



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ
ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ

ΤΡΥΠΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ
ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ

ΤΡΥΠΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 842^Α/ 23-3-2012

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 6-4-2012

Θέμα: «Ανάπτυξη Νέων Αντιαιμοπεταλιακών Παραγόντων και Διερεύνηση του Μηχανισμού Δράσης τους»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 909^Α / 22-5-2015

1. Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Μικρός Εμμανουήλ, Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ
6. Πάνου-Πομώνη Ευγενία, Αν. Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Κατσούρας Χρήστος, Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-6-2015

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος

Ελένη Αδαμαντίου



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

45110 ΙΩΑΝΝΙΝΑ

Καθηγητής Βασίλειος ΤΣΙΚΑΡΗΣ

E-mail: btsikari@cc.uoi.gr

Τηλ.: +2651008383

Ιωάννινα, 29 Ιουνίου 2015

Προς
το Τμήμα Χημείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Θέμα: «Απονομή Διδακτορικού Διπλώματος
στην κ. Παρασκευή Τρύπου»

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κ. Παρασκευής Τρύπου, συνήλθε σε δημόσια συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων στις 29 Ιουνίου 2015, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο: «Ανάπτυξη νέων αντιαμοπεταλιακών παραγόντων και διερεύνηση του μηχανισμού δράσης τους».

Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης. Κατόπιν αυτού η Επιτροπή αποφάσισε να απονεμίσει στην κ. Παρασκευή Τρύπου το Διδακτορικό Δίπλωμα Χημείας με βαθμό: **ΑΡΙΣΤΑ (ΔΕΚΑ)**

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Βασίλειος Τσίκαρης Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων Καθηγητής.
2. Δημόκριτος Τσουκάτος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων.
3. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων.
4. Εμμανουήλ Μικρός, Καθηγητής του Φαρμακευτικού Τμήματος, ΕΚΠΑ.
5. Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων.
6. Λάμπρο Μιχάλη, Καθηγητή Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Χρήστο Κατσούρα, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων.

*Στους γονείς μου
Μιχάλη & Φωτεινή
και στην αδελφή μου
Χρυσάνθη*

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2012-Ιούνιος 2015.

Κατά την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής, πολλοί άνθρωποι και με ποικίλους τρόπους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της. Φτάνοντας στην περάτωση της, θα ήθελα να αναφερθώ σε αυτούς τους ανθρώπους και να τους ευχαριστήσω θερμά για την σημαντική βοήθεια και στήριξη που μου πρόσφεραν στα διάφορα στάδια αυτής της διαδρομής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη για την πολύτιμη συνεισφορά του, την ηθική και ψυχολογική στήριξη που μου προσέφερε, όχι μόνο κατά την διάρκεια της διδακτορικής διατριβής αλλά για ολόκληρη την πορεία μου στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων. Η συνεργασία μου μαζί του αποτέλεσε για μένα έμπνευση, να αγαπήσω πραγματικά την Επιστήμη της Χημείας και να επιθυμώ να αφοσιωθώ σε αυτήν. Η συμβολή του στην υλοποίηση της παρούσας διατριβής υπήρξε καθοριστική και πολύτιμη από την ανάθεση του θέματος, την άμεση επίβλεψη στην διεξαγωγή των πειραμάτων, τη συγγραφή της ως και την ολοκλήρωση της. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση, την παρότρυνση και τα επιστημονικά εφόδια που μου προσέφερε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια. Κυρίως όμως αισθάνομαι την ανάγκη να τον ευχαριστήσω για την αμέριστη στήριξη του σε κάθε μικρή ή μεγάλη απόφαση μου αυτά τα χρόνια, τόσο σε επαγγελματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Ευελπιστώ στην πολύτιμη προσφορά των συμβουλών του και της στήριξης του και στο μέλλον, που είμαι σίγουρη ότι θα μου την προσφέρει όπως πάντα με χαμόγελο.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Δημόκριτο Τσουκάτο για την πολύτιμη βοήθεια του στην ανάπτυξη του θέματος της παρούσας διατριβής, για τον σχεδιασμό και την επίβλεψη της διεξαγωγής των βιολογικών πειραμάτων, καθώς και για την ουσιαστική του βοήθεια (με ατέλειωτες ώρες συζητήσεων) στην κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Κυρίως όμως, τον ευχαριστώ για την άμεση εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την ενθάρρυνση του, το αδιάκοπο ενδιαφέρον του, την πραγματική προθυμία του να με βοηθήσει σε κρίσιμες στιγμές και για την πάντα «ανοιχτή πόρτα» του γραφείου του.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Τσελέπη για το συνεχές ενδιαφέρον του στην εκπόνηση αυτής της εργασίας, για τις εύστοχες παρατηρήσεις του, για την μετάδοση των γνώσεων του και για την άψογη συνεργασία μας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Αναπλ. Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου-Πομώνη για το αμείωτο ενδιαφέρον της, την βοήθειά της, τις εύστοχες παρατηρήσεις της και το πολύ ευχάριστο κλίμα μέσα στο εργαστήριο αυτά τα χρόνια. Το Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων σίγουρα θα ήταν διαφορετικό χωρίς την παρουσία και τη συμβολή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν να μελετήσουν την παρούσα διατριβή και να συμμετάσχουν στην διαδικασία της δημόσιας παρουσίασης της.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω την Christilla Bachelot-Loza, ερευνήτρια του INSERM UMR_S 765, για τη θερμή υποδοχή στην ερευνητική ομάδα της και τη φιλοξενία της, τις πολύτιμες γνώσεις που μου πρόσφερε σε βιολογικές τεχνικές, τις σημαντικές

συμβουλές της και την άριστη συνεργασία μας. Ευχαριστώ πολύ τόσο την ίδια όσο και όλους τους συνεργάτες μου από το Παρίσι, για την πολύτιμη εμπειρία που μου προσέφεραν. Τους σκέφτομαι πάντα με χαμόγελο.

Ευχαριστώ θερμά την υποψήφια Διδάκτορα Στυλιανή Παπαδάκη και την Διδάκτορα Γκουρογιάννη Αλεξία, για την διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων, την προθυμία τους, το ευχάριστο κλίμα και για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους μου από το Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων και όχι μόνο. Ευχαριστώ τους Μάκη Παπά, Βασίλη Μούση, Ευγενία Φώτου, Μαργαρίτα Τσιρογιάννη, Κώστα Χιώνη, Ορνέλα Τζούμπα, Δημήτρη Κρικοριάν, Ελένη Μαλισσιώβα, Σοφία Σιδηροπούλου, Γιάννη Αγγελή, Ντίνα Ασημακίδου, Χριστίνα Μπάτση, Εύη Φώτου, Βασίλη Μιχαήλ και Μαρία Τσουμάνη, όχι μόνο για τη στήριξη και την βοήθεια αλλά επειδή με το γέλιο τους, το χιούμορ τους και την συμπαράσταση τους κατάφεραν ακόμα και τις δύσκολες στιγμές να τις μετατρέψουν σε πολύ όμορφες αναμνήσεις.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ξεχωριστά την φίλη μου Αθηνά Γκεσούλη, όπως επίσης και όλη την οικογένεια της για την αγάπη τους, τη φιλοξενία τους, τις συμβουλές τους, την αμέριστη στήριξη τους και την βοήθεια τους. Η φίλια μου με την Αθηνά ήταν στήριγμα για μένα όλα αυτά τα χρόνια.

Τους φίλους μου που αν και μακριά ήταν πάντα μαζί μου. Ευχαριστώ την Κατερίνα Σπυράτου, τη Στέλλα Ροΐδη και το μικρό μας Γιάννη που ήρθε στις ζωές μας το τελευταίο χρόνο και μας τις έκανε ομορφότερες.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την αδελφή μου Χρυσάνθη και τους γονείς μου Μιχάλη και Φωτεινή, όχι μόνο γιατί χωρίς την οικονομική και ηθική στήριξη τους η παρούσα διατριβή δεν θα μπορούσε να έχει επιτευχθεί αλλά γιατί πάντα με προέτρεπαν να μην συμβιβάζομαι, να θέτω στόχους και να τους κυνηγώ χωρίς ποτέ να κρίνουν αν ήταν ρεαλιστικοί ή αν τους εκπλήρωσα.

Τρύπου Βιβή
Ιωάννινα, 14/6/2015

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AA:	<i>Αραχιδινικό οξύ</i>
ACD:	<i>Acid-Citrate-Dextrose</i>
Acm:	<i>Ακεταμιδομεθυλομάδα</i>
ACN:	<i>Ακέτυλονιτρίλιο</i>
Ac₂O:	<i>Οξικός ανυδρίτης</i>
ADMIDAS:	<i>Παρακείμενη περιοχή στην MIDAS (adjacement to the MIDAS)</i>
ADP:	<i>Διφωσφορική αδενοσίνη</i>
Ala:	<i>Αλανίνη</i>
Arg:	<i>Αργινίνη</i>
Asn:	<i>Ασπαργίνη</i>
Asp:	<i>Ασπαρτικό οξύ</i>
ATP:	<i>Τριφωσφορική αδενοσίνη</i>
Boc:	<i>t-Βουτοξυκαρβονυλομάδα</i>
Bop:	<i>Βενζοτρίαζολ-οξύ-τρις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονιο εξαφθορο φωσφορικό άλας</i>
Bpoc:	<i>2-(π-Διφαινυλο)-2-προπυλοξυκαρβονυλομάδα</i>
Bum:	<i>t-βουτοξυμεθυλομάδα</i>
Bzl:	<i>Βενζυλομάδα</i>
c-AMP	<i>Κυκλικό AMP</i>
Cbz ή Z:	<i>Καρβοβενζοξυ-ομάδας</i>
2-Chlorotrityl-resin:	<i>2-χλωροτριφαίνυλο-ρητίνη</i>
CHO:	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
Cox:	<i>Κυκλοοξυγονάση</i>
CT:	<i>Κυτταροπλασματικός</i>
CVD:	<i>Cardiovascular disease, καρδιοαγγειακή νόσος</i>
Cys:	<i>Κυστεΐνη</i>
DAG:	<i>Διακυλογλυκερόλη</i>
DBU:	<i>1,8-διαζαδικυκλο[5,4,0]ενδεκα-7-ένιο</i>
DBF:	<i>Διφαινυλοφουβένιο</i>
DCC:	<i>Δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο</i>
DCM:	<i>Διχλωρομεθάνιο</i>
DIC:	<i>Διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο</i>
DIEA:	<i>Διϊσοπροπυλ-αιθυλ-αμίνη</i>
DKP:	<i>Δικετοπιπεραζίνη</i>
DMAP:	<i>4-διμεθυλο-αμινοπυριδίνη</i>
DMB:	<i>1,3-διμεθοξυβενζόλιο</i>
Dmb:	<i>2,4-διμεθοξυβενζυλομάδα</i>
DMF:	<i>Διμεθυλοφορμαμίδιο</i>
DMSO:	<i>Διμεθυλοσουλφοξείδιο</i>
DTT:	<i>Διθειοθρεϊτόλη</i>
ESI-MS:	<i>Φασματοσκοπία μάζας με ηλεκτροψεκασμό</i>
ERK:	<i>Κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα</i>
FAK:	<i>Κινάση εστιακής προσκόλλησης</i>
FBS:	<i>Ορός εμβρύου μόσχου</i>
FDA:	<i>Food & Drug Administration, Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων & Φαρμάκων</i>
FERM:	<i>Four-point-one/erzin/radixin/moesin homology domain</i>

Fg:	<i>Ινωδογόνο</i>
Fmoc:	<i>9-Φλουορενυλο-μεθυλοξυκαρβονυλομάδα</i>
Gi:	<i>G-πρωτεΐνη, αναστολέας αδενυλοκυκλάσης</i>
Gln:	<i>Γλουταμίνη</i>
Glu:	<i>Γλουταμινικό οξύ</i>
Gly:	<i>Γλυκίνη</i>
GP:	<i>Γλυκοπρωτεΐνη</i>
Gq:	<i>G-πρωτεΐνη που ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C</i>
HATU:	<i>Εξαφωσφορικό άλας της O-(7-αζαβενζοτρίαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας</i>
HBTU:	<i>Βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφθοροφωσφορικό άλας</i>
His:	<i>Ιστιδίνη</i>
HMPA:	<i>Εξαμεθυλοφωσφορικό αμίδιο</i>
HOAt:	<i>1-υδροξυ-7-αζαβενζοτρίαζόλιο</i>
HOBt:	<i>1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο</i>
HPLC:	<i>Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης</i>
5-HT:	<i>Σεροτονίνη</i>
I-EGF	<i>Περιοχή ανθεκτική στις πρωτεάσες (Epidermal Growth Factor)</i>
Ile:	<i>Ισολευκίνη</i>
IP:	<i>Ανοσοκαταβύθιση</i>
IP₃:	<i>Τριφωσφορικής ινοσιτόλης</i>
Leu:	<i>Λευκίνη</i>
LC-MS:	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy</i>
LIBS:	<i>Ligand Induced Binding Sites, Θέσεις πρόσδεσης επαγόμενες από το πρόσδεμα</i>
LIMBS:	<i>Επαγόμενη από πρόσδεμα περιοχή σύνδεσης μετάλλου</i>
Lys:	<i>Λυσίνη</i>
Mbh:	<i>4,4'-διμεθοξυβενζιδρυλομάδα</i>
Met:	<i>Μεθειονίνη</i>
MIDAS:	<i>Θέση πρόσδεσης εξαρτώμενη από μεταλλικό κατιόν</i>
Mmt:	<i>4-μεθοξυτριτυλομάδα</i>
mRNA:	<i>Αγγελιοφόρο RNA</i>
Mtr:	<i>4-Μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλοφαινυλο-σουλφονυλομάδα</i>
Mtt:	<i>4-μεθυλοτριτυλομάδα</i>
NbzI:	<i>2-νιτροβενζυλομάδα</i>
Nle:	<i>Νορλευκίνη</i>
NMR:	<i>Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός</i>
OAll:	<i>Αλλυλοξυομάδα</i>
OBzl:	<i>Βενζυλοξυομάδα</i>
ODie:	<i>2,3,4-τριμεθυλ-πεντ-3-οξυομάδα</i>
ODmab:	<i>1-(4,4-διμεθυλ-2,6-διοξο-κυκλοεξυλιδεν)3-μεθυλ-βουτυλ-βενζυλοξυομάδα</i>
OtBu:	<i>t-Βουτοξυομάδα</i>
Oxyma Pure:	<i>2-κυανο-2-(υδροξυϊμινο) οξικός αιθυλεστέρας</i>
Pal:	<i>Παλμιτόυλο ομάδα</i>
PAF:	<i>Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων</i>
PAR_s	<i>Protease Activated Receptor</i>

<i>Pbf</i> :	2,2,4,6,7-Πενταμεθυλο-διϋδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλ ομάδα
PBS :	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PDGF :	Αυξητικός παράγοντας
PF4 :	Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4
Phe :	Φαινυλαλανίνη
PI :	Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PIP₂ :	Διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PKC :	Πρωτεϊνική κινάση
PLC :	Φωσφολιπάση C
PLA₂ :	Φωσφολιπάση A ₂
Pmc :	2,2,5,7,8 Πενταμεθυλο-χρωμανο-6-σουλφονυλομάδα
Pro :	Προλίνη
PRP :	Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
PPP :	Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
PS :	Φωσφατιδυλοσερίνη
PTB :	Πρόσδεση φωσφοτυροσινών
PyBrop :	Βρωμο-τρεις-πυρολιδινο-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας
PyBOP :	Βενζοτριαζολ-οξυ-τρεις-πυρολιδίνο-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας
Rink Amide resin :	4-(2',4'-διμεθοξυφαινυλο-(9-φλουορενυλ-μεθοξυκαρβονυλ) αμινο μέθυλο)-φαινοξυ ρητίνη
Rpm :	Στροφές ανά λεπτό
Ser :	Σερίνη
SPPS :	Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση
SymBS :	Συνεργιστική περιοχή πρόσδεσης μεταλλικού ιόντος
TBTU :	Βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό άλας
tBu :	<i>t</i> -Βουτυλομάδα
TFA :	Τριφθοροξικό οξύ
THF :	Τετραϋδροφουράνιο
Thr :	Θρεονίνη
TIS :	Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο
Tmb :	2,4,6-τριμεθοξυβενζυλομάδα
Tmob :	2,4,6-τριμεθοξυβενζυλομάδα
TMP :	Κολλιδίνη (2,4,6 τριμεθυλοπυριδίνη)
Trp :	Τρυπτοφάνη
Trt :	Τριτυλομάδα
TS :	Θρομβοζάνη
TSP :	Θρομβοσπονδίνη
Tyr :	Τυροσίνη
T_xA₂ :	Θρομβοζάνη A ₂
Val :	Βαλίνη
vWF :	Παράγοντας von Willebrand
Wang resin :	<i>p</i> -αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη
Xan :	Ξανθενυλομάδα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σκοπός της εργασίας	1
A. Θεωρητικό Μέρος	
Κεφάλαιο 1° Αντιαιμοπεταλιακά Φάρμακα	
1.1 Εισαγωγή	5
1.2 Αιμοπετάλια	6
1.2.1 Μορφολογία αιμοπεταλίων	6
1.2.2 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων	8
1.2.2.1 Προσκόλληση των αιμοπεταλίων στον υπενδοθηλιακό χώρο	9
1.2.2.2 Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων	11
1.2.2.3 Σύσώρευση των αιμοπεταλίων	13
1.3 Αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα	15
1.3.1 Αναστολείς της κυκλοοξυγονάσης-1	16
1.3.2 Ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y ₁₂	17
1.3.2.1 Η οικογένεια των θειενοπυριδινών	18
1.3.2.2 Άμεσοι αναστρέψιμοι αναστολείς του υποδοχέα P2Y ₁₂	20
1.3.3 Οι αναστολείς των φωσφοδιεστερασών	22
1.3.4 Ανταγωνιστές του υποδοχέα της θρομβίνης PAR-1	22
1.3.5 Ανταγωνιστές του υποδοχέα αIIbβ3	24
Κεφάλαιο 2° Η Αιμοπεταλιακή Ιντεγκρίνη αIIbβ3	
2.1 Αιμοπεταλιακοί υποδοχείς	27
2.1.1 Ιντεγκρίνες	27
2.2 Η ιντεγκρίνη αIIbβ3	28
2.2.1 Η δομή της ιντεγκρίνης αIIbβ3	32
2.3 Ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αIIbβ3	36
2.3.1 Η έξω-μέσα σηματοδότηση της ιντεγκρίνης αIIbβ3	37
2.3.1.1 Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (ERK1/2)	40
2.3.2 Η μέσα-έξω σηματοδότηση της ιντεγκρίνης αIIbβ3	41
Κεφάλαιο 3° RGD Ανάλογα-Νέοι αIIbβ3 Ανταγωνιστές	
3.1 Η RGD αλληλουχία – Περιοχή αναγνώρισης των ιντεγκρινών	49
3.1.1 Η RGD αλληλουχία και η ιντεγκρίνη αIIbβ3	50
3.1.2 Περιορισμός χρήσης των RGD ανταγωνιστών του αIIbβ3 στην καθημερινή κλινική πράξη	53
3.2 Νέοι αIIbβ3 ανταγωνιστές	54
3.2.1 Ο αναστολέας RUC-1	55
3.2.2 Το 8/πεπτίδιο YMESRADR	56
3.2.3 Το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH ₂	58
3.3 Πεπτίδια που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα	59
Κεφάλαιο 4° Πεπτιδική Σύνθεση	
4.1 Εισαγωγή	63

4.2 Τα χαρακτηριστικά του πεπτιδικού δεσμού	64
4.3 Αρχές πεπτιδικής σύνθεσης	65
4.4 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση	66
4.5 Νέες τεχνολογίες στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση	70
4.6 Το στερεό πολυμερές υπόστρωμα	71
4.6.1 Η ρητίνη Wang	72
4.7 Προστασία και αποπροστασία α-αμινομάδας	74
4.8 Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων	76
4.8.1 Η προστασία της γουανιδομάδας της αργινίνης	76
4.8.2 Η προστασία της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού/γλουταμινικού οξέος	78
4.8.3 Η προστασία του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης	79
4.8.4 Η προστασία της υδροξυλομάδας σερίνης/τυροσίνης	80
4.8.5 Η προστασία της N ^ε – αμινομάδας της λυσίνης	80
4.9 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού	80
4.9.1 Τα καρβοδιίμδια	81
4.9.2 Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα	85
4.10 Δοκιμές χρωματομέτρησης ρητίνης	87
4.11 Αποκοπή πεπτιδίου από ρητίνη	88
4.12 Προβλήματα κατά τη διάρκεια επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας	90
4.12.1 Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου	90
4.12.2 Σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος	92
4.12.3 Σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης (DKP)	92
4.12.4 Ρακεμοποίηση	94
4.13 Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης πεπτιδίων	96
4.13.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC)	96
4.13.2 Φασματοσκοπία μάζας	97

B. Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 5^ο Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδικών αναλόγων	101
5.1.1 Αντιδραστήρια	101
5.1.1.1 Διαλύτες	101
5.1.1.2 Αντιδραστήρια σύζευξης	102
5.1.1.3 Προστατευμένα αμινοξέα	102
5.1.2 Γενική πορεία σύνθεσης	103
5.1.2.1 Σύζευξη αμινοξέων	105
5.1.2.2 Προστασίες παράπλευρων αλυσίδων των Fmoc προστατευμένων αμινοξέων	106
5.1.2.3 Αποπροστασία της N ^α προστατευτικής ομάδας	106
5.1.2.4 Test Kaiser	107
5.1.2.5 Αποκοπή πεπτιδίου από τη ρητίνη	108
5.1.2.6 Καθαρισμός, ταυτοποίηση και έλεγχος της καθαρότητας	108
5.2 Πειράματα μοριακής προσομοίωσης	109
5.3 Προσκόλληση CHO κυττάρων υπό ροή	110

5.3.1 Δημιουργία cDNAs μορίων, επιμόλυνση και δημιουργία σταθερών CHO κυτταρικών κλώνων	110
5.3.2 Καλλιέργεια και απομόνωση CHO κυττάρων	110
5.3.2.1 Αντιδραστήρια, υλικά, διαλύματα εργασίας και όργανα	110
5.3.2.2 Πειραματική πορεία ανακαλλιέργειας CHO κυττάρων	112
5.3.2.3 Πειραματική πορεία ψύξης CHO κυττάρων σε υγρό άζωτο	113
5.3.2.4 Πειραματική πορεία αναδιασποράς CHO κυττάρων μετά την απόψυξη από υγρό άζωτο	114
5.3.2.5 Προσδιορισμός της έκφρασης της ιντεγκρίνης αIIbβ3 στα CHO κύτταρα	114
5.3.2.6 Πειραματική πορεία προσκόλλησης CHO κυττάρων υπό ροή	114
5.4 Συσσωρευομετρία	115
5.4.1 Αρχή μεθόδου συσσωρευομετρίας	115
5.4.2 Αντιδραστήρια, υλικά, διαλύματα εργασίας και όργανα	115
5.4.3 Πειραματική πορεία	118
5.4.3.1 Τα πεπτιδικά ανάλογα πριν τον έλεγχο της ανασταλτικής δράσης τους	118
5.4.3.2 Παραλαβή αίματος	119
5.4.3.3 Παρασκευή πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια ανθρώπου (Platelet Rich Plasma, PRP) - Έλεγχος ανασταλτικής δράσης πεπτιδίων με πειράματα συσσωρευομετρίας σε PRP ανθρώπου	119
5.4.3.4 Παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων - Έλεγχος ανασταλτικής δράσης πεπτιδίων με πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου	120
5.5 Κυττρομετρία ροής	121
5.5.1 Εισαγωγή	121
5.5.2 Πειραματική πορεία	122
5.5.2.1 Αντιδραστήρια, υλικά, διαλύματα εργασίας και όργανα	122
5.5.2.2 Επίδραση πεπτιδικών αναστολέων στην έκφραση του PAC-1-FITC, και στην πρόσδεση των Fg-FITC και AP5	123
5.5.2.3 Επεξεργασία αποτελεσμάτων	124
5.6 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)	124
5.6.1 Εισαγωγή	124
5.6.2 Πειραματική πορεία	125
5.6.2.1 Αντιδραστήρια και διαλύματα εργασίας	125
5.6.2.2 Πειραματική πορεία λύσης αιμοπεταλίων	126
5.6.2.3 Επίδραση των πεπτιδικών αναστολέων στη φωσφορυλίωση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών	126
Κεφάλαιο 6^ο Αποτελέσματα	
6.1 Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων	123
6.1.1 Πειραματική πορεία σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης πεπτιδικών αναλόγων	127
6.1.1.1 Σύνθεση πεπτιδίου RMESRADR	129
6.1.1.2 Σύνθεση πεπτιδίου HMESRADR	131
6.1.1.3 Σύνθεση πεπτιδίου γMESRADR	133
6.1.1.4 Σύνθεση πεπτιδίου MESRADR	135

6.1.1.5 Σύνθεση πεπτιδίου Ac-YMESRADR	138
6.1.1.6 Σύνθεση πεπτιδίου Ac-FMESRADR	140
6.1.1.7 Σύνθεση πεπτιδίου YMESRADH	142
6.1.1.8 Σύνθεση πεπτιδίου RMESRADH	145
6.1.1.9 Σύνθεση πεπτιδίου FMESRADH	147
6.1.1.10 Σύνθεση πεπτιδίου YMESRADK	150
6.1.1.11 Σύνθεση πεπτιδίου RMESRADK	152
6.1.1.12 Σύνθεση πεπτιδίου FMESRADK	154
6.1.1.13 Σύνθεση πεπτιδίου YMDSRADR	157
6.1.1.14 Σύνθεση πεπτιδίου RMDSRADR	159
6.1.1.15 Σύνθεση πεπτιδίων KMESRADR και FMESRADR	161
6.2 Αποτελέσματα υπολογιστικών μεθόδων του υποδοχέα αΙΙbβ3	165
6.3 Επίδραση πεπτιδικών αναλόγων YMESRADR και YMESRAAR στη προσκόλληση CHO κυττάρων στο ινωδογόνο, υπό συνθήκες ροής	167
6.4 Αποτελέσματα επίδρασης του μητρικού αναλόγου YMESRADR στην έκθεση των LIBS	170
6.5 Μελέτη της ανασταλτικής δράσης τροποποιημένων πεπτιδικών αναλόγων της αΙΙb αλληλουχίας 313-320 της ιντεγκρίνης αΙΙbβ3	171
6.5.1 Μελέτη της ανασταλτικής δράσης των τροποποιημένων με Ala 8/πεπτιδίων	171
6.5.2 Μελέτης της ανασταλτικής δράσης τροποποιημένων πεπτιδικών αναλόγων της αΙΙb αλληλουχίας 313-320	172
6.5.2.1 Αποτελέσματα πειραμάτων συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια	172
6.5.2.2 Αποτελέσματα πειραμάτων συσσωρευομετρίας σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια ανθρώπου (PRP)	179
6.6 Μελέτη της επίδρασης τροποποιημένων πεπτιδικών αναλόγων της αΙΙb αλληλουχίας 313-320 στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αΙΙbβ3 με χρήση κυτταρομετρίας ροής	186
6.7 Επίδραση τροποποιημένων πεπτιδικών αναλόγων της αΙΙb αλληλουχίας 313-320 στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αΙΙbβ3 στη φωσφορυλίωση της ERK κινάσης	189
Κεφάλαιο 7ο Συζήτηση αποτελεσμάτων – Συμπεράσματα	191
Περίληψη	203
Abstract	205
Βιβλιογραφία	207
Ανακοινώσεις σε συνέδρια – Δημοσιεύσεις	233
Παράρτημα	237

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως. Παρόλο όμως τα ανησυχητικά στατιστικά στοιχεία, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική μείωση της θνησιμότητας που προέρχεται από τα νοσήματα αυτά. Διάφοροι παράγοντες συνέβαλαν σε αυτή τη μείωση, ένας από αυτούς είναι η ανάπτυξη αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων. Ιδιαίτερη σημασία στην ανάπτυξη αυτών, αποτελεί ο κεντρικός ρόλος που κατέχει η αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη αIIbβ3 στο τελικό στάδιο συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Οι ανταγωνιστές της ιντεγκρίνης αIIbβ3 δεν παρεμβαίνουν σε ένα από τα πολλαπλά βιοχημικά μονοπάτια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων αναστέλλοντας τη συσσώρευση από ένα μόνο συγκεκριμένο αγωνιστή των αιμοπεταλίων αλλά αναστέλλουν το τελικό στάδιο συσσώρευσης αυτών ανεξάρτητα από τον αγωνιστή που την προκαλεί. Επομένως, η στόχευση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 αποτελεί μια πολύ καλή στρατηγική για την ανάπτυξη αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων.

Οι περισσότεροι ανταγωνιστές του αIIbβ3 που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη ή έχουν μελετηθεί, είτε πειραματικά είτε σε κλινικές μελέτες, δεσμεύονται στις περιοχές του υποδοχέα που αναγνωρίζουν την RGD αλληλουχία. Τα τελευταία χρόνια όμως, η χρήση των RGD ανταγωνιστών στην καθημερινή κλινική πράξη έχει περιοριστεί σημαντικά επειδή παρουσιάζουν αυξημένο αιμορραγικό κίνδυνο.

Έχει βρεθεί ότι οι RGD ανταγωνιστές προσδένονται σε περιοχές του υποδοχέα αIIbβ3 διαμέσου των οποίων επιφέρουν τη διαμορφωτική αλλαγή του τελευταίου, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν ένα καταρράκτη βιοχημικών αντιδράσεων μέσα στο κύτταρο που στο σύνολό τους είναι γνωστές ως σηματοδότηση «έξω-μέσα», γεγονός που οδηγεί στην περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επίσης δεν εμφανίζουν εξειδίκευση για τον αIIbβ3 αφού αναγνωρίζονται και από άλλους υποδοχείς-ιντεγκρίνες, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα και άλλων κυττάρων εκτός των αιμοπεταλίων. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητή η ανάγκη ανάπτυξης νέων ανταγωνιστών της ιντεγκρίνης αIIbβ3.

Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, έχουμε δείξει ότι το 8/πεπτίδιο YMESRADR που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 313-320 της αIIb υπομονάδας του υποδοχέα αIIbβ3, αποτελεί ισχυρό αναστολέα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Ενώ από τα αποτελέσματα πειραμάτων μας *in vivo* σε κουνέλια, επιβεβαιώθηκε η αρχική

μας παρατήρηση ότι το 8/πεπτιδίο δρα με μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν των RGD αναλόγων καθώς και των ανταγωνιστών του αIIbβ3 που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη.

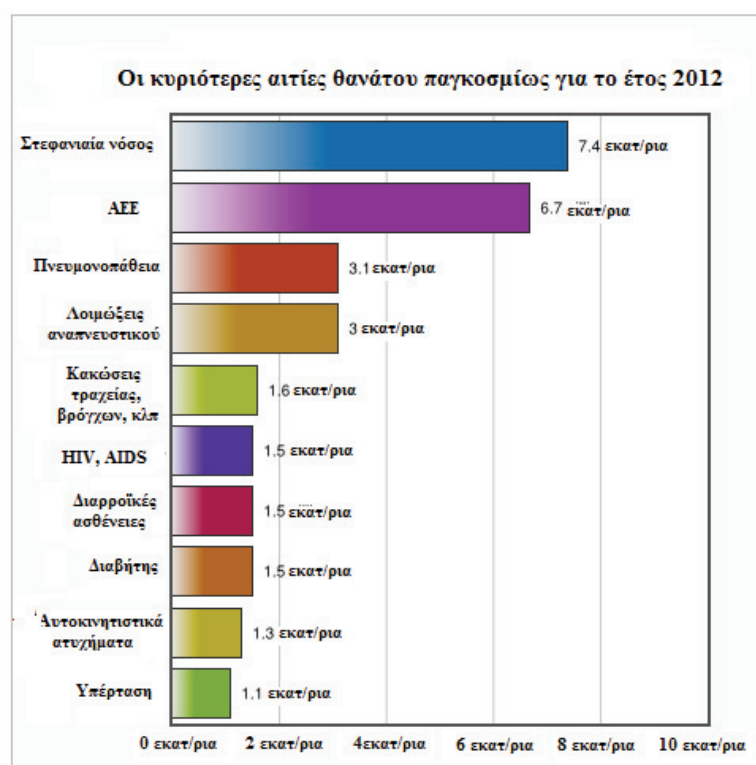
Σκοπός της παρούσης διατριβής είναι η διερεύνηση του τρόπου δράσης του 8/πεπτιδίου $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$. Στο πλαίσιο του στόχου αυτού, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπολογιστικών μεθόδων προσομοίωσης της αλληλεπίδρασης του 8/πεπτιδίου με τον υποδοχέα στην κεκαμμένη διαμόρφωση του. Στη βάση των ευρημάτων της μελέτης αυτής, σχεδιάστηκαν: α) βιολογικά πειράματα επιβεβαίωσης που στηρίχθηκαν στη χρήση κλώνων CHO κυττάρων που εκφράζουν την ιντεγκρίνη αIIbβ3 άγριου τύπου καθώς και με επιλεγμένες μεταλλάξεις στις δυο υπομονάδες, και β) πεπτιδικά ανάλογα με τροποποιήσεις στα αμινοξικά κατάλοιπα που εκτιμήθηκε ότι συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του 8/πεπτιδίου με τον υποδοχέα αIIbβ3 (Πίνακας που ακολουθεί).

1.	$^{313}\text{YMESRADR}^{320}$	ΜΗΤΡΙΚΟ ΑΝΑΛΟΓΟ
2.	$^{313}\text{RMESRADR}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{R}$
3.	$^{313}\text{HMESRADR}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{H}$
4.	$^{313}\text{KMESRADR}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{K}$
5.	$^{313}\text{FMESRADR}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{F}$
6.	$^{313}\text{yMESRADR}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{y}$
7.	$^{313}\text{Ac-YMESRADR}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{Ac-Y}$
8.	$^{313}\text{Ac-FMESRADR}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{Ac-F}$
9.	$^{314}\text{MESRADR}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{--}$
10.	$^{313}\text{YMESRADH}^{320}$	$^{320}\text{R} \rightarrow \text{H}$
11.	$^{313}\text{YMESRADK}^{320}$	$^{320}\text{R} \rightarrow \text{K}$
12.	$^{313}\text{YMDSRADR}^{320}$	$^{315}\text{E} \rightarrow \text{D}$
13.	$^{313}\text{RMESRADH}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{R}, ^{320}\text{R} \rightarrow \text{H}$
14.	$^{313}\text{FMESRADH}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{F}, ^{320}\text{R} \rightarrow \text{H}$
15.	$^{313}\text{RMESRADK}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{R}, ^{320}\text{R} \rightarrow \text{K}$
16.	$^{313}\text{FMESRADK}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{F}, ^{320}\text{R} \rightarrow \text{K}$
17.	$^{313}\text{RMDSRADR}^{320}$	$^{313}\text{Y} \rightarrow \text{R}, ^{315}\text{E} \rightarrow \text{D}$

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την κύρια αιτία απώλειας ζωής παγκοσμίως. Το 2012, το 30% του συνόλου των θανάτων παγκοσμίως, αποδόθηκε στα καρδιαγγειακά νοσήματα (17,5 εκατομμύρια), για τα 7,4 εκατομμύρια ευθυνόταν η στεφανιαία νόσος ενώ για τα 6,7 εκατομμύρια τα αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια [1] (Σχήμα 1.1). Επιπλέον, σύμφωνα με τις στατιστικές αναλύσεις της American Heart Association, κατά το έτος 2012 οι καρδιαγγειακές παθήσεις οδήγησαν σε περισσότερους θανάτους σε σύγκριση με το σύνολο από αυτούς που προήλθαν από καρκίνο, λοιμώξεις του αναπνευστικού και από ατυχήματα [2, 3]. Και στην Ευρώπη όμως, τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την κύρια αιτία πρόωρου θανάτου (πριν την ηλικία των 65 χρόνων), αγγίζοντας περίπου το 50% του συνόλου αυτών, ενώ εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία με μόλις 20% [4]. Στην Ελλάδα, βάσει των δημοσιευμένων δεδομένων, το 2009, τα ποσοστά θνησιμότητας για τα καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν 251,6 ανά 100.000 άτομα [3].



Σχήμα 1.1: Οι κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως για το έτος 2012 [1].

Παρόλο όμως τα ανησυχητικά στατιστικά στοιχεία, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην αντιμετώπιση των καρδιοαγγειακών παθήσεων. Σε μια πρόσφατη μελέτη, αναφέρθηκε μείωση της θνησιμότητας των καρδιοαγγειακών νοσημάτων σε ποσοστό 30,6% μεταξύ των ετών 1998 και 2008 [3]. Παρά όμως το γεγονός ότι τα ποσοστά απώλειας ζωής έχουν μειωθεί, η επιβάρυνση και οι δραματικές συνέπειες της νόσου παραμένουν σε υψηλά επίπεδα [5]. Διάφοροι παράγοντες συνέβαλαν σε αυτή τη μείωση, όπως η βελτίωση των διαγνωστικών και επεμβατικών διαδικασιών, η υιοθέτηση ενός υγιεινότερου τρόπου ζωής αλλά και η ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων έχει ιδιαίτερα συντελέσει ο αποδεδειγμένος πλέον κεντρικός ρόλος που κατέχει η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο σχηματισμό του θρόμβου.

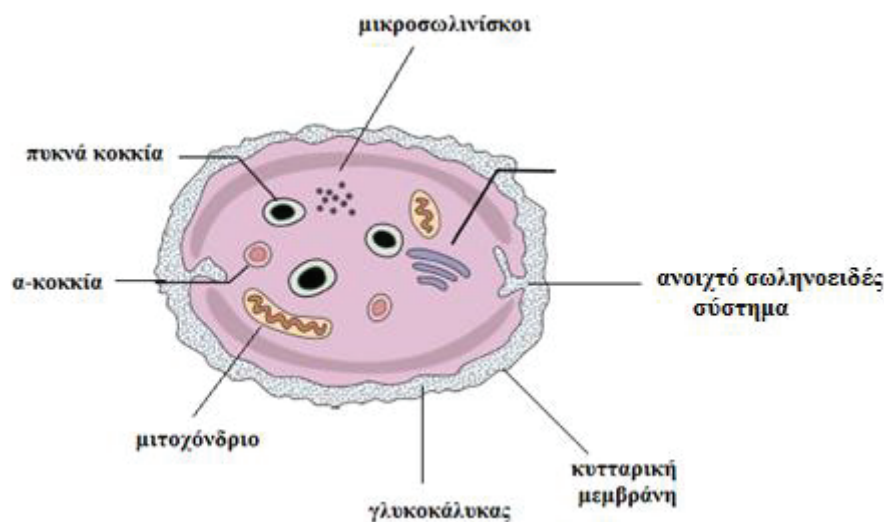
1.2 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

1.2.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Τα αιμοπετάλια δημιουργούνται στο μυελό των οστών από τη θραυσματοποίηση του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων, έχουν δισκοειδή μορφή με διάμετρο 2-3μm, ο αριθμός τους στο αίμα κυμαίνεται από 150.000-450.000 κύτταρα ανά mm³ (μl) αίματος και η φυσιολογική διάρκεια ζωής τους είναι μεταξύ 7-10 ημερών, όπου στη συνέχεια καταστρέφονται από τα μακροφάγα του ήπατος και του σπλήνα [6, 7]. Τα αιμοπετάλια είναι απύρρηνα και για το λόγο αυτό έχουν ελάχιστη ικανότητα για σύνθεση πρωτεϊνών, παρόλα αυτά περιέχουν διάφορα οργανίδια και κοκκία, τα οποία είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του αιμοπεταλίου και τη διατήρηση της φυσιολογικής αιμόστασης. Στη συνέχεια περιγράφεται συνοπτικά η δομή και τα σημαντικότερα συστατικά των αιμοπεταλίων (Σχήμα 1.2).

Η **περιφερική ζώνη** αποτελείται από τη κυτταρική μεμβράνη και το γλυκοκάλυκα. Ο **γλυκοκάλυκας**: περιβάλλει τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων και αποτελείται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια. Τα μόρια σιαλικού οξέος που είναι συνδεδεμένα στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια, προσδίδουν στη μεμβράνη ηλεκτρ αρνητικό φορτίο, που αποτρέπει την προσκόλληση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της κυκλοφορίας τους [8]. **Κυτταροπλασματική μεμβράνη**: Εμφανίζει δομή φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας, στην οποία βρίσκονται βυθισμένες αρκετές γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια και χοληστερόλη. Σε αντίθεση με τα αιμοπετάλια, τα ερυθροκύτταρα εμφανίζουν αυτά τα συστατικά στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης, και ίσως αυτό το γεγονός να προσδίδει στα αιμοπετάλια τις πολλές και ποικίλες λειτουργίες τους στο

ανθρώπινο σώμα. Οι αντλίες νατρίου – ασβεστίου τριφωσφορικής αδενοσίνης ελέγχουν το ενδοκυτταρικό ιοντικό περιβάλλον του αιμοπεταλίου, ενώ η μη συμμετρική κατανομή των φωσφολιπιδίων διατηρούν την επιφάνεια σε μια μη προθρομβωτική κατάσταση. Η ασύμμετρη κατανομή των φωσφολιπιδίων διατηρείται από ATP-εξαρτώμενες τρανσλοκάσες (flippases) που έχουν τη δυνατότητα να μετακινούν τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια από την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης στην εσωτερική [7, 9]. Επίσης αποτελείται από διάφορους διαμεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι προσδένονται σε μια πληθώρα αγωνιστών [7, 10].



Σχήμα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων συστατικών των αιμοπεταλίων [11].

Η **δομική ζώνη** είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση του δισκοειδούς σχήματος του αιμοπεταλίου [12] και αποτελείται από τρία κύρια δομικά συστατικά, έναν μεμβρανικό σκελετό βασισμένο στη σπεκτρίνη (spectrin), ένα σπείραμα από μικροσωληνίσκους και ένα δίκτυο από μικροϊνίδια ή ινίδια ακτίνης [7].

Η **ζώνη των οργανιδίων** περιέχει τρεις τύπους αποθηκευτικών κοκκίων, τα α-κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσώματα (λ-κοκκία). Τα α-κοκκία έχουν σφαιρικό σχήμα, προέρχονται από το δίκτυο Golgi [13], είναι τα κυριότερα κοκκία των αιμοπεταλίων (50-80/ αιμοπετάλιο) και περιέχουν σημαντικές πρωτεΐνες [14]. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF4), η β-θρομβοσφαιρίνη, ο αυξητικός παράγοντας (PDGF) και η P-σελεκτίνη (CD62), η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα και το ενδοθήλιο. Επίσης στα α-

κοκκία εμφανίζονται και υποδοχείς, όπως η ιντεγκρίνη $\alpha\text{IIb}\beta_3$, ο υποδοχέας GPVI [10], [15]. Τα πυκνά κοκκία είναι λιγότερα σε αριθμό από τα α -κοκκία (4-8/αιμοπετάλιο), περιέχουν ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} , σεροτονίνη, διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) [11, 16]. Τα λυσosώματα είναι μικρά οργανίδια που περιέχουν διάφορα ένζυμα, όπως η β -γαλακτοσιδάση, η β -γλυκουρουνιδάση και άλλες όξινες υδρολάσες [16]. Η απελευθέρωση των συστατικών των λ-κοκκίων απαιτεί ισχυρό αγωνιστή, όπως θρομβίνη ή υψηλή συγκέντρωση κολλαγόνου, ενώ τα συστατικά των υπόλοιπων κοκκίων μπορούν να απελευθερωθούν και με την επίδραση ασθενέστερων αγωνιστών [17].

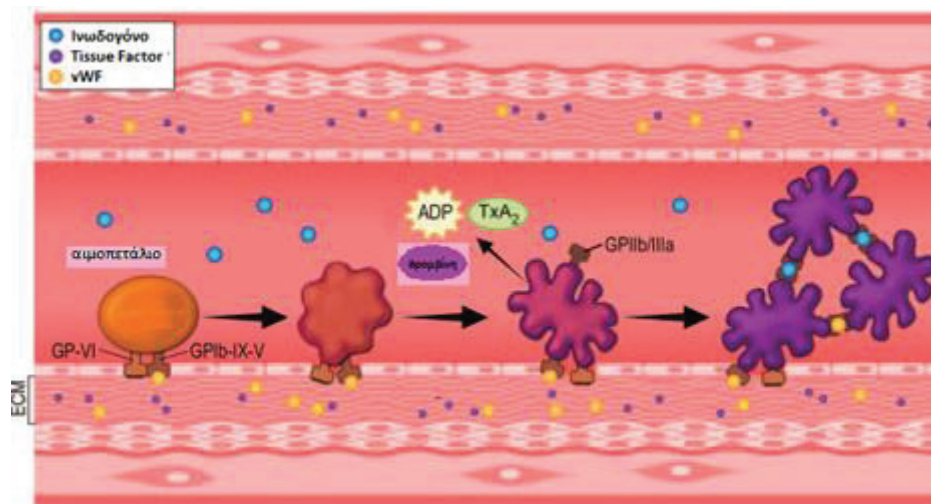
Η **ζώνη μεμβρανικού συστήματος** αποτελείται από δυο σωληνοειδή συστήματα, το ανοιχτό σωληνοειδές σύστημα (OCS) και το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (DTS). Το OCS επιτρέπει τη σύνδεση του κυτοσολίου με το περιβάλλοντα χώρο και εξυπηρετεί σε σημαντικές λειτουργίες του αιμοπεταλίου. Διαμέσου αυτού πραγματοποιείται η πρόσληψη ουσιών στο αιμοπετάλιο και επίσης η απελευθέρωση των συστατικών των κοκκίων στην εξωτερική επιφάνεια [18]. Επιπλέον το OCS λειτουργεί και ως χώρος αποθήκευσης για τις μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες [19]. Το DTS είναι ένα κλειστό διαυλικό σύστημα, το οποίο αποθηκεύει ασβέστιο και ένζυμα σημαντικά για τον έλεγχο της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, όπως η c-AMP [7, 20]. Επίσης στο DTS εντοπίζονται υποδοχείς της τριφωσφορικής ινoσιτόλης (IP_3) και είναι το κύριο οργανίδιο που συμμετέχει στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (AA) [21].

1.2.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Η αιμόσταση είναι ο φυσιολογικός μηχανισμός άμυνας που αποσκοπεί στην επίσχεση της αιμορραγίας από μικρές ή μεγάλες βλάβες των αιμοφόρων αγγείων αλλά και στη διατήρηση ανοικτού του αυλού των αγγείων για την ομαλή ροή του αίματος. Πραγματοποιείται μέσω τριών βασικών μηχανισμών: α) αγγειοσυστολή που περιορίζει την αιμορραγία, β) σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου (λευκού θρόμβου) στη περιοχή της βλάβης και γ) πήξη του αίματος που αποτελεί τη κύρια άμυνα κατά της αιμορραγίας [22]. Η συμμετοχή των αιμοπεταλίων στο μηχανισμό της αιμόστασης αποτελεί και τη σημαντικότερη λειτουργία τους (Σχήμα 1.3).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν σε μη ενεργοποιημένη μορφή, χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αλλά ούτε και με το ενδοθήλιο. Στη

περίπτωση όμως ενδοθηλιακής βλάβης και η αδυναμία των αιμοπεταλίων να διακρίνουν μεταξύ ενός τραυματισμένου αγγείου και μιας θρομβογενούς επιφάνειας, έχουν ως συνέπεια το σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου [23]. Η προσκόλληση, η ενεργοποίηση, η αποκοκκίωση, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τέλος ο σχηματισμός αιμοπεταλιακού θρόμβου σε περιοχές αθηρωματικών πλακών που έχουν υποστεί ρήξη, θεωρούνται οι κύριες αιτίες ασταθούς στηθάγχης και εμφράγματος μυοκαρδίου [24]. Εξαιτίας, λοιπόν του κεντρικού ρόλου που κατέχουν τα αιμοπετάλια στη θρόμβωση, η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία αποτελεί μια ουσιαστική παρέμβαση σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο (στηθάγχη, οξεία στεφανιαία νοσήματα, εγκεφαλικά θρομβωτικά μη εμβολικά επεισόδια, περιφερική αρτηριακή νόσος) [25].

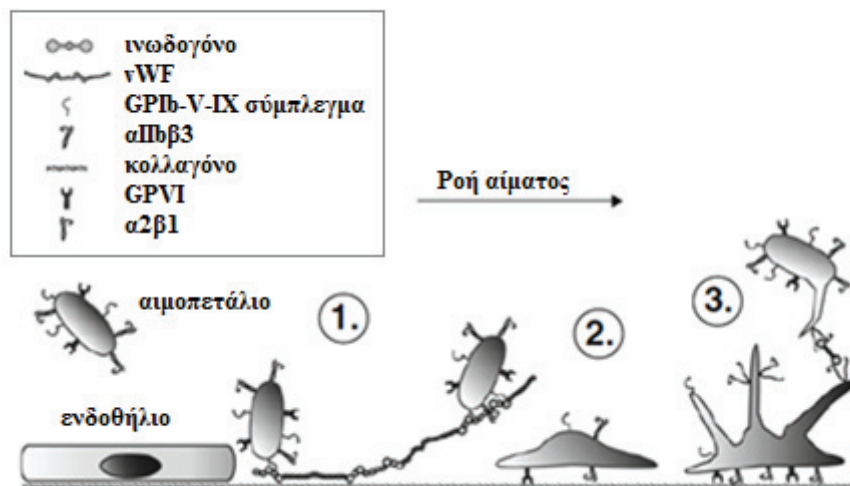


Σχήμα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας [26].

1.2.2.1 Η ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΤΟΝ ΥΠΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟ ΧΩΡΟ

Η ταχύτητα της ροής του αίματος στο εσωτερικό των αγγείων είναι τέτοια ώστε τα αιμοπετάλια, εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους, τείνουν να βρίσκονται στην περιφέρεια της ροής του αίματος, κοντά στο αγγειακό τοίχωμα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν σε μη ενεργοποιημένη μορφή και δεν μπορούν να προσκολληθούν στο αρτηριακό τοίχωμα, ούτε να συσσωρευτούν μεταξύ τους. Στην περίπτωση όμως τραυματισμού του αρτηριακού τοιχώματος προκαλείται λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου, που καλύπτει το εσωτερικό του αγγειακού τοιχώματος. Η λύση της συνέχειας του έσω χιτώνα του τοιχώματος μιας αρτηρίας έχει ως συνέπεια την έκθεση

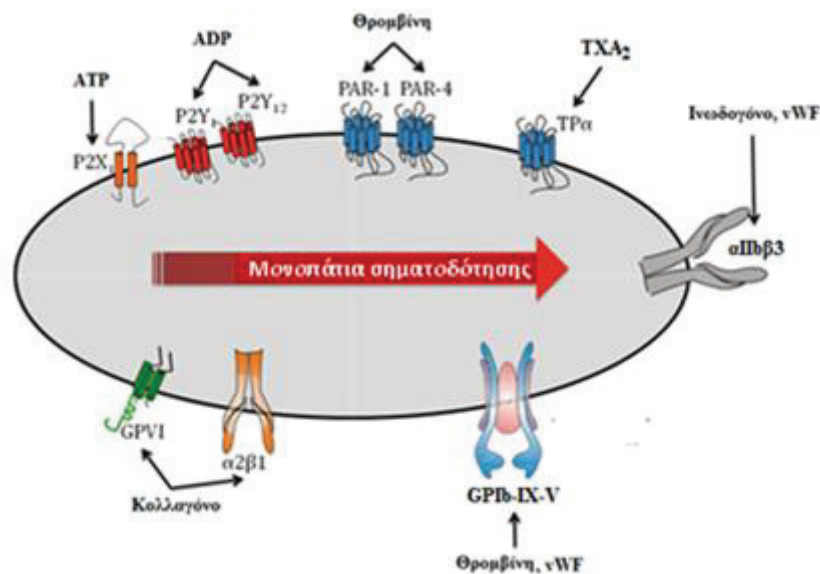
στον ενδοαγγειακό χώρο συστατικών του υπενδοθηλιακού χώρου όπως είναι το κολλαγόνο, η βιτρονεκτίνη, η φιβρονεκτίνη και ο παράγοντας Von Willebrand (vWF), τα οποία αναγνωρίζονται από υποδοχείς της οικογένειας των ιντεγκρινών που βρίσκονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων [27, 28]. Τα αιμοπετάλια αρχικά προσδένονται στον ακινητοποιημένο παράγοντα vWF δια μέσου του αιμοπεταλιακού υποδοχέα GPIb [29]. Ο υποδοχέας αυτός βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων με τη μορφή συμπλόκου με τις γλυκοπρωτεΐνες IX και V και ως συνέπεια αυτής της δέσμευσης, ο παράγοντας vWF μεταβαίνει από την ανενεργή στην ενεργοποιημένη διαμόρφωση του [30]. Στη συνέχεια, η αρχική αυτή ασθενής πρόσδεση, σταθεροποιείται με τη πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο διαμέσου των υποδοχέων της GPVI και GPIIb/IIIa (ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$) [31, 32] αλλά και με άλλα συστατικά του υπενδοθηλιακού χώρου (βιτρονεκτίνη, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη). Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο και στα άλλα συστατικά επάγει με τη σειρά της την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη ενδοκυττάρων μεταβολικών οδών, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4: Σχηματική απεικόνιση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν σε μη ενεργοποιημένη μορφή. 1) Μετά την αγγειακή βλάβη, τα αιμοπετάλια προσδένονται στον παράγοντα vWF δια μέσου του υποδοχέα GPIb. 2) Στη συνέχεια τα αιμοπετάλια προσδένονται στο κολλαγόνο μέσω του υποδοχέα $\alpha_2\beta_1$. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. 3) Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια υφίστανται αλλαγή σχήματος, χάνουν την δισκοειδή τους μορφή και εκβάλλουν προεξοχές της κυτταρικής τους μεμβράνης, τα ψευδοπόδια. Εκκρίνουν τα περιεχόμενα των πυκνών και α -κοκκίων τους, γεγονός που οδηγεί στη περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Στις παθολογικές αυτές καταστάσεις, ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ ενεργοποιείται, αλλάζει διαμόρφωση και αναγνωρίζει το ινωδογόνο με το οποίο συνδέεται, οδηγώντας έτσι στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [33].

1.2.2.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επιτυγχάνεται από ένα πλήθος αγωνιστών (Πίνακας 1.1, Σχήμα 1.5). Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκκρίνουν παράγοντες μεταξύ των οποίων υπάρχουν και διεγέρτες των ίδιων των κυττάρων αυτών (ADP, AA, σεροτονίνη, PAF), οι οποίοι ενισχύουν ακόμα περισσότερο την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση. Κάποιοι από τους βιοδραστικούς αυτούς παράγοντες είναι αποθηκευμένοι στα ενδοκυττάρια κοκκία (πυκνά κοκκία, α-κοκκία) των αιμοπεταλίων [28]. Κάθε αγωνιστής δεσμεύεται στον ειδικό υποδοχέα του στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και διεγείρουν μια σειρά μεταβολικών οδών, όπως την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων, την απελευθέρωση των συστατικών των κοκκίων τους αλλά και την ενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων τους [34].



Σχήμα 1.5: Σχηματική απεικόνιση των αιμοπεταλιακών υποδοχέων και οι μηχανισμοί δράσης τους που οδηγούν στην ενεργοποίηση του υποδοχέα αIIbβ3 [35].

Οι αρχικοί σηματοδοτικοί μηχανισμοί των υποδοχέων των αιμοπεταλίων είναι διαφορετικοί, που όμως συγκλίνουν σε κοινά ενδοκυττάρια σηματοδοτικά συμβάντα. Οι περισσότεροι υποδοχείς των αγωνιστών αυτών είναι συζευγμένοι με γουανιδυλονουκλεοτιδικές πρωτεΐνες (G πρωτεΐνες), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC β) από την Gq πρωτεΐνη [36]. Η ενεργοποιημένη PLC β καταλύει την υδρόλυση της διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνositόλης (PIP₂) προς διακυλογλυκερόλη (DAG) και 1,4,5-τριφωσφοϊνositόλη (IP₃) [37]. Η IP₃ πυροδοτεί με την σειρά της την

απελευθέρωση των Ca^{2+} και ενεργοποιεί των πρωτεϊνική κινάση (PKC) [38]. Ακολουθεί η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω των G12α και G13α πρωτεϊνών, προωθώντας την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων. Τέλος τα ενδοκυττάρια Ca^{2+} ενεργοποιούν το μόριο CalDAG-GEF1 (παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης), το οποίο ενεργοποιεί την Rap1 πρωτεΐνη, που είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [39].

Πίνακας 1.1: Οι αγωνιστές που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [43]

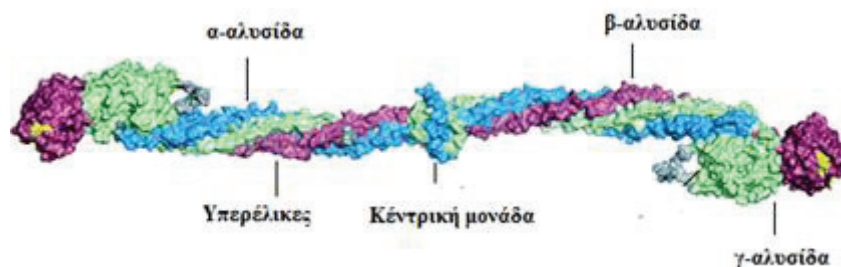
ΑΓΩΝΙΣΤΗΣ	ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ
ADP	P2Y_1 , P2Y_{12}	Αλλαγή σχήματος (P2Y_1), Παροδική συσσώρευση (P2Y_1), Μη αναστρέψιμη συσσώρευση (P2Y_{12}), Έκφραση της P-σελεκτίνης (P2Y_{12}) Απελευθέρωση θρομβοξανίου A_2 (P2Y_1 , P2Y_{12}) Πρόσδεση στα σημεία βλάβης (P2Y_{12}) Συσσώρευση (P2Y_{12})
Θρομβοξανίο A_2	$\text{TP}\alpha$, $\text{TP}\beta$	Συσσώρευση ($\text{TP}\alpha$)
Σερετονίνη	5HT-2A	Συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στις περιοχές τραυματισμού
Επινεφρίνη	$\alpha_2\text{a}$	Συμπληρωματικό ρόλο στη σηματοδότηση του υποδοχέα P2Y_{12}
Κολλαγόνο	GPIb , GPIIb/IIIa , GPIa/IIa , GPVI	Ενεργοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης GPIIb/IIIa Απελευθέρωση του ADP και θρομβοξανίου A_2 Συσσώρευση Απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+}
Θρομβίνη	PAR-1 , PAR-4	Συσσώρευση (PAR-1) Απελευθέρωση του ADP, του θρομβοξανίου A_2 (PAR-4), της σεροτονίνης (PAR-1) και της επινεφρίνης (PAR-1) Ενεργοποίηση της P-σελεκτίνης (PAR-1) Επαγωγή της προπηκτικής δραστηριότητας των αιμοπεταλίων (PAR-1)
Οι κύριοι υποδοχείς που ευθύνονται για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων υποδεικνύονται με έντονους χαρακτήρες.		

Ανεξάρτητα από τον αγωνιστή που ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια, τους διαφορετικούς υποδοχείς που εμπλέκονται αλλά και τα διαφορετικά μονοπάτια βιοσηματοδότησης που ενεργοποιούνται, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} αυξάνεται [40]. Όταν η συγκέντρωση αυτή υπερβεί ένα συγκεκριμένο όριο, τα αιμοπετάλια χάνουν τη δισκοειδή

τους μορφή και εκβάλουν προεξοχές της κυτταρικής τους μεμβράνης, τα ψευδοπόδια. Επίσης, η αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων είναι μια σημαντική διαδικασία που ενισχύει περαιτέρω την ενεργοποίησή τους, εξαιτίας της απελευθέρωσης συστατικών των πυκνών κοκκίων (ADP, ATP) και των α -κοκκίων (P-σελεκτίνη, PAF-4, vWF) [10], που δρουν ως αγωνιστές αυτών [41]. Τέλος οι αλλαγές στο προσανατολισμό των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του συμπλόκου προθρομβινάσης στην ενεργοποιημένη επιφάνεια των αιμοπεταλίων [42]. Συμβάλλοντας κατά αυτό τον τρόπο στην αυξημένη παραγωγή θρομβίνης και στην σταθεροποίηση του θρόμβου.

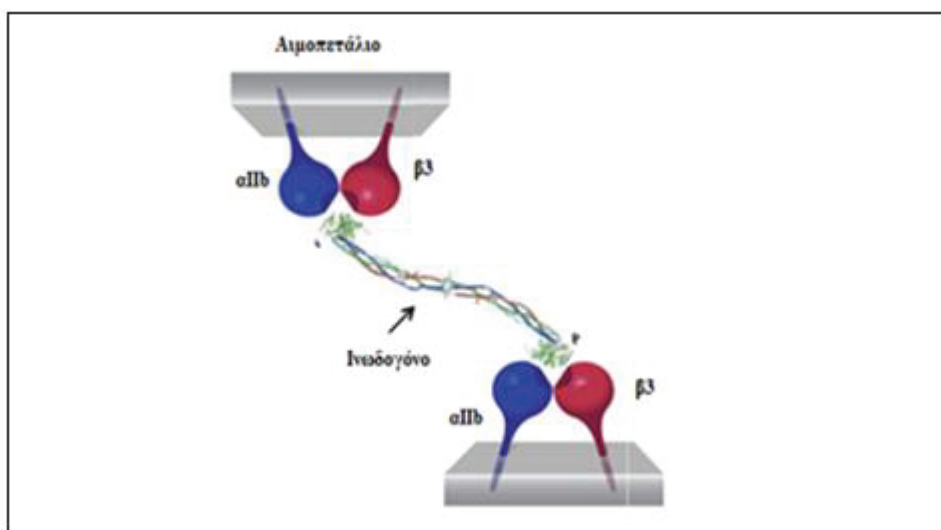
1.2.2.3 Η ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Το τελικό στάδιο μετά την ενεργοποίηση, ανεξάρτητα από τον αγωνιστή που την προκαλεί, είναι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων των αιμοπεταλίων. Ως συσσώρευση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία 2 ή περισσότερα αιμοπετάλια προσκολλούνται μεταξύ τους με το σχηματισμό γεφυρών ινωδογόνου [44] (Σχήμα 1.7). Το ινωδογόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος (MB: 340 kDa) που συντίθεται στο ήπαρ. Αποτελείται από 2 υπομονάδες (ομοδιμερές μόριο) καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες (α , β και γ) [45]. Η κρυσταλλική δομή του [46] αποκάλυψε ότι το ινωδογόνο είναι ένα επίμηκες μόριο, που αποτελείται από ένα μοναδικό κέντρο και από δυο πανομοιότυπες, συμμετρικές, περιφερικές υπομονάδες. Οι τρεις αλυσίδες εκτείνονται ως 2 υπερέλικες από το κέντρο στις περιφερικές υπομονάδες, ενώ τα N-τελικά άκρα και των 6 αλυσίδων συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν το κέντρο του μορίου (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6: Η δομή του ινωδογόνου [46].

Το ινωδογόνο, μέσω των ειδικών περιοχών του, δεσμεύεται σε μόρια του υποδοχέα αIIbβ3 (γλυκοπρωτεΐνη GPIIb/IIIa), δημιουργώντας γέφυρες ινωδογόνου προάγοντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [47] (Σχήμα 1.7). Συγκεκριμένα η πρόσδεση του ινωδογόνου στον αιμοπεταλιακό υποδοχέα αIIbβ3 γίνεται μέσω των αμινοξικών αλληλουχιών RGDF, RGDS που υπάρχουν στην α-αλυσίδα του (περιοχές α95-98, α572-575 αντιστοίχως), καθώς και ενός 12-πεπτιδίου, HHLGGAKQAGDV, που βρίσκεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της γ-αλυσίδας αυτού (περιοχή γ400-411) [48, 49]. Πρόσφατες όμως κρυσταλλογραφικές μελέτες του υποδοχέα αIIbβ3 έδειξαν ότι το ινωδογόνο προσδένεται στον υποδοχέα κυρίως διαμέσου της αλληλουχίας KQAGDV της γ υπομονάδας του [50] (Κεφάλαιο 3.1.1).

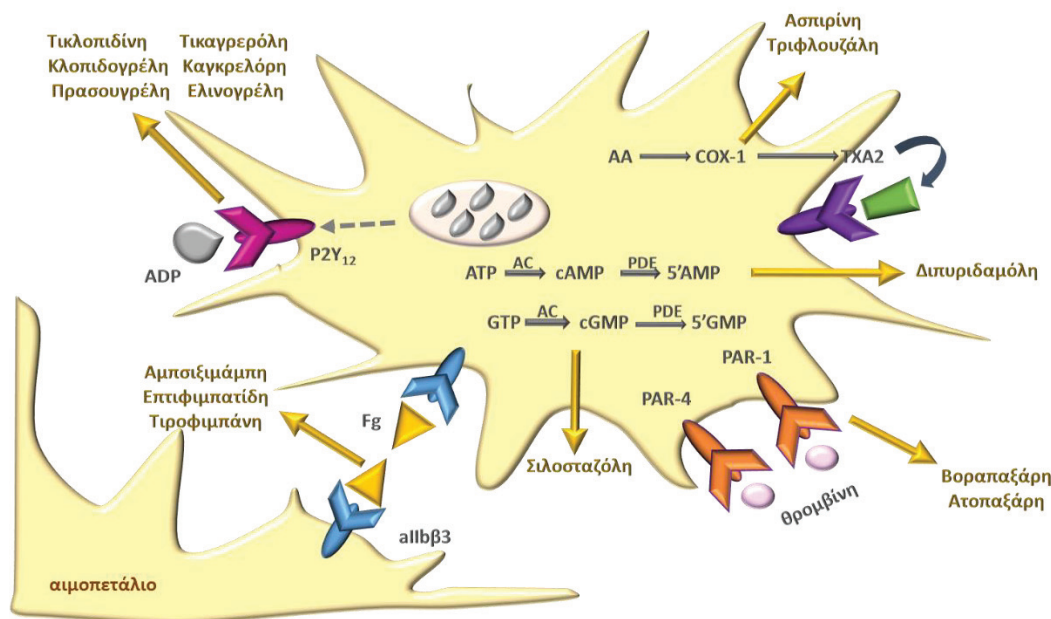


Σχήμα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση της δέσμευσης του ινωδογόνου με τον αιμοπεταλιακό υποδοχέα αIIbβ3. Δύο ενεργοποιημένοι υποδοχείς αIIbβ3 προσδένονται στη γ-αλυσίδα του ινωδογόνου, με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργούνται γέφυρες ινωδογόνου-αιμοπεταλίου [51].

Διακρίνονται δύο φάσεις συσσώρευσης: α) η πρωτογενής και β) η δευτερογενής. Το πρωτογενές συσσώρευμα που σχηματίζεται είναι σχετικά ασταθές αλλά αποτελεί το πρώτο απαραίτητο βήμα για την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης που οδηγεί στο σχηματισμό ινώδους [52]. Η διαδικασία της πρωτογενούς συσσώρευσης είναι αντιστρεπτή, ασταθής και απαιτεί τη σταθεροποίηση του πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου, το οποίο επιτυγχάνεται κατά τη δευτερογενή συσσώρευση. Κατά τη δευτερογενή συσσώρευση απαραίτητη προϋπόθεση είναι η απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων.

1.3 ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Με βάση όλα τα παραπάνω, αντιλαμβανόμαστε τον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζουν τα αιμοπετάλια στη θρόμβωση και γιατί η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία αποτελεί μια από τις κυριότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Γενικά ένα ιδανικό αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο θα πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά: α) ισχυρή αντιθρομβωτική δράση, β) προβλέψιμο φαρμακοδυναμικό προφίλ ώστε να μη χρειάζεται εργαστηριακή παρακολούθηση, γ) ταχεία έναρξη και παύση της δράσης, δ) ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση και παράλληλα μικρό αιμορραγικό κίνδυνο, ε) εύκολη χορήγηση, στ) μικρό αιμορραγικό κίνδυνο, ζ) ελάχιστες κατά το δυνατόν αλληλεπιδράσεις με άλλα συγχρηγούμενα φάρμακα και τέλος η) χαμηλό κόστος [53, 54]. Είναι γεγονός ότι η σύγχρονη αντιαιμοπεταλιακή φαρμακολογία έχει επιτελέσει σημαντική πρόοδο τα τελευταία χρόνια, συμβάλλοντας αποτελεσματικά στην πρόληψη της θρόμβωσης. Παρόλα αυτά όμως η σύγχρονη αντιθρομβωτική αγωγή με ισχυρά, νεότερης γενιάς αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, συνοδεύεται από αυξημένο αιμορραγικό κίνδυνο.



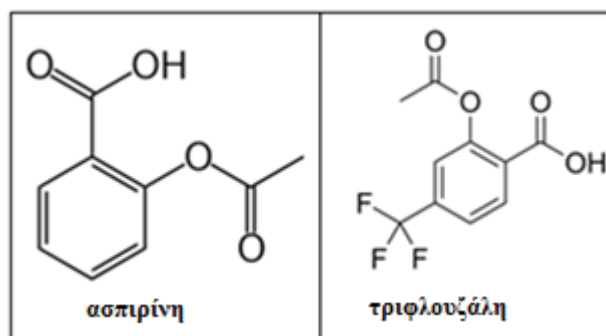
Σχήμα: 1.8: Η δράση των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, είτε είναι υπό διερεύνηση ή πρόσφατα διακόπηκε το πρόγραμμά τους. Τροποποιημένο σχήμα [54].

Τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη κλινική πράξη ή είναι υπό διερεύνηση μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες: 1) αναστολείς της κυκλοοξυγονάσης-1, 2) ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y₁₂, 3) αναστολείς των

φωσφοδιεστεράσεων, 4) ανταγωνιστές του υποδοχέα της θρομβίνης PAR-1, και 5) ανταγωνιστές του υποδοχέα $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (Σχήμα 1.8).

1.3.1 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ-1

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επάγει την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος (AA) [55] εστεροποιημένου στη θέση sn-2 των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων διαμέσου της δράσης μιας κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 (PLA_2). Στα αιμοπετάλια, το AA μεταβολίζεται κυρίως προς τις ασταθείς προσταγλανδίνες PGG_2 και PGH_2 με τη δράση του ενζύμου κυκλοοξυγονάση-1 (COX-1) [56], από τις οποίες στη συνέχεια σχηματίζεται το θρομβοξάνιο A_2 (TxA_2) με τη δράση του ενζύμου συνθετάση του TxA_2 . Το TxA_2 ενεργοποιεί περαιτέρω τα αιμοπετάλια διαμέσου του ειδικού υποδοχέα της μεμβράνης τους (TP) [57]. Αντίθετα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα το AA μεταβολίζεται με τη δράση της COX-1 προς προσταγλανδίνη I_2 (PGI_2). Η αναστολή της COX-1 αναστέλλει σε σημαντικό βαθμό την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από το TxA_2 , όχι όμως την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων διαμέσου των άλλων υποδοχέων τους. Τα αντιπροσωπευτικότερα φάρμακα σε αυτή την κατηγορία είναι η ασπιρίνη και η τριφλουζάλη (Σχήμα 1.9)



Σχήμα 1.9: Οι δομές της ασπιρίνης και της τριφλουζάλης.

Η ασπιρίνη (ακετυλοσαλικυλικό οξύ) παραμένει το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο, εξαιτίας του αποδεδειγμένου προφίλ ασφαλείας και την ιδιαίτερα πολύ χαμηλή τιμή [58]. Ο κύριος μηχανισμός της αντιαιμοπεταλιακής της δράσης, εντοπίζεται στην ακετυλίωση της υδροξυλομάδας της σερίνης 529, η οποία βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου κυκλοοξυγενάση. Η ακετυλίωση της σερίνης δεν επιτρέπει στο υπόστρωμα του ενζύμου, το AA, να προσδεθεί [59]. Ως αποτέλεσμα την

αναστολή σχηματισμού του TXA_2 και τη μη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων διαμέσου του υποδοχέα του θρομβοξανίου TP . Ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου στο αίμα είναι μικρός (περίπου 20 min) εξαιτίας της ταχείας υδρόλυσής του από εστεράσες του εντερικού βλεννογόνου, του ήπατος και του αίματος [60]. Ωστόσο, επειδή τα αιμοπετάλια είναι απύρηντα και δεν μπορούν να συνθέσουν εκ νέου COX-1, οι επιδράσεις της ασπιρίνης διαρκούν σε όλη τη διάρκεια της ζωής των αιμοπεταλίων (περίπου 10 ημέρες) [61]. Μετά από μια μόνο δόση ασπιρίνης, η δράση της COX-1, επανέρχεται περίπου σε ποσοστό 10% ανά ημέρα [62]. Και ενώ χρειάζεται σχεδόν 10 ημέρες για να ανανεωθεί το σύνολο του πληθυσμού των αιμοπεταλίων και να αποκατασταθεί η κανονική λειτουργία τους, η αντιθρομβωτική δράση της ασπιρίνης δεν επηρεάζει τη φυσιολογική αιμόσταση [63].

Σημαντικό μειονέκτημα της ασπιρίνης αποτελεί η γαστρεντερική αιμορραγία, η οποία προκαλείται ακόμα και από μικρές δόσεις χορήγησης της [64] αλλά και το ότι ένα ποσοστό των ασθενών εμφανίζει αντίσταση στην ασπιρίνη [65]. Αντίσταση ή κακή απόκριση, ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ασθενείς που λαμβάνουν δια του στόματος αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, υπάρχει πιθανότητα να εμφανίσουν αυξημένη αιμοπεταλιακή ενεργότητα και κατά συνέπεια οι ασθενείς αυτοί έχουν αυξημένο κίνδυνο για νέο θρομβωτικό επεισόδιο [66].

Η τριφλουζάλη (2-ακετυλοξυ-4-τριφθορομεθυλο-βενζοϊκό οξύ), αποτελεί μια εναλλακτική φαρμακευτική ουσία της ασπιρίνης. Η χημική του δομή είναι παρόμοια με αυτή του ακετυλοσαλικυλικού οξέος και δρα αναστέλλοντας μη αντιστρεπτά την COX-1 στα αιμοπετάλια, σε μικρότερο όμως βαθμό από την ασπιρίνη και συνεπώς μειώνει την παραγωγή του TXA_2 [67]. Σε αντίθεση με τη ασπιρίνη, η τριφλουζάλη, αναστέλλει επίσης τη φωσφοδιεστεράση των αιμοπεταλίων, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (c-AMP) και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (c-GMP) που έχουν ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση [68]. Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι η τριφλουζάλη δεν παρουσιάζει αυξημένο κίνδυνο γαστρεντερικής αιμορραγίας σε σύγκριση με την ασπιρίνη [69, 70].

1.3.2 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ $P2Y_{12}$

Η διφωσφορική αδενοσίνη ADP είναι ένας ασθενής αγωνιστής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, ο οποίος παρακινεί μια αντιστρεπτή απόκριση σε αντίθεση με τους ισχυρούς αγωνιστές όπως η θρομβίνη. Η απελευθέρωση του όμως σε μεγάλες ποσότητες από τα

κοκκία των αιμοπεταλίων κατά την ενεργοποίηση των τελευταίων, τον καθιστούν έναν από τους πιο σημαντικούς αγωνιστές [71]. Ο μηχανισμός δράσης του ADP πραγματοποιείται δια μέσου δυο P2 υποδοχέων συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες, τους P2Y₁ και P2Y₁₂ [72]. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα P2Y₁, επιδρά στην αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων, ενώ ο υποδοχέας P2Y₁₂ είναι απαραίτητος για την αποκοκκίωση των πυκνών κοκκίων, για τη σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου και επίσης συμβάλλει στην παραγωγή του θρομβοξανίου A₂ [73]. Σημαντικό είναι να αναφερθεί, ότι η ενεργοποίηση των δυο αυτών υποδοχέων, επαρκούν για την ενεργοποίηση του αιμοπεταλιακού υποδοχέα αIIbβ3 [73].

Υπάρχουν περίπου 150 P2Y₁ υποδοχείς ανά αιμοπετάλιο [74], αριθμός ιδιαίτερα χαμηλός αν συγκριθεί με του υποδοχέα της θρομβίνης PAR-1 (1000-2000/αιμοπετάλιο). Είναι συζευγμένος με την πρωτεΐνη Gq και ενεργοποιεί το μονοπάτι Gq/φωσφολιπάσης C προς την παραγωγή IP3 και DAG [37]. Η IP3 κινητοποιεί τα ιόντα ασβεστίου από τα κοκκία του αιμοπεταλίου και η DAG ενεργοποιεί την PKC. Ο υποδοχέας P2Y₁₂ είναι υπεύθυνος για την ολοκλήρωση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης επαγόμενη από ADP και που έχει ξεκινήσει από τον υποδοχέα P2Y₁ [75], ενώ η συνεργοποίηση και των δυο αυτών υποδοχέων κρίνεται απαραίτητη για την πλήρη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [76]. Ο P2Y₁₂ είναι υπεύθυνος για την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης (AC) [77], συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων cAMP [78] και επίσης η σηματοδότηση του διεγείρει την έκφραση της P-σελεκτίνης.

Ο κρίσιμος ρόλος του υποδοχέα P2Y₁₂ στο σχηματισμό και στη σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου, τον καθιστά σημαντικό στόχο για την ανάπτυξη αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων. Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y₁₂ που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη ή βρίσκονται υπό διερεύνηση κατηγοριοποιούνται σε δύο κατηγορίες στους: α) έμμεσους μη αναστρέψιμους αναστολείς, τις θειενοπυριδίνες (τικλοπιδίνη, κλοπιδογρέλη, πρασουγρέλη) και β) στους άμεσους αναστρέψιμους αναστολείς (τικαγρελόρη, καγκρελόρη, ελινογρέλη) [79].

1.3.2.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΘΕΙΕΝΟΠΥΡΙΔΙΝΩΝ

Οι θειενοπυριδίνες είναι προφάρμακα, οι οποίες μετατρέπονται στο ήπαρ στους φαρμακολογικούς ενεργούς μεταβολίτες τους με τη δράση του κυτοχρώματος P450 (CYP450). Οι ενεργοί αυτοί μεταβολίτες προσδένονται ομοιοπολικά (μέσω σχηματισμού

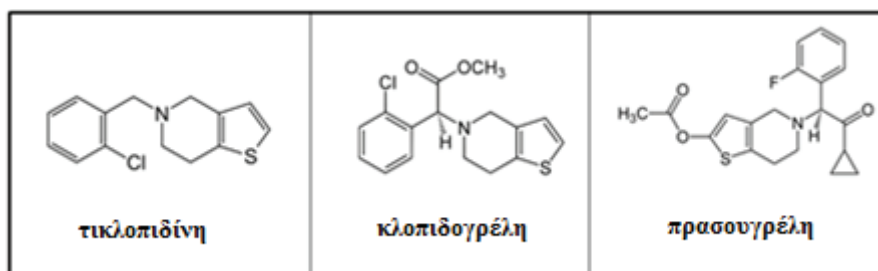
δισουλφιδικών δεσμών) και μη αναστρέψιμα στον υποδοχέα P2Y₁₂, με συνέπεια την αναστολή του υποδοχέα [72, 79].

Τικλοπιδίνη: Ο πρώτος χρονικά ανταγωνιστής της οικογένειας των θειενοπυριδινών ήταν η τικλοπιδίνη. Η χρήση της σήμερα έχει περιοριστεί σημαντικά, διότι προκαλεί σοβαρές παρενέργειες όπως ουδετεροπενία, απλαστική αναιμία, γαστρεντερική αιμορραγία αλλά και ηπατική δυσλειτουργία [80, 81].

Κλοπιδογρέλη: Η κλοπιδογρέλη είναι το πιο συχνά συνταγογραφούμενο φάρμακο παγκοσμίως [82], ανήκει στη δεύτερη γενιά των θειενοπυριδινών, με λιγότερες παρενέργειες από την τικλοπιδίνη την οποία και αντικατέστησε [79]. Επίσης η δράση της είναι αρκετά πιο ισχυρή από ότι η δράση της τικλοπιδίνης [83]. Η κλοπιδογρέλη που απορροφάται από τον οργανισμό υφίσταται δύο μεταβολικά μονοπάτια: α) το 85-90% του φαρμάκου που απορροφάται υδρολύεται από τις εστεράσες του εντερικού βλεννογόνου και του πλάσματος προς το σχηματισμό του αδρανούς μεταβολίτη, β) το 10-15% μεταβολίζεται από το CYP (κυτόχρωμα P450) στο ήπαρ για να σχηματίσει ένα δραστικό μεταβολίτη [84], [85]. Ο ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης είναι ένας ισχυρός εκλεκτικός μη αντιστρεπτός αναστολέας του υποδοχέα P2Y₁₂ του ADP ο οποίος σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς με κυστεϊνικά κατάλοιπα στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή αναστολή της σύνδεσης του ADP στο συγκεκριμένο υποδοχέα [85]. Η αναστολή της πρόσδεσης του ADP στον υποδοχέα P2Y₁₂ από τον μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του κυκλικού AMP (c-AMP) στο κυτόπλασμα των αιμοπεταλίων, η οποία μεταξύ των άλλων επάγει τη φωσφορυλίωση της φωσφοπρωτεΐνης VASP, με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης του υποδοχέα αIIbβ3 και συνεπώς την παρεμπόδιση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων [86].

Παρόλο που η κλοπιδογρέλη είναι το πιο συχνά συνταγογραφούμενο φάρμακο, δεν πληροί τα κριτήρια ενός ιδανικού αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου [79]. Ένα από τα μειονεκτήματα της κλοπιδογρέλης είναι το ότι η αντιαιμοπεταλιακή της δράση δεν είναι άμεση, διότι το προφάρμακο πρέπει να υποστεί ηπατικό μεταβολισμό για να δημιουργηθεί ο ενεργός μεταβολίτης. Επιπλέον, η αντιαιμοπεταλιακή της δράση διαφέρει από ασθενή σε ασθενή, με αποτέλεσμα μειωμένη αποτελεσματικότητα σε μερικούς από αυτούς και κατά συνέπεια ανεπαρκή προστασία (π.χ ασθενείς που υποβάλλονται σε διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση) [87]. Αυτή η μη σταθερή απόκριση από ασθενή σε ασθενή μπορεί να οφείλεται στη μεταβλητή μεταβολική δραστηριότητα του ηπατικού κυτοχρώματος P450

[88]. Επίσης η μη αναστρέψιμη αναστολή του υποδοχέα P2Y₁₂ από τη κλοπιδογρέλη, έχει ως αποτέλεσμα την αργή διαδικασία ανάκαμψης των αιμοπεταλίων μετά τη διακοπή της θεραπείας. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλέσει αιμορραγία μέσα σε 5-7 μέρες από διακοπή της χορήγησης του φαρμάκου [89].



Σχήμα 1.10: Οι δομές της τικλοπιδίνης, κλοπιδογρέλης και πρασουγρέλης.

Πρασουγρέλη: Η πρασουγρέλη είναι τρίτης γενιάς θειενοπυριδίνη και είναι επίσης προ φάρμακο. Δρα με τον ίδιο τρόπο με την κλοπιδογρέλη, δηλαδή ο ενεργός μεταβολίτης της πρασουγρέλης συνδέεται ομοιοπολικά με τον υποδοχέα P2Y₁₂ προκαλώντας μη αντιστρεπτή αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από το ADP [90]. Η πρασουγρέλη έχει ισχυρότερη και ταχύτερη δράση από την κλοπιδογρέλη, εξαιτίας της ταχύτερης μεταβολικής ενεργοποίησης διαμέσου του CYP450 στο ήπαρ και τη γρηγορότερη εμφάνιση υψηλότερων συγκεντρώσεων του δραστικού μεταβολίτη σε σχέση με την κλοπιδογρέλη [91]. Σημαντικό μειονέκτημα της χορήγησης της πρασουγρέλης είναι ο αυξημένος κίνδυνος μειζόνων αιμορραγιών [79] και η αργή διαδικασία ανάκαμψης των αιμοπεταλίων μετά τη διακοπή της θεραπείας, όπως ακριβώς συμβαίνει και με την κλοπιδογρέλη [92].

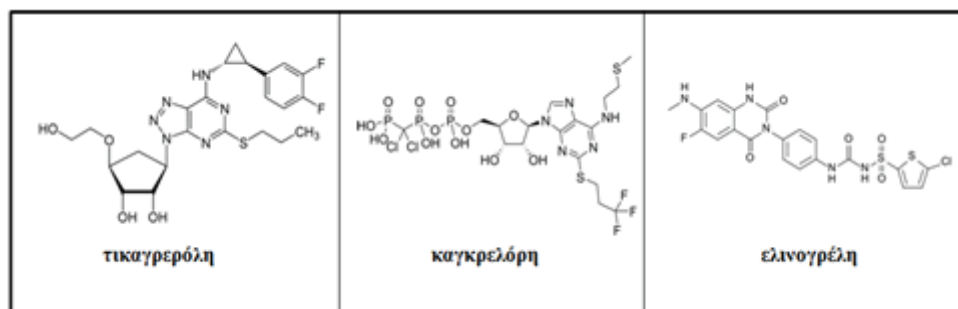
1.3.2.2 ΑΜΕΣΟΙ ΑΝΑΣΤΡΕΨΙΜΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ P2Y₁₂

Προκειμένου να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα των θειενοπυριδινών που περιγράψαμε προηγουμένως, νέοι ανταγωνιστές του υποδοχέα έχουν προσφάτως αναπτυχθεί. Η νέα αυτή κατηγορία αναστολέων του υποδοχέα P2Y₁₂ προκαλούν αντιστρεπτή αναστολή του υποδοχέα, δρουν γρηγορότερα και έχουν μικρό χρόνο ημιζωής [72].

Τικαγρερόλη: Η τικαγρερόλη είναι το πρώτο φάρμακο δια του στόματος της κατηγορίας αυτής [93]. Ο μηχανισμός δράσης της είναι διαφορετικός από αυτόν των θειενοπυριδινών, προκαλεί αντιστρεπτή αναστολή του P2Y₁₂ συνδεδεμένη μη ομοιοπολικά σε διαφορετική

θέση από αυτή στην οποία συνδέονται οι θειενοπυριδίνες, συνεπώς δεν επηρεάζει τη σύνδεση του ADP στον υποδοχέα [94]. Η τικαγρερόλη συνδέεται άμεσα στον υποδοχέα χωρίς να απαιτεί περαιτέρω μεταβολική μετατροπή, απορροφάται γρήγορα και έχει χρόνο ημιζωής περίπου 12 ώρες [93]. Παρόλα αυτά, οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με τικαγρερόλη, εμφάνισαν υψηλά ποσοστά δύσπνοιας, υπότασης, ναυτίας και βραδυκαρδίας [95]. Ενώ το πρόβλημα των μειζόνων αιμορραγικών επιπλοκών δεν ξεπεράστηκε, αντιθέτως είναι στα ίδια επίπεδα με τη κλοπιδογρέλη [96].

Καγκρελόρη: Η καγκρελόρη είναι ένας ισχυρός, εκλεκτικός ανταγωνιστής του υποδοχέα P2Y₁₂, ο οποίος χορηγείται ενδοφλέβια. Είναι ένα τριφωσφορικό ανάλογο της αδενοσίνης, που έχει ισχυρή, άμεση και αντιστρεπτή αναστολή του υποδοχέα. Δρα άμεσα, χωρίς να χρειάζεται να μετατραπεί στο ήπαρ σε ενεργό μεταβολίτη, σε αντίθεση με τις θειενοπυριδίνες [72]. Έχει ταχεία έναρξη δράσης (μερικά δευτερόλεπτα) και μικρό χρόνο ημιζωής (περίπου 6 min) [97]. Ωστόσο μελέτες που πραγματοποιήθηκαν (CHAMPION-PLATFORM [98] και CHAMPION-PCI [99]), δεν κατάφεραν να αποδείξουν ανωτερότητα της θεραπείας με καγκρελόρη σε σύγκριση με τη κλοπιδογρέλη. Μοναδικό σημείο υπεροχής είναι ότι κατάφερε να μειώσει σημαντικά τη μεταβλητότητα μεταξύ ασθενών στην αναστολή συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από την κλοπιδογρέλη [100].

