα της υπερμοριακής χημείας έχει προσελκύσει αρκετά το ενδιαφέρον η σύνθεση βιοσυζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς που παράγονται κατά τη σύζευξη πρωτεϊνών με συνθετικά πολυμερή, με σκοπό την απόκτηση μιας σειράς νέων ιδιοτήτων. Έχει αποδειχθεί η ύπαρξη του πολυμερούς επηρεάζει τη δραστικότητα και τη σταθερότητα ποικίλων πρωτεϊνών προσδίδοντας νέες ιδιότητες που πιθανά μπορούν να κάνουν δυνατή τη χρήση τους στη μεταφορά φαρμάκων για παράδειγμα ρυθμίζοντας τη φαρμακοκινητική ή την ανταπόκριση των βιοσυζυγών σε εξωτερικά ερεθίσματα.<sup>1</sup> Για τη σύνθεση βιοσυζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία διαφορετικές προσεγγίσεις.<sup>2,3</sup> Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι για τη σύνθεση βιοσυζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς μπορεί να εφαρμοστεί και φωτοεπαγώμενος RDPR πολυμερισμός παρουσία οξυγόνου.<sup>4</sup>

Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί και στη εκλεκτική (bioorthogonal) τροποποίηση των πλευρικών αλυσίδων αρωματικών αμινοξέων των πρωτεϊνών, όπως η τυροσίνη, για την σύνθεση βιοσυζυγών. Η εκλεκτική τροποποίηση μιας τυροσίνης μπορεί να επιτευχθεί μέσω σύζευξης με ένα διαζωνιακό άλας, ακόμη και σε ήπιες συνθήκες αντίδρασης, στοιχείο ιδιαίτερα σημαντικό για τη διατήρηση της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών, επιτυγχάνοντας εκτός των άλλων υψηλή απόδοση και εκλεκτικότητα.<sup>5,6,7,8,9</sup> Η σύζευξη της τυροσίνης με το διαζωνιακό άλας οδηγεί στο σχηματισμό ενός αζω δεσμού. Σύνθεση πρωτεϊνικών βιοεκκινητών από τους οποίους να έχουν παρασκευαστεί συζυγή πρωτεΐνης-πολυμερούς, δεν έχει αναφερθεί ακόμη στη βιβλιογραφία.

# 1. Θεωρητικό μέρος

## 1.1 Αμφίφιλα μόρια

Αμφίφιλα ονομάζονται τα μόρια που περιέχουν μια υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά (Εικόνα 1). Η υδρόφοβη ουρά αποτελείται από κορεσμένες ή ακόρεστες αλυσίδες υδρογονανθράκων, οι οποίες είναι αδιάλυτες στην υδατική φάση. Από την άλλη, η πολική υδατοδιαλυτή κεφαλή μπορεί να είναι ουδέτερη, φορτισμένη ή και αμφιτεριονική.<sup>6</sup> Η υδρόφιλη κεφαλή αλληλεπιδρά με πολικούς διαλύτες, όπως το νερό, ενώ η υδρόφοβη ουρά με άπολους διαλύτες. Χάρη στη διττή αυτή φύση που εμφανίζουν τα αμφίφιλα μόρια, παρέχεται σε αυτά η δυνατότητα να αυτοοργανώνονται, μειώνοντας την ενέργεια τους .



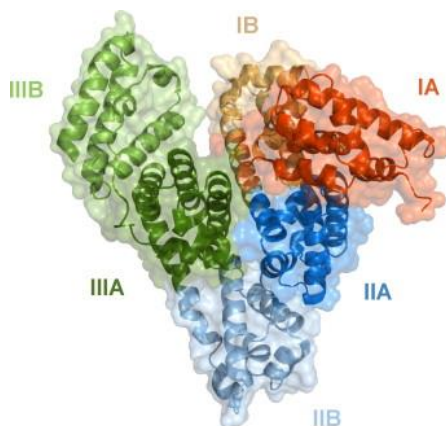
Εικόνα 1: Δομή αμφίφιλου μορίου.

Τα αμφίφιλα μόρια διακρίνονται σε 3 μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα το μοριακό τους βάρος. Έτσι, τα φωσfolιπίδια με μοριακό βάρος ~1 kDa και μοριακό όγκο ~0.5 nm<sup>3</sup> κατατάσσονται στην κατηγορία των μοριακών αμφίφιλων. Τα δισυσταδικά πολυμερή με μοριακό βάρος ~6 kDa και μοριακό όγκο ~6.5 nm<sup>3</sup> ανήκουν στην κατηγορία των μακρομοριακών αμφίφιλων, ενώ στην κατηγορία των γιγάντιων αμφίφιλων υπάγονται βιοϋβρίδια πρωτεΐνης-πολυμερούς με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 40 kDa και μοριακό όγκο μεγαλύτερο από 25 nm<sup>3</sup>.<sup>7</sup> Τα γιγάντια μόρια έχουν την τάση να αυτοοργανώνονται όπως τα αμφίφιλα μόρια και μακρομόρια, όπου το σχήμα τους, ανεξαρτήτως μορίου, καθορίζει τις περισσότερες φορές και την τελική δομή του συσσωματώματος.<sup>7,8,9</sup>

## 1.2. Πρωτεΐνες

Τα τελευταία χρόνια διεξάγονται πολλές έρευνες σχετικά με την δράση πολλών ενζύμων κυρίως σε θέματα αντιμετώπισης ασθενειών και μεταφοράς φαρμάκων. Σε αυτές τις πρωτεΐνες συγκαταλέγονται η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) και η λυσοζύμη. Η BSA αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη πλάσματος του αίματος στα θηλαστικά, αντιπροσωπεύει το 52%-62% της συνολικής ποσότητας πρωτεϊνών του πλάσματος, με πολλούς βιοχημικούς ρόλους. Η BSA συμβάλλει σημαντικά στην διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης και του pH του αίματος. Επίσης, ελέγχει τα επίπεδα μετάλλων στο αίμα (Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup>) και έχει την ικανότητα να δεσμεύει μικρά μόρια, όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα και λειτουργεί ως μεταφορέας για ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών, φαρμάκων, θρεπτικών ουσιών και άλλων μορίων. Οι ιδιότητες αυτές της BSA την καθιστούν χρήσιμη για ποικίλες κλινικές, φαρμακευτικές και βιοχημικών εφαρμογές.<sup>10</sup> Η Αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA, Εικόνα 2) είναι μία πρωτεΐνη με σχήμα καρδιάς και διαστάσεις 3 nm × 3 nm × 8 nm. Η BSA αποτελείται από 583 αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένων 35 κυστεϊνών (17 δισουλφιδικοί δεσμοί), τα οποία παρέχουν μια σχετικά ισχυρή σταθερότητα στην πρωτεΐνη. Το μοριακό βάρος της

πρωτεΐνης είναι 66.5 kDa ενώ το ισοηλεκτρικό της σημείο εμφανίζει εύρος pH 4,7-5,6.<sup>11,12</sup> Τέλος, μελέτες έδειξαν ότι μόνο 4 μονάδες τυροσίνης βρίσκονται εκτεθειμένες στην επιφάνεια της πρωτεΐνης BSA με αποτέλεσμα να αποτελεί μια πρωτεΐνη ικανή να συμμετέχει σε διαδικασίες σύνθεσης βιοϋβριδίων.<sup>11</sup>



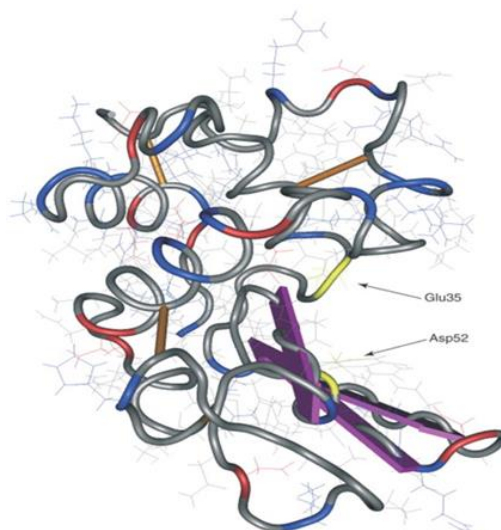
**Εικόνα2: Τρισδιάστατη απεικόνιση της πρωτεΐνης BSA**

Από την άλλη πλευρά, η λυσοζύμη (Εικόνα3) ανακαλύφθηκε από τον Alexander Flemming το 1922. Το ένζυμο αυτό έχει τη δυνατότητα να διασπά την πεπτιδογλυκάνη, ένα γλυκοσιδικό πολυμερές και δομικό συστατικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, που δίνει στα βακτήρια σχήμα και ωσμωτική αντίσταση. Χάρη στην υψηλή δραστηριότητα της β-N-ακετυλογλυκοζαμινιδάσης, η λυσοζύμη διασπά τον β-γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ του C1 του N-ακετυλο μουραμικού (NAM) και του C4 της N-ακετυλο γλυκοζαμίνης (NAG). Έχει απομονωθεί από το ασπράδι αυγών, τα δάκρυα, το σάλιο, τους βλεννογόνους και τα λευκοκύτταρα και έχει παρατηρηθεί η πολύ υψηλή δραστηριότητα σε αυτά τα είδη. Η λυσοζύμη είναι ένα πολύ κατιοντικό και παράλληλα υδατοδιαλυτό ένζυμο με διαστάσεις 4.6 x 3.0 x 3.0 nm, μοριακό βάρος 14.3 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο κοντά στο 11,3. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της λυσοζύμης αποτελείται από 129 αμινοξέα και τέσσερις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, κάνοντας το μόριο άκαμπτο.<sup>11</sup> Τέλος, η λυσοζύμη περιέχει και εκείνη 4-6 ομάδες τυροσίνης που την καθιστούν χρήσιμη για



τη σύνθεση βιοπολυμερών μέσω εκλεκτικής πρόσδεσης σε αυτή τη λειτουργική ομάδα.<sup>11</sup>

### 1.3. Δομή και ιδιότητες αμφίφιλων βιοσυζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς

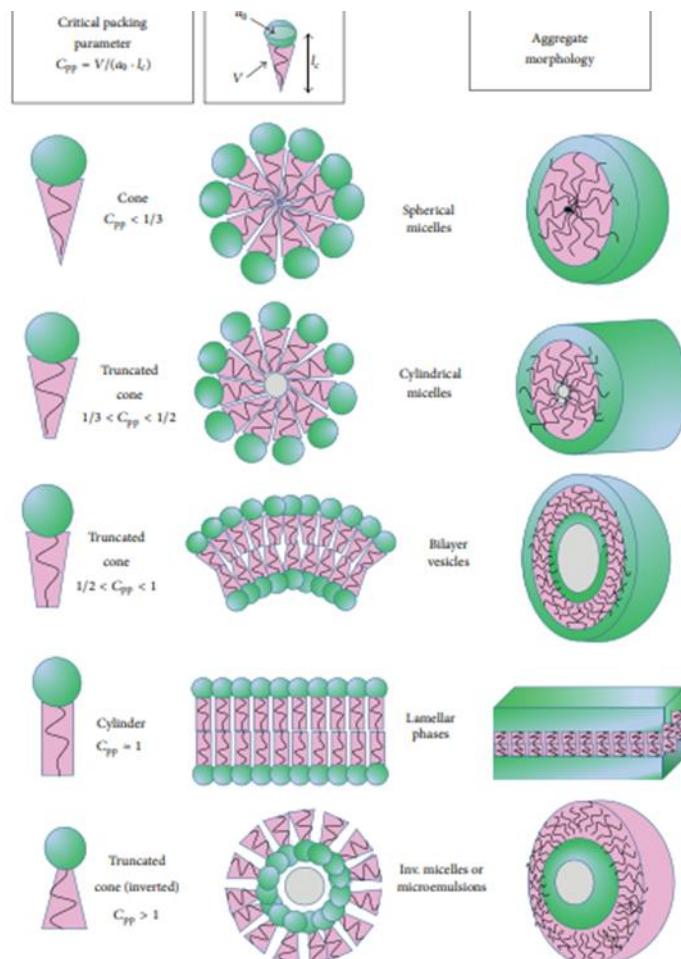


Εικόνα 2 Τρισδιάστατη απεικόνιση της πρωτεΐνης λυσοζύμη.

Τα βιοπολυμερή, ως αμφίφιλα «υπερμόρια», συμπεριφέρονται και έχουν τις ίδιες ιδιότητες με μικρότερου μεγέθους αμφίφιλα μόρια. Η αυτοοργάνωση των αμφίφιλων μορίων αποτελεί μια αυθόρμητη διαδικασία που οφείλεται σε πληθώρα συνεργιστικών, μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, όπως δεσμοί H, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις π-π. Ο παράγοντας που επηρεάζει κατά κύριο λόγο την αυτοοργάνωση των αμφίφιλων είναι η ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συστήματος στην ισορροπία, μειώνοντας την εντροπία τους καθώς αυτοοργανώνονται. Σε ένα πολικό διαλύτη, όπως είναι το νερό, οι πολικές κεφαλές των αμφίφιλων προσεγγίζουναυτόν, ενώ οι υδρόφοβες ουρές κατευθύνονται αντίθετα με τον διαλύτη, προκαλώντας μείωση της επιφανειακής τάσης του και σχηματίζοντας κolloειδή συσσωματώματα, τα οποία ονομάζονται μικκύλια. Άλλοι δύο βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη μορφολογία των αυτοοργανούμενων δομών, όταν βρίσκονται σε ισορροπία, είναι η μοριακή γεωμετρία των μορίων και η συγκέντρωσή τους. Τέλος, μεταβολές όπως η θερμοκρασία, η πίεση, το pH και η ιοντική ισχύς, μπορούν να αλλάζουν την ισορροπία μετασχηματίζοντας τη δομή των αυτοοργανούμενων αμφίφιλων.<sup>6,13,14</sup>

Η δομή και το σχήμα των αυτοοργανούμενων δομών προσδιορίζονται κυρίως από την «packing» παράμετρο  $\rho = V/a_0 l_0$ , όπου  $V$  ο όγκος του υδρόφοβου τμήματος,  $a_0$  η επιφάνεια της πολικής κεφαλής στη διεπιφάνεια του συσσωματώματος-διαλύτη και  $l_0$  το μήκος της υδρόφοβης αλυσίδας. Όταν η παράμετρος  $\rho$  είναι  $< 1/3$  τότε υπάρχει αυθόρμητη τάση προς σχηματισμό σφαιρικών μικκυλίων. Όταν η παράμετρος  $\rho$  βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές  $1/3$  και  $1/2$  τότε υπάρχει τάση προς σχηματισμό μη

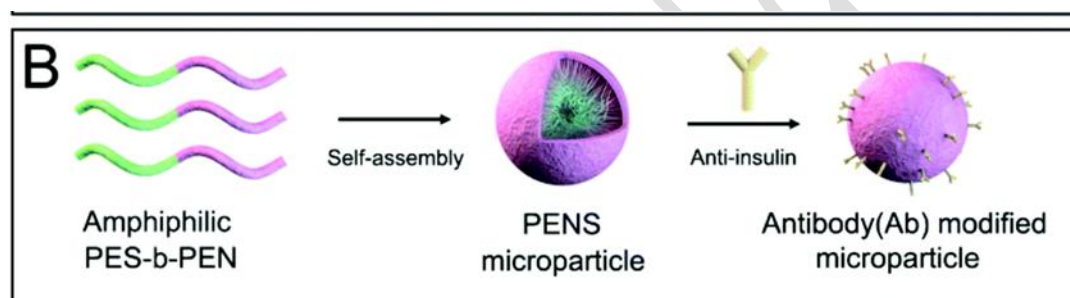
σφαιρικών, κυλινδρικών μικκυλίων, κυβικής ή εξαγωνικής δομής. Επιπλέον, όταν η παράμετρος βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές  $\frac{1}{2}$  και 1, τότε υπάρχει τάση προς σχηματισμό κυστιδίων. Τέλος, όταν η  $\rho$  παράμετρος παίρνει τιμή ίση με το 1, τότε σχηματίζονται επίπεδες διπλοστιβάδες, ενώ για τιμές μεγαλύτερες του 1 προκύπτουν δομές αντίστροφης μικκυλιακής φάσης (Εικόνα 4).<sup>6,15</sup>



Εικόνα 3: Αναπαράσταση της γεωμετρίας διαφόρων αμφίφιλων αυτοοργανούμενων δομών.

