

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265222



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

41

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ
ΔΕΙΚΤΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Γ. ΣΤΡΟΓΓΥΛΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008

- 3 -



Στη μνήμη του πατέρα μου



*Εξαιρετικά αφιερώμενο
στη μάνα μου Ευαγγελιά και στα αδέρφια μου Σάκη και Διονύση,
ανθρώπους στους οποίους οφείλω τα πάντα!*



ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα Ερευνητικά Εργαστήρια της Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, κατά το χρονικό διάστημα Ιούνιος 2003 - Δεκέμβρης 2005.

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Βασίλειο Τσίκαρη, ο οποίος μου ανέθεσε και το θέμα της παρούσας διατριβής, παρέχοντάς μου απλόχερα τη δυνατότητα και παράλληλα μοναδική ευκαιρία, να διευρύνω την αντίληψη και τις γνώσεις μου στην επιστήμη την οποία επέλεξα να ακολουθήσω. Νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω πρώτα τον άνθρωπο, έπειτα το δάσκαλο τέλος τον καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη, για την αμέριστη εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, το γεγονός ότι στάθηκε δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα τόσο στις καλές όσο και στις άσχημες στιγμές μου και τέλος για την συνεχή του επίβλεψη και καθοδήγησή στα πλαίσια της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο, την Καθηγήτρια κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου και την Επίκουρο Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας κ. Ευγενία Πάνου-Πομώνη για το άμεσο ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την Ερευνήτρια του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ κ. Καίτη Σωτηριάδου για την καθοδήγηση και επίβλεψη της, κατά τη διάρκεια εκπαίδευσής μου σε ένα ευρύ φάσμα ανοσοενζυμικών τεχνικών στο εν λόγω Ινστιτούτο. Την ευχαριστώ για την ιδιαίτερα ευχάριστη συνεργασία μας, καθώς και για την πολύτιμη συμβολή της στην διεξαγωγή των διαδικασιών ανοσοποίησης πειραματόζωων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής κ. Λάμπρο Μιχάλη, την Λέκτορα της Ιατρικής Σχολής κ. Κατερίνα Νάκα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Χημείας κ. Δημόκριτο Τσουκάτο για την άριστη συνεργασία μας και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Η συμβολή της κτηνιάτρου κ. Χρύσας Βόιδαρου και του συναδέλφου Χρήστου Παπαδόπουλου κατά τη διεξαγωγή των ανοσοποιήσεων της παρούσας διατριβής υπήρξε πολύτιμη. Τους ευχαριστώ ιδιαίτερα για το ανιδιοτελές τους ενδιαφέρον.

Με αφορμή την παρούσα διατριβή, μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω την Κατερίνα Παναγιώτου η οποία όλο αυτό το διάστημα μου ενέπνευσε την δύναμη και το κουράγιο να συνεχίσω



και να αντιμετωπίσω κάθε εμφανιζόμενο πρόβλημα. Η συμπαράσταση και το αμέριστο ενδιαφέρον της υπήρξαν για μένα ανεκτίμητα.

Θέλω παράλληλα να ευχαριστήσω, αρχικά τους φίλους και έπειτα συναδέλφους μου Παναγιώτη Σταθόπουλο, Δημήτριο Ροκά και Θανάση Καρκαμπούνα, τόσο για την ηθική τους στήριξη, όσο και για τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της εργαστηριακή μας συνύπαρξης.

Θερμότατα ευχαριστώ όλους τους υπόλοιπους συναδέλφους ξεκινώντας από τους παλαιότερους Δημήτριο Κρικοριάν, Σεραφείμ Παππά, Σαράντο Κωστίδη, Κατερίνα Βιτουλαδίτη, Ruxandra-Maria Stanica, Χριστίνα Μπαλαμάτσια, Δήμητρα Δημτσούδη, Στέλλα Ζευγίτη, Αγγελική Κούκη, Γιώργο Στάμο, Βασίλη Μούση, Βασιλική Κολόκα, Κωνσταντίνο Χαριλόγη και στη συνέχεια τους νεότερους Κωνσταντίνα Ρούφου, Αθηνά Γκεσούλη και Θεόδωρο Σκάρλα για την κατανόηση και συμπαράστασή τους, καθώς και για το ιδιαίτερα ευχάριστο πνεύμα συνεργασίας.

Ευχαριστίες επίσης εκφράζονται στην κ. Ελένη Ντάφλου και την κ. Ναταλία Παπαστεργίου, γραμματείς του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας.

Κωνσταντίνος Γ. Στρογγύλης

Ιωάννινα 2008



ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΡΑΞΗ

| | |
|---|----|
| 1. Η βιολογία - Το κέντρο της βιολογίας - Η βιολογία και η βιολογική επιστήμη | 25 |
| 2. Η βιολογία και η ιστορία της - Η βιολογία και η ιστορία της | 27 |
| 3. Η βιολογία και η ιστορία της - Η βιολογία και η ιστορία της | 32 |
| 4. Η βιολογία και η ιστορία της - Η βιολογία και η ιστορία της | 34 |
| 5. Η βιολογία και η ιστορία της - Η βιολογία και η ιστορία της | 35 |
| 6. Η βιολογία και η ιστορία της - Η βιολογία και η ιστορία της | 36 |
| 7. Η βιολογία και η ιστορία της - Η βιολογία και η ιστορία της | 37 |
| 8. Η βιολογία και η ιστορία της - Η βιολογία και η ιστορία της | 37 |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

| | |
|---|----|
| 1. Τροποποίηση και επιστροφή στη βιολογία | 38 |
| 2. Τροποποίηση και επιστροφή στη βιολογία | 39 |
| 3. Τροποποίηση και επιστροφή στη βιολογία | 40 |
| 4. Τροποποίηση και επιστροφή στη βιολογία | 41 |
| 5. Τροποποίηση και επιστροφή στη βιολογία | 42 |
| 6. Τροποποίηση και επιστροφή στη βιολογία | 43 |
| 7. Τροποποίηση και επιστροφή στη βιολογία | 44 |
| 8. Τροποποίηση και επιστροφή στη βιολογία | 45 |

ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΑΚΡΟΜΟΡΙΟΝ ΠΡΟΤΕΙΝΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ

| | |
|--|----|
| 1. Επιστροφή στη βιολογία και κακρομορίον προτεϊνικής ουσίας | 57 |
| 2. Επιστροφή στη βιολογία και κακρομορίον προτεϊνικής ουσίας | 58 |
| 3. Επιστροφή στη βιολογία και κακρομορίον προτεϊνικής ουσίας | 61 |
| 4. Επιστροφή στη βιολογία και κακρομορίον προτεϊνικής ουσίας | 62 |
| 5. Επιστροφή στη βιολογία και κακρομορίον προτεϊνικής ουσίας | 63 |
| 6. Επιστροφή στη βιολογία και κακρομορίον προτεϊνικής ουσίας | 64 |
| 7. Επιστροφή στη βιολογία και κακρομορίον προτεϊνικής ουσίας | 65 |
| 8. Επιστροφή στη βιολογία και κακρομορίον προτεϊνικής ουσίας | 66 |



ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| | |
|---|-----------|
| 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ. ΠΡΟΛΗΨΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ | 25 |
| 2.1 Εισαγωγή - Το καρδιαγγειακό σύστημα - Ο ρόλος και η βιολογική σπουδαιότητα της καρδιάς | 27 |
| 2.2 Καρδιαγγειακά νοσήματα – Συμπτωματολογία | 28 |
| 2.3 Αιτιολογία και παράγοντες κίνδυνου των καρδιαγγειακών ανωμαλιών | 32 |
| 2.4 Μέτρα πρόληψης των καρδιαγγειακών νοσημάτων | 34 |
| 2.5 Διαγνωστικές διαδικασίες - Βιοχημικοί δείκτες | 35 |
| 2.5.1 Κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις | 36 |
| 2.5.2 Αιματολογικές εξετάσεις - Βιοχημικοί δείκτες | 37 |
| 2.6 Αντιμετώπιση καρδιαγγειακών νοσημάτων - Θεραπευτική αγωγή | 39 |
| 3. ΤΡΟΠΟΝΙΝΕΣ - ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA | 41 |
| 3.1 Εισαγωγή | 43 |
| 3.1.1 Αλληλεπιδράσεις των τροπονινών | 45 |
| 3.1.2 Ιδιότητες των τροπονινών | 48 |
| 3.2 Δοκιμασία της τροπονίνης. Διαγνωστική και προγνωστική σπουδαιότητα | 50 |
| 3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την δοκιμασία της τροπονίνης | 53 |
| 3.3.1 Ψευδώς θετικά αποτελέσματα κατά την ανοσοενζυμική δοκιμασία της τροπονίνης | 54 |
| 3.3.2 Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα κατά την ανοσοενζυμική δοκιμασία της τροπονίνης | 55 |
| 4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΦΥΣΗΣ ΕΥΘΥΓΡΑΜΜΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΚΛΑΔΙΣΜΕΝΗΣ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ | 57 |
| 4.1 Εισαγωγή | 59 |
| 4.2 Βήμα προς βήμα πεπτιδική σύνθεση (Stepwise Peptide Synthesis) | 61 |
| 4.2.1 Βήμα προς βήμα σύνθεση γραμμικών πεπτιδικών μορίων | 62 |
| 4.2.2 Βήμα προς βήμα σύνθεση πρωτεϊνικής φύσης μορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής | 66 |
| 4.3 Σύνθεση μακρομορίων πρωτεϊνικής φύσης μέσω σύζευξης (σύγκλισης) πλήρως | 73 |



| | |
|--|----|
| προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων (Convergent Ligation) | |
| 4.4 Σύνθεση μακρομορίων πρωτεϊνικής φύσης μέσω χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης πλήρως αποπροστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων (Chemoselective Ligation) | 75 |
| 4.4.1 Εισαγωγή - Μέθοδοι χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης πεπτιδίων | 75 |
| 4.4.2 Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού θειοεστερικού δεσμού | 78 |
| 4.4.3 Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού δεσμών θειαζολιδίνης, οξαζολιδίνης, οξίμης και υδραζόνης | 80 |
| 4.4.4 Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού θειοεθερικού δεσμού | 83 |
| 4.4.5 Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού φυσικού αμιδικού δεσμού (Native Chemical Ligation) | 87 |

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| | |
|--|-----|
| 5. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΝΙΝΗΣ | 91 |
| 5.1 Συστηματική αντιγονική χαρτογράφηση των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης | 93 |
| 5.2 Μελέτες ομολογίας | 100 |
| 5.3 Σχεδιασμός και επιλογή κατάλληλων αλληλουχιών των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης | 102 |
| 6. ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ | 105 |
| 6.1 Εισαγωγή | 107 |
| 6.1.1 Ρητίνες - Αντιδραστήρια σύζευξης - Αμινοξέα | 108 |
| 6.1.2 Διαλύτες | 110 |
| 6.1.3 Άλλα αντιδραστήρια | 110 |
| 6.2 Γενική μεθοδολογία πεπτιδικής σύνθεσης | 111 |
| 6.2.1 Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία | 111 |
| 6.2.2 Boc/Bzl βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία | 115 |
| 6.2.3 Μεθοδολογία ανάπτυξης μακρομοριακών συμπλεγμάτων μέσω χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων πρόσδεσης επιτόπων (σχηματισμός θειοαιθερικού δεσμού) | 116 |
| 6.3 Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης πεπτιδίων | 117 |
| 6.3.1 Μεθοδολογία διαπίδυσης (Dialysis) | 117 |
| 6.3.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) | 118 |



| | |
|--|------------|
| 6.3.3 Φασματοσκοπία μάζας ESI (Electrospray Ionization) | 119 |
| 6.4 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnI-(118-131)] ₄ -OH | 121 |
| 6.5 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnT-(21-30)] ₄ -OH | 123 |
| 6.6 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnC-(89-98)-Cys] ₄ -OH | 129 |
| 6.6.1 Σύνθεση του φορέα Ac-SOC ₄ [BrCH ₂ CO] ₄ -OH | 129 |
| 6.6.2 Σύνθεση του επιτόπου cTnC-(89-98)-Cys (SKGKSEELSC) | 133 |
| 6.6.3 Χημιοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού θειοθερικού δεσμού μεταξύ του επιτόπου cTnC-(89-98)-Cys και του φορέα Ac-SOC ₄ [BrCH ₂ CO] ₄ -OH | 135 |
| 6.7 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnI-(185-196)-Cys] ₄ -OH | 137 |
| 6.7.1 Σύνθεση του επιτόπου cTnI-(185-196)-Cys (REVGDWKRNIDAC) | 138 |
| 6.7.2 Χημιοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού θειοθερικού δεσμού μεταξύ του επιτόπου cTnI-(185-196)-Cys και του φορέα Ac-SOC ₄ [BrCH ₂ CO] ₄ -OH | 140 |
| 6.8 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | 142 |
| 6.8.1 Boc/Bzl βήμα προς βήμα συνθετική στρατηγική ανάπτυξης του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | 143 |
| 6.8.2 Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετική στρατηγική ανάπτυξης του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | 145 |
| 6.9 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)-Cys] ₄ -OH | 148 |
| 6.9.1 Σύνθεση του επιτόπου cTnI-(19-31)-Cys (RRRSSNYRAYATEC) | 149 |
| 6.9.2 Χημιοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού θειοθερικού δεσμού μεταξύ του επιτόπου cTnI-(19-31)-Cys και του φορέα Ac-SOC ₄ [BrCH ₂ CO] ₄ -OH | 151 |
| 6.10 Συσχέτιση μεταξύ των συνθετικών μεθοδολογιών ανάπτυξης μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής | 153 |
| 7. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ – ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ | 157 |
| 7.1 Εισαγωγή | 159 |
| 7.2 Γενική μεθοδολογία ανοσοποιήσεων και ELISA δοκιμασιών | 159 |
| 7.2.1 Διαδικασία ανοσοποιήσεων | 159 |
| 7.2.2 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των παραχθέντων αντισωμάτων από τα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα | 160 |
| 7.2.3 Μελέτη ύπαρξης διασταυρωτών αντιδράσεων (Cross-Reactions) | 162 |
| 7.2.4 ELISA ανταγωνιστικού τύπου (Competitive ELISA) | 163 |
| 7.2.5 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής και σκελετικής τροπονίνης από τα παραχθέντα αντισώματα | 164 |
| 7.3 Καθαρισμός αντισωμάτων | 164 |
| 7.4 Ανάπτυξη, χαρακτηρισμός και καθαρισμός anti-{Ac-SOC ₄ [cTnI-(118-131)] ₄ -OH} αντισωμάτων | 166 |



| | | |
|-------------------------------------|---|------------|
| 7.4.1 | Ανοσοποιήσεις πειραματόζωνων | 166 |
| 7.4.2 | Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA | 167 |
| 7.4.3 | Καθαρισμός anti-{Ac-SOC ₄ [cTnl-(118-131)] ₄ -OH} αντισωμάτων | 170 |
| 7.5 | Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός anti-{Ac-SOC ₄ [cTnT-(21-30)] ₄ -OH} αντισωμάτων | 171 |
| 7.5.1 | Ανοσοποιήσεις πειραματόζωνων | 171 |
| 7.5.2 | Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA | 172 |
| 7.6 | Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός anti-{Ac-SOC ₄ [cTnC-(89-98)-Cys] ₄ -OH} αντισωμάτων | 173 |
| 7.6.1 | Ανοσοποιήσεις πειραματόζωνων | 173 |
| 7.6.2 | Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA | 173 |
| 7.7 | Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός anti-{Ac-SOC ₄ [cTnl-(185-196)-Cys] ₄ -OH} αντισωμάτων | 176 |
| 7.7.1 | Ανοσοποιήσεις πειραματόζωνων | 176 |
| 7.7.2 | Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA | 177 |
| 7.8 | Ανάπτυξη, χαρακτηρισμός και καθαρισμός anti-{Ac-SOC ₄ [cTnl-(19-31)] ₄ -OH} αντισωμάτων | 180 |
| 7.8.1 | Ανοσοποιήσεις πειραματόζωνων | 180 |
| 7.8.2 | Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA | 181 |
| 7.8.3 | Καθαρισμός anti-{Ac-SOC ₄ [cTnl-(19-31)] ₄ -OH} αντισωμάτων | 184 |
| 7.9 | Ανάπτυξη βιοισθητήρων εμπέδησης | 185 |
| 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ | | 187 |
| 9. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | | 195 |
| 10. SUMMARY | | 199 |
| 11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | | 205 |
| 11.1 | Βιβλιογραφία 2 ^{ου} κεφαλαίου | 207 |
| 11.2 | Βιβλιογραφία 3 ^{ου} κεφαλαίου | 213 |
| 11.3 | Βιβλιογραφία 4 ^{ου} κεφαλαίου | 221 |
| 11.4 | Βιβλιογραφία 5 ^{ου} κεφαλαίου | 229 |
| 11.5 | Βιβλιογραφία 6 ^{ου} κεφαλαίου | 230 |
| 11.6 | Βιβλιογραφία 7 ^{ου} κεφαλαίου | 231 |
| 12. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | | 233 |
| Βιογραφικό σημείωμα | | 235 |



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ



Εργαστηριακές μελέτες στις αρχές της δεκαετίας του '60, ανέδειξαν τα υψηλά επίπεδα της γλουταμικής οξαλοξικής τρανσαμινάσης σε ορούς ασθενικών πληθυσμών με καρδιαγγειακό σύνδρομο. Η ερευνητική αυτή διαπίστωση έμελλε να αποτελέσει και το εφαλτήριο για την ανάπτυξη του ενδιαφέροντος γύρω από το πεδίο των καρδιακών βιοενζύμων. Πλέον, τα καρδιακά ένζυμα με πρωτοπόρο την κινάση της κρεατίνης (CK), κατέχουν για τρεις τουλάχιστον δεκαετίες πρωταρχικό ρόλο στην κλινική διαγνωστική των οξέων μυοκαρδιακών εμφραγμάτων, καθώς και άλλων ασθενειών του μυοκαρδίου.

Οι τροπονίνες, αν και πρωτοπαρουσιάστηκαν βιβλιογραφικά στα τέλη της δεκαετίας του '60, εισήχθησαν στον εργαστηριακό έλεγχο ως εξαιρετικά ειδικοί και ευαίσθητοι βιολογικοί δείκτες μυοκαρδιακής βλάβης μόλις τα τελευταία 20 χρόνια. Πρόκειται για μια ομάδα δομικών πρωτεϊνών οι οποίες εδράζονται στα λεπτά νημάτια των ραβδωτών μυών συγκροτημένες σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, το σύμπλοκο της τροπονίνης. Το εν λόγω σύμπλοκο αποτελεί αναπόσπαστο δομικό συστατικό τόσο των σκελετικών όσο και καρδιακών μυϊκών ιστών και συνίσταται από 3 πρωτεϊνικά μακρομόρια: την τροπονίνη I (TnI, M.B.: 24 kDa), την τροπονίνη T (TnT, M.B.: 37 kDa) και την τροπονίνη C (TnC, M.B.: 18 kDa), καθένα από τα οποία είναι υπεύθυνο για διαφορετικές βιοχημικές λειτουργίες.

Αν και οι τροπονίνες των καρδιακών μυϊκών ιστών κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των σκελετικών, η μεταξύ τους ομολογία έτσι όπως προκύπτει από τον έλεγχο και την αντιπαραβολή των πρωτοταγών τους δομών, αγγίζει το ~70%. Επιπλέον, έχουν την ιδιότητα να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια ενός μη αντιστρεπτού καρδιακού ή σκελετικού μυϊκού τραυματισμού, κυρίως υπό την μορφή του δυαδικού (TnI-TnC) ή του τριαδικού συμπλόκου (TnI-TnC-TnT).

Πιο συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια ενός μυοκαρδιακού επεισοδίου, τα ποσά της τροπονίνης που απελευθερώνονται στο αίμα των ασθενών, μπορούν και ανιχνεύονται με ένα απλό διαγνωστικό τεστ και σε χρόνο που συνήθως δεν ξεπερνά τις 4-6 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Η ανάπτυξη των βιολογικών δοκιμασιών ανίχνευσης καρδιακών τροπονινών στηρίζεται στη χρήση εξειδικευμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του συμπλόκου των καρδιακών τροπονινών ή και περιοχών τους. Τα παραγόμενα από ανοσοποιησείς πειραματόζωνων αντισώματα, χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια ανίχνευσης κατά ζεύγη σε μια ανοσοενζυμική δοκιμή E.L.I.S.A. τύπου "sandwich".

Παρά το γεγονός ότι η μέτρηση της τροπονίνης αποτελεί μια πολύ ειδική, γρήγορη και αρκετά ευαίσθητη εργαστηριακή εξέταση, η ειδικότητα και η ευαισθησία ενός πλήθους διαγνωστικών δοκιμών ποικίλει. Τα διαφορετικά αποτελέσματα κατά την μέτρηση της τροπονίνης (στα ίδια δείγματα αίματος) έχουν εντείνει την διχογνωμία στην επιστημονική κοινότητα. Οι παράγοντες που ευθύνονται για την εν λόγω σύγχυση εντοπίζονται καταρχάς στην περιπλεγμένη βιοχημική φύση του συμπλόκου της τροπονίνης. Παράμετροι που συνεπικουρούν στο παραπάνω γεγονός είναι η



επιλογή διαφορετικών επιτόπων (από τους και οποίους προκύπτουν τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη της δοκιμασίας), η υψηλή ομολογία μεταξύ καρδιακών και σκελετικών τροπονινών καθώς και ο ρόλος των παρεμβατικών παραγόντων, οι οποίοι έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν την αναγνώριση της τροπονίνης κατά τη διάρκεια της διαγνωστικής δοκιμής.

Συνυπολογίζοντας όλους τους παραπάνω παράγοντες με την αναγκαιότητα βελτίωσης της ευαισθησίας των μεθόδων, αντικείμενο και σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας σειράς ευαίσθητων και εξειδικευμένων εργαλείων (αντισώματα), τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη διαγνωστική δοκιμασία της τροπονίνης. Οι παράμετροι που συνεκτιμήθηκαν για την επιλογή και την σύνθεση των κατάλληλων περιοχών των καρδιακών τροπονινών I, C και T, με στόχο τη χρησιμοποίησή τους στην ανάπτυξη αντισωμάτων, ήταν οι αντιγονικές τους ιδιότητες, η ελάχιστη δυνατή τους ομολογία σε σύγκριση με τις αντίστοιχες σκελετικές ισομορφές καθώς και η μη εμπλοκή τους σε διάφορων τύπων διασταυρωτές αντιδράσεις με παρεμβατικούς παράγοντες των ορών, υγιών και ασθενικών πληθυσμών.

Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα διατριβή πραγματεύεται:

1. Τη διερεύνηση και επιλογή κατάλληλων αλληλουχιών των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης.
2. Τη σύνθεση των απαραίτητων ανοσογονικών συμπλεγμάτων για την ανοσοποίηση των πειραματόζωνων.
3. Την παραγωγή και τον καθαρισμό εξειδικευμένων αντισωμάτων για τις καρδιακές ισομορφές της τροπονίνης.
4. Τον έλεγχο της ικανότητας αναγνώρισης του φυσικού καρδιακού συμπλόκου της τροπονίνης από τα παραγόμενα αντισώματα.

Η προσέγγιση του θέματος πραγματοποιήθηκε με τους παρακάτω τρόπους:

1. Συστηματική αντιγονική χαρτογράφηση των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης, μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων πρόβλεψης αντιγονικότητας.
2. Διερεύνηση και επιλογή κατάλληλων αλληλουχιών των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης I και T, οι οποίες παρουσιάζουν την ελάχιστη ομολογία σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών, χρησιμοποιώντας υπολογιστικά προγράμματα ομολογίας.
3. Σχεδιασμός και επιλογή κατάλληλων αλληλουχιών των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης I και C, από τις οποίες έχει προταθεί βιβλιογραφικά ότι προκύπτουν αντισώματα (μετά από ανοσοποιήσεις πειραματόζωνων) τα οποία δεν εμπλέκονται σε διασταυρωτές αντιδράσεις με παρεμβατικούς παράγοντες των ορών, υγιών και ασθενικών πληθυσμών.



4. Σύνθεση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων, η οποία πραγματοποιήθηκε με ομοιοπολική πρόσδεση των επιλεγμένων περιοχών στον τετραμερή ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC₄, είτε με τις κλασσικές βήμα προς βήμα συνθετικές μεθοδολογίες στερεάς φάσης, είτε μέσω χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων πρόσδεσης επιτόπων.
5. Συσχέτιση και αποτίμηση των πλεονεκτημάτων της καθεμιάς εκ των τεχνικών σύνθεσης, με στόχο την επιλογή της πιο λειτουργικής μεθοδολογίας ανάπτυξης μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον εν λόγω συνθετικό φορέα.

Τα πεπτιδικής φύσης ανοσογονικά συμπλέγματα που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής είναι:

| | Πεπτιδικά ανάλογα (κωδικές ονομασίες) | Συνθετική μεθοδολογία | Μοριακά βάρη (Da) |
|---|---|--|----------------------|
| 1 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(118-131)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Boc/Bzl συνθετική μεθοδολογία | 7420,7 |
| 2 | Ac-SOC ₄ [cTnT-(21-30)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία | 6530,5 |
| 3 | Ac-SOC ₄ [cTnC-(89-98)-Cys] ₄ -OH | Χημειοεκλεκτική πρόσδεση επιτόπων με δημιουργία θειοαιθερικών δεσμών | 6084,3 |
| 4 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(185-196)-Cys] ₄ -OH | Χημειοεκλεκτική πρόσδεση επιτόπων με δημιουργία θειοαιθερικών δεσμών | 7544,4 |
| 5 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Boc/Bzl συνθετική μεθοδολογία | 7588,4 |
| 6 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία | 7588,4 |
| 7 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)-Cys] ₄ -OH | Χημειοεκλεκτική πρόσδεση επιτόπων με δημιουργία θειοαιθερικών δεσμών | 8229,0 |

6. Ανοσοποίηση κουνελιών ράτσας Νέας Ζηλανδίας με τα συνθετικά ανοσογονικά συμπλέγματα, χρησιμοποιώντας τα κλασσικά πρωτόκολλα ανοσοποιήσεων.
7. Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των παραγόμενων αντισωμάτων από τα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα, με E.L.I.S.A. μη ανταγωνιστικού τύπου.
8. Μελέτη της ύπαρξης διασταυρωτών αντιδράσεων μεταξύ των παραγόμενων αντισωμάτων και των ανοσογονικών συμπλεγμάτων που συντέθηκαν, με E.L.I.S.A. μη ανταγωνιστικού τύπου.



9. Μελέτη του ανταγωνισμού μεταξύ των ανοσογονικών συμπλεγμάτων και των αντίστοιχων αντιορών, με στόχο τη διευκρίνιση της ειδικότητας των τελευταίων ως προς τα πεπτίδια από τα οποία προήλθαν, με E.L.I.S.A. ανταγωνιστικού τύπου.
10. Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής και σκελετικής τροπονίνης από τα παραγόμενα αντισώματα, με E.L.I.S.A. μη ανταγωνιστικού τύπου.
11. Καθαρισμός των παραγόμενων αντισωμάτων χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία της κλασμάτωσης πρωτεϊνικών μορίων με τη χρήση αλάτων.



ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



**ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ.
ΠΡΟΛΗΨΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.**



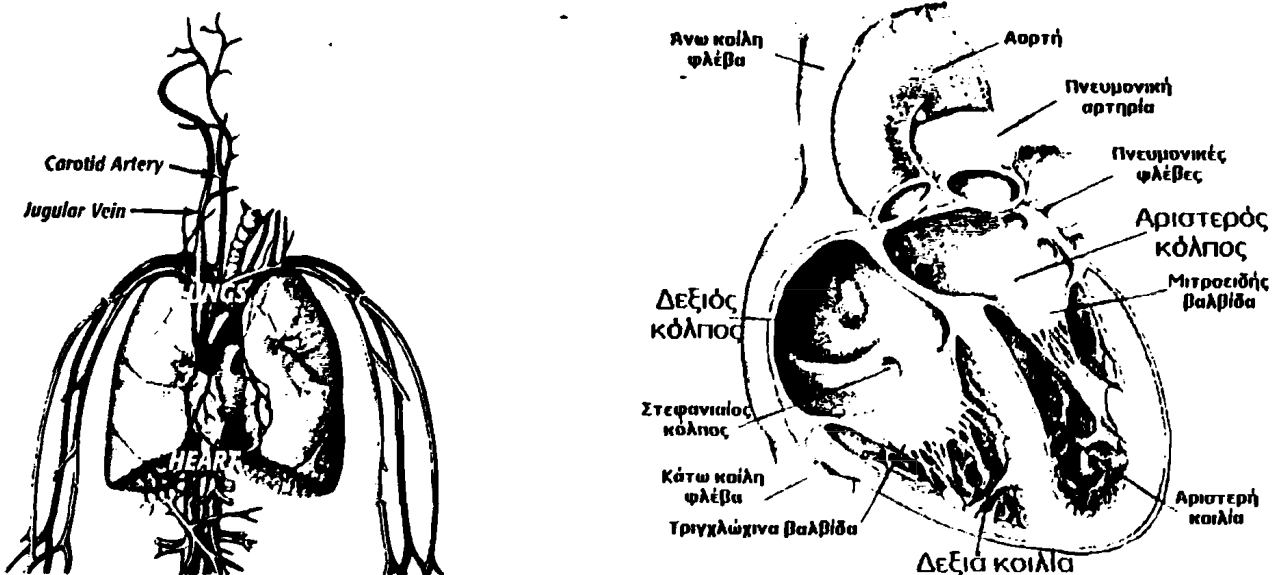
2.1 Εισαγωγή - Το καρδιαγγειακό σύστημα - Ο ρόλος και η βιολογική σπουδαιότητα της καρδιάς

Τα κύτταρα του οργανισμού μας για να διατηρηθούν στη ζωή και να επιτελέσουν τις βιολογικές τους λειτουργίες, χρειάζονται οξυγόνο και μια πληθώρα θρεπτικών ουσιών. Ο εφοδιασμός των κυττάρων με τα απαραίτητα αυτά συστατικά γίνεται από το αίμα, το οποίο εκπληρώνει τον προορισμό του, με το να κυκλοφορεί συνεχώς μέσα στα αιμοφόρα αγγεία. Η καρδιά λειτουργεί αποκλειστικά ως αντλία, παρέχοντας την απαιτούμενη ώθηση για τη συνεχή κυκλοφορία του αίματος μέσα στο κυκλοφορικό σύστημα. Η καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία συγκροτούν το καρδιαγγειακό σύστημα.

Ο William Harvey (Σχήμα 2.1.1) στις αρχές του 17^{ου} αιώνα, ήταν ο πρώτος που διαπίστωσε ότι η καρδιά αντλεί, εξαποστέλλει και κυκλοφορεί το αίμα σε ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα. Σύμφωνα με τις σημερινές επιστημονικές γνώσεις, η καρδιά θεωρείται ως το κεντρικό όργανο της κυκλοφορίας [1,2]. Πρόκειται για ένα κοίλο μυώδες όργανο, το οποίο βρίσκεται μέσα στη θωρακική κοιλότητα μεταξύ των δύο πνευμόνων (Σχήμα 2.1.2).



Σχήμα 2.1.1 William Harvey (1587-1657)



Σχήμα 2.1.2 Σχηματική αναπαράσταση της θέσης και των επιμέρους τμημάτων της καρδιάς

Τα λειτουργικά της χαρακτηριστικά είναι αναμφίβολα εκπληκτικά ως προς το φυσιολογικό έργο που καλείται να επιτελέσει. Αρχικά όταν βρισκόμαστε σε κατάσταση ηρεμίας, η καρδιά μας

“χτυπά” περίπου 70 φορές το λεπτό εξαποστέλλοντας προς τις αρτηρίες περίπου 5 λίτρα αίματος. Ο ρυθμός των καρδιακών παλμών αυξάνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, της έντονης μουσικής δραστηριότητας, της συναισθηματικής φόρτισης και φόβου, εκτοξεύοντας παράλληλα την αρτηριακή παροχή του αίματος στα 30 ή και περισσότερα λίτρα ανά λεπτό. Αντιθέτως η αρτηριακή πίεση μειώνεται μόνο κατά τη διάρκεια του ύπνου. Πιο συγκεκριμένα:

- Η καρδιά μας συστέλλεται και διαστέλλεται πάνω από 100.000 φορές το 24ωρο, γεγονός που συνεπάγεται ότι η καρδιά ενός 75χρονου έχει ήδη εκτελέσει περίπου τρία δισεκατομμύρια συστολές.
- Εκτοξεύει και κυκλοφορεί στο αγγειακό σύστημα περίπου 7.500 λίτρα αίματος το 24ωρο (και άλλα τόσα προς τους πνεύμονες), ή αλλιώς 200.000m³ αίματος κατά τη διάρκεια μιας ολόκληρης ζωής.
- Το μηχανικό έργο που παράγεται από την καρδιά ανά 24ωρο είναι περίπου 12.000 χιλιογραμμόμετρα ή κάπου 350 εκατομμύρια χιλιογραμμόμετρα για μια μέση διάρκεια ζωής, το οποίο με άλλα λόγια αντιστοιχεί σε ανύψωση βάρους ενός τόνου σε ύψος 350 χιλιομέτρων.

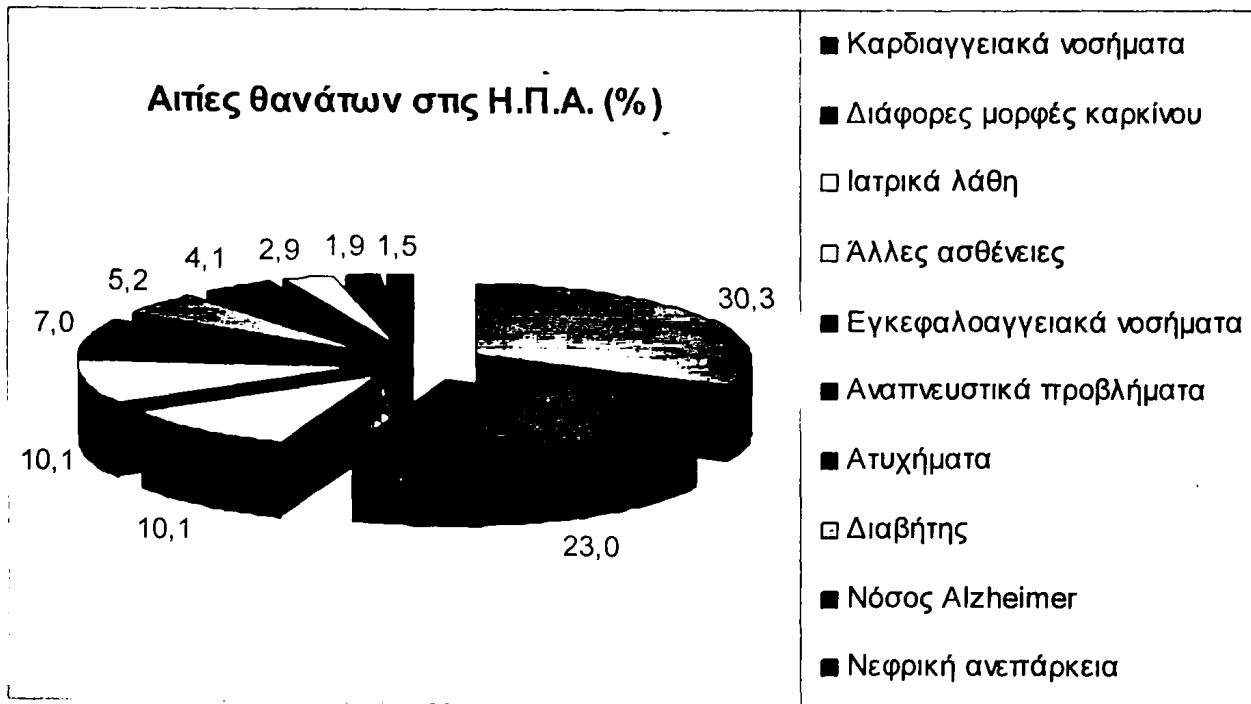
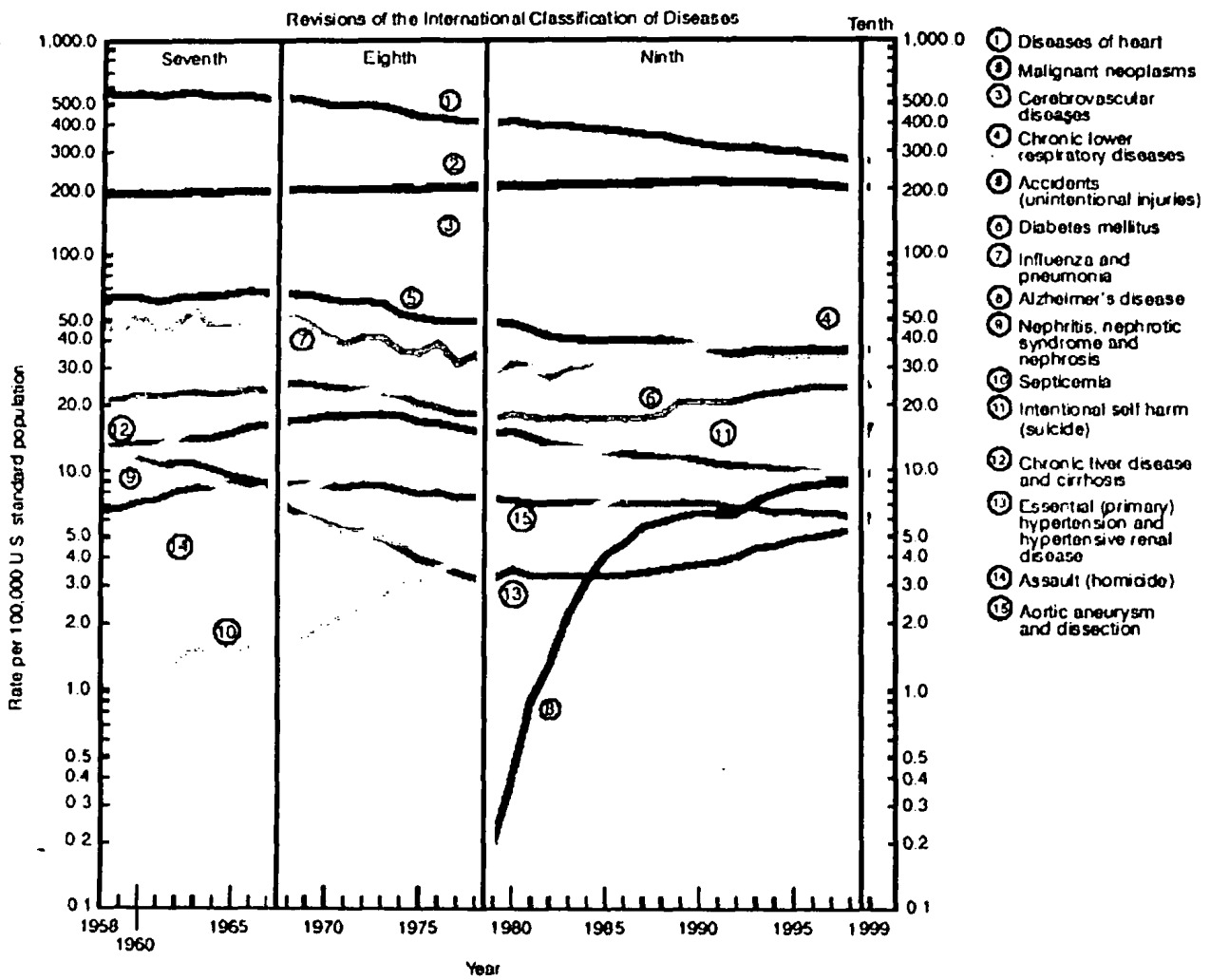
Οι εκπληκτικές αυτές επιδόσεις της καρδιάς επιτρέπουν στο σώμα να λειτουργεί φυσιολογικά και δεδομένου ότι οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν σήμερα την κύρια έκφραση νοσηρότητας και θνησιμότητας στο σύγχρονο πολιτισμό, οτιδήποτε παρεμβαίνει στη λειτουργία της θα πρέπει να αναγνωρίζεται άμεσα, έτσι ώστε να προλαμβάνεται οποιαδήποτε ανεπανόρθωτη βλάβη.

2.2 Καρδιαγγειακά νοσήματα - Συμπτωματολογία

Η αύξηση της συχνότητας των θανάτων οι οποίες οφείλονται αποκλειστικά σε καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες, αποτελεί πλέον αποδεδειγμένα μια από τις μεγαλύτερες μάστιγες του 21^{ου} αιώνα. Στις περισσότερες από τις κοινωνίες του δυτικού κόσμου το φαινόμενο βρίσκεται διαρκώς σε έξαρση, με τη στεφανιαία νόσο και γενικότερα τις καρδιαγγειακές παθήσεις να αποτελούν την κυριότερη αιτία θανάτων, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Το 2001 δημοσιοποιήθηκε στις Η.Π.Α. μια μακροχρόνια μελέτη, η οποία αναδεικνύει περίτρανα την σοβαρότητα του φαινομένου (Σχήμα 2.2.1) [3].

Η στεφανιαία νόσος της καρδιάς, δηλαδή η αρτηριοσκλήρωση των στεφανιαίων αρτηριών [4-8], αποτελεί ουσιαστικά και την πιο συχνή μορφή πάθησης της καρδιάς. Λαμβάνει χώρα όταν σκληραίνονται και στενεύουν οι στεφανιαίες αρτηρίες (οι οποίες τροφοδοτούν με αίμα το μυοκάρδιο) κατά την άθροιση και συσσώρευση λιπαρών ουσιών στα τοιχώματά τους, με αποτέλεσμα να προκαλούνται βλάβες που επιπλέκονται από αιμορραγίες, εξελκώσεις ή θρομβώσεις, αποφρακτικές βλάβες και ινώδεις πλάκες (αθηρωσκλήρωση).



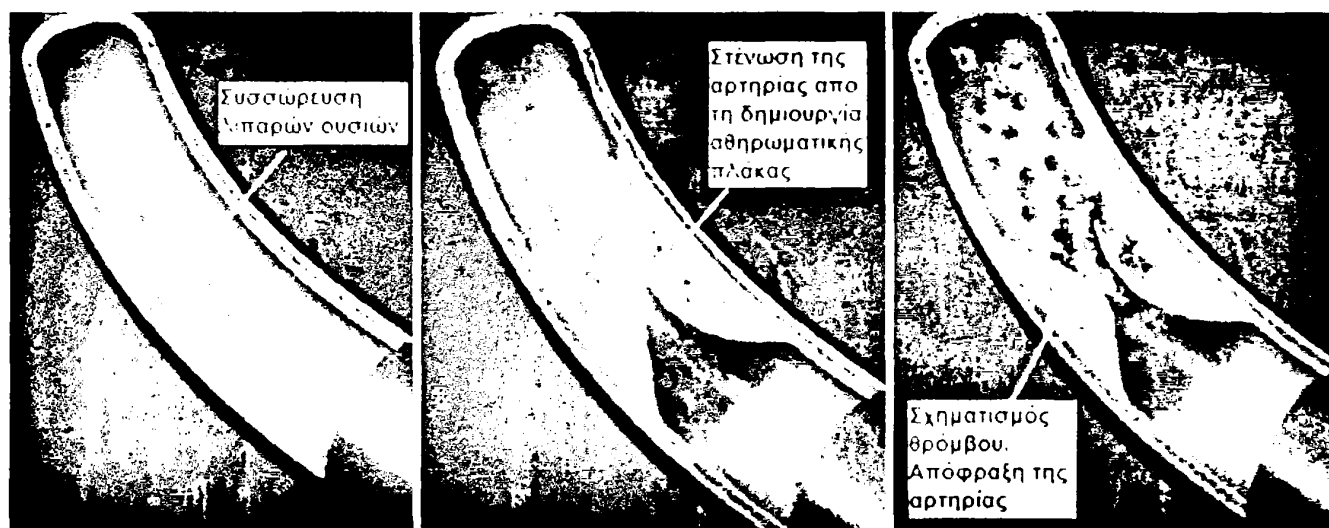


Σχήμα 2.2.1 Αιτίες θανάτων στις Η.Π.Α. από δεδομένα του 1999



Συχνά, το φαινόμενο της δημιουργίας των αθηρωματικών πλάκων ξεκινά από την παιδική κιόλας ηλικία. Η σταδιακή τους ανάπτυξη στις στεφανιαίες αρτηρίες, οδηγεί στις ακόλουθες καταστάσεις (Σχήμα 2.2.2):

- ❖ **Στένωση των στεφανιαίων αρτηριών:** Αποτελεί την αιτία μείωσης της παροχής αίματος και οξυγόνου προς το μυοκάρδιο.
- ❖ **Πλήρης απόφραξη των στεφανιαίων αρτηριών:** Παθολογική κατάσταση κατά την οποία διακόπτεται πλήρως η ροή του αίματος προς το μυοκάρδιο.
- ❖ **Σχηματισμός θρόμβων:** Οι θρόμβοι που σχηματίζονται λόγω των πλάκων αθηρωμάτωσης, μπορούν να διακόψουν μερικώς ή και πλήρως τη ροή του αίματος προς το μυοκάρδιο [9,10].

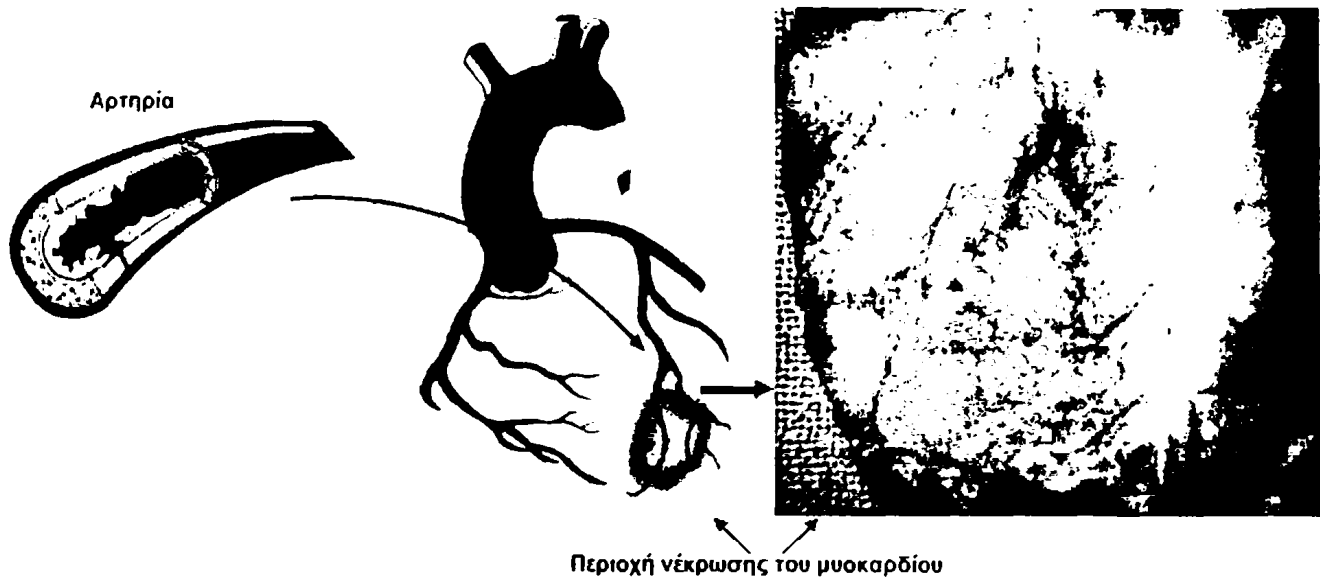


Σχήμα 2.2.2 Στάδια δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας. Σχηματισμός θρόμβου

Η μερική ή ολική απόφραξη των στεφανιαίων αρτηριών δημιουργεί συνθήκες αυξημένης νοσηρότητας και θνησιμότητας, μέσω των βλαβών τις οποίες προκαλεί η ισχαιμία στο μυοκάρδιο [11,12]. Για το λόγο αυτό, η στεφανιαία νόσος της καρδιάς είναι γνωστή και ως ισχαιμική νόσος της καρδιάς. Η μείωση ή και η πλήρης διακοπή της παροχής του οξυγόνου προς στο μυοκάρδιο αποτελεί την πρόδρομη παθολογική κατάσταση των παρακάτω:

- ✘ **Στηθάγχη:** Πρόκειται για έναν έντονο θωρακικό πόνο, ο οποίος οφείλεται στη μείωση της παροχής του αίματος προς στον μυοκαρδιακό ιστό, από τη στένωση των στεφανιαίων αρτηριών [13-15].
- ✘ **Έμφραγμα του μυοκαρδίου:** Το έμφραγμα του μυοκαρδίου προκαλείται από βαρεία και παρατεταμένη ισχαιμία, με αποτέλεσμα τη νέκρωση μέρους του μυοκαρδιακού τοιχώματος (Σχήμα 2.2.3). Αποτελεί την ακραία περίπτωση διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ της προσφοράς και των αναγκών της καρδιάς σε οξυγόνο [16,17].
- ✘ **Καρδιακή προσβολή:** Η καρδιακή προσβολή λαμβάνει χώρα μετά από τον σχηματισμό θρόμβου σε στεφανιαία αρτηρία (στην περιοχή της πλάκας αθηρωμάτωσης). Η απόφραξη που

- προκαλείται έχει ως αποτέλεσμα, η περιοχή του μυοκαρδίου που εξαρτάται από την εν λόγω αρτηρία, να στερείται σε μεγάλο βαθμό ή και πλήρως από το αίμα που χρειάζεται για να λειτουργήσει φυσιολογικά. Η στέρηση οξυγόνου είναι η αιτία θανάτου των κυττάρων του μυοκαρδίου, η οποία συνεπάγεται και την ανεπανόρθωτη μυοκαρδιακή βλάβη [18-21].



Σχήμα 2.2.3 Σχηματική απεικόνιση του εμφράγματος του μυοκαρδίου

Παράλληλα με τα παραπάνω, η στεφανιαία νόσος της καρδιάς εξασθενεί το μυοκάρδιο προκαλώντας:

- **Καρδιακή ανεπάρκεια:** Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι η πολύ σοβαρή παθολογική κατάσταση κατά την οποία η καρδιά αδυνατεί να εκτελέσει επαρκώς το ρόλο της ως αντλία και να αποστέλλει αίμα στα διάφορα μέρη του σώματος [22,23].
- **Αρρυθμίες:** Οι αρρυθμίες είναι οι ανωμαλίες του κανονικού ρυθμού των καρδιακών παλμών. Ως αποτέλεσμα διαφόρων μυοκαρδιακών παρατυπιών, αποτελεί και μια από τις αιτίες της καρδιακής ανεπάρκειας [24,25].

Αξίζει να αναφέρουμε ότι οι καρδιαγγειακές παθήσεις περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα νοσηρών καταστάσεων, οι οποίες δεν σχετίζονται απαραίτητα με τα προαναφερθέντα στεφανιαία καρδιακά σύνδρομα. Πιο συγκεκριμένα:

- ◆ **Μυοκαρδίτιδα και περικαρδίτιδα:** Η μυοκαρδίτιδα [26,27] είναι μια σοβαρή πάθηση η οποία προκαλείται από φλεγμονές του μυοκαρδίου, ενώ αντίστοιχα η περικαρδίτιδα [28] από φλεγμονές του περικαρδίου.
- ◆ **Βαλβιδοπάθειες:** Οι παθήσεις των βαλβίδων της καρδιάς προκαλούν καρδιακή δυσλειτουργία. Οι βλάβες που μπορούν να υποστούν περιλαμβάνουν τη στένωση και την ανεπάρκεια, ή τη μικτή βαλβιδοπάθεια όπου συνυπάρχουν και οι δύο [29].

• **Η υπερτροφία της καρδιάς - Υπερτροφική καρδιομυοπάθεια:** Στην υπερτροφία ο καρδιακός μυς αυξάνεται σε μέγεθος ενώ ταυτόχρονα οι κοιλότητες της καρδιάς γίνονται μικρότερες. Η μείωση των διαστάσεων των κοιλοτήτων της αριστερής ή της δεξιάς κοιλίας της καρδιάς, λόγω της παθολογικής υπερτροφίας του μυοκαρδίου, μειώνουν τις λειτουργικές δυνατότητες της καρδιάς [30].

Οι παραπάνω παθολογικές καταστάσεις εκδηλώνονται και διαγιγνώσκονται μέσα από ένα μεγάλο εύρος συμπτωματολογίας, με την σοβαρότητα των συμπτωμάτων να παρουσιάζει διαφοροποιήσεις μεταξύ των ασθενών. Ο ασθενής μπορεί να αισθανθεί πέρα από το κλασικό θωρακικό άλγος, έντονη δυσφορία και δύσπνοια, αδυναμία, νευρικότητα και ανησυχία. Μπορεί επίσης να έχει ζαλάδες, ναυτία, εμετούς, κρύο ιδρωμένο δέρμα, μέχρι και απώλεια συνειδήσεως (λιποθυμία). Να σημειωθεί τέλος ότι τα συμπτώματα μπορεί να γίνονται ακόμη σοβαρότερα με τη αύξηση της σχηματιζόμενης αθηρωματικής πλάκας, την επιδείνωση δηλαδή του φαινομένου της στένωσης των στεφανιαίων αρτηριών.

2.3 Αιτιολογία και παράγοντες κίνδυνου των καρδιαγγειακών ανωμαλιών

Η πρόβλεψη ενός σοβαρού καρδιαγγειακού επεισοδίου προκύπτει από την αξιολόγηση μιας σειράς παραγόντων, οι οποίοι στην πραγματικότητα προδιαθέτουν αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας [18,19,31]. Υπάρχουν παράγοντες στους οποίους ο ασθενής δεν έχει κανέναν απολύτως έλεγχο και γενικότερα δεν μπορεί να επέμβει άμεσα (όπως π.χ. η ηλικία), αλλά και παράγοντες που εάν προληπτικά ή κατασταλτικά τροποποιηθούν, θα μπορούσαν να μειώσουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Στην πρώτη κατηγορία παραγόντων υψηλού κινδύνου εντάσσονται:

- ✓ **Ηλικία και φύλο:** Οι άνδρες διατρέχουν αποδεδειγμένα μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σχέση με τις γυναίκες. Στους άνδρες ο κίνδυνος αυξάνεται μετά το 45^ο έτος της ηλικίας, ενώ στις γυναίκες μετά το 55^ο έτος.
- ✓ **Οικογενειακό ιστορικό καρδιαγγειακών παθήσεων:** Σημαντική ένδειξη αποτελεί η καρδιοπάθεια που διαγνώστηκε πριν το 55^ο έτος της ηλικίας σε συγγενικό πρόσωπο πρώτου βαθμού όσον αφορά τους άντρες και το 65^ο έτος αντίστοιχα για τις γυναίκες.

Αναμφίβολα, η αναγνώριση των παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο προσβολής από την νόσο είναι εξαιρετικά σημαντική για την πρόληψη. Αναλυτικότερα, στη δεύτερη κατηγορία παραγόντων οι οποίοι μπορούν να ελεγχθούν προληπτικά από τον ίδιο τον ασθενή περιλαμβάνονται:

- **Κάπνισμα:** Ίσως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για θάνατο εμφράγμα του μυοκαρδίου. Η νικοτίνη που περιέχεται σε ένα τσιγάρο, είναι αρκετή για να οδηγήσει την πίεση σε υψηλότερα από το κανονικό επίπεδα.



➤ **Ψηλή κακή χοληστερόλη στο αίμα:** Η αύξηση της χοληστερόλης στο αίμα, ιδιαίτερα της κακής χοληστερόλης LDL, είναι βασικός παράγοντας πρόκλησης στένωσης των στεφανιαίων αρτηριών, καρδιακής προσβολής, εγκεφαλικών επεισοδίων και ξαφνικού θανάτου.

Οι δύο πρώτοι παράγοντες είναι και οι σημαντικότεροι για την εμφάνιση διαφόρων καρδιαγγειακών ανωμαλιών. Είναι συνολικά υπεύθυνοι για την πρόκληση του 66% των εμφραγμάτων του μυοκαρδίου παγκοσμίως.

- **Ψηλή πίεση - Υπέρταση:** Συνήθως η υπέρταση στα αρχικά της στάδια και προτού ακόμη δημιουργηθούν επιπλοκές, δεν προκαλεί συμπτώματα. Για το λόγο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως "σιωπηλός δολοφόνος", διότι εξελίσσεται αθόρυβα, προκαλώντας ανεπανόρθωτες βλάβες σε διάφορα ζωτικά όργανα.
- **Διαβήτης:** Οι κυριότεροι λόγοι θανάτων σε διαβητικούς ασθενείς είναι οι καρδιαγγειακοί, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η ισχαιμική καρδιοπάθεια καθώς επίσης και τα εγκεφαλικά επεισόδια [32].
- **Παχυσαρκία με αυξημένο λίπος εντοπισμένο γύρω από την κοιλιά:** Το υπερβολικό βάρος σώματος και η παχυσαρκία, ιδιαίτερα όταν το περιττό λίπος είναι συσσωρευμένο στην περιοχή της κοιλιάς, αυξάνουν επικίνδυνα τις πιθανότητες προσβολής από υψηλή πίεση [33].
- **Στρες:** Το στρες φαίνεται να διαδραματίζει τεράστιο ρόλο στην πρόκληση της στεφανιαίας νόσου και των εμφραγμάτων του μυοκαρδίου. Συνολικά βρέθηκε να ευθύνεται για το 33% των περιπτώσεων καρδιακής προσβολής [18,19,34].
- **Απουσία καθημερινής κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών:** Η μη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών πλούσιων σε αντι-οξειδωτικές ουσίες, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κακής χοληστερόλης στο αίμα. Έχει υπολογιστεί ότι για κάθε μερίδα φρούτων ή λαχανικών που καταναλώνεται καθημερινά, μειώνεται ο κίνδυνος καρδιακής προσβολής κατά 4%.
- **Απουσία καθημερινής σωματικής άσκησης:** Οδηγεί σε μείωση του μεταβολισμού και αύξηση του σωματικού βάρους, καθιστώντας τον οργανισμό ιδιαίτερα ευάλωτο σε προσβολή από υψηλή πίεση.
- **Κατανάλωση αλκοόλ:** Η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο υψηλής πίεσης, δημιουργώντας παράλληλα τις προϋποθέσεις για την εμφάνιση καρδιακών και εγκεφαλικών επεισοδίων [35].

Υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που δυνητικά μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο της καρδιάς. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι άτομα που πάσχουν από ημικρανίες πιθανόν να έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να υποστούν καρδιακή προσβολή σε σύγκριση με υγιείς πληθυσμούς. Επιπλέον, οι θάνατοι από εμφράγματα του μυοκαρδίου είναι σημαντικά συχνότεροι κατά τις περιόδους του έτους με διαδεδομένη γρίπη. Έχει αποδειχθεί ότι η γρίπη αυξάνει τον κίνδυνο θανάτων από καρδιακή προσβολή κατά 33% [36].



Η καρδιομεγαλία, δηλαδή η αύξηση του μεγέθους της καρδιάς, παρά το γεγονός ότι δεν χαρακτηρίζεται από παθογένεια, οι ασθένειες που την συνοδεύουν είναι πολλές. Σε μερικούς αθλητές υψηλού επιπέδου που λαμβάνουν μέρος σε σπορ αντοχής, παράλληλα με την καρδιομεγαλία, μπορεί να δημιουργηθεί και μια σπάνια αλλά απειλητική για τη ζωή πάθηση, γνωστή ως κοιλιακή αρρυθμία, κατά την οποία η καρδιά κτυπά με ανώμαλο ρυθμό και συχνότητα [37].

Τέλος, αν και ο ρόλος των περιβαλλοντικών παραγόντων στις καρδιαγγειακές παθήσεις παραμένει ακόμη σε μεγάλο βαθμό ανεξιχνίαστος, αυτοί που διερευνούνται ως ύποπτοι για την εμφάνιση εμφραγμάτων του μυοκαρδίου είναι [38]:

- Η ρύπανση του περιβαλλοντικού αέρα
- Η ηχορύπανση
- Το παθητικό κάπνισμα
- Τα χημικά συστατικά του πόσιμου νερού

Η αποτελεσματική πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων ως βασική προϋπόθεση για την προστασία από τις καταστροφικές συνέπειες του εμφράγματος του μυοκαρδίου, απαιτεί τον έλεγχο των πιο πάνω παραγόντων, με τη συμβολή του ίδιου του ατόμου να έχει τεράστια σημασία για την επιτυχία της.

2.4 Μέτρα πρόληψης των καρδιαγγειακών νοσημάτων

Οι ειδικοί σήμερα συστήνουν, ότι η αποτελεσματική πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων προϋποθέτει:

- την αποφυγή του καπνίσματος,
- τον έλεγχο της αρτηριακής υπέρτασης και του διαβήτη (εάν υπάρχουν),
- την τακτική σωματική εξάσκηση και διατήρηση ενός κανονικού βάρους σώματος,
- τη μείωση κατανάλωσης του αλκοόλ,
- τη σημαντική μείωση κατανάλωσης αλατιού,
- την αποφυγή κατανάλωσης τροφών υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λίπη,
- την υγιεινή γενικότερα διατροφή, πλούσια σε φρούτα και λαχανικά.

Οι γνώσεις αναφορικά με τις σχέσεις διατροφής και υγείας της καρδιάς συνεχώς εξελίσσονται. Υπήρχε η διαδεδομένη αντίληψη ότι η κατανάλωση γάλακτος και γενικότερα γαλακτοκομικών προϊόντων είναι παράγοντας που αυξάνει τον κίνδυνο για παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος. Όμως πρόσφατη ανασκόπηση των δεδομένων 400.000 ενηλίκων από διάφορες χώρες, που έτυχαν παρακολούθησης για 28 χρόνια, όχι μόνο δεν επιβεβαίωσε τις επιβλαβείς συνέπειες από την κατανάλωση του γάλακτος για τα αγγεία, αλλά αντιθέτως διαπιστώθηκε και μια σχετικά μικρή αλλά αξιόλογη προληπτική δράση έναντι της εμφάνισης καρδιακής νόσου [39].



Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την αποφυγή και καταπολέμηση της ψυχικής έντασης και του άγχους, θα μπορούσαν να αποτελέσουν θεμελιώδεις κανόνες για την επιτυχή πρόληψη των καρδιαγγειακών επεισοδίων.

Παρόλα αυτά, η πρόληψη σήμερα για το έμφραγμα του μυοκαρδίου με βάση τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου κρίνεται τουλάχιστον ανεπαρκής. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 50% των ανθρώπων που παθαίνουν καρδιακή προσβολή ή πεθαίνουν ξαφνικά λόγω εμφράγματος, δεν γνωρίζουν ότι παρουσίαζαν αθηρωμάτωση. Η επικρατούσα κατάσταση αφήνει εκτεθειμένους στον κίνδυνο θανάτου ένα μεγάλο αριθμό ασθενών, πόσο μάλλον αυτούς με σοβαρού βαθμού αθηρωμάτωση, οι οποίοι δεν έχουν ακόμη παρουσιάσει συμπτώματα.

Πρόσφατα, εμπειρογνώμονες οι οποίοι συνασπίστηκαν στην ειδική επιστημονική ομάδα SHAPE (Screening for Heart Attack Prevention and Education), εξέδωσαν για πρώτη φορά οδηγίες αναφορικά με την αντιμετώπιση του φαινομένου της ανεπαρκούς πρόληψης των καρδιακών προσβολών και εγκεφαλικών επεισοδίων σε ασυμπτωματικούς ενήλικες [40]. Στόχος των οδηγιών είναι να επιτρέψουν στους κλινικούς γιατρούς να αξιολογούν προληπτικά το ποσοστό αθηρωμάτωσης που υπάρχει σε ένα ασθενή, την ανίχνευση δηλαδή των ανωμαλιών της δομής και λειτουργίας των αρτηριών, με δύο απλά διαγνωστικά τεστ:

- ♦ **Ασβέστιο στεφανιαίων αρτηριών:** Υπολογίζεται με τη βοήθεια αξονικής τομογραφίας.
- ♦ **Πάχος του αγγειακού τοιχώματος των καρωτίδων, ιδιαίτερα του έσω/μέσου χιτώνα:** Μετρείται με τη βοήθεια του υπερηχογραφήματος των καρωτίδων.

Σύμφωνα με τους εμπειρογνώμονες του SHAPE, υπολογίζεται ότι η εφαρμογή των μέτρων αυτών στις Ηνωμένες Πολιτείες σε ασυμπτωματικούς πληθυσμούς, θα έχει τα εξής ευεργετικά αποτελέσματα:

- ⊕ Πρόληψη 90.000 θανάτων ετησίως από καρδιακά και αγγειακά νοσήματα.
- ⊕ Μείωση κατά 25% του αριθμού των ατόμων με ιστορικό καρδιακής προσβολής, οι οποίοι σήμερα ανέρχονται στα 13.2 εκατομμύρια (δεδομένα του 2006).
- ⊕ Εξοικονόμηση περίπου 21.5 δισεκατομμυρίων δολαρίων ετησίως, από την πρόληψη καρδιακών ή εγκεφαλικών επεισοδίων σε άτομα που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο.

Για να γίνουμε πιο αποτελεσματικοί όσον αφορά την καταπολέμηση της αυξανόμενης επιδημίας των καρδιαγγειακών αθηρωματικών παθήσεων, είναι ξεκάθαρο ότι απαιτείται η εφαρμογή μιας νέας στρατηγικής η οποία θα εκτείνεται πέρα από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου. Οι οδηγίες SHAPE φαίνεται ότι έχουν τη δυνατότητα να μεταμορφώσουν προς το καλύτερο το πεδίο δράσης της προληπτικής καρδιολογίας.

2.5 Διαγνωστικές διαδικασίες - Βιοχημικοί δείκτες

Ένα από τα καίρια προβλήματα των νοσηλευτικών ιδρυμάτων σήμερα (ιδιαίτέρως στα τμήματα των επειγόντων περιστατικών), αποτελεί η γρήγορη, αποτελεσματική και ορθή αξιολόγηση



των ασθενών που εισέρχονται σε αυτά με συμπτώματα καρδιαγγειακής νόσου. Όταν ένα στεφανιαίο αγγείο της καρδιάς υποστεί απόφραξη, η προκύπτουσα ισχαιμία προκαλεί πολύ γρήγορα νεκρωτικές βλάβες στον καρδιακό ιστό, οι οποίες απειλούν άμεσα τη ζωή του ασθενούς. Έτσι, η κατάλληλη αντιμετώπιση του ασθενή χωρίς λάθη και η έγκαιρη χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας καθίσταται επιβεβλημένη, προς αποφυγή ενδεχόμενων ανεπιθύμητων παθολογικών καταστάσεων.

Η αλήθεια για τις δυνατότητες των διαγνωστικών καρδιολογικών εξετάσεων είναι σήμερα αρκετά συγκεχυμένες. Η διάγνωση γενικά διαμορφώνεται από το ιστορικό του ασθενούς και από την κλινική εικόνα που θα παρουσιάζει, δηλαδή από τα ευρήματα που θα δείξει η λεπτομερής κλινική εξέταση και οι συμπληρωματικές αιματολογικές του εξετάσεις.

2.5.1 Κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις

Η διάγνωση των ασθενών που εισάγονται στα τμήματα επειγόντων περιστατικών με υποψία καρδιαγγειακής νόσου, ανάλογα με τη σπουδαιότητα του προβλήματος συνήθως περιλαμβάνει:

- Κλινική εξέταση:** Περιλαμβάνει την επισκόπηση, την ψηλάφηση, τα είδη των σφυγμών, τη μέτρηση της πίεσης και την ακρόαση.
- Ραδιολογικές Εξετάσεις - Ακτινογραφία θώρακος και καρδιάς:** Οι ακτινογραφίες δίνουν σημαντικές πληροφορίες για το μέγεθος και το σχήμα της καρδιάς, δεδομένου ότι σε περιπτώσεις καρδιακής ανεπάρκειας ή οποιασδήποτε βαλβιδοπάθειας παρουσιάζεται η τάση για καρδιακή διόγκωση.
- Ηλεκτροκαρδιογραφική Εξέταση:** Το ηλεκτροκαρδιογράφημα δίνει πληροφορίες για την ηλεκτρική δραστηριότητα του μυοκαρδίου. Η ευαισθησία της εξέτασης αυτής είναι χαμηλή και μπορεί να συνεισφέρει στη διάγνωση μόνο στο 10% των ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Δεν είναι σπάνιο το γεγονός, το ηλεκτροκαρδιογράφημα να παρουσιάζεται φυσιολογικό ενώ στην πραγματικότητα να υφίσταται έμφραγμα ή ασταθής στηθάγχη. Το ηλεκτροκαρδιογράφημα είναι μια γραφική παράσταση η οποία προσφέρει πληροφορίες για την πορεία πόλωσης και εκπόλωσης της καρδιάς, δεδομένου ότι η μεμβράνη των καρδιακών κυττάρων είναι ηλεκτρικά πολωμένη.
- 24ωρη καταγραφή ηλεκτροκαρδιογραφήματος - HOLTZER:** Η 24ωρη καταγραφή ηλεκτροκαρδιογραφήματος γίνεται για να εντοπισθούν οι αρρυθμίες που ξεφεύγουν από το απλό ηλεκτροκαρδιογράφημα.
- Δοκιμασία κοπώσεως:** Η δοκιμασία κοπώσεως είναι μια απλή και αναίμακτη εξέταση, που συμβάλλει στη διάγνωση και παρακολούθηση της στεφανιαίας νόσου. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας υπάρχει συνεχής παρακολούθηση του ηλεκτροκαρδιογραφήματος και συχνή μέτρηση της αρτηριακής πίεσης. Με τον τρόπο αυτόν είναι εφικτή η εξαγωγή σημαντικών



πληροφοριών για την κατάσταση του ασθενή, πληροφορίες οι οποίες δεν εμφανίζονται όταν αυτός βρίσκεται σε ηρεμία.

- ☑ **Υπερηχοκαρδιογραφία:** Το υπερηχοκαρδιογράφημα ξεκαθαρίζει πιθανά ανατομικά προβλήματα των μεγάλων αγγείων της καρδιάς, των τοιχωμάτων (εάν υπάρχει μυοκαρδιοπάθεια), καθώς και των βαλβίδων της.
- ☑ **Σπινθηρογράφημα μυοκαρδίου:** Με το σπινθηρογράφημα μυοκαρδίου ελέγχεται η αιμάτωση του μυοκαρδίου και έμμεσα εξάγονται συμπεράσματα για την κατάσταση των στεφανιαίων αγγείων. Στον ασθενή χορηγείται ενδοφλεβίως μια μικρή ποσότητα ραδιενεργού ουσίας, συνήθως θάλλιο 201 ή τεχνητό και με τη βοήθεια μιας γ-κάμερας συλλαμβάνονται οι σπινθηρισμοί της ραδιενεργού ουσίας που προέρχονται από την καρδιά. Έτσι, με ειδική επεξεργασία καταγράφονται οι εικόνες της καρδιάς.
- ☑ **Στεφανιογραφία:** Η στεφανιογραφία είναι η εξέταση με την οποία σκιαγραφούνται οι στεφανιαίες αρτηρίες. Με τον τρόπο αυτό απεικονίζονται οι διάφορες παθολογικές καταστάσεις (αθηροσκλήρυνση, θρόμβωση, κ.ο.κ.) και γίνεται η αντίστοιχη εκτίμηση της σοβαρότητας του ασθενούς.
- ☑ **Αξονική τομογραφία:** Η αξονική τομογραφία της καρδιάς αποτελεί καινοτόμο διαγνωστική μεθοδολογία, βάσει της οποίας απεικονίζονται με ακρίβεια η καρδιά και τα στεφανιαία της αγγεία. Η ενδοφλέβια χορήγηση σκιαγραφικού υλικού επιτρέπει την απεικόνιση των στεφανιαίων αγγείων έτσι ώστε να εντοπίζονται οι ενδεχόμενες στενώσεις τους.
- ☑ **Μαγνητική τομογραφία:** Στην απεικόνιση μαγνητικής αντήχησης χρησιμοποιείται ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο και ραδιοκύματα, ώστε να παράγονται οι λεπτομερείς εικόνες της καρδιάς και του θώρακα. Αυτή η ακριβή και περίπλοκη διαδικασία χρησιμοποιείται κυρίως για τη διάγνωση των σύνθετων συγγενών καρδιακών παθήσεων.

2.5.2 Αιματολογικές εξετάσεις - Βιοχημικοί δείκτες

Όσον αφορά τις αιματολογικές εξετάσεις, στις οποίες υποχρεωτικά υποβάλλεται ο ασθενής που εισέρχεται στα νοσοκομειακά τμήματα με υποψία στηθάγχης, παρέχουν πολύ χρήσιμες πληροφορίες δρώντας επικουρικά στη εκτίμηση και τελική διαμόρφωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Οι αναλύσεις αίματος των ασθενών οι οποίες παρουσιάζουν αυξημένα καρδιακά ένζυμα (βιοδείκτες) [41-48], κρούουν τον κώδωνα του κινδύνου, δεδομένου ότι αυτά απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη νέκρωση κυττάρων του μυοκαρδίου. Να επισημανθεί ότι η χρήση των βιοδεικτών σήμερα είναι καθολική, έχοντας φέρει επανάσταση στον τομέα της κλινικής διαγνωστικής. Ένας ιδανικός βιοχημικός δείκτης θα πρέπει γενικά να χαρακτηρίζεται από:

- ☛ Υψηλή συγκέντρωση στο μυοκάρδιο.
- ☛ Χαμηλή συγκέντρωση σε άλλους ιστούς, προς αποφυγή διασταυρωτών αντιδράσεων.
- ☛ Άμεση απελευθέρωση στην κυκλοφορία του αίματος μετά τον μυοκαρδιακό τραυματισμό.



- Μεγάλο χρόνο ημιζωής, να παραμένει δηλαδή για μεγάλο χρονικό διάστημα στο πλάσμα αίματος του ασθενή.
- Να επιτρέπει την ανάπτυξη γρήγορων και ευαίσθητων διαγνωστικών δοκιμών.

Παρακάτω γίνεται μια σύντομη αναφορά στους βιοχημικούς δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρύτατα σε κλινικό επίπεδο.

- ⊕ **Μυογλοβίνη.** Πρόκειται για έναν βιοχημικό δείκτη ο οποίος παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον, λόγω του ότι απελευθερώνεται και ανιχνεύεται στο αίμα των ασθενών ταχύτερα από κάθε άλλον δείκτη. Χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία με την μεγάλη της χρησιμότητα να εντοπίζεται στο γεγονός ότι, η μη ανίχνευσή της στα δείγματα αίματος του ασθενή τις πρώτες 4-8 ώρες από το καρδιαγγειακό επεισόδιο αποκλείει την περίπτωση νέκρωσης μυοκαρδιακών ιστών [49-52].
- ⊕ **Ισοένζυμο BB, της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GPBB).** Το GPBB προτάθηκε για πρώτη φορά ως δείκτης μυοκαρδιακής ισχαιμίας και οξέων μυοκαρδιακών εμφραγμάτων το 1987. Πρόκειται για ένα βιοχημικό δείκτη, η κινητική απελευθέρωσης του οποίου είναι παρόμοια με αυτή της μυογλοβίνης [53,54].
- ⊕ **CRP (C-Reactive Protein).** Η μέτρηση της CRP είναι μια φτηνή, γρήγορη και εύκολη διαγνωστική εξέταση. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη η οποία παράγεται από το συκώτι, με τη συγκέντρωσή της στο αίμα να αυξάνεται ταχύτατα, όταν υφίσταται ερεθισμός ή φλεγμονή στο εσωτερικό των αιμοφόρων αγγείων. Η φλεγμονή των αγγείων προκαλεί την εναπόθεση χοληστερόλης και ασβεστίου με κίνδυνο να προκληθεί σταδιακά στένωση. Κλινικές έρευνες έχουν δείξει ότι άτομα τα οποία παρουσιάζουν πολύ υψηλά επίπεδα CRP, κινδυνεύουν από καρδιακή προσβολή 3 φορές περισσότερο σε σχέση με τους υγιείς πληθυσμούς [55-59].
- ⊕ **Ισοένζυμο MB, της κινάσης της κρεατίνης (CK-MB).** Αύξηση της συγκέντρωσης της κινάσης της κρεατίνης στο πλάσμα αίματος των ασθενών παρατηρείται σε περιπτώσεις μυϊκής καταστροφής, όπως επίσης και μετά από βλάβες του καρδιακού μυϊκού ιστού. Η μέτρηση της CK αποτελεί μια εύκολη, γρήγορη και αρκετά φτηνή διαγνωστική εξέταση, η οποία όμως μειονεκτεί σημαντικά όσον αφορά την καρδιακή της ειδικότητα, αλλά και την γενικότερη ευαισθησία της μεθόδου [60-62].
- ⊕ **H-FABF (Heart Type Fatty Acid Binding Protein).** Πρόκειται για μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους, η οποία ελευθερώνεται ταχύτατα στην κυκλοφορία του αίματος μετά από καταστροφή τμήματος του μυοκαρδιακού ιστού. Στον παράγοντα αυτό οφείλεται και η ευρύτατη χρήση της ως διαγνωστικού δείκτη οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου [63-65].
- ⊕ **BNP (B-type natriuretic peptide).** Η BNP είναι μια νευροορμόνη, η σύνθεση της οποίας λαμβάνει χώρα κυρίως στην περιοχή του κοιλιακού μυοκαρδίου με αυτόματη ελευθέρωσή της



- στην κυκλοφορία του αίματος. Χαρακτηρίζεται από τη σπουδαία διαγνωστική και προγνωστική της αξία, ιδιαίτερα σε παθολογικές καταστάσεις σχετιζόμενες με καρδιακή ανεπάρκεια [66-70].
- ⊕ **Ομοκυστεΐνη.** Η ομοκυστεΐνη είναι ένα αμινοξύ το οποίο προκύπτει από τη διμεθυλίωση της μεθιονίνης. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι όταν τα επίπεδα της στο αίμα των ασθενών είναι υψηλά, αυξάνεται ραγδαία ο κίνδυνος για καρδιακή προσβολή και εγκεφαλικό επεισόδιο [71-74].
 - ⊕ **Τροπονίνες.** Η μέτρηση της τροπονίνης αποτελεί μια πολύ ειδική, γρήγορη και αρκετά ευαίσθητη διαγνωστική μη επεμβατική εξέταση. Τα τελευταία χρόνια έχει φέρει επανάσταση στον τομέα των βιοχημικών δεικτών και γενικότερα της κλινικής διαγνωστικής, βοηθώντας σημαντικά τον κλινικό καρδιολόγο στην αντιμετώπιση των ασθενών με οξεία στεφανιαία σύνδρομα. Ως αντικείμενο της παρούσας διατριβής, εκτενέστατη περιγραφή της διαγνωστικής δοκιμασίας γίνεται στο επόμενο κεφάλαιο.

2.6 Αντιμετώπιση καρδιαγγειακών νοσημάτων - Θεραπευτική αγωγή

Η οφειλόμενη σε οξεία εμφράγματα του μυοκαρδίου νοσοκομειακή θνητότητα, από 30% που ήταν στη δεκαετία του '70 έχει μειωθεί σήμερα σε λιγότερο από 10%. Η σημαντική αυτή μείωση επιτεύχθηκε μετά από την ανάπτυξη των μονάδων εντατικής παρακολούθησης, τη βελτίωση της φαρμακευτικής αγωγής και των επεμβατικών μεθόδων θεραπείας. Οι βασικοί τρόποι της νοσοκομειακής προσέγγισης των καρδιαγγειακών επιπλοκών είναι:

- ⊗ **Συντηρητική προσέγγιση.** Περιλαμβάνει την ιατροφαρμακευτική περίθαλψη και χορήγηση στον ασθενή αντιθρομβωτικών και άλλων φαρμάκων (στατίνες). Η θρομβόλυση βασίζεται στη χορήγηση ειδικών φαρμάκων που μπορούν να διαλύσουν τους θρόμβους οι οποίοι σχηματίζονται και αποφράσσουν τα στεφανιαία αγγεία [75]. Παράλληλα, η ανακάλυψη των στατινών θεωρήθηκε ως μια από τις σημαντικότερες επιτεύξεις της σύγχρονης ιατρικής. Οι στατίνες είναι μια ομάδα φαρμάκων που εμποδίζουν τη σύνθεση χοληστερόλης στο συκώτι. Πρόκειται για φάρμακα τα οποία είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στο να μειώνουν την συγκέντρωση της χοληστερόλης στο αίμα των ασθενών, να προστατεύουν τις στεφανιαίες αρτηρίες της καρδιάς από την αθηρωμάτωση ελαττώνοντας παράλληλα τον κίνδυνο μυοκαρδιακού εμφράγματος και θανάτου [76,77]. Παρά το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην αντιμετώπιση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, εντούτοις η θνησιμότητα και νοσηρότητα που παρατηρούνται στην αρχική φάση της καρδιακής προσβολής εξακολουθεί να παραμένει υψηλή. Τελευταίες μελέτες μιας ερευνητικής ομάδας γιατρών του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης, έδειξαν ότι η χορήγηση ενός νέου φαρμάκου (clopidogrel, κλοπιδογρέλη) παράλληλα με την θρομβολυτική θεραπεία, σε 45.852 ασθενείς από 1250 νοσοκομεία της Κίνας, έδωσε σε πρώτη φάση 9% λιγότερους θανάτους και σημαντικά



λιγότερα επαναλαμβανόμενα καρδιακά επεισόδια, σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών που δεν ελάμβαναν το clopidogrel [78].

- ☒ **Επεμβατική προσέγγιση.** Περιλαμβάνει την αγγειογραφία και τη χειρουργική επέμβαση ανάλογα με την εξέλιξη του ασθενούς. Η αγγειοπλαστική είναι μια αναίμακτη τεχνική της επεμβατικής καρδιολογίας που στοχεύει στη διάταση της στενωμένης στεφανιαίας αρτηρίας με τη βοήθεια ειδικού μπαλονιού [79]. Σε περιπτώσεις που η διάνοιξη της στενωμένης αρτηρίας δεν είναι ικανοποιητική μπορεί να τοποθετηθεί και μια ενδοαυλική πρόθεση (μεταλλικό stent). Παράλληλα μια πρωτοποριακή έρευνα Γερμανών γιατρών από το Πανεπιστήμιο του Ντίσελντορφ, η οποία πραγματεύεται τη μεταμόσχευση κυττάρων μυελού των οστών σε ασθενείς που έχουν υποστεί έμφραγμα, φέρνει επανάσταση στον τομέα της επεμβατικής καρδιολογίας. Χορήγησαν κατευθείαν στην καρδιά εμφραγματιών, μονοπύρηνια κύτταρα μυελού των οστών τα οποία προέρχονταν από τους ίδιους, με τα αποτελέσματα της πρωτοποριακής αυτής έρευνας να καταγράφονται εξαιρετικά. Τρεις μήνες μετά τη μεταμόσχευση των αυτόλογων κυττάρων στις περιοχές του μυοκαρδίου που είχε βλάβες, παρατηρήθηκε κατά 30% μείωση των νεκρωμένων τομέων της καρδιάς, η καρδιακή λειτουργία ιδιαίτερα όσον αφορά στο ρόλο της ως αντλία αποστολής αίματος στο κυκλοφορικό σύστημα ανακτήθηκε τουλάχιστον κατά 15%, ενώ η κινητικότητα των ζωνών με νέκρωση βελτιώθηκε κατά 57%.

Ανακεφαλαιώνοντας θα πρέπει να τονιστεί ότι η επιτυχής αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων προϋποθέτει καταρχάς την άμεση μετάβαση του ασθενούς στα τμήματα επειγόντων περιστατικών, από τα πρώτα κιάλας συμπτώματα. Οι ειδικοί επισημαίνουν ότι η οποιαδήποτε τύπου καθυστέρηση [80], αποτελεί καθοριστικό παράγοντα μείωσης των πιθανοτήτων επιβίωσης των ασθενών με τέτοιου είδους παθολογικά σύνδρομα.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΤΡΟΠΟΝΙΝΕΣ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA

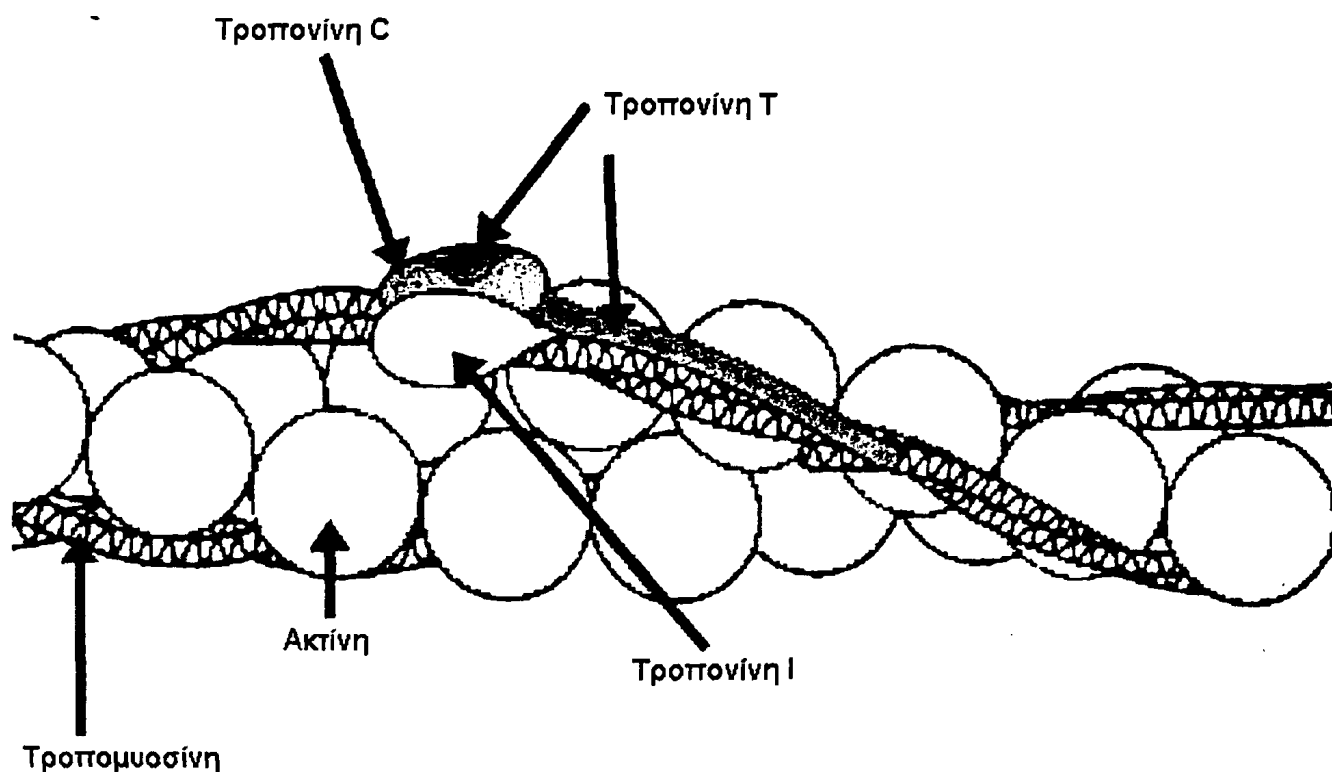


3.1 Εισαγωγή

Οι ερευνητικές μελέτες των S. Ebashi (1968) [1], S. V. Perry (1979) [2], και του J. Gergely (1984) [3], ανέδειξαν τη βιολογική σπουδαιότητα του μορίου της τροπονίνης στη ρύθμιση της μυϊκής σύσπασης. Η τροπονίνη είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο εδράζεται στα λεπτά νημάτια των μυοσκελετικών και μυοκαρδιακών ιστών και συνίσταται από τρεις διαφορετικές πρωτεϊνικές υπομονάδες [4,5] (Σχήμα 3.1.1):

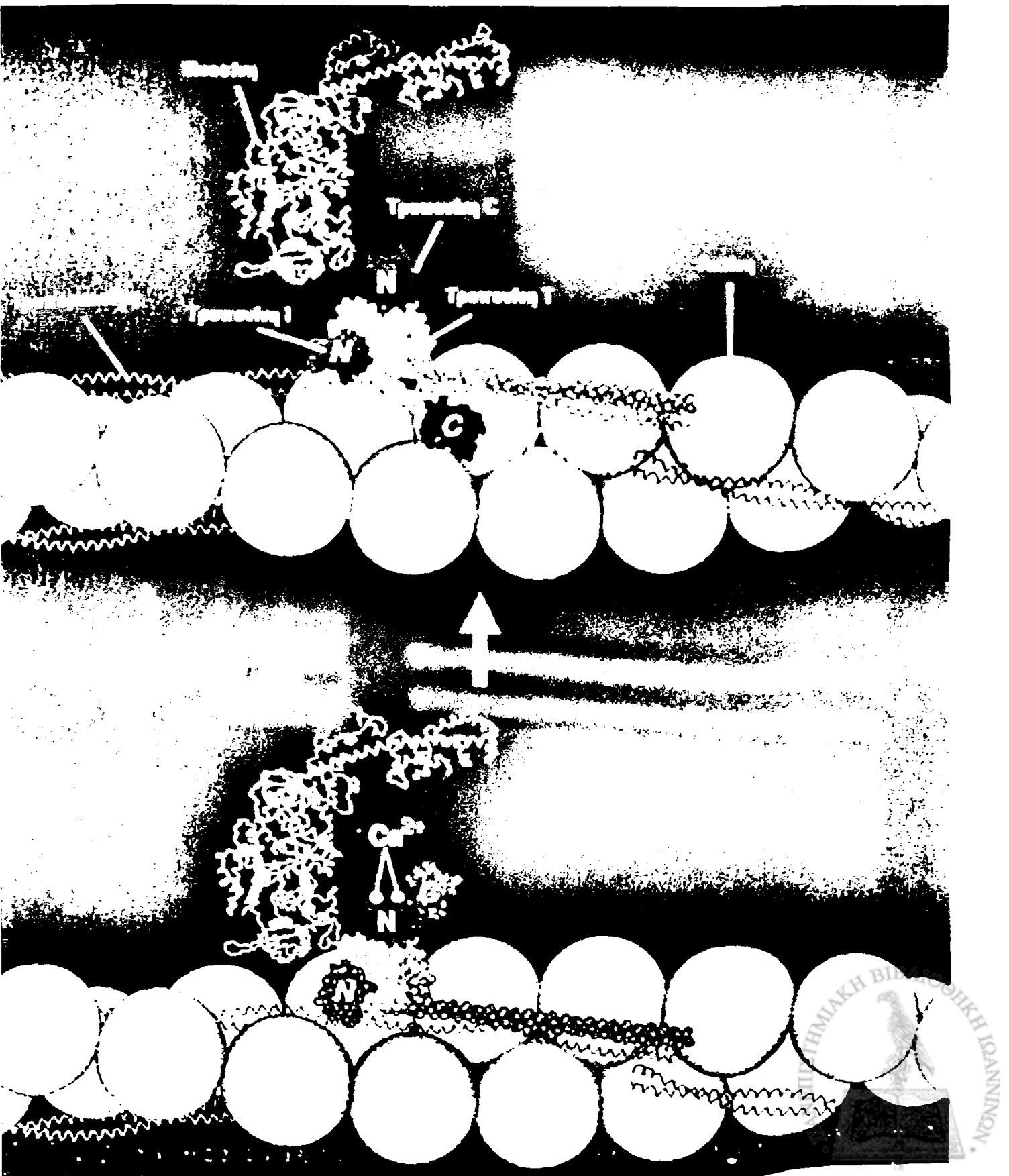
- **Τροπονίνη I (Inhibitor):** Η τροπονίνη I (24 kDa) είναι η υπεύθυνη πρωτεΐνη για την αναστολή της ATPασης της ακτινομυοσίνης [3,6].
- **Τροπονίνη T (Tropomyosin-binding):** Η τροπονίνη T (37 kDa) αλληλεπιδρά στα λεπτά νημάτια των μυϊκών ιστών με την τροπομυοσίνη [7,8].
- **Τροπονίνη C (Calcium-binding protein):** Η τροπονίνη C (24 kDa) ανήκει σε μια μεγάλη κατηγορία ασβέστιο-δεσμευτικών πρωτεϊνών [9,10].

Καθένα από αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια είναι υπεύθυνο για διαφορετικές βιοχημικές λειτουργίες.