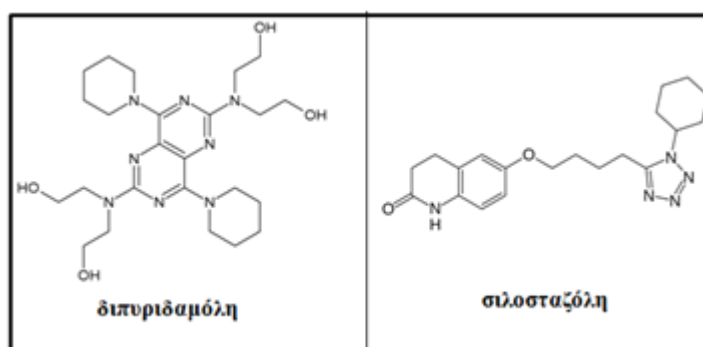


Σχήμα 1.11: Οι δομές της τικαγρερόλης, καγκρεόλης και ελινογρέλης.

Ελινογρέλη: Η ελινογρέλη είναι ένας νέος, άμεσος, αντιστρεπτός αναστολέας του υποδοχέα P2Y₁₂ και ο οποίος είναι διαθέσιμος και σε ενδοφλέβια και σε δια του στόματος μορφή [101]. Οι μελέτες, υπόσχονταν ένα ελκυστικό αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο [72], αλλά δεν εμφάνισε το αναμενόμενο κλινικό όφελος με συνέπεια τη διακοπή του προγράμματος.

1.3.3 ΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΩΝ

Οι αναστολείς των φωσφοδιεστερασών διπυριδαμόλη και σιλοσταζόλη είναι ουσίες που εμφανίζουν αγγειοδιασταλτική και αντιαιμοπεταλιακή δράση. Δρουν αναστέλοντας τις φωσφοδιεστεράσες 3 και 5 των κυκλικών νουκλεοτιδίων c-AMP και c-GMP, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοαιμοπεταλιακής συγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων αυτών, τα οποία αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [57, 102].



Σχήμα 1.12: Οι δομές της διπυριδαμόλης και σιλοσταζόλης.

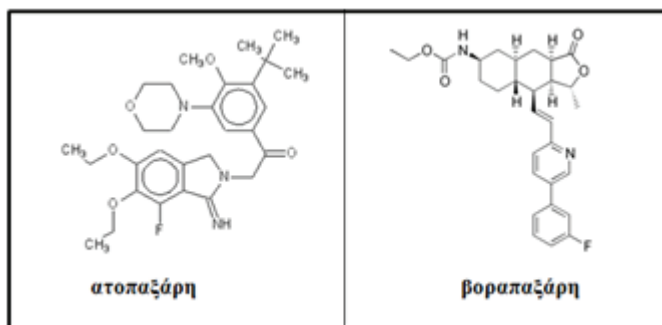
1.3.4 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ PAR-1

Η θρομβίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης και είναι ο πιο ισχυρός αγωνιστής των αιμοπεταλίων, ενεργοποιώντας τα σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις [103]. Συναντάται κυρίως στην ανενεργή της μορφή ως προθρομβίνη, η οποία είναι μια σφαιρίνη του πλάσματος που βιοσυντίθεται στο ήπαρ. Η μετατροπή της προθρομβίνης στην ενεργή πρωτεάση α-θρομβίνη απαιτεί την στρατολόγηση του παράγοντα Xa (FXa) και τον ενεργό παράγοντα Va [104]. Η θρομβίνη προκαλεί την ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, ενεργοποιεί το μηχανισμό του AA, το σχηματισμό TxA₂, και αυξάνει το ελεύθερο ενδοκυττάριο Ca²⁺. Επίσης προκαλεί αλλαγή σχήματος, έκκριση των κοκκίων, και συσσώρευση των αιμοπεταλίων [105]. Οι υποδοχείς της θρομβίνης είναι ο PAR-1 και ο PAR-4 [106] αλλά και το σύμπλοκο GPIb-IX-V [107]. Η ενεργοποίηση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη γίνεται κυρίως διαμέσου του PAR-1, ενώ δευτερεύοντα ρόλο διαδραματίζει ο υποδοχέας PAR-4 [106]. Ο PAR-1 που αποτελεί τον κύριο υποδοχέα μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης (0,1nm), ενώ ο PAR-4 απαιτεί μεγαλύτερη

συγκέντρωση θρομβίνης [106, 108]. Ο υποδοχέας PAR1 ενεργοποιεί το αιμοπετάλιο διαμέσου του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, ενώ ο ίδιος ενεργοποιείται με την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ Arg41 και Ser42, η οποία καταλύεται από τη θρομβίνη οδηγώντας στο σχηματισμό ενός νέου αμινοτελικού-άκρου το οποίο αλληλεπιδρά με υπολείμματα αμινοξέων που βρίσκονται στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα καθώς επίσης και με το αμινοτελικό άκρο της θρομβίνης [109, 110]. Το νέο αμινοτελικό άκρο αποτελείται από το πεπτίδιο με την αλληλουχία Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (SFLLRN) [109]. Εν συντομία, η θρομβίνη προσδένεται στον υποδοχέα της ενεργοποιημένης πρωτεάσης PAR-1 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, διαχωρίζοντας τον υποδοχέα και εκθέτοντας έναν προεξέχοντα προσδέτη, ο οποίος τελικά προσδένεται και ενεργοποιεί τον υποδοχέα [111]. Τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που διεγείρονται, συνδέονται με διάφορες επιδράσεις της θρομβίνης στα αιμοπετάλια, όπως η παραγωγή TXA₂ [112], η απελευθέρωση ADP [113], σερετονίνης και επινεφρίνης [114], η ενεργοποίηση της P-σελεκτίνης [115], η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 [116] και τέλος η συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων διαμέσου του σύμπλοκου GPIb-IX-V, πραγματοποιείται μέσω της α-θρομβίνης. Η ενεργοποίηση με α-θρομβίνη προκαλεί την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A₂ (PLA₂) που οδηγεί στο σχηματισμό του AA. Οι παραπάνω δράσεις οδηγούν στην αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺, αποκοκκίωση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων [117]. Ο υποδοχέας GPIb-IX-V δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση της θρομβίνης, αφού η σηματοδότηση του καταλύεται απουσία του PAR-4 [118].

Στη κλινική πράξη χρησιμοποιείται ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα PAR-1, η βοραπαξάρη [102]. Η βοραπαξάρη χορηγείται δια του στόματος, απορροφάται άμεσα και είναι ένας αναστρέψιμος ανταγωνιστής του υποδοχέα PAR-1. Αναστέλλει τον υποδοχέα PAR-1, πιθανά διαμέσου της ενεργοποίησης του πεπτιδίου TRAP. Οι πρώτες μελέτες δείχνουν ότι δεν προκαλεί αύξηση στις μείζονες αιμορραγίες, ούτε κατά την χορήγηση σε συνδυασμό με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη [119].



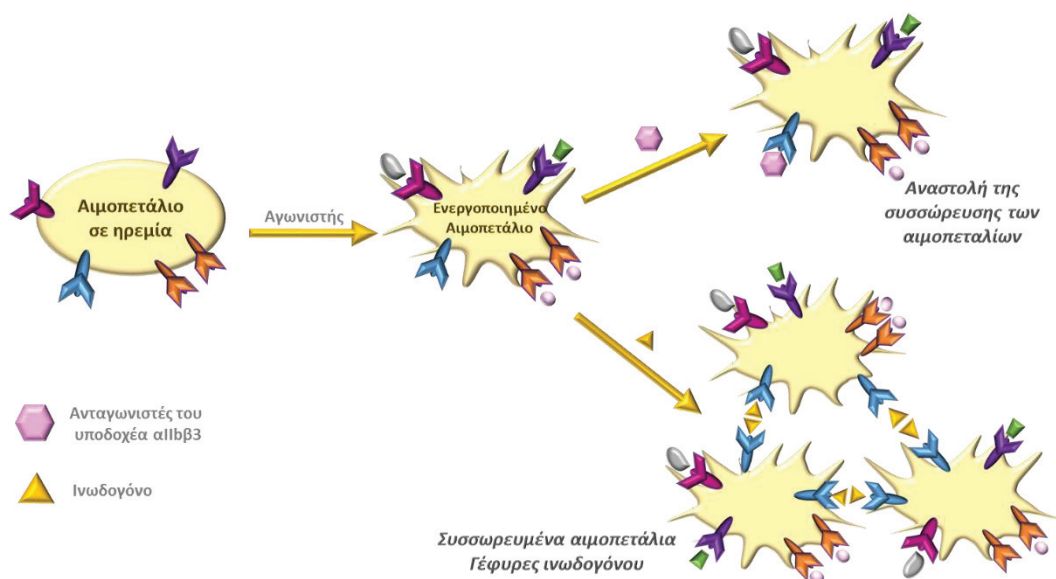
Σχήμα 1.13: Οι δομές της ατοπαζάρης και βοραπαζάρης.

Η ατοπαζάρη είναι ένας αναστρέψιμος ανταγωνιστής του υποδοχέα PAR-1, όμως τα αποτελέσματα από τις κλινικές μελέτες ως προς την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του φαρμάκου δεν ήταν τα αναμενόμενα και η περαιτέρω κλινική αξιολόγηση της ατοπαζάρης έχει ανασταλεί. Προκαλεί ιδιαίτερα μεγάλη αύξηση στα εγκεφαλικά αιμορραγικά επεισόδια όπως επίσης και ηπατικές δυσλειτουργίες [120, 121].

Παρόλο το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει ο υποδοχέας PAR-1 στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, κανένας από τους μέχρι τώρα αναστολείς του δεν χρησιμοποιείται στη καθημερινή κλινική πράξη (αναμένεται η περεταίρω αξιολόγηση της βοραπαζάρης, αφού η έγκριση δόθηκε 5/2014). Στη κλινική πράξη χρησιμοποιούνται φάρμακα τα οποία είναι άμεσοι αναστολείς της θρομβίνης (βαρφαρίνη, ηπαρίνη, δαμπιγκατράνη) και, αντίθετα από τους αναστολείς του PAR-1, συγκαταλέγονται στα αντιπηκτικά [102].

1.3.5 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ αIIbβ3

Όλα τα προαναφερθέντα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, παρεμβαίνουν εξειδικευμένα σε ένα μόνο από τα βιοχημικά μονοπάτια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και δεν παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων διαμέσου των άλλων υποδοχέων τους. Το φαινόμενο αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελλιπή αντιαιμοπεταλιακή δράση τους και συνεπώς την ανεπαρκή αντιμετώπιση του κινδύνου εμφάνισης ενός θρομβωτικού ισχαιμικού επεισοδίου. Αντίθετα, οι αναστολείς του υποδοχέα αIIbβ3 αναστέλλουν την πρόσδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα αIIbβ3 αναστέλλοντας έτσι το κοινό μονοπάτι που οδηγεί στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την περεταίρω ενεργοποίησή τους (Σχήμα 1.14).

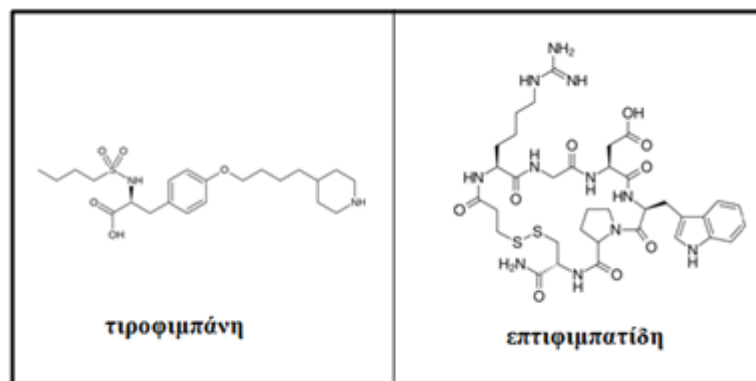


Σχήμα 1.14: Σχηματική απεικόνιση αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και συσσώρευσης. Αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από αIIbβ3 ανταγωνιστές.

Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα αIIbβ3, μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο γενικές κατηγορίες: α) στους φυσικούς πεπτιδικούς αναστολείς, οι οποίοι απομονώνονται από το δηλητήριο των φιδιών (δισιντεγκρίνες) και β) στους συνθετικούς αναστολείς τριών τύπων, οι οποίοι είναι: 1) μονοκλωνικά αντισώματα, 2) πεπτιδικά ανάλογα και 3) μη πεπτιδικά ανάλογα. Στη καθημερινή κλινική πράξη, σήμερα είναι διαθέσιμες 3 φαρμακευτικές ουσίες η αμπσιξιμάμπη, η επιφιμιπατίδη και η τιροφιμπάνη (Σχήμα 1.14).

Οι εκτιμήσεις ότι από το 1999 ως το 2011 υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αIIbβ3 ανταγωνιστές περισσότεροι από 8 εκατομμύρια ασθενείς, αποδεικνύει τη χρησιμότητα αυτών των φαρμάκων [122]. Παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια η χρήση τους έχει μειωθεί, κυρίως διότι εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας [2].

Η αμπσιξιμάμπη (abciximab) ανήκει στον πρώτο τύπο αναστολέων και είναι ένα χημειοκλωνικό αντίσωμα c7E3Fab που συνδέεται μη ειδικά με την β3 υπομονάδα του υποδοχέα αIIbβ3 [123]. Ένα από τα μειονεκτήματα της αμπσιξιμάμπης είναι ότι μετά το τέλος της θεραπείας, η διακοπή της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της αμπσιξιμάμπης είναι αργή γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο αιμορραγίας [124]. Επίσης η αμπσιξιμάμπη δεσμεύεται και στην ιντεγκρίνη αVβ3, επομένως η δράση της δεν περιορίζεται στα αιμοπετάλια αφού ο υποδοχέας της βιτρονεκτίνης είναι ευρύτατα κατανεμημένος σε ιστούς και ακόμη βρίσκεται σε περίσσεια σε λεία μυϊκά κύτταρα ενδοθηλίου [125].



Σχήμα 1.15: Οι δομές της τιροφιμπάνης και της επτιφιμπατίδης.

Η επτιφιμπατίδη (Eptifibatide) είναι ένα κυκλικό επταπεπτίδιο, το οποίο περιέχει την Lys-Gly-Asp (KGD) αλληλουχία. Προτάθηκε ως ένας αναστολέας με μεγάλη εξειδίκευση στον αIIbβ3 υποδοχέα και ότι δεν προσδένεται σε υποδοχείς άλλων ιντεγκρινών [126], παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν το αντίθετο [127]. Παρά τα σημαντικά του πλεονεκτήματα (συνδέεται αντιστρεπτά στον υποδοχέα και έχει μικρό χρόνο ημιζωής), εμφανίζει ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας. Η τιροφιμπάνη είναι ένα Arg-Gly-Asp (RGD) πεπτιδομιμητικό το οποίο προσδένεται αντιστρεπτά στον αIIbβ3 υποδοχέα, αλλά εμφανίζει τα ίδια μειονεκτήματα με την επτιφιμπατίδη [2].

Τα σοβαρά μειονεκτήματα που εμφανίζουν οι δυο αυτές φαρμακευτικές ουσίες οφείλονται στο γεγονός ότι δρουν ως RGD ανάλογα. Τα RGD ανάλογα δεν εμφανίζουν εξειδίκευση στο ινωδογόνο, ούτε στον υποδοχέα αIIbβ3 και επίσης ενεργοποιούν ένα καταρράκτη βιοχημικών αντιδράσεων μέσα στο κύτταρο που οδηγεί στη περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ο σχεδιασμός των RGD αναλόγων και τα μειονεκτήματα τους θα αναφερθούν εκτενώς στο Κεφάλαιο 3.

2.1 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για τη φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο μόνο στην αιμόσταση αλλά παίρνουν μέρος και σε άλλες διαδικασίες του οργανισμού όπως στη φλεγμονή, στην αγγειογένεση, στην ανάπτυξη όγκου και στη μετάσταση αλλά και στην αντιμικροβιακή δράση. Τα αιμοπετάλια αδυνατούν να εκτελέσουν αυτές τις λειτουργίες σε περίπτωση απουσίας των υποδοχέων τους. Ο Glanzmann το 1918 και ο Bernard το 1948 ήταν οι πρώτοι που διαπίστωσαν διαταραχές στους υποδοχείς των αιμοπεταλίων. Οι ασθενείς με την θρομβασθένεια Glanzmann, - η οποία είναι μια διαταραχή που προκαλεί σοβαρή αιμορραγία- έχουν αιμοπετάλια στα οποία είτε λείπει ο υποδοχέας αIIbβ3 είτε είναι ελαττωματικός με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η έκθεση των περιοχών του, στις οποίες συνδέονται οι προσδέτες. Μετά από αυτές τις παρατηρήσεις, η δομή και η λειτουργία των αιμοπεταλιακών υποδοχέων μελετήθηκαν εκτενώς. Μερικοί από τους αιμοπεταλιακούς υποδοχείς που έχουν μελετηθεί είναι οι εξής: α) ιντεγκρίνες, β) πλούσιες σε λευκίνη γλυκοπρωτεΐνες, γ) σελεκτίνες, δ) διαμεμβρανικοί υποδοχείς, ε) υποδοχείς της προσταγλαδίνης, στ) υποδοχείς ανοσοσφαιρινικού τύπου, ζ) υποδοχείς κίνησης της τυροσίνης, η) διάφοροι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς [1].

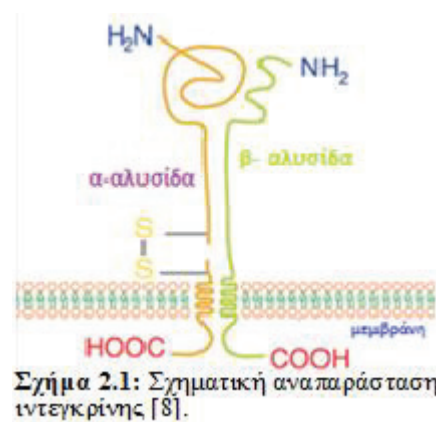
Στην παρούσα εργασία δίνεται περισσότερη έμφαση στις ιντεγκρίνες και συγκεκριμένα στον υποδοχέα αIIbβ3.

2.1.1 ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ

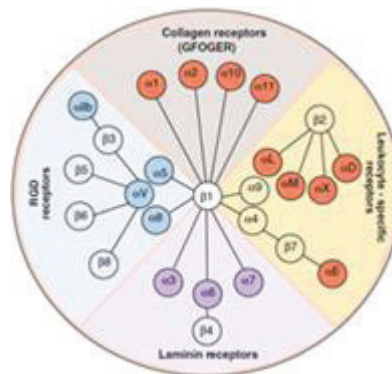
Οι ιντεγκρίνες αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη οικογένεια υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνεια όλων των εμπύρηνων κυττάρων του σώματος. Τα μεσολαβούμενα από ιντεγκρίνες σήματα, ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, οι οποίες είναι σημαντικές για βιολογικές διαδικασίες όπως η εμβρυονική ανάπτυξη, μορφογένεση, αιμόσταση και θρόμβωση, επούλωση τραύματος, λειτουργία ανοσοποιητικού συστήματος και μετάσταση [2]. Πρωτοανακαλύφθηκαν στη δεκαετία του '80 από τον Hynes, με τεχνικές παρεμπόδισης της κυτταρικής προσκόλλησης με αντισώματα και με χρωματογραφία συγγένειας με εξωκυττάρια προσδέματα [3]. Το όνομα "ιντεγκρίνη" προέρχεται από τη λέξη "integrity" που στα ελληνικά σημαίνει "ακεραιότητα" και δόθηκε για να υποδηλώσει την σημασία αυτών των υποδοχέων στην

διατήρηση της ακεραιότητας της σύνδεσης του κυτταροσκελετού με την εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix, ECM) [4].

Οι ιντεγκρίνες είναι α/β ετεροδιμερή τύπου I διαμεμβρανικοί υποδοχείς αποτελούμενα από μια α -υπομονάδα (120-180 kD, περίπου 1000 αμινοξέα) μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μια β -υπομονάδα (90–110 kD, περίπου 750 αμινοξέα) [5] (Σχήμα 2.1). Και οι δυο υπομονάδες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν χαρακτηριστικά μια σχετικά εκτεταμένη εξωκυττάρια περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή, και μια σύντομη κυτταροπλασματική ουρά που αποτελείται από 20 έως 60 αμινοξέα [6]. Οι αλυσίδες των ιντεγκρινών παρουσιάζουν σημαντικού βαθμού αμινοξική ομολογία και ιδιαίτερα μεταξύ των β -αλυσίδων [7].



Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί 18 α και 8 β υπομονάδες που συνθέτουν 24 ιντεγκρίνες σε διάφορα κύτταρα [4, 5], ενώ στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου έχουν περιγραφεί 5 διαφορετικές ιντεγκρίνες: 3 της $\beta 1$ τάξης ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ και $\alpha 6\beta 1$) και 2 της $\beta 3$ τάξης ($\alpha \text{IIb}\beta 3$ και $\alpha \text{v}\beta 3$) [1] (Σχήμα 2.2).

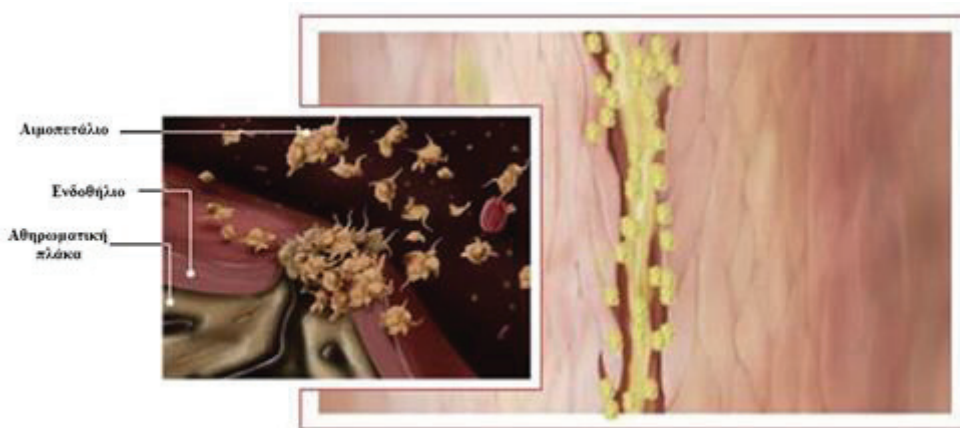


Σχήμα 2.2: Αναπαράσταση της οικογένειας των ιντεγκρινών [8].

2.2 Η ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗ $\alpha \text{IIb}\beta 3$

Η γλυκοπρωτεΐνη GPIIb/IIIa ($\alpha \text{IIb}\beta 3$, CD41/CD61) είναι μέλος της οικογένειας των ιντεγκρινών και είναι ένα εξαρτώμενο από ιόντα ασβεστίου ετεροδιμερές του οποίου η έκφραση περιορίζεται κυρίως στα αιμοπετάλια και στα μεγακαρυοκύτταρα, ενώ περιστασιακά εκφράζονται και σε κάποια καρκινικά κύτταρα [9]. Ο υποδοχέας $\alpha \text{IIb}\beta 3$ είναι

ο αφθονότερος υποδοχέας στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων [1]. Η έκφραση του σε αιμοπετάλια που βρίσκονται σε ηρεμία είναι περίπου 80.000 [10] ανά κύτταρο, επίσης υπάρχουν αντίγραφα $\alpha\text{IIb}\beta 3$ στη μεμβράνη των α -κοκκίων όπου κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μπορούν να μεταφερθούν στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια [1]. Με βάση την εκτιμώμενη επιφάνεια του αιμοπεταλίου, η ιντεγκρίνη $\alpha\text{IIb}\beta 3$, υπολογίζεται ότι καταλαμβάνει λιγότερο από 200 Å [11]. Όταν ο υποδοχέας $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ενεργοποιείται, αλλάζει διαμόρφωση και διαμέσου αυτού επιτυγχάνεται η συνάθροιση των αιμοπεταλίων [3, 12]. Οι προσδέτες του $\alpha\text{IIb}\beta 3$ που διαμεσολαβούν στη δημιουργία γεφυρών είναι το ινωδογόνο και ο παράγοντας von Willebrand [13], ενώ προσδέτες όπως η φιβρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη, η θρομβοσπονδίνη παίρνουν μέρος στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση [14, 15].



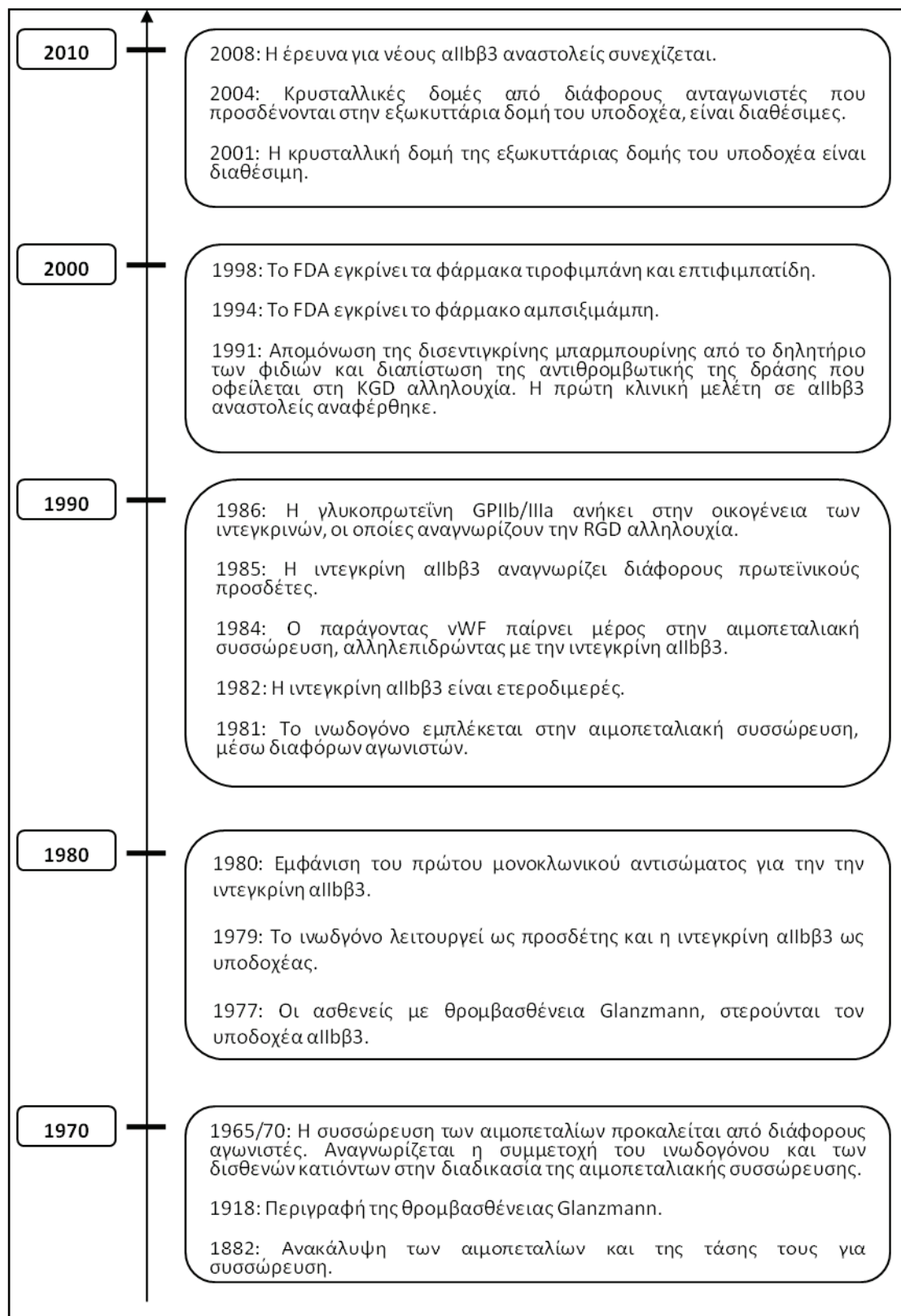
Σχήμα 2.3: Ρήξη της αθηρωματικής πλάκας οδηγεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, σε διαμορφωτική αλλαγή του υποδοχέα $\alpha\text{IIb}\beta 3$ και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων [16].

Η ιντεγκρίνη αποτελείται από 2 διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες την αIIb και $\beta 3$ [17] και η κάθε μια διαπερνά τη κυτταρική μεμβράνη μόνο μια φορά. Όπως σε όλες τις ιντεγκρίνες, οι 2 υπομονάδες της αποτελούνται από μια εκτεταμένη εξωκυττάρια περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια σύντομη κυτταροπλασματική ουρά. Η ιντεγκρίνη έχει προσανατολισμό τύπου I, όπου το N-τελικό άκρο βρίσκεται στην εξωκυττάρια περιοχή και το C-τελικό άκρο στην κυτταροπλασματική ουρά [18]. Η αIIb και η $\beta 3$ είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδίων που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 17 (q21-23) [19]. Η συγκρότηση του ετεροδιμερούς πραγματοποιείται από τα πρόδρομα μονομερή αIIb και $\beta 3$ στο πλούσιο σε ασβέστιο περιβάλλον του ενδοπλασματικού δικτύου των μεγακαρυοκυττάρων, υφίσταται μετα-μεταφραστική επεξεργασία στο σύμπλεγμα Golgi, και μόνο τα σωστά μεταφρασμένα αντίγραφα εκφράζονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων [20, 21].

Η υπομονάδα αIIb (γλυκοπρωτεΐνη IIb, GPIIb ή CD41) αποτελείται 1008 αμινοξέα και από δύο αλυσίδες, μια βαριά και μια ελαφριά που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό [22]. Η αIIb μεταφράζεται από το πρόδρομο μονομερές αIIb από ένα και μόνο RNA που κωδικοποιεί και τις 2 αλυσίδες (βαριά και ελαφριά αλυσίδα), όπου στη συνέχεια υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από ένζυμα τους συμπλέγματος Golgi [23]. Η βαριά αλυσίδα (116kDa) είναι εξωκυττάρια [24], αποτελείται από 871 αμινοξέα και 4 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των 12 αμινοξέων, οι οποίες είναι ικανές να δεσμεύουν ιόντα ασβεστίου. Η ελαφριά αλυσίδα (25kDa) [25], αποτελείται από 137 αμινοξέα και μπορεί να διαχωριστεί σε τρία τμήματα: α) ένα τμήμα αποτελούμενο από 91 αμινοξέα, β) μία διαμεμβρανική περιοχή 26 αμινοξέων και γ) μια αλληλουχία 20 αμινοξέων που εντοπίζεται στο κυτόπλασμα και αποτελεί το καρβοξυτελικό άκρο. Η σύνδεση της βαριάς με την ελαφριά αλυσίδα γίνεται μεταξύ της Cys-826 της βαριάς αλυσίδας και της Cys-9 της ελαφριάς αλυσίδας [26].

Η υπομονάδα β (β3, GPIIIa ή CD61) είναι μία πρωτεΐνη (105 kDa) 762 αμινοξέων μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την αIIb υπομονάδα σε αναλογία 1:1 [26]. Αποτελείται από τρεις περιοχές α) μια εξωκυττάρια περιοχή 692 αμινοξέων, β) μια διαμεμβρανική 23 αμινοξέων και γ) μια κυττοπλασματική περιοχή 47 αμινοξέων. Η υπομονάδα β3 αποτελείται από 56 κυστεϊνικά κατάλοιπα και 28 δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι συγκεντρωμένοι σε 3 περιοχές της εξωκυττάριας περιοχής του μορίου: στο πλούσιο σε κυστεΐνες N-τελικό άκρο, σε μια ευαίσθητη σε πρωτεάσες κεντρική περιοχή και σε ένα πλούσιο σε δισουλφιδικούς δεσμούς κέντρο [27].

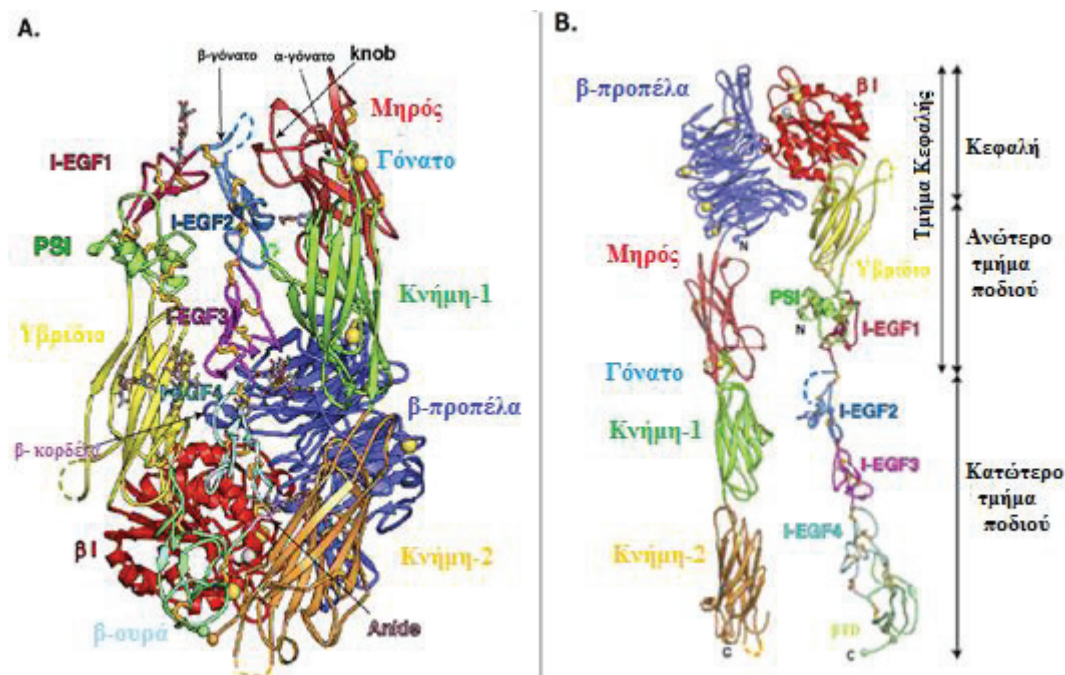
Οι 2 υπομονάδες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στην κατάσταση ηρεμίας και διαχωρίζονται κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Στην ανενεργή μορφή του υποδοχέα, η εξωκυττάρια περιοχή μπορεί να καμφθεί, ώστε η κεφαλή να πλησιάσει την κυτταρική μεμβράνη και να μεταβεί στην εκτεταμένη του μορφή κατά την ενεργοποίηση. Στο Σχήμα 2.4 περιγράφεται σχηματικά μια ιστορική ανασκόπηση του υποδοχέα αIIbβ3.



Σχήμα 2.4: Χρονιές-σταθμοί για τον υποδοχέα αIIbβ3 [28].

2.2.1 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ $\alpha\text{IIb}\beta 3$

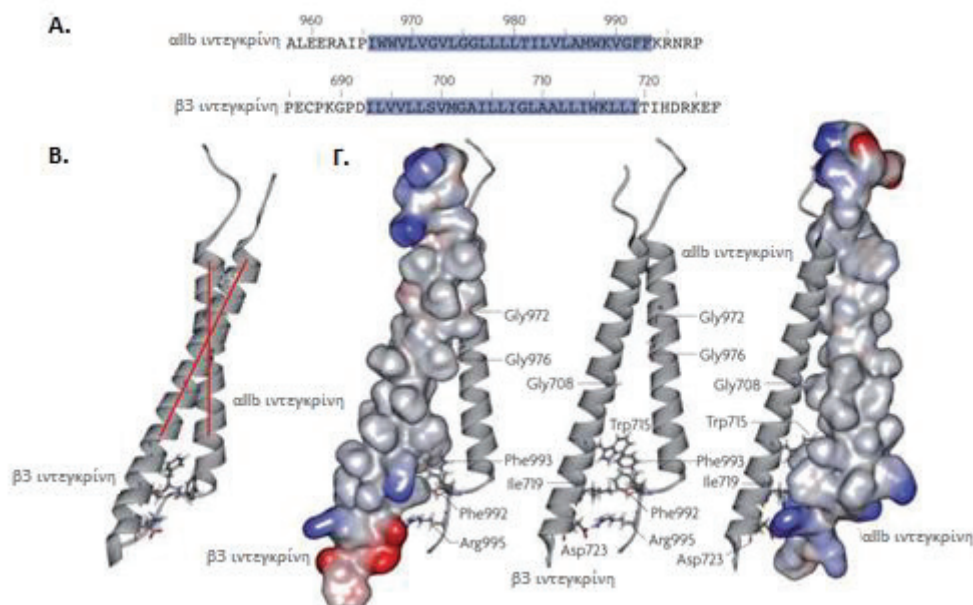
Η εξωκυττάρια περιοχή της αIIb υπομονάδας αποτελείται από μια περιοχή με δομή β -προπέλας (στο N-τελικό άκρο της υπομονάδας) και από μια περιοχή που ονομάζεται μηρός (thigh), τα οποία αποτελούν μέρη της κεφαλής του μορίου. Ενώ, η υπόλοιπη εξωκυττάρια περιοχή της υπομονάδας αποτελείται από 2 μονοκόμματα περιοχές, τις κνήμες (calf-1, 2) και από μια καμπή μεταξύ του μηρού και της κνήμης, που επιτρέπει στην υπομονάδα να καμφθεί και να συμπτυχθεί, το γόνατο (genu) [29]. Οι περιοχές μηρός και κνήμες έχουν δομή β -φύλλου, ενώ η β -προπέλα περιοχή αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μοτίβα 60 αμινοξέων με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν 7 «λεπίδες» που εκτείνονται από έναν κεντρικό πυρήνα. Στη βάση της β -προπέλας, υπάρχουν 4 μοτίβα σύνδεσης δισθενούς ιόντος, οι οποίες σχηματίζονται από οξυγόνα των ασπαρτικών και ασπαραγινών αμινοξέων [18] (Σχήμα 2.5).



Σχήμα 2.5: Η κρυσταλλική δομή της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta 3$ στην (Α) κεκαμμένη διαμόρφωση και στην (Β) εκτεταμένη διαμόρφωση, με συστολή των α - και β -γονάτων [30].

Η διαμεμβρανική περιοχή της αIIb υπομονάδας σχηματίζει α -έλικα, αλληλεπιδρά με το αντίστοιχο τμήμα της $\beta 3$ υπομονάδας [31] και εκτείνεται στην κυτταροπλασματική περιοχή. Η αIIb διαμεμβρανική έλικα αποτελείται από 24 αμινοξέα και διαπερνά τη διπλοστοιβάδα της μεμβράνης χωρίς να σχηματίζει κάποια στροφή [32]. Μελέτες της διαμεμβρανικής

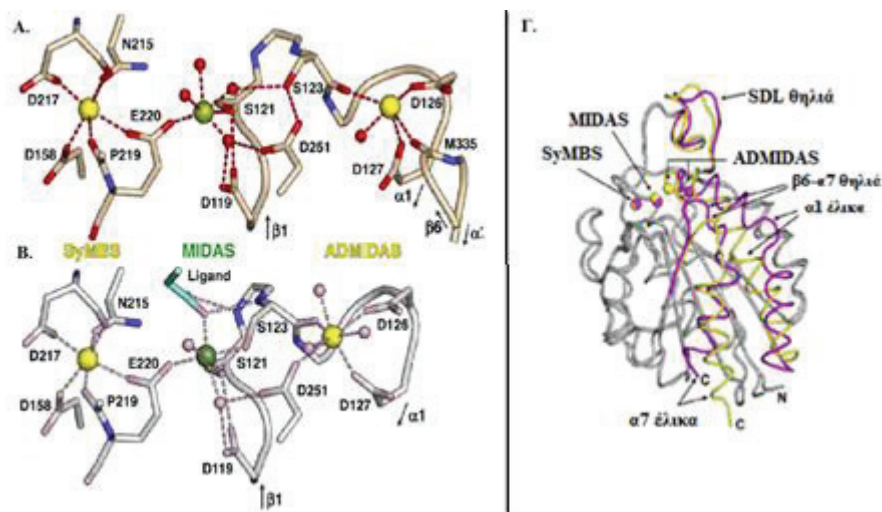
περιοχής των δυο υπομονάδων της ιντεγκρίνης, έδειξαν ότι η διαμεμβρανική περιοχή της β3 υιοθετεί μια μακριά έλικα [33, 34]. Ενώ η αIIb διπλώνει σε μια μικρότερη ευθύγραμμη έλικα, η οποία σταματάει στη Lys989 προς την ενδοκυττάρια περιοχή, τα 4 μη πολικά αμινοξέα που ακολουθούν σχηματίζουν μια θηλειά και τα αμινοξικά κατάλοιπα Phe992 και Phe993 συστρέφονται προς το λιπιδιακό κέντρο [32]. Επίσης τα όρια μεταξύ διαμεμβρανικής και κυτταροπλασματικής ουράς έχουν τεθεί σε καλά διατηρούμενα αμινοξικά κατάλοιπα Arg ή Lys, τα οποία προηγούνται 4 με 6 μη πολικά κατάλοιπα [35, 36]. (Σχήμα 2.6).



Σχήμα 2.6: Α) Αλληλουχία των διαμεμβρανικών περιοχών των υπομονάδων αIIb και β3. Β) Η Ile996, Arg995 της αIIb υπομονάδας και το Asp723 της β3 υπομονάδας υιοθετούν τη διαμόρφωση που επιτρέπει στη β3 υπομονάδα να κλείνει κατά περίπου 25° σε σχέση με το επίπεδο της μεμβράνης. Γ) Περιστροφή του μοντέλου κατά 90°, αποκαλύπτει τις διαμεμβρανικές περιοχές της ιντεγκρίνης. Τα βασικά αμινοξέα φαίνονται με μπλε χρώμα και τα όξινα με κόκκινο [36].

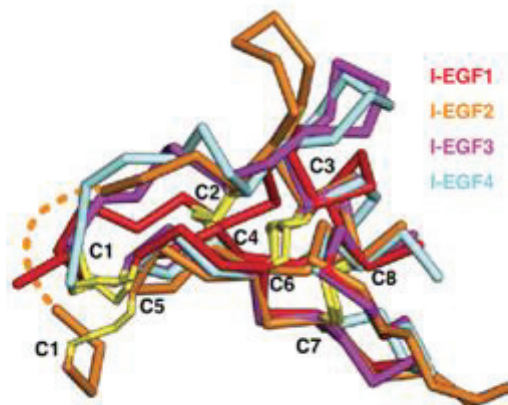
Το ενδοκυττάριο τμήμα της υπομονάδας αποτελείται από 20 αμινοξέα (K989 – E1008) και περιέχει την υψηλά διατηρημένη στις α-υπομονάδες των ιντεγκρινών περιοχή GFFKR [37, 38]. Αυτό το μοτίβο αντιστοιχεί στην περιοχή ⁹⁸⁹KVGFFKRN⁹⁹⁷, τερματίζει στη Pro998, η οποία ανήκει στη στροφή που σχηματίζουν τα αμινοξέα Asn-Arg-Pro-Pro (NRPP) [39] και η οποία επιτρέπει την αναδίπλωση της κυτταροπλασματικής ουράς. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με αντικατάσταση των 2 αμινοξικών καταλοίπων προλίνης με αλανίνη κατέληξαν σε διαφορετικά αποτελέσματα, πλήρη ενεργοποίηση [40] ή μερική ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [41, 42].

Η εξωκυττάρια περιοχή της υπομονάδας β3 αποτελείται από μια βΑ ή βΙ περιοχή, μια υβριδική περιοχή, από ένα N-τελικό κυστείνο-πλούσιο τμήμα (PSI, Plexin/Semaphorin/Integrin), από μια περιοχή ανθεκτική στις πρωτεάσες (I-EGF, Epidermal Growth Factor) και από ένα β-τελικό τμήμα (βTD) [43, 44]. Η βΙ περιοχή περιέχει 6 πλέγματα σε μορφή β-πτυχωτών φύλλων και 3 θέσεις πρόσδεσης μεταλλικών ιόντων που συμμετέχουν στην σύνδεση με το εξωκυττάριο πρόσδεμα (MIDAS, Metal Ion Adhesion Site) [18], την παρακείμενη περιοχή στην MIDAS (ADMIDAS, adjacement to the MIDAS) και την Επαγόμενη από Πρόσδεμα Περιοχή Σύνδεσης Μετάλλου (LIMBS). Η περιοχή MIDAS σχηματίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων, Asp119, Ser121, Ser123, Glu220 και Asp251, η περιοχή AMIDAS από τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Ser123, Met335, Asp126 και Asp127, ενώ η περιοχή LIMBS από τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Asp158, Asn215, Asp217, Pro219 και Glu220 (Σχήμα 2.7) [30]. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η περιοχή LIMBS δεν σχετίζεται με την πρόσδεση του προσδέματος ή δεν είναι επαγόμενη από δισθενές κατιόν και για αυτό προτάθηκε νέο όνομα, Συνεργιστική Περιοχή Πρόσδεσης Μεταλλικού Ιόντος (SyMBS). Η περιοχή SyMBS έχει θετικό ρυθμιστικό ρόλο στη πρόσδεση και είναι η υπεύθυνη περιοχή συνεργίας με τα ιόντα Ca^{2+} [30, 45 - 46].



Σχήμα 2.7: Οι περιοχές MIDAS, ADMIDAS και SyMBS, στη κεκαμμένη διαμόρφωση του υποδοχέα (Α.) και στην πλήρη ανοιγμένη διαμόρφωση του υποδοχέα με υψηλή συγγένεια για το εξωκυττάριο πρόσδεμα. Τα ιόντα Ca (χρυσό χρώμα) και Mn (πράσινο χρώμα) απεικονίζονται ως σφαίρες, τα μόρια νερού με μικρότερες σφαίρες σε ροζ ή κόκκινο χρώμα, τα άτομα N με μπλε χρώμα και τα άτομα O με κόκκινο ή ροζ. Γ. Μεγενθυμένη άποψη της βΙ περιοχής. Με κίτρινο απεικονίζεται στην ανοιχτή διαμόρφωση της ιντεγκρίνης, ενώ με μωβ στη κεκαμμένη διαμόρφωση [30].

Η I-EGF περιοχή αποτελείται από μια σειρά 4 επαναλαμβανόμενων περιοχών (I-EGF 1, - 4), ενώ η I-EGF4 ενώνεται με το βTD τμήμα [44, 47]. Η περιοχή γόνατο στην υπομονάδα β3, εντοπίζεται ανάμεσα στην I-EGF 1 και I-EGF 2 και επιτρέπει τη μετάβαση του υποδοχέα από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση. Στις I-EGF περιοχές εντοπίζονται 4 δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των κυστεϊνών C1-C5, C2-C4, C3-C6, C7-C8. Η I-EGF 1 περιοχή, αποτελεί τη μόνη εξαίρεση και στερείται το δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των κυστεϊνών C2-C4, γεγονός που επιτρέπει στη θηλιά (loop) C1-C3 να καταλάβει διαφορετική θέση σε σχέση με τις άλλες I-EGF περιοχές, παρέχοντας του με αυτό τον τρόπο μεγαλύτερη ευκινησία στη σύνδεση του με το PSI τμήμα και την I-EGF-2 περιοχή [30] (Σχήμα 2.8).



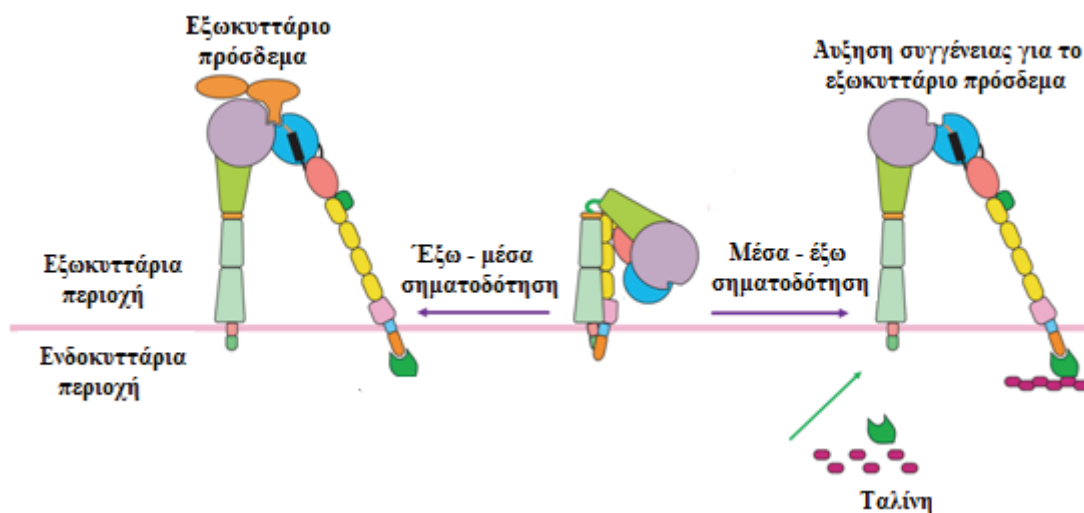
Σχήμα 2.8: Υπόθεση (χρησιμοποιώντας SSM, Secondary – structure matching) [48] των περιοχών I-EGF 1-4, η περιοχή I-EGF1 απεικονίζεται με κόκκινο, η I-EGF2 με πορτοκαλί, η I-EGF3 με μωβ και η I-EGF4 με γαλάζιο[30].

Όπως και στην αIIb υπομονάδα, η διαμεμβρανική έλικα της β3 εκτείνεται στην κυτταροπλασματική ουρά. Έχει βρεθεί ότι η β3 διαμεμβρανική περιοχή της ιντεγκρίνης κλείνει κατά περίπου 25° σε σχέση με το επίπεδο της μεμβράνης και έτσι επιτρέπει στις πλευρικές αλυσίδες των αντίστοιχων υδρόφοβων αμινοξέων στη β υπομονάδα [32, 34] να διατηρούν την ενσωμάτωσή τους στη μεμβράνη. Αυτή η κλίση της β3 διαμεμβρανικής έλικας, μπορεί επίσης να ευνοείται από την τάση των θετικώς φορτισμένων παράπλευρων αλυσίδων των καλά διατηρημένων αμινοξέων Lys και Arg που βρίσκονται ενσωματωμένες στη μεμβράνη και γειτονεύουν με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια [34] (Σχήμα 2.6). Η β3 κυτταροπλασματική περιοχή αποτελείται από 47 αμινοξέα (K716 – T762), μια μακριά α-έλικα προσκείμενη στη μεμβράνη. Η κυτταροπλασματική περιοχή εμφανίζει δυο α-ελικοειδή μοτίβα (K716- R⁷³⁴ και K748 – T755) και δυο NXXY (744NPLY⁷⁴⁷ και

$^{756}\text{NITY}^{759}$), τα οποία χρησιμοποιούνται ως θέσεις πρόσδεσης για διάφορες ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες [44, 49-51].

2.3 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ $\alpha\text{IIb}\beta_3$

Η ιντεγκρίνη $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ενεργοποιείται μέσω δύο μηχανισμών σηματοδότησης, τη μέσα-έξω και την έξω-μέσα σηματοδότηση και παρόλο που αυτά τα μονοπάτια είναι διακριτά, έχουν κοινές επιδράσεις [12, 36]. Ο μηχανισμός της έξω-μέσα της σηματοδότησης εκκινείται από τη πρόσδεση εξωκυττάριου προσδέματος στην κεφαλή της ιντεγκρίνης, που οδηγεί σε δομικές αλλαγές, τον διαχωρισμό των δυο υπομονάδων και την πυροδότηση ενδοκυττάριων μονοπατιών σηματοδότησης. Ενώ η μέσα-έξω σηματοδότηση μπορεί να ξεκινήσει από την αλληλεπίδραση ενδοκυττάριων σημάτων που οδηγούν σε αλλαγές στην εξωκυττάρια περιοχή της ιντεγκρίνης και αυξάνεται ο βαθμός συγγένειας για το πρόσδεμα [36]. Συνδυασμός των δυο μηχανισμών σηματοδότησης οδηγεί στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων για το σχηματισμό του θρόμβου (Σχήμα 2.9). Η πρωτογενής συσσώρευση (αντιστρεπτή συσσώρευση) εξαρτάται από τη μέσα-έξω σηματοδότηση ενώ η δευτερογενής (μη αντιστρεπτή συσσώρευση) εξαρτάται από την έξω-μέσα σηματοδότηση.



Σχήμα 2.9: Η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta_3$ μέσω των δύο μηχανισμών σηματοδότησης.

2.3.1 Η ΕΞΩ – ΜΕΣΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ αIIbβ3

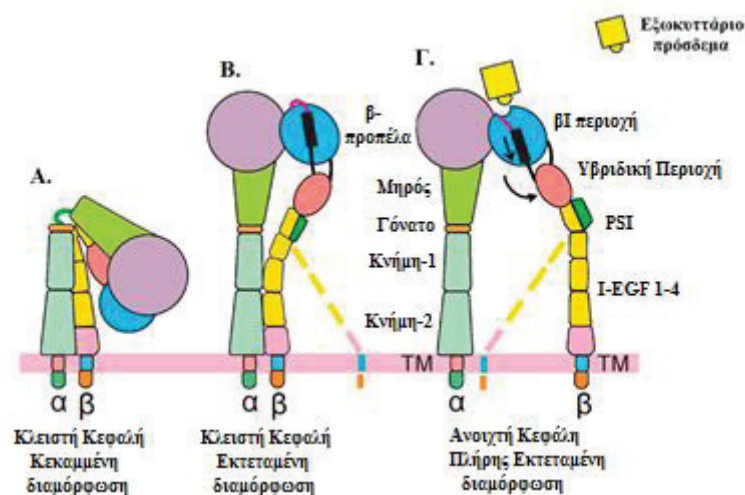
Όπως ήδη αναφέρθηκε, η έξω-μέσα ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης, εκκινείται με την πρόσδεση εξωκυττάρων προσδεμάτων (ινωδογόνο, vWF) στην κεφαλή αυτής. Μετά την πρόσδεση του προσδέματος, πυροδοτούνται ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης που περιλαμβάνουν την ανασύνταξη της ακτίνης, τη δομική αλλαγή της ιντεγκρίνης και τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε αμινοξικά κατάλοιπα της τυροσίνης. Η ενεργοποιημένη μορφή της ιντεγκρίνης μπορεί επίσης να επάγεται και από δισθενή κατιόντα ή από προσδέματα που περιέχουν την RGD αλληλουχία [7, 52]. Οι αναδιοργανώσεις στις εξωκυττάρειες περιοχές της ιντεγκρίνης οδηγούν στην έκφραση νέο-επιτόπων στις δυο υπομονάδες, γνωστοί ως LIBS (ligand-induced binding sites, πρόσδεμα που δημιουργεί θέσεις δέσμευσης) [53, 54].

Το πρώτο στάδιο της έξω-μέσα σηματοδότησης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της οικογένειας των Src και Syk κινασών. Η ενεργοποίηση της οικογένειας των κινασών πραγματοποιείται αμέσως μετά τη σύνδεση του προσδέματος και της σύνδεσης της Ga₁₃ πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική ουρά της β3 υπομονάδας. Το βιοχημικό μονοπάτι που εκκινείται μπορεί να περιγραφεί ως εξής: α) Οι Src κινάσες που βρίσκονται στη β3 κυτταροπλασματική ουρά, ενεργοποιείται από τη σύνδεση του εξωκυττάρου προσδέματος στον υποδοχέα και εκκινεί τη συσσωμάτωση (clustering) του υποδοχέα [55], β) Η Syk κινάση έχει προσληφθεί στη β3 ουρά και ενεργοποιείται από τη Src κινάση [55, 56] και γ) φωσφορυλίωση των αμινοξικών καταλοίπων τυροσίνης στα δυο NXXY μοτίβα στη β3 ουρά, γεγονός ιδιαίτερα κρίσιμο διότι η φωσφορυλίωση έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη φυσική σύνδεση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 με τον κυτταροσκελετό [57]. Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στα αμινοξικά κατάλοιπα Y747 και Y759, κατά τη συσσώρευση ανεξάρτητα από τον αγωνιστή [57] και τα δυο μοτίβα ενώνονται σε θέσεις PTB (θέσεις πρόσδεσης φωσφοτυροσινών) [58].

Υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην έξω-μέσα σηματοδότηση, όπως η CIB (Calcium Binding Protein) που προσδένεται στην αIIb κυτταροπλασματική ουρά, η κυτταροσκελετική πρωτεΐνη ταλίνη που ενώνεται στα κυτταροπλασματικά άκρα της ιντεγκρίνης και η β3-ενδονεξίνη που αλληλεπιδρά με το ⁷⁵⁶NITY⁷⁵⁹ μοτίβο στη β3 υπομονάδα [59]. Όπως επίσης η Shc και η μυοσίνη, οι θέσεις πρόσδεσης των οποίων δημιουργούνται μετά τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης στις περιοχές ⁷⁵⁶NITY⁷⁵⁹ και ⁷⁴⁴NPLY⁷⁴⁷ [57].

Έχουν προταθεί δυο μοντέλα για το μηχανισμό της ενεργοποίησης, το μοντέλο του σύρτη (deadbolt) και το μοντέλο του σουγιά (switchblade) [44]. Σύμφωνα με το μοντέλο switchblade, η ιντεγκρίνη λαμβάνει τρεις διακριτές διαμορφώσεις, που αντιστοιχούν στην κεκαμμένη διαμόρφωση-κλειστή κεφαλή (bent with a closed headpiece, ανενεργή), στην ανοιχτή διαμόρφωση-κλειστή κεφαλή (extended with a closed headpiece) και στην πλήρως ανοιγμένη διαμόρφωση-ανοιχτή κεφαλή (extended with an open headpiece, ενεργή). Στην ανενεργή κατάσταση, η ιντεγκρίνη εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για τους προσδέτες και οι διαμεμβρανικές περιοχές των δυο υπομονάδων είναι ενωμένες [33]. Στην ενδιάμεση κατάσταση, η ιντεγκρίνη δεν βρίσκεται στη κυρτή διαμόρφωση και οι διαμεμβρανικές περιοχές έχουν διαχωριστεί [36, 60] και τέλος η πλήρως ανοιγμένη διαμόρφωση επέρχεται όταν η κεφαλή της ιντεγκρίνης εμπλέκεται σε μια αλληλεπίδραση με το εξωκυττάριο πρόσδεμα [52]. Η πλήρως ανοιγμένη διαμόρφωση με την ενδιάμεση διαφέρουν στο ότι στη πρώτη διαμόρφωση, στη κεφαλή της ιντεγκρίνης δημιουργείται μια σχισμή μεταξύ των δυο υπομονάδων έτσι ώστε να επιτευχθεί η πρόσδεση του εξωκυττάριου προσδέματος [61, 62].

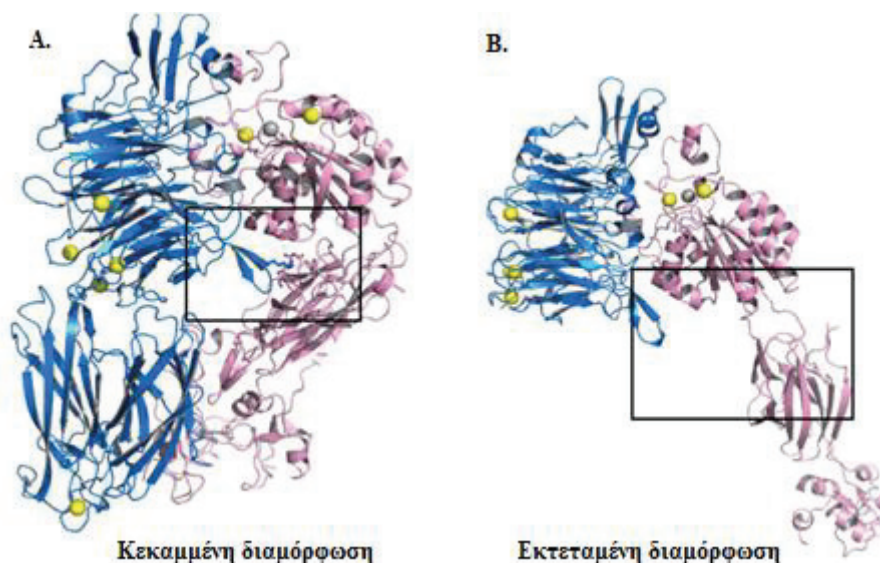
Εναλλακτικά το μοντέλο deadbolt προβλέπει μια πολύ μικρότερη διαμορφωτική αλλαγή της ιντεγκρίνης. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, μια θηλιά «φουρκέτα» στη β3 υπομονάδα, λειτουργεί ως «κοχλίας» και εμποδίζει το εκτόπισμα της β6-α7 θηλιάς της βΙ περιοχής, διατηρώντας έτσι την ιντεγκρίνη στην ανενεργή διαμόρφωση [61, 63-64]. Συγκρίνοντας τα δύο μοντέλα θα μπορούσε κανείς να διαπιστώσει: α) στο switchblade μοντέλο η ιντεγκρίνη προσδέεται με τον προσδέτη όταν βρίσκεται στην εκτεταμένη διαμόρφωση της [65] και β) στο deadbolt μοντέλο το εξωκυττάριο πρόσδεμα προσδέεται στην ιντεγκρίνη όταν αυτή βρίσκεται στην κεκαμμένη διαμόρφωση και στη συνέχεια μεταβαίνει στην πλήρως ανοιγμένη διαμόρφωση [61, 66]. Το μοντέλο deadbolt όμως σύντομα αναθεωρήθηκε, αφού διάφορες μελέτες διαπίστωσαν ότι απαιτείται επέκταση της εξωκυττάριας δομής της ιντεγκρίνης για τη πρόσδεση του προσδέματος. Πρόσφατη μάλιστα μελέτη έδειξε ότι η κεφαλή της ιντεγκρίνης λαμβάνει οχτώ διαφορετικές RGD-προσδεδεδεμένες διαμορφώσεις. Ξεκινώντας από την κλειστή διαμόρφωση της βΙ περιοχής, παρατηρήθηκαν έξι ενδιάμεσες διαμορφώσεις και τέλος η πλήρης ανοιγμένη διαμόρφωση με κίνηση της βΙ περιοχής και με εκτόπισμα προς τα έξω της υβριδικής περιοχής της β3 υπομονάδας [67]. Ο Zhu και οι συνεργάτες τους, βασισμένοι στο switchblade μοντέλο και στα παραπάνω ευρήματα, πρότειναν το μοντέλο στο Σχήμα 2.10.



Σχήμα 2.10: Αναδιαμορφώσεις της εξωκυττάριας δομής της ιντεγκρίνης. Α. Στην κεκαμμένη διαμόρφωση, όπου η κεφαλή είναι κλειστή και η ιντεγκρίνη παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια για το πρόσδεμα. Β. Στην εκτεταμένη διαμόρφωση, όπου η κεφαλή παραμένει κλειστή και η ιντεγκρίνη εξακολουθεί να έχει χαμηλό βαθμό συγγένειας για το πρόσδεμα. Γ. Η πλήρως ανοιγμένη διαμόρφωση με ανοιχτή τη κεφαλή, όπου σε αυτή την περίπτωση η ιντεγκρίνη παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για το πρόσδεμα [67].

Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν την αναγκαιότητα της κίνησης προς τα έξω (swing-out) της β_3 υβριδικής περιοχής στην ανοιγμένη διαμόρφωση της ιντεγκρίνης, ώστε να προσδεθεί το ινωδογόνο και να επιτευχθεί η έξω-μέσα ενεργοποίηση της (Σχήμα 2.11). Τα πρώτα πειραματικά δεδομένα για την αναγκαιότητα της swing-out διαμόρφωσης (ώστε να επιτευχθεί η πρόσδεση του εξωκυττάρια προσδέματος), προήρθαν από τη σταθεροποίηση της ανοιχτής διαμόρφωσης μέσω εισαγωγής δισουλφιδικού δεσμού στη βI περιοχή με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των περιοχών βI και υβριδικής [68]. Στη συνέχεια διάφορες μελέτες εισήγαγαν δισουλφιδικούς δεσμούς στον υποδοχέα ώστε να περιορίσουν ή να σταθεροποιήσουν την κίνηση swing-out: αIIb R320/ β_3 R563 [69], β_3 T329/347 [68], αIIb D319/ β_3 V359 [70], αIIb R597/Y645 [71], β_3 (S367/S551, G382/T546 και V332/S674) [70]. Επίσης πιο πρόσφατες μελέτες εισήγαγαν μεταλλάξεις στον υποδοχέα με σκοπό να επάγουν ή να διευκολύνουν την κίνηση swing-out [70], είτε για επέκταση της υπομονάδας αIIb [70]. Τέλος σε μια μελέτη του 2013, ο Cheng και οι συνεργάτες του δημιούργησαν δυο μεταλλαγμένα μόρια της ιντεγκρίνης, εισάγοντας δισουλφιδικούς δεσμούς στη περιοχή β -προπέλας και στην υβριδική περιοχή, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο τη κίνηση swing-out [72]. Τα δυο αυτά μεταλλαγμένα μόρια της ιντεγκρίνης (αIIb K321/ β_3 E358 και αIIb K321/ β_3 R360) απέτυχαν να προσδεθούν στο διαλυτό ινωδογόνο, προσδέθηκαν όμως στο

ακίνητοποιημένο ινωδογόνο καταλήγοντας όμως σε επαγωγή «ελαττωματικής» έξω-μέσας σηματοδότησης.



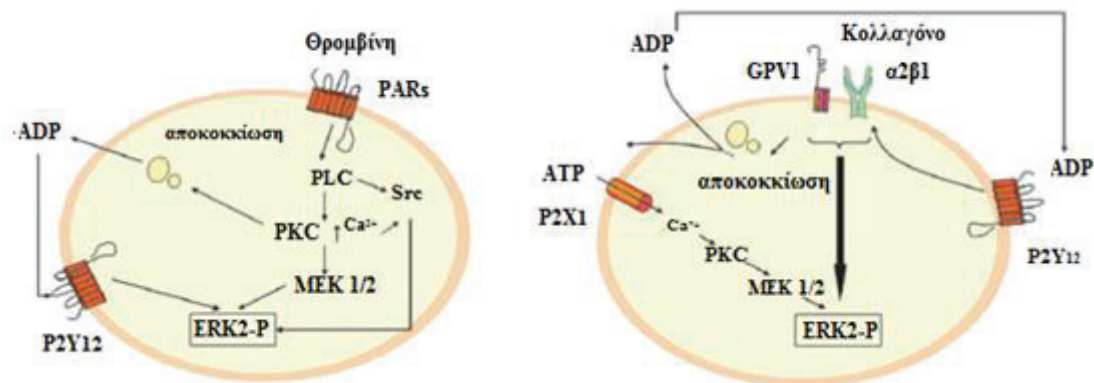
Σχήμα 2.11: Δομή της ιντεγκρίνης αIIbβ3 στην κεκαμμένη διαμόρφωση (A) και στην πλήρως ανοιγμένη διαμόρφωση (B). Η αIIb διακρίνεται με μπλε χρώμα, η υπομονάδα β3 με ροζ χρώμα [72].

2.3.1.1 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ (ERK1/2)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται με το μιτογόνο (MAP), ελέγχουν σημαντικές κυτταρικές αποκρίσεις σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και συμβάλουν σε λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η απόπτωση [73]. Στο ανθρώπινο είδος έχουν περιγραφεί έξι διακριτές υποοικογένειες με βάση την ομολογία αλληλουχίας. Από αυτές οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (ERK1/2), η c-Jun N-τελική κινάση (JNK1) και η p38 MAP κινάσες έχουν αναγνωριστεί στα αιμοπετάλια και φαίνεται να ενεργοποιούνται όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται από διαφορετικούς αγωνιστές, όπως η θρομβίνη και το κολλαγόνο [74]. Η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της ERK2 επάγεται από αγωνιστές των αιμοπεταλίων, όπως η θρομβίνη, το κολλαγόνο, ο παράγοντας vWF και το ADP. Φωσφορυλίωση όμως της ERK1 δεν επάγεται ούτε με ισχυρούς αγωνιστές όπως θρομβίνη ή κολλαγόνο, ίσως γιατί βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες στο αιμοπετάλιο σε σχέση με την ERK2 [73]. Το μονοπάτι της σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της ERK2 δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η ενεργοποίηση της ERK2 από θρομβίνη, είναι εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική

κινάση C (PKC) καθώς και από της κινάσες θρεονίνης/τυροσίνης (MEK1/2) [75]. Η ενεργοποίηση της όμως δεν αποκλείεται να προκαλείται και από άλλους αγωνιστές των αιμοπεταλίων, ενώ φαίνεται ότι οι κινάσες Src πιθανά να εμπλέκονται στη σηματοδότηση της πρωτεΐνης [76].

Έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη RNF181 (18 kDa) που εντοπίζεται στα αιμοπετάλια, αλληλεπιδρά με την ενδοκυττάρια αIIb αλληλουχία $^{989}\text{KVGFFKR}^{995}$ [77] και συμμετέχει σε ουβικιτινυλίωσεις, διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στο βιοχημικό μονοπάτι της ERK/MAPK, όπου στη συνέχεια ακολουθεί η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [78]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι και η πρωτεΐνη CIB συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι της ERK [79]. Η ενεργοποίηση της ERK κατά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων φαίνεται να ρυθμίζεται αρνητικά από την αλληλεπίδραση του προσδέματος με την ιντεγκρίνη $\alpha\text{IIb}\beta 3$ και παρά την αντιφατική σχέση ERK-υποδοχέα, έχει αναφερθεί ότι η επαγόμενη φωσφορυλίωση της ERK από τον vWF και τη θρομβίνη, ενισχύεται σημαντικά παρουσία αναστολέων της ιντεγκρίνης (RGD) ή μονοκλωνικού αντισώματος anti- $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [80].



Σχήμα 2.12: Η ενεργοποίηση της ERK2 επαγόμενη από θρομβίνη και κολλαγόνο [73].

2.3.2 Η ΜΕΣΑ - ΕΞΩ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ $\alpha\text{IIb}\beta 3$

Ο μηχανισμός της μέσα-έξω σηματοδότησης, ορίζεται ως η διαδικασία της ενεργοποίησης που προκαλείται από ένα ενδοκυττάριο σήμα και οδηγεί σε αύξηση της συγγένειας της κεφαλής της ιντεγκρίνης με τα εξωκυττάρια προσδέματα, μέσω της σύνδεσης πρωτεϊνών-κλειδιά στα κυτταροπλασματικά άκρα. Μεταξύ των διάφορων πρωτεϊνών που δεσμεύονται στις ιντεγκρίνες και τις συνδέουν με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, η ταλίνη και η κιντλίνη έχουν αναφερθεί ως υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της

ιντεγκρίνης μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τη κυτταροπλασματική ουρά της $\beta 3$ υπομονάδας [36, 81].

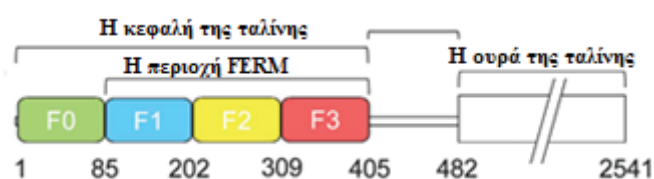
Η πιο γνωστή σηματοδοτική πορεία για την μέσα-έξω ενεργοποίηση, πυροδοτείται με την πρόσδεση της θρομβίνης στον υποδοχέα PAR-1, ο οποίος βρίσκεται στην μεμβράνη των ανθρωπινων αιμοπεταλίων. Αυτή η αλληλεπίδραση διεγείρει τη φωσφολιπιδιακή υδρόλυση και οδηγεί στην παραγωγή της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και της διακυλογλυκερόλης (DAG) και σε αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου. Η αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυττάρων Ca^{2+} και η DAG ενεργοποιούν με τη σειρά τους το CALDAG-GEF1 (παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης), την πρωτεϊνική κινάση C και την πρωτεΐνη RAP-1. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAP-1 [52] οδηγεί στην πρόσληψη της ταλίνης στη $\beta 3$ κυτταροπλασματική ουρά και του μορίου RIAM (RAP-1, Interacting adaptor molecule), διευκολύνοντας την πρόσδεση της ταλίνης στη $\beta 3$ κυτταροπλασματική ουρά και την ενεργοποίηση της $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ιντεγκρίνης [36].

Πίνακας 2.1: Πρωτεΐνες που έχουν αναγνωρισθεί ότι αλληλεπιδρούν με την αIIb ή $\beta 3$ κυτταροπλασματική ουρά [12].

Πρωτεΐνη	Περιοχή σύνδεσης	Πρωτεΐνη	Περιοχή σύνδεσης
Κυτοσολικές πρωτεΐνες		Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες	
Ταλίνη	$\beta 3$	CD9	
Μυοσίνη	$\beta 3$	CD36	
Σκελεμίνη	$\beta 3$	CD47/IAP	
Φιλαμίνη	$\beta 3$	CD63	
α -ακτίνη	$\beta 3$	CD98	
F-ακτίνη	$\beta 3$	CD151	
		CD31	
Σηματοδοτικές πρωτεΐνες			
Παξυλίνη	$\beta 3$	Άλλες	
Shc	$\beta 3$	BiP	$\alpha\text{IIb}\beta 3$
Grb2	$\beta 3$	Καλρετικουλίνη	αIIb
		CIB	αIIb
Πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες		IcIn	αIIb
Src	$\beta 3$	B3-ενδονεξίνη	$\beta 3$
Csk	$\beta 3$	Aup-1	αIIb
Syk	$\beta 3$	Πρωτεϊνική φωσφατάση	αIIb
ILK	$\beta 3$		
FAK	$\beta 3$		
PP1c	αIIb		

Περισσότερες από 20 πρωτεΐνες έχουν αναγνωρισθεί ότι προσδένονται με την αIIb ή $\beta 3$ κυτταροπλασματική ουρά (Πίνακας 2.1) και οι περισσότερες από αυτές έχουν συσχετιστεί με τη μέσα-έξω ενεργοποίηση [82]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ταλίνη θεωρείται από τους

περισσότερους ερευνητές υπεύθυνη για τη μέσα-έξω σηματοδότηση. Η ταλίνη είναι μια άφθονη κυτοσολική πρωτεΐνη (3% του συνόλου των αιμοπεταλιακών πρωτεϊνών) και συνδέει την ιντεγκρίνη με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης [83, 84]. Είναι μια μεγάλη αντιπαράλληλη ομοδιμερές πρωτεΐνη, αποτελείται από 2541 αμινοξέα (270 kDa), από μια N-τελική σφαιρική κεφαλή (47 kDa) και από μια μακριά C-τελική ελικοειδής ουρά (190 kDa) [12]. Η κεφαλή της ιντεγκρίνης αποτελείται από μια FERM περιοχή (Four-point-one/erzin/radixin/moesin homology domain) [85], που αποτελείται από 4 υποπεριοχές, την προσφάτως προσδιορισμένη F0 [86] και τις F1, F2, F3 (Σχήμα 2.13).

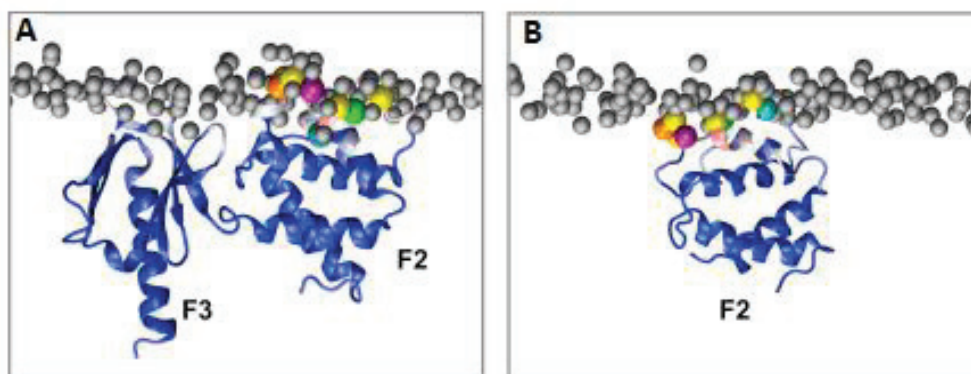


Σχήμα 2.13: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ταλίνης [86].

Η FERM περιοχή είναι μια περιοχή κοινή για διάφορες πρωτεΐνες και διαμεσολαβεί στη σύνδεση του κυτταροσκελετού με την πλασματική μεμβράνη, επίσης αλληλεπιδρά συχνά με την κυτταροπλασματική ουρά των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Η F0 υποπεριοχή είναι ομόλογη της F1 υποπεριοχής και οι δυο εμφανίζουν δομή ουβικουιτίνης. Στην F1 υποπεριοχή έχει βρεθεί ένας βρόγχος, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να υιοθετεί μια ελικοειδή μορφή όπου τα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα ομαδοποιούνται στην επιφάνεια [86]. Έχει βρεθεί ότι αυτός ο βρόγχος και τα βασικά αμινοξέα είναι προαπαιτούμενα για την ενεργοποίηση των β_1 ιντεγκρινών και ότι συνεισφέρουν στην $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ενεργοποίηση [84]. Η F0 υποπεριοχή συναντάται σε όλες τις ισόμορφες μορφές της ταλίνης, υποδεικνύοντας τον σημαντικό της ρόλο. Έχει αναφερθεί ότι είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των β_1 ιντεγκρινών και ότι ενισχύει σημαντικά την ενεργοποίηση των β_3 ιντεγκρινών [87]. Ενώ η F3 υποπεριοχή εμφανίζει PTB δομή (περιοχή δέσμευσης φωσφοτυροσινών) και συνδέεται άμεσα με την β_3 -κυτταροπλασματική ουρά, σχηματίζοντας διεπαφή με το NPxY μοτίβο [88]. Η ουρά της ταλίνης αποτελείται από 62 α -έλικες που καταλήγουν σε μια έλικα στη C-τελική περιοχή.

Οι κυτταροπλασματικές ουρές της ιντεγκρίνης βρίσκονται διατηρημένες κοντά στη μεμβράνη και συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά περιορίζουν την ιντεγκρίνη στην ανενεργή της μορφή. Η πρόσδεση της κεφαλής της ταλίνης με την β_3 κυτταροπλασματική

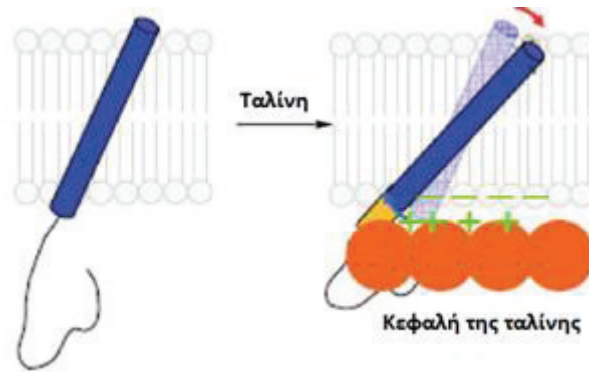
ουρά, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειας με το εξωκυττάριο πρόσδεμα. Η PTB περιοχή της F3 της ταλίνης, μετατρέπει αυτή την υποπεριοχή σε υψηλή συγγένειας περιοχή για τη $\beta 3$ κυτταροπλασματική ουρά και αλληλεπιδρά με το μοτίβο $^{744}\text{NPLY}^{747}$ [90]. Η αλληλεπίδραση αυτή, φαίνεται ότι οφείλεται στον εύκαμπτο βρόγχο μεταξύ των πτυχωτών φύλλων που σχηματίζουν μια υδρόφιλη θύλακα που περιέχουν τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων F^{727} και F^{730} [91]. Επίσης έχει αναφερθεί και μια δεύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ της ταλίνης και $\beta 3$ κυτταροπλασματικής ουράς, η οποία όμως δεν είναι τόσο ισχυρή. Η ασθενής αυτή αλληλεπίδραση λαμβάνει μέρος με την κοντινή στη μεμβράνη αλληλουχία $^{722}\text{HDRKEFAKFEEER}^{734}$, η οποία όμως δεν είναι απαραίτητη για τη σύνδεση της ταλίνης. Επίσης δεν είναι ακόμα σαφές, αν η ισχυρή ή η ασθενής αλληλεπίδραση συμβαίνει ταυτόχρονα ή διαδοχικά [92]. Επιπλέον οι θετικά φορτισμένες υποπεριοχές της F1, F2 και F3 αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση της πρόσδεσης της ταλίνης [86, 91] (Σχήμα 2.14).



Σχήμα 2.14: Η αλληλεπίδραση των F2 και F3 υποπεριοχών της κεφαλής της ταλίνης με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (γκρι σφαίρες) A.) Τα αμινοξικά κατάλοιπα των λιπιδίων που έρχονται σε επαφή με τις υποπεριοχές της ταλίνης φαίνονται με τα χρώματα L262 (πράσινο), F266 (γαλάζιο), Q275 (πορτοκαλί) και G277 (μωβ), ενώ με τα κίτρινα σφαιρίδια φαίνονται τα βασικά αμινοξέα (K258, K274, R276, K280) της F2 υποπεριοχής. B). Διάγραμμα προσομοίωσης για την F2 υποπεριοχή, τα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν είναι K256 (γαλάζιο), L262 (πράσινο), Q275 (πορτοκαλί) και G277 (μωβ) [89].

Το ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί, είναι πως η πρόσδεση της ταλίνης οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Έχουν περιγραφεί 3 πιθανοί διαφορετικοί μηχανισμοί. Ο πρώτος μηχανισμός υποστηρίζει ότι η ταλίνη προκαλεί μια πλευρική κίνηση στη διαμεμβρανική ή κυτταροπλασματική περιοχή της $\beta 3$ υπομονάδας και διακόπτει την αλληλεπίδραση των δυο υπομονάδων με τη μεμβράνη [92]. Αυτό το μοντέλο υποστηρίζεται

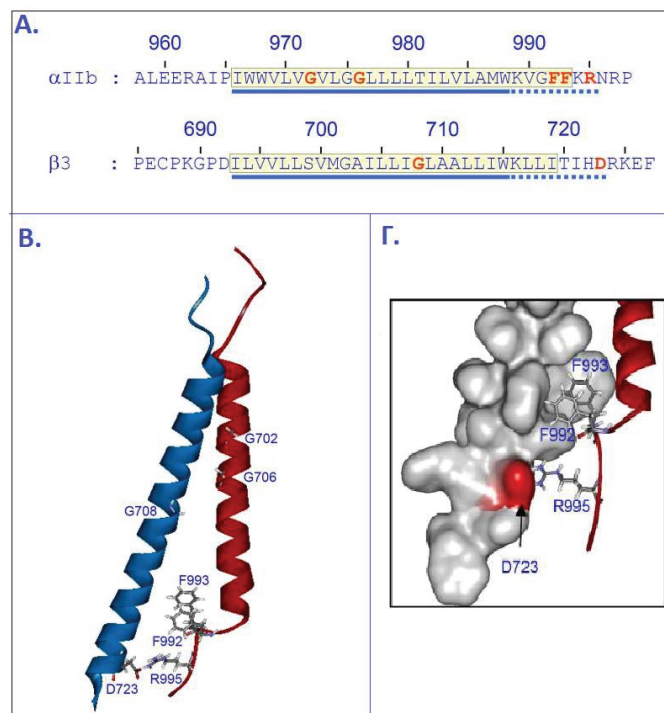
από μελέτη που έδειξε ότι η πρόσδεση της ταλίνης μπορεί να αλλάξει τη γωνία κλίσης της β υπομονάδας της ιντεγκρίνης (Σχήμα 2.15) [89]. Η γωνία αυτή θεωρείται ιδιαίτερος σημαντική, με κατά συνέπεια αλλαγή της κλίσης της να διαταράσσει αυτή την αλληλεπίδραση και να οδηγεί στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [32, 93].



Σχήμα 2.15: Πιθανός μηχανισμός δράσης της ταλίνης, όπου η κλίση της υπομονάδας β_3 της ιντεγκρίνης αλλάζει [94].

Ο δεύτερος πιθανός μηχανισμός υποστηρίζει ότι η K327 της ταλίνης βρίσκεται πολύ κοντά και αλληλεπιδρά με το D723 της β_3 υπομονάδας, διαταράσσοντας τη γέφυρα άλατος μεταξύ R995 (αIIb) και D723, ευνοώντας την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης (Σχήμα 2.15). Η ασύμμετρη δομή της διαμεμβρανικής περιοχής της ιντεγκρίνης και συγκεκριμένα η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του μη ελικοειδούς τμήματος της αIIb (F992 και F⁹⁹³) αλληλεπιδρά με την R995 (αIIb) και D723 (β_3) σταθεροποιεί το διαμεμβρανικό σύμπλοκο. Τα αμινοξικά κατάλοιπα R995 (αIIb) και D723 είναι εύκολα προσβάσιμα από την κεφαλή της ταλίνης, γεγονός που θα μπορούσε να διαταράξει αυτή την αλληλεπίδραση [95]. Μάλιστα μελέτη της δομής των υποπεριοχών F2 και F3 της ταλίνης που βρίσκεται σε σύμπλοκο με την κυτταροπλασματική της β_1 ιντεγκρίνης, έδειξε ότι η ταλίνη σχηματίζει γέφυρα άλατος με αμινοξικά κατάλοιπα ασπαρτικού της β υπομονάδας και ότι δυνητικά διαταράσσει την αλληλεπίδραση με την R995 (αIIb) [95]. Επίσης στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε ότι τα βασικά αμινοξέα της F2 υποπεριοχής αλληλεπιδρούν με την κεφαλή των φωσφολιπιδίων, επιτρέποντας στη ταλίνη να αλλάξει την γωνία κλίσης της διαμεμβρανικής περιοχής των β ιντεγκρινών (πιθανός μηχανισμός 1). Αυτά τα ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η σύνδεση της ταλίνης είναι απαραίτητη για την πλήρη μέσα-έξω ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [91, 96] ακόμα και όταν η αλληλεπίδραση R995 (αIIb) και D723 (β_3) διακόπτεται.

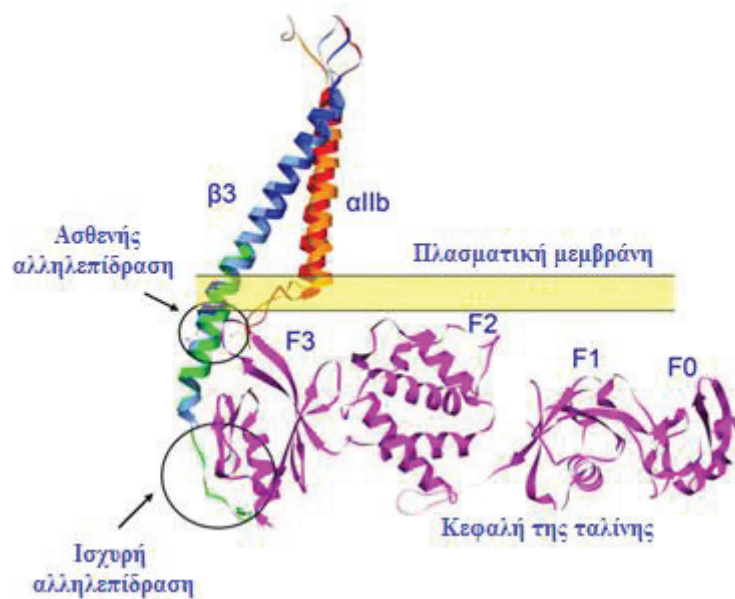
Τέλος ο τρίτος πιθανός μηχανισμός (Σχήμα 2.16) υποστηρίζει ότι η ταλίνη πιθανά να εισέρχεται μεταξύ των υπομονάδων της ιντεγκρίνης, ενεργώντας ως «σφήνα» και να ανοίγει πλήρως την κυτταροπλασματική και διαμεμβρανική περιοχή μέσω στερεοχημικής παρεμπόδισης [92]. Οι 3 αυτοί πιθανοί μηχανισμοί πιθανά να δρουν συνεργατικά, όμως περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να περιγραφεί ο ακριβής μηχανισμός.



Σχήμα 2.16: Α. Αμινοξική αλληλουχία της ιντεγκρίνης α IIb β 3 στη διαμεμβρανική περιοχή. Η διαμεμβρανική αλληλουχία εσωκλείεται σε κίτρινο πλαίσιο. Β. Η NMR δομή της ιντεγκρίνης α IIb β 3, με μπλε χρώμα φαίνεται η υπομονάδα β 3 και με κόκκινο η α IIb. Γ. Η γέφυρα άλατος μεταξύ των αμινοξέων R⁹⁹⁵ (α IIb) και D⁷²³ (β 3) [92].