Οι αμφίφιλες αυτοοργανούμενες δομές, ανάλογα με τα συστατικά τους έχουν και διαφορετικές εφαρμογές σε πληθώρα από τομείς. Τα αμφίφιλα συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περιβαλλοντικούς σκοπούς, καθώς μέσω επιφανειοδραστικών φωτοκαταλυτών βαρέα μέταλλα, τοξικά αέρια, φυτοφάρμακα και οργανικές βαφές μπορούν να δεσμευτούν και να απομακρυνθούν από το περιβάλλον. Επιπλέον, μπορούν να δράσουν και ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, καθώς μπορούν να λύσουν το βακτηριακό τοίχωμα.<sup>16</sup> Επίσης, στον τομέα της οπτοηλεκτρονικής τα αμφίφιλα δύναται να χρησιμοποιηθούν ως χημειοαισθητήρες, καθώς φέρουν φθορίζουσες ομάδες.<sup>17</sup> Ακόμη, έχουν κατασκευαστεί από αμφίφιλα ελαστομερή, υλικά χρήσιμα σε πλαστικά ηλεκτρονικά συστήματα.<sup>15</sup> Τα αμφίφιλα μόρια είναι χρήσιμα και στον τομέα της φαρμακευτικής, αφού έχουν αποδειχθεί τα πλέον κατάλληλα για τη μεταφορά και την απελευθέρωση φαρμάκων. Μια

πρόσφατη μελέτη στον τομέα της βιοϊατρικής ανέδειξε την χρήση αμφίφιλων αυτοοργανωμένων συστημάτων, όπως για παράδειγμα κατά τη σύνθεση του αμφίφιλου συμπολυμερούς που ονομάζεται amPENS. Αυτό το μόριο αποτελεί συνδυασμό ενός υδρόφιλου τμήματος πολυαρυλενικού αιθέρα νιτριλίου(PEN) και ενός υδρόφοβου τμήματος πολυαιθεροσουλφόνης(PES). Το υδρόφοβο PES είναι ένα ευρέως γνωστό στον τομέα της βιοϊατρικής πολυμερές, λόγω του μοναδικού συνδυασμού μηχανικών ιδιοτήτων και βιοσυμβατότητας που παρέχει. Παρόλα αυτά, η εγγενής υδροφοβικότητα του PES παρεμποδίζει, σε ένα βαθμό, την αποτελεσματικότητα κατά τη βιοϊατρική εφαρμογή του λόγω της μη ειδικής προσρόφησης, κάτι που θα μπορούσε να μετριαστεί με την εισαγωγή υδρόφιλων τμημάτων PEN. Το παραγόμενο συμπολυμερές amPENS μετατρέπεται σε αυτοοργανούμενα μικροσωματίδια μεγέθους κοντά στο μικρόμετρο, τα οποία προσδένονται σε συγκεκριμένο αντίσωμα και χρησιμοποιούνται στην ανοσοανίχνευση της ινσουλίνης (Εικόνα 5). Έτσι, η σύνθεση τέτοιων μικροσωματιδίων ανοίγει το δρόμο για την παρασκευή ανοσοαισθητήρων και όχι μόνο.<sup>18</sup>



**Εικόνα 4:** Αναπαράσταση γεωμετρίας του αμφίφιλου συμπολυμερούς amPENS και πρόσδεσης του αντισώματος κατά την ανοσοανίχνευση της ινσουλίνης.

#### 1.4. Μέθοδοι σύνθεσης αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς.

Η σύνθεση αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς τις τελευταίες δεκαετίες αναπτύσσεται ραγδαία και βρίσκεται στο επίκεντρο πολλών ερευνών. Η ενσωμάτωση της πρωτεΐνης στη δομή του πολυμερούς προσφέρει νέες προοπτικές για τη δημιουργία βιομακρομορίων που εμπεριέχουν τις βιολογικές ιδιότητες του πρωτεϊνικού συστατικού με τις χημικές ιδιότητες και την οργάνωση του πολυμερούς. Κατά τη σύζευξη του συνθετικού πολυμερούς, αναμένεται η μεταφορά των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων και κατ' επέκταση η τροποποίηση της βιοκατανομής και της διαλυτότητας της πρωτεΐνης. Αυτό προσφέρει τη δυνατότητα δημιουργίας συνθετικών ενζύμων που είναι διαλυτά και ενεργά σε οργανικούς διαλύτες. Επίσης, συνεισφέρει στην ανάπτυξη νέων τεχνικών στη βιοκατάλυση και στην εξέλιξη της υπερμοριακής νανο-βιοτεχνολογίας και φαρμακευτικής τεχνολογίας. Έχουν αναπτυχθεί τρεις κύριες κατηγορίες στρατηγικών σύνθεσης αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς, συγκεκριμένα οι «grafting to», «grafting from» και «grafting through» προσεγγίσεις.

α) Μέθοδος «grafting to»

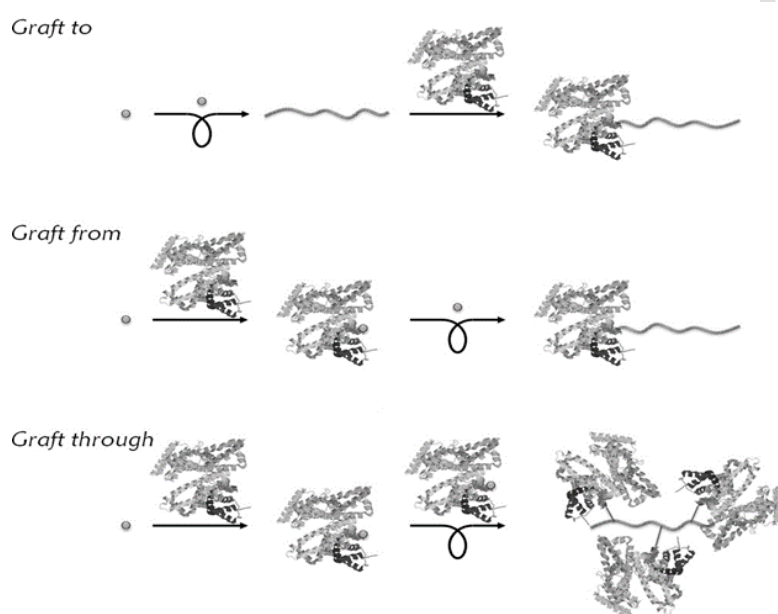
Η μέθοδος αυτή αναφέρεται στην τροποποίηση της πρωτεΐνης από ένα πολυμερές, το οποίο συντίθεται πρώτο και στη συνέχεια συζεύγνυται με κάποια πλευρική ομάδα αμινοξέος μέσα από εκλεκτική αντίδραση σύζευξης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων αντιδράσεων αποτελούν η αμιδίωση, η Michael προσθήκη, καθώς και οι αντιδράσεις τύπου «κλικ». Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το πολυμερές μπορεί να χαρακτηριστεί με ακρίβεια μέσα από διάφορες φυσικοχημικές μεθόδους. Επίσης, η μέθοδος αυτή είναι απλούστερη και ταχύτερη σε σύγκριση με άλλες, διότι δεν περιλαμβάνει περίπλοκες διαδικασίες σύνθεσης και η πρωτεΐνη δεν επηρεάζεται από τη διαδικασία του πολυμερισμού. Ωστόσο, για κάποιες συζεύξεις εμφανίζονται φαινόμενα στερικής παρεμπόδισης που καθιστούν δύσκολη την προσέγγιση του πολυμερούς στην πρωτεΐνη. Τέλος, αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί για την παρασκευή πολυμερικών «βουρτσών» που έχουν καλά καθορισμένα μοριακά βάρη και μπορούν να προσεγγίσουν επιφάνειες πρωτεϊνών.<sup>19,20,21</sup>

β) Μέθοδος «grafting from»

Η μέθοδος «grafting from» αφορά στην ανάπτυξη των πολυμερικών αλυσίδων από την πρωτεΐνη, μέσω του εκκινητή πολυμερισμού που έχει προσδεθεί ήδη σε κάποιο εκτεθειμένο αμινοξύ. Ο εκκινητής ή ο παράγοντας μεταφοράς μπορεί να συνδεθεί είτε με φυσικές είτε με τροποποιημένες, μη φυσικές λειτουργικές ομάδες. Για την αποτελεσματική σύζευξη του εκκινητή πολυμερισμού χρησιμοποιούνται και εδώ οι αντιδράσεις αμιδίωσης, και αυτές της προσθήκης τύπου Michael και «κλικ». Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η ικανότητα να ελεγχθεί το μοριακό βάρος των συζευγμένων πολυμερικών αλυσίδων με μεγάλη ακρίβεια. Παρόλα αυτά η μέθοδος αυτή πολλές φορές οδηγεί σε αστάθεια κατά τον πολυμερισμό και η ανάπτυξη των πολυμερικών αλυσίδων δεν είναι πάντα ελεγχόμενη, ενώ οι συνθήκες που απαιτούνται για τη διατήρηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης, καθιστούν μη εφικτές τις συνθήκες που χρειάζεται για να επιτευχθεί ο πολυμερισμός.<sup>19,20,21</sup>

γ) Μέθοδος «grafting through»

Η μέθοδος «grafting through» βασίζεται στη σύνδεση μιας πρωτεΐνης στην επιφάνεια των αναπτυσσόμενων πολυμερικών αλυσίδων. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη περιέχει πεπτίδια που έχουν την ικανότητα να συζευχθούν πάνω στην αναπτυσσόμενη πολυμερική αλυσίδα. Έτσι, δημιουργείται ένα πολυμερές με ρόλο ραχοκοκαλιάς για τις συζευγμένες πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν τις διακλαδώσεις του πολυμερούς. Στην περίπτωση αυτή είναι έντονη η παρουσία της στερικής παρεμπόδισης λόγω των πρωτεϊνών που προστίθενται. Ωστόσο οι δομές που προκύπτουν είναι περισσότερο ομοιόμορφες σε σύγκριση με τις προαναφερθείσες μεθόδους. Παρόλα αυτά είναι μια μέθοδος η οποία δε χρησιμοποιείται αρκετά λόγω της πολυπλοκότητας της.<sup>19,20,21</sup>

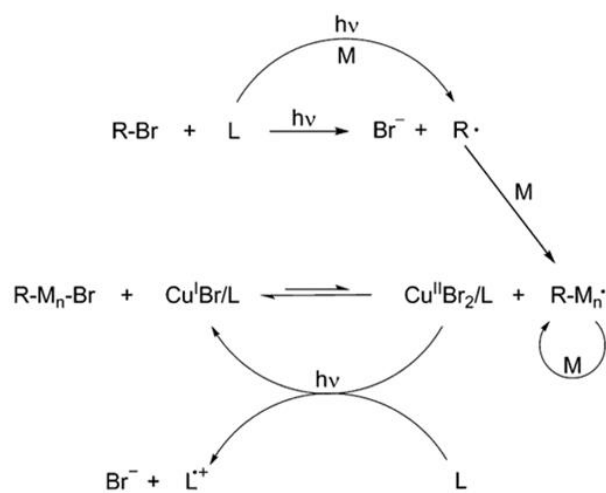


Εικόνα 5: Στρατηγικές σύνθεσης βιοπολυμερών.

### 1.5. Φωτοεπαγόμενος ριζικός πολυμερισμός με χρήση Cu(II) και ο μηχανισμός

Τα τελευταία χρόνια στο πεδίο του RDPR πολυμερισμού έχει παρατηρηθεί η θετική επίδραση του φωτός σε τέτοιες διαδικασίες. Σε αντίθεση με τον απλό ATRP πολυμερισμό, στον φωτοεπαγόμενο πολυμερισμό με υπεριώδη ακτινοβολία παρατηρείται η αύξηση του βαθμού του πολυμερισμού, η βελτίωση του «ζωντανού» χαρακτήρα του και οι υψηλότερες μετατροπές σε προϊόν. Ο φωτοεπαγόμενος πολυμερισμός ξεκινάει από την υψηλότερη οξειδωτική κατάσταση του καταλύτη (Cu(II) X<sub>2</sub>/L), ο οποίος βρίσκεται συμπλοκοποιημένος, και στη συνέχεια προκαλείται ο σχηματισμός του συμπλόκου του Cu(I) (Cu(I)X/L) με φωτοχημικό τρόπο. Μηχανιστικά, η παραγωγή ριζών ενεργοποιείται από τη διάσπαση του δεσμού του αλκυλαλογονιδίου R-Br. Η ενεργοποίηση αυτή προκαλείται από τον υποκαταστάτη (L), ο οποίος δέχεται την υπεριώδη ακτινοβολία, προκαλώντας ρίζες διάδοσης H

παραγωγή ειδών Cu(I) από Cu(II) μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων μονοπατιών, όπως μέσω της αναγωγής με χρήση αμίνης ως ελεύθερο υποκαταστάτη στη διεγερμένη μορφή, καθώς και από την βασική κατάσταση του υποκαταστάτη μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας. Τέλος ο αμινο-υποκαταστάτης χρησιμοποιείται ως ισχυρός αναγωγικός παράγοντας και είναι πιθανόν ο κύριος συμμετέχων στη δημιουργία του Cu(I) (Εικόνα 7).<sup>22</sup>



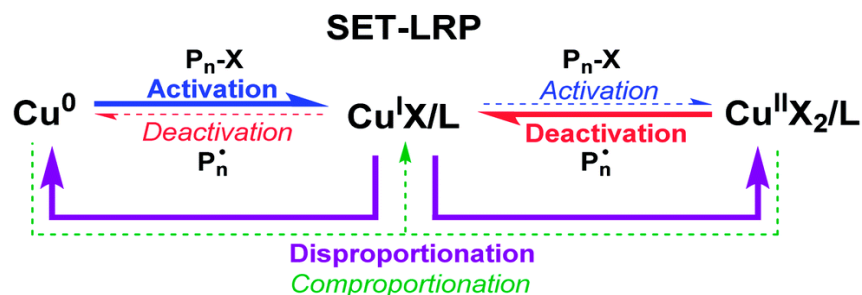
Εικόνα 6:Μηχανισμός φωτοεπαγόμενου RDRP πολυμερισμού καταλυόμενος από Cu(II).