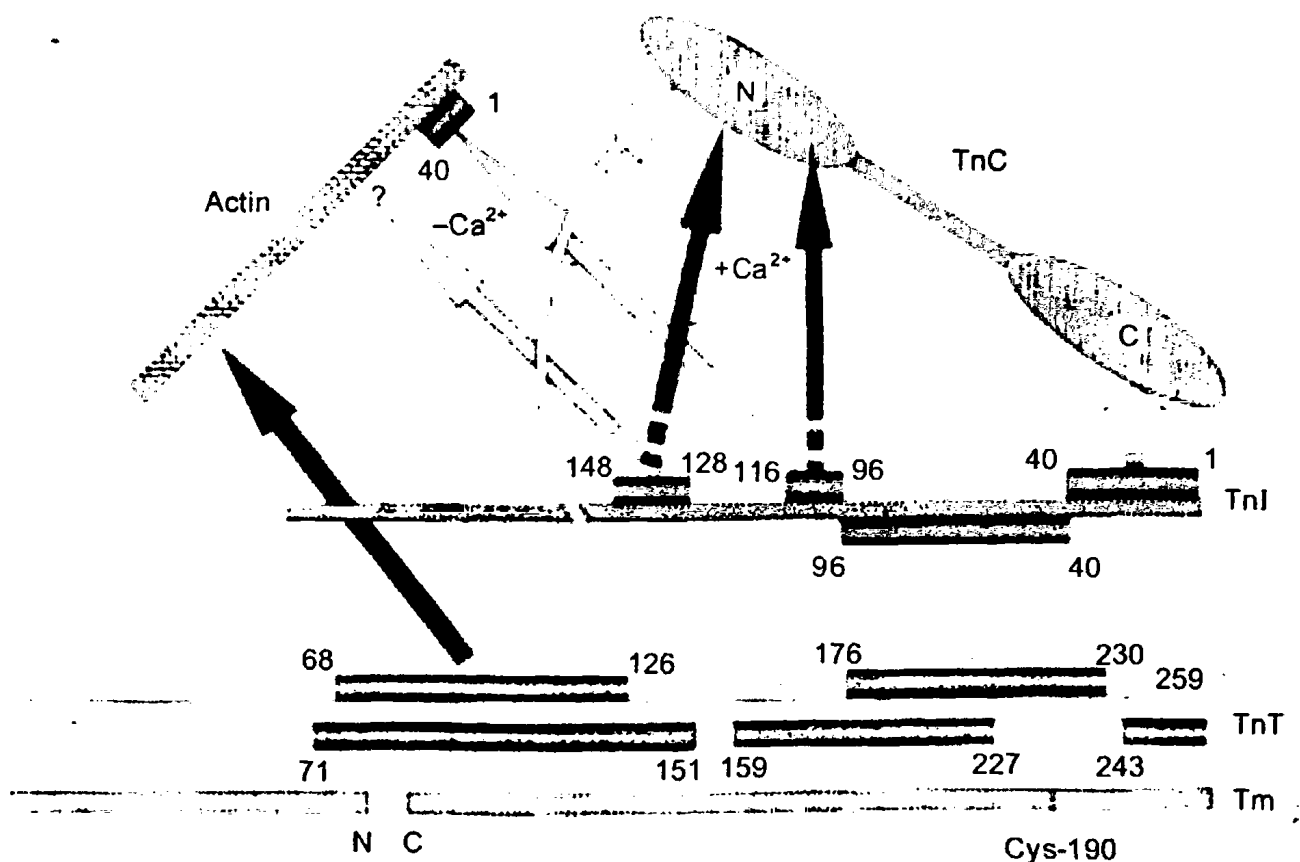
Σχήμα 3.1.1 Το σύμπλοκο της τροπονίνης ως αναπόσπαστο τμήμα των λεπτών νημάτων των μυϊκών ιστών.

Πιο συγκεκριμένα, η έναρξη της μυϊκής σύσπασης λαμβάνει χώρα με την είσοδο των ιόντων Ca^{2+} στο κύτταρο και τη δέσμευσή τους από το ισομερές C. Το ισομερές I αποσυνδέεται και αναστέλλοντας την παρεμποδιστική του δράση στην αντίδραση ακτίνης-μυοσίνης. Το ισομερές T ρυθμίζει τη λειτουργία του όλου συστήματος μέσω της ρυθμιστικής πρωτεΐνης (Σχήμα 3.1.2).



3.1.1 Αλληλεπιδράσεις των τροπονινών

Έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές και εμπειριστατωμένες μελέτες επί των μηχανισμών λειτουργίας αλλά και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών αυτών μορίων. Μια από τις πιο ολοκληρωμένες ερευνητικές εργασίες δημοσιεύτηκε το 1999 στο *Biochemistry (Moscow)* από μια ομάδα Ρώσων επιστημόνων, οι οποίοι συγκέντρωσαν σε μια πλήρη ανασκόπηση τα δομικά χαρακτηριστικά, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τους μηχανισμούς λειτουργίας στα λεπτά νημάτια των μυϊκών ιστών [4]. Κύριος στόχος της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας ήταν η σύνοψη όλων των μέχρι τότε δημοσιευμένων πειραματικών δεδομένων για το σύμπλοκο της τροπονίνης. Τα δεδομένα αυτά κρίνονται ιδιαίτερα χρήσιμα όχι μόνο από θεωρητικής σκοπιάς, αλλά και από το γεγονός ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν κάλλιστα από τους ερευνητές σε πρακτική εφαρμογή. Στο σχήμα 3.1.1.1 παρουσιάζεται μια απεικόνιση (από την συγκεκριμένη ερευνητική εργασία) όλων των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τροπονινών και των άλλων πρωτεϊνικών μορίων, έτσι όπως προέκυψαν από φασματοσκοπικές μελέτες NMR και κρυσταλλογραφικά δεδομένα.



Σχήμα 3.1.1.1 Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στα λεπτά νημάτια των μυϊκών ιστών. TnI, TnT, TnC: (τροπονίνη I, C και T, αντίστοιχα), Tm: (τροπομουσίνη)



Αναλυτικότερα, η τροπονίνη Ι εμπλέκεται με τις παρακάτω αμινοξικές της αλληλουχίες στις εξής αλληλεπιδράσεις:

1. **Αμινοξική αλληλουχία (1-40):** Εμπλέκεται σε αλληλεπίδραση με το C-τελικό άκρο της τροπονίνης C [11].
2. **Αμινοξική αλληλουχία (40-96):** Εμπλέκεται σε αλληλεπίδραση με το C-τελικό άκρο της τροπονίνης T. Η σύμπλεξη μεταξύ τροπονίνης Ι και T εξαρτάται άμεσα από την αναγωγή των κυστεϊνών στις θέσεις 48 και 64 στο μόριο της τροπονίνης Ι [12].
3. **Αμινοξική αλληλουχία (96-116):** Πρόκειται για τη βασική λειτουργική μονάδα της τροπονίνης Ι, τμήμα το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για τη αναστολή της δραστηριότητας της ΑΤΡασης της ακτινομοοσίνης [13]. Επιπλέον αλληλεπιδρά τόσο με την ακτίνη όσο και με το N-τελικό άκρο της τροπονίνης C, παρουσία Ca^{2+} [14].
4. **Αμινοξική αλληλουχία (128-148):** Εμπλέκεται στην αναστολή της δραστηριότητας της ΑΤΡασης της ακτινομοοσίνης. Παράλληλα, αλληλεπιδρά με το N-τελικό άκρο της τροπονίνης C, παρουσία Ca^{2+} [11].

Αντίστοιχα για τις αλληλεπιδράσεις της τροπονίνης T:

1. **Αμινοξική αλληλουχία (68-126):** Αλληλεπιδρά με την ακτίνη [15].
2. **Αμινοξικές αλληλουχίες (71-151, 159-227 και 243-259):** Εμπλέκονται σε αλληλεπίδραση με την τροπομοοσίνη [8,16-18].
3. **Αμινοξική αλληλουχία (176-230):** Αλληλεπιδρά με το κεντρικό τμήμα της τροπονίνης Ι και το N-τελικό άκρο της τροπονίνης C [16,19]. Σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των τροπονινών T και C, δυστυχώς δεν υπάρχει βιβλιογραφική ομοφωνία.

Τέλος η τροπονίνη C αλληλεπιδρά στο σύμπλοκο της τροπονίνης με την Ι, με την ισχύ αυτής της αλληλεπίδρασης να αυξάνεται αισθητά παρουσία Ca^{2+} . Είναι γεγονός ότι η αλληλεπίδραση της τροπονίνης C με την T έχει διερευνηθεί σε πολύ μικρότερο βαθμό, εντούτοις είναι γνωστό ότι τα δύο αυτά πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, με το αμινο-τελικό τμήμα της τροπονίνης C να παίζει καθοριστικό ρόλο στην παραπάνω αλληλεπίδραση. Πιο συγκεκριμένα:

1. **N-τελική περιοχή:** Αλληλεπιδρά με την τροπονίνη T. Μελέτες έχουν επισημάνει τη σπουδαιότητα των όξινων καταλοίπων της τροπονίνης C (Glu-53, Glu-54 και Glu-85, Glu-86) στην αλληλεπίδρασή της με την T. Η εν λόγω αλληλεπίδραση φαίνεται να ενισχύεται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου [7,20].
2. **Αμινοξική αλληλουχία (81-161):** Εμπλέκεται σε αλληλεπίδραση με περιοχές της τροπονίνης Ι [21,22].

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών του συμπλόκου της τροπονίνης, έχει εξηγηθεί ότι το δυαδικό σύμπλοκο της τροπονίνης Ι με την C (I-C) παρουσιάζει την ισχυρότερη δυνατή αλληλεπίδραση, η οποία και ενισχύεται πολύ περισσότερο από την παρουσία Ca^{2+}



[11,14,21,23]. Η τροπονίνη C υπό τη μορφή του δυαδικού συμπλόκου με την I, αλλάζει την διαμόρφωση της τελευταίας και την σταθεροποιεί (η τροπονίνη I στην ελεύθερη μορφή της είναι εξαιρετικά ασταθής), προστατεύοντάς την παράλληλα από την δράση των πρωτεασών.

Το παραπάνω σχηματικό μοντέλο αλληλεπιδράσεων συνοψίζει τις πρώτες θεωρητικές και πειραματικές μελέτες για το σύμπλοκο της τροπονίνης των σκελετικών μυϊκών ιστών. Το γεγονός όμως ότι οι πρωτοταγείς δομές των σκελετικών τροπονινών διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τις αντίστοιχες των καρδιακών, όπως περιγράφεται και στη συνέχεια, έχει ως αποτέλεσμα πολλές από τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις να μην υφίστανται στο αντίστοιχο σύμπλοκο της τροπονίνης του μυοκαρδίου. Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος των σκελετικών και καρδιακών τροπονινών στις διάφορες βιολογικές λειτουργίες είναι ουσιαστικά ο ίδιος, είναι αρκετά δύσκολο να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα επί των αλληλεπιδράσεων των καρδιακών τροπονινών, αναγόντας απλώς τις σκελετικές αμινοξικές αλληλουχίες στις αντίστοιχες καρδιακές.

Μια πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία στο *Nature* το 2003 περιγράφει την κρυσταλλική δομή ολόκληρου σχεδόν του συμπλόκου της καρδιακής τροπονίνης, έρευνα η οποία τελεσφόρησε έπειτα από προσπάθειες 10 ετών [24]. Η συμβολή της στην καλύτερη κατανόηση επί των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στο σύμπλοκο της τροπονίνης των καρδιακών μυϊκών ιστών καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική. Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα της ερευνητικής αυτής εργασίας σε συνδυασμό με μια σειρά από άλλα δημοσιευμένα πειραματικά δεδομένα, αναφορικά με τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρδιακών τροπονινών και των άλλων πρωτεϊνικών μορίων. Σε πολλές περιπτώσεις παραπέμπουμε στην αρίθμηση των ομόλογων αλληλουχιών των καρδιακών τροπονινών, παρά το γεγονός ότι βιβλιογραφικά καθορίζονται διαφορετικά.

Πιο συγκεκριμένα, το κοινώς αποδεκτό μοντέλο αλληλεπίδρασης των τροπονινών I και C περιλαμβάνει την αντιπαράλληλη διευθέτηση των εν λόγω πολυπεπτιδικών αλυσίδων, με τον σχηματισμό και την καταστροφή των μεταξύ τους συνδέσμων να χαρακτηρίζεται από μια δυναμική ισορροπία, αποκλειστικά εξαρτώμενη από την παρουσία Ca^{2+} [25-27].

Αναλυτικότερα, η καρδιακή τροπονίνη I εμπλέκεται με τις παρακάτω αμινοξικές της αλληλουχίες στις εξής αλληλεπιδράσεις:

1. **Αμινοξικές αλληλουχίες (19-32, 45-54, 129-138, 145-164, 161-178 και 191-210):** Περιοχές με πολύ υψηλή συγγένεια για την τροπονίνη C, έτσι όπως προέκυψαν μετά από συστηματική χαρτογράφηση της καρδιακής τροπονίνης I [28].
2. **Αμινοξική αλληλουχία (1-64):** Αλληλεπιδρά ισχυρά με το C-τελικό άκρο της τροπονίνης C και ασθενώς με το N-τελικό της άκρο. [25,29].
3. **Αμινοξική αλληλουχία (38-63):** Αλληλεπιδρά ισχυρά με το C-τελικό άκρο της τροπονίνης C [22,25].
4. **Αμινοξική αλληλουχία (33-80):** NMR μελέτες ανέδειξαν την ισχυρή της αλληλεπίδραση με το C-τελικό άκρο της τροπονίνης C. [30,31].



5. **Αμινοξική αλληλουχία (90-130):** Αλληλεπιδρά με την τροπονίνη T [25,32,33].
6. **Αμινοξική αλληλουχία (129-138):** Αλληλεπιδρά εναλλάξ είτε με την τροπονίνη C είτε με την ακτίνη [13,25,28,34].
7. **Αμινοξική αλληλουχία (128-148):** Αλληλεπιδρά με την ακτίνη, ενώ παρουσία Ca^{2+} αλληλεπιδρά με την τροπονίνη C [35].
8. **Αμινοξική αλληλουχία (147-163):** NMR μελέτες ανέδειξαν την ισχυρή της αλληλεπίδραση με την N-τελική περιοχή της τροπονίνης C. [36].
9. **Αμινοξική αλληλουχία (152-199):** Αλληλεπιδρά με την N-τελική περιοχή της τροπονίνης C [37].
10. **C-τελική περιοχή:** Αλληλεπιδρά τόσο με την ακτίνη όσο και με το N-τελικό άκρο της τροπονίνης C [25,36,37,38].

Αν και μέχρι στιγμής δεν έχουν καταγραφεί σημαντικά δεδομένα από X-Ray και NMR φασμασκοπικές μελέτες, φαίνεται να υπάρχει να αρκετά ισχυρή συγγένεια μεταξύ της τροπονίνης T και C [39]. Παράλληλα, αποτυπώνεται έντονα βιβλιογραφικά η ισχυρή αλληλεπίδραση της τροπονίνης T τόσο με το μόριο της ακτίνης όσο και της τροπομυοσίνης [40].

Επιπλέον, η καρδιακή τροπονίνη T εμπλέκεται με τις παρακάτω αμινοξικές της αλληλουχίες στις εξής αλληλεπιδράσεις:

1. **Αμινοξική αλληλουχία (107-165):** Αλληλεπιδρά με την ακτίνη [15].
2. **Αμινοξική αλληλουχία (183-288):** Έχει κρυσταλλωθεί στα τριαδικά σύμπλοκα TnC(1-161)-TnI(31-163)-TnT(183-288) και TnC(1-161)-TnI(31-210)-TnT(183-288) [24].
3. **Αμινοξική αλληλουχία (183-288):** Αλληλεπιδρά με την τροπομυοσίνη [24].

Τέλος, αντίστοιχα για την τροπονίνη C:

1. **Αμινοξική αλληλουχία (1-41):** Φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες [41].
2. **Αμινοξική αλληλουχία (81-161):** Αλληλεπιδρά με το N-τελικό άκρο της τροπονίνης I [31].

Γενικότερα πάντως, η αλληλεπίδραση των τροπονινών I και C πραγματοποιείται μέσω πολλαπλών δεσμών, καλύπτοντας με τον τρόπο αυτό το μεγαλύτερο μέρος των επιφανειών τους [30].

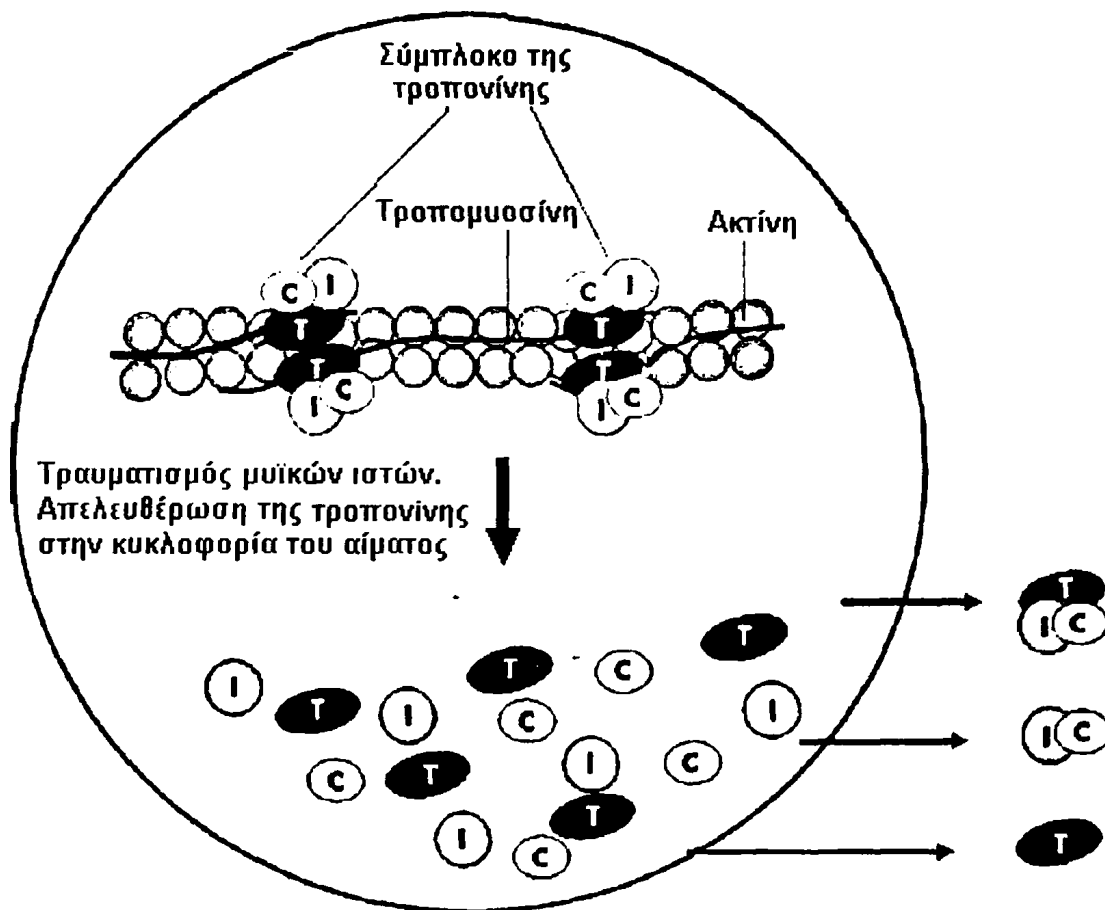
3.1.2 Ιδιότητες των τροπονινών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το σύμπλοκο της τροπονίνης αποτελεί βασικό δομικό συστατικό τόσο των σκελετικών όσο και καρδιακών μυϊκών ιστών. Οι τροπονίνες παρουσιάζονται στους καρδιακούς και σκελετικούς μύες σε διαφορετικές ισομορφές, οι οποίες και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Έτσι, για τις τροπονίνες I και T αντίστοιχα υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές, εκ των οποίων οι δύο εκφράζονται στους σκελετικούς μύες, γρήγορης και αργής μυϊκής σύσπασης (fast skeletal muscle Troponin-**fsTn**, slow skeletal muscle Troponin-**ssTn**) και μία μόνο στο μυοκάρδιο (cardiac muscle Troponin-**cTn**) [6,42-44]. Αντίθετα, για την τροπονίνη C δεν υπάρχει



ειδική καρδιακή ισομορφή. Υπάρχουν τρεις σχηματισμοί, εκ των οποίων ο πρώτος είναι αμιγώς μυοσκελετικός (skeletal muscle Troponin C-sTnC), ενώ οι άλλοι δύο (οι οποίοι είναι και 100% ομόλογοι) απαντώνται εξίσου στους δύο τύπους μυϊκών ιστών (skeletal and cardiac muscle Troponin C-cTnC) [45,46].

Παρά το γεγονός ότι οι ισομορφές των τροπονινών κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, παρουσιάζουν μεταξύ τους πολύ υψηλή ομολογία η οποία αγγίζει και το 70%. Παράλληλα έχουν την ιδιότητα να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, κατά τη διάρκεια ενός σκελετικού ή καρδιακού μυϊκού τραυματισμού (Σχήμα 3.1.2.1).



Σχήμα 3.1.2.1 Σχηματική περιγραφή της διαδικασίας απελευθέρωσης της τροπονίνης από τον τραυματισμένο μυϊκό ιστό.

Μελέτες έδειξαν ότι η τροπονίνη απελευθερώνεται στο αίμα των ασθενών με μυοκαρδιακό ή μυοσκελετικό τραυματισμό, κυρίως υπό τη μορφή του δυαδικού συμπλόκου (TnI-TnC) σε ένα ποσοστό που αγγίζει το 90%, πολύ λιγότερο με τη μορφή του τριαδικού (TnI-TnT-TnC), ενώ ανιχνεύονται και αμελητέες ποσότητες των ελεύθερων συστατικών της [47-49]. Στον πίνακα 3.1.2.1 παρουσιάζονται αναλυτικά όλοι οι ανιχνεύσιμοι σχηματισμοί της τροπονίνης. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια ενός μυϊκού τραυματισμού, η τροπονίνη I είναι επιρρεπέστατη σε αποικοδόμηση από τη



δράση των πρωτεασών [50]. Φαίνεται ότι το N- και C-τελικό της άκρο αποκόπτονται από την αμινοξική της αλληλουχία, με το κεντρικό της τμήμα 30-110 να θεωρείται ως το πιο σταθερό, κυρίως λόγω της προστασίας που παρέχεται από την τροπονίνη C [51,52].

Πίνακας 3.1.2.1 Ανιχνεύσιμες μορφές των τροπονινών μετά από την απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία του αίματος.

| | Μορφές Τροπονίνης | Τροπονίνη I | Τροπονίνη T |
|----------|-------------------------------------|--|--|
| 1 | Ελεύθερη πρωτεΐνη | Χαμηλό ποσοστό | Επικρατούσα μορφή |
| 2 | Διαδικό σύμπλοκο | Επικρατούσα μορφή. Υψηλή συγγένεια με την καρδιακή τροπονίνη C | Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα. Χαμηλή συγγένεια με την καρδιακή τροπονίνη C |
| 3 | Τριαδικό σύμπλοκο | Χαμηλό ποσοστό | Χαμηλό ποσοστό |
| 4 | Ανηγγμένη ή οξειδωμένη μορφή | Έχουν ανιχνευτεί και οι δύο μορφές. Η αμινοξική αλληλουχία της σκελετικής τροπονίνης περιέχει 2 κυστεΐνες στις θέσεις 48 και 64 | Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα |
| 5 | Φωσφορυλιωμένη μορφή | Έχουν ανιχνευτεί τρεις μορφές. Η μόνο-, η δι- και η μη φωσφορυλιωμένη μορφή. Η αμινοξική αλληλουχία περιέχει 2 σερίνες στις θέσεις 23 και 24 | Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα |
| 6 | Σταθερότητα | Η ελεύθερη μορφή της είναι επιρρεπής σε πρωτεόλυση | Η ελεύθερη μορφή της είναι πολύ σταθερή |

3.2 Δοκιμασία της τροπονίνης. Διαγνωστική και προγνωστική σπουδαιότητα

Στα τέλη της δεκαετίας του 80' οι τροπονίνες I και T προτάθηκαν ως δείκτες νέκρωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων, ενώ σήμερα χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην διάγνωση οξέων μυοκαρδιακών εμφραγμάτων [53,54], μετεγχειρητικών τραυμάτων του μυοκαρδίου, καθώς και σε άλλες ασθένειες σχετικές με τραυματισμούς καρδιακών μυϊκών ιστών. Οι τροπονίνες ανιχνεύονται

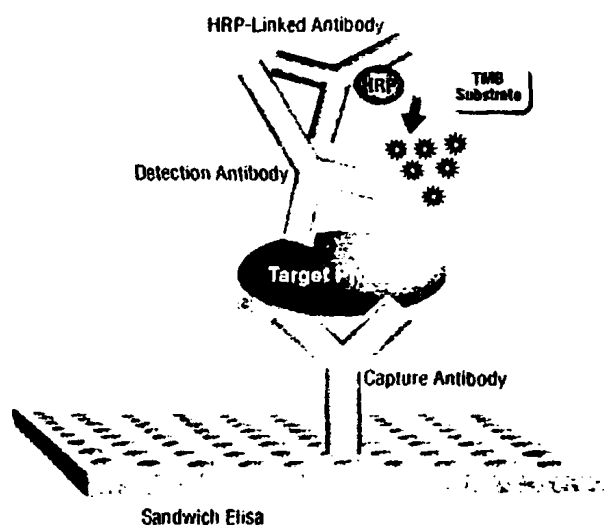


στο αίμα των ασθενών με ένα απλό διαγνωστικό τεστ και σε χρόνο που δεν ξεπερνά τις 4-6 ώρες από το καρδιακό επεισόδιο. Το γεγονός όμως ότι η απελευθέρωση τους από τον νεκρωμένο μυοκάρδιο μπορεί να διαρκέσει και περισσότερο από 10-14 ημέρες, τις καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα διαγνωστικά και προγνωστικά εργαλεία [55-57].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι τροπονίνες έχουν ισομορφές που βρίσκονται αποκλειστικά στα μυοκαρδιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ειδικοί καρδιακοί δείκτες. Από τις καρδιακές ισομορφές των τροπονινών, η τροπονίνη I πλεονεκτεί σημαντικά ως προς την ειδικότητά της σε σύγκριση με την T, ενώ η τροπονίνη C είναι η μοναδική που δεν χρησιμοποιείται ως καρδιακός δείκτης λόγω έλλειψης ειδικής καρδιακής ισομορφής.

Η διαγνωστική ευαισθησία της τροπονίνης οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία της (σε ένα μικρό βέβαια ποσοστό, της τάξης του 3-7%) στο κυτταρόπλασμα [58]. Τα ποσά αυτά απελευθερώνονται ταχύτατα στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια ενός μυοσκελετικού ή μυοκαρδιακού τραυματισμού. Βέβαια για να υπάρξει μια ικανοποιητική ευαισθησία στη διάγνωση της μυοκαρδιακής βλάβης, απαιτούνται τουλάχιστον 4-6 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Το γεγονός αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο μέγεθος του μορίου της τροπονίνης, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η απαγωγή του από τη συσταλτική μηχανή.

Η ανάπτυξη βιολογικών δοκιμασιών ανίχνευσης των καρδιακών τροπονινών στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με υποψία καρδιαγγειακής νόσου, στηρίζεται στη χρήση εξειδικευμένων αντισωμάτων ("σύλληψης" και "ανίχνευσης"), έναντι των αντιγονικών τους περιοχών ή και ολόκληρης της πρωτεΐνης [59-63]. Τα αντισώματα τα οποία προκύπτουν μετά από ανοσοποιήσεις πειραματόζων, χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια ανίχνευσης κατά ζεύγη σε μια ανοσοενζυμική δοκιμή E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) τύπου "sandwich" (Σχήμα 3.2.1).



Σχήμα 3.2.1 Σχηματική απεικόνιση της γενικής μεθοδολογίας των δοκιμασιών ανίχνευσης καρδιακών τροπονινών.



Θα πρέπει σε αυτό το σημείο να τονιστεί ότι η αλλαγή της διαμόρφωσης της τροπονίνης I κατά την σύμπλεξή της με την C, έχει ως αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των ανοσολογικών της ιδιοτήτων σε σχέση με αυτές της ελεύθερης πρωτεΐνης. Αυτό έχει ως συνέπεια ένας μεγάλος αριθμός μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ελεύθερης τροπονίνης I, να μην αλληλεπιδρά με την ίδια όταν αυτή είναι συμπλεγμένη στο δυαδικό (TnI-TnC) ή ακόμα και στο τριαδικό σύμπλοκο (TnI-TnT-TnC) [64].

Ανεξάρτητα από τα παραπάνω, το τεστ της τροπονίνης λόγω της πολύ υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης που παρουσιάζει, θεωρείται σήμερα ως το πιο αξιόπιστο τεστ για τη διάγνωση, τόσο των οξέων μυοκαρδιακών εμφραγμάτων [65-74], όσο και άλλων ασθενειών οι οποίες όμως πιθανότατα υποκρύπτουν νέκρωση μυϊκών ιστών [75-77]. Ακόμη και μια μικρή άνοδος των τιμών της τροπονίνης I και T σε δείγματα αίματος ασθενών, σηματοδοτεί ανεπιφύλακτα σοβαρότατη μυοκαρδιακή βλάβη. Μελέτες απέδειξαν ότι η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνει κατά 10%-45% όταν η μέτρηση λαμβάνει χώρα μέσα στην πρώτη ώρα από την έναρξη των συμπτωμάτων και ξεπερνάει το 90% όταν αυτή πραγματοποιείται 8 ή και περισσότερες ώρες μετά από το συμβάν [78]. Αντίστοιχα, η εξειδίκευση της μεθόδου όσον αφορά την τροπονίνη T, μειώνεται σταδιακά από το 87% στο 80% στις πρώτες 12 ώρες μετά το επεισόδιο, ενώ για την τροπονίνη I διατηρείται περίπου στο 95% [78]. Αν και ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται οι φυσιολογικές τιμές ποικίλλουν, το σύνηθες όριο για τον χαρακτηρισμό μυοκαρδιακής βλάβης είναι το 0,1 ng/ml, ενώ για τον χαρακτηρισμό μυοκαρδιακού εμφράγματος τα 1,5 ng/ml.

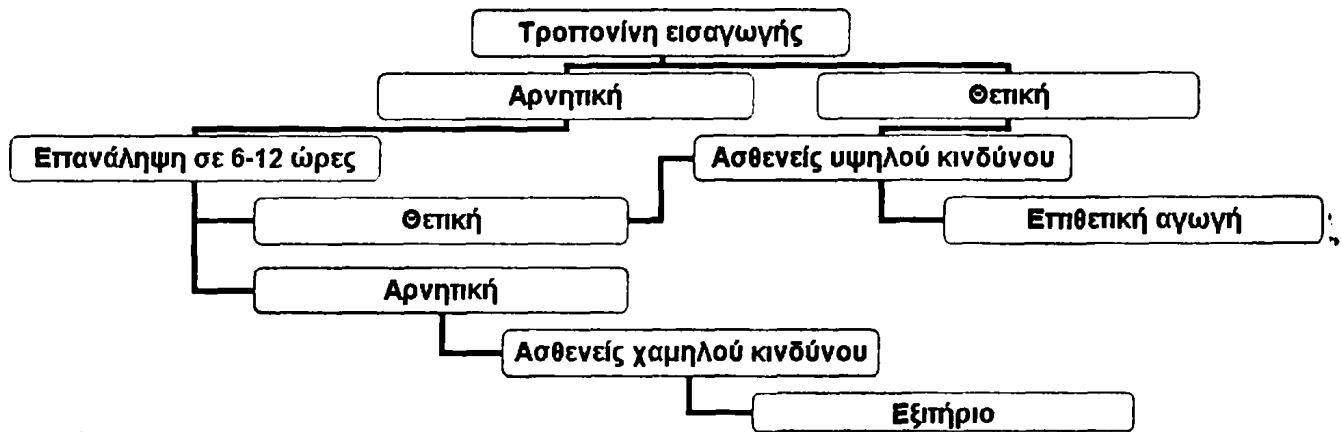
Πέρα όμως από τη διαγνωστική του σπουδαιότητα, το τεστ της τροπονίνης μπορεί να δώσει και σημαντικότερες προγνωστικές πληροφορίες [79-85]. Παλαιότερες έρευνες απέδειξαν ότι ασθενείς με ασταθή στηθάγχη και τροπονίνη θετική, παρουσίασαν 5-10 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας (από τους ασθενείς με φυσιολογική τροπονίνη), σε μόλις 30 ημέρες από την εμφάνιση των συμπτωμάτων [86-87]. Παράλληλα, μελέτη Αμερικανών γιατρών με επικεφαλής τον F.S Apple, ανέδειξε την ικανότητα των τροπονινών I και T στην πρόβλεψη θανάτου σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Σύμφωνα με την εν λόγω έρευνα, ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και θετική τροπονίνη, παρουσίασαν μέχρι και 5 φορές μεγαλύτερο τον κίνδυνο θανάτου, συγκριτικά με εκείνους των οποίων η τροπονίνη ήταν αρνητική [88].

Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα Σουηδών επιστημόνων η οποία δημοσιεύτηκε στο *American Journal of Cardiology* το Σεπτέμβριο του 2007, αναδεικνύει τον κίνδυνο εμφάνισης οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου ή και θνησιμότητας σε ένα follow-up 40 μηνών, σε ασθενείς με υποψία ισχαιμίας και επίπεδα τροπονίνης I κυμαινόμενα [89]. Τα ποσοστά θνησιμότητας βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα (5.9%) σε ασθενείς με τροπονίνη γύρω στα 0.02 μg/L, σε σύγκριση με τους ασθενείς των οποίων η τροπονίνη μετρήθηκε στα 0.02-0.10 μg/L (23.2%), 0.11-0.40 μg/L (25.4%), και πάνω από 0.40 μg/L (27.2%), αντίστοιχα. Στους ήδη εμφραγματίες τα ποσοστά θανάτων διαμορφώθηκαν στο 28% και 24.2%, για επίπεδα τροπονίνης 0.11-0.40 μg/L και πάνω από 0.40



μg/L, αντίστοιχα. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι ακόμη και όταν η τροπονίνη των ασθενών είναι μικρότερη από το ορισθέν cut-off, η πιθανότητα θανάτων είναι σημαντικά μικρότερη αλλά όχι αμελητέα.

Κατά γενική πάντως ομολογία όταν η τροπονίνη μετρηθεί θετική, ο ασθενής κατατάσσεται αυτομάτως στην ομάδα υψηλού κινδύνου. Στην αντίθετη περίπτωση, η μέτρηση επαναλαμβάνεται 6-12 ώρες αργότερα και εφόσον παραμείνει αρνητική, ο ασθενής χαρακτηρίζεται ως χαμηλού κινδύνου και μπορεί να του δοθεί εξιτήριο (Σχήμα 3.2.2).



Σχήμα 3.2.2 Μοντέλο κατάταξης ασθενών με βάση την μετρήσιμη τροπονίνη εισαγωγής

Κλείνοντας θα πρέπει να επισημανθεί ότι, αν και η μέτρηση της τροπονίνης αποτελεί μια πολύ ειδική, γρήγορη και αρκετά ευαίσθητη εξέταση, πολλές φορές καθίσταται αναξιόπιστη από μια πληθώρα παρεμβατικών παραγόντων που επηρεάζουν δραστικά την ορθή εργαστηριακή της ανίχνευση και οι οποίοι και αναλύονται στις επόμενες παραγράφους.

3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την δοκιμασία της τροπονίνης

Στην πράξη, κατά την διάρκεια των διαγνωστικών δοκιμασιών της τροπονίνης, μπορεί να παρατηρηθούν “ψευδώς θετικά” ή και “ψευδώς αρνητικά” αποτελέσματα [90-92]. Για παράδειγμα, η μέτρηση της τροπονίνης θεωρείται ως μη αξιόπιστη για τη διάγνωση ισχαιμικών συνδρόμων, ενώ παράλληλα παρουσιάζει περιορισμένη εξειδίκευση στη διάγνωση ενός πιθανού επανεμφράγματος, ειδικά τις πρώτες ημέρες μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Έχει επιπλέον δημιουργηθεί σύγχυση στην επιστημονική κοινότητα λόγω των διαφορετικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν κατά την μέτρηση της τροπονίνης (στα ίδια δείγματα αίματος) από μια πληθώρα διαγνωστικών δοκιμών. Ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος θα πρέπει να συνεκτιμηθεί και από τους κατασκευαστές, είναι η ομοφωνία τους στην επιλογή των επιτόπων από τους οποίους προκύπτουν τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη της δοκιμασίας



[63,91,93-95]. Η παραπάνω αναγκαιότητα γεννάται κυρίως από την περιπλεγμένη βιοχημική φύση του συμπλόκου της τροπονίνης. Παρακάτω, γίνεται μια εν συντομία ανάλυση των κυριότερων παραγόντων που παρεμβαίνουν, επηρεάζουν και αναστέλλουν την αναγνώριση της τροπονίνης κατά τη διάρκεια της διαγνωστικής δοκιμασίας.

3.3.1 Ψευδώς θετικά αποτελέσματα κατά την ανοσοενζυμική δοκιμασία της τροπονίνης

Αυξημένα επίπεδα καρδιακών τροπονινών είναι δυνατόν να παρατηρηθούν και σε μια σειρά από άλλες ασθένειες, με αποτέλεσμα να προκαλούνται ασάφειες που επηρεάζουν σημαντικά τη τελική διαμόρφωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς [75-77]. Στις παθολογικές αυτές καταστάσεις περιλαμβάνονται η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, οι μυοπάθειες με ακραία περίπτωση τη ραβδομύωση και οι διάφορες καρδιακές βλάβες όπως η μυοκαρδίτιδα, η περικαρδίτιδα, η καρδιακή ανεπάρκεια, η πνευμονική εμβολή, η καρδιοτοξικότητα από χημειοθεραπευτικά, κ.ο.κ. Πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη αποκαλύπτει στοιχεία που ενισχύουν την εν λόγω παραδοχή [96]. Βρέθηκε λοιπόν ότι περίπου το 65% των περιπτώσεων ασθενών με αυξημένα επίπεδα τροπονίνης και αρνητικά αγγειογραφικά δεδομένα, νόσησε από άλλου είδους ασθένειες που δεν είχαν καμία σχέση με εμφράγματα του μυοκαρδίου.

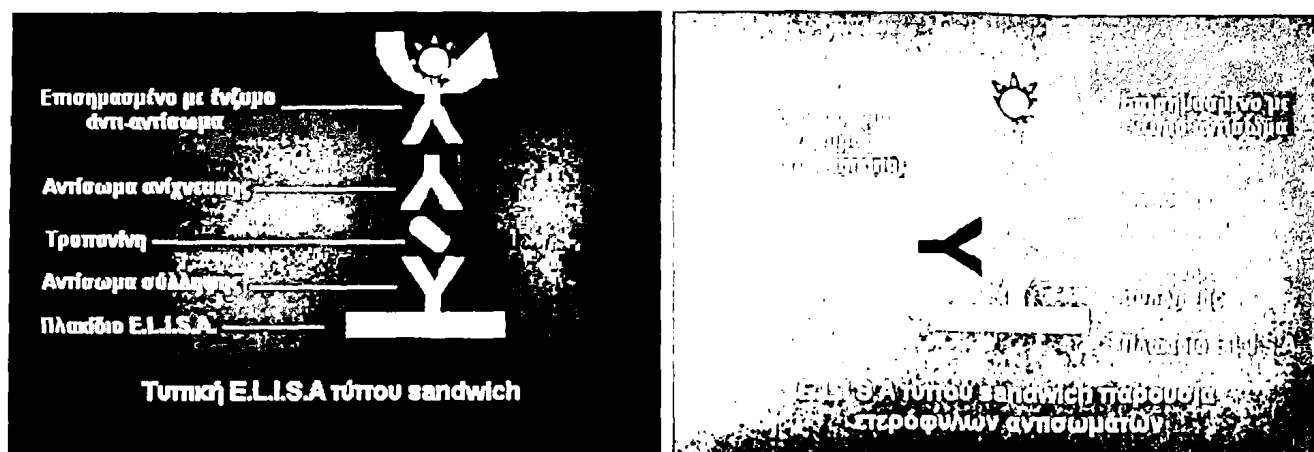
Ψευδώς θετικά αποτελέσματα κατά τη μέτρηση της τροπονίνης μπορούν να προκύψουν για παράδειγμα από ελλιπή κατεργασία του προς εξέταση ορού [97]. Ερευνητική μελέτη του 2005 δημοσιευμένη στο *International Journal of Cardiology*, επανέφερε το πρόβλημα των ψευδώς θετικών μετρήσεων της τροπονίνης, όπως αυτό προκύπτει από την ελλιπή φυγοκέντρηση των δειγμάτων αίματος. Επαναλαμβάνοντας τις μετρήσεις τους σε πλάσμα και όχι σε ορό αίματος, διαπίστωσαν μια κατακόρυφη αύξηση των τιμών της τροπονίνης. Το παραπάνω γεγονός ερμηνεύτηκε με την παραδοχή ότι το ινώδες στο πλάσμα του αίματος, πιθανότατα αλληλεπιδρά μη-ειδικά με το προσδεδεμένο στη στερεή επιφάνεια αντίσωμα "σύλληψης", δημιουργώντας στη συνέχεια μια "γέφυρα" με το αντίσωμα "ανίχνευσης" [98].

Αντίστοιχα ψευδώς θετικά αποτελέσματα προκύπτουν από το σχηματισμό ενός μακρομοριακού-συμπλέγματος μεταξύ της τροπονίνης και των κυκλοφορούντων στο αίμα IgG ανοσοσφαιρινών. Από δεδομένα πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης (immuno-blotting) το απομονωμένο σύμπλεγμα χαρακτηρίστηκε από ένα μοριακό βάρος της τάξης των ~500 kDa [99].

Τέλος, εξίσου σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η παρουσία ετερόφυλων αντισωμάτων ή αλλιώς *human anti-animal antibodies* στα δείγματα αίματος των ασθενών. Έχει υπολογιστεί ότι τέτοιου είδους αντισώματα ανιχνεύονται στο ~40% του γενικού πληθυσμού. Η αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου, η έκθεση σε άγνωστες πρωτεΐνες, οι κτηνοτροφικές εργασίες και η επαφή με κατοικίδια ζώα, είναι μόνο κάποιοι από τους παράγοντες εμφάνισής τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Υψηλές συγκεντρώσεις ετερόφυλων αντισωμάτων στα δείγματα αίματος των ασθενών, οδηγούν σε εσφαλμένα αποτελέσματα κατά τη μέτρηση της τροπονίνης, κυρίως λόγω της



δημιουργίας γεφυρών (cross-linking) μεταξύ το δύο αντισωμάτων σε μια τυπική E.L.I.S.A. τύπου sandwich [100,101] (Σχήμα 3.3.1.1).



Σχήμα 3.3.1.1 Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης των ετερόφυλων αντισωμάτων στην ανοσοενζυμική δοκιμασία της τροπονίνης.

Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με την περίπτωση του ρευματοειδούς παράγοντα (RF: Rheumatoid Factor). Πρόκειται για ένα είδος ετερόφυλου αντισώματος IgM ή IgA τάξης ανοσοσφαιρινών, τα επίπεδα του οποίου είναι ιδιαίτερα υψηλά σε ασθενείς που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα [102,103].

Θα ήταν παράληψη να μην αναφέρουμε το γεγονός, ότι οι περισσότερες σύγχρονες ανοσοενζυμικές τεχνικές χρησιμοποιούν αντιδραστήρια τα οποία έχουν την ικανότητα να μπλοκάρουν όλους τους προαναφερθέντες παρεμβατικούς παράγοντες, συμβάλλοντας τα μέγιστα στη λήψη σαφώς πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

3.3.2 Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα κατά την ανοσοενζυμική δοκιμασία της τροπονίνης

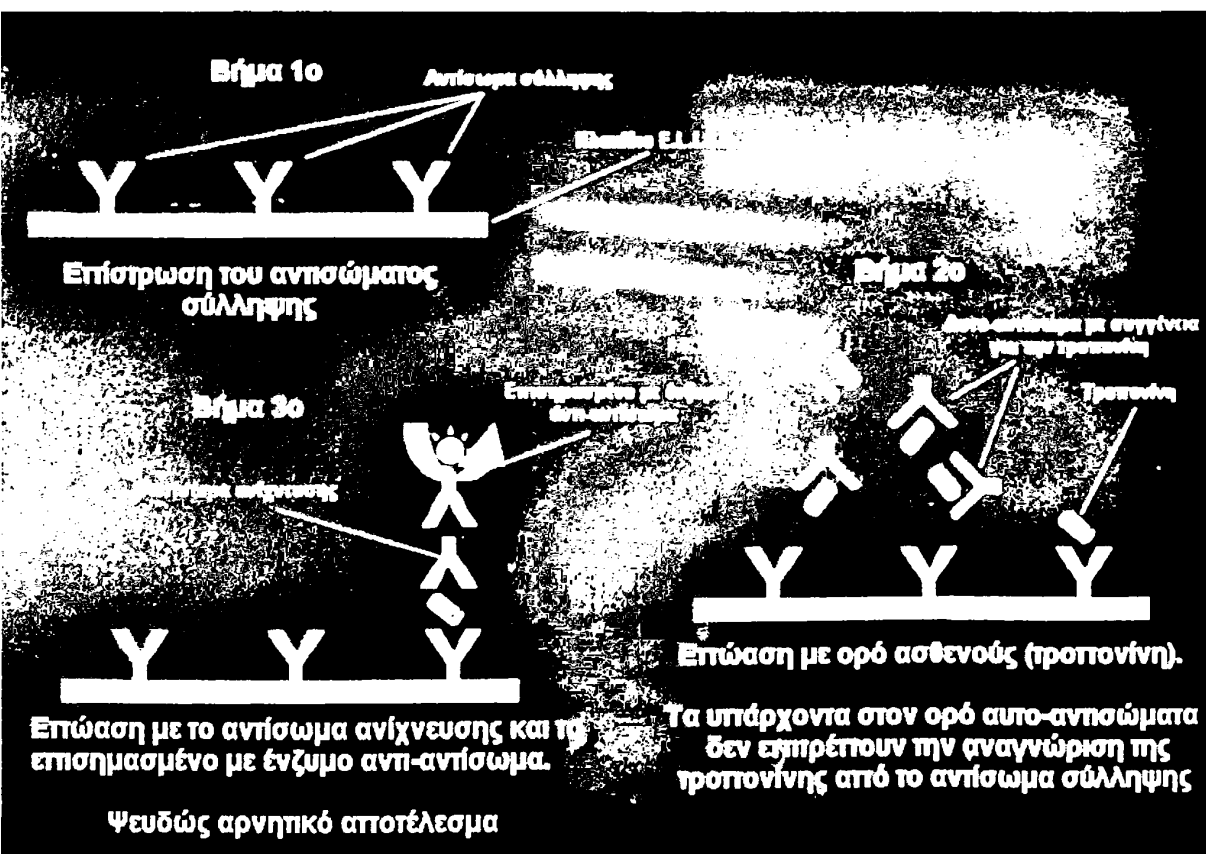
Το φαινόμενο των "ψευδώς αρνητικών" αποτελεσμάτων στις ανοσοενζυμικές δοκιμασίες της τροπονίνης ίσως να θεωρείται ο σημαντικότερος λόγος αναξιοπιστίας του τεστ. Και αυτό διότι οι πάσχοντες από στεφανιαίο σύνδρομο ασθενείς που εισέρχονται στα τμήματα των επειγόντων περιστατικών και των οποίων η τροπονίνη μετράται αρνητική, κατατάσσονται ψευδώς στην κατηγορία των ασθενών χαμηλού κινδύνου, όπως έχει ήδη περιγραφεί (Σχήμα 3.2.2).

Η έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα μέσα της περασμένης δεκαετίας από μια ομάδα Γερμανών επιστημόνων σε 32 ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (by-pass surgery) ανέδειξε το εξής εκπληκτικό [104]. Σε μία από τις 32 προς εξέταση περιπτώσεις δεν βρέθηκαν μετεγχειρητικά ανιχνεύσιμα επίπεδα τροπονίνης. Το προφανές "ψευδώς αρνητικό" αποτέλεσμα αποδόθηκε στην πιθανή ύπαρξη ενός παρεμβατικής φύσης παράγοντα στον ορό του εν λόγω ασθενή. Μετά από εργαστηριακές μελέτες κατέληξαν στο



τέραςμα ότι ο παρεμβατικός αυτός παράγοντας δεν ήταν τίποτα περισσότερο από ανθρώπινα -αντισώματα IgG τάξης ανοσοσφαιρινών (autoantibodies), τα οποία παρουσίαζαν υψηλή γένεια για την τροπονίνη, αποτρέποντας την αναγνώριση της από το αντίσωμα σύλληψης (μα 3.3.2.2.).

Σε συνέχεια της παραπάνω μελέτης η ερευνητική ομάδα της S. Eriksson, ανέλυσε σε βάθος τρεις εργασίες της στο *Clinical Biochemistry* (2004) [105] και στο *Clinical Chemistry* (2005) [107] αντίστοιχα, την φύση και την ανασταλτική επίδραση των αυτό-αντισωμάτων στην ενζυμική δοκιμασία της τροπονίνης. Χρησιμοποιώντας μια σειρά από ζεύγη αντισωμάτων τα οποία αναγνώριζαν διαφορετικές αμινοξικές αλληλουχίες της τροπονίνης I, συμπέρανε ότι η χρήση αντισωμάτων τα οποία παρουσίαζαν υψηλή συγγένεια προς το κεντρικό της τμήμα (30-110), είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη "ψευδώς αρνητικών" αποτελεσμάτων. Συνέκρινε τα ευρήματά της με άλλες πραγματοποιημένες δοκιμασίες, όπως και με την επανάληψη της διαδικασίας χρησιμοποιώντας την φορά αντισώματα που αναγνώριζαν τμήματα της τροπονίνης I εκτός του κεντρικού. Τα αποτελέσματα της δεύτερης δοκιμασίας ανταποκρινόταν πολύ περισσότερο στην πραγματικότητα, φυσική συνέπεια να αναθεωρηθεί σε ένα μεγάλο βαθμό η μέχρι στιγμής παραδοχή, της εβλημένης για ορθά αποτελέσματα χρήσης αντισωμάτων έναντι του κεντρικού σταθερότερου τμήματος της τροπονίνης I [51,94].



μα 3.3.2.2 Σχηματική περιγραφή της ανασταλτικής επίδρασης των αυτό-αντισωμάτων στην ενζυμική δοκιμασία της τροπονίνης.



ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ
ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΦΥΣΗΣ ΕΥΘΥΓΡΑΜΜΗΣ ΚΑΙ
ΔΙΑΚΛΑΔΙΣΜΕΝΗΣ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ.



4.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες, έτσι όπως η Ελληνική ρίζα της λέξης ορίζει, είναι τις πρώτες χημικές ενώσεις που έχουν ταξινομηθεί, διότι αποτελούν τις ενώσεις της ζωής. Η λέξη "πρωτεΐνη" χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως ορισμός το 1838 από τον Σουηδό χημικό J.J. Berzelius, θέλοντας να τονίσει τη σημασία αυτής της τάξης των μορίων. Τα πεπτιδία ως τα μικρότερα τμήματα των πρωτεϊνών, έχουν εδώ και χρόνια μελετηθεί ως προς τους εξαιρετικά σημαντικούς ρόλους που διαδραματίζουν, σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες. Η απαρχή πραγματοποιήθηκε στην αλλαγή του περασμένου αιώνα (1901), με την πρώτη καταγεγραμμένη σύνθεση πεπτιδίου από τον Γερμανό χημικό E. Fischer [1] (Σχήμα 4.1.1). Αργότερα το 1953, ο F. Sanger προσδιόρισε την αλληλουχία των αμινοξέων της ινσουλίνης, εργασία η οποία αποτέλεσε ορόσημο για τη Βιοχημεία. Απέδειξε για πρώτη φορά ότι μια πρωτεΐνη, συνίσταται από μια απολύτως καθορισμένη διαδοχή αμινοξέων [2].

Η ερμηνεία των πρωτεϊνικών λειτουργιών σήμερα ευνοείται όλο και περισσότερο από τον έλεγχο της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει όλο της το ενδιαφέρον στην κατασκευή πεπτιδικής φύσεως μοριακών αρχιτεκτονικών, με στόχο τη διασαφήνιση της διαμόρφωσης αλλά και της χημικής σταθερότητας ενός τεραστίου φάσματος πρωτεϊνών.



Σχήμα 4.1.1 Emil Hermann Fischer (1852-1919)

Η ανάπτυξη μεθοδολογιών σύνθεσης πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικής φύσης μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής με συγκεκριμένες λειτουργίες, αποτέλεσε ένα σημαντικό πεδίο μελέτης τα τελευταία 40 περίπου χρόνια. Η κατασκευή τέτοιου είδους μακρομορίων έχει γίνει πλέον ιδιαίτερα προσιτή, κυρίως λόγω των σημαντικών βελτιώσεων που έχουν επιτευχθεί στα πρωτόκολλα της πεπτιδικής σύνθεσης, καθώς και στην ανάπτυξη σύγχρονων και εξελιγμένων αντιδραστηρίων σύζευξης. Τα τελευταία μάλιστα έχουν συμβάλει τα μέγιστα στην ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων, ένα από τα καίρια προβλήματα κατά την επιμήκυνση των πεπτιδικών αλυσίδων.

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί μια ραγδαία χρήση των συνθετικών πεπτιδίων στην επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης. Παράλληλα, τα πεπτιδία ως μόρια τα οποία παρασκευάζονται σχετικά εύκολα και παραλαμβάνονται χημικώς καθαρά, μπορούν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν υπό ορισμένες συνθήκες σε ποικίλες εφαρμογές που



αφορούν την ανάπτυξη διαγνωστικών τεχνικών και εμβολίων [3,4]. Βέβαια τα γραμμικά πεπτιδικά μόρια κυρίως λόγω του μικρού τους μεγέθους, χαρακτηρίζονται από φτωχές ανοσογονικές ή αντιγονικές ιδιότητες [3,5]. Παρατηρείται συχνά σε πρωτεϊνικά τμήματα μικρού μήκους, να μην έχουν τις ιδιότητες εκείνες που θα επέτρεπαν την *in vitro* ή *in vivo* εκμετάλλευσή τους. Το παραπάνω γεγονός αποτελεί και μια από τις αιτίες στις οποίες οφείλεται ο μικρός αριθμός εμβολίων που έχουν παρασκευαστεί με τη χρήση των συνθετικών πεπτιδίων.

Η εισαγωγή των πρωτεϊνικών φορέων [6] συνέβαλλε σημαντικά στην ενίσχυση της σταθερότητάς των συνθετικών πεπτιδίων έναντι διαφόρων μηχανισμών αποικοδόμησης και παράλληλα στην αύξηση της αντιγονικότητας ή ανοσογονικότητάς τους. Παρά το γεγονός ότι η χρήση των πρωτεϊνικών φορέων αποτέλεσε μια ιδιαίτερα ελπιδοφόρα λύση για τον σχεδιασμό ισχυρών ανοσογόνων, η επιλογή τους στην πάροδο των χρόνων περιορίστηκε αισθητά εξαιτίας μιας σειράς παραγόντων όπως, η επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης έναντι του μορίου του φορέα, ο αδύνατος προσδιορισμός της δομής του πεπτιδίου κατά την πρόσδεση του στον πρωτεϊνικό φορέα, κ.ο.κ.

Τα παραπάνω προβλήματα ξεπεράστηκαν σε μεγάλο βαθμό με την καθιέρωση μιας νέας γενιάς συνθετικών πεπτιδικών φορέων [3,7-12]. Η πρόσδεση πολλαπλών επιτόπων σε συνθετικούς φορείς, οδήγησε στην κατασκευή πρωτεϊνικών μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής με μοριακά βάρη έως και 10.000 Dalton [3,13,14]. Τα μακρομόρια αυτά μπορούν να σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να κατέχουν συγκεκριμένες δομικές και λειτουργικές ιδιότητες, ενώ με τις παρούσες πλέον τεχνικές μπορούν να χαρακτηρίζονται και να ταυτοποιούνται σχετικά εύκολα.

Υπάρχουν τρεις γενικές συνθετικές προσεγγίσεις για την σύνθεση πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών μακρομορίων γραμμικής ή διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής:

- (1) **Solid Phase Peptide Synthesis (Βήμα προς βήμα σύνθεση στερεάς φάσης):** Σύνθεση μακρομορίων με σύζευξη των απαιτούμενων αμινοξέων σε μια συνεχή διαδικασία.
- (2) **Convergent Ligation:** Σύνθεση μακρομορίων με σύζευξη (σύγκλιση) πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων.
- (3) **Chemoselective Ligation (Μεθοδολογία χημιοεκλεκτικής πρόσδεσης):** Σύνθεση μακρομορίων με σύζευξη πλήρως αποπροστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων.

Οι μεθοδολογίες χημιοεκλεκτικής πρόσδεσης διαχωρίζονται σε:

- ⚡ Μεθόδους χημικής πρόσδεσης οι οποίες δημιουργούν μη φυσικούς δεσμούς μεταξύ των πεπτιδικών τμημάτων που συνδέονται, όπως π.χ. θειοεστερικός δεσμός, θειοαιθερικός δεσμός, δεσμός οξίμης, δεσμός θειαζολιδίνης, δεσμός οξαζολιδίνης, δεσμός υδραζόνης κ.ο.κ.
- ⚡ Μεθόδους χημικής πρόσδεσης στις οποίες σχηματίζεται αμιδικός δεσμός μεταξύ των πεπτιδικών τμημάτων που πρόκειται να συνδεθούν (*native chemical ligation*).

Στις παρακάτω παραγράφους γίνεται μια αναλυτική περιγραφή των εν λόγω συνθετικών προσεγγίσεων.



4.2 Βήμα προς βήμα πεπτιδική σύνθεση (Stepwise Peptide Synthesis)

Η σύνθεση μορίων πεπτιδικής φύσης αποτελεί αναμφίβολα μια ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία, η οποία προϋποθέτει την επαρκή γνώση μιας σειράς παραγόντων που επηρεάζουν σημαντικά την λήψη ενός καθαρού τελικού προϊόντος. Ο E. Fischer επιχειρώντας στις αρχές του περασμένου αιώνα τη σύνθεση ενός διπεπτιδίου, έθεσε τους εξής χημικούς περιορισμούς:

- ✓ Εισαγωγή προστατευτικών ομάδων στο καρβοξύλιο του ενός και στην αμινομάδα του άλλου αμινοξέος.
- ✓ Ενεργοποίηση του ελεύθερου καρβοξυλίου του N^ο-προστατευμένου αμινοξέος.
- ✓ Αντίδραση και δημιουργία αμιδικού δεσμού.
- ✓ Εκλεκτική απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων και λήψη του επιθυμητού διπεπτιδίου.

Δεν κατάφερε όμως ποτέ να αναπτύξει την κατάλληλη αντιστρεπτή αμινο-προστατευτική ομάδα, κάτι που επετεύχθη στη συνέχεια από τον μαθητή του Max Bergmann και τον Λεωνίδα Ζέρβα [15] (Σχήμα 4.2.1). Η εισαγωγή της καρβοβενζόξυ αμινο-προστατευτικής ομάδας (Z) το 1932 έθεσε τα θεμέλια της μετέπειτα ραγδαίας ανάπτυξης στον τομέα της Χημείας των πεπτιδίων. Η μεθοδολογία τους απέκτησε παγκόσμια εμβέλεια βάσει της ορθότητας και αποτελεσματικότητάς της, με αποκορύφωμα την πρώτη χημική σύνθεση της ορμόνης οξυτοκίνης από τον Du Vigneaud το 1953 [16], για την οποία βραβεύτηκε και με το Nobel Χημείας (1958). Οι συνθέσεις βέβαια των μορίων αυτών ελάμβαναν χώρα σε υγρή φάση, γεγονός που τις καθιστούσε επίπονες, χρονοβόρες και αρκετά δύσχρηστες.



Σχήμα 4.2.1 Ο Λεωνίδας Ζέρβας (1902-1980) και ο Max Bergmann (1886-1944)

Ο R. B. Merrifield (Σχήμα 4.2.2) το 1963 παρέκαμψε τα παραπάνω προβλήματα, εισάγοντας την πρωτοποριακή ομολογουμένως ιδέα της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση [17]. Αυτή περιελάμβανε την εξ'ολοκλήρου σύνθεση πεπτιδικών μορίων σε ένα αδιάλυτο πολυμερικό





υπόστρωμα, μεθοδολογία που εξακολουθεί να παραμένει μέχρι και σήμερα επαναστατική και πρωτοπόρα, συμβάλλοντας παράλληλα στην πλήρη αυτοματοποίηση των μεθόδων.

Σχήμα 4.2.2 Robert Bruce Merrifield (1921-2006)

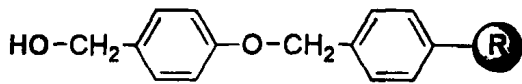
4.2.1 Βήμα προς βήμα σύνθεση γραμμικών πεπτιδικών μορίων

Κατά τη διαδικασία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση, το C-τελικό αμινοξύ του προς μελέτη πεπτιδίου προσδένεται ομοιοπολικά στο πολυμερικό υπόστρωμα, με την N^ο-αμινομάδα καθώς και τη δραστική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας του (εάν κριθεί αναγκαίο) ορθογωνικά προστατευμένες. Ακολουθεί εκλεκτική αποπροστασία της N^ο-αμινομάδας, ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του δεύτερου N^ο-προστατευμένου αμινοξέος και σύζευξη, με στόχο την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας. Με την ολοκλήρωση της σύνθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας αμινοξέων, το πεπτιδίο αποκόπτεται από το στερεό πολυμερές και λαμβάνεται σε μια ποικιλία χημικών μορφών στο C-τελικό του άκρο (-COOH, -CONH₂, -CH₂OH, -COSH, -COSR, -CONHNH₂, κ.ο.κ), γεγονός που εξαρτάται τόσο από τις πειραματικές συνθήκες όσο και από το υπόστρωμα που έχει χρησιμοποιηθεί [18-25] (Σχήμα 4.2.1.1).

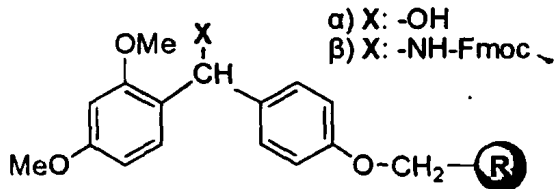
Η εισαγωγή των N^ο-προστατευτικών ομάδων, *tert*-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc) [26] και 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc) [27], καθώς και των ορθογωνικών προς αυτές προστασιών των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, οδήγησε στην ανάπτυξη δύο στρατηγικών πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση, της Boc/Bzl και της Fmoc/tBu, αντίστοιχα.

Στην Boc/Bzl μεθοδολογία η απομάκρυνση της N^ο-Boc προστατευτικής ομάδας πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση τριφθοροξικού οξέος (TFA) σε διχλωρομεθάνιο (DCM) και σε συγκέντρωση 30-40% v/v. Στη συνέχεια ακολουθεί εξουδετέρωση του σχηματισθέντος άλατος, με την προσθήκη διαλύματος διίσοπροπυλο-αιθυλαμίνης (DIEA) σε DCM και σε συγκέντρωση 7-10% v/v. Η σύζευξη του επόμενου N^ο-Boc προστατευμένου αμινοξέος γίνεται συνήθως με χρήση τριπλάσιας μοριακής περίσσειας.

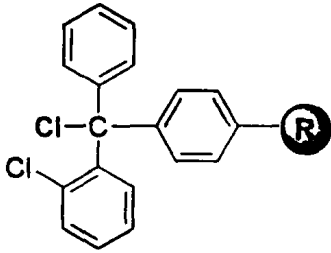




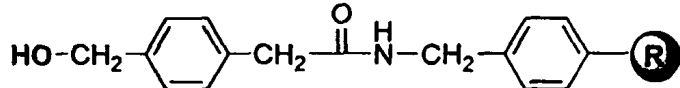
π-βενζυλόξυ-βενζυλική αλκοολική ρητίνη
(Ρητίνη Wang)



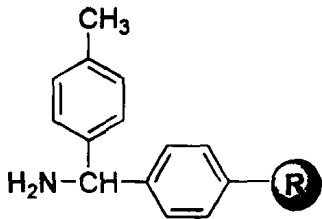
α) 4-(2', 4'-Διμεθοξυφαινυλο-υδροξυμεθυλο)-φαινοξυ ρητίνη
β) 4-(2', 4'-Διμεθοξυφαινυλο-Fmoc-αμινομεθυλο)-φαινοξυ- ρητίνη
(Ρητίνη Rink)



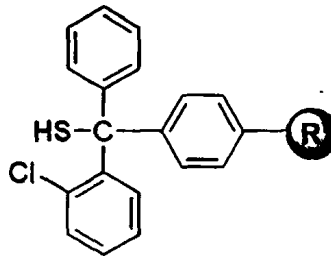
(2-χλωροτρίτυλο-χλωρίδιο Ρητίνη)



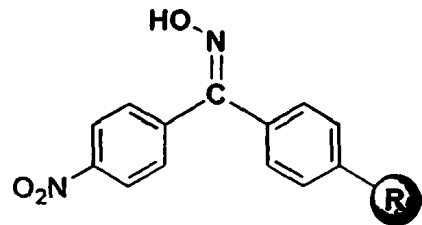
4-υδροξυμέθυλο-φαινυλακετάμιδο-μέθυλο-ρητίνη
(Ρητίνη PAM)



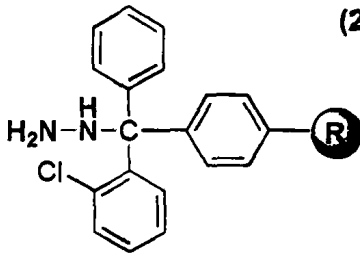
4-μέθυλο-βενζυδραλαμίνη ρητίνη
(Ρητίνη MBHA)



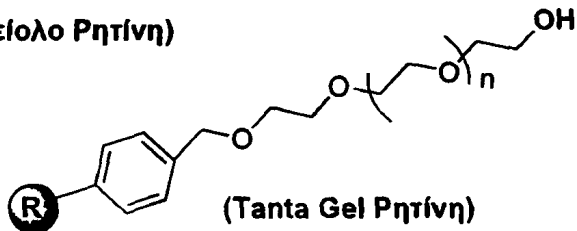
(2-χλωροτρίτυλο-θειολο Ρητίνη)



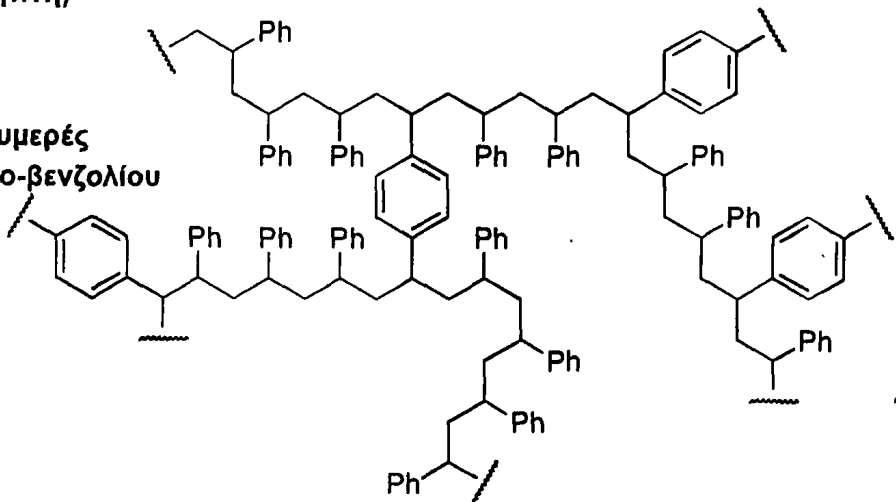
4-νίτρο-βενζυδροξίμη ρητίνη
(Ρητίνη Οξίμης)



(2-χλωροτρίτυλο-υδράζινο Ρητίνη)



R: Πολυστυρένιο ή συμπολυμερές
στυρενίου και πολυβίνυλο-βενζολίου

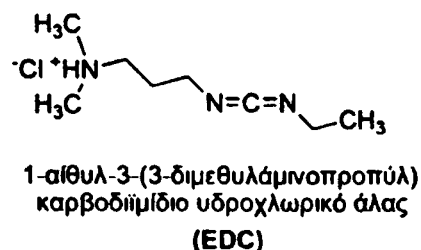
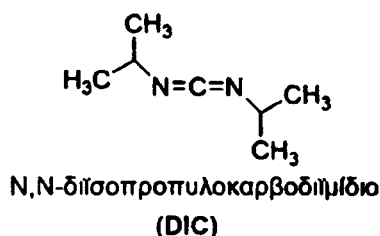
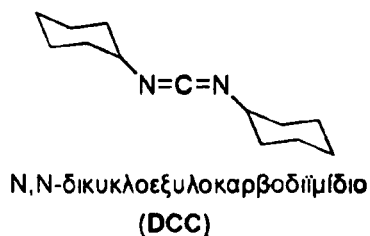


Σχήμα 4.2.1.1 Δομές των πολυμερικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρύτατα στην πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης, δίνοντας μια ποικιλομορφία χημικών μορφών στο C-τελικό άκρο του αποκόπτοντος πεπτιδίου.

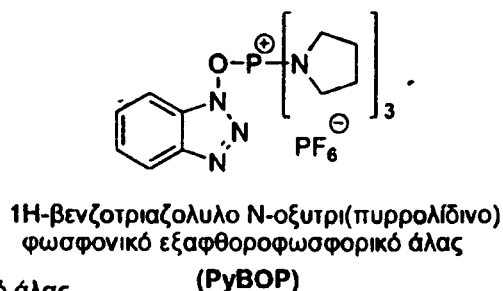
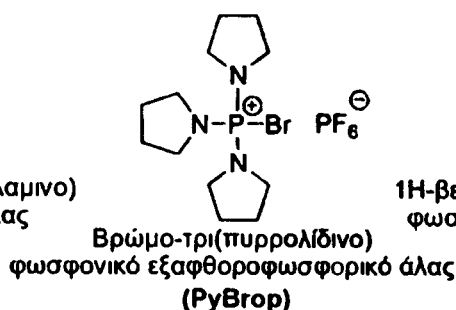
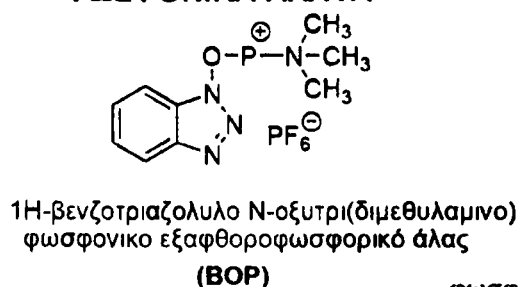


Η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του πραγματοποιείται *in situ*, με τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων σύζευξης [28-34], παρουσία κατά κανόνα του βοηθητικού πυρηνόφιλου 1-υδροξυβενζοτριαζολίου (HOBT) [35,36] (Σχήμα 4.2.1.2). Οι προστασίες των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων (εάν υπάρχουν και εάν δεν συντρέχει ιδιαίτερος λόγος) θα πρέπει να είναι σταθερές κατά την επαναλαμβανόμενη κατεργασία της πεπτιδορηνίτης με το διάλυμα του TFA και να απομακρύνονται μόνο μετά το πέρας της σύνθεσης, με τη χρήση πολύ ισχυρών οξέων όπως πχ. το υγρό υδροφθόριο (HF), παρουσία μορίων "παγίδων καρβοκατιόντων" (ανισόλη, φαινόλη, κ.ο.κ) [37].

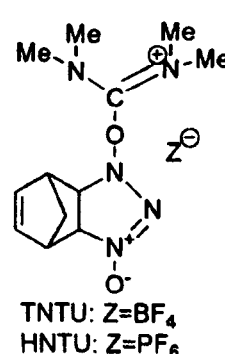
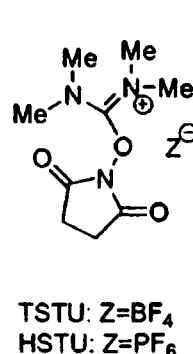
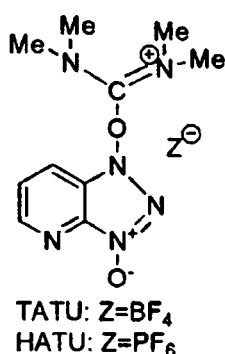
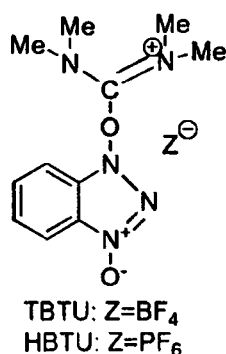
ΚΑΡΒΟΔΙΪΜΙΔΙΑ



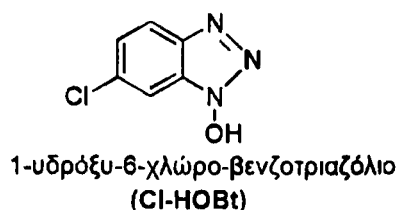
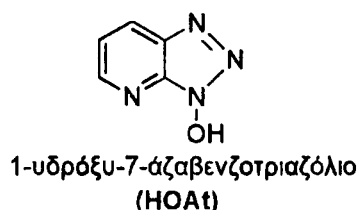
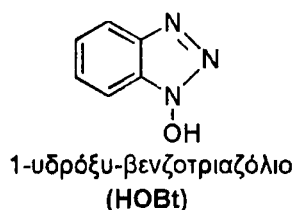
ΦΩΣΦΟΝΙΚΑ ΑΛΑΤΑ



ΟΥΡΟΝΙΚΑ ΑΛΑΤΑ



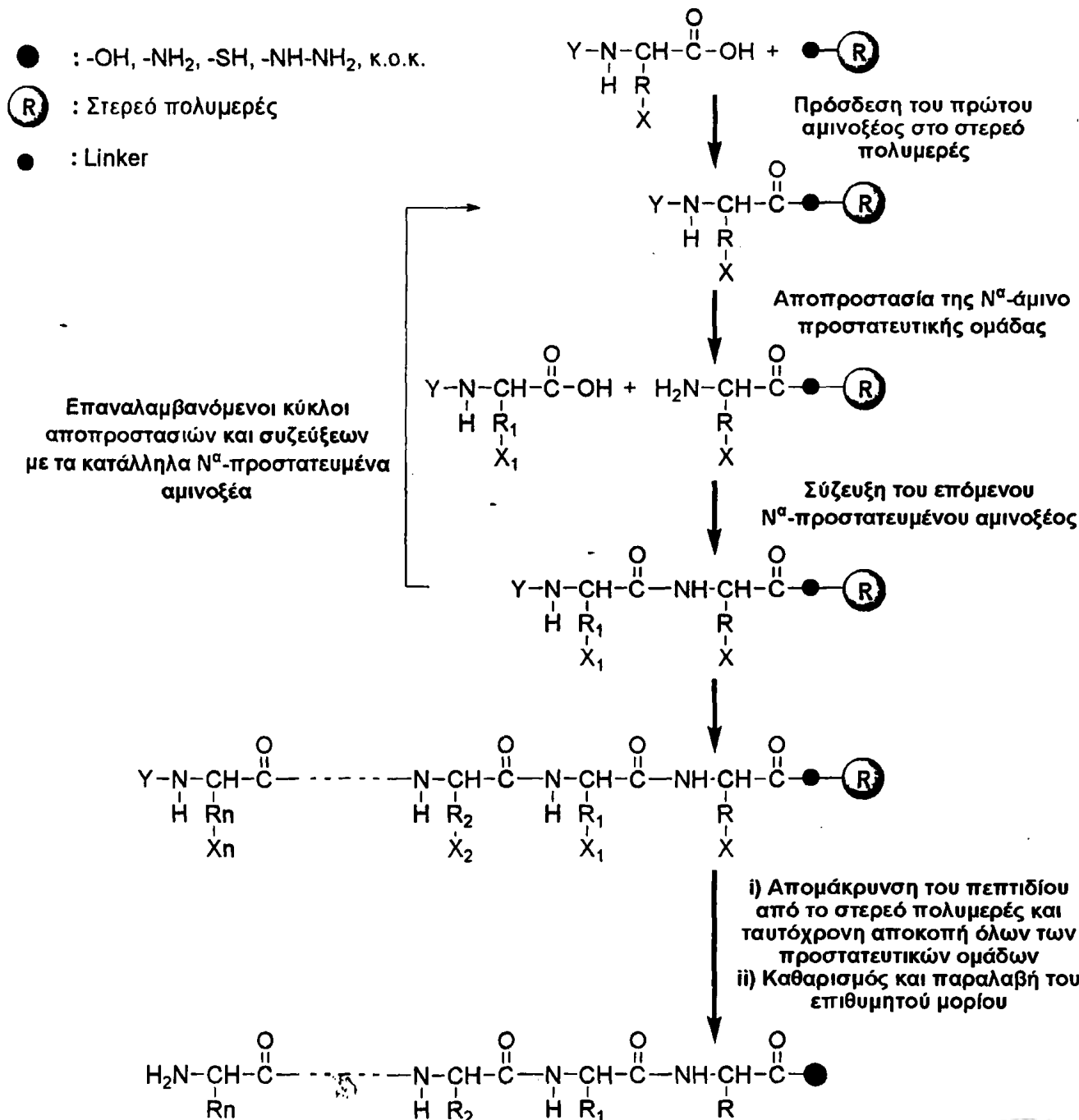
ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ ΠΥΡΗΝΟΦΙΛΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ



Σχήμα 4.2.1.2 Χημικές δομές των συνηθέστερων αντιδραστηρίων σύζευξης και βοηθητικών πυρηνόφιλων, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση.



Στην Fmoc/tBu μεθοδολογία η N^α-Fmoc προστατευτική ομάδα αποκόπτεται σε κάθε κύκλο της σύνθεσης, με τη χρήση διαλύματος πιπεριδίνης σε N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), και σε συγκέντρωση 20% v/v. Η σύζευξη του επόμενου N^α-Fmoc προστατευμένου αμινοξέος γίνεται συνήθως με χρήση τριπλάσιας μοριακής περίσσειας σε DMF, λόγω της χαμηλής διαλυτότητας των Fmoc-προστατευμένων αμινοξέων στο DCM. Η απομάκρυνση των προστασιών των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων πραγματοποιείται παρουσία οξέων κάτω από ήπιες συνθήκες, κατά την διάρκεια αποκοπής του πεπτιδίου από την ρητίνη με διάλυμα TFA ~95% v/v, παρουσία "παγίδων" ανάλογα με την αμινοξική αλληλουχία (τρισοπρότυλο-σιλάνιο, αιθάνο-διθειόλη, κ.ο.κ). Σχηματικά τα στάδια της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση δίδονται στο σχήμα 4.2.1.3.



Σχήμα 4.2.1.3 Σχηματική περιγραφή της βήμα προς βήμα σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση.



Η αυτοματοποίηση των Boc/Bzl και Fmoc/tBu μεθοδολογιών, καθώς και η εξαιρετική πρόοδος στον τομέα των αντιδραστηρίων σύζευξης (Σχήμα 4.2.1.2), είχαν ως αποτέλεσμα την πραγματοποίηση πολλών και εντυπωσιακών συνθέσεων πρωτεϊνικής τάξης μορίων. Η σύνθεση της ριβονουκλεάσης A (124 αμινοξικά κατάλοιπα) από τους Gutte και Merrifield το 1971 [38], η σύνθεση του ενεργού ενζύμου της HIV-1 ασπαρτικής πρωτεάσης (99 αμινοξικά κατάλοιπα) από τους Schneider, Kent και Nutt το 1988 [39,40] και η σύνθεση του αναστολέα της βοείας παγκρεατικής θρυψίνης (58 αμινοξικά κατάλοιπα) από τον Ferrer το 1992 [41], αποτελούν μερικές μόνο από τις εφαρμογές της βήμα προς βήμα πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση κατά Merrifield.

4.2.2 Βήμα προς βήμα σύνθεση πρωτεϊνικής φύσης μορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής

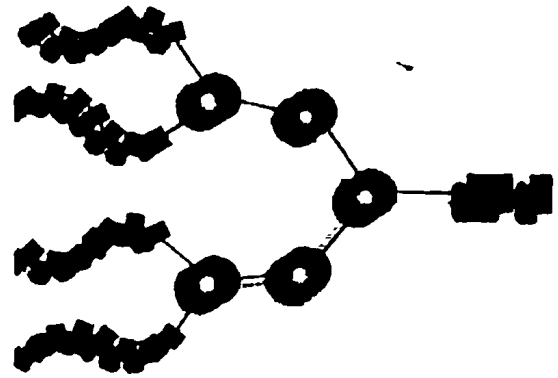
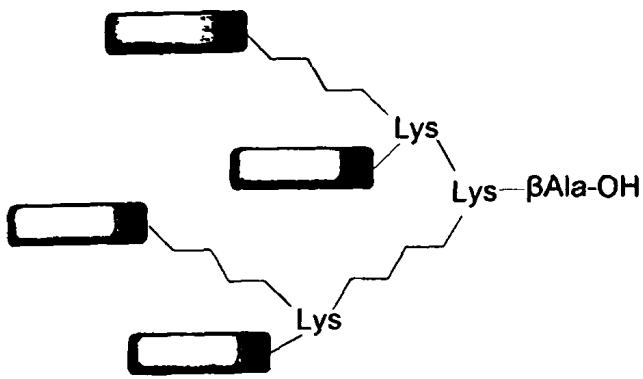
Η βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία στερεάς φάσης, έχει παράλληλα χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής με την πρόσδεση πολλαπλών επιτόπων σε συνθετικούς φορείς [3,7-14]. Στην προκειμένη περίπτωση, οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποπροστασιών και συζεύξεων με τα κατάλληλα N^o-προστατευμένα αμινοξέα μειώνονται σημαντικά, δεδομένου ότι μπορούν ανάλογα με την περίπτωση, να συζεύγνυνται μέχρι και 8 αντίγραφα αμινοξέων σε ένα και μόνο συνθετικό βήμα.

Το σύστημα των πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (Multiple Antigenic Peptides, MAPs), τα συστήματα πρόσδεσης πεπτιδίων (Template-Assembled Synthetic Proteins, TASP) και οι επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers, SOC) είναι από τα πλέον εδραιωμένα στην επιστημονική κοινότητα πρωτεϊνικής φύσης μακρομόρια διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής (Σχήμα 4.2.2.1), τα οποία έχουν ευρύτατα χρησιμοποιηθεί για μελέτες πάνω στις λειτουργίες των πρωτεϊνών καθώς και για ανοσολογικούς σκοπούς.

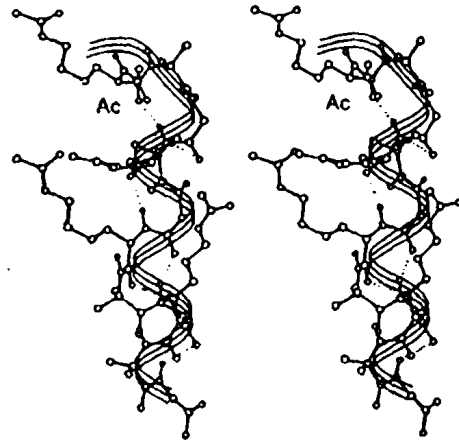
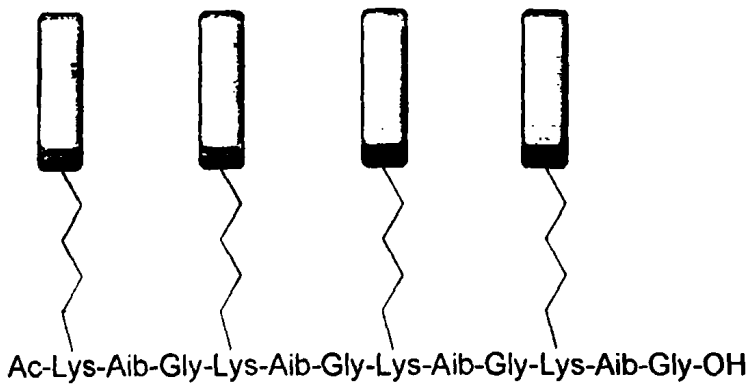
Στα τέλη της δεκαετίας του 80' ο J.P. Tam και οι συνεργάτες του, εισήγαγαν την ιδέα του συστήματος πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (MAPs) [3,4] (Σχήμα 4.2.2.1), με αρχικό στόχο τη λειτουργία του συστήματος ως ένα ισχυρό ανοσογόνο και αντιγόνο [42-46]. Χρησιμοποιώντας ως βασική δομική μονάδα τη λυσίνη, συνέθεσαν έναν φορέα μικρού μοριακού βάρους (δέντρο της λυσίνης), πάνω στον οποίο θα μπορούσαν να προσδένονται ομοιοπολικά πεπτιδικά αντιγόνα σε πολλαπλά αντίγραφα. Πολύ γρήγορα οι εφαρμογές του συστήματος MAPs επεκτάθηκαν και σε άλλα πεδία, όπως στο σχεδιασμό αναστολέων και μοντέλων ενζύμων, στην ανάπτυξη εμβολίων κ.ο.κ.

Η βήμα προς βήμα σύνθεση των συστημάτων MAPs τόσο με την Boc/Bzl όσο και με την Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία [46,47], επέτρεψε τη ανάπτυξη μονοεπιτοπικών αλλά και διεπιτοπικών πεπτιδικών συμπλεγμάτων [46,48]. Στο σχήμα 4.2.2.2 παρουσιάζεται ένα γενικό συνθετικό μοντέλο ανάπτυξης διεπιτοπικών συστημάτων MAPs. Καθοριστικό παράγοντα στη σύνθεση των παραπάνω αποτέλεσε και η τεράστια εμπορική διαθεσιμότητα των ορθογωνικών προστασιών [46,48] (Σχήμα 4.2.2.3).

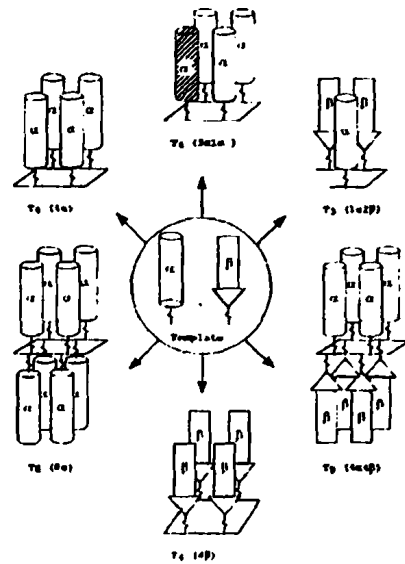
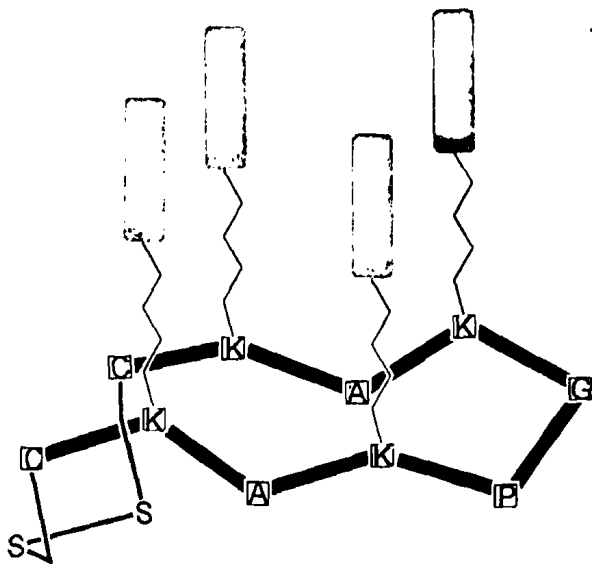




Πολλαπλά Αντιγονικά Πεπτιδία MAPs



Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς SOCs

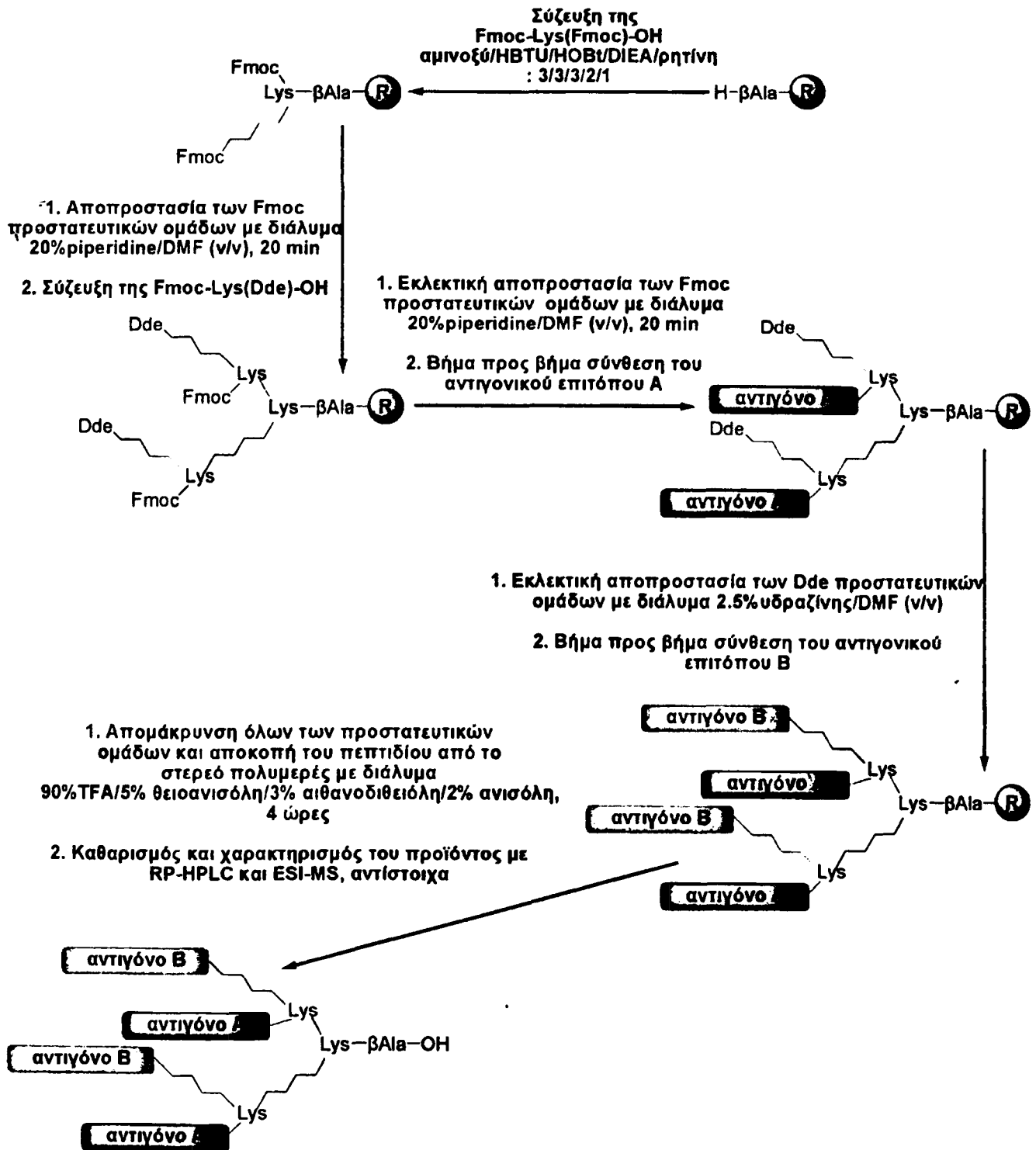


Συστήματα Πρόσδεσης Πεπτιδίων TASPs



Σχήμα 4.2.2.1 Σχηματική απεικόνιση των δημοφιλέστερων συνθετικών φορέων για τη σύνθεση πεπτιδικών μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής.



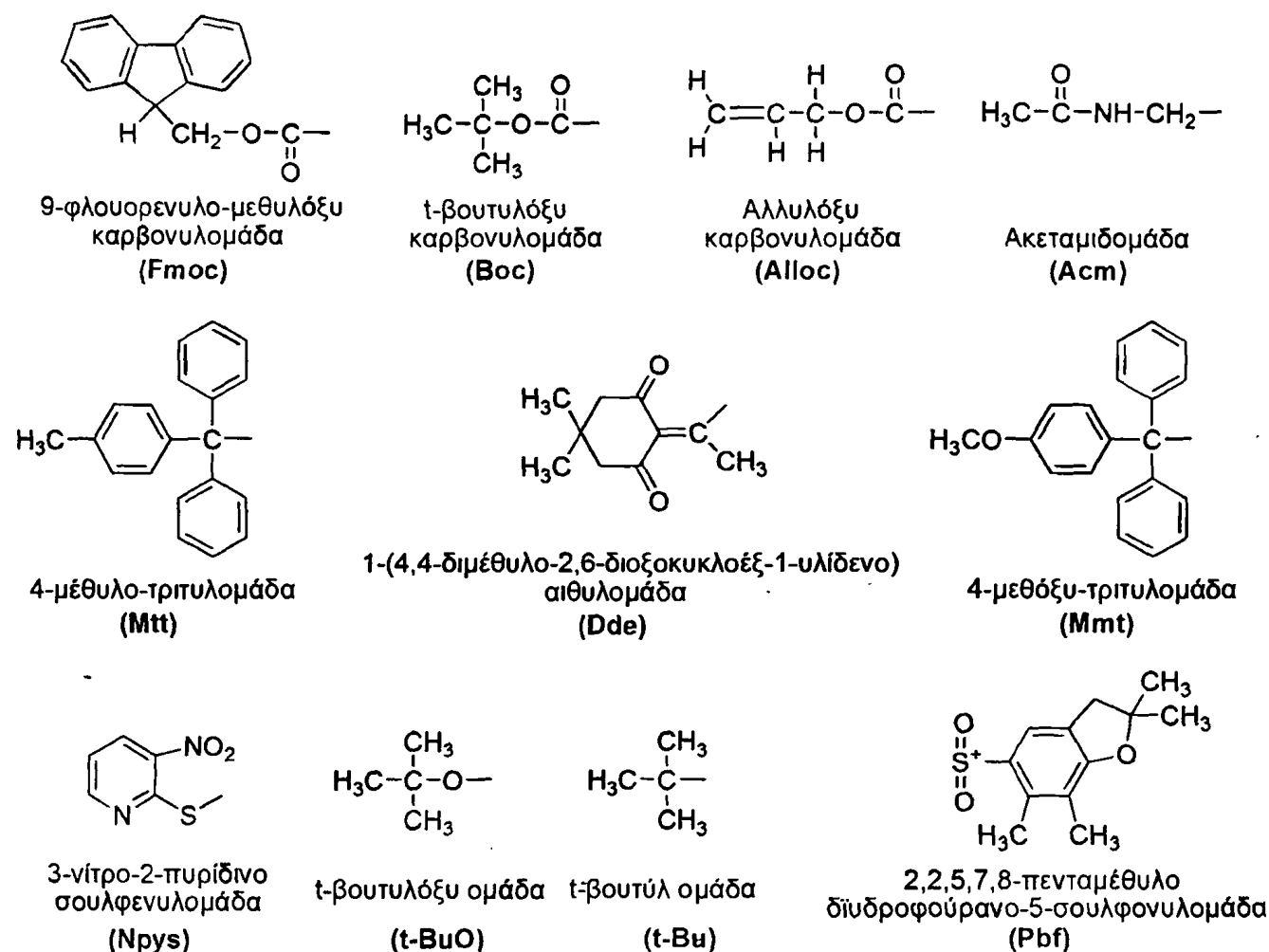


Σχήμα 4.2.2.2 Τυπικό πρωτόκολλο ανάπτυξης διεπιτοπικών συστημάτων MAPs, χρησιμοποιώντας την Fmoc/tBu (βήμα προς βήμα) συνθετική μεθοδολογία στερεάς φάσης.