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει ότι μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών που δεσμεύονται στη β -κυτταροπλασματική ουρά των ιντεγκρινών, οι κιντλίνες, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [36]. Στα θηλαστικά εντοπίζονται 3 ισόμορφα κιντλινών, η κιντλίνη-1 (URP1), η κιντλίνη-2 (Mig-2) και η κιντλίνη-3 (URP2) [97]. Οι κιντλίνες περιέχουν στη δομή τους μια FERM περιοχή, η οποία αποτελείται από 4 υποπεριοχές F0, F1, F2 και F3. Η F2 υποπεριοχή χωρίζεται σε δυο ίσα μέρη με ομολογία πλεκστρίνης (pleckstrin homology-PH domain) [94]. Η δομή των κιντλινών διαφέρει από αυτή της ταλίνης σε δυο σημαντικά χαρακτηριστικά, την απουσία της C-τελικής ελικοειδούς ουράς και την παρουσία της PH περιοχής [98]. Διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η PH

περιοχή είναι απαραίτητη ώστε η κιντλίνη να επάγει την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών [98-100] και άλλες ότι η F0 περιοχή είναι απαραίτητη για να μπορέσει η κιντλίνη να ενισχύσει την ενεργοποίηση της $\alpha\text{IIb}\beta_3$, επαγόμενης από ταλίνη [101]. Επίσης έχει αναφερθεί ότι οι κιντλίνες δεσμεύονται στο δεύτερο NxxY μοτίβο της β κυτταροπλασματικής ουράς των ιντεγκρινών, ότι η θέση πρόσδεσης τους είναι διαφορετική από αυτή της ταλίνης και ότι αυτή η πρόσδεση είναι απαραίτητη για να μπορέσουν οι κιντλίνες να δράσουν ως ρυθμιστές της ιντεγκρίνης [94, 99, 102].



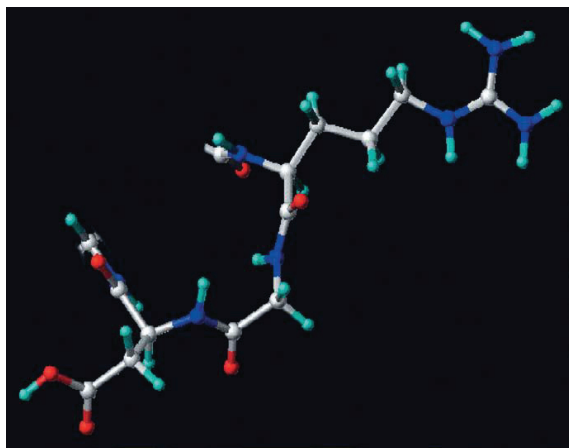
Σχήμα 2.17: Υποθετικό μοντέλο της πρόσδεσης της ταλίνης στη β_3 κυτταροπλασματική ουρά της ιντεγκρίνης [92].

Ο ακριβής όμως μηχανισμός δράσης των κιντλινών παραμένει άγνωστος, αν και τα τελευταία χρόνια διάφοροι ερευνητές έχουν στρέψει την προσοχή τους σε αυτές. Ενδεικτικά κάποιες από αυτές τις μελέτες περιγράφονται παρακάτω. Μεταλλάξεις στη κιντλίνη-1 οδήγησαν σε διαταραχή της λειτουργίας των β_1 ιντεγκρινών και ελλαττωματική προσκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων [103, 104] ενώ γενετική εκτομή της κιντλίνης-2 σε ποντίκια οδήγησε σε αναστολή της β_1 ενεργοποίησής [105]. Υπερέκφραση της κιντλίνης-1 ή της κιντλίνης-2 αναστέλλει δραματικά την ενεργοποίηση επαγόμενη από ταλίνη των β_1 ιντεγκρινών [106], ενώ αντίθετα υπερέκφραση αυτών ενίσχυσε σημαντικά την ενεργοποίηση από ταλίνη της $\alpha\text{IIb}\beta_3$, αν και στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι μικρή επίδραση έχει η δράση των κιντλινών από μόνες τους [99, 106]. Πειράματα με κύτταρα αναφέρουν ότι οι κιντλίνες όταν δρουν μόνες τους έχουν μικρή επίδραση στην

ενεργοποίηση, ενώ σε συνδυασμό με την ταλίνη ο ρόλος τους είναι σημαντικός [99, 106]. Νέες μελέτες που βασίστηκαν σε αυτή την παρατήρηση, -για το αν δηλαδή η ταλίνη δεν δρα μόνη της κατά την μέσα-έξω ενεργοποίηση- πραγματοποιήθηκαν αλλά τα αποτελέσματα τους δεν επιβεβαίωσαν την αρχική παρατήρηση [107, 108], καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι πιθανά οι κιντλίνες δρουν με μηχανισμό διακριτό σε σχέση με αυτόν της ταλίνης. Τέλος μια πολύ πρόσφατη μελέτη πρότεινε έναν πιθανό μηχανισμό για τη δράση των κιντλίνων. Σύμφωνα με αυτόν οι κιντλίνες προωθούν την ομαδοποίηση (clustering) της ενεργοποιημένης $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ιντεγκρίνης επαγόμενης από την ταλίνη [109] (Σχήμα 2.17). Ίσως αυτός ο προτεινόμενος πιθανός μηχανισμός να εξηγεί τα διάφορα αποτελέσματα των ερευνών, όπως γιατί οι κιντλίνες έχουν μικρή επίδραση στην ενεργοποίηση απουσία ταλίνης [99, 106] και γιατί φαίνεται ότι δεν συμμετέχουν στην αρχική πρόσδεση της ταλίνης στην ιντεγκρίνη [110].

3.1 Η RGD ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ – ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ

Η αλληλουχία Arg-Gly-Asp (RGD) ανακαλύφθηκε στη φιβρονεκτίνη το 1984 από την ερευνητική ομάδα των Pierschbacher και Ruoslahti και χαρακτηρίστηκε ως η ελάχιστη περιοχή αναγνώρισης των πρωτεϊνών από κύτταρα [1]. Σήμερα είναι γνωστό ότι η RGD αλληλουχία αναγνωρίζεται από το 1/3 περίπου των γνωστών ιντεγκρινών, μέσω περιοχών πρόσδεσης και λαμβάνει μέρος σε ένα πλήθος βιολογικών διεργασιών, φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. Μερικές από αυτές τις ιντεγκρίνες αναγνωρίζουν και μια δεύτερη περιοχή αναγνώρισης, διαφορετική από την RGD αλληλουχία, αλλά είναι ασαφές αν αυτές οι δύο περιοχές δρουν ανεξάρτητα, ανταγωνιστικά ή συνεργατικά [2].



Σχήμα 3.1: Μοριακό μοντέλο της διαμόρφωσης της RGD αλληλουχίας στο κυκλικό πεπτίδιο RGDfK [3]

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των αλληλουχιών που αναγνωρίζονται από τις ιντεγκρίνες, είναι ότι περιέχουν το αμινοξικό κατάλοιπο Asp και παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με το RGD μοτίβο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η KGD αλληλουχία αναγνώρισης, η οποία υπάρχει στη δισιντεγκρίνη μαρμπουρίνη και αναγνωρίζει εξειδικευμένα τον ενεργοποιημένο υποδοχέα αIIbβ3 [4]. Σε αυτή την αλληλουχία στηρίχθηκε και ο σχεδιασμός για τον αIIbβ3 ανταγωνιστή, επτιφιμπατίδη (Κεφάλαιο 1.3.5). Επίσης έχουν αναφερθεί αλληλουχίες στις οποίες η θέση της Gly έχει καταληφθεί από διαφορετικά αμινοξέα ή ακόμα και από δύο αμινοξέα, σε διαμορφωτικά περιορισμένα πεπτίδια, με διατήρηση της δράσης τους [5]. Το αμυλοειδές πεπτίδιο (amyloid peptide) είναι αυτής της κατηγορίας, περιέχει την RHD αλληλουχία, η οποία αποτελεί πιθανή περιοχή αναγνώρισης για τις ιντεγκρίνες [6]. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η αλληλουχία NRG μιμείται το RGD μοτίβο και έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στις ιντεγκρίνες [1] και ότι

το πεπτίδιο SDGR (ανεστραμμένη RGD αλληλουχία) αναστέλλει την κυτταρική πρόσδεση με τρόπο παρόμοιο με αυτό των RGD πεπτιδίων [7]. Ενώ, πεπτίδια που περιέχουν την DGR αλληλουχία δεν παρουσιάζουν δράση, αν η αμινομάδα του Asp δεν λαμβάνει μέρος σε πεπτιδικό δεσμό [8]. Μερικά ακόμη παραδείγματα αποτελούν: η αλληλουχία LDV [9] που αναγνωρίζεται από την ιντεγκρίνη $\alpha 4\beta 1$, οι αλληλουχίες DGEA [10], YGYGDALR που βρίσκεται στη λαμινίνη και η αλληλουχία FYFDLR που βρίσκεται στο κολλαγόνο τύπου IV [11] και αναγνωρίζονται από την ιντεγκρίνη $\alpha 2\beta 1$, ενώ η ιντεγκρίνη $\alpha M\beta 2$ αναγνωρίζει την αλληλουχία KRLDGS που βρίσκεται στο ινωδογόνο [12]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σχεδόν όλες αυτές οι αλληλουχίες περιέχουν τα αμινοξέα Arg και Asp.

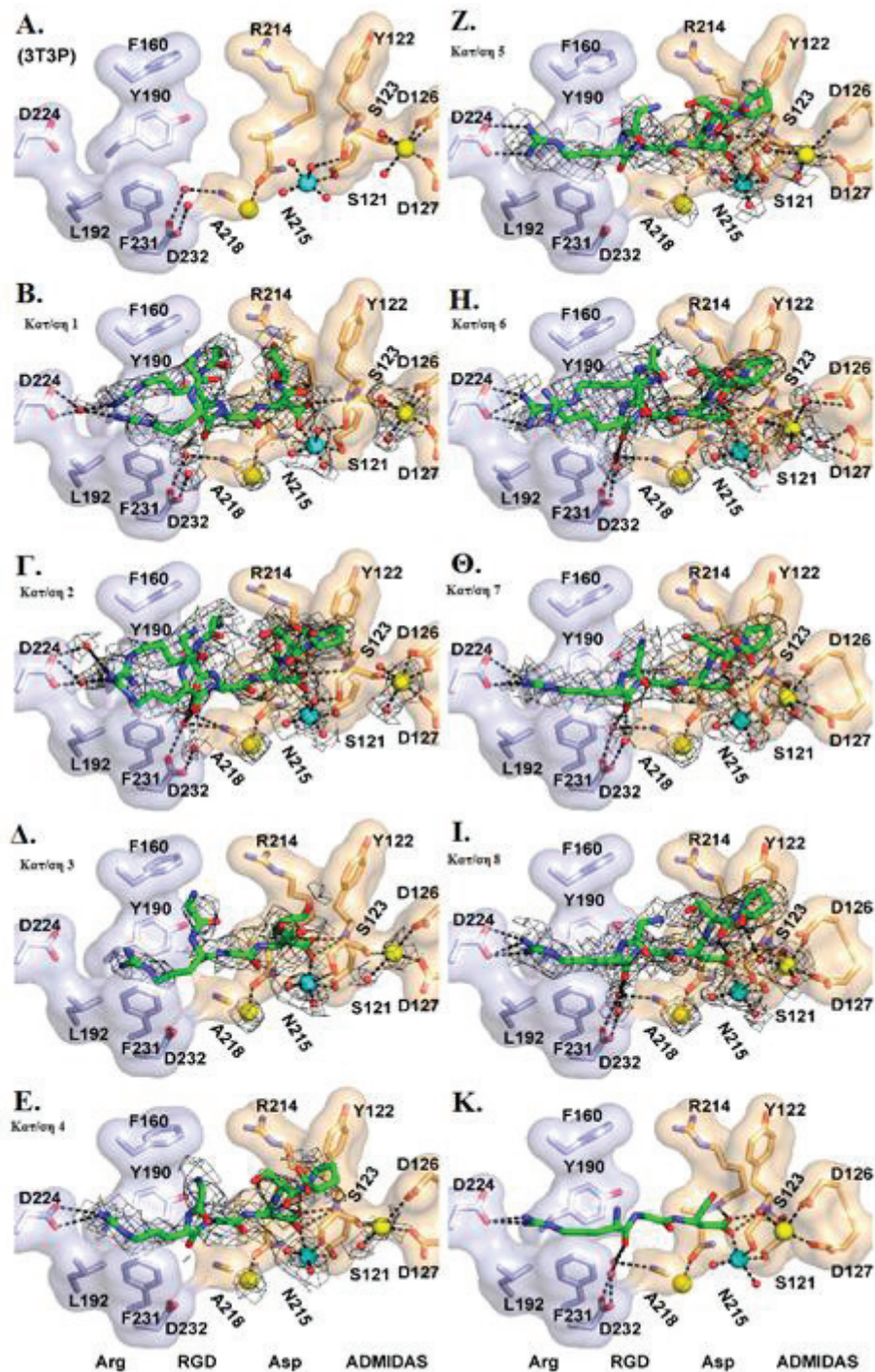
3.1.1 Η RGD ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΚΑΙ Η ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗ $\alpha I\text{Ib}\beta 3$

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.2.2.3, η αλληλεπίδραση του υποδοχέα $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ με το ανθρώπινο ινωδογόνο πραγματοποιείται μέσω τριών αλληλουχιών του. Οι τρεις αυτές περιοχές πρόσδεσης είναι: το δωδεκαπεπτίδιο $^{400}\text{HHLGGAKQAGDV}^{411}$ [13] στο καρβόξυ τελικό άκρο της γ αλυσίδας αυτού, το τετραπεπτίδιο Arg-Gly-Asp-Ser ($^{572}\text{RGDS}^{575}$) και το τετραπεπτίδιο Arg-Gly-Asp-Phe ($^{95}\text{RGDF}^{98}$) στην α αλυσίδα [14]. Η υπομονάδα $\alpha I\text{Ib}$ έχει 2 θέσεις πρόσδεσης που αναγνωρίζουν την RGD ή την KGD αλληλουχία, ενώ η υπομονάδα $\beta 3$ έχει μία επιπλέον θέση πρόσδεσης που αναγνωρίζει την HHLGGAKQAGDV αλληλουχία [15]. Πρόσφατες όμως κρυσταλλογραφικές μελέτες του υποδοχέα $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ έδειξαν ότι το ινωδογόνο προσδένεται στον υποδοχέα κυρίως διαμέσου της αλληλουχίας KQAGDV της γ αλυσίδας του [16]. Παρόλα αυτά πολλές μελέτες απέδειξαν ότι πεπτίδια που περιέχουν την RGD αλληλουχία αναστέλλουν ισχυρά την πρόσδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα και συνεπώς τη συσώρευση των αιμοπεταλίων [17]. Όταν ο υποδοχέας βρίσκεται στην ανενεργή του μορφή, οι θέσεις αυτές βρίσκονται κρυμμένες, ενώ κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με διάφορους αγωνιστές ο υποδοχέας υφίσταται διαμορφωτική αλλαγή και μετατρέπεται από χαμηλής συγγένειας σε υψηλής συγγένειας υποδοχέας για διάφορους προσδέτες του.

Έχει προταθεί ένας μηχανισμός για την πρόσδεση του $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ στο ακινητοποιημένο ινωδογόνο, ο οποίος πραγματοποιείται σε δύο στάδια [18]. Αρχικά το ινωδογόνο μέσω της $\gamma 400-411$ αλληλουχίας αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα $\alpha I\text{Ib}\beta 3$, ενώ η RGD αλληλουχία λειτουργεί ως ένας «μοριακός διακόπτης» που προκαλεί διαμορφωτική αλλαγή στη $\beta 3$ υπομονάδα της ιντεγκρίνης. Η διαμορφωτική αλλαγή της υπομονάδας $\beta 3$ προκαλεί την

ενεργοποίηση των κινασών τυροσίνης της οικογένειας Src, οδηγώντας στη πλήρη ενεργοποίηση του κυττάρου [2]. Ο προτεινόμενος αυτός μηχανισμός μπορεί να γενικευθεί και για άλλες ιντεγκρίνες, εκτός της αIIbβ3, κατά τον οποίο για την πλήρη ενεργοποίηση του κυττάρου απαιτείται εκτός από την RGD περιοχή αναγνώρισης και μια δεύτερη μη RGD περιοχή.

Σύμφωνα λοιπόν με τα νέα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, η αλληλουχία GAKQAGDV από τη γ-αλυσίδα του ινωδογόνου συνδέεται με τον υποδοχέα με παρόμοιο τρόπο με τα RGD πεπτίδια [16]. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με διάφορες μελέτες, δύο αλληλεπιδράσεις φαίνεται να είναι το κλειδί για την πρόσδεση της RGD αλληλουχίας στην ιντεγκρίνη: η παράπλευρη αλυσίδα του Asp αλληλεπιδρά άμεσα με το Mg^{2+} (MIDAS) στη βI περιοχή της β3 υπομονάδας, ενώ η βασική παράπλευρη αλυσίδα της Arg εκτείνεται σε αντίθετη κατεύθυνση για να σχηματίσει γέφυρα άλατος με το Asp 224 της περιοχής β-προπέλας της αIIb υπομονάδας [19, 20]. Η πρόσδεση αυτή της RGD αλληλουχίας, σταθεροποιεί την ανοιχτή διαμόρφωση του υποδοχέα και ακολουθούν μια σειρά χαρακτηριστικών διεργασιών της ιντεγκρίνης [21] (Κεφάλαιο 2.3). Ο Zhu και οι συνεργάτες του σε πρόσφατη εργασία τους, πρότειναν ένα μοντέλο ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης οχτώ διαφορετικών σταδίων. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η μετάβαση της ιντεγκρίνης από την κεκαμμένη διαμόρφωση στην εκτεταμένη (με ανοιχτή κεφαλή) διαμόρφωση, λαμβάνει χώρα μέσω 6 ενδιάμεσων σταδίων χωρίς σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές στην κεφαλή της ιντεγκρίνης (Κεφάλαιο 2.3.1, Σχήμα 3.2) [22].



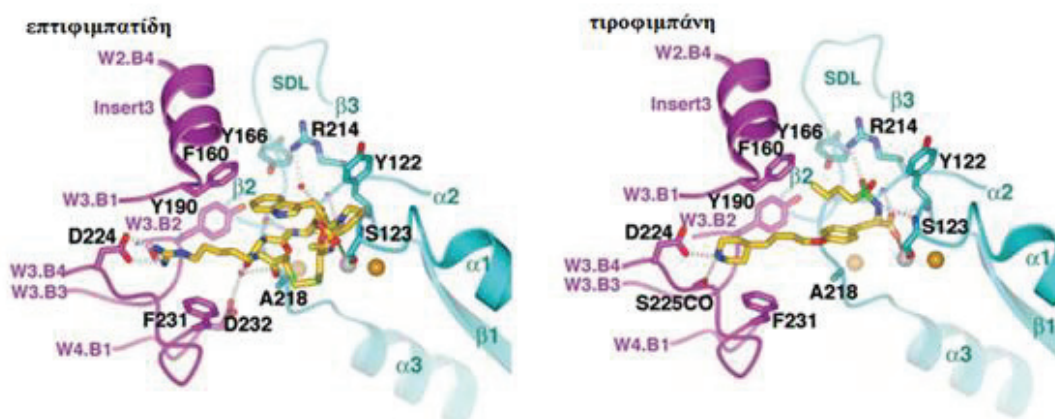
Σχήμα 3.2: Οι έξι RGD ενδιάμεσες διαμορφώσεις της ιντεγκρίνης αIIbβ3, από την κλειστή στην κεκαμμένη διαμόρφωση. Α). Η κλειστή διαμόρφωση της β1 περιοχής, Β – Ι). Οι έξι ενδιάμεσες διαμορφώσεις και Κ). Η πλήρης ανοιγμένη διαμόρφωση με κίνηση της β1 περιοχής και με εκτόπισμα προς τα έξω της υβριδικής περιοχής της β3 υπομονάδας. Τα αμινοξέα που συμβάλουν στην RGD πρόσδεση απεικονίζονται ως ράβδοι. Με γαλάζιο ανοιχτό χρώμα φαίνεται η αIIb υπομονάδα και με ροζ ανοιχτό η β3 υπομονάδα. Τα ιόντα μετάλλων φαίνονται με κίτρινες σφαίρες για τις περιοχές SyMBS και ADMIDAS και με κυανές σφαίρες για την περιοχή MIDAS, ενώ τα μόρια νερού ως κόκκινες σφαίρες. Το πεπτίδιο GRGDSP φαίνεται σε ραμβοειδές σχήμα και με πράσινο χρώμα φαίνονται τα άτομα του C, με κόκκινο τα άτομα του O ενώ με μπλε τα άτομα του N. Οι δεσμοί H και ο συντονισμός των μεταλλικών ιόντων φαίνονται με διακεκομμένες γραμμές [22].

3.1.2 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ RGD ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΤΟΥ αIIbβ3 ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

Οι περισσότεροι από τους ανταγωνιστές του αIIbβ3 που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη ή έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί, δεσμεύονται στις περιοχές του υποδοχέα που αναγνωρίζουν την RGD αλληλουχία. Τα τελευταία χρόνια όμως, η χρήση των RGD ανταγωνιστών στην καθημερινή κλινική πράξη έχει περιοριστεί σημαντικά επειδή παρουσιάζουν αυξημένο αιμορραγικό κίνδυνο (Κεφάλαιο 1.3.5). Επιπλέον, μελέτες για νέους αIIbβ3 ανταγωνιστές έχουν πραγματοποιηθεί, αλλά τα αποτελέσματα τους δεν έδειξαν το αναμενόμενο κλινικό όφελος. Συγκεκριμένα, τρία RGD-μιμητικά φάρμακα (xemilofiban, orbofiban, και sibrafiban) είχαν προχωρήσει σε κλινική φάση III (κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους), που όμως σταμάτησαν διότι επέφεραν αυξημένη αιμορραγία, θρομβοπενία αλλά και θνησιμότητα [23, 24].

Η μελέτη του Xiao και των συνεργατών του αποκάλυψαν ότι οι αIIbβ3 ανταγωνιστές τιροφιμπάνη και επτιφιμπατίδη αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα με μηχανισμό παρόμοιο με το ινωδογόνο [16, 19] (Κεφάλαιο 3.1.1), (Σχήμα 3.3). Τα δυο αυτά φάρμακα περιέχουν ένα βασικό τμήμα που μιμείται την R στην RGD αλληλουχία ή την K της αλληλουχίας του ινωδογόνου και μια καρβοξυλική ομάδα που μιμείται το D. Στην β-προπέλα της αIIb υπομονάδας (Κεφάλαιο 2.2.1), οι βρόγχοι που συνδέουν τις λεπίδες 2 και 3 (147-166 αλληλουχία) και οι λεπίδες 3 και 4 (224-234 αλληλουχία) σχηματίζουν τοιχώματα περικλείοντας την βασική ομάδα (που μιμείται την Lys). Ο πρώτος βρόγχος περιέχει τη Phe 160, η οποία αλληλεπιδρά με την παράπλευρη αλυσίδα της βασικής ομάδας (που μιμείται την Lys) περιοχή που έχει βρεθεί ότι είναι σημαντική για την πρόσδεση του ινωδογόνου [25]. Η Phe 231 που βρίσκεται στις λεπίδες 3 και 4, προεξέχει στο αντιδιαμετρικό τοίχωμα, ενώ η Tyr 190 που βρίσκεται στη λεπίδα 2 συμπληρώνει το τελικό τοίχωμα στο «δάπεδο» της περιοχής πρόσδεσης (binding pocket). Τα δυο αυτά αρωματικά αμινοξέα είναι απαραίτητα για τη δέσμευση του ινωδογόνου [25]. Στην αντίθετη κατεύθυνση, ο βρόγχος της βI περιοχής της β3 υπομονάδας σχηματίζει τοιχώματα περικλείοντας την καρβοξυλική ομάδα. Ο βρόγχος αυτός περιέχει την αλληλουχία Asp-Leu-Ser-Tyr-Ser-Met-Lys-Asp-Asp, στην οποία όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα Asp και Ser αλληλεπιδρούν με τα ιόντα της περιοχής MIDAS ή ADMIDAS, ενώ οι Tyr122 και η Arg214 ολοκληρώνουν την περιοχή πρόσδεσης [19]. Τα δυο αυτά αμινοξέα επίσης εμπλέκονται στην πρόσδεση του ινωδογόνου [26] και στη θρομβασθένεια Glanzmann [27].

Επομένως ο μηχανισμός δράσης των παραπάνω φαρμάκων, ουσιαστικά μιμείται τη θέση πρόσδεσης του ινωδογόνου. Με αποτέλεσμα να επιφέρουν διαμορφωτική αλλαγή στον υποδοχέα, διατηρώντας τον στην ενεργή διαμόρφωση του [28, 29] και να ενεργοποιούν ένα καταρράκτη βιοχημικών αντιδράσεων μέσα στο κύτταρο που στο σύνολό τους είναι γνωστές ως σηματοδότηση «έξω-μέσα», γεγονός που οδηγεί στη περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [30]. Επιπλέον δεν εμφανίζουν εξειδίκευση για τον αIIbβ3 αφού αναγνωρίζονται και από άλλους υποδοχείς-ιντεγκρίνες (ανβ3, ανβ5, ανβ6, ανβ8, α5β1, α8β1) με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα και άλλων κυττάρων εκτός των αιμοπεταλίων [19]. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητή η ανάγκη ανεύρεσης νέων ανταγωνιστών της ιντεγκρίνης αIIbβ3.



Σχήμα 3.3: Οι θέσεις πρόσδεσης για τους ανταγωνιστές τιροφιμπρίνης και επιφιμπρατίνης στην κεφαλή της ιντεγκρίνης. Οι α και β υπομονάδες παριστάνονται με μωβ και μπλε αντίστοιχα. Τα μικρά μόρια που παρουσιάζονται ως σφαίρες και ράβδοι με τον άνθρακα, το άζωτο, το οξυγόνο, τα άτομα θείου και αρσενικού να απεικονίζονται με κίτρινο, μπλε, κόκκινο, πράσινο, και γκρι αντίστοιχα. Τα ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} παρουσιάζονται χρυσές και ασημένιες σφαίρες αντίστοιχα [19].

3.2 ΝΕΟΙ αIIbβ3 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ

Η στόχευση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 εξακολουθεί να είναι μια πολύ καλή στρατηγική για την ανάπτυξη αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, εξαιτίας του αδιαμφισβήτητου κρίσιμου ρόλου της στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στο σχηματισμό του θρόμβου. Επομένως διάφοροι ερευνητές έχουν στρέψει την προσοχή τους στην ανάπτυξη νέων ανταγωνιστών της ιντεγκρίνης αIIbβ3, οι οποίοι δεν θα προκαλούν διαμορφωτικές αλλαγές στον υποδοχέα. Στο Κεφάλαιο 3.2.1 περιγράφεται ο αναστολέας RUC-1, ένας δημοσιευμένος αIIbβ3 ανταγωνιστής που έχει προταθεί έναντι των RGD ανταγωνιστών, ενώ στα Κεφάλαια 3.2.2

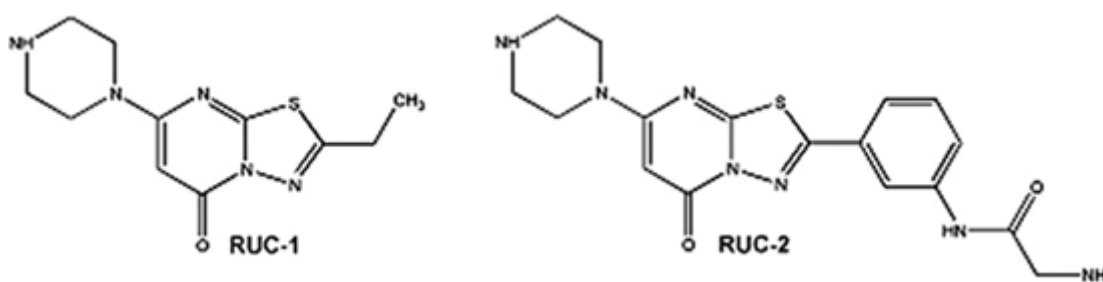
και 3.2.3 περιγράφονται οι δημοσιευμένοι αIIbβ3 ανταγωνιστές που έχουν προταθεί από την ερευνητική μας ομάδα στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Η ερευνητική μας ομάδα στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, εδώ και χρόνια μελετά την ιντεγκρίνη αIIbβ3 με στόχο την εύρεση σύγχρονης, εναλλακτικής θεραπείας. Η προσέγγιση μας έχει να κάνει με το σχεδιασμό και τη σύνθεση α) αναστολών που προσδένονται στην εξωκυττάρια περιοχή, χωρίς όμως να προωθούν αλλαγές στην διαμόρφωση του υποδοχέα και [31-33] και β) ενδοκυττάρια αναστολών, οι οποίοι αλληλεπιδρούν στα κυτταροπλασματικά άκρα του υποδοχέα αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του [34-36]. Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στο σχεδιασμό των εξωκυττάρια αναστολών και συγκεκριμένα στο 8/πεπτίδιο YMESRADR.

3.2.1 Ο ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ RUC-1

Πρόσφατα ο R. Blue και οι συνεργάτες του, ανέφεραν έναν νέο εξειδικευμένο αIIbβ3 αναστολέα τον RUC-1 ($IC_{50} = 13 \pm 5 \mu M$), ο οποίος εντοπίστηκε με χρήση διαλογής υψηλής απόδοσης (high-throughput screening) σε περισσότερα από 30.000 μικρά μόρια και ελέγχοντας την ικανότητα αυτών να αναστέλλουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ινωδογόνο [30]. Το RUC-1 πιστεύεται ότι διαφέρει από τους RGD αIIbβ3 ανταγωνιστές (επιπιμπατίδη και τιροφιμπάνη) ως προς την έκθεση λιγότερων LIBS θέσεων στην β3 υπομονάδα όπως ανιχνεύεται από τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs), προτείνοντας έτσι ότι δημιουργεί μικρότερες διαμορφωτικές αλλαγές στην β3 υπομονάδα [30]. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι το RUC-1 συνδέεται αποκλειστικά στην αIIb υπομονάδα, γεγονός που πιθανά εξηγεί την μειωμένη ικανότητα έκθεσης LIBS θέσεων του μορίου [37]. Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της θέσης πρόσδεσης του RUC-1 στην ιντεγκρίνη, οδήγησαν στη σύνθεση διάφορων παραγώγων του. Ένα από αυτά το RUC-2 ($IC_{50} = 0,0096 \pm 0,011 \mu M$), βρέθηκε 100 φορές πιο δραστικό ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε σχέση με το RUC-1 και επιπλέον διατηρεί πολλές σημαντικές ιδιότητες του μητρικού αναλόγου (εξειδίκευση στην ιντεγκρίνη αIIbβ3, την μειωμένη ικανότητα έκθεσης LIBS θέσεων στην β3 υπομονάδα) [38]. Κρυσταλλογραφικές μελέτες με τη χρήση ακτίνων X, έδειξαν ότι η μεγάλη δραστηριότητα του RUC-2 οφείλεται εν μέρει σε μια πρόσθετη αλληλεπιδρά με το αμινοξύ Glu220 της β3 υπομονάδας και επίσης με το ιόν Mg^{2+} στην περιοχή MIDAS, με αποτέλεσμα την απώλεια του ιόντος [39]. Εφόσον λοιπόν η πρόσδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα απαιτεί την αλληλεπίδρασή του με το ιόν της περιοχής

MIDAS, ο υποδοχέας δεν μπορεί να προσδεθεί στον προσδέτη παρουσία του RUC-2. Επιπλέον, δεδομένου ότι η αλληλεπίδραση του υποδοχέα με το ιόν της περιοχής MIDAS συνδέεται με την επαγωγή του υποδοχέα σε διαμόρφωση υψηλής συγγένειας για τον προσδέτη (πλήρη ανοιχτή διαμόρφωση), η δράση του RUC-2 μπορεί να παρέχει ένα θεραπευτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τα ήδη υπάρχοντα [38, 40].



Σχήμα 3.4: Οι δομές των μορίων RUC-1 και RUC-2.

3.2.2 ΤΟ 8/ΠΕΠΤΙΔΙΟ YMESRADR

Σε εργασία της ερευνητικής μας ομάδας το 2003, πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση της αIIb υπομονάδας και συγκεκριμένα συντέθηκαν 82 συνθετικά 20πεπτίδια (αλληλεπικαλυπτόμενα κατά 8 αμινοξικά κατάλοιπα) και ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την επαγόμενη από ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας εντοπίστηκε η περιοχή $^{313}\text{YMESRADRKLAEVGRYLFL}^{332}$, η οποία ανέστειλε ισχυρά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ανταγωνίστηκε την πρόσδεση του ινωδογόνου [32]. Η σπουδαιότητα αυτής της περιοχής (313-332) στην πρόσδεση του ινωδογόνου φαίνεται και από το γεγονός ότι έχουν αναφερθεί δυο σημειακές μεταλλάξεις (E324K, R327H) σε ασθενείς με θρομβασθένεια Glanzmann [41-43]. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μελέτες που εστίασαν στον προσδιορισμό του ελάχιστου μήκους της αIIb 313-332, το οποίο χρειάζεται για την διατήρηση της ανασταλτικής δράσης. Συγκεκριμένα συντέθηκαν διαδοχικά 8/πεπτίδια από την αλληλουχία 313-332, ακολούθησαν πειράματα ελέγχου ανασταλτικής δράσης και τα ευρήματα από αυτή τη μελέτη έδειξαν ότι πεπτίδια που περιείχαν την RAD αλληλουχία εμφάνιζαν αυξημένη δράση, με το $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ να εμφανίζει την καλύτερη ανασταλτική δράση. Επιπλέον φαίνεται ότι η αλληλουχία YMES διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανασταλτική δράση του πεπτιδίου [44]. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν

ότι το $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ αποτελεί ισχυρό αναστολέα της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα καθώς και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η αλληλουχία RAD θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ομόλογη της RGD περιοχής, όμως τα αποτελέσματα από πειράματα κυτταρομετρίας ροής παρουσίας του PAC-1 (μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύεται στον ενεργοποιημένο αIIbβ3 υποδοχέα) ενίσχυσαν την υπόθεση μας ότι το 8/πεπτιδίο δρα με διαφορετικό τρόπο από αυτήν των RGD αναλόγων [44, 45]. Επιπλέον, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι κυκλικά ή ευθύγραμμα πεπτιδία τα οποία περιέχουν την αλληλουχία RAD εμφάνιζαν αδύναμη βιολογική δράση [46-48]. Στη συνέχεια, για επιβεβαίωση της αρχικής μας παρατήρησης το ότι το YMESRADR δρα με τρόπο διαφορετικό από αυτόν των RGD αναλόγων καθώς και των ανταγωνιστών του αIIbβ3 που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, πραγματοποιήθηκε μελέτη της δράσης του 8/πεπτιδίου *in vivo* σε πειραματικά επαγόμενη αρτηριακή θρόμβωση σε κουνέλια [49]. Το πειραματικό αυτό μοντέλο επιλέχθηκε διότι, σε αντίθεση με τον άνθρωπο, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στα κουνέλια είναι ανεξάρτητη από την RGD αλληλουχία (ο υποδοχέας τους δεν αναγνωρίζει τους RGD ανταγωνιστές) [50]. Τα ευρήματα και από αυτή την μελέτη επιβεβαίωναν ότι το 8/πεπτιδίο $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ δεν δρα με RGD μηχανισμό. Για το μηχανισμό δράσης του 8/πεπτιδίου είχε υποτεθεί ότι αλληλεπιδρά με το ινωδογόνο εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του τελευταίου με τον υποδοχέα, χωρίς όμως να έχει αποκλειστεί η πιθανότητα να δρα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να κρατάει τον υποδοχέα σε μια ανενεργή κατάσταση.

Επιπλέον, επιδιώκοντας να διευκρινιστεί ο ρόλος του κάθε αμινοξέος του 8/πεπτιδίου, πραγματοποιήθηκε μελέτη όπου το κάθε αμινοξύ αντικαταστάθηκε με Ala (Ala scanning) [51]. Τα αποτελέσματα των βιολογικών πειραμάτων αυτής της μελέτης έδειξαν ότι: α) τα αμινοξέα της αλληλουχίας $^{313}\text{YMES}^{316}$ δεν επηρεάζουν σημαντικά την δράση του 8/πεπτιδίου, χωρίς όμως να είναι εφικτή η παράλειψη τους καθώς στην περίπτωση αυτή η δράση τους μειώνεται σημαντικά. Φαίνεται ότι το τμήμα αυτό του πεπτιδίου, συμβάλει στον μηχανισμό δράσης του αναλόγου, ο οποίος διαφέρει από αυτόν των RGD αναλόγων. β) Τα αμινοξέα Arg³¹⁷ και Asp³¹⁹ φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση της ανασταλτικής δράσης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμορφωτικής ανάλυσης με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ σε 3 επιλεγμένα τροποποιημένα με Ala ανάλογα και το πιο σημαντικό εύρημα από αυτά είναι ότι η δομή του πεπτιδίου YAESRADR χαρακτηρίζεται κύρια από την αλληλεπίδραση της Arg³¹⁷ και του Asp³¹⁹ (σε συμφωνία με τα βιολογικά

πειράματα). Οι πλευρικές αλυσίδες αυτών των καταλοίπων είναι προσανατολισμένες προς την ίδια κατεύθυνση του μορίου. Η ιοντικού τύπου αλληλεπίδραση ανάμεσα στις αντίθετες φορτισμένες ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στην καρβοξυλομάδα και τη γουανιδομάδα. Επιπλέον η πλευρική αλυσίδα του Glu³¹⁵; έχει τον ίδιο προσανατολισμό με τις παράπλευρες ομάδες της Arg³¹⁷ και του Asp³¹⁹ και ως έναν βαθμό προσεγγίζει την γουανιδομάδα της Arg³¹⁷.

Σημαντικό είναι ότι τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα μιας άλλης μελέτης της ερευνητικής ομάδας μας που ως σκοπό είχε να συμβάλει στην καλύτερη κατάταξη των κριτηρίων που αφορούν την σχέση διαμόρφωσης - βιολογικής δράσης των RGD αναλόγων. Ένα από τα πρώτα, διαμορφωτικά κριτήρια που προτάθηκαν για τη διερεύνηση της σχέσης διαμόρφωσης - βιολογικής δράσης των RGD αναλόγων ήταν η παρουσία μιας β-στροφής τύπου II με κεντρική αλληλουχία Gly-Asp [52, 54]. Παρ' όλα αυτά, δομικές μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν ότι η ύπαρξη β-στροφής δεν αποτελεί προαπαιτούμενο για την αντιθρομβωτική δράση ενός αναλόγου. Αντίθετα μια πολύ καλή συσχέτιση μπορεί να γίνει με την τιμή της ψευδοδιέδρης γωνίας (pdo), η οποία καθορίζει το σχετικό προσανατολισμό των παράπλευρων αλυσίδων της Arg και του Asp και σχηματίζεται από τα C^ζ και C^α άτομα της Arg και τα C^α και C^γ άτομα του Asp και για δραστικά πεπτίδια παίρνει τιμές $-45^{\circ} \leq pdo \leq +45^{\circ}$. Δραστικοί αναστολείς είναι εκείνοι οι οποίοι εκπληρώνουν το κριτήριο $-45^{\circ} \leq pdo \leq +45^{\circ}$ σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη δυνατή απόσταση μεταξύ των C^β ατόμων και/ή φορτισμένων κέντρων των παράπλευρων αλυσίδων της Arg και του Asp [55].

3.2.3 ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ (S,S) PSRCDCR-NH₂

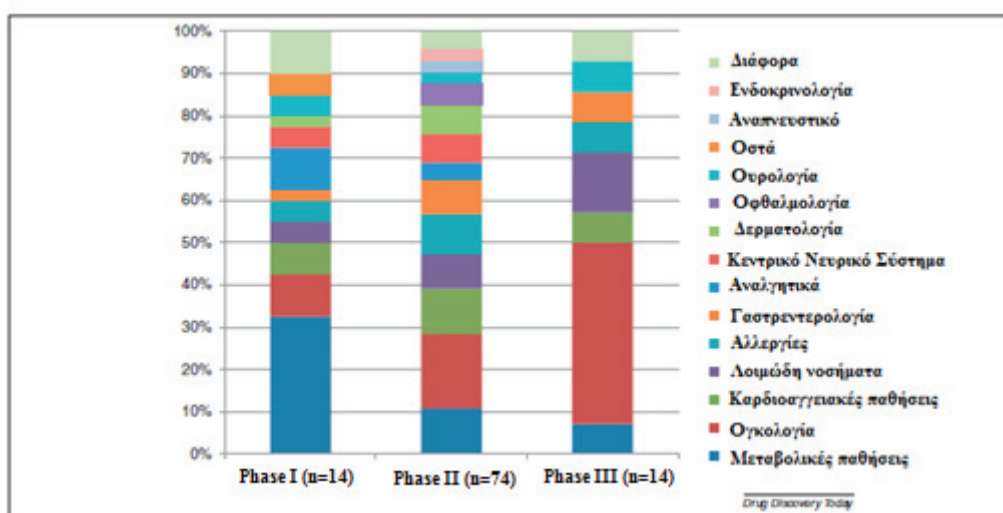
Η ερευνητική ομάδα μας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μελετά επίσης και τη σχέση διαμόρφωσης - βιολογικής δράσης των RGD αναλόγων. Η μελέτη για τη συσχέτιση της ψευδοδιέδρης γωνίας (pdo) με την αντιθρομβωτική δράση επιτεύχθηκε με τη χρήση των ισχυρά παρεμποδισμένων κυκλικών (S,S) -CDC- αναλόγων [55]. Παρόλο που σε αυτά τα πεπτιδικά ανάλογα το αμινοξικό κατάλοιπο της Gly έχει αντικατασταθεί από μια Cys, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από τα RGD ανάλογα. Το γεγονός ότι αυτά τα πεπτίδια παρουσιάζουν αυξημένη ανασταλτική δράση και ότι δεν περιέχουν το RGD μοτίβο έκρινε τη μελέτη του μηχανισμού δράσης τους αναγκαία. Επομένως, πραγματοποιήθηκε εκτενή μελέτη πεπτιδικών αναλόγων που περιέχουν το (S,S) -CDC- και

το (S,S) –CRC- μοτίβο. Η εισαγωγή του δισουλφιδικού δεσμού και η στεreoχημεία της Cys υπήρξαν δυο πολύ σημαντικοί παράγοντες για τη σταθεροποίηση του κατάλληλου προσανατολισμού των παράπλευρων αλυσίδων της Arg και του Asp. Η διαμορφωτική μελέτη των αναλόγων έδειξε ότι οι παράπλευρες αλυσίδες της Arg και του Asp προσανατολίζονται προς την ίδια πλευρά του πεπτιδικού σκελετού, ενώ από τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδικών αναλόγων έδειξε ότι τα πεπτίδια που φέρουν (S,S) –CRC- μοτίβο εμφανίζουν χαμηλότερη ανασταλτική δράση. Τα πεπτιδικά ανάλογα που φέρουν το (S,S) –CDC- μοτίβο παρουσιάζουν πολύ καλή αναστολή της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα αIIbβ3 και της έκφρασης της p-σελεκτίνης, ενώ δεν αναστέλλουν την πρόσδεση του PAC-1. Τα αποτελέσματα μας οδηγούσαν στο συμπέρασμα ότι τα κυκλικά αυτά πεπτίδια δρουν με μηχανισμό διαφορετικό από των RGD αναλόγων [31]. Ένα από αυτά τα πεπτίδια το (S,S) PSRCDCR-NH₂ που εμφάνισε ισχυρή αναστολή της συσσώρευσης των ανθρώπινων αιμοπεταλίων αλλά και ισχυρή αναστολή της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα αIIbβ3 και της έκφρασης της p-σελεκτίνης, ενώ δεν αναστέλλει την πρόσδεση του PAC-1, επιλέχθηκε για περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της δράσης του (S,S) PSRCDCR-NH₂ *in vivo* σε πειραματικά επαγόμενη αρτηριακή θρόμβωση σε κουνέλια και τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι το κυκλικό πεπτίδιο δεν δρα με RGD μηχανισμό [33]. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των (S,S) –CDC- αναλόγων και του (S,S) PSRCDCR-NH₂ μπορεί να είναι και σε αυτή την περίπτωση, η πρόσδεσή τους σε ενεργά τμήματα του ινωδογόνου οπότε εμποδίζεται η αλληλεπίδραση του τελευταίου με τον υποδοχέα αIIbβ3. Ένας δεύτερος πιθανός μηχανισμός δράσης είναι μια μη RGD αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα, η οποία τον κρατάει σε μια ανενεργή, χαμηλής συγγένειας κατάσταση.

3.3 ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΑ

Το πρώτο συνθετικό πεπτίδιο παρασκευάστηκε από τον E. Fischer πριν από ένα αιώνα περίπου [56]. Όμως η φαρμακευτική χρήση αυτών ξεκίνησε μετά το 2^ο παγκόσμιο πόλεμο και μόνο όταν τα πεπτίδια μπορούσαν να παραληφθούν σε καθαρή μορφή. Από τη δεκαετία του 1960 (εξαιτίας της επαναστατικής μεθόδου στη σύνθεση των πεπτιδίων που εισήγαγε ο Merrifield, (Κεφάλαιο 4.4) μέχρι και σήμερα τα πεπτίδια θεωρούνται από πολλούς ως τα «φάρμακα του μέλλοντος».

Πληθώρα πεπτιδίων ή πρωτεϊνών έχουν χρησιμοποιηθεί ή χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών μέσων [57]. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον αμερικάνικο οργανισμό FDA, το 2014 ήταν εμπορικά διαθέσιμα περίπου 70 πεπτίδια [58]. Το 2012, έξι πεπτίδια πήραν έγκριση από τις αρμόδιες αρχές των Ηνωμένων Πολιτειών και τα 5 από αυτά εγκρίθηκαν και από την Ευρωπαϊκή ένωση, ενώ το 2013 128 πεπτίδια βρισκόταν σε διάφορες φάσεις αξιολόγησης (Σχήμα 1.15) [59]. Επίσης ο οργανισμός Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA), ανέφερε ότι μέχρι το 2013 πάνω από 900 πρωτεΐνες, πεπτίδια και πεπτιδομημιτικά βρίσκονται σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης στοχεύοντας παραπάνω από 100 ασθένειες. Ενδεικτικά, 353 από τα εν δυνάμει φάρμακα στοχεύουν τον καρκίνο, 187 μολυσματικές ασθένειες, 69 αυτοάνοσα νοσήματα και 59 καρδιαγγειακές παθήσεις [60]. Τα στοιχεία αυτά είναι πολύ σημαντικά, διότι δίνουν νέα ώθηση στον τομέα της χρήσης των πεπτιδίων ως φάρμακα.



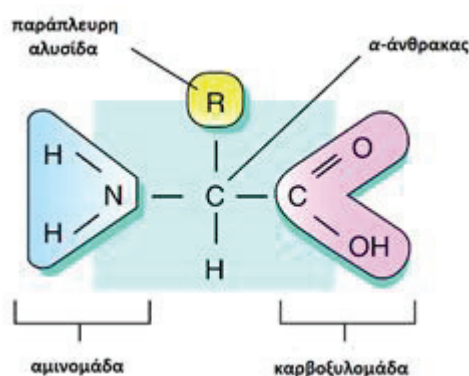
Σχήμα 3.5: Πεπτίδια που βρίσκονται σε κλινικές μελέτες για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών (τελευταία ενημέρωση 15/2/2013) [59].

Η χρήση των πεπτιδίων ως φαρμάκων παρουσιάζει πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Συνοψίζοντας, τα πιο βασικά πλεονεκτήματα είναι τα εξής: α) υψηλή βιολογική δραστηριότητα, δηλαδή μικρή δόση χορήγησης πεπτιδίου είναι αρκετή για την εμφάνιση βιολογικής δράσης στον ανθρώπινο οργανισμό, β) παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση, γ) σχετικά χαμηλή τοξικότητα, δ) δεν αντιδρούν με άλλα φάρμακα, ε) εμφανίζουν ελάχιστες παρενέργειες και στ) δυνατότητα στόχευσης της αλληλεπιδράσης πρωτεΐνης – πρωτεΐνης [61]. Το πιο σημαντικό μειονέκτημα τους είναι η χορήγηση τους. Τα περισσότερα πεπτίδια δεν μπορούν να χορηγηθούν ευρέως από το στόμα, εξαιτίας της

χαμηλής τους διαπερότητας της μεμβράνης αλλά και από την ταχεία αποικοδόμηση τους από τα ένζυμα του γαστρεντερικού συστήματος και συνήθως απαιτείται η υποδερμική ή ενδοφλέβια χορήγηση τους [57]. Η χορήγηση ενός φαρμάκου δια του στόματος, εκτός από την μεγαλύτερη αποδοχή που εισπράττει από τους ασθενείς, η παραγωγή τους είναι πιο οικονομική διότι δεν απαιτούνται αποστειρωμένες συνθήκες [62]. Για αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια διάφοροι ερευνητές έχουν στρέψει τις έρευνες προς αυτή τη κατεύθυνση. Δεν θα επεκταθούμε περαιτέρω στη συγκεκριμένη εργασία για τις έρευνες ως προς τη χορήγηση των πεπτιδίων, αξίζει όμως να σημειωθεί ότι η προσθήκη D-αμινοξέων στο πεπτιδικό ανάλογο αυξάνει το χρόνο ημιζωής και επίσης την ανθεκτικότητα των πεπτιδίων από την υδρόλυση των πεπτιδασών [60, 63].

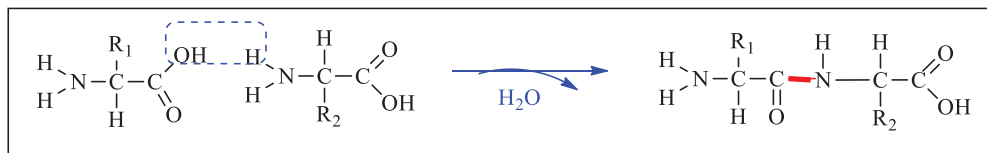
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αμινοξέα (α -άμινο καρβοξυλικά οξέα) αποτελούν τα δομικά χαρακτηριστικά των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Ένα α -αμινοξύ αποτελείται από ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα (α -άνθρακας, σε α θέση ως προς το καρβονύλιο), μια αμινο-ομάδα, μια καρβόξυλο-ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία χαρακτηριστική ομάδα R που ονομάζεται πλευρική αλυσίδα (Σχήμα 4.1). Στη φύση συναντώνται 20 αμινοξέα, έχουν οπτική ενεργότητα, είναι L εναντιομερή και S στερεοχημικής διάταξης (εκτός της γλυκίνης). Επίσης 19 από τα 20 αμινοξέα είναι πρωτοταγείς αμίνες (RNH_2) και διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς την φύση των υποκαταστατών και μόνο η προλίνη είναι δευτεροταγής αμίνη, στην οποία το άζωτο και τα άτομα άνθρακα στη θέση α αποτελούν τμήμα ενός πυρρολιδινικού δακτυλίου. Οι συντακτικοί τύποι των αμινοξέων δίνονται στο Παράρτημα I.



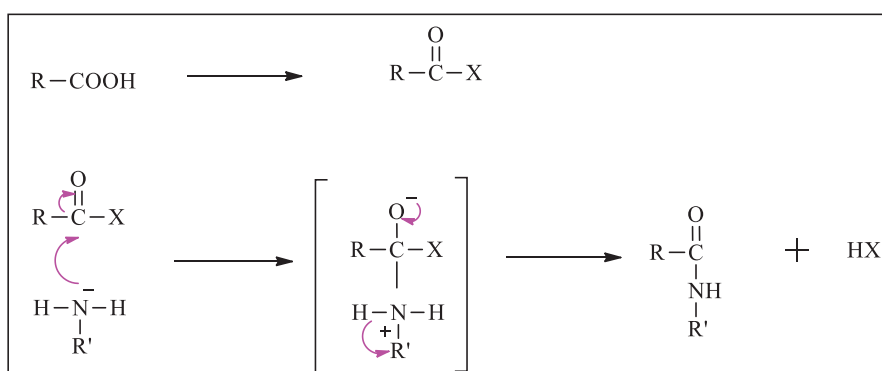
Σχήμα 4.1: Η δομή ενός α -αμινοξέος [1].

Ο πεπτιδικός δεσμός (ή αμιδικός δεσμός) προκύπτει ύστερα από πυρηνόφιλη προσβολή της α -αμινομάδας ενός αμινοξέος με την α - καρβοξυλομάδα κάποιου άλλου αμινοξέος με απώλεια ενός μορίου νερού [2], σύμφωνα με την αντίδραση του σχήματος 4.2. Η διαδικασία αυτή, ο σχηματισμός δηλαδή ενός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ 2 αμινοξέων, ονομάζεται σύζευξη. Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται στην πλευρά της υδρόλυσης του πεπτιδίου παρά της σύνθεσης. Κατά συνέπεια, ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού δεν ευνοείται θερμοδυναμικά και απαιτεί κατανάλωση ενέργειας $\sim 4 \text{ Kcal/mol}$ (ενδόθερμη αντίδραση). Παρόλα αυτά, η αντίδραση της υδρόλυσης είναι μια γενικά πολύ αργή διαδικασία και για αυτό τα πεπτίδια θεωρούνται σταθερές ενώσεις στα υδατικά διαλύματα.



Σχήμα 4.2: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού

Για να επιτευχθεί μια αντίδραση σύζευξης απαιτούνται ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες, επειδή όμως τα αμινοξέα όμως είναι θερμοευαίσθητες ενώσεις, κρίνεται απαραίτητη η ενεργοποίηση μιας εκ των δραστικών ομάδων και κατά κύριο λόγο του καρβοξυλίου, το οποίο μετατρέπεται σε κάποιο παράγωγο καρβοξυλικού οξέος [2]. Η μετατροπή του καρβοξυλικού οξέος σε ακυλιωτικό μέσο γίνεται με αντικατάσταση της καρβοξυλομάδας από έναν υποκαταστάτη (X) που έλκει ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα την αύξηση της πολικότητας της καρβονυλικής ομάδας και άρα του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του ατόμου άνθρακα (Σχήμα 4.3).

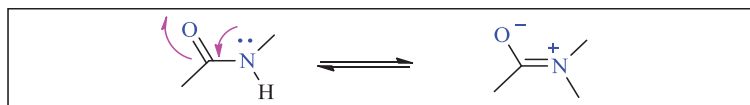


Σχήμα 4.3: Ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με ενεργοποίηση του καρβοξυλίου.

4.2 ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ

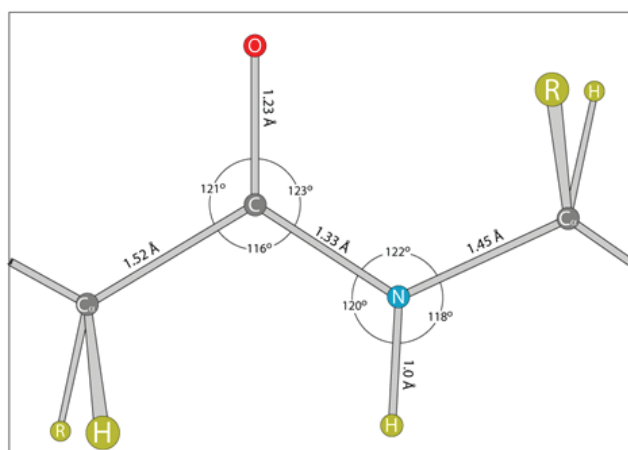
Οι L. Pauling και R. Corey χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφικές μελέτες με ακτίνες X ανακάλυψαν ότι τα άτομα της πεπτιδικής μονάδας βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο χωρίς να υπάρχει ελευθερία περιστροφής του καρβονυλικού άνθρακα και του αζώτου, στη πεπτιδική μονάδα (C-N), διότι ο δεσμός αυτός παρουσιάζει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού (Σχήμα 4.4). Το μήκος του δεσμού είναι 1,32 Å μεταξύ δηλαδή ενός απλού C-N (1,49 Å) και ενός διπλού C=N (1,27 Å). Επιπλέον, στην ίδια μελέτη προσδιορίστηκε ότι το υδρογόνο της

αμινομάδας βρίσκεται σχεδόν πάντα σε *trans* (απέναντι) θέση ως προς το οξυγόνο του καρβονυλίου [3] (Σχήμα 4.5).



Σχήμα 4.4: Ο πεπτιδικός δεσμός παρουσιάζει μερικώς χαρακτήρα διπλού δεσμού

Για το λόγο αυτό, ο πεπτιδικός δεσμός εμφανίζει το φαινόμενο της μεσομέρειας και οδηγεί στην ύπαρξη δύο σταθερών ισομερών μορφών την *cis* και την *trans* διάταξη [4]. Η *trans* διαμόρφωση ευνοείται ενεργειακά (κατά 2 Kcal/mol) από την *cis* μορφή, και συναντάται στις φυσιικές πρωτεΐνες με εξαίρεση τη προλίνη όπου ο πεπτιδικός δεσμός είναι δυνατόν να λαμβάνει και τις 2 διαμορφώσεις.



Σχήμα 4.5: Η γεωμετρία του πεπτιδικού δεσμού

4.3 ΑΡΧΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Η σύνθεση των πεπτιδίων μπορεί να επιτευχθεί είτε σε στερεή είτε σε υγρή φάση, όμως ο πρώτος τρόπος είναι ο προτιμώμενος καθώς πλεονεκτεί. Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης σε υγρή φάση, είναι αναγκαία η απομόνωση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων προϊόντων σε κάθε βήμα της σύνθεσης, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρονοβόρα [5].

Οι γενικές αρχές που πρέπει να διέπουν μια πεπτιδική σύνθεση είναι οι εξής:

- ✔ Παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού άκρου με μία κατάλληλη ομάδα. Η ομάδα αυτή θα πρέπει να είναι σταθερή καθόλη τη διάρκεια της σύζευξης και να απομακρύνεται εύκολα χωρίς τον κίνδυνο διάσπασης των πεπτιδικών δεσμών.
- ✔ Ημιμόνιμη προστασία του α-καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο στη σύνθεση σε υγρή φάση, ενώ δεν είναι απαραίτητο στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση γιατί το C-τελικό είναι συζευγμένο με το στερεό υπόστρωμα, τη ρητίνη.
- ✔ Ημιμόνιμη προστασία των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, για να εμποδιστεί η διακλάδωση της επιμηκυνόμενης πεπτιδικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό παραπροϊόντων.
- ✔ Απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων σε κατάλληλες συνθήκες, ώστε να μην καταστρέφονται οι πεπτιδικοί δεσμοί και να λαμβάνεται το πεπτίδιο στην ελεύθερη μορφή του.

4.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ

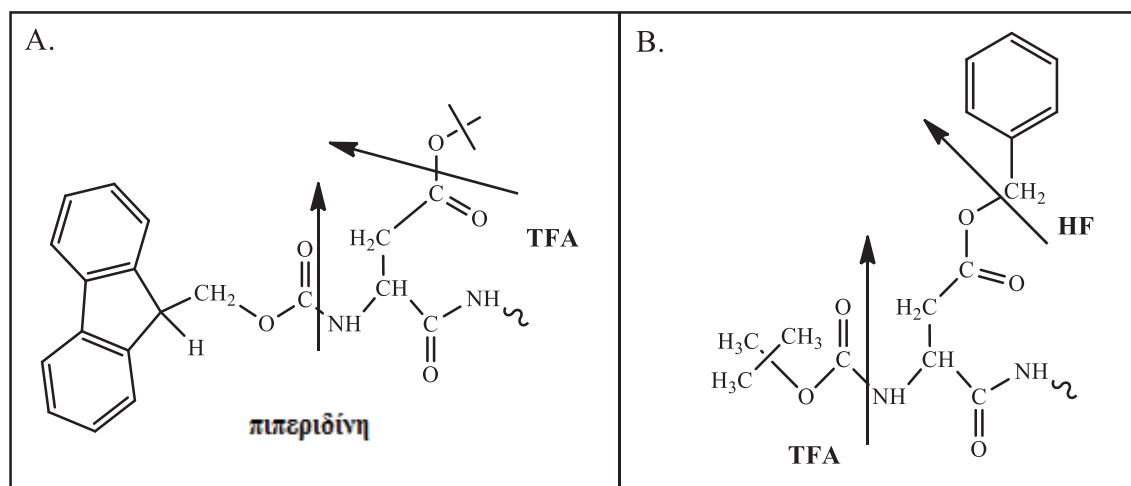
Η σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS), η οποία παρουσιάστηκε το 1963 από τον R.B Merrifield, αποτέλεσε ορόσημο στην ιστορία της πεπτιδικής χημείας [6]. Συνέβαλε σημαντικά στην αποφυγή προβλημάτων που υπήρχαν κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων σε υγρή φάση και κατέστησε δυνατή τη σύνθεση μεγάλου αριθμού πεπτιδίων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ο Merrifield τιμήθηκε το 1984 με το βραβείο Nobel Χημείας για τη μεγάλη του προσφορά στην πρόοδο της επιστήμης. Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται σημαντικές χρονολογίες που αποτέλεσαν σταθμούς στην Πεπτιδική σύνθεση.

Πίνακας 4.1: Χρονολογίες-σταθμοί στην Πεπτιδική Σύνθεση [7]

Χρονολογία	Ανακάλυψη
1901	Σύνθεση του πρώτου διπεπτιδίου <i>Gly-Gly</i>
1957	<i>Boc</i> ομάδα
1963	Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (<i>SPPS</i>)
1967	Αποκοπή πεπτιδίου με <i>HF</i>
1968	Πρώτος Αυτόματος Πεπτιδικός Συνθέτης (<i>Peptide Synthesizer</i>)
1970	<i>Fmoc</i> ομάδα
1973	<i>Wang</i> ρητίνη
1976	Παρασκευαστική <i>HPLC</i>
1977	Ορθογωνική προστασία
1987	<i>Rink</i> ρητίνη
1994	Φυσική χημική πρόσδεση πεπτιδίων

Σύμφωνα με τη μέθοδο του Merrifield η σύνθεση των πεπτιδίων γίνεται πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα (ρητίνη). Το C-τελικό αμινοξύ προσδένεται ομοιοπολικά μέσω ενός αμιδικού ή εστερικού δεσμού στις δραστικές ομάδες της ρητίνης, ενώ η παράπλευρη αλυσίδα του είναι ορθογωνικά προστατευμένη (αν κριθεί απαραίτητο). Με τον όρο ορθογωνικότητα, περιγράφεται η παράλληλη προστασία δραστικών ομάδων στο ίδιο μόριο, έχοντας όμως τη δυνατότητα της εκλεκτικής απομάκρυνσης μιας εξ αυτών, χωρίς να επηρεάζεται η σταθερότητα των υπόλοιπων ομάδων. Ακολουθεί αποπροστασία της N^α-προστατευτικής αμινομάδας και σύζευξη του επόμενου ενεργοποιημένου αμινοξέος. Η απομάκρυνση των πιθανών παραπροϊόντων και η περίσσεια του διαλύτη πραγματοποιείται σε κάθε στάδιο με κατάλληλα επιλεγμένους οργανικούς διαλύτες. Με την επανάληψη των παραπάνω βημάτων (αποπροστασιών, συζεύξεων και εκπλύσεων) επιτυγχάνεται η σύζευξη του επιθυμητού πεπτιδίου. Ακολουθεί η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων και τελική αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων. Για τη σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεή φάση ακολουθούνται δυο μεθοδολογίες, η *Boc/Bzl* ή η *Fmoc/tBu* στρατηγική.

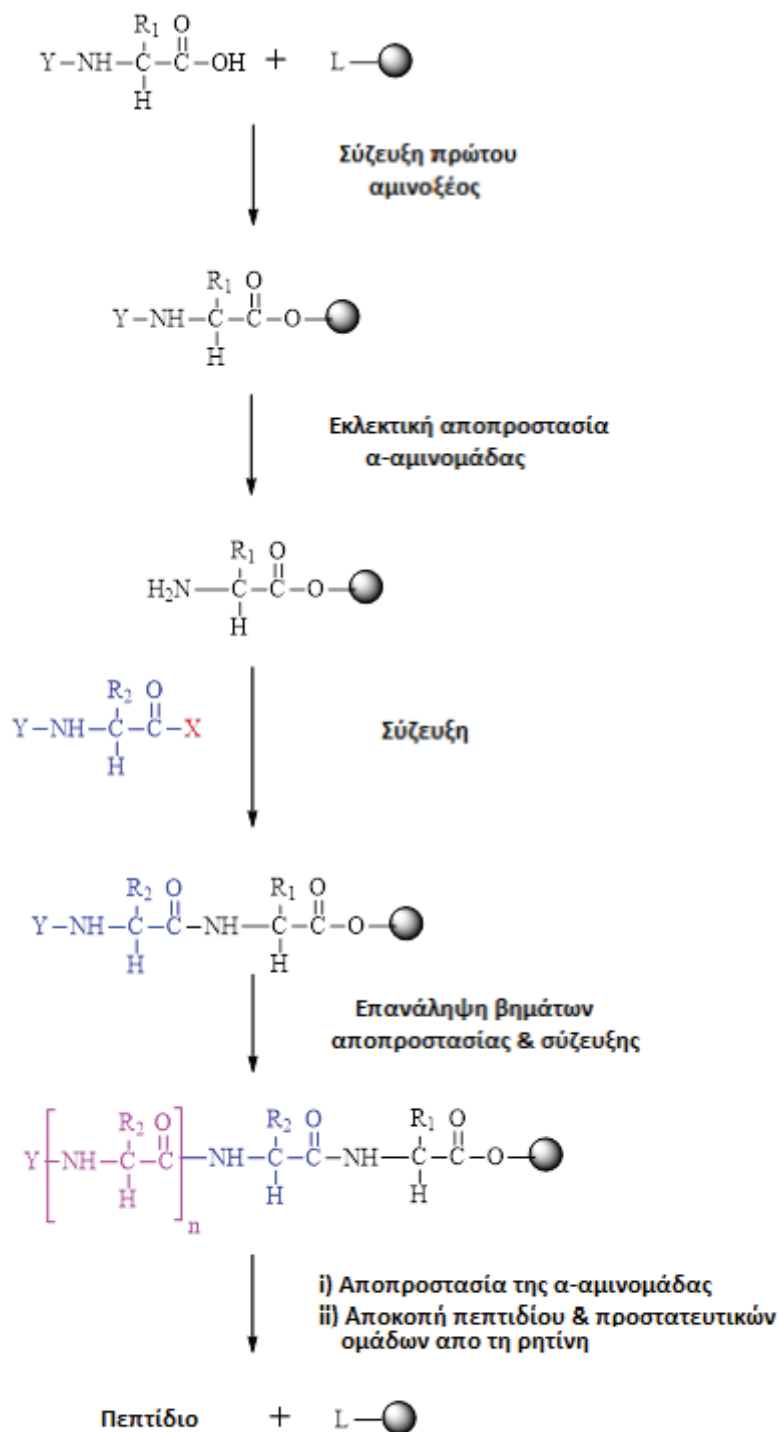
Στην *Boc/Bzl* στρατηγική χρησιμοποιείται η *tert*-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (*Boc*) για την προστασία της α-αμινομάδας, η οποία απομακρύνεται με τριφθοροξικό οξύ (*TFA*), ενώ η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη πραγματοποιείται παρουσία ισχυρού οξέος, συνήθως υδροφθόριο (*HF*) (Σχήμα 4.6).



Σχήμα 4.6: Στρατηγικές απομάκρυνσης προστατευτικών ομάδων για τις μεθοδολογίες Fmoc και Boc.

Σε αντίθεση με την Boc/Bzl στρατηγική, στην Fmoc/*t*-Bu στρατηγική χρησιμοποιείται για την προστασία της α -αμινομάδας, η 9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc) και η αποπροστασία της γίνεται σε βασικές συνθήκες. Ενώ η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων και η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη γίνεται παρουσία οξέων, σε ηπιότερες συνθήκες από ότι με την Boc/Bzl στρατηγική (Σχήμα 4.6). Βασικά πλεονεκτήματα, επομένως της μεθόδου είναι η μη χρησιμοποίηση του τοξικού υδροφθορίου, όπως επίσης και η αποφυγή των επαναλήψεων χρήσης των όξινων συνθηκών, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει τους ευαίσθητους πεπτιδικούς δεσμούς [8]. Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η αδυναμία απευθείας παρακολούθησης της πορείας των αντιδράσεων κατά την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας και για όσο διάστημα το πεπτίδιο βρίσκεται συνδεδεμένο με τη ρητίνη. Παρόλα αυτά, υπάρχουν μέθοδοι για τον έλεγχο ολοκλήρωσης της αντίδρασης κατά τα στάδια σύζευξης και απομάκρυνσης της Na-προστατευτικής ομάδας (Κεφάλαιο 4.7).

Στη παρούσα εργασία γίνεται εκτενής αναφορά στην Fmoc/*t*Bu στρατηγική και στο Σχήμα 4.7 περιγράφεται η βασική μεθοδολογία της.



L: δραστική ομάδα του linker της ρητίνης

R1, R2, Rn: προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων

X: ομάδα ενεργοποιητής του καρβοξυλίου

Σχήμα 4.7: Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με τη μεθοδολογία Fmoc/tBu.

4.5 ΝΕΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιείται είτε «χειροκίνητα» σε υάλινο αντιδραστήρα, όπου στο κάτω άκρο του είναι εφοδιασμένο με πορώδες φίλτρο, στρόφιγγα και ακροφύσιο για την απόρριψη των διηθημάτων, τα οποία απομακρύνονται με την εφαρμογή κενού, είτε «αυτόματα» με τη χρήση οργάνων (αυτόματο πεπτιδικό συνθέτη-peptide synthesizer). Είναι γεγονός ότι η επαναστατική εισαγωγή της μεθόδου SPPS στη πεπτιδική σύνθεση, άνοιξε από την αρχή το δρόμο για ένα ταχύτερο, πιο απλοποιημένο και αυτοματοποιημένο τρόπο στη σύνθεση των πεπτιδίων [9]. Το 1985 ο Houghton ανέφερε στην εργασία του, την παράλληλη σύνθεση διαφορετικών πεπτιδίων που διεξαγόταν σε θέσεις πολυστερυλενίου, συγκολλημένες σε μια βάση προπυλενίου. Σε αυτή τη μέθοδο, το κάθε πεπτίδιο φυλασσόταν σε ξεχωριστή βάση (οι λεγόμενες tea bag) όπου πραγματοποιούνταν οι συζεύξεις. Ενώ οι αποπροστασίες και οι εκπλύσεις πραγματοποιούνταν ταυτόχρονα με το ίδιο διάλυμα για όλα τα πεπτίδια, σε μπουκάλι πολυαιθυλενίου [10]. Σε άλλη εργασία, ο Geysen και η ομάδα του, ανέφεραν τη σύνθεση μικρών ποσοτήτων πεπτιδίων χρησιμοποιώντας πλακίδια μικροτιτλοδότησης, τα οποία βρίσκονταν σε μια μεγάλη «δεξαμενή». Οι συζεύξεις πραγματοποιούνταν ξεχωριστά για το κάθε πεπτίδιο στα πλακίδια, ενώ οι αποπροστασίες και εκπλύσεις πραγματοποιούνταν ταυτόχρονα στη «δεξαμενή» [11].

Ο Merrifield όμως είχε ένα διαφορετικό όραμα για τον αυτόματο πεπτιδικό συνθέτη. Οραματιζόταν ένα όργανο όπου η παράλληλη σύνθεση των πεπτιδίων θα πραγματοποιούνταν για το κάθε πεπτίδιο σε μια μοναδική θέση, οι οποίες θα βρίσκονταν σε ένα μεγαλύτερο μπλοκ [6]. Το όργανο θα έπρεπε να είναι εξοπλισμένο με ειδικές θέσεις για όλα τα αντιδραστήρια (αμινοξέα, αντιδραστήρια σύζευξης, διαλύτες, διάλυμα αποκοπής), τα οποία θα μπορούσαν να παρέχονται στη κάθε θέση (όπου θα βρισκόταν το πεπτίδιο) ξεχωριστά. Το πρώτο όργανο αυτού του τύπου, περιγράφηκε από τον ίδιο τον Merrifield, το 1965 (Σχήμα 4.8) [12].



Σχήμα 4.8: Ο Merrifield με τον πρώτο αυτοματοποιημένο πεπτιδικό συνθέτη στερεάς φάσης. Το όργανο σήμερα αποτελεί μουσειακό έκθεμα του Ινστιτούτου Σμιθσόνιαν.

Σήμερα, περισσότερες από 15 εταιρίες προμηθεύουν στην αγορά αυτόματους πεπτιδικούς συνθέτες [13]. Τα όργανα αυτά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο μεταφοράς του διαλύματος, τον τρόπο της ανάμιξης αλλά και ως προς την κλίμακα της σύνθεσης [14]. Επίσης μπορεί να διαφέρουν και ως προς κάποια ειδικά χαρακτηριστικά,

όπως η δυνατότητα θέρμανσης με μικροκύματα ή μη, η δυνατότητα για αδρανή ατμόσφαιρα ή ως προς την δυνατότητα αυτοματοποιημένης αποκοπής πεπτιδίου. Λειτουργούν είτε με διήθηση υπό κενό είτε με εφαρμογή πίεσης, σε συνεχή ή μη ροή [13].

Η σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων με δύσκολη αλληλουχία, συχνά οδηγεί στη δημιουργία παραπροϊόντων αλλά και σε χαμηλή απόδοση σύνθεσης. Το 1992, ο Yu και οι συνεργάτες του ανέφεραν για πρώτη φορά ότι η ακτινοβολία με μικροκύματα σε συνδυασμό με την SPPS μέθοδο, οδηγεί σε πεπτίδια με υψηλές αποδόσεις και μεγάλου βαθμού καθαρότητας [15]. Σήμερα, διάφοροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η θέρμανση με μικροκύματα σε συνδυασμό με την SPPS μεθοδολογία, μπορούν να ξεπεράσουν τις προαναφερθείσες δυσκολίες. Όργανα που υποστηρίζουν αυτή τη λειτουργία έχουν αναπτυχθεί και είναι πλέον διαθέσιμα στην αγορά. Η επιλογή όμως της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης πρέπει να γίνεται με προσοχή, με σκοπό να αποφευχθεί η ρακεμοποίηση [16].

4.6 ΤΟ ΣΤΕΡΕΟ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Η επιλογή του σωστού στερεού υποστρώματος (ρητίνη) είναι υψίστης σημασίας για την επιτυχή σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου. Για να χρησιμοποιηθεί μια ρητίνη στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση θα πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια [17]:

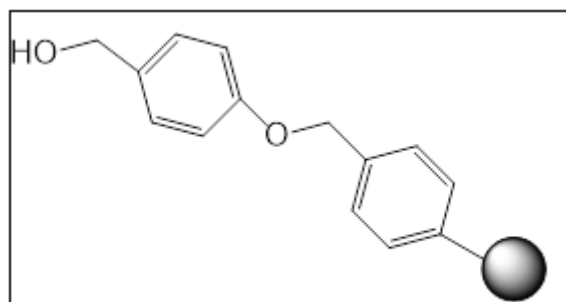
- ✓ Τα σωματίδια (κόκκοι) του πολυμερούς πρέπει να έχουν κατάλληλο σχήμα και μέγεθος, ώστε να διευκολύνεται η πρόσβαση των αμινοξέων με τις δραστικές ομάδες.
- ✓ Η ρητίνη πρέπει να φέρει ικανό αριθμό δραστικών ομάδων, πάνω στις οποίες θα συντεθεί το πεπτίδιο, ώστε να λαμβάνονται ικανοποιητικές αποδόσεις. Οι δραστικές αυτές ομάδες πρέπει να δημιουργούν δεσμό ανθεκτικό στις αντιδράσεις επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας, ο οποίος να αποκόπτεται εκλεκτικά στο τέλος της σύνθεσης χωρίς να επηρεάζει τους πεπτιδικούς δεσμούς.
- ✓ Η ρητίνη πρέπει να είναι αδιάλυτη στους διαλύτες και στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην SPPS καθώς επίσης και να μην αντιδρά με αυτά.
- ✓ Να έχει την ικανότητα να διογκώνεται ικανοποιητικά με σχετικά μη πολικούς διαλύτες επιτρέποντας την καλύτερη διάχυση των αντιδραστηρίων καθώς και την εύκολη απομάκρυνση της περίσσειάς τους ή των διαφόρων παραπροϊόντων.

Η σύνδεση του πρώτου αμινοξέος πάνω στο στερεό πολυμερές γίνεται με αντίδραση της καρβοξυλομάδας του είτε απ' ευθείας με τη χαρακτηριστική ομάδα του πολυμερούς, είτε με μια ενδιάμεση ομάδα που έχει το ρόλο του συνδέσμου (linker) μεταξύ του αμινοξέος και

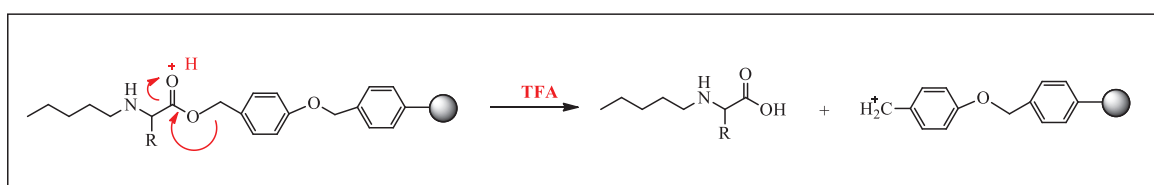
του πολυμερικού υποστρώματος. Το είδος της χαρακτηριστικής αυτής ομάδας καθορίζει τη φύση του ομοιοπολικού δεσμού πεπτιδίου-ρητίνης και προσδιορίζει τη στρατηγική που θα ακολουθηθεί. Η ρητίνη Merrifield ήταν η πρώτη ρητίνη που αναφέρθηκε και αποτελείται από το συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου και την δραστική χλωρομέθυλο ομάδα [6]. Σήμερα, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός εμπορικών διαθέσιμων ρητινών, οι οποίες είναι κατάλληλες για πολύπλοκες πεπτιδικές συνθέσεις. Στο Παράρτημα II αναφέρονται οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες ρητίνες. Στη παρούσα εργασία θα αναφερθούμε εκτενώς στη Wang ρητίνη, την οποία χρησιμοποιήσαμε κατά τη σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων, που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 6.1.

4.6.1 Η PHTINH WANG

Η Wang (p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλο) ρητίνη είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ρητίνη για τη λήψη πεπτιδίων με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο. Αποτελείται από έναν ευαίσθητο στις όξινες συνθήκες linker (4-[υδροξυμεθυλ]-φαινοξυμεθυλ-ομάδα), ο οποίος συνδέεται κατευθείαν με το βασικό πολυμερές (πολυστυρενίου) [18] (Σχήμα 4.9). Η πρόσδεση του πεπτιδίου στη ρητίνη πραγματοποιείται μέσω ενός εστερικού δεσμού, ο οποίος είναι αρκετά σταθερός σε ποικίλες συνθήκες, αλλά μπορεί εύκολα να διασπαστεί παρουσία οξέος. Η απομάκρυνση του πεπτιδίου επιτυγχάνεται ύστερα από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 95% TFA (Σχήμα 4.10). Επίσης, στην Wang ρητίνη εκτός από καρβοξυλικά οξέα μπορεί να προσδεθούν και φαινόλες χρησιμοποιώντας την αντίδραση Mitsunobu [19].



Σχήμα 4.9: Η ρητίνη Wang



Σχήμα 4.10: Αποκοπή πεπτιδίου από την Wang ρητίνη.

Η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος στη Wang ρητίνη, απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, αφού μπορεί να οδηγήσει στη ρακεμοποίηση του πεπτιδίου, σε χαμηλής απόδοσης σύνθεση αλλά και στο σχηματισμό διπεπτιδίου. Για αυτό το λόγο, πλέον οι περισσότερες εταιρίες έχουν διαθέσιμα προϊόντα Wang ρητίνης με συζευγμένο ήδη το πρώτο αμινοξύ. Παρόλα αυτά, στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί διάφορες μεθοδολογίες για τη σύζευξη του πρώτου αμινοξέος στη Wang ρητίνη. Οι επικρατέστερες από αυτές είναι: α) η μέθοδος Sieber [20], σύμφωνα με την οποία η σύζευξη επιτυγχάνεται παρουσία 2,6-διχλωροβενζοϋλοχλωριδίου και πυριδίνης, για 15-20 ώρες, ενώ ως διαλύτης χρησιμοποιείται το DMF. β) Η αντίδραση Mitsunobu [21], με σχηματισμό εστερικού δεσμού χρησιμοποιώντας τριφαινυλοφωσφίνη (PPh_3) και διαιθυλαζοδικαρβοξυλεστέρα (DEAD) σε διαλύτη DMF για 1 ώρα. Η υδροξυλομάδα της ρητίνης παρουσία PPh_3 και DEAD ενεργοποιείται, μετατρέπεται σε ένα δραστικό ενδιάμεσο και αντιδρά με την ελεύθερη καρβοξυλομάδα του καρβοξυ-συστατικού, γ) Επίσης παρουσία των αντιδραστηρίων 2,4,6-μεσιτυλεν-σουλφονυλ-3-νιτρο-1,2,4-τριαζολίδιο (MSNT) και 1-μεθυλ-ιμιδαζόλιο (MeIm), σε διαλύτη DMF για 30 λεπτά [22, 23].

Η απλούστερη όμως και η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο εστεροποίησης στα υδροξυ-πολυμερή, είναι η χρήση συμμετρικών ανυδριτών των N^a -προστατευμένων αμινοξέων (που παρασκευάζονται με τη χρήση των καρβοδιϊμιδίων DCC και DIC), παρουσία καταλυτικής ποσότητας 4-διμεθυλο-αμινοπυριδίνης (DMAP) [24, 25]. Αν και ο ρόλος της DMAP στην αντίδραση εστεροποίησης δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, η προσθήκη της κρίνεται απαραίτητη διότι διαφορετικά οδηγούμαστε σε ιδιαίτερα χαμηλές αποδόσεις (5% σε 2 ώρες) [26].

Τα βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι εξαιτίας του βασικού χαρακτήρα του DMAP, παρουσιάζονται υψηλά ποσοστά ρακεμοποίησης, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις σύζευξης ευαίσθητων αμινοξέων όπως His ή Cys [20], αλλά και πιθανά σχηματισμός διπεπτιδίου. Οπτικώς καθαρά προϊόντα με ικανοποιητικές αποδόσεις σύζευξης, λαμβάνονται όταν χρησιμοποιούνται ενεργοί εστέρες αντί των συμμετρικών ανυδριτών, με παρουσία DMAP που δεν υπερβαίνει τα 0,1 eq (ως προς τα mmol των υδροξυλομάδων της ρητίνης) και HOBT (2eq) σε χαμηλή θερμοκρασία (0-3 °C) [27].

Όπως αναφέρθηκε, ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής, είναι ο ανεπιθύμητος σχηματισμός διπεπτιδίου που μπορεί να ληφθεί κατά την πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος στις υδροξυλομάδες της ρητίνης [28]. Οι βασικές ιδιότητες της DMAP μπορεί να οδηγήσουν σε μερική αποκοπή της Fmoc ομάδας του C-τελικού αμινοξέος με αποτέλεσμα μετά το τέλος

της σύζευξης να προκύπτει και διπεπτίδιο. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να περιοριστεί με μείωση του χρόνου σύζευξης, με την προσθήκη HOBt αλλά και πραγματοποιώντας την αντίδραση σε χαμηλές θερμοκρασίες.

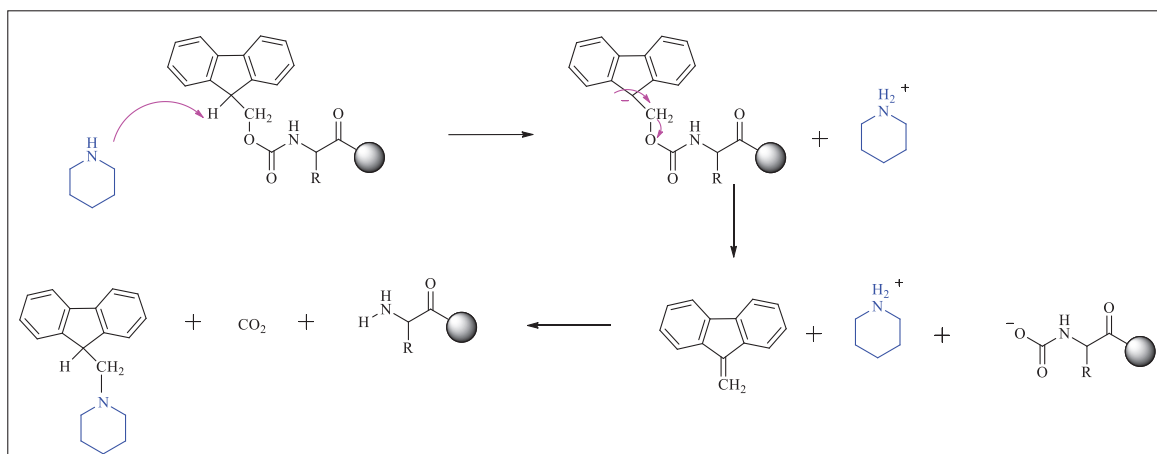
Τέλος, εξαιτίας της φύσης του δεσμού που συνδέει το πεπτίδιο με τη ρητίνη, η σύνθεση πεπτιδίων σε Wang ρητίνη μπορεί να οδηγήσει σε παραπροϊόντα τα οποία είναι δύσκολο να απομονωθούν. Τα πιο γνωστά παραπροϊόντα, είναι οι δικετοπιπεραζίνες, τα οποία προκύπτουν κατά την απομάκρυνση της Fmoc ομάδας του δεύτερου (από το C-τελικό άκρο) αμινοξέος. Για την παράπλευρη αντίδραση σχηματισμού δικετοπιπεραζίνης θα αναφερθούμε εκτενώς στο Κεφάλαιο 4.12.3.

4.7 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ & ΑΠΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ α -ΑΜΙΝΟΜΑΔΑΣ

Η επιλογή της προστασίας της α -αμινομάδας των αμινοξέων που θα σχηματίσουν τον πεπτιδικό δεσμό, είναι υψίστης σημασίας, ώστε να αποφεύγεται η εμπλοκή της ομάδας αυτής σε παράπλευρες αντιδράσεις και σχηματισμό παραπροϊόντων. Τα βασικά χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει μια N^{α} -άμινο προστατευτική ομάδα είναι: σταθερότητα κατά τη σύζευξη του αμινοξέος, εύκολη και εκλεκτική απομάκρυνσή της μετά την ολοκλήρωση της σύζευξης σε συνθήκες και με αντιδραστήρια που να μην επηρεάζουν τον πεπτιδικό δεσμό, καθώς επίσης και να μην ευνοεί την ρακεμοποίηση. Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, οι προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται κυρίως για την προστασία της N^{α} -αμινομάδας είναι η Boc ομάδα (tert-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα) και η Fmoc ομάδα (9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα).

Τα πλεονεκτήματα της Fmoc ομάδας έναντι της Boc [29], έχουν οδηγήσει τους πεπτιδοχημικούς στην κατεύθυνση σύνθεσης πεπτιδίων με την Fmoc/tBu μεθοδολογία. Τα βασικότερα πλεονεκτήματα είναι τα εξής: (i) χρήση ήπιων συνθηκών καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης, (ii) σύνθεση προστατευμένων πεπτιδίων χρησιμοποιώντας ευαίσθητες σε οξέα ρητίνες, (iii) δυνατότητα ελέγχου της πορείας της σύνθεσης (μετρώντας την απορρόφηση στα 273 nm του διφαινυλοφουλβενίου που απελευθερώνεται από την αποκοπή της Fmoc ομάδας), (iv) αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων κατά την απομάκρυνση της Fmoc ομάδας (μη σχηματισμός ανεπιθύμητων καρβοκατιόντων που μπορούν να ακυλώσουν ευαίσθητα αμινοξέα) και (v) υψηλός βαθμός καθαρότητας των τελικών προϊόντων.

Η Fmoc ομάδα, εισήχθη το 1970 από τους Carpino και Han και είναι μια ουρεθανικού τύπου (ουρεθάνη: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCONH}_2$) ομάδα [29]. Πρόκειται για ένα αλκόξυ καρβόνυλο παράγωγο στο οποίο ο πλούσιος σε ηλεκτρόνια δακτύλιος της φλουορένυλο ομάδας καθιστά το μοναδικό πρωτόνιο του β-ατόμου άνθρακα πολύ όξινο με αποτέλεσμα να αποσπάται εύκολα υπό την επίδραση ασθενών βάσεων. Στη συνέχεια το καρβανιόν που παράγεται υφίσταται αποκαρβοξυλίωση δίνοντας ελεύθερη αμίνη, ενώ το παραπροϊόν διφαινυλο φουλβένιο (DBF) αντιδρά με τη δευτεροταγή αμίνη και δίνει μια σταθερή τριτοταγής βάση η οποία απομακρύνεται εύκολα κατά τη διάρκεια των εκπλύσεων της πεπτιδορητίνης [30] (Σχήμα 4.11). Το σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι οι αμινομάδες λαμβάνονται ελεύθερες και όχι πρωτονιωμένες, όπως συμβαίνει κατά την αποπροστασία με την επίδραση οξέων.