### 1.6 Ριζικός πολυμερισμός αντιστρεπτής απενεργοποίησης μέσω ανακατανομής (SET-LRP) και ο μηχανισμός

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι ριζικού πολυμερισμού μέσω αντιστρεπτής απενεργοποίησης (RDRP). Κατά τον RDRP πολυμερισμό χρησιμοποιούνται μέταλλα μετάπτωσης, τα οποία ενεργοποιούν, καταλυτικά, αλκυλαλογονίδια δημιουργώντας ρίζες και ύστερα τις απενεργοποιούν με το πέρας της προσθήκης αρκετών μονομερών. Στον RDRP πολυμερισμό υπάρχει ένα νέο είδος πολυμερισμού, ο ριζικός πολυμερισμός αντιστρεπτής απενεργοποίησης μέσω ανακατανομής (SET-LRP). Στο συγκεκριμένο είδος, ο Cu(0) είναι εκείνος που ενεργοποιεί το αλκυλαλογονίδιο μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου από την εξωτερική του στιβάδα ενώ ο Cu(II) λειτουργεί ως απενεργοποιητής των ριζών. Στην περίπτωση



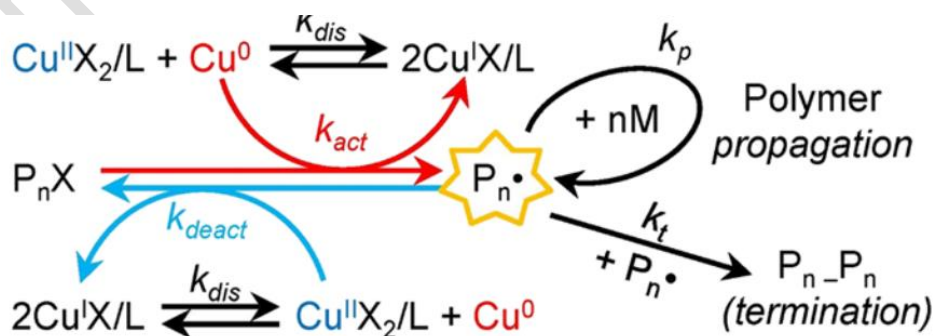
αυτή, ο Cu(I) δε συμμετέχει στην ενεργοποίηση του αλκυλαλογονιδίου αλλά υφίσταται στιγμιαία ανακατανομή σε Cu(0) και Cu(II) (Εικόνα 8).<sup>2</sup>



Εικόνα 8: Σύνοψη απεικόνιση του μηχανισμού κατά τον SET-LRP πολυμερισμό.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ανακατανομή του Cu(I) σε Cu(0) και Cu(II) είναι μια διαδικασία «insitu», πράγμα το οποίο σημαίνει ότι προετοιμάζεται σε ξεχωριστό φιαλίδιο που περιέχει H<sub>2</sub>O, πριν την έναρξη του πολυμερισμού, με σκοπό ο ενεργοποιητής Cu(0) να δράσει γρήγορα και χωρίς την παρουσία οξυγόνου. Μόλις ο CuBr εισέλθει στο H<sub>2</sub>O και αναδευτεί, τότε πραγματοποιείται η ανακατανομή και συνήθως παρατηρείται ένα γαλαζοπράσινο χρώμα στο διάλυμα λόγω του συμπλόκου CuBr<sub>2</sub>/Me<sub>6</sub>TREN.<sup>3</sup>

Οι ερευνητές παρατήρησαν κατά τις αντιδράσεις πολυμερισμού μέσω της SET-LRP ότι η αντίστροφη διαδικασία της ανακατανομής ήταν αμελητέα, η ενεργοποίηση και η απενεργοποίηση ήταν ξεχωριστές αντιδράσεις, το μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς δεν επηρεάζει την κινητική της αντίδρασης, και ότι τα στάδια της διάδοσης και του τερματισμού δεν έχουν παραπροϊόντα. Επίσης, η χρήση χαμηλής συγκέντρωσης καταλύτη και χαμηλής ποσότητας οξυγόνου μειώνουν την πολυπλοκότητα και το κόστος της διαδικασίας. Τα πλεονεκτήματα του SET-LRP είναι ότι έχει πολύ υψηλή ταχύτητα αντίδρασης και ότι είναι μια «πράσινη» και απλή μέθοδος. Επιπλέον, η SET-LRP έχει την ικανότητα να παράγει πολυμερικές αλυσίδες με υψηλό μοριακό βάρος, τόσο σε δραστικές συνθήκες, όσο και σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, η ίδια μέθοδος, έχει τη δυνατότητα να παράγει πολυμερικές αλυσίδες με διαφορετική σειρά πολικών και άπολων μονομερών διαφόρων ειδών, που κυμαίνονται από ακρυλικούς εστέρες έως και το στυρένιο (Εικόνα 9).<sup>2</sup>



Εικόνα 9: Μηχανισμός SET-LRP πολυμερισμού, χρησιμοποιώντας Cu(I).

### 1.7. Εκλεκτική πρόσδεση σε μονάδες πρωτεϊνικής τυροσίνης.

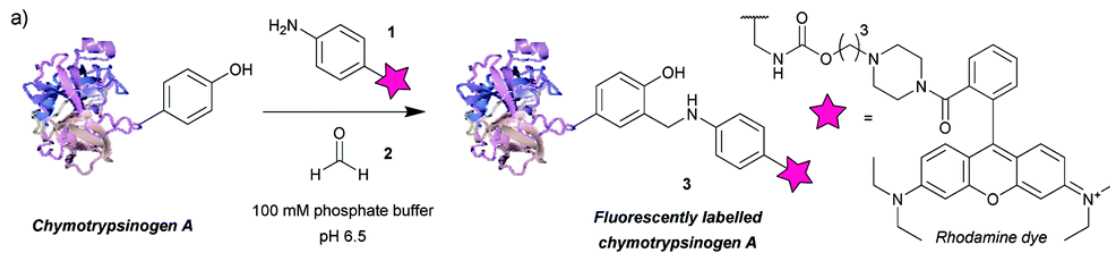
Στον τομέα της τροποποίησης πρωτεϊνών εισέρχεται με μεγάλο ενδιαφέρον η βιοσύζευξη πάνω σε μονάδες πρωτεϊνικής τυροσίνης, καθώς η τυροσίνη επιτρέπει τη σύνθεση καλά καθορισμένων βιοσυζυγών μέσω ειδικής θέσης σύζευξης, καθώς και την εκτενή μελέτη τους. Οι πιο διεξοδικώς μελετημένες μέθοδοι βιοσύζευξης είναι αυτές της τροποποίησης της λυσίνης και της κυστεΐνης μιας πρωτεΐνης, ενώ η τροποποίηση της τυροσίνης είναι η λιγότερη ανεπτυγμένη, αλλά περισσότερο υποσχόμενη μέθοδος μέχρι στιγμής. Γενικά, η τυροσίνη εμφανίζει κάποια πλεονεκτήματα στο πεδίο της βιοσύζευξης, όπως το γεγονός ότι σπάνια είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια των πρωτεϊνών λόγω της αμφίφιλης φύσης της, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για εκλεκτική τροποποίηση. Αντιθέτως, η λυσίνη απαντά σε μεγάλη αφθονία στις πρωτεΐνες, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τη δυσκολία εκλεκτικής πρόσδεσης. Από την άλλη πλευρά, η κυστεΐνη, παρόλο που δεν υπάρχει σε αφθονία, εντούτοις λόγω της υψηλής δραστηριότητας μπορεί να προκαλέσει την οξειδωση ή το διμερισμό της πρωτεΐνης μέσω της δημιουργίας δισουλφιδικού δεσμού, κάτι που δεν υφίσταται στη λιγότερο δραστική τυροσίνη. Επιπλέον, για την πρόσβαση σε κυστεΐνες πολλές φορές απαιτείται η αναγωγή τους πριν τη σύζευξη, επειδή έχουν δημιουργηθεί δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ τους, κάτι που στην περίπτωση της τυροσίνης δεν υφίσταται, διότι βρίσκεται στη δραστική της μορφή.<sup>23</sup>

Με σκοπό την εκλεκτική βιοσύζευξη πρωτεϊνικής τυροσίνης, αναπτύχθηκαν ορισμένες σχετικά πρόσφατες μέθοδοι, με πιο σημαντικές εξ αυτών τις παρακάτω:

#### A) Αντίδραση τύπου Mannich

Η αντίδραση τύπου Mannich τριών συστατικών περιελάμβανε *in situ* σχηματισμό ιμίνης από υποκατεστημένη ανιλίνη και αλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια αντιδρά με κατάλοιπα τυροσίνης προς σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ ανθράκων για τη δημιουργία τροποποιημένης πρωτεΐνης (Εικόνα 10). Ένα πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η θεωρητική ικανότητα ταυτόχρονης προσθήκης δύο λειτουργικών ομάδων, όμως πρακτικά εισάγεται μόνο μία. Η επιλογή της ανιλίνης είναι επίσης περιορισμένη, τόσο σε ομάδες υποκαταστατών που είναι δότες ηλεκτρονίων ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{OCH}_3$ ), όσο και σε ομάδες που είναι δέκτες ηλεκτρονίων ( $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ) προκαλώντας μικρή ή καθόλου μετατροπή της τυροσίνης. Επιπλέον, παρόλο που οι συνθήκες αντίδρασης είναι ήπιες απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι αντίδρασης, η αποτελεσματικότητα είναι μέτρια και η αντίδραση οδηγεί συχνά σε ένα μείγμα προϊόντων. Πάντως, το κύριο πρόβλημα με αυτήν τη μέθοδο φαίνεται να είναι η χαμηλή εκλεκτικότητα ως προς την τυροσίνη. Φάσματα NMR από τις τροποποιημένες πρωτεΐνες, έδειξαν πως υπήρχαν στο διάλυμα προϊόντα πυρηνόφιλης προσβολής στην ιμίνη από υπολείμματα τρυπτοφάνης και κυστεΐνης.<sup>23</sup>

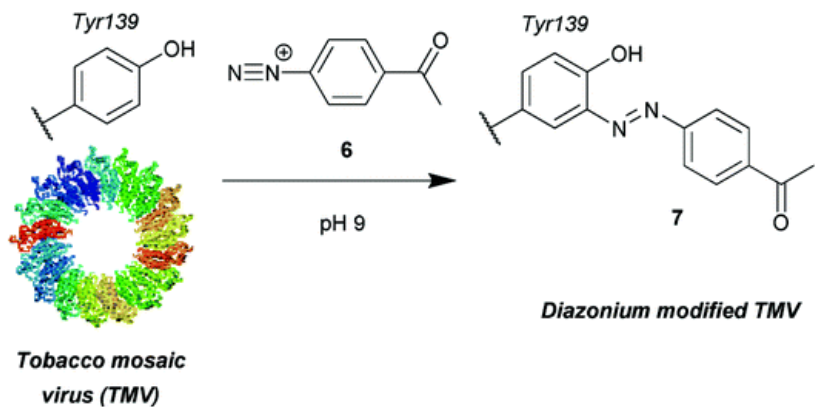




**Εικόνα 10: Βιοσύζευξη τυροσίνης μέσω αντιδράσης τύπου Mannich**

Β) Αντίδραση μέσω διαζωνικού άλατος.

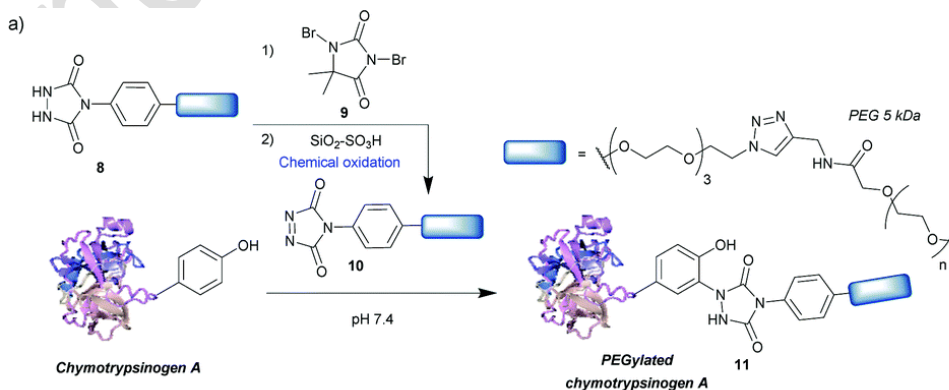
Για την τροποποίηση κατάλοιπων πρωτεϊνικής τυροσίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαζωνικά άλατα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση κατάλοιπων τυροσίνης στο MS2 βακτηριοφάγο και καψίδιων ιού μωσαϊκού του καπνού, προς σχηματισμό συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς, μέσω άζω σύζευξης (Εικόνα 11).<sup>24,25</sup> Παρατηρήθηκε ότι η τροποποίηση είναι μεγαλύτερη του 90% μέσω των διαζωνικών αλάτων που φέρουν υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων σε παρα-θέση. Μελέτες έδειξαν ότι ανάλογα την πρωτεΐνη και τις συνθήκες του διαλύματος, η βιοσύζευξη σε τυροσίνη έχει και τα ανάλογα ποσοστά επιτυχίας, καθώς τα διαζωνικά άλατα μπορούν να αντιδράσουν με μια μεγάλη ποικιλία καταλοίπων αμινοξέων. παρόλα αυτά, σε pH διαλύματος 4.5, οι ερευνητές παρατήρησαν επιτυχή σύζευξη διαζωνιακού άλατος αποκλειστικά σε τυροσίνη, όταν σε pH μεταξύ 5.4 και 7.0 παρουσιάστηκαν ζητήματα χημειοεκλεκτικότητας, δηλαδή το διαζωνικό άλας φαίνεται να αντιδρά και με άλλα κατάλοιπα αμινοξέων. Επίσης, οι συνθήκες αντίδρασης που επιλέχθηκαν για τη βελτιστοποίηση της εκλεκτικότητας επηρέασαν την πυρηνοφιλία της τυροσίνης, αυξάνοντας σημαντικά το χρόνο αντίδρασης στις 72 ώρες για να επιτευχθεί η τροποποίηση σε ποσοστό άνω του 90%. Ωστόσο, χρειάζεται να παρασκευαστεί ένα διαζωνικό αλας που να είναι σταθερό σε υδατικά διαλύματα και να αντιδρά χημειοεκλεκτικά ως προς ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. Η ανάγκη αυτή προέτρεψε τους ερευνητές να συνθέσουν το αντιδραστήριο του εξαφθοροφωσφορικού 4-φορμυλοβενζολίου. Το πλεονέκτημα του αντιδραστήριου αυτού, πέραν της σταθερότητας, είναι ο έλεγχος των ισοδυνάμων που προστίθενται, με αποτέλεσμα τη μείωση των παραπροϊόντων. Για την ακρίβεια, η τυροσίνη βρέθηκε να τροποποιείται κατά κύριο λόγο, όταν αμινοξέα όπως η ιστιδίνη, η τρυπτοφάνη και η κυστεΐνη παρουσίασαν μόλις 2% ποσοστό τροποποίησης, ενώ βελτιώθηκαν οι συνθήκες της αντίδρασης και μειώθηκε ο χρόνος τροποποίησης στα 30 λεπτά.<sup>23,24,25</sup>



Εικόνα 11: Τροποποίηση πρωτεϊνικής τυροσίνης μέσω διαζωνιακού άλατος.