Ο M. Mutter και η ερευνητική του ομάδα στις αρχές της δεκαετίας του 90', ανέπτυξαν τα συστήματα πρόσδεσης πεπτιδίων (TASPs) βασιζόμενοι στην έννοια της επαγωγής και σταθεροποίησης μικρών δευτεροταγών δομών, παρακάμπτοντας τα προβλήματα των πρωτεϊνικών αναδιπλώσεων [49,50]. Η ανάγκη σύνθεσης πεπτιδικών αναλόγων τα οποία θα μπορούσαν να



μιμούνται πρωτεΐνες και καταλυτικά κέντρα ενζύμων, ήταν και ο λόγος εδραίωσης της μεθοδολογίας του στην επιστημονική κοινότητα.

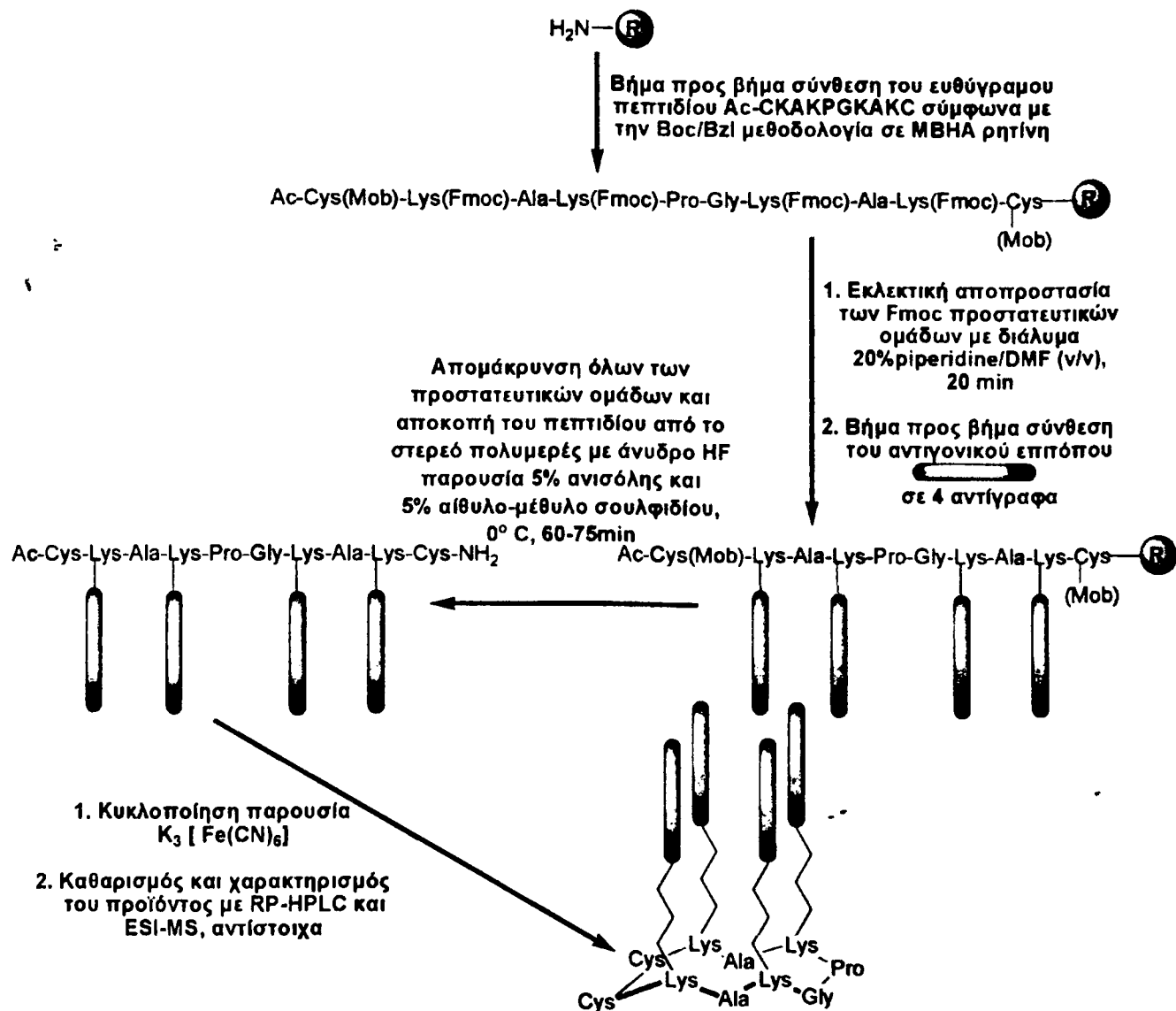


Σχήμα 4.2.2.3 Συντακτικοί τύποι των συνηθέστερων προστατευτικών ομάδων με ευρύτατη χρήση στην πεπτιδική σύνθεση.

Τα συστήματα TASP's απαρτίζονται από μια μικρή δομική μονάδα (template), η οποία φέρει δραστικές ομάδες (λυσίνες) πάνω στις οποίες προσδένονται ομοιοπολικά τα πεπτίδια (Σχήμα 4.2.2.1), λαμβάνοντας παράλληλα κατάλληλο προσανατολισμό στο χώρο. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση διαφόρων δευτεροταγών δομών, με αποτέλεσμα τα μοριακά αυτά συμπλέγματα να μπορούν να μιμηθούν (δομικά και διαμορφωτικά) πεπτίδια και πρωτεΐνες σε πειράματα μοριακής προσομοίωσης.

Αν και λιγότερο αποτελεσματική σε σύγκριση με τις χημειοεκλεκτικές μεθόδους πρόσδεσης επιτόπων, η βήμα προς βήμα σύνθεση των συμπλεγμάτων TASP's (Σχήμα 4.2.2.4) αποτέλεσε αναμφίβολα το εφαλτήριο των ερευνών και της περαιτέρω ανάπτυξης στο πεδίο της εξ'ολοκλήρου χημικής σύνθεσης πρωτεϊνών [51-53].





Σχήμα 4.2.2.4 Πρωτόκολλο ανάπτυξης συστημάτων TASPs, χρησιμοποιώντας την Boc/Bzl (βήμα προς βήμα) συνθετική μεθοδολογία στερεάς φάσης.

Το 1996 δημοσιεύτηκε στο *Bio polymers* η πρώτη ερευνητική εργασία η οποία ανέλυε τη γενική ιδέα σχεδιασμού μιας νέας γενιάς συνθετικών φορέων, τους επαναλαμβανόμενους ολιγοπεπτιδικούς φορείς (SOCs) [10] (Σχήμα 4.2.2.1). Βασικός στόχος του σχεδιασμού των SOCs ήταν η παρασκευή ενός συνθετικού υποστρώματος με προκαθορισμένη τρισδιάστατη δομή, ώστε τα προσδεμένα σε αυτόν αντιγονικά πεπτίδια να λαμβάνουν ένα συγκεκριμένο προσανατολισμό στο χώρο, χωρίς διαμορφωτικούς περιορισμούς και στερεοχημικές παρεμπόδισεις.

Οι επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς (SOCs) συνίστανται από μια επαναλαμβανόμενη τριπλέτα αμινοξέων, λυσίνης, αμινοϊσοβουτυρικού οξέος και γλυκίνης (-Lys-Aib-Gly-) με τα αντιγονικά πεπτίδια να προσδένονται ομοιοπολικά στις N^ε-αμινομάδες των λυσινών του. Η 3₁₀-ελικοειδής δομή του, έτσι όπως προέκυψε μετά από πειράματα ¹H-NMR και μελέτες με



μοντέλα μοριακής δυναμικής, αναγκάζει τα προσδεδεμένα στις N^{ϵ} -αμινομάδες της λυσίνης πεπτιδικά αντιγόνα να παραμείνουν σε μια συγκεκριμένη χωροταξική διάταξη [13,54].

Τα συστήματα SOCs έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί τόσο στην ανάπτυξη διαγνωστικών μεθόδων (με επιτόπους αντιγόνα), όσο και στην επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης (με επιτόπους ανοσογόνα). Η βήμα προς βήμα σύνθεση τους, αποδείχθηκε αν και επίπονη ιδιαίτερα αποτελεσματική, στην ανάπτυξη πεπτιδικών συμπλεγμάτων της τάξης των ~ 10 kDa [13,14,55,56] (Σχήμα 4.2.2.5).

Θα πρέπει βέβαια να τονιστεί ότι, παρά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η βήμα προς βήμα σύνθεση πρωτεϊνικών μακρομορίων, συχνά προκύπτουν σοβαρά προβλήματα λόγω διαμορφωτικών και στερικών περιορισμών από την υπερβολική αύξηση του μεγέθους του μορίου. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται σημαντικά η απόδοση αλλά και η ομοιογένεια του τελικού επιθυμητού μορίου. Πιο συγκεκριμένα, η απόδοση μιας βήμα προς βήμα σύνθεσης πρωτεΐνης 100 αμινοξέων αναμένεται στο $\sim 90\%$, αν κάθε κύκλος σύζευξης αμινοξέος και αποπροστασίας της N^{ϵ} -προστατευτικής ομάδας πραγματοποιείται κατά 99,9%. Αντίστοιχα, αν το τελευταίο ποσοστό μειωθεί στο 98%, τότε η τελική απόδοση σύνθεσης του επιθυμητού μακρομορίου διαμορφώνεται στο $\sim 13\%$.

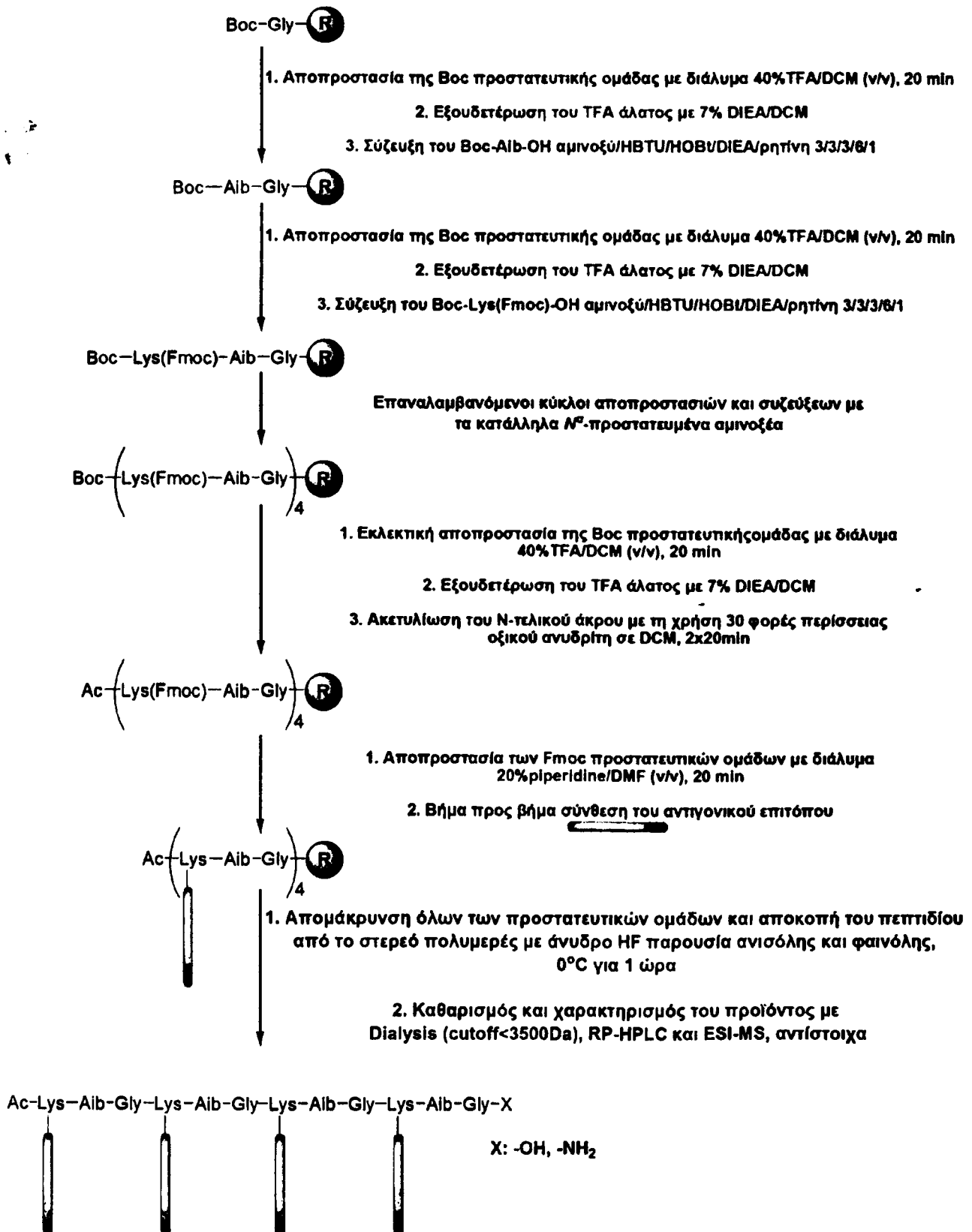
Βέβαια, οι παραπάνω αποδόσεις παρουσιάζονται σε σχεδόν ιδανικές συνθήκες σύνθεσης. Στην πραγματικότητα όμως, οι προβληματικές και δύσκολες συζεύξεις αμινοξέων αποτελούν ένα αναπόφευκτο γεγονός, ιδιαίτερα κατά τη σύνθεση πεπτιδίων με περισσότερα από 30 αμινοξικά κατάλοιπα. Φασματοσκοπικές μελέτες IR και NMR έδειξαν ότι το συγκεκριμένο φαινόμενο πιθανότατα να οφείλεται στη αλληλεπίδραση των πεπτιδικών αλυσίδων και στη δημιουργία συσσωματωμάτων β -φύλλων [57]. Βελτίωση της απόδοσης σύνθεσης αλλά και της ομοιογένειας των τελικών επιθυμητών μακρομορίων θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη μείωση της υποκατάστασης της ρητίνης, γεγονός το οποίο συνεπάγεται ελάττωση των στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Παράλληλα, η αποτελεσματική λύση των συσσωματωμάτων β -φύλλων απαιτεί τη χρήση πολικών μη πρωτικών διαλυτών [58,59] (π.χ. διμέθυλο σουλφοξείδιο, DMSO) και την προσθήκη χαστροπικών αλάτων στους οργανικούς διαλύτες [60].

Κάποια επίσης από τα συνηθέστερα προβλήματα που συχνά συναντώνται κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της αμινοξικής αλληλουχίας είναι:

- **Ρακεμοποίηση** [61]: Λαμβάνει χώρα σε βασικές συνθήκες κατά την απόσπαση υδρογόνου από το C^{α} -άτομο άνθρακα του αμινοξέος, με το σχηματιζόμενο καρβανιόν να αλλάζει πολύ εύκολα την στερεοχημική του διάταξη. Αυτό έχει ως συνέπεια την απώλεια της οπτικής καθαρότητας του αμινοξέος και τη λήψη μείγματος εναντιομερών R και S (ρακεμικό μείγμα). Θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη ο κίνδυνος ρακεμοποίησης από την υπερβολική περίσσεια βάσης, κατά τη διάρκεια των διαδικασιών σύζευξης αμινοξέων και απομάκρυνσης προστατευτικών



ομάδων, δεδομένου ότι όλα τα αμινοξέα εκτός από την γλυκίνη περιέχουν ασύμμετρο άτομο άνθρακα.



Σχήμα 4.2.2.5 Σχηματική περιγραφή ενός αντιπροσωπευτικού πρωτοκόλλου ανάπτυξης συστημάτων SOC, χρησιμοποιώντας την Boc/Bzl (βήμα προς βήμα) συνθετική μεθοδολογία στερεάς φάσης.



⇒ Ο σχηματισμός δικετοπιπεραζινών [62]: Λαμβάνει χώρα κατά την ενδομοριακή προσβολή της αμινομάδας του δευτέρου κατά σειρά αμινοξέος στο C-τελικό καρβονύλιο (κυκλοποίηση), με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός εξαμελούς δακτυλίου και την αποκοπή ενός σημαντικού ποσοστού πεπτιδίου από την ρητίνη. Η παράπλευρη αυτή αντίδραση ευνοείται κυρίως κατά τη Fmoc/tBu μεθοδολογία στη διάρκεια απομάκρυνσης της Fmoc-άμινο προστατευτικής ομάδας με διάλυμα πιπεριδίνης.

⇒ Ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου [63,64]: Πρόκειται για την ενδομοριακή κυκλοποίηση του ασπαρτικού οξέος, η οποία λαμβάνει χώρα τόσο στην Boc/Bzl μεθοδολογία κατά τη διάρκεια απομάκρυνσης του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές με ισχυρά οξέα (όξινης συνθήκες), όσο και κατά την Fmoc/tBu μεθοδολογία (σε μικρότερη συχνότητα) από την παρατεταμένη κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα πιπεριδίνης (βασικές συνθήκες) και τον σχηματισμό α- και β- πιπεριδιδίων. Το αμινοξικό κατάλοιπο που προηγείται του ασπαρτικού οξέος (-Asp-X-) κατά την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας ($N \leftarrow C$), φαίνεται να διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στο σχηματισμό του ασπαρτιμιδίου, με τις αλληλουχίες -Asp-Gly-, -Asp-Ser-, -Asp-Asn-, -Asp-His- και -Asp-Ala-, να ευνοούν ιδιαίτερα την εν λόγω παράπλευρη αντίδραση.

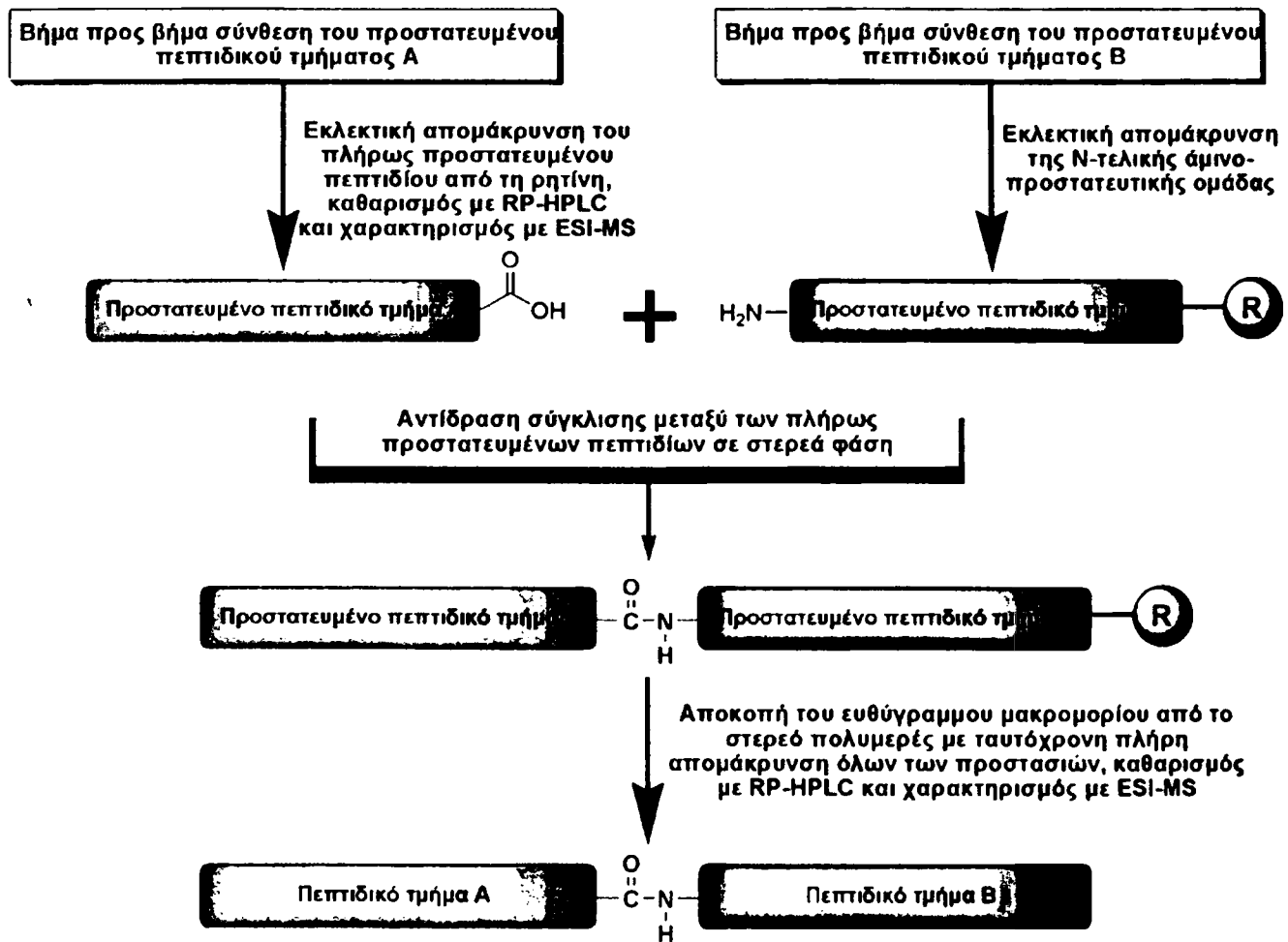
⇒ Ο σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος [65]: Λαμβάνει χώρα κατά την ενδομοριακή κυκλοποίηση της N-τελικής γλουταμίνης σε ασθενώς όξινης συνθήκες, κυρίως κατά την απομάκρυνση της Boc-άμινο προστατευτικής ομάδας με διάλυμα τριφθωροξικού οξέος, αλλά και κατά την σύζευξη του επόμενου κατά σειρά N^o-προστατευμένου αμινοξέος.

Ωστόσο, όπως διεξοδικά περιγράφεται στη συνέχεια, η εισαγωγή μιας πληθώρας χημειοεκλεκτικών μεθόδων σύνθεσης έχει συνεισφέρει τα μέγιστα στην πρακτική διευκόλυνση ανάπτυξης ευθύγραμμων και διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής μακρομοριακών συμπλεγμάτων, παρακάμπτοντας αρκετά από τα προαναφερθέντα συνθετικά προβλήματα.

4.3 Σύνθεση μακρομορίων πρωτεϊνικής φύσης μέσω σύζευξης (σύγκλισης) πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων (Convergent Ligation)

Σε αντίθεση με την βήμα προς βήμα συνθετική προσέγγιση, η ανάπτυξη μακρομοριακών συμπλεγμάτων πραγματοποιείται τόσο σε υγρή όσο και σε στερεά φάση, μέσω σύζευξης (σύγκλισης) πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων (Convergent Ligation) (Σχήμα 4.3.1). Η συγκεκριμένη μεθοδολογία περιλαμβάνει καταρχάς την σύνθεση (με την βήμα προς βήμα συνθετική στρατηγική), τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο μόρια υψηλής καθαρότητας και ομοιογένειας. Στη συνέχεια ακολουθεί αντίδραση σύγκλισης των εν λόγω μορίων με την δημιουργία αμιδικού δεσμού και την ανάπτυξη του επιθυμητού μακρομορίου [66-68].





Σχήμα 4.3.1 Σχηματική περιγραφή της μεθοδολογίας σύνθεσης ευθύγραμμων μακρομοριακών συμπλεγμάτων μέσω σύζευξης (σύγκλισης) πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων (Convergent Ligation) σε στερεά φάση.

Η εκτενέστατη χρησιμοποίηση της μεθόδου για την κατασκευή μεγάλου μοριακού βάρους ευθύγραμμων ή και διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής μακρομορίων έναντι της βήμα προς βήμα συνθετικής στρατηγικής, αποτυπώνεται έντονα βιβλιογραφικά. Η εξ'ολοκλήρου χημική σύνθεση της ριβονουκλεάσης A (124 αμινοξικά κατάλοιπα) [69] σε υγρή φάση, η σύνθεση της πρωτεΐνης προθυμοσίνης A (109 αμινοξικά κατάλοιπα) [70] και η σύνθεση της πρωτεΐνης *Aequorea* (238 αμινοξικά κατάλοιπα) με τη σύγκλιση 26 πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων [71] είναι μερικές μόνο από τις εφαρμογές της.

Ωστόσο στην πράξη, η σύγκλιση πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων παρουσιάζει και μια σειρά από συνθετικές δυσκολίες. Πιο συγκεκριμένα, στα μειονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται τα εξής:

- * Συχνά παρατηρούνται σοβαρά προβλήματα διαλυτότητας των πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων, τόσο σε υδατικά διαλύματα όσο και στους κλασσικούς οργανικούς διαλύτες που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση [68]. Το πρόβλημα της



- διαλυτότητας περιορίζεται, είτε με τη χρήση μείγματος οργανικών διαλυτών [72], είτε με την επιλογή κατάλληλων ομάδων για την προστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, οι οποίες δεν θα επιβαρύνουν την υδατοδιαλυτότητα του μορίου [73,74].
- * Ο χαρακτηρισμός των πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων ακόμη και με τις μοντέρνες αναλυτικές τεχνικές (ESI-MS), πολλές φορές καθίσταται αδύνατος.
- * Οι αποδόσεις των αντιδράσεων σύζευξης μεταξύ των μακρομορίων είναι γενικά χαμηλές, με αποτέλεσμα να παρατείνεται πολλές φορές ανεξέλεγκτα ο χρόνος αποπεράτωσης της αντίδρασης.
- * Τέλος, έχει παρατηρηθεί υψηλό ποσοστό ρακεμοποίησης στο C-τελικό άκρο του προς σύζευξη πεπτιδικού μορίου κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σύγκλισης. Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με τη σύνθεση πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων τα οποία φέρουν C-τελική γλυκίνη ή προλίνη.

4.4 Σύνθεση μακρομορίων πρωτεϊνικής φύσης μέσω χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης πλήρως αποπροστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων (Chemoselective Ligation)

4.4.1 Εισαγωγή - Μέθοδοι χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης πεπτιδίων

Η ανάπτυξη των χημειοεκλεκτικών μεθόδων πρόσδεσης αποτέλεσε τα τελευταία χρόνια την πιο σημαντική εξέλιξη στον τομέα της σύνθεσης ευθύγραμμης ή και διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής μακρομοριακών συμπλεγμάτων. Η βασική της αρχή στηρίζεται σε μια εκλεκτική χημική αντίδραση, η οποία λαμβάνει χώρα σε υγρή φάση (και λιγότερο σε στερεά), μεταξύ δύο πλήρως αποπροστατευμένων αμινοξικών αλληλουχιών προς την δημιουργία του επιθυμητού μακρομορίου. [75-77] (Σχήμα 4.4.1.1).

Για παράδειγμα, η αντίδραση μεταξύ δύο πλήρως αποπροστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων, εκ των οποίων το ένα φέρει C-τελικό θειοοξύ και το άλλο μια N-τελική βρωμοακέτυλο ομάδα, δίνει ένα προϊόν το οποίο εμπεριέχει έναν θειοεστερικό δεσμό.

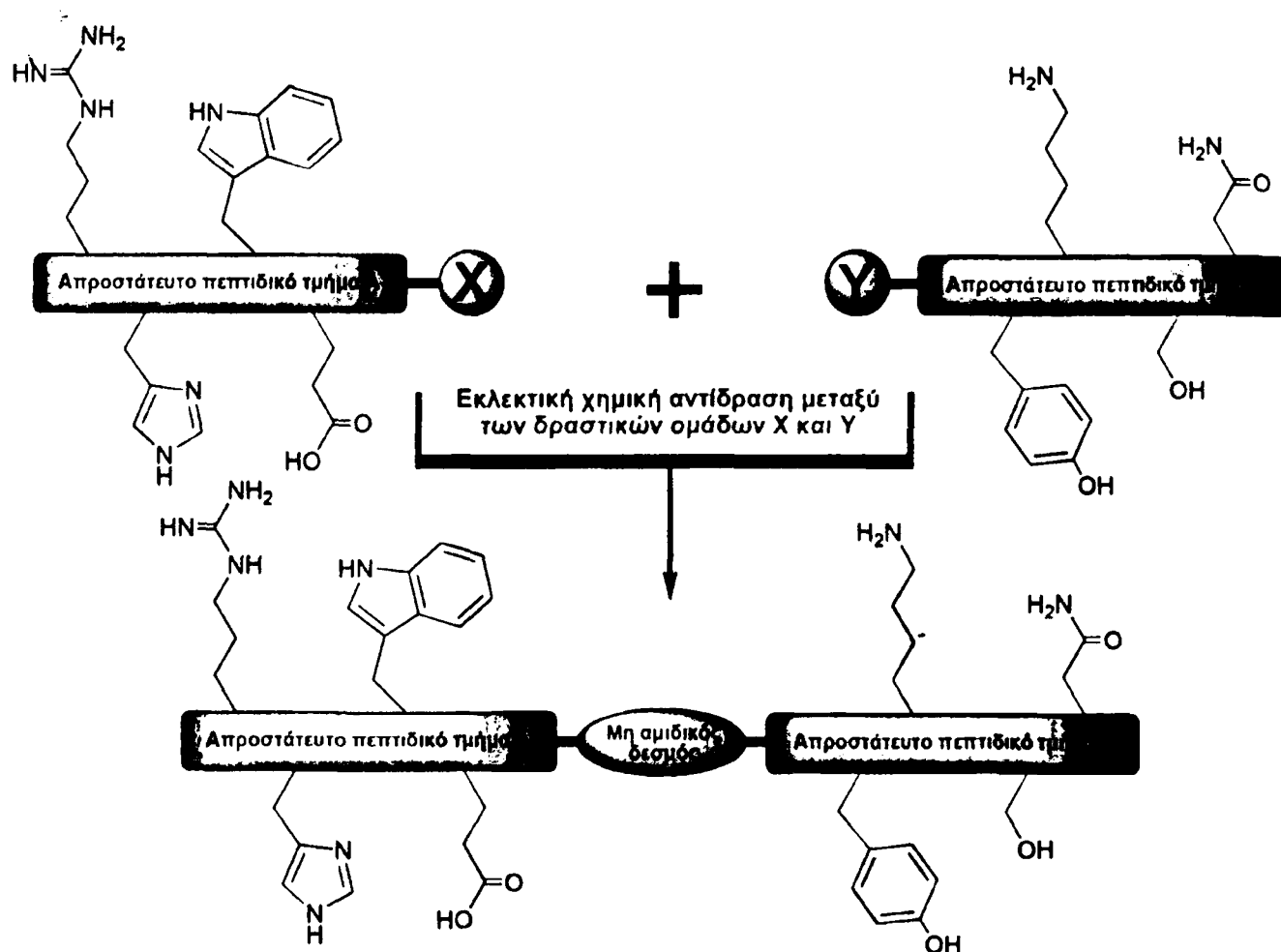
Η χρησιμοποίηση των χημειοεκλεκτικών μεθόδων πρόσδεσης πεπτιδίων με τη δημιουργία μη φυσικών χημικών δεσμών μεταξύ των συζευγμένων αμινοξικών αλληλουχιών (Σχήμα 4.4.1.2), χαρακτηρίζεται ως μια ιδιαίτερα αποτελεσματική συνθετική μεθοδολογία, παρουσιάζοντας μια σειρά από σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των προαναφερθέντων στρατηγικών.

Πιο αναλυτικά:

- ✂ Λόγω του ότι οι συγκεκριμένες αντιδράσεις σύζευξης λαμβάνουν χώρα σε υδατικά κυρίως διαλύματα, καθίσταται αναγκαία η χρήση υδατοδιαλυτών και υψηλής καθαρότητας πεπτιδικών παραγώγων. Πλέον, η αυτοματοποιημένη σύνθεση ευθύγραμμων συνθετικών πεπτιδίων έως και 30 αμινοξικά κατάλοιπα, έχει συνεισφέρει τα μέγιστα στη λήψη τέτοιου είδους προϊόντων.



- β Η μεθοδολογία χαρακτηρίζεται από την ταχύτητα των συζεύξεων, τις υψηλές αποδόσεις και την αποφυγή δημιουργίας φαινομένων συσσωματώσεων.
- β Τέλος, η λήψη ελαχίστων παραπροϊόντων διευκολύνει σημαντικά τις διαδικασίες καθαρισμού και ταυτοποίησης των τελικών προϊόντων.

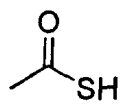


Σχήμα 4.4.1.1 Σχηματική αναπαράσταση της βασικής αρχής των χημειοεκλεκτικών μεθόδων πρόσδεσης πλήρως αποπροστατευμένων αμινοξικών αλληλουχιών.

Η μεθοδολογία καθίσταται ιδιαίτερα δύσχρηστη σε αντιδράσεις συζεύξεων μεταξύ υδροφοβικών πεπτιδικών τμημάτων, λόγω της μικρής διαλυτότητας των παραπάνω σε υδατικά διαλύματα. Το πρόβλημα αυτό πολλές φορές παρακάμπτεται με τη χρήση χαστροπικών αντιδραστηρίων, όπως η 6M υδροχλωρική-γουανιδίνη, η 6-8M ουρία, κ.ο.κ., τα οποία έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν σημαντικά την διαλυτότητα των αντιδρώντων μέσων.

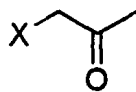
Η τεχνική των χημειοεκλεκτικών μεθόδων πρόσδεσης έχει εφαρμοστεί για την σύνθεση πολλών πρωτεϊνών και πρωτεϊνικής φύσης ευθύγραμμης και διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής μακρομορίων, με μοριακά βάρη έως και 25 kDa. Στη συνέχεια παρουσιάζονται κάποιες από τις πλέον διαδεδομένες μεθοδολογίες χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης αντιγονικών πεπτιδίων, συνοδευόμενες από τα αντίστοιχα συνθετικά τους πρωτόκολλα.



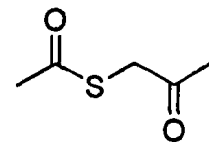
Σ-τελικό άκρο**N-τελικό άκρο****Προϊόν**

θειοξύ

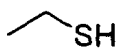
+



αλογόνο-ακέτυλο ομάδα

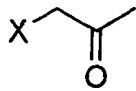


θειοεστερικός δεσμός

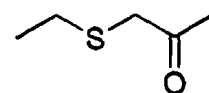


θειόλη

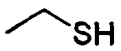
+



αλογόνο-ακέτυλο ομάδα

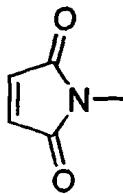


θειοαιθερικός δεσμός

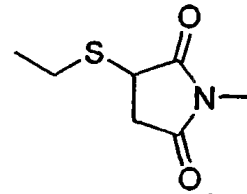


θειόλη

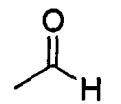
+



μαλεΐμιδο ομάδα

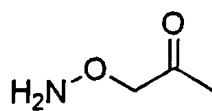


θειοαιθερικός δεσμός

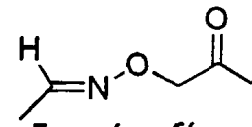


αλδεϋδη

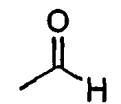
+



άμινο-όξυ ακέτυλο ομάδα

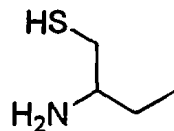


δεσμός οξίμης

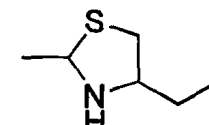


αλδεϋδη

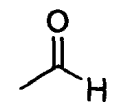
+



κυστεΐνη

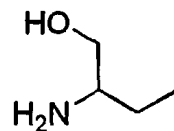


δεσμός θειαζολιδίνης

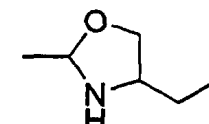


αλδεϋδη

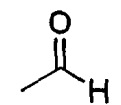
+



θρεονίνη

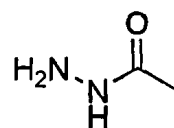


δεσμός οξαζολιδίνης

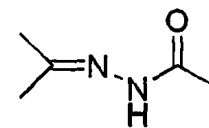


αλδεϋδη

+



υδραζίνη



δεσμός υδραζόνης

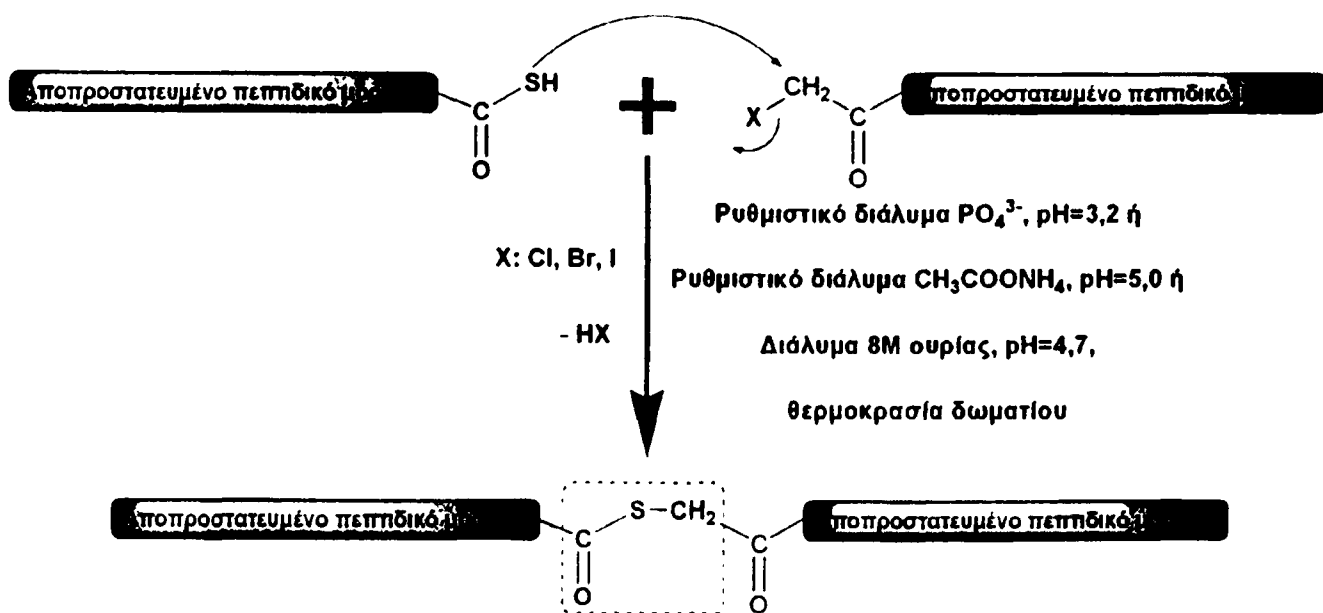
Σχήμα 4.4.1.2 Σχηματική περιγραφή των συνηθέστερων χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων.



4.4.2 Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού θειοεστερικού δεσμού

Οι χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού θειοεστερικού δεσμού (Σχήμα 4.4.2.1), αποτελούν ουσιαστικά μια από τις πρώτες συνθετικές προσεγγίσεις στον τομέα ανάπτυξης πρωτεϊνικής φύσης ευθύγραμμης και διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής μακρομορίων.

Αρχικά το 1992, οι M. Schmolzer και S.B.H. Kent [78] χρησιμοποιώντας την συγκεκριμένη τεχνική επιχείρησαν να συνθέσουν την πρωτεάση HIV-1, υποβάλλοντας σε αντίδραση δύο πεπτιδικές αλληλουχίες των 50 αμινοξέων, εκ των οποίων η πρώτη έφερε ένα C-τελικό θειοξύ, ενώ η δεύτερη μια N-τελική βρωμοακέτυλο ομάδα. Η αντίδραση των παραπάνω έδωσε το επιθυμητό μακρομόριο, το οποίο έφερε στον πεπτιδικό του σκελετό έναν μη φυσικό θειοεστερικό δεσμό. Να σημειωθεί ότι η σύνθεση των αποπροστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων τα οποία έχουν τροποποιημένο το C-τελικό τους άκρο ως θειοξύ, πραγματοποιείται συνήθως με τις κλασσικές ρητίνες οι οποίες όμως έχουν ομοιοπολικά προσδεμένους κατάλληλους συνδέσμους (linkers) [79].



Σχήμα 4.4.2.1 Σχηματική περιγραφή της αντίδρασης σχηματισμού θειοεστερικού δεσμού μεταξύ αποπροστατευμένων πεπτιδικών αλληλουχιών.

Ένα χρόνο μετά ο δεύτερος σε συνεργασία με τον P.E. Dawson δημοσίευσαν στο *Journal of American Chemical Society* μια ερευνητική εργασία [80], η οποία αφορούσε την κατασκευή ενός μακρομοριακού συμπλέγματος TASP μέσω χημειοεκλεκτικών μεθόδων πρόσδεσης επιτόπων και σχηματισμό θειοεστερικών δεσμών, όπως περιγράφεται στο σχήμα 4.4.2.2.

Οι αντιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα κυρίως σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα (όπως, ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών, ρυθμιστικά διαλύματα οξικού αμμωνίου, 8M υδατικό διάλυμα ουρίας, κ.ο.κ.) και σε pH ασθενώς όξινα (3,0-5,0).



Boc-Gly-**(R)** A. Σύνθεση φορέα

Βήμα προς βήμα σύνθεση του ευθύγραμου πεπτιδίου ΚΚΚΡΓΚΕΚ σύμφωνα με την Boc/Bzl μεθοδολογία σε ρητίνη PAM



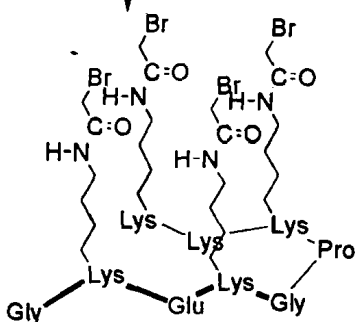
1. Εκλεκτική αποπροστασία των Fmoc προστατευτικών ομάδων των λυσινών με διάλυμα 50% piperidine/DMF (v/v)

2. Βρωμοακετυλίωση των ελεύθερων N^ε-NH₂ με BrCH₂COOH/DIC σε DCM



1. Απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων και αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές με άνυδρο HF παρουσία 10% π-κρεσόλης, 0° C, 60min

2. Καθαρισμός και χαρακτηρισμός του προϊόντος με RP-HPLC και ESI-MS, αντίστοιχα



B. Σύνθεση επιτόπου **ΕΠΙΤΟΠΟΣ**



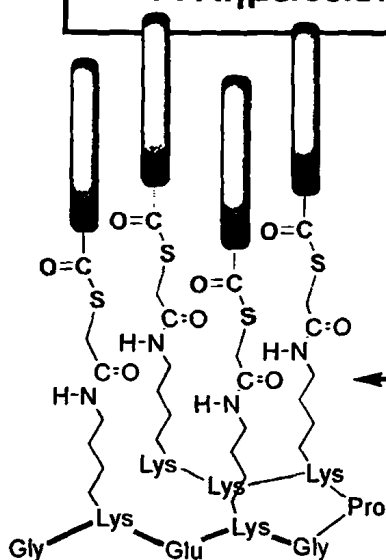
1. Βήμα προς βήμα σύνθεση του ευθύγραμου πεπτιδίου DAATALANALKKL σύμφωνα με την Boc/Bzl μεθοδολογία σε ρητίνη με θειοεστερικό linker

2. Απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων και αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές με άνυδρο HF παρουσία 2% ανισόλης, 0° C, 60min

3. Καθαρισμός και χαρακτηρισμός του προϊόντος με RP-HPLC και ESI-MS, αντίστοιχα



Γ. Χημειοεκλεκτική αντίδραση



Χημειοεκλεκτική αντίδραση σε υδατικό περιβάλλον
10mM CH₃COONH₄, pH=5.0, 23 °C

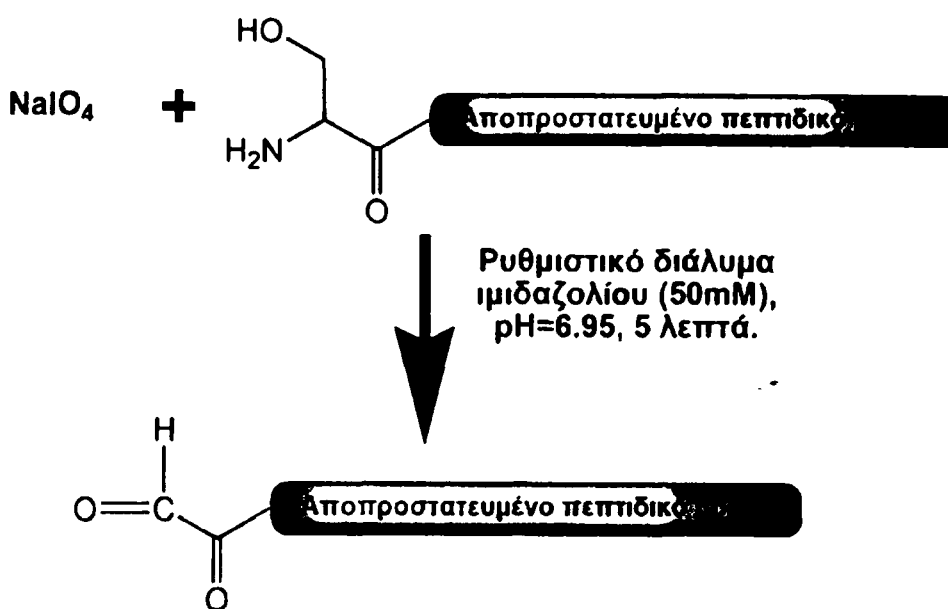
Σχηματισμός θειοεστερικών δεσμών R-C(=O)-S-R'

Σχήμα 4.4.2.2 Σχηματική περιγραφή ενός κλασσικού πρωτοκόλλου ανάπτυξης τετραεπιτοπικού μακρομορίου TASP, μέσω χημειοεκλεκτικών μεθόδων πρόσδεσης επιτόπων και σχηματισμό θειοεστερικών δεσμών.



4.4.3 Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού δεσμών θειαζολιδίνης, οξαζολιδίνης, οξίμης και υδραζόνης

Η ευαισθησία των 1-άμινο-2-ύδροξυ ενώσεων στα υπεριωδικά ιόντα έχει συμβάλει καταλυτικά στην ανάπτυξη νέων βελτιωμένων χημειοεκλεκτικών μεθολογιών πρόσδεσης επιτόπων. Η οξείδωση τους με τη χρήση υπεριωδικών ιόντων είναι μια ταχύτατη αντίδραση η οποία λαμβάνει χώρα εκλεκτικά, ακόμα και όταν υπάρχουν στον πεπτιδικό σκελετό και άλλα αμινοξικά κατάλοιπα με ευαίσθητες στην οξείδωση πλευρικές αλυσίδες. Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι οι *N*-τελικές σερίνες και θρεονίνες των πεπτιδικών αλληλουχιών, μπορούν μετά από κατεργασία τους με NaIO_4 κάτω από ήπιες συνθήκες, να μετατραπούν εύκολα σε αλδεΐδες [81] (Σχήμα 4.4.3.1).

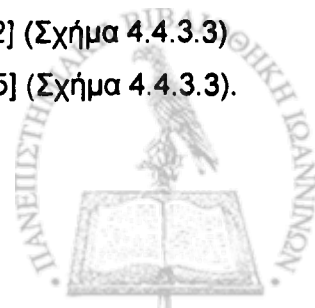


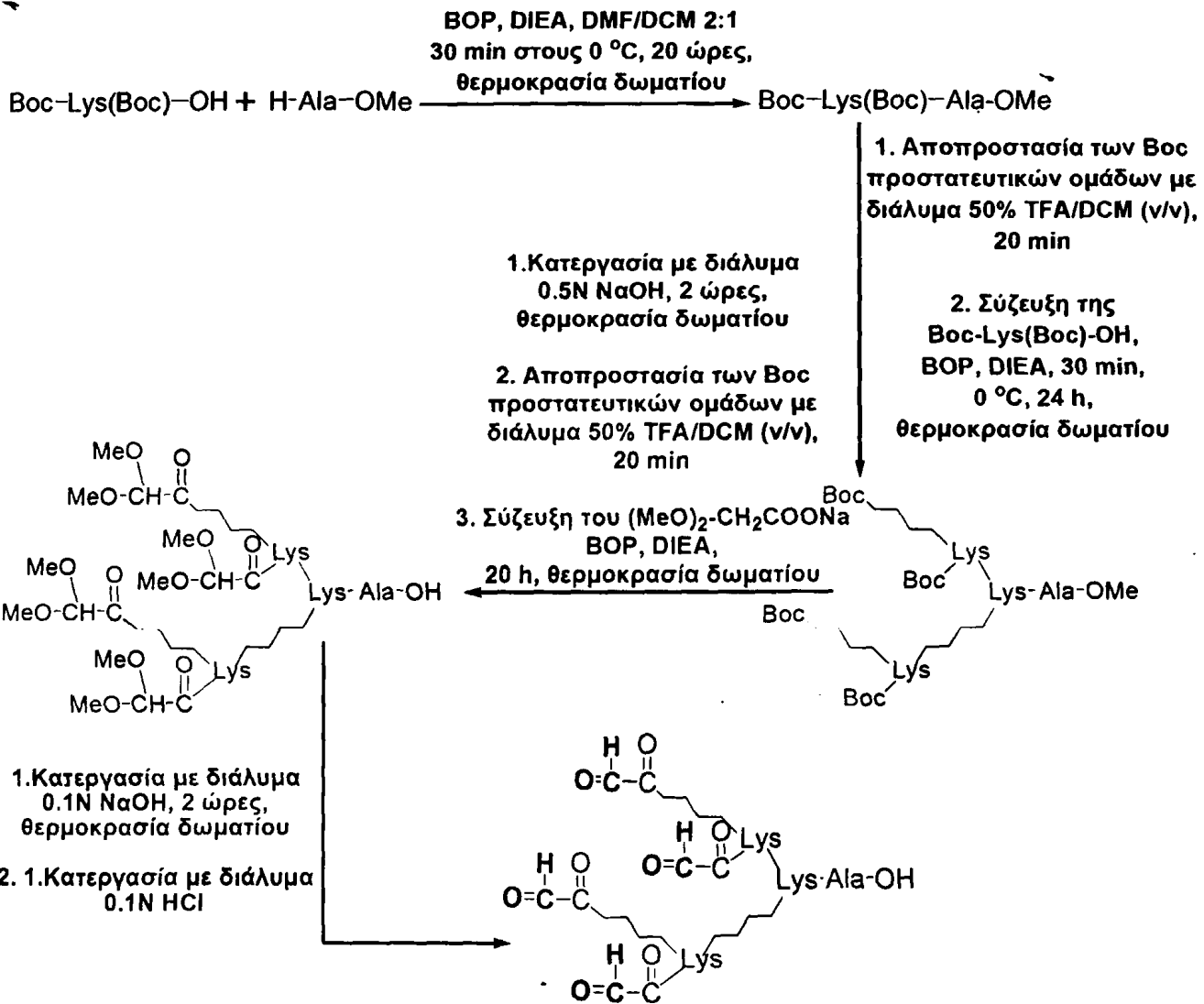
Σχήμα 4.4.3.1: Οξείδωση της *N*-τελικής σερίνης μετά από κατεργασία με NaIO_4 και σχηματισμός της αλδεϋδικής ομάδας

Παράλληλα, η αντίδραση οξείδωσης προς το σχηματισμό αλδεΐδης λαμβάνει χώρα και στην τροποποιημένη 2-άμινο αλκοολική παράπλευρη αλυσίδα της λυσίνης (Σχήμα 4.4.3.2). Η τελευταία προσέγγιση έχει εφαρμοστεί ευρύτατα στη σύνθεση μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, παρά το γεγονός ότι κάποιοι από τους προκύπτοντες δεσμούς παρουσιάζουν αστάθεια σε όξινο ή και σε βασικό pH.

Η προκύπτουσα αλδεϋδική ομάδα μπορεί να αντιδράσει χημειοεκλεκτικά σε υγρή φάση:

1. με μια *N*-τελική υδράζινο ομάδα προς το σχηματισμό δεσμού υδραζόνης [82-86] (Σχήμα 4.4.3.3),
2. με μια *N*-τελική αμινόξυ ακέτυλο ομάδα προς το σχηματισμό δεσμού οξίμης [82,84,87-89] (Σχήμα 4.4.3.3),
3. με μια *N*-τελική κυστεΐνη προς το σχηματισμό δεσμού θειαζολιδίνης [84,90-92] (Σχήμα 4.4.3.3)
4. και με μια *N*-τελική θρεονίνη προς το σχηματισμό δεσμού οξαζολιδίνης [92-95] (Σχήμα 4.4.3.3).



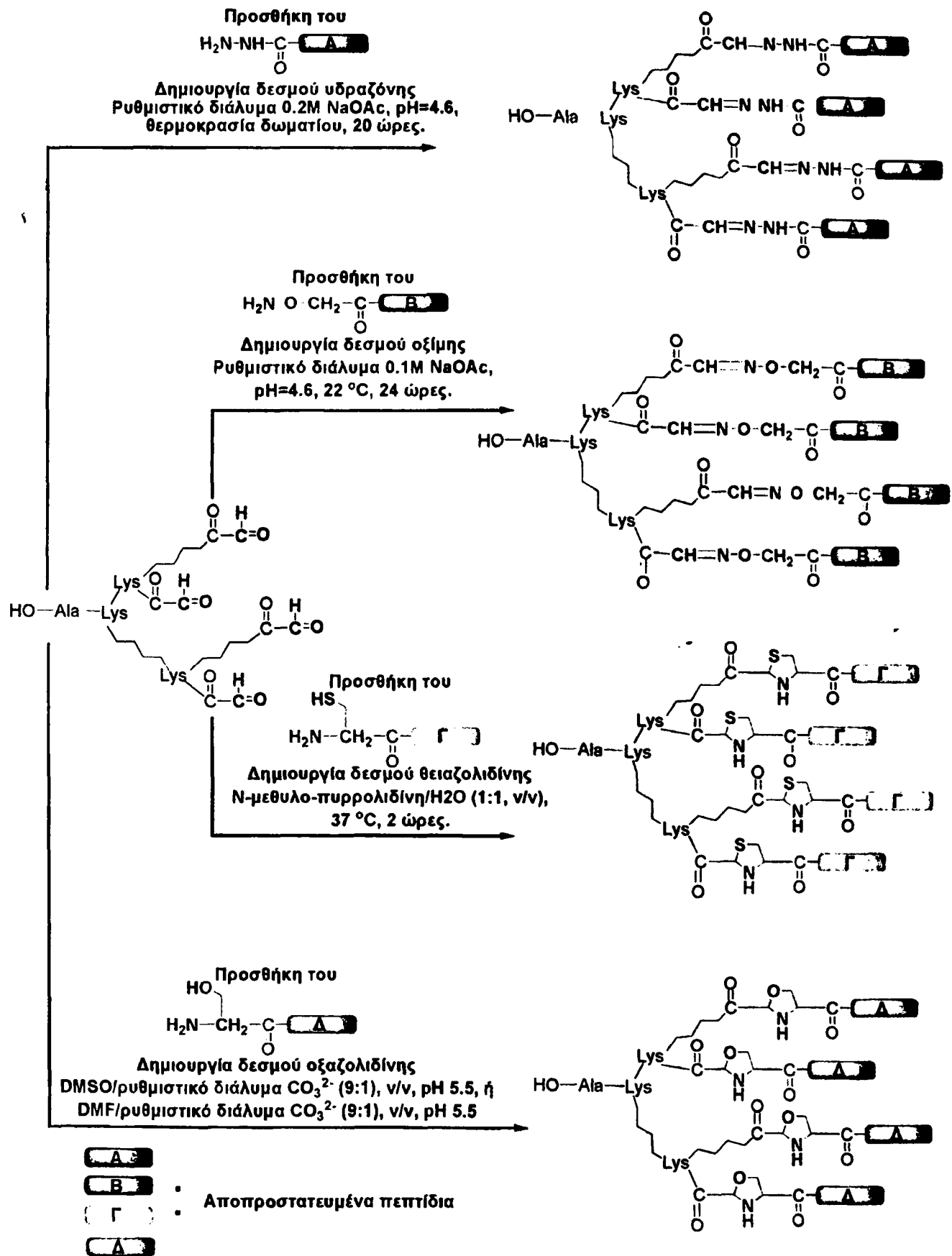


Σχήμα 4.4.3.2 Σχηματική περιγραφή της σύνθεσης του τροποποιημένου συστήματος πολλαπλών, αντιγονικών πεπτιδίων.

Πρόκειται για μια πυρηνόφιλη προσθήκη στον καρβονυλικό άνθρακα της αλδεϋδικής ομάδας η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως σε ασθενώς όξινες συνθήκες. Στο περιβάλλον αυτό, η πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου καθιστά τον άνθρακα ιδιαίτερα επιρρεπή σε μια πυρηνόφιλη προσβολή. Θεωρητικά, επικεντρώνοντας την προσοχή μας στο καρβονύλιο της αλδεϋδικής ομάδας, όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος της οξύτητας τόσο πιο αποτελεσματική και η αντίδραση προσθήκης. Στην πραγματικότητα όμως, η αντίδραση είναι ανέφικτη σε ισχυρά όξινες συνθήκες λόγω της πρωτονίωσης των πυρηνόφιλων μέσων με τον σχηματισμό των αντίστοιχων μη πυρηνόφιλων ιόντων τους ($-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}_3^+$, $-\text{OH} \rightarrow -\text{OH}_2^+$, κ.ο.κ).

Οι συνθήκες εκείνες οι οποίες θα επιτρέψουν την επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής ταχύτητας σε τέτοιου είδους αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσθήκης, είναι αποτέλεσμα ενός συμβιβασμού.





Σχήμα 4.4.3.3 Σχηματική περιγραφή των χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού δεσμών υδραζόνης, οξίμης, θειαζολιδίνης και οξαζολιδίνης, ανάμεσα σε συνθετικό φορέα (MAPs) και αποπροστατευμένα πεπτιδικά αντιγόνα.



Τα διαλύματα θα πρέπει να είναι αρκετά όξινα ώστε ένα μεγάλο ποσοστό της καρβονυλικής ένωσης να βρίσκεται στην πρωτονιωμένη του μορφή, συνυπολογίζοντας παράλληλα όμως και το γεγονός, ότι οι υπερβολικά χαμηλές τιμές pH θα μπορούσαν να επηρεάσουν δραστικά τις ιδιότητες του πυρηνόφιλου μέσου.

Έχει αποδειχθεί ότι οι προκύπτοντες δεσμοί υδραζόνης, οξίμης και θειαζολιδίνης είναι ιδιαίτερα σταθεροί σε φυσιολογικές τιμές pH [82,84], ενώ για το δεσμό οξαζολιδίνης έχει βρεθεί ότι είναι 10^4 φορές ασταθέστερος από τον αντίστοιχο της θειαζολιδίνης [96,97].

4.4.4 Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού

Μια από τις σπουδαιότερες χημειοεκλεκτικές μεθοδολογίες πρόσδεσης πεπτιδικής φύσης μορίων, με ευρύτατη χρήση στην ανάπτυξη πρωτεϊνών και διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής μακρομοριακών συμπλεγμάτων, είναι οι εκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού. Η μεθοδολογία αποτελεί παραλλαγή των χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού θειοεστερικού δεσμού και περιλαμβάνει την αντίδραση μεταξύ της C-τελικής θειόλης (π.χ. κυστεΐνη, ή τροποποιημένο C-τελικό άκρο) μιας πεπτιδικής αλληλουχίας, με την αντίστοιχη N-τελική αλογόνο-ακέτυλο ομάδα (ή μαλεϊμιδο ομάδα) της άλλης.

Η σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων τα οποία φέρουν C-τελικό άκρο ως θειόλη, πραγματοποιείται τόσο με την Boc/Bzl [98] όσο και με την Fmoc/tBu [99] στρατηγική, κατά την απομάκρυνση τους από τροποποιημένα πολυμερικά υποστρώματα, τα οποία φέρουν ομοιοπολικά προσδεμένους κατάλληλους συνδέσμους (linkers).

Αντίστοιχα, η εισαγωγή της απαραίτητης για την χημειοεκλεκτική αντίδραση αλογόνο-ακετυλομάδας μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους, χρησιμοποιώντας μια σειρά από εμπορικά διαθέσιμα αλογονοπαράγωγα. Τα δημοφιλέστερα από αυτά περιγράφονται στη συνέχεια:

⌘ **Αλογονοακέτυλο αλογονίδια:** Πρόκειται για αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την εισαγωγή της αλογόνο-ακετυλομάδας στις αντίστοιχες ελεύθερες αμινομάδες της πεπτιδικής αλληλουχίας. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα χλώρο-, βρώμο-, ιώδο-ακέτυλο χλωρίδια, καθώς και όλα τα αντίστοιχα βρωμίδια και ιωδίδια. Η αντίδραση αλογονοακετυλίωσης λαμβάνει χώρα σε ασθενώς βασικές συνθήκες τόσο σε στερεά όσο και σε υγρή φάση, με τη χρήση 5πλάσιας τουλάχιστον περίσσειας του αντιδραστήριου για κάθε ελεύθερη αμινομάδα. Ιδιαίτερη μέριμνα απαιτείται κατά τη χρήση των φωτοευαίσθητων βρωμιδίων τα οποία απαιτούν αυστηρώς άνυδρες συνθήκες, περιβάλλον αργού και σκότος.

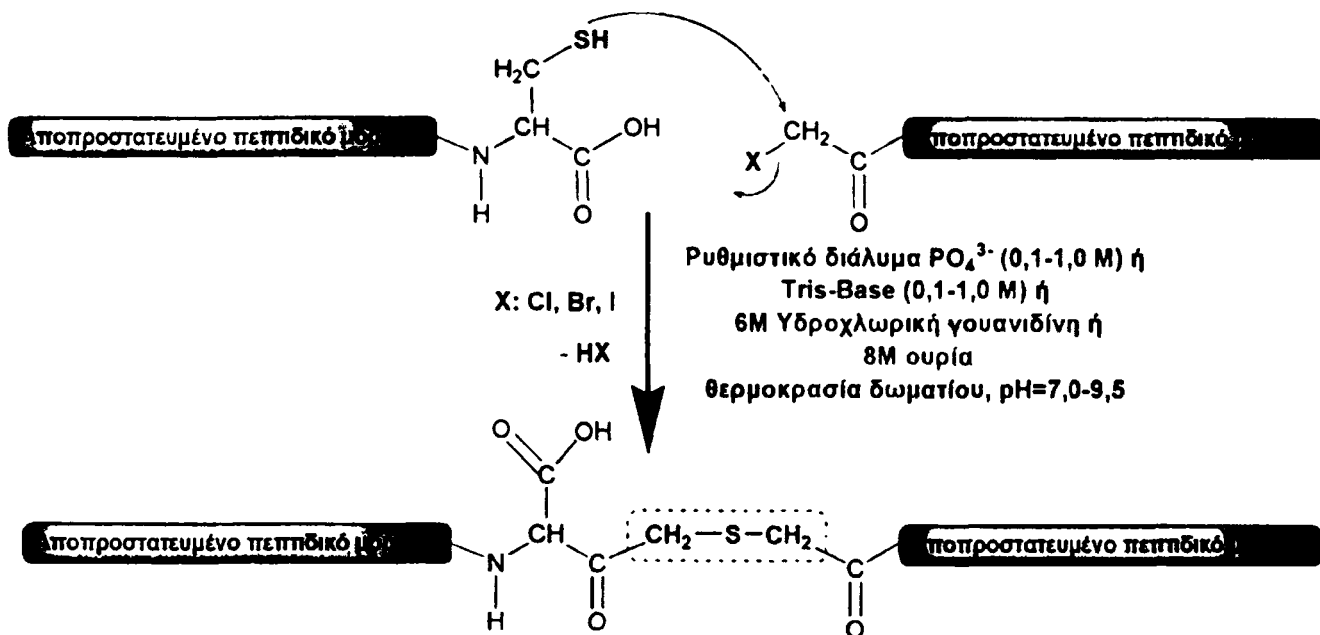
⌘ **Αλογονοξέα:** Η διαδικασία αλογονοακετυλίωσης των στοχευμένων ελεύθερων αμινομάδων πραγματοποιείται σε στερεά φάση με τη χρήση αλογονοξέων, όπως το χλώρο-, βρώμο- και ιώδο-οξικό οξύ. Όπως και στις αντιδράσεις σύζευξης των αμινοξέων, έτσι και σ' αυτήν την περίπτωση, απαιτείται η ^{ενεργοποίηση} ενεργοποίηση της αντίστοιχης καρβοξυλομάδας του αντιδραστήριου αλογονοακετυλίωσης, με το σχηματισμό του απαραίτητου για την ολοκλήρωση της αντίδρασης



ανιδρύτη [100,101]. Το αντιδραστήριο σύζευξης το οποίο χρησιμοποιείται ευρύτατα σε τέτοιου είδους αντιδράσεις είναι το διίσοπρότυλο-καρβοδιιμίδιο (DIC), ενώ ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της αντίδρασης ανέρχεται στις 2-3 ώρες.

✂ **Αλογονοξικοί ανιδρύτες:** Παράλληλα, η αντίδραση αλογονοακετυλίωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί απ'ευθείας είτε σε στερεά είτε σε υγρή φάση, με τη χρήση των αντίστοιχων αλογονοξικών ανιδρυτών [102]. Οι αντιδράσεις αυτές είναι κατά κανόνα ταχύτατες και μάλιστα όταν η διαδικασία αλογονοακετυλίωσης λαμβάνει χώρα σε υγρή φάση, ολοκληρώνεται σε μόλις 10-15 λεπτά.

Ο σχηματισμός διαμοριακού θειοαιθερικού δεσμού (Σχήμα 4.4.4.1) μεταξύ της ελεύθερης σουλφιδριλικής ομάδας του ενός πεπτιδικού τμήματος και της αντίστοιχης αλογονοακετύλο ομάδας του άλλου, είναι μια πυρηνόφιλη αντίδραση η οποία προχωρά με τον S_N2 μηχανισμό.



Σχήμα 4.4.4.1 Σχηματική περιγραφή της αντίδρασης σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού μεταξύ αποπροστατευμένων πεπτιδικών αλληλουχιών.

Παράγοντες και μεταβλητές που επηρεάζουν την ταχύτητα της εν λόγω αντίδρασης εκτός από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων μέσων, είναι:

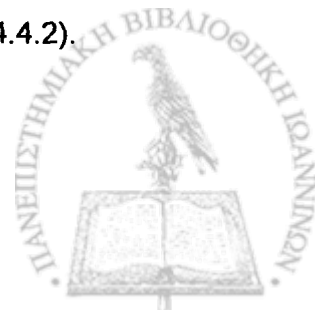
☑ **pH και προσβάλλον πυρηνόφιλο μέσο:** Η αντίδραση απαιτεί κατά κανόνα ουδέτερες ή και ασθενώς βασικές συνθήκες, με το pH να διαμορφώνεται σε τιμές μεταξύ 7,0 και 9,5. Μελέτες της επίδρασης του pH κατά τη διάρκεια της εν λόγω αντίδρασης, έδειξαν ότι η ταχύτητά της είναι ανάλογη της τιμής του pH [103]. Ως πυρηνόφιλο μέσο μπορεί να δράσει οποιαδήποτε ουδέτερη ή αρνητικά φορτισμένη ένωση η οποία διαθέτει ένα τουλάχιστον ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων. Στην προκειμένη περίπτωση, η αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης οφείλεται στην ενίσχυση της πυρηνοφιλικότητας του μέσου, λόγω της αποπρωτονίωσης της θειόλο-ομάδας (-SH) και το σχηματισμό των ισχυρότερων πυρηνόφιλων θειολικών ανιόντων ($-\text{S}^-$) [104,105].



- ☑ **Αποχωρούσα αλογονομάδα:** Η ταχύτητα σχηματισμού του θειοαιθερικού δεσμού είναι άμεσα εξαρτώμενη από η φύση της αποχωρούσας αλογονομάδας [104,105]. Ως καλύτερη θα μπορούσε να χαρακτηριστεί εκείνη η οποία σταθεροποιεί περισσότερο το αρνητικό της φορτίο, δεδομένου ότι αποβάλλεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υπό την μορφή ιόντος (X^-). Η σταθερότητα ενός ανιόντος συνδέεται άμεσα με τη βασικότητα, επομένως ιδανικές για την αντίδραση αποχωρούσες αλογονομάδες είναι αυτές που χαρακτηρίζονται ως ασθενέστερες βάσεις ($I^- > Br^- > Cl^-$).
- ☑ **Διαλύματα-Διαλύτες:** Μια άλλη μεταβλητή που μπορεί να λειτουργήσει ανασταλτικά στην ταχύτητα σχηματισμού του θειοαιθερικού δεσμού είναι και η επιλογή του συστήματος διαλυτών, μέσα στο οποίο θα λάβει χώρα η χημειοεκλεκτική αντίδραση. Οι πολικοί πρωτικοί διαλύτες, όπως το H_2O , η μεθανόλη, η αιθανόλη κ.ο.κ., θεωρούνται από τις χειρότερες επιλογές, διότι έχουν την τάση να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου επιδιαλυτώνοντας το πυρηνόφιλο μέσο [104,105]. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η ελάττωση της ενέργειας και η σταθεροποίηση του αντιδρώντος πυρηνόφιλου, με φυσική συνέπεια την επιβράδυνση της αντίδρασης. Αντίθετα, η χρησιμοποίηση πολικών μη πρωτικών διαλυτών όπως το ακετονιτρίλιο (CH_3CN) και το διμέθυλο-φορμαμίδιο (DMF) συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης, δεδομένου ότι οι συγκεκριμένοι διαλύτες δεν επιδιαλυτώνουν το πυρηνόφιλο μέσο, αυξάνοντας την ενέργειά του και κατά συνέπεια την πυρηνόφιλη ισχύ του.

Το κυριότερο μειονέκτημα της συνθετικής αυτής στρατηγικής είναι η σχηματισμός διμερών παραπροϊόντων, τα οποία προκύπτουν κατά τη δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών γεφυρών μεταξύ των ελεύθερων σουλφιδριλομάδων των κυστεϊνών [14,106]. Ο σχηματισμός του θειοαιθερικού δεσμού είναι ταχύτερος από αυτόν του δισουλφιδικού λόγω της ηλεκτραρνητικότητας του αλογονοιόντος, η οποία καθιστά τον άνθρακα της μεθυλενομάδας πιο ηλεκτροθετικό και ευπρόσβλητο σε πυρηνόφιλη επίθεση. Παρόλα αυτά το πρόβλημα υφίσταται και μπορεί να γίνει ιδιαίτερα σοβαρό αν δεν εξασφαλιστούν οι συνθήκες εκείνες, οι οποίες θα επιτρέψουν την ταχύτερη δυνατή ολοκλήρωση της αντίδρασης. Παράλληλα, ο διμερισμός σε ένα βαθμό μπορεί να ελεγχθεί, με την προσεκτική και σε μικρές ποσότητες προσθήκη στο μείγμα της αντίδρασης, της ουσίας που φέρει στον πεπτιδικό της σκελετό την κυστεϊνή ή την τροποποιημένη θειόλη.

Ωστόσο πρόκειται για την δημοφιλέστερη χημειοεκλεκτική τεχνική, δεδομένου ότι ο σχηματιζόμενος θειοαιθερικός δεσμός και κατ' επέκταση τα προκύπτοντα προϊόντα είναι ιδιαίτερα σταθερά σε *in vivo* συνθήκες που επικρατούν στα διάφορα βιολογικά συστήματα. Ενζυμικές μελέτες σχετικές με τη σταθερότητα του θειοαιθερικού δεσμού, ανέδειξαν την μεγάλη του ανθεκτικότητα σε φαινόμενα αποικοδόμησης στα διάφορα βιολογικά υγρά [107]. Οι εφαρμογές της τεχνικής επεκτάθηκαν ραγδαία στον τομέα της ανάπτυξης μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, με την ομοιοπολική πρόσδεση αντιγονικών ή και ανοσογονικών επιτόπων σε διάφορα δένδρομερή υποστρώματα (συνθετικοί φορείς) [106,108-111] (Σχήμα 4.4.4.2).



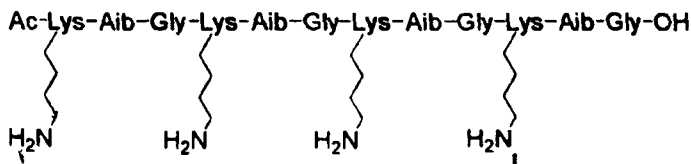
Σύνθεση του ευθύγραμμου υποστρώματος SOC₄
σε ρητίνη Wang, σύμφωνα με την
Fmoc/tBu συνθετική στρατηγική

1. Απομάκρυνση της N-τελικής Fmoc προστατευτικής ομάδας με διάλυμα 20% piperidine/DMF (v/v)

2. Ακετυλίωση του N-τελικού άκρου με τη χρήση 30 φορές περισσεύσας οξικού ανυδρίτη σε DCM, 2x20min

3. Απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων και αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές με διάλυμα 95/2,5/2,5 TFA /H₂O/TIS (v/v/v), 3 ώρες, θερμοκρασία δωματίου

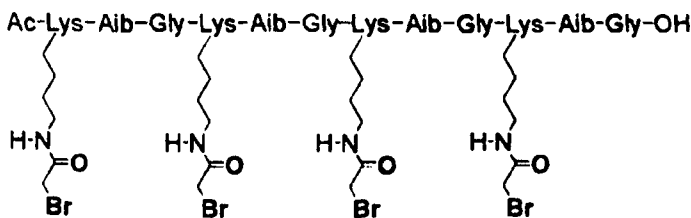
4. Καθαρισμός και χαρακτηρισμός του προϊόντος με RP-HPLC και ESI-MS, αντίστοιχα



HO (R)

1. Βρωμοακετυλίωση των ελεύθερων -NH₂ σε υγρή φάση με 2eq. BrCH₂COBr, 4eq. DIEA, υπό αργό, σκότος, 0°C, 15-20 min

2. Καθαρισμός και χαρακτηρισμός του προϊόντος με RP-HPLC και ESI-MS, αντίστοιχα



Χημειοεκλεκτική αντίδραση σε υγρή φάση

1. 0.2M Tris-Base pH=8,2/CH₃CN (3:1) v/v, υπό αργό, σκότος, θερμοκρασία δωματίου, 8-10 ώρες

2. Καταβύθιση του πεπτιδίου με παγωμένο διαιθυλαιθέρα, κατάψυξη για 2 ώρες, παραλαβή του πεπτιδίου με CH₃COOH 2N, λυοφιλοποίηση

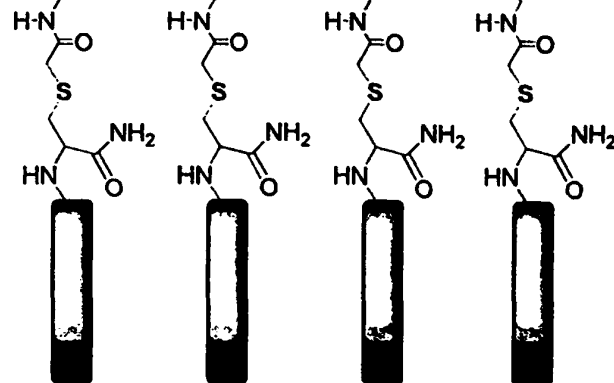
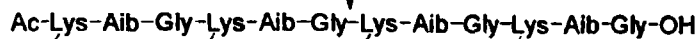
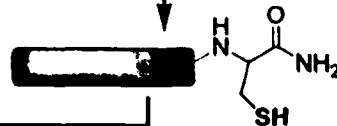
3. Καθαρισμός και χαρακτηρισμός του προϊόντος με Dialysis (cutoff<3500Da), RP-HPLC και ESI-MS, αντίστοιχα

Σύνθεση του ευθύγραμμου επιτόπου ο οποίος φέρει C-τελική κυστεΐνη, σε ρητίνη Rink-Amide, σύμφωνα με την Fmoc/tBu συνθετική στρατηγική

1. Απομάκρυνση της N-τελικής Fmoc προστατευτικής ομάδας με διάλυμα 20% piperidine/DMF (v/v)

2. Απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων και αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές με διάλυμα 94/2,5/2,5/1,0 TFA /H₂O/EDT/TIS (v/v/v/v), 3 ώρες, θερμοκρασία δωματίου

4. Καθαρισμός και χαρακτηρισμός του προϊόντος με RP-HPLC και ESI-MS, αντίστοιχα



- Αποπροστατευμένο πεπτιδικό τμήμα

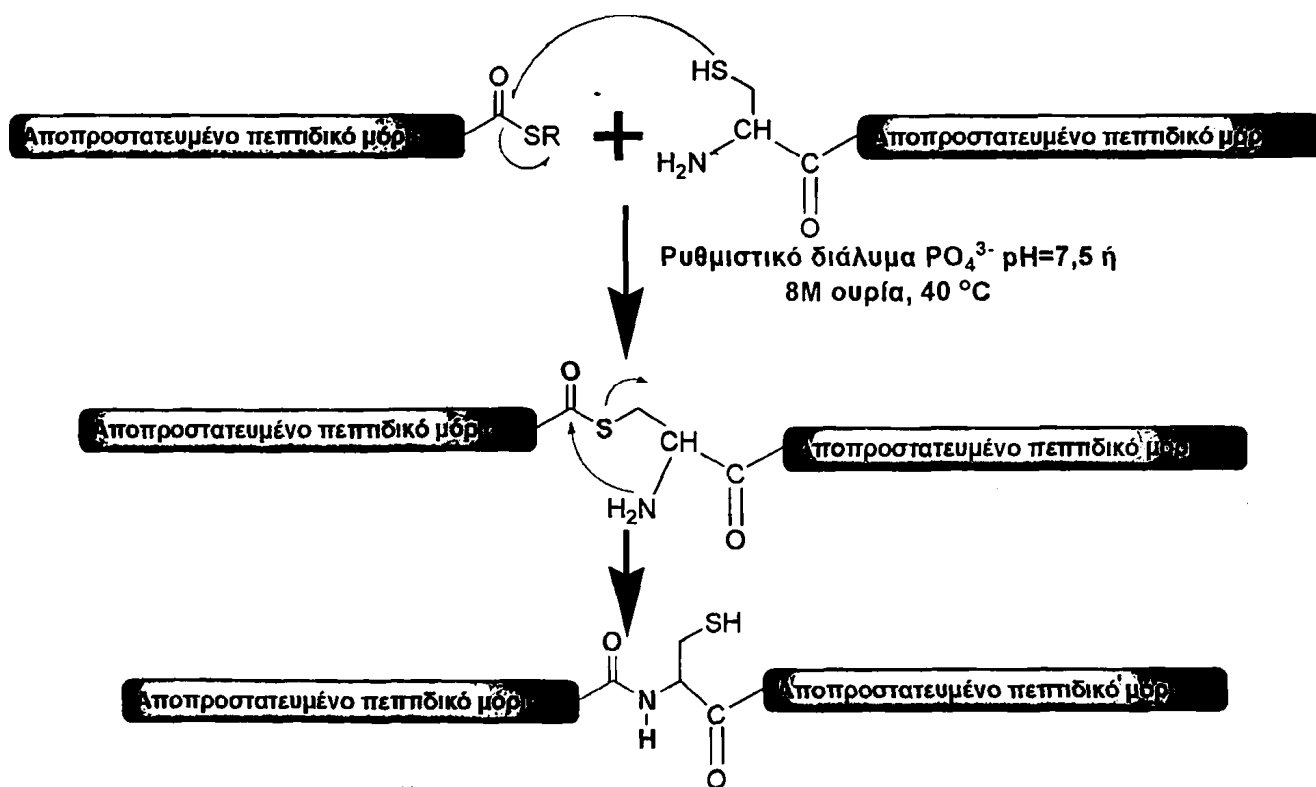
Σχήμα 4.4.4.2 Σχηματική περιγραφή ενός τυπικού πρωτοκόλλου ανάπτυξης τετραεπιτοπικού μακρομορίου SOC, μέσω χημειοεκλεκτικών μεθόδων πρόσδεσης επιτόπων και σχηματισμού θειοαιθερικών δεσμών.



Παράλληλα έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα στην ανάπτυξη πρωτεϊνικής φύσης μορίων με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τη δημοσιευμένη εργασία στο *Tetrahedron* το 1995 από τον D.G. McCafferty, η οποία πραγματεύονταν τη ανάπτυξη της εξωκυτταρικής ρυθμιστικής πρωτεΐνης *Tripod* (127 αμινοξικά κατάλοιπα) [112] με τις χημειοεκλεκτικές μεθόδους σχηματισμού θειοαιθερικών δεσμών. Μια πιο πρόσφατη μελέτη του 2001 (*Journal of Biological Chemistry*) από την ερευνητική ομάδα του J.A. Wilce, αναπτύσσει τη σύνθεση σε 3 βήματα της πρωτεΐνης *Transthyretin* (127 αμινοξικά κατάλοιπα) [113], υπεύθυνης για την μεταφορά των θυρεοειδών ορμονών και της ρετινόλης στον ορό του αίματος.

4.4.5 Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σχηματισμού φυσικού αμιδικού δεσμού (Native Chemical Ligation)

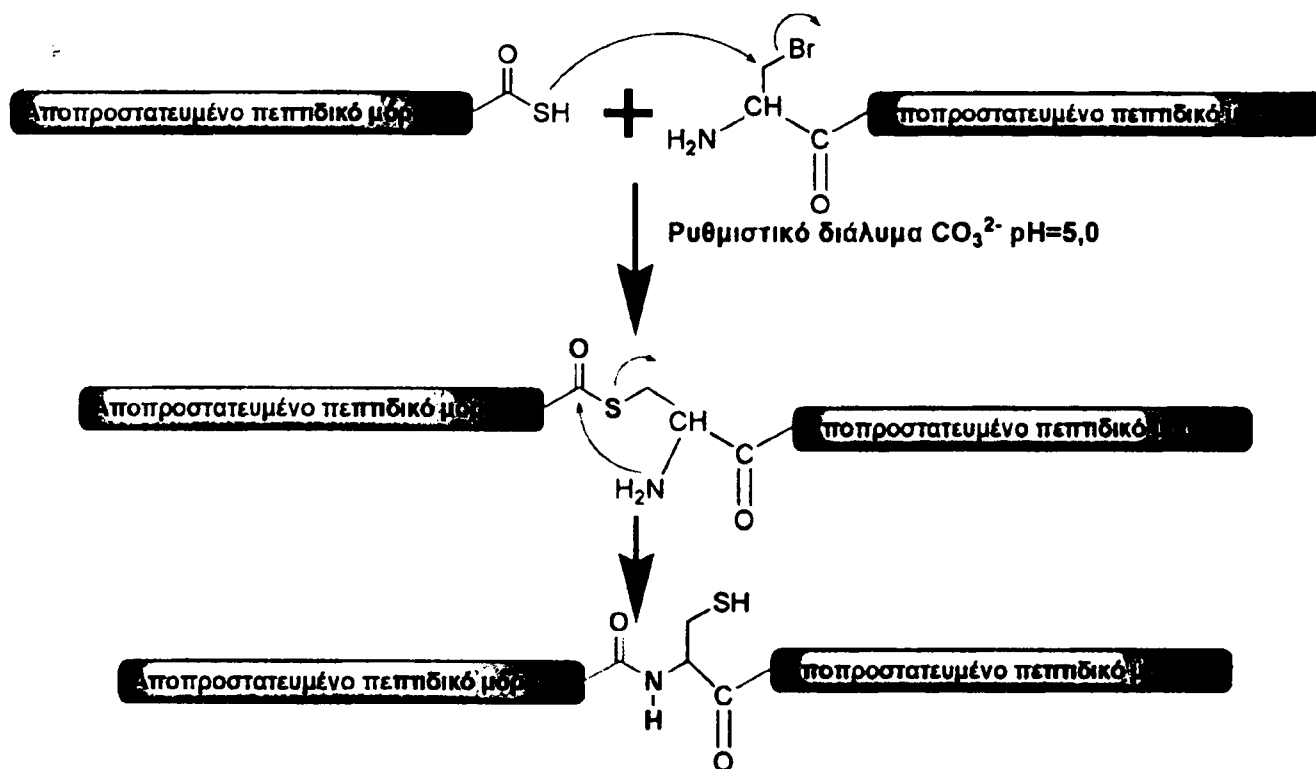
Οι χημειοεκλεκτικές τεχνικές σύνθεσης μακρομοριακών συμπλεγμάτων έγιναν περισσότερο ελκυστικές μετά από την εισαγωγή μεθόδων σχηματισμού φυσικών αμιδικών δεσμών μεταξύ των αποπροστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων (native chemical ligation) [114,115]. Η στρατηγική περιλαμβάνει την διαμοριακή εκλεκτική χημική αντίδραση μεταξύ της C-τελικής θειοεστερικής ομάδας ενός αποπροστατευμένου πεπτιδικού τμήματος με την N-τελική κυστεΐνη ενός δευτέρου και τον σχηματισμό φυσικού αμιδικού δεσμού σε 2 στάδια (Σχήμα 4.4.5.1). Σε πρώτη φάση σχηματίζεται ένας θειοεστερικός δεσμός ο οποίος όμως αναδιατάσσεται αυθόρμητα μέσω μιας S→N άκυλο μετάθεσης.



Σχήμα 4.4.5.1 Αντίδραση σχηματισμού φυσικού αμιδικού δεσμού (σε 2 στάδια) μεταξύ μιας τροποποιημένης C-τελικής θειοεστερικής ομάδας και μιας N-τελικής κυστεΐνης.



Παραλλαγή της παραπάνω τεχνικής αποτελεί ο σχηματισμός αμιδικού δεσμού σε 2 στάδια, μέσω της πυρηνόφιλης προσβολής ενός C-τελικού θειοοξέος σε μια N-τελική β-βρωμοαλανίνη [116] (Σχήμα 4.4.5.2).



Σχήμα 4.4.5.2 Αντίδραση σχηματισμού φυσικού αμιδικού δεσμού (σε 2 στάδια) μεταξύ μιας τροποποιημένης C-τελικής θειοοξικής ομάδας και μιας N-τελικής β-βρωμοαλανίνης.

Η συγκεκριμένη συνθετική στρατηγική μπορεί παράλληλα, υπό συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, να εφαρμοστεί και ενδομοριακά προς τον σχηματισμό κυκλοποιημένων πρωτεϊνικών μακρομορίων [117,118].

Ανακεφαλαιώνοντας θα πρέπει να επισημάνουμε, ότι η εξ' ολοκλήρου χημική σύνθεση πρωτεϊνικής φύσης μακρομορίων θεωρείται πλέον η αποτελεσματικότερη συνθετική προσέγγιση για την ανάπτυξη τέτοιου είδους πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Επιπλέον, ανεξάρτητα από τις προαναφερθείσες εφαρμογές των μεθόδων, θα πρέπει να τονιστεί και η τεράστια συμβολή της εξ' ολοκλήρου χημικής σύνθεσης στην ανάπτυξη πρωτεϊνών οι οποίες είναι αδύνατον να εκφραστούν με τις κλασικές βιολογικές τεχνικές λόγω υψηλής τοξικότητας.

Η τελική επιλογή της συνθετικής στρατηγικής που πρόκειται να ακολουθηθεί για την ανάπτυξη ενός μακρομοριακού συμπλέγματος, δεδομένου ότι όλες οι μεθοδολογίες έχουν πλεονεκτήματα αλλά και περιορισμούς, εξαρτάται από τον συνυπολογισμό μια σειράς παραγόντων με σημαντικότερο ενδεχομένως τη φύση του επιθυμητού μορίου.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ
ΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ
ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΝΙΝΗΣ**



Ο σχεδιασμός και η επιλογή κατάλληλων αλληλουχιών των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης, με στόχο την παραγωγή αντισωμάτων και την χρησιμοποίησή τους ως αντιδραστηρίων ανίχνευσης κατά ζεύγη σε μια ανοσοενζυμική δοκιμή E.L.I.S.A. τύπου "sandwich", στηρίχθηκε στο γεγονός ότι τα αντισώματα αυτά θα πρέπει να αναγνωρίζουν διαφορετικές περιοχές του συμπλόκου της τροπονίνης, με ισχυρή εξειδίκευση και συγγένεια. Η προσέγγιση του θέματος πραγματοποιήθηκε με τους παρακάτω τρόπους:

1. Έλαβε χώρα συστηματική αντιγονική χαρτογράφηση των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης, μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων πρόβλεψης αντιγονικότητας. Το τμήμα της μελέτης που αφορά τη χαρτογράφηση των αντιγονικών περιοχών των τροπονινών I και T, πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της αντίστοιχης μεταπτυχιακής διατριβής [1]. Στην παρούσα εργασία παραθέτουμε τα αποτελέσματα της έρευνας για την καρδιακή ισομορφή της τροπονίνης C.
2. Έχοντας θέσει ως στόχο την παραγωγή αντισωμάτων που θα αναγνωρίζουν εξειδικευμένα καρδιακές και όχι σκελετικές τροπονίνες, διερευνήσαμε και επιλέξαμε εκείνες τις αλληλουχίες των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης I και T, οι οποίες παρουσιάζουν την ελάχιστη δυνατή ομολογία σε σύγκριση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών, χρησιμοποιώντας υπολογιστικά προγράμματα ομολογίας [1].
3. Επιπλέον επιλέξαμε αλληλουχίες, από τις οποίες έχει αποδειχθεί βιβλιογραφικά ότι μετά από ανοσοποιήσεις πειραματόζων, παράγονται αντισώματα τα οποία δεν εμπλέκονται σε διασταυρωτές αντιδράσεις με παρεμβατικούς παράγοντες των ορών υγιών και ασθενικών πληθυσμών, κατά την διεξαγωγή του διαγνωστικού τεστ ανίχνευσης της τροπονίνης [Κεφάλαιο 3, βιβλ. 105-107].

5.1 Συστηματική αντιγονική χαρτογράφηση των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης

Η χαρτογράφηση των αντιγονικών περιοχών της τροπονίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων πρόβλεψης αντιγονικότητας, η λογική των οποίων στηρίζεται στην πρόβλεψη των ανοσογονικών περιοχών μιας πρωτεΐνης, βασιζόμενο σε δεδομένα τα οποία προκύπτουν από κλίμακες (αλγόριθμους) υδροφιλικότητας [2], υδροφοβικότητας [3-6] και αντιγονικότητας [7-9] των 20 φυσικών αμινοξέων. Τα προγράμματα αυτά είναι διαθέσιμα για τους χρήστες του διαδικτύου μέσα από την ιστοσελίδα www.expasy.ch. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και το διαθέσιμο μέσω διαδικτύου υπολογιστικό πρόγραμμα *Peptide Companion* (free trial), το οποίο παρέχει εξίσου αντίστοιχες δυνατότητες αναλύσεων. Στη συνέχεια παρατίθενται σχηματικά τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών [1], αναφορικά με την αντιγονική χαρτογράφηση των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης I (Σχήμα 5.1.1) και T (Σχήμα 5.1.2).



Human cardiac isoform of troponin I

```
1 45 50
| | |
ADGSSDAAREPRPAPAPIRRRSSNYRAYATEPHAKKKSISASRKLQLKT

51 61 80 96 100
| | | | |
LLLQIAKQELEREAEERRGEEKGRALSTRCQPLELAGLGF AELQDLCRQLH

101 120 130 150
| | | |
ARVDKVDEERYDIEAKVTKNITEIADLTQKIFDLRGKFKRPTLRRVRISA

151 166 195 200
| | | |
DAMMQALLGARAKESLDLRAHLKQVKKEDTEKENREVGDWKKNIDALSGM

201 209
| |
EGRKKKFES
```

Σχήμα 5.1.1 Σχηματική παρουσίαση των πιθανών αντιγονικών περιοχών της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I (επισημασμένες με κόκκινο χρώμα) στις οποίες συγκλίνουν οι προβλέψεις όλων των αλγορίθμων που χρησιμοποιήθηκαν.

Human cardiac isoform of troponin T

```
1 11 35 50
| | | |
SDIEEVVVEEYEEEEQEEAAVEEEEDWREDEDEQEEAAEEDAEAEAEETEET

51 75 95 100
| | | |
RAEEDDEEEEAKEAEDGPMEE SKPKPRSFMPNLVPPKIPDGERVDFDDIH

101 107 137 150
| | | |
RKRMEKDLNELQALIEAHFENRKKEEEELVSLKDRIERRRAERAEQQRIR

151 180 200
| | |
NEREKERQNLAEERARREEEENRRKAEDEARKKKALS NMMHFGGYIQKQ

201 205 226 235 244 250
| | | | | |
AQTERKSGKRQTEREKKKKI LAERRKVL AIDHLNEDQLREKAKE LWQSIY

251 254 263 297
| | | |
NLEAEKFDLQEKFKQQKYEINVLRNRINDNQKVS KTRGKAKVTGRWK
```

Σχήμα 5.1.2 Σχηματική παρουσίαση των πιθανών αντιγονικών περιοχών της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης T (επισημασμένες με κόκκινο χρώμα) στις οποίες συγκλίνουν οι προβλέψεις όλων των αλγορίθμων που χρησιμοποιήθηκαν.



Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η συστηματική αντιγονική χαρτογράφηση της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων SWISS-PROT μέσω της ιστοσελίδας του διαδικτύου <http://www.expasy.ch/sprot/>, εισάγαμε στα προγράμματα αντιγονικής χαρτογράφησης της ιστοσελίδας καθώς και στο υπολογιστικό πρόγραμμα *Peptide Companion*, την πρωτεϊνική αλληλουχία της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C (cTnC HUMAN, code: P02590) και στη συνέχεια λάβαμε τα προφίλ υδροφιλικότητας, υδροφοβικότητας και αντιγονικότητας, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα τους παρακάτω αλγόριθμους (Πίνακας 5.1.1):

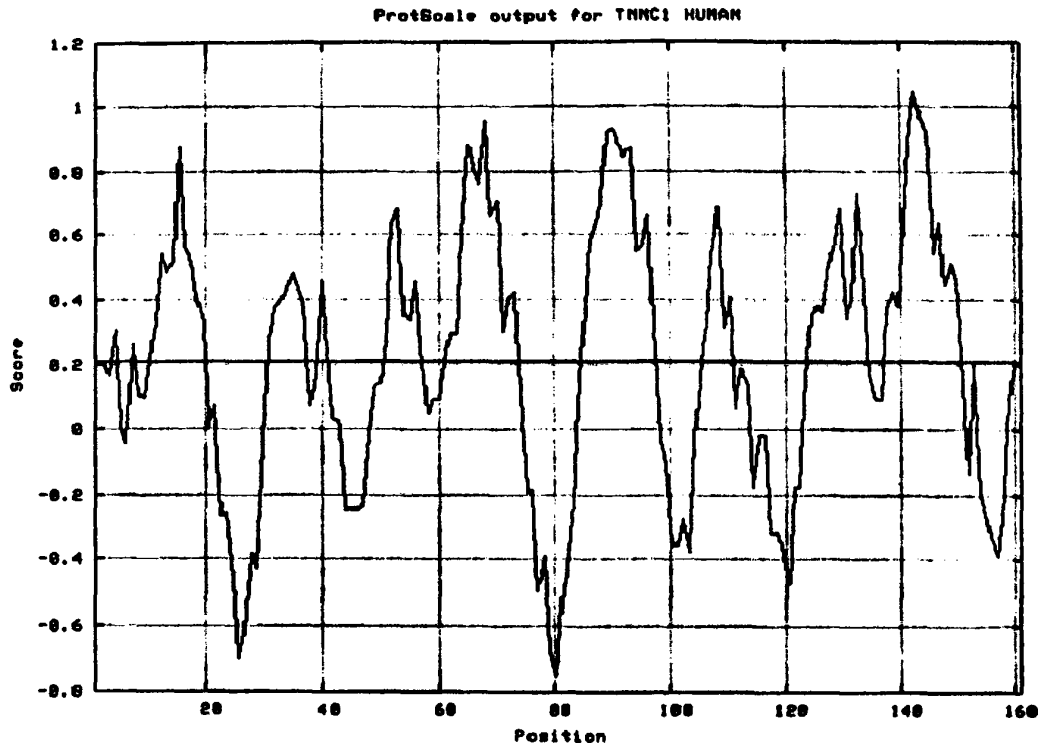
Πίνακας 5.1.1 Αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιγονική χαρτογράφηση της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C.

| | Αλγόριθμοι υδροφιλικότητας | Αλγόριθμοι υδροφοβικότητας | Αλγόριθμοι αντιγονικότητας |
|---|--|---|--|
| 1 | Αλγόριθμος υδροφιλικότητας του Parker [2] | Αλγόριθμος υδροφοβικότητας του Manavalan [3] | Αλγόριθμος αντιγονικότητας του Welling [7] |
| 2 | | Αλγόριθμος υδροφοβικότητας του Janin [4] | Αλγόριθμος αντιγονικότητας των Hopp/Woods [8] |
| 3 | | Αλγόριθμος υδροφοβικότητας των Fauchere/Pliska [5] | |
| 4 | | Αλγόριθμος αντιγονικότητας των Kyte/Doolittle [6] | |



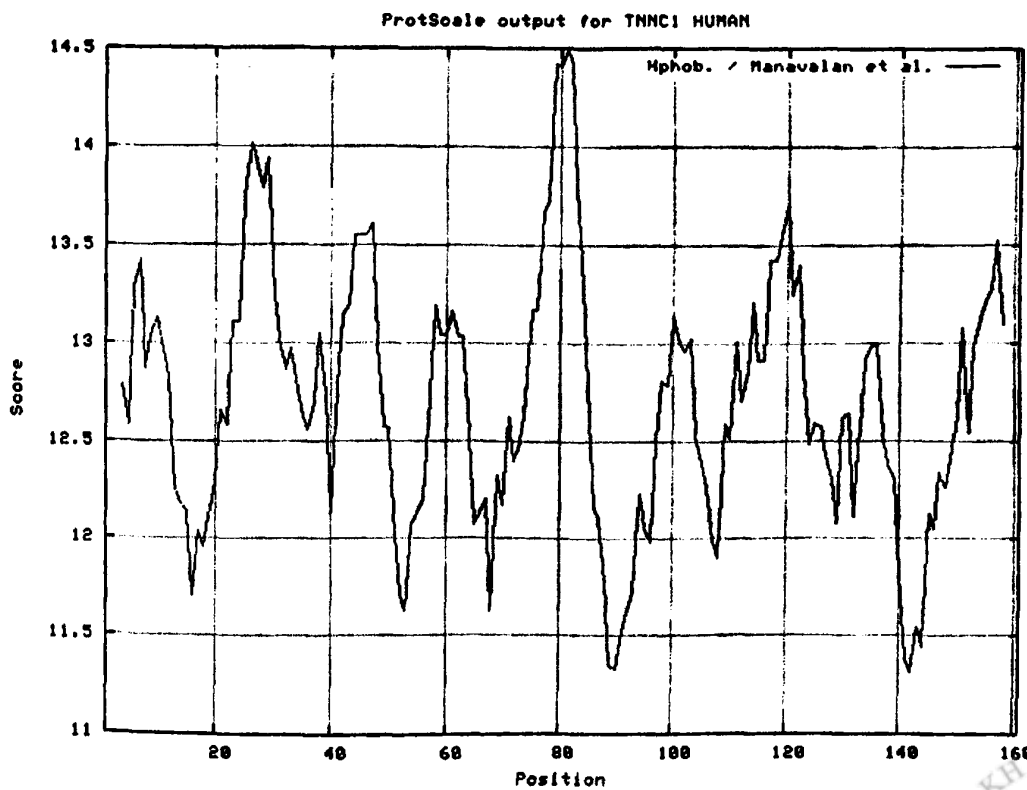
Αναλυτικά:

➔ Προφίλ υδροφιλικότητας της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C

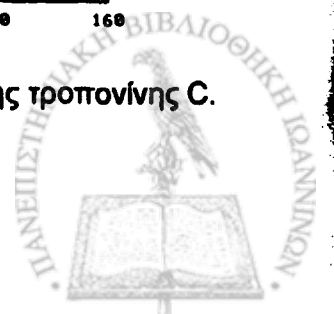


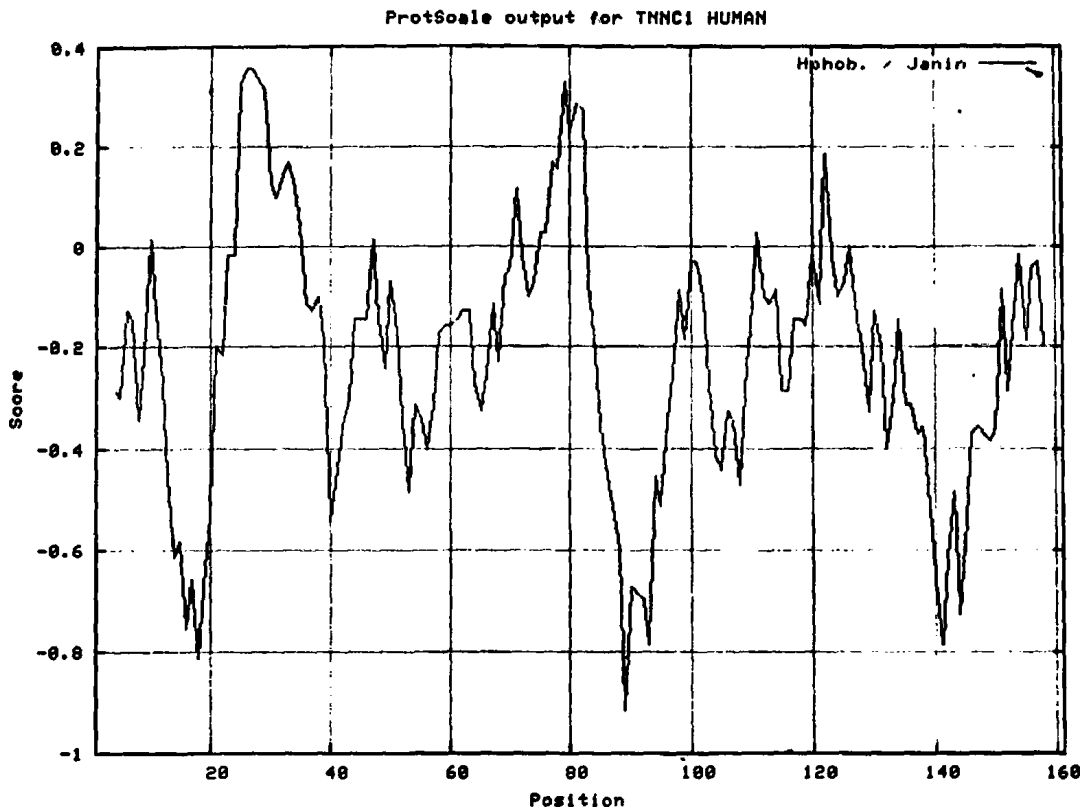
Σχήμα 5.1.3 Προφίλ υδροφιλικότητας Parker της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C.

➔ Προφίλ υδροφοβικότητας της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C

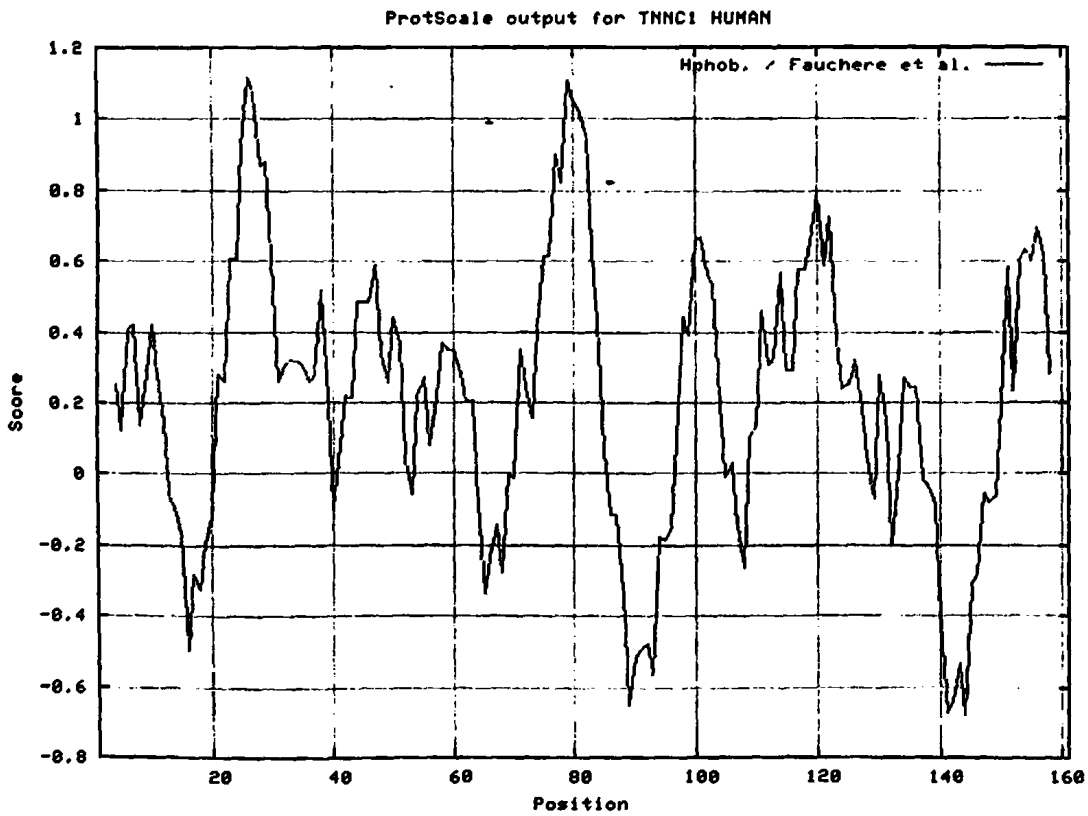


Σχήμα 5.1.4 Προφίλ υδροφοβικότητας Manavalan της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C.

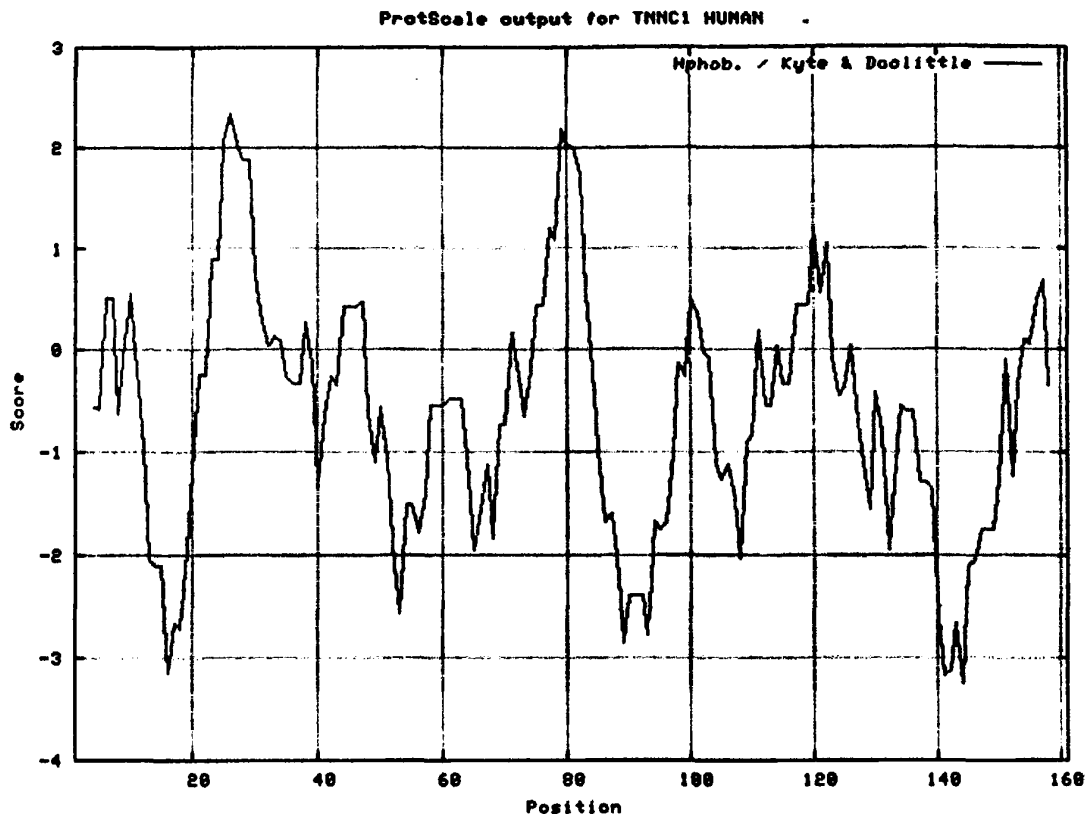




Σχήμα 5.1.5 Προφίλ υδροφοβικότητας Janin της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C.

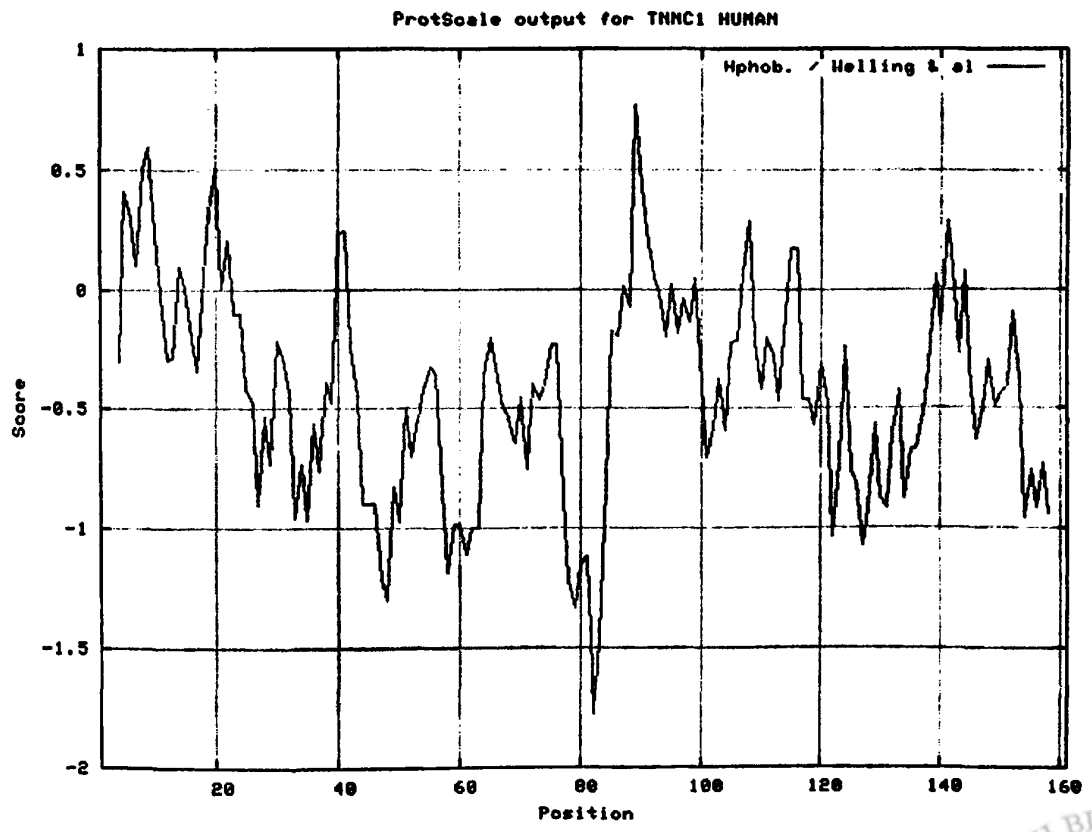


Σχήμα 5.1.6 Προφίλ υδροφοβικότητας Fauchere/Pliska της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C.



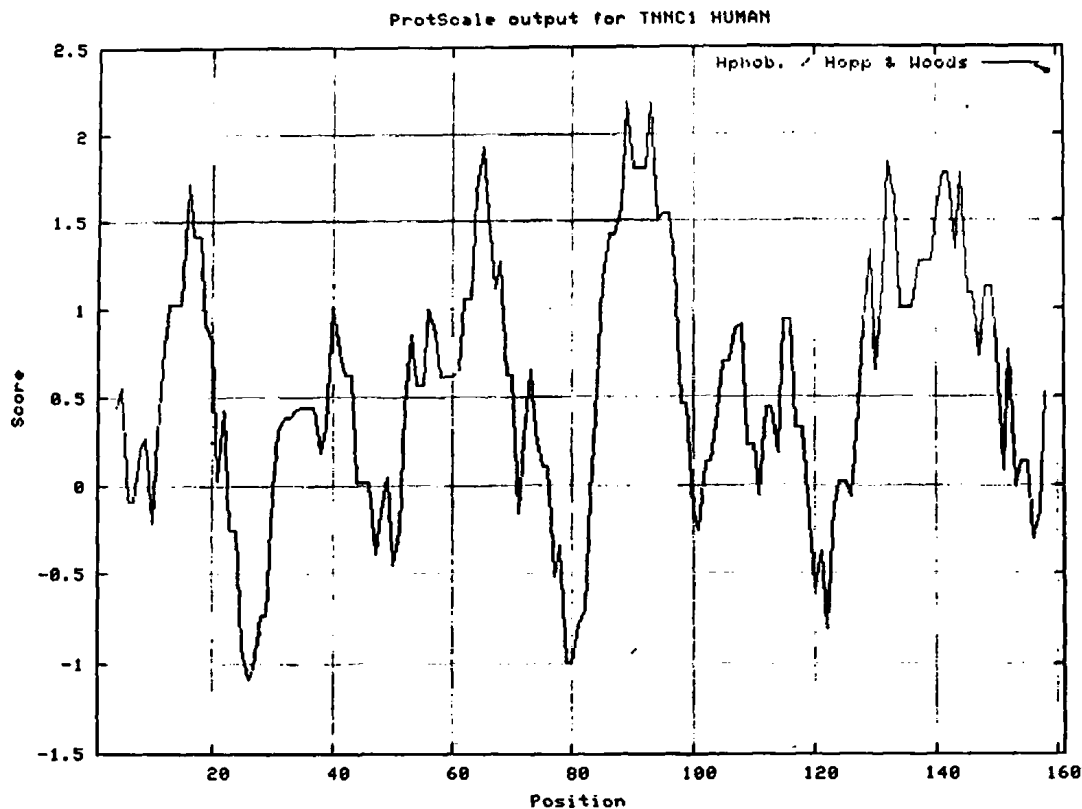
Σχήμα 5.1.7 Προφίλ υδροφοβικότητας Kyte/Doolittle της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C.

➡ Προφίλ αντιγονικότητας της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C



Σχήμα 5.1.8 Προφίλ αντιγονικότητας Welling της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C.





Σχήμα-5.1.9 Προφίλ αντιγονικότητας Hopp/Woods της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C.

Συγκρίνοντας όλες τις παραπάνω απεικονίσεις, παρατηρούμε ότι υπάρχει μια γενική ομοφωνία στις προβλέψεις των προαναφερθέντων αλγορίθμων όσον αφορά τις πιθανές αντιγονικές περιοχές της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Συσχετίζοντας τα αποτελέσματα αυτά, καταλήξαμε στις κοινά προβλεπόμενες αντιγονικές περιοχές της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C, έτσι όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 5.1.10.

Human cardiac isoform of troponin C

```

1           9           18           37    41           50
|           |           |           |     |           |
DDIYKAAVEQLTEEQKNEFKAAFDIFVLGAEDGCISTKELGKVMRMLGQN

51           61           68           82           98 100
|           |           |           |           |     |
PTPEELQEMIDEVDEDGSGTVDFDEF LVMVRCMKDDSKGKSEEELSDLF

101          108          125          148 150
|           |           |           |     |     |
RMFDKNADGYIDLEELKIMLQATGETITEDDIEELMKDGDKNNDGRIDYD

151          160
|           |
EFLEFMKGVE

```

Σχήμα 5.1.10 Σχηματική παρουσίαση των πιθανών αντιγονικών περιοχών της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C (επισημασμένες με κόκκινο χρώμα) στις οποίες συγκλίνουν οι προβλέψεις όλων των αλγορίθμων που χρησιμοποιήθηκαν.



Πίνακας 5.2.1 Αλληλουχίες των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης I και T με τη μικρότερη ομολογία σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών.

| Skeletal Troponin Isoforms Cardiac Troponin Sequences | ssTnI (slow skeletal muscle troponin I) | fsTnI (fast skeletal muscle troponin I) | ssTnT (slow skeletal muscle troponin T) | fsTnT (fast skeletal muscle troponin T) | sTnC (skeletal muscle troponin C) |
|--|---|---|---|---|---|
| cTnI (19-31) RRRSSNYRAYATE | 30% | 33% | 33% | 23% | 30% |
| cTnI (72-85) GRALSTRQCPLLELA | 28% | 35% | 42% | 35% | 35% |
| cTnI (118-131) TKNITEIADLTQKI | 42% | 35% | 28% | 28% | 21% |
| cTnT (20-33) VEEEEDWREDEDEQ | 28% | 35% | 35% | 50% | 35% |
| cTnT (62-75) KEAEDGPMEEKPK | 28% | 21% | 28% | 28% | 21% |

Επιπλέον, μετά από σύγκριση των ανθρώπινων καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης έναντι της βάσης δεδομένων SWISS-PROT [14], χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ομολογίας BLAST, διαπιστώθηκε ότι τα πρωτεϊνικά αυτά μόρια είναι εξελεγκτικά διατηρημένα σε πλήθος θηλαστικών. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει τη σπουδαιότητα των τελευταίων ερευνητικών ευρημάτων όσον αφορά τις διάφορες βιολογικές λειτουργίες του συμπλόκου της τροπονίνης στους οργανισμούς των θηλαστικών και την πιθανή τους συσχέτιση με τις αντίστοιχες λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό. Ενδεικτικά να αναφέρουμε ότι η ομολογία της ανθρώπινης καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I σε σύγκριση με αυτή των διαφόρων θηλαστικών (π.χ., βόδι, άλογο, κουνέλι, ποντίκι, αρουραίος, κ.ο.κ.) αγγίζει το ~80%. Αντίστοιχα για την ανθρώπινη καρδιακή ισομορφή της τροπονίνης T το ποσοστό ομολογίας ανέρχεται στο ~75%, ενώ η τροπονίνη C σχεδόν ταυτίζεται με τις ανάλογες ισομορφές των θηλαστικών, με το ποσοστό της ομολογίας της να διαμορφώνεται στο ~95%.

Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την δύσκολη απομόνωση και την απαγορευτική τιμολόγηση των καρδιακών τροπονινών στο εμπόριο, επιτρέπουν τη χρησιμοποίηση πρωτεϊνών οι οποίες προέρχονται από άλλα θηλαστικά είδη, για την διεξαγωγή διαφόρων βιοχημικών και βιολογικών πειραματισμών. Δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι κατά καιρούς έχουν παρουσιαστεί βιβλιογραφικά ερευνητικές μελέτες επί των βιολογικών λειτουργιών καθώς και των αλληλεπιδράσεων στις οποίες εμπλέκονται τα πρωτεϊνικά αυτά μόρια, σε διάφορα θηλαστικά. Πρόκληση για το μέλλον στους κύκλους της επιστημονικής κοινότητας, αποτελεί μια βελτιωμένη τεχνική απομόνωσης ή και η ολική σύνθεση της ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης.



5.3 Σχεδιασμός και επιλογή κατάλληλων αλληλουχιών των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης

Από το σύνολο των περιοχών που προσδιορίστηκαν με βάση τις παραπάνω υπολογιστικές μελέτες καθώς και από βιβλιογραφικά δεδομένα, επιλέχθηκαν για ανάπτυξη αντισωμάτων οι παρακάτω περιοχές των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης (Πίνακας 5.3.1):

Πίνακας 5.3.1 Αλληλουχίες των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης που επιλέχθηκαν για την ανάπτυξη αντισωμάτων

| | Τροπονίνη I | Τροπονίνη T | Τροπονίνη C |
|---|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | cTnI (19-31) RRRSSNYRAYATE | cTnT (21-30) EEEEDWREDE | cTnC (89-98) SKGKSEEELS |
| 2 | cTnI (118-131) TKNITEIADLTQKI | | |
| 3 | cTnI (185-196) REVGDWWRKNIDA | | |

Πιο συγκεκριμένα, η επιλογή των παραπάνω αμινοξικών αλληλουχιών, στηρίχθηκε στα εξής κριτήρια:

1. **cTnI (19-31) (RRRSSNYRAYATE):** Η επιλογή της συγκεκριμένης αλληλουχίας στηρίχθηκε στο γεγονός ότι ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I, το οποίο είναι μοναδικό και αποτελεί επέκταση των σκελετικών ισομορφών. Επιπλέον, η ομολογία της σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών δεν ξεπερνά το 33%, ενώ παρουσιάζεται και ως πιθανή ανοσογονική περιοχή.
2. **cTnI (118-131) (TKNITEIADLTQKI):** Παρά το γεγονός ότι δεν προβλέπεται ως ισχυρή ανοσογονική περιοχή, η χαμηλή της ομολογία σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών, η οποία δεν ξεπερνά το 42%, αποτέλεσε σημαντικό κριτήριο για την επιλογή της.
3. **cTnI (185-196) (REVGDWWRKNIDA):** Βασικός παράγοντας για την επιλογή της συγκεκριμένης αλληλουχίας αποτέλεσαν οι μελέτες της S. Eriksson, η οποία ανέδειξε την αναγκαιότητα χρήσης αντισωμάτων τα οποία παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια έναντι τμημάτων της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I, πέραν του κεντρικού (αμινοξική αλληλουχία 30-110) [Κεφάλαιο 3, βιβλ. 105-107]. Και αυτό διότι, η χρήση αντισωμάτων τα οποία στρέφονται προς το κεντρικό της τμήμα προκαλούν "ψευδώς αρνητικά" αποτέλεσμα κατά τη δοκιμασία ανίχνευσης της τροπονίνης. Επιπλέον, το γεγονός ότι χαρακτηρίζεται ως πιθανή ανοσογονική περιοχή, βάσει της αντιγονικής χαρτογράφησης που προηγήθηκε, ήταν μία ακόμη παράμετρος που συνεκτιμήθηκε.



4. **cTnT (21-30) (EEEEEDWREDE)**: Η αμινοξική αλληλουχία που προέκυψε από τις μελέτες ομολογίας ήταν η cTnT (20-33) (VEEEEEDWREDEDEQ), η οποία μάλιστα ανήκει και σε πιθανή ανοσογονική περιοχή της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης T. Η αλληλουχία των 14 αμινοξέων περιορίστηκε στα 10, αποκλειστικά για συνθετικούς λόγους.
5. **cTnC (89-98) (SKGKSEEELS)**: Τέλος, επιδιώκοντας την επιλογή μιας περιοχής της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C με σκοπό την ανάπτυξη της ELISA δοκιμασίας, καταλήξαμε στην αμινοξική αλληλουχία 89-98 με βασικό κριτήριο το γεγονός ότι χαρακτηρίζεται ως πιθανή ανοσογονική περιοχή.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω καθώς και το γεγονός ότι τα γραμμικά πεπτιδικά μόρια, κυρίως λόγω του μικρού τους μεγέθους χαρακτηρίζονται από φτωχές ανοσογονικές ιδιότητες, επιλέχθηκε ως φορέας ανοσογόνων ο τετραμερής ολιγοπεπτιδικός φορέας SOC₄ (sequential oligopeptide carrier), με στόχο την αύξηση της ανοσογονικότητας των επιλεγμένων αλληλουχιών. Η σύνθεση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων πραγματοποιήθηκε με την ομοιοπολική πρόσδεση των επιλεγμένων περιοχών των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης στον εν λόγω υπόστρωμα, είτε με τις κλασσικές βήμα προς βήμα συνθετικές μεθοδολογίες στερεάς φάσης, είτε μέσω χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων πρόσδεσης επιτόπων.



**ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ**



6.1 Εισαγωγή

Τα γραμμικά πεπτιδικά μόρια καθώς και τα πρωτεϊνικής φύσης ανοσογονικά συμπλέγματα που σχεδιάσαμε, συνθέσαμε και μελετήσαμε στο πλαίσιο της έρευνας της παρούσας διατριβής, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 6.1.1:

Πίνακας 6.1.1 Πεπτιδία που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας

| | Πεπτιδικά ανάλογα (κωδικές ονομασίες) | Συνθετική μεθοδολογία | Μοριακά βάρη (Da) |
|----|---|---|----------------------|
| 1 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(118-131)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Boc/Bzl συνθετική μεθοδολογία (στερεά φάση) | 7420,7 |
| 2 | Ac-SOC ₄ [cTnT-(21-30)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία (στερεά φάση) | 6530,5 |
| 3 | cTnC-(89-98)-Cys (SKGKSEELSC) | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία (στερεά φάση) | 1195,3 |
| 4 | Ac-SOC ₄ [cTnC-(89-98)-Cys] ₄ -OH | Χημειοεκλετική πρόσδεση επιτόπων με δημιουργία θειοαιθερικών δεσμών (υγρή φάση) | 6084,3 |
| 5 | Ac-SOC ₄ [BrCH ₂ CO] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία. Η αντίδραση βρωμοακετυλίωσης πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση | 1625,1 |
| 6 | cTnI-(185-196)-Cys (REVGDWKRNIDAC) | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία (στερεά φάση) | 1560,7 |
| 7 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(185-196)-Cys] ₄ -OH | Χημειοεκλετική πρόσδεση επιτόπων με δημιουργία θειοαιθερικών δεσμών (υγρή φάση) | 7544,4 |
| 8 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Boc/Bzl συνθετική μεθοδολογία (στερεά φάση) | 7588,4 |
| 9 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία (στερεά φάση) | 7588,4 |
| 10 | cTnI-(19-31)-Cys (RRRSSNYRAYATEC) | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία (στερεά φάση) | 1731,9 |
| 11 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)-Cys] ₄ -OH | Χημειοεκλετική πρόσδεση επιτόπων με δημιουργία θειοαιθερικών δεσμών (υγρή φάση) | 8229,0 |



Η σύνθεση των γραμμικών πεπτιδικών μορίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield, χρησιμοποιώντας την βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία. Η σύνθεση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων έλαβε χώρα κατόπιν ομοιοπολικής πρόσδεσης των επιλεγμένων γραμμικών επιτόπων των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης, στον τετραμερή ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC₄, ακολουθώντας διάφορες συνθετικές στρατηγικές. Στόχος μας ήταν η διασαφήνιση των πλεονεκτημάτων της καθεμιάς εξ αυτών και η επιλογή της πιο λειτουργικής μεθοδολογίας ανάπτυξης πρωτεϊνικής φύσης μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον εν λόγω συνθετικό φορέα.

6.1.1 Ρητίνες - Αντιδραστήρια σύζευξης - Αμινοξέα

Ως πολυμερικά υποστρώματα, πάνω στα οποία διεξήχθησαν οι συνθέσεις των πεπτιδίων σε στερεή φάση, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

| | Πολυμερικά υποστρώματα (Ρητίνες) | Υποκατάσταση (mmol/g ρητίνης) | Προμηθευτής (Εταιρεία) |
|---|--|----------------------------------|--|
| 1 | Ρητίνη Fmoc-Gly-Wang (9-φλουορένυλο-μεθυλοξυκαρβόνυλο-γλύκνιο-π-βενζυλόξυ-βενζυλική αλκοολική ρητίνη) | 0,8 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 2 | Ρητίνη Wang (π-βενζυλόξυ-βενζυλική αλκοολική ρητίνη) | 0,75 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 3 | Ρητίνη Rink amide 4-(2',4'-διμεθοξυφαινυλο-Fmoc-αμινομέθυλο)-φαινόξυ ρητίνη | 0,8 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 4 | Ρητίνη PAM 4-υδροξυμέθυλο-φαινυλακετάμιδο μέθυλο ρητίνη | 0,74 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |

Για τις αντιδράσεις σύζευξης των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

| | Αντιδραστήρια σύζευξης | Μοριακό βάρος | Προμηθευτής (Εταιρεία) |
|---|--|---------------------------|--|
| 1 | TBTU (O-βενζοτρίαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραφθοροβορικό άλας) | 321,1 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France), GL Biochem (Shanghai, China) |
| 2 | HBTU (O-βενζοτρίαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας) | 379,3 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France), GL Biochem (Shanghai, China) |
| 3 | DCC (N,N-δικυκλοξέτυλο καρβοδιϊμίδιο) | 206,3 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 4 | DIC (N,N-διισοπρόπυλο καρβοδιϊμίδιο) | 126,2 (density: 0,815) | Fluka (Schnelldorf, Germany) |
| 5 | HOBt (1-υδρόξυ βενζοτρίαζόλιο) | 135,1 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France), GL Biochem (Shanghai, China) |



Στη συνέχεια παρουσιάζονται όλα τα N^o-Boc και Fmoc προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των παραπάνω πεπτιδίων:

| | N-προστατευμένα αμινοξέα | Μοριακό βάρος | Προμηθευτής (Εταιρεία) |
|----|-------------------------------------|--------------------------|---|
| 1 | Boc-Gly-OH | 175,2 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 2 | Boc-Aib-OH | 203,2 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 3 | Boc-Lys(Fmoc)-OH | 468,6 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 4 | Boc-Lys(2Cl-Z)-OH | 414,9 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 5 | Boc-Ile-OH. ½ H ₂ O | 231,3 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 6 | Boc-Gln-OH | 246,3 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 7 | Boc-Thr(Bzl)-OH | 309,4 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 8 | Boc-Leu-OH.H ₂ O | 231,3 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 9 | Boc-Asp(OBzl)-OH | 323,4 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 10 | Boc-Ala-OH | 189,2 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 11 | Boc-Glu(OBzl)-OH | 337,4 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 12 | Boc-Asn-OH | 232,2 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 13 | Boc-Tyr(2,6 diCl-Bzl)-OH | 440,3 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 14 | Boc-Arg(Tos)-OH | 428,5 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 15 | Boc-Ser(Bzl)-OH | 295,3 | Neosystem Laboratoire, (Strasbourg, France) |
| 16 | Fmoc-Gly-OH | 297,3 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 17 | Fmoc-Aib-OH | 325,4 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 18 | Fmoc-Lys(Boc)-OH | 468,6 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 19 | Fmoc-Lys(Mtt)-OH | 624,8 | CBL Patras – Barlos |
| 20 | Fmoc-Ala-OH | 311,3 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 21 | Fmoc-Arg(Pbf)-OH | 648,8 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 22 | Fmoc-Asn(Trt)-OH | 596,7 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 23 | Fmoc-Asp(OtBu)-OH | 411,5 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 24 | Fmoc-Cys(Trt)-OH | 584,7 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 25 | Fmoc-Glu(OtBu)-OH | 425,5 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 26 | Fmoc-Ile-OH | 353,4 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 27 | Fmoc-Leu-OH | 353,4 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 28 | Fmoc-Ser(tBu)-OH | 383,4 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 29 | Fmoc-Thr(tBu)-OH | 397,5 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 30 | Fmoc-Tpr(Boc)-OH | 526,6 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 31 | Fmoc-Tyr(tBu)-OH | 459,6 | GL Biochem (Shanghai, China) |
| 32 | Fmoc-Val-OH | 339,4 | GL Biochem (Shanghai, China) |



6.1.2 Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των συνθέσεων, καθαρισμών και ταυτοποίησης των πεπτιδίων που συντέθηκαν, ήταν οι εξής:

| Διαλύτης | Στάδιο της σύνθεσης που χρησιμοποιήθηκε | Προμηθευτής (Εταιρεία) |
|--|---|--------------------------------|
| 1 DCM (Διχλωρομεθάνιο) | Διεξαγωγή των αντιδράσεων της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή και υγρή φάση | Fluka (Germany) |
| 2 DMF (Διμέθυλοφορμαμίδιο) | Διεξαγωγή των αντιδράσεων της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή και υγρή φάση | Fluka (Germany) |
| 3 TFA (Τριφθοροξικό οξύ) | Αποκοπή των Boc προστατευτικών ομάδων και απομάκρυνση των πεπτιδίων από τα πολυμερικά υποστρώματα | Riedel (Germany) |
| 4 Piperidine (Πιπεριδίνη) | Αποκοπή των Fmoc προστατευτικών ομάδων | Fluka (Germany) |
| 5 n-Hexane (Εξάνιο) | Διεξαγωγή των συμπυκνώσεων του TFA, μετά την αποκοπή των πεπτιδίων από τα πολυμερικά υποστρώματα | LAB-SCAN, (Dublin, Ireland) |
| 6 Diethyl ether (Διαιθυλαιθέρας) | Διάλυση των scavengers και καταβύθιση του πεπτιδίου, μετά την συμπύκνωση του TFA | Riedel (Germany) |
| 7 Acetonitrile (Ακετονιτρίλιο) | Καθαρισμός και ταυτοποίηση των προϊόντων με αναλυτική και ημι-παρασκευαστική HPLC | LAB-SCAN, (Dublin, Ireland) |
| 8 Methanol (Μεθανόλη) | Καθαρισμός και ταυτοποίηση των προϊόντων με αναλυτική και ημι-παρασκευαστική HPLC | LAB-SCAN, (Dublin, Ireland) |

6.1.3 Άλλα αντιδραστήρια

Άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορα στάδια της σύνθεσης των πεπτιδίων ήταν:

| Αντιδραστήριο | Στάδιο της σύνθεσης που χρησιμοποιήθηκε | Προμηθευτής (Εταιρεία) |
|--|--|------------------------|
| 1 Ac ₂ O (Οξικός ανυδρίτης) | Διεξαγωγή των αντιδράσεων ακετυλίωσης ελεύθερων αμινομάδων και υδροξυλομάδων | Merk (Germany) |
| 2 DIEA (Διίσοπρότυλο-αιθυλαμίνη) | Διεξαγωγή αντιδράσεων σύζευξης των αμινοξέων και εξουδετέρωση των TFA-αλάτων | Fluka (Germany) |
| 3 DMAP (4-διμεθυλάμινο πυριδίνη) | Αντίδραση σύζευξης του πρώτου N-προστατευμένου αμινοξέος στη Wang ρητίνη | Fluka (Germany) |
| 4 TIS (Τριίσοπροπυλαμίνιο) | Αντίδραση αποκοπής των πεπτιδίων από τα πολυμερικά υποστρώματα, ως παγίδες καρβοκατιόντων | Fluka (Germany) |
| 5 DMB (Διμεθόξυ βενζόλιο) | Αντίδραση αποκοπής των πεπτιδίων από τα πολυμερικά υποστρώματα, ως παγίδες καρβοκατιόντων. Χρησιμοποιείται παράλληλα και για την αποφυγή της αποικοδόμησης του δακτυλίου της Rink Amide ρητίνης. | Fluka (Germany) |



| | | | |
|---|---|---|-----------------|
| 6 | EDT (Αιθανοδιθειόλη) | Αντίδραση αποκοπής πεπτιδίων (που περιέχουν κυστεϊνικά και μεθειονινικά κατάλοιπα) από τα πολυμερικά υποστρώματα | Fluka (Germany) |
| 7 | Bromoacetyl bromide (Βρωμοξικό βρωμίδιο) | Διεξαγωγή των αντιδράσεων βρωμοακετυλίωσης ελεύθερων αμινομάδων | Fluka (Germany) |
| 8 | Trisma Base (Τρι-υδροξυμεθύλο-άμινο μεθάνιο) | Χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων, περιβάλλον στο οποίο έλαβαν χώρα οι χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις | Sigma (USA) |
| 9 | Gu-HCl (Υδροχλωρική γουανιδίνη) | Χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 6M, περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιήθηκαν δοκιμές χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων | Sigma (USA) |

6.2 Γενική μεθοδολογία πεπτιδικής σύνθεσης

Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται συνοπτικά τα συνθετικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ανάπτυξη τόσο των γραμμικών, όσο και των διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής πεπτιδικών μακρομορίων που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα αναλύονται οι εξής συνθετικές στρατηγικές:

1. Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία
2. Boc/Bzl βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία
3. Μεθοδολογία χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων πρόσδεσης επιτόπων σε συνθετικούς φορείς (σχηματισμός θειοαιθερικού δεσμού μεταξύ αποπροστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων)

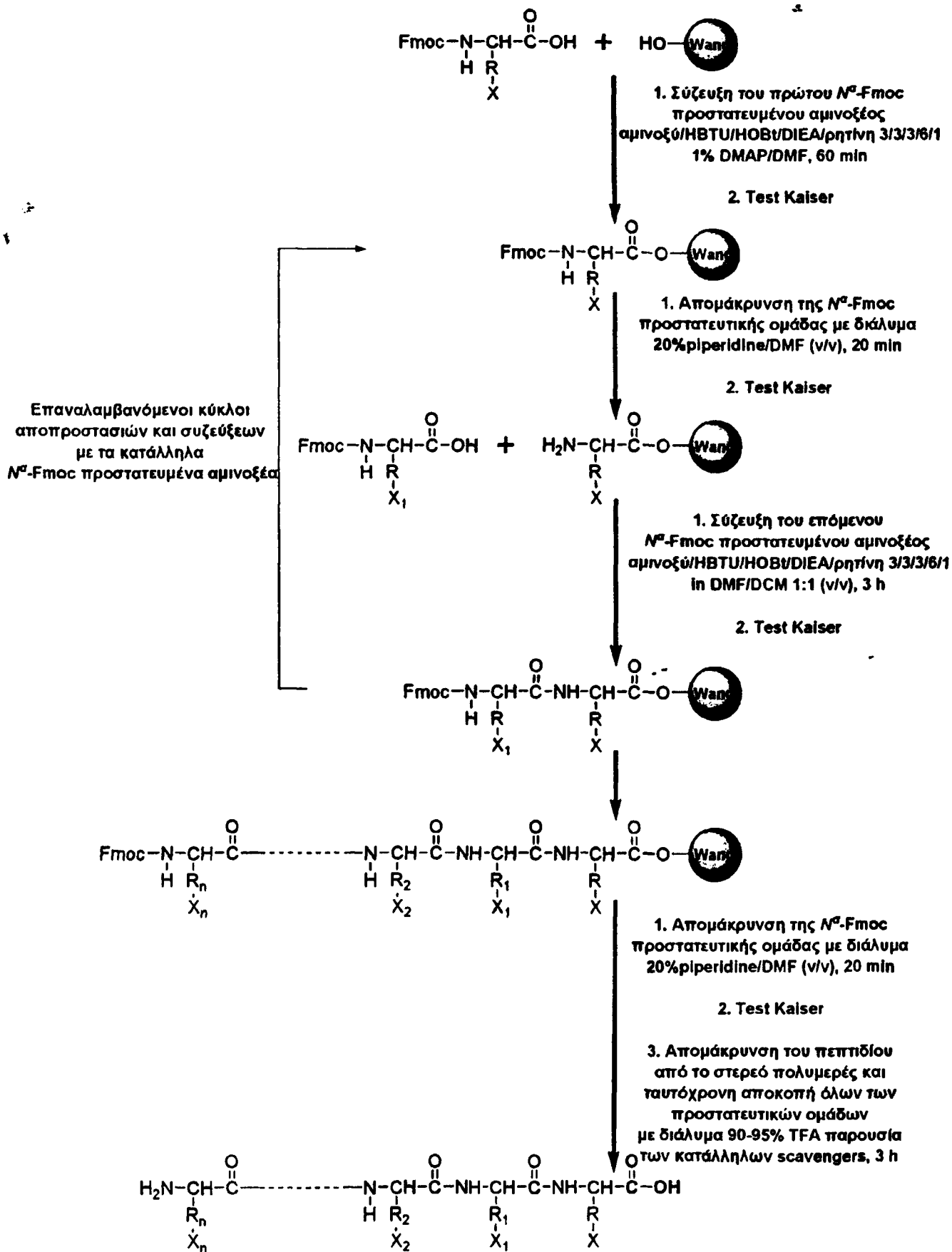
6.2.1 Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία

Η σύνθεση των γραμμικών πεπτιδίων **3**, **5**, **6** και **10** (πίνακας 6.1.1) και των ανοσογονικών συμπλεγμάτων **2** και **9** (πίνακας 6.1.1), έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας.

Με στόχο τη λήψη καρβοξυλικού C-τελικού άκρου (μετά την απομάκρυνση των πεπτιδίων από τα στερεά πολυμερή), η σύνθεση των αναλόγων **2**, **5** και **9** (πίνακας 6.1.1) διεξήχθη πάνω σε ρητίνη Wang. Αντίστοιχα, η λήψη αμιδικού C-τελικού άκρου στους επιτόπους **3**, **6** και **10** (πίνακας 6.1.1) επετεύχθη μετά την αποκοπή και απομάκρυνσή τους από την Rink amide ρητίνη. Αν εξαιρέσουμε το στάδιο σύζευξης του πρώτου αμινοξέος στα προαναφερθέντα πολυμερικά υποστρώματα, τα υπόλοιπα συνθετικά βήματα μέχρι και την παραλαβή του τελικού επιθυμητού προϊόντος διαφέρουν ελάχιστα.

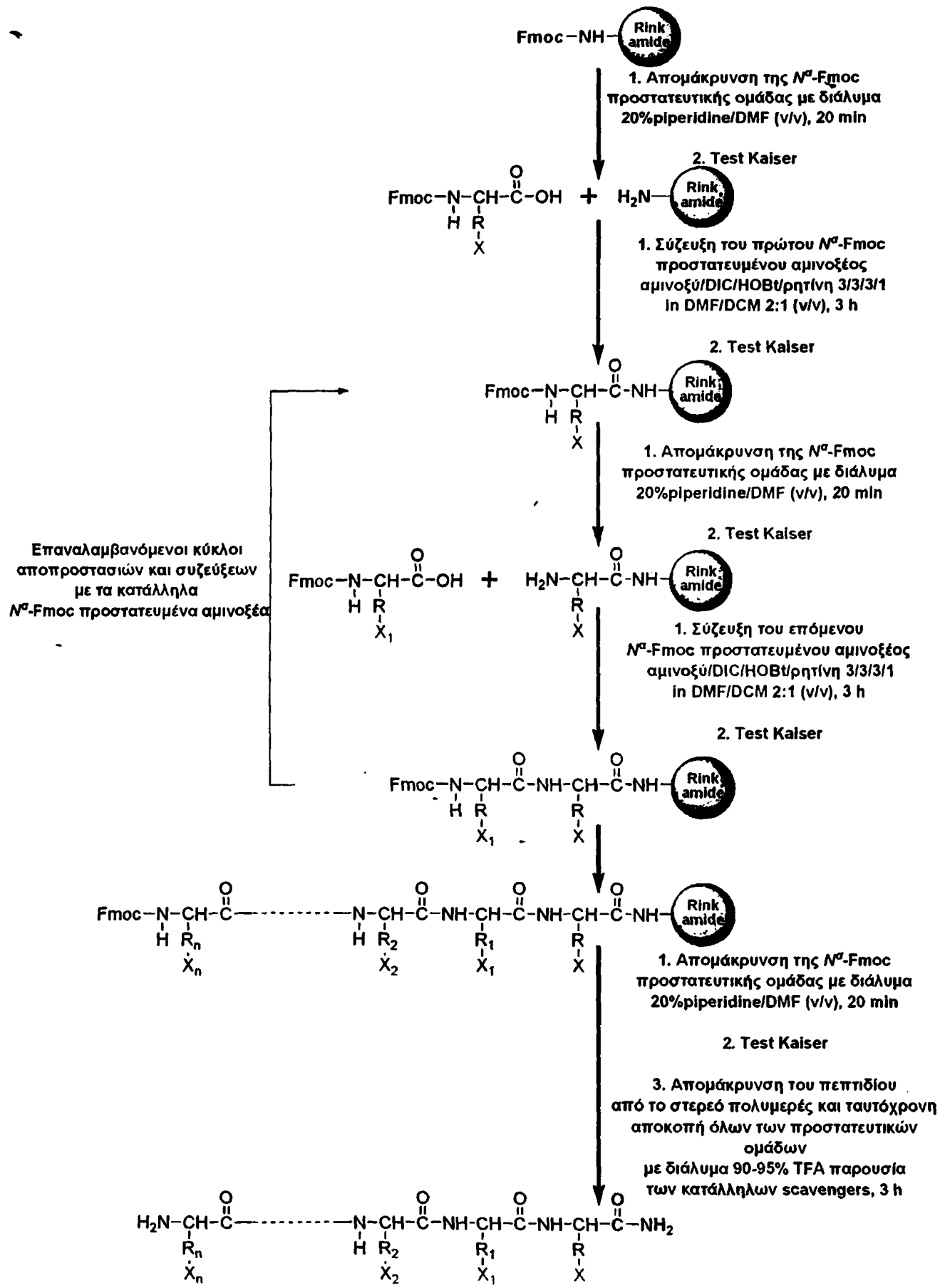
Στη συνέχεια παρατίθεται ένα γενικό σχήμα της συνθετικής πορείας που ακολουθήθηκε; ξεκινώντας είτε από Wang (Σχήμα 6.2.1.1) είτε από Rink amide ρητίνη (Σχήμα 6.2.1.2).





Σχήμα 6.2.1.1 Γενικό σχήμα της Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την ρητίνη Wang.





Σχήμα 6.2.1.2 Γενικό σχήμα της Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την ρητίνη Rink amide.



Η εστεροποίηση των υδροξυμέθυλο-τροποποιημένων πολυμερικών υποστρωμάτων (ρητίνες του τύπου Wang), πραγματοποιείται κυρίως μέσω συμμετρικών ανυδριτών των N^o-Fmoc προστατευμένων αμινοξέων παρουσία καταλυτικής ποσότητας DMAP [1]. Παρόλα αυτά η μέθοδος παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα, δεδομένου ότι συχνά παραλαμβάνονται εναντιομερή παράγωγα και διπεπτιδικά παραπροϊόντα, λόγω των βασικών συνθηκών που επιβάλλονται από την περίσσεια DMAP. Επιπλέον, το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αντενδείκνυται σε περιπτώσεις πεπτιδίων που φέρουν C-τελική κυστεΐνη ή ιστιδίνη, αμινοξέα ιδιαίτερα επιρρεπή σε ρακεμοποίηση.

Αντίθετα στην περίπτωση των Rink amide ρητινών, τα πράγματα είναι πιο απλά όσον αφορά την σύζευξη του πρώτου αμινοξέος. Προηγείται η απομάκρυνση της N^o-Fmoc προστατευτικής ομάδας του βραχίονα (linker) της ρητίνης με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF (v/v), οι απαραίτητες εκπλύσεις και ο ποιοτικός έλεγχος ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων, στον οποίο και θα αναφερθούμε διεξοδικά στη συνέχεια. Η αντίδραση σύζευξης του πρώτου αμινοξέος όπως και των υπολοίπων πραγματοποιείται με την χρήση αναλογίας αμινοξύ/DIC/HOBt/ρητίνη 3/3/3/1 σε διάλυμα DMF/DCM, 2/1 (v/v). Η διάρκεια της αντίδρασης κυμαίνεται από 2-4 ώρες, ανάλογα με το μήκος του πεπτιδίου και το αμινοξύ που πρόκειται να συζευχθεί. Ακολουθώντας επαναλαμβανόμενους κύκλους αποπροστασιών και συζεύξεων με τα κατάλληλα N^o-Fmoc προστατευμένα αμινοξέα, επιτυγχάνουμε τη σύνθεση τη επιθυμητής αμινοξικής αλληλουχίας.

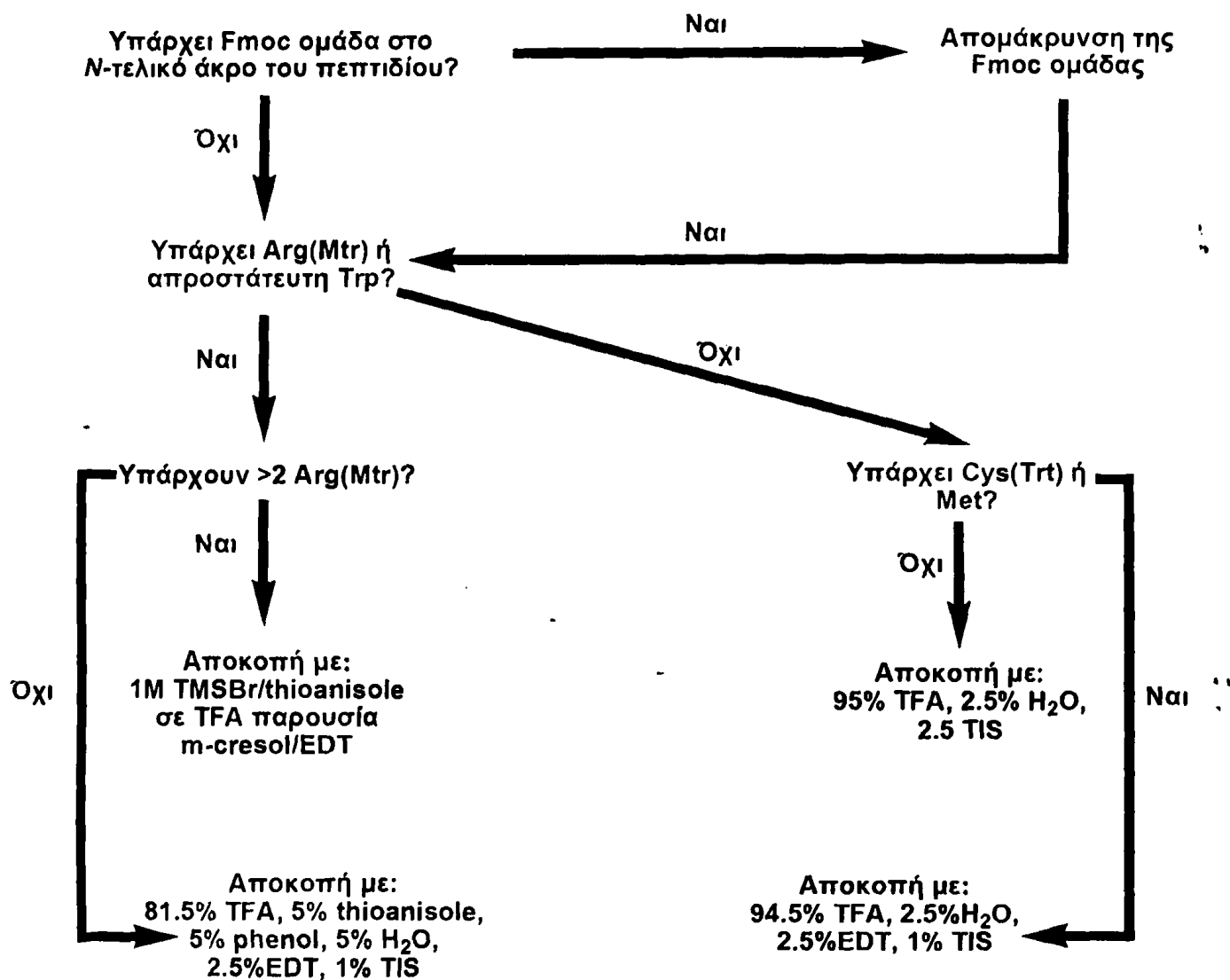
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημάνουμε ότι ο έλεγχος της ολοκλήρωσης των εκάστοτε συζεύξεων και αποπροστασιών πραγματοποιείται με το τεστ της νινυδρίνης (Test Kaiser), το οποίο παρέχει τη δυνατότητα ποιοτικής και όχι ποσοτικής αξιολόγησης των ελεύθερων αμινομάδων της πεπτιδορητίνης [2]. Η αντίδραση της νινυδρίνης με τις πρωτοταγείς αμίνες παρέχει χρώση (συνήθως βαθυγάλαζη ή καφέ), δίνοντάς μας τη δυνατότητα να αξιολογούμε κάθε φορά την αποπεράτωση των συνθετικών κύκλων.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης και την απομάκρυνση της N^o-τελικής Fmoc ομάδας, η απομάκρυνση των πεπτιδίων από τα στερεά πολυμερή τύπου Wang, πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την αποκοπή όλων των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, σε σχετικά ήπιες συνθήκες (Σχήμα 6.2.1.3). Η πεπτιδορητίνη κατεργάζεται με διάλυμα 80-95% TFA, παρουσία των απαραίτητων scavengers (TIS, EDT, θειοανισόλη, φαινόλη, κ.ο.κ.), για 3-24 ώρες ανάλογα με την αμινοξική αλληλουχία, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διήθηση της ρητίνης και μεταφορά του μίγματος της αντίδρασης σε περιστροφικό εξατμιστήρα για τη συμπύκνωση του TFA. Στο ελαιώδες υπόλειμμα προστίθεται μίγμα διχλωρομεθανίου/εξανίου, 1:1 (v/v), και μετά από διαδοχικές εξατμίσεις ακολουθεί η καταβύθιση των πεπτιδίων με παγωμένο αιθέρα. Τα πεπτιδία παραλαμβάνονται στη στερεή τους μορφή, μετά από διάλυση σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποίηση.

Ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα που έχουν παρατηρηθεί κατά τη διεξαγωγή της σύνθεσης πεπτιδίων σε ρητίνες του τύπου Rink amide, είναι η λήψη C-τελικών αλκυλιωμένων



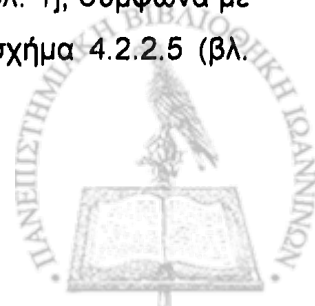
παραπροϊόντων (και μάλιστα σε μεγάλες αποδόσεις), τα οποία προκύπτουν από τη μερική της αποικοδόμηση. Η παράπλευρη αυτή αντίδραση λαμβάνει χώρα κατά την κατεργασία της πεπτιδορηνίνης με διάλυμα TFA (χρησιμοποιώντας τα συνήθη πρωτόκολλα αποκοπής), στο στάδιο της απομάκρυνσης του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (Σχήμα 6.2.1.3). Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με τη χρήση του μίγματος TFA/TIS/DMB σε αναλογία 92,5/2,5/5 (v/v/v) ως διάλυμα αποκοπής, ανεξάρτητα από την παρουσία κυστεΐνης ή μεθειονίνης στην αλληλουχία του πεπτιδίου [3].



Σχήμα 6.2.1.3 Συνθήκες απομάκρυνσης των πεπτιδίων από τα στερεά πολυμερή σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/tBu συνθετικής μεθοδολογίας σε στερεή φάση.

6.2.2 Boc/Bzl βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία

Η σύνθεση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων 1 και 8 (πίνακας 6.1.1) διεξήχθη εξ' ολοκλήρου στο πλαίσιο της αντίστοιχης μεταπτυχιακής διατριβής [Κεφάλαιο 5, βιβλ. 1], σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Boc/Bzl βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας. Στο σχήμα 4.2.2.5 (βλ.



Θεωρητικό μέρος, Κεφάλαιο 4) παρουσιάζεται συνοπτικά η γενική συνθετική στρατηγική που ακολουθήθηκε, ξεκινώντας από ρητίνη PAM.

6.2.3 Μεθοδολογία ανάπτυξης μακρομοριακών συμπλεγμάτων μέσω χημιοεκλεκτικών αντιδράσεων πρόσδεσης επιτόπων (σχηματισμός θειοαιθερικού δεσμού)

Η σύνθεση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων 4, 7 και 11 (πίνακας 6.1.1) πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των εκλεκτικών χημικών αντιδράσεων σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού, μεταξύ πλήρως αποπροστατευμένων αμινοξικών αλληλουχιών. Πιο συγκεκριμένα, η μεθοδολογία περιελάμβανε την χημιοεκλεκτική αντίδραση μεταξύ της ελεύθερης σουλφιδριλικής ομάδας της C-τελικής κυστεΐνης των τροποποιημένων γραμμικών επιτόπων 3, 6 και 10 (πίνακας 6.1.1), με τον N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένο φορέα SOC₄ 5, (πίνακας 6.1.1), (βλ. Σχήμα 4.4.4.2, Θεωρητικό μέρος, Κεφάλαιο 4). Οι επίτοποι σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν με C- και όχι N-τελική κυστεΐνη, ώστε να περιορίσουμε τον σχηματισμό των διμερών παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια της χημιοεκλεκτικής αντίδρασης [Κεφάλαιο 4, βιβλ. 106].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επιτυχία και η ομαλή διεξαγωγή των εν λόγω αντιδράσεων, ειδικά στην περίπτωση της ομοιοπολικής πρόσδεσης επιτόπων σε συνθετικούς φορείς, απαιτεί υψηλής καθαρότητας και ομοιογένειας πεπτιδικά ανάλογα. Για το λόγο αυτό και πριν την έναρξη των διαδικασιών, τα αποπροστατευμένα πεπτιδικά τμήματα υποβλήθηκαν σε καθαρισμούς με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC).

Αναλυτικότερα, οι αντιδράσεις διεξήχθησαν σε μικρή σφαιρική φιάλη των 5 ή 10ml, ανάλογα με την περίπτωση, όπου αρχικά διαλύθηκε σε μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος 0,2M Tris pH=8,2/CH₃CN, 3/1 (v/v), όλη η ποσότητα του N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄. Στη συνέχεια και σε τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε 20-30min), προσθέταμε προσεκτικά και σε μικρές δόσεις στο μείγμα της αντίδρασης τον εκάστοτε γραμμικό επίτοπο (ο οποίος έφερε C-τελική κυστεΐνη). Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε σκότος και υπό ατμόσφαιρα αργού, με στόχο την προστασία των φωτοευαίσθητων βρώμο-αναλόγων. Ο έλεγχος της πορείας των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας ESI (κάθε 60min), ενώ η συνολική τους διάρκεια δεν ξεπέρασε τις 10 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας το διάλυμα της αντίδρασης οξινίστηκε με HCl 0,1N. Τα επιθυμητά μακρομόρια ελήφθησαν στην στερεή τους μορφή, αφού προηγουμένως υποβλήθηκαν σε προκαταρκτικό καθαρισμό με την μεθοδολογία της διαπίδυσης, τον κυρίως καθαρισμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων.

Να επισημάνουμε, ότι οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής των συγκεκριμένων αντιδράσεων, προέκυψαν μετά από δεκάδες δοκιμές σε πλήθος ρυθμιστικών διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων (0,1-1M Tris buffer, 0,1-1M phosphate buffer, 0,1-1M carbonate buffer, 6-8M Gu·HCl) και σε ένα σημαντικό εύρος τιμών pH (6,5-9,0).



6.3 Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης πεπτιδίων

Ο καθαρισμός, η ταυτοποίηση και ο έλεγχος της καθαρότητας των πεπτιδίων που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε με τις παρακάτω τεχνικές:

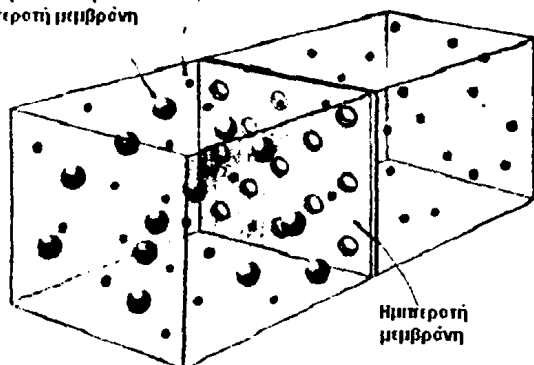
6.3.1 Μεθοδολογία διαπίδυσης (Dialysis)

Ο καθαρισμός των πεπτιδίων με την μεθοδολογία της διαπίδυσης στηρίζεται στη χρήση ειδικών μεμβράνων (ημιπερατά διαφράγματα), οι οποίες διαθέτουν πόρους διαφορετικών διαστάσεων ανάλογα με το μέγεθος του μακρομορίου που πρόκειται διαχωριστεί. Η διαδικασία περιλαμβάνει την διάλυση των ακάθαρτων πεπτιδίων στο εσωτερικό της μεμβράνης και την μετέπειτα εμβάπτιση της σε ποτήρι ζέσης το οποίο περιέχει κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ή απιονισμένο H_2O (υπό ανάδευση). Η εξισορρόπηση της ιονικής ισχύος, του pH και των συγκεντρώσεων μεταξύ των δύο διαλυμάτων (εσωτερικό και εξωτερικό μέρος της μεμβράνης), αποτελεί ουσιαστικά και την αρχή την εν λόγω μεθοδολογίας καθαρισμού (Σχήμα 6.3.1.1).

Μεθοδολογία Διαπίδυσης

Τα μεγάλο μόρια δεν μπορούν να διεπεράσουν την ημιπερατή μεμβράνη

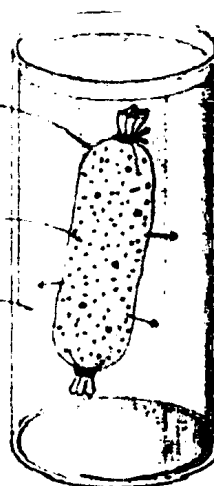
Μόρια μικρού Μ.Β.



Μεμβράνη Διοπίδυσης

Διάλυμα ουσίας στο εσωτερικό της μεμβράνης

Ρυθμιστικό διάλυμα ή H_2O



Σχήμα 6.3.1.1 Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας διαπίδυσης

Η διαδικασία μπορεί να επηρεαστεί από διάφορες παραμέτρους, όπως το σχήμα και το μέγεθος των προς διάχυση μορίων, η θερμοκρασία, το ιξώδες του διαλύματος στο εσωτερικό της μεμβράνης και η ταχύτητα ανάδευσης.

Φυσικές ή συνθετικές, οι ημιπερατές μεμβράνες χρησιμοποιούνται σήμερα ευρύτατα στις διαδικασίες καθαρισμού πεπτιδικής φύσης μακρομορίων, πρωτεϊνών, αντισωμάτων κ.ο.κ. Τα υλικά

από τα οποία παρασκευάζονται είναι η κυτταρίνη, το πολυπροπυλένιο, το πολυβίνυλο φθωρίδιο καθώς και ένα πλήθος από άλλα πολυμερή.

Τα πεπτιδικά μακρομόρια της παρούσας διατριβής υποβλήθηκαν σε προκαταρκτικό καθαρισμό με την μέθοδο της διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας μεμβράνες με ορισμένη τιμή (cut off μοριακών βαρών) 2000 και 3500 Da. Σύμφωνα με τις υποδείξεις των κατασκευαστών, η μεμβράνη των 2000 Da (Sigma, USA) ενεργοποιείται κατά την εμβάπτισή της σε ζέον διάλυμα 0,01M NaHCO₃ και 0,001M EDTA για 30 min. Μετά από τις απαραίτητες εκπλύσεις, το ακάθαρτο πεπτίδιο (διαλυμένο σε απιονισμένο H₂O) μεταφέρεται στο εσωτερικό της μεμβράνης και το όλο σύστημα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσης το οποίο περιέχει απιονισμένο H₂O. Η μεμβράνη με το περιεχόμενο της αναδεύεται, ενώ το εξωτερικό διάλυμα ανανεώνεται τουλάχιστον 3 φορές κατά τη διάρκεια του 24ώρου. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, το περιεχόμενο της μεμβράνης λυοφιλοποιείται και από την ποσότητα του πεπτιδίου που ανακτάται υπολογίζεται η απόδοση του προκαταρκτικού αυτού καθαρισμού.

Αντίστοιχη ήταν και η διαδικασία καθαρισμού με τη χρήση της ημιπερατής μεμβράνης των 3500 Da (Orange Scientific, Belgium), με τη μόνη διαφορά ότι στην προκειμένη περίπτωση δεν υποδεικνυόταν από τους κατασκευαστές προενεργοποίησή της.

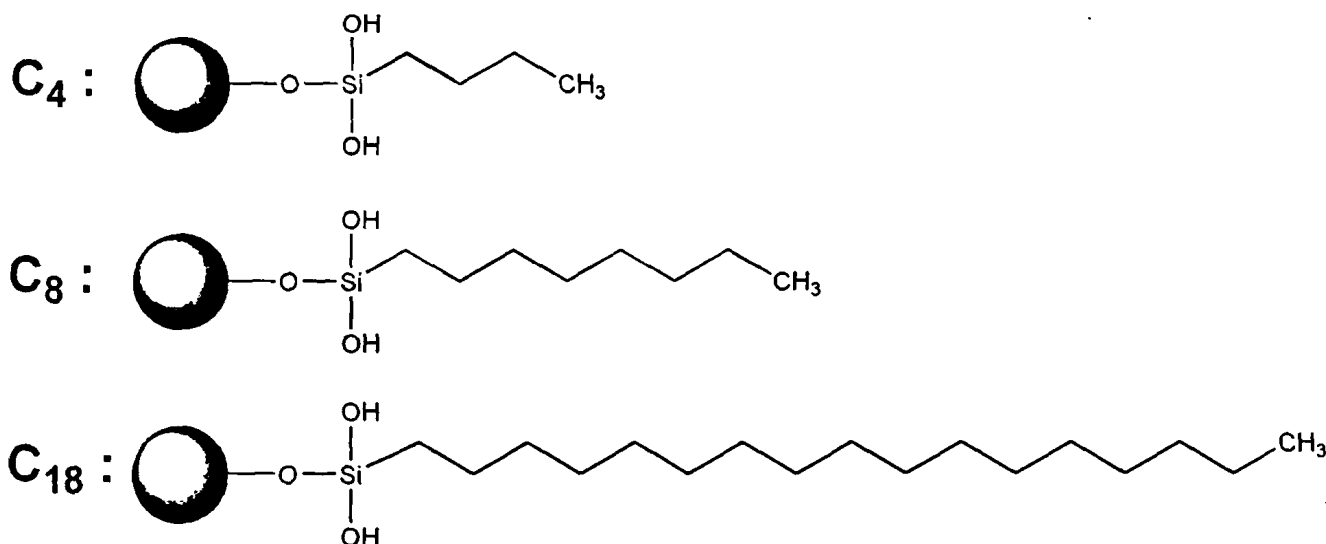
6.3.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC)

Τα πεπτιδικά ανάλογα έτσι όπως προκύπτουν μετά την ολοκλήρωση της πεπτιδικής σύνθεσης (είτε σε στερεά είτε σε υγρή φάση) και τον προκαταρκτικό τους καθαρισμό με την τεχνική της διαπίδυσης εξακολουθούν να εμπεριέχουν πλήθος παραπροϊόντων, τα οποία κυρίως λόγω μεγέθους, είναι αδύνατον σε πρώτη φάση να διαχωριστούν. Τα εν λόγω παραπροϊόντα είναι αποτέλεσμα διαφόρων ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων (κατά την διεξαγωγή της πεπτιδικής σύνθεσης), όπως πρόωρου τερματισμού της πεπτιδικής αλυσίδας, ελλιπούς σύζευξης κάποιων αμινοξέων καθώς και διαφόρων χημικών μετατροπών όπως π.χ. παραπροϊόντα οξειδωσης κυστεϊνικών ή μεθιονινικών καταλοίπων. Έτσι για τον περαιτέρω καθαρισμό των πεπτιδικών αναλόγων χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) [4,5].

Πρόκειται για την πλέον διαδεδομένη μεθοδολογία διαχωρισμού μείγματος ουσιών, η οποία στηρίζεται στην αρχή της υδροφιλικότητας και λιποφιλικότητας. Η διαδικασία καθαρισμού διεξάγεται με τη χρήση κατάλληλων χρωματογραφικών στηλών (αναλυτικές, ημιπαρασκευαστικές, παρασκευαστικές) οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν υπό υψηλές πιέσεις. Το υλικό πλήρωσης της στήλης συνήθως αποτελείται από ανθρακικές αλυσίδες προσδεδωμένες στην επιφάνεια του πυριτίου (Si), με το μήκος τους να κυμαίνεται από 4-18 άτομα άνθρακα (Σχήμα 6.3.2.1). Όσο μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα χρησιμοποιείται τόσο ισχυρότερα συγκρατούνται οι λιπόφιλες



ουσίες. Έτσι για το διαχωρισμό πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, ενδείκνυται η χρησιμοποίηση στηλών οι οποίες διαθέτουν πληρωτικό υλικό με μικρό μήκος ανθρακοατόμων (π.χ. C₄ ή C₈).



Σχήμα 6.3.2.1 Συνήθη πληρωτικά υλικά των χρωματογραφικών στηλών RP-HPLC

Ο καθαρισμός των πεπτιδικών αναλόγων της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ημιπαρασκευαστικής RP-HPLC (Waters PrepLC 4000 System) σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm και παρασκευαστικής (Waters PrepLC 4000 System) σε στήλη C₁₈ Interchrom, 250 x 21,2 mm. Οι βέλτιστες συνθήκες για το σύστημα των διαλυτών έκλουσης, καθορίστηκαν σε αναλυτική RP-HPLC (Waters 600s) χρησιμοποιώντας στήλη Discovery C₁₈. Ως διαλύματα έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν δισαπτεσταγμένο H₂O (0,1% TFA) και ακετονιτρίλιο (0,1% TFA), τα οποία αναμίχθηκαν σύμφωνα με πρόγραμμα γραμμικής μεταβολής (gradient). Επιπροσθέτως, η αναλυτική RP-HPLC αξιοποιήθηκε σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία μάζας ESI, για τον πλέον ολοκληρωμένο έλεγχο της καθαρότητας των τελικών μας προϊόντων.

6.3.3 Φασματοσκοπία μάζας ESI (Electrospray Ionization)

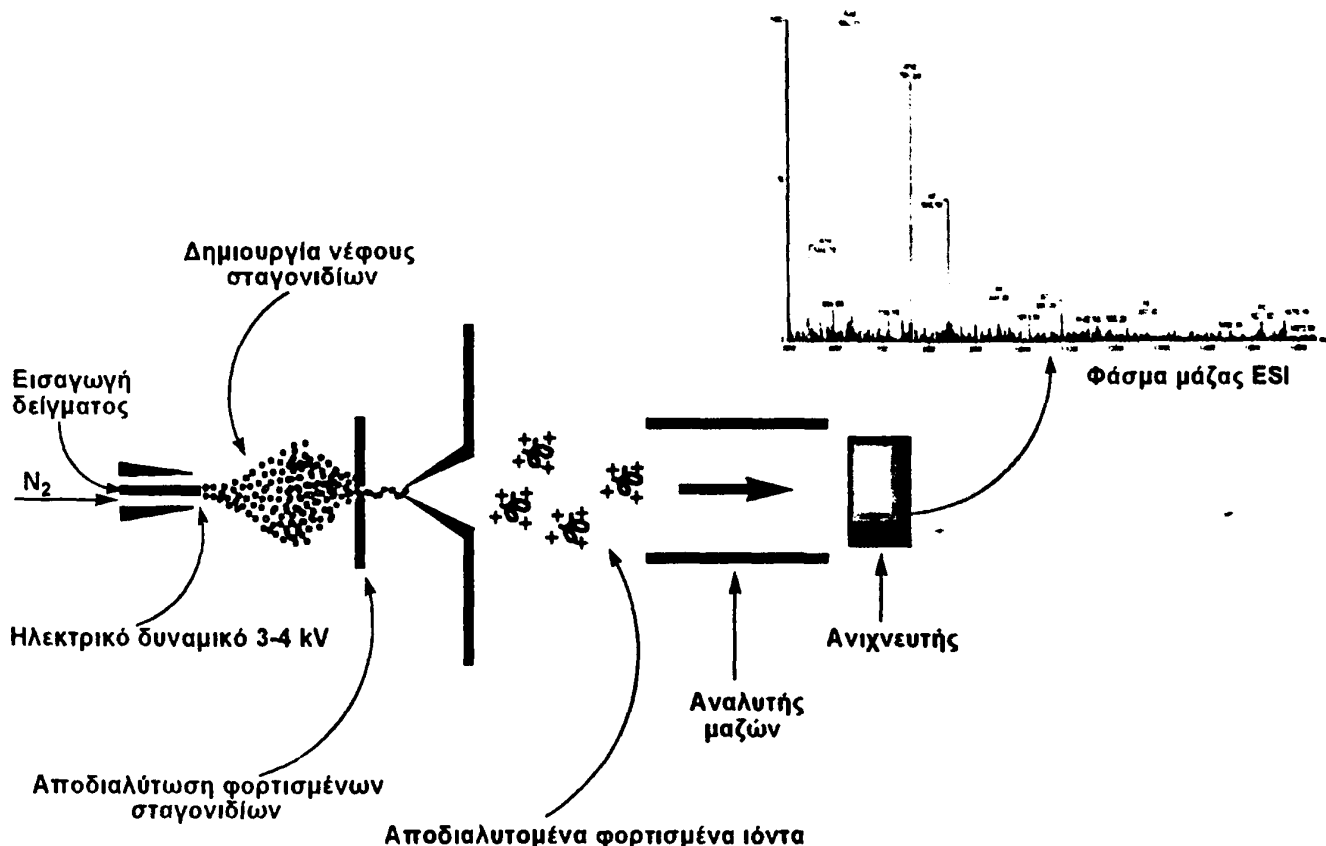
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο της καθαρότητας των τελικών επιθυμητών μας προϊόντων, ήταν η φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionisation (ESI-MS), η οποία διεξήχθη στη συσκευή Micromass Platform LC Quadrupole. Παράλληλα, η συγκεκριμένη μεθοδολογία ταυτοποίησης συνέβαλε τα μέγιστα στον έλεγχο και την αξιολόγηση της πορείας των χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων, οι οποίες έλαβαν χώρα σε υγρή φάση.

Η φασματοσκοπία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS) χαρακτηρίζεται ως μία από τις ηπιότερες αναλυτικές μεθοδολογίες ταυτοποίησης πεπτιδίων και πρωτεϊνικής φύσης μακρομορίων [6,7]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ονομασία Electrospray Ionisation δεν θεωρείται απολύτως σωστή, δεδομένου ότι κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού σε καμία περίπτωση δεν λαμβάνει χώρα ιονισμός (με την χημική έννοια του όρου) των πεπτιδίων. Τα πεπτιδία βρίσκονται



ήδη σε ιονισμένη μορφή, ανάλογα με το pH του προς ανάλυση διαλύματος. Ο ιονισμός τους οφείλεται κυρίως στην αποβολή ή πρόσληψη H^+ από τις όξινες ή βασικές λειτουργικές ομάδες των N- και C-τελικών τους άκρων, καθώς και των αντίστοιχων ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων τους.

Πιο συγκεκριμένα (Σχήμα 6.3.3.1), η μεθοδολογία περιλαμβάνει την προετοιμασία του δείγματος και εισαγωγή του στον χώρο ιονισμού, κάτω από συνθήκες σταθερής ροής. Το διάλυμα διατρέχει τριχοειδή σωλήνα ο οποίος διατηρείται σε υψηλό ηλεκτρικό δυναμικό (3-4 kV).

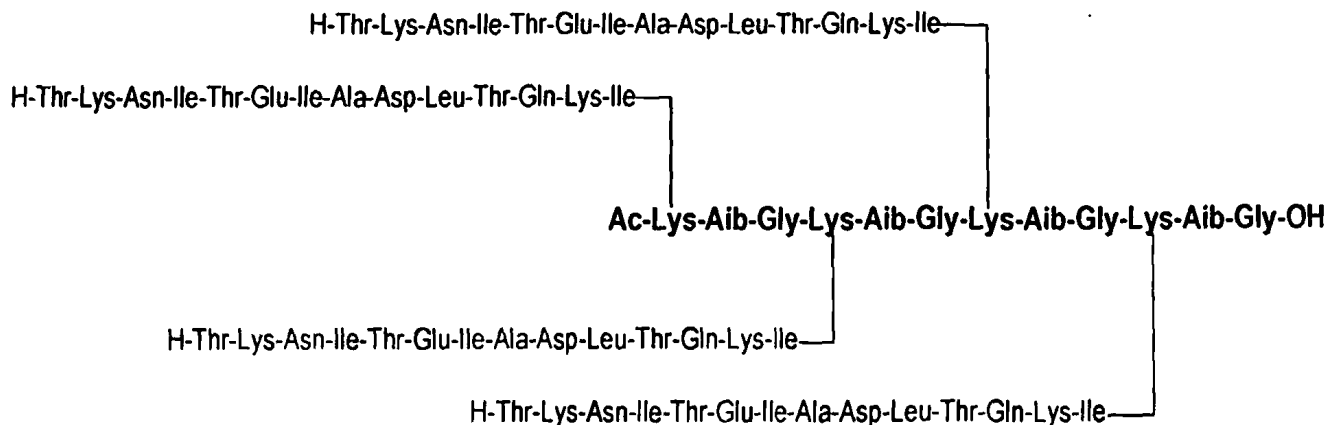


Σχήμα 6.3.3.1 Σχηματική περιγραφή της φασματοσκοπίας μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό.

Εάν υποθέσουμε ότι το δυναμικό που εφαρμόζεται είναι θετικό (+ESI), τότε τα αρνητικά ιόντα του προς ανάλυση διαλύματος κατευθύνονται προς τα τοιχώματα του τριχοειδούς, με τα αντίστοιχα θετικά ιόντα να παραμένουν στο διάλυμα κινούμενα προς την έξοδό του. Η εφαρμογή ομοαξονικής (κατά μήκος του τριχοειδούς) ροής αζώτου, υποβοηθά στη δημιουργία νέφους φορτισμένων σταγονιδίων, που σταδιακά εξατμίζονται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που αναπτύσσεται στο συγκεκριμένο χώρο. Με τον τρόπο αυτό τα σταγονίδια διαρκώς συρρικνώνονται, με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των εγκλωβισμένων ιόντων, οδηγώντας στην τελική τους απόσπαση. Η δημιουργία σταγονιδίων μικρότερου όγκου ακολουθεί αντίστοιχα στάδια εξάτμισης και απόσπασης, μέχρις ότου δημιουργηθούν αποδιαλυτομένα ιόντα (στην αέρια φάση). Τα ιόντα αυτά είναι κατάλληλα για την εισαγωγή στον αναλυτή μαζών, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός (ανάλογα με το m/z) και η ανίχνευσή τους.



6.4 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH



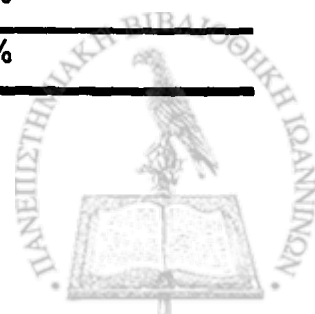
cTnl-(118-131)

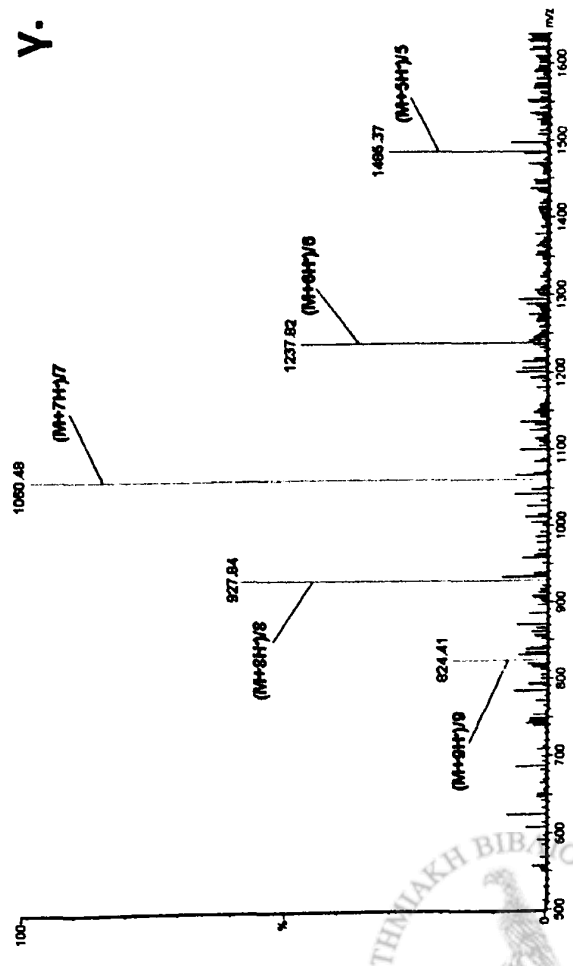
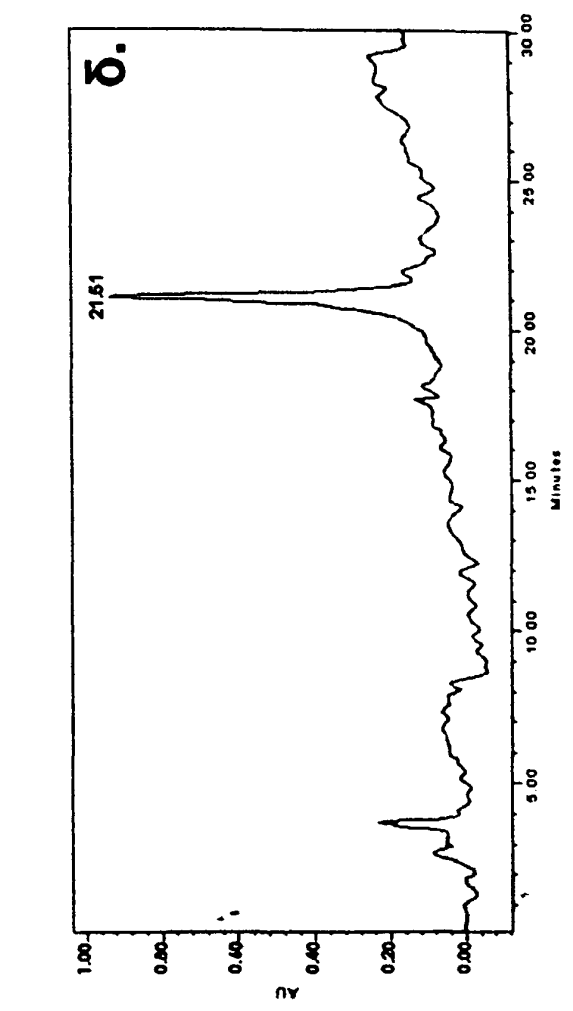
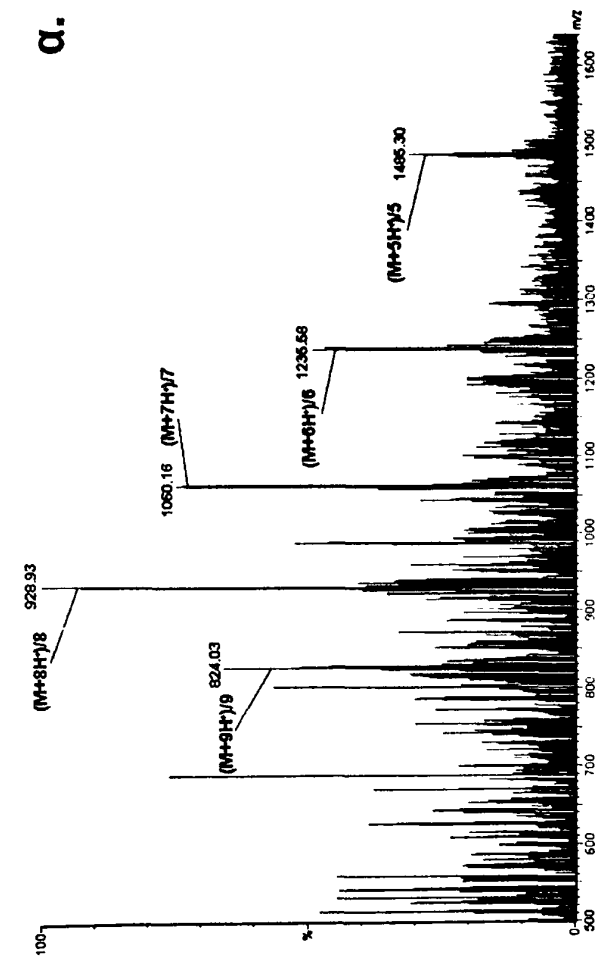
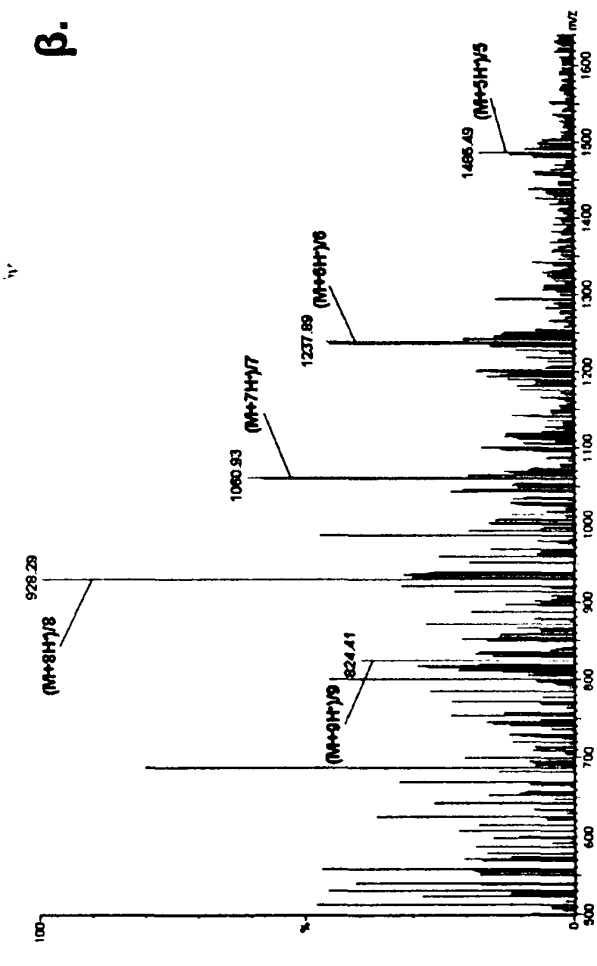
H-Thr-Lys-Asn-Ile-Thr-Glu-Ile-Ala-Asp-Leu-Thr-Gln-Lys-Ile-OH

M.T. Συμπλέγματος : C₃₂₆H₅₇₂N₈₈O₁₀₆ **M.B. Συμπλέγματος :** 7420,7

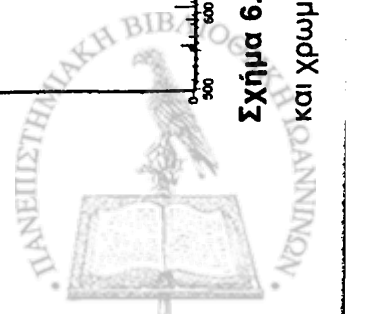
Η ανάπτυξη του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH (1) (Πίνακας 6.1.1) πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στο πλαίσιο της αντίστοιχης μεταπτυχιακής διατριβής, χρησιμοποιώντας ως συνθετικό πρωτόκολλο τη βήμα προς βήμα Boc/Bzl στρατηγική στερεής φάσης, σε 4-υδροξυμέθυλο-φαινυλακετάμιδο μέθυλο ρητίνη (ρητίνη PAM) [8,9]. Ο λόγος για τον οποίο γίνεται αναφορά στην παρούσα εργασία, έχει ως στόχο τη διαμόρφωση μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας επί της συνολικής έρευνας που πραγματοποιήθηκε (με αντικείμενο το συγκεκριμένο θέμα), καθώς και με σκοπό την συσχέτιση όλων των συνθετικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μακρομορίων αυτού του τύπου. Χωρίς καμιά περαιτέρω αναφορά, στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αποδόσεις σύνθεσης, αποκοπής από το πολυμερικό υπόστρωμα και καθαρισμού του εν λόγω ανοσογονικού συμπλέγματος. Στο σχήμα 6.4.1, παραθέτουμε τα φάσματα μάζας +ESI του μακρομορίου στα διάφορα στάδια σύνθεσης και καθαρισμού του, καθώς και την αναλυτική HPLC του απομονωμένου καθαρού τελικού προϊόντος.

| | | |
|---|----------|--------------|
| Απόδοση σύνθεσης (πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές) | : | 50,0% |
| Απόδοση σταδίου αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (HF) | : | 89,2% |
| Απόδοση καθαρισμού Dialysis (M.W. cutoff<2000 Da) | : | 88,5% |
| Απόδοση καθαρισμού ημιπαρασκευαστικής HPLC | : | 26,4% |
| Συνολική απόδοση | : | 10,4% |

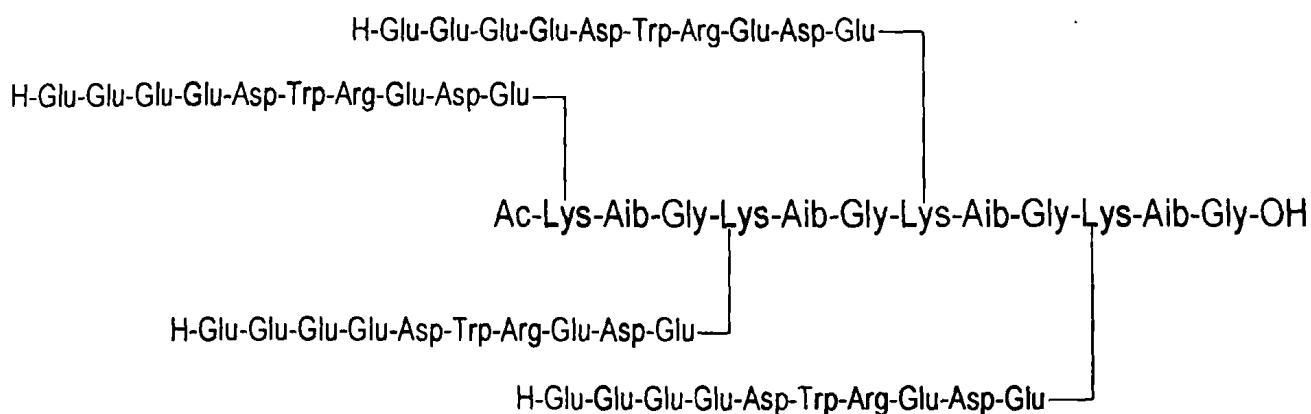




Σχήμα 6.4.1 Φάσματα μάζας +ESI (α. ακάθαρμο προϊόν πεπτιδικής σύνθεσης, β. μετά από Dialysis καθαρισμό, γ. μετά από HPLC καθαρισμό) και χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC (δ.) του απομονωμένου καθαρού μακρομορίου Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH.