Σχήμα 4.11: Μηχανισμός απομάκρυνση της Fmoc ομάδας με χρήση πιπεριδίνης.

Η πιπεριδίνη αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο για την αποκοπή της Fmoc ομάδας, όταν η σύνθεση των πεπτιδίων γίνεται σε στερεή φάση και συνήθως χρησιμοποιείται διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF. Σε περιπτώσεις όμως, όπου η χρήση ακόμα και υψηλών ποσοστών πιπεριδίνης (έως και 60%) δεν οδηγεί σε πλήρη αποπροστασία της N^α -αμινομάδας, απαιτείται η παρουσία πιο ισχυρών βάσεων στο διάλυμα αποκοπής, όπως το 1,8-διαζαδικυκλο[5,4,0]ενδεκα-7-ένιο (DBU) [31]. Το DBU μειονεκτεί ως προς την πιπεριδίνη στο ότι δεν λειτουργεί ως δεσμευτής του διφαινυλοφουλβενίου με αποτέλεσμα αυτό να επαναδεσμεύεται και να σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με την ελεύθερη αμινομάδα.

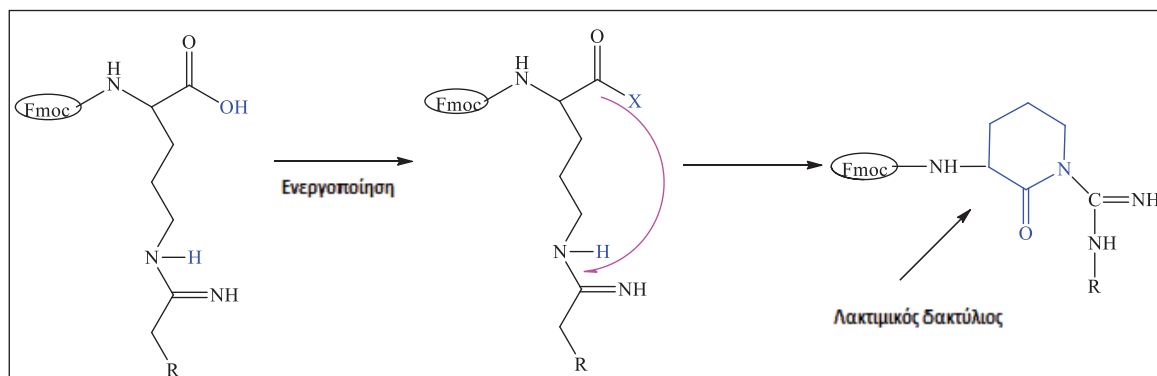
4.8 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Οι δραστικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, πρέπει να είναι προστατευμένες καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης, με σκοπό να εμποδιστεί η διακλάδωση της επιμηκυνόμενης αλυσίδας. Ο E. Fischer ήταν ο πρώτος που εισήγαγε την έννοια της προσωρινής προστασίας των λειτουργικών ομάδων για να πραγματοποιηθεί μια τοποεκλεκτική αντίδραση [32]. Ενώ ο M. Bergmann και ο Λ. Ζέρβας εισήγαγαν την πρώτη «σύγχρονη» προστατευτική ομάδα βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z), η οποία αποτέλεσε σταθμό στη πεπτιδική χημεία [33]. Οι προστατευτικές ομάδες θα πρέπει να μένουν ανέπαφες κατά την αποκοπή της N^α- προστατευτικής ομάδας και να απομακρύνονται εκλεκτικά, σε συνθήκες και με αντιδραστήρια που να μην επηρεάζουν τις άλλες. Να σημειωθεί ότι τα αμινοξέα γλυκίνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, προλίνη, αλανίνη, φαινυλαλανίνη και μεθειονίνη χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση απροστάτευτα διότι οι παράπλευρες αλυσίδες των παραπάνω αμινοξέων δεν εμπεριέχουν δραστικές ομάδες ικανές να δημιουργήσουν προβλήματα κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων.

Σήμερα, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός προστατευτικών ομάδων για τις δραστικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Στο Παράρτημα III παρουσιάζονται οι προστασίες που συνήθως χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση με την Fmoc/tBu μεθοδολογία. Στην παρούσα εργασία γίνεται αναφορά στις συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες παράπλευρες προστασίες για τα N^α-Fmoc προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν στο Πειραματικό Μέρος (Κεφάλαιο 6.1).

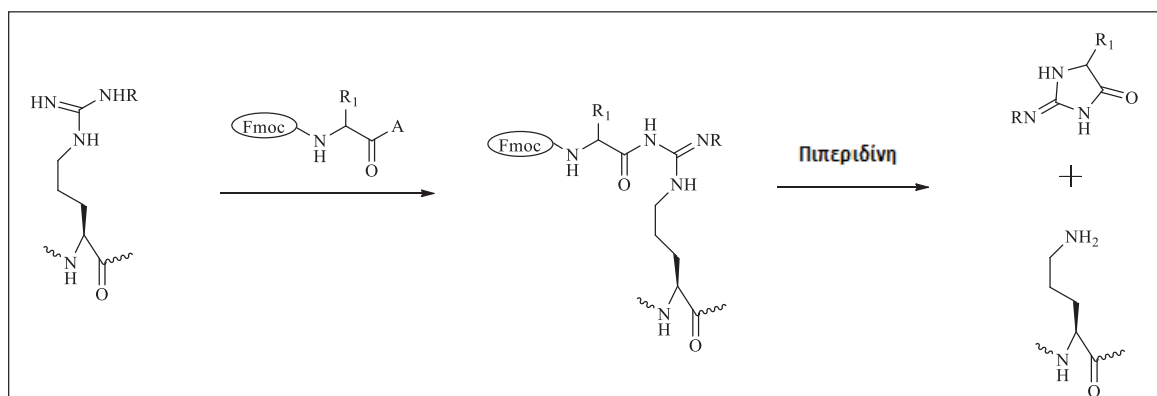
4.8.1 Η ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΓΟΥΑΝΙΔΟΜΑΔΑΣ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ

Η προστασία της γουανιδομάδας της αργινίνης κρίνεται απαραίτητη ώστε να αποφευχθεί η δεγουανιδίνωση, από την οποία προκύπτει ορνιθίνη αλλά και η ενδομοριακή κυκλοποίηση της παράπλευρης αλυσίδας της [34]. Στο Σχήμα 4.12 παρουσιάζεται η αντίδραση σχηματισμού λακτιμικού δακτυλίου, η οποία ευνοείται σε βασικές συνθήκες κατά την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος. Ενώ στο Σχήμα 4.13 παρουσιάζεται ο σχηματισμός της ορνιθίνης κατά τη δεγουανιδίνωση της αργινίνης [35-37].



Σχήμα 4.12: Σχηματισμός λακταμικού δακτυλίου κατά την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας της αργινίνης. Η δ αμινομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της αργινίνης προσβάλλει ενδομοριακά τον καρβονυλικό της άνθρακα με αποτέλεσμα το κλείσιμο της αλυσίδας και το σχηματισμό του λακταμικού δακτυλίου [38].

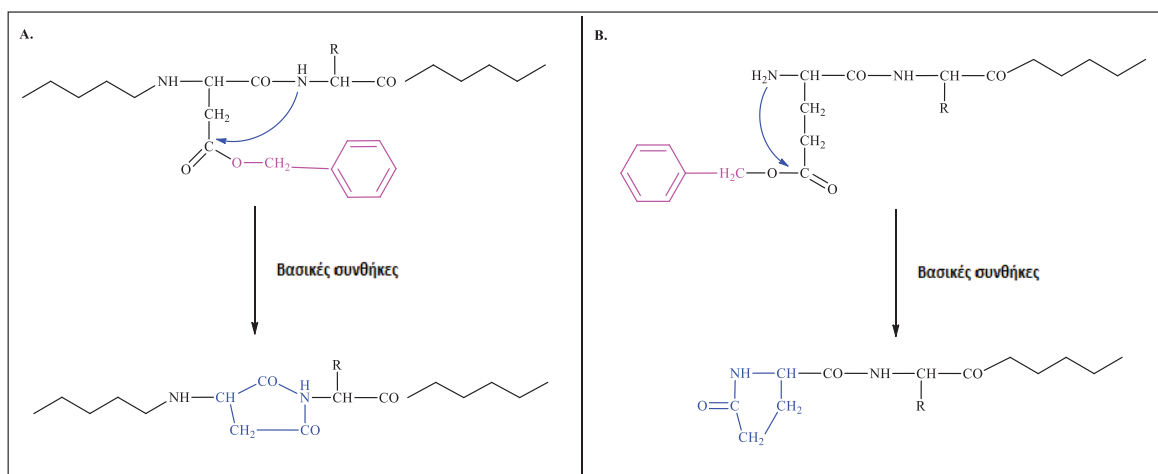
Οι παραπάνω παράπλευρες αντιδράσεις περιορίζονται με τη χρήση κατάλληλων προστασιών της παράπλευρης αλυσίδας της αργινίνης [39]. Στην Fmoc/*t*Bu στρατηγική ως προστατευτικές ομάδες για τη γουανιδομάδα της αργινίνης χρησιμοποιούνται συνήθως η 4-Μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλοφαινυλο-σουλφονυλομάδα (Mtr), η 2,2,4,6,7-Πενταμεθυλο - διϋδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλομάδα (Pbf) [40] και η 2,2,5,7,8 Πενταμεθυλο-χρωμαιο-6-σουλφονυλομάδα(Pmc) [41]. Η Pbf-ομάδα που εισήχθη από τον Carpino και τους συνεργάτες του [40] θεωρείται η καλύτερη επιλογή για την προστασία της γουανιδομάδας της αργινίνης καθώς είναι ευαίσθητη στα όξινα διαλύματα του TFA, ενώ δεσμεύεται εύκολα κατά την απομάκρυνσή της από την παράπλευρη αλυσίδα του αμινοξέος.



Σχήμα 4.13: Σχηματισμός ορνιθίνης κατά τη δεγουανιδίνωση της αργινίνης.

4.8.2 Η ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΑΣΠΑΡΤΙΚΟΥ/ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Η καρβοξυλική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέος, πρέπει να εισαχθεί προστατευμένη στην πεπτιδική αλυσίδα, προκειμένου να αποφευχθεί η ενεργοποίηση της κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα διακλαδισμένα πεπτίδια. Στην Fmoc/tBu στρατηγική, για την προστασία των β- και γ-καρβοξυλομάδων του ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέος αντίστοιχα χρησιμοποιείται κυρίως η της tetr-βουτυλόξυ ομάδα [42]. Το βασικό μειονέκτημα της χρήσης της tBu ομάδας είναι τα υψηλά ποσοστά ασπαρτιμιδίου και πυρογλουταμινικού οξέος που λαμβάνονται από τις επαναλαμβανόμενες κατεργασίες τις πεπτιδορρήτης με το διάλυμα πιπεριδίνης [43, 44] (Σχήμα 4.14). Για το σχηματισμό του ασπαρτιμιδίου και του πυρογλουταμινικού οξέος θα αναφερθούμε στα Κεφάλαια 4.12.1 και 4.12.2,



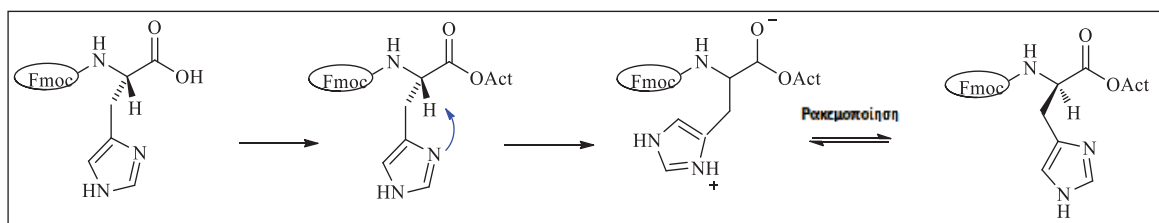
Σχήμα 4.14: Ενδομοριακή κυκλοποίηση ασπαρτικού (Α.) και γλουταμινικού οξέος (Β.).

Εκτός από την tetr-βουτυλόξυ ομάδα, ως προστατευτικές ομάδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν η 2,3,4-τριμεθυλ-πεντ-3-οξυομάδα (ODie), η αλλυλοξυομάδα (OAllyl) και η 1-(4,4-διμεθυλ-2,6-διοξο-κυκλοεξυλιδεν)3-μεθυλ-βουτυλ-βενζυλοξυ ομάδα (ODmab). Ενώ η προστατευτική ομάδα ODie είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στο σχηματισμό ασπαρτιμιδίου [45], δεν ισχύει το ίδιο και για τις OAllyl και ODmab όταν η σύζευξη γίνεται παρουσία του διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμιδίου (DIC) ή με την μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής αντίστοιχα [46, 47]. Το 2014, στο 9^ο Συνέδριο Annual Peptide Therapeutics Symposium, η C.Basava από την εταιρία Merck, παρουσίασε μια καινούρια προστατευτική ομάδα για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος, την oEpe [48].

Σύμφωνα με την εργασία αυτή, η ομάδα οEρε θεωρείται ανώτερη σε σχέση με τις άλλες προστατευτικές ομάδες στην αποφυγή σχηματισμού ασπαρτιμιδίου. Παρόλα αυτά στις περιπτώσεις πεπτιδίων που περιέχουν την αλληλουχία Asp-Gly, η χρήση του εμπορικά διαθέσιμου διπεπτιδίου Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH, θεωρείται η πιο σίγουρη μέθοδος για το μη σχηματισμό ασπαρτιμιδίου [49].

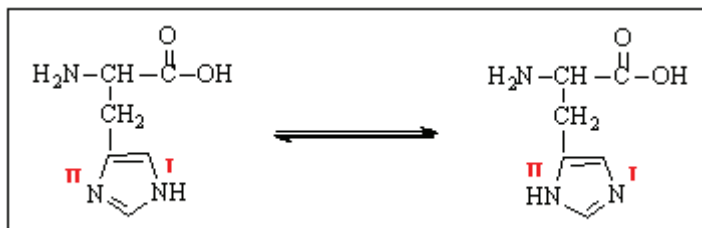
4.8.3 Η ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΙΜΙΔΑΖΟΛΙΚΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ ΤΗΣ ΙΣΤΙΔΙΝΗΣ

Η προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της ιστιδίνης κρίνεται απαραίτητη για την αποφυγή της ρακεμοποίησης (Σχήμα 4.15) και της ακυλίωσης του ιμιδαζολικού δακτυλίου της [50].



Σχήμα 4.15: Προτεινόμενος μηχανισμός ρακεμοποίησης της ιστιδίνης κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Απόσπαση του C^α πρωτονίου της ιστιδίνης από το ισχυρώς βασικό π-άτομο αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου.

Αν και έχει αναφερθεί ότι η προστασία του π-ατόμου αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου μειώνει σε μεγάλο βαθμό το ποσοστό της ρακεμοποίησης της ιστιδίνης [51], η προστασία του τ-ατόμου αζώτου με την τριτυλομάδα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική [52] και την καθιστά την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη προστατευτική ομάδα. Επίσης η προστασία του τ-αζώτου επιτυγχάνεται και με την 4-μεθυλοτριτυλομάδα (Mtt) ομάδα [53], ενώ η t-βουτοξυμεθυλομάδας (Bum) [54] ομάδα προστατεύει το π-άτομο αζώτου.



Σχήμα 4.16: Τα τ- και π- άτομα αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου

4.8.4 Η ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΛΟΜΑΔΑΣ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

Η υδροξυλομάδα της σερίνης και η φαινολική υδροξυλομάδα της τυροσίνης θα μπορούσαν να εισαχθούν στην πεπτιδική αλυσίδα απροστάτευτες. Παρόλα αυτά στην σύνθεση σε στερεή φάση, εξαιτίας της περίσσειας των ακυλιωτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται, η προστασία τους κρίνεται απαραίτητη. Η πρωτοταγής υδροξυλομάδα της σερίνης είναι ιδιαίτερα επιρρεπής στην ακυλίωση αλλά και η φαινυλομάδα της τυροσίνης μπορεί να ακυλιωθεί σε βασικές συνθήκες εξαιτίας του πυρηνόφιλου χαρακτήρα του φαινολικού ιόντος [17]. Οι προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται για την παράπλευρη αλυσίδα της σερίνης και της τυροσίνης είναι η t-βουτυλομάδα (tBu) [55], η τριτυλομάδα (Trt) [56] και η βενζυλομάδα (Bzl) [57].

4.8.5 Η ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ N^ε-AMINΟΜΑΔΑΣ ΤΗΣ ΛΥΣΙΝΗΣ

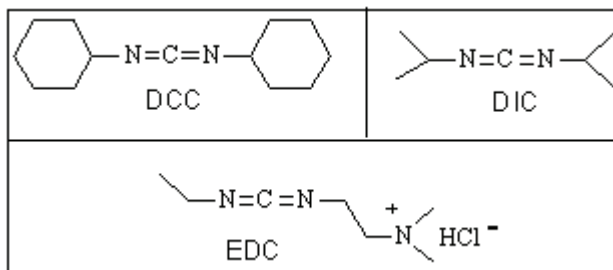
Η προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της λυσίνης κρίνεται απαραίτητη διότι η ελεύθερη ε-αμινομάδα εξαιτίας του βασικού χαρακτήρα της, μπορεί να μετατραπεί σε ε-αμίνη [17]. Πολλές ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία της α-αμινομάδας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την προστασία της παράπλευρης ε-αμινομάδας. Στην Fmoc/tBu στρατηγικής η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη προστασία για την παράπλευρη αλυσίδα της λυσίνης είναι η t-βουτοξυκαρβονυλομάδα (Boc) [17, 42].

4.9 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ

Όπως αναφέρθηκε, όταν η α-αμινομάδα ενός αμινοξέος αντιδρά με την α-καρβοξυλομάδα ενός άλλου αμινοξέος το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός δεσμού, που ονομάζεται πεπτιδικός (ή αμιδικός) δεσμός. Για να επιτευχθεί όμως η αντίδραση, απαιτείται η κατάλληλη ενεργοποίηση της α-καρβοξυλομάδας του καρβόξυ-συστατικού. Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού είναι: α) η μέθοδος των χλωριδίων, β) μέθοδος των αζιδίων, γ) μέθοδος των ανυδριτών, δ) μέθοδος των ενεργών εστέρων και ε) αντιδραστήρια σύζευξης [17]. Η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η μέθοδος των αντιδραστηρίων σύζευξης καθώς διακρίνεται για την απλότητα και την ευκολία χειρισμού της και οι πιο συνηθισμένες κατηγορίες αντιδραστηρίων σύζευξης είναι τα καρβοδιϊμίδια, τα φωσφονικά και τα ουρονικά παράγωγα.

4.9.1 ΤΑ ΚΑΡΒΟΔΙΪΜΙΔΙΑ

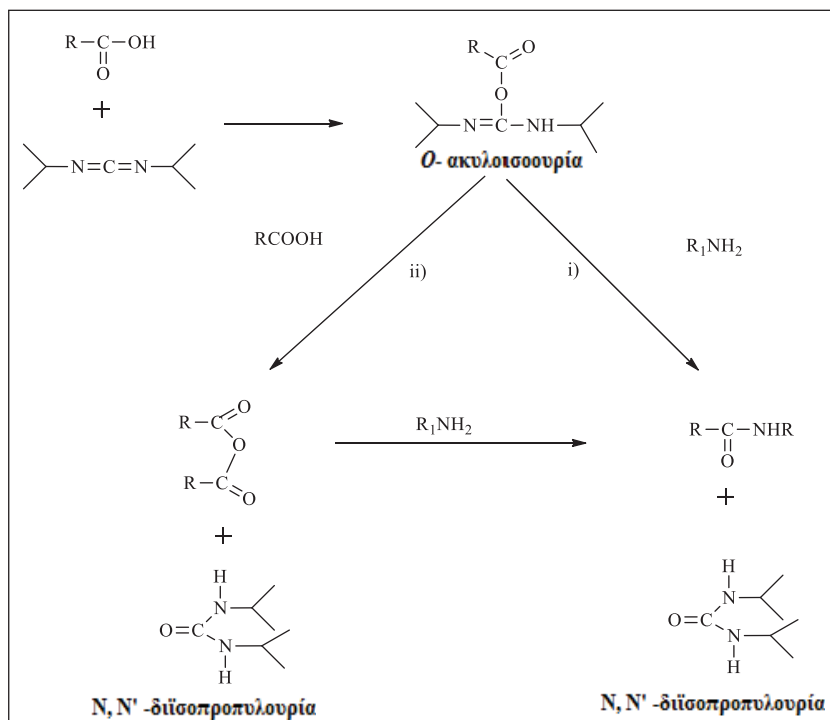
Το δικυκλοεξυλο καρβοδιΐμίδιο (DCC) εισήχθη το 1955 από τους Sheehan και Hess [58] και εξακολουθεί μέχρι σήμερα να αποτελεί ένα πιο τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια σύζευξης. Το 1976 εισήχθη ένα νέο βελτιωμένο καρβοδιΐμίδιο, το διισοπροπυλοκαρβοδιΐμίδιο (DIC) [59] το οποίο πλεονεκτεί σε σχέση με το



DCC, καθώς το παραπροϊόν που σχηματίζεται, η N-εθυλο-N'-(3-(διμεθυλαμινο)προπυλο) καρβοδιΐμίδιο (EDU) είναι υδατοδιαλυτό, αντί της δυσδιάλυτης ουρίας [60].

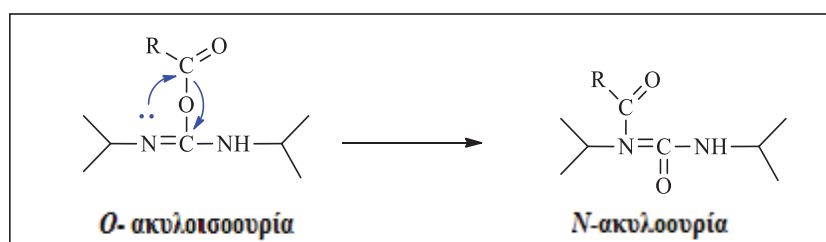
Επίσης το N-αιθυλο-N'-(3-(διμεθυλαμινο)προπυλο) καρβοδιΐμίδιο (EDC) αποτελεί μέλος αυτής της κατηγορίας, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του οποίου είναι η υδατοδιαλυτότητά του [61].

Σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης των καρβοδιΐμιδίων το N^α-άμινο προστατευμένο αμινοξύ προσβάλλει τον έναν από τους διπλούς δεσμούς C=N του καρβοδιΐμιδίου με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ενεργού ενδιάμεσου O-ακυλο-ισοουρίας [62] (Σχήμα 4.18). Στη συνέχεια η O-ακυλο-ισοουρία μπορεί: (α) είτε να υποστεί πυρηνόφιλη προσβολή από την ελεύθερη αμινομάδα του αμινοξυ-συστατικού οδηγώντας στον επιθυμητό πεπτιδικό δεσμό, είτε (β) να αντιδράσει με ένα μόριο καρβοξυ-συστατικού με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ενεργοποιημένου καρβοξυ-παραγώγου ικανό να προσβάλλει το αμινοξυ-συστατικό και να σχηματιστεί το επιθυμητό προϊόν (Σχήμα 4.18).



Σχήμα 4.18: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης το DIC.

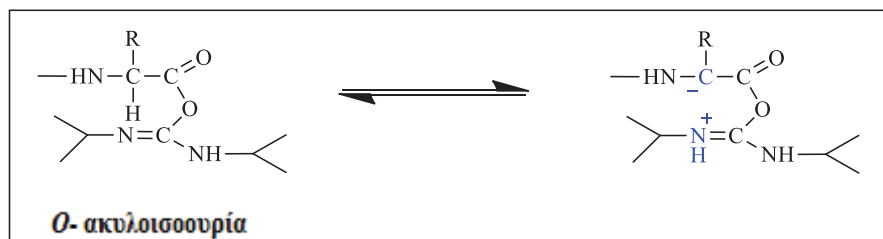
Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί το γεγονός ότι το πυρηνόφιλο κέντρο στο παράγωγο της *O*-ακυλο-ισουρίας ανταγωνίζεται με το αμινο-συστατικό για το ακυλο-αμινοξύ και ο ανταγωνισμός αυτός οδηγεί στο σχηματισμό μη δραστικών παραγώγων *N*-ακυλοουρίας (Σχήμα 4.19).



Σχήμα 4.19: Σχηματισμός *N*-ακυλοουρίας μέσω της *N*-άκυλο μετάθεσης

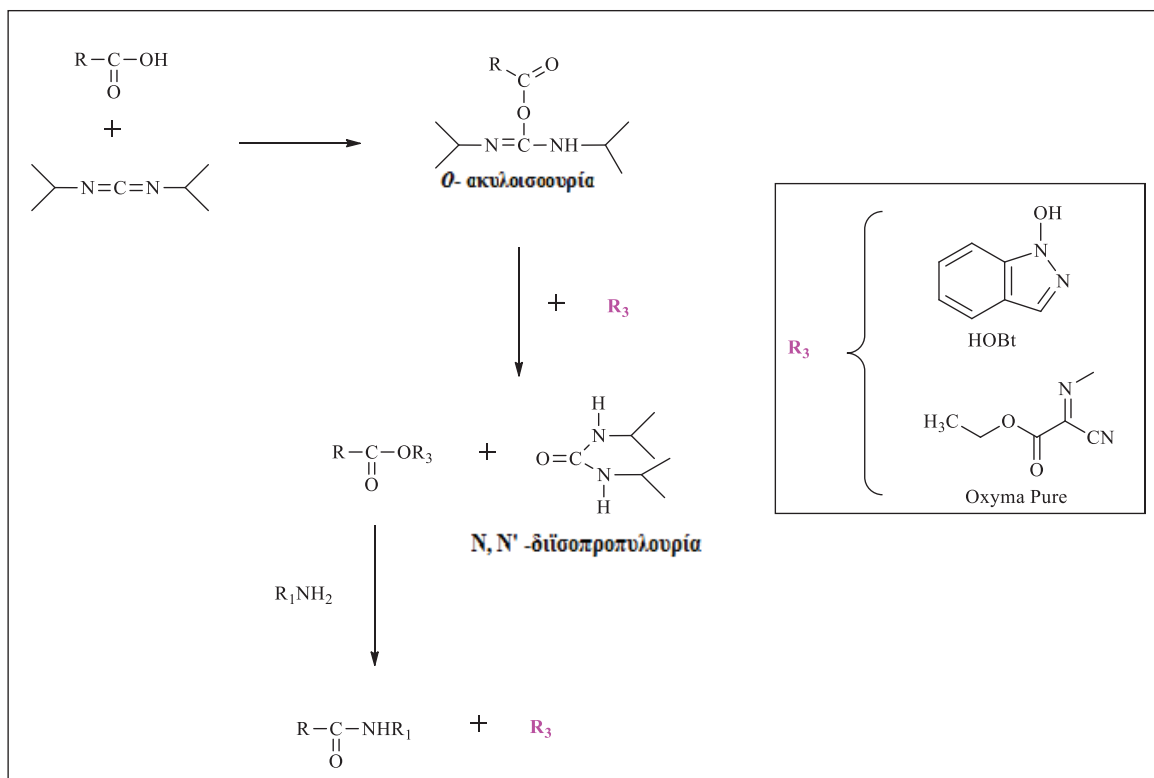
Επίσης άλλο ένα μειονέκτημα της μεθόδου, αποτελεί η απώλεια της οπτικής καθαρότητας του ενεργοποιημένου αμινοξέος κατά το στάδιο της σύζευξης (Σχήμα 4.20). Πιθανά αυτό να οφείλεται στην ενδομοριακή απόσπαση του H^a πρωτονίου από το βασικό κέντρο του δραστικού ενδιάμεσου της *O*-ακυλοϊσουρίας. Ο άνθρακας χάνει την οπτική του

καθαρότητα, επαναπροσλαμβάνει ένα πρωτόνιο για να δώσει τελικά ένα ρακεμικό μίγμα L- και D-αμινοξέων.



Σχήμα 4.20: Ενδομοριακή απόσπαση του H^a πρωτονίου από το βασικό κέντρο του δραστικού ενδιάμεσου της O-ακυλοϊσοουρίας.

Η ρακεμοποίηση και ο σχηματισμός της N-ακυλοουρίας μπορούν να ελαττωθούν με την προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων αντιδραστηρίων στο διάλυμα της σύζευξης. Το περισσότερο διαδεδομένο αντιδραστήριο αυτής της κατηγορίας ήταν μέχρι πρόσφατα 1-υδροξυβενζοτριάζολιο (HOBt) [63]. Το HOBt προσβάλλει το ενεργό ενδιάμεσο της O-ακυλο-ισουρίας με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός πιο ισχυρού ακυλιωτικού μέσου (ενεργός εστέρας βενζοτριάζολιου). Κατόπιν, ο σχηματιζόμενος ενεργός εστέρας αντιδρά ταχύτατα με την αμινομάδα του αμινοξυ-συστατικού με αποτέλεσμα το σχηματισμό του επιθυμητού πεπτιδικού δεσμού (Σχήμα 4.21). Τα πλεονεκτήματα του HOBt είναι τα εξής: α) μειώνει το χρόνο ζωής του ενδιάμεσου παραγώγου της O-άκυλο-ισουρίας και κατά συνέπεια την έκταση της O-N ακυλο-μετάθεσης, που οδηγεί στο σχηματισμό των παραγώγων της N-ακυλοουρίας, β) ως ασθενές οξύ εμποδίζει την αφαίρεση πρωτονίου από το οπτικώς ενεργό άτομο άνθρακα συμβάλλοντας στη διατήρηση της οπτικής καθαρότητας των αμινοξέων, γ) η συγκέντρωση του κατά το στάδιο της σύζευξης παραμένει σχεδόν σταθερή διότι αναγεννάται κατά τη διάρκεια της ακυλίωσης, και δ) συμβάλλει στη δημιουργία ενός πιο δραστικού και ισχυρού ακυλιωτικού μέσου που αποτρέπει το σχηματισμό ανεπιθύμητων αντιδράσεων, όπως η αφυδάτωση της ασπαραγίνης και της γλουταμίνης.

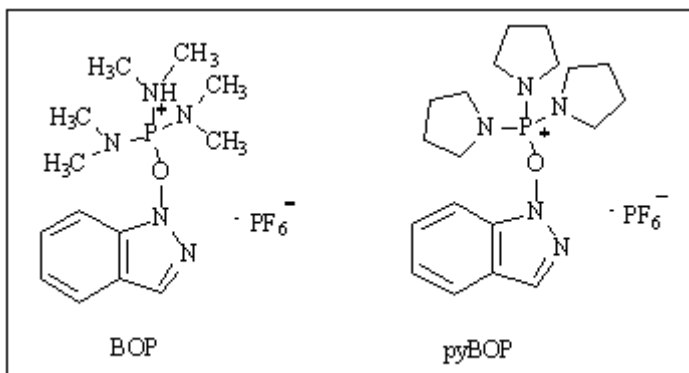


Σχήμα 4.21: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με χρήση του αντιδραστηρίου σύζευξης DIC και ως βοηθητικά πυρηνόφιλα το HOBT ή το Oxyma Pure.

Πρόσφατα όμως η Επιτροπή Εμπειρογνομόνων των Ηνωμένων Εθνών για την μεταφορά επικίνδυνων φορτίων (UN Committee of Experts on the Transportation of Dangerous Cargos), κατηγοριοποίησε το HOBT ως εκρηκτικό τάξεως 1c. Αυτό σημαίνει ότι πλέον το HOBT δεν μπορεί να αποσταλθεί και για αυτό το λόγο οι πεπτιδοχημικοί αναζήτησαν ένα μη-εκρηκτικό πυρηνόφιλο που θα περιλαμβάνει τα χαρακτηριστικά του HOBT. Ένα πολλά υποσχόμενο αντιδραστήριο για την αντικατάσταση του HOBT θεωρείται το 2-κυανο-2-(υδροξυμυμίνιο) οξικός αιθυλεστέρα (Oxyma Pure). Ο Subiros-Funosas και οι συνεργάτες του, σε μια πρόσφατη εργασία τους ανέφεραν ότι το Oxyma Pure στις αντιδράσεις σύζευξης με DIC μειώνει τη ρακεμοποίηση και δίνει καλύτερες αποδόσεις σε σχέση με το HOBT [64]. Το Oxyma Pure χρησιμοποιείται στην αντίδραση πεπτιδικού δεσμού όπως και το HOBT (Σχήμα 4.21).

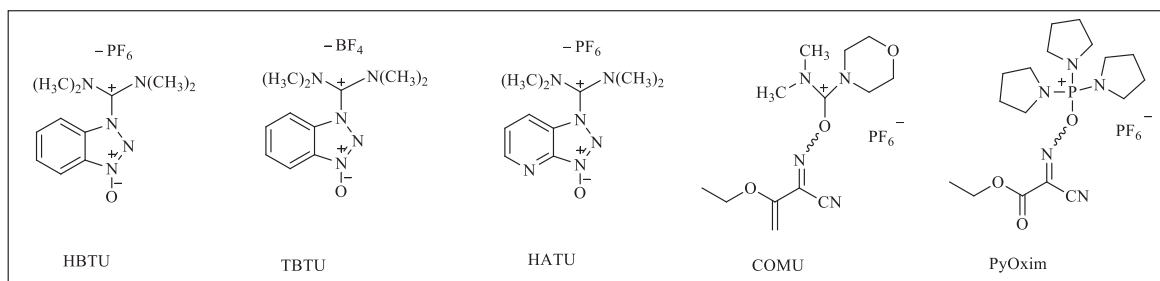
4.9.2 ΦΩΣΦΟΝΙΚΑ & ΟΥΡΟΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Τα αντιδραστήρια σύζευξης, όπως τα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα που επιτρέπουν την in-situ παραγωγή ενεργών εστέρων, έχουν ιδιαίτερη σημασία στην πεπτιδική χημεία. Το βενζοτρίαζολ-οξυ-τρις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας (BOP) αποτελεί το πρώτο αντιδραστήριο αυτού του τύπου και εισήχθη από τον Castro και τους συνεργάτες του, το 1975 [65]. Ένα σοβαρό μειονέκτημα που έχει η χρήση του BOP είναι ότι κατά τη διάρκεια της ακυλίωσης ελευθερώνεται



Σχήμα 4.22: Φωσφονικά αντιδραστήρια

εξαμεθυλοφωσφορικό αμίδιο (HMPA) το οποίο είναι καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Για αυτό το λόγο, πλέον χρησιμοποιείται κυρίως το βενζοτρίαζολ-οξυ-τρις-πυρολιδινο-φωσφονιο εξαφθορο φωσφορικό άλας (PyBOP) το οποίο κατά την ακυλίωση δίνει ένα λιγότερο τοξικό παραπροϊόν [66].

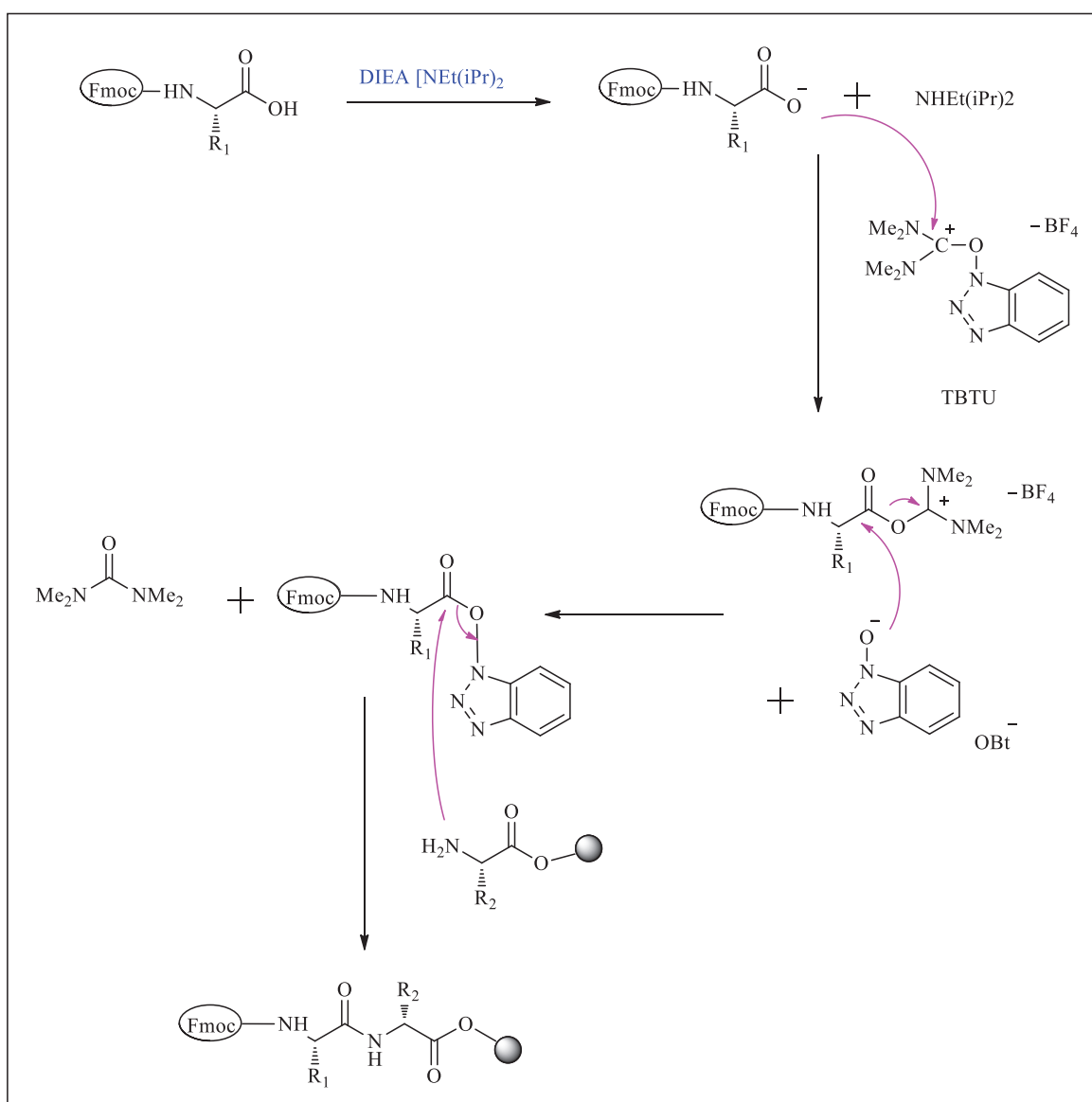


Σχήμα 4.23: Τα ουρανικά παράγωγα HBTU, TBTU, HATU, COMY και PyOxim

Μια άλλη κατηγορία αντιδραστηρίων που επιτρέπουν την in situ παραγωγή ενεργών εστέρων είναι τα ουρονικά παράγωγα. Τα κυριότερα αυτής της κατηγορίας είναι το HBTU (βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφθοροφωσφορικό άλας), το TBTU (βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό άλας) [67] και το εξαφωσφορικό άλας της O-(7-αζαβενζοτρίαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας (HATU) [68]. Το HATU θεωρείται το καλύτερο αντιδραστήριο αυτής της κατηγορίας, το γεγονός όμως ότι είναι ιδιαίτερα ακριβό περιορίζει αρκετά τη χρήση του. Πολύ πρόσφατα, εισήχθησαν νέα

αντιδραστήρια αυτού του τύπου βασισμένα στο μόριο του Oxyma Pure, όπως το COMU [69] και το PyOxim [70], τα οποία παράγουν ενεργούς εστέρες στο επίπεδο του HATU που στοιχίζουν όμως πολύ λιγότερο.

Τα αντιδραστήρια αυτά αντιδρούν με καρβοξυλικά ανιόντα και γι' αυτό κρίνεται απαραίτητη η παρουσία μιας οργανικής βάσης στο μίγμα της αντίδρασης. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες βάσεις για το σκοπό αυτό είναι η διϊσοπροπυλ-αιθυλ-αμίνη (DIEA) και η Ν-μεθυλομορφολίνη (NMM), η κολλιδίνη (TMP) [71] και η 2,6-δι-τριτοταγής βουτυλο-4-(διμεθυλοαμινο)πυριδίνη [DB(DMAP)] [72].

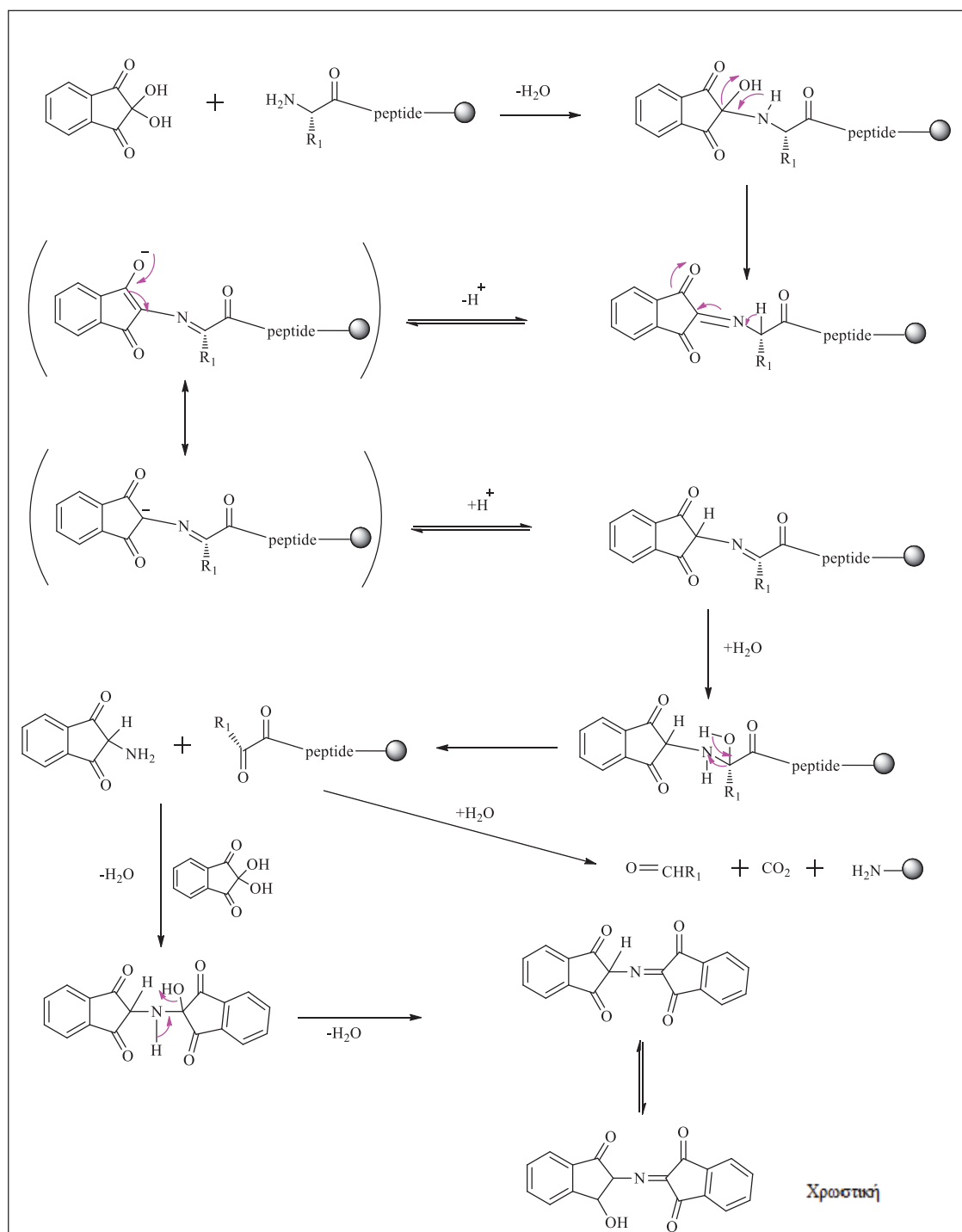


Σχήμα 4.24: Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού παρουσία του αντιδραστηρίου σύζευξης TBTU, της τριτοταγής βάσης DIEA και του βοηθητικού πυρηνόφιλου HOBT

Στο Σχήμα 4.24 δίνεται ένας προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης το TBTU, ως βοηθητικό πυρηνόφιλο το HOBt και το DIEA ως τριτοταγής βάση. Σύμφωνα με το μηχανισμό η DIEA ιονίζει το N^α-άμινο προστατευμένο αμινοξύ το οποίο μετατρέπεται σε ένα ισχυρό ακυλιωτικό μέσο. Στη συνέχεια το καρβοξυλικό ανιόν του αμινοξέος αντιδρά με το ουρονικό παράγωγο σχηματίζοντας ένα δραστικό ακυλοουρονικό παράγωγο το οποίο αντιδρά ταχύτατα με το πυρηνόφιλο HOBt για να δώσει τελικά ένα πιο δραστικό ακυλιωτικό μέσο, τον ενεργό εστέρα του βενζοτριαζολίου. Τέλος, ο σχηματιζόμενος ενεργός εστέρας αντιδρά ταχύτατα με την αμινομάδα του αμινοξυ-συστατικού με αποτέλεσμα το σχηματισμό του επιθυμητού πεπτιδικού δεσμού. Να σημειωθεί ότι η περίσσεια τριτοταγούς βάσης, θα πρέπει να αποφεύγεται όταν η σύνθεση των πεπτιδίων γίνεται με την Fmoc/tBu μεθοδολογία διότι οι συνθήκες αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε αποκοπή της Fmoc ομάδας [73].

4.10 ΔΟΚΙΜΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΗΣΗΣ ΡΗΤΙΝΗΣ

Σε κάθε στάδιο αποπροστασίας και σύζευξης του κάθε αμινοξέος ελέγχεται η επιτυχία της αντίδρασης. Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί που βασίζονται στις έγχρωμες αντιδράσεις, όπως η δοκιμή TNBS [74], η δοκιμή κυανό της βρωμοφαινόλης [75], και η δοκιμή ακεταλδεΰδη/χλωρανίλη [76]. Ωστόσο, δεν υπάρχει καμία άλλη μέθοδος, τόσο διαδεδομένη όσο η αντίδραση της νινυδρίνης (Test Kaiser) [77, 78]. Η συγκεκριμένη δοκιμή περιλαμβάνει την αντίδραση μιας πρωτοταγούς ή δευτεροταγούς αμινομάδας με τη νινυδρίνη. Το αποτέλεσμα της είναι μια ένωση με το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα του Ruhemann. Η παρουσία των αντιδραστηρίων: KCN 0,001M, φαινόλης και πυριδίνης στο διάλυμα του Test Kaiser, βελτιώνει τις ιδιότητες του χρωμοφόρου και οδηγεί σε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

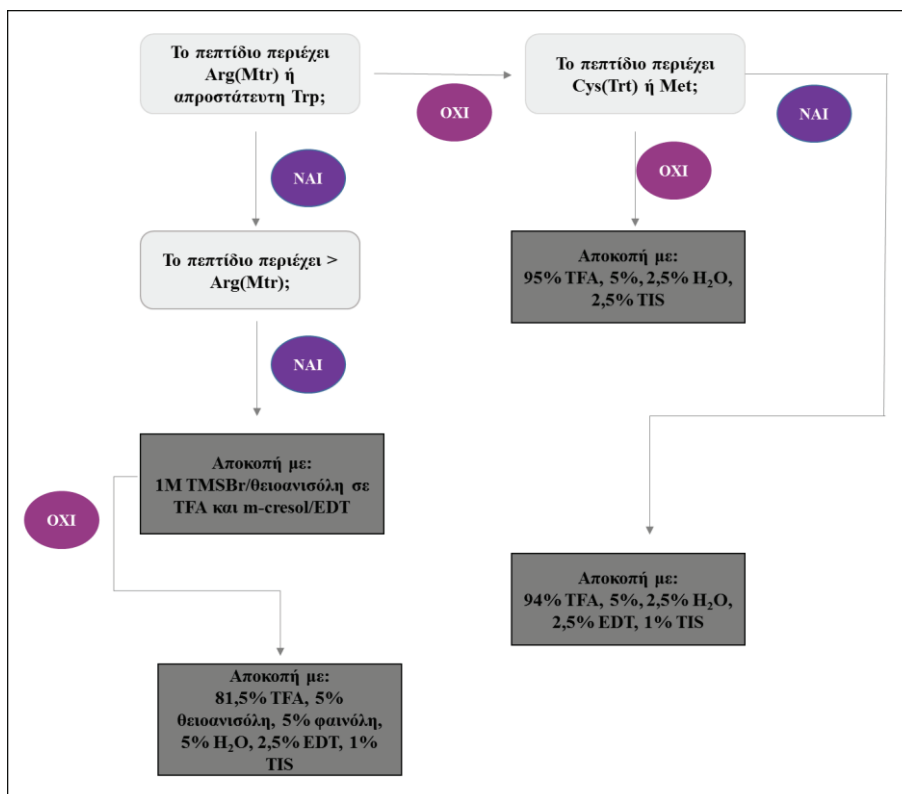


Σχήμα 4.25: Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης νινυδρίνης.

4.11 ΑΠΟΚΟΠΗ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΡΗΤΙΝΗ

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου πάνω στο στερεό πολυμερές, ακολουθεί η αποκοπή του από αυτό. Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι

κατάλληλες ώστε να μην καταστρέφεται το πεπτίδιο αλλά και ταυτοχρόνως να επιτυγχάνεται η αποκοπή των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Η διαδικασία που επιλέγεται κάθε φορά εξαρτάται: α) από τον τύπο της ρητίνης, β) το δεσμό που συνδέει το C-τελικό αμινοξύ με τη ρητίνη, γ) την επιθυμία διατήρησης ή αποκοπής των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων καθώς επίσης και δ) από τη φύση αυτών (Σχήμα 4.26).



Σχήμα 4.26: Διάγραμμα επιλογής μίγματος αποκοπής στη σύνθεση στερεής φάσης με την Fmoc στρατηγική.

Στην περίπτωση της Fmoc στρατηγικής, η αποκοπή του πεπτιδίου επιτυγχάνεται με χρήση ήπιων οξέων όπως είναι το τριφθοροξικό οξύ (TFA). Για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων (καρβοκατιόντα), η παρουσία μορίων παγίδων κρίνεται απαραίτητη. Τέτοια μόρια-παγίδες (scavengers) που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων είναι η ανισόλη, η φαινόλη, παράγωγα θειολών [θειοανισόλη, 1,2-αιθανοδιθειόλη (EDT), η 2-μερκαπτοαιθανόλη, το διμεθυλοσουλφίδιο (DMS), η διθειοθρεϊτόλη (DTT)], τα παράγωγα σιλανίου [τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS)] [79-81]. Επίσης και η προσθήκη νερού στο διάλυμα αποκοπής χρησιμοποιείται πολύ συχνά, διότι δεσμεύει τα τριτοταγή βουτυλοκατιόντα και επιταχύνει την απομάκρυνση της Pmc ομάδας από την παράπλευρη αλυσίδα της αργινίνης

[81]. Ο χρόνος της αντίδρασης ποικίλει από 2 ως 6 ώρες, ανάλογα με τα αμινοξέα και τις προστατευτικές ομάδες του πεπτιδίου. Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί διάφορα μίγματα αποκοπής, ανάλογα με τη φύση των αμινοξέων που απαρτίζουν την αμινοξική αλληλουχία και το είδος των προστατευτικών τους ομάδων. Στο Σχήμα 4.26 φαίνεται ένα διάγραμμα για το μίγμα αποκοπής που πρέπει να επιλέγεται στη σύνθεση στερεής φάσης με την Fmoc στρατηγική.

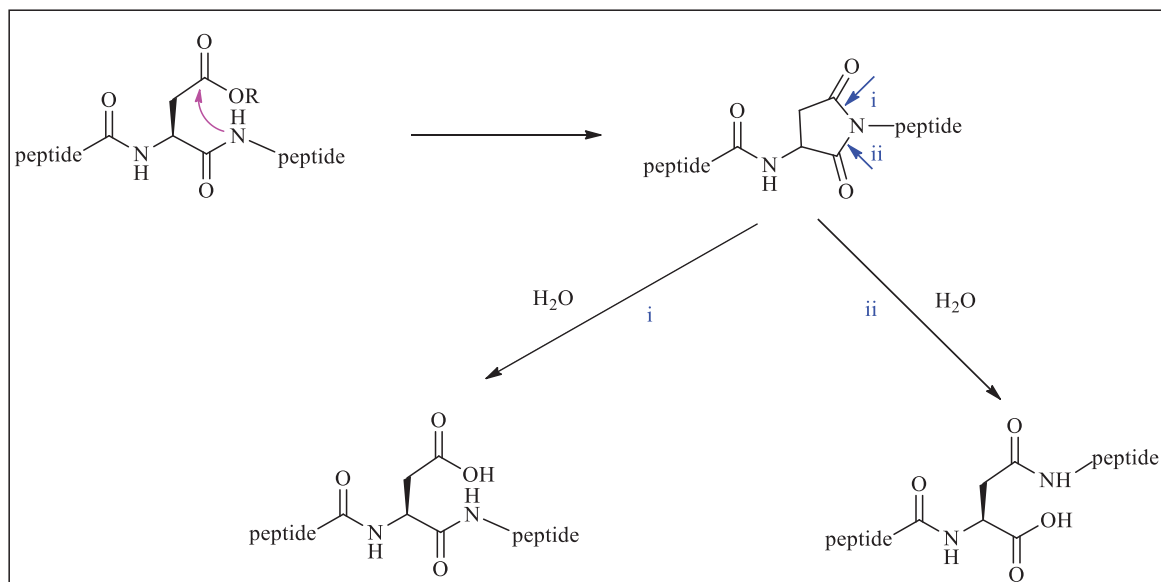
4.12 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

Κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης είναι πιθανό να προκύψουν διάφορα προβλήματα ανάλογα με την αλληλουχία, τη στρατηγική που ακολουθείται, την επιλογή των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων και τη μέθοδο αποπροστασίας. Τα πιο σημαντικά είναι ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου, ο σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος, ο σχηματισμός δικετοπιπεραζινών και η ρακεμίσωση. Στην παρούσα εργασία θα αναφερθούμε συνοπτικά σε αυτές τις περιπτώσεις.

4.12.1 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΣΠΑΡΤΙΜΙΔΙΟΥ

Μια συνηθισμένη παράπλευρη αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης είναι η κυκλοποίηση του ασπαρτικού οξέος προς σχηματισμό ασπαρτιμιδίου [82, 83]. Η αντίδραση εξαρτάται από την αλληλουχία του πεπτιδίου, τον καθοριστικό όμως ρόλο στο ποσοστό σχηματισμού του ασπαρτιμιδίου διαδραματίζει το αμινοξύ που ακολουθεί το Asp στην αλληλουχία (Asp-X) [82, 83]. Επίσης οι παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων, οι οποίες είτε είναι δότες ηλεκτρονίων είτε δεν είναι ογκώδεις, διευκολύνουν την ανεπιθύμητη κυκλοποίηση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα τόσο σε όξινες όσο και σε βασικές συνθήκες. Κατά την Boc/Bzl στρατηγική, οι ισχυρά όξινες συνθήκες κατά την αποκοπή του πεπτιδίου ευνοούν αυτήν την παράπλευρη αντίδραση [84]. Όπως επίσης και στην Fmoc/tBu στρατηγική, από τις επαναλαμβανόμενες κατεργασίες της πεπτιδορηνίνης με το διάλυμα πιπεριδίνης [85, 86]. Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης αυτής ο καρβονυλικός άνθρακας της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος δέχεται πυρηνόφιλη προσβολή από το ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου του πεπτιδικού

σκελετού με αποτέλεσμα το κλείσιμο του δακτυλίου και το σχηματισμό του ιμιδικού δακτυλίου (Σχήμα 4.27).



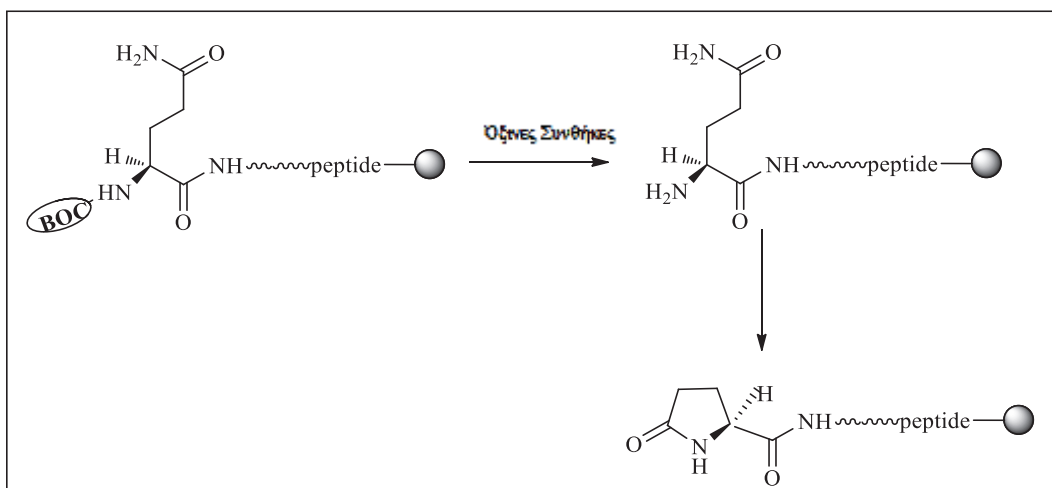
Σχήμα 4.27: Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου και υδρόλυση αυτού προς α- και β- πεπτίδιο.

Για να αντιμετωπιστεί αυτή η ανεπιθύμητη αντίδραση κατά την Fmoc/*t*Bu στρατηγική θα πρέπει: α) να γίνεται χρήση κατάλληλων προστατευτικών ομάδων για το β-καρβοξύλιο του ασπαρτικού οξέος [47, 87]. Καλά αποτελέσματα λαμβάνονται όταν χρησιμοποιείται ως προστατευτικές ομάδες η ODie [45], ή η OMpe [88] είτε η πολύ πρόσφατη oEpe [48]. β) Η αντικατάσταση της πιπεριδίνης με μια ασθενέστερη βάση περιορίζει την έκταση της παράπλευρης αυτής αντίδρασης. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η χρήση είτε της πιπεραζίνης, είτε της 1-υδροξυπιπεριδίνης, είτε της μορφολίνης αντί της πιπεριδίνης εμποδίζει σε μεγάλο βαθμό το κλείσιμο του πενταμελούς δακτυλίου [85, 86], γ) έχει επίσης αναφερθεί ότι η προσθήκη 1-υδροξυβενζοτριάζολίου (0,1 M HOBt) ή 2,4-δινιτροφαινόλης στο διάλυμα αποπροστασίας της Fmoc ομάδας δρα θετικά [89] – αν και υπάρχουν και εργασίες όπου δεν επιβεβαιώνεται ο παραπάνω ισχυρισμός [47]- μειώνοντας το ποσοστό του σχηματιζόμενου ιμιδίου. Εξαιτίας της πρόσφατης κατηγοριοποίησης του HOBt ως εκρηκτικού τάξεως 1c, ο Subiros-Funosas και οι συνεργάτες τους, πρότειναν την προσθήκη 1M Oxyma Pure σε διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF, με πάρα πολύ καλά αποτελέσματα [90].

4.12.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΥΡΟΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Ο σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος οδηγεί στην ενδομοριακή κυκλοποίηση την N τελικής γλουταμίνης. Η παράπλευρη αυτή αντίδραση πραγματοποιείται κάτω από ασθενώς όξινες συνθήκες [91], όπως κατά την απομάκρυνση της Boc ομάδας με τριφθορικό οξύ.

Στην περίπτωση της Fmoc στρατηγικής η ανεπιθύμητη κυκλοποίηση λαμβάνει χώρα κατά τη σύζευξη του επόμενου N^α-προστατευμένου αμινοξέος. Το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο μαζί με το N^α-προστατευμένο αμινοξύ παρέχουν τις ασθενώς όξινες συνθήκες ικανές να καταλύσουν την παράπλευρη αυτή αντίδραση. Συνήθως όμως η παράπλευρη αυτή αντίδραση δεν συναντάται όταν ακολουθείται η Fmoc στρατηγική. Στο Σχήμα 4.28 παρουσιάζεται ο σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος.

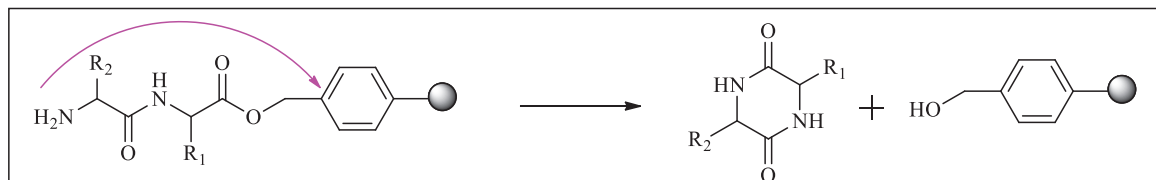


Σχήμα 4.28: Σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος.

4.12.3 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΗΣ (DKP)

Η παράπλευρη αυτή αντίδραση λαμβάνει χώρα είτε κατά την αποκοπή της N^α-αμινο προστατευτικής ομάδας του δεύτερου (από το C-τελικό άκρο) αμινοξέος, είτε κατά το στάδιο της σύζευξης του τρίτου αμινοξέος. Ο σχηματισμός των δικετοπιπεραζινών καταλύεται είτε από ασθενή οξέα (Boc/Bzl στρατηγική) [92] είτε από διαλύματα βάσεων (Fmoc/tBu στρατηγική) [93]. Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης αυτής, η ελεύθερη αμινομάδα του προσδεδμεμένου στη ρητίνη διπεπτιδίου προσβάλλει ενδομοριακά τον καρβονυλικό άνθρακα που συνδέει το πεπτιδίο με τη ρητίνη [92] σχηματίζοντας κυκλικά

διπεπτίδια, τις δικετοπιπεραζίνες (Σχήμα 4.29). Επομένως ένα ποσοστό κατά την προσθήκη του 3^{ου} αμινοξέος, θα συζευχθεί στις ελεύθερες υδροξυλομάδες τις ρητίνης, με αποτέλεσμα μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης να ληφθεί και ένα παραπροϊόν το οποίο αντιστοιχεί στο επιθυμητό πεπτίδιο χωρίς τα δύο C-τελικά αμινοξέα.



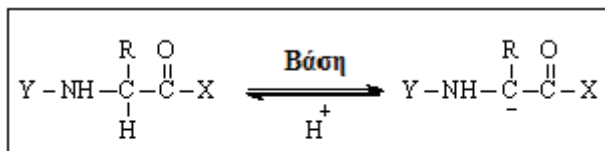
Σχήμα 4.29: Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού δικετοπιπεραζίνης.

Η ενδομοριακή αυτή αμινόλυση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι πιο σημαντικοί από αυτούς -και διάφοροι τρόποι αντιμετώπισης- είναι: α) το είδος του δεσμού που συνδέει το πεπτίδιο με τη ρητίνη [94]. Ο σχηματισμός DKP ευνοείται όταν η σύνθεση των πεπτιδίων γίνεται σε υδρόξυ-πολυμερή ενώ συνήθως δεν παρατηρείται όταν το πεπτίδιο συνδέεται μέσω αμιδικού δεσμού με το στερεό πολυμερές, διότι είναι πολύ σταθερός σε τέτοιου είδους κυκλοποιήσεις λόγω της κακώς αποχωρούσας βενζυλαμινο-ομάδας, β) η έκταση της αντίδρασης ελαττώνεται όταν η σύνθεση πραγματοποιείται σε ογκώδεις ρητίνες (π.χ τριτυλορητίνες), εξαιτίας στερεοχημικών παρεμποδίσεων [95], γ) η φύση των δύο C-τελικών αμινοξέων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και έχει αναφερθεί ότι η γλυκίνη (απουσία παράπλευρης ομάδας) και η προλίνη (ο πλευρικός δακτύλιος βρίσκεται στο επίπεδο της DKP) στις θέσεις αυτές οδηγούν στο σχηματισμό μεγάλων ποσοστών DKP [96]. Επίσης, η ύπαρξη L-και D-αμινοξέων στην αμινοξική αλληλουχία του διπεπτιδίου διευκολύνει το κλείσιμο του εξαμελούς δακτυλίου, λόγω της μικρής στερεοχημικής παρεμπόδισης που επιφέρουν οι πλευρικές τους αλυσίδες [92], δ) Για να αποφευχθούν οι βασικές συνθήκες στην Fmoc/tBu στρατηγική και κατά συνέπεια ο σχηματισμός DKP, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο (TBAF) [97] (αντί της πιπεριδίνης), είτε μειώνοντας τον χρόνο κατεργασίας της πεπτιδορητίνης με το διάλυμα πιπεριδίνης.

4.12.4 ΡΑΚΕΜΟΠΟΙΗΣΗ

Ο κίνδυνος της ρακεμοποίησης υπάρχει σε όλες τις αντιδράσεις που περιλαμβάνουν λειτουργικές ομάδες οι οποίες συνδέονται άμεσα με το στερεογονικό κέντρο ενός α-αμινοξέος (εκτός της γλυκίνης).

Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της πεπτιδικής σύνθεσης διότι οδηγεί σε απώλεια της οπτικής καθαρότητας των συντιθέμενων



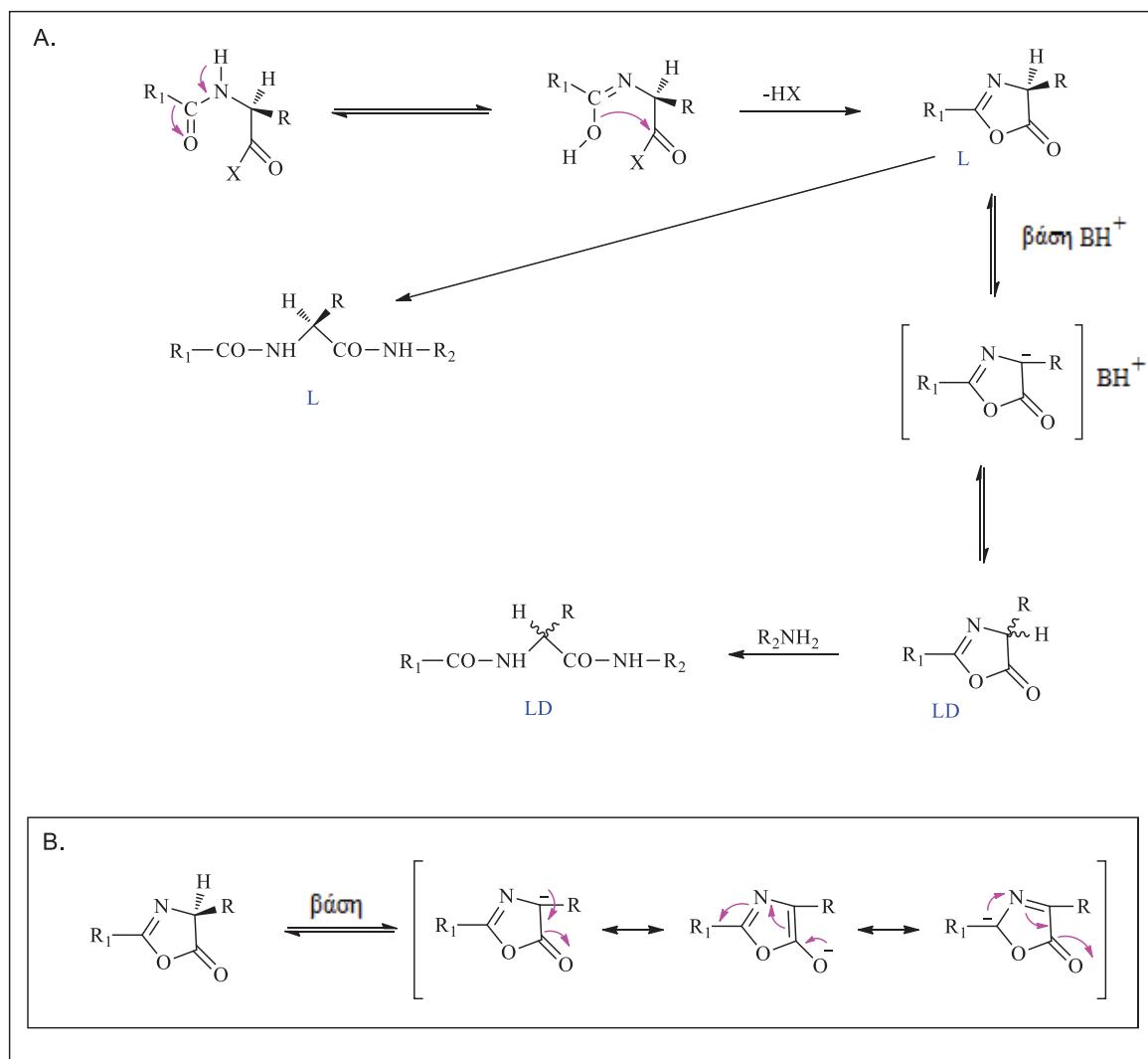
4.30 Η ομάδα X διευκολύνει το σχηματισμό του καρβανιόντος και αυξάνει τον κίνδυνο ρακεμοποίησης. Y: αμινο-προστατευτική ομάδα.

πεπτιδίων, ο διαχωρισμός μίγματος διαστερεομερών είναι δύσκολος και πολλές φορές αδύνατος αλλά και γιατί η βιολογική δράση των πεπτιδίων εξαρτώνται από τη δομή τους. Η ρακεμοποίηση στην SPPS πραγματοποιείται κυρίως στο στάδιο της σύζευξης, κατά την ενεργοποίηση των N^α-προστατευμένων αμινοξέων [98] και συγκεκριμένα όταν η καρβοξυλομάδα αυτών βρίσκεται στην ενεργοποιημένη της μορφή [Y-NHCH(R₁)CO-X]. Η επίδραση της έλξης ηλεκτρονίων της ενεργοποιημένης ομάδας X, εκτείνεται στο άτομο άνθρακα και διευκολύνεται η απόσπαση του H^α πρωτονίου (από μια βάση), με αποτέλεσμα να παρατείνεται ο χρόνος ζωής του καρβανιόντος στο διάλυμα σύζευξης και να αυξάνεται το ποσοστό της ρακεμοποίησης (Σχήμα 4.30).

Αυτό το είδος απλής απόσπασης πρωτονίου, δεν είναι ο μόνος ούτε ο πιο κοινός μηχανισμός ρακεμοποίησης. Ο πιο συχνά παρατηρούμενος μηχανισμός ρακεμοποίησης κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων είναι μέσω σχηματισμού αζλακτόνης [2]. Τα ενεργοποιημένα αμινοξέα σε βασικό περιβάλλον μπορούν να κυκλοποιηθούν δίνοντας αζλακτόνες. Τα κυκλικά αυτά ενδιάμεσα μπορούν είτε να δεχθούν πυρηνόφιλη προσβολή από την ελεύθερη αμινομάδα του αμινοξέος οδηγώντας έτσι στο επιθυμητό προϊόν, είτε να υποστούν απόσπαση πρωτονίου από μια βάση (το καρβοανιόν σταθεροποιείται με μεσομέρεια) και να προκύψει έτσι μίγμα εναντιομερών [99] (Σχήμα 4.31).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα και την έκταση της ρακεμοποίησης είναι διάφοροι. Συγκεκριμένα η ρακεμοποίηση ενισχύεται από: i) την χρήση πολικών διαλυτών [100], ii) την αύξηση της θερμοκρασίας [89], iii) την σύζευξη αμινοξέων όπως His, Ser και Cys [101, 102], iv) την χρήση ισχυρών βάσεων χωρίς στερεοχημική παρεμπόδιση [98], v) από το πόσο ισχυρά ηλεκτρονιοελκτική είναι η ομάδα η οποία ενεργοποιεί το καρβοξύλιο του υπό σύζευξη αμινοξέος, vi) από τον χρόνο ημιζωής του ενεργοποιημένου καρβοξυ-συστατικού κατά το στάδιο της ενεργοποίησης [100]. Θα μπορούσαν να αναφερθούν πάρα

πολλοί τρόποι για την αποφυγή αυτού του σημαντικού προβλήματος, το οποίο όμως δεν αφορά τα πλαίσια της παρούσης εργασίας. Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι, στην πραγματικότητα ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης της ρακεμοποίησης είναι οι στρατηγικές της πεπτιδικής σύνθεσης, που υπαγορεύονται καταρχήν από τις προϋποθέσεις που αφορούν την διατήρηση της οπτικής ομογένειας [2].

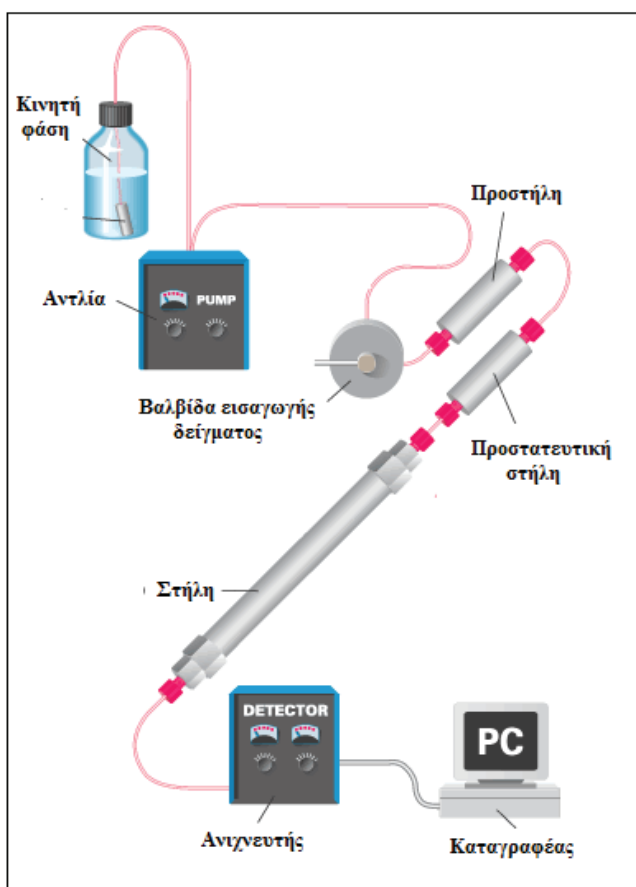


Σχήμα 4.31: Α. Μηχανισμός ρακεμοποίησης μέσω σχηματισμού αζλακτόνης. Β. Σταθεροποίηση του καρβανιόντος που προκύπτει κατά την απόσπαση του H^α πρωτονίου από αζλακτόνη.

4.13. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ & ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

4.13.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (REVERSE PHASE-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, RP-HPLC)

Η Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχει πλέον εδραιωθεί ως η κορυφαία τεχνική για την ανάλυση και τον καθαρισμό διαφόρων και ποικίλων μορίων. Συγκεκριμένα για τον καθαρισμό των συνθετικών πεπτιδίων, η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης [103]. Στηρίζεται στην αρχή της υδροφιλικότητας και λιποφιλικότητας και ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη συνδυαστική δράση μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Η στατική φάση αποτελείται από πολυμερή διοξειδίου του πυριτίου (silica) πάνω στα οποία είναι προσδεδεμένες αλειφατικές αλυσίδες 4, 8 και 18 ατόμων άνθρακα (C4, C8 και C18 αντίστοιχα). Όσο πιο υδρόφοβη είναι η σταθερή φάση (μεγάλη ανθρακική αλυσίδα) τόσο πιο ισχυρά συγκρατούνται οι λιπόφιλες ουσίες. Ενώ η κινητή φάση είναι πολική και αποτελείται από μίγμα διαλυτών που διοχετεύονται συνεχώς στη στατική φάση. Η σύσταση της κινητής φάσης μπορεί να παραμένει σταθερή (ισοκρατικό σύστημα έκλουσης) ή να μεταβάλλεται (βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης). Ο κύριος διαλύτης της κινητής φάσης είναι το νερό χρησιμοποιούνται όμως και οργανικοί διαλύτες όπως η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Το νερό εξαιτίας της πολικότητας του συγκρατεί ισχυρά τα πεπτίδια στη στατική φάση, ενώ οι οργανικοί διαλύτες μειώνουν την πολικότητα με αποτέλεσμα την αποδεσμευσή τους. Η έκλουση των ουσιών που διαχωρίζονται πραγματοποιείται με σειρά μειούμενης πολικότητας (αυξανόμενης υδροφοβικότητας) και αυξάνοντας το πολικό



Σχήμα 4.32: Σχηματική αναπαράσταση ενός τυπικού οργάνου HPLC.

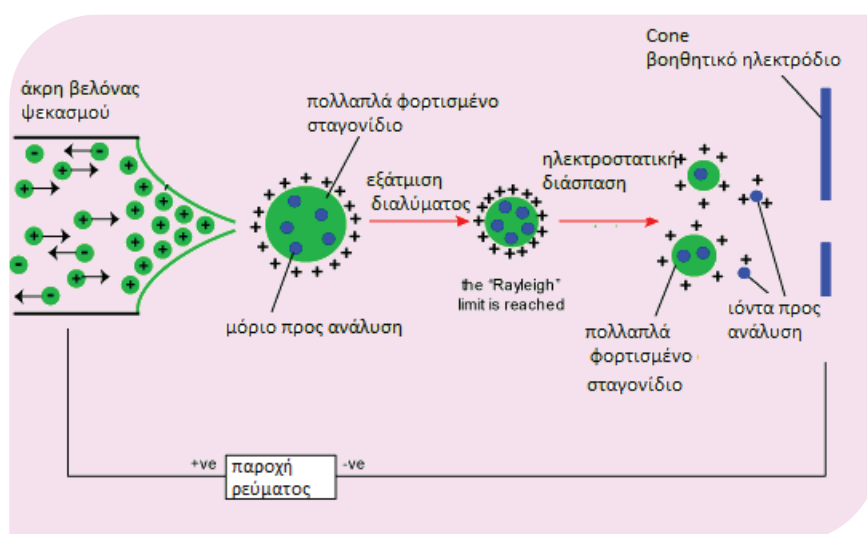
Η έκλουση των ουσιών που διαχωρίζονται πραγματοποιείται με σειρά μειούμενης πολικότητας (αυξανόμενης υδροφοβικότητας) και αυξάνοντας το πολικό

συστατικό της κινητής φάσης αυξάνεται η κατακράτηση των διαλυμένων συστατικών (βαθμιδωτό σύστημα). Στο Σχήμα 4.32 παρουσιάζονται τα τυπικά μέρη ενός οργάνου HPLC.

Για την ανίχνευση των πεπτιδίων χρησιμοποιείται κυρίως ο ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα μήκη κύματος 214-220 nm ενώ στα 254 nm ανιχνεύονται τα αμινοξέα τα οποία φέρουν αρωματικές ομάδες. Από την καταγραφή της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου προκύπτει το χρωματογράφημα το οποίο καταγράφεται στον καταγραφέα. Το εμβαδόν των εκλούμενων κορυφών του χρωματογραφήματος αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση των αντίστοιχων συστατικών του μίγματος.

4.3.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROSCOPY)

Βασική αρχή της μεθόδου είναι η δημιουργία ιόντων, ο διαχωρισμός και η καταγραφή τους με βάση το λόγο της μάζας m προς το φορτίο τους (m/z). Τα βασικά τμήματα από τα οποία αποτελείται ένα φασματόμετρο μάζας είναι τα: α) σύστημα εισαγωγής, β) πηγή ιόντων, γ) αναλυτής μάζας, δ) ανιχνευτής ιόντων (Σχήμα 4.33) [104]. Το δείγμα εισάγεται κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και υφίσταται διαδικασίες που έχουν ως αποτέλεσμα τον ιονισμό του. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι ιονισμού, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Electrospray Ionization (E.S.I.–M.S.) [105], η οποία είναι μια ήπια μέθοδος ιονισμού. Επίσης η τεχνική αυτή πλεονεκτεί έναντι των άλλων τεχνικών διότι δεν παράγει ιόντα από το προς ανάλυση δείγμα, αλλά εξάγει τα ήδη υπάρχοντα ιόντα.



Σχήμα 4.33: Μηχανισμός σχηματισμού ιόντων στο ESI-MS.

Σύμφωνα με τη μέθοδο, το υπό εξέταση δείγμα (διαλυμένο συνήθως σε μίγμα $\text{H}_2\text{O}/0,1\% \text{HCOOH}$ και $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\% \text{HCOOH}$), διέρχεται με χαμηλή ροή (2-10 $\mu\text{l}/\text{min}$) σε ένα τριχοειδή σωλήνα, υφίσταται την επίδραση ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου (εφαρμογή διαφοράς δυναμικού της τάξεως των 3-4 KV) και δημιουργείται νέφος υψηλά φορτισμένων σταγόνων. Στη συνέχεια, μέσω εξάτμισης του διαλύτη, το φορτίο κατανέμεται σε μικρότερη επιφάνεια, διασπάται λόγω απωστικών δυνάμεων και απελευθερώνονται τα φορτισμένα ιόντα. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των ιόντων στον αναλυτή μαζών και αμέσως μετά ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα. Τέλος το σήμα ενισχύεται και καταγράφεται στον καταγραφέα. Για τον υπολογισμό του λόγου M/Z χρησιμοποιείται η εξίσωση $M/Z = (M + nH^+)/n$, όπου M : μοριακή μάζα του δείγματος, n : ο αριθμός των θετικών φορτίων και H^+ : η μάζα του πρωτονίου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ & ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

5.1.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Οι διαλύτες, τα αντιδραστήρια σύζευξης, τα προστατευμένα αμινοξέα καθώς και άλλα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των πεπτιδίων έχουν ως ακολούθως:

5.1.1.1 ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια της σύνθεσης των πεπτιδίων είναι:

- Διχλωρομεθάνιο (*DCM*, >99,9% Fisher Scientific).
- Διμεθυλοφορμαμίδιο (*DMF*, >99,9% Carlo Erba Reagents) για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων κατά τα στάδια των εκπλύσεων της πεπτιδορητίνης. Το διμεθυλοφορμαμίδιο που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις σύζευξης είχε υποστεί μια επιπλέον κατεργασία προκειμένου το *DMF* να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Σύμφωνα μάλιστα με τις προδιαγραφές του *DMF*, το ποσοστό του H_2O είναι μικρότερο ή ίσο του $\leq 0,01\%$, όταν αυτό έχει επεξεργαστεί με *molecular sieves*. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει: παραμονή του *DMF* σε ενεργοποιημένα *molecular sieves* (4 Å) για τουλάχιστον 3 ημέρες, κατόπιν διήθηση για να απομακρυνθούν τα αιωρήματα που δημιουργούνται από τα *molecular sieves* και τέλος φύλαξή του σε σκοτεινό μέρος.
- Τριφθορικό οξύ (*TFA*, 99% Sigma – Aldrich) για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και τη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων.
- Πιπεριδίνη (*Piperidine*, 99% Merck Millipore) για την αποπροστασία της Fmoc-ομάδας.
- Διαιθυλαιθέρας (>99,8% Sigma-Aldrich) για την καταβύθιση του πεπτιδίου μετά την αποκοπή του από τη ρητίνη.
- Εξάνιο (*n-Hexane*, Carlo Erba Reagents) που χρησιμοποιείται κατά την απομάκρυνση του τριφθορικού οξέος σε περιστροφικό εξατμιστήρα.
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN , > 99,9% LAB-SCAN) κατά τον καθαρισμό των πεπτιδίων.
- Μεθανόλη (CH_3OH , >99.9% Merck Millipore) κατά τον καθαρισμό των πεπτιδίων.
- Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (*TIS*, 99% Sigma-Aldrich) ως μόριο ‘παγίδα’ για τη δέσμευση των καρβοκατιόντων που προκύπτουν κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη.

- Αιθανοδιθειόλη (*EDT*, 98% Fluka Chemie AG) για την προστασία της σουλφιδρυλομάδας της μεθειονίνης από την οξείδωση.
- Οξικός ανυδρίτης (*Ac₂O*, 99% Merk Millipore) για την ακετυλίωση των ελεύθερων υδοξυλομάδων και αμινομάδων.

Και τέλος:

- ✓ Νιτυδρίνη (*C₉H₆O₄*, Sigma-Aldrich),
- ✓ Κυανιούχο κάλιο, (*KCN*, Fluka Chemie AG),
- ✓ Αιθανόλη (*C₂H₆O*, Fiscer Scientific),
- ✓ Φαινόλη (*C₆H₆O*, Riedel-de Haen) και
- ✓ Πυριδίνη (*C₅H₅N*, Lab-Scan Analytical) ως αντιδραστήρια για την παρασκευή του διαλύματος του Test Kaiser, το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των μη συζευγμένων αμινομάδων.

5.1.1.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ

- ✓ Διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (*DIC*, Fluka).
- ✓ Βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφθοροφωσφορικό άλας, (*HBTU*, G.L. Biochem).
- ✓ 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (*HOBt*, G.L. Biochem), ως βοηθητικό πυρηνόφιλο στις αντιδράσεις σύζευξης.
- ✓ Διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη (*DIEA*, Merck Millipore) ως τριτοταγής βάση, όταν αντίδραση σύζευξης γίνεται παρουσία φωσφονικών / ουρονικών αλάτων,

5.1.1.3 ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΜΕΝΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Τα Fmoc-προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των παραπάνω πεπτιδίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1 και προέρχονται από την εταιρία G.L. Biochem, Shanghai, China.

Πίνακας 5.1: Fmoc-προστατευμένα αμινοξέα

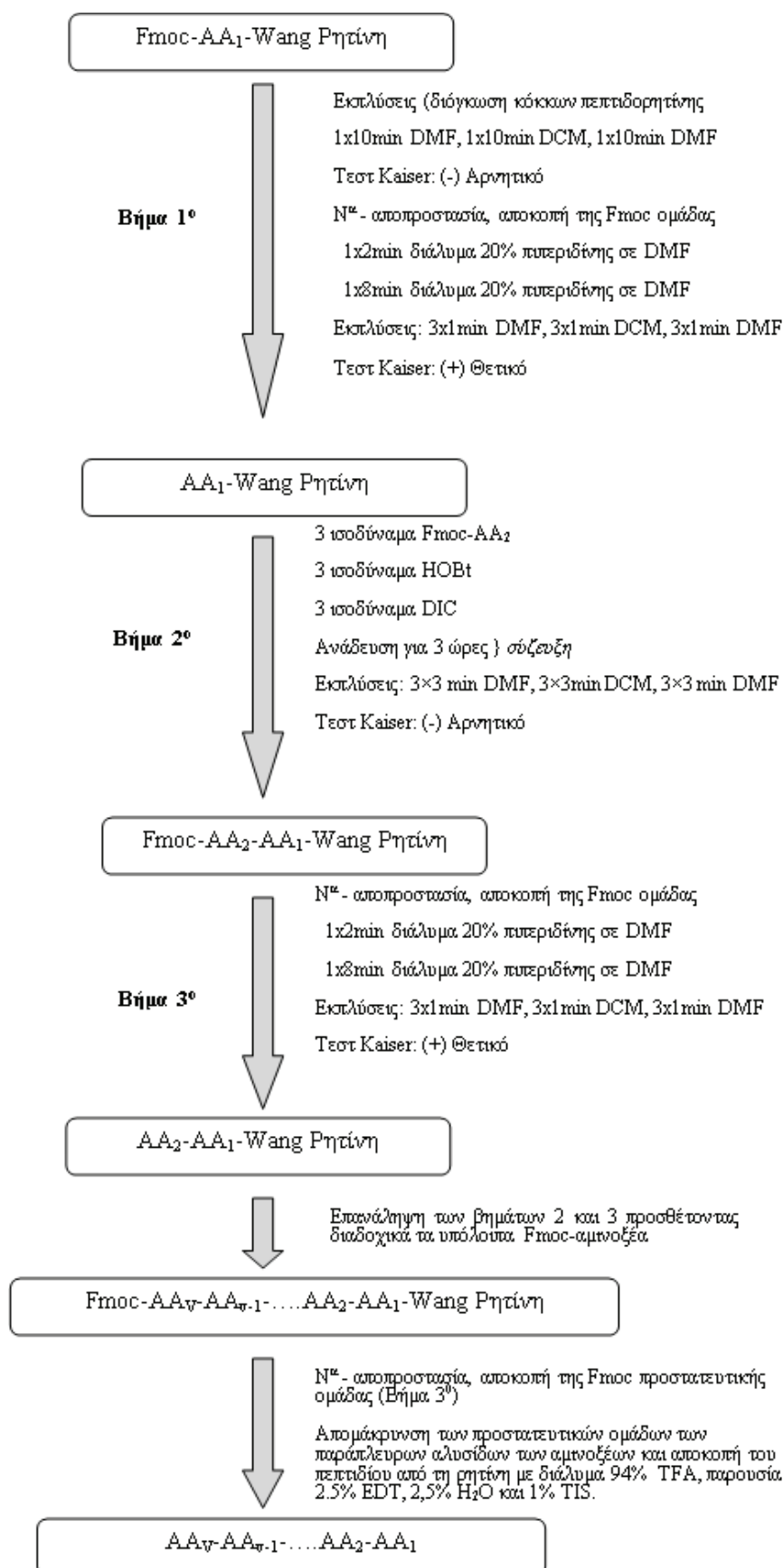
Fmoc-Met-OH	Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Fmoc-Phe-OH
Fmoc-Glu(otBu)-OH	Fmoc-His(Trt)-OH
Fmoc-Set(tBu)-OH	Fmoc-Asp(otBu)-OH
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Ala-OH

5.1.2 ΓΕΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Ως πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η Wang {p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-} ρητίνη (Neosystem), στην οποία ήταν ήδη συνδεδεμένο το 1^ο αμινοξύ. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ρητίνες :

- Fmoc-Arg(Pmc)-Wang Resin
- Fmoc-His(Trt)-Wang Resin
- Fmoc-Lys(Boc)-Wang Resin

Στο Σχήμα 5.1 παρουσιάζεται σχηματικά η γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με την Fmoc/tBu μεθοδολογία.