Γ) Αντίδραση μέσω διαζωδικαρβοξυαμιδίων

Μια άλλη μέθοδος τροποποίησης πρωτεϊνικής τυροσίνης είναι η χρήση κυκλικών διαζωδικαρβοξυαμιδίων, όπως για παράδειγμα οι λεγόμενες 4-φαινυλο-1,2,4-τριαζολι-3,5-διόνες (PTAD), οι οποίες παράγονται μέσω οξείδωσης των αντίστοιχων 4-φαινυλο ουραζολών (Εικόνα 12). Σε σύγκριση με τις προηγούμενες μεθόδους, αυτού του τύπου οι ενώσεις αντιδρούν ταχύτερα (15-30 λεπτά) και προσδένονται εκλεκτικά σε τυροσίνη. Επίσης, ένα άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η σταθερότητα του δεσμού που σχηματίζεται με την τυροσίνη. Η αντίδραση διεξάγεται σε μεγάλο εύρος pH (από 2-10), και φαίνεται ότι σε υψηλότερα pH λαμβάνονται και υψηλότερες αποδόσεις λόγω αύξησης της ταχύτητας της διαδικασίας. Για παράδειγμα, η τροποποίηση της BSA με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 5 mM σε pH 7.4 είχε 96% απόδοση σε 15 λεπτά. Επίσης, η αντίδραση αυτή προχωρά καλύτερα όταν στο δακτύλιο του φαινυλίου υπάρχουν ομάδες δότες ηλεκτρονίων ή ουδέτεροι υποκαταστάτες. Επιπλέον, η μέθοδος έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων τροποποίησης πρωτεΐνης, όπως η προσάρτηση φθορίζοντων δεικτών σε πρωτεΐνες, η PEGυλίωση, η παρασκευή αντισωμάτων με πολλαπλή εκλεκτικότητα, τα συζυγή αντισωμάτων-φαρμάκων (ADCs), τα εμβόλια γλυκοσυζεύγματος και τα συζυγή πρωτεΐνης-DNA.<sup>23</sup>

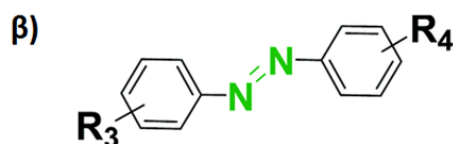
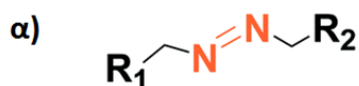


Εικόνα 12: Παράδειγμα τροποποίησης πρωτεϊνικής τυροσίνης με χρήση υποκατεστημένης 4-φαινυλο-1,2,4-τριαζολι-3,5-διόνης (PTAD).

### 1.8 Εκλεκτική πρόσδεση σε μονάδες πρωτεϊνικής τυροσίνης μέσω σχηματισμού αζω δεσμού.

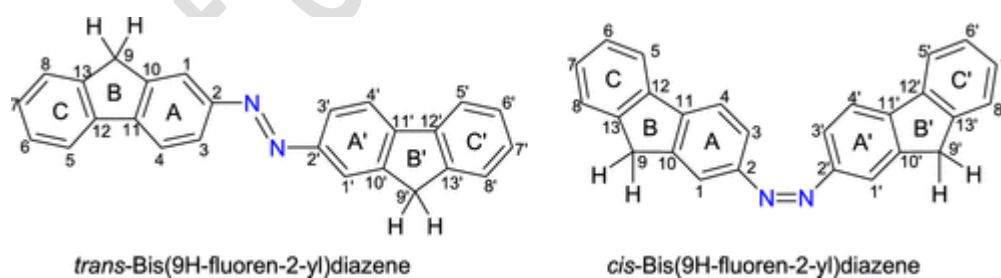
Τα τελευταία χρόνια διεξάγονται πολλές μελέτες για τη χρησιμότητα και τις λειτουργίες του αζω δεσμού σε υπερομοριακές ενώσεις. Αρκετός λόγος γίνεται γύρω από αυτό τον τύπο σύζευξης εξαιτίας των ενδιαφερόντων φυσικών και χημικών ιδιοτήτων που εμφανίζει. Αρχικά, ως αζω δεσμός χαρακτηρίζεται ο διπλός δεσμός ανάμεσα σε δυο άτομα αζώτου ( $-N=N-$ ), τα οποία και αυτά συνδέονται κυρίως με άνθρακα (Εικόνα 13). Ο αζω δεσμός έχει την ικανότητα να μεταβάλλει τη γεωμετρία κατά τη φωτοχημική ή θερμική cis-trans ισομερείωση, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορα λειτουργικά υλικά, όπως μοριακά δοχεία, πολυμερή, υπερμοριακούς νανοσωλήνες πρωτεΐνης και αισθητήρες. Κατά τη διαδικασία του φωτοϊσομερισμού των μορίων που αποτελούνται από αζω δεσμό, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μετατρέπεται σε μηχανική ενέργεια, με αποτέλεσμα οι ενώσεις αυτές να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μοριακές μηχανές μέσω της κίνησης που παρέχει το φως. Έχει διενεργηθεί αρκετά ενδιαφέρουσα έρευνα σχετικά με τη σύνθεση και τις διάφορες εφαρμογές των αλειφατικών αζω ενώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται υλικά μαλακής ύλης. Οι αλειφατικές αζω ενώσεις έχουν την ικανότητα να αποσυντίθενται, με αποτέλεσμα να αποτελούν πηγή ελευθέρων ριζών και κατ'επέκταση να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πολυμερισμού.<sup>26</sup>

Ακόμη, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μελέτες σχετικά με τις αρωματικές αζω ενώσεις, οι οποίες έχουν την ικανότητα να ισομερίζονται από trans σε cis και αντιστρόφως λόγω της φωτοευαισθησίας που εμφανίζουν στην περιοχή του ορατού και του υπεριώδους φωτός, επιφέροντας σημαντικές αλλαγές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν κυρίως την πολικότητα και το μοριακό τους μέγεθος, επιτρέποντας έτσι σε μεγάλο βαθμό τον έλεγχο της σύνθεσης των νανοδομών που φέρουν αρωματικές αζω ενώσεις, καθώς και τον σχεδιασμό υλικών διττής φύσης. Οι παραπάνω αζω ενώσεις μελετούνται διεξοδικά, καθώς εμφανίζουν τεράστιο ενδιαφέρον στη μεταφορά φαρμάκων, στηριζόμενες στην εύκολη αναγωγή του αζω δεσμού και την αποσύνθεση του μορίου. Για το σκοπό αυτό, έχουν ήδη συντεθεί πολυμερικά συστήματα που ανταποκρίνονται σε διάφορα ερεθίσματα, με σκοπό την απελευθέρωση του φαρμάκου σε συγκεκριμένο χρόνο και σε συγκεκριμένο ιστό.<sup>26,27</sup>



Εικόνα 13: Παράδειγμα απεικόνισης α) αζω αλειφατικού μορίου και β) αζωβενζολίου

Ο άζω δεσμός, έχει μελετηθεί και σε μακροκυκλικές ενώσεις, αφού έχει την ιδιαιτερότητα ότι μπορεί να ενσωματώνεται σε οποιοδήποτε μόριο, εμφανίζοντας εξαιρετικές ιδιότητες. Το φωτοχημικό χαρακτηριστικό των κυκλικών αζωβενζολίων εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως τον βαθμό σύζευξης, τον αριθμό των μονάδων στο μακροκυκλικό σύστημα και τη συμμετρία του συνολικού μορίου. Η δυνατότητα της αντιστρεπτής *cis-trans* ισομερείωσης, δίνει την ευκαιρία για περαιτέρω έλεγχο των μακροκυκλικών δομών, δηλαδή τη συναρμολότητα ή την αποσυναρμολότητά τους λόγω της επίδρασης του φωτός σε αυτά (Εικόνα 14). Επιπρόσθετως, τα αζωμακροκυκλικά συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν φωτοδιακόπτες, κάτι το οποίο θα ήταν χρήσιμο στη μεταφορά ιόντων μέσω μεμβρανών και συστημάτων απελευθέρωσης φαρμάκων. Τέλος οι χρωμογονικές και ηλεκτροδραστικές ιδιότητες του αζω δεσμού επιτρέπουν τα μακροκυκλικά συστήματα να χρησιμοποιηθούν σε οπτικούς αλλά και ηλεκτροχημικούς αισθητήρες.<sup>28</sup>



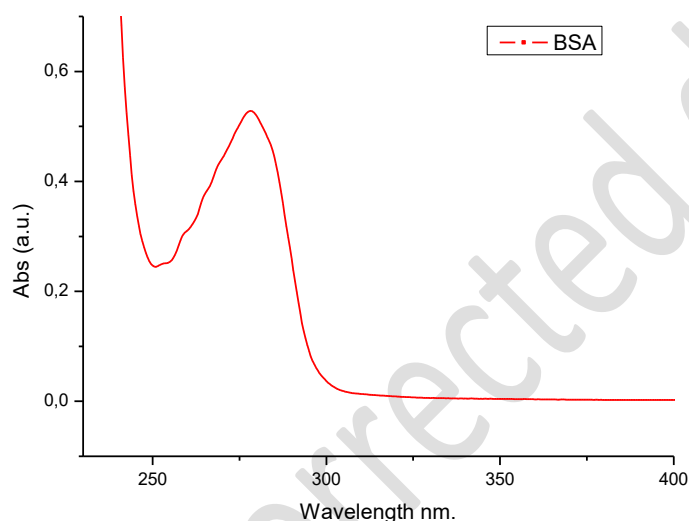
Εικόνα 14: Παράδειγμα απεικόνισης αζω μακροκυκλικών μορίων σε *cis-trans* μορφές.

### 1.9 Στόχος διπλωματικής εργασίας

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, σκοπός ήταν η σύνθεση αμφίφιλων γιγαντιαίων βιοσυζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς μέσω εκλεκτικής αζω-σύζευξης σε μονάδες τυροσίνης. Οι πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν για τη μελέτη αυτή ήταν η BSA και η λυσοζύμη, οι οποίες έχουν μεγάλο ενδιαφέρον σε ιατροφαρμακευτικούς τομείς και διαθέτουν ελεύθερες μονάδες τυροσίνης. Για τη σύνθεση των βιοσυζυγών ακολουθήθηκε η προσέγγιση «grafting from» που περιλαμβάνει την απευθείας ανάπτυξη της πολυμερικής αλυσίδας πάνω σε κατάλληλα τροποποιημένη πρωτεΐνη, που φέρει εκκινητή πολυμερισμού. Η βιοσύζευξη πραγματοποιήθηκε πάνω σε μονάδες τυροσίνης των επιλεγμένων πρωτεϊνών από μόρια ανιλίνης που φέρουν τον εκκινητή πολυμερισμού και μετατράπηκαν σε διαζωνιακά άλατα κατά την αντίδραση με  $\text{NaNO}_2$  και TFA. Οι μέθοδοι πολυμερισμού που επιλέχθηκαν να εξεταστούν είναι ο RDPR φωτοεπαγώμενος πολυμερισμός και ο SET-LRP πολυμερισμός, μέσω ανακατανομής. Η ανακατανομή αυτή οφείλεται στην οξειδοαναγωγή του  $\text{Cu(I)Br}$ , καθώς ο  $\text{Cu(I)}$  με τη βοήθεια του υποκαταστάτη  $\text{Me}_6\text{TREN}$  ανακατανέμεται σε  $\text{Cu(0)}$  και  $\text{Cu(II)}$ , όπου ο  $\text{Cu(0)}$  ενεργοποιεί την αντίδραση του ριζικού πολυμερισμού, ενώ ο  $\text{Cu(II)}$  απενεργοποιεί τις ρίζες. Τέλος, σχετικά με την επιμήκυνση της πολυμερικής αλυσίδας το μονομερές που εξετάστηκε ήταν το στυρένιο.

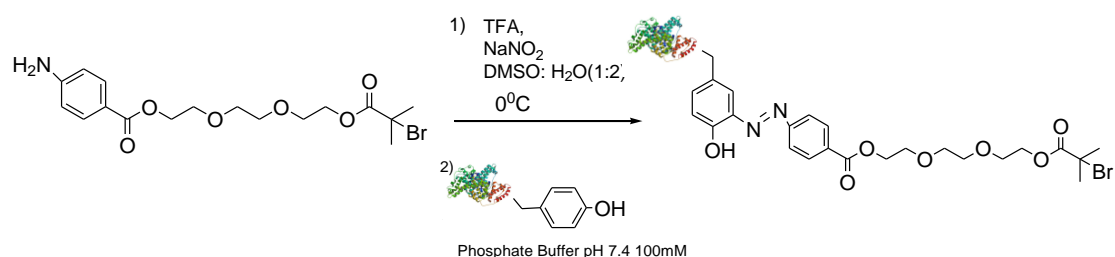
## 2.0. Αποτελέσματα

Στη συνέχεια, παρατίθενται πηκτές ηλεκτροφόρησης και φάσματα UV (200-700nm) με σκοπό τη διερεύνηση της δημιουργίας άζω δεσμού μεταξύ πρωτεϊνικής τυροσίνης και εκκινητή, όπως επίσης, και τη μελέτη της πιθανής πραγματοποίησης του πολυμερισμού του βιοεκκινητή με μονάδες στυρενίου. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, λόγω της συζυγίας που αναπτύσσεται μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και του άζω δεσμού, παρατηρείται χαρακτηριστική απορρόφηση στα 350 nm σε φάσμα UV. Επίσης, εξασφαλίστηκε ένα φάσμα UV της BSA (Εικόνα 15), με σκοπό τη σύγκριση με τα αντίστοιχα φάσματα UV των δειγμάτων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, το δείγμα της BSA εμφανίζει απορρόφηση στα 278 nm, η οποία οφείλεται στην απορρόφηση των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων της πρωτεΐνης (τυροσίνη, φαινυλαλαίνη, θρυπτοφάνη).