6.5 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnT-(21-30)}]_4\text{-OH}$



cTnT-(21-30)

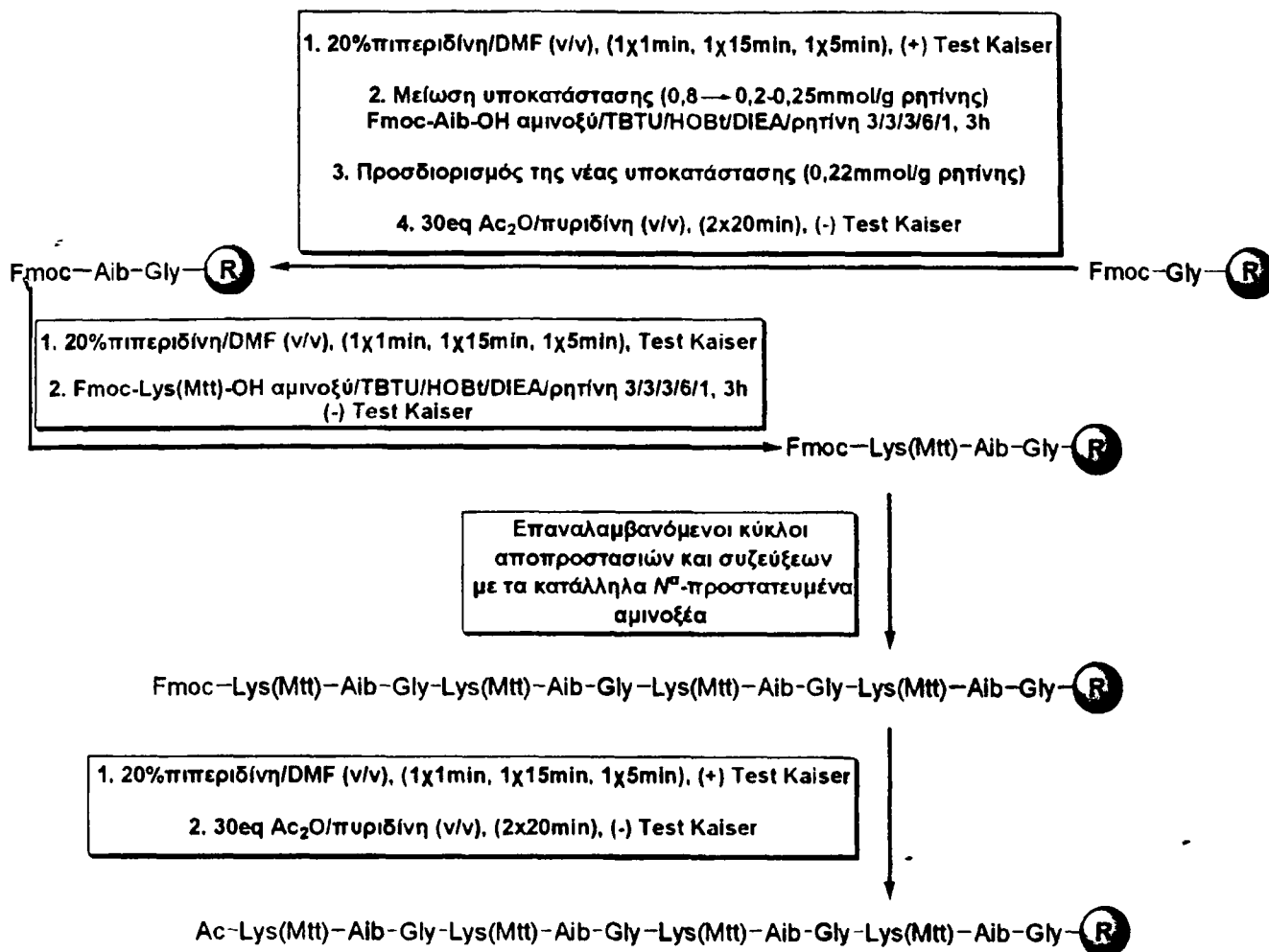
$\text{H-Glu-Glu-Glu-Glu-Asp-Trp-Arg-Glu-Asp-Glu-OH}$

M.T. Συμπλέγματος : $\text{C}_{270}\text{H}_{388}\text{N}_{72}\text{O}_{118}$ **M.B. Συμπλέγματος :** 6530,5

Η ανάπτυξη του ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnT-(21-30)}]_4\text{-OH}$ (2) (Πίνακας 6.1.1) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία στερεής φάσης, σε 9-φλουορένυλο-μεθυλοξυκαρβόνυλο-γλύκינו-π-βενζυλόξυ-βενζυλική αλκοολική ρητίνη (Fmoc-Gly-Wang ρητίνη) [10]. Αρχικά συντέθηκε ο τετραμερής ολιγοπεπτιδικός φορέας SOC_4 (Σχήμα 6.5.1), ο οποίος στη συνέχεια χωρίστηκε σε τμήματα, με στόχο τη σύνθεση διαφόρων πεπτιδικών συμπλεγμάτων και την διεξαγωγή μιας σειράς εργαστηριακών δοκιμών.

Χρησιμοποιήθηκαν 3,7g Fmoc-Gly-Wang με αρχική υποκατάσταση 0,8mmol/g ρητίνης ($3,70_{(g)} \times 0,80_{(mmol/g)} = 2,96\text{mmol}$ πεπτιδίου). Στο σημείο αυτό (πριν από την έναρξη της σύνθεσης), έλαβε χώρα μείωση της αρχικής υποκατάστασης της ρητίνης, με στόχο την ελαχιστοποίηση των στερεοχημικών παρεμποδίσεων που αναμένεται να υπάρξουν, λόγω του μεγάλου μεγέθους αλλά και της περίπλοκης διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής του πεπτιδικού μακρομορίου. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας περιελάμβανε την απομάκρυνση της N^{α} -Fmoc προστατευτικής ομάδας με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF (v/v), για 20min. Τον έλεγχο ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων ακολούθησε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας Fmoc-Aib-OH ($325,4_{(mg/mmol)} \times 0,3_{(mmol/g)} \times 3,7_{(g)} = 360,8\text{mg}$), με στόχο της επίτευξη της επιθυμητής τελικής υποκατάστασης της ρητίνης ($0,8 \rightarrow 0,2\text{-}0,25\text{mmol/g}$ ρητίνης). Μετά την ολοκλήρωση της σύζευξης και τις απαραίτητες εκπλύσεις, ένα τμήμα της πεπτιδορητίνης μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού προς ξήρανση. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν δύο δείγματα (10-15mg), τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου και κατεργάστηκαν (υπό ανάδευση) με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF (v/v) για 30min. Αποτέλεσμα της παραπάνω κατεργασίας ήταν η αποκοπή της Fmoc ομάδας και ο σχηματισμό παραγώγου του φουλβενίου, ο ποσοτικός προσδιορισμός του οποίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία UV στα 300,6nm όπου





Σχήμα 6.5.1 Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC₄, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας.

και απορροφά. Η τελική υποκατάσταση της ρητίνης υπολογίστηκε στα 0,22mmol/g ρητίνης (δηλ. 3,7_(g) x 0,22_(mmol/g) = 0,81mmol) με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{υποκατάσταση}(\text{mmol} / \text{g}) = \frac{a \times V}{\varepsilon \times m \times l}$$

a: μέγιστη απορρόφηση στα 300,6 nm

V: όγκος κατά την τελική αραίωση (ml)

ε: συντελεστής μοριακής απορρόφησης

l: μήκος της κυψελίδας σε εκατοστά (cm)

m: βάρος της πεπτιδορητίνης σε γραμμάρια (g)

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση των εναπομεινάντων ελεύθερων αμινομάδων της πεπτιδορητίνης, χρησιμοποιώντας τριάντα ισοδύναμα Ac₂O/πιριδίνη (v/v), συνολικά για 40 λεπτά. Τον έλεγχο ολοκλήρωσης της αντίδρασης (τεστ Kaiser) ακολούθησε η απομάκρυνση της N^o-Fmoc προστατευτικής ομάδας του Aib, με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF (v/v), όπως ακριβώς



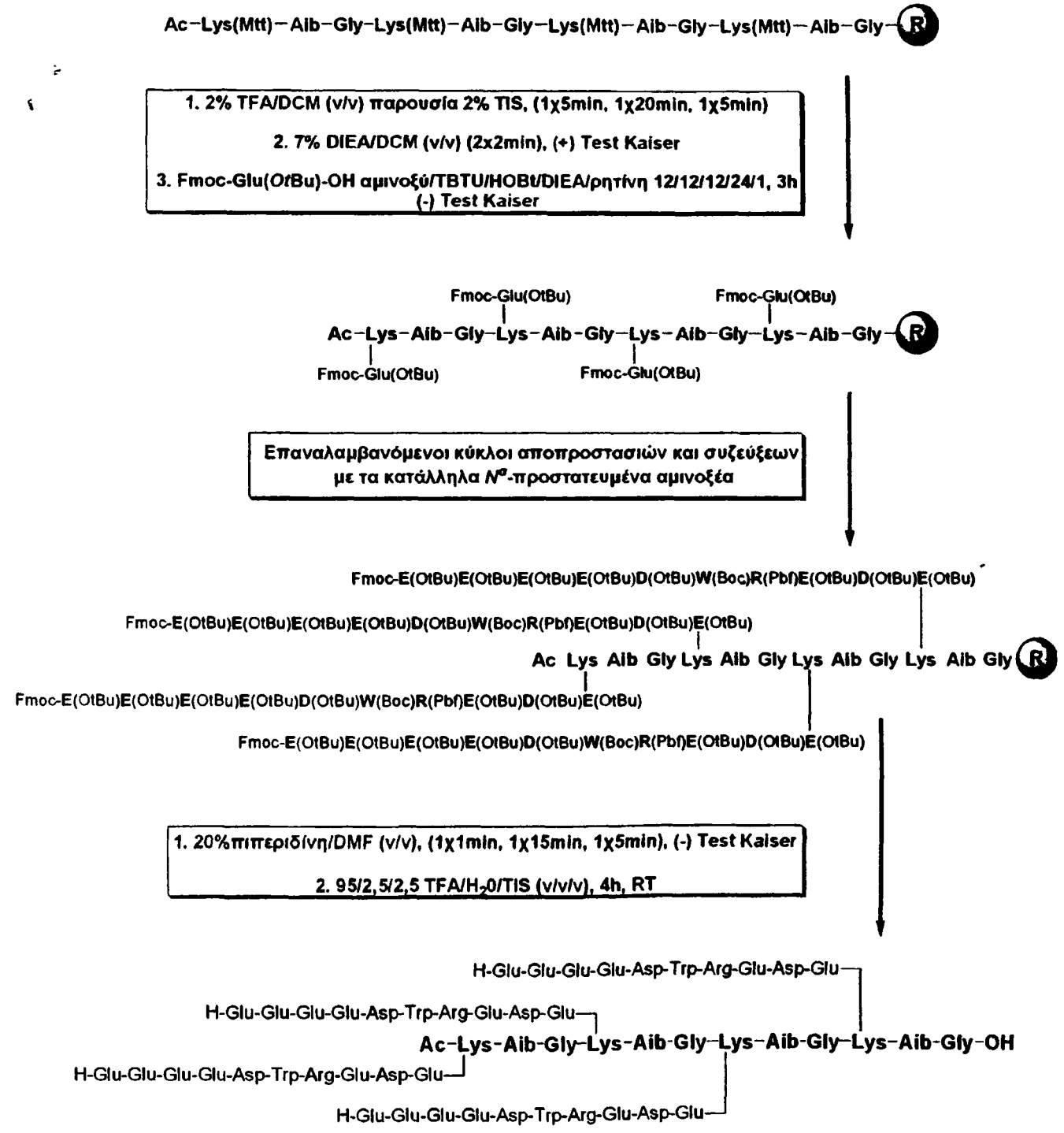
περιγράφηκε και προηγουμένως. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί, ότι η ποιοτική αξιολόγηση ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων μετά την απομάκρυνση της N^{α} -Fmoc προστατευτικής ομάδας του Aib ήταν αδύνατη, πιθανότατα λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων που προκαλούν οι δυο μεθυλομάδες του C^{α} ατόμου άνθρακα. Για το λόγο αυτό η αντίδραση σύζευξης του επόμενου κατά σειρά αμινοξέος (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) ελάμβανε χώρα εις διπλούν αυξάνοντας παράλληλα και τη διάρκεια της αντίδρασης. Το επιθυμητό μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας του τετραμερούς φορέα SOC₄ επιτεύχθη μετά από διαδοχικούς κύκλους συζεύξεων με τα κατάλληλα N^{α} -Fmoc προστατευμένα αμινοξέα και αποπροστασιών των αντίστοιχων N^{α} -Fmoc προστατευτικών τους ομάδων. Τα N^{α} -Fmoc-παράγωγα των αμινοξέων προενεργοποιούνταν με το αντιδραστήριο TBTU, παρουσία HOBt και DIEA για 10min, με τον σχηματιζόμενο εστέρα να προστίθεται στο μείγμα της αντίδρασης. Το N-τελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας του φορέα ακετυλιώθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράψαμε. Στη συνέχεια η πεπτιδορηνίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού προς ξήρανση, όπου και αφέθηκε μέχρις ότου σταθεροποιηθεί το βάρος της, διαδικασία απαραίτητη για τον υπολογισμό της απόδοσης σύνθεσης του φορέα ($\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 85,0\%$).

Στη συνέχεια, ελήφθη κατάλληλη ποσότητα πεπτιδορηνίνης (712mg δηλ. 0,12mmol πεπτιδίου), για τη ταυτόχρονη βήμα προς βήμα σύνθεση των τεσσάρων αντιγράφων του επιτόπου 21-30, της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης T (Σχήμα 6.5.2). Αρχικά οι N^{α} -Mtt προστατευτικές ομάδες των τεσσάρων λυσινών του φορέα, απομακρύνθηκαν μετά από κατεργασία της πεπτιδορηνίνης με διάλυμα 2% TFA/DCM (v/v) παρουσία 2% TIS (συνολικά για 30min). Ακολούθησε εξουδετέρωση των σχηματισθέντων TFA-αλάτων με διάλυμα 7% DIEA/DCM (v/v) (2x2min) και ο ποιοτικός προσδιορισμός ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων. Τα αμινοξέα του επιτόπου εισήχθησαν ως N^{α} -Fmoc-παράγωγα, ενώ οι διαδοχικές αντιδράσεις συζεύξεων στην πεπτιδορηνίνη πραγματοποιήθηκαν με την διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, η πεπτιδορηνίνη μεταφέρθηκε εκ νέου σε ξηραντήρα κενού και στη συνέχεια υπολογίστηκε η απόδοση σύνθεσης, πριν την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη ($\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 67,2\%$). Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την αποκοπή όλων των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων του, μετά από κατεργασία της πεπτιδορηνίνης με διάλυμα 95/2,5/2,5 TFA/H₂O/TIS (v/v/v) (Σχήμα 6.2.1.3), για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας (παράγραφος 6.2.1) και έπειτα από λυοφιλοποίηση του διαλύματος του πεπτιδίου (2N CH₃COOH), υπολογίστηκε η απόδοση του συγκεκριμένου σταδίου σε $\alpha_{\text{αποκοπής}} = 83,3\%$.

Το πεπτίδιο υποβλήθηκε αρχικά σε προκαταρκτικό καθαρισμό με την μεθοδολογία της διαπίδυσης έναντι νερού, κάνοντας χρήση της ημιπερατής μεμβράνης Dialysis με cutoff μοριακών βαρών <3500 Da. Μετά από 4 ανανεώσεις του εξωτερικού διαλύματος (απιονισμένο H₂O) στη διάρκεια ενός 24ώρου, το θεωρητικά απαλλαγμένο από παραπροϊόντα μοριακού βάρους <3500 Da



περιεχόμενο της μεμβράνης λυοφιλοποιήθηκε και από την ποσότητα του στερεού πεπτιδίου που ανακτήθηκε, υπολογίστηκε η αντίστοιχη απόδοση καθαρισμού ($\alpha_{\text{Dialysis}} (<3500 \text{ Da}) = 86,0\%$).



Σχήμα 6.5.2 Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για την σύνθεση του μακρομοριακού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH**, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες του συστήματος διαλυτών έκλουσης, για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με



παρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Interchrom, 250 x 21,2 mm. Χρησιμοποιήθηκε βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλυσης (gradient) (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1% TFA, με τη βαθμίδωση των διαλυτών τελικά να διαμορφώνεται από A/B: 95/5 (t=0) σε A/B: 50/50 (t=30min). Η ταχύτητα ροής του συστήματος καθορίστηκε στα 20ml/min, ενώ η ανίχνευση έλαβε χώρα στα 214 nm. Ακολούθησε συλλογή και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων, ενώ από την ποσότητα του στερεού καθαρού πεπτιδίου που ανακτήθηκε, υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού HPLC σε α_{HPLC} = 10,0%.

Ο έλεγχος της καθαρότητας του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC. Οι συνθήκες και τα αποτελέσματα της αναλυτικής παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

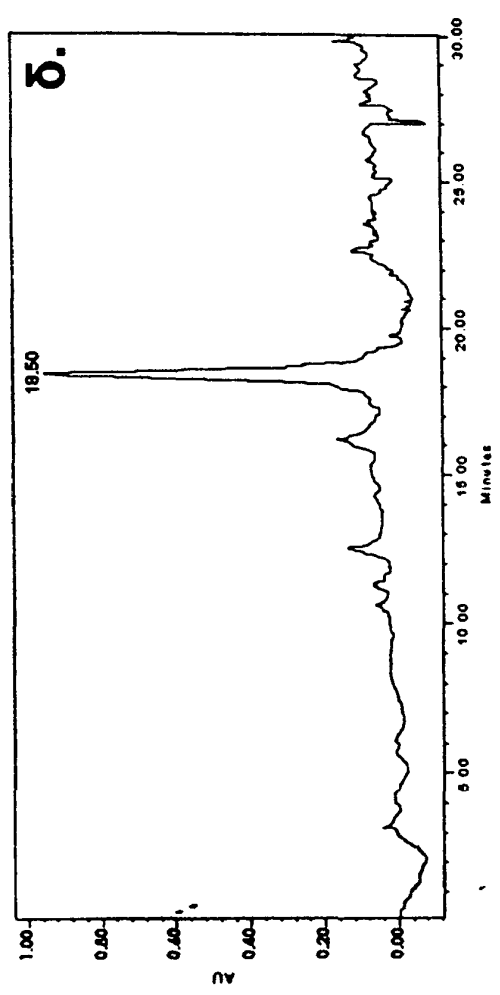
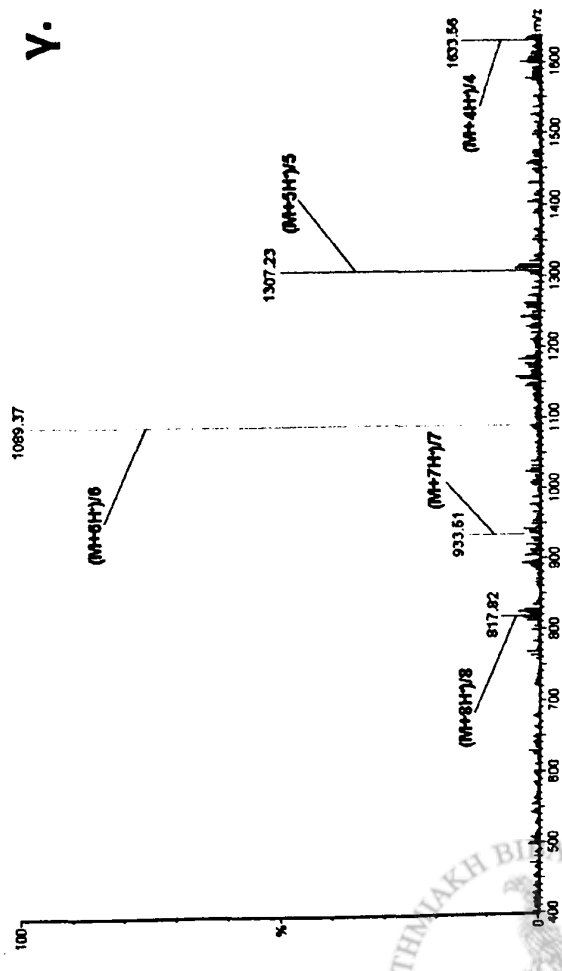
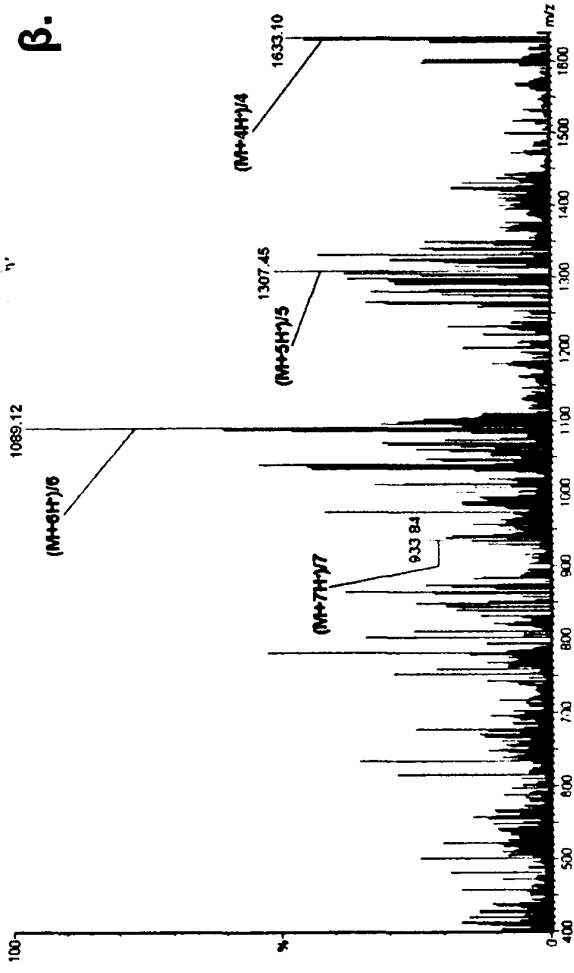
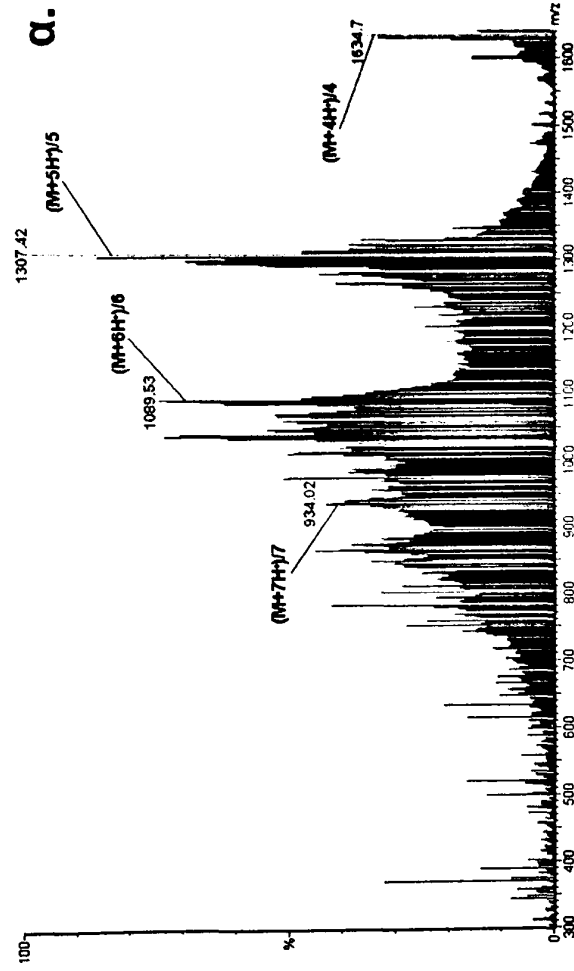
| | | | |
|---|---|------------------------------|---------------------------------|
| Διαλύτες | : | (A) H ₂ O/0,1%TFA | (B) CH ₃ CN/0,1% TFA |
| Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλυσης διαλυτών (gradient) | : | A/B: 95/5 (t=0) | → A/B: 50/50 (t=30 min) |
| Ταχύτητα ροής του συστήματος έκλυσης | : | 1 ml/min | |
| Χρόνος έκλυσης | : | 30 min | |
| Χρόνος κατακράτησης (Retention time, R _t) | : | 18,5 min | |

Η καθαρότητα του επιθυμητού προϊόντος πιστοποιήθηκε και με φασματοσκοπία μάζας +ESI. Στο σχήμα 6.5.3, παραθέτουμε τα φάσματα μάζας +ESI του πεπτιδικού μακρομορίου στα διάφορα στάδια σύνθεσης και καθαρισμού του, καθώς και την αναλυτική HPLC του απομονωμένου καθαρού τελικού προϊόντος.

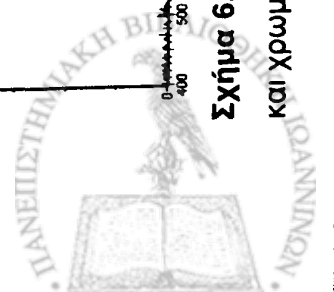
Τέλος, στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης, αποκοπής από το πολυμερικό υπόστρωμα και καθαρισμού, του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH.

| | | |
|---|---|-------------|
| Απόδοση σύνθεσης (πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές) | : | 67,2% |
| Απόδοση σταδίου αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (95% TFA) | : | 83,3% |
| Απόδοση καθαρισμού Dialysis (M.W. cutoff<3500 Da) | : | 86,0% |
| Απόδοση καθαρισμού παρασκευαστικής HPLC | : | 10,0% |
| Συνολική απόδοση | : | 4,8% |

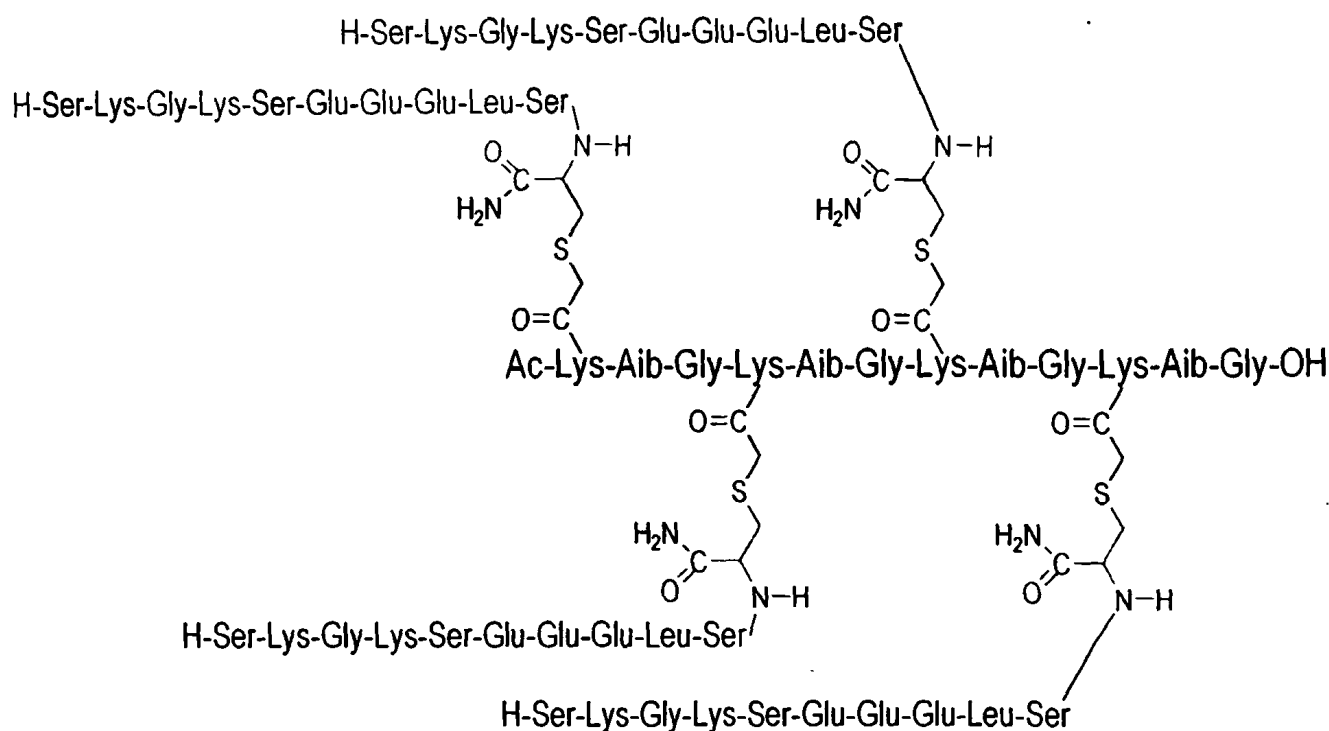




Σχήμα 6.5.3 Φάσματα μάζας +ESI (α. ακάθαρτο προϊόν πεπτιδικής σύνθεσης, β. μετά από Dialysis καθαρισμό, γ. μετά από HPLC καθαρισμό) και χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC (δ.) του απομονωμένου καθαρού μακρομορίου Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH.



6.6 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH



cTnC-(89-98)-Cys

H-Ser-Lys-Gly-Lys-Ser-Glu-Glu-Glu-Leu-Ser-Cys-NH₂

M.T. Επιτόπου : C₄₇H₈₂N₁₄O₂₀S M.B. Επιτόπου : 1195,3

M.T. Συμπλέγματος : C₂₄₆H₄₂₁N₇₂O₉₈S₄ M.B. Συμπλέγματος : 6084,3

Η σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH (4) (Πίνακας 6.1.1) πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού, μεταξύ του N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ (5) (Πίνακας 6.1.1) και του επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C 89-98, ο οποίος έφερε C-τελική κυστεΐνη (3) (Πίνακας 6.1.1).

6.6.1 Σύνθεση του φορέα Ac-SOC₄[BrCH₂CO]₄-OH

Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC₄, έλαβε χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει ήδη περιγραφεί στη προηγούμενη παράγραφο, με τη μόνη διαφορά ότι το πολυμερικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε δεν έφερε προσδεμένο το C-τελικό αμινοξύ (Gly). Αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν 4,8g ρητίνης Wang με αρχική υποκατάσταση 0,75mmol/g ρητίνης (4,80_(g) × 0,75_(mmol/g) = 3,60mmol πεπτιδίου). Η ρητίνη πλύθηκε για 2 ώρες με διάλυμα 1:1 DMF/DCM (v/v), με στόχο την επαρκή διόγκωση του πολυμερούς. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας περιελάμβανε τη μείωση της αρχικής της υποκατάστασης από 0,75 σε 0,3-0,4mmol/g



ρητίνης. Για το λόγο αυτό, η αντίδραση σύζευξης του πρώτου αμινοξέος (Fmoc-Gly-OH) πραγματοποιήθηκε με την χρήση της κατάλληλης αναλογίας αμινοξέος/HBTU/HOBT/DIEA/ρητίνη (3/3/3/6/1) παρουσία καταλυτικής ποσότητας DMAP (1%), σε DMF. Η αντίδραση σύζευξης διήρκεσε 1 ώρα. Στη συνέχεια και μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο τιτλοδότησης που ήδη περιγράψαμε, με την τελική υποκατάσταση να διαμορφώνεται στα 0,39mmol/g ρητίνης (δηλ. $4,8_{(g)} \times 0,39_{(mmol/g)} = 1,87mmol$). Μετά το χαρακτηρισμό της νέας υποκατάστασης, πραγματοποιήσαμε ακετυλίωση των εναπομεινάντων ελεύθερων υδροξυλομάδων της ρητίνης, χρησιμοποιώντας τριάντα ισοδύναμα Ac₂O/πυριδίνη (v/v), συνολικά για 40 λεπτά. Η βήμα προς βήμα σύνθεση της επιθυμητής αμινοξικής αλληλουχίας του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC₄ διεξήχθη χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα, με την απόδοση σύνθεσης πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το πολυμερές να διαμορφώνεται σε $\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 92,0\%$.

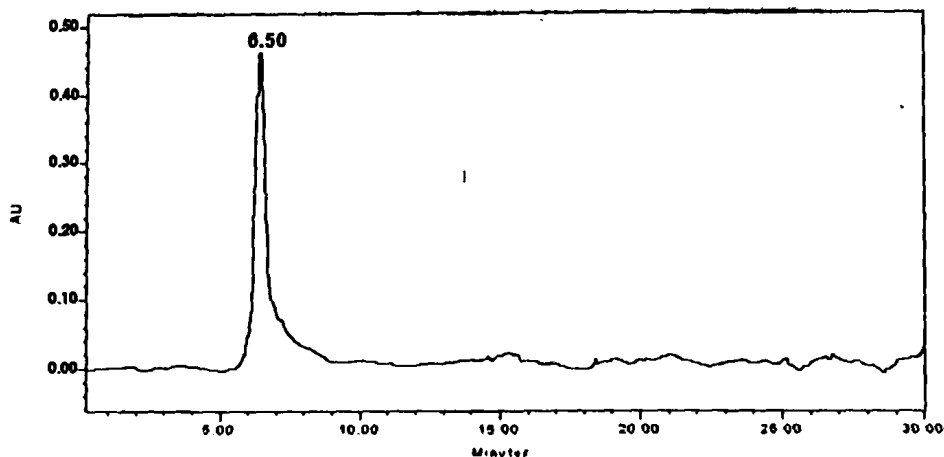
Η αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των N^t-Mtt προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των λυσινών του, έλαβε χώρα μετά από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα 95/2.5/2.5 TFA/H₂O/TIS (v/v/v) για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ($\alpha_{\text{αποκοπής}} = 92,8\%$).

Το πεπτίδιο υποβλήθηκε σε καθαρισμό με παρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας τη στήλη C₁₈ Interchrom, 250 x 21,2 mm. Χρησιμοποιήθηκε βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης (gradient) (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1% TFA, με τη βαθμίδωση των διαλυτών να διαμορφώθηκε από A/B: 95/5 (t=0) σε A/B: 50/50 (t=30min). Η απόδοση καθαρισμού HPLC του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC₄ υπολογίστηκε σε $\alpha_{\text{HPLC}} = 74,0\%$. Ο χαρακτηρισμός του πεπτιδίου έγινε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6.6.1.1) και φασματοσκοπία μάζας +ESI (Σχήμα 6.6.1.2).

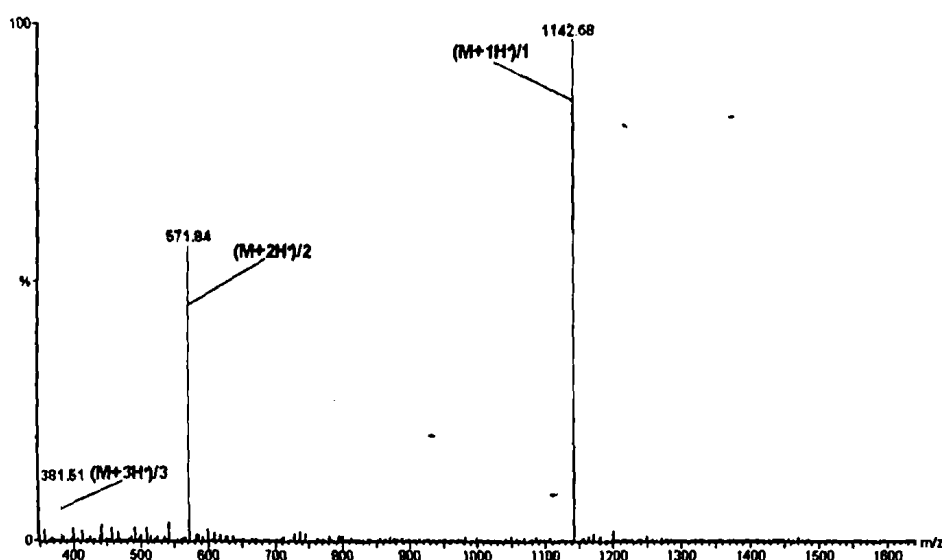
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης, αποκοπής από το πολυμερικό υπόστρωμα και καθαρισμού, του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα Ac-SOC₄-OH.

| | | |
|---|---|--------------|
| Απόδοση σύνθεσης (πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές) | : | 92,0% |
| Απόδοση σταδίου αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (95% TFA) | : | 92,8% |
| Απόδοση καθαρισμού παρασκευαστικής HPLC | : | 74,0% |
| Συνολική απόδοση | : | 63,2% |





Σχήμα 6.6.1.1 Χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC του απομονωμένου καθαρού τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα Ac-SOC₄-OH.

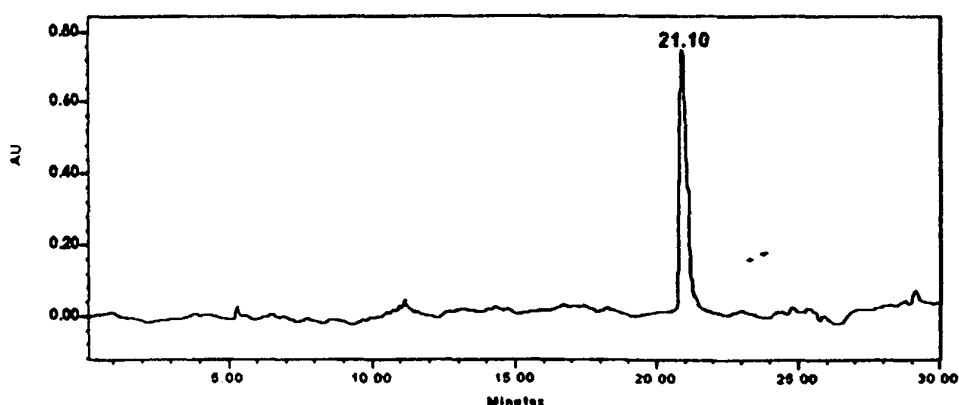


Σχήμα 6.6.1.2 Φάσμα μάζας +ESI του απομονωμένου από HPLC τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα Ac-SOC₄-OH.

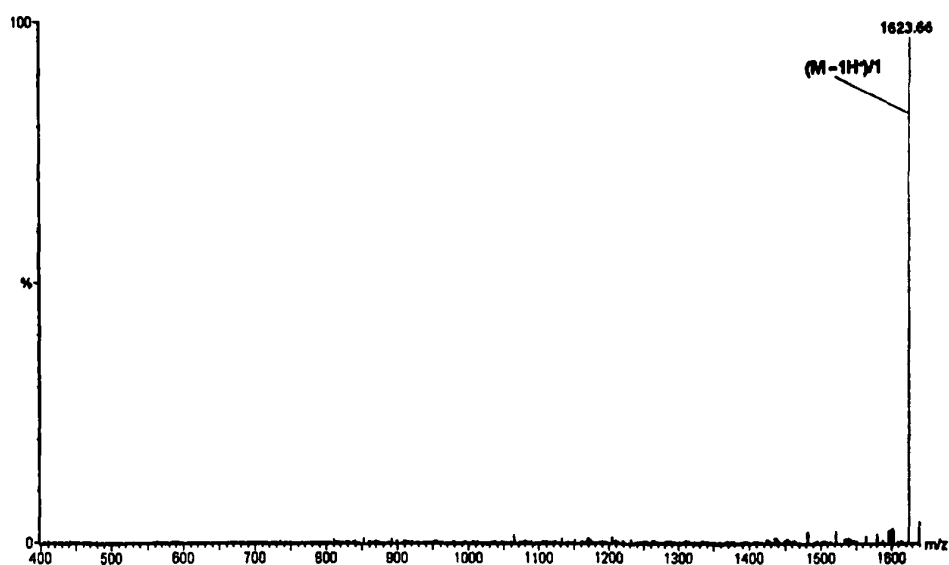
Η σύνθεση του N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ (Ac-SOC₄[BrCH₂CO]₄-OH) (5) (Πίνακας 6.1.1) έλαβε χώρα σε υγρή φάση, με την χρήση αναλογίας -NH₂/BrCH₂COBr/DIEA 1/2/4 σε διάλυμα DMF/DCM, 4/1 (v/v). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 0,04mmol (45mg) φορέα τα οποία αρχικά διαλύθηκαν στο μείγμα διαλυτών της αντίδρασης, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε η σταδιακή προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας BrCH₂COBr (συνολικά, 0,04_(mmol) Χ 2_(eq) Χ 4_(Lys) Χ 201,84_(mg/mmol) / 2,329_(mg/μl) = 27,7μl). Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε σε τιμές μεταξύ 8-9 με προσθήκη DIEA (συνολικά, 0,04_(mmol) Χ 4_(eq) Χ 4_(Lys) Χ 129,24_(mg/mmol) / 0,755_(mg/μl) = 109,6μl), απαραίτητη βάση για την εξουδετέρωση του HBr που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε σκότος, στους 0 °C υπό ατμόσφαιρα Ar, με τη συνολική της διάρκεια να μην ξεπερνά τα 20min. Ο έλεγχος της προόδου της αντίδρασης



πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας -ESI, ενώ μετά την ολοκλήρωσή της το διάλυμα οξινίστηκε με HCl 0,1N. Ακολούθησε η καταβύθιση του προϊόντος της αντίδρασης με παγωμένο αιθέρα και αποθήκευση της σφαιρικής φιάλης στους -20 °C, για 2-3 ώρες. Το επόμενο στάδιο περιελάμβανε τη διήθηση του ιζήματος και την παραλαβή του πεπτιδίου, μετά από διάλυση σε μείγμα H₂O/CH₃CN, 4/1 (v/v). Χωρίς καμιά περαιτέρω κατεργασία το διάλυμα ενέθηκε σε παράσκευαστική RP-HPLC, χρησιμοποιώντας πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών αντίστοιχο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα Ac-SOC₄-OH. Η απόδοση καθαρισμού HPLC του N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ υπολογίστηκε σε α_{HPLC} = 25,0%. Ο χαρακτηρισμός και ο έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου από HPLC τελικού προϊόντος έγινε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6.6.1.3) και φασματοσκοπία μάζας -ESI (Σχήμα 6.6.1.4).



Σχήμα 6.6.1.3 Χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC του απομονωμένου καθαρού N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ (Ac-SOC₄[BrCH₂CO]₄-OH).



Σχήμα 6.6.1.4 Φάσμα μάζας -ESI του απομονωμένου από HPLC N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ (Ac-SOC₄[BrCH₂CO]₄-OH).



6.6.2 Σύνθεση του επιτόπου cTnC-(89-98)-Cys (SKGKSEEELSC)

Η σύνθεση του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C 89-98 (3) (Πίνακας 6.1.1), έλαβε χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας (όπως έχει ήδη περιγραφεί στην παράγραφο 6.2.1), χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την 4-(2',4'-διμεθοξυφαινόλυλο-Fmoc-αμινομέθυλο)-φαινόξυ ρητίνη (Rink amide). Για τη σύνθεση 0,8mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε 1,0g ρητίνης με αρχική υποκατάσταση 0,8mmol/g. Τα αμινοξέα του επιτόπου εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^ε-Fmoc-παράγωγα, ενώ οι διαδοχικές αντιδράσεις συζεύξεων τους στην πεπτιδορρητίνη πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της αναλογίας αμινοξύ/DIC/HOBt/ρητίνη 3/3/3/1 σε διάλυμα DMF/DCM, 2/1 (v/v). Η βήμα προς βήμα σύνθεση του γραμμικού επιτόπου ολοκληρώθηκε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα, με την απόδοση της, πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το πολυμερές να υπολογίζεται σε $\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 91,9\%$. Η αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων του, έλαβε χώρα μετά από κατεργασία της πεπτιδορρητίνης με διάλυμα TFA/DMB/EDT/TIS/H₂O σε αναλογία 91,5/2,5/2,5/2,5/1 (v/v/v/v/v) για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ($\alpha_{\text{αποκοπής}} = 97,2\%$).

Ακολούθησε η αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες του συστήματος διαλυτών έκλουσης, για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με παρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Interchrom, 250 x 21,2 mm. Το βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και οι υπόλοιποι παράμετροι καθαρισμού, δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

| | | | |
|---|---|--|---------------------------------|
| Διαλύτες | : | (A) H ₂ O/0,1%TFA | (B) CH ₃ CN/0,1% TFA |
| Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών (gradient) | : | A/B: 90/10 (t=0) → A/B: 40/60 (t=30 min) | |
| Ταχύτητα ροής του συστήματος έκλουσης | : | 20 ml/min | |
| Χρόνος έκλουσης | : | 30 min | |
| Χρόνος κατακράτησης (Retention time, R _t) | : | 2,8 min | |

Στη συνέχεια έλαβε χώρα συλλογή και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων και από την ποσότητα του στερεού πεπτιδίου που ανακτήθηκε, υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού HPLC σε $\alpha_{\text{HPLC}} = 65,5\%$.

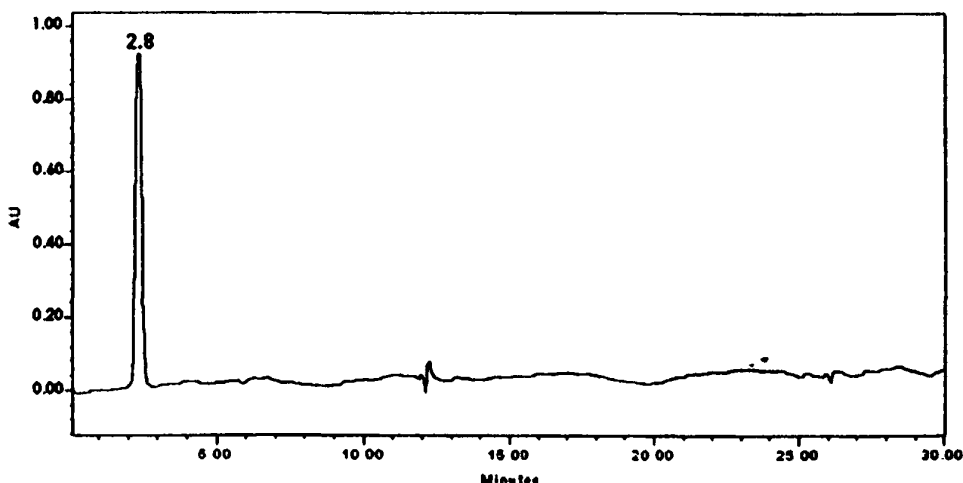
Τέλος, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός του απομονωμένου από HPLC τελικού επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6.6.2.1) και φασματοσκοπία μάζας +ESI (Σχήμα 6.6.2.2).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης, αποκοπής από το πολυμερικό υπόστρωμα και καθαρισμού, του

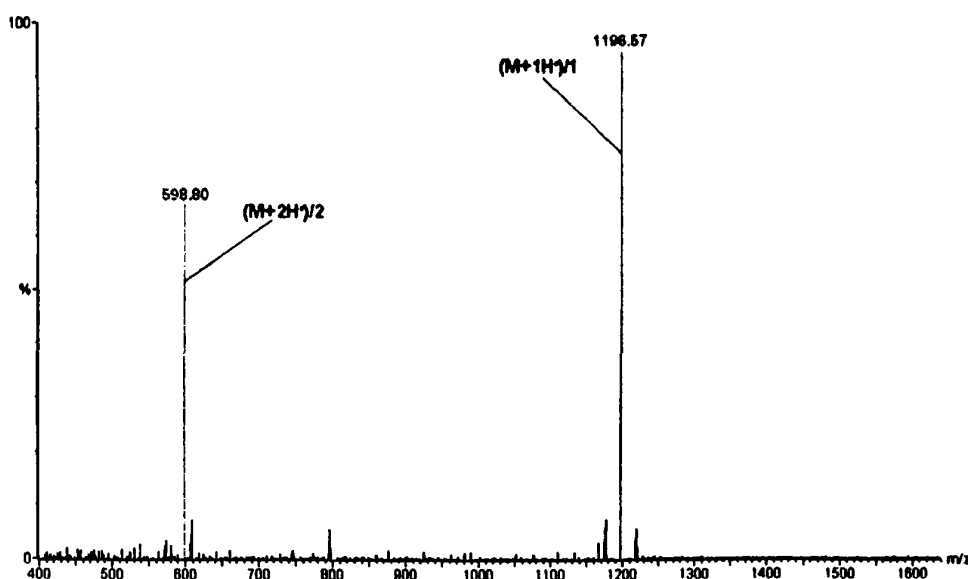


τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C 89-98 cTnC-(89-98)-Cys.

| | | |
|---|----------|--------------|
| Απόδοση σύνθεσης (πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές) | : | 91,9% |
| Απόδοση σταδίου αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (95% TFA) | : | 97,2% |
| Απόδοση καθαρισμού παρασκευαστικής HPLC | : | 65,5% |
| Συνολική απόδοση | : | 58,5% |



Σχήμα 6.6.2.1 Χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC του απομονωμένου καθαρού γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C 89-98, cTnC-(89-98)-Cys.



Σχήμα 6.6.2.2 Φάσμα μάζας +ESI του απομονωμένου από HPLC γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C 89-98, cTnC-(89-98)-Cys.



6.6.3 Χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού θειοεθερικού δεσμού μεταξύ του επιτόπου **cTnC-(89-98)-Cys** και του φορέα **Ac-SOC₄[BrCH₂CO]₄-OH**

Χρησιμοποιήθηκαν 11,0mg (0,0068mmol) *N*^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ τα οποία μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη των 5ml, όπου και διαλύθηκαν σε 4ml διαλύματος 0,2M Tris pH=8,2/CH₃CN, 3/1 (v/v). Κατόπιν προστέθηκε σταδιακά στο μείγμα της αντίδρασης (κάθε 20-30min), η απαιτούμενη ποσότητα του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη γραμμικού επιτόπου **cTnC-(89-98)-Cys** (συνολικά, 0,0068_(mmol) · Χ 1,2_(eq) Χ 4_[Lys(BrCH₂CO)] Χ 1537,4_(mg/mmol) = 50,2mg). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σκότος υπό ατμόσφαιρα αργού και παρακολουθήθηκε με τη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας +ESI (κάθε 60min). Η συνολική της διάρκεια δεν ξεπέρασε τις 8 ώρες, ενώ με την ολοκλήρωση της διαδικασίας το διάλυμα της αντίδρασης οξινίστηκε με HCl 0,1N.

Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ημιπερατή μεμβράνη Dialysis με cutoff μοριακών βαρών <3500 Da, για τον προκαταρκτικό καθαρισμό με την μεθοδολογία της διαπίδυσης έναντι νερού. Πραγματοποιήθηκαν 4 ανανεώσεις του εξωτερικού διαλύματος (απιονισμένο H₂O) στη διάρκεια ενός 24ώρου. Το περιεχόμενο της μεμβράνης λυοφιλοποιήθηκε και ακολούθως υπολογίστηκε η συνολική απόδοση σύνθεσης και Dialysis καθαρισμού του πεπτιδίου (α = 92,0%).

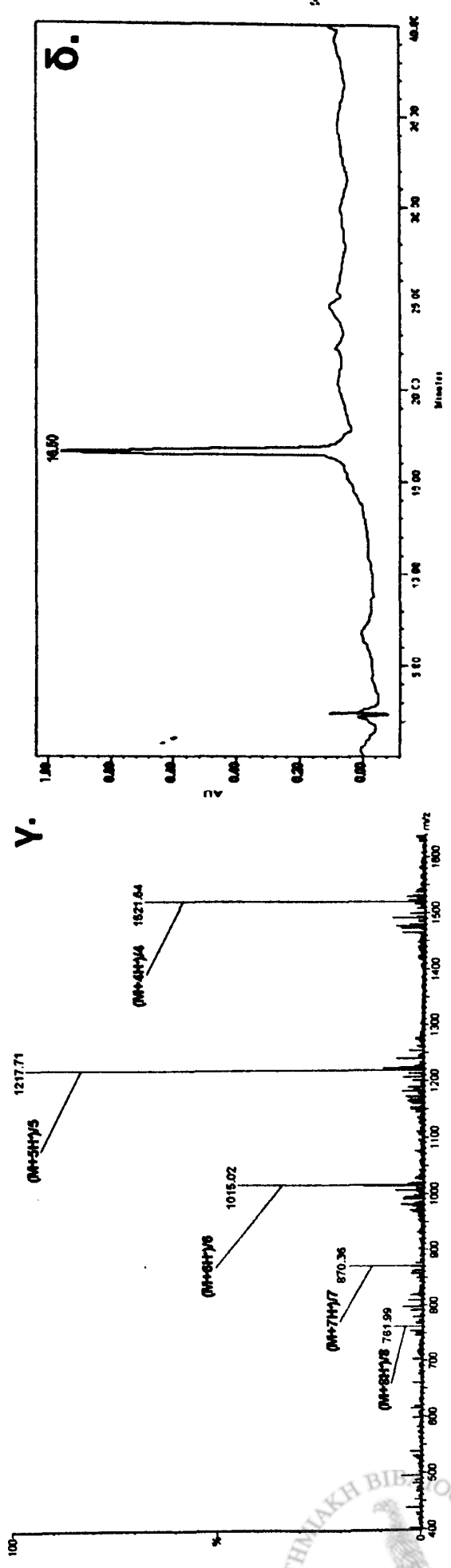
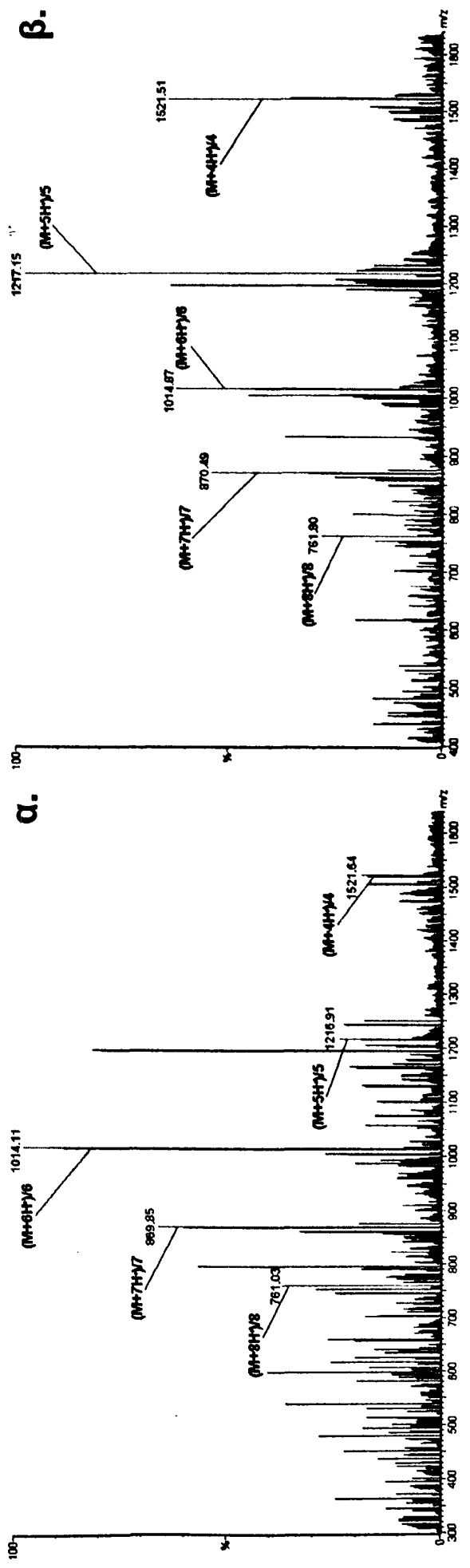
Ακολούθησε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες του συστήματος διαλυτών έκλουσης, για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με παρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Interchrom, 250 x 21,2 mm. Η βαθμίδωση των διαλυτών του προγράμματος έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε [(A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1% TFA] διαμορφώθηκε από A/B: 95/5 (t=0) σε A/B: 60/40 (t=40min). Μετά από συλλογή και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού HPLC σε α_{HPLC} = 35,0%.

Ο έλεγχος της καθαρότητας του επιθυμητού προϊόντος **Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH** πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC και πιστοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας +ESI. Οι συνθήκες και τα αποτελέσματα της αναλυτικής HPLC παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

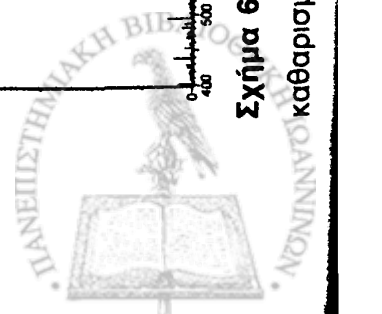
| | | | |
|---|---|------------------------------|---------------------------------|
| Διαλύτες | : | (A) H ₂ O/0,1%TFA | (B) CH ₃ CN/0,1% TFA |
| Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών (gradient) | : | A/B: 95/5 (t=0) → | A/B: 60/40 (t=40 min) |
| Ταχύτητα ροής του συστήματος έκλουσης | : | 1 ml/min | |
| Χρόνος έκλουσης | : | 40 min | |
| Χρόνος κατακράτησης (Retention time, R _t) | : | 16,5 min | |

Στο σχήμα 6.6.3.1, παραθέτουμε τα φάσματα μάζας +ESI του πεπτιδικού μακρομορίου στα διάφορα στάδια σύνθεσης και καθαρισμού του, καθώς και την αναλυτική HPLC του απομονωμένου επιθυμητού προϊόντος. Το πρωτόκολλο ανάπτυξης τέτοιου τύπου μακρομοριακών συμπλεγμάτων περιγράφεται σχηματικά στο σχήμα 4.4.4.2 (βλ. Θεωρητικό μέρος, Κεφάλαιο 4).





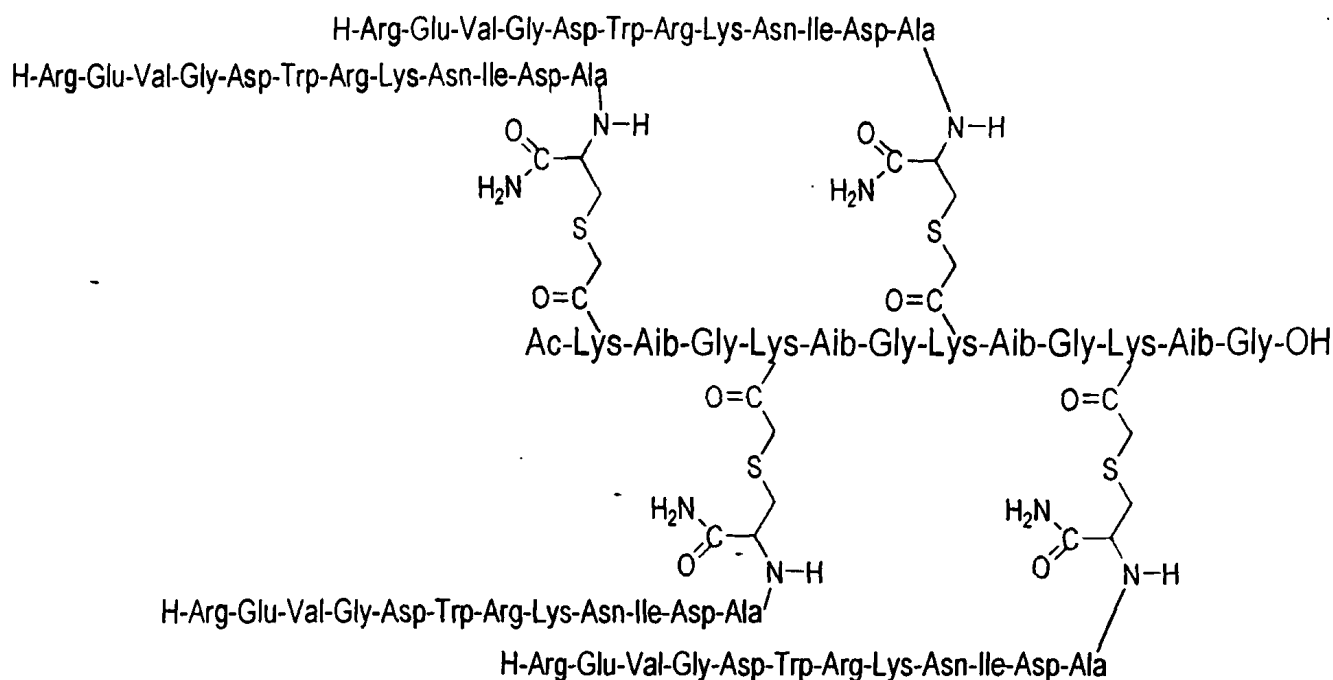
Σχήμα 6.6.3.1 Φάσματα μάζας +ESI (α. ακάθαρτο προϊόν χημειοεκλεκτικής αντίδρασης, β. μετά από Dialysis καθαρισμό, γ. μετά από HPLC καθαρισμό) και χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC (δ.) του απομονωμένου καθαρού μακρομόριου Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH.



Στη συνέχεια παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης και καθαρισμού του ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnC-(89-98)-Cys}]_4\text{-OH}$.

| | | |
|--|---|--------------|
| Απόδοση σύνθεσης (χημειοεκλεκτική αντίδραση) και προκαταρκτικού καθαρισμού Dialysis (<3500 Da) | : | 92,0% |
| Απόδοση καθαρισμού παρασκευαστικής HPLC | : | 35,0% |
| Συνολική απόδοση | : | 32,2% |

6.7 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnI-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}$



$\text{cTnI-(185-196)-Cys}$

$\text{H-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Trp-Arg-Lys-Asn-Ile-Asp-Ala-Cys-NH}_2$

M.T. Επιτόπου : $\text{C}_{65}\text{H}_{105}\text{N}_{23}\text{O}_{20}\text{S}$ **M.B. Επιτόπου :** 1560,7

M.T. Συμπλέγματος : $\text{C}_{318}\text{H}_{512}\text{N}_{108}\text{O}_{98}\text{S}_4$ **M.T. Συμπλέγματος :** 7544,4

Η σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnI-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}$ (7) (Πίνακας 6.1.1) διεξήχθη σε υγρή φάση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο ανάπτυξης τετραμερών μακρομοριακών συμπλεγμάτων SOC_4 , που έχει ήδη περιγραφεί στη προηγούμενη παράγραφο. Η χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού, πραγματοποιήθηκε μεταξύ του N^ϵ -



βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ (βλ. παράγραφο 6.6.1) και του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 185-196 (6) (Πίνακας 6.1.1).

6.7.1 Σύνθεση του επιτόπου cTnI-(185-196)-Cys (REVGDWKRNIDAC)

Η σύνθεση του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 185-196 (6) (Πίνακας 6.1.1), έλαβε χώρα σύμφωνα με το Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετικό πρωτόκολλο στερεής φάσης, το οποίο έχει ήδη αναλυθεί στην παράγραφο 6.6.2. Χωρίς να υπεισέλθουμε σε άσκοπες επαναλήψεις συνθετικών βημάτων, συνοπτικά αναφέρουμε ότι για τη σύνθεση 0,64mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 0,8g Rink amide ρητίνης με αρχική υποκατάσταση 0,8mmol/g. Η σύνθεση τη επιθυμητής αμινοξικής αλληλουχίας του εν λόγω επιτόπου ολοκληρώθηκε επιτυχώς, με την απόδοση σύνθεσης πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές να διαμορφώνεται σε $\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 93,1\%$. Η διαδικασία αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των όλων προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων του, πραγματοποιήθηκε μετά από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα TFA/EDT/TIS/H₂O σε αναλογία 94/2,5/2,5/1 (v/v/v/v) για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Αν και δεν χρησιμοποιήθηκε στο μείγμα αποκοπής το DMB, η λήψη C-τελικών αλκυλιωμένων παραπροϊόντων που οφείλονται στην μερική αποικοδόμηση της Rink amide ρητίνης, περιορίστηκε σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές διαμορφώθηκε σε $\alpha_{\text{αποκοπής}} = 95,7\%$.

Το πεπτιδίο υποβλήθηκε σε καθαρισμό με παρασκευαστική RP-HPLC, χρησιμοποιώντας τη στήλη C₁₈ Interchrom, 250 x 21,2 mm. Το βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε, έτσι όπως προέκυψε από την αναλυτική RP-HPLC, καθώς και οι υπόλοιπες παράμετροι του καθαρισμού, δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

| | | | |
|---|---|------------------------------|---------------------------------|
| Διαλύτες | : | (A) H ₂ O/0,1%TFA | (B) CH ₃ CN/0,1% TFA |
| Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών (gradient) | : | A/B: 95/5 (t=0) | → A/B: 60/40 (t=30 min) |
| Ταχύτητα ροής του συστήματος έκλουσης | : | 20 ml/min | |
| Χρόνος έκλουσης | : | 40 min | |
| Χρόνος κατακράτησης (Retention time, R _t) | : | 3,7 min | |

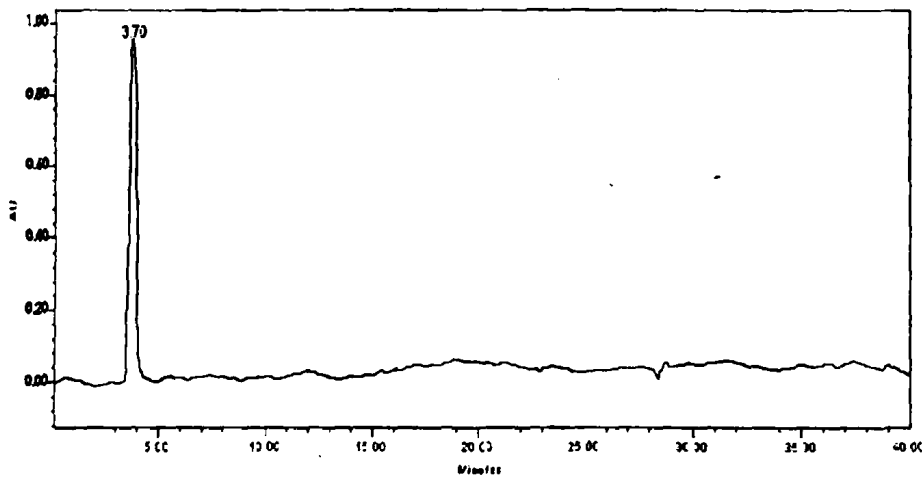
Ακολούθησε συλλογή και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων και από την ποσότητα του στερεού πεπτιδίου που συλλέχθηκε, υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού HPLC σε $\alpha_{\text{HPLC}} = 50,2\%$.

Το απομονωμένο από HPLC τελικό επιθυμητό προϊόν, ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6.7.1.1) και φασματοσκοπία μάζας +ESI (Σχήμα 6.7.1.2).

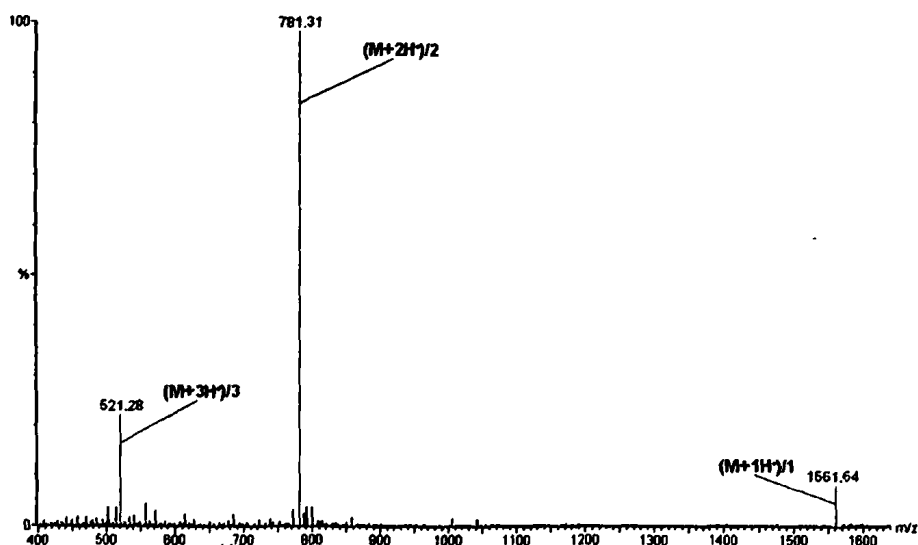


Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης, αποκοπής από το πολυμερικό υπόστρωμα και καθαρισμού, του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 185-196 cTnI-(185-196)-Cys.

| | | |
|---|---|-------|
| Απόδοση σύνθεσης (πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές) | : | 93,1% |
| Απόδοση σταδίου αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (95% TFA) | : | 95,7% |
| Απόδοση καθαρισμού παρασκευαστικής HPLC | : | 50,2% |
| Συνολική απόδοση | : | 44,7% |



Σχήμα 6.7.1.1 Χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC του απομονωμένου καθαρού γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 185-196, cTnI-(185-196)-Cys.



Σχήμα 6.7.1.2 Φάσμα μάζας +ESI του απομονωμένου από HPLC γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 185-196, cTnI-(185-196)-Cys.



6.7.2 Χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού θειοθερικού δεσμού μεταξύ του επιτόπου cTnl-(185-196)-Cys και του φορέα Ac-SOC₄[BrCH₂CO]₄-OH

Χρησιμοποιήθηκαν 10,0mg (0.0062mmol) N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ τα οποία αρχικά διαλύθηκαν σε 4ml διαλύματος 0,2M Tris pH=8,2/CH₃CN, 3/1 (v/v). Ακολούθησε η σταδιακή προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη γραμμικού επιτόπου cTnl-(185-196)-Cys (συνολικά, 0,0062_(mmol) · χ 1,2_(eq) · χ 4_{(Lys(BrCH₂CO))} · χ 2016,8_(mg/mmol) = 60,0mg). Η αντίδραση διεξήχθη σε σκότος υπό ατμόσφαιρα αργού, ενώ η πρόοδος της παρακολουθήθηκε με φασματοσκοπία μάζας +ESI. Η συνολική της διάρκεια δεν ξεπέρασε τις 10 ώρες και με την ολοκλήρωση της διαδικασίας το διάλυμα της αντίδρασης οξινίστηκε με HCl 0,1N.

Ακολούθησε ο προκαταρκτικός καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης με την μεθοδολογία της διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας ημιπερατή μεμβράνη Dialysis με cutoff μοριακών βαρών <3500 Da. Μετά από 4 ανανεώσεις του εξωτερικού διαλύματος (απιονισμένο H₂O) στη διάρκεια ενός 24ώρου, το περιεχόμενο της μεμβράνης λυοφιλοποιήθηκε και ακολούθως υπολογίστηκε η συνολική απόδοση σύνθεσης και Dialysis καθαρισμού του πεπτιδίου σε α = 89,8%.

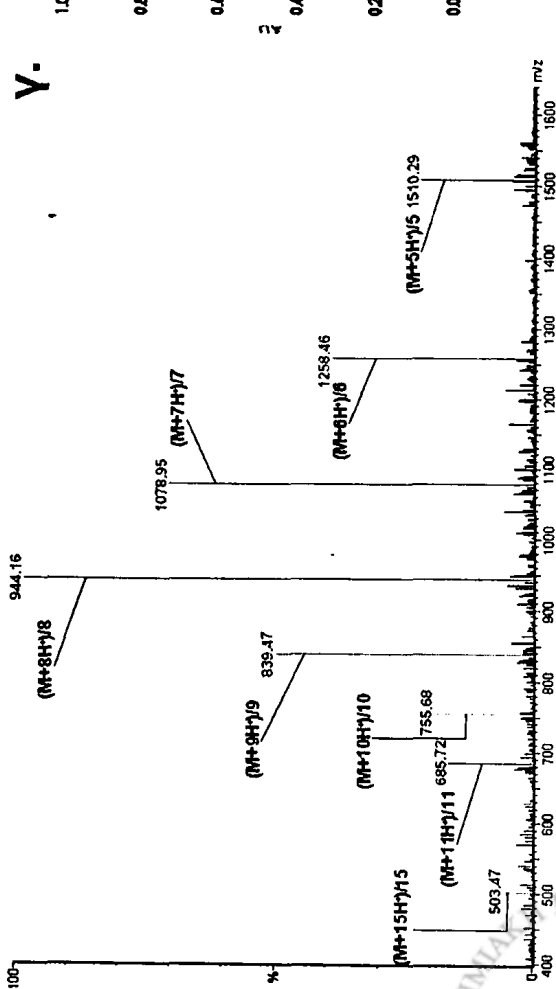
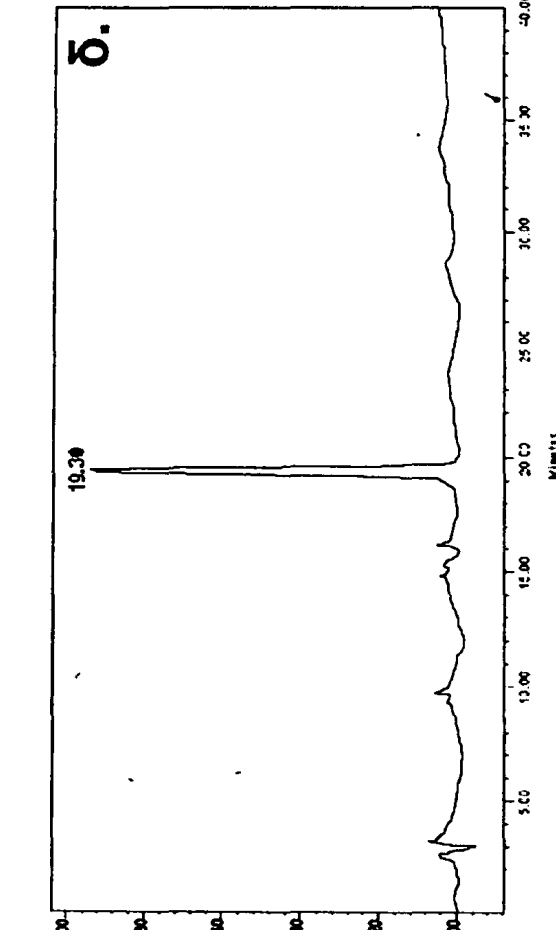
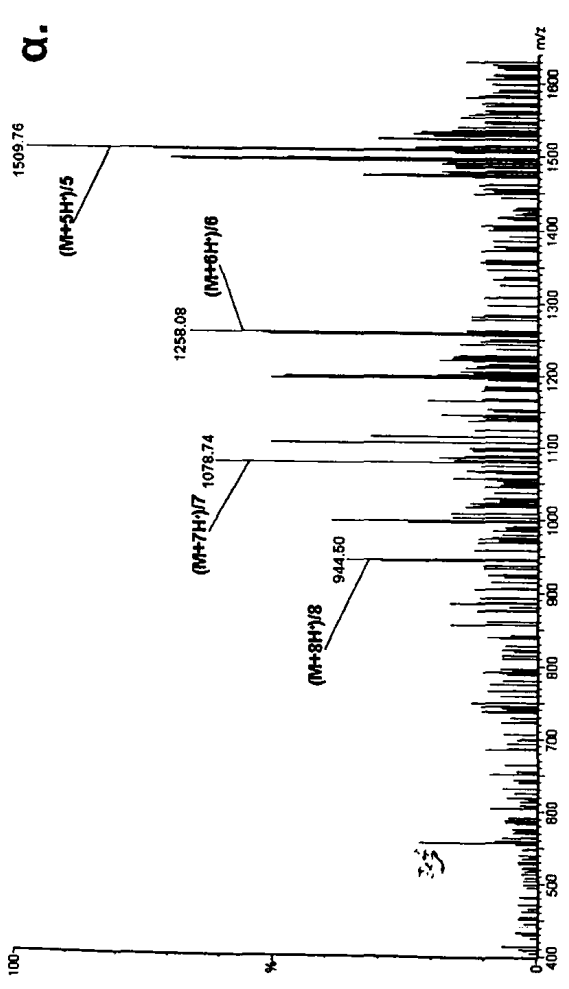
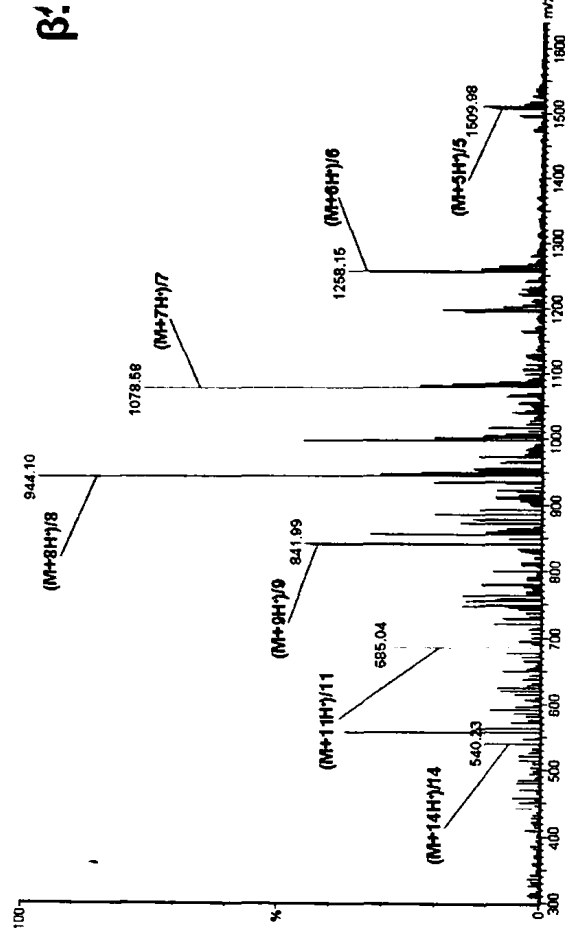
Ακολούθησε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες του συστήματος διαλυτών έκλουσης, για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με παρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Interchrom, 250 x 21,2 mm. Η βαθμίδωση των διαλυτών του προγράμματος έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε [(A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1% TFA] διαμορφώθηκε από A/B: 95/5 (t=0) σε A/B: 70/30 (t=40min). Μετά από συλλογή και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού HPLC σε α_{HPLC} = 40,6%.

Ο έλεγχος της καθαρότητας και ομοιογένειας του επιθυμητού μακρομοριακού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(185-196)-Cys]₄-OH πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC και πιστοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας +ESI. Οι συνθήκες και τα αποτελέσματα της αναλυτικής HPLC παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

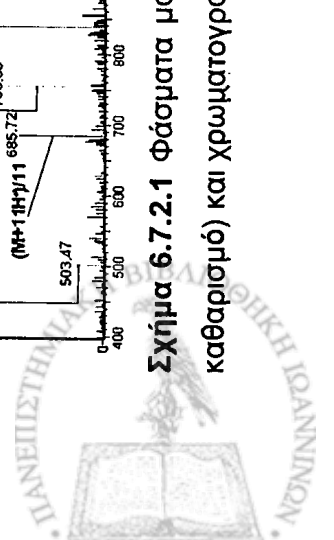
| | | | |
|---|---|------------------------------|---------------------------------|
| Διαλύτες | : | (A) H ₂ O/0,1%TFA | (B) CH ₃ CN/0,1% TFA |
| Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών (gradient) | : | A/B: 95/5 (t=0) | → A/B: 70/30 (t=40 min) |
| Ταχύτητα ροής του συστήματος έκλουσης | : | 1 ml/min | |
| Χρόνος έκλουσης | : | 40 min | |
| Χρόνος κατακράτησης (Retention time, R _t) | : | 19,3 min | |

Στο σχήμα 6.7.2.1, παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας +ESI του πεπτιδικού μακρομορίου στα διάφορα στάδια σύνθεσης και καθαρισμού του, καθώς και την αναλυτική HPLC του τελικού επιθυμητού προϊόντος.





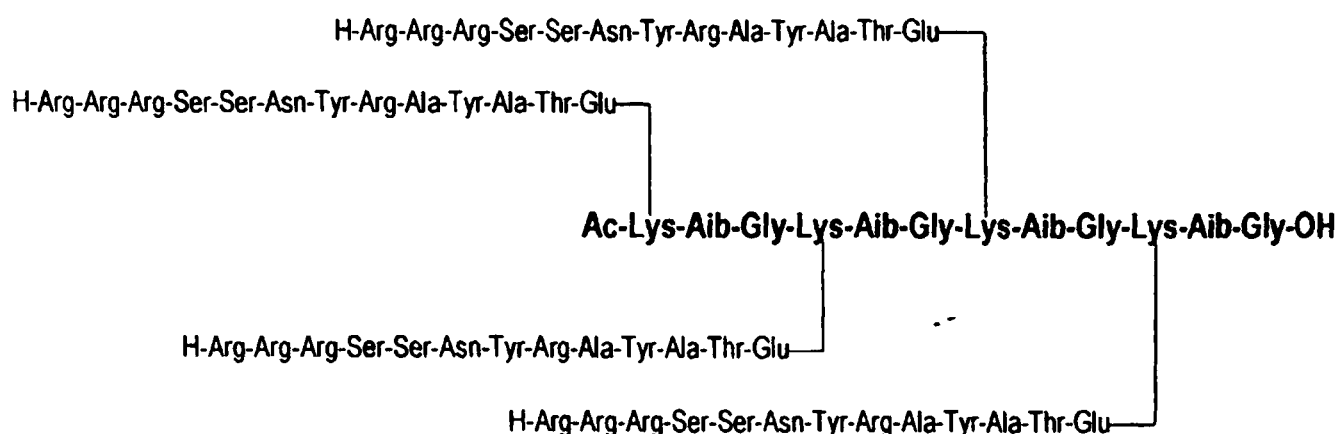
Σχήμα 6.7.2.1 Φάσματα μάζας +ESI (α. ακάθαρτο προϊόν χημειοελεγκτικής αντίδρασης, β. μετά από Dialysis καθαρισμό, γ. μετά από HPLC καθαρισμό) και χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC (δ.) του απομονωμένου καθαρού μακρομορίου Ac-SOC₄[cTnI-(185-196)-Cys]₄-OH.



Στη συνέχεια παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης και καθαρισμού του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnl-(185-196)-Cys]₄-OH**.

| | | |
|--|---|--------------|
| Απόδοση σύνθεσης (χημειοεκλεκτική αντίδραση) και προκαταρκτικού καθαρισμού Dialysis (<3500 Da) | : | 89,8% |
| Απόδοση καθαρισμού παρασκευαστικής HPLC | : | 40,6% |
| Συνολική απόδοση | : | 36,5% |

6.8 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH**



cTnl-(19-31)

H-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Asn-Tyr-Arg-Ala-Tyr-Ala-Thr-Glu-OH

M.T. Συμπλέγματος : C₃₁₈H₅₁₆N₁₂₀O₉₈ M.T. Συμπλέγματος : 7588,4

Η σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH (8, 9)** (Πίνακας 6.1.1) διεξήχθη αποκλειστικά σε στερεή φάση, χρησιμοποιώντας τόσο την Boc/Bzl όσο και την Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετική στρατηγική. Η εν λόγω σύνθεση αποτέλεσε ουσιαστικά και την αφορμή για την διερεύνηση και διασαφήνιση των πλεονεκτημάτων της καθεμιάς εκ των συνθετικών μεθοδολογιών ανάπτυξης τετραμερών μακρομορίων SOC₄, δεδομένου ότι η πρώτη χρονολογικά απόπειρα σύνθεσης του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH** σύμφωνα με την Boc/Bzl συνθετική στρατηγική κρίθηκε ιδιαίτερα επίπονη, γεγονός που αποδόθηκε στα σοβαρά προβλήματα που συχνά προκύπτουν (κατά τη διεξαγωγή της σύνθεσης), είτε λόγω της φύσης και του μεγέθους του μορίου, είτε λόγω διαμορφωτικών περιορισμών κατά την επιμήκυνση των πεπτιδικών αλυσίδων.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται συνοπτικά τα συνθετικά πρωτόκολλα ανάπτυξης των εν λόγω μακρομοριακών συμπλεγμάτων.



6.8.1 Boc/Bzl βήμα προς βήμα συνθετική στρατηγική ανάπτυξης του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH

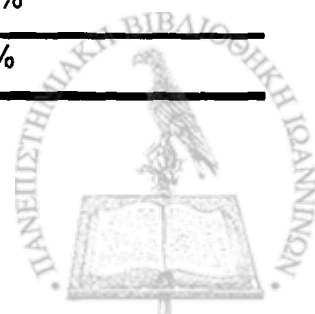
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρώτη απόπειρα ανάπτυξης του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH (8) (Πίνακας 6.1.1), πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στο πλαίσιο της αντίστοιχης μεταπτυχιακής διατριβής σύμφωνα με το Boc/Bzl βήμα προς βήμα συνθετικό πρωτόκολλο στερεής φάσης, χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την 4-υδροξυμέθυλοφαινυλακετάμιδο μέθυλο ρητίνη (ρητίνη PAM) [8.9]. Η γενική συνθετική στρατηγική που ακολουθήθηκε περιγράφεται συνοπτικά στο σχήμα 4.2.2.5 (βλ. Θεωρητικό μέρος, Κεφάλαιο 4). Αυτό που αξίζει να επισημανθεί είναι ότι, κατά τη διεξαγωγή της σύνθεσης αντιμετωπίσαμε ιδιαίτερα σοβαρά προβλήματα, γεγονός που αποτυπώθηκε τόσο στις αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης, όσο και στις αποδόσεις καθαρισμού του πεπτιδίου.

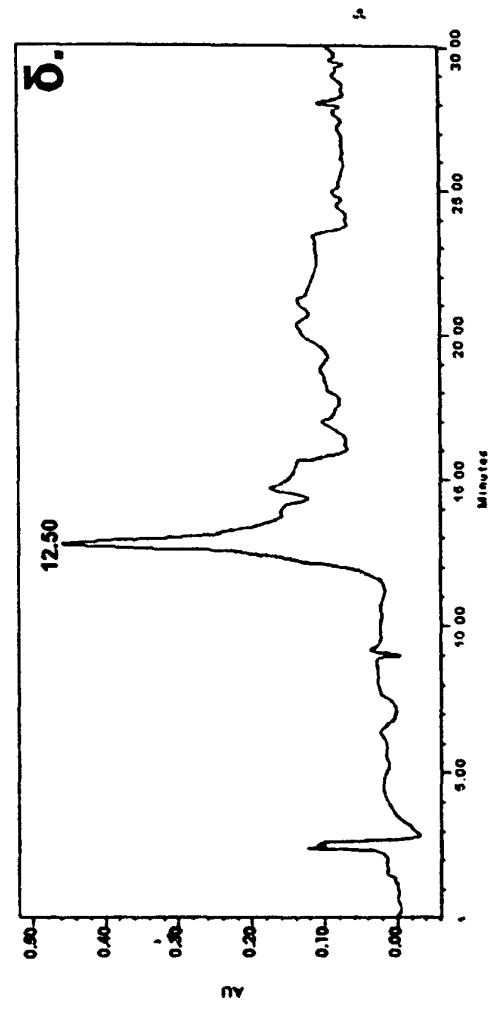
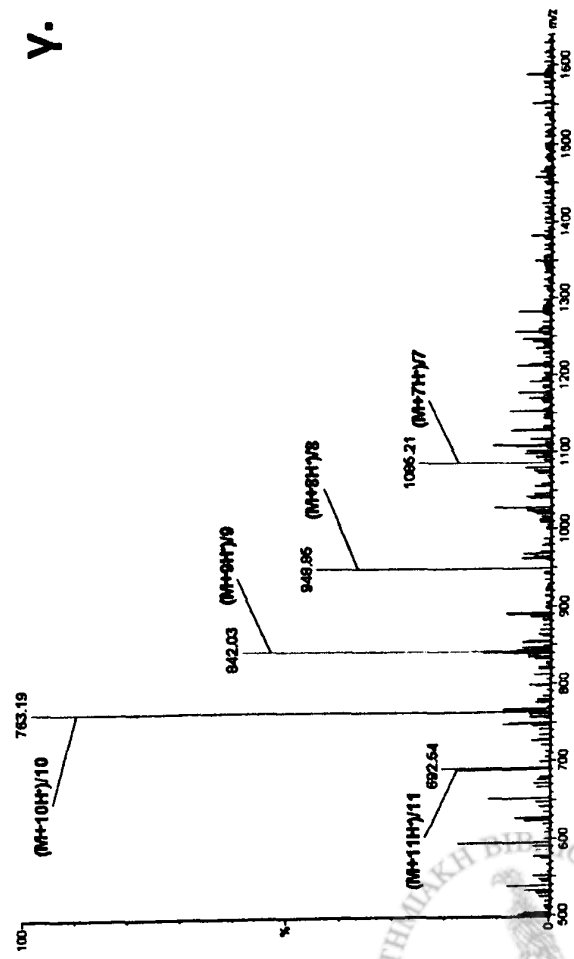
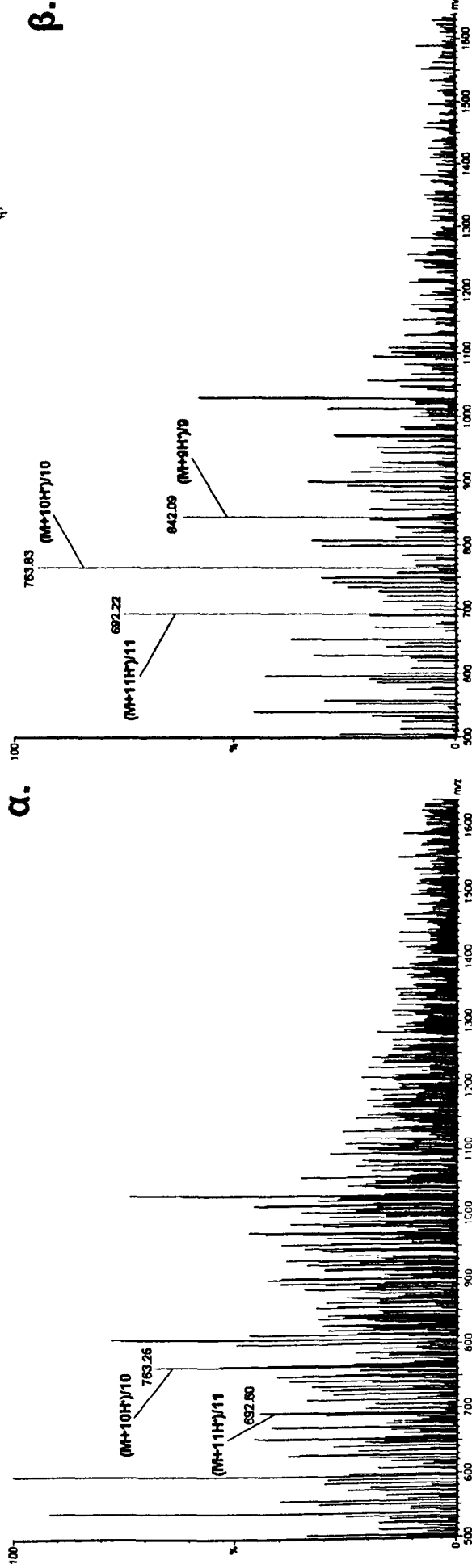
Η βήμα προς βήμα σύνθεση του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC₄ και η ομοιοπολική πρόσδεση (σε τέσσερα αντίγραφα) των τριών πρώτων αμινοξέων του γραμμικού επιτόπου cTnl-(19-31) (RRRSSNYRAYATE), διεξήχθη χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα. Τα συνθετικά προβλήματα ξεκίνησαν να εμφανίζονται μόλις από το τέταρτο κατά σειρά αμινοξύ (RRRSSNYRAYATE), το οποίο εισήχθη στον πεπτιδικό σκελετό ως Boc-Tyr(2,6 diCl-Bzl)-OH. Από το σημείο αυτό και έπειτα, οι συζεύξεις των υπολοίπων αμινοξέων της αλληλουχίας του επιτόπου μέχρι και το δέκατο κατά σειρά αμινοξύ (RRRSSNYRAYATE), έλαβαν χώρα εις διπλούν. Εξαιρέση αποτέλεσαν τις τρεις τελευταίες αργινίνες του επιτόπου (RRRSSNYRAYATE), η σύζευξη των οποίων επαναλήφθηκε τρεις φορές, παρά την εναλλαγή των αντιδραστηρίων σύζευξης (TBTU, HBTU, DCC). Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα τεστ της νινυδρίνης από το έκτο κατά σειρά αμινοξύ και έπειτα (RRRSSNYRAYATE), σε καμιά περίπτωση δεν έδωσαν ξεκάθαρη εικόνα που να πιστοποιεί την ολοκλήρωση των εκάστοτε αντιδράσεων.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις σύνθεσης, αποκοπής από το πολυμερές και καθαρισμού του εν λόγω ανοσογονικού συμπλέγματος.