Σχήμα 5.1: Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με την Fmoc/tBu μεθοδολογία.

5.1.2.1 ΣΥΖΕΥΞΗ AMINOΞΕΩΝ

Η σύζευξη των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) παρουσία 1-υδροξυβενζοτρίαζολίου (HOBt), σε μοριακή αναλογία αμινοξύ/HOBt/DIC/ρητίνη : 3/3/3/1. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα DCM και DMF σε αναλογία 1:1 (v/v). Το DMF που χρησιμοποιήθηκε κατά τη σύζευξη είχε παραμείνει για τουλάχιστον 3 ημέρες σε ενεργοποιημένα molecular sieves (4 Å), προκειμένου να δεσμευτούν οι επιβλαβείς αμίνες που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της φωτοδιάσπασής του. Το HOBt, ως βοηθητικό πυρηνόφιλο χρησιμοποιείται επειδή συμβάλλει στη δημιουργία ενός ισχυρού και δραστικού ακυλιωτικού μέσου και ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο ρακεμοποίησης. Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε συγκεκριμένα είχε ως εξής: αρχικά το Fmoc-προστατευόμενο αμινοξύ και το βοηθητικό πυρηνόφιλο HOBt διαλύθηκαν σε μίγμα 1:1 DMF/DCM. Στη συνέχεια προστέθηκε το αντιδραστήριο σύζευξης DIC και αφέθηκε για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 min. Τέλος το διάλυμα σύζευξης προστέθηκε στη πεπτιδορητίνη και η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 3-4 h. Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης της σύζευξης πραγματοποιήθηκε με test Kaiser (αρνητικό(-) test Kaiser). Για τις εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες το DMF και το DCM (Σχήμα 5.1).

Στις περιπτώσεις όπου η αντίδραση σύζευξης δεν ήταν επιτυχής με το αντιδραστήριο διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο, γινόταν επανάληψη της αντίδρασης (όπου κρινόταν απαραίτητο) χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης το βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλοουρονικό εξαφθορο φωσφορικό άλας (HBTU) παρουσία HOBt και DIEA (διϊσοπροπυλ αιθυλαμίνη), σε μοριακή αναλογία αμινοξύ/HBTU/HOBt/DIEA/ρητίνη:1/1/1/3/1 (διότι ήταν επανάληψη του αμινοξέος). Η παρουσία της DIEA κρίνεται απαραίτητη τόσο για την αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας του Fmoc-προστατευμένου αμινοξέος όσο και για τον ιονισμό του HOBt. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν DMF (απαλλαγμένο από επιβλαβείς αμίνες) και DCM. Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής: αρχικά το Fmoc-προστατευόμενο αμινοξύ μαζί με το αντιδραστήριο σύζευξης (HBTU) και το βοηθητικό πυρηνόφιλο (HOBt) διαλύονται σε μίγμα DCM/DMF. Η διαλυτότητα του παραπάνω μίγματος βελτιώνεται αισθητά με την προσθήκη της τριτοταγούς βάσης (DIEA) στο διάλυμα της αντίδρασης. Στη συνέχεια, το διάλυμα της σύζευξης αφήνεται υπό ανάδευση για 3-5 min και στη συνέχεια προστίθεται στη πεπτιδορητίνη. Η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα σε 2h περίπου. Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης της σύζευξης

πραγματοποιήθηκε με test Kaiser (αρνητικό(-) test Kaiser). Για τις εκπλύσεις της πεπτιδορηνίνης χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες το DMF και το DCM.

5.1.2.2 ΠΡΟΣΤΑΣΙΕΣ ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΝ ΤΩΝ FMOC ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΜΕΝΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα με τις δραστικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων τους προστατευμένες με κατάλληλες ομάδες (Κεφάλαιο 5.1.1.3). Συγκεκριμένα για την προστασία της γουανιδομάδας της αργινίνης επιλέχθηκαν οι ομάδες Pbf και Pmc, οι οποίες απομακρύνονται με διάλυμα 90% TFA. Για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της λυσίνης, χρησιμοποιήθηκε η Boc ομάδα, η οποία απομακρύνεται με 95% TFA στο τέλος της σύνθεσης. Για την προστασία της υδροξυλομάδας των υδροξυ-αμινοξέων (σερίνης και τυροσίνης) χρησιμοποιήθηκε η tBu ομάδα, η οποία απομακρύνεται σε ήπια όξινες συνθήκες (60% TFA). Το ασπαρτικό και το γλουταμινικό οξύ εισήχθησαν στην πεπτιδική αλυσίδα με προστατευμένη την καρβοξυλομάδα της παράπλευρης αλυσίδας τους από την OtBu ομάδα, η οποία απομακρύνεται εύκολα με 95% TFA. Τέλος για την προστασία του ιμιδαζολικού δακτυλίου της παράπλευρης αλυσίδας της ιστιδίνης επιλέχθηκε η Trt ομάδα, η οποία είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική έναντι της ρακεμοποίησης, ενώ ταυτόχρονα είναι σταθερή στις συνθήκες σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού.

5.1.2.3 ΑΠΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ N^α ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΟΜΑΔΑΣ

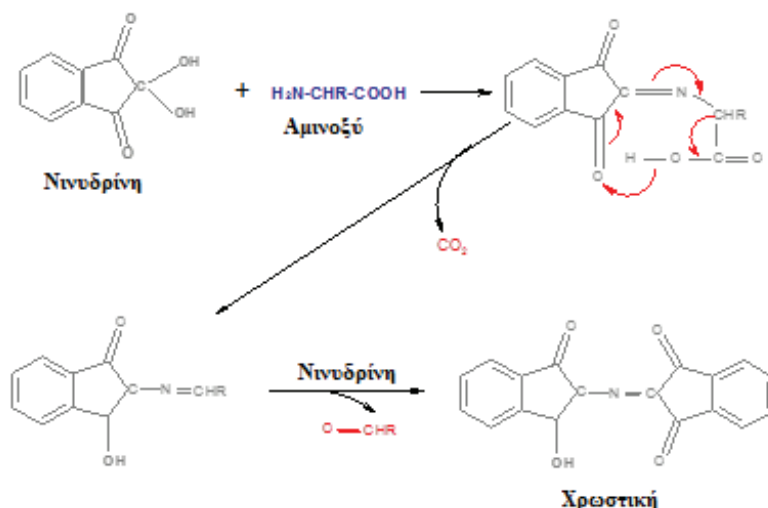
Η αποπροστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων από την Fmoc ομάδα πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορηνίνης με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε διμεθυλοφορμαμίδιο. Αρχικά λαμβάνει χώρα η απομάκρυνση του μεγαλύτερου ποσοστού των καρβοκατιόντων που σχηματίζονται (1x2min), ενώ στη συνέχεια ποσοτική απομάκρυνση της Fmoc ομάδας (1x8min). Αφού γίνει η απομάκρυνση των παραπροϊόντων με τους κατάλληλους διαλύτες (DMF, DCM, DMF), η αποπροστασία της αμινομάδας διαπιστώθηκε με test Kaiser [1, 2].

5.1.2.4 TEST KAISER

Η ολοκλήρωση της αντίδρασης σύζευξης και της αποπροστασίας της N^α-αμινομάδας πιστοποιούνται κάθε φορά με το Test Kaiser [2], το οποίο είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη δοκιμή για την ανίχνευση ελεύθερων αμινομάδων. Το test Kaiser βασίζεται στην αντίδραση της νινυδρίνης με πρωτοταγείς αμίνες η οποία δίνει μια κυανοϊώδη χρωστική (Σχήμα 5.2). Πραγματοποιείται σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα με την προσθήκη μερικών κόκκων πεπτιδορηνίνης και τριών σταγόνων από καθένα από τα παρακάτω διαλύματα:

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

Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται σε υδρόλουτρο των 100° C για 30 sec. Εμφάνιση μπλε κόκκων πιστοποιεί την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων (θετικό (+) test Kaiser). Στην περίπτωση που οι κόκκοι παραμένουν λευκοί (αρνητικό (-) test Kaiser) πιστοποιείται ότι η σύζευξη του αμινοξέος έχει ολοκληρωθεί και δεν υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες στην πεπτιδορηνίνη, γεγονός που μας επιτρέπει να προχωρήσουμε στη σύζευξη του επόμενου αμινοξέος. Η ακρίβεια του test Kaiser κυμαίνεται στο 99,9%.



Σχήμα 5.2: Αντίδραση νινυδρίνης

5.1.2.5 ΑΠΟΚΟΠΗ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΡΗΤΙΝΗ

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των υπόλοιπων προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με τριφθορικό οξύ (TFA) παρουσία απεσταγμένου H₂O, αιθανοδιθειόλη (EDT) και τριϊσοπροπυλοσιλανίου (TIS) ως μόρια παγίδες για τα καρβοκατιόντα. Το EDT προστίθεται στο διάλυμα αποκοπής για την αποφυγή της οξείδωσης της Met. Τα παραπάνω αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν με τις εξής αναλογίες: 94% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% EDT και 1% TIS. Η πεπτιδορητίνη και το διάλυμα αποκοπής μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη και αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3h σε θερμοκρασία δωματίου. Η διάρκεια της αντίδρασης αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη ποικίλει ανάλογα με τα αμινοξέα του πεπτιδικού αναλόγου. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν το πεπτιδικό ανάλογο περιέχει αργινίνη τότε η αντίδραση παρατείνεται 1h επιπλέον για κάθε αμινοξικό κατάλοιπο αργινίνης, ώστε να απομακρυνθεί η προστατευτική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της. Μετά το τέλος της αντίδρασης αποκοπής, η ρητίνη διηθήθηκε και το TFA εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα ενώ στο υπόλειμμα προστέθηκε διάλυμα DCM:εξάνιο (1:1) και συμπυκνώθηκε εκ νέου. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις ή τέσσερις φορές με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του TFA. Στη συνέχεια, τα πεπτίδια καταβυθίστηκαν με την προσθήκη παγωμένου διαιθυλαιθέρα. Ακολούθησε διήθηση και κατεργασία με αιθέρα για την απομάκρυνση των μορίων-παγίδων (scavenger) που χρησιμοποιήθηκαν. Τα πεπτίδια παραλείφθηκαν σε υδατικό διάλυμα με διάλυση σε οξικό οξύ 2N και στη συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν.

5.1.2.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ & ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ

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

- Υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας RP-HPLC (Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography)
- Ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, (Shimadzu, Liquid Chromatograph, LC-10 AD Pump, SPD-10A UV-VIS Detector) και (Waters PrepLC 4000 System)
- Παρασκευαστική RP-HPLC, (Shimadzu, Preparative Liquid Chromatograph, LC-8A Pump, SPD-M20A Diode Array Detector, με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10AF)
- Αναλυτική RP-HPLC, (Agilent 1200, Quaternary Pump, Diode Array Detector)

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

Για τον καθαρισμό των πεπτιδίων με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες Supelco, Discovery C₁₈ 25cm x 10mm, 5μm και Interchrom C₁₈, 25cm x 7,8mm, 5μm ενώ στην περίπτωση καθαρισμού των πεπτιδίων με παρασκευαστική RP-HPLC ως σταθερή φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη Supelco C₁₈, 25cm x 21,2mm, 10μm. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, Χρόνος έκλουσης 30 min, Βαθμίδωση διαλυτών γραμμική, Ανίχνευση στα 214 nm, Ταχύτητα ροής 4,7 ml/min ή 3 ml/min (για ημιπαρασκευαστική RP-HPLC) και 20 ml/min (για παρασκευαστική RP-HPLC) αντίστοιχα.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε η στήλη Agilent, Eclipse XDB-C₁₈, 4,6 x 150mm, 5μm για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών για το σύστημα έκλουσης αλλά και για τον έλεγχο της καθαρότητας των πεπτιδίων. Το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για το χρωματογράφημα της αναλυτικής ήταν: (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 min. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική, ενώ η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στο 1 ml/min και η ανίχνευση έγινε στα 214 nm.

5.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ

Τα πειράματα διαμορφωτικής προσομοίωσης πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα ICM-Pro v.3.7-2a (www.molsoft.com). Αναλύθηκαν όλες οι σχετικές και διαθέσιμες βιβλιογραφικά δομές της ιντεγκρίνης. Χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός υπέρθεσης και μοντελοποίησης ώστε να δημιουργηθούν ατομικά μοντέλα ιντεγκρίνης σε μη υπαρκτές διαμορφώσεις, υποθέτοντας ότι τα κοντινά μέλη της οικογένειας των ιντεγκρινών υιοθετούν ανάλογης κλίμακας διαμορφωτικές κινήσεις. Η υπέρθεση πραγματοποιήθηκε αρχικά για τις περιοχές που σχηματίζουν η κεφαλή της ιντεγκρίνης με τα αντίστοιχα άτομα από ομόλογα ή και πανομοιότυπες περιοχές. Ακολούθησε ενεργειακή ελαχιστοποίηση επιβάλλοντας οι γωνίες στρέψης φ και ψ των αμινοξικών καταλοίπων να λάβουν τιμές στις επιτρεπόμενες τροχές. Στη συνέχεια έγινε ενεργειακή ελαχιστοποίηση συμπεριλαμβάνοντας και τις πλευρικές αλυσίδες.

5.3 ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ CHO (CHINESE HAMSTER OVARY) ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΥΠΟ ΡΟΗ

5.3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNAs ΜΟΡΙΩΝ, ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΤΑΘΕΡΩΝ CHO ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ

Τα cDNAs μόρια που κωδικοποιούν τις μεταλλάξεις αIbR317A/D319A/R320A (αIb_{3M}) και β3K384A (β3_{1M}) δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο μετάλλαξης Quikchange κατευθυνόμενης μεταλλαξιογένεσης (Quikchange site-directed, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Τα pcDNA3.1(-)Zeo-β₃wt και pcDNA3.1(-)Neo-αIbwt χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία. Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των μεταλλαγμάτων πιστοποιήθηκε με αυτοματοποιημένο έλεγχο της αλληλούχησης. Η επιμόλυνση των CHO κυττάρων (κυτταρική σειρά CRL 9096, American Type Culture Collection, Rockville, MD) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο lipofectAMINE (Life Technologies Europe B.V, Gent Belgium) [3]. Τα επιμολυσμένα κύτταρα ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την επιφανειακή έκφραση του ανασυνδιασμένου μεταλλαγμένου αIbβ₃ συμπλέγματος με τη χρήση του αντισώματος mAb Pl2-73 (προσφορά της Dr Cécile Kaplan, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France). Οι τελικοί κλώνοι επιλέχθηκαν με βάση την επιφανειακή έκφραση του μεταλλαγμένου υποδοχέα, ανάλογη με τους κλώνους του άγριου τύπου.

5.3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ CHO ΚΥΤΤΑΡΩΝ

5.3.2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΥΛΙΚΑ, ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ & ΟΡΓΑΝΑ

Τα αντιδραστήρια, υλικά, διαλύματα εργασίας και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα της καλλιέργειας και απομόνωσης των CHO κυττάρων έχουν ως εξής:

Αντιδραστήρια-Όργανα

- IMDM Glutamax (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), GIBCO, ως θρεπτικό μέσο.
- 10% ορός αίματος βόειου εμβρύου (Fetal Bovine Serum, FBS), GIBCO, ως συμπλήρωμα πρωτεϊνών και αναπτυξιακών παραγόντων
- Μίγμα αντιβιοτικών (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη) για την αποφυγή μικροβιακών μολύνσεων
- 200mM L-γλουταμίνη (GIBCO)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-Buffered Saline) απουσία ιόντων Ca²⁺, Mg²⁺, Dulbecco's Biowhittaker, Walkersville, MD, για τις εκπλύσεις

- Διμεθυλοσουλφοξείδιο, DMSO (Dimethyl sulfoxide), Sigma-Aldrich, για το πάγωμα των κυττάρων
- EDTA, GIBCO, για την αποκόλληση των κυττάρων
- Μπλε τρυπανίου (trypan blue), GIBCO, για τη μέτρηση των κυττάρων
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), GIBCO, για τον προσδιορισμό της έκφρασης της ιντεγκρίνης
- Αντισώματα, CD41a-PE και IgG, Becton Dickinson, για τον προσδιορισμό της έκφρασης της ιντεγκρίνης
- Φυσιολογικός ορός
- Ινωδογόνο, GIBCO
- T75 φλάσκες (75m²)
- Κρυοφιαλίδια (2 ml)
- Αποστειρωμένα σιφόνια (Costar, Corning Incorporated)
- Αιμοκυτταρόμετρο malassez
- Κλίβανος επώασης 37 °C και 5% CO₂ (NUAIRE)
- Θάλαμος νηματοειδούς ροής
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος, Heraeus Multifuge 3SR Plus
- Κυτταρόμετρο ροής Becton Dickinson FACSort

Διαλύματα

- IMDM Glutamax με αντιβιοτικό: Στα 500 ml εμπορικά διαθέσιμου IMDM προστίθενται κατά το άνοιγμά του 5 ml πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό μέσο κυττάρων: 178 ml IMDM Glutamax, 20ml FBS και 2ml L-γλουταμίνης
- Διάλυμα PBS (1X): 100 ml PBS (10X) διαλύονται σε 900 ml φυσιολογικού ορού
- Διάλυμα 0,5mM EDTA σε PBS 1X
- Διάλυμα για την ψύξη των κυττάρων (Freezing media): 90% FBS και 10% DMSO
- Διάλυμα HCL/EtO (1:1, v/v), για τον καθαρισμό των καλυπτρίδων
- Διάλυμα ινωδογόνου αρχικής συγκέντρωσης 5mg/ml σε φιλτραρισμένο TBS 1X (TRIS-HCL 20mM, NaCl 150 mM, Ph=7,4). Αραίωση με TBS 1X ώστε να προκύψει διάλυμα 10 µg/ml

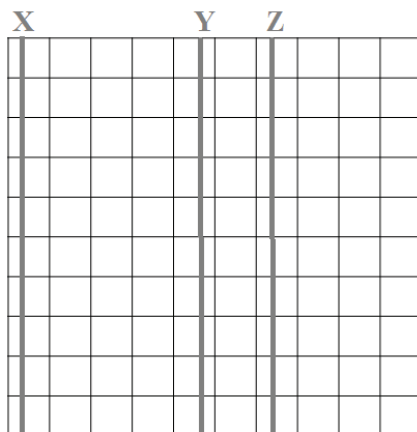
5.3.2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ CHO ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Όταν η πυκνότητα ενός δοχείου καλλιέργειας κυττάρων προσεγγίζει το 90-100% πρέπει να απομακρυνθούν τουλάχιστον τα μισά κύτταρα για μην υπάρξει αναστολή της ανάπτυξης τους και θάνατος. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε φορά που οι φλάσκες έχουν μεγάλο αριθμό κυττάρων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

1. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από τη T75 φλάσκα.
2. Εκπλύσεις με προθερμασμένο PBS 1X (2 φορές).
3. Προσθήκη 3 ml διαλύματος EDTA (0,5mM σε PBS 1X).
4. Τοποθέτηση της φλάσκας στο θάλαμο επώασης (37 °C) για 6-7 min.
5. Ήπιο χτύπημα στον πάτο της φλάσκας για την αποκόλληση των κυττάρων και επιβεβαίωση με το μικροσκόπιο.
6. Προσθήκη διαλύματος 7 ml PBS 1X και μεταφορά του διαλύματος σε σωληνάριο τύπου Falcon.
7. Μέτρηση των κυττάρων, όπως περιγράφεται παρακάτω.
8. Φυγοκέντρηση στις 1100 rpm για 5 min.
9. Απόγχυση του υπερκειμένου και επαναιώρηση στον επιθυμητό όγκο με το θρεπτικό μέσο. Αν για παράδειγμα επιθυμούμε τα κύτταρα να αναπαραχθούν σε 3 μέρες, προσθέτουμε 1ml (4×10^5 κύτταρα/ml) σε νέα T75 φλάσκα και προσθέτουμε 14 ml με θρεπτικό μέσο.
10. Τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο επώασης για να αναπαραχθούν.

Μέτρηση Κυττάρων

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων και την αναδιασπορά τους σε PBS 1X, παίρνουμε 10 μl και προσθέτουμε 90 μl μπλε της θρυψίνης. Το διάλυμα ομογενοποιείται και στη συνέχεια παίρνουμε 10 μl και τα τοποθετούμε κάτω από την καλυπτρίδα του αιμοκυτταρόμετρου malassez. Μετράμε τα κύτταρα που βρίσκονται στις 3 κατακόρυφες στήλες και ο αριθμός τους προκύπτει από την εξίσωση: $(X+Y+Z)/3 \times 10.000 \times V_{\text{κυττάρων}}$



Σχήμα 5.4: Αιμοκυτταρόμετρο malassez.

5.3.2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΨΥΞΗΣ CHO ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΥΓΡΟ ΑΖΩΤΟ

Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο ή στους -130°C . Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

1. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από την T75 φλάσκα.
2. Εκπλύσεις με προθερμασμένο PBS 1X (2 φορές).
3. Προσθήκη 3 ml διαλύματος EDTA (0,5mM σε PBS 1X).
4. Τοποθέτηση της φλάσκας στο θάλαμο επώασης (37°C) για 6-7 min.
5. Ήπιο χτύπημα στον πάτο της φλάσκας για την αποκόλληση των κυττάρων και επιβεβαίωση με το μικροσκόπιο.
6. Προσθήκη διαλύματος 7 ml PBS 1X και μεταφορά του διαλύματος σε σωληνάριο τύπου Falcon.
7. Φυγοκέντρηση στις 1100 rpm για 5 min.
8. Απόγχυση του υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος ψύξης (Freezing media).
9. Μεταφορά των κυττάρων σε κρυοφιαλίδια των 2 ml.
10. Τοποθέτηση των κρυοφιαλιδίων στους -20°C για 1h.
11. Μεταφορά των κρυοφιαλιδίων στους -80°C over night.
12. Αποθήκευση των κυττάρων σε υγρό άζωτο στους -130°C .

5.3.2.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΔΙΑΣΠΟΡΑΣ CHO ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΨΥΞΗ ΑΠΟ ΥΓΡΟ ΑΖΩΤΟ

1. Παραλαβή του κρυοφιαλιδίου από το υγρό άζωτο και τοποθέτηση του σε υδατόλουτρο στους 37°C.
2. Όταν τα κύτταρα ξεπαγώσουν, μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου Falcon και προστίθενται περίπου 15 ml διαλύματος ψύξης (Freezing media).
3. Αναδιασπορά των κυττάρων και φυγοκέντρωση στις 1100 rpm για 5 min.
4. Απομάκρυνση του διαλύματος και επαναδιασπορά των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο σε φλάσκα T75.
5. Τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο επώασης για να αναπαραχθούν.

5.3.2.5 ΠΡΟΣΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ $\alpha\text{IIb}\beta 3$ στα CHO ΚΥΤΤΑΡΑ

1. Ανακαλλιέργεια των κυττάρων όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.3.2.2.
2. Μετά την φυγοκέντρωση των κυττάρων και τη μέτρηση τους, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος HBSS έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι 2×10^6 κύτταρα/ml.
3. Μεταφέρονται σε σωληνάκια Becton-Dickinson 62,5μl κύτταρα, 62,5μl HBSS και 5μl αντισώματος.
4. Επώαση για 20 min στους 4°C στο σκοτάδι.
5. Φυγοκέντρωση στις 1100 rpm για 5 min.
6. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
7. Έκπλυση κυττάρων με 300 μl HBSS.
8. Φυγοκέντρωση στις 1100 rpm για 5 min.
9. Επαναιώρηση με 350 μl HBSS Ανάλυση στο κυτταρόμετρο ροής.
10. Η απορρόφηση του δείγματος πραγματοποιείται με χαμηλή ροή ($12 \mu\text{l} \pm 3 \mu\text{l}/\text{min}$).

5.3.2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ CHO ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΥΠΟ ΡΟΗ

Η πειραματική πορεία έχει ως εξής:

1. Καθαρισμός των γυάλινων καλυπτρίδων στο θάλαμο νηματοειδούς ροής υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε διάλυμα HCL/EtOH για 20 min και στη συνέχεια ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό.

2. Επίστρωση των καλυπτρίδων με 1 ml διαλύματος ινωδογόνου, επώαση στους 37°C για 2h ή στους 4°C για 12 h. Κατά τη διάρκεια της επώασης, οι καλυπτρίδες φυλάσσονται σε ειδικά πλαστικά κουτιά σε περιβάλλον υγρασίας.
3. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σύμφωνα με τη πειραματική διαδικασία του Κεφαλαίου 5.3.2.2. Η τελική συγκέντρωση των κυττάρων καθορίζεται $1,2 \times 10^6$ κύτταρα/ml και η αναδιασπορά πραγματοποιείται με IMDM χωρίς την προσθήκη FBS.
4. Η γυάλινη καλυπτρίδα τοποθετείται σε κανάλι έγχυσης (πάχους 200μM) μαζί με θρεπτικό μέσο IMDM, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες.
5. Το διάλυμα των κυττάρων εκχύνεται στο κανάλι έγχυσης με ρυθμό έγχυσης από 30 s^{-1} (60 μl/min ταχύτητα διάτμισης).
6. Τα κύτταρα οπτικοποιούνται με φακό αντίθεσης 10x Hoffman Modulation μαζί με αναστραμμένο μικροσκόπιο. Οι εικόνες καταγράφονται σε πραγματικό χρόνο για 12 min με ενσωματωμένη φωτογραφική μηχανή. Ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων υπολογίστηκε με τη βοήθεια των λογισμικού Histolab και Archimed.
7. Ο υπολογισμός της % αναστολής της προσκόλλησης πραγματοποιείται με τον τύπο:
[Προσκολλημένα κύτταρα (χωρίς αναστολέα) - Προσκολλημένα κύτταρα (με αναστολέα) / Προσκολλημένα κύτταρα (χωρίς αναστολέα)] $\times 100$.

5.4 ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΙΑ

5.4.1 ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΙΑΣ

Η συσσωρευομετρία βάσει της νεφελομετρικής μεθόδου κατά Born, βασίζεται στην αρχή ότι η οπτική πυκνότητα ενός εναιωρήματος σωματιδίων εξαρτάται από τον αριθμό των σωματιδίων και όχι από το μέγεθος τους [4]. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία ενός εξωγενώς προστιθέμενου αγωνιστή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων, η οποία μετριέται με ειδικό νεφελόμετρο, το συσσωρευόμετρο.

5.4.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΥΛΙΚΑ, ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ & ΟΡΓΑΝΑ

Τα αντιδραστήρια, υλικά, διαλύματα εργασίας και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια ανθρώπου (platelet rich plasma, PRP) και σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου έχουν ως εξής:

Αντιδραστήρια-Υλικά-Όργανα

- Απυράση (Sigma)
- PGE₁ (Προσταγλανδίνη E₁, Sigma)
- Απόλυτη Αιθανόλη (Riedel de Haën)
- HEPES (C₁₈H₁₈N₂O₄S, M.B. 238.31 g/mol, Sigma)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl, M.B. 74.56 g/mol, Sigma)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃, M.B. 84.01 g/mol, Fluka-Garanite)
- Εξαένδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂•6H₂O, M.B. 203.31 g/mol, Sigma)
- Ένυδρο διςόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH₂PO₄•H₂O, M.B. 137.99 g/mol, Merck)
- Γλυκόζη (D (+) C₆H₁₂O₆, MB : 180.16 gr/mole, Fluka)
- Διένυδρο κιτρικό νάτριο (C₆H₅Na₃O₇•2H₂O, MB : 294.1 g/mol, Merck)
- Ένυδρο κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇•H₂O, MB : 210 g/mol)
- Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂•2H₂O, MB: 147 g/mol, Sigma)
- Χλωριούχο ασβέστιο CaCl₂ (M.B. 110.99 g/mol, Merck)
- Διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH)
- Οξαλικό αμμώνιο ((NH₄)₂C₂O₄•H₂O, MB: 142.11 g/mol, Mallinckrod)
- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z320)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, MB: 58.44 g/mol, Merck)
- Θρομβίνη (Thrombin, Sigma)
- ADP Adenosine diphosphate, Sigma
- Κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇, M.B.:192.13 g/mol, Merck)
- Κιτρικό νάτριο (C₆H₅Na₃O₇•H₂O, M.B.:294.10 g/mol, Merck)
- D(+) Γλυκόζη (HOCH₂CH(CHOH)₄O, M.B.:180.16 g/mol, Fluka)
- Φυσιολογικός Ορός (0.9 %) (0.9% Sodium chloride NaCl, Fresenius Kobi)
- Διμέθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide, DMSO, (CH₃)₂SO, MB : 78.13, Ferak Berlin)
- Πεπτίδιο RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser, C₁₅H₂₇H₇O₈, MB: 433.4 g/mol, 5mg Sigma)
- Συσσωρευόμετρο (Whole blood Lumi – Aggregometer, model 700-4DR, Chrono – Log και PAP-8E Biodata)
- Καταγραφικό (Aggrolink, Chrono – Log)

Διαλύματα Εργασίας

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD).** Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Συγκεκριμένα 0.8 g κιτρικού οξέος, 2.2 g κιτρικού νατρίου και 2,5 g D(+) γλυκόζης διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα απυράσης:** 500 Units (μονάδες ενζυμικής δράσης) της απυράσης διαλύονται σε 5 ml φυσιολογικού ορού. Η απυράση είναι μία φωσφατάση (adenosine 5'-triphosphatase και adenosine 5'-diphosphatase) η οποία μετατρέπει το απελευθερωμένο από τα αιμοπετάλια ADP σε ανενεργό AMP [359] σύμφωνα με την αντίδραση:



Η δράση της απυράσης επιτυγχάνεται σε τελική συγκέντρωση 1 Unit/ml. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -80°C.

- **Διάλυμα προσταγλανδίνης E₁ (PGE₁):** 5 mgr προσταγλανδίνης E₁ διαλύονται σε 5 ml αιθανόλη. Η PGE₁ ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (AC) οδηγώντας σε αύξηση των επιπέδων του κυκλικού AMP (cAMP) και στην αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -80°C.
- **Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου 1 % βάρος κατ' όγκο (w/v):** Το οξαλικό αμμώνιο διαλύεται στο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C. Το οξαλικό αμμώνιο βοηθάει στη λύση τυχόν υπαρχόντων ερυθροκυττάρων. Χρησιμεύει στη μέτρηση των αιμοπεταλίων.
- **Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου:** Φτιάχνουμε διάλυμα CaCl₂ συγκέντρωσης 1M. Η διάλυση της ουσίας γίνεται σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- **Διάλυμα έκπλυσης αιμοπεταλίων (pH 6.5) 10X:** Το διάλυμα αυτό περιέχει: 6 % w/v χλωριούχο νάτριο (NaCl), 0.373 % w/v χλωριούχο κάλιο (KCl), 0.9 % w/v γλυκόζη (C₆H₁₂O₆), 7.56 % w/v ένυδρο κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇·H₂O), 0.294 % w/v ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂·2H₂O) και 0.203 % w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂·6H₂O). Οι ουσίες διαλύονται σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 ml και αποθηκεύεται στους -20°C.
- **Διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων (pH 7.35) 10X:** Το διάλυμα αυτό περιέχει: 8.18 % w/v χλωριούχο νάτριο (NaCl), 0.22 % w/v χλωριούχο κάλιο (KCl), 1.8 % w/v γλυκόζη (C₆H₁₂O₆), 0.1 % w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂·6H₂O), 2.38 % w/v HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S), και 0.42 % w/v όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃). Οι ουσίες

διαλύονται σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 ml και αποθηκεύεται στους -20°C .

- Οι παραπάνω συγκεντρώσεις για τα διαλύματα έκπλυσης και εναιώρησης των αιμοπεταλίων είναι δεκαπλάσιες (10X) από αυτές που χρησιμοποιούμε κατά την πειραματική διαδικασία (1X). Γι' αυτό πριν από αυτήν γίνεται αραίωση των παραπάνω διαλυμάτων με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7,35 ή στο 6,5 αντίστοιχα με διάλυμα NaOH. Τα αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4°C .
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε χλωριούχο νάτριο (phosphate buffer saline, PBS) 10 mM, pH=7.4:** Διάλυμα φωσφορικών τελικής συγκέντρωσης 10 mM σε χλωριούχο νάτριο (140 mM). Διαλύονται 8.1816 g χλωριούχο νάτριο (NaCl), 1.38 g ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) και 1.7795 gr δις-ένυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) σε 800 ml απεσταγμένο νερό. Ρυθμίζεται το pH στα 7.4 και προστίθεται επιπλέον νερό σε τελικό όγκο 1 λίτρο (L). Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO):** Έτοιμο διάλυμα του εμπορίου (Dimethyl Sulfoxide, DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, MB: 78.13 άνυδρο, 0.03% H_2O , Ferak Berlin)
- **Διάλυμα αγωνιστή θρομβίνης (Thrombin):** Διάλυμα αγωνιστή θρομβίνης αρχικής συγκέντρωσης 20 U/ml. Διαλύεται ένα φιαλίδιο λυοφιλοποιημένης θρομβίνης από πλάσμα ανθρώπου σε 500 μl φυσιολογικού ορού (0.9 % Sodium chloride). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -80°C . Κατά τη χρήση της η θρομβίνη διατηρείται σε πάγο.
- **Διάλυμα αγωνιστή ADP:** Διάλυμα αγωνιστή ADP από υπάρχον stock συγκέντρωσης 10mM. Αναμιγνύονται 200μl ADP 10mM με 1.8ml φυσιολογικό ορό ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα συγκέντρωσης 1mM (αραίωση 1:10). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -80°C .
- **Διάλυμα αγωνιστή θρομβίνης:** Διαλυτοποιείται RGDS με 461μL PBS (10Mm, pH=7,4) με τελική συγκέντρωση 25mM. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .

5.4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

5.4.3.1 ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΡΙΝ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ

Τα πεπτιδικά ανάλογα μελετήθηκαν υπό μορφή υδροχλωρικού άλατος και διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (10mM, pH=7,4), έτσι ώστε η αρχική

συγκέντρωση να ισούται με 50 mM ή 25mM (stock). Η διάλυση των πεπτιδίων έγινε υπό ανάδευση σε vortex έτσι ώστε να προκύψει διαυγές διάλυμα. Ο χρόνος επώασης πεπτιδίου-αιμοπεταλίων ήταν 2 min για όλα τα πεπτίδια που εξετάστηκαν. Η επώαση γίνεται σε ειδικούς υποδοχείς του οργάνου, όπου η θερμοκρασία είναι 37 °C.

5.4.3.2 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

Το αίμα που χρησιμοποιήθηκε, παραλήφθηκε από υγιείς εθελοντές, οι οποίοι δεν είχαν κάνει χρήση φαρμακευτικών ουσιών τις προηγούμενες 14 ημέρες, όπως ασπιρίνη ή άλλα μη στερεοειδή αντιφλεγμονώδη και αντιϊσταμινικά, προκειμένου να μην επιδράσουν στη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Το αίμα συλλέχθηκε χωρίς βία (για αποφυγή ενεργοποίησης αιμοπεταλίων) σε σωληνάκια προπυλενίου με αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD). Το ACD προστίθεται, διότι δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου που είναι υπεύθυνα για τη πήξη του αίματος στον σωλήνα.

5.4.3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΛΟΥΣΙΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (PLATELET RICH PLASMA, PRP) – ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΕ PRP ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Το ολικό αίμα (Κεφάλαιο 5.4.3.2) φυγοκεντρείται στις 900 rpm (120 x g), για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Λαμβάνετε προσεκτικά περίπου τα 2/3 του όγκου του PRP που έχει απομονωθεί σε διαφορετικό σωληνάκι προπυλενίου. Το πλάσμα που υπολείπεται μαζί με τα κύτταρα του αίματος φυγοκεντρείται στη συνέχεια στις 3,100 rpm (1,500 x g), για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και απομονώνεται το υπερκείμενο υγρό που είναι το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP, platelets poor plasma). Μετρείται ο όγκος του PPP που έχει απομονωθεί και μεταφέρετε προσεκτικά σε άλλο σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Υπολογίζεται η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο εναιώρημα, μετρώντας τον αριθμό των αιμοπεταλίων με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer [Παράρτημα V]. Στη συνέχεια με βάση τον αριθμό των αιμοπεταλίων, υπολογίζεται η ποσότητα του PPP με την οποία πρέπει να αραιωθεί το ομόλογο του PRP έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων να είναι 250.000 αιμοπετάλια/mm³ ή αιμοπετάλια/μL. Ο απαιτούμενος όγκος V_{PPP} που απαιτείται για την αραιώση προκύπτει από την εξίσωση:

$$A.A. \times V_{PRP} = 250.000 \text{ αιμ./}\mu\text{L} \times V_{ολικό}$$

Όπου Α.Α.: ο αριθμός των αιμοπεταλίων ανά mm^3 στο αρχικό PRP, V_{PRP} : ο όγκος του PRP, $V_{\text{ολικό}}$: ο όγκος του PRP και του PPP που πιθανόν να προστεθεί για την προσαρμογή της συγκέντρωσης.

Ο αγωνιστής που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα συσσωρευομετρίας σε PRP ανθρώπου, ήταν το ADP σε συγκέντρωση (2,5-10 μM). Ως δείγμα αναφοράς (τυφλό) χρησιμοποιείται εναιώρημα αιμοπεταλίων μαζί με το διαλύτη του πεπτιδίου, στα 2 min προστίθεται ο αγωνιστής και καταγράφεται η % συσσώρευση του. Ακολουθεί η καταγραφή της % συσσώρευσης των αιμοπεταλίων υπό την επίδραση του πεπτιδίου σε διάφορες συγκεντρώσεις. Το ποσοστό της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλεί κάθε φορά το «υπό μελέτη» πεπτίδιο, υπολογίζεται από τη σχέση 1:

$$\% \text{ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ} = \frac{\% \text{Συσσώρευση τυφλού} - \% \text{Συσσώρευση δείγματος πεπτιδίου}}{\% \text{Συσσώρευση τυφλού}} \times 100\%$$

5.4.3.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΑΝΘΡΩΠΟΥ – ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΕ ΠΛΥΜΕΝΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Για την παραλαβή των πλυμένων αιμοπεταλίων ακολουθήθηκε η τροποποιημένη μέθοδος Mustard [5]. Στο ολικό αίμα με αντιπηκτικό (Κεφάλαιο 5.4.3.2), προστέθηκε 10μl απυράση, ώστε η τελική της συγκέντρωση στο δείγμα να είναι 1U/ml και 1μl προσταγλανδίνης E_1 (PGE_1). Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 900 στροφές το λεπτό (rpm) ($126 \times g$) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Λαμβάνεται προσεκτικά το PRP και μετρείται ο όγκος του PRP και συμπληρώνεται ως τα 10 ml με διάλυμα έκπλυσης (1X pH 6,5). Επίσης, προστίθεται στο διάλυμα 1,5 μl απυράσης (τελική συγκέντρωση 0,015 U/ml) και 3,5 μl PGE_1 (αραιωμένης) (τελική συγκέντρωση 0,1 μM). Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 rpm ($975 \times g$) για 12 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αποχύνεται απότομα το υπερκείμενο και αυτό που απομένει είναι ένα λευκό ίζημα. Το ίζημα αναδιασπείρεται αμέσως με 10 ml διαλύματος έκπλυσης (1X pH 6,5), στο οποίο έχει προστεθεί 1,5 μl απυράσης (τελική συγκέντρωση 0,015 U/ml) και 3,5 μl PGE_1 (αραιωμένη, τελική συγκέντρωση 0,1 μM). Το δείγμα φυγοκεντρείται εκ νέου στις 2500 rpm ($975 \times g$) για 12 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αποχύνεται απότομα το υπερκείμενο και αυτό που απομένει είναι ένα λευκό ίζημα. Αναδιασπείρεται αμέσως με το διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων (1X pH 7,35) και

προστίθεται όγκος διαλύματος εναιώρησης περίπου ίσος με το 1/3 του όγκου του P.R.P (της πρώτης φυγοκέντρωσης) Υπολογίζεται η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο εναιώρημα με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer (Παράρτημα V). Μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης προστίθεται στο διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων τόσος όγκος διαλύματος εναιώρησης των αιμοπεταλίων (1X pH 7,35), ώστε η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στην κυψελίδα συσσωρευομετρίας να ισούται με 250.000/μl. Τέλος στο τελικό εναιώρημα των αιμοπεταλίων προστίθεται ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου ώστε η τελική συγκέντρωση του να ισούται με 1mM και αφήνεται σε ηρεμία για 10 με 15 min.

Ο αγωνιστής που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα συσσωρευομετρίας ήταν η θρομβίνη σε τελική συγκέντρωση από 0,1-0,2 U/ml. Ως δείγμα αναφοράς (τυφλό) χρησιμοποιείται εναιώρημα αιμοπεταλίων μαζί με το διάλυτη του πεπτιδίου, στα 2 min προστίθεται ο αγωνιστής και καταγράφεται η % συσσώρευση του. Ακολουθεί η καταγραφή της % συσσώρευσης των αιμοπεταλίων υπό την επίδραση του πεπτιδίου σε διάφορες συγκεντρώσεις. Το ποσοστό της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλεί κάθε φορά το «υπό μελέτη» πεπτίδιο, υπολογίζεται από τη σχέση 1 που αναφέρεται στο κεφάλαιο 5.4.3.3.

5.5 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

5.5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων με βάση τη σκέδαση και το φθορισμό. Επιτρέπει ταυτόχρονα την πολυπαραμετρική ανάλυση φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των κυττάρων όταν αυτά βρίσκονται σε εναιώρημα εντός υγρού που ρέει σε νηματοειδή ροή.

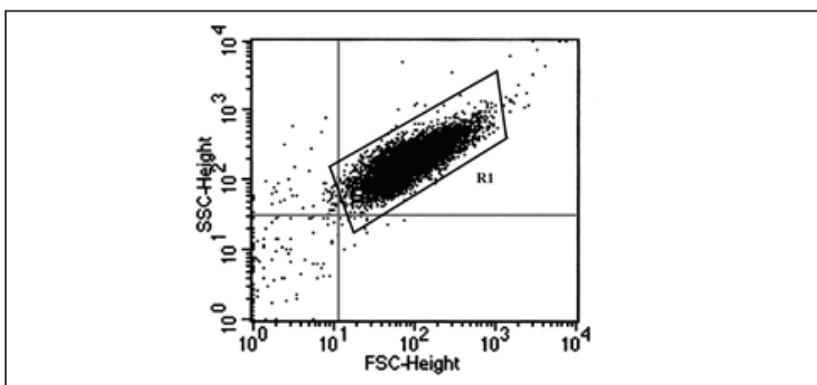
Για τη σωστή διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας πρέπει το δείγμα να βρίσκεται σε μορφή κυτταρικού εναιωρήματος, τα προς ανάλυση κύτταρα πρέπει να έχουν μέγεθος μεταξύ 0.2-150μm και να επισημαίνονται με μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν σημειωθεί με τις κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που παρουσιάζονται στη παρούσα εργασία, ήταν το PAC-1-FITC, το Anti-Fibrinogen-FITC και το AP5. Το PAC-1-FITC είναι ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει έναν επίτοπο της ιντεγκρίνης αIIbβ3 μόνο στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και δεν αναγνωρίζει τη μη ενεργοποιημένη

μορφή του υποδοχέα [6]. Το anti-Fibrinogen-FITC, ένα πολυκλωνικό αντίσωμα, το οποίο προσδένεται στην ιντεγκρίνη $\alpha\text{IIb}\beta_3$ μόνο κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και όχι στα εν ηρεμία αιμοπετάλια [7]. Ενώ το AP5 είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ενεργοποιημένης διαμόρφωσης της β_3 υπομονάδας [8].

Ο προσδιορισμός των αντιγόνων στην κυτταρική επιφάνεια, γίνεται μέσω των παραγόμενων σημάτων φθορισμού από τα σημασμένα αντισώματα. Για να παραχθούν τα σήματα φθορισμού απαιτείται μία πηγή ενέργειας συγκεκριμένου μήκους κύματος, η οποία προέρχεται από τη δέσμη φωτός του οργάνου. Η ακτινοβολία αυτή είναι σταθερή και μονοχρωματική, ισχύος 15mW και μήκους κύματος 488nm και προκαλεί τη διέγερση των φθορίζοντων ουσιών. Μετά τη διέγερση τους οι φθορίζουσες χρωστικές εκπέμπουν σε διάφορα μήκη κύματος, μεγαλύτερα από εκείνα της διέγερσης. Η χρωστική φλουορεσκεΐνη που χρησιμοποιείται για τη σήμανση των αντισωμάτων εκπέμπει σε μήκος κύματος 530nm.

Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται ως διαγράμματα δύο παραμέτρων, της πρόσθιας και της πλάγιας σκέδασης, όπου τα κύτταρα διαχωρίζονται σε διάφορους πληθυσμούς ανάλογα το μέγεθος και την κοκκίωση τους, ως διαγράμματα μεγέθους ως προς την ένταση φθορισμού ενός φθοριοχρώματος, ως διαγράμματα δύο διαφορετικών φθοριοχρωμάτων ή ως ιστογράμματα όπου παρίστανται τα συμβάματα ως προς την ένταση φθορισμού ενός φθοριοχρώματος (Σχήμα 5.3).



Σχήμα 5.3: Αντιπροσωπευτική εικόνα πληθυσμού αιμοπεταλίων που προκύπτει από το κυτταρόμετρο ροής. Ο άξονας x αντιστοιχεί στο μέγεθος και ο άξονας y στην κοκκίωση. Στη μαρκαρισμένη περιοχή R1 εντοπίζεται ο πληθυσμός των αιμοπεταλίων.

5.5.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

5.5.2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΥΛΙΚΑ, ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ & ΟΡΓΑΝΑ

Τα αντιδραστήρια, υλικά, διαλύματα εργασίας και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα της κυτταρομετρίας ροής έχουν ως εξής.

- PAC-1-FITC, Becton Dickinson, San Jose, CA. Διατηρείται σε σκοτεινό μέρος στους 4°C.
- Anti-Fibrinogen-FITC: Abcam. Διατηρείται σε σκοτεινό μέρος στους 4°C.
- AP5: Προσφορά του Dr T. J. Kunicki, (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).
- Διαλύτης αγωνιστή ADP: Κεφάλαιο 5.4.2.
- Διαλύματα πεπτιδίων: Τα προς μελέτη πεπτίδια διαλύθηκαν σε PBS.
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur: Flow Cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA ή Becton Dickinson FACSsort.
- Σωληνάκια πολυστυρενίου: Becton-Dickinson, San Jose, CA.
- Λογισμικό Cell Quest Software: Becton Dickinson, San Jose, CA.

5.5.2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ PAC-1-FITC ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΩΝ Fg-FITC ΚΑΙ AP5

Παρασκευάζεται το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) με τελική συγκέντρωση 250.000 αιμοπετάλια/μλ, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.4.3.3. Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται ως εξής: προστίθενται 90μλ PRP και 5 μλ πεπτιδίου (στην επιθυμητή συγκέντρωση) ή διαλύτης πεπτιδίου και επωάζονται για 2 min στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθεται ο αγωνιστής (ADP), συγκεκριμένα τα δείγματα έχουν ως εξής: 1°: 95μλ PRP + 5μλ διαλύτης αγωνιστή, 2°: 95μλ PRP + 5μλ διαλύτης πεπτιδίου, 3°: 90μλ PRP + 5μλ διαλύτης πεπτιδίου + 5μλ ADP (50μM), 4°: 90μλ PRP + 5μλ διαλύτης πεπτιδίου + 5μλ ADP (50μM), 5°: 90μλ PRP + 5μλ πεπτιδίου στην επιθυμητή συγκέντρωση + 5μλ ADP (50μM). Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 4 min ώστε να πραγματοποιηθεί η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επίσης προετοιμάζονται σωληνάκια Becton-Dickinson όπου προστίθενται 5μλ αντισώματος και 5μλ από τα προαναφερθέντα δείγματα και συμπληρώνονται μέχρι τα 50μλ με PBS 10mM, pH 7,4. Ακολουθεί ήπια ανάδευση, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min και αμέσως μετά ακολουθεί η ανάλυση στο κυτταρόμετρο και η ανάλυση των δεδομένων.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για το αντίσωμα AP5 ήταν ελαφρώς διαφορετική. Χρησιμοποιήθηκαν πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου (Κεφάλαιο 5.4.3.4) με τελική συγκέντρωση 250.000 αιμοπετάλια/μλ, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη θρομβίνης (2.5 U/ml) και η τελική αραίωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με διάλυμα εναιώρησης αιμοπεταλίων (Κεφάλαιο 5.4.2).

5.5.2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το ποσοστό των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων (Non-specific binding, NB) προσδιορίζονται από τα δείγματα 1,2 και 3, ενώ το ποσοστό των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και η ολική πρόσδεση των αντισωμάτων (Total Binding, TB) προσδιορίζονται από το δείγμα 4. Τέλος η αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων παρουσία του πεπτιδίου σε διάφορες συγκεντρώσεις προσδιορίζονται από το δείγμα 5. Η ειδική πρόσδεση (Specific Binding) για τα αντισώματα υπολογίζεται ως εξής: $SB_{Ab} = TB_{Ab} - NB_{Ab}$

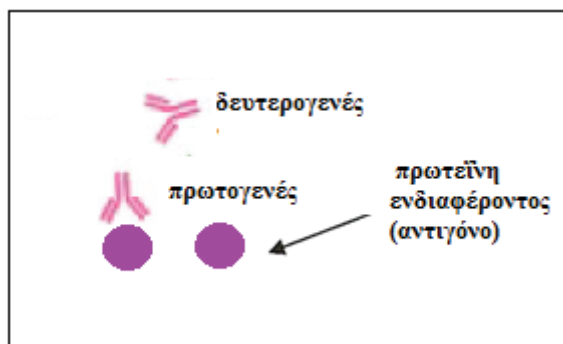
Ενώ το % ποσοστό της αναστολής της πρόσδεσης των αντισωμάτων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$[SB_{Ab(\text{τυφλού δείγματος})} - SB_{(\text{δείγματος πεπτιδίου})} / SB_{Ab(\text{τυφλού δείγματος})}] \times 100$$

5.6 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN BLOT)

5.6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (immunoblotting) ή αποτύπωσης κατά Western (Western Blot) αποτελεί μια από τις σπουδαιότερες και ευρύτερα χρησιμοποιούμενες ανοσοχημικές τεχνικές της σύγχρονης Βιοχημείας. Η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ειδική ανίχνευση και τον προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης (αντιγόνου) από μείγμα πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά επί πηγματος, εφόσον βέβαια είναι διαθέσιμο ένα ειδικό αντίσωμα (μόριο ανοσοσφαιρίνης) που αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη αυτή [9]. Η ολοκλήρωση της τεχνικής απαιτεί τρία στάδια: α) ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE), β) μεταφορά και πρόσδεση των πρωτεϊνών σε μεμβρανικό υπόστρωμα (Western Transfer) και γ) επώαση της μεμβράνης με το ειδικό αντίσωμα – ανιχνευτή (antibody probe) και στη συνέχεια με ένα δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο, ώστε να γίνει ανίχνευση της αντίστοιχης πρωτεΐνης (αντιγόνου) μέσω ανίχνευσης προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης (immunodetection).



Σχήμα 5.4: Απεικόνιση ανίχνευσης της πρωτεΐνης με επίδραση πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος.

Συνοπτικά, η παραπάνω πειραματική διαδικασία συνδυάζει τρία πλεονεκτήματα: διακριτική ικανότητα (ηλεκτροφόρηση), εξειδίκευση (αντίσωμα), ευαισθησία (ενζυμική δοκιμασία). Η πληροφορία που μπορεί να δώσει η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης είναι όχι μόνο ποιοτική (παρουσία ή απουσία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης), αλλά και ποσοτική (συνολική ποσότητα ή συγκέντρωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης) και δομική (μοριακό μέγεθος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης).

5.6.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

5.6.2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούμε για τη μελέτη των επιθυμητών πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων είναι τα εξής:

1. Αιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων (500μl)
2. Αιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων και αγωνιστή (500μl)
3. Αιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων με το ανασταλτικό πεπτίδιο (500μl)
4. Αιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων με το ανασταλτικό πεπτίδιο και αγωνιστή (500μl)

Πρωτογενή αντισώματα:

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού ενάντια στην πρωτεΐνη ERK 1 προερχόμενη από αρουραίο: ERK 1: sc-94, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικίου τάξης IgG_{2a} ενάντια στη φωσφορυλιωμένη Tyr-204 της πρωτεΐνης ERK 1 ανθρώπινης προέλευσης: p-ERK (E-4), sc-7383, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

Δευτερογενή αντισώματα:

- Αντιορός Αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με ραφαδινική υπεροξειδάση τάξης IgG: goat anti-rabbit IgG-HRP (horseradish-peroxidase) sc-2030, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

5.6.2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΛΥΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Παρασκευάζονται πλυμένα αιμοπετάλια όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 5.4.3.4 και ακολουθεί η καταγραφή της συσσώρευσης. Η επίδραση του διαλύματος λύσης (SDS 10% w/v, K₂ EDTA 5mM) γίνεται στο τέλος των 4 λεπτών όπου τερματίζεται η καταγραφή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και θεωρούμε ότι έχει ολοκληρωθεί το φαινόμενο. Σε καθένα από τα δείγματα (1-4, Κεφάλαιο 5.6.2.1) εισάγουμε 125 μl του διαλύματος SDS - K₂EDTA, (αναλογία 1 όγκος διαλύματος SDS - K₂EDTA για 4 όγκους αιμοπεταλίων) και το αποδιαταγμένο από κυτταρικές μεμβράνες αιώρημα αιμοπεταλίων μεταφέρεται σε eppendorfs για αποθήκευση στους -20°C. Ακολουθεί η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

5.6.2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, εξετάστηκε η επίδραση των πεπτιδίων στη φωσφορυλίωση τυροσινών της ενδοκυττάριας πρωτεΐνης της ERK με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, τα στάδια της οποίας αναφέρονται στο Κεφάλαιο 5.6.1. Αρχικά επώαστηκαν οι μεμβράνες με τα αντισώματα κατά των φωσφοτυροσινών της ERK. Ακολουθεί η αποδέσμευση μεμβράνης από παλιά αντισώματα των μεμβρανών με την τεχνική του stripping και η επώαση αυτών με το αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης.

6.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Στον Πίνακα 6.1 δίνονται τα πεπτιδικά ανάλογα που σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν, καθαρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν, στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Πίνακας 6.1: Συνθετικά πεπτίδια της εξωκυττάριας περιοχής της αIIb υπομονάδας, του αιμοπεταλιακού υποδοχέα αIIbβ₃.

	Πεπτιδικό ανάλογο	Μοριακός Τύπος	Μοριακό Βάρος
1.	YMESRADR	C ₄₁ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₅ S	1027,13
2.	YMESRAAR	C ₄₀ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₃ S	983,12
3.	YMESAADR	C ₃₈ H ₅₉ N ₁₁ O ₁₅ S	942,02
4.	YMESRADA	C ₃₈ H ₅₉ N ₁₁ O ₁₅ S	942,05
5.	RMESRADR	C ₃₈ H ₆₉ N ₁₇ O ₁₄ S	1020,14
6.	HMESRADR	C ₃₈ H ₆₄ N ₁₆ O ₁₄ S	1001,10
7.	yMESRADR	C ₄₁ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₆ S	1027,13
8.	MESRADR	C ₃₂ H ₅₇ N ₁₃ O ₁₃ S	863,95
9.	Ac-YMESRADR	C ₄₃ H ₆₉ N ₁₄ O ₁₅ S	1069,17
10.	Ac-FMESRADR	C ₄₂ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₅ S	1053,17
11.	KMESRADR	C ₃₈ H ₆₉ N ₁₅ O ₁₄ S	992,13
12.	FMESRADR	C ₄₁ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₄ S	1011,13
13.	YMESRADH	C ₄₁ H ₆₁ N ₁₃ O ₁₅ S	1008,09
14.	RMESRADH	C ₃₈ H ₆₄ N ₁₆ O ₁₄ S	1001,09
15.	FMESRADH	C ₄₁ H ₆₁ N ₁₃ O ₁₄ S	992,09
16.	YMESRADK	C ₄₁ H ₆₆ N ₁₂ O ₁₅ S	992,12
17.	RMESRADK	C ₃₈ H ₆₉ N ₁₅ O ₁₄ S	992,13
18.	FMESRADK	C ₄₁ H ₆₆ N ₁₂ O ₁₄ S	983,12
19.	YMDSRADR	C ₄₀ H ₆₄ N ₁₄ O ₁₅ S	1013,11
20.	RMDSRADR	C ₃₇ H ₆₇ N ₁₇ O ₁₄ S	1006,12

Τα πεπτιδικά ανάλογα 1-4 συντέθηκαν, καθαρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στις αναγκαίες ποσότητες για την ανάγκη εκτέλεσης των βιολογικών πειραμάτων που αναφέρονται στην παρούσα διατριβή. Η σύνθεση τους όμως δεν παρουσιάζεται, επειδή αποτελούν σχεδιασμό προηγούμενης διδακτορικής διατριβής [1].

Στη συνέχεια με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης της αλληλεπίδραση του μητρικού αναλόγου με τον υποδοχέα αΙΙbβ3 στην κεκκαμένη διαμόρφωση του, χρησιμοποιώντας υπολογιστικές μεθόδους και αφού τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με πειράματα προσκόλλησης υπό ροή χρησιμοποιώντας κλώνους CHO κυττάρων, με πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου και με πειράματα κυτταρομετρίας ροής για να μελετηθεί η επίδραση αυτών στην έκθεση (LIBS) νέων επιτόπων στη β3 υπομονάδα, σχεδιάστηκαν τα πεπτιδικά ανάλογα 6-21.

Τα πεπτίδια 6-21 σχεδιάστηκαν με σκοπό την επιβεβαίωση του ρόλου και την εμπλοκή των αμινοξικών καταλοίπων Y³¹³ και R³²⁰ στην αλληλεπίδραση τους με τις δύο υπομονάδες του υποδοχέα αΙΙbβ3 αλλά και την ανάπτυξη νέων ισχυρότερων αναστολέων της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Ενώ τα πεπτίδια 20 και 21 σχεδιάστηκαν θέλοντας να διερευνηθεί επιπλέον ο ρόλος του αμινοξέος E³¹⁵ στη βιολογικά ενεργή διαμόρφωση του πεπτιδίου που φαίνεται να σταθεροποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης E³¹⁵ και R³¹⁷.

Η βιολογική δράση των αναλόγων 6-21 εξετάστηκε με πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου αλλά και σε PRP ανθρώπου, ενώ τα πεπτίδια 6, 8, 9, 10 και 13 εξετάστηκαν επιπλέον με πειράματα κυτταρομετρίας ροής για να μελετηθεί η επίδραση αυτών στην πρόσδεση του ινωδογόνου και στην έκφραση του υποδοχέα αΙΙbβ3. Τέλος τα πεπτίδια 6, 9 και 13 εξετάστηκαν περαιτέρω ως προς την επίδραση τους στη βιοσηματοδότηση των αιμοπεταλίων μέσω της κινάσης ERK2.

6.1.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Η σύνθεση των πεπτιδίων 6-21 πραγματοποιήθηκε με σύνθεση ανά ομάδες ως και το κοινό αμινοξύ της κάθε πεπτιδικής αλυσίδας. Μετά το τέλος της σύζευξης και του κοινού αμινοξέος της κάθε ομάδας, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού και χωρίστηκε ώστε να ολοκληρωθεί η σύνθεση των πεπτιδίων.

- RMESRADR, HMESRADR, γMESRADR
- MESRADR, Ac-YMESRADR, Ac-FMESRADR
- YMESRADH, RMESRADH, FMESRADH
- YMESRADK, RMESRADK, FMESRADK
- YMDSRADR, RMDSRADR
- FMESRADR, KMESRADR

6.1.1.1 Σύνθεση πεπτιδίου RMESRADR

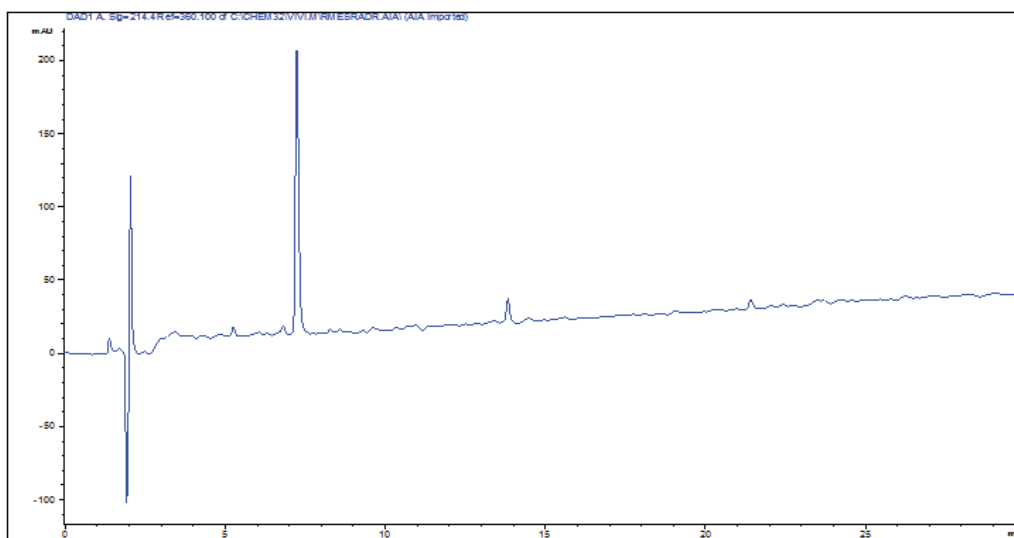
Η σύνθεση του πεπτιδίου Arg-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-Arg-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADR-Wang Resin ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*tBu* στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Arg(Pmc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,54 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,245 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 453,83 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων τους δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 4^{ου}, 5^{ου} και 8^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 475,31 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 73,57%).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 8,94 ml TFA παρουσία 0,24 ml H₂O, 0,24 ml EDT και 95 μl TIS για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 181,1 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.1) (απόδοση αποκοπής: 98,49%)

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 63,24%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.2).

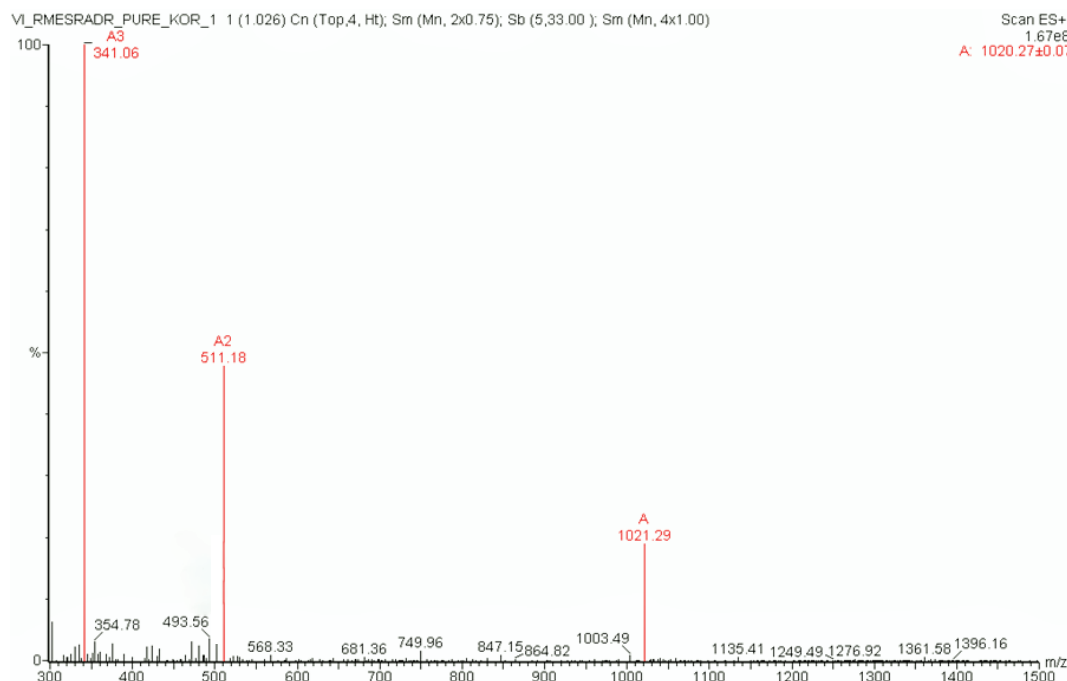


Σχήμα 6.1: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου RMESRADR (Αναμενόμενο M.B:1020,14 Βρέθηκε MB: 1020,31±0,13).



Σχήμα 6.2: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου RMESRADR.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.3) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 1021,29$ και $[M+2H^+]/2 = 511,18$ που αντιστοιχούν σε M.B: 1020,27±0,07, Αναμενόμενο M.B: 1020,14.



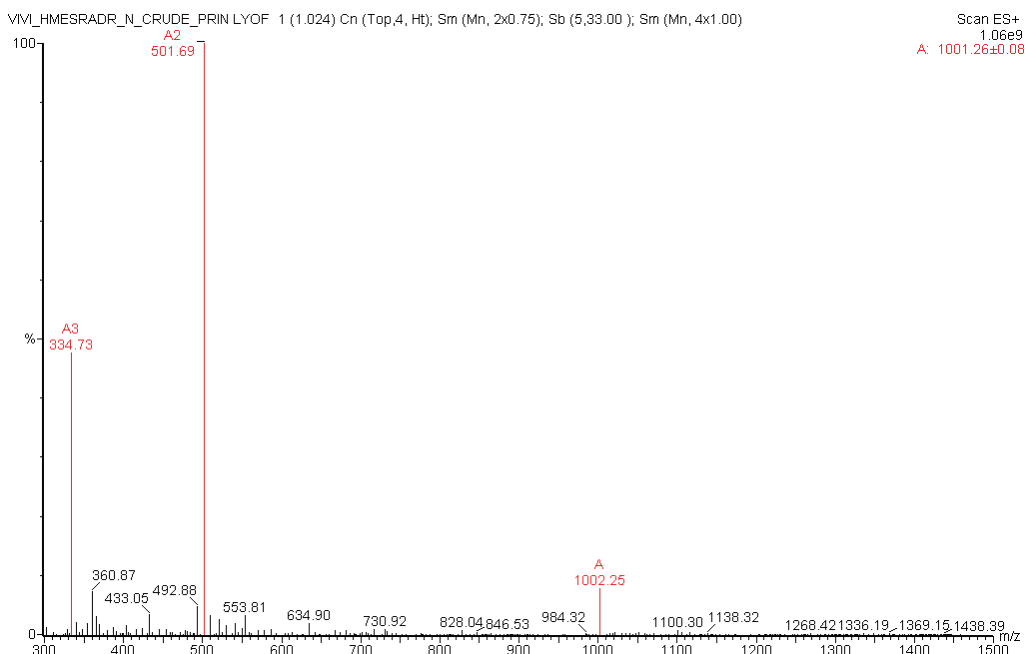
Σχήμα 6.3: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου RMESRADR.

6.1.1.2 Σύνθεση πεπτιδίου HMESRADR

Η σύνθεση του πεπτιδίου His-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-Arg-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADR-Wang Resin -όπως προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*tBu* στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Arg(Pmc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,54 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,25 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 462,46 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων τους δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 4^{ου} και 5^{ου} πραγματοποιήθηκε 2 φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 472,62 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 72,73%).

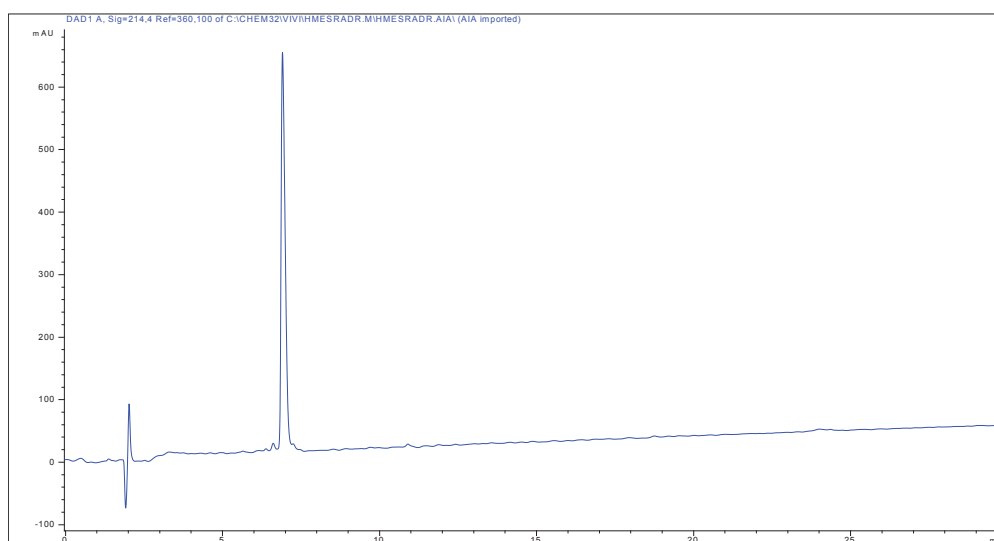
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 8,88 ml TFA παρουσία 0,24 ml H₂O, 0,24 ml EDT και 95 μl TIS για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και

λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 179,3 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.4) (απόδοση αποκοπής: 98,99%).

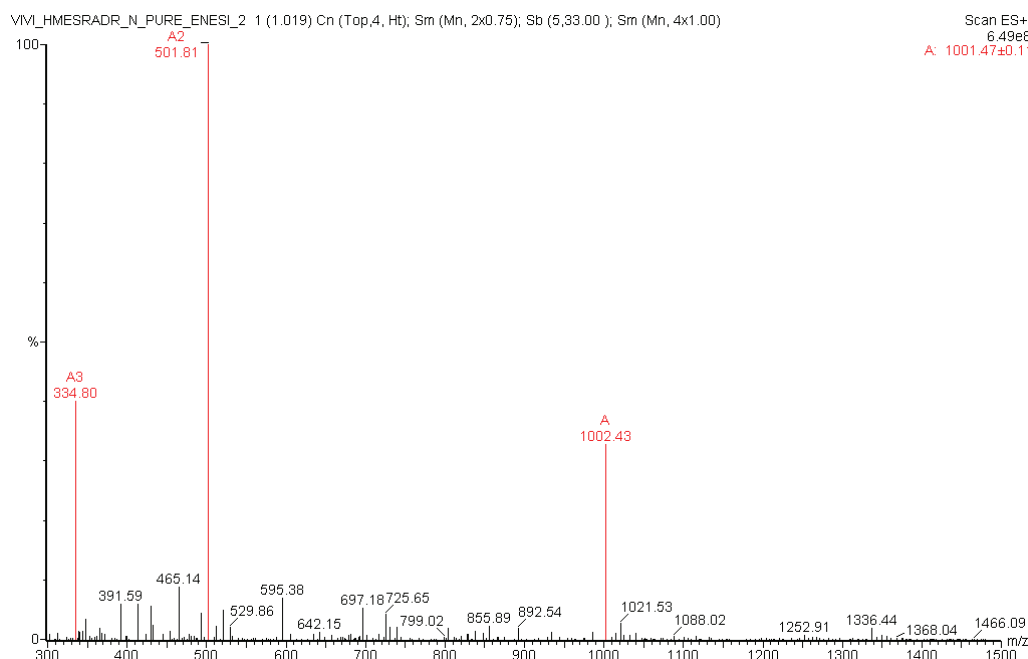


Σχήμα 6.4: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου HMESRADR (Αναμενόμενο M.B: 1001,1 Βρέθηκε MB: 1001,26±0,08).

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:98/2 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 63,57%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.5).



Σχήμα 6.5: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου HMESRADR



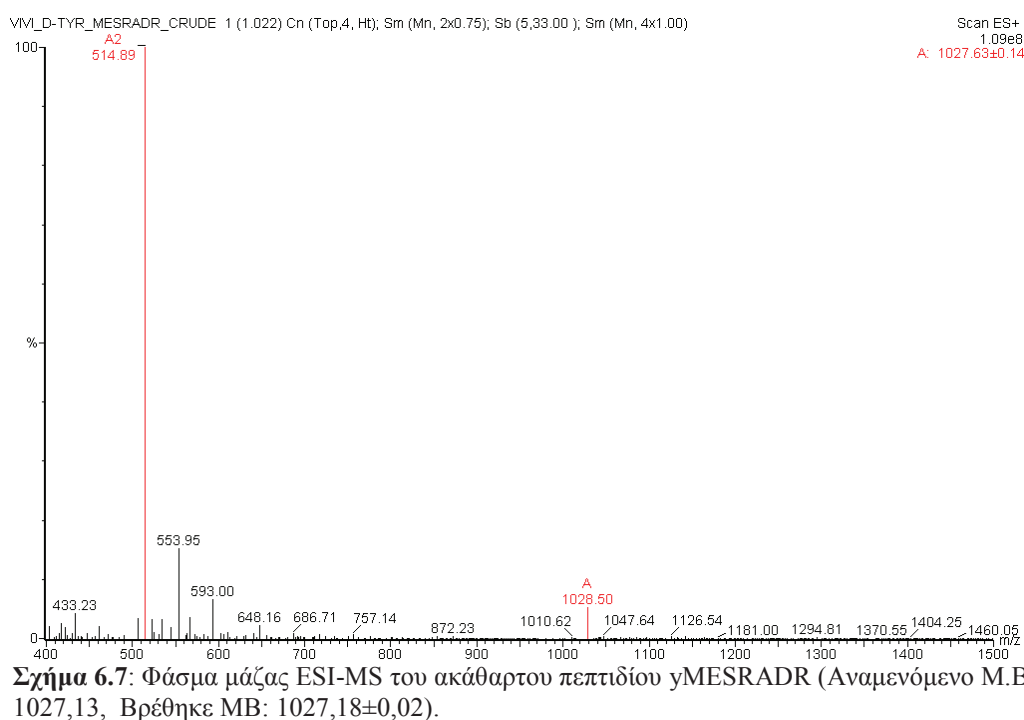
Σχήμα 6.6: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου HMESRADR.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.6) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 1002,43$ και $[M+2H^+]/2 = 501,81$ που αντιστοιχούν σε M.B: $1001,47 \pm 0,11$ Αναμενόμενο M.B: 1001,1.

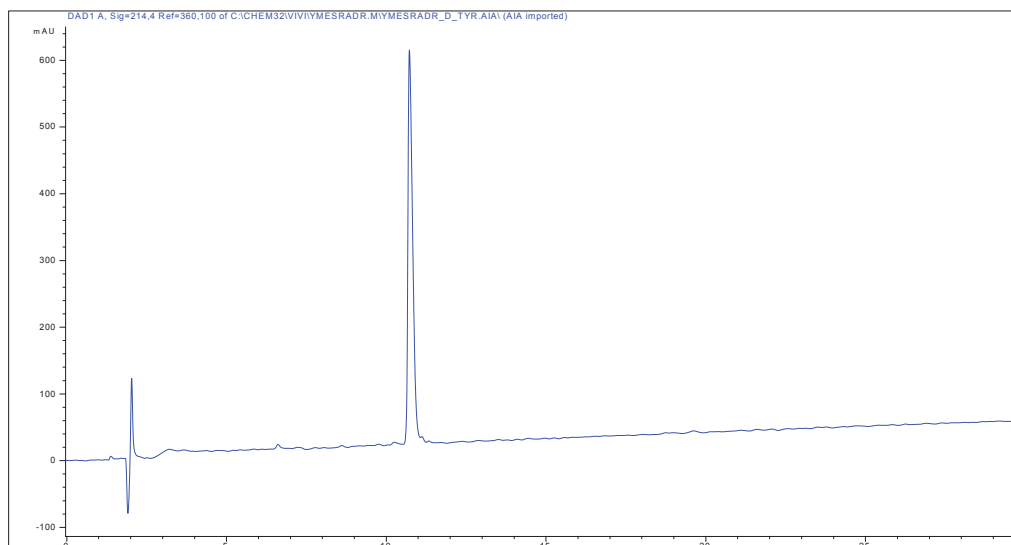
6.1.1.3 Σύνθεση πεπτιδίου γMESRADR

Η σύνθεση του πεπτιδίου (D-Tyr)-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-Arg-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADR-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*tBu* στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Arg(Pmc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,54 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,24 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 450,74 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^{α} -Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων τους δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 4^{ου}, 5^{ου} και 8^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 533,90 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 90,54%).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 10,04 ml TFA παρουσία 0,27 ml H₂O, 0,27 ml EDT και 107μl TIS για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 201,8 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.7) (απόδοση αποκοπής: 82,76%).

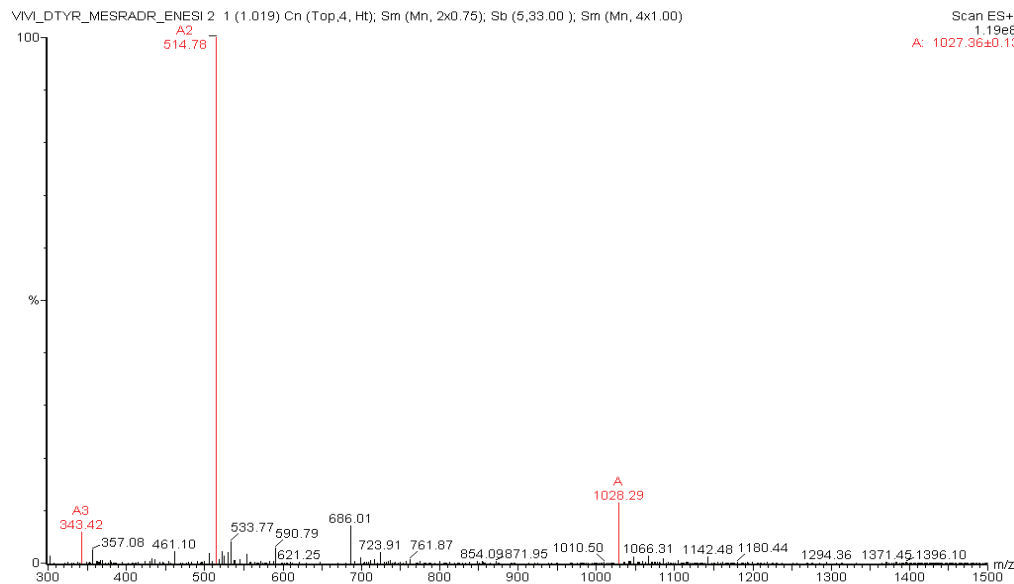


Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 59,33%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.8).



Σχήμα 6.8: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου γMESRADR.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.9) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 1028,29$ και $[M+2H^+]/2 = 514,78$ που αντιστοιχούν σε M.B: $1027,36 \pm 0,13$. Αναμενόμενο M.B: 1027,13.



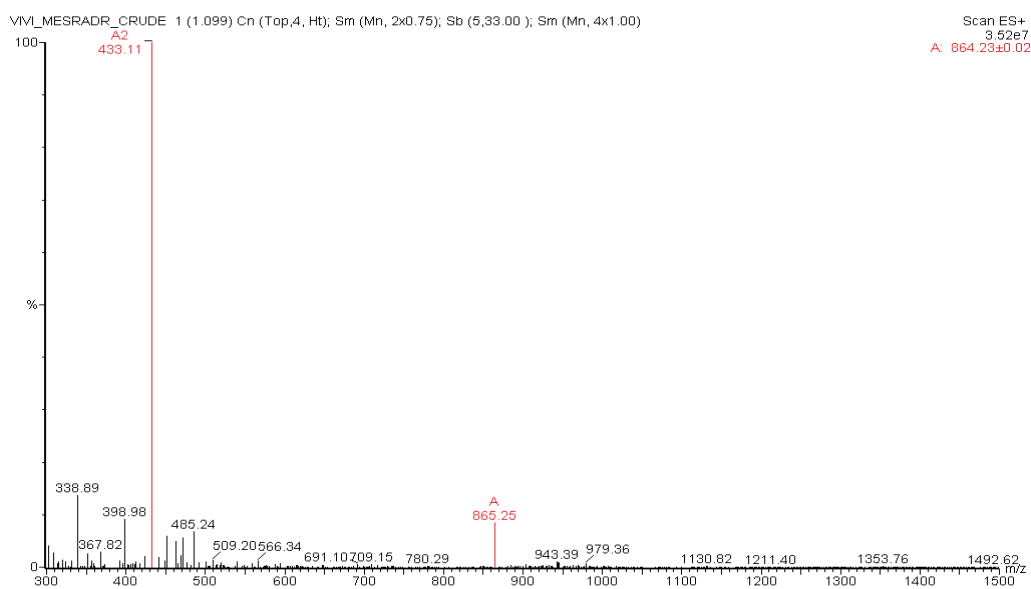
Σχήμα 6.9: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου γMESRADR.

6.1.1.4 Σύνθεση πεπτιδίου MESRADR

Η σύνθεση του πεπτιδίου Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-Arg-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADR-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως-

ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Arg(Pmc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,54 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,35 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 648,15 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων τους δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 2^{ου} και 5^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 724,6 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 92,20%).

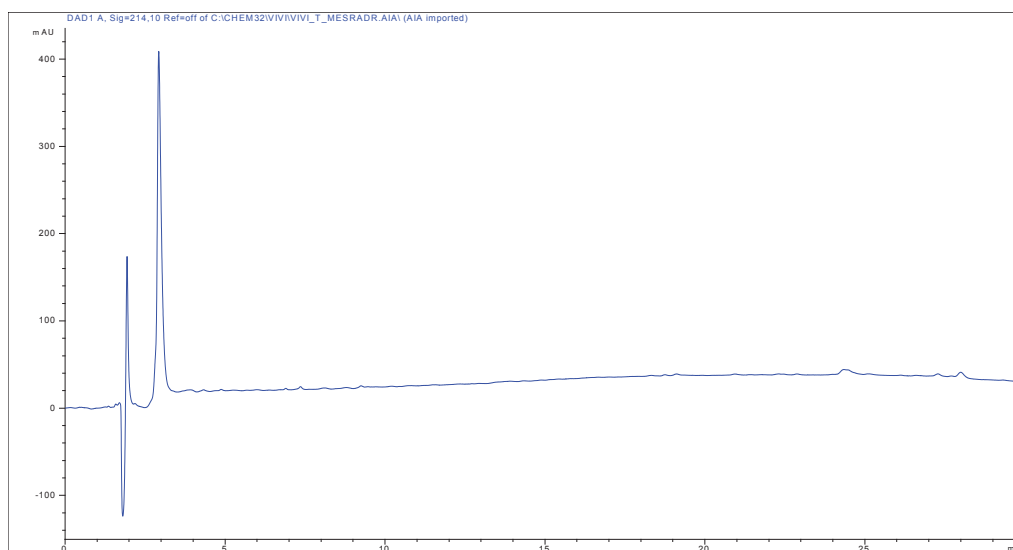
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 13,62 ml TFA παρουσία 0,36 ml H₂O, 0,36 ml EDT και 145 μl TIS για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 361,34 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.10) (απόδοση αποκοπής: 91,73%).



Σχήμα 6.10: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου MESRADR (Αναμενόμενο M.B: 863,95 , Βρέθηκε MB: 864,23±0,02).

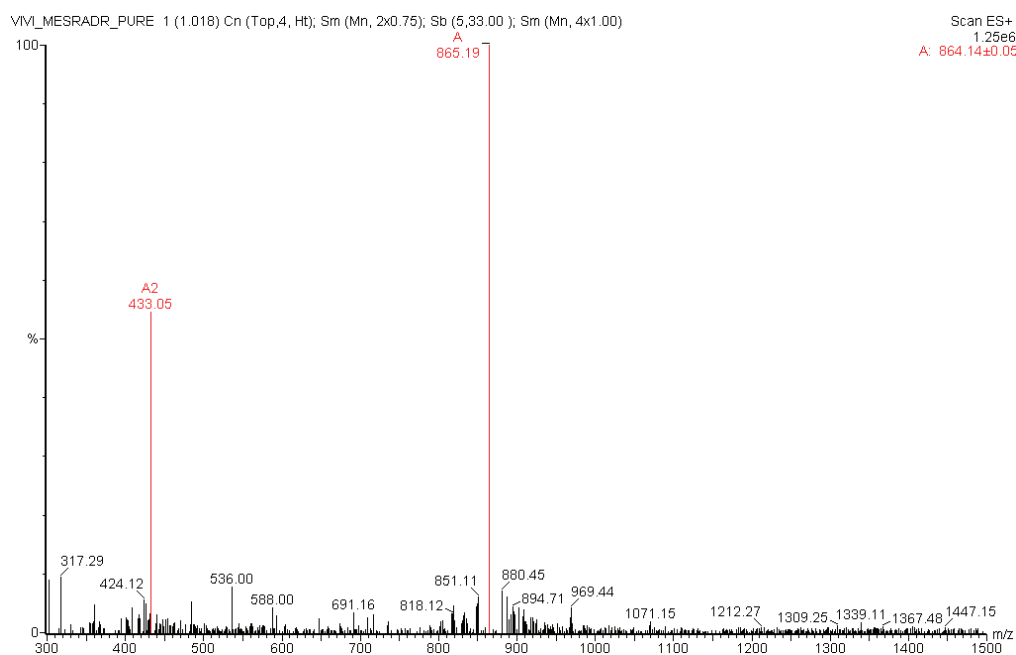
Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:90/10 σε A/B:30/70

(απόδοση καθαρισμού: 52,28%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.11).



Σχήμα 6.11: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου MESRADR.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.12) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 865,19$ και $[M+2H^+]/2 = 433,05$ που αντιστοιχούν σε M.B: $864,14 \pm 0,05$ Αναμενόμενο M.B: 863,95.



Σχήμα 6.12: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου MESRADR.

6.1.1.5 Σύνθεση πεπτιδίου Ac-YMESRADR

Η σύνθεση του πεπτιδίου Ac-Tyr-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-Arg-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADR-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*t*Bu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Arg(Pmc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,54 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,28 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 519,61 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων τους δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 2^{ου} και 5^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση της N^α-τελικής αμινομάδας της τυροσίνης με 30 eq οξικού ανυδρίτη σε διύσοπροπυλαιθυλαμίνη (1:1, v/v) για 10 min. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 758,4 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 97,76%).