**Εικόνα 15: Φάσμα UV δείγματος BSA με απορρόφηση στα 278nm.**

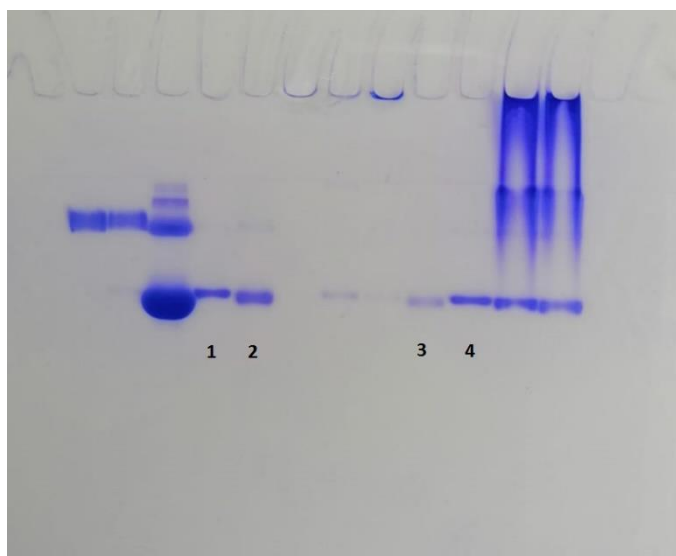
## 2.1. Σύνθεση BSA αζω εκκινητή.



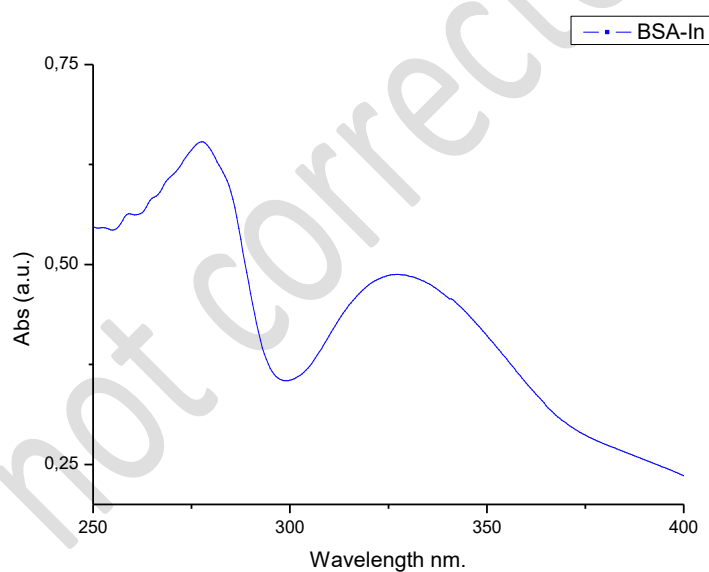
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στη σύνθεση βιοσυζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς μέσω εκλεκτικής αζω-σύζευξης σε μονάδες πρωτεϊνικής τυροσίνης. Για το σκοπό αυτό έγινε παρασκευή του διαζωνιακού άλατος από ανιλίνη και προσπάθεια πρόσδεσης σε τυροσίνες της BSA μέσω της δημιουργία αζω σύζευξης. Για την σύνθεση του διαζωνιακού άλατος από ανιλίνη και σύζευξη σε τυροσίνες BSA μέσω της δημιουργίας αζω δεσμού σε vial των 4 mL διαλύεται το CG-1-76 (50 ισοδ.) σε DMSO (0.55ml) και στο κίτρινο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται το υπερκάθαρο νερό (H<sub>2</sub>O milliQ, 1.1 mL). Στο μίγμα αυτό διοχετεύεται με γυάλινη σύριγγα το TFA (75 ισοδ.) σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στους 0 °C με πιπέτα εισάγεται το υδατικό διάλυμα NaNO<sub>2</sub> (55 ισοδ.), το οποίο είχε αφεθεί πρωτίστως σε πάγο. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 30 λεπτά. Παράλληλα, σε erpedorf προστίθεται η BSA (1 ισοδ.) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM και pH 5.8, (1.25 mL) και το μίγμα αναδεύεται υπό περιστροφή μέχρι την πλήρη διάλυση της πρωτεΐνης. Με το πέρας των 30 λεπτών, το σχηματιζόμενο διαζωνιακό άλας αντλείται με πλαστική σύριγγα, διοχετεύεται σταδιακά με ανάδευση στο διάλυμα της BSA και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Τέλος το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25000kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μείγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH7.4, έπειτα σε 5mM και τελικώς σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας των μονομερών το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) (Εικόνα 16) και με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού(UV-Vis) (Εικόνα 17).

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 16, θέση 2) παρατηρείται ότι η ζώνη στη πηκτή του δείγματος εμφανίζεται ελάχιστα πιο κάτω από το δείγμα της BSA (θέση 1 και θέση 4), κάτι που σημαίνει ότι κατά πάσα πιθανότητα έχει δημιουργηθεί ο αζω δεσμός μεταξύ εκκινητή και πρωτεϊνικής τυροσίνης. Στο φάσμα UV (Εικόνα 19) εντοπίζονται δύο βασικές κορυφές στα 277.5 nm και 327.5nm. Η κορυφή στα 277.5 nm οφείλεται στην απορρόφηση των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων της πρωτεΐνης, ενώ η κορυφή στα 327.5nm οφείλεται στη συζυγία που αναπτύσσεται μεταξύ των

αρωματικών δακτυλίων και του αζω δεσμού. Κατ' επέκταση η δεύτερη κορυφή θεωρείται άλλη μια απόδειξη της δημιουργία του αζω δεσμού.



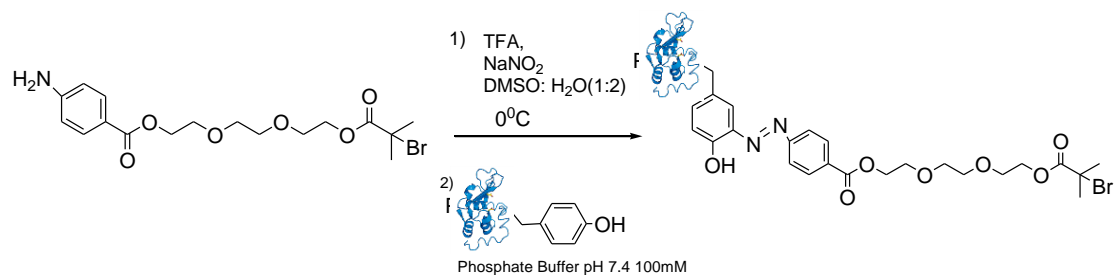
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε κανονικές συνθήκες, 10% Resolving. Θέση 1 και θέση 4: φυσική BSA, θέση 2: BSA-αζω εκκινητής πολύμερισμού, θέση 3: BSA-εκκινητής πολύμερισμού.



Εικόνα 17: Φάσμα UV BSA-εκκινητή σε συγκέντρωση 0.018mM με απορρόφηση στα 277.5nm και 327.5nm

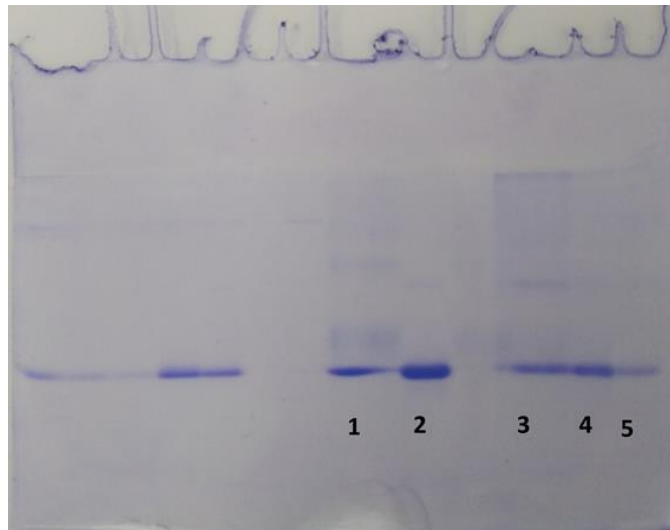


## 2.2. Σύνθεση λυσοζύμης αζω εκκινητή.

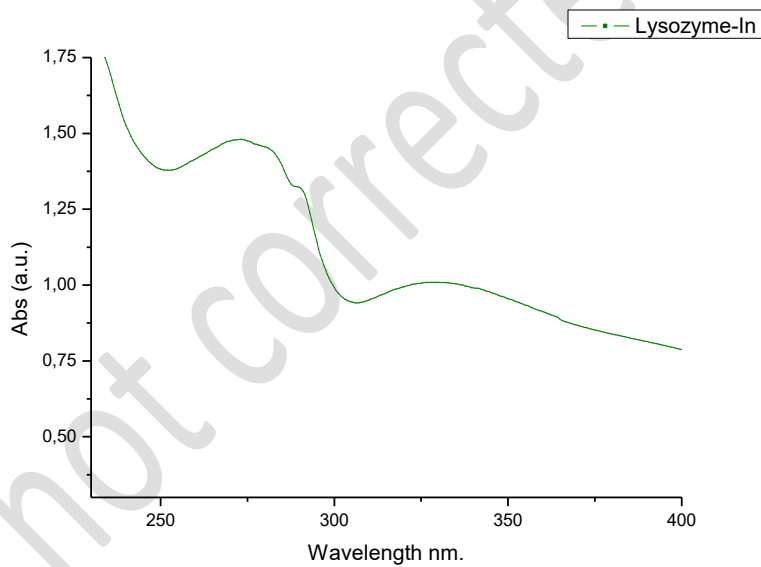


Για την σύνθεση του διαζωνιακού άλατος από ανιλίνη και σύζευξη σε τυροσίνες λυσοζύμη μέσω της δημιουργίας αζω δεσμού σε vial των 4 mL διαλύεται το CG-1-76 (50 ισοδ.) σε DMSO (0.55ml) και στο κίτρινο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται το υπερκάθαρο νερό (H<sub>2</sub>O milliQ, 1.1 mL). Στο μίγμα αυτό διοχετεύεται με γυάλινη σύριγγα το TFA (75 ισοδ.) σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στους 0 °C με πιπέτα εισάγεται το υδατικό διάλυμα NaNO<sub>2</sub> (55 ισοδ.), το οποίο είχε αφεθεί πρωτίστως σε πάγο. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 30 λεπτά. Παράλληλα, σε erpedorf προστίθεται η λυσοζύμη (1 ισοδ.) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM και pH 5.8, (1.25 mL) και το μίγμα αναδεύεται υπό περιστροφή μέχρι την πλήρη διάλυση της πρωτεΐνης. Με το πέρας των 30 λεπτών, το σχηματιζόμενο διαζωνιακό άλας αντλείται με πλαστική σύριγγα, διοχετεύεται σταδιακά με ανάδευση στο διάλυμα της BSA και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Τέλος το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 6000-8000 kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μείγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH7.4, έπειτα σε 5mM και τελικώς σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας των, το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) (Εικόνα 18) και με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού(UV-Vis) (Εικόνα 19).

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 18, θέση 2) παρατηρείται ότι η ζώνη στη πηκτή του δείγματος εμφανίζεται ελάχιστα πιο κάτω από τη ζώνη του δείγματος της λυσοζύμης(θέση 1), αυτό σημαίνει ότι κατά πάσα πιθανότητα έχει δημιουργηθεί ο άζω δεσμός μεταξύ εκκινητή και πρωτεϊνικής τυροσίνης. Στο φάσμα UV, Εικόνα 19, εντοπίζονται δύο βασικές κορυφές στα 273.0 nm και 329.5nm. Η κορυφή στα 273.0 nm οφείλεται στην απορρόφηση των αρωματικών δακτυλίων αμινοξέων της πρωτεΐνης, ενώ η κορυφή στα 329.5 nm οφείλεται στη συζυγία που αναπτύσσεται μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και του άζω δεσμού. Κατ' επέκταση η δεύτερη κορυφή θεωρείται άλλη μια απόδειξη της δημιουργία του αζω δεσμού.

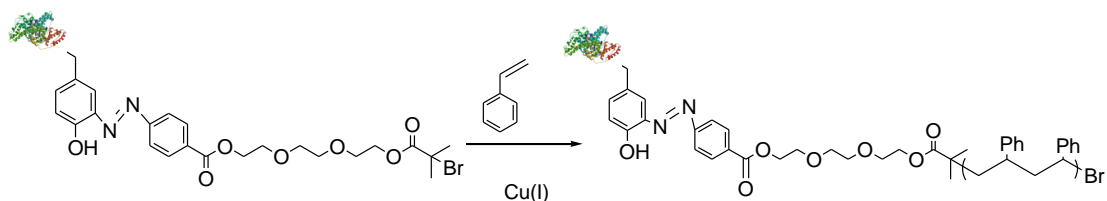


Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου σε αποδιατακτικές συνθήκες, 16% Resolving. Θέση 1: φυσική λυσοζύμη, θέση 2: λυσοζύμη-αζω εκκινητής, θέση 3: λυσοζύμη-πολυστερένιο (Αντίδραση I), θέση 4: λυσοζύμη-πολυστερένιο (Αντίδραση II), θέση 5: λυσοζύμη-πολυστερένιο (Αντίδραση III).



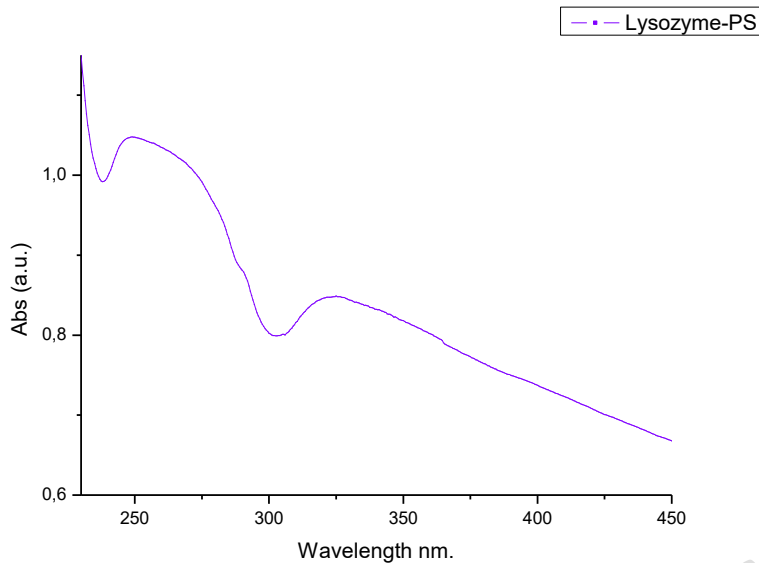
Εικόνα 19: Φάσμα UV δείγματος λυσοζύμης-αζω εκκινητή συγκέντρωσης 0.08mM με απορρόφηση στα 273.00nm και 329.5nm.