Στο σχήμα 6.8.1.1, παραθέτουμε τα φάσματα μάζας +ESI του πεπτιδικού μακρομορίου στα διάφορα στάδια σύνθεσης και καθαρισμού του, καθώς και την αναλυτική HPLC του απομονωμένου καθαρού επιθυμητού προϊόντος.

| | | |
|---|---|-------------|
| Απόδοση σύνθεσης (πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές) | : | 45,5% |
| Απόδοση σταδίου αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (HF) | : | 91,8% |
| Απόδοση καθαρισμού Dialysis (M.W. cutoff<2000 Da) | : | 68,0% |
| Απόδοση καθαρισμού ημιπαρασέκυστικής HPLC | : | 15,7% |
| Συνολική απόδοση | : | 4,5% |





Σχήμα 6.8.1.1 Φάσματα μάζας +ESI (α. ακάθαρτο προϊόν πεπτιδικής σύνθεσης, β. μετά από Dialysis καθαρισμό, γ. μετά από HPLC καθαρισμό) και χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC (δ.) του απομονωμένου καθαρού μακρομορίου $Ac-SOC_4[εTnl-(19-31)]_n-OH$.

6.8.2 Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετική στρατηγική ανάπτυξης του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH

Η σύνθεση του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC₄, έλαβε χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει ήδη περιγραφεί στη προηγούμενη παράγραφο 6.6.1. Συνοπτικά, χρησιμοποιήθηκαν 3,5g ρητίνης Wang με αρχική υποκατάσταση 0,75mmol/g ρητίνης (3,50_(g) x 0,75_(mmol/g) = 2,63mmol πεπτιδίου). Πραγματοποιήθηκε μείωση της αρχικής υποκατάστασης της ρητίνης, με την τελική να διαμορφώνεται στα 0,28mmol/g (δηλ. 3,5_(g) x 0,28_(mmol/g) = 0,98mmol). Μετά το χαρακτηρισμό της νέας υποκατάστασης ακολούθησε η βήμα προς βήμα σύνθεση της επιθυμητής αμινοξικής αλληλουχίας του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC₄, η οποία και διεξήχθη χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα. Η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε προς ξήρανση σε ξηραντήρα κενού και στη συνέχεια υπολογίστηκε η απόδοση σύνθεσης, πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το πολυμερικό υπόστρωμα ($\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 87,5\%$).

Στη συνέχεια, ελήφθη κατάλληλη ποσότητα πεπτιδορητίνης (696mg δηλ. 0,12mmol πεπτιδίου), για τη ταυτόχρονη βήμα προς βήμα σύνθεση των τεσσάρων αντιγράφων του επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 19-31 (Σχήμα 6.8.2.1). Από το σημείο αυτό και στη συνέχεια, η διαδικασία σύνθεσης είναι όμοια με αυτή που έχει ήδη περιγραφεί στην ανάπτυξη του μακρομορίου Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH (βλ. παράγραφο 6.5). Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι τα συνθετικά προβλήματα που αντιμετωπίσαμε κατά τη σύνθεση του μακρομοριακού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH με την Boc/Bzl συνθετική μεθοδολογία, στην προκειμένη περίπτωση περιορίστηκαν αισθητά, δίνοντας σαφώς καθαρότερα προϊόντα και σημαντικά μεγαλύτερες αποδόσεις. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί, ότι επανάληψη των αντιδράσεων σύζευξης πραγματοποιήθηκε μόνο στην περίπτωση της ασπαραγίνης, της τυροσίνης και των δύο τελευταίων αμινοξέων της αλληλουχίας του επιτόπου (RRRSSNYRAYATE).

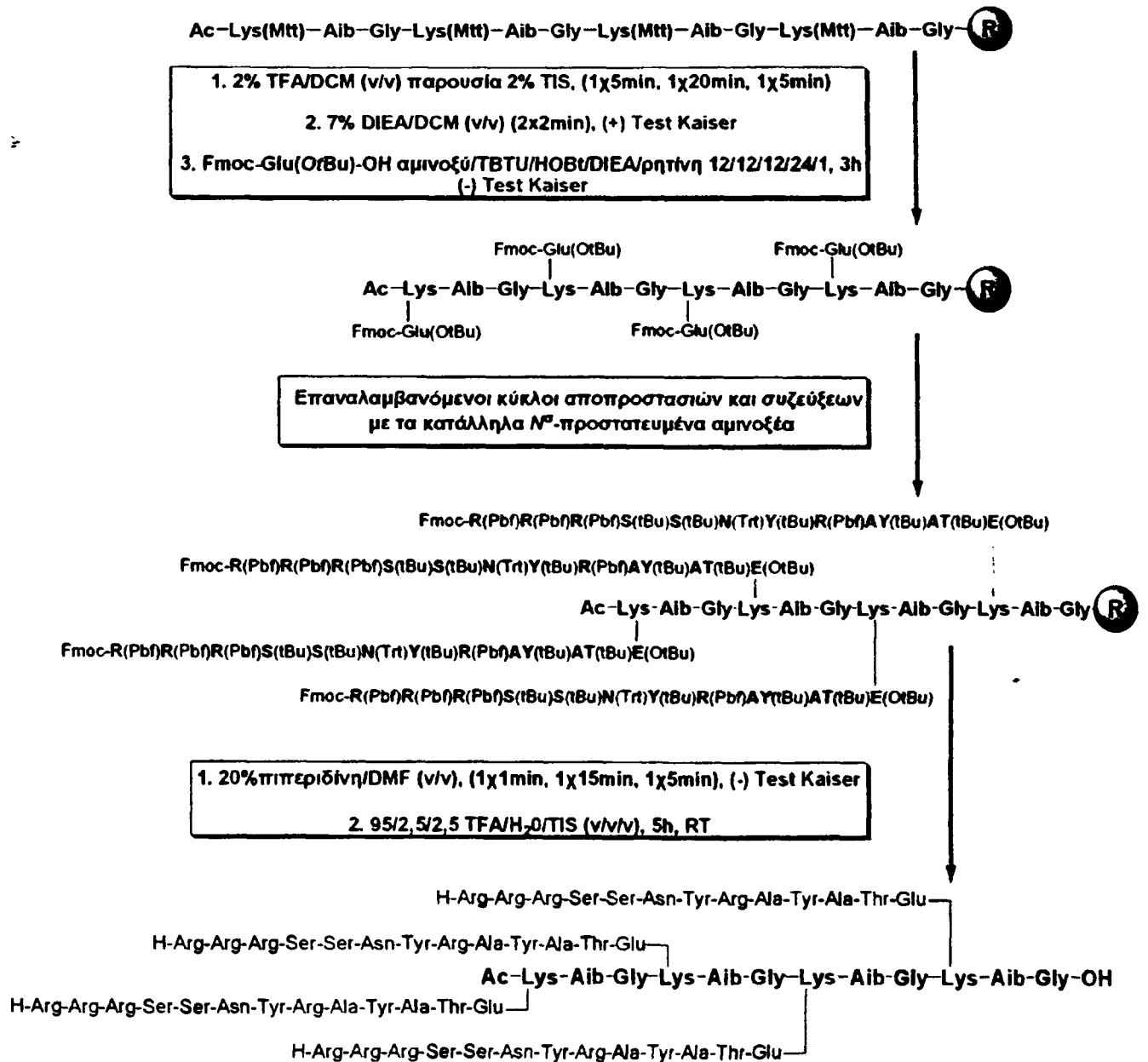
Γενικότερα, η σύνθεση του εν λόγω μακρομορίου πραγματοποιήθηκε ταχύτερα και αποτελεσματικότερα, με την απόδοσή της (πριν την αποκοπή του πεπτιδίου από το πολυμερές) να διαμορφώνεται σε $\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 57,5\%$.

Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη αποκοπή όλων των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων του, έλαβε χώρα μετά από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα 95/2,5/2,5 TFA/H₂O/TIS (v/v/v) (Σχήμα 6.2.1.3), για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας ακολούθησε λυοφιλοποίηση του διαλύματος του πεπτιδίου (2N CH₃COOH). Από την ποσότητα του στερεού ακάθαρτου (crude) προϊόντος που συλλέχθηκε υπολογίστηκε η αντίστοιχη απόδοση σε $\alpha_{\text{αποκοπής}} = 95,7\%$.

Το πεπτίδιο υποβλήθηκε σε προκαταρκτικό καθαρισμό με την μεθοδολογία της διαπίδυσης έναντι νερού, χρησιμοποιώντας ημιπερατή μεμβράνη Dialysis με cutoff μοριακών βαρών <3500 Da. Η διαδικασία περιελάμβανε 24ώρη ανάδευση, με το εξωτερικό διάλυμα (απιονισμένο H₂O) να ανανεώνεται 4 φορές. Το θεωρητικά απαλλαγμένο από παραπροϊόντα μοριακού βάρους <3500 Da



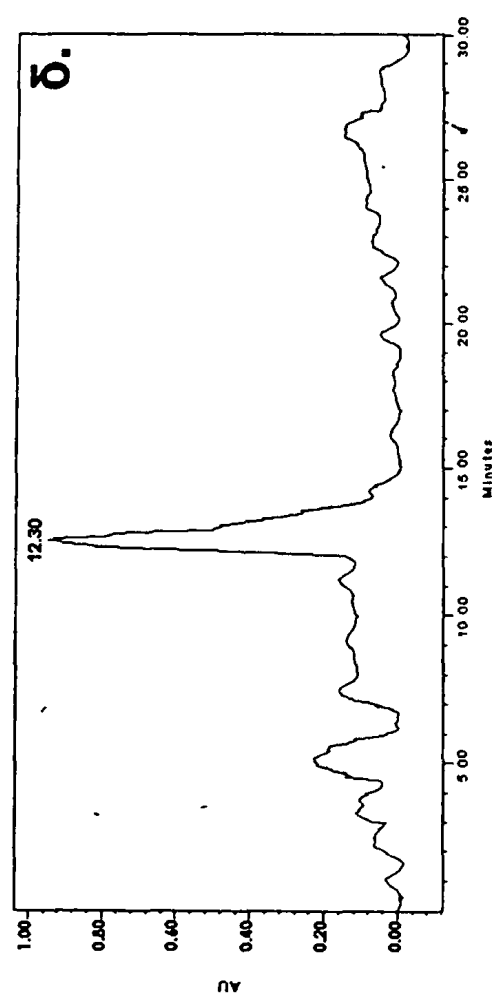
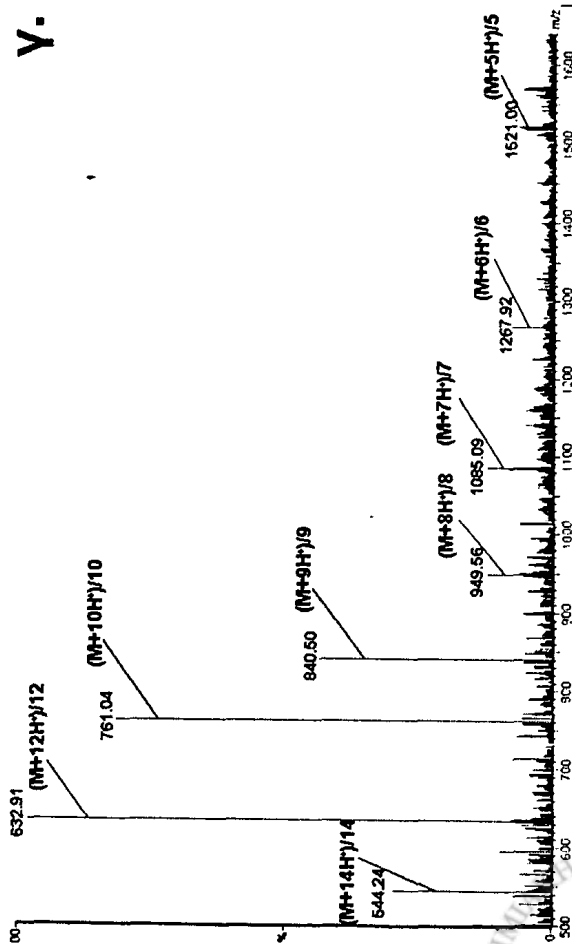
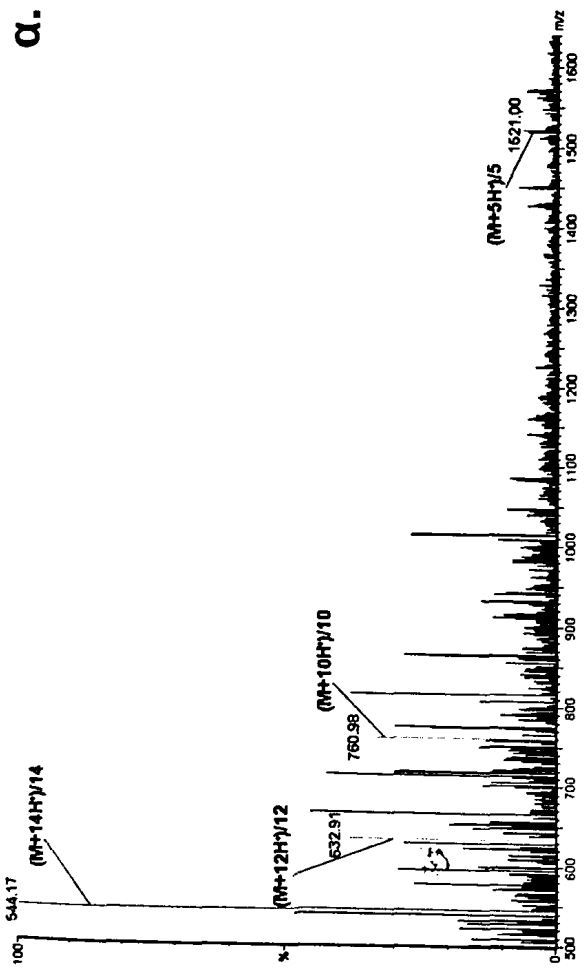
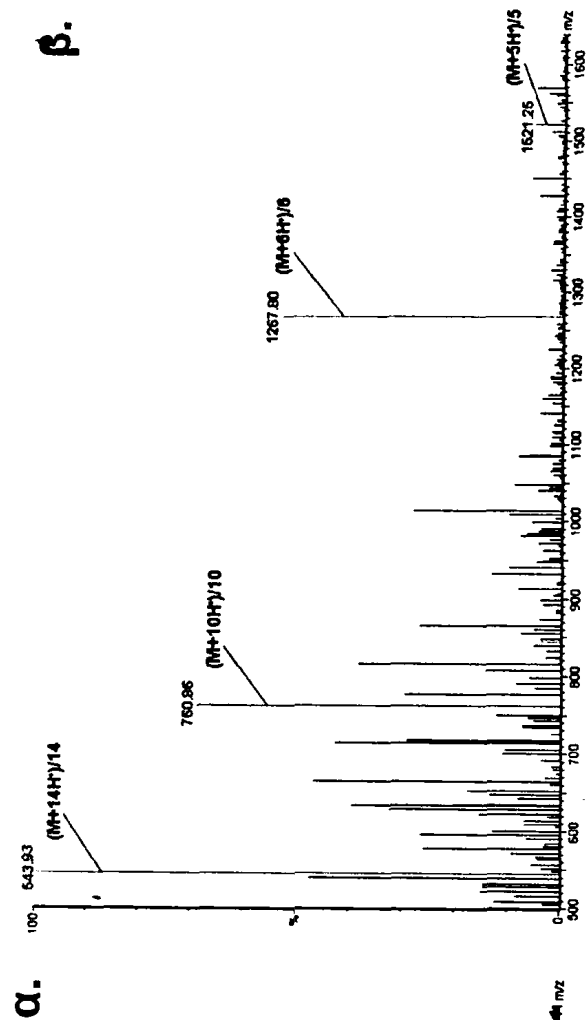
περιεχόμενο της μεμβράνης λυοφιλοποιήθηκε και από το στερεό ακάθαρτο προϊόν που συλλέχθηκε υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού σε $\alpha_{Dialysis (<3500 Da)} = 74,0\%$.



Σχήμα 6.8.2.1 Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη του μακρομοριακού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα έκλουσης (gradient) που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Μετά από συλλογή και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού HPLC του μακρομορίου σε $\alpha_{HPLC} = 24,2\%$. Η καθαρότητα και η ομοιογένεια του επιθυμητού προϊόντος πιστοποιήθηκαν με αναλυτική HPLC και φασματοσκοπία μάζας +ESI (Σχήμα 6.8.2.2).





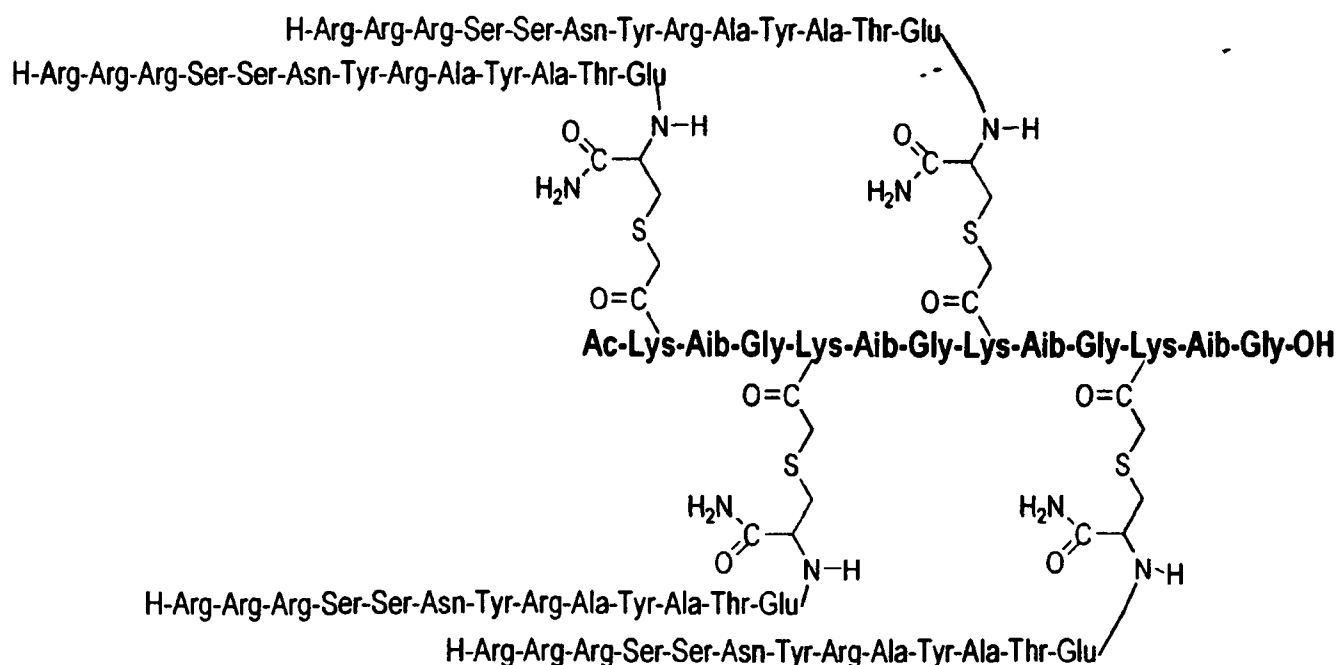
Σχήμα 6.8.2.2 Φάσματα μάζας +ESI (α. ακάθαρμο προϊόν πεπτιδικής σύνθεσης, β. μετά από Dialysis καθαρισμό, γ. μετά από HPLC καθαρισμό) και χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC (δ.) του απομονωμένου καθαρού μακρομορίου Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH.



Τέλος, στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης, αποκοπής από το πολυμερικό υπόστρωμα και καθαρισμού, του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH**.

| | | |
|---|---|-------------|
| Απόδοση σύνθεσης (πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές) | : | 57,5% |
| Απόδοση σταδίου αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (95% TFA) | : | 95,7% |
| Απόδοση καθαρισμού Dialysis (M.W. cutoff<3500 Da) | : | 74,0% |
| Απόδοση καθαρισμού ημιπαρασκευαστικής HPLC | : | 24,2% |
| Συνολική απόδοση | : | 9,9% |

6.9 Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)-Cys]₄-OH**



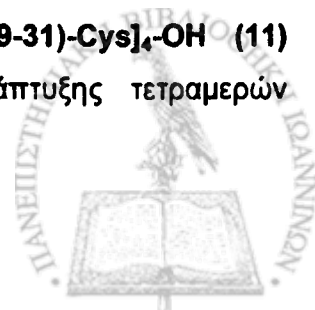
cTnl-(19-31)-Cys

H-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Asn-Tyr-Arg-Ala-Tyr-Ala-Thr-Glu-Cys-NH₂

M.T. Επιτόπου : C₇₀H₁₁₄N₂₈O₂₂S **M.B. Επιτόπου** : 1731,9

M.T. Συμπλέγματος : C₃₃₈H₅₄₈N₁₂₈O₁₀₆S₄ **M.T. Συμπλέγματος** : 8229,0

Η σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)-Cys]₄-OH (11)** (Πίνακας 6.1.1) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο ανάπτυξης τετραμερών



μακρομοριακών συμπλεγμάτων SOC₄, που έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες παραγράφους. Σε συνέχεια των παραπάνω, στόχος της συγκεκριμένης σύνθεσης ήταν η διαμόρφωση της πλέον ολοκληρωμένης εικόνας, επί των συνθετικών μεθοδολογιών ανάπτυξης πρωτεϊνικής φύσης μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον τετραμερή συνθετικό ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC₄. Η αντίδραση διεξήχθη σε υγρή φάση μεταξύ του N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ (βλ. παράγραφο 6.6.1) και του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 19-31 (10) (Πίνακας 6.1.1).

6.9.1 Σύνθεση του επιτόπου cTnI-(19-31)-Cys (RRRSSNYRAYATEC)

Η σύνθεση του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 19-31 (10) (Πίνακας 6.1.1) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Fmoc/tBu βήμα προς βήμα στρατηγική στερεής φάσης, χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την ρητίνη Rink amide (βλ. παραγράφους 6.6.2, 6.7.1). Περιληπτικά, χρησιμοποιήθηκαν 0,75g ρητίνης με αρχική υποκατάσταση 0,8mmol/g, έχοντας ως στόχο τη σύνθεση 0,6mmol γραμμικού επιτόπου. Κατά τη βήμα προς βήμα ομοιοπολική πρόσδεση των N^ε-Fmoc προστατευμένων αμινοξέων δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερα συνθετικά προβλήματα, εκτός από την περίπτωση των τριών τελευταίων αργινινών της αλληλουχίας (RRRSSNYRAYATEC), όπου κρίθηκε απαραίτητη η επανάληψη των αντιδράσεων σύζευξης. Γενικότερα η διαδικασία ολοκληρώθηκε επιτυχώς, με την απόδοση σύνθεσης πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές να διαμορφώνεται σε $\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 88,2\%$.

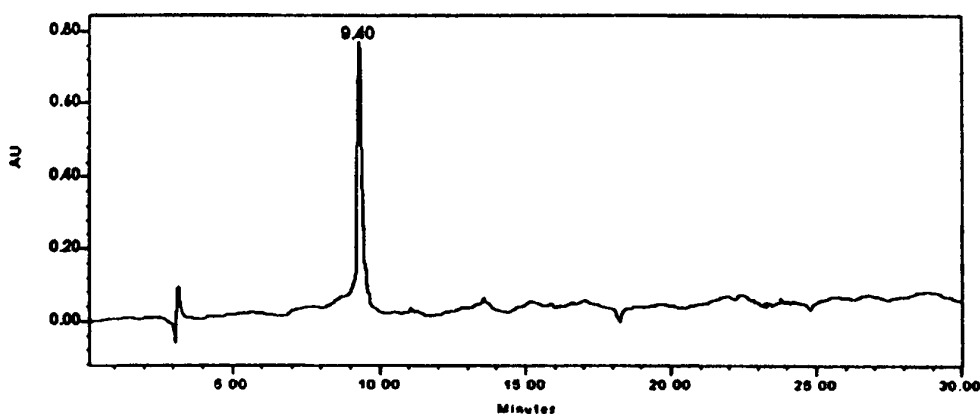
Το πεπτίδιο απομακρύνθηκε από τη ρητίνη ταυτόχρονα με την αποκοπή όλων προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων του, μετά από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα TFA/DMB/EDT/TIS/H₂O σε αναλογία 91,5/2,5/2,5/2,5/1 (v/v/v/v/v) για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η απόδοση αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές διαμορφώθηκε σε $\alpha_{\text{αποκοπής}} = 93,3\%$.

Το ακάθαρμο προϊόν υποβλήθηκε σε καθαρισμό με παρασκευαστική RP-HPLC, χρησιμοποιώντας τη στήλη C₁₈ Interchrom, 250 x 21,2 mm. Το βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλυσης διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε, έτσι όπως προέκυψε από την αναλυτική RP-HPLC, καθώς και οι υπόλοιπες παράμετροι του καθαρισμού, παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

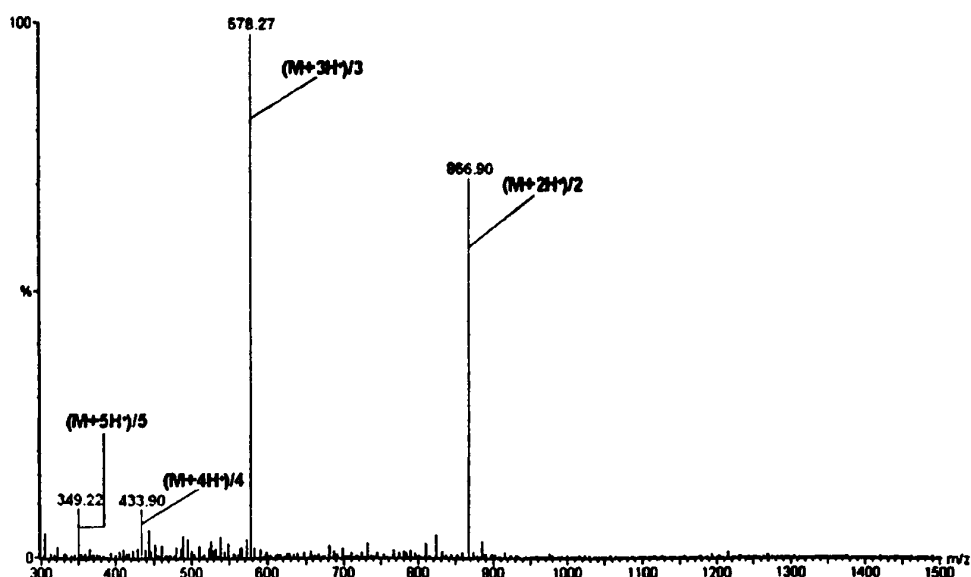
| | | | |
|---|---|------------------------------|---------------------------------|
| Διαλύτες | : | (A) H ₂ O/0,1%TFA | (B) CH ₃ CN/0,1% TFA |
| Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλυσης διαλυτών (gradient) | : | A/B: 95/5 (t=0) | → A/B: 60/40 (t=30 min) |
| Ταχύτητα ροής του συστήματος έκλυσης | : | 20 ml/min | |
| Χρόνος έκλυσης | : | 30 min | |
| Χρόνος κατακράτησης (Retention time, R _t) | : | 9,4 min | |



Το γεγονός ότι στο στερεό ακάθαρτο (crude) μείγμα της σύνθεσης συνυπήρχαν με το επιθυμητό μόριο και παραπροϊόντα, τα οποία υπολείπονταν της αμινοξικής αλληλουχίας κατά μία, δύο ή και τρεις αργίνινες, επέβαλε την επανάληψη της διαδικασίας καθαρισμού επί των απομονωμένων κλασμάτων, με στόχο τη λήψη ομοιογενούς τελικού προϊόντος. Έτσι μετά από δύο διαδοχικούς καθαρισμούς, υπολογίστηκε η απόδοση HPLC του γραμμικού επιτόπου σε $\alpha_{\text{HPLC}} = 10,6\%$. Το απομονωμένο από HPLC τελικό επιθυμητό προϊόν, ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6.9.1.1) και φασματοσκοπία μάζας +ESI (Σχήμα 6.9.1.2).



Σχήμα 6.9.1.1 Χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC του απομονωμένου καθαρού γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 19-31, cTnI-(19-31)-Cys.



Σχήμα 6.9.1.2 Φάσμα μάζας +ESI του απομονωμένου από HPLC γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 19-31, cTnI-(19-31)-Cys.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης, αποκοπής από το πολυμερικό υπόστρωμα και καθαρισμού, του



τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I 19-31, **cTnl-(19-31)-Cys**.

| | | |
|---|---|-------------|
| Απόδοση σύνθεσης (πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές) | : | 88,2% |
| Απόδοση σταδίου αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (95% TFA) | : | 93,3% |
| Απόδοση καθαρισμού παρασκευαστικής HPLC | : | 10,6% |
| Συνολική απόδοση | : | 8,7% |

6.9.2 Χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού θειοεθερικού δεσμού μεταξύ του επιτόπου **cTnl-(19-31)-Cys** και του φορέα **Ac-SOC₄[BrCH₂CO]₄-OH**

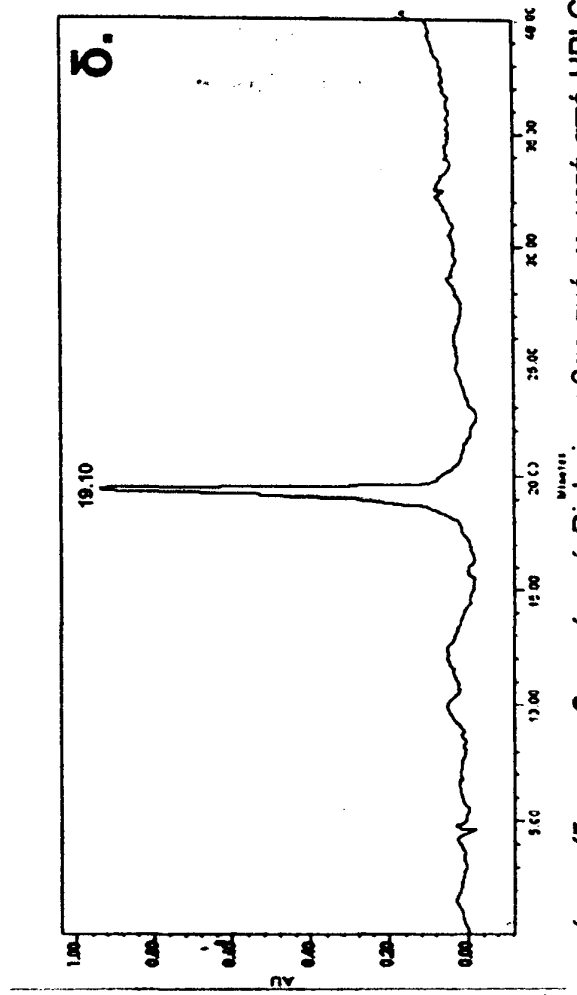
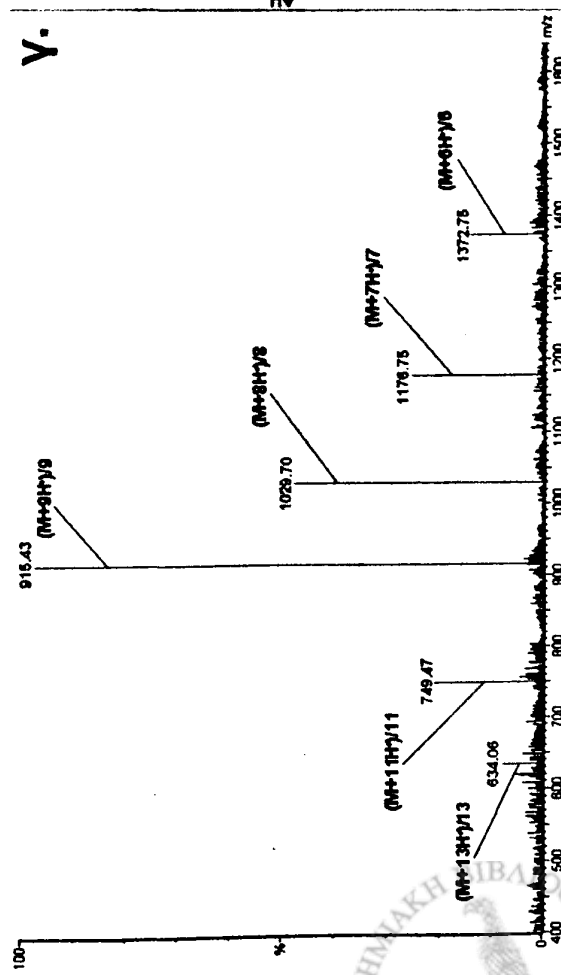
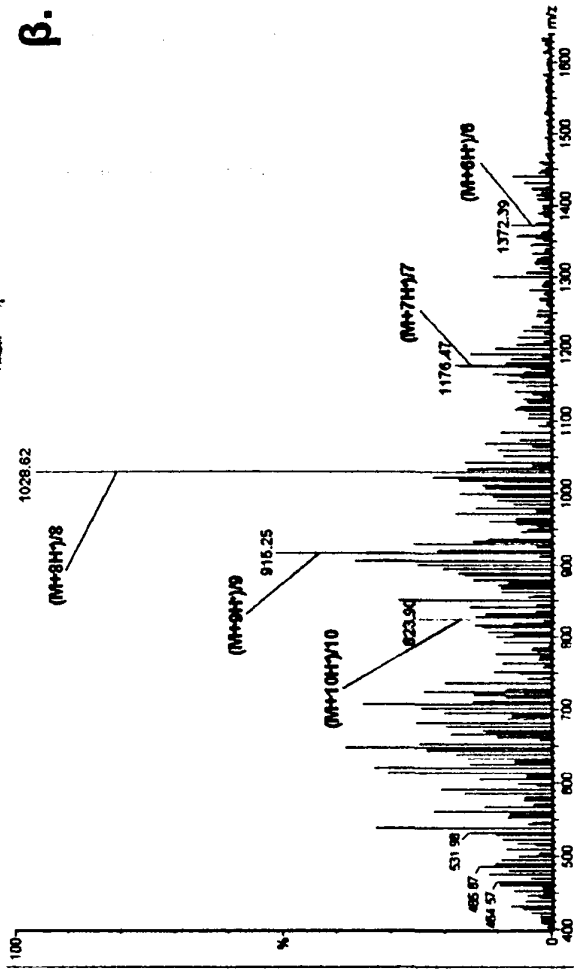
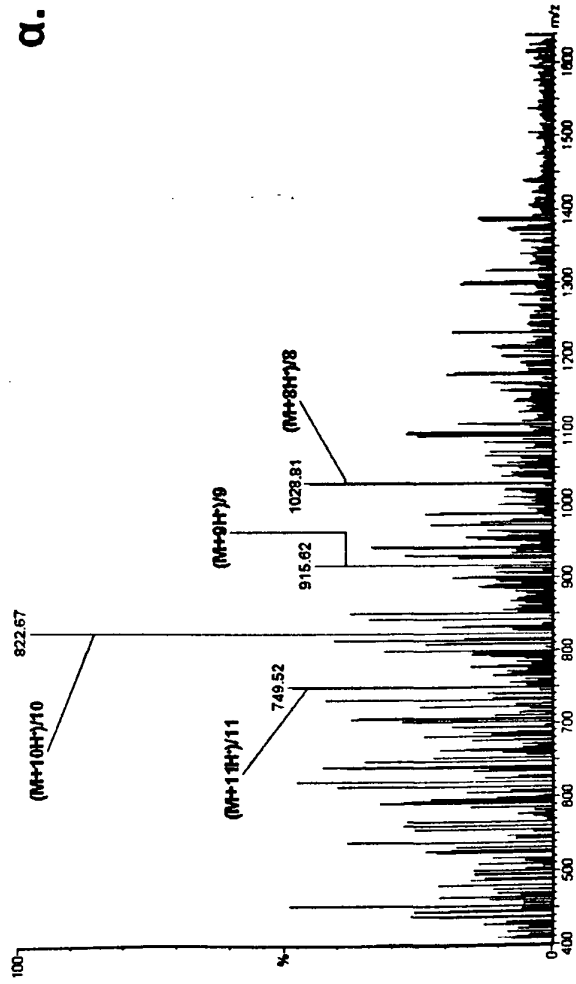
Χρησιμοποιήθηκαν 8,5mg (0,0052mmol) *N*^t-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ τα οποία μεταφέρθηκαν αρχικά σε σφαιρική φιάλη των 5ml, όπου και διαλύθηκαν σε συνολικό όγκο 3ml διαλύματος 0,2M Tris pH=8,2/CH₃CN, 2/1 (v/v). Στη συνέχεια προστέθηκε σταδιακά στο μείγμα της αντίδρασης, η απαιτούμενη ποσότητα του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη γραμμικού επιτόπου της τροπονίνης I **cTnl-(19-31)-Cys** (συνολικά, 0,0052_(mmol) · Χ 1,2_(eq) · Χ 4_[Lys(BrCH₂CO)] · Χ 2302,0_(mg/mmol) = 57,5mg). Η αντίδραση διεξήχθη σε σκότος υπό ατμόσφαιρα αργού, ενώ η πορεία της παρακολουθήθηκε με φασματοσκοπία μάζας +ESI (κάθε 90min). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας (12 ώρες) το διάλυμα της αντίδρασης οξινήστηκε με HCl 0,1N

Ακολούθησε καθαρισμός του μείγματος της αντίδρασης με την μεθοδολογία της διαπίδυσης έναντι νερού, χρησιμοποιώντας ημιπερατή μεμβράνη Dialysis με cutoff μοριακών βαρών <3500 Da. Μετά από 5 ανανεώσεις του εξωτερικού διαλύματος (απιονισμένο H₂O) στη διάρκεια ενός 24ώρου, το απαλλαγμένο από παραπροϊόντα μοριακού βάρους <3500 Da περιεχόμενο της μεμβράνης λυοφιλοποιήθηκε και από την ποσότητα του στερεού ακάθαρτου πεπτιδίου που συλλέχθηκε, υπολογίστηκε η συνολική απόδοση σύνθεσης και Dialysis καθαρισμού του πεπτιδίου σε **α = 84,7%**.

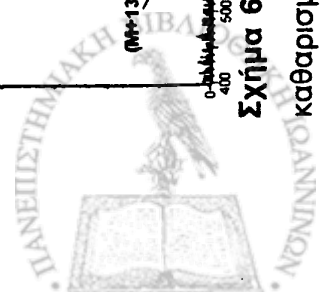
Ακολούθησε ο καθαρισμός του μακρομορίου με παρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Interchrom, 250 x 21,2 mm. Η βαθμίδωση των διαλυτών του προγράμματος έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε (έτσι όπως προέκυψε από την αναλυτική RP-HPLC) [(**A**) H₂O/0,1%TFA και (**B**) CH₃CN/0,1% TFA] διαμορφώθηκε από **A/B**: 95/5 (t=0) σε **A/B**: 70/30 (t=40min). Μετά από συλλογή και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού HPLC σε **α_{HPLC} = 26,8%**.

Ο έλεγχος της καθαρότητας και ομοιογένειας του πεπτιδικού μακρομορίου πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC και πιστοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας +ESI. Στο σχήμα 6.9.2.1, παρατίθενται τα φάσματα μάζας +ESI στα διάφορα στάδια σύνθεσης και καθαρισμού του, καθώς και την αναλυτική HPLC του τελικού επιθυμητού προϊόντος.





Σχήμα 6.9.2.1 Φάσματα μάζας +ESI (α. ακάθαρτο προϊόν χημειοεκλεκτικής αντίδρασης, β. μετά από Dialysis καθαρισμό, γ. μετά από HPLC καθαρισμό) και χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC (δ.) του απομονωμένου καθαρού μακρομορίου Ac-SOC₄[C₁Nl-(19-31)-Cys]₄-OH.



Οι συνθήκες και τα αποτελέσματα της αναλυτικής HPLC παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

| | | | |
|---|---|---|---------------------------------|
| Διαλύτες | : | (A) H ₂ O/0,1%TFA | (B) CH ₃ CN/0,1% TFA |
| Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών (gradient) | : | A/B: 95/5 (t=0) → A/B: 70/30 (t=40 min) | |
| Ταχύτητα ροής του συστήματος έκλουσης | : | 1 ml/min | |
| Χρόνος έκλουσης | : | 40 min | |
| Χρόνος κατακράτησης (Retention time, R _t) | : | 19,1 min | |

Στη συνέχεια παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης και καθαρισμού του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)-Cys]₄-OH**.

| | | |
|--|---|--------------|
| Απόδοση σύνθεσης (χημειοεκλεκτική αντίδραση) και προκαταρκτικού καθαρισμού Dialysis (<3500 Da) | : | 84,7% |
| Απόδοση καθαρισμού παρασκευαστικής HPLC | : | 26,8% |
| Συνολική απόδοση | : | 22,7% |

6.10 Συσχέτιση μεταξύ των συνθετικών μεθοδολογιών ανάπτυξης μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής

Αναμφίβολα η βήμα προς βήμα συνθετική στρατηγική στερεής φάσης έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς με μεγάλη επιτυχία, στην ανάπτυξη μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής με υποστρώματα συνθετικούς φορείς. Παρόλα αυτά, συχνά παρουσιάζονται σοβαρά προβλήματα κατά τη διεξαγωγή των συνθέσεων, που οφείλονται κυρίως στη φύση και το μέγεθος των εκάστοτε επιτόπων καθώς και στους διαμορφωτικούς περιορισμούς που επιβάλλονται κατά την επιμήκυνση των πεπτιδικών αλυσίδων.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, το συνθετικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε (τετραμερής ολιγοπεπτιδικός φορέας SOC₄), λόγω της προκαθορισμένης τρισδιάστατης δομής του, προσφερόταν ανεπιφύλακτα για τέτοιου είδους συνθέσεις. Στην πράξη όμως, τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν κατά τη διεξαγωγή των συνθέσεων ήταν αρκετά, γεγονός που αποτυπώθηκε τόσο στις αποδόσεις των επιμέρους σταδίων σύνθεσης, όσο και στις αντίστοιχες του καθαρισμού των πεπτιδίων. Στον πίνακα 6.10.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα χαρακτηριστικά των μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας.



Πίνακας 6.10.1 Χαρακτηριστικά ανοσογονικών συμπλεγμάτων που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας

| Μακρομοριακά συμπλέγματα (κωδικές ονομασίες) | Συνθετική μεθοδολογία | Αριθμός συζευγμένων επιτόπων | M.T. | Υπολογισθέντα M.B. | Ασφάλεια | Αποδοτικότητα | Ανάλυση | α-HPLC | Αποδοτικότητα | Ευρεθέντα M.B. (ESI-MS) |
|---|---|------------------------------------|--|-----------------------|----------------------------------|---------------|---------|--------|---------------|-------------------------------|
| 1 Ac-SOC ₄ [cTnI-(118-131)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Boc/Bzl (στερεή φάση) | 4 | C ₃₂₈ H ₅₇₂ N ₆₈ O ₁₀₈ | 7420,7 | 50,0% | 89,2% | 88,5% | 26,4% | 10,4% | 7420,7 ± 1,19 |
| 2 Ac-SOC ₄ [cTnI-(21-30)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Fmoc/Fbu (στερεή φάση) | 4 | C ₂₇₀ H ₃₉₈ N ₇₂ O ₁₁₈ | 6530,5 | 67,2% | 83,3% | 86,0% | 10,0% | 4,8% | 6530,7 ± 1,47 |
| 4 Ac-SOC ₄ [cTnI-(89-98)-Cys] ₄ -OH | Χημειοελεγκτική πρόσδεση επιτόπων (υγρή φάση) | 4 | C ₂₄₈ H ₄₂₁ N ₇₂ O ₁₄₈ S ₄ | 6084,3 | 92,0% (σύνθεσης και Dialysis) | | | 35,0% | 32,2% | 6084,2 ± 1,61 |
| 7 Ac-SOC ₄ [cTnI-(185-196)-Cys] ₄ -OH | Χημειοελεγκτική πρόσδεση επιτόπων (υγρή φάση) | 4 | C ₃₁₈ H ₅₁₂ N ₁₀₈ O ₁₄₈ S ₄ | 7544,4 | 89,8% (σύνθεσης και Dialysis) | | | 40,6% | 36,5% | 7544,2 ± 0,89 |
| 8 Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Boc/Bzl (στερεή φάση) | 4 | C ₃₁₈ H ₅₁₈ N ₁₂₀ O ₁₄₈ | 7588,4 | 45,5% | 91,8% | 68,0% | 15,7% | 4,5% | 7589,5 ± 2,56 |
| 9 Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Fmoc/Fbu (στερεή φάση) | 4 | C ₃₁₈ H ₅₁₈ N ₁₂₀ O ₁₄₈ | 7588,4 | 57,5% | 95,7% | 74,0% | 24,2% | 9,9% | 7588,0 ± 1,29 |
| 11 Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)-Cys] ₄ -OH | Χημειοελεγκτική πρόσδεση επιτόπων (υγρή φάση) | 4 | C ₃₃₈ H ₅₄₈ N ₁₂₈ O ₁₆₈ S ₄ | 8229,0 | 84,7% (σύνθεσης και Dialysis) | | | 26,8% | 22,7% | 8228,9 ± 1,88 |

(Η αρίθμηση των πεπτιδικών αναλόγων έγινε σύμφωνα με τον πίνακα 6.1.1)



Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη των συμπλεγμάτων **Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH (1)** και **Aδ-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH (8)** (Πίνακας 6.10.1) διεξήχθη σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Boc/Bzl βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας σε αποδόσεις **10,4%** και **4,5%**, αντίστοιχα. Οι επαναλαμβανόμενες και συχνά μη ολοκληρωμένες συζεύξεις αμινοξέων κατά τη διεξαγωγή των εν λόγω συνθέσεων, κατέστησαν τη διαδικασία ιδιαίτερα ασύμφορη, επίπονη και χρονοβόρα. Το γεγονός αυτό, επέβαλλε την αναζήτηση άλλων στρατηγικών ανάπτυξης μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής.

Η εναλλαγή από την Boc/Bzl στην Fmoc/tBu συνθετική στρατηγική αποτέλεσε μια εναλλακτική λύση, δεδομένου ότι ποτέ στο παρελθόν δεν είχε επιχειρηθεί αντίστοιχη σύνθεση (χρησιμοποιώντας την εν λόγω μεθοδολογία) μακρομορίου διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Έτσι η ανάπτυξη του συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH (2)** και του αντίστοιχου **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH (9)** (Πίνακας 6.10.1) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας σε αποδόσεις **4,8%** και **9,9%**.

Αναφορικά με τη σύνθεση του αναλόγου **2** θα πρέπει να επισημανθεί ότι, παρά τις ικανοποιητικές αποδόσεις σύνθεσης, αποκοπής και προκαταρκτικού καθαρισμού του με Dialysis, η τελική του ανάκτηση διαμορφώθηκε από την εξαιρετικά χαμηλή απόδοση κατά τον HPLC καθαρισμό σε παρασκευαστική κλίμακα (10,0%). Η βελτίωση των εκάστοτε παραμέτρων του τελευταίου θα μπορούσε ενδεχομένως να βελτιώσει σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα.

Μια πιο εμπειριστατωμένη συσχέτιση μεταξύ των δύο βασικών συνθετικών μεθοδολογιών στερεής φάσης, θα μπορούσε να προκύψει από την σύγκριση των αναλόγων **8** και **9**. Κατά τη σύνθεση του αναλόγου **9** τα συνθετικά προβλήματα περιορίστηκαν σημαντικά, με την απόδοση σύνθεσής του να αυξάνεται (σε σχέση με το ανάλογο **8**) κατά 120% (από 4,5% σε 9,9%). Αν και η απόδοση σύνθεσης του αναλόγου **9** δεν κρίνεται ως εντυπωσιακή, η σημαντική αυτή αύξηση αποτελεί αναμφίβολα κριτήριο επιλογής της Fmoc/tBu μεθοδολογίας έναντι της αντίστοιχης Boc/Bzl.

Παράλληλα, όπως έχει ήδη επισημανθεί, η ανάπτυξη των χημειοεκλεκτικών μεθόδων πρόσδεσης επιτόπων σε συνθετικούς φορείς, αποτέλεσε ίσως την πιο σημαντική εξέλιξη στο πεδίο της ανάπτυξης ευθύγραμμης ή και διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής πρωτεϊνικής τάξης μακρομορίων. Πιο συγκεκριμένα, η ομοιοπολική πρόσδεση επιτόπων στον ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC₄ είχε πραγματοποιηθεί και στο παρελθόν από την ερευνητική ομάδα του Ferenc Hudecz [Κεφάλαιο 4, βιβλ. 14]. Η σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[[[Ni¹¹]-9-22)-Cys]₄-OH** (όπου **[Ni¹¹]-9-22** ⁹LKNiADPNRFRGKDL²²) με υπολογισθέν μοριακό βάρος 8281,4Da, πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού, μεταξύ του N^ε-χλώρο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ και του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη B-κυτταρικού επιτόπου της γλυκοπρωτεΐνης D του ιού του έρπητα. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε επιτυχώς σε 72 ώρες με το επιθυμητό μακρομόριο να παραλαμβάνεται σε πολύ υψηλή απόδοση.



Έχοντας λοιπόν ως στόχο τη διαμόρφωση μιας ολοκληρωμένης εικόνας επί των συνθετικών μεθοδολογιών ανάπτυξης πρωτεϊνικής φύσης μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής (χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον τετραμερή ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC_4) και με αφορμή τα παραπάνω, επιχειρήσαμε δεκάδες δοκιμές, σε πλήθος ρυθμιστικών διαλυμάτων (διαφόρων συγκεντρώσεων) και σε ένα σημαντικό εύρος τιμών pH, ώστε να εξαγάγουμε τις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής των συγκεκριμένων αντιδράσεων.

Έτσι, η σύνθεση των μακρομορίων **Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH (4)**, **Ac-SOC₄[cTnI-(185-196)-Cys]₄-OH (7)** και **Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)-Cys]₄-OH (11)** (Πίνακας 6.10.1) διεξήχθη σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των εκλεκτικών χημικών αντιδράσεων σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού σε αποδόσεις **32,2%**, **36,5%** και **22,7%** αντίστοιχα. Η συνολική διάρκεια των αντιδράσεων βελτιώθηκε εντυπωσιακά και σε καμιά περίπτωση δεν ξεπέρασε τις 10 ώρες. Παράλληλα, το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε συνεισέφερε τα μέγιστα, στην ελαχιστοποίηση των διμερών παραπροϊόντων που προκύπτουν κατά τη δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών γεφυρών, μεταξύ των ελεύθερων σουλφιδριλομάδων των κυστεϊνών του εκάστοτε επιτόπου.

Ανακεφαλαιώνοντας, όσον αφορά τη διερεύνηση και διασαφήνιση των πλεονεκτημάτων της καθεμιάς εκ των συνθετικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν, θα άξιζε να σημειωθεί ότι η εναλλαγή από την Boc/Bzl στην Fmoc/tBu στρατηγική στερεής φάσης, συνέβαλλε σημαντικά στην μείωση των συνθετικών προβλημάτων, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα την παραλαβή σαφώς καθαρότερων τελικών προϊόντων σε αξιόλογες αποδόσεις.

Παρόλα αυτά, εάν θα έπρεπε να επιλέξουμε την πλέον λειτουργική μεθοδολογία ανάπτυξης μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον εν λόγω φορέα, θα καταλήγαμε αναμφίβολα στην συνθετική στρατηγική των χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού, μεταξύ πλήρως αποπροστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων. Η μεθοδολογία χαρακτηρίζεται από την λήψη ελαχίστων παραπροϊόντων, με αποτέλεσμα να παραλαμβάνονται μακρομόρια υψηλής ομοιογένειας σε ιδιαίτερα υψηλές αποδόσεις. Η ταχύτητα, η αποτελεσματικότητα και η πρακτική διευκόλυνση κατά την διεξαγωγή των αντιδράσεων, είναι κάποια από τα πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής έναντι των υπολοίπων.



ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ



7.1 Εισαγωγή

Έχει αποδειχθεί ότι η πρόσδεση γραμμικών επιτόπων στον τετραμερή ολιγοπετιδικό φορέα SOC₄, έχει συμβάλει στην ενίσχυση της ανοσογονικότητάς τους, αλλά και της σταθερότητας των εν λόγω επιτόπων έναντι διαφόρων μηχανισμών αποικοδόμησης (πέπτιδάσες). Έχει παράλληλα δειχθεί ότι τα αντισώματα που αναπτύσσονται (μετά από ανοσοποιήσεις πειραματόζων) από τα ανοσογονικά αυτά συμπλέγματα, αναγνωρίζουν εξίσου καλά τόσο τα μακρομόρια από τα οποία προήλθαν, όσο και τα ελεύθερα γραμμικά πεπτιδία. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να επισημανθεί ότι ο φορέας SOC επάγει την παραγωγή υψηλών τίτλων αντισωμάτων, απολύτως έναντι των πεπτιδικών αντιγόνων που φέρει, αποτελώντας ένα ιδανικό υπόστρωμα για ισχυρές και εξειδικευμένες ανοσολογικές αποκρίσεις.

Πιο συγκεκριμένα, οι ανοσοποιήσεις των πειραματόζων (κουνέλια) με τα ανοσογονικά συμπλέγματα της παρούσας έρευνας, διεξήχθησαν εξ' ολοκλήρου από τους συναδέλφους κ. Χρύσα Βοίδαρου και κ. Χρήστο Παπαδόπουλο, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Τα ELISA πειράματα που ακολούθησαν και ο προκαταρκτικός καθαρισμός των παραχθέντων αντισωμάτων (μεθοδολογία κλασμάτωσης πρωτεϊνικών μορίων με τη χρήση αλάτων), εκτελέστηκαν και ολοκληρώθηκαν στα Ερευνητικά Εργαστήρια της Χημείας Πεπτιδίων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στις επόμενες παραγράφους γίνεται αναλυτική περιγραφή των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των ανοσοποιήσεων, των ELISA πειραμάτων, καθώς και της μεθοδολογίας καθαρισμού των παραχθέντων αντισωμάτων.

7.2 Γενική μεθοδολογία ανοσοποιήσεων και ELISA δοκιμασιών

7.2.1 Διαδικασία ανοσοποιήσεων

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ανοσοποιήθηκαν λευκά θηλυκά κουνέλια ράτσας Νέας Ζηλανδίας, με τα ανοσογονικά συμπλέγματα Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH (2), Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH (4), Ac-SOC₄[cTnI-(185-196)-Cys]₄-OH (7), και Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH (9) (βλ. Κεφάλαιο. 6, πίνακας 6.1.1.). Οι ανοσοποιήσεις των πειραματόζων με τα μακρομόρια Ac-SOC₄[cTnI-(118-131)]₄-OH (1) και Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH (8) (βλ. Κεφάλαιο. 6, πίνακας 6.1.1.) πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της αντίστοιχης μεταπτυχιακής διατριβής ειδίκευσης. Το πρωτόκολλο των ανοσοποιήσεων που ακολουθήθηκε [1] ήταν ουσιαστικά το ίδιο (με μικρές παραλλαγές) για όλες τις περιπτώσεις και περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

1. Πριν την έναρξη των ανοσοποιήσεων πραγματοποιήθηκε μια πρώτη αιμοληψία των κουνελιών και οι οροί που συλλέχθηκαν (μετά από φυγοκέντρηση), αποτέλεσαν τους ορούς "μάρτυρες" (preimmune) για τις δοκιμασίες ELISA που εκτελέστηκαν στη συνέχεια.



2. Κατά την πρώτη ανοσοποίηση τα ανοσογονικά συμπλέγματα κατεργάστηκαν με το ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA) και τα γαλακτώματα που σχηματίστηκαν ενέθηκαν στα αντίστοιχα κουνέλια, στο σύνολό τους υποδόρια (2-3 εκχύσεις).
3. Μετά από περίπου 10-20 μέρες (ανάλογα με την περίπτωση), πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες αιμοληψίες των ανοσοποιημένων πλέον κουνελιών. Κατά τη διάρκεια των αιμοληψιών τα αίματα παρέμειναν για περίπου 30 λεπτά σε συνθήκες περιβάλλοντος, ενώ ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 στροφές για 10 λεπτά (2 φορές). Οι οροί που συλλέχθηκαν αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης.
4. Από τη δεύτερη ανοσοποίηση και στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε παράλληλα με το εκάστοτε ανοσογονικό σύμπλεγμα και το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (Complete Freund's Adjuvant). Ανάλογα με την περίπτωση και την εκτελούμενη διαδικασία ανοσοποίησης, υπήρξαν πειραματόζωα που ενέθηκαν υποδόρια (όπως και προηγουμένως), ενώ σε άλλες περιπτώσεις οι ενέσεις ελάμβαναν χώρα ενδομυϊκά. Αντίστοιχα, έπειτα από 2-3 περίπου εβδομάδες πραγματοποιήθηκε και η δεύτερη αιμοληψία.
5. Στη συνέχεια διεξήχθησαν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ανοσοποιήσεων και αιμοληψιών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει ήδη περιγραφεί.

Ακολούθησε μια σειρά από ELISA δοκιμασίες [2], με στόχο τον πλήρη χαρακτηρισμό των παραχθέντων αντισωμάτων. Πιο συγκεκριμένα οι δοκιμασίες περιελάμβαναν:

- ✓ τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των παραχθέντων αντισωμάτων από τα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα,
- ✓ τη μελέτη ύπαρξης διασταυρωτών αντιδράσεων μεταξύ των παραχθέντων αντισωμάτων και του συνόλου των ανοσογονικών συμπλεγμάτων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας,
- ✓ τη μελέτη του ανταγωνισμού μεταξύ πεπτιδικών μακρομορίων και γραμμικών επιτόπων για τα αντίστοιχα παραχθέντα αντισώματα, με στόχο τη διερεύνηση της δόσοεξαρτώμενης εξειδίκευσης των πρώτων έναντι των τελευταίων
- ✓ και τέλος τη μελέτη της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής και σκελετικής τροπονίνης από τα ειδικά αντισώματα των παραχθέντων αντιορών.

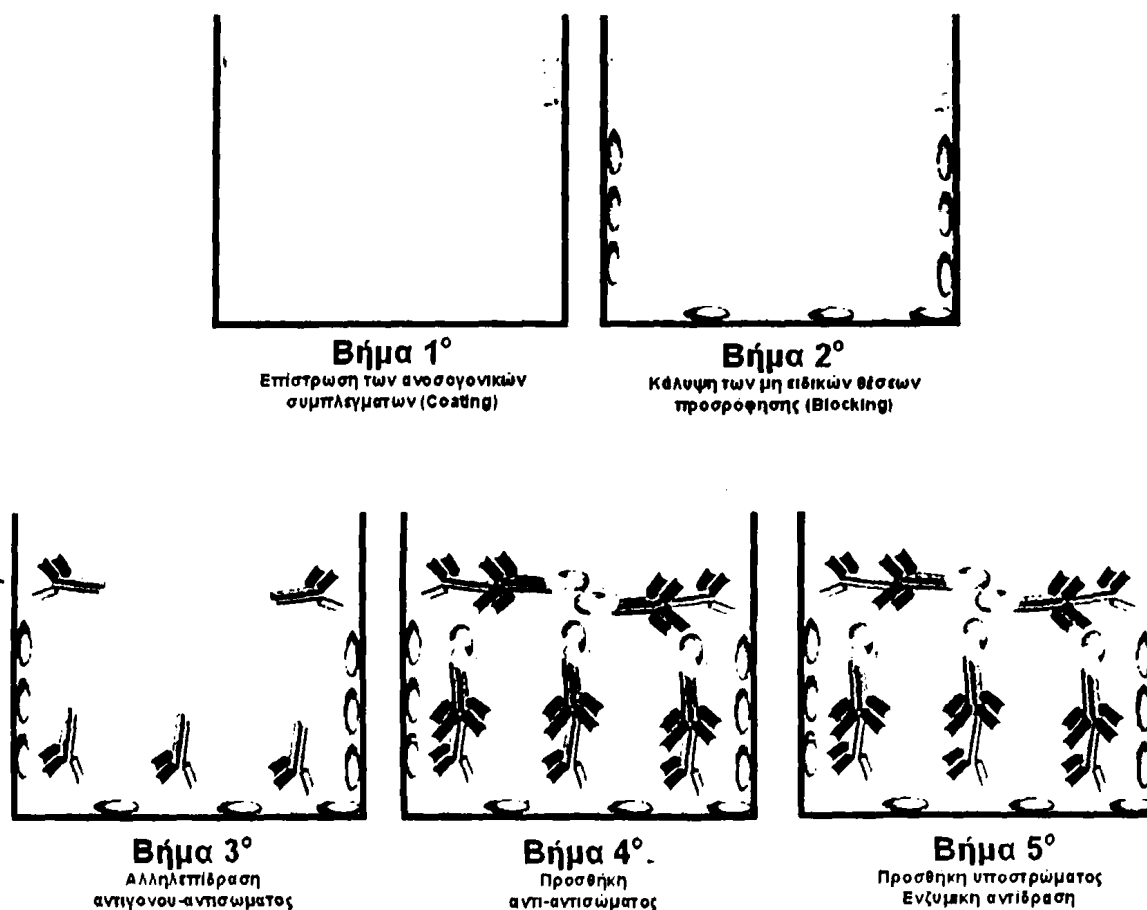
7.2.2 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των παραχθέντων αντισωμάτων από τα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα

Μετά την ολοκλήρωση των ανοσοποιήσεων αναπτύχθηκαν ELISA δοκιμές μη ανταγωνιστικού τύπου (Σχήμα 7.2.2.1), με στόχο τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των παραχθέντων αντισωμάτων από τα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα. Οι βέλτιστες συνθήκες



για την ανάπτυξη των ELISA πειραμάτων διαμορφώθηκαν μετά από δοκιμές με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιγόνου, διαλυμάτων επίστρωσης, χρόνων επώασης, αραιώσεις των ορών καθώς και του επισημασμένου με ένζυμο αντι-αντισώματος.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το αναλυτικό πρωτόκολλο των ELISA δοκιμασιών που χρησιμοποιήθηκε:



Σχήμα 7.2.2.1 Σχηματική αναπαράσταση της κλασσικής ELISA δοκιμασίας μη ανταγωνιστικού τύπου.

Βήμα 1°: Επίστρωση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων (Coating)

Τα πεπτιδικά μακρομόρια επιστρώθηκαν σε πλακίδια ELISA των 96 φρεατίων (NUNC), σε συγκέντρωση 5μg/ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,2M $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$, pH=9,6 (100μl/φρεάτιο). Ακολούθησε επώαση 24ώρου στους 4°C, ώστε να λάβει χώρα η επαρκής προσρόφηση των αντιγόνων στη στερεή επιφάνεια των πλακιδίων. Μετά τη ολοκλήρωση της διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκπλύσεις των πλακιδίων, με διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος (αποβουτυρωμένο, Regilait) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (Phosphate Buffer Saline) (w/v), pH=7,4 (5 φορές).

Βήμα 2°: Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης (Blocking)

Η κάλυψη της στερεής επιφάνειας των πλακιδίων από τα μόρια επίστρωσης, είναι αποδεδειγμένα αρκετά μικρότερη της μεγίστης δυνατής. Για το λόγο αυτό έλαβε χώρα έμφραξη των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης, κατόπιν επώασης με διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v), pH=7,4 (200μl/φρεάτιο) υπό ανάδευση, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν οι απαραίτητες εκπλύσεις των πλακιδίων με το αντίστοιχο διάλυμα γάλακτος (3 φορές).

Βήμα 3°: Αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος

Η αλληλεπίδραση των προσροφημένων (στην επιφάνεια των πλακιδίων) ανοσογονικών συμπλεγμάτων με τα παραχθέντα αντισώματα, επετεύχθη κατόπιν επώασης με τους αντίστοιχους ορούς των ανοσοποιημένων κουνελιών, σε αραιώσεις από 1/100 έως 1/51600 (v/v), σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) pH=7,4, (100μl/φρεάτιο). Τα πλακίδια μεταφέρθηκαν σε συνθήκες συντήρησης (4°C), περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιήθηκε επώαση 24ώρου. Ακολούθησαν σχολαστικές εκπλύσεις των πλακιδίων (5 φορές).

Βήμα 4°: Προσθήκη υποστρώματος αντι-αντισώματος

Το επόμενο βήμα της διαδικασίας περιελάμβανε την προσθήκη ενός δεύτερου επισημασμένου με υπεροξειδάση αντισώματος (goat anti-rabbit IgG (H+L), Pierce), το οποίο αναγνωρίζει και προσκολλάται στα εκάστοτε προσροφημένα συμπλέγματα [3,4]. Η επώαση με το συγκεκριμένο αντι-αντίσωμα πραγματοποιήθηκε σε αραιώση 1/2000 (v/v), σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) pH=7,4, (100μl/φρεάτιο), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση και αυτού του σταδίου, διεξήχθησαν οι απαραίτητες για την συνέχεια εκπλύσεις των πλακιδίων (5 φορές).

Βήμα 5°: Ενζυμική αντίδραση

Η μέτρηση της ενζυμικής δράσης των παραπάνω συμπλεγμάτων, δηλαδή ο ποσοτικός προσδιορισμός των ειδικών για τα αντιγόνα αντισωμάτων, έγινε με τη χρήση του ειδικού υποστρώματος, της 3,3',5,5'-τετραμέθυλο βενζιδίνης (TMB substrate kit, Pierce) (100μl/φρεάτιο). Η αντίδραση έλαβε χώρα για 20-30 λεπτά σε σκότος και διακόπηκε (μετά την ολοκλήρωσή της) με διάλυμα θειικού οξέος 2M. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, έχει την ιδιότητα να δίνει διαλυτά και έγχρωμα προϊόντα ενζυμικής αντίδρασης, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο ακριβείς μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (O.D.). Οι μετρήσεις των ELISA δοκιμασιών πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο SIRIO-S (SEAC-RADIM) στα 450nm.

7.2.3 Μελέτη ύπαρξης διασταυρωτών αντιδράσεων (Cross-Reactions)

Με στόχο τη μελέτη της εξειδίκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων (έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων από τα οποία προήλθαν), διεξήχθησαν ELISA δοκιμασίες μη ανταγωνιστικού τύπου, κατά τη διάρκεια των οποίων διερευνήθηκε η πιθανή ύπαρξη διασταυρωτών

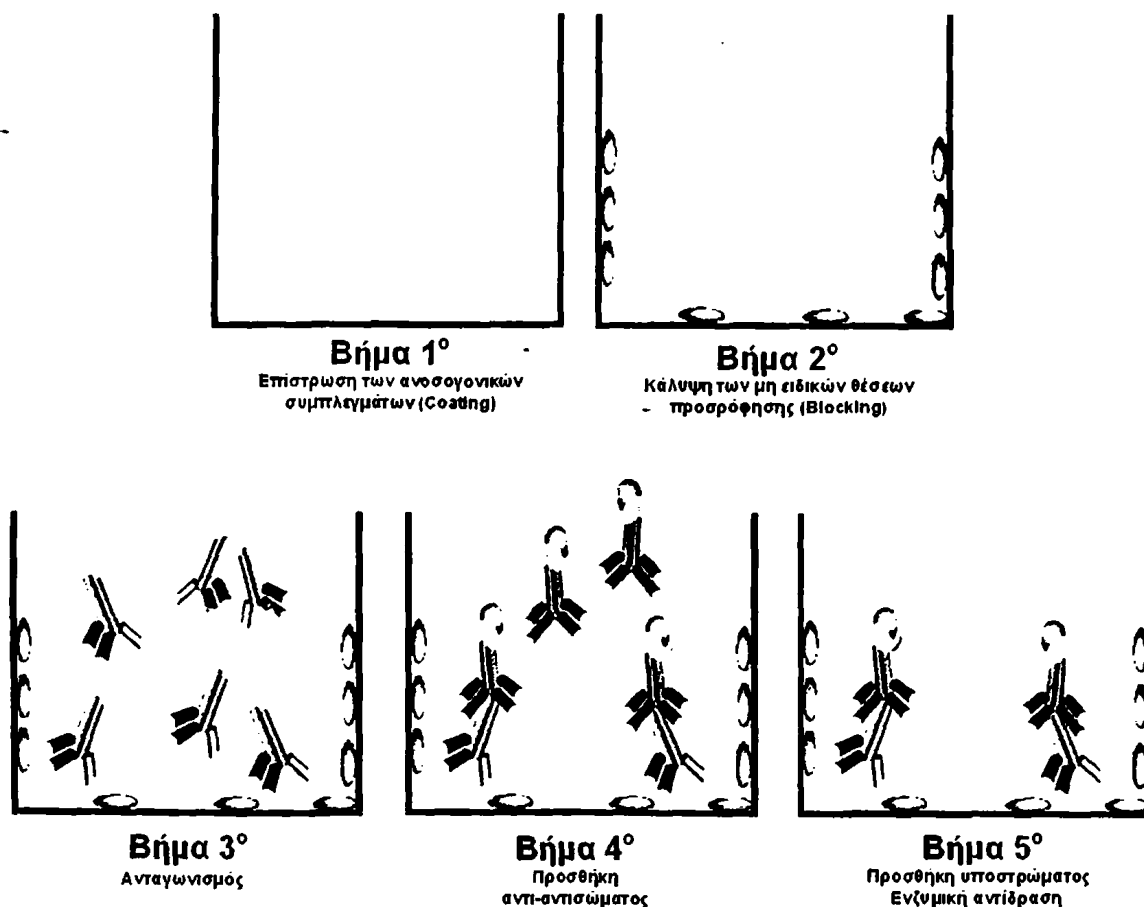


απειδράσεων με άλλα μακρομόρια της παρούσας διατριβής. Το πρωτόκολλο ELISA που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίστοιχο με αυτό της προηγούμενης παραγράφου.

Συνοπτικά, το πρώτο στάδιο της διαδικασίας προέβλεπε την επίστρωση όλων των ανοσογονικών συμπλεγμάτων της διατριβής σε 6 διαφορετικά πλακίδια (ένα για κάθε αντιορό). Στη συνέχεια και μετά την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης, ακολούθησε η επώαση των αντιορών (ένας για κάθε πλακίδιο) σε τελική αραιώση 1/2000 (v/v), σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) pH=7,4, (100μl/φρεάτιο). Οι εκάστοτε αντιοροί επωάστηκαν με όλα τα διαθέσιμα μακρομόρια της παρούσας διατριβής, έχοντας ως στόχο τη διασαφήνιση της ειδικής και μη αλληλεπίδρασης τους, με τα προσροφημένα ανοσογονικά συμπλέγματα.

7.2.4 ELISA ανταγωνιστικού τύπου (Competitive ELISA)

Ο ανταγωνισμός μεταξύ των πεπτιδικών μακρομορίων και των γραμμικών επιτόπων για τα αντίστοιχα παραχθέντα αντισώματα, μελετήθηκε με ELISA ανταγωνιστικού τύπου (Σχήμα 7.2.4.1).



Σχήμα 7.2.4.1 Σχηματική αναπαράσταση της κλασσικής ELISA δοκιμασίας ανταγωνιστικού τύπου.

Στην πράξη, η μοναδική διαφορά που παρουσιάζει η εν λόγω δοκιμασία σε σχέση με το πρωτόκολλο ELISA της παραγράφου 7.2.2 είναι στο βήμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ αντιγόνου



και αντισώματος (Βήμα 3^ο). Στην προκειμένη περίπτωση, αντί της προσθήκης 100μl αντιορού (κλασσική ELISA μη ανταγωνιστικού τύπου), προστίθεται μείγμα 50μl αντιορού και 50μl διαλύματος ανοσογονικού συμπλέγματος (ή γραμμικού επιτόπου) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 10μg/ml έως 1,25μg/ml, σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) pH=7,4.

Έτσι, αντί της κλασσικής επώασης με τον εκάστοτε αντιορό (στην ορισθείσα αραίωση), λαμβάνει χώρα ανταγωνισμός μεταξύ του προσροφημένου (στο πλακίδιο) και του αντίστοιχου διάλυμένου (στο μείγμα προσθήκης) ανοσογονικού συμπλέγματος ή γραμμικού επιτόπου, για το ειδικό αντίσωμα του αντιορού. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του ανοσογονικού συμπλέγματος (ή του γραμμικού επιτόπου) στο μείγμα προσθήκης, τόσο μεγαλύτερος και ο ανταγωνισμός που λαμβάνει χώρα. Με άλλα λόγια, όσο αυξάνεται η εν λόγω συγκέντρωση, τόσο μειώνεται η ποσότητα του αντισώματος που προσδένεται στο ακινητοποιημένο μακρομόριο. Αυτό έχει ως προφανή συνέπεια τη σταδιακή μείωση της πρόσδεσης του επισημασμένου με υπεροξειδάση δευτέρου αντισώματος (στο ακινητοποιημένο σύμπλεγμα) και τελικώς την ανάλογη μείωση της ενζυμικής αντίδρασης.

7.2.5 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής και σκελετικής τροπονίνης από τα παραχθέντα αντισώματα

Ο έλεγχος της εξειδίκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι των καρδιακών τροπονινών, αποτέλεσε ουσιαστικά και τον αντικειμενικό σκοπό της παρούσας διατριβής. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν ELISA δοκιμασίες μη ανταγωνιστικού τύπου, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν η φυσική ανθρώπινη καρδιακή τροπονίνη (Human cardiac Troponin Complex, Research Diagnostics, Inc, catalog#: RDI-TRK8T62 και Human cardiac Troponin Complex, SCIPAC, code No: P184-4), καθώς και η αντίστοιχη τροπονίνη (Human Skeletal Troponin I, Hytest, catalog#: 8T25).

Το πρώτο στάδιο της δοκιμασίας περιελάμβανε την επίστρωση των φυσικών πρωτεϊνικών μορίων σε συγκεντρώσεις 0,5-1μg/ml διαλύματος 0,2M Na₂CO₃-NaHCO₃, pH=9,6 (100μl/φρεάτιο). Ακολουθώντας πιστά το πρωτόκολλο της παραγράφου 7.2.2 και μετά την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης, έλαβε χώρα επώαση των αντιορών σε τελική αραίωση 1/2000 (v/v), σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) pH=7,4, (100μl/φρεάτιο).

Στόχος της συγκεκριμένης δοκιμασίας ήταν η επιβεβαίωση των αρχικών μας θεωρήσεων, οι οποίες αφορούσαν την ανάπτυξη ευαίσθητων και εξειδικευμένων αντιδραστηρίων (αντισωμάτων) ανίχνευσης καρδιακών τροπονινών, τα οποία δεν θα αλληλεπιδρούσαν με σκελετικές τροπονίνες.

7.3 Καθαρισμός των αντισωμάτων

Οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων στους αντιορούς των υπερανοσοποποιημένων ζώων είναι γενικά χαμηλές, σε σύγκριση πάντα με τις συνολικές ανοσοσφαιρίνες και τις λοιπές πρωτεΐνες



του ορού του αίματος. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι η συγκέντρωση των συνολικών πρωτεϊνών σε έναν αντιορό είναι περίπου 70mg/ml. Από τις πρωτεΐνες αυτές τα ~20mg/ml αντιστοιχούν στις συνολικές ανοσοσφαιρίνες, ενώ η συγκέντρωση του δραστικού αντισώματος κυμαίνεται από 0,5-5mg/ml.

Η χρησιμοποίηση καθαρών αντισωμάτων στην ανάπτυξη βιολογικών και ανοσοδιαγνωστικών δοκιμασιών καθίσταται επιβεβλημένη κυρίως για τους εξής λόγους:

1. Η παρουσία πλήθους μη ειδικών ανοσοσφαιρινών θα μπορούσε να δώσει ψευδώς θετικές αντιδράσεις κατά τη διεξαγωγή των ανοσοδιαγνωστικών διαδικασιών.
2. Τα μη καθαρά κλάσματα αντισωμάτων είναι προτιμότερο να μη χρησιμοποιούνται σε μια δαπανηρή δοκιμασία (όπως αυτή της τροπονίνης), τόσο για λόγους οικονομίας όσο και για λόγους αποτελεσματικότητας της τεχνικής.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των αντισωμάτων της παρούσας διατριβής βασίζεται στην ιδιότητα της κατακρήμνισης των πρωτεϊνικών μορίων με την αύξηση της ιονικής ισχύος του μέσου στο οποίο βρίσκονται, κατόπιν προσθήκης διαφόρων αλάτων (εξαλάτωση, salting out) [5,6]. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης, λόγω αφυδάτωσης των υδρόφιλων ομάδων της. Το άλας που συνήθως χρησιμοποιείται στη διεξαγωγή της διαδικασίας διαχωρισμού (από άλλα πρωτεϊνικά μόρια του ορού) και καθαρισμού των επιθυμητών IgG ανοσοσφαιρινών [7], είναι το θειϊκό αμμώνιο. Ανάλογα με τον βαθμό κορεσμού του υδατικού του διαλύματος, λαμβάνονται και διαφορετικά πρωτεϊνικά κλάσματα (Πίνακας 7.3.1).

Πίνακας 7.3.1 Πρωτεΐνες του ορού που κατακρημνίζονται ανάλογα με τον βαθμό κορεσμού του υδατικού διαλύματος θειϊκού αμμωνίου.

| Κορεσμένο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% v/v) | Πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται (%) | (είδος) |
|---|---------------------------------------|-------------------|
| 25 | 3 | ινωδογόνο |
| 33 | 20 | IgG |
| 40 | 15 | IgG, IgA και IgM |
| 50 | 14 | α και β σφαιρίνες |
| 70 | 46 | αλβουμίνη |

Το κορεσμένο διάλυμα θειϊκού αμμωνίου παρασκευάζεται με διάλυση 76mg στερεού $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε 100ml απιονισμένου νερού, με ήπια θέρμανση υπό ανάδευση. Όταν το διάλυμα αποκτήσει τη θερμοκρασία δωματίου αρχίζουν και εμφανίζονται κρύσταλλοι, αποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό το κορεσμό του διαλύματος. Πριν από κάθε χρήση το διάλυμα θα πρέπει να υποβάλλεται σε έντονη ανάδευση, ώστε να επιτυγχάνεται κάθε φορά ο επανακορεσμός του. Για την



απομόνωση των καθαρών IgG ανοσοσφαιρινών της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε θειϊκό αμμώνιο σε τελική περιεκτικότητα 33% (v/v). Η μεθοδολογία περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

1. Φυγοκέντρηση των ορών στους 4°C για 10 λεπτά (2500 στροφές). Ακολουθεί η συλλογή των υπερκείμενων διαλυμάτων και επαναφυγοκέντρηση για 10 λεπτά (2500 στροφές). Στο τέλος υπολογίζεται ο ακριβής όγκος των περισυλλεγμένων διαλυμάτων (V).
2. Οι οροί αραιώνονται σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), με τα τελικά διαλύματα να τοποθετούνται σε παγόνερο, όπου και υποβάλλονται σε αργή μαγνητική ανάδευση.
3. Ακολουθεί η σταδιακή προσθήκη συγκεκριμένου όγκου κορεσμένου διαλύματος (NH₄)₂SO₄ (στους αραιωμένους ορούς), ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός κορεσμός (33% v/v). Με άλλα λόγια, 1ml τελικού διαλύματος θα πρέπει να περιέχει 330μl κορεσμένου διαλύματος (NH₄)₂SO₄ και 670μl αραιωμένου αντιορού. Τα μείγματα αναδεύονται για 2 ώρες σε παγόνερο.
4. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά στις 10000 στροφές. Τα υπερκείμενα διαλύματα απομακρύνονται, ενώ τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε όγκο V 33% (v/v) κορεσμένου διαλύματος (NH₄)₂SO₄.
5. Επανάληψη των σταδίων 3 και 4.
6. Τα τελικά ιζήματα διαλύονται σε PBS και σε όγκο ίσο με το ¼ του αρχικού (V/4). Ακολούθως υποβάλλονται σε καθαρισμό με την μεθοδολογία της διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας ημιπερατές μεμβράνες Dialysis με cutoff μοριακών βαρών <12000-14000 Da (Orange Scientific, Belgium). Η διαδικασία λαμβάνει χώρα στους 4°C, με τα εξωτερικά διαλύματα να ανανεώνονται κάθε 1 ώρα (5 φορές). Η τελευταία διαπίδυση αφήνεται στους 4°C, overnight.

7.4 Ανάπτυξη, χαρακτηρισμός και καθαρισμός anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH} αντισωμάτων

7.4.1 Ανοσοποιήσεις πειραματόζων

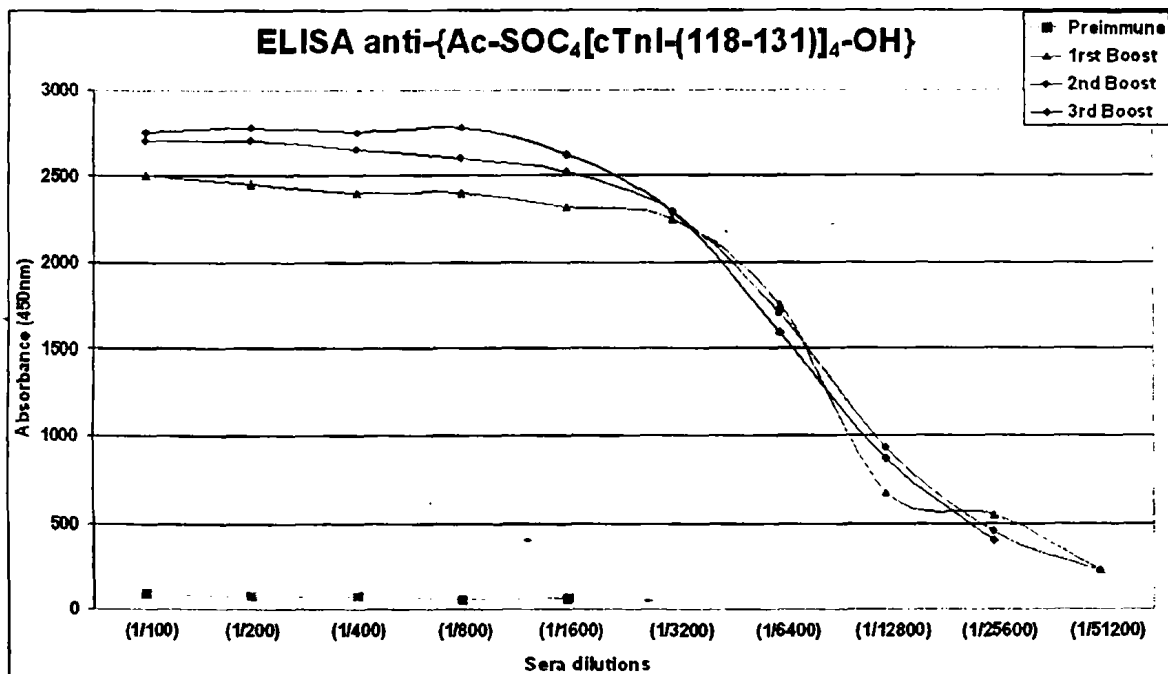
Η ανάπτυξη των anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH} αντισωμάτων διεξήχθη στα πλαίσια της αντίστοιχης μεταπτυχιακής διατριβής ειδίκευσης. Συνοπτικά, το πειραματόζωο ενέθηκε υποδόρια στον τράχηλό του (με το αντίστοιχο ανοσογόνο) 6 φορές, ενώ πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο τους 3 αιμοληψίες, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (κάθε 3 εβδομάδες). Η διαδικασία της ανοσοποίησης ολοκληρώθηκε επιτυχώς, με τον χαρακτηρισμό και καθαρισμό των παραχθέντων αντισωμάτων να λαμβάνει χώρα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν ήδη περιγραφεί (βλ. παράγραφο 7.2 και 7.3).



7.4.2 Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA

Αρχικά αναπτύχθηκε μία συγκεντρωτική δοκιμασία ELISA με το σύνολο των ορών του ανοσοποιημένου κουνελιού και με στόχο τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των παραχθέντων αντισωμάτων (σε διαφορετικές αραιώσεις ορών) από το αντίστοιχο ανοσογονικό σύμπλεγμα (βλ. παράγραφο. 7.2.2).

Θα πρέπει να επισημάνουμε ότι παρά τα αποτελέσματα της αντιγονικής χαρτογράφησης της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I (βλ. Κεφάλαιο 5, παράγραφος 5.1), τα οποία προέβλεπαν την περιοχή 118-131 (TKNITEIADLTQKI) ως μη ανοσογονική, η ανοσοποίηση του πειραματόζωου με το πεπτιδικό μακρομόριο $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}$ έδωσε μια ιδιαίτερα ισχυρή ανοσολογική απόκριση με πολύ υψηλούς τίτλους αντισωμάτων (Σχήμα 7.4.2.1).



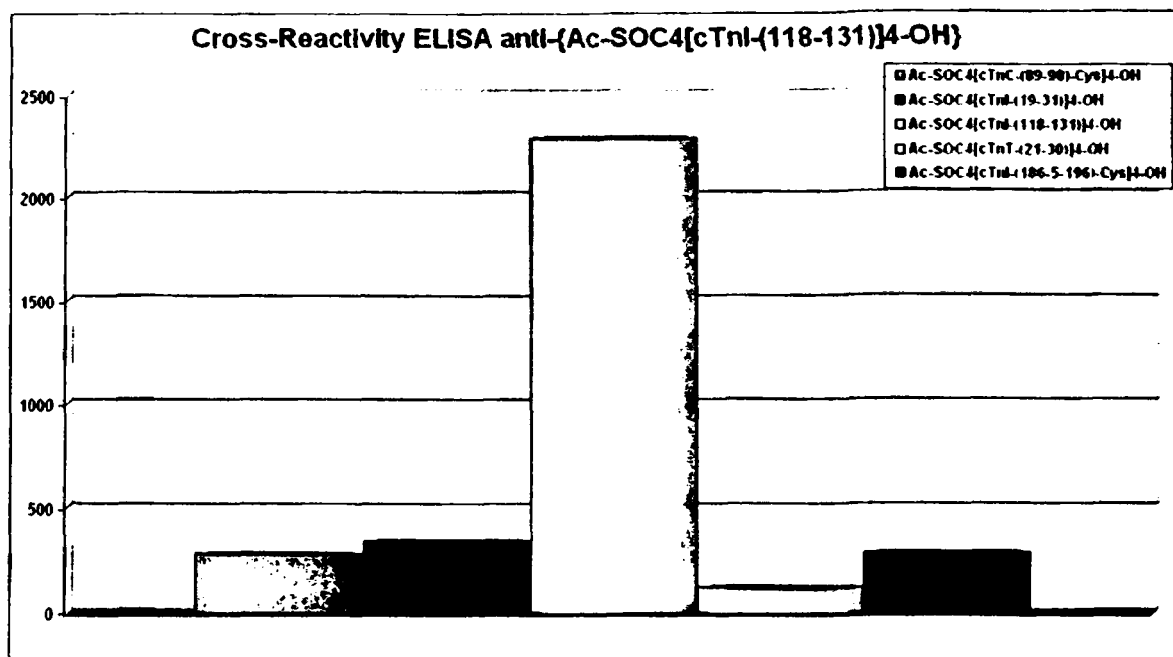
Σχήμα 7.4.2.1 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}$. Με πορτοκαλί χρώμα παρουσιάζονται οι τίτλοι αντισωμάτων του ορού "μάρτυρα" (preimmune), ενώ με πράσινο, κόκκινο και μπλε οι τίτλοι αντισωμάτων της πρώτης, δεύτερης και τρίτης αιμοληψίας αντίστοιχα, σε διαφορετικές αραιώσεις ορού.

Ακολούθησε δοκιμασία ELISA μη ανταγωνιστικού τύπου κατά την οποία ελέγχθηκε η εξειδικευμένη αναγνώριση των $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}\}$ αντισωμάτων έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος από το οποίο προήλθαν και η πιθανή ύπαρξη διασταυρωτών αντιδράσεων με άλλα μακρομόρια της παρούσας διατριβής (βλ. παράγραφο 7.2.3).

Στο σχήμα 7.4.2.2 απεικονίζονται γραφικά τα αποτελέσματα της δοκιμής, τα οποία επιβεβαιώνουν αρχικά την ισχυρή συγγένεια των $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}\}$



αντισωμάτων για το πεπτιδικό μακρομόριο $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}$. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε καμιά (μη ειδική) αλληλεπίδραση με άλλου τύπου πεπτιδικά μακρομόρια, όπως άλλωστε αναμενόταν.



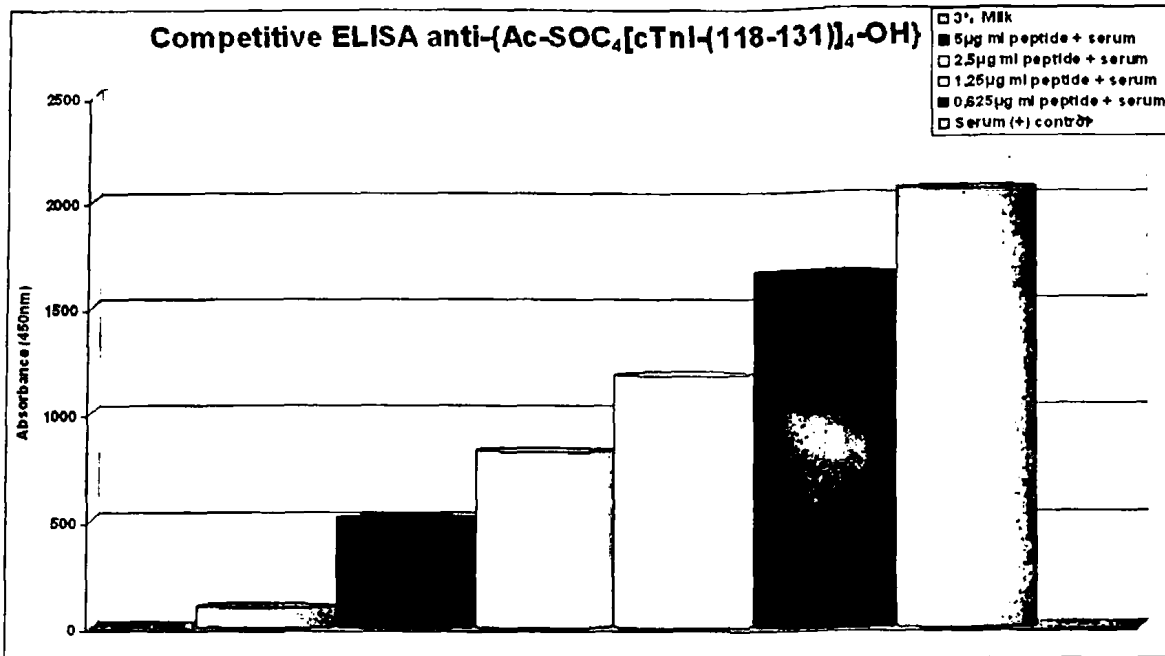
Σχήμα 7.4.2.2 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ELISA, αναφορικά με τον έλεγχο ύπαρξης διασταυρωτών αντιδράσεων μεταξύ των $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}\}$ αντισωμάτων και του συνόλου των ανοσολογικών συμπλεγμάτων της παρούσας διατριβής.