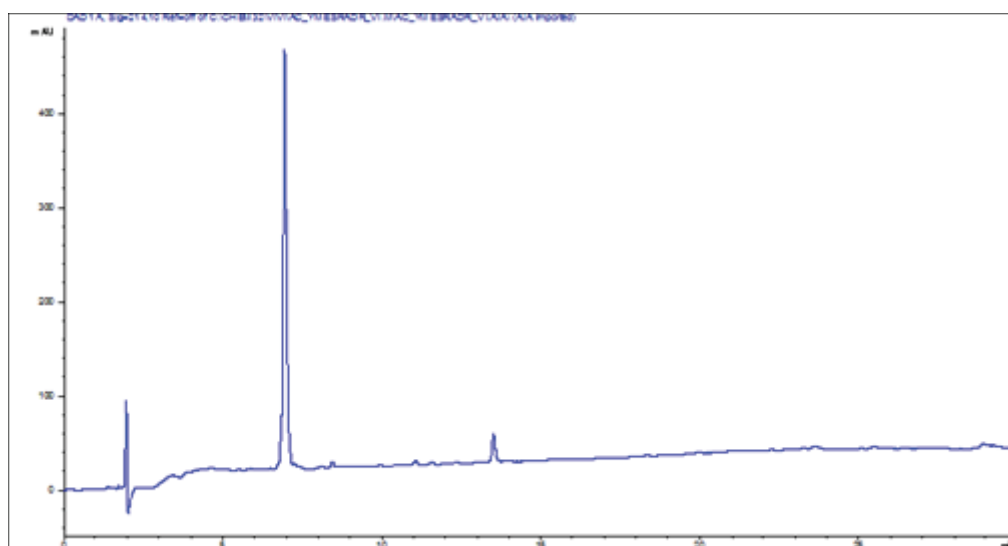


Σχήμα 6.13: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου Ac-YMESRADR (Αναμενόμενο M.B: 1069,17, Βρέθηκε MB: 1069,72±0,15).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 14,26 ml TFA παρουσία 0,38 ml H₂O, 0,38 ml EDT και 152μl TIS

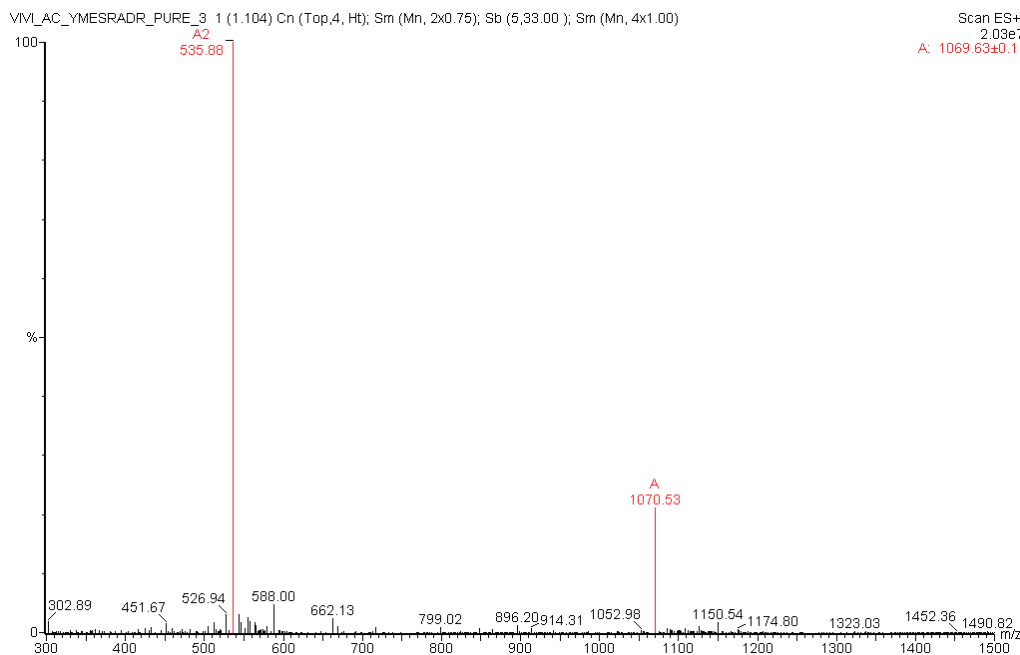
για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 385,62 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.13) (απόδοση αποκοπής: 89,22%).

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 61,38%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.14).



Σχήμα 6.14: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου Ac-YMESRADR.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.15) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 1070,53$ και $[M+2H^+]/2 = 535,88$ που αντιστοιχούν σε M.B: $1069,63 \pm 0,11$. Αναμενόμενο M.B: 1069,17.



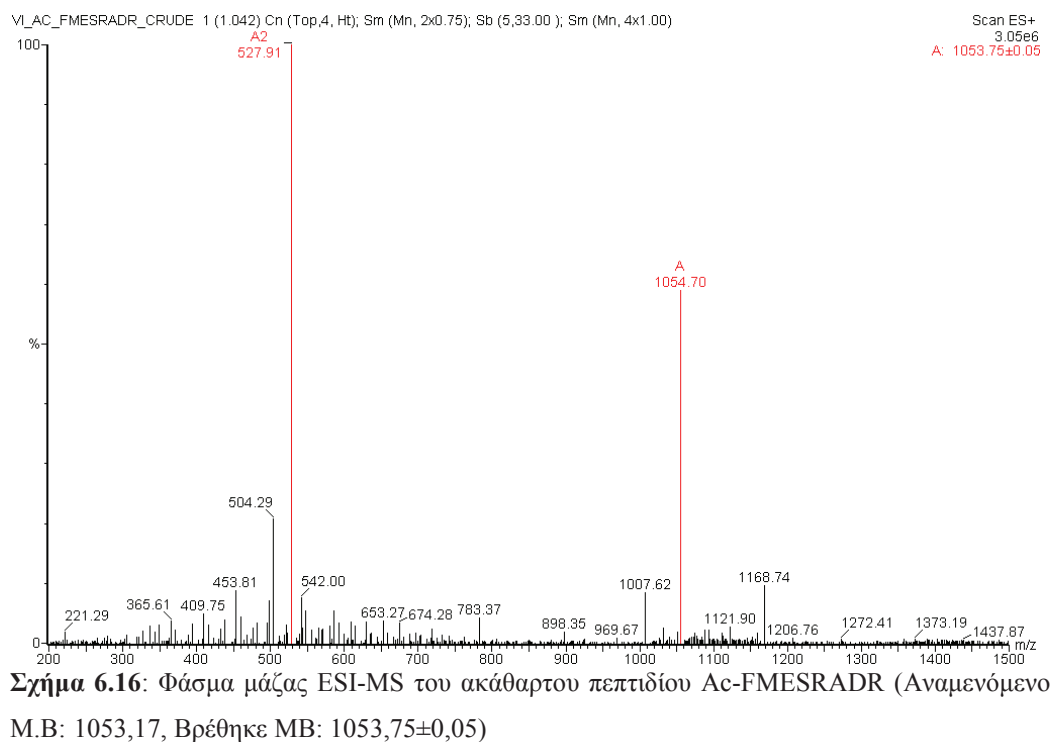
Σχήμα 6.15: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου Ac-YMESRADR.

6.1.1.6 Σύνθεση πεπτιδίου Ac-FMESRADR

Η σύνθεση του πεπτιδίου Ac-Phe-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-Arg-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADR-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*t*Bu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Arg(Pmc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,54 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,24 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 439,59 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων τους δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 2^{ου} και 5^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση της N^α-τελικής αμινομάδας της φαιμυλανίνης με 30 eq οξικού ανυδρίτη σε διίσοπροπυλαιθυλαμίνη (1:1, v/v) για 10 min. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 592,85 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 96,34%).

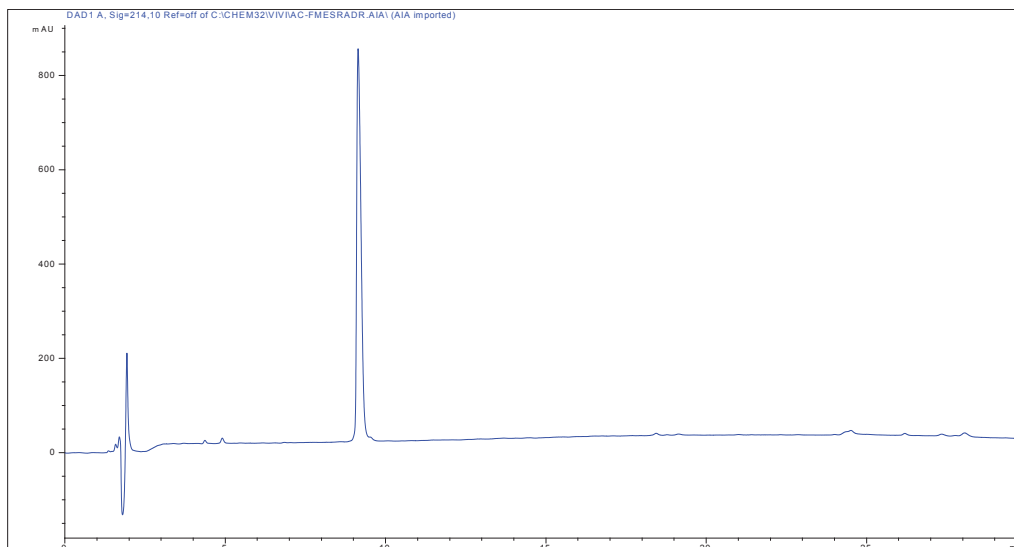
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 11,26 ml TFA παρουσία 0,30 ml H₂O, 0,30 ml EDT και 119 μl TIS για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση

του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 306,04 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.16) (απόδοση αποκοπής: 86,35%).

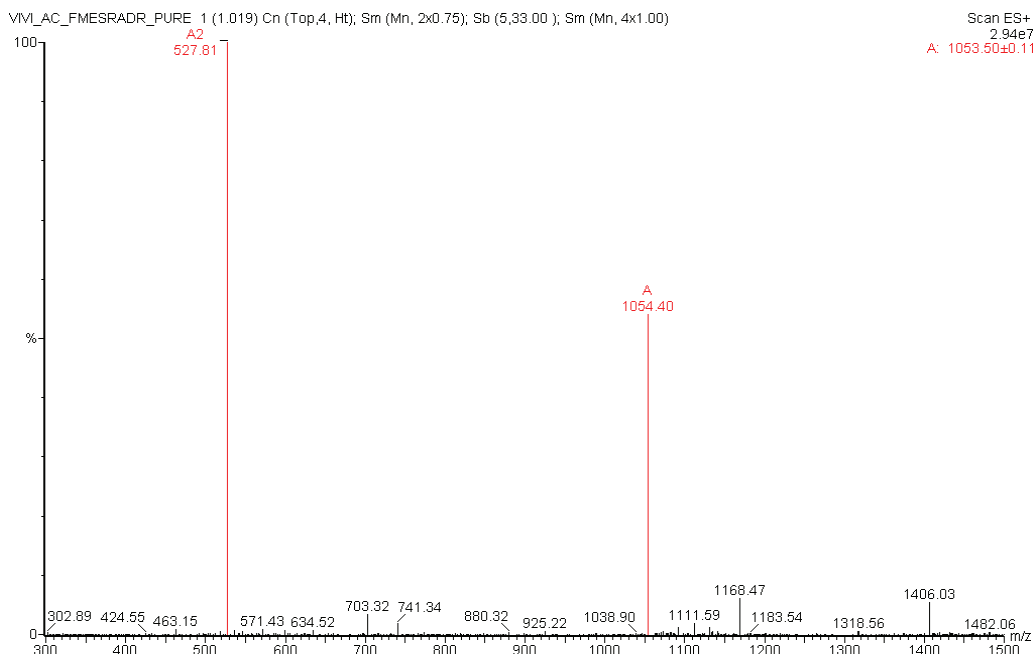


Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 63,28%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.17).

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.18) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 1054,40$ και $[M+2H^+]/2 = 527,81$ που αντιστοιχούν σε M.B: 1053,50±0,11 Αναμενόμενο M.B: 1053,17.



Σχήμα 6.17: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου Ac-FMESRADR.



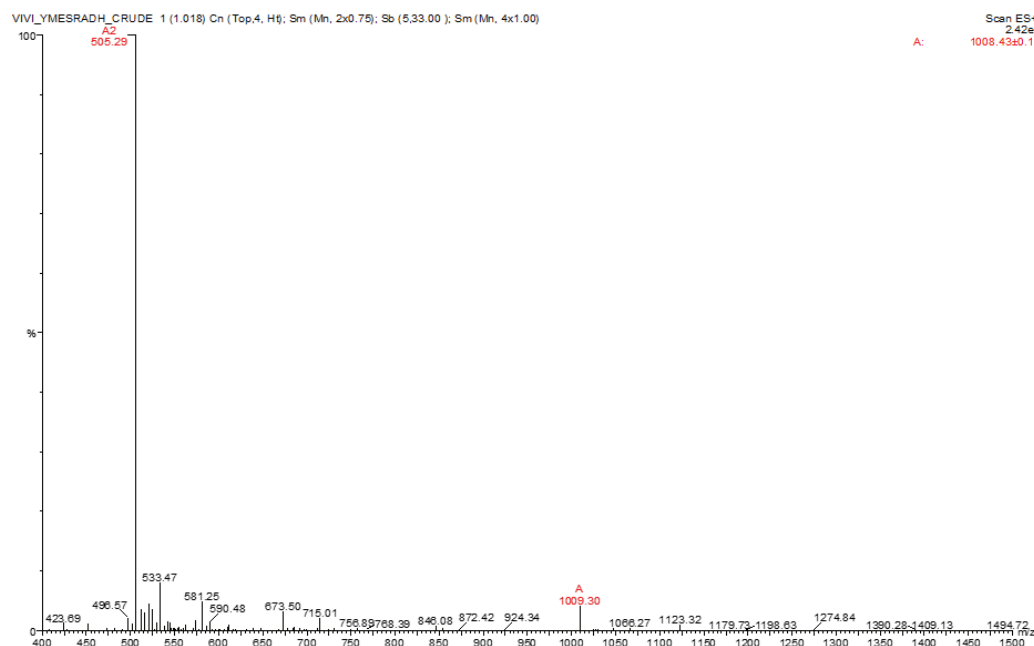
Σχήμα 6.18: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου Ac-FMESRADR.

6.1.1.7 Σύνθεση πεπτιδίου YMESRADH

Η σύνθεση του πεπτιδίου Tyr-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-His-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορηνίνης MESRADH-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*t*Bu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-His(Trt)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,5 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,28 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 569,71 mg πεπτιδορηνίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον

πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 2^{ου} και 8^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 588,62 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 77,27%).

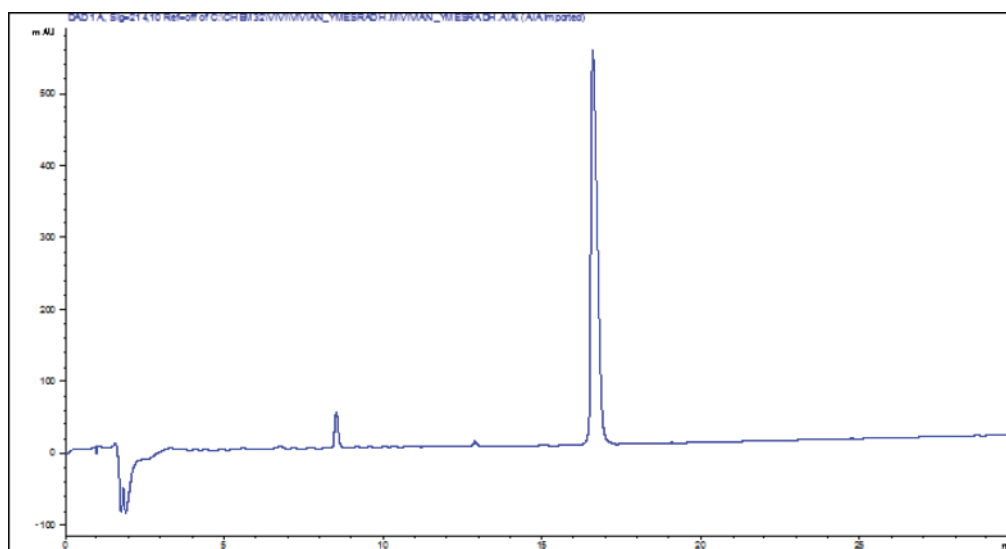
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 11,05 ml TFA παρουσία 0,29 ml H₂O, 0,29 ml EDT και 118 μl TIS για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 206,48 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.19) (απόδοση αποκοπής: 77,96%).



Σχήμα 6.19: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου YMESRADH (Αναμενόμενο M.B: 1008,09 , Βρέθηκε MB: 1008,43±0,13).

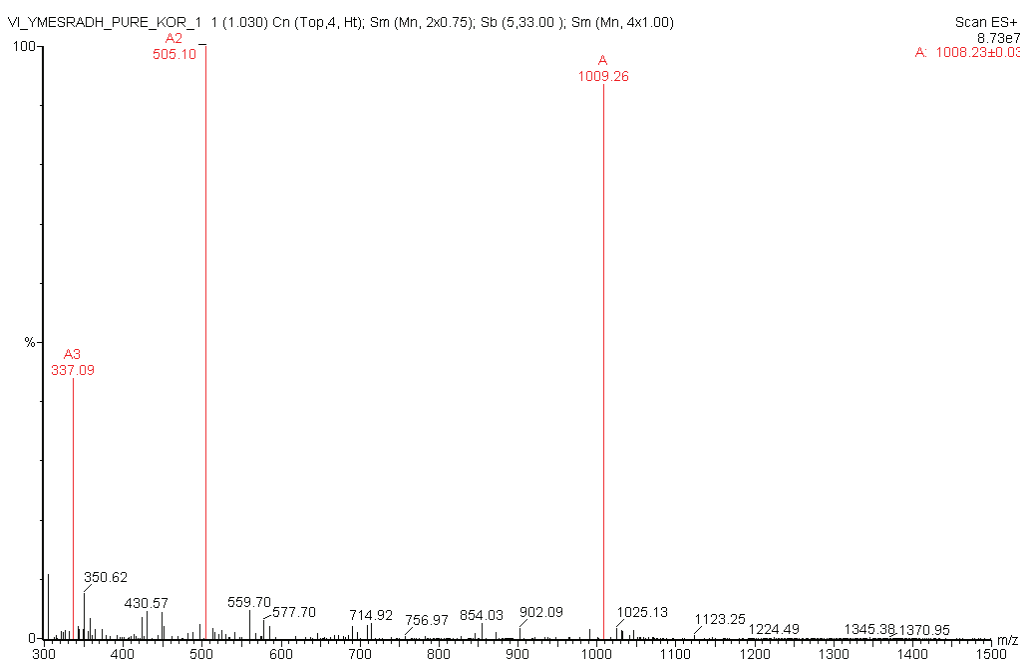
Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 66,77%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με

αναλυτική RP-HPLC (βλέπε κεφάλαιο) με σύστημα έκλουσης (A) $\text{H}_2\text{O}/0,1\%$ TFA, (B) $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\%$ TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (Σχήμα 6.20).



Σχήμα 6.20 : Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου YMESRADH.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-ΜΣ (Σχήμα 6.21) δείχνει την ανίχνευση των $M+1\text{H}^+ = 1009,26$ και $M+2\text{H}^+/2 = 505,10$ που αντιστοιχούν σε Μ.Β: $1008,23 \pm 0,03$, Αναμενόμενο Μ.Β: 1008,09.



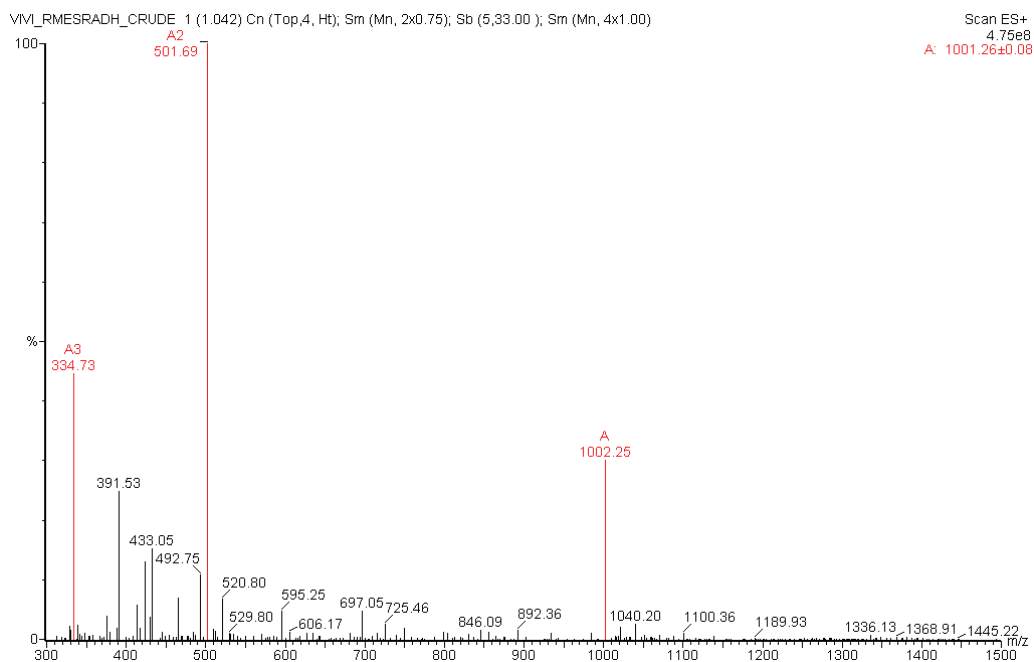
Σχήμα 6.21: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου YMESRADH.

6.1.1.8 Σύνθεση πεπτιδίου RMESRADH

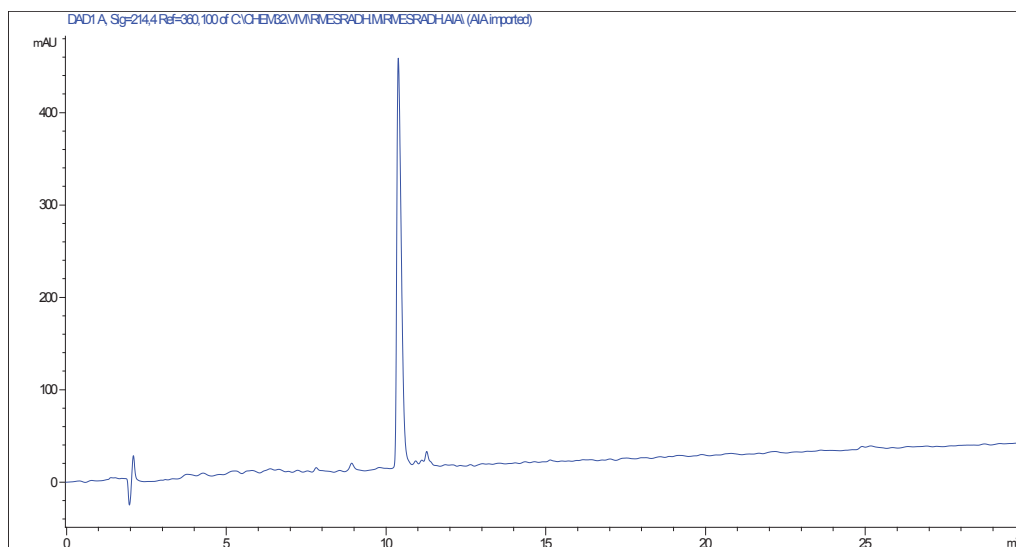
Η σύνθεση του πεπτιδίου Arg-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-His-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADH-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*tBu* στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-His(Trt)-Wang ρητίνη και η υποκατάσταση της ήταν 0,5 mmol ελεύθερων υδροξυλομάδων/g ρητίνης. Για τη σύνθεση 0,13 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 256,9 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 2^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 270,35 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 79,58%).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 5,08 ml TFA παρουσία 0,14 ml H₂O, 0,14 ml EDT και 54 μl TIS για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 98,7 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.22) (απόδοση αποκοπής: 77,44%).

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:98/2 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 64,83%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.23).

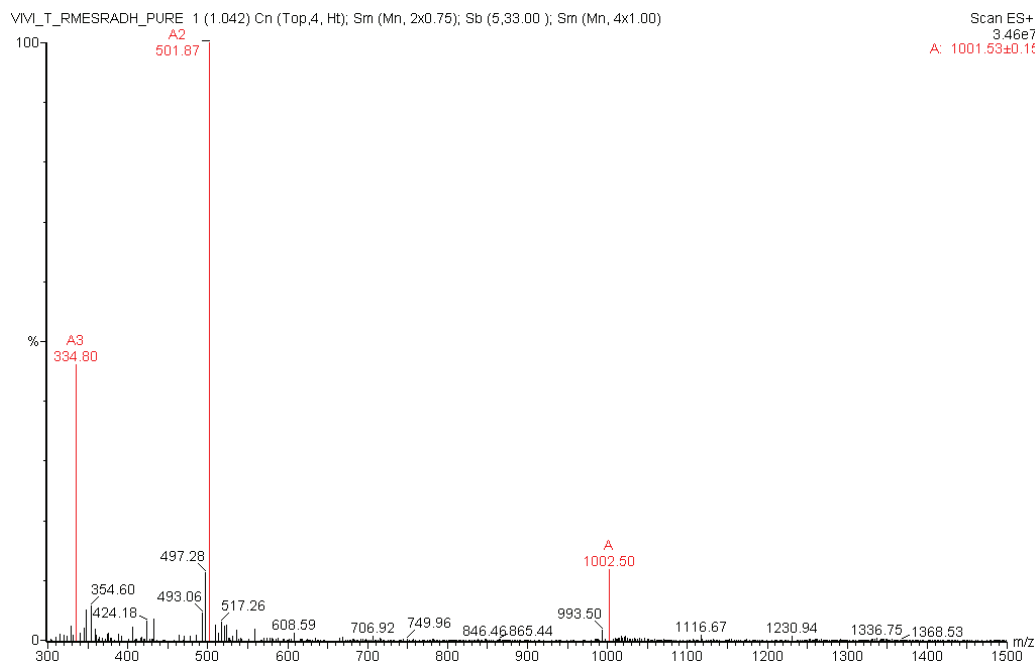


Σχήμα 6.22: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου RMESRADH (Αναμενόμενο M.B: 1001,09, Βρέθηκε MB: 1001,26±0,08).



Σχήμα 6.23: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου RMESRADH.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.24) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+$ = 1002,50 και $[M+2H^+]/2$ = 501,87 που αντιστοιχούν σε M.B: 1001,53±0,15, Αναμενόμενο M.B: 1001,09

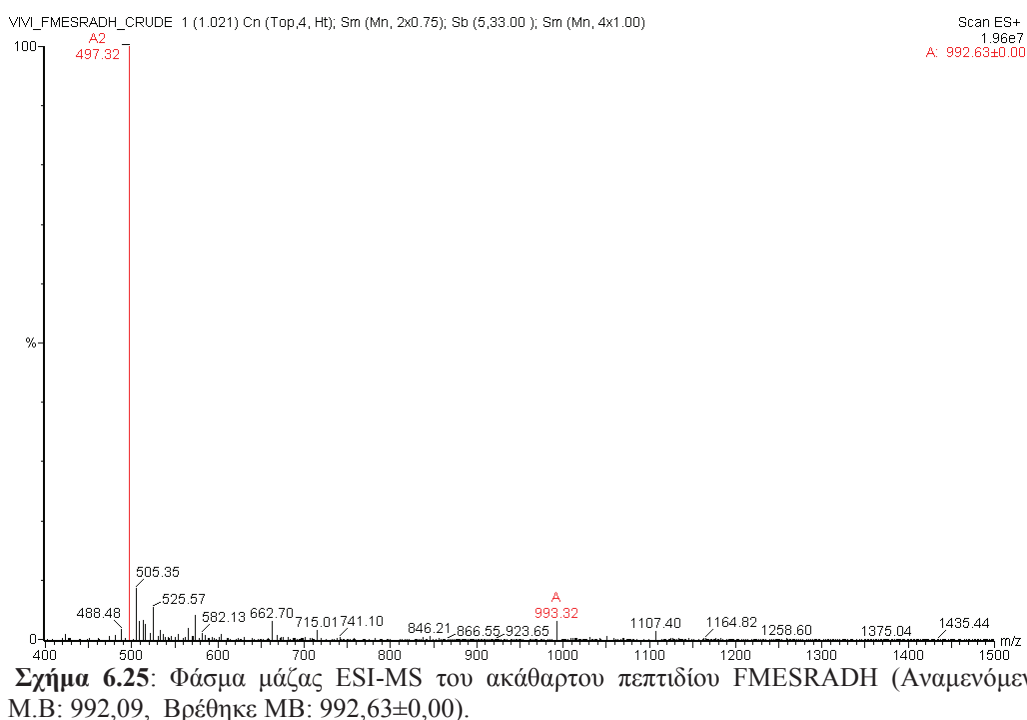


Σχήμα 6.24: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου RMESRADH

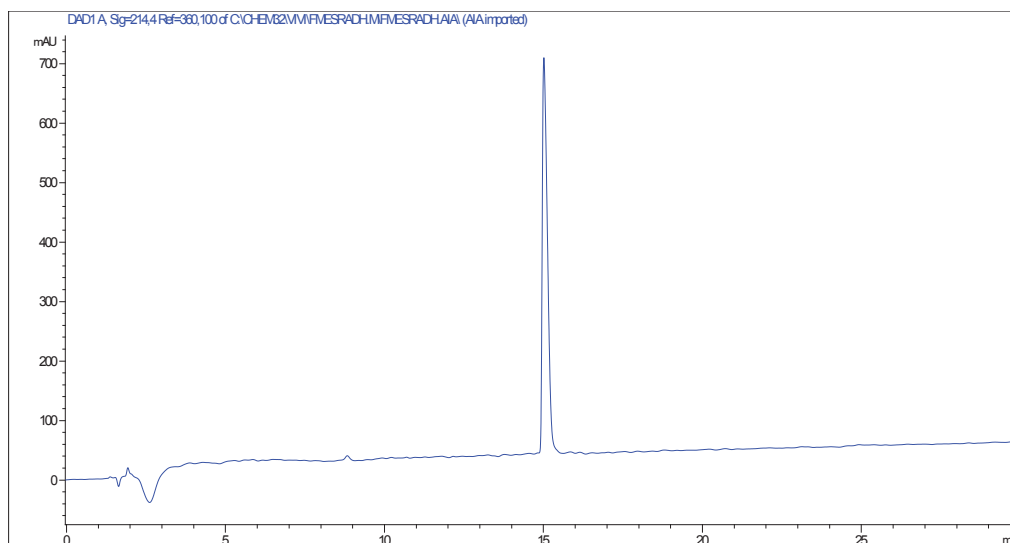
6.1.1.9 Σύνθεση πεπτιδίου FMESRADH

Η σύνθεση του πεπτιδίου Phe-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-His-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADH-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*t*Bu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-His(Trt)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,5 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,34 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 680,46 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 2^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 714,6 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 96,98%).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 13,43 ml TFA παρουσία 0,36 ml H₂O, 0,36 ml EDT και 143μl TIS για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 218,22 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.25) (απόδοση αποκοπής: 66,71%).

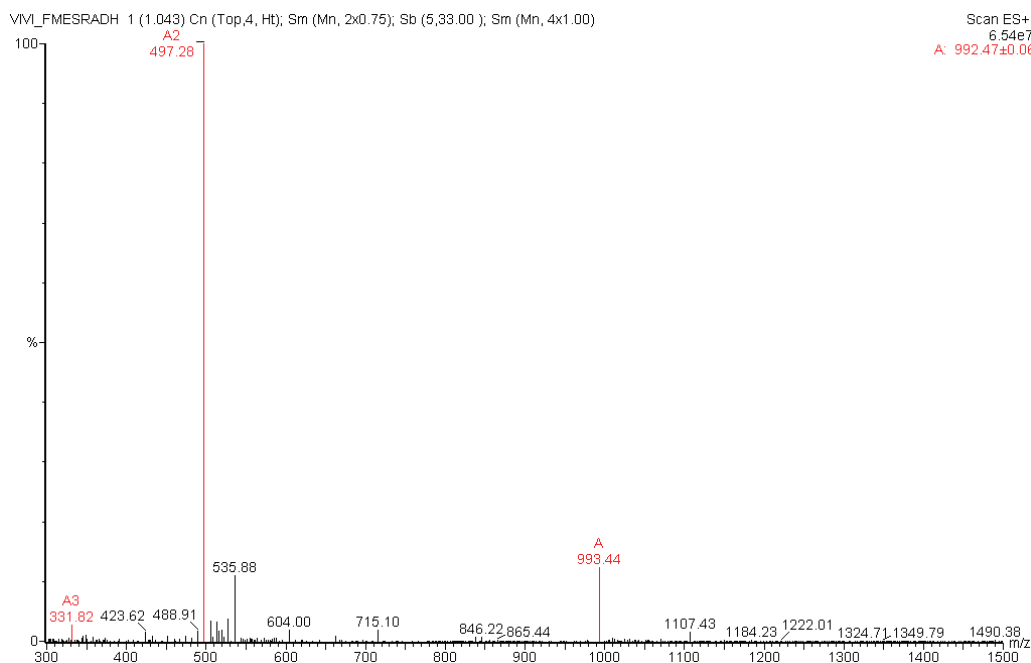


Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:90/10 σε A/B:30/70 (απόδοση καθαρισμού: 60,83%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.26).



Σχήμα 6.26: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου FMESRADH.

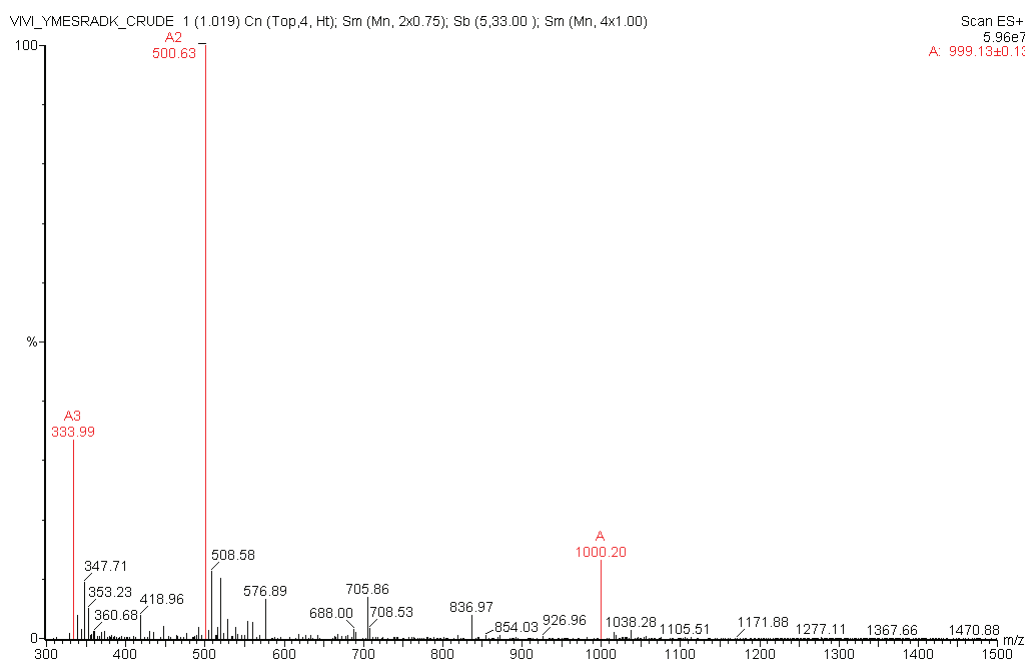
Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.27) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 993,44$ και $[M+2H^+]/2 = 497,28$ που αντιστοιχούν σε M.B: $992,47 \pm 0,06$, Αναμενόμενο M.B: 992,09.



Σχήμα 6.27: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου FMESRADH

6.1.1.10 Σύνθεση πεπτιδίου YMESRADK

Η σύνθεση του πεπτιδίου Tyr-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-Lys-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADK-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*t*Bu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Lys(Boc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,37 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,25 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 676,28 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 4^{ου} και του 6^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 702,11 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 96,84%).

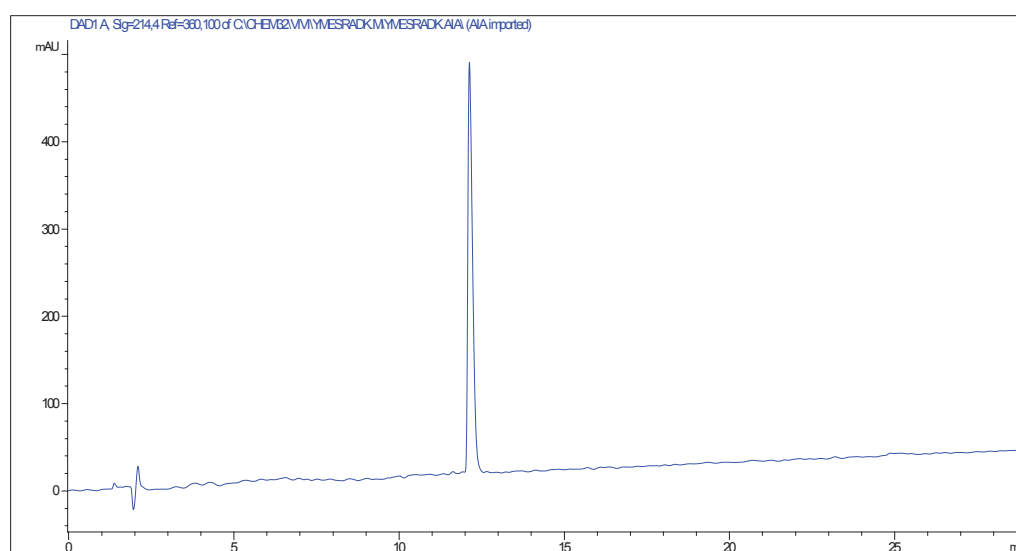


Σχήμα 6.28: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου YMESRADK (Αναμενόμενο M.B: 992,12, Βρέθηκε MB: 999,13±0,13).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 13,34 ml TFA παρουσία 0,35 ml H₂O, 0,35 ml EDT και 140μl TIS για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού

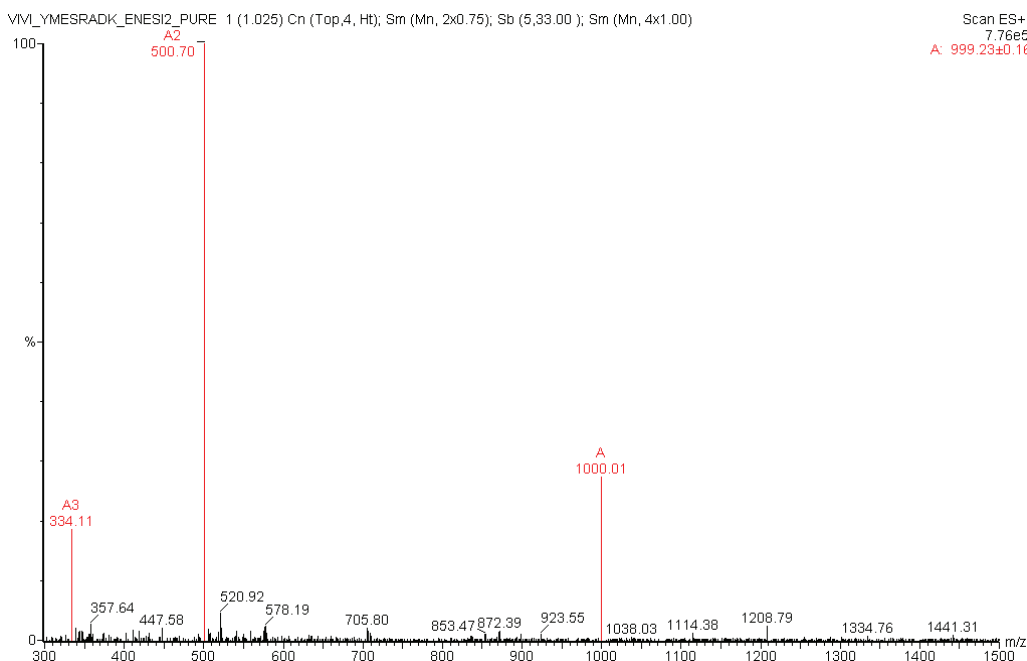
διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 253,6 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.28) (απόδοση αποκοπής: 80,05%).

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 62,81%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.29).



Σχήμα 6.29: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου YMESRADK.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.30) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 1000,01$ και $[M+2H^+]/2 = 500,70$ που αντιστοιχούν σε M.B: $999,23 \pm 0,16$, Αναμενόμενο M.B: 999,12.



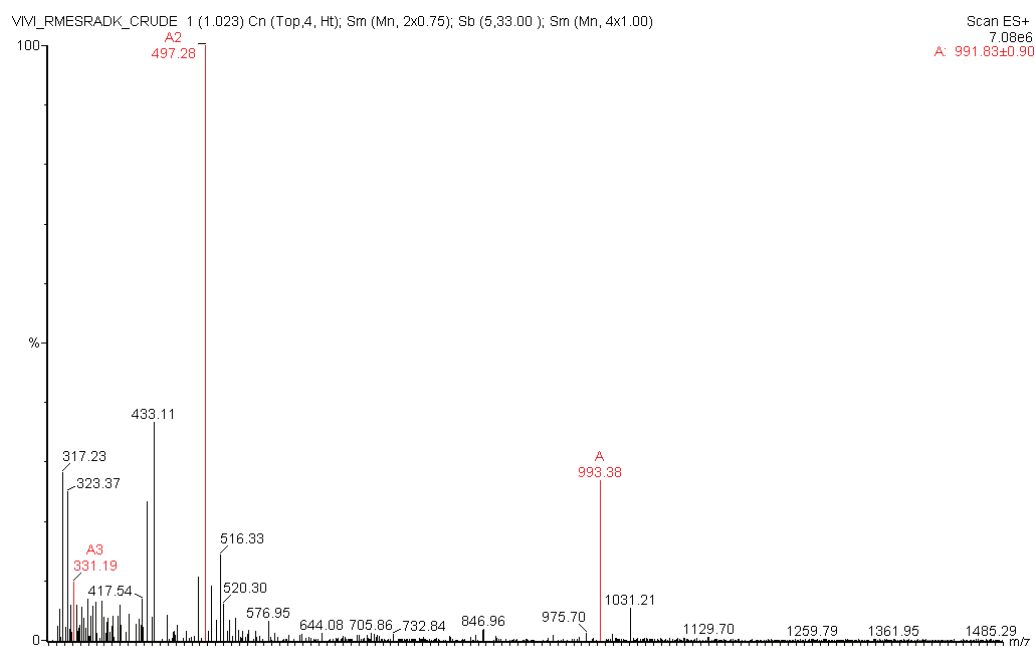
Σχήμα 6.30: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου YMESRADK.

6.1.1.11 Σύνθεση πεπτιδίου RMESRADK

Η σύνθεση του πεπτιδίου Arg-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-Lys-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADK-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*t*Bu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Lys(Boc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,37 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,25 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 681,05 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 4^{ου}, 6^{ου} και του 8^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 733,8mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 94,73%).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 13,9 ml TFA παρουσία 0,37 ml H₂O, 0,37 ml EDT και 147μl TIS για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και

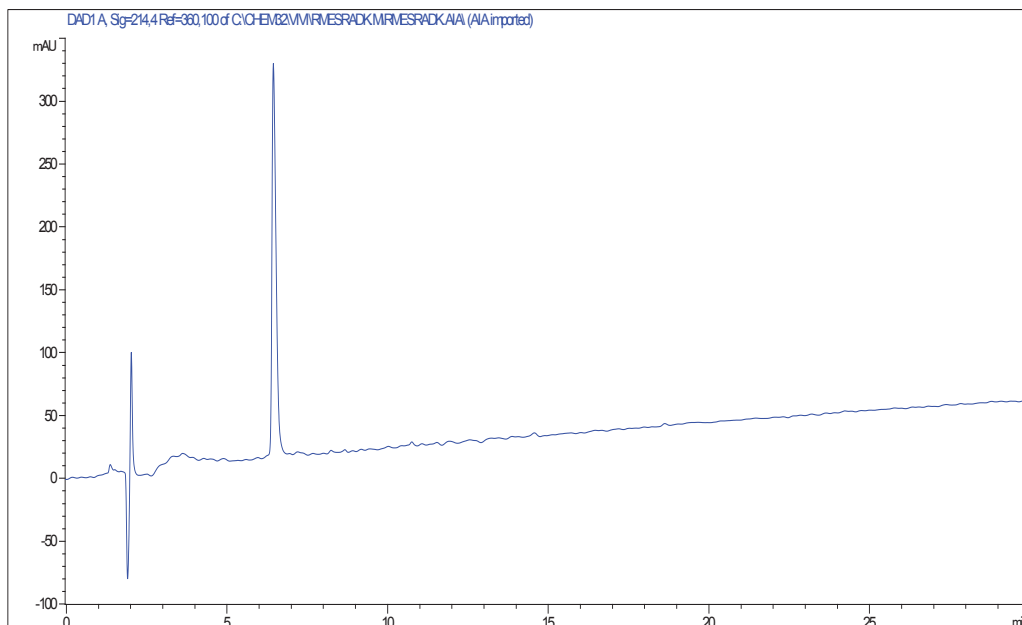
λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 320,34 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.31) (απόδοση αποκοπής: 93,78%).



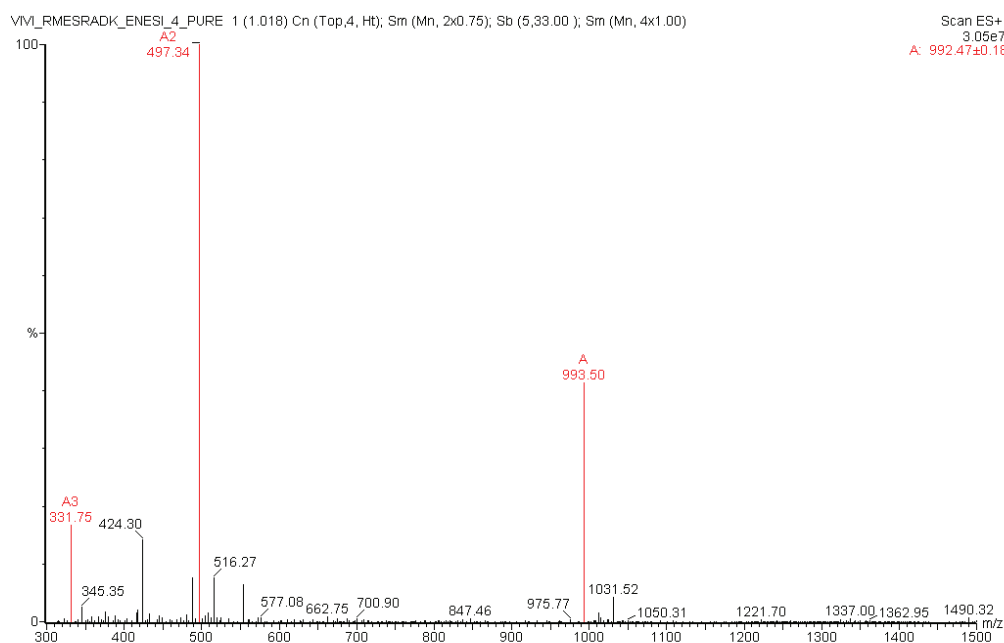
Σχήμα 6.31: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου RMESRADK (Αναμενόμενο M.B: 992,13, Βρέθηκε MB: 991,83±0,90).

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 66,15%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.32).

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.33) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 993,50$ και $[M+2H^+]/2 = 497,34$ που αντιστοιχούν σε M.B: 992,47±0,18, Αναμενόμενο M.B: 992,13.



Σχήμα 6.32: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου RMESRADK.



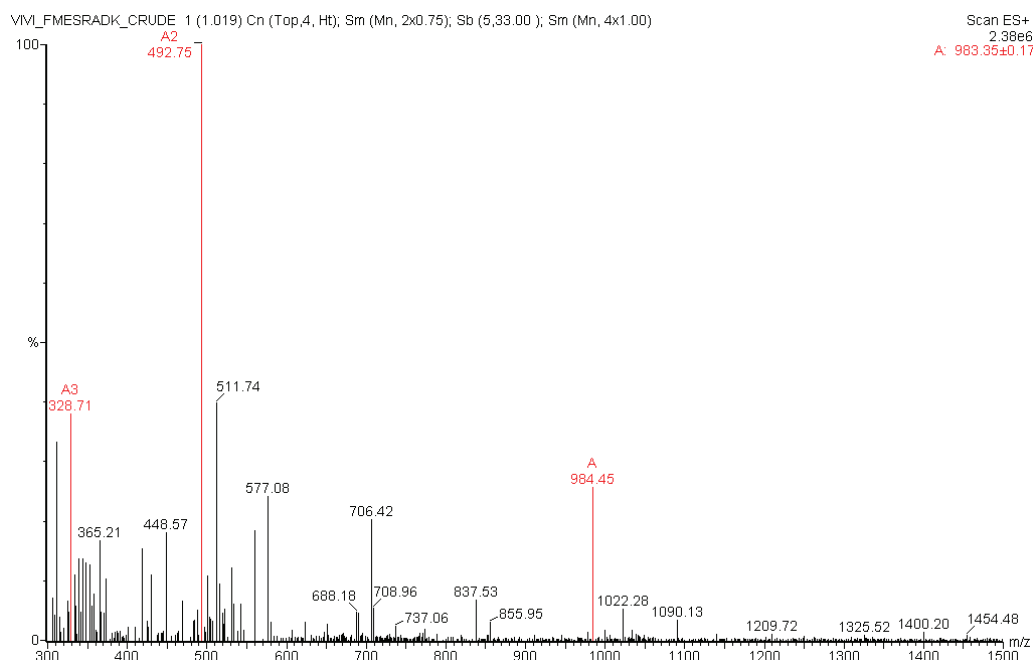
Σχήμα 6.33: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου RMESRADK.

6.1.1.12 Σύνθεση πεπτιδίου FMESRADK

Η σύνθεση του πεπτιδίου Phe-Met-Glu-Ser-Arg-Ala-Asp-Lys-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MESRADK-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*t*Bu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-

Lys(Boc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,37 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,25 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 686,49 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 4^{ου} και του 6^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 714,8 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 99,81%).

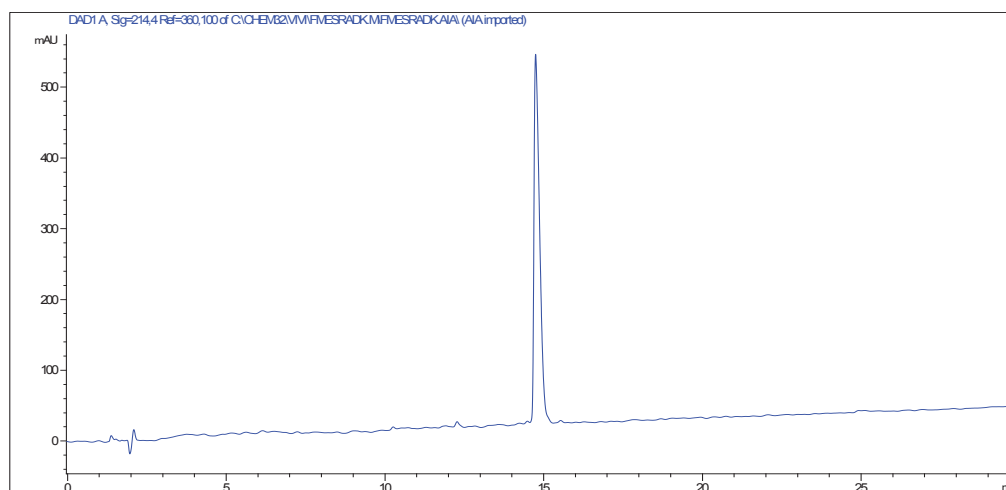
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 13,44 ml TFA παρουσία 0,36 ml H₂O, 0,36 ml EDT και 143 μl TIS για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 318,09 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.34) (απόδοση αποκοπής: 86,71%).



Σχήμα 6.34: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακατέργαστου πεπτιδίου FMESRADK (Αναμενόμενο M.B: 983,12, Βρέθηκε MB: 983,35±0,17).

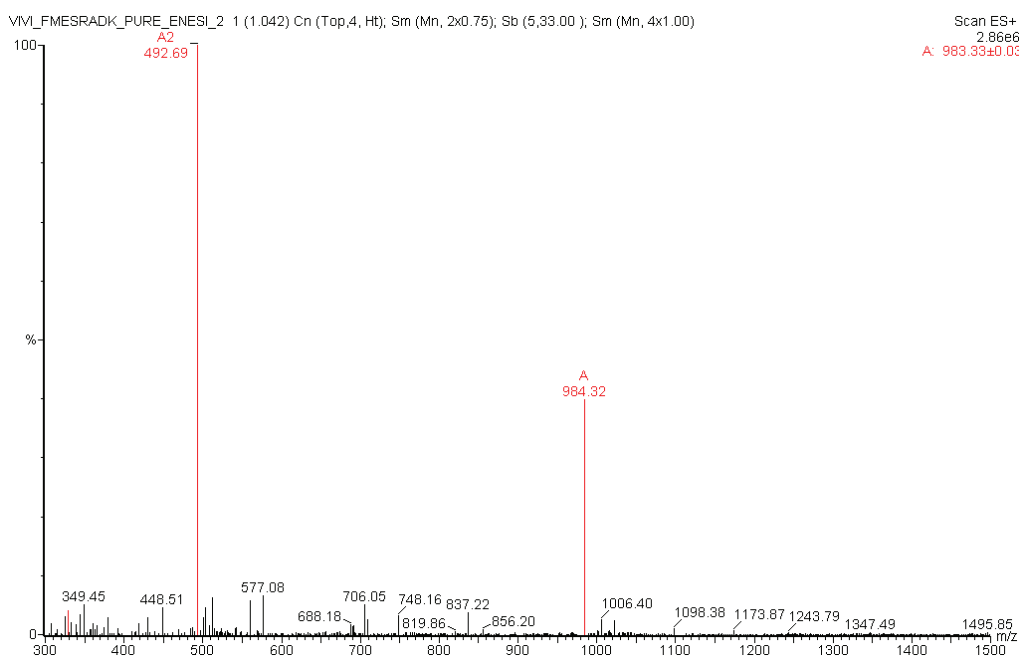
Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η

βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 60,31%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.35).



Σχήμα 6.35: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου FMESRADK.

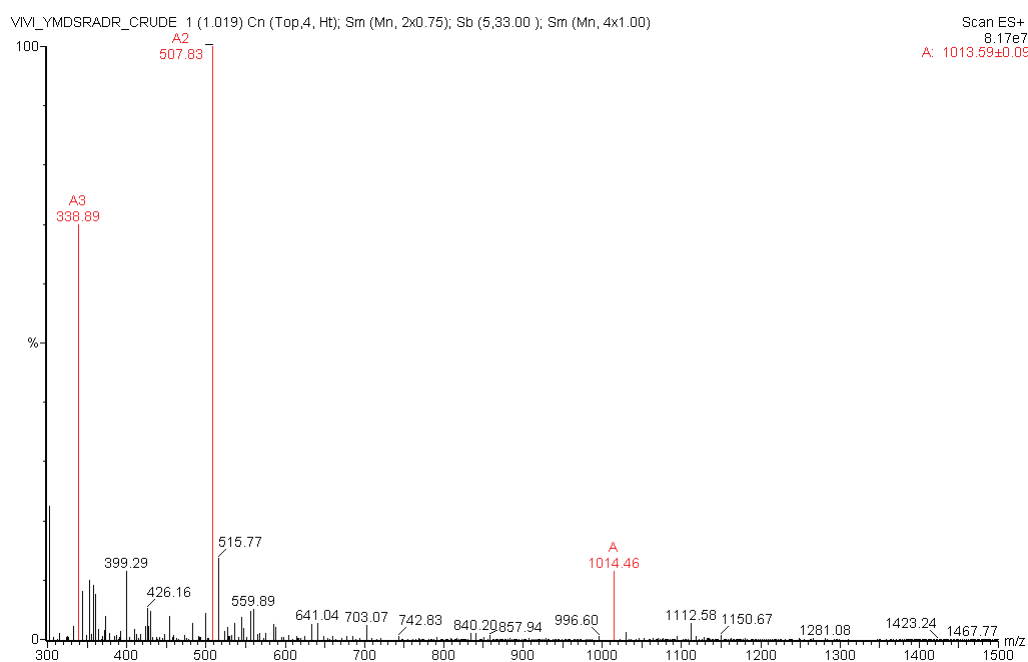
Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.36) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+ = 984,32$ και $[M+2H^+]/2 = 491,69$ που αντιστοιχούν σε M.B: $983,33 \pm 0,03$, Αναμενόμενο M.B: 983,12.



Σχήμα 6.36: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου FMESRADK.

6.1.1.13 Σύνθεση πεπτιδίου YMDSRADR

Η σύνθεση του πεπτιδίου Tyr-Met-Asp-Ser-Arg-Ala-Asp-Arg-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MDSRADR-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*t*Bu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Arg(Pmc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,54 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,25 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 456,98 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 4^{ου} και του 5^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 506,5 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 66,61%).

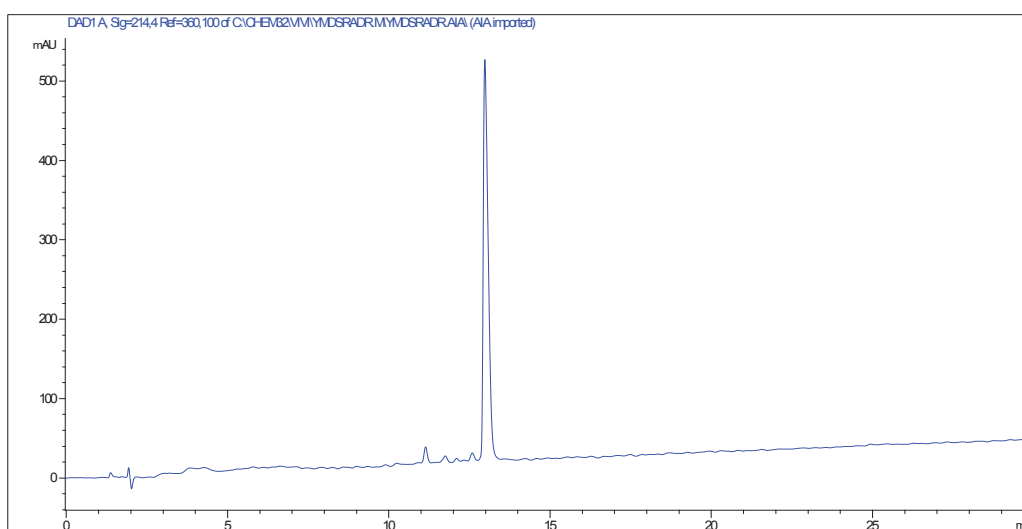


Σχήμα 6.37: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου YMDSRADR (Αναμενόμενο M.B: 1013,11, Βρέθηκε MB: 1013,59±0,09).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 9,52 ml TFA παρουσία 0,25 ml H₂O, 0,25 ml EDT και 101μl TIS για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού

διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτιδίο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 268,11 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.37) (απόδοση αποκοπής: 83,03%).

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 62,26%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.38).



Σχήμα 6.38: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου YMDSRADR.

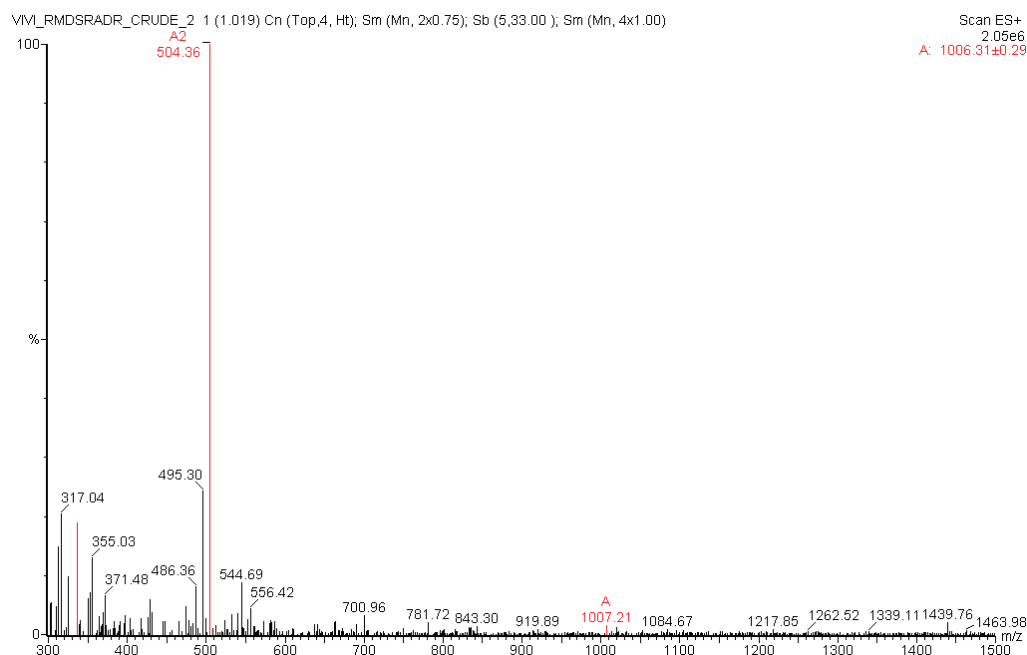


Σχήμα 6.39: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου YMDSRADR.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.39) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+=1014,71$ και $[M+2H^+]/2 = 507,96$ που αντιστοιχούν σε M.B: $1013,81\pm0,08$, Αναμενόμενο M.B: $1013,11$.

6.1.1.14 Σύνθεση πεπτιδίου RMDSRADR-OH

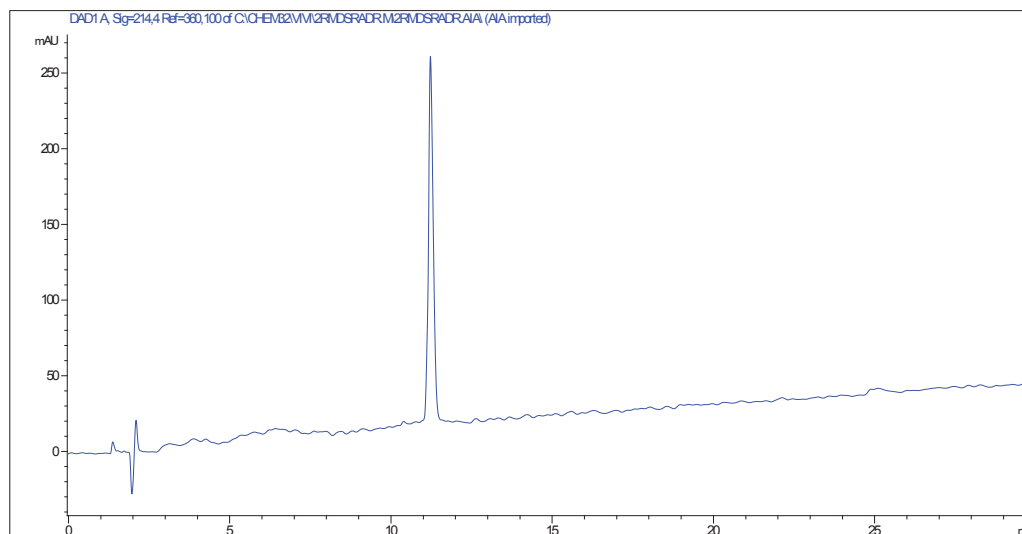
Η σύνθεση του πεπτιδίου Arg-Met-Asp-Ser-Arg-Ala-Asp-Arg-OH συνεχίστηκε με τμήμα της πεπτιδορητίνης MDSRADR-Wang Resin -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/*t*Bu στρατηγικής. Χρησιμοποιήθηκε η Fmoc-Arg(Pmc)-Wang ρητίνη με υποκατάσταση 0,54 mmol/g. Για τη σύνθεση 0,25 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 460,16 mg πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^{α} -Fmoc παράγωγα και οι προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων δίνονται στον Πίνακα 5.1. Η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνθηκε ως την ολοκλήρωσή της με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 5.1. Η σύζευξη του 4^{ου} και του 5^{ου} αμινοξέος πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπό κενό και ελήφθησαν 514,9 mg αυτής (απόδοση σύνθεσης: 68,60%).



Σχήμα 6.40: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου RMDSRADR (Αναμενόμενο M.B: 1006,12, Βρέθηκε MB: $1006,31\pm0,29$).

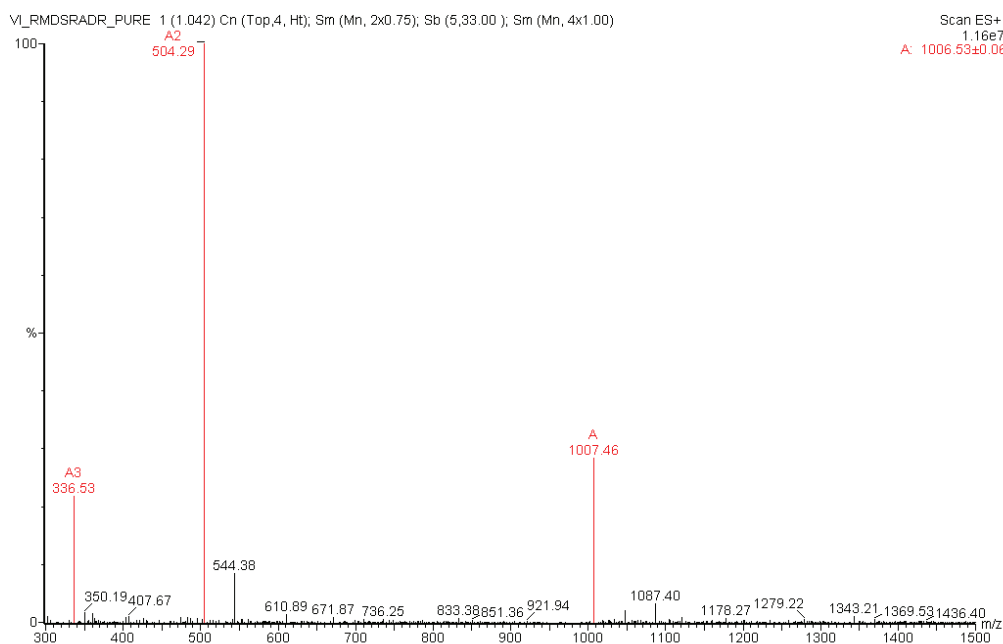
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 10,19 ml TFA παρουσία 0,27 ml H₂O, 0,27 ml EDT και 109 μl TIS για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και απομάκρυνση του TFA υπό κενό. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα. Μετά τη διήθηση το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Από τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 267,72 mg ακατέργαστου (crude) πεπτιδίου (Σχήμα 6.40) (απόδοση αποκοπής: 95,24%).

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική και RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40 (απόδοση καθαρισμού: 56,12%). Ενώ η καθαρότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.41).



Σχήμα 6.41: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου RMDSRADR.

Η ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS (Σχήμα 6.42) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+=1007,46$ και $[M+2H^+]/2 = 504,29$ που αντιστοιχούν σε M.B: $1006,53 \pm 0,06$, Αναμενόμενο M.B: 1006,12.

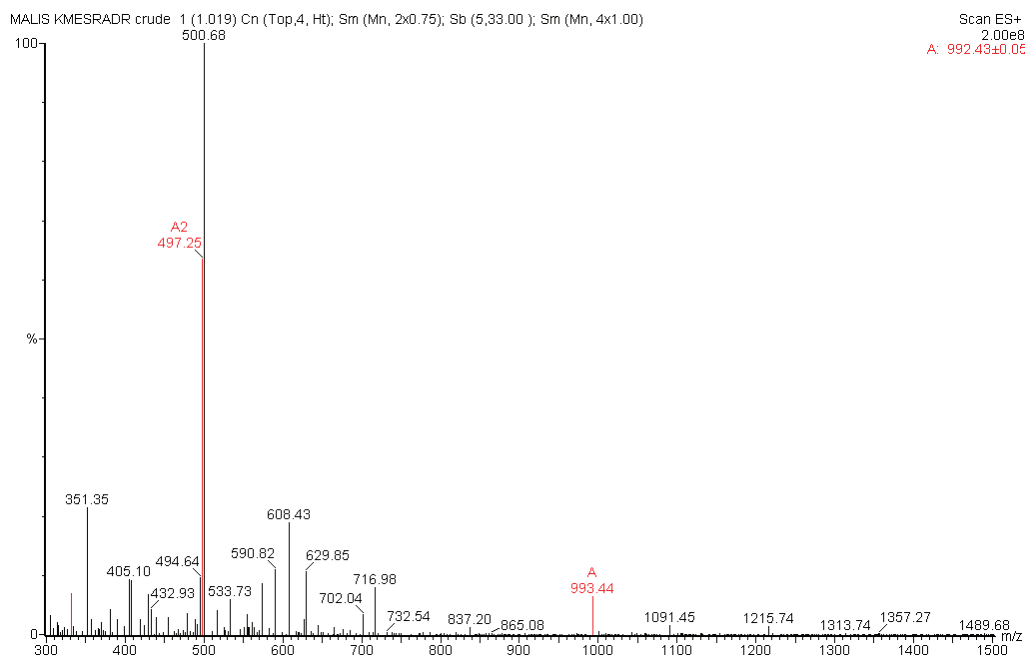


Σχήμα 6.42: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου RMDSRADR

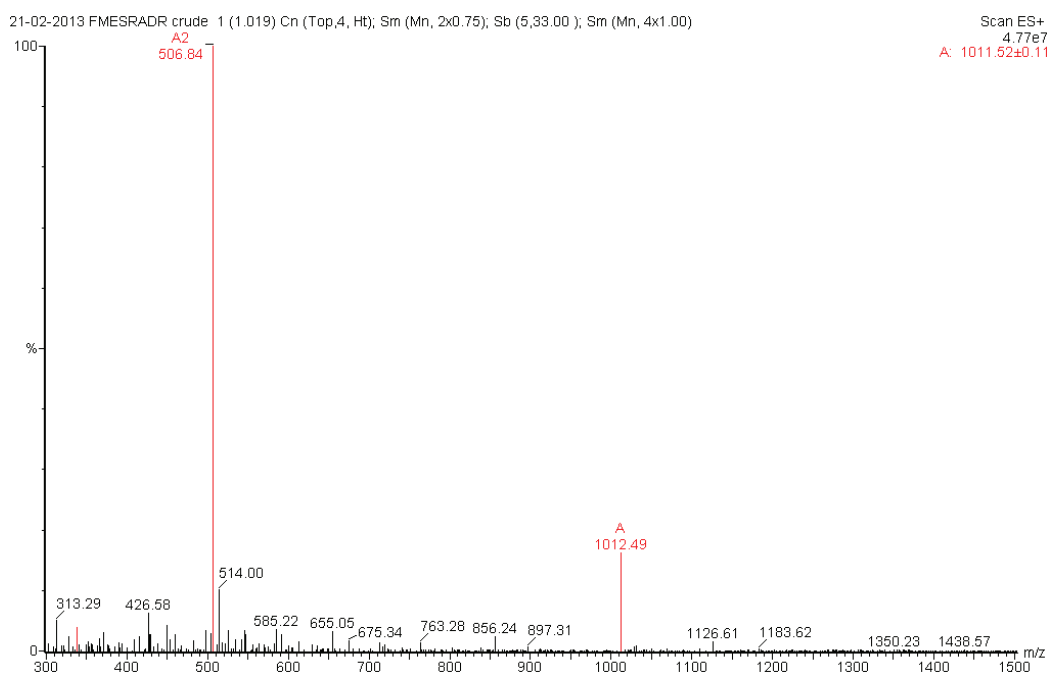
6.1.1.15 Σύνθεση πεπτιδίων KMESRADR και FMESRADR

Η σύνθεση των πεπτιδίων FMESRADR και KMESRADR πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων με τη συμβολή της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Ελένης Μαλισσιώβα. Παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας ESI-MS των ακάθαρτων πεπτιδίων (Σχήμα 6.43 και 6.44).

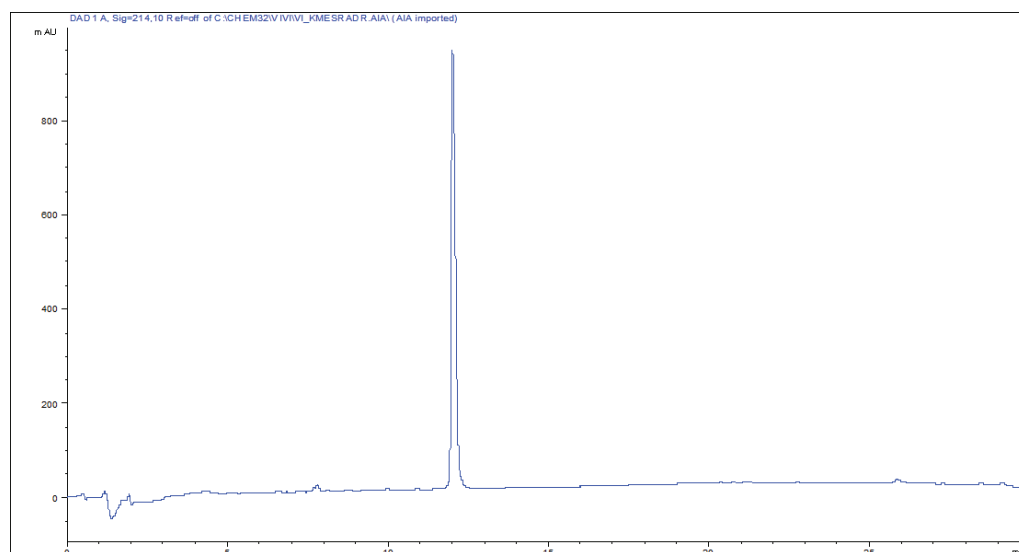
Ακολούθησε ο καθαρισμός των πεπτιδίων σε ημιπαρασκευαστική και RP-HPLC με σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA για 30 λεπτά. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40. Ενώ η καθαρότητα των τελικών προϊόντων ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκλουσης (Σχήμα 6.45 και 6.46).



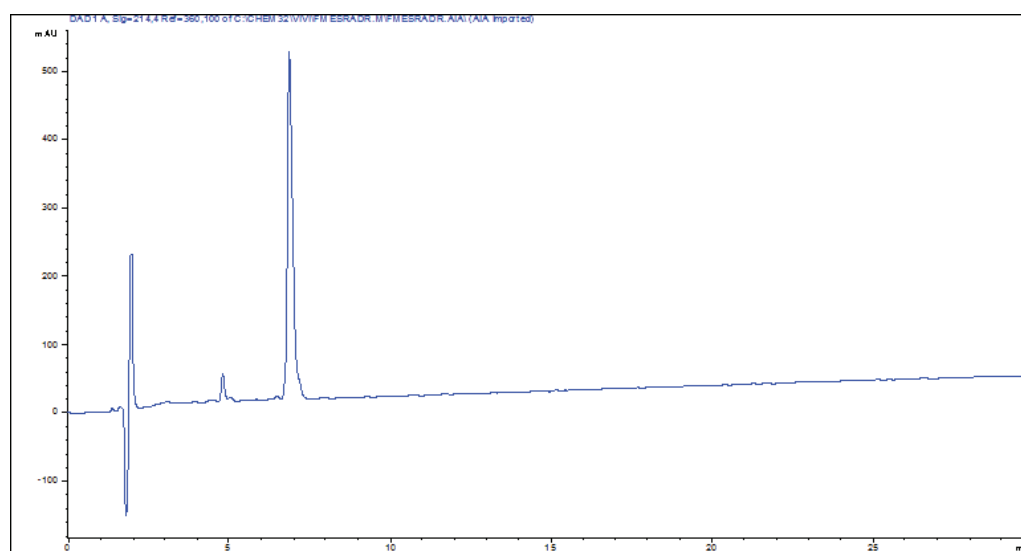
Σχήμα 6.43: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου KMESRADR (Αναμενόμενο M.B: 992,13, Βρέθηκε MB: 992,43±0,05).



Σχήμα 6.44: Φάσμα μάζας ESI-MS του ακάθαρτου πεπτιδίου FMESRADR (Αναμενόμενο M.B: 1011,13, Βρέθηκε MB: 1011,52±0,11).



Σχήμα 6.45: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου KMESRADR.



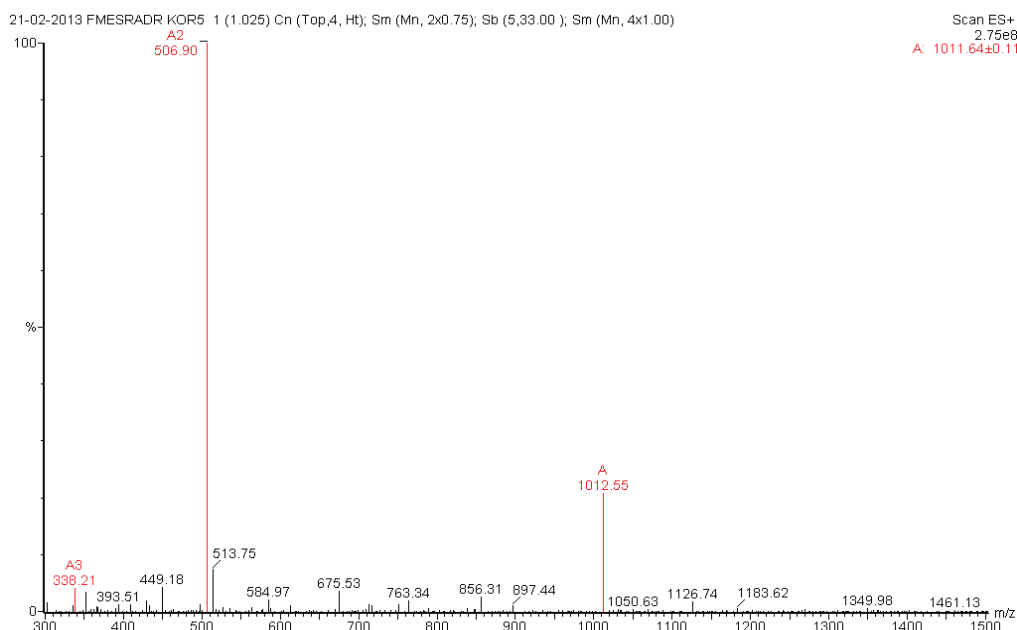
Σχήμα 6.46: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου FMESRADR

Η ταυτοποίηση των τελικών προϊόντων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το φάσμα ESI-MS του πεπτιδικού αναλόγου KMESRADR (Σχήμα 6.47) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+=993,75$ και $[M+2H^+]/2 = 497,41$ που αντιστοιχούν σε M.B: $992,77 \pm 0,03$, Αναμενόμενο M.B: 992,13.



Σχήμα 6.47: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου KMESRADR

Το φάσμα ESI-MS για το πεπτιδικό ανάλογο FMESRADR (Σχήμα 6.48) δείχνει την ανίχνευση των μοριακών ιόντων $M+H^+=1012,55$ και $[M+2H^+]/2 = 506,90$ που αντιστοιχούν σε M.B: $1011,64\pm0,11$, Αναμενόμενο M.B: 1011,13.

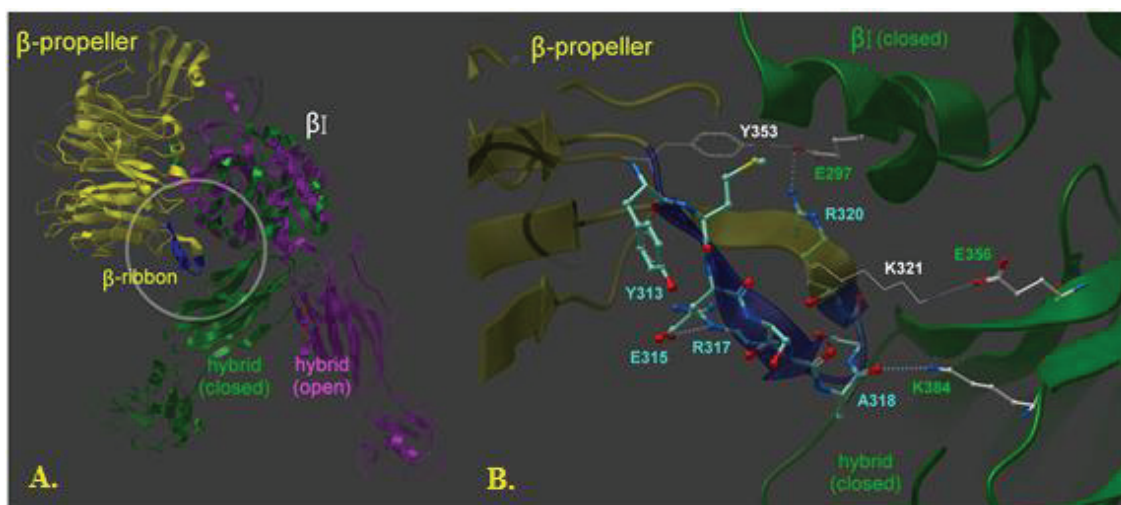


Σχήμα 6.48: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου FMESRADR

6.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ αΙΙbβ3

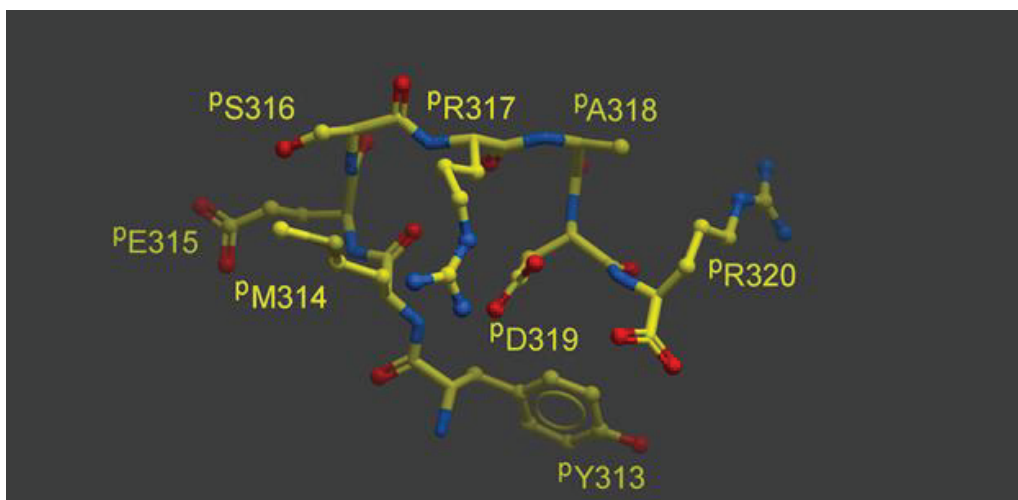
Τα πειράματα που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 6.2, πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο SGC του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης από τον Dr. Wen Hwa Lee.

Η αλληλουχία 313-320, εντοπίζεται στο βρόγχο (β-ribbon) που εκτείνεται μεταξύ των β2 και β3 αντιπαράλληλων πτυχών (strands) της W5 λεπίδας της περιοχής β-προπέλας της αΙΙb υπομονάδας [2]. Η κρυσταλλική δομή του υποδοχέα στην κεκαμμένη διαμόρφωση του, μας αποκάλυψε ότι η αλληλουχία 313-320 λειτουργεί ως φουρκέτα - «μανταλάκι» που συγκρατεί κοντά την αΙΙb περιοχή με τις βI, υβριδική και τις IGF3 και IGF4 της β3 υπομονάδας. Μέσα σε αυτό το βρόγχο δημιουργούνται 3 γέφυρες άλατος E315(αΙΙb)-R317(αΙΙb), R320(αΙΙb)-E297(β3), K321(αΙΙb)-E356(β3). Επίσης η καρβονυλική ομάδα του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων A318 και D319 (αΙΙb) αλληλεπιδρά με τη K 384 (β3). Παρατηρείται επίσης, μια επιπλέον αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο υπομονάδων, ηY353(αΙΙb) και E297(β3) (Σχήμα 6.49).

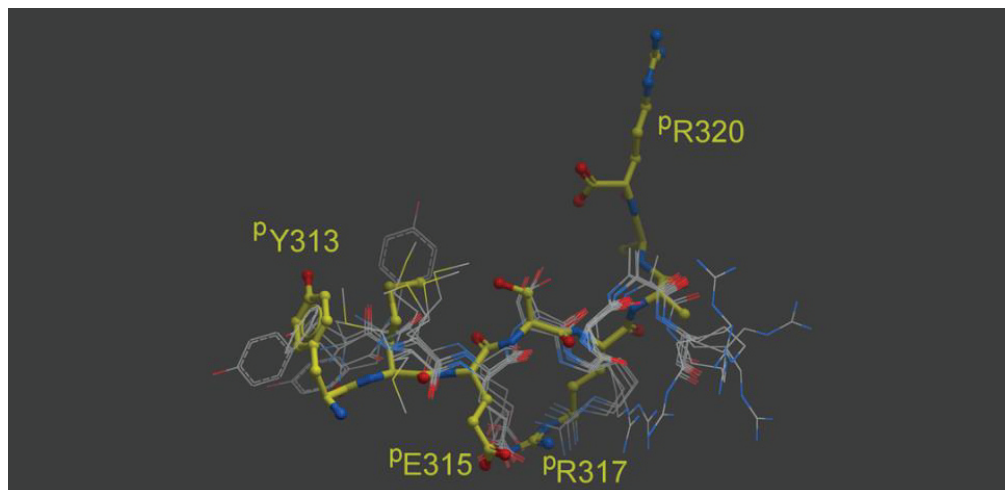


Σχήμα 6.49: Η αλληλουχία 313-320 YMESRADR κουμπώνει τις υπομονάδες αΙΙb και β3 στη κεκαμμένη διαμόρφωση του υποδοχέα. Α) Δυο διαμορφώσεις της β3 υπομονάδας έχουν παρατηρηθεί σε διαφορετικές κρυσταλλικές δομές: η κεκαμμένη (πράσινο χρώμα) και η εκτεταμένη (μωβ χρώμα), ενώ η β-προπέλα της αΙΙb υπομονάδας (κίτρινο) παραμένει αμετάβλητη. Με μπλέ χρώμα φαίνεται η φουρκέτα που σχηματίζεται στη β προπέλα της αΙΙb υπομονάδας (YMESRADR αλληλουχία). Β.) Η αλληλεπίδραση της αΙΙb φουρκέτας με τη β3 υπομονάδα στη κεκαμμένη διαμόρφωση. Η β προπέλα της αΙΙb (κίτρινο χρώμα) περιλαμβάνει την YMESRADR αλληλουχία (μπλε χρώμα) και την β3 υβριδική περιοχή (πράσινο χρώμα). Δημιουργούνται τρεις γέφυρες άλατος μεταξύ των δυο υπομονάδων E315(αΙΙb)-R317(αΙΙb), R320(αΙΙb)-E297(β3), K321(αΙΙb)-E356(β3). Στην ίδια περιοχή η β προπέλα της αΙΙb εμπλέκεται περεταίρω με την βI περιοχή της β3 υπομονάδας μέσω της αλληλεπίδρασης Y353(αΙΙb)- E297(β3). Τα αμινοξικά κατάλοιπα της YMESRADR αλληλουχίας φαίνονται με ραβδοειδή μορφή και τα άτομα C, O και N με γαλάζιο, κόκκινο και μπλε αντίστοιχα. Τα αμινοξέα της β3 υπομονάδας που εμπλέκονται φαίνονται με ραβδοειδή μορφή και τα άτομα C με άσπρο χρώμα.

Στο Σχήμα 6.50 απεικονίζεται η δομή του 8/πεπτιδίου YMESRADR, όπως καθορίστηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) [1]. Στο Σχήμα 6.51 απεικονίζεται το *in silico* μοντέλο του 8/πεπτιδίου στην διαμόρφωση που υιοθετεί ώστε να γεφυρώσει την βΙ και υβριδική περιοχή της β3 υπομονάδας (inhibitory conformation) σε σύγκριση με το πεπτίδιο YMESRAAR. Παρατηρούμε ότι η ενδομοριακή γέφυρα άλατος E315 – R317 διατηρείται, παρά τις διαφορές στη γεωμετρία των δυο δομών.



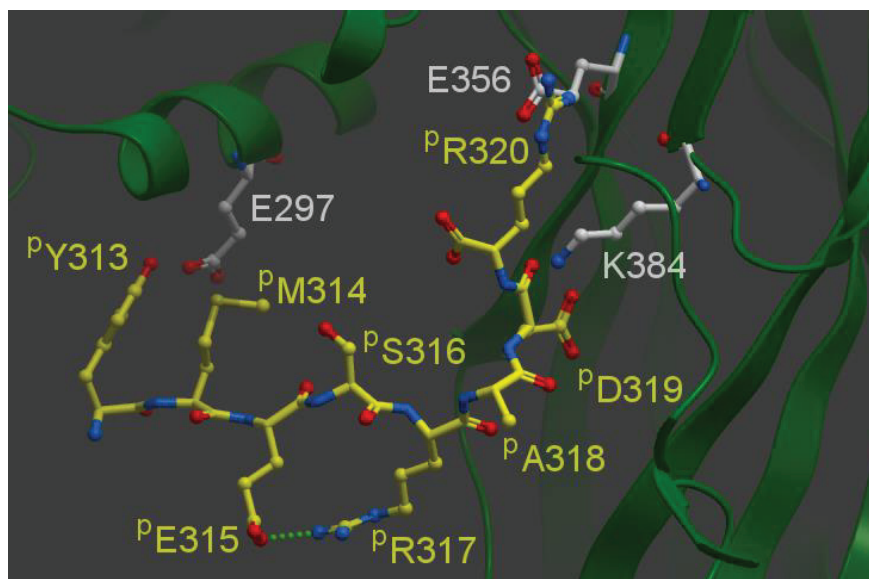
Σχήμα 6.50: Η δομή του 8/πεπτιδίου YMESRADR με χρήση NMR [1].