### 2.3. Σύνθεση λυσοζύμης-πολυστερενίου (Αντίδραση I).



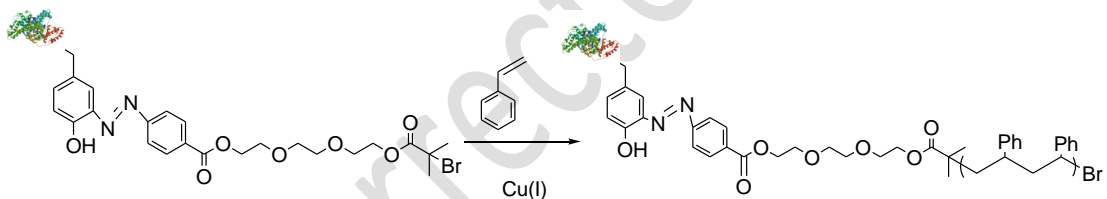
Στην συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται Photo-RDRP πολυμερισμός στυρενίου στον αζω βιοεκκινητή λυσοζύμης, με χρήση Cu(II) και λάμπας UV. Αρχικά, σε falcon των 50 mL προστίθεται CuBr<sub>2</sub> (7.5 ισοδ.) σε H<sub>2</sub>O mQ (10mL), ανακινείται και ύστερα αντλείται 1mL που μεταφέρεται σε erpedorf. Στο νέο διάλυμα προστίθεται Me<sub>6</sub>TREN (60 ισοδ.). Το διάλυμα φυλάσσεται σε πάγο. Σε σύριγγα των 2.5mL που φέρει μαγνητικό αναδευτήρα διοχετεύεται το μίγμα του λυσοζύμη-βιοεκκινητή (ισοδ.1), ενώ σε erpedorf προστίθεται το στυρένιο (2000 ισοδ.) σε H<sub>2</sub>O mQ (79μL) και τοποθετείται στους υπέρηχους για λιγότερο από 5 λεπτά με σκοπό τη δημιουργία ομοιόμορφου γαλακτώματος. Κατόπιν, ποσότητα από το διάλυμα CuBr<sub>2</sub>-Me<sub>6</sub>TREN (107μL) προστίθεται στο γαλακτώμα στυρενίου-νερού και αμέσως μεταφέρεται με γυάλινη σύριγγα στην πλαστική σύριγγα που φέρει τον βιοεκκινητή. Η σύριγγα σφραγίζεται, αφού απομακρυνθεί όλος ο αέρας που εμπεριέχεται, τοποθετείται στη λάμπα UV και ακτινοβολείται σε χαμηλή ανάδευση για 3ώρες και 30 λεπτά. Τέλος το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 6000-8000 kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μείγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH7.4, ~2 mM EDTA έπειτα σε 5mM και τελικώς σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας των μονομερών καθώς και του συμπλόκου Cu(II), το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) (Εικόνα 18) και με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού(UV-Vis) (Εικόνα 20).

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 18, θέση 3) παρατηρείται ότι η ζώνη του δείγματος στην πηκτή εμφανίζεται στο ίδιο ύψος με την ζώνη του δείγματος της λυσοζύμης αζω εκκινητή. Να σημειωθεί ότι σε περίπτωση πολυμερούς η ζώνη στη πηκτή εμφανίζεται στο σημείο φόρτωσης του δείγματος. Κάτι που σημαίνει ότι το δείγμα δεν περιέχει πολυμερές. Στο φάσμα UV, Εικόνα 20, εντοπίζονται δύο βασικές κορυφές στα 249.0 nm και 325.0nm. Η κορυφή στα 249.0 nm οφείλεται στην απορρόφηση των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων της πρωτεΐνης, ενώ η κορυφή στα 325.0 nm οφείλεται συζυγίας που αναπτύσσεται μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και του αζω δεσμού.



**Εικόνα 20: Φάσμα UV δείγματος λυσοζύμης-πολυστυρενίου συγκέντρωσης 0.08mM με απορρόφηση στα 249.0nm και 325.0nm**

#### 2.4. Σύνθεση BSA- πολυστυρενίου (Αντίδραση I).

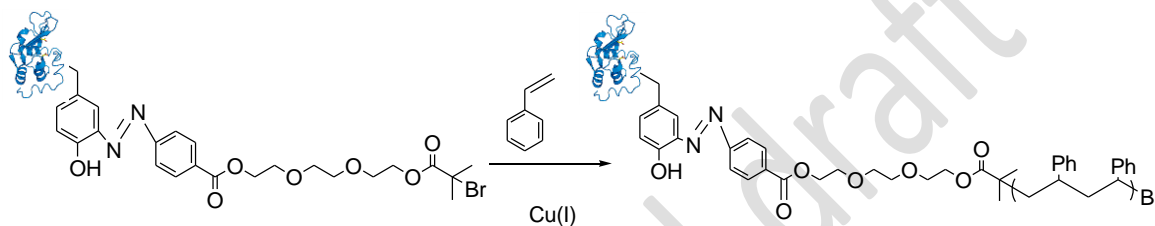


Στην συγκεκριμένη αντίδραση, πραγματοποιείται SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου πάνω στον αζω βιοεκκινητή BSA, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I). Σε σύριγγα των 2,5 mL που φέρει μαγνητικό αναδευτήρα, προσαρμόζεται tip και προστίθεται ο CuBr (40 ισοδ.) mL H<sub>2</sub>O (72μL). Έπειτα προστίθεται το Me<sub>6</sub>TREN(40 ισοδ.) και πιέζοντας έμβολο της συριγγας αντλείται το περιεχόμενο του tip, ενώ προστίθεται επιπλέον mL H<sub>2</sub>O (72μL) στο tip για ξέπλυμα, όπου διοχετεύεται στη σύριγγα. Αφού αφαιρεθεί ο αέρας και σφραγιστεί η σύριγγα τοποθετείται σε πάγο υπό ανάδευση για 3 λεπτά. Ταυτόχρονα με σύριγγα γυάλινη προστίθεται το στυρένιο (1000 ισοδ.) σε erpedorf μαζί με H<sub>2</sub>O mL (100μL) και ακολουθεί υπερήχηση εως ότου δημιουργηθεί γαλάκτωμα. Μετά με πλαστική σύριγγα διοχετεύεται το γαλάκτωμα στυρενίου-νερού στη σύριγγα όπου πραγματοποιείται η αντίδραση και τοποθετείται ο BSA βιοεκκινητής (1 ισοδ.). Αφαιρείται πλήρως ο αέρας, η σύριγγα σφραγίζεται και αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου περίπου 4 ώρες. Τέλος το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25000 kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μείγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος

φωσφορικών, pH 7.4, ~2 mM EDTA έπειτα σε 5mM και τελικώς σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας των μονομερών καθώς και του συμπλόκου Cu(II), το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) (Εικόνα 16).

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 16, θέση 3) παρατηρείται ότι η ζώνη του δείγματος στην πηκτή εμφανίζεται στο ίδιο ύψος με την ζώνη του δείγματος του βιοεκκινητή (θέση 2). Όπως προαναφέρθηκε αυτό σημαίνει ότι το δείγμα δεν περιέχει πολυμερές. Για το συγκεκριμένο δείγμα δεν λαμβάνεται φάσμα UV.

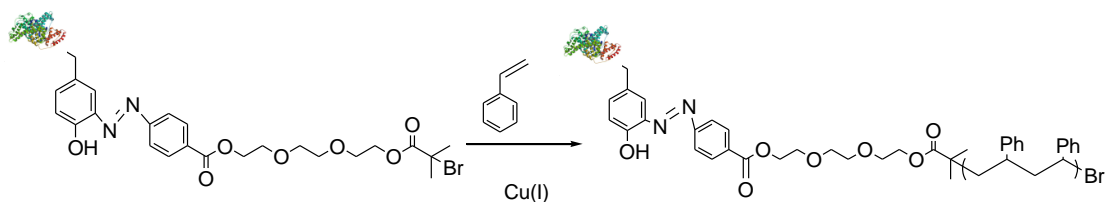
## 2.5. Σύνθεση βιοπολυμερούς λυσοζύμης-πολυστυρένιο (Αντίδραση II).



Στη συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου πάνω στον αζω βιοεκκινητή BSA, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I). Για τον σκοπό αυτό ακολουθείται η ίδια μέθοδος σύνθεσης με εκείνη της BSA-πολυστυρένιο (υποενότητα 2.4). Ειδικότερα, προστίθενται ο αζω βιοεκκινητής λυσοζύμης (1 ισοδ.), ο CuBr (40 ισοδ.), το Me<sub>6</sub>TREN (40 ισοδ.), το στυρένιο (1000 ισοδ.) και ο συνολικός όγκος H<sub>2</sub>O mQ (100μL). Τέλος το περιεχόμενο της σύρριγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 6000-8000 kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μείγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4, ~2 mM EDTA έπειτα σε 5mM και τελικώς σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας των μονομερών καθώς και του συμπλόκου Cu(II), το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) (Εικόνα 18) και με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) (Εικόνα 21).

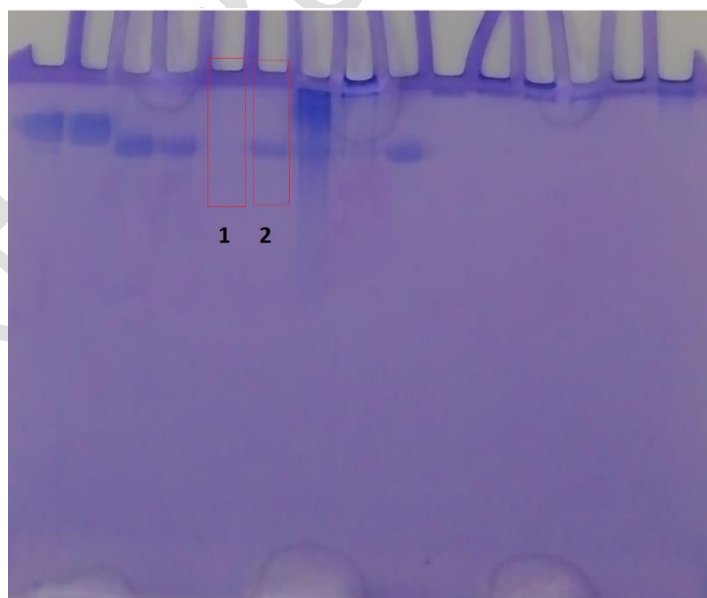
Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 18, θέση 4) παρατηρείται ότι η ζώνη του δείγματος στη πηκτή εμφανίζεται στο ίδιο ύψος με την ζώνη του δείγματος του βιοεκκινητή (θέση 2). Όπως προαναφέρθηκε αυτό σημαίνει ότι το δείγμα της συγκεκριμένης αντίδρασης δεν περιέχει πολυμερές. Για το συγκεκριμένο δείγμα δεν λαμβάνεται φάσμα UV.

## 2.6 Σύνθεση βιοπολυμερούς BSA-πολυστυρένιο(Αντίδραση II).



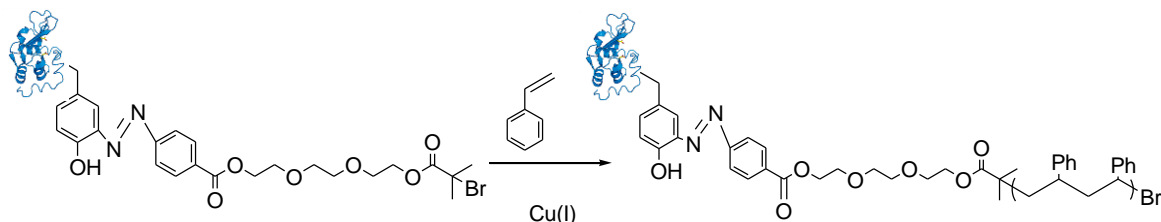
Στην αντίδραση αυτή πραγματοποιείται SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου πάνω στον αζω βιοεκκινητή BSA, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I). Για το σκοπό αυτό προστίθενται ο BSA-βιοεκκινητής (1 ισοδ.), ο CuBr (55 ισοδ.), το Me<sub>6</sub>TREN (55 ισοδ.), το στυρένιο (1500 ισοδ.) και ο συνολικός όγκος H<sub>2</sub>O mQ (100μL). Το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25000kDa. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH7.4, ~2 mM EDTA έπειτα σε 5mM και τελικώς σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας των μονομερών καθώς και του συμπλόκου Cu(II), το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) (Εικόνα 21)

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 21 θέση 2) παρατηρείται ότι η ζώνη του δείγματος, βρίσκεται στο ίδιο ύψος με την ζώνη του βιοεκκινητη. Άρα το δείγμα δεν περιέχει πολυμερές. Για το συγκεκριμένο δείγμα δεν λαμβάνεται φάσμα UV.



Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες, 12% Resolving. Θέση 1: BSA-πολυστυρένιο(Αντίδραση II)θέση 2: BSA-πολυστυρένιο(Αντίδραση III)

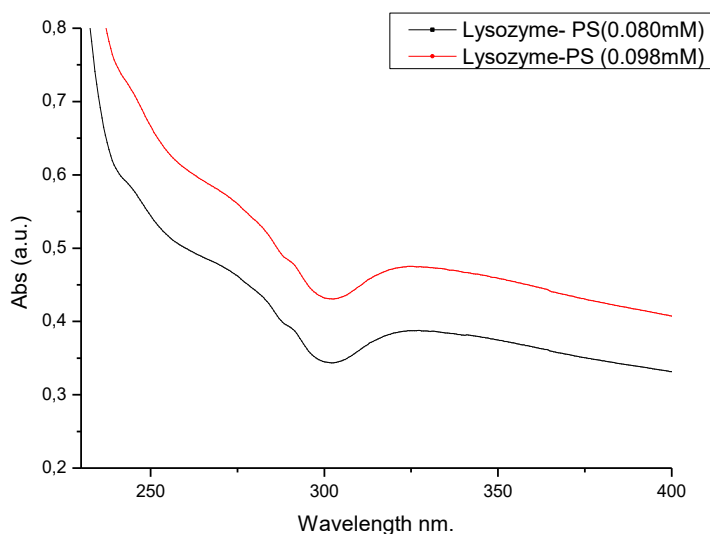
## 2.7. Σύνθεση βιοπολυμερούς λυσοζύμης- πολυστυρένιο (Αντίδραση III).



Στην αντίδραση αυτήν πραγματοποιείται SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου πάνω στον άζω βιοεκκινητή BSA, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I) προστίθενται ο άζω βιοεκκινητής λυσοζύμης (1 ισοδ.) ο CuBr (40ισοδ.), το Me<sub>6</sub>TREN(40ισοδ.) το στυρένιο (1500 ισοδ.) και ο συνολικός όγκος H<sub>2</sub>O mQ (100μL). Τέλος το περιεχόμενο της σύρριγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 6000-8000 kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μείγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH7.4, ~2 mM EDTA έπειτα σε 5mM και τελικώς σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας των μονομερών καθώς και του συμπλόκου Cu(II), το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) (Εικόνα 21) και με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού(UV-Vis) (Εικόνα 22).