Η ισχυρή και δοσοεξαρτώμενη εξειδίκευση του πεπτιδικού μακρομορίου $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}$ έναντι των $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}\}$ αντισωμάτων, αναδείχθηκε από την δοκιμασία ELISA ανταγωνιστικού τύπου που ακολούθησε (Σχήμα 7.4.2.3), η οποία και διεξήχθη σύμφωνα με το αναλυτικό πρωτόκολλο της παραγράφου 7.2.4.

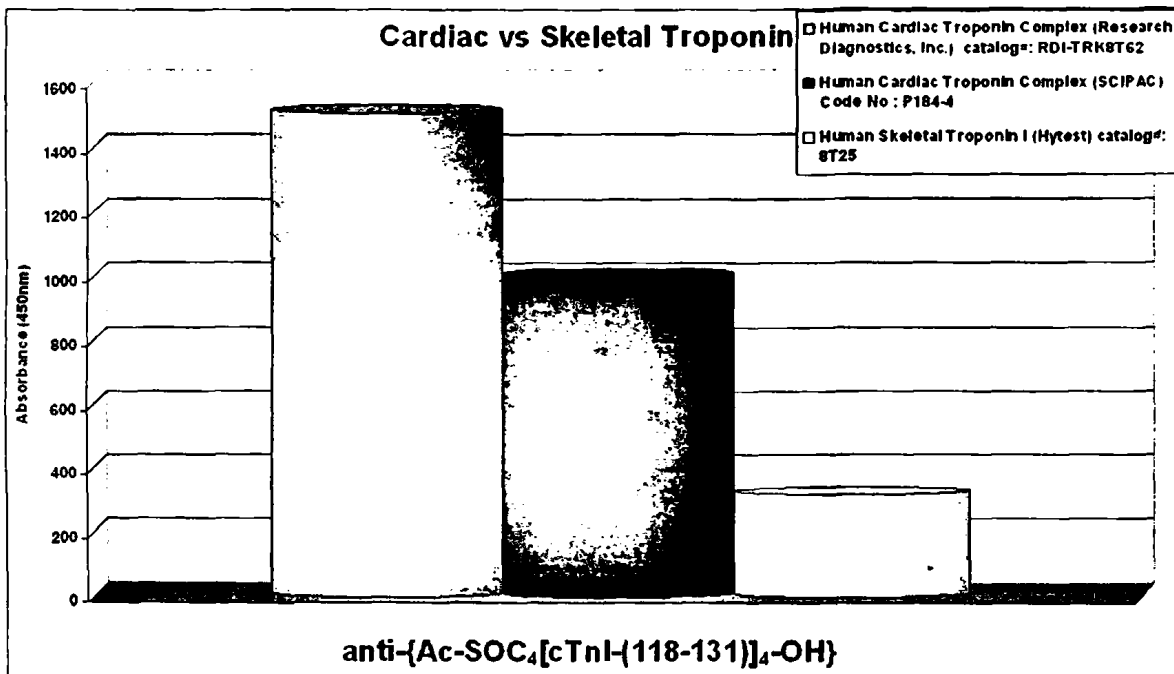
Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας έλαβε χώρα ισχυρός ανταγωνισμός μεταξύ του προσροφημένου στο πλακίδιο και του αντίστοιχου διαλυμένου (στο μείγμα προσθήκης) ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}$, για το ειδικό αντίσωμα του αντιορού $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}\}$. Όπως ξεκάθαρα παρουσιάζεται και στο παρακάτω σχήμα, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του εν λόγω πεπτιδικού μακρομορίου (στο μείγμα προσθήκης), λαμβάνει χώρα μια σταδιακή μείωση της καταγραφείσας οπτικής πυκνότητας.

Ακολούθησε η διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής και σκελετικής τροπονίνης από το ειδικό αντίσωμα του αντιορού $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}\}$. Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 7.2.5 με τα αποτελέσματά της (σχήμα 7.4.2.4) να αναδεικνύουν μια πολύ ισχυρή συγγένεια των $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(118-131)}]_4\text{-OH}\}$ αντισωμάτων για το σύμπλοκο της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης, όχι όμως και για την αντίστοιχη σκελετική τροπονίνη I.





Σχήμα 7.4.2.3 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ELISA ανταγωνιστικού τύπου μεταξύ του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnI-(118-131)]₄-OH και του αντίστοιχου ειδικού αντισώματος του αντιορού anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(118-131)]₄-OH}.

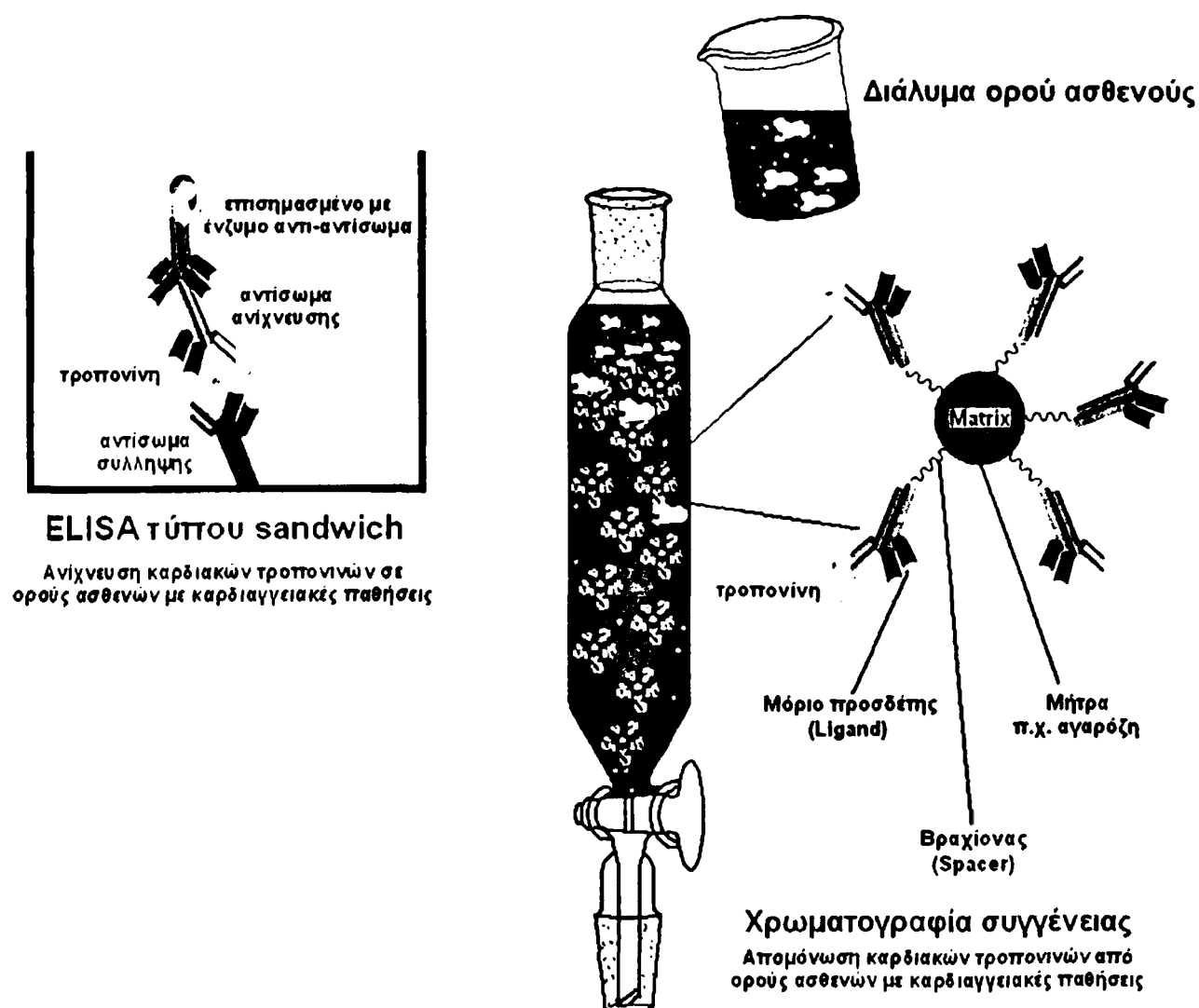


Σχήμα 7.4.2.4 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας, αναφορικά με την αναγνώριση της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής (μπλε και σκούρο καφέ) και σκελετικής τροπονίνης (ανοιχτό κίτρινο) από το ειδικό αντίσωμα του anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(118-131)]₄-OH} αντιορού.



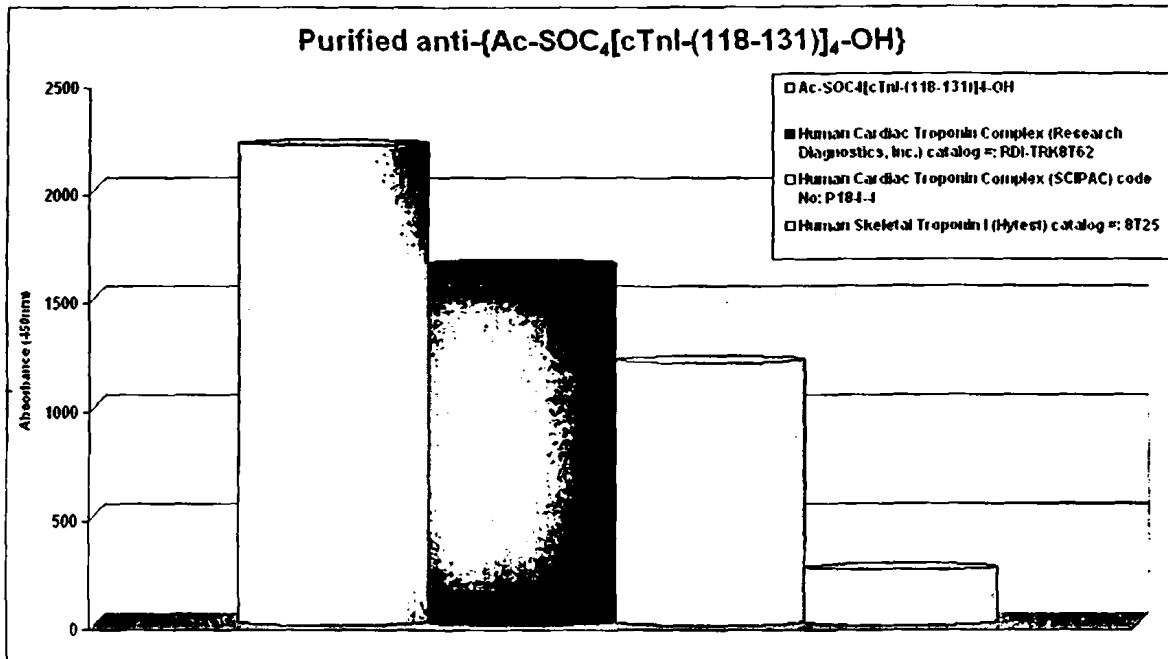
7.4.3 Καθαρισμός anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH} αντισωμάτων

Τα τελευταία πειράματα που διεξήχθησαν επιβεβαίωσαν τις αρχικές μας θεωρήσεις, λαμβάνοντας υπόψη ότι το κριτήριο για την επιλογή του επιτόπου cTnl (118-131) (TKNITEIADLTQKI), ήταν η χαμηλή του ομολογία σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών. Έτσι, ο καθαρισμός των anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH} αντισωμάτων θεωρήθηκε επιβεβλημένος, δεδομένου ότι ικανοποιώντας τις προϋποθέσεις που αρχικά είχαμε θέσει, το καθαρό πλέον αντίσωμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, τόσο σε χρωματογραφία συγγένειας για την απομόνωση καρδιακών τροπονινών από ορούς ασθενών με καρδιαγγειακές παθήσεις, όσο και στην ανάπτυξη μιας ανοσοενζυμικής δοκιμασίας ELISA τύπου sandwich, ως αντίσωμα σύλληψης ή και ανίχνευσης (Σχήμα 7.4.3.1).



Σχήμα 7.4.3.1 Σχηματική περιγραφή της διαγνωστικής δοκιμασίας ELISA τύπου sandwich και της τεχνικής απομόνωσης καρδιακών τροπονινών από ορούς ασθενών με καρδιαγγειακές παθήσεις.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των καθαρών IgG ανοσοσφαιρινών του αντιορού **anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(118-131)]₄-OH}** έχει περιγραφεί αναλυτικά στην παράγραφο 7.3. Να αναφέρουμε συνοπτικά ότι σε καθαρισμό υποβλήθηκαν 500μl αντιορού, ενώ στο τέλος και πάντα σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο, παραλάβαμε τις επιθυμητές καθарές ανοσοσφαιρίνες, διαλυμένες σε 125μl διαλύματος PBS. Προκαταρκτικές ELISA δοκιμασίες πιστοποίησαν τα χαρακτηριστικά του ειδικού αντισώματος του αντιορού **anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(118-131)]₄-OH}**, παρουσιάζοντας παράλληλα μια σημαντική βελτίωση των αποτελεσμάτων (Σχήμα 7.4.3.2).

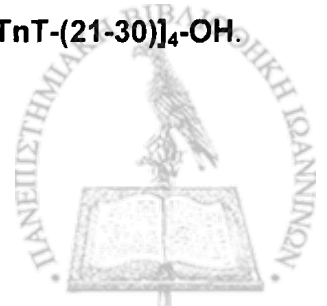


Σχήμα 7.4.3.2 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της συγκεντρωτικής ELISA δοκιμασίας, αναφορικά με την αναγνώριση του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnI-(118-131)]₄-OH** (μπλε), της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής (σκούρο καφέ και ανοιχτό κίτρινο) και σκελετικής τροπονίνης (γαλάζιο), από το ειδικό αντίσωμα του **anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(118-131)]₄-OH}** αντιορού, μετά τον προκαταρκτικό καθαρισμό του με τη μεθοδολογία της κλασμάτωσης πρωτεϊνικών μορίων.

7.5 Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός **anti-{Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH}** αντισωμάτων

7.5.1 Ανοσοποιήσεις πειραματόζων

Η ανάπτυξη των **anti-{Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH}** αντισωμάτων διεξήχθη στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Συνοπτικά, αφού πραγματοποιήθηκε η πρώτη αιμοληψία του ορού "μάρτυρα", το πειραματόζωο ενέθηκε υποδόρια με το γαλάκτωμα του ατελούς ανοσοενισχυτικού του Freund και του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH**.

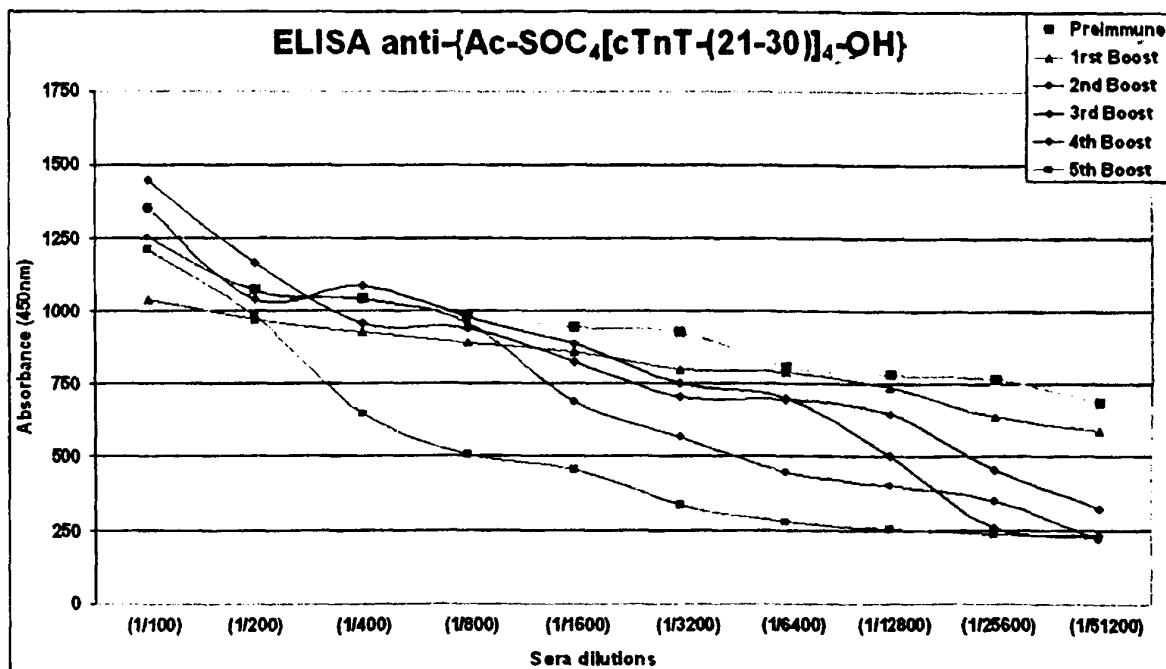


Μετά από ~10-15 ημέρες έλαβε χώρα η πρώτη αιμοληψία του ανοσοποιημένου πλέον κουνελιού και στη συνέχεια η διαδικασία χορήγησης των αναμνηστικών δόσεων ανοσογόνου πραγματοποιήθηκε ενδομυϊκά. Το πειραματόζωο ενέθηκε συνολικά 5 φορές, ενώ διεξήχθησαν και οι αντίστοιχες σε αριθμό αιμοληψίες, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Η διαδικασία της ανοσοποίησης διακόπηκε πριν ολοκληρωθεί, λόγω θανάτου του πειραματόζωου.

7.5.2 Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA

Βασικό κριτήριο για την επιλογή της περιοχής cTnT (21-30) (EEEEEDWREDE), ήταν τα αποτελέσματα της αντιγονικής χαρτογράφησης της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης T (βλ. Κεφάλαιο 5, παράγραφος 5.1), τα οποία την παρουσίαζαν ως πιθανή ισχυρή ανοσογονική. Αυτό λοιπόν που λογικά αναμέναμε ήταν μια ιδιαίτερα ισχυρή ανοσολογική απάντηση του πειραματόζωου κατόπιν ανοσοποίησής του με το πεπτιδικό μακρομόριο $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnT-(21-30)}]_4\text{-OH}$.

Έτσι λοιπόν, αναπτύχθηκαν ELISA με το σύνολο των ορών που συλλέχθηκαν έναντι του συγκεκριμένου πεπτιδικού ανοσογόνου (βλ. παράγραφο. 7.2.2), ώστε να διαμορφωθεί μία πλήρης εικόνα για την επιτυχή έκβαση της ανοσοποίησης (Σχήμα 7.5.2.1).



Σχήμα 7.5.2.1 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnT-(21-30)}]_4\text{-OH}$. Με πορτοκαλί χρώμα παρουσιάζονται οι τίτλοι αντισωμάτων του ορού "μάρτυρα" (preimmune), ενώ με πράσινο, κόκκινο, μπλε, σκούρο μπλε και ροζ οι τίτλοι αντισωμάτων της πρώτης, δεύτερης, τρίτης, τέταρτης και πέμπτης αιμοληψίας αντίστοιχα, σε διαφορετικές αραιώσεις ορού.



Σύμφωνα με την εικόνα των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας (αναφορικά με την ικανότητα αναγνώρισης του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH** από τον αντιορό **anti-{Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH}**) η ανοσοποίηση κρίθηκε ανεπιτυχής, δεδομένου ότι οι τίτλοι των αντισωμάτων κυμάνθηκαν στα επίπεδα του ιδιαίτερα υψηλών preimmune τίτλων. Η φύση του πεπτιδικού ανοσογόνου, ο ενδομυϊκός και όχι υποδόριος εμβολιασμός του ζώου κατά την χορήγηση των αναμνηστικών δόσεων και η συγκεκριμένη (πιθανά μολυσμένη) παρτίδα πειραματόζων, είναι οι πιθανοί παράγοντες που διαφοροποίησαν την εν λόγω διαδικασία από μια επιτυχή ανοσοποίηση ρουτίνας.

7.6 Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}** αντισωμάτων

7.6.1 Ανοσοποιήσεις πειραματόζων

Η ανάπτυξη των **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}** αντισωμάτων διεξήχθη εξ ολοκλήρου στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Η διαδικασία των ανοσοποιήσεων ολοκληρώθηκε με επιτυχία, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της παραγράφου 7.4.1. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι βασικό κριτήριο για την επιλογή της περιοχής cTnC (89-98) (SKGKSEELS) υπήρξε το γεγονός ότι, ανήκε σε πιθανή ανοσογονική περιοχή της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C (βλ. Κεφάλαιο 5, παράγραφος 5.1).

Τα παραχθέντα **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}** αντισώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μόνο στην περίπτωση της διαγνωστικής δοκιμασίας ELISA τύπου sandwich, ως αντιδραστήρια "ανίχνευσης" (Σχήμα 7.4.3.1). Και αυτό διότι σύμφωνα με τον σχεδιασμό και τις προϋποθέσεις που αρχικά θέσαμε, αναμένεται να αναγνωρίζουν εξίσου ισχυρά τόσο την φυσική καρδιακή όσο την αντίστοιχη σκελετική τροπονίνη. Δεδομένου ότι μια τέτοια δοκιμασία θα μπορούσε να εφαρμοστεί εξίσου αποτελεσματικά με τη χρήση των αντιορών και όχι των καθαρών μονοκλωνικών αντισωμάτων (ως αντιδραστηρίων "ανίχνευσης"), στην παρούσα φάση δεν κρίθηκε αναγκαίος ο περαιτέρω καθαρισμός τους.

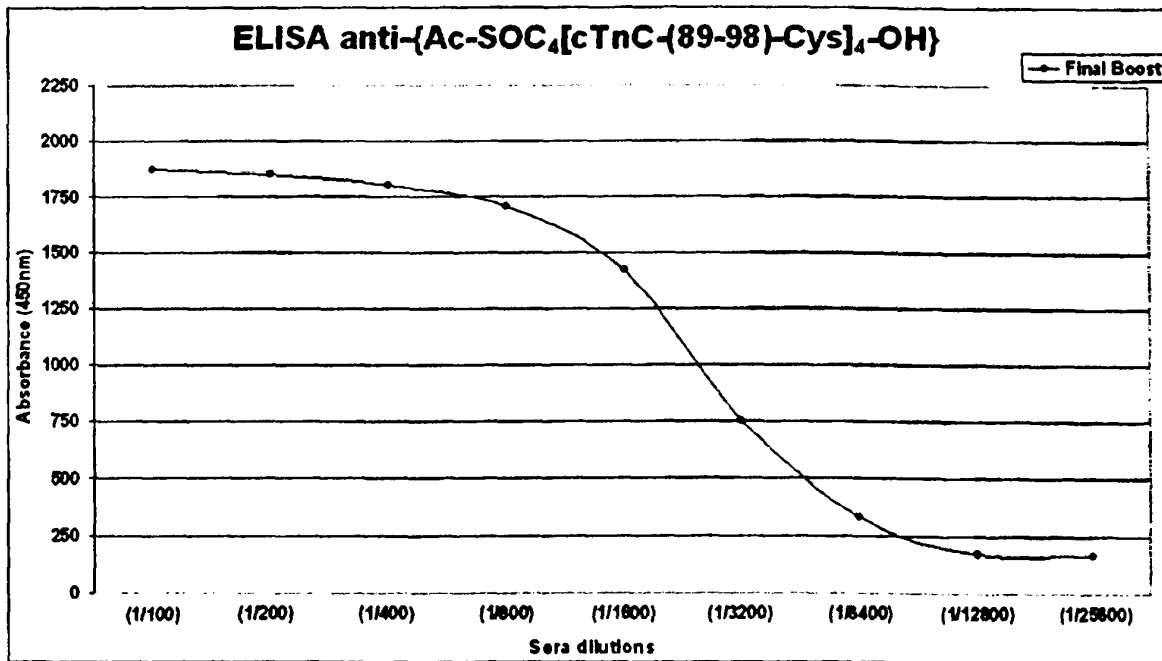
7.6.2 Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA

Η δοκιμασία ELISA που αρχικά έλαβε χώρα αφορούσε τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH** από διαφορετικές αραιώσεις **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}** αντιορού (βλ. παράγραφο. 7.2.2) (Σχήμα 7.6.2.1).

Εξετάζοντας το παρακάτω γράφημα συμπεραίνουμε ότι, το ανοσοποιημένο με το πεπτιδικό μακρομόριο **Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH** πειραματόζωο, έδωσε μια αρκετά καλή



ανοσολογική απάντηση με υπολογίσιμους τίτλους αντισωμάτων, χαμηλότερους όμως σε σχέση με τις υπόλοιπες ανοσοποιήσεις που διεξήχθησαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.



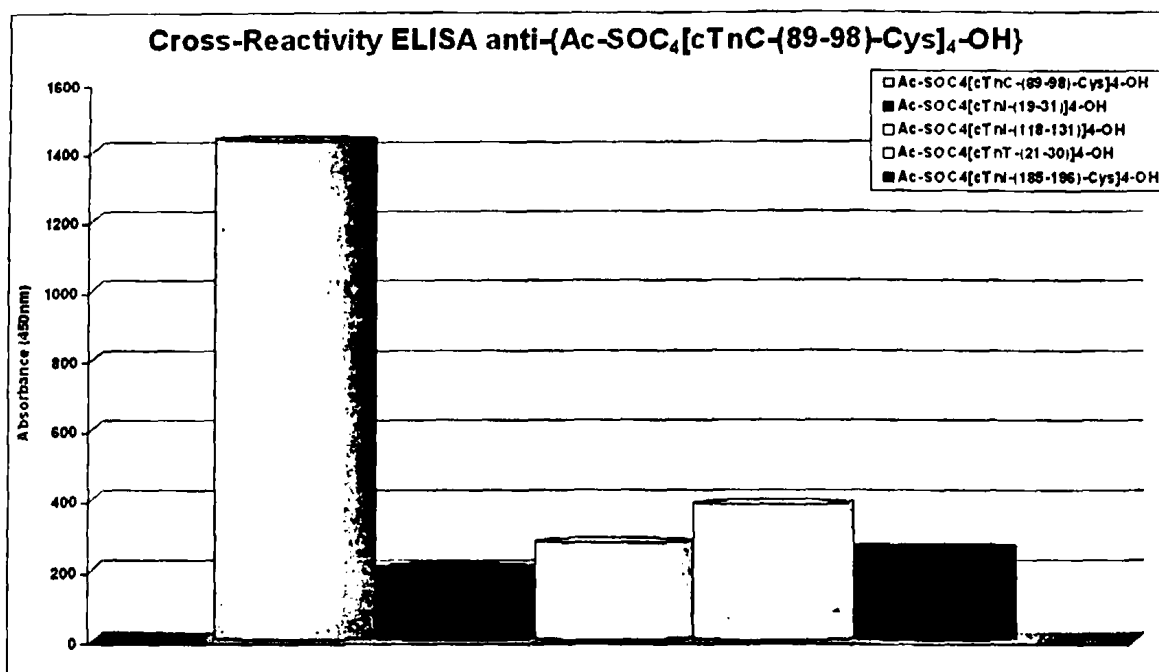
Σχήμα 7.6.2.1 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα **Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH**. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι τίτλοι αντισωμάτων τελευταίας αιμοληψίας, σε διαφορετικές αραιώσεις ορού.

Ακολούθως αναπτύχθηκε ELISA μη ανταγωνιστικού τύπου, κατά την οποία εξετάστηκε η εξειδικευμένη αναγνώριση των **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}** αντισωμάτων από το πεπτιδικό μακρομόριο **Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH**, καθώς και η πιθανή ύπαρξη διασταυρωτών αντιδράσεων με άλλου τύπου μακρομόρια (βλ. παράγραφο 7.2.3). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται γραφικά τα αποτελέσματα της δοκιμασίας (Σχήμα 7.6.2.2), όπου και απεικονίζεται ξεκάθαρα η εξειδικευμένη συγγένεια του εν λόγω αντιορού μόνο για το ανοσογονικό σύμπλεγμα από το οποίο προήλθε. Δεν παρατηρήθηκε καμιά (μη ειδική) αλληλεπίδραση με άλλου τύπου πεπτιδικά μακρομόρια.

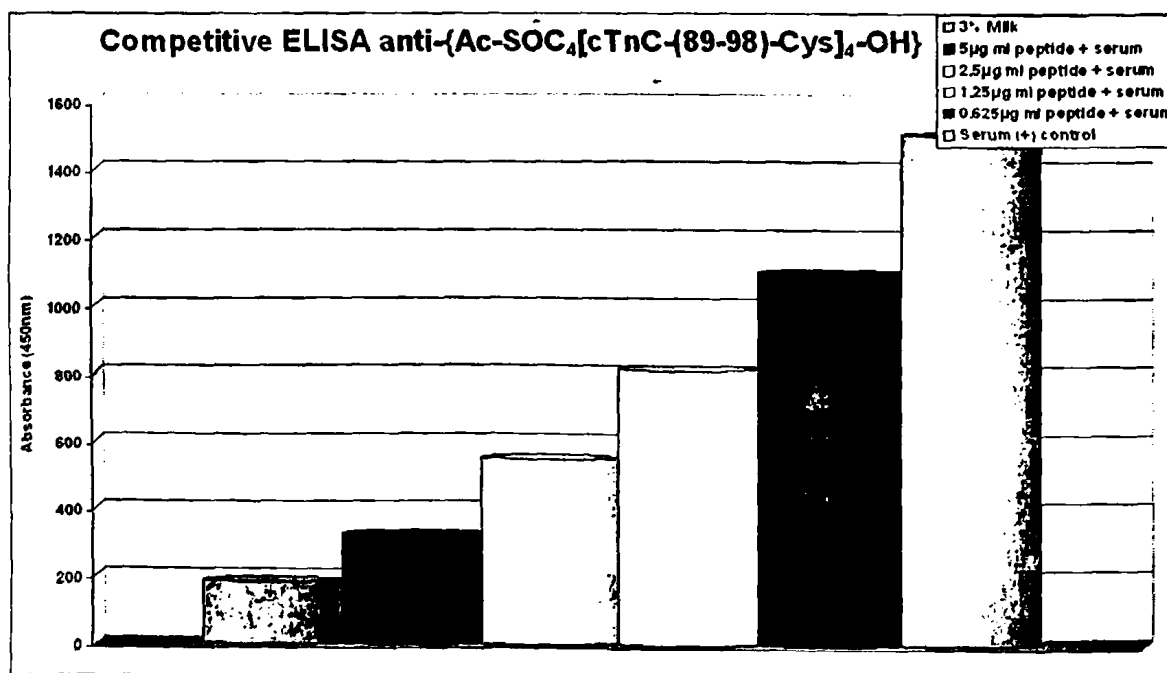
Ακολουθώντας το πρωτόκολλο της παραγράφου 7.2.4, έγινε έλεγχος της δοσοεξαρτώμενης εξειδίκευσης, τόσο του πεπτιδικού μακρομορίου **Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH** όσο και του αντίστοιχου γραμμικού επιτόπου **cTnC-(89-98)-Cys**, έναντι των **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}** αντισωμάτων. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας και στις δύο περιπτώσεις ήταν ανάλογα, αναδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την ύπαρξη ισχυρού ανταγωνισμού μεταξύ του προσροφημένου στο πλακίδιο ανοσογονικού συμπλέγματος και του αντίστοιχου στο μείγμα προσθήκης (μακρομόριο ή γραμμικός επίτοπος), για το ειδικό αντίσωμα του **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}**



άντιορού. Στη συνέχεια δίδεται η σχηματική περιγραφή των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας που αφορά την ανοσογονικό σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnC-(89-98)-Cys}]_4\text{-OH}$ (Σχήμα 7.6.2.3).



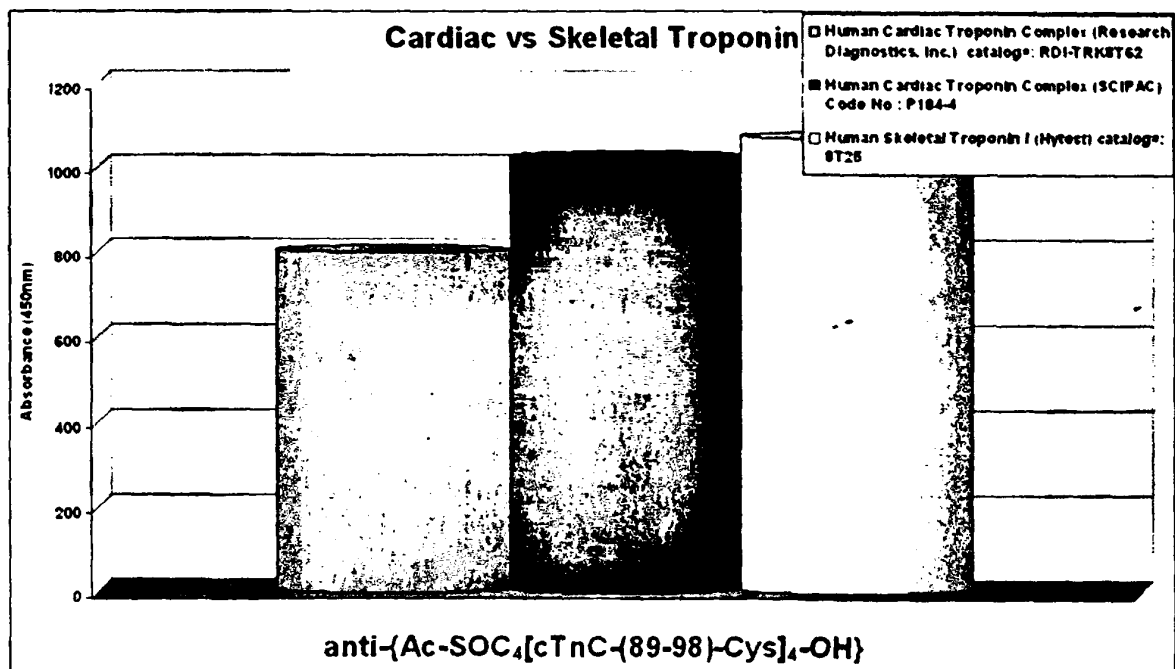
Σχήμα 7.6.2.2 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας, αναφορικά με τον έλεγχο ύπαρξης διασταυρωτών αντιδράσεων μεταξύ των $\text{anti-(Ac-SOC}_4[\text{cTnC-(89-98)-Cys}]_4\text{-OH)}$ αντισωμάτων και του συνόλου των ανοσολογικών συμπλεγμάτων της παρούσας διατριβής.



Σχήμα 7.6.2.3 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας ανταγωνιστικού τύπου μεταξύ του ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnC-(89-98)-Cys}]_4\text{-OH}$ και του αντίστοιχου ειδικού αντισώματος του αντιορού $\text{anti-(Ac-SOC}_4[\text{cTnC-(89-98)-Cys}]_4\text{-OH)}$.



Η συγγένεια των **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}** αντισωμάτων έναντι της ανθρώπινης καρδιακής αλλά και της αντίστοιχης φυσικής σκελετικής πρωτεΐνης, πιστοποιήθηκε με την δοκιμασία ELISA που ακολούθησε (βλ. παράγραφο. 7.2.5), τα αποτελέσματα της οποίας απεικονίζονται στο σχήμα 7.6.2.4. Πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από δοκιμές χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις αντιορού και συγκεντρώσεις των επιστρωμένων πρωτεϊνικών μορίων, ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της δοκιμασίας. Η αραιώση του αντιορού διαμορφώθηκε σε 1/2000 (v/v), σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) pH=7,4, ενώ οι φυσικές πρωτεΐνες επιστρώθηκαν στα φρεάτια των πλακιδίων σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,2M Na₂CO₃-NaHCO₃, pH=9,6 (σε αντίθεση με τις υπόλοιπες δοκιμασίες όπου η επίστρωση των φυσικών πρωτεϊνών έλαβε χώρα σε συγκέντρωση 0,5μg/ml).



Σχήμα 7.6.2.4 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας, αναφορικά με την αναγνώριση της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής (μπλε και σκούρο καφέ) και σκελετικής τροπονίνης (ανοιχτό κίτρινο) από τον αντιορό **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}**.

7.7 Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός **anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(185-196)-Cys]₄-OH}** αντισωμάτων

7.7.1 Ανοσοποιήσεις πειραματόζωων

Η ανοσοποίηση του πειραματόζωου με το ανοσογονικό σύμπλεγμα **Ac-SOC₄[cTnI-(185-196)-Cys]₄-OH** πραγματοποιήθηκε στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράψαμε στην παράγραφο 7.5.1. Περιληπτικά αναφέρουμε ότι το



Πειραματόζωο ενέθηκε συνολικά 7 φορές, ενώ διεξήχθησαν και οι αντίστοιχες σε αριθμό αιμοληψίες, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (κάθε 10-15 ημέρες). Η διαδικασία της αγοσοποίησης ολοκληρώθηκε επιτυχώς, χωρίς βέβαια να παραλάβουμε (όπως περιγράφεται και στη συνέχεια) την ισχυρή ανοσολογική απάντηση που αναμέναμε. Αναδεικνύεται για μια ακόμη το γεγονός ότι, ο τρόπος με τον οποίο λαμβάνει χώρα η ομοιοπολική πρόσδεση των επιτόπων στα εκάστοτε συνθετικά και πρωτεϊνικά υποστρώματα (φορείς), επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα των διαδικασιών ανοσοποίησης. Το εν λόγω φαινόμενο παρατηρήθηκε τόσο στην προκειμένη περίπτωση, όσο και κατά την ανοσοποίηση με το πεπτιδικό ανοσογόνο **Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH**.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από βιοχημικές δοκιμασίες ELISA, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν ήδη περιγραφεί (βλ. παράγραφο 7.2), με στόχο τον πλήρη χαρακτηρισμό των παραχθέντων αντισωμάτων.

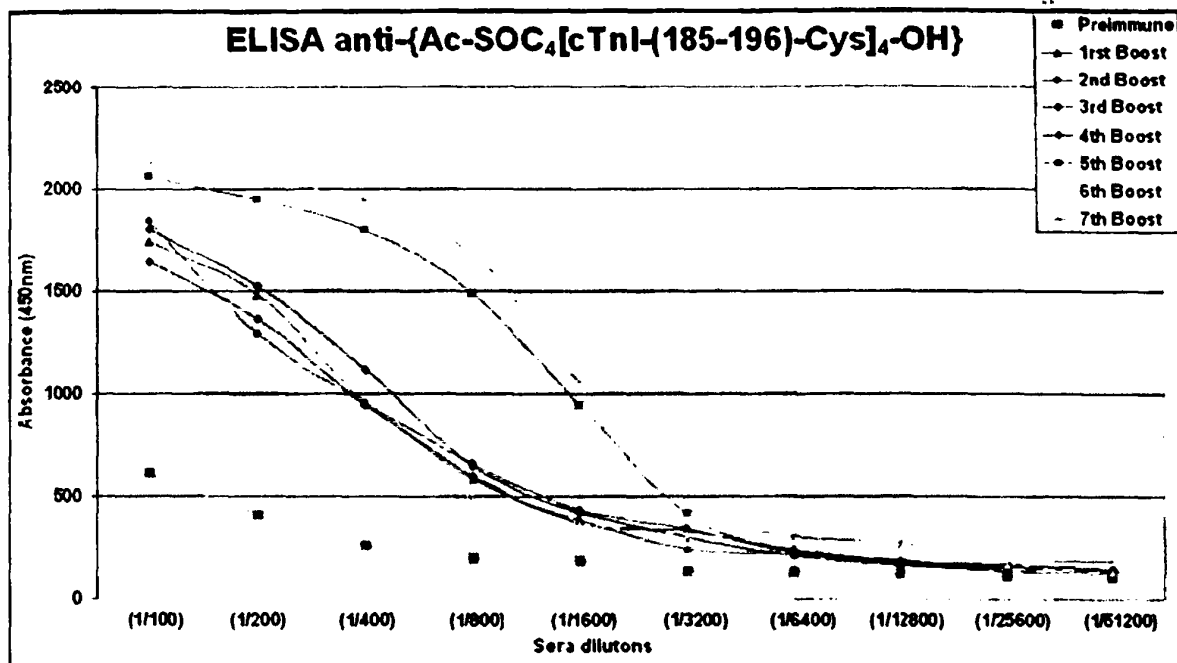
Θα πρέπει στο σημείο αυτό να επισημανθεί ότι, ο σχεδιασμός και η τελική επιλογή του, επιτόπου cTnC(185-196) (REVGDWWRKNIDA) για ανάπτυξη αντισωμάτων, στηρίχθηκε αποκλειστικά στις μελέτες της S. Eriksson [Κεφάλαιο 3, βιβλ. 105-107] και στα αποτελέσματα της συστηματικής αντιγονικής χαρτογράφησης που προηγήθηκαν (βλ. Κεφάλαιο 5, παράγραφος 5.1). Σύμφωνα με τις αρχικές μας θεωρήσεις και δεδομένου ότι η εν λόγω αλληλουχία παρουσιάζει υψηλή ομολογία έναντι των σκελετικών τροπονινών (>70%), τα παραχθέντα **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(185-196)-Cys]₄-OH}** αντισώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μόνο ως αντιδραστήρια "ανίχνευσης" (Σχήμα 7.4.3.1) σε μια διαγνωστική δοκιμασία ELISA τύπου sandwich. Έτσι λοιπόν, για τους λόγους στους οποίους έχουμε ήδη αναφερθεί, τα παραχθέντα **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(185-196)-Cys]₄-OH}** αντισώματα δεν υποβλήθηκαν σε περαιτέρω καθαρισμό.

7.7.2 Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA

Αναπτύχθηκαν ELISA δοκιμασίες με το σύνολο των ορών του ανοσοποιημένου κουνελιού (σε διαφορετικές αραιώσεις) έναντι του μακρομορίου **Ac-SOC₄[cTnC-(185-196)-Cys]₄-OH**. Όπως παρουσιάζεται και στο παρακάτω γράφημα (Σχήμα 7.7.2.1), η ανοσοποίηση του πειραματόζωου με το πεπτιδικό μακρομόριο **Ac-SOC₄[cTnC-(185-196)-Cys]₄-OH** έδωσε μια ικανοποιητική ανοσολογική απόκριση με αρκετά υψηλούς τίτλους αντισωμάτων.

Αξιοσημείωτο γεγονός αποτέλεσαν για ακόμη μια φορά οι ασυνήθιστα υψηλοί preimmune τίτλοι, φαινόμενο το οποίο παρουσιάστηκε και στη περίπτωση της ανεπιτυχούς διαδικασίας ανοσοποίησης με το πεπτιδικό ανοσογονικό σύμπλεγμα **Ac-SOC₄[cTnT-(21-30)]₄-OH**. Συσχετίζοντας τις δύο αυτές περιπτώσεις συγκλίνουμε στο συμπέρασμα ότι, η συγκεκριμένη ομάδα πειραματόζωων καθώς και το ελαφρώς τροποποιημένο πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων, πιθανότατα επηρέασαν την εικόνα των αποτελεσμάτων.





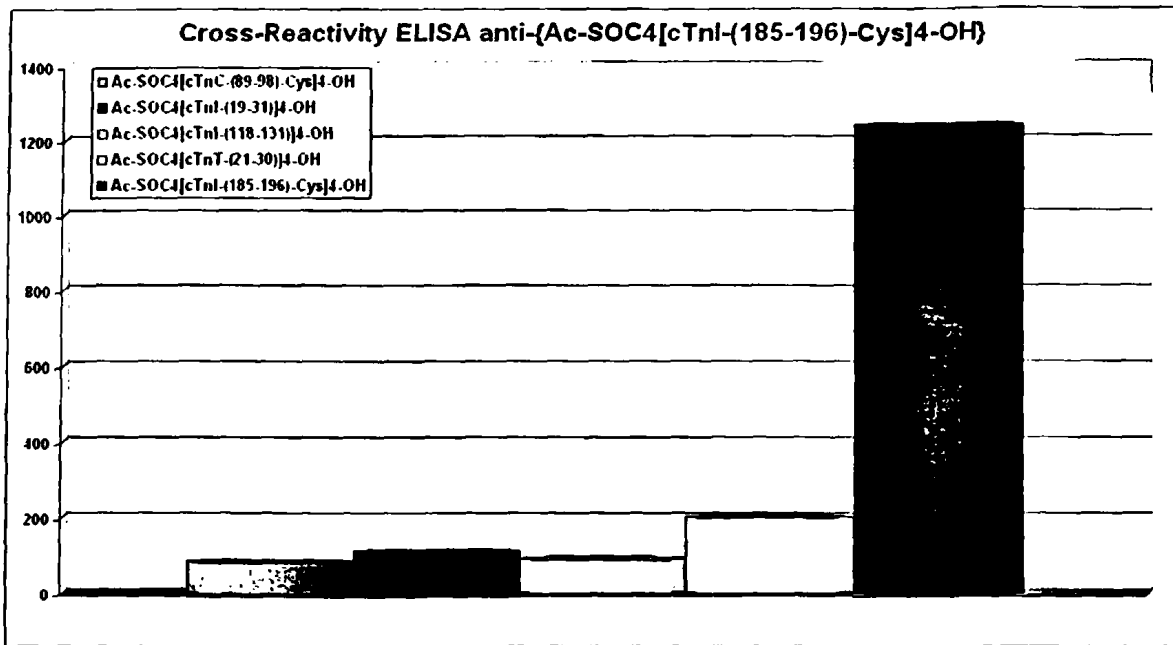
Σχήμα 7.7.2.1 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}$. Με πορτοκαλί χρώμα παρουσιάζονται οι τίτλοι αντισωμάτων του ορού "μάρτυρα" (preimmune), ενώ με πράσινο, κόκκινο, μπλε, σκούρο μπλε, ροζ, κίτρινο και θαλασσί οι τίτλοι αντισωμάτων της πρώτης, δεύτερης, τρίτης, τέταρτης, πέμπτης, έκτης και έβδομης αιμοληψίας αντίστοιχα, σε διαφορετικές αραιώσεις ορού.

Στη συνέχεια αναπτύχθηκε ELISA μη ανταγωνιστικού τύπου, κατά την οποία εξετάστηκε η εξειδικευμένη συγγένεια των $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}\}$ αντισωμάτων για το πεπτιδικό μακρομόριο $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}$, καθώς και η πιθανή ύπαρξη διασταυρωτών αντιδράσεων με άλλου τύπου ανοσογόνα (βλ. παράγραφο 7.2.3). Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.7.2.2 ανέδειξαν την ισχυρή και εξειδικευμένη αναγνώριση του εν λόγω αντιορού μόνο για το ανοσογονικό σύμπλεγμα από το οποίο προήλθε. Δεν παρατηρήθηκε καμιά (μη ειδική) αλληλεπίδραση με άλλου τύπου πεπτιδικά μακρομόρια.

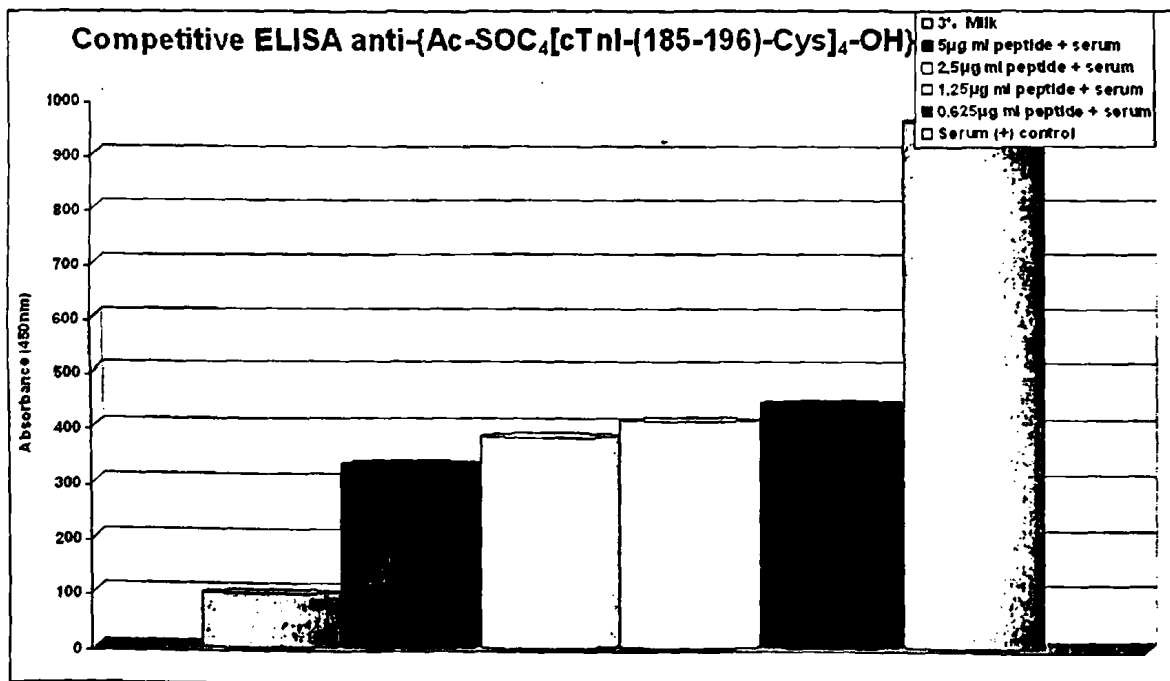
Ακολουθώντας το πρωτόκολλο της παραγράφου 7.2.4, μελετήσαμε την δοσοεξαρτώμενη εξειδίκευση, τόσο του πεπτιδικού μακρομορίου $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}$ όσο και του αντίστοιχου γραμμικού επιτόπου $\text{cTnl-(185-196)-Cys}$, έναντι των $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}\}$ αντισωμάτων. Στη συνέχεια δίδεται η σχηματική περιγραφή των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας που αφορά την ανοσογονικό σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}$ (Σχήμα 7.7.2.3). Εξετάζοντας βέβαια το παρακάτω γράφημα συγκλίνουμε στο συμπέρασμα ότι υφίσταται μια πολύ ισχυρή, όμως στις συνθήκες της δοκιμασίας, ελάχιστα δοσοεξαρτώμενη εξειδίκευση μεταξύ των παραχθέντων $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}\}$ αντισωμάτων για το αντίστοιχο πεπτιδικό ανοσογονικό. Το εν λόγω φαινόμενο αποδίδεται στην μικρή συγκέντρωση του ειδικού για το ανοσογόνο αντισώματος, στον αντιορό του ανοσοποιημένου κουνελιού. Άλλωστε αυτό



πιστοποιείται και από σχήμα 7.7.2.1, στο οποίο παρουσιάζονται τα γενικότερα αποτελέσματα της ανοσοποίησης και οι τίτλοι των αντισωμάτων σε διαφορετικές αραιώσεις αντιορού.



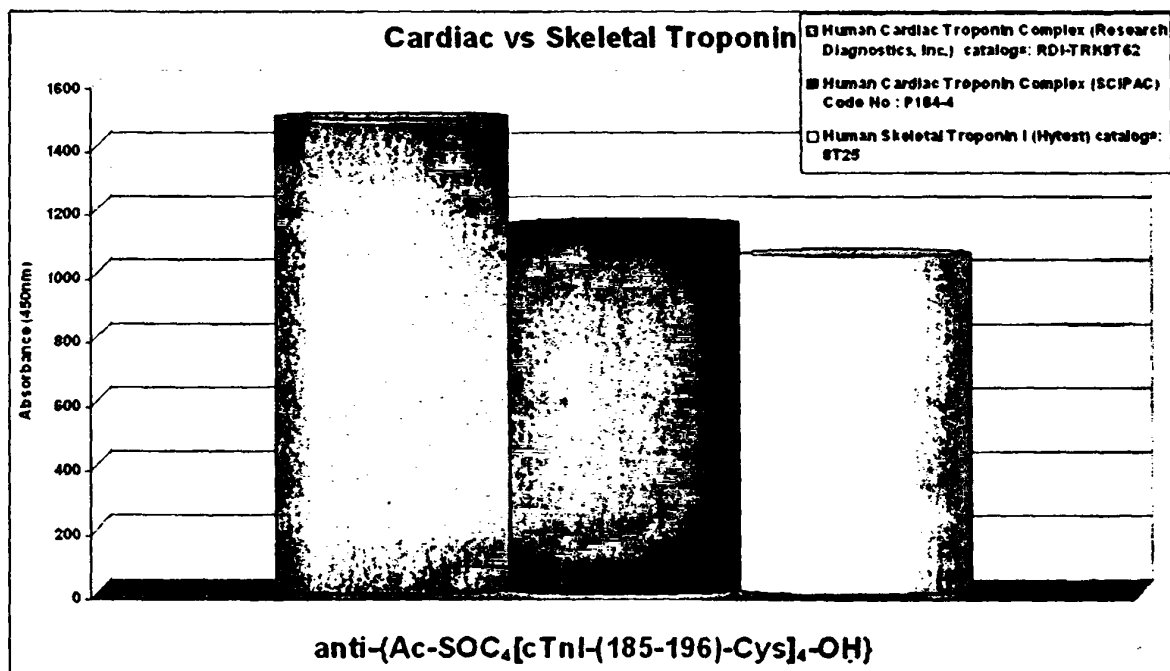
Σχήμα 7.7.2.2 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας, αναφορικά με τον έλεγχο ύπαρξης διασταυρωτών αντιδράσεων μεταξύ των anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(185-196)-Cys]₄-OH} αντισωμάτων και του συνόλου των ανοσολογικών συμπλεγμάτων της παρούσας διατριβής.



Σχήμα 7.7.2.3 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας ανταγωνιστικού τύπου μεταξύ του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(185-196)-Cys]₄-OH και του αντίστοιχου ειδικού αντισώματος του αντιορού anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(185-196)-Cys]₄-OH}.



Στο σχήμα 7.7.2.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης, αναφορικά με τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής και σκελετικής τροπονίνης από τον εν λόγω αντιορό. Αναδεικνύεται η ισχυρή του συγγένεια τόσο για την φυσική καρδιακή όσο και για την αντίστοιχη σκελετική τροπονίνη, όπως άλλωστε αναμενόταν.



Σχήμα 7.7.2.4 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας, αναφορικά με την αναγνώριση της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής (μπλε και σκούρο καφέ) και σκελετικής τροπονίνης (ανοιχτό κίτρινο) από το ειδικό αντίσωμα του $\text{anti}\{-\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnI-(185-196)-Cys}]_4\text{-OH}\}$ αντιορού.

7.8 Ανάπτυξη, χαρακτηρισμός και καθαρισμός $\text{anti}\{-\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnI-(19-31)]_4\text{-OH}\}$ αντισωμάτων

7.8.1 Ανοσοποιήσεις πειραματόζων

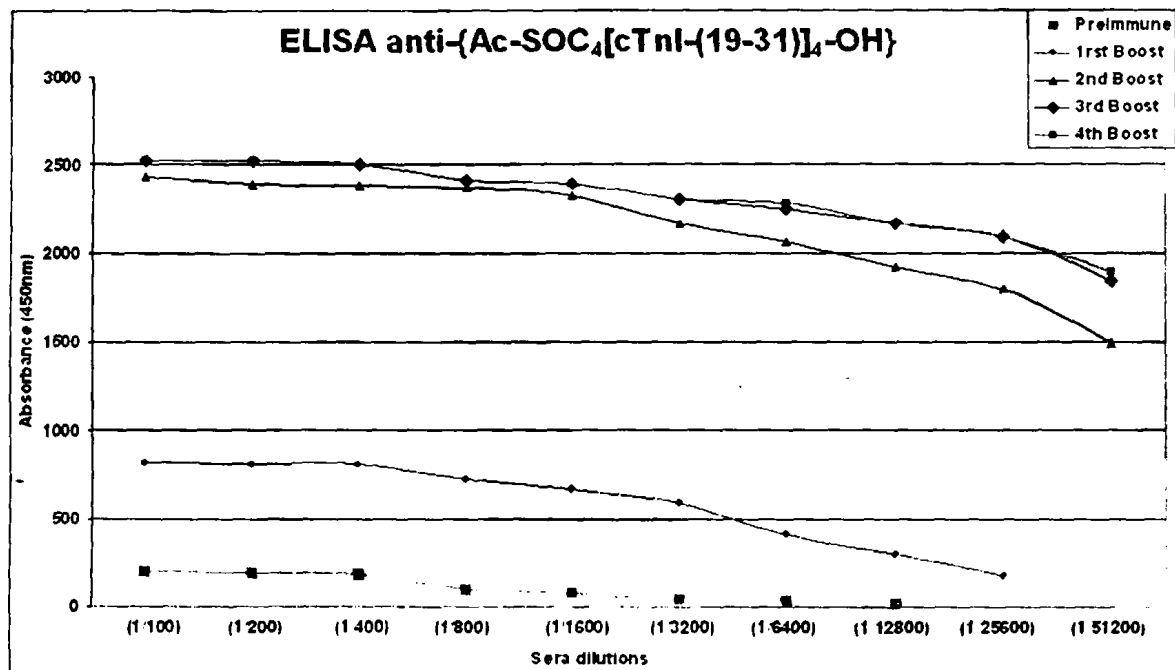
Η ανοσοποίηση πειραματόζων με το ανοσογονικό σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnI-(19-31)]_4\text{-OH}$ (8) (βλ. Κεφάλαιο 6, πίνακας 6.1.1) πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, στο πλαίσιο της αντίστοιχης μεταπτυχιακής διατριβής ειδίκευσης. Συνοπτικά, το πειραματόζωο ενέθηκε συνολικά 4 φορές, ενώ διεξήχθησαν και οι αντίστοιχες σε αριθμό αιμοληψίες, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (κάθε 3 εβδομάδες).

Οι διαδικασίες των ανοσοποιήσεων ολοκληρώθηκε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν ήδη περιγραφεί. Ακολούθησε ο πλήρης χαρακτηρισμός και καθαρισμός των παραχθέντων αντισωμάτων (βλ. παράγραφο 7.2 και 7.3).



7.8.2 Βιοχημικές δοκιμασίες ELISA

Αναπτύχθηκαν συγκεντρωτικές ELISA δοκιμασίες με το σύνολο των αντιορών και με στόχο τη μελέτη της ικανότητας αναγνώρισης των παραχθέντων αντισωμάτων από τὸ αντίστοιχο πεπτιδικό μακρομόριο. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας παρουσιάζονται στο σχήμα 7.8.2.1, σύμφωνα με το οποίο φαίνεται ότι η ανοσοποίηση του πειραματόζωου με το πεπτιδικό μακρομόριο $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(19-31)}]_4\text{-OH}$, έδωσε μια ιδιαίτερα ισχυρή ανοσολογική απόκριση με πολύ υψηλούς τίτλους αντισωμάτων.

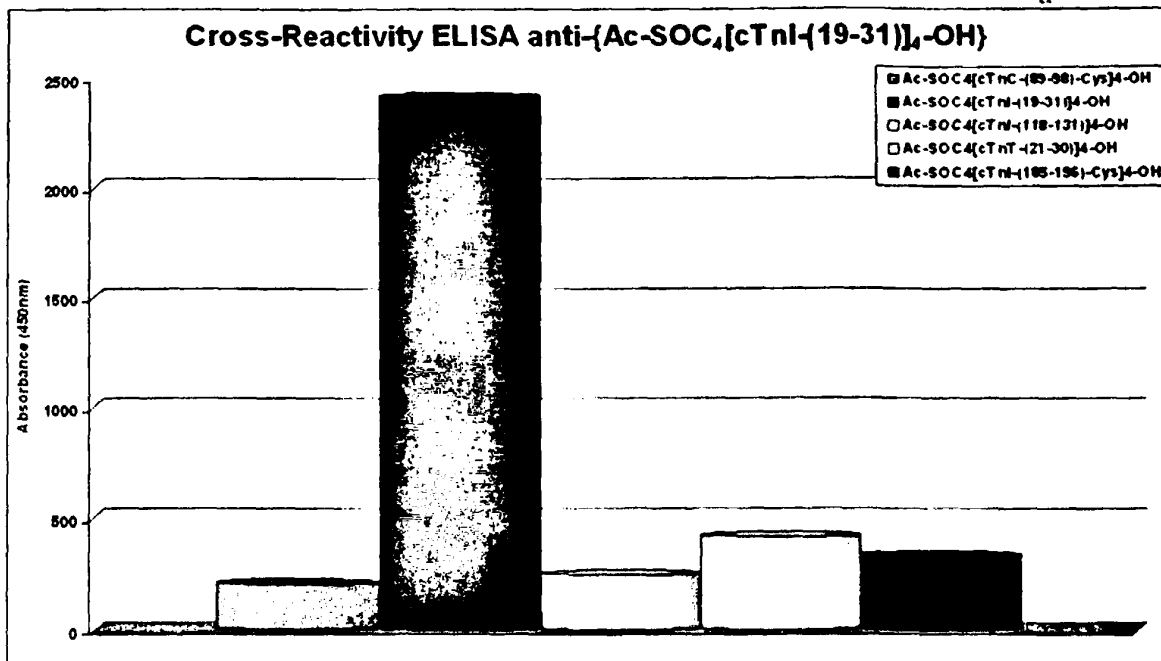


Σχήμα 7.8.2.1 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(19-31)}]_4\text{-OH}$. Με πορτοκαλί χρώμα παρουσιάζονται οι τίτλοι αντισωμάτων του ορού "μάρτυρα" (preimmune), ενώ με πράσινο, καφέ, μπλε και κόκκινο οι τίτλοι αντισωμάτων της πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης αιμοληψίας αντίστοιχα, σε διαφορετικές αραιώσεις αντιορού.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν ELISA δοκιμασίες μη ανταγωνιστικού τύπου έναντι του συνόλου των πεπτιδικών μακρομορίων, με στόχο την διασαφήνιση ύπαρξης διασταυρωτών αντιδράσεων μεταξύ αυτών και των παραχθέντων $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(19-31)}]_4\text{-OH}\}$ αντισωμάτων (Σχήμα 7.8.2.2).

Όπως προκύπτει από το παρακάτω γράφημα, ο αντιορός $\text{anti-}\{\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(19-31)}]_4\text{-OH}\}$ παρουσιάζει μια εξειδικευμένη συγγένεια για το πεπτιδικό μακρομόριο $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnl-(19-31)}]_4\text{-OH}$ από το οποίο και προήλθε, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη διασταυρωτή αντίδραση με άλλου τύπου πεπτιδικά ανοσογόνα.





Σχήμα 7.8.2.2 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας, αναφορικά με τον έλεγχο ύπαρξης διασταυρωτών αντιδράσεων μεταξύ των **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}** αντισωμάτων και του συνόλου των ανοσολογικών συμπλεγμάτων.

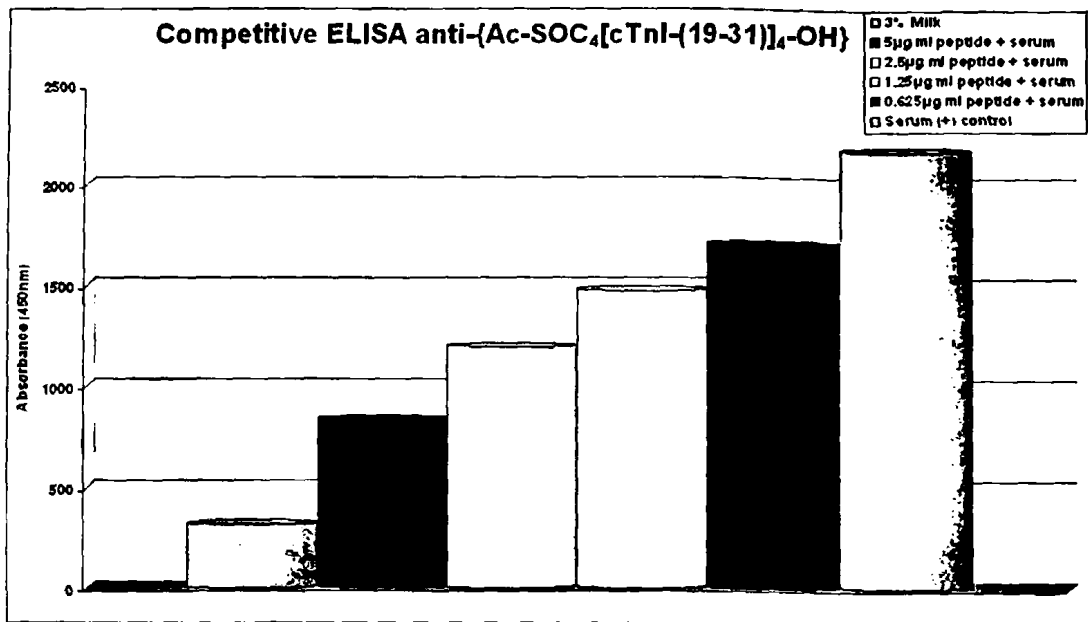
Σε συνέχεια των παραπάνω διεξήχθησαν ELISA ανταγωνιστικού τύπου, τόσο με το πεπτιδικό μακρομόριο **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH** όσο και με τον αντίστοιχο γραμμικό επίτοπο **cTnl-(19-31)-Cys**, έναντι των παραχθέντων **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}** αντισωμάτων. Από τα αποτελέσματα των εν λόγω δοκιμασιών, διαπιστώθηκε ένας ισχυρός ανταγωνισμός μεταξύ του προσροφημένου στο πλακίδιο ανοσογονικού συμπλέγματος και του αντιστοίχου διαλυμένου στο μείγμα προσθήκης (μακρομόριο ή γραμμικός επίτοπος), για το ειδικό αντίσωμα του **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}** αντιορού. Η παραπάνω πειραματική διαπίστωση αναδεικνύει την ισχυρά εξειδικευμένη και δοσοεξαρτώμενη συγγένεια τόσο του πεπτιδικού μακρομορίου όσο και του γραμμικού επιτόπου, για το ειδικό αντίσωμα του **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}** αντιορού (Σχήματα 7.8.2.3).

Για τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής και σκελετικής τροπονίνης από το ειδικό αντίσωμα του **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}** αντιορού, αναπτύχθηκαν ELISA δοκιμασίες σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 7.2.5.

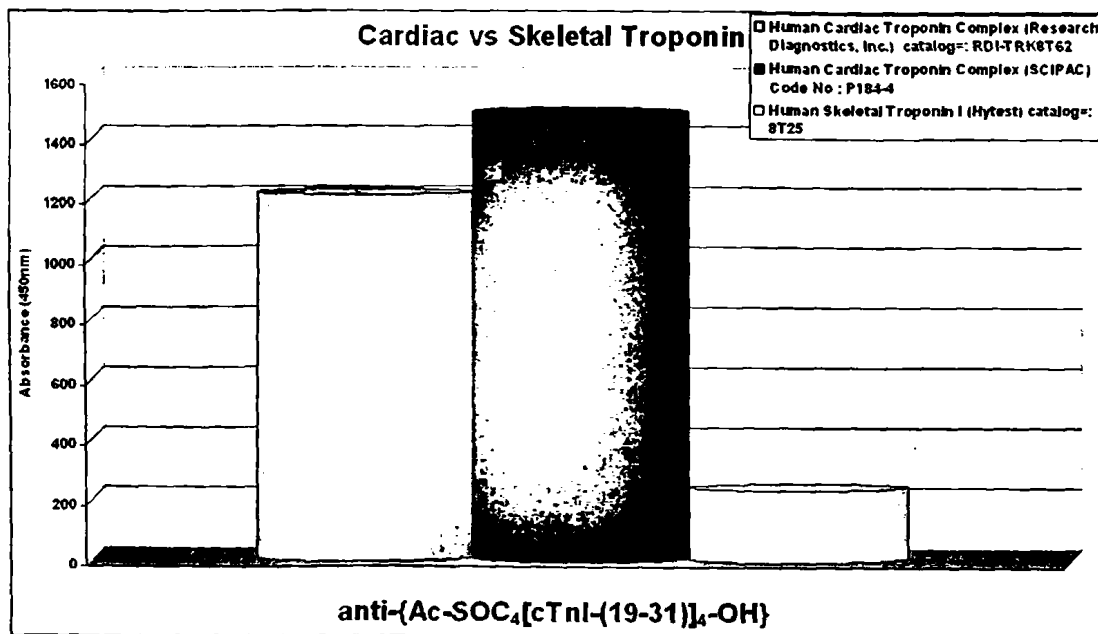
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί, ότι βασικό κριτήριο για την επιλογή του γραμμικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I, **cTnl (19-31) (RRSSNYRAYATE)**, υπήρξε τόσο η χαμηλή του ομολογία σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών, όσο και το γεγονός ότι ανήκει σε πιθανή αντιγονική περιοχή της πρωτεΐνης, έτσι όπως προέκυψε από τη χαρτογράφηση που προηγήθηκε (βλ. Κεφάλαιο 5, παράγραφος 5.1). Αυτό που θα αναμενόταν, ήταν μια ισχυρή και εξειδικευμένη αναγνώριση του συμπλόκου της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής



τροπονίνης (και όχι της σκελετικής) από το ειδικό αντίσωμα του **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}** αντιορού. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας έτσι όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 7.8.2.4 επιβεβαίωσαν τις αρχικές μας θεωρήσεις.



Σχήμα 7.8.2.3 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας ανταγωνιστικού τύπου μεταξύ του ανοσογονικού συμπλέγματος **Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH** και του αντίστοιχου ειδικού αντισώματος του αντιορού **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}**.



Σχήμα 7.8.2.4 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας, αναφορικά με την αναγνώριση της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής (μπλε και σκούρο καφέ) και σκελετικής τροπονίνης (ανοιχτό κίτρινο) από το ειδικό αντίσωμα του **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}** αντιορού.

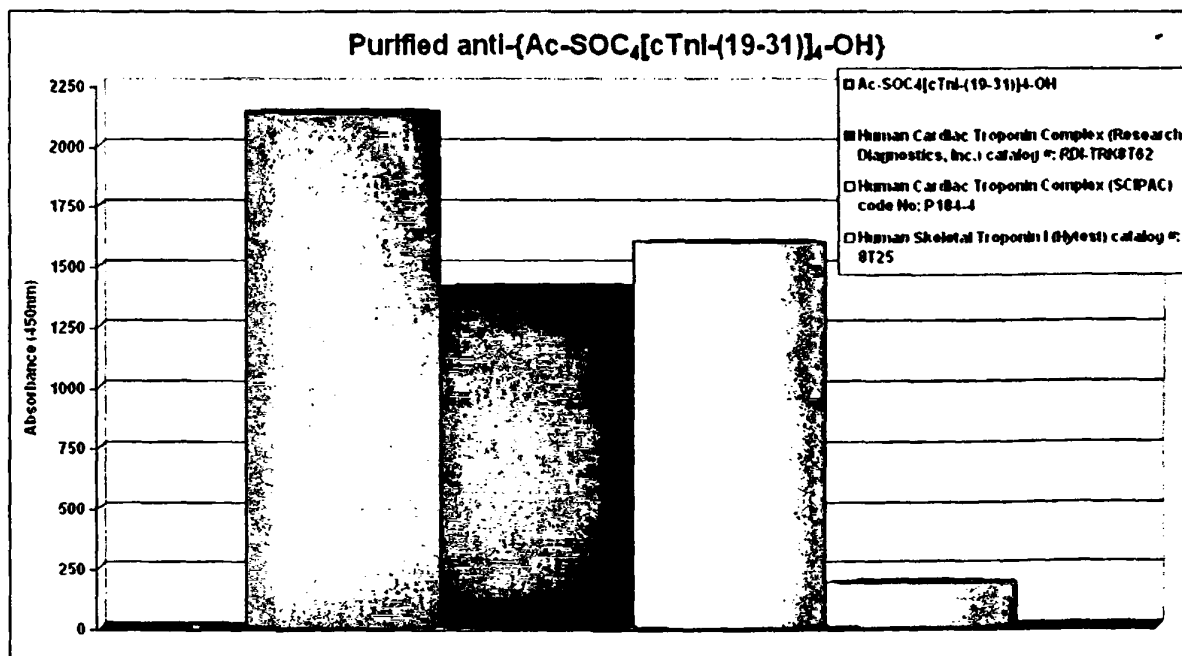


Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας περιελάμβανε την ανάπτυξη της μεθοδολογίας κλασμάτωσης για τον καθαρισμό και την απομόνωση των καθαρών IgG ανοσοσφαιρινών του παραχθέντος anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH} αντιορού.

7.8.3 Καθαρισμός anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH} αντισωμάτων

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο της παραγράφου 7.3, υποβάλλαμε σε καθαρισμό 500μl anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH} αντιορού. Ο καθαρισμός των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα, παραλαμβάνοντας τελικά τις επιθυμητές καθαρές ανοσοσφαιρίνες, διαλυμένες σε 125μl διαλύματος PBS.

Με την χρησιμοποίηση των καθαρών πλέον αντισωμάτων, διαπιστώθηκε μια σημαντική βελτίωση στα αποτελέσματα των προκαταρκτικών ELISA δοκιμασιών που διεξήχθησαν (Σχήμα 7.8.3.1). Τα καθαρά anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH} αντισώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, όπως και στην περίπτωση των αντίστοιχων anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH}, στην ανάπτυξη τεχνικών απομόνωσης καρδιακών τροπονινών από ορούς ασθενών με καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς και σε διαγνωστικές δοκιμασίες της τροπονίνης (ELISA τύπου sandwich), ως αντισώματα σύλληψης ή και ανίχνευσης (Σχήμα 7.4.3.1).



Σχήμα 7.8.3.1 Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της συγκεντρωτικής ELISA δοκιμασίας, αναφορικά με την αναγνώριση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH (μπλε), της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής (σκουρό καφέ και ανοιχτό κίτρινο) και σκελετικής τροπονίνης (γαλάζιο), από το ειδικό αντίσωμα του anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH} αντιορού, μετά τον προκαταρκτικό καθαρισμό του με τη μεθοδολογία της κλασμάτωσης πρωτεϊνικών μορίων.

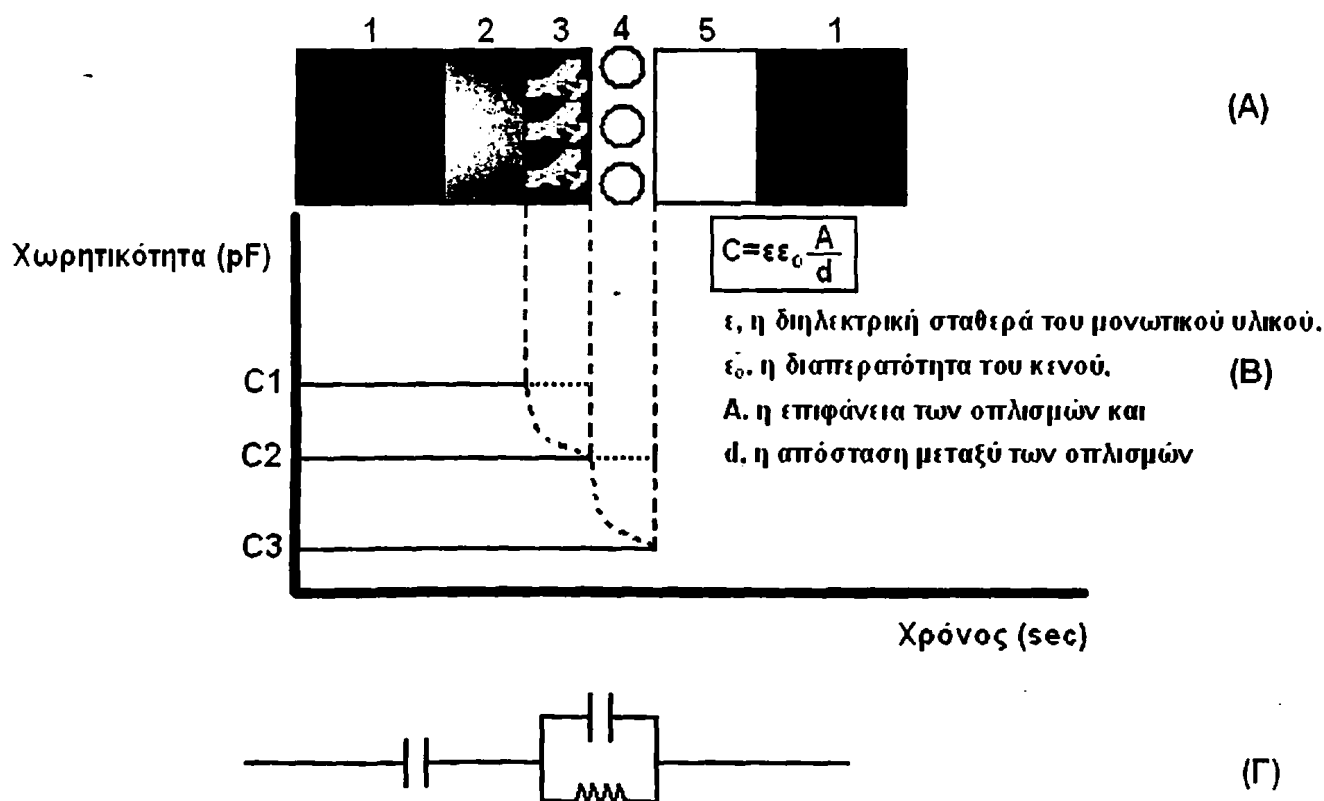


7.9 Ανάπτυξη βιοαισθητήρων εμπέδησης

Η κατασκευή μικρο-βιοαισθητήρων χαμηλού κόστους με δυνατότητες εφαρμογής σε επιτόπιες διαγνωστικές δοκιμασίες, αποτελεί μια πρόκληση και παράλληλα μια ελπιδοφόρα μελλοντική εξέλιξη στον τομέα της κλινικής διαγνωστικής.

Η παρούσα διατριβή παράλληλα με τον αντικειμενικό της σκοπό, συνεισέφερε σημαντικά στην διερεύνηση και ανάπτυξη μιας νέας καινοτόμου αναλυτικής τεχνικής (στηριζόμενη στους βιοαισθητήρες εμπέδησης), η οποία επιτρέπει την απ' ευθείας παρακολούθηση αλληλεπιδράσεων του τύπου αντιγόνου-αντισώματος. Πρόκειται για μια έρευνα η οποία διεξήχθη στα εργαστήρια της Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τη συνάδελφο κ. Κατερίνα Μαντζίλα υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Μάμαντου Προδρομίδα.

Συνοπτικά, η αρχή της μεθόδου της συγκεκριμένης τεχνικής στηρίζεται στην μέτρηση της χωρητικότητας ενός βιοχημικού πυκνωτή (Σχήμα 7.9.1), ο οποίος προκύπτει μετά από επικάλυψη του ηλεκτροδίου εργασίας με μονωτικό υλικό και ακολούθως με το χημικά δεσμευμένο ή προσροφημένο βιομόριο (αντίσωμα, πρωτεΐνη, πεπτιδικό μακρομόριο κ.ο.κ.).



Σχήμα 7.9.1 Σχηματικό μοντέλο απεικόνισης βιοχημικού πυκνωτή (Α). Όπου (1) Ηλεκτρόδιο εργασίας, (2) Διηλεκτρική στιβάδα, (3) Στιβάδα ακινητοποιημένου βιομορίου, (4) Αναλύτης, (5) Ηλεκτρολύτης, (B) μεταβολή του καταγραφόμενου σήματος και (Γ) ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα.

Η χωρητικότητα, όπως παρουσιάζεται και στο σχήμα 7.9.1, είναι ανάλογη του πάχους και της διηλεκτρικής σταθεράς της διηλεκτρικής στιβάδας (C1). Η ακινητοποίηση των βιομορίων στην επιφάνεια της τελευταίας, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πάχους της (αύξηση δηλαδή της αντίστασης του κυκλώματος), γεγονός που συνεπάγεται την μείωση της μετρούμενης χωρητικότητας (C2). Κατά την εμβάπτιση του παραπάνω συστήματος σε διάλυμα βιομορίου (π.χ. πρωτεΐνη) που εξειδικευμένα αναγνωρίζει τον ακινητοποιημένο (στο ηλεκτρόδιο αναφοράς) προσδέτη (π.χ. αντίσωμα), λαμβάνει χώρα εκ νέου αύξηση του πάχους της διηλεκτρικής στιβάδας, η οποία συνοδεύεται από την αντίστοιχη μείωση της μετρούμενης χωρητικότητας (C3) [8]. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή τόσο η ποιοτική όσο και η ποσοτική παρακολούθηση των παραπάνω αλληλεπιδράσεων, παρέχοντας παράλληλα τη δυνατότητα διεξαγωγής ταχύτατων αναλύσεων.

Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια χρυσού πάνω στα οποία ακινητοποιήθηκε ο τροποποιημένος με C-τελική κυστεΐνη γραμμικός επίτοπος της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C **cTnC-(89-98)-Cys**. Η εν λόγω ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε κατόπιν εμβάπτισης των ράβδων χρυσού σε διάλυμα πεπτιδίου (απομονωμένου από HPLC) 0,1mM σε 50mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH=5,0, στους 40 °C για 24 ώρες. Ακολούθησε η έμφραξη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης, έπειτα από κατεργασία του τροποποιημένου πλέον ηλεκτροδίου με διάλυμα 3mM 4-μερκαπτοφαινόλης για 3 ώρες. Για τις αντιδράσεις αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος χρησιμοποιήθηκε ως θετικό πρότυπο δείγμα ο ειδικός για το ακινητοποιημένο πεπτίδιο αντιορός **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}**, ενώ ως αρνητικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε ο αντιορός **anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(118-131)]₄-OH}**. Οι αραιώσεις των αντιορών διαμορφώθηκαν σε 1/2000, 1/4000, και 1/8000 σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris, pH=7,0. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας εμπέδησης EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy).

Τα πρώτα αποτελέσματα της ερευνητικής αυτής εργασίας κρίθηκαν εντυπωσιακά [9], γεγονός που δίνει άλλη διάσταση στον τομέα ανάπτυξης ανοσοδιαγνωστικών τεχνικών της τροπονίνης και μεθοδολογιών απομόνωσής της από ορούς ασθενών με καρδιαγγειακές παθήσεις.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν μακρομοριακά σύμπλεγματα διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, για την ανάπτυξη ευαίσθητων και εξειδικευμένων αντιδραστηρίων ανίχνευσης καρδιακών τροπονινών. Η προσέγγιση του θέματος περιελάμβανε την μελέτη και επιλογή κατάλληλων αλληλουχιών των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης, την ανάπτυξη των απαραίτητων ανοσογονικών συμπλεγμάτων για τις ανοσοποιήσεις πειραματόζωων που ακολούθησαν, την παραγωγή και καθαρισμό των αντισωμάτων και τέλος τον έλεγχο της ικανότητας αναγνώρισής τους από το φυσικό καρδιακό σύμπλοκο της τροπονίνης. Πιο συγκεκριμένα:

Σχεδιασμός και επιλογή αλληλουχιών των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης

Οι βασικές προϋποθέσεις που εξ' αρχής θέσαμε για την επιλογή και σύνθεση των κατάλληλων αλληλουχιών της τροπονίνης ήταν οι αντιγονικές τους ιδιότητες, η ελάχιστη δυνατή ομολογία τους σε σύγκριση με το σύνολο των σκελετικών ισομορφών της τροπονίνης, καθώς και η μη εμπλοκή τους σε διαφόρων τύπων αλληλεπιδράσεις. Η συστηματική αντιγονική χαρτογράφηση των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης, ανέδειξε μια σειρά από πιθανές αντιγονικές αλληλουχίες, όπως παρουσιάζονται στα σχήματα 5.1.1, 5.1.2 και 5.1.10 του 5^{ου} κεφαλαίου. Αντίστοιχα, οι μελέτες ομολογίας που ακολούθησαν, ανέδειξαν με τη σειρά τους πέντε αμινοξικές αλληλουχίες των καρδιακών ισομορφών, οι οποίες παρουσίασαν την ελάχιστη δυνατή ομολογία σε σύγκριση με το σύνολο των αντίστοιχων σκελετικών ισομορφών.

| Skeletal Troponin Isoforms | ssTnI (slow skeletal muscle troponin I) | fsTnI (fast skeletal muscle troponin I) | ssTnT (slow skeletal muscle troponin T) | fsTnT (fast skeletal muscle troponin T) | sTnC (skeletal muscle troponin C) |
|---|--|--|--|--|--------------------------------------|
| Cardiac Troponin Sequences | | | | | |
| cTnI (19-31) RRRSSNYRAYATE | 30% | 33% | 33% | 23% | 30% |
| cTnI (72-85) GRALSTRCPLELA | 28% | 35% | 42% | 35% | 35% |
| cTnI (118-131) TKNITEIADLTQKI | 42% | 35% | 28% | 28% | 21% |
| cTnT (20-33) VEEEEDWREDEDEQ | 28% | 35% | 35% | 50% | 35% |
| cTnT (62-75) KEAEDGPMEEKPK | 28% | 21% | 28% | 28% | 21% |

Από το σύνολο των περιοχών που προσδιορίστηκαν βάσει των παραπάνω μελετών, επιλέχθηκαν για την ανάπτυξη ανοσογονικών συμπλεγμάτων οι περιοχές **cTnI (19-31)** (RRRSSNYRAYATE) και **cTnI (118-131)** (TKNITEIADLTQKI) της καρδιακής ισομορφής της



τροπονίνης I, ενώ από την αντίστοιχη T επιλέχθηκε η περιοχή ³cTnT (20-33) (VEEEEDWREDEDEQ). Η αλληλουχία των 14 αμινοξέων περιορίστηκε στα 10 αμινοξικά κατάλοιπα cTnT (21-30) (EEEEEDWREDE), αποκλειστικά για συνθετικούς λόγους. Κριτήριο για την επιλογή της αμινοξικής αλληλουχίας cTnI (185-196) (REVGDWWRKNIDA) αποτέλεσαν οι μελέτες της S. Eriksson, η οποία ανέδειξε την αναγκαιότητα χρήσης κατάλληλων επιτόπων για την παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία να παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια έναντι τμημάτων της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I, πέραν του κεντρικού (αμινοξική αλληλουχία 30-110). Παράλληλα, η επιλογή της αμινοξικής αλληλουχίας cTnC (89-98) (SKGKSEEELS) στηρίχθηκε αποκλειστικά στα αποτελέσματα της αντιγονικής χαρτογράφησης της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C, όπου και παρουσιάστηκε ως πιθανή ισχυρή ανοσογονική.

Σύνθεση ανοσογονικών συμπλεγμάτων

Η σύνθεση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων που ακολούθησε, πραγματοποιήθηκε με ομοιοπολική πρόσδεση των επιλεγμένων περιοχών της τροπονίνης στον τετραμερή ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC₄, είτε με τις κλασσικές βήμα προς βήμα συνθετικές μεθοδολογίες στερεάς φάσης, είτε μέσω χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων πρόσδεσης επιτόπων. Τα πεπτιδικά μακρομόρια που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της ερευνητικής εργασίας παρατίθενται στη συνέχεια:

| | Πεπτιδικά ανάλογα (κωδικές ονομασίες) | Συνθετική μεθοδολογία | Μοριακά βάρη (Da) |
|---|---|--|----------------------|
| 1 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(118-131)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Boc/Bzl συνθετική μεθοδολογία | 7420,7 |
| 2 | Ac-SOC ₄ [cTnT-(21-30)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία | 6530,5 |
| 3 | Ac-SOC ₄ [cTnC-(89-98)-Cys] ₄ -OH | Χημειοεκλεκτική πρόσδεση επιτόπων με δημιουργία θειοαιθερικών δεσμών | 6084,3 |
| 4 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(185-196)-Cys] ₄ -OH | Χημειοεκλεκτική πρόσδεση επιτόπων με δημιουργία θειοαιθερικών δεσμών | 7544,4 |
| 5 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Boc/Bzl συνθετική μεθοδολογία | 7588,4 |
| 6 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH | Βήμα προς βήμα Fmoc/tBu συνθετική μεθοδολογία | 7588,4 |
| 7 | Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)-Cys] ₄ -OH | Χημειοεκλεκτική πρόσδεση επιτόπων με δημιουργία θειοαιθερικών δεσμών | 8229,0 |



Τα μακρομόρια **1** και **5**, έτσι, συντέθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Boc/Bzl βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας, σε συνολικές αποδόσεις 10,4% και 4,5% αντίστοιχα. Η σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος **2**, έγινε σύμφωνα με την Fmoc/tBu βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία στερεής φάσης, σε απόδοση 4,8%. Η σύνθεση του μακρομορίου **3** πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού, μεταξύ του N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄ Ac-SOC₄[BrCH₂CO]₄-OH και του επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C 89-98, ο οποίος έφερε C-τελική κυστεΐνη cTnC (89-98)-Cys (SKGKSEELSC), σε συνολική απόδοση 32,2%. Με ανάλογο τρόπο πραγματοποιήθηκε και η σύνθεση του μακρομορίου **4**, σε απόδοση 36,5%. Η σύνθεση του μακρομορίου **6**, έγινε σύμφωνα με την Fmoc/tBu βήμα προς βήμα στρατηγική σύνθεσης σε στερεή φάση, σε απόδοση 9,9%. Τέλος, η σύνθεση του μακρομοριακού συμπλέγματος **7**, έγινε με ομοιοπολική πρόσδεση του τροποποιημένου με C-τελική κυστεΐνη επιτόπου cTnI-(19-31)-Cys (RRRSSNYRAYATEC), στον N^ε-βρώμο-ακετυλιωμένο φορέα SOC₄ και με συνολική απόδοση 22,7%.

Η συσχέτιση των μεθοδολογιών ανάπτυξης μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον εν λόγω συνθετικό φορέα, ανέδειξε ως πλέον αποτελεσματική και λειτουργική συνθετική στρατηγική, τη μεθοδολογία χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης επιτόπων.

Ανοσοποιήσεις πειραματόζων. Βιολογικά πειράματα

Η ανοσολογική απόκριση των πειραματόζων που ανοσοποιήθηκαν με τα μακρομοριακά συμπλέγματα **1** και **5** ήταν ιδιαίτερα ισχυρή, με πολύ υψηλούς τίτλους αντισωμάτων. Τα ανοσοποιημένα με τα πεπτιδικά μακρομόρια **3** και **4** πειραματόζωα, έδωσαν αρκετά καλές ανοσολογικές απαντήσεις με υπολογίσιμους τίτλους αντισωμάτων, χαμηλότερους όμως σε σχέση με αυτές των συμπλεγμάτων **1** και **5**. Αναδεικνύεται για μια ακόμη το γεγονός ότι, ο τρόπος με τον οποίο λαμβάνει χώρα η ομοιοπολική πρόσδεση των επιτόπων στα εκάστοτε συνθετικά και πρωτεϊνικά υποστρώματα (φορείς), επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα των διαδικασιών ανοσοποίησης.

Σε συνέχεια των βιολογικών πειραμάτων μελετήθηκε η ύπαρξη διασταυρωτών αντιδράσεων μεταξύ των παραχθέντων αντισωμάτων και του συνόλου των ανοσογονικών συμπλεγμάτων που συντέθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης ανέδειξαν την εξειδικευμένη συγγένεια του συνόλου των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι των αντίστοιχων ανοσογονικών συμπλεγμάτων από τα οποία και προήλθαν. Δεν παρατηρήθηκε καμιά σημαντική (μη ειδική) αλληλεπίδραση των παραχθέντων αντισωμάτων με διαφορετικού τύπου πεπτιδικά ανοσογόνα.

5



Τα παραπάνω πιστοποιούν εκ νέου τα χαρακτηριστικά του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC και πιο συγκεκριμένα την ικανότητα του να επάγει υψηλές και εξειδικευμένες ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι των γραμμικών επιτόπων που φέρει, ανεξάρτητα από τις αντιγονικές τους ιδιότητες.

Οι βιοχημικές δοκιμασίες ELISA ανταγωνιστικού τύπου που διεξήχθησαν, ανέδειξαν την ισχυρά δοσοεξαρτώμενη εξειδίκευση του συνόλου των πεπτιδικών μακρομορίων της παρούσας διφτρίβης, για τα ειδικά αντισώματα των αντίστοιχων παραχθέντων αντιορών τους. Η μοναδική παρατυπία που παρατηρήθηκε, ήταν στην περίπτωση των **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(185-196)-Cys]₄-OH}** αντισωμάτων, κατά την οποία υπήρξε μεν πολύ ισχυρή, όμως στις συνθήκες της δοκιμασίας, ελάχιστα δοσοεξαρτώμενη εξειδίκευση μεταξύ των παραχθέντων αντισωμάτων για το αντίστοιχο πεπτιδικό ανοσογονικό. Το εν λόγω φαινόμενο θα μπορούσε να αποδοθεί στην μικρή συγκέντρωση του ειδικού για το ανοσογόνο αντισώματος, στον αντιρό του ανοσοποιημένου κουνελιού.

Σύμφωνα με τα πειράματα αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής και σκελετικής τροπονίνης από τα ειδικά αντισώματα των παραχθέντων αντιορών, φαίνεται ότι τα **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH}** και **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}** αντισώματα παρουσιάζουν μια εξειδικευμένη συγγένεια για το σύμπλοκο της ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης, όπως άλλωστε αναμενόταν. Αντίστοιχα, τα **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(185-196)-Cys]₄-OH}** και **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}** αντισώματα, φαίνεται να αναγνωρίζουν εξίσου ισχυρά τόσο την καρδιακή όσο και την αντίστοιχη σκελετική τροπονίνη. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν τους αρχικούς μας σχεδιασμούς, δεδομένου ότι στην μεν πρώτη περίπτωση ο επίτοπος **cTnl-(185-196)-Cys** παρουσιάζει υψηλή ομολογία έναντι των σκελετικών τροπονινών (>70%), ενώ στη δεύτερη η αλληλουχία **cTnC-(89-98)-Cys** απαντάται ταυτόχρονα και στους δύο τύπους πρωτεϊνικών μορίων.