Σχήμα 6.51: *In silico* μοντέλο του 8/πεπτιδίου σε σύγκριση με διάφορες NMR δομές του πεπτιδίου YMESRAAR (γκρι χρώμα). Τα αμινοξικά κατάλοιπα της YMESRADR αλληλουχίας φαίνονται με ραβδοειδή μορφή ενώ τα άτομα C, O και N με γαλάζιο, κόκκινο και μπλε αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του 8/πεπτιδίου $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ με τον υποδοχέα στην κεκαμμένη διαμόρφωση έδειξαν ότι τα

προαναφερθέντα αμινοξικά κατάλοιπα από την β3 υπομονάδα που εμπλέκονταν στις γέφυρες άλατος παραμένουν και αλληλεπιδρούν με τα αμινοξικά κατάλοιπα του πεπτιδίου. Συγκεκριμένα οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι D319 (8/πεπτίδιο) - K384 (β3) και R320 (8/πεπτίδιο) - E356 (β3). Η νέα διαμόρφωση επιτρέπει μια νέα αλληλεπίδραση μεταξύ Y313 (8/πεπτίδιο) και E297 (β3) (Σχήμα 6.52). Οι 3 αυτές αλληλεπιδράσεις διατηρούν την ιντεγκρίνη στη κεκαμμένη (ανενεργή) διαμόρφωση της.



Σχήμα 6.52: Η διαμόρφωση που υιοθετεί το 8/πεπτίδιο ώστε να γεφυρώσει τις β1 και υβριδική περιοχή της β3 υπομονάδας. Το αμινοξύ Y313 του 8/πεπτιδίου τώρα αντικαθιστά το αμινοξύ Y353 (Σχήμα 7.49) στην αλληλεπίδραση με την β1 περιοχή. Η ενδομοριακή γέφυρα άλατος E315 – R317 διατηρείται.

6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ YMESRADR ΚΑΙ YMESRAAR ΣΤΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ CHO ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΙΝΩΔΟΓΟΝΟ, ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΡΟΗΣ

Η μετάλλαξη (κωδικοποίηση) των CHO κυττάρων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Laboratoire de Biologie et Physiologie Intégrée, (CNRS/GDRE-ITI) του Πανεπιστημίου του Λουξεμβούργου από την Dr. Elisabeth Schaffner-Reckinger και την καθηγήτρια Nelly Kieffer. Ενώ η ανακαλλιέργεια των CHO κύτταρων και τα πειράματα προσκόλλησης στο ινωδογόνο, υπό συνθήκες ροής πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Inserm UMR_S 765 της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Université Paris Descartes υπό την επίβλεψη της Dr Christilla Bachelot-Loza.

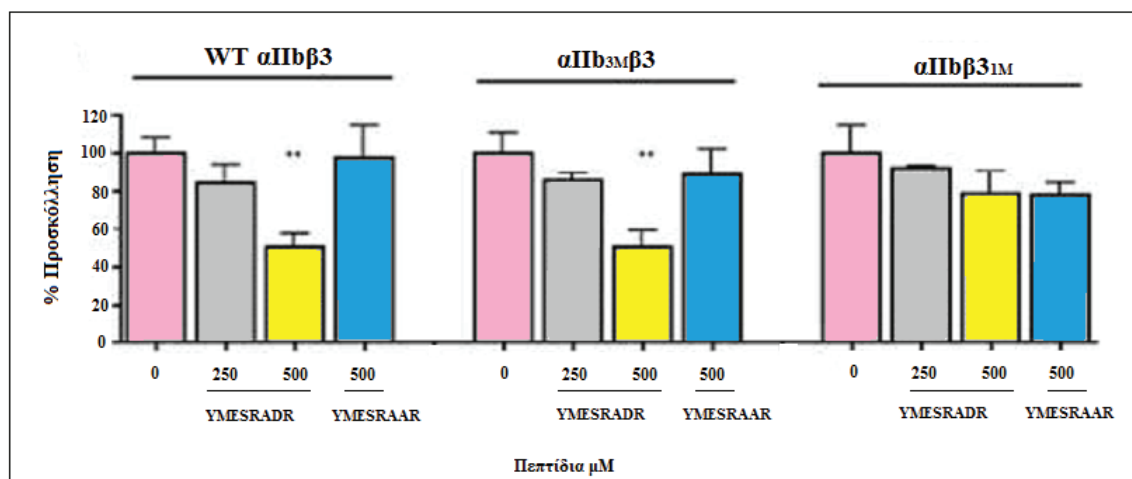
CHO κύτταρα με άγριου τύπου (WT) ή με μεταλλαγμένη ιντεγκρίνη [α IIbR317A/D319A/R320A (α IIb_{3M}) και β 3K384A (β 3_{1M})], εγχύθηκαν σε γυάλινες πλάκες

επιστρωμένες με ινωδογόνο (10 mg/ml) υπό ταχύτητες ροής 60-200 $\mu\text{l}/\text{min}$ (ρυθμός διάτμησης 30-100 s^{-1}), με σκοπό να επιλεχθεί ο ρυθμός διάτμησης για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν οι ρυθμοί διάτμησης 30-100 s^{-1} , διότι έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης σχετίζεται με σταθεροποίηση της πρόσδεσης της με το ινωδογόνο σε αυτούς τους ρυθμούς διάτμησης [3].

Πίνακας 6.2: Προσκόλληση των CHO κυττάρων σε ρυθμούς διάτμησης από 30 s^{-1} έως 100 s^{-1} . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm\text{SD}$ και με $n \geq 3$.

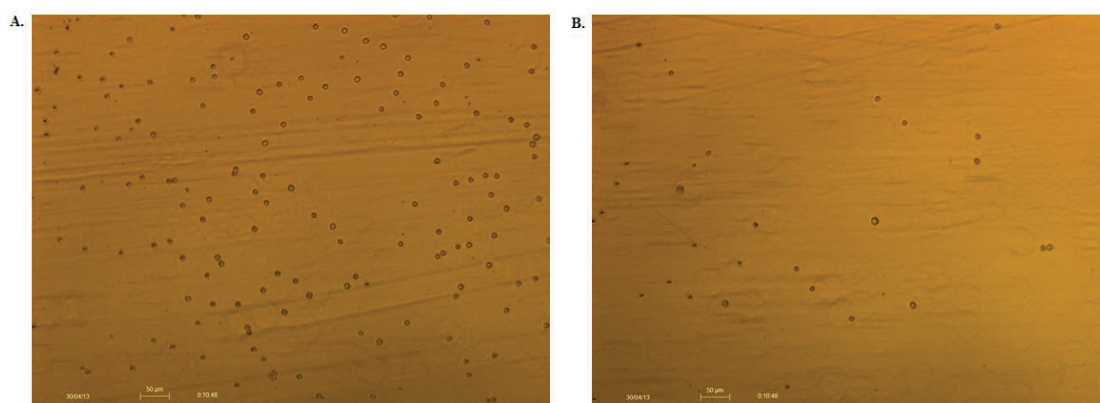
CHO κύτταρα (κύτταρα/ml)	Κλώνος	Ρυθμός διάτμησης (s^{-1})	Προσκολλημένα κύτταρα
$1,25 \times 10^6$	$\alpha\text{Ib}\beta 3$ (WT) $\alpha\text{Ib}_{3M}\beta 3$ $\alpha\text{Ib}\beta 3_{1M}$	30	65 $\pm$ 15
			70 $\pm$ 10
			80 $\pm$ 5
	$\alpha\text{Ib}\beta 3$ (WT) $\alpha\text{Ib}_{3M}\beta 3$ $\alpha\text{Ib}\beta 3_{1M}$	50	25 $\pm$ 10
			35 $\pm$ 5
			49 $\pm$ 10
	$\alpha\text{Ib}\beta 3$ (WT) $\alpha\text{Ib}_{3M}\beta 3$ $\alpha\text{Ib}\beta 3_{1M}$	75	10 $\pm$ 5
			20 $\pm$ 10
			39 $\pm$ 8
	$\alpha\text{Ib}\beta 3$ (WT) $\alpha\text{Ib}_{3M}\beta 3$ $\alpha\text{Ib}\beta 3_{1M}$	100	-
			-
			20 $\pm$ 6

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 6.2, η αύξηση του ρυθμού διάτμησης οδηγεί σε ελάττωση της προσκόλλησης, ενώ στα 100 s^{-1} μόνο τα κύτταρα που εκφράζουν την $\alpha\text{Ib}\beta 3_{1M}$ ιντεγκρίνη εμφάνισαν προσκόλληση χαμηλού ποσοστού. Επομένως για τα πειράματα επίδρασης των πεπτιδικών αναλόγων στη προσκόλληση CHO κυττάρων υπό ροή επιλέχτηκε ο ρυθμός διάτμησης 30 s^{-1} , σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.3.2.6. Αρχικά τα κύτταρα επώαστηκαν για 20 λεπτά με τα πεπτίδια YMESRADR και YMESRAAR σε συγκεντρώσεις 250 και 500 μM (Σχήμα 6.53).



Σχήμα 6.53: Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού προσκόλλησης των CHO κυττάρων, τα οποία εκφράζουν την άγριου τύπου ιντεγκρίνη (WT), είτε τις μεταλλαγμένες ιντεγκρίνες αIb3Mβ3 και αIbβ31M έπειτα από έγχυσή τους στο ινωδογόνο υπό ροή 30 s⁻¹. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος προσκολλημένων κυττάρων/πεδίο (παίρνοντας υπόψιν 10 πεδία). Ως control χρησιμοποιήθηκε τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με τον διαλύτη των πεπτιδίων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± SEM, n=6 και **p<0,01.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το YMESRADR (500μM) ανέστειλε σημαντικά την προσκόλληση των CHO κυττάρων που εκφράζουν την άγριου τύπου (WT) ιντεγκρίνη και την αIb3M μεταλλαγμένη ιντεγκρίνη στο ινωδογόνο, ενώ δεν ανέστειλε την προσκόλληση των κυττάρων που εκφράζουν την β31M μεταλλαγμένη ιντεγκρίνη. Ενώ το πεπτίδιο YMESRAAR (500μM) δεν εμφάνισε καμία επίδραση στη προσκόλληση των CHO κυττάρων που εκφράζουν είτε την άγριου τύπου είτε την μεταλλαγμένη ιντεγκρίνη (Σχήμα 6.53).

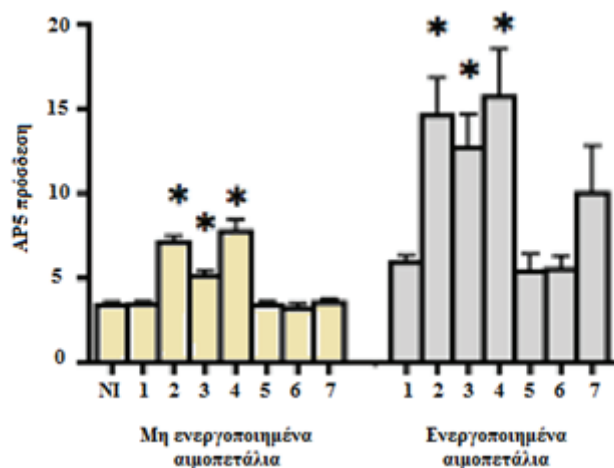


Σχήμα 6.54: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες προσκόλλησης CHO κυττάρων που εκφράζουν τον άγριο τύπο ιντεγκρίνης (WT). Α. Τα κύτταρα έχουν επωαστεί με τον διαλύτη των πεπτιδίων (PBS) και Β. Τα κύτταρα έχουν επωαστεί με τον YMESRADR (500 μM).

6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΗΤΡΙΚΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ YMESRADR ΣΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΤΩΝ LIBS (Ligand Induced Binding Sites)

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 6.4 πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Inserm UMR_S 765 της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Université Paris Descartes υπό την επίβλεψη της Dr Christilla Bachelot-Loza και σύμφωνα με τη πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.5.2.2.

Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι το YMESRADR αλληλεπιδρά απευθείας με τη β3 υπομονάδα, εξετάστηκε αν έχει την δυνατότητα να επάγει την έκθεση (LIBS) νέων επιτόπων στη β3 υπομονάδα. Οι επίτοποι LIBS θεωρούνται δείκτες για διάφορες διαμορφωτικές αλλαγές της αIIbβ3 κατά την μετατροπή της από την ανενεργή στην ενεργή διαμόρφωση της [4]. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η πρόσδεση του αντισώματος AP5 με κυτταρομετρία ροής και βρέθηκε ότι το YMESRADR επάγει τη πρόσδεση του AP5 σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι το RGDS. Όμως, σε ενεργοποιημένα με θρομβίνη αιμοπετάλια η δράση του YMESRADR βρέθηκε στα ίδια επίπεδα με το RGDS (Σχήμα 6.55).



Σχήμα 6.55: Πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια ($2,5 \times 10^8$ αιμ/ml) επώστηκαν είτε με NaCl 0,9% (κοντρόλ) είτε με τα πεπτίδια (500μM) για 5 λεπτά. Ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη (0,1 U/ml). Πρόσδεση του αντισώματος AP5, όπου 1: Control, 2: RGDS, 3: YMESRADR 4: RGDS +YMESRADR, 5: YMESAADR, 6: YMESRAAR και 7:YMESRADA σε ενεργοποιημένα ή μη αιμοπετάλια. Η πρόσδεση του AP5 ποσοτικοποιήθηκε με την ένταση φθορισμού του αντιαντισώματος φυκοερυθρίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM, n=6.

6.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ αΙΙb ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ 313-320 ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ αΙΙbβ3

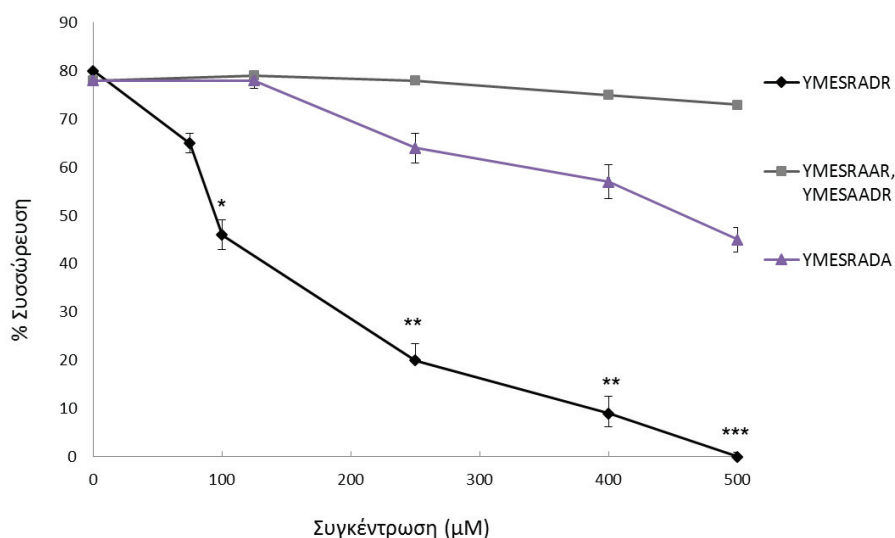
6.5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΕ ΑΛΑ 8/ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 6.5.1 πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Inserm UMR_S 765 της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Université Paris Descartes με τη συμβολή της Δρ. Γκουρογιάννη Αλεξίας, υπό την επίβλεψη της Dr Christilla Bachelot-Loza. Μελετήθηκαν τα πεπτίδια που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.3 με πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια, σύμφωνα με τη πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.4.3.4.

Τα τροποποιημένα με Ala πεπτίδια στις θέσεις 317 και 319 και 320 δεν εμφάνισαν καμία δραστικότητα ως προς την αιμοπεταλιακή συσσώρευση στη συγκέντρωση 500 μM . Το τροποποιημένο με Ala πεπτίδιο στη θέση 320, έδειξε καλύτερη ανασταλτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα πεπτιδικά ανάλογα όχι όμως και σε σχέση με το μητρικό ανάλογο (Πίνακας 6.3, Σχήμα 6.56).

Πίνακας 6.3: Ανασταλτική δράση των τροποποιημένων με Ala πεπτιδικών αναλόγων της αΙΙb υπομονάδας σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή $\pm$ SD και με $n=3$.

Πεπτίδιο	Αγωνιστής	Συγκέντρωση (μM)	Αναστολή (%)
YMESRADR	Θρομβίνη 0,2 U/ml	500	100
		250	73 ±5
YMESAADR		500	0
YMESRAAR		500	0
YMESRADA		500	42 ± 2
		250	20 ± 3



Σχήμα 6.56: Επίδραση των πεπτιδίων YMESRADR, YMESAADR, YMESRAAR και YMESRADA στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο $\pm$ SD τριών πειραμάτων, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6.5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ α IIb ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ 313-320

6.5.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΕ ΠΛΥΜΕΝΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 6.5.2 και 6.6 πραγματοποιήθηκαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Κλινικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Στυλιανή Παπαδάκη, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημόκριτου Τσουκάτου.

Οι παράγοντες του πλάσματος μπορούν να επηρεάσουν σημαντική λειτουργία των αιμοπεταλίων και για το λόγο αυτό αρχικά τα πεπτιδικά ανάλογα 6-21 (Πίνακας 6.1) μελετήθηκαν σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια, δηλαδή αιμοπετάλια ελεύθερα από τα στοιχεία του πλάσματος. Ακολουθούν οι καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων (Σχήμα 6.57-6.62), χαρακτηριστικές καμπύλες συσσώρευσης αντιπροσωπευτικών πεπτιδίων (Σχήμα 6.63-6.65), ο συγκεντρωτικός πίνακας ανασταλτικής δράσης σε χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις των πεπτιδικών αναλόγων (Πίνακας 6.4) και ο πίνακας με τις τιμές IC_{50} (Πίνακας 6.5).

Πίνακας 6.4: Συγκεντρωτικός πίνακας ανασταλτικής δράσης των πεπτιδικών αναλόγων σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή $\pm$ SD και με $n \geq 3$.

	Πεπτίδιο	Αγωνιστής	Συγκέντρωση (μ M)	Αναστολή (%)
1.	YMESRADR	Θρομβίνη 0,2 U/ml	500 62,5	90 $\pm$ 10 10 $\pm$ 1
2.	Ac-YMESRADR		500 62,5	84 $\pm$ 6 20 $\pm$ 5
3.	yMESRADR		500 62,5	78 $\pm$ 2 11 $\pm$ 3
4.	RMESRADR		500 62,5	86 $\pm$ 1 40 $\pm$ 9
5.	HMESRADR		500 62,5	85 $\pm$ 2 17 $\pm$ 3
6.	KMESRADR		500 62,5	92 $\pm$ 2 36 $\pm$ 7
7.	FMESRADR		500 62,5	93 $\pm$ 1 22 $\pm$ 1
8.	Ac-FMESRADR		500 62,5	87 $\pm$ 4 22 $\pm$ 7
9.	MESRADR		500 62,5	82 $\pm$ 2 20 $\pm$ 2
10.	YMESRAD H		500 62,5	34 $\pm$ 13 0
11.	YMESRAD K		500 62,5	87 $\pm$ 4 26 $\pm$ 9
12.	RMESRADH		500 62,5	32 $\pm$ 9 0
13.	FMESRADH		500 62,5	24 $\pm$ 6 0
14.	RMESRADK		500 62,5	75 $\pm$ 4 4 $\pm$ 4
15.	FMESRADK		500 62,5	85 $\pm$ 5 9 $\pm$ 5
16.	YM D SRADR		500 62,5	83 $\pm$ 5 19 $\pm$ 5
17.	RMDSRADR		500 62,5	87 $\pm$ 4 30 $\pm$ 4

Πίνακας 6.5: Συγκεντρωτικός πίνακας IC₅₀ των πεπτιδικών αναλόγων σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ±SD και με n≥3.

Πεπτίδιο	IC ₅₀ (μM)	Πεπτίδιο	IC ₅₀ (μM)
1. YMESRADR	120±20		
2. Ac -YMESRADR	125±15	10. YMESRAD H	>500
3. y MESRADR	170±15	11. YMESRAD K	185±30
4. R MESRADR	65±15	12. R MESRAD H	>500
5. H MESRADR	155±25	13. F MESRAD H	>500
6. K MESRADR	75±25	14. R MESRAD K	205±25
7. F MESRADR	100±20	15. F MESRAD K	225±30
8. Ac-F MESRADR	145±30	16. YM D SRADR	115±15
9. MESRADR	135±5	17. RMD SRADR	110±30

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα πεπτιδικά ανάλογα **1-9** προκύπτει ότι:

- Από την αντικατάσταση του 1^{ου} αμινοξέος (Y³¹³) του μητρικού πεπτιδίου με φαινυλαλανίνη (F), λυσίνη (K) ή αργινίνη (R) προκύπτουν ανάλογα που εμφανίζουν ισχυρότερη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από το YMESRADR.
- Η αλλαγή της στερεοχημείας της τυροσίνης (Y³¹³) από L- σε D- διαμόρφωση ή αντικατάσταση της με ιστιδίνη (H), μειώνει την ανασταλτική δράση του μητρικού αναλόγου.
- Τα πεπτιδικά ανάλογα στα οποία ακετυλιώθηκε ή απομακρύνθηκε το 1^ο αμινοξύ εμφάνισαν αναστολή της συσσώρευσης ίδιας τάξεως με το μητρικό ανάλογο YMESRADR.
- Το πεπτιδικό ανάλογο RMESRADR αποτελεί έναν πολύ ισχυρό αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα πεπτιδικά ανάλογα **1**, **10** και **11** προκύπτει ότι:

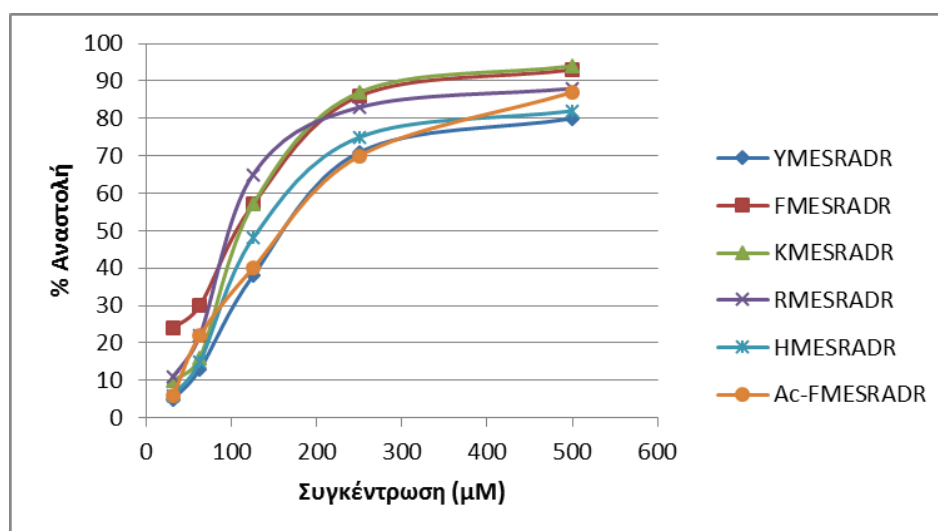
- Αντικατάσταση του 8ου αμινοξέος (R³²⁰) με ιστιδίνη (H) επιφέρει σημαντικότερη μείωση της ανασταλτικής δράσης των αναλόγων.
- Ενώ, η αντικατάσταση της R³²⁰ με λυσίνη (K) είχε σαν αποτέλεσμα μικρή μείωση της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδικών αναλόγων.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα πεπτιδικά ανάλογα **1** και **12 - 15** προκύπτει ότι:

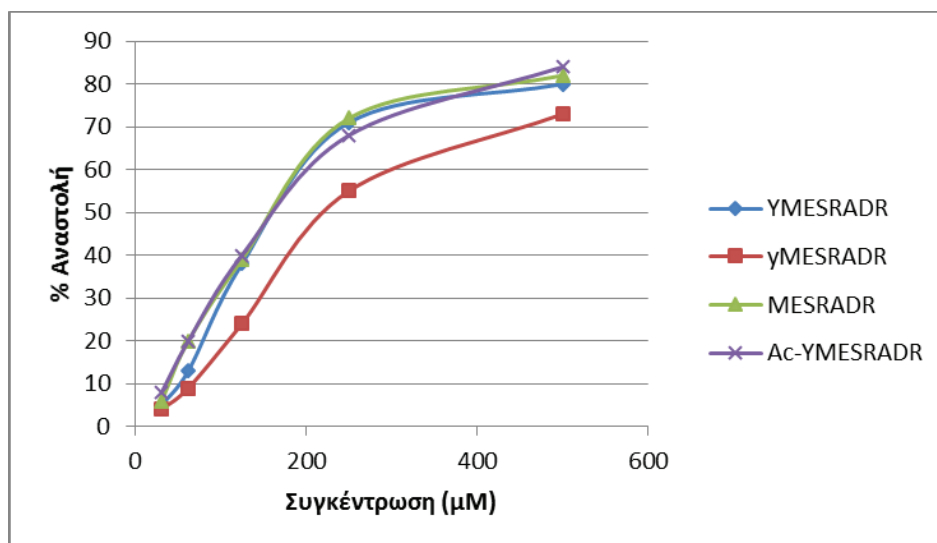
- Από την ταυτόχρονη αντικατάσταση του 1^{ου} αμινοξέος (Y) με φαινυλαλανίνη (F) ή αργινίνη (R) και του 8^{ου} αμινοξέος (R) με λυσίνη (K), προκύπτουν ανάλογα τα οποία αναστέλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, αλλά ασθενέστερα σε σχέση με το μητρικό ανάλογο YMESRADR.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα πεπτιδικά ανάλογα **1**, **16** και **17** προκύπτει ότι:

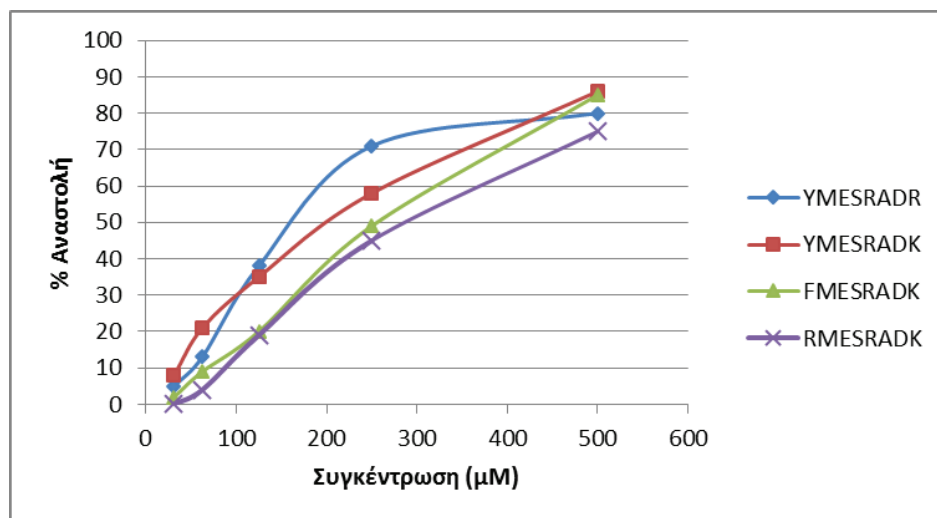
- Αντικατάσταση του 3^{ου} αμινοξέος του μητρικού αναλόγου (E³¹⁵) με ασπαρτικό οξύ (D), καθώς και την ταυτόχρονη αντικατάσταση του 1^{ου} (Y³¹³) και του 3^{ου} (E³¹⁵) αμινοξέος με αργινίνη (R) και ασπαρτικό (D) αντίστοιχα, προκύπτουν ανάλογα τα οποία εμφάνισαν παρόμοια ανασταλτική δράση με το μητρικό ανάλογο YMESRADR



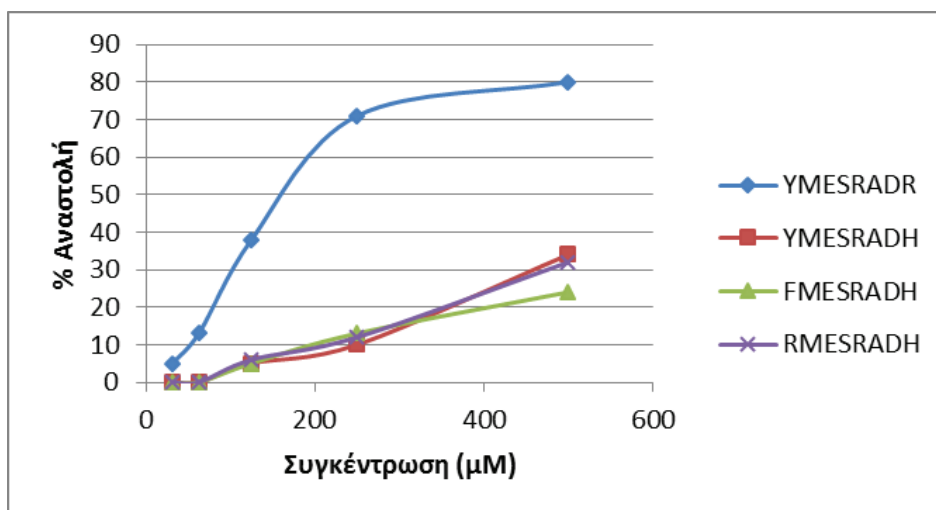
Σχήμα 6.57: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων FMESRADR, KMESRADR, RMESRADR, HMESRADR, Ac-FMESRADR και του μητρικού αναλόγου YMESRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



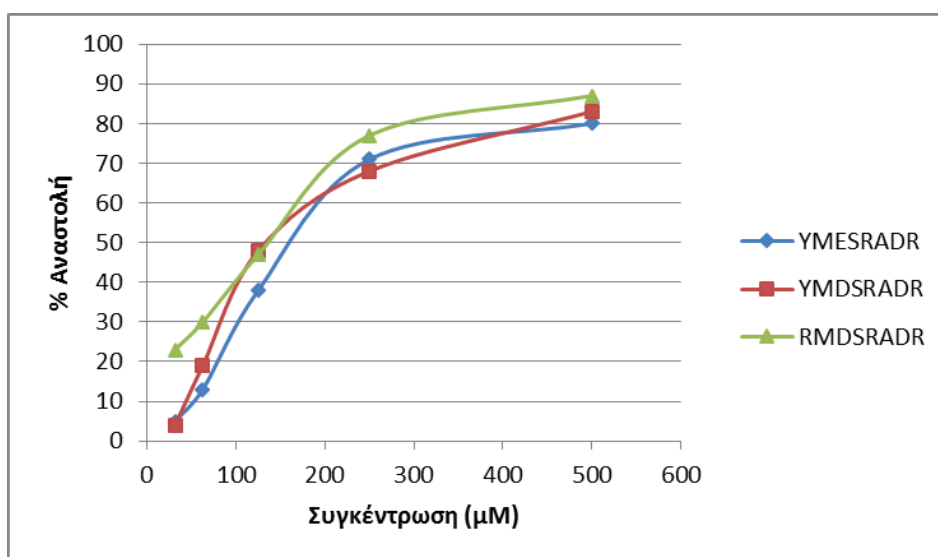
Σχήμα 6.58: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων γMESRADR, MESRADR, Ac-YMESRADR και του μητρικού αναλόγου YMESRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



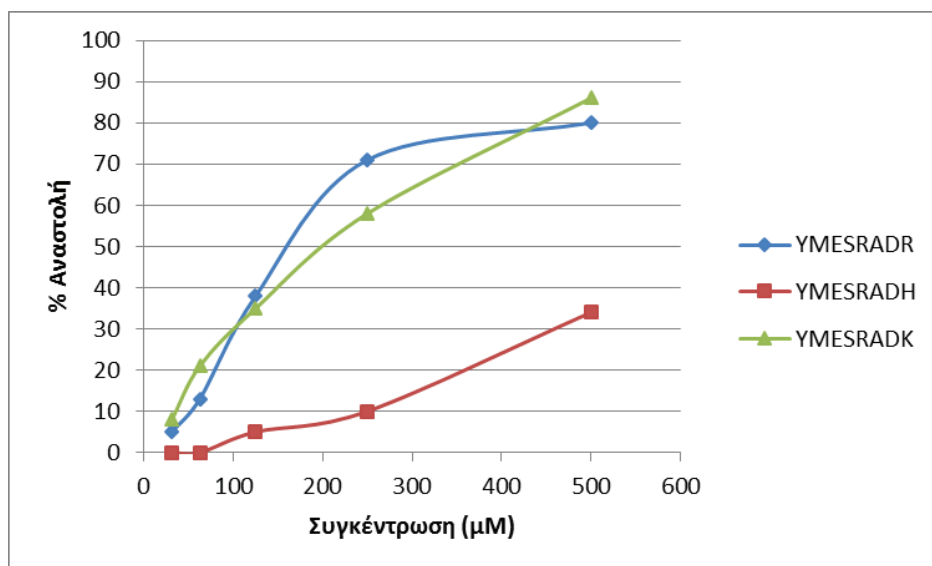
Σχήμα 6.59: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων YMESRADK, FMESRADK, RMESRADK και του μητρικού αναλόγου YMESRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



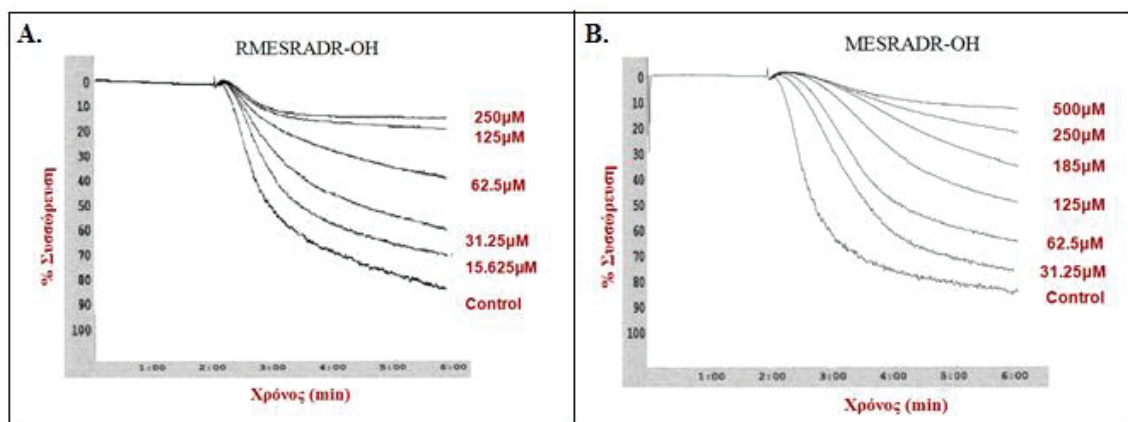
Σχήμα 6.60: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων YMESRADH, FMESRADH, RMESRADH και του μητρικού αναλόγου YMESRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



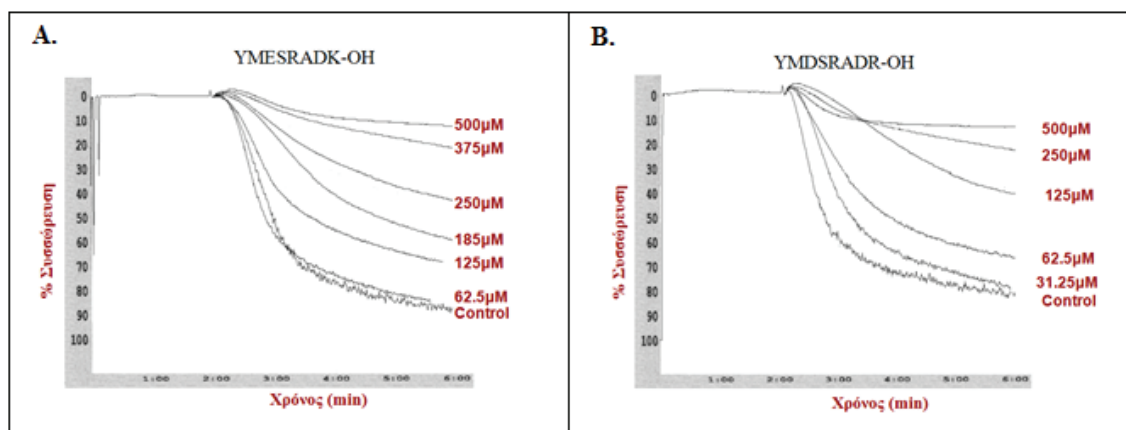
Σχήμα 6.61: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων YMDSRADR, RMDSRADR και του μητρικού αναλόγου YMESRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



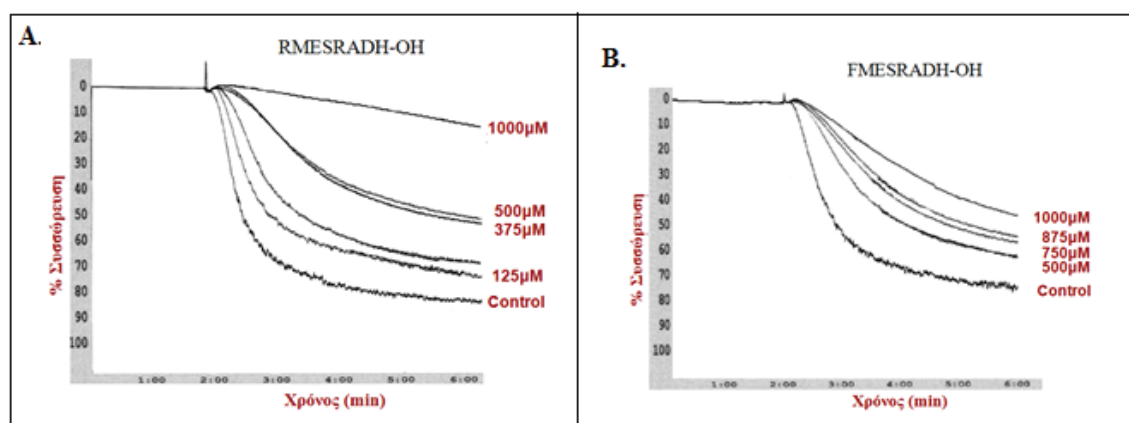
Σχήμα 6.62: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων YMESRADH, YMESRADK και του μητρικού αναλόγου YMESRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή $\pm$ SD τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



Σχήμα 6.63: Καμπύλες συσώρευσης υπό τη δράση του RMESRADR (A) και MESRADR (B). Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσώρευσης ανθρώπινων πλυμένων αιμοπεταλίων, όπου εμφανίζεται η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Σχήμα 6.64: Καμπύλες συσσώρευσης υπό τη δράση του YMESRADK (A) και YMDSRADR (B). Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης ανθρώπινων πλυμένων αιμοπεταλίων, όπου εμφανίζεται η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Σχήμα 6.65: Καμπύλες συσσώρευσης υπό τη δράση του RMESRADH (A) και FMESRADH (B). Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης ανθρώπινων πλυμένων αιμοπεταλίων, όπου εμφανίζεται η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

6.5.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΠΛΟΥΣΙΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (PRP)

Μετά την μελέτη της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδικών αναλόγων 6-21 (Πίνακας 6.1) σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια, μελετήθηκε η δράση τους σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια ανθρώπου (PRP) ώστε να προσομοιαστούν *in vivo* συνθήκες. Ακολουθούν οι καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων (Σχήμα 6.66 - 6.71), οι χαρακτηριστικές καμπύλες συσσώρευσης αντιπροσωπευτικών πεπτιδίων (Σχήμα 6.72-6.74), ο συγκεντρωτικός πίνακας με τις τιμές ανασταλτικής δράσης σε χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις των πεπτιδικών αναλόγων (Πίνακας 6.6) και ο πίνακας με τις τιμές IC₅₀ (Πίνακας 6.7).

Πίνακας 6.6: Συγκεντρωτικός πίνακας ανασταλτικής δράσης των πεπτιδικών αναλόγων σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια ανθρώπου (PRP). Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή $\pm$ SD και με $n \geq 3$.

	Πεπτίδιο	Αγωνιστής	Συγκέντρωση (μ M)	Αναστολή (%)
1.	YMESRADR	ADP (5 μ M).	500	68 $\pm$ 5
			250	33 $\pm$ 5
2.	Ac-YMESRADR		500	35 $\pm$ 4
			250	15 $\pm$ 4
3.	yMESRADR		500	26 $\pm$ 4
			250	4 $\pm$ 2
4.	RMESRADR		500	66 $\pm$ 4
			250	33 $\pm$ 5
5.	HMESRADR		500	46 $\pm$ 4
			250	22 $\pm$ 4
6.	KMESRADR		500	54 $\pm$ 2
			250	22 $\pm$ 1
7.	FMESRADR		500	43 $\pm$ 4
			250	11 $\pm$ 2
8.	Ac-FMESRADR		500	49 $\pm$ 3
			250	9 $\pm$ 2
9.	MESRADR		500	46 $\pm$ 6
			250	21 $\pm$ 1
10.	YMESRADH		500	40 $\pm$ 8
			250	13 $\pm$ 1
11.	YMESRADK		500	21 $\pm$ 8
			250	4 $\pm$ 4
12.	RMESRADH		500	10 $\pm$ 5
			250	2 $\pm$ 1
13.	FMESRADH		500	25 $\pm$ 6
			250	7 $\pm$ 4
14.	RMESRADK		500	61 $\pm$ 7
			250	19 $\pm$ 2
15.	FMESRADK		500	49 $\pm$ 13
			250	10 $\pm$ 0
16.	YMDSRADR		500	60 $\pm$ 2
			250	30 $\pm$ 2
17.	RMDSRADR		500	76 $\pm$ 5
			250	29 $\pm$ 6

Πίνακας 6.7: Συγκεντρωτικός πίνακας IC₅₀ των πεπτιδικών αναλόγων σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια ανθρώπου (PRP). Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ±SD και με n≥3.

Πεπτίδιο	IC ₅₀ (μM)	Πεπτίδιο	IC ₅₀ (μM)
1. YMESRADR	305±5		
2. Ac -YMESRADR	>500	10. YMESRAD H	410±10
3. y MESRADR	>500	11. YMESRAD K	>500
4. R MESRADR	280±30	12. R MESRAD H	>500
5. H MESRADR	430±30	13. F MESRAD H	>500
6. K MESRADR	430±10	14. R MESRAD K	380±40
7. F MESRADR	420±20	15. F MESRAD K	420±20
8. Ac-F MESRADR	450±20	16. YM D SRADR	350±25
9. MESRADR	410±10	17. RMD SRADR	305±20

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα πεπτιδικά ανάλογα **1-9** προκύπτει ότι:

- Η αντικατάσταση του 1^{ου} αμινοξέος (Y³¹³) με φαινυλαλανίνη (F), λυσίνη (K), ιστιδίνη (His), με τυροσίνη D στερεοχημείας (y), ακετυλίωση του 1^{ου} αμινοξέος, με ακετυλιωμένη φαινυλαλανίνη (Ac-F) ή αφαίρεση του 1^{ου} αμινοξέος, οδηγεί σε ανάλογα με ασθενέστερη ανασταλτική δράση.
- Το πεπτιδικό ανάλογο RMESRADR (IC₅₀: 280 ± 30 μM). εμφανίζει ισχυρότερη ανασταλτική δράση από αυτή του μητρικού αναλόγου YMESRADR, της ίδιας όμως τάξεως.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα πεπτιδικά ανάλογα **1, 10** και **11** προκύπτει ότι:

- Αντικατάσταση του 8ου αμινοξέος (R³²⁰) με λυσίνη (K) ή με ιστιδίνη (H) οδηγεί σε ανάλογα τα οποία αναστέλλουν ασθενέστερα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση.

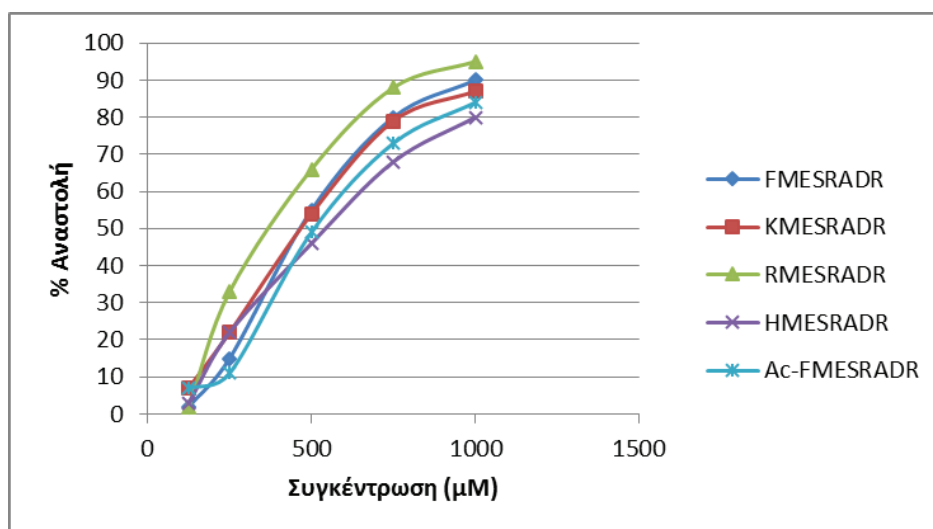
Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα πεπτιδικά ανάλογα **1, και 12 - 15** προκύπτει ότι:

- Από την ταυτόχρονη αντικατάσταση του 1^{ου} αμινοξέος (Y) με φαινυλαλανίνη (F) ή αργινίνη (R) και του 8^{ου} αμινοξέος (R) με ιστιδίνη (H), προκύπτουν ανάλογα με μειωμένη ανασταλτική δράση,
- Από την ταυτόχρονη αντικατάσταση του 1^{ου} αμινοξέος (Y) με φαινυλαλανίνη (F) και του 8^{ου} αμινοξέος (R) με λυσίνη (K) προκύπτει ανάλογο με ασθενέστερη ανασταλτική δράση.

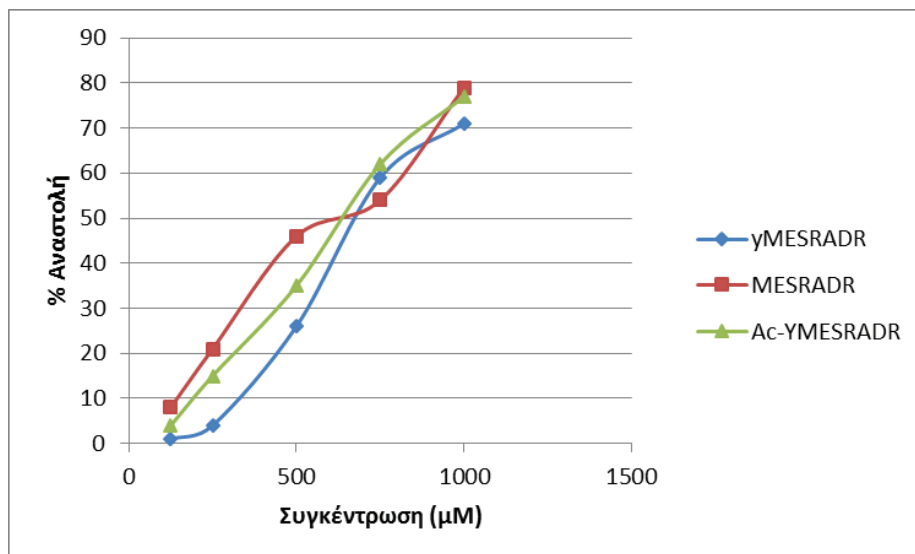
- Από την ταυτόχρονη αντικατάσταση του 1^{ου} αμινοξέος (Y) με αργινίνη (R) και του 8^{ου} αμινοξέος (R) με λυσίνη (K), προκύπτει ανάλογο με ασθενέστερη δράση από το μητρικό ανάλογο, της ίδιας τάξεως.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα πεπτιδικά ανάλογα **1**, **16** και **17** προκύπτει ότι:

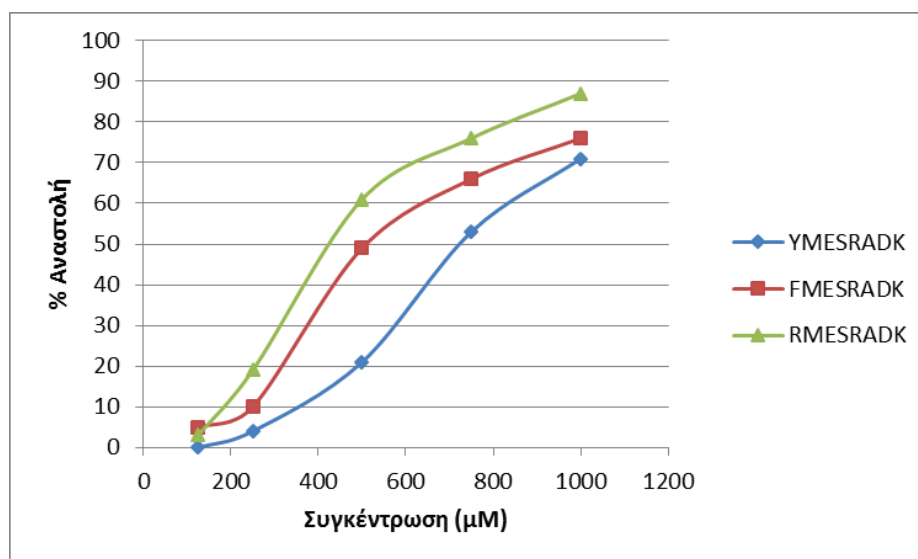
- Αντικατάσταση του 3^{ου} αμινοξέος του μητρικού αναλόγου (E³¹⁵) με ασπαρτικό οξύ (D), καθώς και την ταυτόχρονη αντικατάσταση του 1^{ου} (Y³¹³) και του 3^{ου} (E³¹⁵) αμινοξέος με αργινίνη (R) και ασπαρτικό (D) αντίστοιχα, προκύπτουν ανάλογα τα οποία εμφανίζουν ανασταλτική δράση παρόμοια με αυτή του μητρικού αναλόγου YMESRADR.



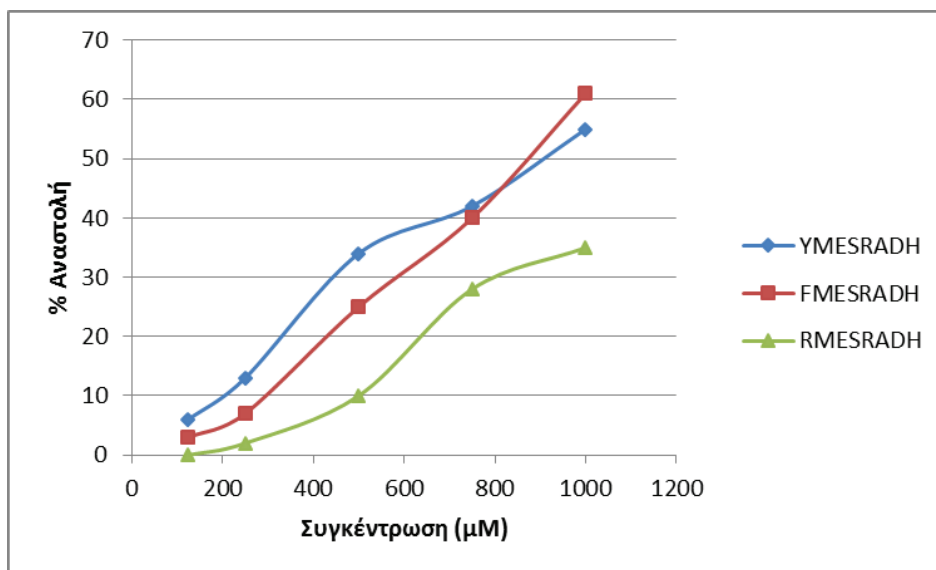
Σχήμα 6.66: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων FMESRADR, KMESRADR, RMESRADR, HMESRADR και Ac-FMESRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε PRP. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



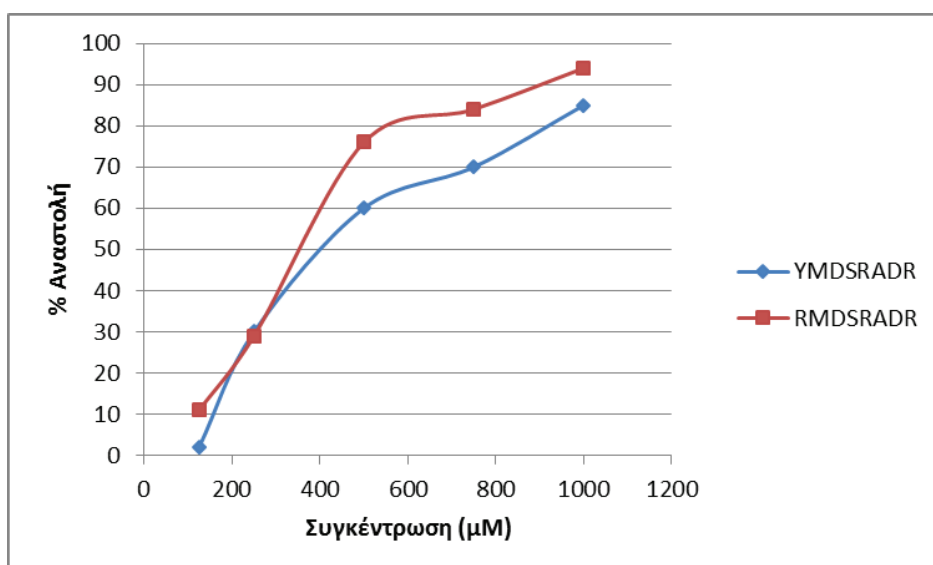
Σχήμα 6.67: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων γMESRADR, MESRADR και Ac-YMESRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε PRP. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



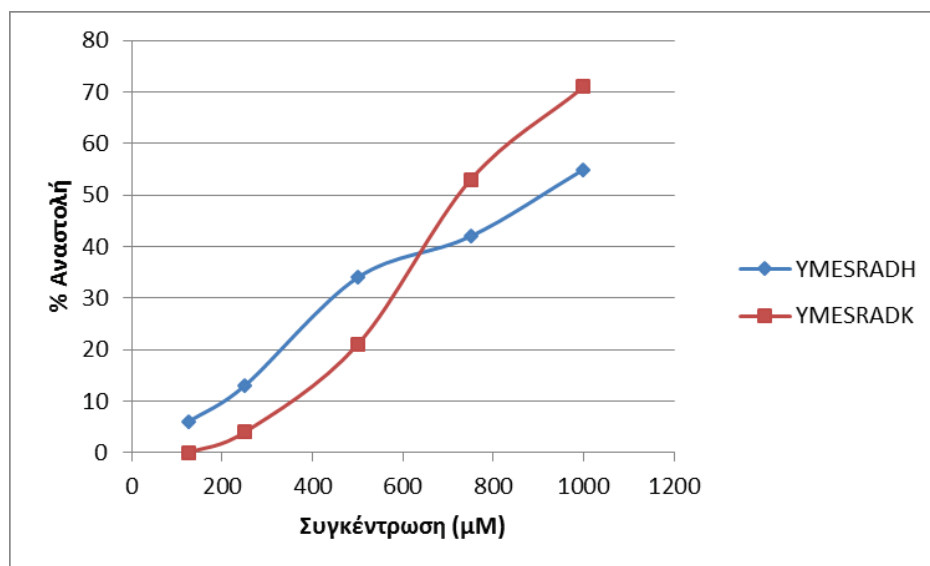
Σχήμα 6.68: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων YMESRADK, FMESRADK και RMESRADK σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε PRP. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



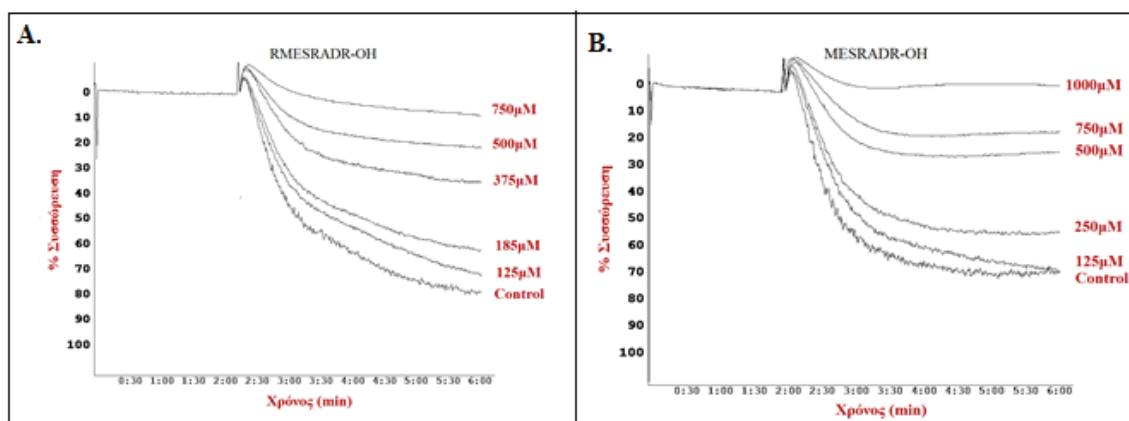
Σχήμα 6.69: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων YMESRADH, FMESRADH και RMESRADH σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε PRP. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



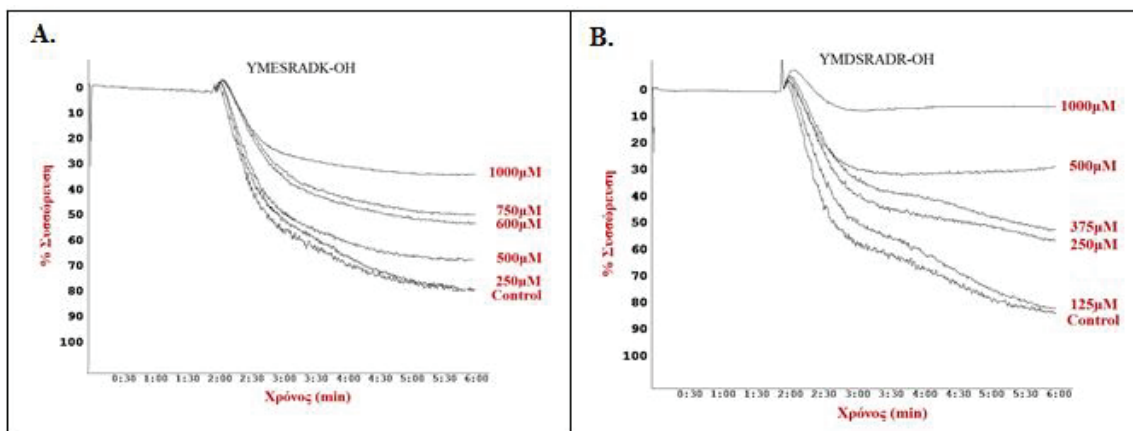
Σχήμα 6.70: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδικών αναλόγων YMDSRADR και RMDSRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε PRP. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



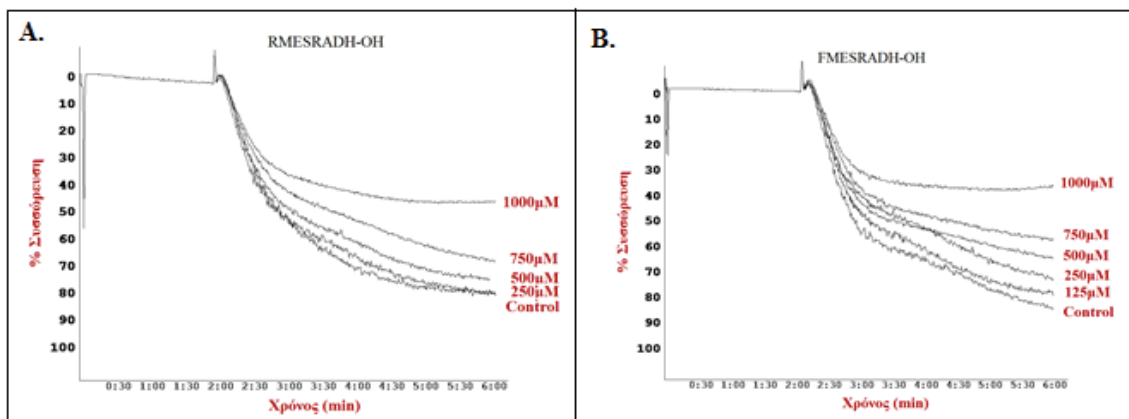
Σχήμα 6.71: Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδίων YMESRADH και YMESRADK σε πειράματα συσσωρευομετρίας σε PRP. Οι τιμές εκπροσωπούν τη μέση τιμή τουλάχιστον 3 πειραμάτων.



Σχήμα 6.72: Καμπύλες συσώρευσης υπό τη δράση του RMESRADR (A) και MESRADR (B). Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσώρευσης πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια, όπου εμφανίζεται η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Σχήμα 6.73: Καμπύλες συσώρευσης υπό τη δράση του YMESRADK (A) και YMDSRADR (B). Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσώρευσης πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια, όπου εμφανίζεται η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



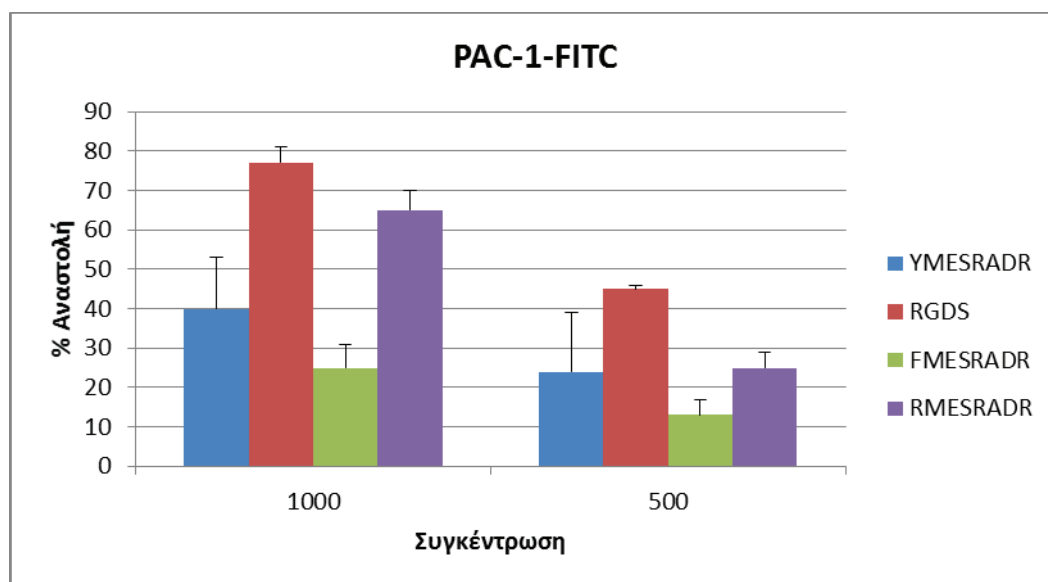
Σχήμα 6.74: Καμπύλες συσσώρευσης υπό τη δράση του RMESRADH (A) και FMESRADH (B). Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια, όπου εμφανίζεται η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

6.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ α IIb ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ 313-320 ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ α IIb3 ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

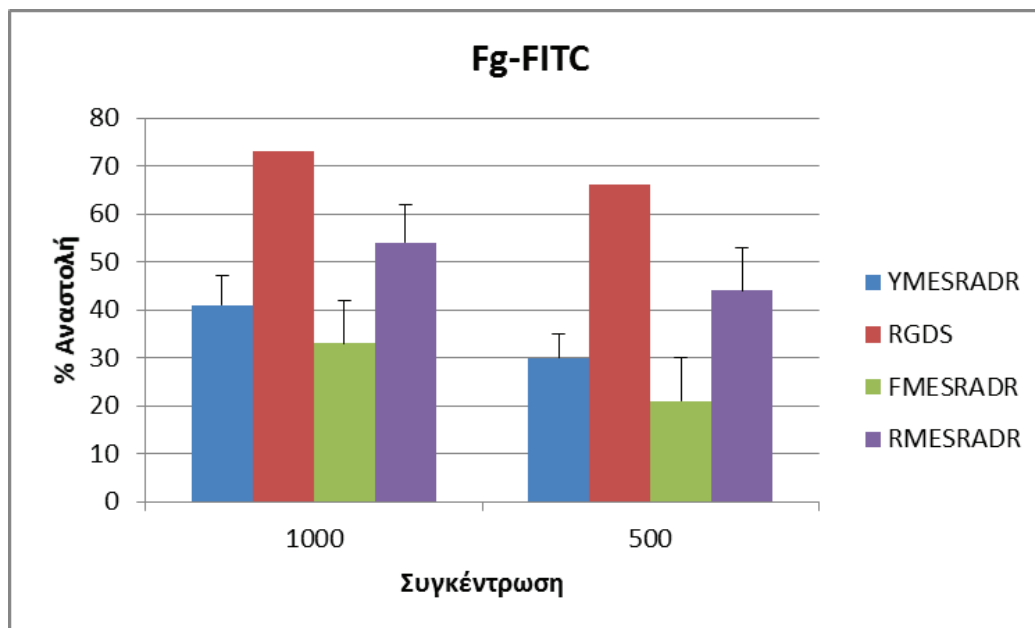
Στη συνέχεια επιλέχθηκαν πεπτίδια που έδειξαν ισχυρή ανασταλτική αλλά και που θέλαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω το μηχανισμό δράσης τους ώστε να μελετηθεί η ανασταλτική τους δράση στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης με κυτταρομετρία ροής. Τα πειράματα αυτά επιλέχθηκαν προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση καθενός εκ των πεπτιδίων στην έκφραση του PAC-1-FITC (εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει μόνο την ενεργοποιημένη μορφή του α IIb3 υποδοχέα) και στην πρόσδεση του ινωδογόνου, σε ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια. Ακολουθεί ο πίνακας με τις τιμές της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην έκφραση του PAC-1 και της πρόσδεσης του ινωδογόνου (Πίνακας 6.8)

Πίνακας 6.8: Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στην έκφραση του PAC-1 και στη πρόσδεση του ινωδογόνου σε ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή $\pm$ SD και με $n \geq 3$.

Πεπτίδιο	Συγκέντρωση (μ M)	Αναστολή έκφρασης PAC-1-FITC (%)	Αναστολή πρόσδεσης Fg-FITC (%)
YMESRADR	1000	40 $\pm$ 13	41 $\pm$ 6
	500	24 $\pm$ 12	30 $\pm$ 5
RGDS	1000	77 $\pm$ 4	73 $\pm$ 2
	500	45 $\pm$ 1	66 $\pm$ 3
FMESRADR	1000	25 $\pm$ 6	33 $\pm$ 9
	500	13 $\pm$ 4	21 $\pm$ 9
yMESRADR	1000	35 $\pm$ 8	38 $\pm$ 8
	500	18 $\pm$ 4	8 $\pm$ 3
MESRADR	1000	40 $\pm$ 6	50 $\pm$ 6
	500	17 $\pm$ 3	38 $\pm$ 10
Ac-YMESRADR	1000	36 $\pm$ 5	50 $\pm$ 6
	500	19 $\pm$ 5	40 $\pm$ 10
RMESRADR	1000	65 $\pm$ 5	54 $\pm$ 8
	500	25 $\pm$ 4	44 $\pm$ 9



Σχήμα 6.75: Αναστολή της πρόσδεσης του PAC-1-FITC στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη, υπό την επίδραση των YMESRADR, RGDS, FMESRADR και RMESRADR σε συγκεντρώσεις 1000 μ M και 500 μ M.



Σχήμα 6.76: Αναστολή της πρόσδεσης του φθορισμένου ινωδογόνου σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, υπό την επίδραση των YMESRADR, RGDS, FMESRADR και RMESRADR σε συγκεντρώσεις 1000 μ M και 500 μ M.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ανασταλτικής δράσης στη πρόσδεση του PAC-1 για τα πεπτιδικά ανάλογα 1-5 και του μητρικού αναλόγου προκύπτει ότι:

- Το RMESRADR εμφάνισε ισχυρότερη αναστολή της πρόσδεσης του PAC-1 στα 1000 μ M (65 ± 5) σε σχέση με το μητρικό ανάλογο (40 ± 13) και με τα πεπτιδικά ανάλογα 2-5. Στα 500 μ M το RMESRADR (25 ± 4) παρουσίασε ανασταλτική δράση στα ίδια επίπεδα με το μητρικό ανάλογο (24 ± 12).
- Το MESRADR εμφάνισε παρόμοια ανασταλτική δράση με το μητρικό ανάλογο στα 1000 μ M (40 ± 6), ενώ στα 500 μ M ελαφρώς μειωμένη (17 ± 3).
- Το FMESRADR εμφανίζει την ασθενέστερη ανασταλτική δράση σε σχέση με τα πεπτιδικά ανάλογα 1-5 και με το μητρικό ανάλογο, τόσο στα 1000 μ M (25 ± 6) όσο και στα 500 μ M (13 ± 4).
- Η ανασταλτική δράση των Ac-YMESRADR και γ MESRADR είναι ελαφρώς μειωμένη σε σχέση με το μητρικό ανάλογο, αλλά της ίδιας τάξεως.

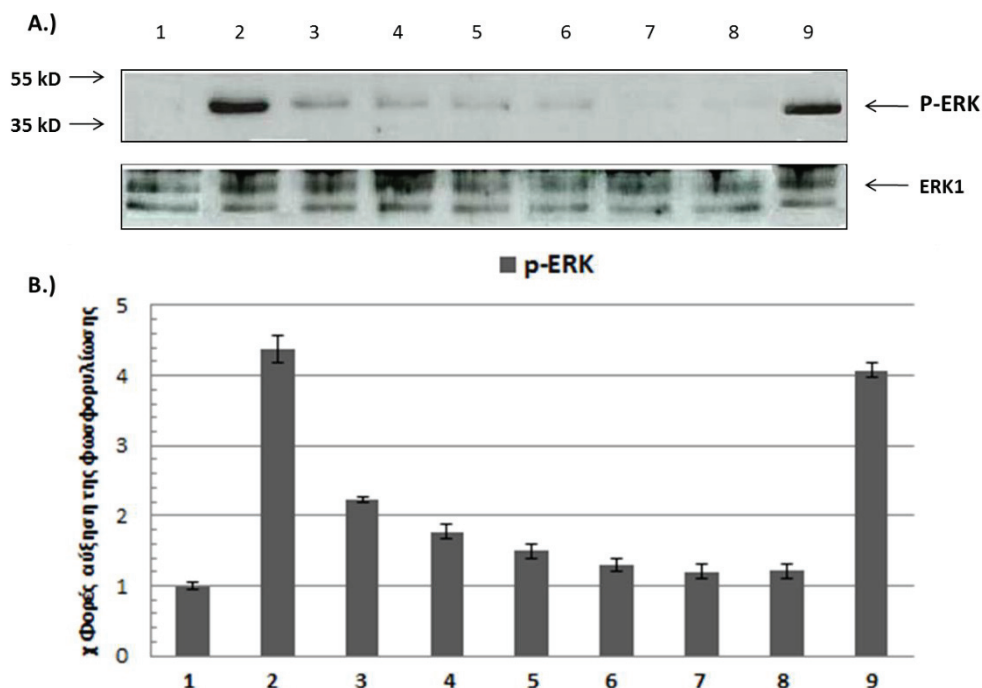
Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ανασταλτικής δράσης στη πρόσδεση του ινωδογόνου για τα πεπτιδικά ανάλογα 1-5 και του μητρικού αναλόγου προκύπτει ότι:

- Το RMESRADR εμφάνισε ισχυρότερη αναστολή της πρόσδεσης του ινωδογόνου στα 1000 μ M (54 ± 8) και στα 500 μ M (44 ± 9) σε σχέση με το μητρικό ανάλογο (41 ± 6 και 30 ± 5) και με τα πεπτιδικά ανάλογα 2-5.

- Το Ac-YMESRADR και το MESRADR, εμφάνισαν ισχυρότερη αναστολή από το μητρικό ανάλογο στα 1000μM και στα 500μM αλλά όχι από το RMESRADR.
- Το FMESRADR και το γMESRADR εμφάνισαν παρόμοια ανασταλτική δράση - ελαφρώς μειωμένη - με το μητρικό ανάλογο στα 1000μM και στα 500μM.

6.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ αIIb ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ 313-320 ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ERK ΚΙΝΑΣΗΣ

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 6.7 πραγματοποιήθηκαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Κλινικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από τη Δρ. Γκουρογιάννη Αλεξία, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημόκριτου Τσουκάτου.



Σχήμα 6.77: Απεικόνιση της επίδρασης των πεπτιδικών αναλόγων σε συγκέντρωση 500μM, στη φωσφορυλίωση της ERK. **A)** Μη ενεργοποιημένα πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια (1), ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με θρομβίνη (0,2 U/ml) (2), αιμοπετάλια που επώαστηκαν με το μητρικό ανάλογο YMESRADR (500μM) (3), το γMESRADR (500μM) (4), το RMESRADR (500μM) (5), το FMESRADR (500μM) (6), το Ac-YMESRADR (500μM) (7), το MESRADR (500μM) (8) και το RGDS (250μM) (9) για 2 min, ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη (0.2 U/ml) για 4 min, λύθηκαν και ανοσοαποτυπώθηκαν σε μεμβράνη με αντίσωμα κατά της φωσφορυλίωσης της ERK (anti-p-ERK). Η ίδια μεμβράνη, μετά από διαδικασία αποδέσμευσης αντισωμάτων (stripping), επώαστηκε με αντίσωμα κατά της ERK 1 (anti-ERK). **B)** Οι στήλες προέκυψαν από 3 διαφορετικά πειράματα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± S.D. * p < 0.05 σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης με εξειδικευμένα αντισώματα κατά της φωσφορυλιωμένης ERK (p-ERK), έδειξαν ότι όλα τα πεπτίδια (500 μ M) ανέστειλαν την φωσφορυλίωση της ERK1, ενώ το RGDS (250 μ M) δεν την ανέστειλε (Σχήμα 6.77).

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα καρδιοαγγειακά νοσήματα αποτελούν στις μέρες μας την πρώτη αιτία απώλειας ζωής στις αναπτυγμένες χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Παρόλο όμως τα ανησυχητικά στατιστικά στοιχεία, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική μείωση της θνησιμότητας που προέρχεται από τα νοσήματα αυτά. Διάφοροι παράγοντες συνέβαλαν σε αυτή τη μείωση, όπως η βελτίωση των διαγνωστικών και επεμβατικών διαδικασιών, η υιοθέτηση ενός υγιεινότερου τρόπου ζωής αλλά και η ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

Τα περισσότερα αντιαμοπεταλιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη, παρεμβαίνουν σε ένα από τα πολλαπλά μονοπάτια σηματοδότησης της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων αναστέλλοντας τη συσσώρευση από συγκεκριμένο αγωνιστή (ασπιρίνη, κλοπιδογρέλη, ελινογρέλη κ.α). Εξαιρέση αποτελούν οι ανταγωνιστές του υποδοχέα αIIbβ3, οι οποίοι αναστέλλουν το τελικό στάδιο συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ανεξάρτητα από τον αγωνιστή που την προκαλεί (αμπσιξιμάμπη, επιτιφιπατίδη τιροφιμπάνη). Επομένως, η στόχευση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 αποτελεί μια πολύ καλή στρατηγική για την ανάπτυξη αντιαμοπεταλιακών φαρμάκων.

Στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, η ιντεγκρίνη αIIbβ3 συναντάται στην ανενεργή της μορφή (κεκαμμένη διαμόρφωση) και παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια για το εξωκυττάριο πρόσδεμα. Κατά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, η ιντεγκρίνη μεταβαίνει στην ενεργή της διαμόρφωση, όπου παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για το εξωκυττάριο πρόσδεμα [1]. Η αύξηση της συγγένειας της ιντεγκρίνης για το πρόσδεμα βασίζεται σε διάφορες διαμορφωτικές αλλαγές, από την κλειστή διαμόρφωση της κεφαλής της ιντεγκρίνης ως και την πλήρη ανοιγμένη διαμόρφωση με κίνηση της β1 περιοχής και με εκτόπισμα προς τα έξω της υβριδικής περιοχής της β3 υπομονάδας [2]. Ο κύριος προσδέτης που οδηγεί στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαμέσου του αIIbβ3 είναι το ινωδογόνο και έχει βρεθεί ότι αναστολείς που περιέχουν την RGD αλληλουχία αναστέλλουν ισχυρά την πρόσδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα και συνεπώς τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Οι περισσότεροι ανταγωνιστές του αIIbβ3 που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη ή έχουν μελετηθεί, είτε πειραματικά είτε σε κλινικές μελέτες, δεσμεύονται στις περιοχές του υποδοχέα που αναγνωρίζουν την RGD αλληλουχία. Τα τελευταία χρόνια όμως, η χρήση αυτών των ανταγωνιστών έχει περιοριστεί σημαντικά στην καθημερινή κλινική πράξη, επειδή παρουσιάζουν αυξημένο αιμορραγικό κίνδυνο. Έχει βρεθεί ότι οι RGD

ανταγωνιστές προσδένονται σε περιοχές του υποδοχέα $\alpha\text{IIb}\beta 3$ διαμέσου των οποίων επιφέρουν τη διαμορφωτική αλλαγή του τελευταίου, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν ένα καταρράκτη βιοχημικών αντιδράσεων μέσα στο κύτταρο που στο σύνολό τους είναι γνωστές ως «έξω-μέσα» σηματοδότηση, γεγονός που οδηγεί στην περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [3]. Στην πραγματικότητα, οι ανταγωνιστές αυτοί ανταγωνίζονται και εμποδίζουν την πρόσδεση του ινωδογόνου, χωρίς όμως να εμποδίζουν την επέκταση της εξωκυττάριας διαμόρφωσης της ιντεκρίνης. Επιπλέον δεν εμφανίζουν εξειδίκευση για τον $\alpha\text{IIb}\beta 3$ αφού εξαιτίας της RGD αλληλουχίας αναγνωρίζονται και από άλλους υποδοχείς-ιντεκρίνες, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα και άλλων κυττάρων εκτός των αιμοπεταλίων. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητή η ανάγκη ανάπτυξης νέων ανταγωνιστών της ιντεκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta 3$, οι οποίοι θα διατηρούν τον υποδοχέα σε κατάσταση χαμηλής συγγένειας για το εξωκυττάριο πρόσδεμα.

Από προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, έχει βρεθεί ότι το 8/πεπτίδιο YMESRADR που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 313-320 της αIIb υπομονάδας του υποδοχέα $\alpha\text{IIb}\beta 3$, αποτελεί ισχυρό αναστολέα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων [4]. Επιπλέον, τα αποτελέσματα πειραμάτων *in vivo* σε κουνέλια, έδειξαν ότι το 8/πεπτίδιο δρα με μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν των RGD αναλόγων καθώς και των ανταγωνιστών του $\alpha\text{IIb}\beta 3$ που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη [5].

Σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν η διερεύνηση του τρόπου δράσης του 8/πεπτιδίου $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$.

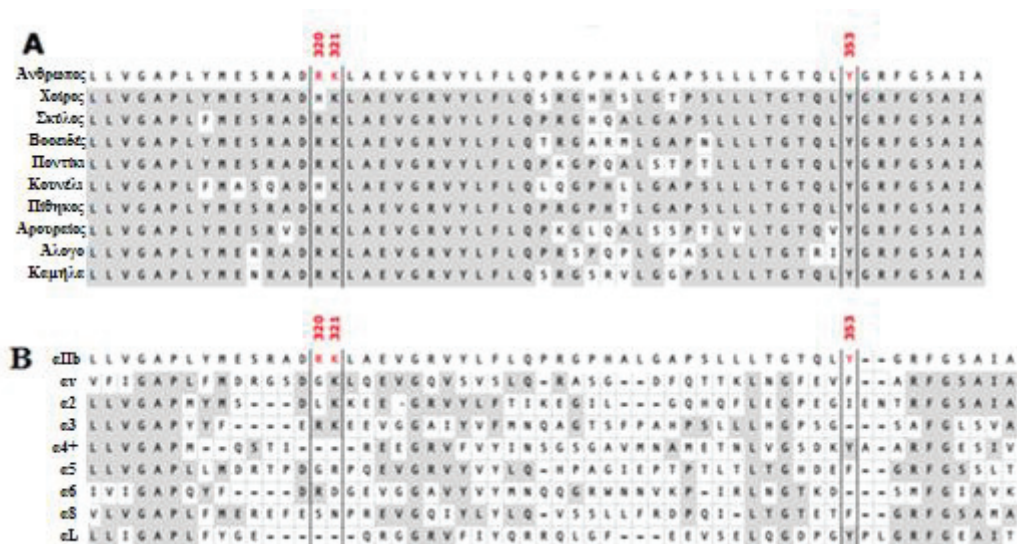
Αρχικά μελετήθηκε με πειράματα υπολογιστικών μεθόδων προσομοίωσης, που στηρίχθηκαν στην κρυσταλλική δομή του υποδοχέα στην κεκαμμένη διαμόρφωση του με την αλληλεπίδραση του 8/πεπτιδίου. Η αλληλουχία 313-320, εντοπίζεται στο βρόγχο (β -ribbon) που εκτείνεται μεταξύ των $\beta 2$ και $\beta 3$ αντιπαράλληλων πτυχών (strands) της W5 λεπίδας της περιοχής β -προπέλας της αIIb υπομονάδας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι έχουν αναφερθεί πεπτίδια που προέρχονται από την ίδια περιοχή της αIIb ή της $\beta 3$ υπομονάδας, που προωθούν την ενεργοποίηση της ιντεκρίνης. Ένα από αυτά είναι το 8/πεπτίδιο $^{314}\text{MESRADRK}^{321}$ που προέρχεται από την αIIb υπομονάδα και διαφέρει ως προς το $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ ότι είναι μετατοπισμένο κατά 1 αμινοξύ [6].

Η κρυσταλλική δομή του υποδοχέα στην κεκαμμένη διαμόρφωση του, αποκάλυψε ότι η αλληλουχία 313-320 λειτουργεί ως φουρκέτα «μανταλάκι» που συγκρατεί κοντά την αIIb περιοχή με τις βI , υβριδική και τις IGF3 και IGF4 της $\beta 3$ υπομονάδας. Μέσα σε αυτό το βρόγχο δημιουργούνται 3 γέφυρες άλατος $\text{E}^{315}(\alpha\text{IIb})\text{-R}^{317}(\alpha\text{IIb})$, $\text{R}^{320}(\alpha\text{IIb})\text{-E}^{297}(\beta 3)$,

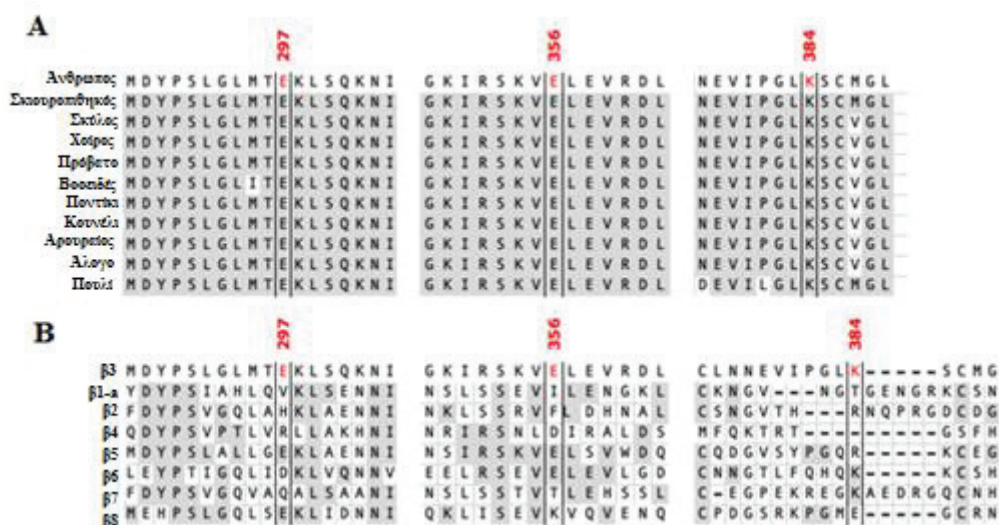
K³²¹(αΙΙb)-E³⁵⁶(β3). Η καρβονυλική ομάδα του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων A³¹⁸ και D³¹⁹ (αΙΙb) αλληλεπιδρά με την K³⁸⁴ (β3). Επίσης, παρατηρείται μια επιπλέον αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο υπομονάδων, στην οποία συμμετέχουν τα αμινοξέα Y³⁵³(αΙΙb) και E²⁹⁷(β3).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αλληλουχία της W5 λεπίδας της β-προπέλας (αΙΙb υπομονάδα) διατηρείται σε υψηλό βαθμό στα διάφορα είδη. Εξαίρεση αποτελεί το αμινοξικό κατάλοιπο R³²⁰, που αντικαθίσταται με His στα κουνέλια και στα γουρούνια, ενώ τα αμινοξικά κατάλοιπα K³²¹ και Y³⁵³ διατηρούνται σε όλα τα είδη (Σχήμα 7.1, Α). Επιπλέον, ο βρόγχος αυτός είναι ένας από τις πιο υψηλά διατηρημένες περιοχές για διάφορες ιντεγκρίνες που εντοπίζονται στον άνθρωπο, τονίζοντας το ρόλο του ως φουρκέτα «μανταλάκι» για τις δυο υπομονάδες (Σχήμα 7.2, Β).

Η κυρτή διαμόρφωση που υιοθετεί η β3 υπομονάδα αποκάλυψε μια καλά διατηρημένη περιοχή σε διάφορα είδη, που συμπίπτει με την περιοχή διεπαφής της αΙΙb υπομονάδας και της W5 λεπίδας της β-προπέλας (Σχήμα 7.3, Α). Η ανάλυση όμως με τις ομόλογες ιντεγκρίνες, έδειξε ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα της W5 λεπίδας που αλληλεπιδρούν με τα αμινοξικά κατάλοιπα της β3 υπομονάδας δεν διατηρούνται σε υψηλό βαθμό (Σχήμα 7.1, 7.2). Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί ως το αποτέλεσμα της εξέλιξης της ιντεγκρίνης για απόκτηση νέων ρόλων και λειτουργιών.



Σχήμα 7.1: Α) Οι αλληλουχίες κοντά στην περιοχή 313-320 για διάφορα είδη και Β) για διάφορες ιντεγκρίνες που εντοπίζονται στον άνθρωπο. Τα διατηρημένα αμινοξέα φαίνονται με γκρι σκιαγράφηση.



Σχήμα 7.2: A) Οι αλληλουχίες κοντά στα αμινοξικά κατάλοιπα 297, 356 και 384 για διάφορα είδη και B) για ομόλογες ιντεγκρίνες που εντοπίζονται στον άνθρωπο. Τα διατηρημένα αμινοξέα φαίνονται με γκρι σκιαγράφηση.

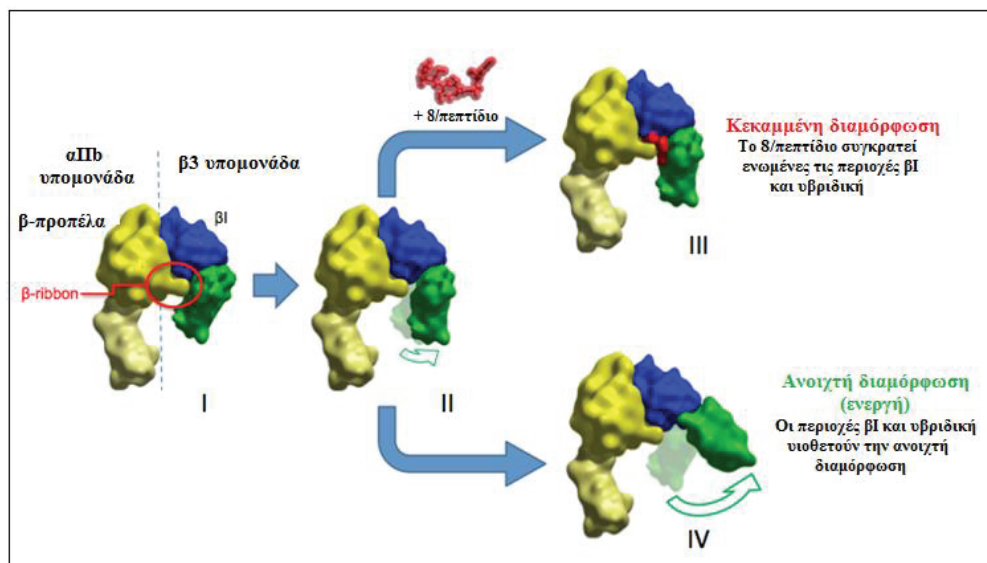
Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του 8/πεπτιδίου ³¹³YMESRADR³²⁰ με τον υποδοχέα στην κεκαμμένη διαμόρφωση έδειξαν ότι τα προαναφερθέντα αμινοξικά κατάλοιπα από τη β3 υπομονάδα που εμπλέκονταν στις γέφυρες άλατος παραμένουν και αλληλεπιδρούν με τα αμινοξικά κατάλοιπα του πεπτιδίου. Συγκεκριμένα οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι D³¹⁹ (8/πεπτίδιο) - K³⁸⁴ (β3) και R³²⁰ (8/πεπτίδιο) - E³⁵⁶ (β3). Η νέα διαμόρφωση επιτρέπει μια νέα αλληλεπίδραση μεταξύ Y³¹³ (8/πεπτίδιο) και E²⁹⁷ (β3).