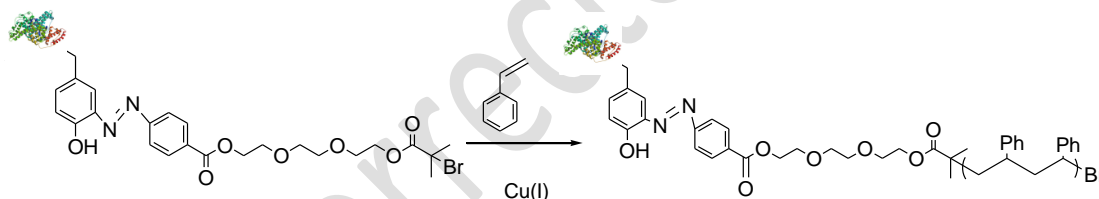
Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 18, θέση 5) παρατηρείται ότι η ζώνη στην πηκτή του δείγματος εμφανίζεται στο ίδιο ύψος με την ζώνη του δείγματος του βιοεκκινητή Επίσης στο παρακάτω φάσμα (Εικόνα 22) εντοπίζονται δύο βασικές κορυφές στα 272.0 nm και 327.0 nm σε συγκέντρωση δείγματος 0.08 mM και δύο κορυφές στα 272.0 nm και 324.5.0 nm σε συγκέντρωση δείγματος 0.098mM. Η κορυφή στα 272 nm οφείλεται στην απορρόφηση των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων της πρωτεΐνης, ενώ οι κορυφές στα 327.0 και 324.5nm οφείλονται στη συζυγία που αναπτύσσεται μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και του άζω δεσμού. Αν συγκριθεί το φάσμα του δείγματος του λυσοζύμης άζω εκκινητή με το φάσμα του εξετάζοντος δείγματος, δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη διαφορά που θα μπορούσε να οδηγήσει σε κάποιο συμπέρασμα ότι το δείγμα περιέχει πολυμερές.





**Εικόνα 22:** Φάσμα UV δείγματος λυσοζύμης-PS δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων. Σε συγκέντρωση 0.08mM εμφανίζονται κορυφές με απορρόφηση στα 272.0nm και 327.0nm. Σε συγκέντρωση 0.098mM εμφανίζονται κορυφές με απορρόφηση στα 272.0nm και 324.5nm.

## 2.8. Σύνθεση βιοπολυμερούς BSA-πολυστυρένιο (Αντίδραση III).



Για την σύνθεση του βιοπολυμερούς BSA-πολυστυρένιο πραγματοποιείται SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου πάνω στον αζω βιοεκκινητή BSA, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I). Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία με την προαναφερθείσα. Ειδικότερα, προστίθενται ο BSA-βιοεκκινητής (1 ισοδ.), ο CuBr (55 ισοδ.), το Me<sub>6</sub>TREN (55 ισοδ.), το στυρένιο (1375 ισοδ.) και ο συνολικός όγκος H<sub>2</sub>O mQ (100μL). Τέλος το περιεχόμενο της σύρριγας τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής (MWCO) 25000 kDa με σκοπό τον εμπλουτισμό του μείγματος. Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε αρχικά σε 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH7.4, ~2 mM EDTA έπειτα σε 5mM και τελικώς σε 20mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.4. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας των μονομερών καθώς και του συμπλόκου Cu(II), το προϊόν χαρακτηρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) (Εικόνα 21).

Στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 21, θέση 1) παρατηρείται ότι στο κελί του δείγματος της συγκεκριμένης αντίδρασης δεν εμφανίζεται κάποια ζώνη. Η απουσία ζώνης ίσως οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση της ουσίας που περιείχε η ποσότητα δείγματος



που προστέθηκε. Υπό αυτές τις συνθήκες δεν μπορεί να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Για το συγκεκριμένο δείγμα δεν λαμβάνεται φάσμα UV.

### 3.0 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Από τα πειράματα που διεξήχθησαν συμπεραίνεται ότι η σύζευξη μεταξύ πρωτεϊνικής τυροσίνης και διαζωνιακού άλατος, που φέρει έναν εκκινητή πολυμερισμού, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων είτε με pH 5,8 είτε με pH 7.4 φαίνεται να είναι επιτυχής. Την ίδια ώρα, για τα πειράματα πολυμερισμού είτε με CuBr είτε με CuBr<sub>2</sub> και λάμπα UV απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές με σκοπό την επιτυχή σύνθεση αμφίφιλων βιοσυζυγών.

not corrected draft

## 5.0. Πειραματικό μέρος

### 5.1. Αναλυτικές τεχνικές.

#### Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου

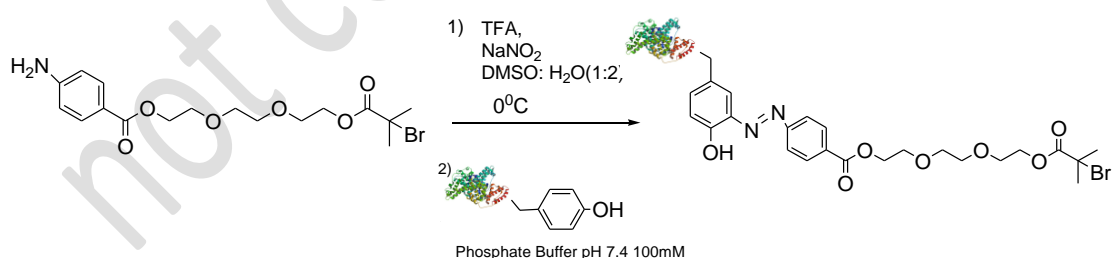
Για τα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε η BSA ως πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες σε πήκτωμα συσσώρευσης 4% και πήκτωμα διαχωρισμού 10% , ενώ για τα δείγματα που περιέχουν λυσοζύμη, οι αποδιατακτικές συνθήκες κρίθηκαν απαραίτητες, με χρήση σε πήκτωμα συσσώρευσης 4% και πήκτωμα διαχωρισμού 16%.Επίσης, για την δημιουργία των πηκτωμάτων διαχωρισμού και συσσώρευσης προστίθενται υδατικό διάλυμα 10% υπερθειικού αμμωνίου (APS) ,TEMED και υδατικό διάλυμα 10% SDS.Το σύστημα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται είναι το Mini-PROTEANT TetraCell της BIO-RAD. Τα δείγματα διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε Tris-HCl, γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης, ενώ η χρώση της εκάστοτε πηκτής πραγματοποιήθηκε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue.

#### Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UVShimadzu 1900σε εύρος μήκους κύματος από 200-700 nm. Σε όλες τις μετρήσεις δειγμάτων χρησιμοποιείται κυψελίδα χαλαζία του 0.5mL και τα δείγματα είναι διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων συγκέντρωσης 20 mM και pH 7.4.

### 3.2. Αναλυτικές Μέθοδοι σύνθεσης.

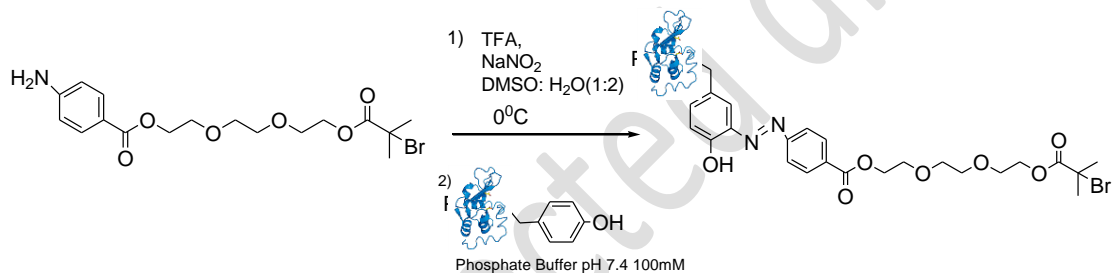
#### 5.2.1.Παρασκευή διαζωνιακού άλατος από ανιλίνη και σύζευξη σε τυροσίνες BSA μέσω της δημιουργίας αζω δεσμού.



Σε vial των 4 mL διαλύεται το CG-1-76 (8.5 mg, 50 ισοδ.) σε DMSO (0.55ml) και στο κίτρινο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται το υπερκάθαρο νερό (H<sub>2</sub>O mQ, 1.1 mL). Στο μίγμα αυτό διοχετεύεται με γυάλινη σύριγγα το TFA (2.2 μL, 75 ισοδ.) σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στους 0 °C με πιπέτα εισάγεται το υδατικό διάλυμα NaNO<sub>2</sub> (1.43 mg σε 100 μLH<sub>2</sub>O, 55 ισοδ.), το οποίο είχε αφεθεί πρωτίστως σε πάγο. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 30 λεπτά. Παράλληλα, σε erpedorf προστίθεται η BSA (25mg, 3.759x10<sup>-4</sup> mmol, 1 ισοδ.) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer συγκέντρωσης 100 mM και pH 5.8, 1.25 mL)

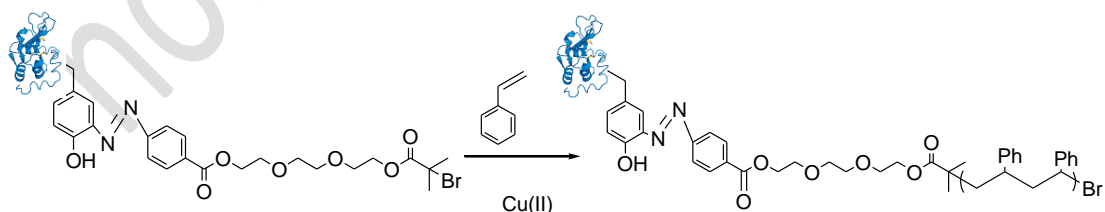
και το μίγμα αναδεύεται υπό περιστροφή μέχρι την πλήρη διάλυση της πρωτεΐνης. Με το πέρας των 30 λεπτών, το σχηματιζόμενο διαζωνιακό άλας αντλείται με πλαστική σύριγγα, διοχετεύεται σταδιακά με ανάδευση στο διάλυμα της BSA και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Έπειτα, η αντίδραση μεταβιβάζεται σε ημιπερατή μεμβράνη CWM με MWCO 25000 kDa όπου αναδεύεται σε διάλυμα 5 mM phosphate buffer (pH= 7.4) που περιεχει 10% CH<sub>3</sub>CN (150 mL) μέσα σε πλαστικό ποτήρι ζέσεως των 500mL και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα ανταλλάχθηκε με αντίστοιχο διάλυμα phosphate buffer (pH= 7.4) συγκέντρωσης 5 mM, (200mL) και αφέθηκε υπό ανάδευση στους 7 °C για 2 ώρες, κατόπιν με διάλυμα phosphate buffer (pH= 7.4) συγκέντρωσης 20mM (200mL) για επιπλέον 2 ώρες υπό ανάδευση στους 7 °C και , τέλος, το κίτρινο μίγμα φυλάσσεται σε falcon των 14 mL (2.698 mL, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 139.3 μM).

### 5.2.2. Παρασκευή διαζωνιακού άλατος από ανιλίνη και σύζευξη σε τυροσίνες λυσοζύμης μέσω της δημιουργίας αζω δεσμού.



Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία με την αντίδραση 1 με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη η λυσοζύμη (5,38 mg/1 ισοδ.), ενώ η ημιπερατή μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε έχει MWCO 6000-8000 kDa.

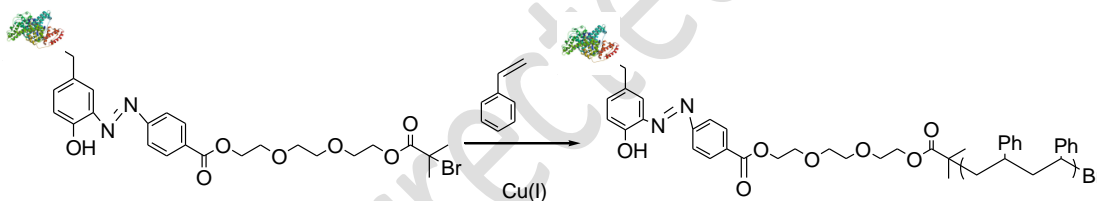
### 5.2.3 Photo-RDRP πολυμερισμός στυρενίου στον αζω βιοεκκινητή λυσοζύμης, με χρήση Cu(II) και λάμπας UV.



Άρχικά, σε falcon των 50 mL προστίθεται CuBr<sub>2</sub> (0.15mg/7.5 ισοδ.) σε H<sub>2</sub>O mQ (10mL), ανακινείται για πλήρη διάλυση και αντλείται 1mL που μεταφέρεται σε erpedorf. Στο νέο διάλυμα προστίθεται Me<sub>6</sub>TREN (1.4μL/60 ισοδ.) και από μια απαλή απόχρωση του μπλέ το διάλυμα γίνεται ανοιχτό γαλάζιο. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πάγο. Σε σύριγγα των 2.5mL που φέρει μαγνητικό αναδευτήρα διοχετεύεται το μίγμα του λυσοζύμη-βιοεκκινητή (0.622/ ισοδ.1), ενώ σε erpedorf προστίθεται το στυρένιο

(21.4μL/2000 ισοδ.) σε H<sub>2</sub>O mQ (79μL) και τοποθετείται στους υπέρηχους για λιγότερο από 5 λεπτά με σκοπό τη δημιουργία ομοιόμορφου γαλακτώματος. Κατόπιν, ποσότητα από το διάλυμα CuBr<sub>2</sub>-Me<sub>6</sub>TREN (107μL) προστίθεται στο γαλάκτωμα στυρενίου-νερού και αμέσως μεταφέρεται με γυάλινη σύριγγα στην πλαστική σύριγγα που φέρει τον βιοεκκινητή. Η σύριγγα σφραγίζεται, αφού απομακρυνθεί όλος ο αέρας που εμπεριέχεται, τοποθετείται στη λάμπα UV και ακτινοβολείται σε χαμηλή ανάδευση για 3 ώρες και 30 λεπτά. Έπειτα, η αντίδραση μεταβιβάζεται σε ημιπερατή μεμβράνη CWM με MWCO 6000-8000 kDa όπου αναδεύεται σε διάλυμα 5 mM phosphate buffer (pH= 7.4) που περιέχει 10% CH<sub>3</sub>CN (150 mL) μέσα σε πλαστικό ποτήρι ζέσεως των 500mL και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα ανταλλάχθηκε με αντίστοιχο διάλυμα phosphate buffer (pH= 7.4) συγκέντρωσης 5 mM, (200mL) και αφέθηκε υπό ανάδευση στους 7 °C για 2 ώρες, κατόπιν με διάλυμα phosphate buffer (pH= 7.4) συγκέντρωσης 20mM (200mL) για επιπλέον 2 ώρες υπό ανάδευση στους 7 °C και η αντίδραση μεταβιβάζεται σε erpedorf των 2mL(863μL, 107.8 μM).

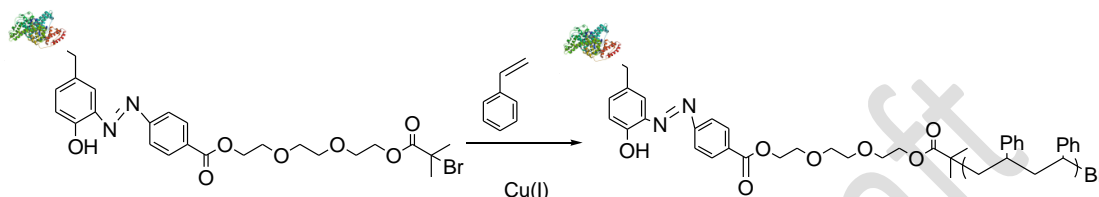
#### 5.2.4. SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου στον αζω βιοεκκινητή BSA, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I).