Ο καθαρισμός των **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(118-131)]₄-OH}** και **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH}** αντισωμάτων (μεθοδολογία κλασμάτωσης πρωτεϊνικών μορίων με τη χρήση αλάτων) θεωρήθηκε επιβεβλημένος δεδομένου ότι, ικανοποιώντας τις προϋποθέσεις που αρχικά θέσαμε, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τόσο στην ανάπτυξη μιας βελτιωμένης τεχνικής απομόνωσης καρδιακών τροπονινών από ορούς ασθενών με καρδιαγγειακές παθήσεις, όσο και σε ανοσοδιαγνωστικές δοκιμασίες ELISA τύπου sandwich, ως αντισώματα σύλληψης ή και ανίχνευσης. Ο καθαρισμός διεξήχθη χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα, ενώ οι προκαταρκτικές δοκιμασίες ELISA που ακολούθησαν, πιστοποίησαν τα χαρακτηριστικά των αντισωμάτων παρουσιάζοντας παράλληλα σημαντική βελτίωση των αποτελεσμάτων. Τα **anti-{Ac-SOC₄[cTnC-(89-98)-Cys]₄-OH}** και τα **anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(185-196)-Cys]₄-OH}** αντισώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη διαγνωστικής ELISA δοκιμασίας, ως αντισώματα ανίχνευσης. Παράλληλα η περαιτέρω χρησιμοποίηση του συνόλου των αντισωμάτων, προϋποθέτει εκτενέστερο καθαρισμό με τη μεθοδολογία της χρωματογραφίας συγγένειας.



Τέλος, αναπτύχθηκε μια καινοτόμα αναλυτική τεχνική (στηριζόμενη στους βιοαισθητήρες εμπέδησης), η οποία επιτρέπει την απ' ευθείας παρακολούθηση αλληλεπιδράσεων του τύπου αντιγόνου-αντισώματος, δίνοντας νέες προοπτικές στον τομέα της κλινικής διαγνωστικής.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας έγινε μια προσπάθεια ανάπτυξης εξειδικευμένων αντιδραστηρίων ανίχνευσης των καρδιακών ισομορφών του συμπλόκου της ανθρώπινης τροπονίνης. Για το σκοπό αυτό:

Επιλέχθηκαν κατάλληλες αμινοξικές αλληλουχίες των καρδιακών ισομορφών της ανθρώπινης τροπονίνης. Η λογική που χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των εν λόγω αλληλουχιών περιελάμβανε τον συνυπολογισμό τριών βασικών κριτηρίων: τις αντιγονικές ιδιότητες των επιτόπων, την ελάχιστη ομολογία τους έναντι των σκελετικών ισομορφών και την μη εμπλοκή τους σε αλληλεπιδράσεις με παρεμβατικούς παράγοντες των ορών, υγιών και ασθενικών πληθυσμών.

Χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές σύνθεσης, συντέθηκαν επτά συνολικά πεπτιδικά ανάλογα διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από ~6kDa μέχρι ~8,5kDa. Οι συνολικές αποδόσεις σύνθεσης των μακρομορίων κυμάνθηκαν στην περιοχή από 4,5% έως και 36,5%.

Μελετήθηκαν και συσχετίστηκαν οι συνθετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν, για την σύνθεση των μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής της παρούσας διατριβής. Το μικρό ποσοστό παραπροϊόντων, η ταχύτητα, η αποτελεσματικότητα και η πρακτική διευκόλυνση κατά την διεξαγωγή των αντιδράσεων, ανέδειξαν την συνθετική στρατηγική των χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού, ως την πλέον λειτουργική μεθοδολογία.

Τα συνθετικά μακρομόρια χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία ως ανοσογόνα για την παρασκευή εξειδικευμένων αντισωμάτων έναντι της ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης. Η συνδυαστική χρήση των αντισωμάτων αυτών προσφέρει τη δυνατότητα ανάπτυξης εναλλακτικών ELISA τεχνικών, για τη βελτίωση των δοκιμασιών ανίχνευσης των ανθρώπινων καρδιακών τροπονινών. Τα αντισώματα αυτά ύστερα από κατάλληλο καθαρισμό, προσφέρονται επίσης για την απομόνωση αλλά και τον καθαρισμό καρδιακών τροπονινών από ορούς ασθενικών πληθυσμών.

Τέλος, αναπτύχθηκε μια νέα αναλυτική τεχνική βασιζόμενη στους βιοαισθητήρες εμπέδησης, η οποία επιτρέπει την απ' ευθείας ανίχνευση της αλληλεπίδρασης συζευγμένου σε ηλεκτρόδια χρυσού γραμμικού ανοσογονικού επιτόπου της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C, έναντι των



ειδικών για τον επίτοπο αντισωμάτων αντιορού. Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά στην ανάπτυξη νέων ανοσοδιαγνωστικών τεχνικών.

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...

Επισημαίνεται ότι οι αντισωματοειδή...



SUMMARY

The text on the left side of the page is extremely faint and mostly illegible. It appears to be a list of items or a detailed report, possibly related to the 'SUMMARY' section. Some words like 'number', 'weight', and 'percentage' are barely discernible. The text is organized into several paragraphs or sections, but the specific content cannot be accurately transcribed.



In the past 15 years, there has been an explosion of new information regarding the presentation, outcomes, and management of patients presenting with suspected acute myocardial infarction. Although today, one of the main problems of the clinic institutions which still remains, is the valid, effective, and "in time" valuation of the patients, who are getting in the emergency departments with chest pain and suspected acute coronary syndromes. Thereby, the scientific community has lately focused their main concern on the development and application of new improved diagnostic techniques, aiming at the optimal and "in time" diagnosis, the significant decrease of the diagnostic time, and finally the better nursing management and treatment of the patients who are dealing with these very serious and risky pathologic conditions.

The diagnosis of acute myocardial infarction depends in general upon the patient's clinical history, interpretation of the electrocardiogram (EGC), and the measurement of serum levels of cardiac enzymes, which are commonly used to reduce any diagnostic uncertainty in the confrontation of myocardial infarction. Serologic biochemical markers such as Creatine Kinase MB Isoenzyme (CK-MB), myoglobin, Glycogen Phosphorylase Isoenzyme BB (GPBB), and C-reactive Protein (CRP), are routinely used to assist cardiologists and other physicians for the diagnosis and management of patients with acute coronary syndromes. In the last decades, the identification and development of assays for the determination of cardiac troponins, has been the most important innovation in the field of cardiovascular laboratory diagnostics.

The troponins are proteins integral to the function of striated muscles. They exist as a complex with actin and tropomyosin on the thin filament of the contractile apparatus, playing an important role in regulating skeletal and cardiac muscle contraction. In particular, the troponin complex consists of three protein subunits. Troponin C (18-kDa) binds calcium and regulates the activation of thin filaments during contraction. Troponin T (37-kDa) binds the troponin complex to tropomyosin and finally, troponin I (24-kDa) as an inhibitory subunit, prevents contraction in the absence of calcium and troponin C. Troponins have been found to exist as isoforms specific to the cardiac and skeletal muscle cells, respectively. Three isoforms of troponin I have been identified: one of each in fast and slow skeletal muscles, and one isoform in cardiac muscles. Troponin T is also found in skeletal (fast and slow) and cardiac isoforms, but in skeletal muscle exists as many slightly different subforms. Troponin C exists in 2 isoforms, a fast and a slow one. The fast isoform is found only in skeletal muscle, but the slow isoform is found in both skeletal and cardiac muscle tissues. Because of this lack of cardiac specificity, it has been the least studied troponin.

One of the main characteristics of troponins is the high homology between the skeletal and cardiac muscle isoforms, which is estimated to be ~70% for troponin I and T isoforms, and more than 85% for troponin C isoforms (the slow isoform is completely identical in both kind of cells).

Cardiac troponins are released in the peripheral blood during irreversible cardiac muscle damage in a time-specific manner. They are detectable in blood 4-6 hours after the onset of the



cardiovascular incident, peak at 16–18 hours, and remain detectable for at least 7 days. Cardiac troponin I is released in complexes of troponin I-C-T and troponin I-C, while cardiac troponin T is released in a troponin I-C-T form, as well as free troponin T. Analysis of cardiac troponin I and T have been shown to be effective in detecting minor myocardial injury in patients with acute coronary syndromes. Determination of minor myocardial injury is absolutely significant, as these patients have a higher short-term morbidity and mortality than other unstable angina patients with normal concentrations for these markers.

The development of biological assays for the detection of cardiac troponins is based on the application of specific antibodies against the whole troponin complex or some of its regions. The high homology between cardiac and skeletal muscle troponins, establishes the problem of cross-reactions, reflecting negatively on the specificity of the diagnostic method. This fact combined with the necessity of a signifying improvement of the method's sensitivity, enforces the search of more sensitive and specific reagents.

Aiming to contribute in the field of developing highly specific and sensitive reagents for the detection and isolation of troponin complex we synthesized five epitope-carrier conjugates. The selection of the appropriate sequences of cardiac troponin isoform, was mainly made on the basis of their predicted immunogenicity, minimum homology compared to the skeletal isoforms and the absence of involvement with interfering factors in the sera of healthy and patient population.

The sequential oligopeptide carrier SOC₄, formed by the repetitive motif -Lys-Aib-Gly-, was used for conjugation of multiple copies of the selected peptide sequences leading to protein-like molecules of branched architecture. Three synthetic strategies were used for the synthesis of the high molecular weight (~6-8,5kDa) macromolecules of this work. The selected epitopes were conjugated on the sequential oligopeptide carrier (SOC), by using: i) the step-by-step Fmoc/tBu solid phase peptide synthetic methodology, ii) the corresponding Boc/Bzl methodology and iii) chemoselective ligation methods through thioether bonds formation. From the examination and comparison of the synthetic methodologies used, we concluded that the chemoselective ligation methodology is the most effective technique for the synthesis of high molecular weight immunological complexes of branched architecture.

The resulted conjugates were used as immunogens for releasing anti-troponin specific antibodies. The performed ELISA experiments confirmed our initial considerations for producing anti-troponin antibodies with high affinity and specificity against the native protein (human cardiac troponin complex). The produced antibodies could be used for the development of improved troponin immunodiagnostic assays.

Finally, this work also contributed to the development of a label-free faradaic impedimetric immunosensor for the direct probing of the interaction between cysteine-modified synthetic peptides



and their specific antibodies. The prospective contribution of such label-free affinity-based probing concepts in the field of development of new immunodiagnostic techniques, is of main importance.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11°

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



14.1 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 2^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] Σιδεράς, Δ.Α. *Πρωτοβάθμια καρδιολογία*, Επιστημονικές εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος", (1991)
- [2] Guyton, A.G. *Ιατρική Φυσιολογία*, Τόμος Α', Όγδοη έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος", (1992)
- [3] **New CDC Report on U.S. Mortality Patterns**, Causes of death in USA. *NVSR*, (2001) 49, 114
- [4] Libby, P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, (1995), 91, 2844
- [5] Glass, C.K., Witztum, J.L. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*, (2001), 104, 503
- [6] Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hulten, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., Boren, J., Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, (2002), 417,750
- [7] Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, (2002), 420, 868
- [8] Scott, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, (2004), 14, 1
- [9] van der Wal, A.C., Becker, A.E., van der Loos, C.M., Das, P.K. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*, (1994), 89, 36
- [10] Farb, A., Burke, A.P., Tang, A.L. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core: a frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*, (1996), 93, 1354
- [11] The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined – A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur. Heart. J.*, (2000), 21, 1502
- [12] Guideline for the management of patients with acute coronary syndromes without persistent ECG ST segment elevation. *Heart*, (2001), 85, 13
- [13] McClellan, J.R. Unstable angina: prognosis, non-invasive assessment and strategies for management. *Clin. Cardiol.*, (1994), 17, 229
- [14] Braunwald, E. Unstable angina: an etiologic approach to management. *Circulation*, (1998), 98, 2219
- [15] American College of Cardiology (ACC) and American Heart Association (AHA) (2000). Guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: Executive summary and recommendations. ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients with Unstable Angina). *Circulation*, 102, 1193



- [16] ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients with Unstable Angina). *Journal of the American College of Cardiology*, (2000), 36, 3
- [17] Ryan, T.J., Antman, E.M., Brooks, N.H. The American College of Cardiology/American Heart Association guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, (1999), 100, 1016
- [18] Yusuf, S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, (2004) 364, 937
- [19] Rosengren, A., Hawken, S., Ounpuu, S., Sliwa, K., Zubaid, M., Almahmeed, W.A., Blackett, K.N., Sitthi-Amorn, C., Sato, H., Yusuf, S. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, (2004) 364, 953
- [20] Solomon, S.D., Zelenkofske, S., McMurray, J.J.V., Finn, P.V., Velazquez, E., Ertl, G., Harsanyi, A., Rouleau, J.L., Maggioni, A., Kober, L., White, H., Van de Werf, F., Pieper, K., Califf, R.M., Pfeffer, M.A. Sudden Death in Patients with Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction, Heart Failure, or Both. *NEJM*, (2005), 353, 744
- [21] Buxton, A.E. Sudden Death after Myocardial Infarction. Who Needs Prophylaxis, and When? *NEJM*, (2005), 352, 2638
- [22] Spencer, F.A., Meyer, T.E., Goldberg, R.J., Twenty year trends (1975-1995) in the incidence, in-hospital and long-term death rates associated with heart failure complicating acute myocardial infarction: a community-wide perspective. *JACC*, (1999), 34, 1378
- [23] Hellermann, J.P., Goraya, T.Y., Jacobsen, S.J., Incidence of heart failure after myocardial infarction: is it changing over time? *Am. J. Epidemiol.*, (2003), 157, 1101
- [24] James, T.N. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation*, (1994), 90, 556
- [25] De Mello, W.C. Cardiac arrhythmias: the possible role of the renin-angiotensin system. *J. Mol. Med.*, (2001), 79, 103
- [26] Aretz, H.T., Billingham, M.E., Edwards, W.D., Factor, S.M., Fallon, J.T., Fenoglio, J.J. Jr, Olsen, E.G., Schoen, F.J. Myocarditis: a histopathologic definition and classification. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.*, (1987), 1, 3



- [27] Sarda, L., Colin, P., Boccara, F., Daou, D., Lebtahi, R., Faraggi, M., Nguyen, C., Cohen, A., Slama, M.S., Steg, P.G., Le Guludec, D. Myocarditis in patients with clinical presentation of myocardial infarction and normal coronary angiograms. *JACC*, (2001), 37, 786
- [28] Oakley, C.M. General Cardiology: Myocarditis, pericarditis and other pericardial diseases. *Heart*, (2000), 84, 449
- [29] Soler-Soler, J., Galve E. Valve disease: Worldwide perspective of valve disease. *Heart*, (2000), 83, 721
- [30] Richter, G.W., Kellner, A. Hypertrophy of the human heart at the level of fine structure: an analysis and two postulates. *J.Cell.Biol.*, (1963), 18, 195
- [31] Kannel, W.B. Hazards, risks, and threats of heart disease from the early stages to symptomatic coronary heart disease and cardiac failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, (1997), 11, 199
- [32] Franco, O.H. Associations of diabetes mellitus with total life expectancy and life expectancy with and without cardiovascular disease. *Arch. Intern. Med.*, (2007), 167, 1145
- [33] Chuang, S., Chou, P., Hsu, P., Cheng, H., Tsai, S., Lin, I., Chen, C. Presence and progression of abdominal obesity are predictors of future high blood pressure and hypertension. *American Journal of Hypertension*, (2006), 19, 788
- [34] Lane, R.D., Laukes, C., Marcus, F.I., Chesney, M.A., Sechrest, L., Gear, K., Fort, C.L., Priori, S.G., Schwartz, P.J., Steptoe, A. Psychological stress preceding idiopathic ventricular fibrillation. *Psychosom. Med.*, (2005), 67, 359
- [35] Beulens, J.W.J., Rimm, E.B., Ascherio, A., Spiegelman, D., Hendriks, H.F.J., Mukamal, K.J. Alcohol consumption and risk for coronary heart disease among men with hypertension. *Annals of Internal Medicine*, (2006), 146, 10
- [36] Madjid, M., Miller, C.C., Zarubaev, V.V., Marinich, I.G., Kiselev, O.I., Lobzin, Y.V., Filippov, A.E., Casscells, S.W. Influenza epidemics and acute respiratory disease activity are associated with a surge in autopsy-confirmed coronary heart disease death: results from 8 years of autopsies in 34 892 subjects. *Eur. Heart J.*, (2007), 28, 1205
- [37] Ector, J., Ganame, J., van der Merwe, N., Adriaenssens, B., Pison, L., Willems, R., Gewillig, M., Heidbüche, H. Reduced right ventricular ejection fraction in endurance athletes presenting with ventricular arrhythmias: a quantitative angiographic assessment. *Eur. Heart J.*, (2007), 28, 345
- [38] Rosenlund, M. Environmental factors in cardiovascular disease. Doctoral Thesis. (2005), *Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden)*
- [39] Elwood, P.C., Pickering, J.E., Hughes, J., Fehily, A.M., Ness, A.R. Milk drinking, ischaemic heart disease and ischaemic stroke II. Evidence from cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, (2004), 58, 718



- [40] Naghavi, M., Falk, E., Hecht, H.S., Jamieson, M.J., Kaul, S., Berman, D., Fayad, Z., Budoff, M.J., Rumberger, J., Naqvi, T.Z., Shaw, L.J., Faergeman, O., Cohn, J., Bahr, R., Koenig, W., Demirovic, J., Arking, D., Herrera, V.L., Badimon, J., Goldstein, J.A., Rudy, Y., Airaksinen, J., Schwartz, R.S., Riley, W.A., Mendes, R.A., Douglas, P., Shah, P.K. From vulnerable plaque to vulnerable patient--Part III: Executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) Task Force report. *Am. J. Cardiol.*, (2006), 98, 1
- [41] Bhayana, V., Henderson, R. Biochemical markers of myocardial damage. *Clinical Biochemistry*, (1995), 28, 1
- [42] Christenson, R.H., Azzazy, H.M. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin. Chem.* (1998), 44, 1855
- [43] Collinson, P.O. Cardiac markers into the new millennium. *Ann. Clin. Biochem.*, (2000), 37, 109
- [44] Panteghini, M. Recent approaches to the standardization of cardiac markers. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, (2001), 61, 95
- [45] Collinson, P.O., Chamberlain, L. Cardiac markers in the diagnosis of acute coronary syndromes. *Curr. Cardiol. Rep.*, (2001), 3, 280
- [46] Jaffe, A.S., Katus, H. Acute coronary syndrome biomarkers; the need for more adequate reporting. *Circulation*, (2004), 110, 104
- [47] Jaffe, A.S., Babuin, L., Apple, F.S. Biomarkers in acute cardiac disease. The present and the future. *JACC*, (2006), 48, 1
- [48] Sato, Y., Miyamoto, T., Taniguchi, R., Nishio, Y., Kita, T., Fujiwara, H., Takatsu, Y. Current understanding of biochemical markers in heart failure. *Med. Sci. Monit.*, (2006), 12, 252
- [49] Gibler, W.B., Gibler, C.D., Weinshenker, E., Abbottsmith, C., Hedges, J.R., Barsan, W.G., Sperling, M., Chen, I.W., Embry, S., Kereiakes, D. Myoglobin as an early indicator of acute myocardial infarction. *Ann. Emerg. Med.*, (1987), 16, 851
- [50] Miyata, M., Abe, S., Arima, S., Nomoto, K., Katawaki, M., Yeno, M. Rapid diagnosis of coronary reperfusion by measurement of myoglobin level every 15 min in acute myocardial infarction. *JACC*, (1994), 5, 1009
- [51] Tucker, J.F., Collins, R.A., Anderson, A.J., Hess, M., Farley, I.M., Hagemann, D.A., Harkins, H.J., Zwicke, D. Value of serial myoglobin levels in early diagnosis of patients admitted for acute myocardial infarction. *Ann. Emerg. Med.*, (1994), 24, 704
- [52] Montague, C., Kircher, T. Myoglobin in early evaluation of acute chest pain. *Am. J. Clin. Pathol.*, (1995), 104, 472



- [53] Krause, E.G., Rabitzsch, G., Noll, F., Mair, J., Puschendorf, B. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of myocardial ischaemic injury and infarction. *Mol. Cell. Biochem.*, (1996), 160, 289
- [54] Mair, J. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB to diagnose ischaemic myocardial damage. *Clin. Chim. Acta*, (1998), 272, 79
- [55] Ferreiros, E.R, Boissonet, C.P, Pizarro, R. Independent prognostic value of elevated C-reactive protein in unstable angina. *Circulation*, (1999), 100, 1958
- [56] Zebrack, J.S., Anderson, J.L., Maycock, C.A., Horne, B.D., Bair, T.L., Muhlstein, J.B. Usefulness of high-sensitivity C-reactive protein in predicting long-term risk of death or acute myocardial infarction in patients with unstable or stable angina pectoris or acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, (2002), 89, 145
- [57] Kennon, S., Timmis, A.D., Whitbourn, R., Knight, C. C-reactive protein for risk stratification in acute coronary syndromes? Verdict: unproven. *Heart*, (2003) 89, 1288
- [58] De Servi, S., Mariani, M., Mariani, G., Mazzone, A. C-Reactive Protein Increase in Unstable Coronary Disease Cause or Effect? *JACC*, (2005), 46, 8
- [59] Brunetti, N.D., Troccoli, R., Correale, M., Pellegrino, P.L., Biase, M. C-reactive protein in patients with acute coronary syndrome: Correlation with diagnosis, myocardial damage, ejection fraction and angiographic findings. *International Journal of Cardiology*, (2006), 109, 248
- [60] Apple, F.S., Rogers, M.A., Cusal, D.C., Sherman, W.M., Ivy, J.L. Creatine kinase MB isoenzyme adaptations in stressed human skeletal muscle of marathon runners. *J. Appl. Physiol.*, (1985), 59, 149
- [61] Siegel, A.J., Silverman, L.M., Holman, B.L. Elevated creatine kinase MB isoenzyme levels in marathon runners. Normal myocardial scintigrams suggest noncardiac source. *JAMA*, (1981), 246, 18
- [62] Alexander, J.H., Sparapani, R.A., Mahaffey, K.W. Association between minor elevations of creatine kinase-MB level and mortality in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *JAMA*, (2000), 283, 347
- [63] Tanaka, T., Hirota, Y., Sohmiya, K., Nishimura, S., Kawamura, K. Serum and urinary human heart fatty acid-binding protein in acute myocardial infarction. *Clin. Biochem.*, (1991) 24, 195
- [64] Schaap, F.G, van der Vusse, G.J., Glatz, J.F. Fatty acid-binding proteins in the heart. *Mol. Cell. Biochem.*, (1998), 180, 43
- [65] Arimoto, T, Takeishi, Y., Shiga, R., Fukui, A., Tachibana, H., Nozaki, N. Prognostic value of elevated circulating heart-type fatty acid binding protein in patients with congestive heart failure. *J. Card. Fail.*, (2005) 11, 56



- [66] Troughton, R.W., Frampton, C.M., Yandle, T.G. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet*, (2000), 355, 1126
- [67] Maisel, A.S., Krishnaswamy, P., Nowak, R.M. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *NEJM*, (2002), 347, 161
- [68] Richards, A.M., Nicholls, M.G., Espiner, E.A. B-type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after acute myocardial infarction. *Circulation*, (2003) 107, 2786
- [69] Apple, F.S., Panteghini, M., Ravkilde, J., Mair, J., Wu, A.H.B., Tate, J., Pagani, F., Christenson, R.H., Jaffe, A.S. Quality specifications for B-Type natriuretic peptide assays. *Clin. Chem.*, (2005), 51, 3
- [70] Yamamoto, T., Sato, N., Yasutake, M., Takagi, H., Morita, N., Akutsu, K., Fujii, M., Fujita, N., Tanaka, K., Takano, T. B-type natriuretic peptide as an integrated risk marker in non-ST elevation acute coronary syndromes. *International Journal of Cardiology*, (2006), 111, 224
- [71] Boushey, C.J., Beresford, S.A., Omenn, G.S., Motulsky, A.G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, (1995), 274, 1049
- [72] Facila, L., Nunez, J.E., Bertomeu, V.G., Sanchis, J., Bodi, V., Chorro, F.J., Llacer, A. Early determination of homocysteine levels in acute coronary syndromes, is it an independent prognostic factor? *International Journal of Cardiology*, (2005), 100, 275
- [73] Bønaa, K.H., Njølstad, I., Ueland, P.M., Schirmer, H., Tverdal, A., Steigen, T., Wang, H., Nordrehaug, J.E., Arnesen, E., Rasmussen, K. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *NEJM*, (2006), 354, 1578
- [74] Loscalzo, J. Homocysteine trials. Clear outcomes for complex reasons. *NEJM*, (2006), 354, 1629
- [75] Fernandez-Avilés, F., Alonso, J., Castro-Beiras, A., Vázquez, N., Blanco, J., Alonso-Briales, J., López-Mesa, J., Fernández-Vazquez, F., Calvo, I., Martínez-Elbal, L., San Román, J., Ramos, B. Routine invasive strategy within 24 hours of thrombolysis versus ischaemia-guided conservative approach for acute myocardial infarction with ST-segment elevation (GRACIA-1): a randomised controlled trial. *Lancet*, (2004), 364, 1045
- [76] Ridker, P.M., Cannon, C.P., Morrow, D. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *NEJM*, (2005) 352, 20
- [77] Nissen, S.E., Tuzcu, E.M., Schoenhagen, P. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *NEJM*, (2005) 352, 29
- [78] COMMIT Collaborative Group. Addition of clopidogrel to aspirin in 45852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, (2005), 366, 1607
- [79] De Luca, G., van't Hof, A.W., de Boer, M.J., Ottervanger, J.P., Hoorntje J.C., Gosselink, A.T. Time-to-treatment significantly affects the extent of ST-segment resolution and



- myocardial blush grade in patients with acute myocardial infarction treated by primary angioplasty. *Eur. Heart J.*, (2004), 25, 1009
- [80] Boland, L.L., Folsom, A.R., Sorlie, P.D., Taylor, H.A., Rosamond, W.D., Chambless, L.E., Cooper, L.S. Occurrence of unrecognized myocardial infarction in subjects aged 45 to 65 years (the ARIC study). *Am. J. Cardiol.*, (2002), 90, 927

11.2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 3^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] Ebashi, S., Kodama, A., Ebashi, F. Troponin I. Preparation and physiological function. *J. Biochem.*, (1968), 64, 465
- [2] Perry, S.V. The regulation of contractile activity in muscle. *Biochem. Soc. Trans.*, (1979), 7, 593
- [3] Leavis, P.C., Gergely, J. Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate skeletal muscle contraction. *Critical Rev. Biochem.*, (1984), 16, 235
- [4] Filatov, V.L., Katrukha, A.G., Bulargina, T.V., Gusev, N.B. Troponin: Structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry, Biokhimiia*, (1999), 64, 969
- [5] Sarko, J., Pollack, C.V. Cardiac troponins. *The Journal of Emergency Medicine*, (2002), 23, 57
- [6] Perry, S.V. Troponin I: Inhibitors or facilitators. *Mol. Cell. Biochem.*, (1999), 190, 9
- [7] Potter, J.D., Sheng, Z., Pan, B.S., Zhao, J. A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.*, (1995), 270, 2557
- [8] Fisher, D., Wang, G., Tobacman, L.S. NH₂-terminal truncation of skeletal muscle troponin T does not alter the Ca²⁺ sensitivity of thin filament assembly. *J. Biol. Chem.*, (1995), 270, 25455
- [9] Parmacek, M.S., Leider, J.M. Structure, function, and regulation of troponin C. *Circulation*, (1991), 84, 991
- [10] Houdusse, A., Love, M.L., Dominguez, R., Grabarek, Z., Cohen, C. Structures of four Ca²⁺-bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca²⁺-switch in the calmodulin superfamily. *Structure*, (1997), 5, 1695
- [11] Tripet, B., Van Eyk, J.E., Hodges, R.S. Mapping of a second actin-tropomyosin and a second troponin C binding site within the C terminus of troponin I, and their importance in the Ca²⁺-dependent regulation of muscle contraction. *J. Mol. Biol.*, (1997), 271, 728
- [12] Chong, P.C., Hodges, R.S. Photochemical cross-linking between rabbit skeletal troponin and alpha-tropomyosin. Attachment of the photoaffinity probe N-(4-azidobenzoyl-[2-³H]glycyl)-S-(2-thiopyridyl)-cysteine to cysteine 190 of alpha-tropomyosin. *J. Biol. Chem.*, (1982), 257, 9152



- [13] Syska, H., Wilkinson, J.M., Grand, R.J., Perry, S.V. The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochem. J.*, (1976), 153, 375
- [14] Jha, P.K., Mao, C., Sarkar, S. Photo-cross-linking of rabbit skeletal troponin I deletion mutants with troponin C and its thiol mutants: The inhibitory region enhances binding of troponin I fragments to troponin C. *Biochemistry*, (1996), 35, 11026
- [15] Hinkle, A., Goranson, A., Butters, C.A., Tobacman, L.S. Roles for the troponin tail domain in thin filament assembly and regulation. A DELETIONAL STUDY OF CARDIAC TROPONIN T. *J. Biol. Chem.*, (1999), 274, 7157
- [16] Chong, P.C., Hodges, R.S. Photochemical cross-linking between rabbit skeletal troponin subunits. Troponin I-troponin T interactions. *J. Biol. Chem.*, (1982), 257, 11667
- [17] Mak, A.S., Smillie, L.B. Structural interpretation of the two-site binding of troponin on the muscle thin filament. *J. Mol. Biol.*, (1981), 149, 541
- [18] Zot, A.S., Potter, J.D. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, (1987), 16, 535
- [19] Leszyk, J., Collins, J.H., Leavis, P.C., Tao, T. Cross-linking of rabbit skeletal muscle troponin subunits: labeling of cysteine-98 of troponin C with 4-maleimidobenzophenone and analysis of products formed in the binary complex with troponin T and the ternary complex with troponins I and T. *Biochemistry*, (1988), 27, 6983
- [20] Kobayashi, T., Zhao, X., Wade, R., Collins, J.H. Involvement of conserved, acidic residues in the N-terminal domain of troponin C in calcium-dependent regulation. *Biochemistry*, (1999), 38, 5386
- [21] Leszyk, J., Tao, T., Nuwaysir, L.M., Gergely, J. Identification of the photocrosslinking sites in troponin-I with 4- maleimidobenzophenone labeled mutant troponin-Cs having single cysteines at positions 158 and 21. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, (1998), 19, 479
- [22] Vassilyev, D.G., Takeda, S., Wakatsuki, S., Maeda, K., Maeda, Y. Crystal structure of troponin C in complex with troponin I fragment at 2.3-Å resolution. *PNAS*, (1998), 95, 4847
- [23] Farah, C.S., Reinach, F.C. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.*, (1995), 9, 755
- [24] Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., and Maeda, Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form. *Nature*, (2003), 424, 35
- [25] Ward, D.G., Brewer, S.M., Cornes, M.P., Trayer, I.P. A cross-linking study of the N-terminal extension of human cardiac troponin I. *Biochemistry*, (2003), 42, 10324
- [26] Farah, C.S., Miyamoto, C.A., Ramos, C.H.I., da Silva, A.C.R., Quaggio, R.B., Fujimora, K., Smillie, L.B., Reinach, F.C. Structural and regulatory functions of the NH₂- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J. Biol. Chem.*, (1994), 269, 5230



- [27] **Tung, C.S., Wall, M.E., Gallagher, S.C., Trehella, J.** A model of troponin-I in complex with troponin-C using hybrid experimental data: the inhibitory region is a beta-hairpin. *Protein Sci.*, (2000), 9, 1312
- [28] **Ferrieres, G., Pugniere, M., Mani, J.C., Villard, S., Laprade, M., Doutre, P., Pau, B., Granier, C.** Systematic mapping of regions of human cardiac troponin I involved in binding to cardiac troponin C: N- and C-terminal low affinity contributing regions. *FEBS Lett.*, (2000), 479, 99
- [29] **Ward, D.G., Brewer, S.M., Calvert, M.J., Gallon, C.E., Gao, Y., Trayer, I.P.** Characterization of the interaction between the N-terminal extension of human cardiac troponin I and troponin C. *Biochemistry*, (2004), 43, 4020
- [30] **Krudy, G.A., Kleerekoperl, Q., Guo, X., Howarth, J.W., R. Solaro, J., Rosevear, P.R.** NMR studies delineating spatial relationships within the cardiac troponin I-troponin C complex. *J. Biol. Chem.*, (1994), 269, 23731
- [31] **Gasmi-Seabrook, G., Howarth, J. W., Finley, N., Abusamhadneh, E., Gaponenko, V., Brito, R.M. M., Solaro, R.J., Rosevear, P.R.** Solution structures of the C-terminal domain of cardiac troponin C free and bound to the N-terminal domain of cardiac troponin I, *Biochemistry*, (1999), 8, 8313
- [32] **Pearlstone, J.R., and Smillie, L.B.** The interaction of rabbit skeletal muscle troponin-T fragments with troponin-I. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, (1985), 63, 212
- [33] **Stefancsik, R., Jha, P.K., Sarkar, S.** Identification and mutagenesis of a highly conserved domain in troponin T responsible for troponin I binding: Potential role for coiled coil interaction. *PNAS*, (1998), 95, 957
- [34] **Van Eyk, J.E., Strauss, A.W., Hodges, R.S., Ruegg, J.C.** A synthetic peptide mimics troponin I function in the calcium-dependent regulation of muscle contraction. *FEBS Lett.*, (1993), 323, 223
- [35] **Lindhout, D.A., Sykes, B.D.** Structure and dynamics of the C-domain of human cardiac troponin C in complex with the inhibitory region of human cardiac troponin I. *J. Biol. Chem.*, (2003), 278, 27024
- [36] **Li, M.X., Spyropoulos, L., Sykes, B.D.** Binding of cardiac troponin-I 147-163 induces a structural opening in human cardiac troponin-C. *Biochemistry*, (1999), 38, 8289
- [37] **Rarick, H. M., Tu, X.-H., Solaro, R. J., and Martin, A. F.** The C-terminus of cardiac troponin I is essential for full inhibitory activity and Ca^{2+} sensitivity of rat myofibrils. *J. Biol. Chem.*, (1997), 272, 26887
- [38] **Ramos, C.H.I.** Mapping subdomains in the C-terminal region of troponin I involved in its binding to troponin C and to thin filament. *J. Biol. Chem.*, (1999), 274, 18189



- [39] Verin, A.D., Gusev, N.B. The role of the N-terminal fragment of troponin T in the interaction with troponin-tropomyosin complex components of the heart. *Biokhimiya*, (1988), 53, 1235
- [40] Dahiya, R., Butters, C.A., Tobacmanson L.S. Equilibrium linkage analysis of cardiac thin filament assembly. Implications for the regulation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.*, (1994) 269, 29457
- [41] Gulati, J., Babu, A., Su, H. Functional delineation of the Ca²⁺-deficient EF hand in cardiac muscle, with genetically engineered cardiac-skeletal chimeric troponin C. *J. Biol. Chem.*, (1992), 267, 25073
- [42] Dhoot, G.K., Gell, P.G.H., Perry, S.V. The localization of the different forms of troponin I in skeletal and cardiac muscle cells. *Exp. Cell. Res.*, (1978), 117, 357
- [43] Pan, B. S., Potter, J.D. Two genetically expressed troponin T fragments representing alpha and beta isoforms exhibit functional differences. *J. Biol. Chem.*, (1992), 267, 23052
- [44] Anderson, P.A.W., Greig, A., Mark, T.M., Malouf, N.N., Oakeley, A.E., Ungerleider, R.M., Allen, P.D., Kay, B.K. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult and failing heart. *Circ. Res.*, (1995), 76, 681
- [45] Kawasaki, H., Kretsinger, R.H. Calcium-binding proteins. 1: EF-hands. *Protein Profile*, (1994) 1, 343
- [46] Tobacman, L.S. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.*, (1996), 58, 447
- [47] Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Esakova, T.V. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex. *Clin. Chem.*, (1997), 43, 1379
- [48] Wu A.H., Feng, Y.J., Moore. R. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin. Chem.*, (1998), 44, 1198
- [49] Labugger, R., Organ, L., Collier, C., Atar, D., Van Eyk, J.E. Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, (2000), 102, 1221
- [50] Gao, W.D., Atar, D., Liu, Y. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ. Res.*, (1997), 80, 393
- [51] Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Filatov, V.L., Esakova, T.V., Kolosova, O.V., Pettersson, K. Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin. Chem.*, (1998), 44, 2433
- [52] Morjana, N.A. Degradation of human cardiac troponin I after myocardial infarction. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, (1998) 28, 105



- [53] Cummins, B., Auckland, M.L., Cummins, P. Cardiac-specific troponin- I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. Heart J.*, (1987), 113, 1333
- [54] Katus, H.A., Remppis, A., Looser, S., Hallermeier, K., Scheffold, T., Kuebler, W. Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J. Mol. Cell Cardiol.*, (1989), 21, 1349
- [55] Burlina, A., Zaninotto, M., Secchiero, S., Rubin, D., Accorsi, F. Troponin T as a marker of ischemic myocardial injury. *Clin. Biochem.*, (1994), 27, 113
- [56] Mair, J., Thome-Kromer, B., Wagner, I. Concentration time courses of troponin and myosin subunits after acute myocardial infarction. *Coron. Artery Dis.*, (1994), 5, 865
- [57] Wu, A.H., Feng, Y.J., Contois, J.H., Pervaiz, S. Comparison of myoglobin, creatine kinase-MB, and cardiac troponin I for diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, (1996), 26, 291
- [58] Adams, J.E. Clinical application of markers of cardiac injury: basic concepts and new considerations. *Clinica Chimica Acta*, (1999), 284, 127
- [59] Heeschen, C., Goldmann, B.U., Moeller, R.H., Hamm, C.W. Analytical performance and clinical application of a new rapid assay for the detection of serum cardiac troponin I. *Clin. Chem.*, (1998), 44, 1925
- [60] Heeschen, C., Deu, A., Langenbrink, L., Goldmann, B.U., Hamm, C.W. Analytical and diagnostic performance of troponin assays in patients suspicious for acute coronary syndromes. *Clin. Biochem.*, (2000), 33, 359
- [61] Venge, P., Lindahl, B., Wallentin, L. New generation cardiac troponin I assay for the access immunoassay system. *Clin. Chem.*, (2001), 47, 959
- [62] Venge, P., Lagerqvist, B., Diderholm, E., Lindahl, B., Wallentin, L. Clinical performance of three cardiac troponin assays in patients with unstable coronary artery disease (a FRISC II substudy). *Am. J. Cardiol.*, (2002), 89, 1035
- [63] Uettwiller-Geiger, D., Wu, A.H., Apple, F.S., Jevans, A.W., Venge, P., Olson, M.D. Multicenter evaluation of an automated assay for troponin I. *Clin. Chem.*, (2002), 48, 869
- [64] Cardiac Markers Panel, HyTest, <http://www.hytest.fi>
- [65] Katus, H.A., Remppis, A., Neumann, F.J. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation*, (1991), 83, 902
- [66] Mair, J., Genser, N., Morandell, D., Maier, J., Mair, P., Lechleitner, P., Calzolari, C., Larue, C., Ambach, E., Dienstl, F., Pau, B., Puschendorf, B. Cardiac troponin I in the diagnosis of myocardial injury and infarction. *Clinica Chimica Acta*, (1996), 245, 19
- [67] D'Costa, M., Fleming, E., Patterson, M.C. Cardiac troponin I for the diagnosis of acute myocardial infarction in the emergency department. *Am. J. Clin. Pathol.*, (1997), 108, 550



- [68] **Wu, A.H., Feng, Y.J.** Biochemical differences between cTnT and cTnI and their significance for diagnosis of acute coronary syndromes. *Eur. Heart. J.*, (1998), 19, 25
- [69] **Chapelle, J.P.** Cardiac troponin I and troponin T: recent players in the field of myocardial markers. *Clin. Chem. Lab. Med.*, (1999), 37, 11
- [70] **Wu, A.H.** A comparison of cardiac troponin T and cardiac troponin I in patients with acute coronary syndromes. *Coron. Artery Dis.*, (1999), 10, 69
- [71] **Lindahl, B.** Detection of myocardial damage: are the troponins the ultimate solution? *Scand. Cardiovasc. J.*, (2001), 35, 229
- [72] **Colantonio, D.A., Pickett, W., Brison, R.J., Collier, C.E., van Eyk, J.E.** Detection of cardiac troponin I early after onset of chest pain in six patients. *Clin. Chem.*, (2002), 48, 668
- [73] **Ilva, T., Eriksson, S., Lund, J., Porela, P., Mustonen, H., Pettersson, K., Pulkki, K., Voipio-Pulkki, L.M.** Improved early risk stratification and diagnosis of myocardial infarction, using a novel troponin I assay concept. *European Journal of Clinical Investigation*, (2005), 35, 112
- [74] **Planer, D., Leibowitz, D., Paltiel, O., Boukhobza, R., Lotan, C., Weiss, T.A.** The diagnostic value of troponin T testing in the community setting. *International Journal of Cardiology*, (2006), 107, 369
- [75] **Roongsritong, C., Warraich, I., Bradley, C.** Common causes of troponin elevations in the absence of acute myocardial infarction: incidence and clinical significance. *Chest*, (2004), 125, 1877
- [76] **Mahajan, N., Mehta, Y., Rose, M., Shani, J., Lichstein, E.** Elevated troponin level is not synonymous with myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.*, (2006), 111, 442
- [77] **Jeremias, A., Gibson, C.M.** Narrative review: alternative causes for elevated cardiac troponin levels when acute coronary syndromes are excluded. *Ann. Intern. Med.*, (2005), 142, 786
- [78] **Ebell, M.H., Flewelling, D., Flynn, C.A.** A systematic review of troponin T and I for diagnosing acute myocardial infarction. *J. Fam. Pract.*, (2000), 49, 550
- [79] **Antman, E.M., Tanasijevic, M.J., Thompson, B.** Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *NEJM*, (1996), 335, 1342
- [80] **Lindahl, B., Diderholm, E., Lagerqvist, B., Venge, P., Wallentin, L.** FRISC II (Fast Revascularization during InStability in CAD) Investigators. Mechanisms behind the prognostic value of troponin T in unstable coronary artery disease: a FRISC II substudy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, (2001), 38, 979
- [81] **Morrow, D.A., Cannon, C.P., Rifai, N., Frey, M.J., Vicari, R., Lakkis, N., Robertson, D.H., Hille, D.A., DeLucca, P.T., DiBattiste, P.M., Demopoulos, L.A., Weintraub, W.S., Braunwald, E.** Ability of minor elevations of troponins I and T to predict benefit from an early



- invasive strategy in patients with unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction: results from a randomized trial. *JAMA*, (2001), 286, 2405
- [82] Henrikson, C.A., Howell, E.E., Bush, D.E. Prognostic usefulness of marginal troponin T elevation. *Am. J. Cardiol.*, (2004), 93, 275
- [83] Dokainish, H., Pillai, M., Murphy, S.A. Prognostic implications of elevated troponin in patients with suspected acute coronary syndrome but no critical epicardial coronary disease: a TACTICS-TIMI-18 substudy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, (2005), 45, 19
- [84] Zethelius, B., Johnston, N., Venge, P. Troponin I as a predictor of coronary heart disease and mortality in 70-year-old men: a community-based cohort study. *Circulation*, (2006), 113, 1071
- [85] Waxman, D.A., Hecht, S., Schappert, J., Husk, G. A Model for troponin I as a quantitative predictor of in-hospital mortality. *JACC*, (2006), 48, 9
- [86] Hamm, C.W., Ravkilde, J., Gerhardt, W., Jorgensen, P., Peheim, E., Ljungdahl, L., Goldmann, B., Katus, H.A. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. *NEJM*, (1992), 327, 146
- [87] Hamm, C.W., Goldmann, B.U., Heeschen, C., Kreyman, G., Berger, J., Meinertz, T., Emergency room triage of patients with acute chest pain based on rapid testing for troponin T or troponin I. *NEJM*, (1997), 337, 1648
- [88] Apple, F.S., Murakami, M.M., Pearce, L.A., Herzog, C.A. Predictive value of cardiac troponin I and T for subsequent death in end-stage renal disease. *Circulation*, (2002), 106, 2941
- [89] Agewall, S., Olsson, T., Loewbeer, C. Usefulness of troponin levels below the diagnostic cut-off level for acute myocardial infarction predicting prognosis in unselected patients admitted to the coronary care unit. *Am. J. Cardiol.*, (2007), 99, 1357
- [90] Katrukha, A., Bereznikova, A., Filatov, V., Esakova, T. Biochemical factors influencing measurement of cardiac troponin I in serum. *Clin. Chem. Lab. Med.*, (1999), 37, 1091
- [91] Panteghini, M. Selection of antibodies and epitopes for cardiac troponin immunoassays: Should we revise our evidence-based beliefs? *Clin. Chem.*, (2005), 51, 803
- [92] McNeil, A. The trouble with troponin. *Heart, Lung and Circulation*, (2007), 16, 13
- [93] Wilson, D.H., Laird, D.M., Forsythe, C.M., Biegalski, T.T., Keller, A.L., Herrmann, R.J. Antibody selection for the Abbott AxSYM troponin I assay. *Clin. Chem.*, (1999), 45, 2293
- [94] Shi, Q., Ling, M., Zhang, X., Zhang, M., Kadujevic, L., Liu, S., Laurino, J.P. Degradation of cardiac troponin I in serum complicates comparisons of cardiac troponin I assays. *Clin. Chem.*, (1999), 45, 1018
- [95] James, S., Flodin, M., Johnston, N., Lindahl, B., Venge, P. The antibody configurations of cardiac troponin I assays may determine their clinical performance. *Clin. Chem.*, (2006), 52, 832



- [96] Assomull, R.G., Lyne, J.C., Keenan, N., Gulati, A., Bunce, N.H., Davies, S.W., Pennell, D.J., Prasad, S.K. The role of cardiovascular magnetic resonance in patients presenting with chest pain, raised troponin and unobstructed coronary arteries. *Eur. Heart J.*, (2007), 28, 1242
- [97] Nosanchuk, J.S. False increases of troponin I attributable to incomplete separation of serum. *Clin. Chem.*, (1999), 45, 714
- [98] Kazmierczak, S.C., Sekhon, H., Richards, C. False-positive troponin I measured with the Abbott AxSYM attributed to fibrin interference. *International Journal of Cardiology*, (2005), 101, 27
- [99] Plebani, M., Mion, M., Altinier, S., Girotto, M.A., Baldo, G., Zaninotto, M. False-positive troponin I attributed to a macrocomplex. *Clin. Chem.*, (2002), 48, 677
- [100] Fitzmaurice, T.F., Brown, C., Rifai, N., Wu, A.H. B., Yeo, K.T.J. False increase of cardiac troponin I with heterophilic antibodies. *Clin. Chem.*, (1998), 44, 2212
- [101] García-Mancebo, M.L., Agulló-Ortuño, M.T., Gimeno, J.R., Navarro-Martínez, M.D., Ruiz-Gómez, J., Noguera-Velasco, J.A. Heterophile antibodies produce spuriously elevated concentrations of cardiac Troponin I in patients with *Legionella pneumophila*. *Clinical Biochemistry*, (2005), 38, 584
- [102] Krahn, J., Parry, D.M., Leroux, M., Dalton, J. High percentage of false positive cardiac troponin I results in patients with rheumatoid factor. *Clinical Biochemistry*, (1999), 32, 477
- [103] Onuska, K.D., Hill, S.A. Effect of rheumatoid factor on cardiac troponin I measurement using two commercial measurement systems. *Clin. Chem.*, (2000), 46, 307
- [104] Bohnerl, J., von Pape', K.W., Hannes W., Stegmann, T. False-negative immunoassay results for cardiac troponin I probably due to circulating troponin I autoantibodies. *Clin. Chem.*, (1996), 42, 2046
- [105] Eriksson, S., Junikka, M., Pettersson, K. An interfering component in cardiac troponin I immunoassays. Its nature and inhibiting effect on the binding of antibodies against different epitopes. *Clinical Biochemistry*, (2004), 37, 472
- [106] Eriksson, S., Halenius, H., Pulkki, K., Hellman, J., Pettersson, K. Negative interference in cardiac troponin I immunoassays by circulating troponin autoantibodies. *Clin. Chem.*, (2005), 51, 839
- [107] Eriksson, S., Ilva, T., Becker, C., Lund, J., Porela, P., Pulkki, K., Voipio-Pulkki, L.M., Pettersson, K. Comparison of cardiac troponin I immunoassays variably affected by circulating autoantibodies. *Clin. Chem.*, (2005), 51, 848



11.3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 4^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] Fischer, E. Fournau, E. "Ueber einige derivate des glykocolls". *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, (1901), 34, 2868
- [2] Sanger, F., Thompson, E.O.P. The amino-acid sequence in the glycol chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J.*, (1953), 53, 353
- [3] Tam, J.P. Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high density multiple antigenic peptide system. *PNAS*, (1988), 85, 5409
- [4] Posnett, D.N., McGrath, H., Tam, J.P. A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. *J. Biol. Chem.*, (1988), 263, 1719
- [5] Van Regenmortel, M.H.V. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals*, (2001), 29, 209
- [6] Arnon, R., Maron, E., Sela, M., Anfinsen, C.B. Antibodies reactive with native lysozyme, elicited by a completely synthetic antigen. *PNAS*, (1971), 68, 1450
- [7] Dyrberg, T., Oldstone, M.B. Peptides as antigens. Importance of orientation. *J. Exp. Med.*, (1986), 164, 1344
- [8] Kirkley, J.E., Goldstein, A.L., Naylor, P.H. Effect of peptide carrier coupling on peptide-specific immune responses. *Immunology*, (2001), 203, 601
- [9] Deen, C., Claassen, E., Gerritse, K., Zegers, N.D., Boersma, W.J. A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides: enhanced antipeptide antibody responses. *J. Immunol. Methods*, (1990), 129, 119
- [10] Tsikaris, V., Sakarellos, C., Cung, M.T., Marraud, M., Sakarellos-Daitsiotis, M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymers*, (1996), 38, 291
- [11] Mezö, G., Kajtar, J., Nagy, I., Szekerke, M., Hudecz, F. Carrier design: Synthesis and conformational studies of poly (L-lysine) based branched polypeptides with hydroxyl groups in the side chains. *Biopolymers*, (1997), 42, 719
- [12] Haro, I., Gómara, M.J. Different approaches to potentiate the immune response induced by a 12-mer synthetic peptide. *Curr. Protein Pept. Sci.*, (2000), 1, 125
- [13] Tsikaris, V., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., Cung, M.T., Marraud, M., Konidou, G., Tzinia, A., Soteriadou, K.P. Use of sequential oligopeptide carriers (SOCn) in the design of potent *Leishmania* gp63 immunogenic peptides. *Peptide Res.*, (1996), 9, 240
- [14] Mezo, G., de Oliveira, E., Krikorian, D., Fejlbrieff, M., Jakab, A., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Welling-Wester, S., Andreu, D., Hudecz, F. Synthesis and comparison of antibody recognition of conjugates containing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D epitope VII. *Bioconjugate Chem.*, (2003), 14, 1260



- [15] Bergmann, M., Zervas, L. "Uber ein allgemeines verfahren der peptid-synthese" *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, (1932), 65, 1192
- [16] Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan J.M., Roberts C.W., Katsoyannis, P.G., Gordon, S., The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.*, (1953), 75, 4879
- [17] Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, (1963), 85, 2149
- [18] Wang, S.S. *p*-Alkoxybenzyl alcohol resin and *p*-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Am. Chem. Soc.*, (1973), 95, 1328
- [19] Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.*, (1987), 28, 3787
- [20] Barlos, K., Gatos, D., Kallitsis, J., Papaphotiu, G., Sotiriu, P., Wenquing, Y., Schafer, W. The solid-phase synthesis is carried out using the 2-chloro trityl chloride resin. *Tetrahedron Lett.*, (1989), 30, 3943
- [21] DeGrado, W.F., Kaiser, E.T. Solid-phase synthesis of protected peptides on a polymer-bound oxime: preparation of segments comprising the sequence of a cytotoxic 26-peptide analog. *J. Org. Chem.*, (1982), 47, 3258
- [22] Jensen, K.J., Alsina, J., Songster, M.F., Vagner, J., Albericio, F., Barany, G. Backbone amide linker (BAL) strategy for solid-phase synthesis of C-terminal-modified and cyclic peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, (1998), 120, 5441
- [23] DeGrado, W.F., Kaiser, E.T. Polymer-bound oxime esters as supports for solid-phase peptide synthesis. The preparation of protected peptide fragments. *J. Org. Chem.*, (1980), 45, 1295
- [24] Stavropoulos, G., Gatos, D., Magafa, V., Barlos, K. Preparation of polymer-bound trityl-hydrazines and their application in the solid phase synthesis of partially protected peptide hydrazides. *Letters in Peptide Science*, (1996), 2, 315
- [25] Fehrentz, J.A., Paris, M., Heitz A, Velek, J., Liu, C.F., Winternitz, F., Martinez, J. Improved solid phase synthesis of C-terminal peptide aldehydes. *Tetrahedron Lett.*, (1995), 36, 7871
- [26] Mckay, F.C., Albertson, N.F. New amine-masking groups for peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, (1957), 79, 4686
- [27] Carpino, L.A., Han, G.Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J. Am. Chem. Soc.*, (1970), 92, 5748
- [28] Sheeman, J.C., Hess, G.P. A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, (1955), 77, 1067



- [29] Izdebski, J., Pachulska, M., Orlowska, A. N-cyclohexyl-N'-isopropylcarbodiimide: a hybrid that combines the structural features of DCC and DIC. *Int. J. Pept. Protein. Res.*, (1994), 45, 414
- [30] Castro, B., Dourtoglou, B., Dormay, J. R., Evin, G., Serve, C., Ziegler, J. C. Peptide coupling reagents. VI. A novel, cheaper preparation of benzotriazoloxyltris [dimethylamino] phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent). *Synthesis*, (1976), 18, 751
- [31] Coste, J., Le Nguyen, D., Castro, B. PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.*, (1990), 31, 205
- [32] Knorr, R., Trzeciak, A., Bannawarth, W., Gillsen, D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.*, (1989), 30, 1927
- [33] Dourtoglou, V., Ziegler, J. C., Gross, B. Hexafluorophosphate of O-Benzotriazole-N,N-tetramethyurea – New and effective reagent of coupling peptide. *Tetrahedron Lett.*, (1978), 19, 1269
- [34] Dourtoglou, V., Gross, B., Lambropoulou, V., Ziodrou, C. O-Benzotriazolyl-N, N, N', N'-tetramethyloronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis*, (1984), 572
- [35] Prasad, K.U., Iqbal, M.A. Urry, D.W. Utilization of 1-Hydroxybenzotriazole in mixed anhydride coupling reactions. *Int. J. Pep. Protein. Res.*, (1985), 25, 408
- [36] Carpino, L.A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.*, (1993), 115, 4397
- [37] Tam, J.P., Heath, W., Merrifield, R.B. An S_N2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of hydrofluoric acid in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, (1983), 105, 6442
- [38] Gutte, B., Merrifield, R.B. The synthesis of ribonuclease A. *J. Biol. Chem.*, (1971), 246, 1922
- [39] Schneider, J., Kent, S.B.H. Enzymatic activity of a synthetic 99 residue protein corresponding to the putative HIV-1 protease. *Cell*, (1988), 54, 363
- [40] Nutt, R.F., Brady, S.F., Darke, P.L., Ciccarone, T.M., Colton, CD., Nutt, E.M., Rodkey, J.A., Bennett, C.D., Waxman, L.H., Sigal, I.S. Chemical synthesis and enzymatic activity of a 99-residue peptide with a sequence proposed for the human immunodeficiency virus protease. *PNAS*, (1988), 85, 7129
- [41] Ferrer, M., Woodward, C., Barany, G. Solid-phase synthesis of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) and two analogues. *Int. J. Pept. Protein Res.*, (1992), 40, 194
- [42] Sadler, K., Tam, J.P. Peptide dendrimers: applications and synthesis. *Reviews in Mol. Biotechnol.*, (2002), 90, 195
- [43] Veprek, P., Jezek, J.J. Peptide and glycopeptide dendrimers. Part II. *J. Peptide Sci.*, (1999), 5, 203



- [44] Saravanan, P., Kumar, S., Kataria, J.M. Use of multiple antigenic peptides related to antigenic determinants of infectious bursal disease virus (IBDV) for detection of anti-IBDV-specific antibody in ELISA-quantitative comparison with native antigen for their use in serodiagnosis. *J. Immunol. Methods*, (2004), 293, 61
- [45] Basak, A., Boudreault, A., Chen, A., Chretien, M., Seidah, N.G., Lazure, C. 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. Peptide Sci.*, (1995), 1, 385
- [46] Ahlborg, N. J. Synthesis of a diepitope multiple antigen peptide containing sequences from two malaria antigens using Fmoc chemistry. *Immunol. Methods*, (1995), 179, 269
- [47] Ndongmo, C.B., Switzer, W.M., Pan, C.P., Zeh, C., Schaefer, A., Pieniazek, D., Folks, T.M., Kalish, M.C. New multiple antigenic peptide-based enzyme immunoassay for detection of Simian immunodeficiency virus infection in nonhuman primates and humans. *J. Clin. Microbiol.*, (2004), 42, 5161
- [48] Tam, J.P., Lu, Y.A. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. *PNAS*, (1989), 86, 9084
- [49] Mutter, M., Dumy, P., Garrouste, P., Lehmann, C., Mathieu, M., Peggion, C., Peluso, S., Razaname, A., Tuchscherer, G. Template assembled synthetic peptides (Tasp) as functional mimetics of proteins. *Angew. Chemie, Int.Ed. Engl.*, (1994), 35, 1482
- [50] Tuchscherer, G., Mutter, M. Templates in protein de novo design, *Journal of Biotechnology*, (1995), 41, 197
- [51] Mutter, M., Hersperger, R., Gubemator, K., Müller, K. The construction of new proteins: V. A template-assembled synthetic protein (TASP) containing both a 4-helix bundle and b-barrel-like structure. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, (1989), 5, 13-21
- [52] Tuchscherer, G., Servis, C., Corradin, G.P., Blum, U., Rivier, J.E, Mutter, M. Total chemical synthesis, characterization, and immunological properties of an MHC class I model using the TASP concept for protein de novo design. *Protein Science*, (1992), 10, 1377
- [53] Mutter, M., Tuchscherer, G., Miller, C., Altmann, K.H., Carey, R., Wyss, D., Ladhardt, A., Rivier, J.E. Template-assembled synthetic proteins with four-helix-bundle topology. Total chemical synthesis and conformational studies. *J. Am. Chem. Soc.*, (1992), 114, 1463
- [54] Tsikaris V., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Orlewski P., Maraud M., Cung M. T., Vatzaki E., Tzartos S. Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) for multiple anchoring of antigenic peptides--application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. *International Journal of Biological Macromolecules*, (1996), 19, 195



- [55] Jezek, J., El Ridi, R., Salah, M., Wagih, A., Aziz, H.W., Tallima, H., El Shafie, M.H., Abdel Khalek, T., Abo Ammou, F.F., Strongylis, C., Moussis V., Tsikaris, V. Fasciola gigantica cathepsin L proteinase-based synthetic peptide for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Biopolymers*, (2007), (in press)
- [56] Strongylis, C., Voidarou, C., Tsoukatos, D., Naka, K., Michalis, L., Soteriadou, K., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Tsikaris, V. Development of a new sensitive immunoassay for the detection of cardiac troponins in sera of patients with cardiovascular diseases. *J. Peptide Sci.*, (2004), 10 (S2), 293
- [57] Ludwick, A.G., Jelinski, L.W., Live, D., Kintanar, A., Dumais, J.J. Association of peptide chains during Merrifield solid-phase peptide synthesis. A deuterium NMR study. *J. Am. Chem. Soc.*, (1986), 108, 6493
- [58] Hyde, C., Johnson, T., Sheppard, R.C. Internal aggregation during solid phase peptide synthesis: dimethyl sulfoxide as a powerful dissociating solvent. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1992), 1573
- [59] Miranda, L.P., Alewood, P.F. Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins. *PNAS*, (1999), 96, 1181
- [60] Thaler, A., Seebach, D., Cardinaux, F. Lithium-salt effects in peptide synthesis, part II: improvement of degree of resin swelling and of efficiency of coupling in solid-phase synthesis. *Helv. Chim. Acta*, (1991), 74, 628
- [61] Manning, J.M., Moore, S. Determination of d- and l-amino acids by ion exchange chromatography as l-d and l-l dipeptides. *J. Biol. Chem.*, (1968), 243, 5591
- [62] Gisin, B.F., Merrifield, R.B. Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. Side reaction in solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, (1972), 94, 3102
- [63] Karlstrom, A., Unden, A. Design of protecting groups for the [beta]-carboxylic group of aspartic acid that minimize base-catalysed aspartimide formation. *Int. J. Peptide Protein Res.*, (1996), 48, 305
- [64] Rabanal, F., Pastor, J.J., Nicols, E., Albericio, F., Giralt, E. Synthesis of aspartimide-free protected peptides on base-labile functionalized resins. *Tetrahedron Lett.*, (2000), 41, 8093
- [65] DiMarchi, R., Tam, J.P., Kent, S.B.H., Merrifield, R.B. Weak acid-catalyzed pyrrolidone carboxylic acid formation from glutamine during solid phase peptide synthesis. Minimization by rapid coupling. *Int. J. Pept. Protein Res.*, (1982), 19, 88
- [66] Lloyd-Williams, P., Albericio, F., Giralt, E. Convergent solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron*, (1993) 49, 11065
- [67] Benz, H. The role of solid-phase fragment condensation (SPFC) in peptide synthesis. *Synthesis*, (1994), 337



- [68] Albericio, F., Lloyd-Williams, P., Giralt, E. Convergent solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.*, (1997), 289, 313
- [69] Yajima, H., Fujii, N. Totally synthetic crystalline ribonuclease A. *Biopolymers*, (1981), 20, 1859
- [70] Barlos, K., Gatos, D., Schaifer, W. Synthesis of prothymosin a (ProTa) – a protein consisting of 109 amino acid residues. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (1991), 30, 590
- [71] Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bódi, J., Kimura, T., Tsuji, F.I., Sakakibara, S. Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *PNAS*, (1998), 95, 13549
- [72] Sakakibara, S. Chemical synthesis of proteins in solution. *Biopolymers (Peptide Sci.)*, (1999), 51, 279
- [73] Narita, M., Ishikawa, K., Chen, J.Y., Kim, Y. Prediction and improvement of protected peptide solubility in organic solvents. *Int. J. Peptide Protein Res.*, (1984), 24, 580
- [74] Narita, M., Fukunaga, T., Wakabayashi, A., Ishikawa, K., Nakano, H. Syntheses and properties of tertiary peptide bond-containing polypeptides. I: Syntheses and properties of oligo(L-leucine)s containing proline or glycyl-N-(2,4-dimethoxybenzyl)-L-leucine residues. *Int. J. Peptide Protein Res.*, (1984), 23, 306
- [75] Dawson, P.E., Kent, S.B.H. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.*, (2000), 69, 923
- [76] Borgia, J.A., Fields, G.B. Chemical synthesis of proteins. *Tibtech*, (2000), 18, 243
- [77] Papas, S., Strongylis, C., Tsikaris V. Synthetic approaches for total chemical synthesis of proteins and protein-like macromolecules of branched architecture. *Current Organic Chemistry*, (2006), 10, 1727
- [78] Schnolzer, M., Kent, S.B.H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease. *Science*, (1992), 256, 221
- [79] Canne, L.E., Walker, S.M., Kent, S.B.H. A general method for the synthesis of thioester resin linkers for use in the solid phase synthesis of peptide- α -thioacids. *Tetrahedron Lett.*, (1995), 36, 1217
- [80] P.E., Dawson, Kent, S.B.H. Convenient total synthesis of a 4-helix TASP molecule by chemoselective ligation. *J. Am. Chem. Soc.*, (1993), 115, 7263
- [81] Geoghegan, K.F., Stroh, J.G. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chem.*, (1992), 3, 138
- [82] Rose, K., Zeng, W., Regamey, P.O., Chernushevich, I.V., Standing, K.G, Gaertner, H.F. Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkages. *Bioconjug. Chem.*, (1996), 7, 552



- [82] Spetzler, J.C., Tam, J.P. Unprotected peptides as building blocks for branched peptides and peptide dendrimers. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, (1995), 45, 78
- [84] Shao, J., Tam, J.P. Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages. *J. Am. Chem. Soc.*, (1995) 117, 3893
- [85] King, T.P., Zhao, S.W., Lam, T. Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage. *Biochemistry*, (1986), 25, 5774
- [86] Gaerhner, H.F., Rose, K., Cotton, R., Timms, D., Camble, R., Offord, R.E. Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconjugate Chem.*, (1992), 3, 262
- [87] Tuchscherer, G. Template assembled synthetic proteins: condensation of a multifunctional peptide to a topological template via chemoselective ligation. *Tetrahedron Lett.*, (1993), 34, 8419
- [88] Rose, K. Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, (1994) 116, 30
- [89] Rose, K., Zeng, W., Brown, L.E., Jackson, D.C. A synthetic peptide based polyoxime vaccine construct of high purity and activity. *Mol. Immunol.*, (1996), 32, 1031
- [90] Rao, C., Tam, J.P. Synthesis of peptide dendrimer. *J. Am. Chem. Soc.*, (1994), 116, 6975
- [91] Liu, C.F., Tam, J.P. Chemical ligation approach to form a peptide bond between unprotected peptide segments. Concept and model study. *J. Am. Chem. Soc.*, (1994), 116, 4149
- [92] Liu, C.F., Tam, J.P. Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups. *PNAS*, (1994), 91, 6584
- [93] Liu, C.-F., Rao, C., Tam, J.P. Orthogonal ligation of unprotected peptide segments through pseudoproline formation for the synthesis of HIV-1 protease analogs. *J. Am. Chem. Soc.*, (1996), 118, 307
- [94] Tam, J.P.; Miao, Z. Stereospecific pseudoproline ligation of N-terminal serine, threonine or cysteinecontaining unprotected peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, (1999), 121, 9013
- [95] Tam, J.P., Rao, C., Shao, J., Liu, C.F. Specificity and formation of unusual amino acids of an amide ligation strategy for unprotected peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.*, (1995), 45, 209
- [96] Baldwin, J. E. Rules for ring-closure. Application to intramolecular aldol condensations in polyketonic substrates. *Tetrahedron*, (1982), 38, 2939
- [97] Fulop, F., Marttinen, J., Pihlaja, K. Ring-chain tautomerism in 1,3-thiazolidines. *Tetrahedron*, (1990), 46, 6545
- [98] <http://www.chempep.com/ChemPep-Boc-Solid-Phase-Peptide-Synthesis.htm> "Boc Solid Phase Peptide Synthesis"



- [99] <http://www.chempep.com/ChemPep-Fmoc-Solid-Phase-Peptide-Synthesis.htm> "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis"
- [100] Futaki, S., Ishikawa, T., Niwa, M., Kitagawa K., Yagami, T. Embodying a stable α -helical protein structure through efficient chemical ligation via thioether formation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (1997), 5, 1883
- [101] Zeng, W., Ghosh, S., Macris, M., Pagnon, J., Jackson, D.C. Assembly of synthetic peptide vaccines by chemoselective ligation of epitopes: influence of different chemical linkages and epitope orientations on biological activity. *Vaccine*, (2001), 19, 3843
- [102] Grandjean, C., Gras-Masse, H., Melnyk, O. Synthesis of clustered glycoside antigen conjugates by two one-pot, orthogonal, chemoselective ligation reactions: Scope and limitations. *Chem. Eur. J.*, (2001), 7, 230
- [103] Englebretsen, D.R., Garnham, B., Alewood, P.F. A cassette ligation strategy with thioether replacement of three Gly-Gly peptides bonds: Total chemical synthesis of the 101 residue protein early pregnancy factor [ψ (CH₂S)^{28-29,56-57,76-77}]. *J. Org. Chem.*, (2002), 67, 5883
- [104] McMurry, J. Οργανική Χημεία, Τόμος Ι, 4^η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, (2004)
- [105] Morrison, R.T, Boyd, R.N. Οργανική Χημεία, Τόμος Α', 4^η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, (1988)
- [106] Mezo, G., Manea, M., Jakab, A., Kapuvári, B., Bosze, S., Schlosser, G., Przybylski M., Hudecz, F. Synthesis and structural characterization of bioactive peptide conjugates using thioether linkage approaches. *J. Peptide Sci.*, (2004), 10, 701
- [107] Tugyi, R., Mezo, G., Fellingner, E., Andreu, D., Hudecz, F. The effect of cyclization on the enzymatic degradation of herpes simplex virus glycoprotein D derived epitope peptide. *J. Peptide Sci.*, (2005), 11, 642
- [108] Strongylis, C., Papadopoulos, Ch., Naka, K., Michalis, L., Soteriadou, K., Tsikaris, V. Cardiac troponins derived conjugates as tools for producing specific antibodies: synthesis and immune response. *J. Peptide Sci.*, (2006), 12 (S1), 105
- [109] de Oliveira, E., Villen, J., Giralt, E., Andreu, D. Synthetic approaches to multivalent lipopeptide dendrimers containing cyclic disulfide epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Bioconjugate Chem.*, (2003), 14, 144
- [110] Nefzi, A., Sun, X., Mutter, M. Chemoselective ligation of multifunctional peptides to topological templates via thioether formation for TASP synthesis. *Tetrahedron Lett.*, (1995), 36, 229
- [111] Defoort, J.P., Nardelli, B., Huang, W., Tam, J.P. A rational design of synthetic peptide vaccine with a built-in adjuvant. A modular approach for unambiguity. *Int. J. Peptide Protein Res.*, (1992), 40, 214



- [112] McCafferty, D.G., Slate, C.A., Nakhle, B.M., Graham, H.D., Austell, T.L., Vachet, R.W., Mullis, B.H., Erickson, B.W. Engineering of a 129-residue tripod protein by chemoselective ligation of proline-II helices. *Tetrahedron*, (1995), 51, 9859
- [113] Wilce, J.A., Love, S.G., Richardson, S.J., Alewood, P.F., Craik, D.J. Synthesis of an analog of the thyroid hormone-binding protein transthyretin via regioselective chemical ligation. *J. Biol. Chem.*, (2001), 276, 25997
- [114] Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., Kent, S.B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, (1994) 266, 776
- [115] Muir, T.W., Dawson, P.E., Kent, S.B. Protein synthesis by chemical ligation of unprotected peptides in aqueous solution. *Methods Enzymol.*, (1997), 289, 266
- [116] Tam, J.P., Lu, Y.-A., Liu, C.-F., Shao, J. Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. *PNAS*, (1995), 92, 12485
- [117] Camarero, J.A., Pavel, J., Muir T.W. Chemical synthesis of a circular protein domain: evidence for folding-assisted cyclization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (1998), 37, 347
- [118] Camarero, J.A., Muir, T.W. Biosynthesis of a head-to-tail cyclized protein with improved biological activity. *J. Am. Chem. Soc.*, (1999), 121, 5597

11.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 5^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] Στρογγύλης, Κ. Διερεύνηση, επιλογή και σύνθεση κατάλληλων περιοχών των καρδιακών ισομορφών των τροπονινών I και T για την ανάπτυξη εξειδικευμένων αντιδραστηρίων ανίχνευσής τους. *Διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης*, Ιωάννινα (2003)
- [2] Parker, J.M.R., Guo, D., Hodges, R.S., New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*, (1986), 25, 5425
- [3] Manavalan, P., Ponnuswamy, P.K. Hydrophobic character of amino acid residues in globular proteins. *Nature*, (1978), 275, 673
- [4] Janin, J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature*, (1979), 277, 491
- [5] Fauchere, J.L., Pliska, V. Hydrophobic parameters of amino acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino acid amides. *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.*, (1983) 18, 369
- [6] Kyte, J., Doolittle, R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, (1982) 157, 105
- [7] Welling, G.W., Weijer, W.J., van der Zee, R., Welling-Wester, S. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Letters*, (1985), 188, 215
- [8] Hopp, T.P., Woods, K.R., Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences (hydrophilicity analysis/protein conformation). *PNAS*, (1981), 78, 3824



- [9] Pettersson, I. Methods of epitope mapping. *Biol. Reports*, (1992), 16, 149
- [10] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, (1990), 215, 403
- [11] Altschul, S.F., Gish, W. Local alignment statistics, *Methods in Enzymology*, (1996), 266, 460
- [12] Pearson, W.R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *M. Enzymol.*, (1990) 183, 63
- [13] Pearson, W.R. Searching protein sequence libraries: comparison of the sensitivity and selectivity of the Smith-Waterman and FASTA algorithms. *Genomics*, (1991), 11, 635
- [14] Bairoch, A., Apweiler, R. The SWISS-PROT protein database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.*, (2000), 28, 45

11.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 6^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] NovaBiochem, www.novabiochem.com, Peptide resin loading protocols. Hydroxymethyl functionalized resins.
- [2] Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, (1970), 34, 595
- [3] Stathopoulos, P., Papas, S., Tsikaris, V. C-terminal N-alkylated peptides amides resulting from the linker decomposition of the Rink amide resin. A new cleavage mixture prevents their formation. *J. Peptide Sci.*, (2006), 12, 227
- [4] Lottspeich, F. High-performance liquid chromatography in protein chemistry. *Chromatographia*, (1986), 22, 7
- [5] Vydac, <http://www.vydac.com>, Analysis and purification of polypeptides by Reversed-Phase HPLC.
- [6] Kebarle, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrometry*, (2000), 35, 804
- [7] Μπαϊραχτάρη, Κ., Τσακάλωφ, Α. Μέθοδοι ιοντισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση στην υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών. *Χημικά Χρονικά*, (2002), 64, 106
- [8] Strongylis, C., Voidarou, C., Tsoukatos, D., Naka, K., Michalis, L., Soteriadou, K., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Tsikaris, V. Antibodies against sequences derived from cardiac troponins as tools for their detection in sera of patients with cardiovascular diseases. *4th Hellenic Forum on Bioactive Peptides*, (P.A. Cordopatis, E. Manessi-Zoupa and G.N. Pairas Eds.), TYPORAMA-Tachytypo Ltd, Patras, Greece, (2005), 217
- [9] Strongylis, C., Voidarou, C., Tsoukatos, D., Naka, K., Michalis, L., Soteriadou, K., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakareilos, C., Tsikaris, V. Development of new specific reagents



- ↘ for the detection of cardiac troponins in patient's sera with cardiovascular diseases *Program and Book of Abstracts of the 5th Conference of the Chemistry Department*, (2002), 81
- [10] **Στρογγύλης, Κ., Νάκα, Κ., Τσίκαρης, Β.** Σχεδιασμός και σύνθεση κατάλληλων ανοσογονικών συμπλεγμάτων για την ανάπτυξη αντιδραστηρίων ανίχνευσης καρδιακών τροπονινών. *Πρακτικά 20ου Πανελληνίου Συνεδρίου Χημείας, Ιωάννινα*, (2005), 233

11.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 7^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] **Stryer, L.** ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Τόμος II, Δεύτερη Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, (1997)
- [2] **Ternynck, T., Avrameas, S.**, Ανοσοενζυμικές Τεχνικές. Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Εκδόσεις Data Key Ε.Π.Ε. (1990), 61
- [3] **Avrameas, S., Guilbert, B.**, Enzyme-immunoassay for the measurement of antigens using peroxidase conjugates, *Biochimie*, (1972), 54, 837
- [4] **R.A., Abuknesha, Luk, C.Y., Griffith, H.H.M., Maragkou, A., Iakovaki, D.** Efficient labelling of antibodies with horseradish peroxidase using cyanuric chloride, *Journal of Immunological Methods*, (2005), 306, 211
- [5] **Ternynck, T., Avrameas, S.**, Ανοσοενζυμικές Τεχνικές. Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Εκδόσεις Data Key Ε.Π.Ε. (1990), 17
- [6] **Jakoby, W.B.** Crystallization as a purification technique. *Methods in Enzymology*, (1971), 22, 248
- [7] **Τσελέπης, Α.Δ., Τσουκάτος, Δ.Κ.** Θέματα κλινικής χημείας, Ιωάννινα (1997)
- [8] **Souteyrand, E., Martin, J.R., Martelet, C.** Direct detection of biomolecules by electrochemical impedance measurements. *Sens. Actuators B*, (1994), 20, 63
- [9] **Mantzila, A.G., Strongylis, C., Tsikaris V., Prodromidis, M.I.** Assessment of the interaction between a synthetic epitope of troponin C and its specific antibody using a label-free faradaic impedimetric immunosensor and α -keggin silicotungstic heteropolyacid as a redox probe. *Biosensors and Bioelectronics*, (2007), 23, 362



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

ΕΠΩΝΥΜΟ : ΣΤΡΟΓΓΥΛΗΣ
ΟΝΟΜΑ : ΚΩΝ/ΝΟΣ
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΕΡΑ : ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ : ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ : ΧΗΜΙΚΟΣ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : 23/07/1976
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : ΛΙΤΟΧΩΡΟ ΠΙΕΡΙΑΣ
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ : ΑΓΑΜΟΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ : ΑΝΘΕΩΝ 14, ΛΙΤΟΧΩΡΟ
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΟΙΚΙΑΣ : 2352 0 83043 (ΛΙΤΟΧΩΡΟ)
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ : 2651 0 98396 (ΙΩΑΝΝΙΝΑ)
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΓΡΑΦΕΙΟΥ : 2651 0 97330 (ΙΩΑΝΝΙΝΑ)
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΚΙΝΗΤΟ : 6937311175
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ : kostasstrongylis@gmail.com



ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ-ΣΠΟΥΔΕΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2003 Υποψήφιος Διδάκτορας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ : Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης

ΜΑΙΟΣ 2003 ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (MASTERS) στη Χημεία Βιομορίων και Βιοχημεία με θέμα:
"ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ, ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΩΝ
ΤΡΟΠΟΝΙΝΩΝ Ι ΚΑΙ Τ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥΣ"

ΜΑΡΤΙΟΣ 2001 Μεταπτυχιακός φοιτητής στο εγκεκριμένο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ) του
Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

1995-2000 ΠΤΥΧΙΟ ΧΗΜΙΚΟΥ από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Βαθμός πτυχίου: «Λίαν Καλώς» (6.65)

1994 Αποφοίτησή από το Γενικό Λύκειο Λιτοχώρου



ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

| | |
|---|--|
| 20/03/2007-ΣΗΜΕΡΑ | ΑΝΑΛΗΨΗ ΚΑΘΗΚΟΝΤΩΝ ΩΣ ΥΠΑΛΛΗΛΟΣ (Ι.Δ.Α.Χ. ΠΕ ΧΗΜΙΚΟΣ) ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ Η κατάταξη σε συσταθείσα οργανική θέση πραγματοποιήθηκε με την υπ' αριθμόν Πρυτανική Πράξη 12260/20-03-2007 (αριθμ. πρωτ. 11992) |
| 01/04/2005-31/12/2006 (21 ΜΗΝΕΣ) | ΣΥΜΒΑΣΗ ΑΝΑΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΥ <u>Συμμετοχή στο πρόγραμμα 61/1895</u> ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II Υπ 16. "ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΤΟΥ ΙΝΩΔΟΓΟΝΟΥ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΥΚΛΙΚΩΝ (S,S)-CDC-ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΠΤΙΔΟΜΙΜΗΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ" Επιστημονικός Υπεύθυνος: Αν. Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης |
| 01/07/2005-31/12/2005 (6 ΜΗΝΕΣ) | ΣΥΜΒΑΣΗ ΑΝΑΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΥ <u>Συμμετοχή στο ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα NOESIS</u> "PLATFORM FOR WIDE SCALE INTEGRATION AND VISUAL REPRESENTATION OF MEDICAL INTELLIGENCE" Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Λάμπρος Μιχάλης |
| 26/01/2005-30/06/2005 (5 ΜΗΝΕΣ) | ΣΥΜΒΑΣΗ ΑΝΑΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΥ <u>Συμμετοχή στο ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα NOESIS</u> "PLATFORM FOR WIDE SCALE INTEGRATION AND VISUAL REPRESENTATION OF MEDICAL INTELLIGENCE" Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Λάμπρος Μιχάλης |
| 01/03/2004-31/12/2004 (10 ΜΗΝΕΣ) | ΣΥΜΒΑΣΗ ΑΝΑΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΥ <u>Συμμετοχή στο ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα NOESIS</u> "PLATFORM FOR WIDE SCALE INTEGRATION AND VISUAL REPRESENTATION OF MEDICAL INTELLIGENCE" Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Λάμπρος Μιχάλης |
| 01/03/2004-31/08/2004 (6 ΜΗΝΕΣ) | ΣΥΜΒΑΣΗ ΑΝΑΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΥ <u>Συμμετοχή στο πρόγραμμα 61/1201</u> "ΠΑΡΟΧΗ ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΟΥ ΈΡΓΟΥ ΣΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ" Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Γεροθανάσης Ιωάννης |



| | |
|-----------------------|--|
| 01/01/2004-30/06/2004 | <p>ΣΥΜΒΑΣΗ ΑΝΑΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΥ</p> <p><u>Συμμετοχή στο πρόγραμμα 61/1566</u></p> <p>(6 ΜΗΝΕΣ)</p> <p>"ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ"</p> <p>Επιστημονικός Υπεύθυνος: Αν. Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης</p> |
| 01/05/2003-30/04/2005 | <p>ΣΥΜΒΑΣΗ ΑΝΑΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΥ</p> <p><u>Συμμετοχή στο πρόγραμμα 61/1404</u></p> <p>(24 ΜΗΝΕΣ)</p> <p>"ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΑΝΟΣΟΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ (ELISA) ΓΙΑ ΤΗΝ ΦΑΣΙΩΛΙΩΣΗ"</p> <p>Επιστημονικός Υπεύθυνος: Αν. Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης</p> |
| 01/01/2003-30/04/2003 | <p>ΣΥΜΒΑΣΗ ΑΝΑΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΥ</p> <p><u>Συμμετοχή στο πρόγραμμα 61/1206</u></p> <p>(4 ΜΗΝΕΣ)</p> <p>"ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΟ ΔΑΚΤΥΛΙΟ"</p> <p>Επιστημονικός Υπεύθυνος: Αν. Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης</p> |
| 01/11/2000-31/03/2001 | <p>ΣΥΜΒΑΣΗ ΑΝΑΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΥ</p> <p><u>Συμμετοχή στο πρόγραμμα ΕΠΕΤ II 97-ΕΚΒΑΝ-ΕΡΓΟ 61/0787</u></p> <p>(5 ΜΗΝΕΣ)</p> <p>"ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΙ in vivo ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ, ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ"</p> <p>Ανάδοχος : Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών</p> <p>Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Χ.Μ. Μουτσόπουλος</p> <p><u>Για το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων :</u></p> <p>Επιστημονικός Υπεύθυνος : Καθηγητής Κων/νος Σακαρέλλος (ΦΟΡΕΑΣ 4 , ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ , ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ)</p> |
| 01/07/1999-15/08/1999 | <p>Πρακτική άσκηση στη Μονάδα Βιολογικού Καθαρισμού (Κατερίνη)</p> |

ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΕΣ ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ

| | |
|------------|--|
| 14/02/2006 | Κατάταξη στο Κέντρο Εκπαίδευσης Εφοδιασμού Μεταφορών (Κ.Ε.Ε.Μ) ΕΔΥΕΘΑ 152/2005 |
| 04/07/2006 | Λοχίας (ΕΜ) με ειδικότητα Υπαξιωματικός Κινήσεως-Οδηγός Αυτοκινήτου |
| 14/02/2007 | Ολοκλήρωση των στρατιωτικών υποχρεώσεων και απόλυση από την 24 ^η Επιλαρχία Υποστηρίξεως (24 ΕΥΠ) ως Λοχίας (ΕΜ) με ειδικότητα Υπαξιωματικός Κινήσεως-Οδηγός Αυτοκινήτου |



ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- ✦ "Fasciola gigantica cathepsin L proteinase-based synthetic peptide for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis"
Jan Jezek, Rashika El Ridi, Mohamed Salah, Amal Wagih, Haidy W. Aziz, Hatem Tallima, Mohamed H. El Shafie, Tarek Abdel Khalek, Faten F. Abo Ammou, Constantinos Strongylis, Vassilios Moussis and Vassilios Tsikaris, *Biopolymers*, (2007), (*in press*)
- ✦ "Assessment of the interaction between a synthetic epitope of troponin C and its specific antibody using a label-free faradaic impedimetric immunosensor and α -Keggin silicotungstic heteropolyacid as a redox probe"
Aikaterini G. Mantzila, Constantinos Strongylis, Vassilios Tsikaris and Mamas I. Prodromidis, *Biosensors and Bioelectronics*, (2007), 23, 362
- ✦ "Synthetic Approaches for Total Chemical Synthesis of Proteins and Protein-like Macromolecules of Branched Architecture"
Serafim Papas, Constantinos Strongylis and Vassilios Tsikaris, *Current Organic Chemistry*, (2006), 10, 1727.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΚΑΙ ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΟ ΕΡΓΟ

| | |
|---|--|
| ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ ΈΤΗ 2002-2003, 2003-2004, 2004-2005 (Εαρινά εξάμηνα) | Επίβλεψη φοιτητών στα Προχωρημένα Ερευνητικά Εργαστήρια Οργανικής Σύνθεσης και στην Βιβλιογραφική-Εργαστηριακή Έρευνα του προγράμματος σπουδών του τμήματος Χημείας. |
| ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ ΈΤΗ 2002-2003, 2003-2004 | Επίβλεψη φοιτητών στα Εργαστήρια Οργανικής Χημείας I και II. |
| ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2003-2004 (Εαρινό εξάμηνο) | Επίβλεψη φοιτητών στα Εργαστήρια Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Εφαρμογών. |

ΧΡΗΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

- ✓ Αναλυτική Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης (Analytical RP-HPLC, Waters)
- ✓ Ημι-παρασκευαστική και Παρασκευαστική Υψηλής Απόδοσης Υγρή



✓ Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης (Semi-Preperative and Preperative RP-HPLC, Waters)

✓ Φασματογράφος Μάζας ElectronSpray Ionization σε συνδυασμό με Αναλυτική Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης (LC-MS) (Platform LC, Micromass, UK).

✓ Ανοσοενζυμική Τεχνική **ELISA**. Χειρισμός **ELISA READER**.

✓ Τεχνογνωσία και χειρισμός **SDS-PAGE** (Πολυακριλαμιδίου Gel Ηλεκτροφόρηση) εξοπλισμού.

✓ Τεχνογνωσία και χειρισμός **Western Blotting** (μεθοδολογία της ανοσοαποτύπωσης) εξοπλισμού.

✓ Τεχνογνωσία και χειρισμός **Affinity Chromatography** (Χρωματογραφία συγγένειας) εξοπλισμού.

ΓΛΩΣΣΕΣ

○ Αγγλικά: Πολύ καλή γνώση (Lower)

ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΣΕ Η/Υ

ΠΟΛΥ ΚΑΛΗ ΓΝΩΣΗ

✓ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ: Windows 95/98/Millennium/XP/Vista

✓ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΡΑΦΕΙΟΥ: Microsoft Office (MS Word 95/97/2000/XP/2007, MS Excel 95/97/2000/XP/2003/2007, Power Point 95/97/2000/XP/2003/2007)

✓ INTERNET: Χρήση Βιβλιογραφικών Βάσεων Δεδομένων μέσω του Διαδικτύου. Web Browsers (Explorer, Netscape, Mozilla Firefox, Opera)

✓ CHEMISTRY SOFTWARE: IsisDraw, ChemDraw, Omiga, Homology Computer Software (Fasta, Blast, Crystalw), Peptide Companion, MassLynx

✓ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΚΟΝΑΣ: Photoshop, CorelDraw, Adobe Illustrator, ACDSsee



**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ
ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ
ΚΑΤΑΡΤΙΣΗΣ**

**ΔΙΚΤΥΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗΣ, ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΗ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ**

"ΝΕΑ ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΒΙΩΣΙΜΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ"

**ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ : ΕΚΕΤΑ/ΙΤΧΗΔ – Εργαστήριο Περιβαντολογικών Καυσίμων και
Υδρογονανθράκων**

8-17 Δεκεμβρίου 2004

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ
ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ
ΔΙΕΘΝΗ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ
ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

54^ο ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

25-27 Οκτωβρίου 2002

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

3^ο ΕΛΛΗΝΙΚΟ FORUM ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

11-14 Απριλίου 2002

Πανεπιστήμιο Πατρών

4^ο ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

"Βασική και Εφαρμοσμένη Χημική Έρευνα"

16-18 Μαΐου 2001

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ORAL PRESENTATIONS

4TH HELLENIC FORUM ON BIOACTIVE PEPTIDES, PATRAS

22-24 April 2004

University of Patras

**"ANTIBODIES AGAINST SEQUENCES DERIVED FROM CARDIAC TROPONINS AS TOOLS FOR THEIR
DETECTION IN SERA OF PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES"**

**C. Strongylis, C. Voidarou, D. Tsoukatos, K. Naka, L. Michalis, K. Soteriadou, M. Sakarellos-
Daitsiotis, C. Sakarellos, V. Tsikaris, 4th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, (P.A.
Cordopatis, E. Manessi-Zoupa and G.N. Pairs Eds.), TYPORAMA-Tachytypo Ltd, Patras,
Greece, 2005, pp. 217-223.**

5TH CONFERENCE OF THE CHEMISTRY DEPARTMENT

25 YEARS OF THE CHEMISTRY DEPARTMENT OF THE UNIVERSITY OF IOANNINA (1997-2002)

"Basic and Applied Chemical Research"



22-24 October 2002

University of Ioannina

"DEVELOPMENT OF NEW SPECIFIC REAGENTS FOR THE DETECTION OF CARDIAC TROPONINS IN PATIENTS SERA WITH CARDIOVASCULAR DISEASES"

C. Strongylis, C. Voidarou, D. Tsoukatos, K. Naka, L. Michalis, K. Soteriadou, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, V. Tsikaris

Program and Book of Abstracts of the 5th Conference of the Chemistry Department, pp. 81-82.

POSTER PRESENTATIONS

29TH EUROPEAN PEPTIDE SYMPOSIUM

September 3-8, 2006

Gdansk, Poland.

"CARDIAC TROPONINS DERIVED CONJUGATES AS TOOLS FOR PRODUCING SPECIFIC ANTIBODIES: SYNTHESIS AND IMMUNE RESPONSE"

C. Strongylis, Ch. Papadopoulos, K. Naka, L. Michalis, K. Soteriadou, V. Tsikaris, *J. Peptide Sci.*, 2006, 12 (S1), 604.

5TH HELLENIC FORUM ON BIOACTIVE PEPTIDES, PATRAS

14-16 May 2006

University of Patras

"SYNTHESIS OF SEQUENTIAL OLIGOPEPTIDE CARRIER CONJUGATED SEQUENCES OF CARDIAC TROPONINS AS TOOLS FOR RAISING SPECIFIC ANTIBODIES"

C. Strongylis, Ch. Papadopoulos, K. Naka, L. Michalis, K. Soteriadou, V. Tsikaris, *5^o Hellenic Forum on Bioactive Peptides, Patras, Greece, Book of Abstracts*, 2006, pp. 76.

20^o ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σεπτέμβριος 20-23, 2005

Ιωάννινα, Ελλάς

"ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΤΡΟΠΟΝΙΝΩΝ"

Κ. Στρογγύλης, Κ. Νάκα και Β. Τσίκαρης, *Πρακτικά 20^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Χημείας*, Ιωάννινα, 2005, σελ. 233.

20^o ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σεπτέμβριος 20-23, 2005



Ιωάννινα, Ελλάς

"ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ 110-123 ΤΗΣ CATHEPSIN L1"

B. Μούσης, Κ. Στρογγύλης, Α. Σταυρακούδης, Κ. Σακαρέλλος και Β. Τσίκαρης, *Πρακτικά 20^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Χημείας, Ιωάννινα, 2005, σελ. 279.*

3RD INTERNATIONAL AND 28TH EUROPEAN PEPTIDE SYMPOSIUM

September 5-10 2004

Prague, Czech Republic

"SYNTHESIS OF THE CATHEPSIN-L1 110-123 EPITOPE CONJUGATED TO SEQUENTIAL OLIGOPEPTIDE CARRIER AND 1H-NMR CONFORMATIONAL ANALYSIS IN ITS FREE STATE"

V. Moussis, C. Strongyllis, A. Stavrakoudis, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, M. Thong Cung, R. El Ridi, V. Tsikaris, *J. Peptide Sci.*, 2004, 10 (S2), 276.

3RD INTERNATIONAL AND 28TH EUROPEAN PEPTIDE SYMPOSIUM

September 5-10 2004

Prague, Czech Republic

"DEVELOPMENT OF A NEW SENSITIVE IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF CARDIAC TROPONINS IN SERA OF PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES"

C. Strongyllis, C. Voidarou, D. Tsoukatos, K. Naka, L. Michalis, K. Soteriadou, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, V. Tsikaris, *J. Peptide Sci.*, 2004, 10 (S2), 293.

4TH HELLENIC FORUM ON BIOACTIVE PEPTIDES, PATRAS

22-24 April 2004

University of Patras

"SYNTHESIS OF A CATHEPSIN-L1 DERIVED SEQUENCE CONJUGATED ON SEQUENTIAL OLIGOPEPTIDE CARRIER AND 1H-NMR CONFORMATIONAL ANALYSIS IN ITS FREE STATE"

V. Moussis, C. Strongyllis, A. Stavrakoudis, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, M. Thong Cung, R. El Ridi, V. Tsikaris, 4th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, (P.A. Cordopatis, E. Manessi-Zoupa and G.N. Palaras Eds.), TYPORAMA-Tachytypo Ltd, Patras, Greece, 2005, pp. 327-330.

ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

- Επιστημονικά Βιβλία
- Μοτοσικλέτες



- Ορειβασία
- Υπολογιστές
- Internet
- Κινηματογράφος
- Μουσική