Σε σύριγγα των 2,5 mL που φέρει μαγνητικό αναδευτήρα, προσαρμόζεται tip (κομμένο στην άκρη) και ριζόχαρτο σε μορφή χωνιού και από εκεί προστίθεται ο CuBr (0.659 mg/40 ισοδ.) mQ H<sub>2</sub>O (72μL). Έπειτα προστίθεται το Me<sub>6</sub>TREN(1,23μL/40 ισοδ.) και πιέζοντας έμβολο της σύριγγας αντλείται το περιεχόμενο του tip, ενώ προστίθεται επιπλέον mQ H<sub>2</sub>O (72μL) στο tip για ξέπλυμα, όπου διοχετεύεται στη σύριγγα. Αφού αφαιρεθεί ο αέρας και σφραγιστεί η σύριγγα τοποθετείται σε πάγο υπό ανάδευση για 3 λεπτά. Ταυτόχρονα με σύριγγα γυάλινη προστίθεται το στυρένιο (19,8μL/1500 ισοδ.) σε erpedorf μαζί με H<sub>2</sub>O mQ (100μL) και ακολουθεί υπερήχηση εως ότου δημιουργηθεί γαλάκτωμα. Μετά με πλαστική σύριγγα διοχετεύεται το γαλάκτωμα στυρενίου-νερού στη σύριγγα όπου πραγματοποιείται η αντίδραση και τοποθετείται ο βιοεκκινητής JM-1 (0.825mL/1 ισοδ.). Αφαιρείται πλήρως ο αέρας, η σύριγγα σφραγίζεται και αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου περίπου 4 ώρες. Το διάλυμα απέκτησε ανοιχτό πράσινο χρώμα με μαύρα στερεά και το χρώμα παρέμεινε ως το τέλος της αντίδρασης. Έπειτα, η αντίδραση μεταβιβάζεται σε ημιπερατή μεμβράνη CWM με MWCO 25000 kDa όπου αναδεύεται σε διάλυμα 5 mM phosphate buffer (pH= 7.4) που περιέχει 10% CH<sub>3</sub>CN (150 mL) μέσα σε πλαστικό ποτήρι ζέσεως των 500mL. Επίσης, προστίθεται EDTA με σκοπό να δεσμεύσει τον δισθενή χαλκό (Cu<sup>2+</sup>) και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα ανταλλάχθηκε με αντίστοιχο διάλυμα phosphate buffer

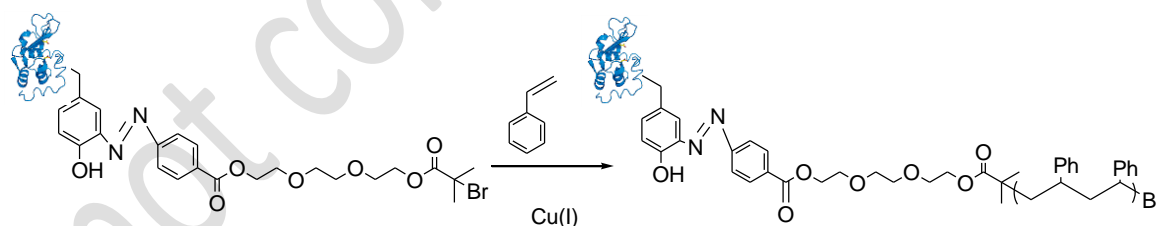
(pH= 7.4) συγκέντρωσης 5 mM, (200mL) και αφέθηκε υπό ανάδευση στους 7 °C για 2 ώρες, κατόπιν με διάλυμα phosphate buffer (pH= 7.4) συγκέντρωσης 20mM (200mL) για επιπλέον 2 ώρες υπό ανάδευση στους 7 °C και τέλος, το κίτρινο μίγμα φυλάσσεται σε erpedorrf των 1,5 mL (0.766mL, 194 μM).

### 5.2.5. SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου πάνω στον αζω βιοεκκινητή BSA, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I).



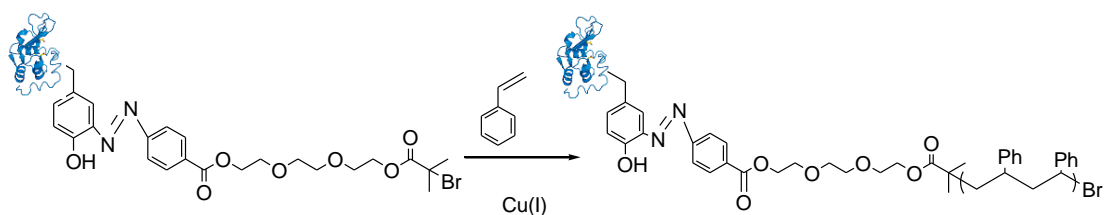
Η μέθοδος που ακολουθείται είναι ίδια με την σύνθεση της υποενότητας 5.2.4 πείραμα JM-10, με τη διαφορά ότι, σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται διαφορετικές ποσότητες των αντιδραστηρίων και δεν γίνεται υπερήχηση του μίγματος στυρενίου-νερού. Ειδικότερα, προστίθενται ο BSA-βιοεκκινητής (1.256μL/ 1ισοδ.), ο CuBr (1.0mg/40 ισοδ.), το Me<sub>6</sub>TREN(1,87μL/40 ισοδ.), το στυρένιο (20.1μL/1000 ισοδ.) και ο συνολικός όγκος H<sub>2</sub>O mQ (100μL), βάσει της διαδικασίας που προαναφέρθηκε στην υποενότητα 5.2.4. Το μίγμα φυλάσσεται σε erpedorf του 1,5 mL (0.511 mL, 342μM).

### 5.2.6. SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου πάνω στον αζω βιοεκκινητή λυσοζύμης, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I).



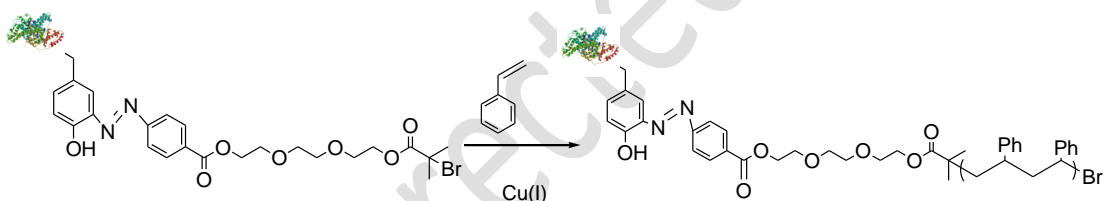
Η μέθοδος που ακολουθείται είναι ίδια με την αντίδραση της υποενότητας 5.2.4, με τη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται διαφορετικές ποσότητες των αντιδραστηρίων και δε γίνεται υπερήχηση του μίγματος στυρενίου-νερού. Ειδικότερα, προστίθενται ο αζω βιοεκκινητής λυσοζύμης (1.17μL/1 ισοδ.), ο CuBr (1.0mg/40ισοδ.), το Me<sub>6</sub>TREN(1,87μL/40 ισοδ.), το στυρένιο (20.1μL/1000 ισοδ.) και ο συνολικός όγκος H<sub>2</sub>O mQ (100μL) βάσει της διαδικασίας που προαναφέρθηκε στην υποενότητα 5.2.4, ενώ, η ημιπερατή μεμβράνη που χρησιμοποιείται έχει MWCO 6000-8000 kDa. Το ελαφρώς κίτρινο μίγμα φυλάσσεται σε erpedorrf των 1,5 mL (0.798mL, 219 μM).

### 5.2.7. SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου πάνω στον αζω βιοεκκινητή λυσοζύμης, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I).



Η μέθοδος που ακολουθείται είναι ίδια με την σύνθεση της υποενότητας 5.2.4, με τη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται διαφορετικές ποσότητες των αντιδραστηρίων και δε γίνεται υπερήχηση του μίγματος στυρενίου-νερού. Ειδικότερα, προστίθενται ο αζω βιοεκκινητής λυσοζύμης (0.409mL/1 ισοδ.) ο CuBr (0.352 mg/40ισοδ.), το Me<sub>6</sub>TREN((0.653μL/40ισοδ.) το στυρένιο (10.53μL/1500 ισοδ.) και ο συνολικός όγκος H<sub>2</sub>O mQ (100μL) βάσει της διαδικασίας που προαναφέρθηκε στην υποενότητα 5.2.4, ενώ, η ημιπερατή μεμβράνη που χρησιμοποιείται έχει MWCO 6000-8000 kDa. Το ελαφρώς κίτρινο μίγμα φυλάσσεται σε erpedorrf των 1,5 mL(0.396 mL, 154μM).

#### 5.2.8. SET-LRP πολυμερισμός στυρενίου πάνω στον αζω βιοεκκινητή BSA, μέσω ανακατανομής με χρήση Cu(I).



Η μέθοδος που ακολουθείται είναι ίδια με τη σύνθεση της υποενότητας 5.2.4, με τη διαφορά ότι, σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται διαφορετικές ποσότητες των αντιδραστηρίων και δεν γίνεται υπερήχηση του μίγματος στυρενίου-νερού. Ειδικότερα, προστίθενται ο BSA-βιοεκκινητής (0.7mL/ 1 ισοδ.), ο CuBr (0.52mg/55 ισοδ.), το Me<sub>6</sub>TREN (0.98μL/55 ισοδ.), το στυρένιο (10.5μL/1375 ισοδ.) και ο συνολικός όγκος H<sub>2</sub>O mQ (100μL), βάσει της διαδικασίας που προαναφέρθηκε στην υποενότητα 5.2.4. Το μίγμα φυλάσσεται σε erpedorrf του 1,5 mL (0.452m, 146 μM).

## 6. Βιβλιογραφία

1. Wright, T. A., Page, R. C. & Konkolewicz, D. Polymer conjugation of proteins as a synthetic post-translational modification to impact their stability and activity. *Polym. Chem.* **10**, 434–454 (2019).
2. Gunter, K., Sorci, M. & Belfort, G. A Simplified Predictive Tool for Design and Analysis of SET-LRP Reactions with Mechanistic Insight. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2**, 4924–4935 (2020).
3. Samanta, S. R., Nikolaou, V., Keller, S., Monteiro, M. J., Wilson, D. A., Haddleton, D. M., & Percec, V. Aqueous SET-LRP catalyzed with 'in situ' generated Cu(0) demonstrates surface mediated activation and bimolecular termination. *Polym. Chem.* **6**, 2084–2097 (2015).
4. Theodorou, A., Liarou, E., Haddleton, D. M., Stavrakaki, I. G., Skordalidis, P., Whitfield, R., Velonia, K. Protein-polymer bioconjugates via a versatile oxygen tolerant photoinduced controlled radical polymerization approach. *Natur. Commun.* 11(1). (2020). doi:10.1038/s41467-020-15259-z
5. Ban, H., Gavrilyuk, J. & Barbas, C. F. Tyrosine bioconjugation through aqueous ene-type reactions: A click-like reaction for tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1523–1525 (2010).
6. Lombardo, D., Kiselev, M. A., Magazù, S. & Calandra, P. Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, (2015).
7. Velonia, K., Rowan, A. E. & Nolte, R. J. M. Lipase polystyrene giant amphiphiles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 4224–4225 (2002).
8. Thordarson, P., Le Droumaguet, B. & Velonia, K. Well-defined protein-polymer conjugates - Synthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 243–254 (2006).
9. Le Droumaguet, B. & Velonia, K. In situ ATRP-mediated hierarchical formation of giant amphiphile bionanoreactors. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 6263–6266 (2008).
10. Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Minor, W.. Structural and immunologic characterization of bovine , horse , and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174–182 (2012).
11. Brandes, N., Welzel, P. B., Werner, C. & Kroh, L. W. Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles : Differential scanning calorimetry and FTIR analysis. **299**, 56–69 (2006).
12. Barbosa, L. R. S., Ortore, M. G., Spinozzi, F., Mariani, P. & Bernstorff, S. The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin : A Small-Angle X-Ray Scattering Study. *Biophysj* **98**, 147–157 (2010).
13. Qiu, F., Chen, Y. & Tang, C. Amphiphilic peptides as novel nanomaterials : design , self-assembly and application. 5003–5022 (2018).

14. Zhao, Y., Yang, W., Chen, C., Wang, J., Zhang, L., & Xu, H. ScienceDirect Rational design and self-assembly of short amphiphilic peptides and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **35**, 112–123 (2018).
15. Feng, H., Lu, X., Wang, W., Kang, N.-G., & Mays, J. Block Copolymers: Synthesis, Self-Assembly,. (2017) doi:10.3390/polym9100494.
16. Liang, Q., Liu, X., Zeng, G., Liu, Z., Tang, L., Shao, B., Gong, S. Surfactant-assisted synthesis of photocatalysts: Mechanism, synthesis, recent advances and environmental application. *Chem. Eng. J.* **372**, 429–451 (2019).
17. Dasgupta, A. & Das, D. Designer Peptide Amphiphiles: Self-Assembly to Applications. (2019) doi:10.1021/acs.langmuir.9b01837.
18. Hu, W., He, X., Bai, Y., Zheng, L., Hu, Y., Wang, P., Jia, K. Synthesis and self-assembly of polyethersulfone-based amphiphilic block copolymers as microparticles for suspension immunosensors. *Polym. Chem.* **11**, 1496–1503 (2020).
19. Wright, T. A., Page, R. C. & Konkolewicz, D. Polymer conjugation of proteins as a synthetic post-translational modification to impact their stability and activity. *Polym. Chem.* **10**, 434–454 (2019).
20. Sun, W., Liu, W., Wu, Z. & Chen, H. Chemical Surface Modification of Polymeric Biomaterials for Biomedical Applications. *Macromol. Rapid Commun.* **41**, 1–26 (2020).
21. Borchmann, D. E., Carberry, T. P. & Weck, M. ‘Bio’-macromolecules: polymer-protein conjugates as emerging scaffolds for therapeutics. *Macromol. Rapid Commun.* **35**, 27–43 (2014).
22. Frick, E., Anastasaki, A., Haddleton, D. M. & Barner-Kowollik, C. Enlightening the mechanism of copper mediated PhotoRDRP via high-resolution mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 6889–6896 (2015).
23. Szijj, P. A., Kostadinova, K. A., Spears, R. J. & Chudasama, V. Tyrosine bioconjugation-an emergent alternative. *Org. Biomol. Chem.* **18**, 9018–9028 (2020).
24. Schlick, T. L., Ding, Z., Kovacs, E. W. & Francis, M. B. Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 3718–3723 (2005).
25. Hooker, J. M., Kovacs, E. W. & Francis, M. B. Interior Surface Modification of Bacteriophage MS2. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3718–3719 (2004).
26. Mutlu, H., Geiselhart, C. M. & Barner-Kowollik, C. Untapped potential for debonding on demand: The wonderful world of azo-compounds. *Mater. Horizons* **5**, 162–183 (2018).
27. Liu, M. *et al.* Synthesis of monodisperse aromatic azo oligomers toward gaining new insight into the isomerization of  $\pi$ -conjugated azo systems. *Polym. Chem.* **10**, 1806–1811 (2019).



28. Khayer, K. & Haque, T. Density functional theory calculation on the structural, electronic, and optical properties of fluorene-based azo compounds. *ACS Omega* **5**, 4507–4531 (2020).

not corrected draft