Για επιβεβαίωση του προτεινόμενου μοντέλου του τρόπου δράσης του YMESRADR, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επίδρασης του μητρικού αναλόγου αλλά και του YMESRAAR στην προσκόλληση CHO κυττάρων [WT, αIbR317A/D319A/R320A (αIb_{3M}) και β3K384A (β3_{1M})] στο ινωδογόνο, υπό συνθήκες ροής. Οι κλώνοι αIb_{3M}β3 επιλέχθηκαν διότι η μετάλλαξη αντιστοιχεί στην αλληλουχία RADR που σε προηγούμενη εργασία μας είχαμε καταλήξει στο συμπέρασμα ότι αυτή η περιοχή είναι κρίσιμη για την έκφραση της ανασταλτικής δράσης του πεπτιδίου [7]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι: α) η μετάλλαξη στην αIb υπομονάδα δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με την ιντεγκρίνη, σε αντίθεση με τη μετάλλαξη στη β3 υπομονάδα. β) Το γεγονός ότι το 8/πεπτίδιο δεν αναστέλλει τα CHO κύτταρα που εκφράζουν τη μετάλλαξη β3K384A, αποδεικνύει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η γέφυρα άλατός D³¹⁹ (8/πεπτίδιο) - K³⁸⁴ (β3) στην ανασταλτική δράση του και ότι το αμινοξύ D στη θέση 319 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αλληλεπίδραση 8/πεπτιδίου - ιντεγκρίνης.

Επίσης μελετήθηκε η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων YMESAADR, YMESRAAR και YMESRADA με πειράματα συσσωρευομετρίας ροής σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια, χρησιμοποιώντας ως αγωνιστή τη θρομβίνη σε συγκέντρωση 0,2 U/ml. Τα τροποποιημένα με Ala πεπτίδια στις θέσεις 317 και 319 δεν εμφάνισαν καμία δραστικότητα ως προς την αιμοπεταλιακή συσσώρευση στη συγκέντρωση 500 μ M. Το τροποποιημένο με Ala πεπτίδιο στη θέση 320, έδειξε καλύτερη ανασταλτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα πεπτιδικά ανάλογα όχι όμως και σε σχέση με το μητρικό ανάλογο.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η πρόσδεση του αντισώματος AP5 με κυτταρομετρία ροής, ώστε να επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι το YMESRADR αλληλεπιδρά απευθείας με τη β 3 υπομονάδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το YMESRADR επάγει την πρόσδεση του AP5 σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι το RGDS. Σε ενεργοποιημένα με θρομβίνη αιμοπετάλια η δράση του YMESRADR βρέθηκε στα ίδια επίπεδα με το RGDS. Παρόλο που έχει αναφερθεί ότι το AP5 προσδένεται μόνο όταν η ιντεγκρίνη α IIb β 3 βρίσκεται στην ενεργοποιημένη κατάσταση της [8], θεωρούμε ότι στο προτεινόμενο μοντέλο δράσης του 8/πεπτιδίου η ιντεγκρίνη έχει τη δυνατότητα να εκθέτει επιτόπους που αναγνωρίζονται από το αντίσωμα, ενώ βρίσκεται ακόμα στην ανενεργή της κατάσταση. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από διάφορες πρόσφατες μελέτες: α) ο Zhu και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα μοντέλο ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης οχτώ διαφορετικών σταδίων. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η μετάβαση της ιντεγκρίνης από την κεκαμμένη διαμόρφωση στην εκτεταμένη (με ανοιχτή κεφαλή) διαμόρφωση, λαμβάνει χώρα μέσω 6 ενδιάμεσων σταδίων χωρίς σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές στην κεφαλή της ιντεγκρίνης. Ακολουθεί το τελικό στάδιο, με κίνηση της β1 περιοχής και με εκτόπισμα προς τα έξω της υβριδικής περιοχής της β 3 υπομονάδας (swing-out motion) και τελικά η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [9]. Στο στάδιο αυτό, ωστόσο, κατά την απεμπλοκή του β -ribbon, τα αμινοξικά κατάλοιπα από τη β 3 υπομονάδα (E297, E356 και K384) απομένουν διαθέσιμα για να αλληλεπιδράσουν με το 8/πεπτίδιο και για να «κλειδώσουν» τη β1 και την υβριδική περιοχή σε ένα ενδιάμεσο στάδιο που μιμείται την κλειστή διαμόρφωση της ιντεγκρίνης, αποκλείοντας με αυτό τον τρόπο την πλήρη ενεργοποίηση της. β) Επίσης ο Cheng και οι συνεργάτες του, σε μελέτη τους το 2013 κατέληξαν σε παρόμοιο συμπέρασμα. Η εισαγωγή ενός δισουλφιδικού δεσμού στην ιντεγκρίνη, ο οποίος διαδραματίζει παρόμοιο δομικό ρόλο με αυτό του 8/πεπτιδίου (σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο μας), δεν ανέστειλε την πρόσδεση του AP5 που προκαλείται από την κιστρίνη (πρωτεΐνη που περιέχει την RGD αλληλουχία) [2]

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι: οι αλληλεπιδράσεις D319 (8/πεπτίδιο) - K384 (β3), R320 (8/πεπτίδιο) - E356 (β3) και Y313 (8/πεπτίδιο) και E297 (β3), διατηρούν την ιντεγκρίνη στη κεκαμμένη (ανενεργή) διαμόρφωση της, προτείνοντας ότι το YMESRADR ουσιαστικά αντικαθιστά την αλληλουχία του βρόγχου (β-ribbon) της αIIb υπομονάδας συγκρατώντας τη βI και την υβριδική περιοχή της β3 υπομονάδας στην κλειστή διαμόρφωση (Σχήμα 7.3).



Σχήμα 7.3: Μοντέλο της επέκτασης της ιντεγκρίνης παρουσία ή μη του 8/πεπτιδίου. I) Ο υποδοχέας αIIbβ3 στη κεκαμμένη διαμόρφωση. II) Ο υποδοχέας αρχίζει να ενεργοποιείται. III) Το 8/πεπτίδιο συγκρατεί τη βI περιοχή (μπλε) και υβριδική περιοχή (πράσινο) ενωμένες. IV) Ακολουθεί η ανοιχτή διαμόρφωση (ενεργή κατάσταση) του υποδοχέα.

Το προτεινόμενο μοντέλο μας έρχεται επίσης σε συμφωνία με την εργασία του Derrick και των συνεργατών του [10]. Σύμφωνα με την εργασία τους, το 7/πεπτίδιο LSARLAF σχεδιάστηκε με σκοπό να αλληλεπιδρά με την αIIb αλληλουχία 315-321 της αIIbβ3 ιντεγκρίνης, επάγοντας απευθείας διαμορφωτική αλλαγή στον υποδοχέα. Η αλληλεπίδραση του 7/πεπτιδίου με τη συγκεκριμένη περιοχή (που περικλείει τη περιοχή β-ribbon της αIIb υπομονάδας), διακόπτει την αλληλεπίδραση της περιοχής β-ribbon της αIIb υπομονάδας με την υβριδική περιοχή της β3 υπομονάδας, διευκολύνοντας την επέκταση του υποδοχέα. Φαίνεται ότι η δράση του 7/πεπτιδίου LSARLAF είναι αντίθετη από αυτή του 8/πεπτιδίου YMESRADR.

Στη συνέχεια, με σκοπό την επιβεβαίωση του ρόλου και της εμπλοκής των αμινοξέων στις θέσεις 313 και 320, στην αλληλεπίδραση τους με τον υποδοχέα αλλά και επιδιώκοντας την ανάπτυξη νέας γενιάς αναστολέων της συσσώρευση των αιμοπεταλίων, οι οποίοι θα

κλειδώνουν τον υποδοχέα στην ανενεργή του διαμόρφωση σχεδιάστηκαν τα πεπτιδικά ανάλογα του Πίνακα 7.1 με τροποποιήσεις στις θέσεις 313 και 320. Επιλέχτηκε η αντικατάσταση της Y³¹³ με R, K, H, όπου φέρουν βασικές παράπλευρες αλυσίδες, με το υδρόφοβο αμινοξύ F ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος του υδροξυλίου της παράπλευρης αλυσίδας της Y στην κατάσταση σύμπλεξης και με D-Tyr για εξεταστεί η D-στεreoχημεία. Επιπλέον, σε ένα πεπτιδικό ανάλογο αφαιρέθηκε τελείως το αμινοξύ 313 και τέλος το μητρικό ανάλογο και το FMESRADR ακετυλιώθηκαν. Αντίστοιχα η R³²⁰ αντικαταστάθηκε με K και H. Τα πεπτίδια 16 και 17 σχεδιάστηκαν με σκοπό να διερευνηθεί επιπλέον ο ρόλος του αμινοξέος E³¹⁵ στη βιολογικά ενεργή διαμόρφωση του πεπτιδίου που φαίνεται να σταθεροποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης E³¹⁵ και R³¹⁷.

Πίνακας 7.1: Συνθετικά πεπτίδια της εξωκυττάριας περιοχής της αIIb υπομονάδας, του αιμοπεταλιακού υποδοχέα αIIbβ3.

1.	YMESRADR	ΜΗΤΡΙΚΟ ΑΝΑΛΟΓΟ
2.	Ac -YMESRADR	³¹³ Y → Ac-Y
3.	y MESRADR	³¹³ Y → y
4.	R MESRADR	³¹³ Y → R
5.	H MESRADR	³¹³ Y → H
6.	K MESRADR	³¹³ Y → K
7.	F MESRADR	³¹³ Y → F
8.	Ac-F MESRADR	³¹³ Y → Ac-F
9.	MESRADR	³¹³ Y → -
10.	YMESRAD H	³²⁰ R → H
11.	YMESRAD K	³²⁰ R → K
12.	R MESRAD H	³¹³ Y → R , ³²⁰ R → H
13.	F MESRAD H	³¹³ Y → F , ³²⁰ R → H
14.	R MESRAD K	³¹³ Y → R , ³²⁰ R → K
15.	F MESRAD K	³¹³ Y → F , ³²⁰ R → K
16.	YMD S RADR	³¹⁵ E → D
17.	R MD S RADR	³¹³ Y → R , ³¹⁵ E → D

Η σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων πραγματοποιήθηκε σε στερεή φάση ακολουθώντας την Fmoc/*t*Bu στρατηγική, χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την Wang ρητίνη με συζευγμένο το 1^ο αμινοξύ. Εξαίρεση αποτελούν τα πεπτιδικά ανάλογα 4 και 5 αλλά και τα πεπτιδικά ανάλογα με την Ala όπου η σύζευξη του 1^ο αμινοξέος πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, ακολουθώντας τη μέθοδο εστεροποίησης με χρήση συμμετρικών ανυδριτών των N^α-προστατευμένων αμινοξέων (χρησιμοποιώντας DIC), παρουσία καταλυτικής ποσότητας DMAP. Η σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων έγινε με επιτυχία και με αποδόσεις του καθαρού επιθυμητού πεπτιδίου ιδιαίτερα ικανοποιητικές (52,28% - 66,77%).

Αρχικά μελετήθηκε η ανασταλτική δράση των τροποποιημένων αΠb πεπτιδικών αναλόγων με πειράματα συσσωρευομετρίας ροής σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια, δηλαδή αιμοπετάλια ελεύθερα από τα στοιχεία του πλάσματος. Ως αγωνιστής χρησιμοποιήθηκε η θρομβίνη σε συγκέντρωση 0.1-0.2 U/ml. Υπολογίστηκαν τα IC₅₀ των πεπτιδικών αναλόγων και συγκρίθηκε η ανασταλτική τους δράση σε χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις, καθώς και σε σχέση με τη δράση του μητρικού αναλόγου YMESRADR (IC₅₀: 120 ± 20 μM).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι:

- ✓ Το 1^ο αμινοξύ που αντιστοιχεί στη θέση 313 επηρεάζει την ανασταλτική δράση των πεπτιδικών αναλόγων αλλά όχι με καθοριστικό τρόπο. Πιθανά συμμετέχει στην αλληλεπίδραση των αναλόγων με την ιντεγκρίνη αΠbβ3 αλλά φαίνεται αυτή η αλληλεπίδραση να μην είναι η κρίσιμη για την έκφραση της ανασταλτικής δράσης.
- ✓ Το 8^ο αμινοξύ που αντιστοιχεί στη θέση 320 είναι καθοριστικής σημασίας καθώς φαίνεται να είναι απαραίτητη η ύπαρξη θετικά φορτισμένου αμινοξέος στη θέση αυτή για την έκφραση της ανασταλτικής δράσης.
- ✓ Το 3^ο αμινοξύ που αντιστοιχεί στη θέση 315, σχετίζεται με την έκφραση της ανασταλτικής δράσης, καθώς φαίνεται να συμβάλει στη σταθεροποίηση της ενεργούς διαμόρφωσης του μητρικού πεπτιδίου.
- ✓ Το πεπτιδικό ανάλογο RMESRADR φαίνεται να είναι ένας αρκετά καλύτερος αναστολέας της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προηγούμενη εργασία μας όπου είχαμε συμπεράνει ότι τα αμινοξέα της αλληλουχίας ³¹³YMES³¹⁶ δεν επηρεάζουν σημαντικά τη δράση του 8/πεπτιδίου, χωρίς όμως να είναι εφικτή η παράλειψη τους καθώς στην περίπτωση αυτή η δράση τους μειώνεται σημαντικά, επισημαίνοντας ταυτόχρονα τον καθοριστικό ρόλο της αλληλουχίας RADR στην έκφραση της ανασταλτικής δράσης [7].

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ανασταλτική δράση των πεπτιδικών αναλόγων με συσσωρευομετρία ροής σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, ώστε να προσομοιαστούν *in vivo* συνθήκες αλλά και με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των παραγόντων του πλάσματος στη βιολογική τους δράση. Ως αγωνιστής χρησιμοποιήθηκε το ADP σε συγκέντρωση 2,5-10 μM. Υπολογίστηκαν τα IC₅₀ των πεπτιδικών αναλόγων και συγκρίθηκε η ανασταλτική τους δράση σε χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις, καθώς και σε σχέση με τη δράση του μητρικού αναλόγου YMESRADR (IC₅₀: 305 ± 5 μM)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι:

- ✓ Η ανασταλτική δράση όλων των πεπτιδικών αναλόγων στο PRP μειώθηκε σε σχέση με την αναστολή της συσσώρευσης που εμφάνισαν στα πλυμένα αιμοπετάλια.
- ✓ Το δραστικότερο πεπτιδικό ανάλογο ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης του PRP είναι το RMESRADR με $IC_{50} 280 \pm 30M\mu$, το οποίο εμφανίζει παρόμοια ανασταλτική δράση με το μητρικό ανάλογο.

Το γεγονός ότι η ανασταλτική δράση όλων των πεπτιδικών αναλόγων μειώθηκε στο PRP ίσως να οφείλεται στους παράγοντες του πλάσματος που φαίνεται ότι επηρεάζουν τη βιολογική δράση των συγκεκριμένων πεπτιδίων. Γεγονός που συμφωνεί με παλαιότερες έρευνες που σχετίζονται με την επίδραση των πρωτεασών στη βιολογική δράση των πεπτιδίων. Πιθανά, τα πεπτιδικά ανάλογα της παρούσας μελέτης, να παρουσιάζουν ευαισθησία στην αποικοδόμηση από πρωτεάσες του πλάσματος, με αποτέλεσμα να μειώνεται η βιολογική τους δράση [11]. Τόσο τα συνθετικά όσο και τα φυσικά πεπτίδια υδρολύονται από τη δράση εξωπεπτιδασών και ενδοπεπτιδασών. Οι εξωπεπτιδάσες υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς έναν προς έναν από το τέλος του μορίου, ενώ οι ενδοπεπτιδάσες δρουν σε διάφορα σημεία της αλληλουχίας του πεπτιδίου. Όμως, σε μικρά πεπτίδια που δεν ξεπερνούν τα 15 αμινοξέα, η δράση των ενδοπεπτιδασών προχωράει σε πολύ χαμηλό ρυθμό [11]. Επίσης έχει αναφερθεί ότι οι πεπτιδάσες δρουν κυρίως στο N-τελικό άκρο των πεπτιδίων, ενώ η δράση των καρβοξυπεπτιδασών δεν θεωρείται σημαντική [12]. Επίσης η μείωση της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδικών αναλόγων μπορεί να οφείλεται και από τη δράση διάφορων πρωτεϊνών του πλάσματος και κυρίως της αλβουμίνης. Η αλβουμίνη (66 kDa) είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος και αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν διάφορα χορηγούμενα φάρμακα εξαιτίας της μεγάλης ικανότητας της να αλληλεπιδρά με διάφορους προσδέτες (στο μόριο της υπάρχουν πολλαπλές υδροφοβικές περιοχές δέσμευσης) [13, 14]. Σε κάποιες περιπτώσεις η αλληλεπίδραση της αλβουμίνης με διάφορα φάρμακα είναι επιθυμητή (σε διαλυτοποίηση ουσιών) αλλά σε άλλες περιπτώσεις δεν είναι, διότι απαιτείται υψηλή δόση φαρμάκου, ώστε να επιτευχθεί αποτελεσματική συγκέντρωση στον οργανισμό [14, 15].

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων συσσωρευομετρίας, επιλέχθηκαν τα πεπτίδια RMESRADR (1), Ac-YMESRADR (2), γMESRADR (3), FMESRADR (4) και MESRADR (5), ώστε να μελετηθεί η ανασταλτική τους δράση στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Τα πεπτίδια αυτά επιλέχθηκαν διότι εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική δράση στα πειράματα συσσωρευομετρίας και επίσης επειδή κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί περαιτέρω ο τρόπος

δράσης τους. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρία ροής σε ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια χρησιμοποιώντας τα αντισώματα PAC-1-FITC και Fg-FITC.

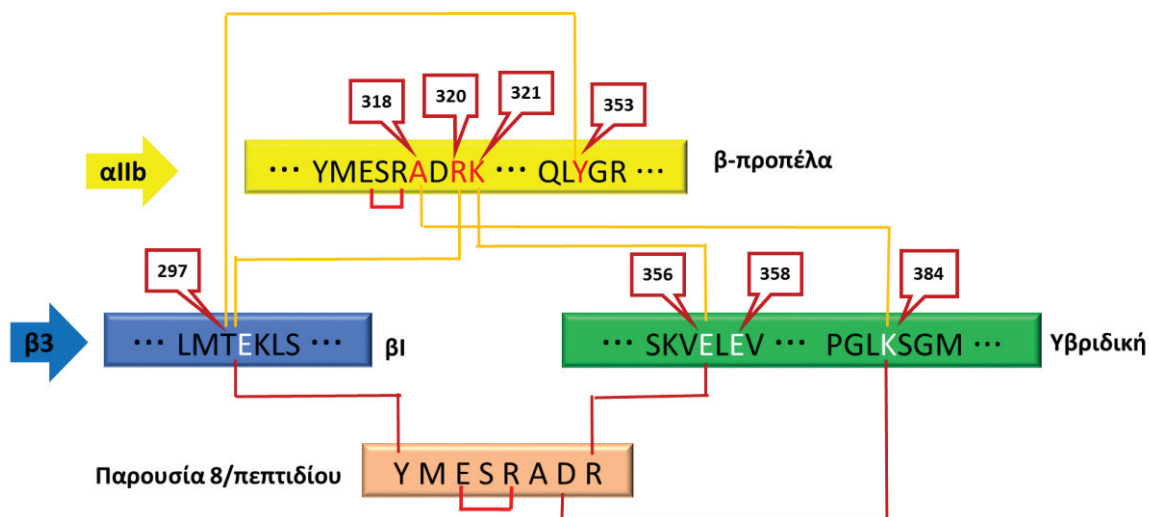
Η ανασταλτική δράση στην πρόσδεση του PAC-1 των πεπτιδικών αναλόγων στην υψηλή συγκέντρωση 1000 μM θα μπορούσε να αποδοθεί και ως ένα βαθμό στη μη εξειδικευμένη πρόσδεση του. Η διαφοροποίηση εμφανίζεται κυρίως στα 500 μM (τιμή κοντινή στο IC_{50} των πεπτιδίων), όπου είναι εμφανές ότι το RGDS διατηρεί μεγάλο ποσοστό αναστολής του PAC-1 σε αντίθεση με τα ανάλογα του YMESRADR τα οποία παρουσιάζουν μικρότερη ανασταλτική δράση. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με το προτεινόμενο μοντέλο δράσης του YMESRADR, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

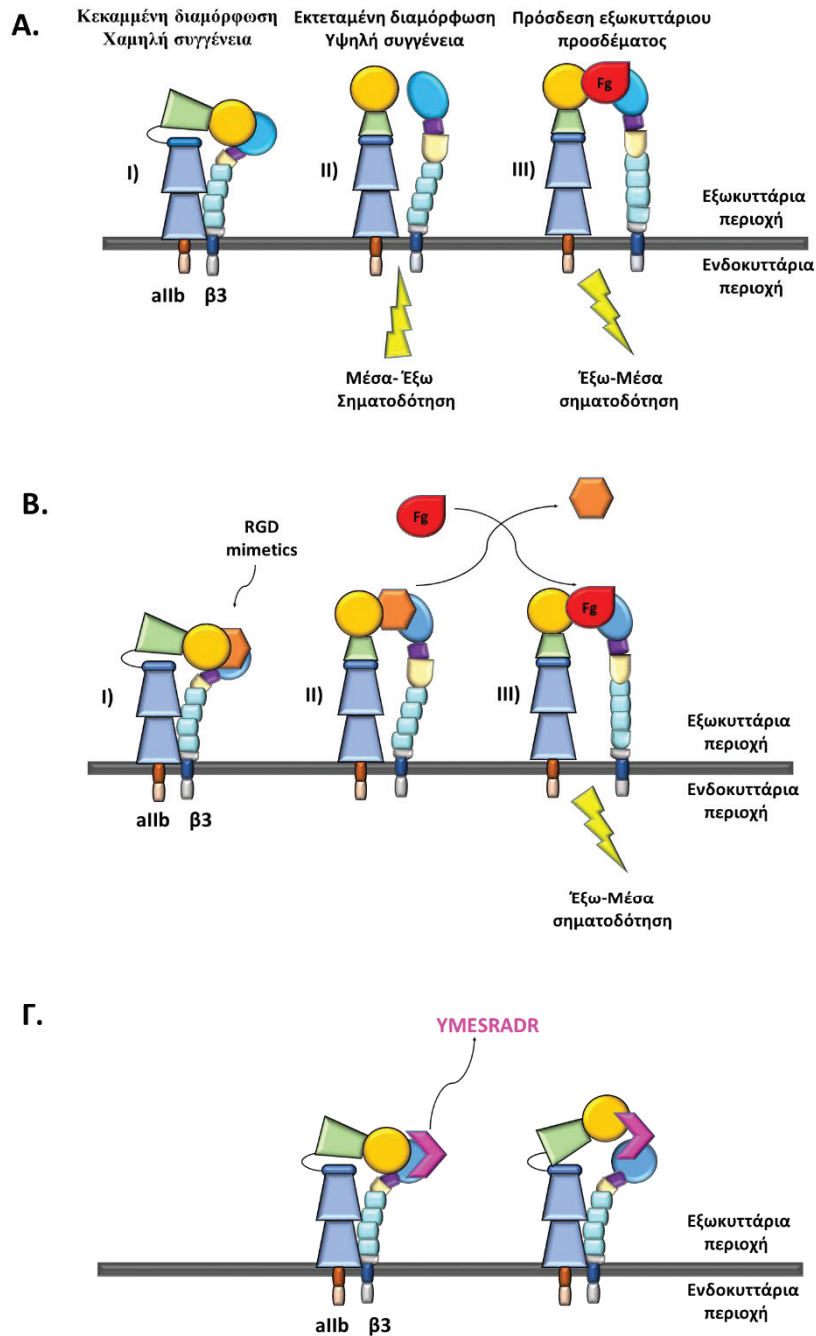
- ✓ Το 1^ο αμινοξύ στη θέση 313 φαίνεται ότι συμβάλει στο μηχανισμό δράσης των αναλόγων. Παρόλο που και η απαλοιφή του 1^{ου} αμινοξέος (MESRADR) δίνει παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του μητρικού αναλόγου, η αντικατάσταση της Y με R στη θέση 313 δίνει καλύτερα αποτελέσματα στην έκφραση της ανασταλτικής δράσης.
- ✓ Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα πεπτιδικά ανάλογα 1-5 και το μητρικό ανάλογο αναστέλλουν την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta_3$.

Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση των πεπτιδικών αναλόγων RMESRADR, Ac-YMESRADR, yMESRADR, FMESRADR και MESRADR στη φωσφορυλίωση μιας κύριας σηματοδοτικής πρωτεΐνης της ERK. Η φωσφορυλίωση της ERK είναι αποτέλεσμα της «έξω-μέσα» σηματοδότησης, είναι ανεξάρτητη της συσσώρευσης που προκαλεί η $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ιντεγκρίνη και παρά την αντιφατική σχέση ERK- $\alpha\text{IIb}\beta_3$ υποδοχέα, έχει βρεθεί ότι οι RGD αναστολείς ενισχύουν την φωσφορυλίωση της [16]. Από τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης με εξειδικευμένα αντισώματα κατά της φωσφορυλιωμένης ERK (p-ERK) επιβεβαιώνεται ότι ο μηχανισμός δράσης, ως προς την αναστολή της συσσώρευσης, των παραπάνω πεπτιδικών αναλόγων είναι διαφορετικός από αυτόν των RGD αναλόγων. Τα πεπτιδικά ανάλογα αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της ERK, ενώ το RGDS στη μέγιστη ανασταλτική του συγκέντρωση, δεν αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της ERK.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το 8/πεπτίδιο $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ φαίνεται να αναστέλλει την πρόσδεση του ινωδογόνου μέσω πρόσδεσης του στη βΙ και υβριδική περιοχή της β_3 υπομονάδας, η οποία επιβάλει τη διατήρηση του υποδοχέα σε μια ανενεργή κατάσταση. Η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει τον καθοριστικό ρόλο των αμινοξέων D^{319} και R^{320} , στην έκφραση της ανασταλτικής δράσης, ενώ δεν φαίνεται καθοριστική η συμβολή της Y^{313} στην αλληλεπίδραση της με τη βΙ περιοχή

της β3 υπομονάδας. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με την ασθενή αλληλεπίδραση του υδροξυλίου της παράπλευρης αλυσίδας της Y σε σχέση με το καρβοξύλιο της παράπλευρης αλυσίδας του E297 (β3 υπομονάδας) (Σχήμα 7.4). Σε ενίσχυση της παραπάνω εκτίμησης, συμβάλουν τα αποτελέσματα για το πεπτιδικό ανάλογο RMESRADR, όπου πέρα της δυνατότητας σταθεροποίησης της αλληλεπίδρασης με περισσότερους δεσμούς υδρογόνου, είναι εφικτό να αναπτύσσεται και μια ιοντικού τύπου αλληλεπίδραση.





Σχήμα 7.5: Σχηματική αναπαράσταση της διαμορφωτικής αλλαγής του υποδοχέα αIIbβ3 υπό φυσιολογικές συνθήκες ή υπό την παρουσία αναστολών. Α. Ο υποδοχέας αIIbβ3 βρίσκεται στην κεκαμμένη διαμόρφωση του (I), με την επίδραση της «μέσα-έξω» σηματοδότησης ο υποδοχέας ενεργοποιείται, υφίσταται διαμορφωτική αλλαγή και εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τους προσδέτες (II) και τέλος η πρόσδεση του εξωκυττάριου προσδέματος (ινωδογόνο) επιφέρει τον πλήρη διαχωρισμό των 2 υπομονάδων και επάγει την «έξω-μέσα» σηματοδότηση (III). Β. Τα RGD μιμητικά αποτελούν τη βάση για των κλινικά διαθέσιμων αIIbβ3 ανταγωνιστών. Προσδένονται στον υποδοχέα, επάγοντας την ενεργοποίησή του και όταν το επίπεδο των φαρμάκων στο πλάσμα μειώνεται, τότε τη θέση τους μπορούν να την πάρουν άλλοι εξωκυττάριοι προσδέτες, όπως το ινωδογόνο. Γ. Ο τρόπος δράσης αλλοστερικών αναστολών, όπως το YMESRADR, που διατηρούν τον υποδοχέα στην ανενεργή του κατάσταση. Τροποποιημένο σχήμα [3].

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κεντρικός ρόλος που κατέχει η αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη αIIbβ3 στο τελικό στάδιο συσσώρευσης των αιμοπεταλίων καθιστά τη στόχευση της μια πολύ καλή στρατηγική για την ανάπτυξη αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων.

Κατά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, η ιντεγκρίνη αIIbβ3 υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές και μεταβαίνει στην ενεργή της διαμόρφωση, όπου παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για το εξωκυττάριο πρόσδεμα. Αναστολείς που περιέχουν την RGD αλληλουχία αναστέλλουν ισχυρά την πρόσδεση του ινωδογόνου (κύριος προσδέτης) στον υποδοχέα και συνεπώς τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα τελευταία χρόνια όμως, η χρήση αυτών των ανταγωνιστών έχει περιοριστεί σημαντικά διότι προσδένονται σε περιοχές του υποδοχέα αIIbβ3 διαμέσου των οποίων επιφέρουν τη διαμορφωτική αλλαγή του τελευταίου, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η «έξω-μέσα» σηματοδότηση. Η ανάπτυξη νέων ανταγωνιστών της ιντεγκρίνης αIIbβ3 κρίνεται αναγκαία.

Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι το 8/πεπτιδίο YMESRADR που προέρχεται από την αλληλουχία 313-320 της αIIb υπομονάδας του υποδοχέα αIIbβ3, αποτελεί ισχυρό αναστολέα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν η διερεύνηση του τρόπου δράσης του 8/πεπτιδίου $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$.

Σχεδιάστηκαν πειράματα υπολογιστικών μεθόδων προσομοίωσης της αλληλεπίδρασης του 8/πεπτιδίου με τον υποδοχέα στην κεκαμμένη διαμόρφωση του. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά, έδειξαν ότι το $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ αλληλεπιδρά με τις βI και υβριδική περιοχή της β3 υπομονάδας κλειδώνοντας τον υποδοχέα στην ανενεργή κατάσταση του. Οι αλληλεπιδράσεις που εμπλέκονται είναι οι εξής: D^{319} (8/πεπτιδίο) - K^{384} (β3), R^{320} (8/πεπτιδίο) - E^{356} (β3) και Y^{313} (8/πεπτιδίο) και E^{297} (β3).

Τα αμινοξέα που βρέθηκαν ότι λαμβάνουν μέρος στην αλληλεπίδραση, επιβεβαιώθηκαν με πειράματα προσκόλλησης υπό ροή χρησιμοποιώντας κλώνους CHO κυττάρων που εκφράζουν την ιντεγκρίνη αIIbβ3 άγριου τύπου καθώς και με μεταλλάξεις στις δυο υπομονάδες αλλά και με πειράματα ελέγχου της ανασταλτικής δράσης τόσο του μητρικού αναλόγου όσο και τροποποιημένων $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ 8/πεπτιδίων (alanine scanning).

Στη συνέχεια, για την επιβεβαίωση του ρόλου και την εμπλοκή των αμινοξικών καταλοίπων Y^{313} και R^{320} στην αλληλεπίδραση τους με τις δύο υπομονάδες του υποδοχέα αIIbβ3 αλλά και για την ανάπτυξη νέων ισχυρότερων αναστολέων της συσσώρευσης των

αιμοπεταλίων, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν, καθαρίστηκαν, ταυτοποιήθηκαν και εξετάστηκε η ανασταλτική δράση 14 τροποποιημένων 8/πεπτιδίων. Επίσης σχεδιάστηκαν επιπλέον 2 τροποποιημένα πεπτιδικά ανάλογα στη θέση 315.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το 8/πεπτίδιο $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ φαίνεται να αναστέλλει την πρόσδεση του ινωδογόνου μέσω πρόσδεσης του στην υβριδική και βΙ περιοχή της β3 υπομονάδας, η οποία επιβάλλει τη διατήρηση του υποδοχέα σε μια ανενεργή κατάσταση. Η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει τον καθοριστικό ρόλο των αμινοξέων D^{319} και R^{320} , στην έκφραση της ανασταλτικής δράσης, ενώ δεν φαίνεται καθοριστική η συμβολή της Y^{313} στην αλληλεπίδραση της με τη βΙ περιοχή της β3 υπομονάδας. Σε ενίσχυση της παραπάνω εκτίμησης, συμβάλουν τα αποτελέσματα για το πεπτιδικό ανάλογο RMESRADR, όπου πέρα της δυνατότητας σταθεροποίησης της αλληλεπίδρασης με περισσότερους δεσμούς υδρογόνου, είναι εφικτό να αναπτύσσεται και μια ιοντικού τύπου αλληλεπίδραση.

Συμπερασματικά η εργασία αυτή προτείνει μια νέα εναλλακτική αντιαιμοπεταλιακή προσέγγιση μέσω της ανάπτυξης αλλοστερικών ανταγωνιστών του $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Οι ανταγωνιστές αυτοί θα μπορούσαν να δράσουν μέσω αλληλεπίδρασης τους με τον υποδοχέα $\alpha\text{IIb}\beta 3$, διατηρώντας τον στη χαμηλής συγγένειας κατάσταση.

ABSTRACT

The platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ plays an important role at the final step of platelet aggregation and that renders it a very promising target in the development of antiplatelet drugs.

Upon platelet activation, the integrin extends and switches in its active conformation, where exhibits high affinity for the extracellular ligand. RGD - peptides strongly inhibit the binding of fibrinogen (main ligand) to the receptor and consequently platelet aggregation. However, nowadays the use of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ antagonists in daily clinical have been limited. It has been reported that their ligation to $\alpha\text{IIb}\beta 3$, has as result the maintenance of the receptor in its active conformation. In this condition, the receptor induce an outside-inside signaling. The development of new $\alpha\text{IIb}\beta 3$ antagonist is necessary.

We have previously shown that the 8/peptide YMESRADR corresponding to amino acids 313-320 of the αIIb subunit, acts as a potent inhibitor of platelet aggregation.

The purpose of this study is to highlight the mechanism through which $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ exhibits its inhibitory activity effect on platelet aggregation.

The results from the *in silico* modelling analysis of the receptor - 8/peptide interaction, showed that the peptide is able to act as a substitute for the β -ribbon by forming a clasp restraining the $\beta 3$ hybrid and βI domains in a closed conformation. The proposed interactions involve: D^{319} (8/peptide) - K^{384} ($\beta 3$), R^{320} (8/peptide) - E^{356} ($\beta 3$) και Y^{313} (8/peptide) και E^{297} ($\beta 3$).

The residues that were found to take place at the interaction, were confirmed by studies of CHO cells (expressing the wild type or mutated $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin) adhesion to fibrinogen under flow conditions and inhibitory studies on platelet functions of the native or Ala substituted peptides.

In order to confirm the role of the Y^{313} and R^{320} amino acid residues in the interaction with the receptor and moreover to develop new potent inhibitors of platelet aggregation, 14 αIIb derived peptides were designed, synthesized, purified, identified and tested for their inhibitory effect.

The results indicated that $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$ exerts its inhibitory effect on fibrinogen binding through its interaction with the βI and hybrid domains of $\beta 3$ subunit; maintaining the receptor in its low affinity state. This study confirms the crucial role of the D^{319} and R^{320} amino acids on peptide's inhibitory activity. On the other hand, contribution of Y^{313} does

not seem to be crucial. The inhibitory activity of RMESRADR peptide reinforces this point of view, wherein besides of arginine hydrogen-bonding capability, ionic interactions are possible to be developed.

In conclusion, this study revealed that a new antiplatelet approach can be used for developing allosteric $\alpha\text{IIb}\beta_3$ antagonists. These antagonists could act via their interaction with the receptor maintaining it in its low affinity state.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 1^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] WHO, “The top 10 causes of death: Fact sheet N°310,” *World Health Organisation*, 2013. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
- [2] K. Bledzka, S. S. Smyth, and E. F. Plow, “Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$: from discovery to efficacious therapeutic target,” *Circ. Res.*, vol. 112, no. 8, pp. 1189–200, Apr. 2013.
- [3] V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, et al, “Heart disease and stroke statistics-2012 update: A report from the American heart association,” *Circulation*, vol. 125, 2012.
- [4] W. H. O. R. O. for Europe, “European ‘Health for All’ Database (HFA-DB),” *World Health Organization Regional Office for Europe*. p. -, 2007.
- [5] A. S. Go, D. Mozaffarian, V. L. Roger, et al, *Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association.*, vol. 129, no. 3. 2014.
- [6] J. N. George, “Platelets,” *Lancet*, vol. 355, no. 9214, pp. 1531–1539, 2000.
- [7] M. G. Valdes, “Textbook of Clinical Pediatrics,” *Mayo Clin. Proc.*, vol. 76, no. 12, p. 1281, 2001.
- [8] J. H. Hartwig, K. Barkalow, A. Azim, and J. Italiano, “The elegant platelet: Signals controlling actin assembly,” in *Thrombosis and Haemostasis*, 1999, vol. 82, no. 2, pp. 392–398.
- [9] J. W. M. Heemskerk, E. M. Bevers, and T. Lindhout, “Platelet activation and blood coagulation,” *Thromb. Haemost.*, vol. 88, no. 2, pp. 186–193, 2002.
- [10] P. Blair and R. Flaumenhaft, “Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates,” *Blood Rev.*, vol. 23, pp. 177–189, 2009.
- [11] J. S. S. G. de Jong and L. R. C. Dekker, “Platelets and cardiac arrhythmia,” *Front. Physiol.*, vol. 1 DEC, no. December, pp. 1–8, 2010.
- [12] T. D. Pollard and J. A. Cooper, “Actin, a central player in cell shape and movement,” *Science*, vol. 326, no. 5957, pp. 1208–1212, 2009.
- [13] O. P. Jones, “Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles,” *Anat. Rec.*, vol. 138, pp. 105–113, Oct. 1960.
- [14] S. Koseoglu and R. Flaumenhaft, “Advances in platelet granule biology,” *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 20, no. 5, pp. 464–71, 2013.
- [15] F. Rendu and B. Brohard-Bohn, “The platelet release reaction: granules’ constituents, secretion and functions,” *Platelets*, vol. 12, no. 5, pp. 261–273, 2001.
- [16] A. McNicol and S. J. Israels, “Platelet dense granules: Structure, function and implications for haemostasis,” *Thrombosis Research*, vol. 95, no. 1. pp. 1–18, 1999.
- [17] P. Gresele, C. P. Page, V. Fuster, and J. Vermynen, “Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: pathophysiology, pharmacology and therapeutics,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 1, no. 3, pp. 613–614, 2003.
- [18] J. A. Rosado and S. O. Sage, “Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp1) channels in human platelets,” *Biochem J*, vol. 356, no. Pt 1, pp. 191–198, 2001.
- [19] A. D. Michelson, “Thrombin-induced down-regulation of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 18, no. 1, pp. 18–27, Jan. 1992.
- [20] A. L. Ambrosio, J. A. Boyle, and S. M. Di Pietro, “Mechanism of platelet dense granule biogenesis: Study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system,” *Blood*, vol. 120, no. 19, pp. 4072–4081, 2012.

- [21] J. M. Gerrard, J. G. White, and D. A. Peterson, "The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 40, no. 2. pp. 224–231, 1978.
- [22] P. Coales, "Principles of Anatomy and Physiology," *Physiotherapy*, vol. 86. p. 555, 2000.
- [23] L. Badimon, J. J. Badimon, G. Vilahur, E. Segalés, and V. Llorente, "Pathogenesis of the acute coronary," pp. 225–231, 2002.
- [24] D. T. Price and J. Loscalzo, "Cellular Adhesion Molecules and Atherogenesis," vol. 1, no. 6.
- [25] T. H. Wang, D. L. Bhatt, K. A. A. Fox, S. R. S et al, "An analysis of mortality rates with dual-antiplatelet therapy in the primary prevention population of the CHARISMA trial," *Eur. Heart J.*, vol. 28, pp. 2200–2207, 2007.
- [26] T. A. Meadows and D. L. Bhatt, "Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation.," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 9, pp. 1261–75, May 2007.
- [27] G. Cimmino and P. Golino, "Platelet biology and receptor pathways.," *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 299–309, Jun. 2013.
- [28] L. K. Jennings, "Role of platelets in atherothrombosis.," *Am. J. Cardiol.*, vol. 103, no. 3 Suppl, p. 4A–10A, Feb. 2009.
- [29] S. Massberg, K. Brand, S. Gruner, et al, "A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 196. pp. 887–896, 2002.
- [30] T. Lisman, N. Raynal, D. Groeneveld, et al, "A single high-affinity binding site for von Willebrand factor in collagen III, identified using synthetic triple-helical peptides," *Blood*, vol. 108, pp. 3753–3756, 2006.
- [31] T. J. Kunicki, D. J. Nugent, S. J. Staats, et al, "The Human Fibroblast Class II Extracellular Matrix Receptor Mediates Platelet Adhesion to Collagen and Is Identical to the Platelet Glycoprotein Ia-IIa Complex," no. 1987, pp. 1873–1874, 1988.
- [32] B. Savage, F. Almus-Jacobs, and Z. M. Ruggeri, "Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow," *Cell*, vol. 94, pp. 657–666, 1998.
- [33] P. G. De Groot, R. T. Urbanus, and M. Roest, "Antiplatelet Agents," vol. 210, 2012.
- [34] K. Jurk and B. E. Kehrel, "Platelets: Physiology and biochemistry," in *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2005, vol. 31, pp. 381–392.
- [35] A. Kauskot and M. F. Hoylaerts, *Antiplatelet Agents*, vol. 210. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [36] D. Varga-Szabo, A. Braun, and B. Nieswandt, "Calcium signaling in platelets," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 7. pp. 1057–1066, 2009.
- [37] S. Offermanns, "Activation of platelet function through G protein-coupled receptors," *Circ Res*, vol. 99, pp. 1293–1304, 2006.
- [38] M. J. Berridge, M. D. Bootman, and H. L. Roderick, "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, pp. 517–529, 2003.
- [39] J. R. Crittenden, W. Bergmeier, Y. Zhang, et al, "CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation.," *Nat. Med.*, vol. 10, pp. 982–986, 2004.
- [40] T. J. Rink and S. O. Sage, "Calcium signaling in human platelets," *Annu Rev Physiol*, vol. 52, pp. 431–449, 1990.

- [41] G. L. Dale, P. Friese, P. Batar, et al, "Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface.," *Nature*, vol. 415, pp. 175–179, 2002.
- [42] M. Kalafatis, "Coagulation factor V: a plethora of anticoagulant molecules.," *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 12, pp. 141–148, 2005.
- [43] L. K. Jennings, "Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis.," *Thromb. Haemost.*, vol. 102, no. 2, pp. 248–57, Aug. 2009.
- [44] L. Tao, Y. Zhang, X. Xi, and N. Kieffer, "Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms regulating platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activation.," *Protein Cell*, vol. 1, no. 7, pp. 627–37, Jul. 2010.
- [45] J. W. Weisel, "Fibrinogen and fibrin," *Adv Protein Chem*, vol. 70, pp. 247–299, 2005.
- [46] J. M. Kollman, L. Pandi, M. R. Sawaya, M. Riley, and R. F. Doolittle, "Crystal structure of human fibrinogen," *Biochemistry*, vol. 48, pp. 3877–3886, 2009.
- [47] M. Madan, S. D. Berkowitz, and J. E. Tchong, "Glycoprotein IIb/IIIa Integrin Blockade," *Circulation*, vol. 98, no. 23, pp. 2629–2635, Dec. 1998.
- [48] J. Kloczewiak, M. Timmons, S. Hawiger, "Recognition site for the platelet receptor is present on the 15-residue carboxy-terminal fragment of the γ chain of human fibrinogen and is not involved in the fibrin polymerization reaction," *Thromb. Res.*, vol. 29, pp. 249–254, 1983.
- [49] S. C. Lam, E. F. Plow, M. A. Smith, et al, "Evidence that arginyl-glycyl-aspartate peptides and fibrinogen gamma chain peptides share a common binding site on platelets.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, pp. 947–950, 1987.
- [50] T. A. Springer, J. Zhu, and T. Xiao, "Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen γC peptide by the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$," *J. Cell Biol.*, vol. 182, no. 4, pp. 791–800, 2008.
- [51] K. M. Hook and J. S. Bennett, "Antiplatelet Agents," vol. 210, pp. 199–223, 2012.
- [52] P. R. Eisenberg and G. Ghigliotti, "Platelet-dependent and procoagulant mechanisms in arterial thrombosis," *Int. J. Cardiol.*, vol. 68, 1999.
- [53] M. Cattaneo, "Resistance to anti-platelet agents," *Thromb. Res.*, vol. 127, 2011.
- [54] Ι. Α. Γουδέβερος, Κ. Ι. Καλαντζή, Δ. Αλεξόπουλος, και συν, "Κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιαιμοπεταλιακή αγωγή στην πρωτογενή και δευτερογενή πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου," *Hellenic Journal of Cardiology*, vol 53, 2012
- [55] R. M. Kramer, E. F. Roberts, J. V Manetta, P. A. Hyslop, and J. A. Jakubowski, "Thrombin-induced phosphorylation and activation of $\text{Ca}(2+)$ -sensitive cytosolic phospholipase A2 in human platelets.," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, pp. 26796–26804, 1993.
- [56] W. L. Smith, "Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action.," *Am. J. Physiol.*, vol. 263, pp. F181–F191, 1992.
- [57] C. Patrono, F. Andreotti, H. Arnesen, et al, "Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis," *European Heart Journal*, vol. 32. pp. 2922–2932, 2011.
- [58] A. D. Michelson, "Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease.," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 9, pp. 154–169, 2010.
- [59] P. J. Loll, D. Picot, and R. M. Garavito, "The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 2, pp. 637–643, 1995.

- [60] E. H. Awtry and J. Loscalzo, "Aspirin," *Circulation*, vol. 101, no. 10, pp. 1206–1218, Mar. 2000.
- [61] L. A. Harker and C. A. Finch, "Thrombokinetis in man.," *J. Clin. Invest.*, vol. 48, pp. 963–974, 1969.
- [62] A. K. Pedersen and G. A. FitzGerald, "Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 311, pp. 1206–1211, 1984.
- [63] C. Patrono, G. Ciabattini, P. Patrignani, et al, "Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition.," *Circulation*, vol. 72, pp. 1177–1184, 1985.
- [64] M. M. Wolfe, D. R. Lichtenstein, and G. SINGH, "Gastrointestinal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs," *Surv. Anesthesiol.*, vol. 44, no. 3, pp. 180–181, Jun. 2000.
- [65] T. A. Papathanasiou A, Goudevenos J, "Resistance to Aspirin and Clopidogrel : Possible," pp. 352–363, 2007.
- [66] D. A. Gorog, J. M. Sweeny, and V. Fuster, "Antiplatelet drug 'resistance'. Part 2: laboratory resistance to antiplatelet drugs-fact or artifact?," *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 6, pp. 365–373, 2009.
- [67] D. Murdoch and G. L. Plosker, "Triflusal: A review of its use in cerebral infarction and myocardial infarction, and as thromboprophylaxis in atrial fibrillation," *Drugs*, vol. 66, pp. 671–692, 2006.
- [68] J. García-Rafanell, J. Ramis, L. Gomez, and J. Forn, "Effect of triflusal and other salicylic acid derivatives on cyclic AMP levels in rat platelets.," *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, vol. 284, pp. 155–165, 1986.
- [69] A. Lanas, P. Serrano, E. Bajador, J. Fuentes, and R. Sáinz, "Risk of upper gastrointestinal bleeding associated with non-aspirin cardiovascular drugs, analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs.," *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 15, pp. 173–178, 2003.
- [70] L. Ibáñez, X. Vidal, L. Vendrell, U. Moretti, and J. R. Laporte, "Upper gastrointestinal bleeding associated with antiplatelet drugs.," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 23, no. 2, pp. 235–42, Jan. 2006.
- [71] B. Nieswandt and S. P. Watson, "Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor?," *Blood*, vol. 102, pp. 449–461, 2003.
- [72] F. Moheimani and D. E. Jackson, "P2Y12 receptor: Platelet thrombus formation and medical interventions," *International Journal of Hematology*, vol. 96, pp. 572–587, 2012.
- [73] B. N. Kahner, H. Shankar, S. Murugappan, G. L. Prasad, and S. P. Kunapuli, "Nucleotide receptor signaling in platelets," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 4, pp. 2317–2326, 2006.
- [74] P. Ohlmann, S. de Castro, G. G. Brown, C. Gachet, K. A. Jacobson, and T. K. Harden, "Quantification of recombinant and platelet P2Y 1 receptors utilizing a [125I]-labeled high-affinity antagonist 2-iodo-N 6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate ([125I]MRS2500)," *Pharmacol. Res.*, vol. 62, pp. 344–351, 2010.
- [75] B. Hechler, C. Léon, C. Vial, et al, "The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation.," *Blood*, vol. 92, pp. 152–159, 1998.
- [76] M. Cattaneo, "Molecular defects of the platelet P2 receptors," *Purinergic Signal.*, vol. 7, pp. 333–339, 2011.

- [77] H. M. Jantzen, D. S. Milstone, L. Gousset, P. B. Conley, and R. M. Mortensen, "Impaired activation of murine platelets lacking Gai2," *J. Clin. Invest.*, vol. 108, pp. 477–483, 2001.
- [78] J. L. Daniel, C. Dangelmaier, J. Jin, Y. B. Kim, and S. P. Kunapuli, "Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation," *Thromb. Haemost.*, vol. 82, pp. 1322–1326, 1999.
- [79] M. Cattaneo, "New P2Y(12) inhibitors," *Circulation*, vol. 121, no. 1, pp. 171–9, Jan. 2010.
- [80] M. E. Bertrand, H. J. Rupprecht, P. Urban, A. H. Gershlick, and F. T. C. Investigators, "Double-Blind Study of the Safety of Clopidogrel With and Without a Loading Dose in Combination With Aspirin Compared With Ticlopidine in Combination With Aspirin After Coronary Stenting : The Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study (CLAS)," *Circulation*, vol. 102, no. 6, pp. 624–629, Aug. 2000.
- [81] S. Uchiyama, Y. Fukuuchi, and T. Yamaguchi, "The safety and efficacy of clopidogrel versus ticlopidine in Japanese stroke patients: combined results of two Phase III, multicenter, randomized clinical trials," *J. Neurol.*, vol. 256, no. 6, pp. 888–97, Jun. 2009.
- [82] J. L. Mega, S. L. Close, S. D. Wiviott, et al, "Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: A pharmacogenetic analysis," *Lancet*, vol. 376, pp. 1312–1319, 2010.
- [83] P. Savi, P. Nurden, A. T. Nurden, S. Levy-Toledano, and J. M. Herbert, "Clopidogrel: a review of its mechanism of action," *Platelets*, vol. 9, pp. 251–255, 1998.
- [84] N. A. Farid, A. Kurihara, and S. A. Wrighton, "Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans," *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 50, pp. 126–142, 2010.
- [85] D. J. Angiolillo and J. L. Ferreiro, "Platelet adenosine diphosphate P2Y12 receptor antagonism: benefits and limitations of current treatment strategies and future directions," *Rev. española Cardiol.*, vol. 63, pp. 60–76, 2010.
- [86] K. Horstrup, B. Jablonka, P. Honig-Liedl, M. Just, K. Kochsiek, and U. Walter, "Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition," *Eur. J. Biochem.*, vol. 225, pp. 21–27, 1994.
- [87] P. A. Gurbel, K. P. Bliden, B. L. Hiatt, and C. M. O'Connor, "Clopidogrel for coronary stenting: Response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity," *Circulation*, vol. 107, pp. 2908–2913, 2003.
- [88] D. J. Angiolillo, A. Fernandez-Ortiz, E. Bernardo, et al, "Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, pp. 1895–1900, 2006.
- [89] E. Abergel and E. Nikolsky, "Ticagrelor: an investigational oral antiplatelet treatment for reduction of major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndrome," *Vasc. Health Risk Manag.*, vol. 6, pp. 963–77, Jan. 2010.
- [90] L. Wallentin, C. Varenhorst, S. James, et al, "Prasugrel achieves greater and faster P2Y12receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease," *Eur. Heart J.*, vol. 29, no. 1, pp. 21–30, Jan. 2008.

- [91] J. T. Brandt, C. D. Payne, S. D. Wiviott, et al, "A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation.," *Am. Heart J.*, vol. 153, no. 1, pp. 66.e9–16, Jan. 2007.
- [92] S. D. Wiviott, E. Braunwald, C. H. McCabe, et al, "Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes.," 2007.
- [93] R. Teng and K. Butler, "Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist, in healthy subjects.," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 66, no. 5, pp. 487–96, May 2010.
- [94] J. J. J. van Giezen, L. Nilsson, P. Berntsson, et al, "Ticagrelor binds to human P2Y₁₂ independently from ADP but antagonizes ADP-induced receptor signaling and platelet aggregation," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7, pp. 1556–1565, 2009.
- [95] R. F. Storey, S. Husted, R. A. Harrington, et al, "Inhibition of Platelet Aggregation by AZD6140, A Reversible Oral P2Y₁₂ Receptor Antagonist, Compared With Clopidogrel in Patients With Acute Coronary Syndromes," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 50, pp. 1852–1856, 2007.
- [96] R. C. Becker, C. P. Cannon, M. J. Claeys, et al, "Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes undergoing coronary artery bypass surgery: results from the PLATO (Platelet Inhibition and Patient Outcomes) trial.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 57, pp. 672–84, 2011.
- [97] R. F. Storey, "The P2Y₁₂ receptor as a therapeutic target in cardiovascular disease.," *Platelets*, vol. 12, pp. 197–209, 2001.
- [98] D. L. Bhatt, A. M. Lincoff, C. M. Gibson, et al, "Intravenous platelet blockade with cangrelor during PCI.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, pp. 2330–2341, 2009.
- [99] R. A. Harrington, G. W. Stone, S. McNulty, et al, "Platelet inhibition with cangrelor in patients undergoing PCI.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, pp. 2318–2329, 2009.
- [100] H. J. Bouman, J. W. van Werkum, C. M. Hackeng, N. Clappers, and J. M. Ten Berg, "Cangrelor increases the magnitude of platelet inhibition and reduces interindividual variability in clopidogrel-pretreated subjects.," *Neth. Heart J.*, vol. 17, pp. 195–198, 2009.
- [101] M. Ueno, S. V Rao, and D. J. Angiolillo, "Elinogrel: pharmacological principles, preclinical and early phase clinical testing.," *Future Cardiol.*, vol. 6, pp. 445–453, 2010.
- [102] A. D. Michelson, "Advances in antiplatelet therapy.," *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2011, pp. 62–9, Jan. 2011.
- [103] K. G. Mann, "Thrombin formation.," *Chest*, vol. 124, p. 4S–10S, 2003.
- [104] J. H. Morrissey, V. Pureza, R. L. Davis-Harrison, et al, "Blood clotting reactions on nanoscale phospholipid bilayers," *Thrombosis Research*, vol. 122, 2008.
- [105] J. Rivera, M. L. Lozano, L. Navarro-Núñez, and V. Vicente, "Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation.," *Haematologica*, vol. 94, pp. 700–711, 2009.
- [106] S. R. Coughlin, "Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology," in *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005, vol. 3, pp. 1800–1814.
- [107] A. Fontayne, K. Vanhoorelbeke, I. Pareyn, et al, "Rational humanization of the powerful antithrombotic anti-GPIIb/IIIa antibody: 6B4.," *Thromb. Haemost.*, vol. 96, pp. 671–684, 2006.

- [108] R. Shah, "Protease-activated receptors in cardiovascular health and diseases," *American Heart Journal*, vol. 157, pp. 253–262, 2009.
- [109] M. R. Burnham, M. T. Harte, A. Richardson, J. T. Parsons, and A. H. Bouton, "The identification of p130cas-binding proteins and their role in cellular transformation," *Oncogene*, vol. 12, pp. 2467–2472, 1996.
- [110] T. K. H. Vu, D. T. Hung, V. I. Wheaton, and S. R. Coughlin, "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation," *Cell*, vol. 64, pp. 1057–1068, 1991.
- [111] L. Martorell, J. Martínez-González, C. Rodríguez, et al, "Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis," *Thromb. Haemost.*, vol. 99, pp. 305–315, 2008.
- [112] R. A. Henriksen and V. K. Hanks, "PAR-4 agonist AYPGKF stimulates thromboxane production by human platelets," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 22, pp. 861–866, 2002.
- [113] L. Covic, C. Singh, H. Smith, and A. Kuliopulos, "Role of the PAR4 thrombin receptor in stabilizing platelet-platelet aggregates as revealed by a patient with Hermansky-Pudlak Syndrome," *Thromb. Haemost.*, vol. 87, pp. 722–727, 2002.
- [114] P. Lova, S. Paganini, F. Sinigaglia, C. Balduini, and M. Torti, "A Gi-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, pp. 12009–12015, 2002.
- [115] V. Henn, J. R. Slupsky, M. Gräfe, et al, "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells," *Nature*, vol. 391, pp. 591–594, 1998.
- [116] S. J. Shattil, H. Kashiwagi, and N. Pampori, "Integrin signaling: the platelet paradigm," *Blood*, vol. 91, no. 8, pp. 2645–57, Apr. 1998.
- [117] F. Adam, M. C. Guillin, and M. Jandrot-Perrus, "Glycoprotein Ib-mediated platelet activation: A signalling pathway triggered by thrombin," *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, pp. 2959–2970, 2003.
- [118] J. R. Hamilton, I. Cornelissen, and S. R. Coughlin, "Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 2, pp. 1429–1435, 2004.
- [119] R. C. Becker, D. J. Moliterno, L. K. Jennings, et al, "Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II study," *Lancet*, vol. 373, pp. 919–928, 2009.
- [120] M. L. O'Donoghue, D. L. Bhatt, S. D. Wiviott, et al, "Safety and tolerability of atopaxar in the treatment of patients with acute coronary syndromes: The lessons from antagonizing the cellular effects of thrombin-acute coronary syndromes trial," *Circulation*, vol. 123, pp. 1843–1853, 2011.
- [121] S. D. Wiviott, M. D. Flather, M. L. O'Donoghue, et al, "Randomized trial of atopaxar in the treatment of patients with coronary artery disease: The lessons from antagonizing the cellular effect of thrombin-coronary artery disease trial," *Circulation*, vol. 123, pp. 1854–1863, 2011.
- [122] B. S. Collier, "Translating from the rivers of Babylon to the coronary bloodstream," vol. 122, no. 11, pp. 4293–4299, 2012.
- [123] L. K. Jennings, M. M. White, and T. D. Mandrell, "Interspecies comparison of platelet aggregation, LIBS expression and clot retraction: observed differences in GPIIb-IIIa functional activity," *Thromb. Haemost.*, vol. 74, pp. 1551–1556, 1995.

- [124] M. A. Mascelli, E. T. Lance, L. Damaraju, C. L. Wagner, H. F. Weisman, and R. E. Jordan, "Pharmacodynamic profile of short-term abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/IIIa receptor blockade.," 1998.
- [125] S. H. Tam, P. M. Sassoli, R. E. Jordan, and M. T. Nakada, "Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha(v)beta3 integrins.," *Circulation*, vol. 98, pp. 1085–1091, 1998.
- [126] R. A. Harrington, N. S. Kleiman, K. Kottke-marchant, et al, "Platelet Administration of a Peptide Glycoprotein IIb / IIIa During Percutaneous Coronary Intervention," vol. 76, 1995.
- [127] M. Lele, M. Sajid, N. Wajih, and G. A. Stouffer, "Eptifibatide and 7E3, but not tirofiban, inhibit alpha(v)beta(3) integrin-mediated binding of smooth muscle cells to thrombospondin and prothrombin.," *Circulation*, vol. 104, pp. 582–587, 2001.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] M. Saboor, Q. Ayub, S. Ilyas, and Moinuddin, "Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology.," *Pakistan J. Med. Sci.*, vol. 29, no. 3, pp. 891–6, May 2013.
- [2] M. A. Schwartz, M. D. Schaller, and M. H. Ginsberg, "Integrins: emerging paradigms of signal transduction.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 11, pp. 549–599, 1995.
- [3] J. S. Bennett, "Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3.," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, pp. 3363–3369, 2005.
- [4] R. O. Hynes, "The emergence of integrins: a personal and historical perspective.," *Matrix Biol.*, vol. 23, no. 6, pp. 333–40, Oct. 2004.
- [5] I. D. Campbell and M. J. Humphries, "Integrin structure, activation, and interactions.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–14, Mar. 2011.
- [6] A. Kasirer-Friede, M. L. Kahn, and S. J. Shattil, "Platelet integrins and immunoreceptors.," *Immunol. Rev.*, vol. 218, pp. 247–64, Aug. 2007.
- [7] R. O. Hynes, "Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines," *Cell*, vol. 110, pp. 673–687, 2002.
- [8] M. Barczyk, S. Carracedo, and D. Gullberg, "Integrins.," *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 269–80, Jan. 2010.
- [9] M. Trikha, J. Timar, S. K. Lundy, et al, "Human prostate carcinoma cells express functional alphaIIb(beta)3 integrin.," *Cancer Res.*, vol. 56, pp. 5071–5078, 1996.
- [10] C. L. Wagner, H. F. Weisman, and R. E. Jordan, "Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets," pp. 907–914, 2014.
- [11] B. S. Coller and O. G. L. Levy, "Perspectives Series : Cell Adhesion in Vascular Biology Platelet GPIIb / IIIa Antagonists: The First Anti-Integrin Receptor Therapeutics," vol. 99, no. 7, pp. 1467–1471, 1997.
- [12] Y. Q. Ma, J. Qin, and E. F. Plow, "Platelet integrin ??IIb???3: Activation mechanisms," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, pp. 1345–1352, 2007.
- [13] S. Timmons, M. Kloczewiak, and J. Hawiger, "ADP-dependent common receptor mechanism for binding of von Willebrand factor and fibrinogen to human platelets.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 81, no. 15, pp. 4935–9, Aug. 1984.
- [14] A. Reheman, P. Gross, H. Yang, et al, "Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 3, pp. 875–883, 2005.

- [15] E. F. Plow, R. P. McEver, B. S. Collier, et al, "Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets.," *Blood*, vol. 66, pp. 724–727, 1985.
- [16] D. J. Schneider, "Anti-platelet therapy: glycoprotein IIb-IIIa antagonists.," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 72, no. 4, pp. 672–82, Oct. 2011.
- [17] T. Xiao, J. Takagi, B. S. Collier, et al, "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics.," *Nature*, vol. 432, no. 7013, pp. 59–67, Nov. 2004.
- [18] M. J. Quinn, T. V Byzova, J. Qin, et al, "Integrin α IIb β 3 and its antagonism.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, pp. 945–952, 2003.
- [19] P. F. Bray, J. P. Rosa, V. R. Lingappa, et al, "Biogenesis of the platelet receptor for fibrinogen : Evidence for separate precursors for glycoproteins IIb and IIIa," vol. 83, no. March, pp. 1480–1484, 1986.
- [20] B. D. Adair and M. Yeager, "Three-dimensional model of the human platelet integrin α IIb β 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, pp. 14059–14064, 2002.
- [21] A. Duperray, A. Troesch, R. Berthier, et al, "evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for on the," pp. 1603–1611, 2014.
- [22] D.R. Phillips, I. F. Charo, L. V. Parise "The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa Complex," *Blood*, vol. 71, no. 4, pp. 831–843, 1988.
- [23] K. M. Hook and J. S. Bennett, "Antiplatelet Agents," vol. 210, pp. 199–223, 2012.
- [24] G. Van Willigen, "Regulation of Glycoprotein IIB/IIIA Exposure on Platelets Stimulated With a-Thrombin," vol. 1, no. 1, pp. 82–90, 1992.
- [25] S. J. Shattil, L. F. Brass, J. S. Bennett, and P. Pandhi, "Biochemical and functional consequences of dissociation of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex.," *Blood*, vol. 66, pp. 92–98, 1985.
- [26] P. Usobiaga, J. J. Calvete, J. L. Saiz, et al, "Molecular characterization of human platelet glycoproteins IIIa and IIb and the subunits of the latter," *Eur. Biophys. J.*, vol. 14, pp. 211–218, 1987.
- [27] A. T. Nurden, "Platelet membrane glycoproteins: A look back into the past and a view to the future," pp. 49–54, 2007.
- [28] K. Bledzka, S. S. Smyth, and E. F. Plow, "Integrin α IIb β 3: from discovery to efficacious therapeutic target.," *Circ. Res.*, vol. 112, no. 8, pp. 1189–200, Apr. 2013.
- [29] J. P. Xiong, "Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin α V β 3," *Science*, vol. 294, pp. 339–345, 2001.
- [30] J. Zhu, B. H. Luo, T. Xiao, et al, "Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces," *Mol. Cell*, vol. 32, pp. 849–861, 2008.
- [31] K. E. Gottschalk, "A coiled-coil structure of the α IIb β 3 integrin transmembrane and cytoplasmic domains in its resting state.," *Structure*, vol. 13, no. 5, pp. 703–12, May 2005.
- [32] T.L. Lau, V. Dua, and T. S. Ulmer, "Structure of the integrin α IIb transmembrane segment.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, pp. 16162–16168, 2008.
- [33] T. L. Lau, C. Kim, M. H. Ginsberg, and T. S. Ulmer, "The structure of the integrin α IIb β 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling.," *EMBO J.*, vol. 28, pp. 1351–1361, 2009.
- [34] T. L. Lau, A. W. Partridge, M. H. Ginsberg, and T. S. Ulmer, "Structure of the integrin α IIb β 3 transmembrane segment in phospholipid bicelles and detergent micelles," *Biochemistry*, vol. 47, pp. 4008–4016, 2008.

- [35] M. J. Williams, P. E. Hughes, T. E. O'Toole, and M. H. Ginsberg, "The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains.," *Trends Cell Biol.*, vol. 4, pp. 109–112, 1994.
- [36] S. J. Shattil, C. Kim, and M. H. Ginsberg, "The final steps of integrin activation: the end game.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, pp. 288–300, 2010.
- [37] W. Wang and B. H. Luo, "Structural basis of integrin transmembrane activation.," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 109, pp. 447–452, 2010.
- [38] J. L. Popot and D. M. Engelman, "Helical membrane protein folding, stability, and evolution.," *Annu Rev Biochem*, vol. 69, pp. 881–922, 2000.
- [39] O. Vinogradova, T. Haas, E. F. Plow, and J. Qin, "A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, pp. 1450–1455, 2000.
- [40] T. M. Leisner, J. D. Wencel-Drake, W. Wang, and S. C. T. Lam, "Bidirectional transmembrane modulation of integrin alpha(IIb)beta3 conformations.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, pp. 12945–12949, 1999.
- [41] T. E. Ootole, D. Mandelman, J. Forsyth, et al, "Modulation of the Affinity of Integrin GqIIb13 (GPIIb-IIIa) by the Cytoplasmic Domain of aIIb.," *Science (80-.)*, vol. 1610, pp. 845–847, 1991.
- [42] Y. Q. Ma, J. Yang, M. M. Pesho, et al, "Regulation of integrin aIIbβ3 activation by distinct regions of its cytoplasmic tails.," *Biochemistry*, vol. 45, pp. 6656–6662, 2006.
- [43] J.P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, et al, "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand.," *Science*, vol. 296, pp. 151–155, 2002.
- [44] N. Beglova, S. C. Blacklow, J. Takagi, and T. A. Springer, "Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 9, pp. 282–287, 2002.
- [45] J. Chen, A. Salas, and T. A. Springer, "Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 10, pp. 995–1001, 2003.
- [46] A. P. Mould, S. J. Barton, J. A. Askari, et al, "Role of ADMIDAS Cation-binding Site in Ligand Recognition by Integrin α5β1.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, pp. 51622–51629, 2003.
- [47] J. J. Calvete, "Structures of integrin domains and concerted conformational changes in the bidirectional signaling mechanism of alphaIIbbeta3.," *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, vol. 229, pp. 732–744, 2004.
- [48] E. Krissinel and K. Henrick, "Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions.," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 60, pp. 2256–2268, 2004.
- [49] T. S. Ulmer, B. Yaspan, M. H. Ginsberg, and I. D. Campbell, "NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin alpha IIb beta 3 in aqueous solution.," *Biochemistry*, vol. 40, pp. 7498–7508, 2001.
- [50] O. Vinogradova, J. Vaynberg, X. Kong, et al, "Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 12, pp. 4094–9, Mar. 2004.
- [51] R. Li, C. R. Babu, K. Valentine, et al, "Characterization of the monomeric form of the transmembrane and cytoplasmic domains of the integrin ??3 subunit by NMR spectroscopy.," *Biochemistry*, vol. 41, pp. 15618–15624, 2002.
- [52] M. Mehrbod, S. Trisno, and M. R. K. Mofrad, "On the activation of integrin αIIbβ3: outside-in and inside-out pathways.," *Biophys. J.*, vol. 105, no. 6, pp. 1304–15, Sep. 2013.

- [53] S. Honda, Y. Tomiyama, T. Aoki, et al, "Association between ligand-induced conformational changes of integrin IIb β 3 and IIb β 3-mediated intracellular Ca²⁺ signaling.," *Blood*, vol. 92, no. 10, pp. 3675–3683, Nov. 1998.
- [54] W. C. Kouns, C. D. Wall, M. M. White, et al, "A conformation-dependent epitope of human platelet glycoprotein IIIa.," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 33, pp. 20594–20601, Nov. 1990.
- [55] A. Obergefell, K. Eto, A. Mocsai, et al, "Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIb β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton," *J. Cell Biol.*, vol. 157, pp. 265–275, 2002.
- [56] D. G. Woodside, A. Obergefell, L. Leng, et al, "Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin cytoplasmic domains," no. October, pp. 1799–1804, 2001.
- [57] A. L. Jenkins, L. Nannizzi-Alaimo, D. Silver, et al, "Tyrosine phosphorylation of the β 3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, pp. 13878–13885, 1998.
- [58] P. Van der Geer and T. Pawson, "The PTB domain: A new protein module implicated in signal transduction," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 20, pp. 277–279, 1995.
- [59] D. R. Phillips, K. S. S. Prasad, J. Manganello, et al, "Integrin tyrosine phosphorylation in platelet signaling," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, pp. 546–554, 2001.
- [60] J. Zhu, B. Boylan, B. H. Luo, et al, "Tests of the extension and deadbolt models of integrin activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, pp. 11914–11920, 2007.
- [61] J.-P. Xiong, T. Stehle, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout, "New insights into the structural basis of integrin activation.," *Blood*, vol. 102, pp. 1155–1159, 2003.
- [62] M. Jin, I. Andricioaei, and T. A. Springer, "Conversion between three conformational states of integrin I domains with a C-terminal pull spring studied with molecular dynamics," *Structure*, vol. 12, pp. 2137–2147, 2004.
- [63] W. Chen, J. Lou, J. Hsin, et al, "Molecular dynamics simulations of forced unbending of integrin α V β 3," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 7, 2011.
- [64] M. A. Arnaout, B. Mahalingam, and J.P. Xiong, "Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 21, pp. 381–410, 2005.
- [65] B. H. Luo, C. V Carman, and T. A. Springer, "Structural basis of integrin regulation and signaling.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 25, pp. 619–647, 2007.
- [66] L. Tao, Y. Zhang, X. Xi, and N. Kieffer, "Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms regulating platelet integrin α IIb β 3 activation.," *Protein Cell*, vol. 1, no. 7, pp. 627–37, Jul. 2010.
- [67] J. Zhu, J. Zhu, and T. A. Springer, "Complete integrin headpiece opening in eight steps," *J. Cell Biol.*, vol. 201, pp. 1053–1068, 2013.
- [68] B. H. Luo, J. Takagi, and T. A. Springer, "Locking the β 3 Integrin I-like Domain into High and Low Affinity Conformations with Disulfides," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 10215–10221, 2004.
- [69] J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz, and T. A. Springer, "Global conformational arrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling," *Cell*, vol. 110, pp. 599–611, 2002.
- [70] T. Kamata, M. Handa, S. Ito, et al, "Structural requirements for activation in α IIb β 3 integrin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 38428–38437, 2010.
- [71] R. Blue, J. Li, J. Steinberger, M. Murcia, M. Filizola, and B. S. Coller, "Effects of limiting extension at the α IIb genu on ligand binding to integrin α IIb β 3," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 17604–17613, 2010.

- [72] M. Cheng, J. Li, A. Negri, and B. S. Collier, "Swing-out of the $\beta 3$ hybrid domain is required for $\alpha \text{IIb}\beta 3$ priming and normal cytoskeletal reorganization, but not adhesion to immobilized fibrinogen.," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e81609, Jan. 2013.
- [73] F. Adam, A. Kauskot, J. P. Rosa, and M. Bryckaert, "Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis.," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 6, pp. 2007–2016, 2008.
- [74] F. Bugaud, F. Nadal-Wollbold, S. Lévy-Toledano, et al, "Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets.," *Blood*, vol. 94, pp. 3800–3805, 1999.
- [75] F. Nadal-Wollbold, M. Pawlowski, S. Lévy-Toledano, et al, "Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf," *FEBS Lett.*, vol. 531, pp. 475–482, 2002.
- [76] H. Shankar, A. Garcia, J. Prabhakar, et al, "P2Y₁₂ receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A₂ generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation.," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 4, no. 3, pp. 638–647, Mar. 2006.
- [77] D. Larkin, A. Treumann, D. Murphy, et al, "Compartmentalization regulates the interaction between the platelet integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ and ICln," *Br. J. Haematol.*, vol. 144, no. 4, pp. 580–590, 2009.
- [78] S. Wang, X. Huang, Y. Li, et al, "RN181 suppresses hepatocellular carcinoma growth by inhibition of the ERK/MAPK pathway," *Hepatology*, vol. 53, no. 6, pp. 1932–1942, 2011.
- [79] T. Junrong, Z. Huancheng, H. Feng, et al, "Proteomic identification of CIB1 as a potential diagnostic factor in hepatocellular carcinoma," *J. Biosci.*, vol. 36, no. 4, pp. 659–668, 2011.
- [80] F. Nadal, S. Lévy-Toledano, F. Grelac, et al, "Negative regulation of mitogen-activated protein kinase activation by integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ in platelets.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 22381–22384, 1997.
- [81] O. Vinogradova, A. Velyvis, A. Velyviene, et al, "A structural mechanism of integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 'inside-out' activation as regulated by its cytoplasmic face," *Cell*, vol. 110, pp. 587–597, 2002.
- [82] S. Liu, D. A. Calderwood, and M. H. Ginsberg, "Integrin cytoplasmic domain-binding proteins.," *J. Cell Sci.*, vol. 113 (Pt 2, pp. 3563–3571, 2000.
- [83] C. A. Otey, F. M. Pavalko, and K. Burridge, "An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro.," *J. Cell Biol.*, vol. 111, pp. 721–729, 1990.
- [84] K. Burridge and M. Chrzanowska-Wodnicka, "Focal adhesions, contractility, and signaling.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 12, pp. 463–518, 1996.
- [85] D. J. Rees, S. E. Ades, S. J. Singer, and R. O. Hynes, "Sequence and domain structure of talin.," *Nature*, vol. 347, pp. 685–689, 1990.
- [86] B. T. Goult, M. Bouaouina, P. R. Elliott, et al, "Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: a role in integrin activation.," *EMBO J.*, vol. 29, no. 6, pp. 1069–80, Mar. 2010.
- [87] M. Bouaouina, Y. Lad, and D. A. Calderwood, "The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate $\alpha 1$ and $\alpha 3$ integrins," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, pp. 6118–6125, 2008.
- [88] D. A. Calderwood, Y. Fujioka, J. M. de Pereda, et al, "Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, pp. 2272–2277, 2003.

- [89] A. C. Kalli, K. L. Wegener, B. T. Goult, et al, "The Structure of the Talin/Integrin Complex at a Lipid Bilayer: An NMR and MD Simulation Study," *Structure*, vol. 18, pp. 1280–1288, 2010.
- [90] B. García-Alvarez, J. M. De Pereda, D. A. Calderwood, et al, "Structural determinants of integrin recognition by talin," *Mol. Cell*, vol. 11, pp. 49–58, 2003.
- [91] K. L. Wegener, A. W. Partridge, J. Han, et al, "Structural Basis of Integrin Activation by Talin," *Cell*, vol. 128, pp. 171–182, 2007.
- [92] F. Ye, C. Kim, and M. H. Ginsberg, "Molecular mechanism of inside-out integrin regulation," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 9, pp. 20–25, 2011.
- [93] C. Kim, T.L. Lau, T. S. Ulmer, and M. H. Ginsberg, "Interactions of platelet integrin α IIb and β 3 transmembrane domains in mammalian cell membranes and their role in integrin activation.," *Blood*, vol. 113, pp. 4747–4753, 2009.
- [94] F. Ye, A. K. Snider, and M. H. Ginsberg, "Talin and kindlin: The one-two punch in integrin activation," *Frontiers of Medicine in China*, vol. 8, pp. 6–16, 2014.
- [95] N. J. Anthis, K. L. Wegener, F. Ye, et al, "The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction.," *EMBO J.*, vol. 28, pp. 3623–3632, 2009.
- [96] S. Tadokoro, S. J. Shattil, K. Eto, et al, "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation.," *Science*, vol. 302, pp. 103–106, 2003.
- [97] S. Ussar, H.V. Wang, S. Linder, et al, "The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development.," *Exp. Cell Res.*, vol. 312, pp. 3142–3151, 2006.
- [98] L. A. Yates, C. N. Lumb, N. N. Brahme, et al, "Structural and functional characterization of the kindlin-1 pleckstrin homology domain.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, pp. 43246–61, 2012.
- [99] Y. Q. Ma, J. Qin, C. Wu, and E. F. Plow, "Kindlin-2 (Mig-2): A co-activator of α 3 integrins," *J. Cell Biol.*, vol. 181, pp. 439–446, 2008.
- [100] H. Qu, Y. Tu, X. Shi, et al, "Kindlin-2 regulates podocyte adhesion and fibronectin matrix deposition through interactions with phosphoinositides and integrins.," *J. Cell Sci.*, vol. 124, pp. 879–891, 2011.
- [101] B. T. Goult, M. Bouaouina, D. S. Harburger, et al, "The Structure of the N-Terminus of Kindlin-1: A Domain Important for α IIb β 3 Integrin Activation," *J. Mol. Biol.*, vol. 394, pp. 944–956, 2009.
- [102] M. Moser, B. Nieswandt, S. Ussar, et al, "Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation.," *Nat. Med.*, vol. 14, pp. 325–330, 2008.
- [103] S. Ussar, M. Moser, M. Widmaier, et al, "Loss of kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction," *PLoS Genet.*, vol. 4, 2008.
- [104] S. Kloeker, M. B. Major, D. A. Calderwood, et al, "The Kindler Syndrome Protein Is Regulated by Transforming Growth Factor- β and Involved in Integrin-mediated Adhesion," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 6824–6833, 2004.
- [105] E. Montanez, S. Ussar, M. Schifferer, et al, "Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins," *Genes Dev.*, vol. 22, pp. 1325–1330, 2008.
- [106] D. S. Harburger, M. Bouaouina, and D. A. Calderwood, "Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 17, pp. 11485–97, Apr. 2009.
- [107] K. Bledzka, J. Liu, Z. Xu, et al, "Spatial coordination of kindlin-2 with talin head domain in interaction with integrin β 3 cytoplasmic tails," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, pp. 24585–24594, 2012.

- [108] B. N. Kahner, H. Kato, A. Banno, et al, "Kindlins, integrin activation and the regulation of talin recruitment to $\alpha\text{IIb}\beta_3$," *PLoS One*, vol. 7, 2012.
- [109] F. Ye, B. G. Petrich, P. Anekal, et al, "The mechanism of kindlin-mediated activation of integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$," *Curr. Biol.*, vol. 23, pp. 2288–2295, 2013.
- [110] C. T. Lefort, J. Rossaint, M. Moser, et al, "Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation," *Blood*, vol. 119, pp. 4275–4282, 2012.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 3^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] E. Ruoslahti, "RGD and other recognition sequences for integrins.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 12, pp. 697–715, 1996.
- [2] A. Salsmann, E. Schaffner-Reckinger, and N. Kieffer, "RGD, the Rho'd to cell spreading.," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 85, no. 3–4, pp. 249–54, Apr. 2006.
- [3] P. Schaffner and M. M. Dard, "Cellular and Molecular Life Sciences Structure and function of RGD peptides involved in bone biology," vol. 60, pp. 119–132, 2003.
- [4] R. M. Scarborough, M. A. Naughton, W. Teng, et al, "Design of potent and specific integrin antagonists: Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, pp. 1066–1073, 1993.
- [5] R. Kodandapani, B. Veerapandian, T. J. Kunicki, and K. R. Ely, "Crystal structure of the OPG2 fab: An antireceptor antibody that mimics an RGD cell adhesion site," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 2268–2273, 1995.
- [6] S. M. Saporito-Irwin and W. E. Van Nostrand, "Coagulation factor XIa cleaves the RHDS sequence and abolishes the cell adhesive properties of the amyloid protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 26265–26269, 1995.
- [7] K. M. Yamada and D. W. Kennedy, "Peptide inhibitors of fibronectin, laminin, and other adhesion molecules: unique and shared features.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 130, pp. 21–28, 1987.
- [8] E. Koivunen, B. Wang, and E. Ruoslahti, "Isolation of a highly specific ligand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library," *J Cell Biol*, vol. 124, pp. 373–380, 1994.
- [9] J. L. Guan and R. O. Hynes, "Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1.," *Cell*, vol. 60, pp. 53–61, 1990.
- [10] W. D. Staatz, K. F. Fok, M. M. Zutter, et al, "Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, pp. 7363–7367, 1991.
- [11] P. A. Underwood, F. A. Bennett, A. Kirkpatrick, et al, "Evidence for the location of a binding sequence for the alpha 2 beta 1 integrin of endothelial cells, in the beta 1 subunit of laminin.," *Biochem. J.*, vol. 309 (Pt 3, pp. 765–771, 1995.
- [12] L. Osborn, C. Vassallo, B. G. Browning, et al, "Arrangement of domains, and amino acid residues required for binding of vascular cell adhesion molecule-1 to its counter-receptor VLA-4 (alpha4beta1)," *J. Cell Biol.*, vol. 124, pp. 601–608, 1994.
- [13] M. Kloczewiak, S. Timmons, T. J. Lukas, and J. Hawiger, "Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain.," *Biochemistry*, vol. 23, pp. 1767–1774, 1984.
- [14] R. F. Doolittle, K. W. Watt, B. A. Cottrell, D. D. Strong, and M. Riley, "The amino acid sequence of the alpha-chain of human fibrinogen.," *Nature*, vol. 280, pp. 464–468, 1979.

- [15] D. C. Gulba, K. Huber, S. Moll, and R. Dietz, "Platelet inhibition: new agents, new strategies, new trials," *Fibrinolysis and Proteolysis*, vol. 12, no. Supplement 2, pp. 13–23, 1998.
- [16] T. A. Springer, J. Zhu, and T. Xiao, "Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen γ C peptide by the platelet integrin α IIb β 3," *J. Cell Biol.*, vol. 182, no. 4, pp. 791–800, 2008.
- [17] S. Massberg, K. Brand, S. Gruner, et al, "A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 196, pp. 887–896, 2002.
- [18] A. Salsmann, E. Schaffner-Reckinger, F. Kabile, S. Plançon, and N. Kieffer, "A new functional role of the fibrinogen RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin α IIb β 3-dependent RhoA activation during cell spreading," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 33610–33619, 2005.
- [19] T. Xiao, J. Takagi, B. S. Collier, J. H. Wang, and T. A. Springer, "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics," *Nature*, vol. 432, no. 7013, pp. 59–67, Nov. 2004.
- [20] J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, et al, "Crystal structure of the extracellular segment of integrin α V β 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand," *Science*, vol. 296, pp. 151–155, 2002.
- [21] J. Zhu, J. Zhu, A. Negri, et al, "Closed headpiece of integrin α IIb β 3 and its complex with an α IIb β 3-specific antagonist that does not induce opening," *Blood*, vol. 116, no. 23, pp. 5050–9, Dec. 2010.
- [22] J. Zhu, J. Zhu, and T. A. Springer, "Complete integrin headpiece opening in eight steps," *J. Cell Biol.*, vol. 201, pp. 1053–1068, 2013.
- [23] K. M. Hook and J. S. Bennett, "Antiplatelet Agents," vol. 210, pp. 199–223, 2012.
- [24] M. J. Quinn, "Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors: Recognition of a Two-Edged Sword?," *Circulation*, vol. 106, no. 3, pp. 379–385, Jul. 2002.
- [25] T. Kamata, K. K. Tieu, A. Irie, T. A. Springer, and Y. Takada, "Amino Acid Residues in the α IIb Subunit that Are Critical for Ligand Binding to Integrin α IIb β 3 Are Clustered in the β -Propeller Model," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 47, pp. 44275–44283, 2001.
- [26] S. E. D'Souza, T. A. Haas, R. S. Piotrowicz, et al, "Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the integrin β 3 subunit: cation displacement is involved in ligand binding," *Cell*, vol. 79, pp. 659–667, 1994.
- [27] D. L. French and B. S. Collier, "Hematologically important mutations: Glanzmann thrombasthenia," *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 23, no. 1, pp. 39–51, 1997.
- [28] D. Cox, "Oral GPIIb/IIIa antagonists: what went wrong?," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 10, no. 14, pp. 1587–1596, 2004.
- [29] D. P. Chew, D. L. Bhatt, and E. J. Topol, "Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: why don't they work?," *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, vol. 1, no. 6, pp. 421–428, 2001.
- [30] R. Blue, M. Murcia, C. Karan, M. Jirousková, and B. S. Collier, "Application of high-throughput screening to identify a novel α IIb-specific small-molecule inhibitor of α IIb β 3-mediated platelet interaction with fibrinogen," *Blood*, vol. 111, no. 3, pp. 1248–56, Feb. 2008.
- [31] A. Kouki, J. V Mitsios, M. Sakarellos - Daitisiotis, et al, "Highly constrained cyclic (S, S)-CXaaC-peptides as inhibitors of fibrinogen binding to platelets," no. December 2004, pp. 2324–2330, 2005.
- [32] N. Biris, M. Abatzis, J. V. Mitsios, et al, "Mapping the binding domains of the α IIb subunit. A study performed on the activated form of the platelet integrin α IIb β 3," *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, no. 18, pp. 3760–3767, Sep. 2003.

- [33] V. D. Roussa, E. M. Stathopoulou, N. D. Papamichael, et al, "A highly constrained cyclic (S,S)-CDC- peptide is a potent inhibitor of carotid artery thrombosis in rabbits.," *Platelets*, vol. 22, no. 5, pp. 361–370, 2011.
- [34] A. A. Dimitriou, P. Stathopoulos, J. V Mitsios, et al, "Inhibition of platelet activation by peptide analogs of the beta(3)-intracellular domain of platelet integrin alpha(IIb)beta(3) conjugated to the cell-penetrating peptide Tat(48-60).," *Platelets*, vol. 20, pp. 539–547, 2009.
- [35] A. Gkourogiani, M. Egot, V. Koloka, et al, "Palmitoylated peptide, being derived from the carboxyl-terminal sequence of the integrin alphaIIb cytoplasmic domain, inhibits talin binding to alphaIIbbeta(3).," *Platelets*, vol. 25, no. 8, pp. 619–627, 2014.
- [36] V. Koloka, E. D. Christofidou, S. Vaxevanelis, et al "A palmitoylated peptide, derived from the acidic carboxyl-terminal segment of the integrin alphaIIb cytoplasmic domain, inhibits platelet activation.," *Platelets*, vol. 19, no. 7, pp. 502–511, Nov. 2008.
- [37] R. Blue, M. A. Kowalska, J. Hirsch, et al, "Structural and therapeutic insights from the species specificity and in vivo antithrombotic activity of a novel alphaIIb-specific alphaIIb beta3 antagonist," *Blood*, vol. 114, pp. 195–201, 2009.
- [38] J. Zhu, W. S. Choi, J. G. McCoy, et al, "Structure-Guided Design of a High-Affinity Platelet Integrin alphaIIb beta3 Receptor Antagonist That Disrupts Mg²⁺ Binding to the MIDAS," *Science Translational Medicine*, vol. 4, pp. 125ra32–125ra32, 2012.
- [39] R. Blue, M. A. Kowalska, J. Hirsch, et al, "Structural and therapeutic insights from the species specificity and in vivo antithrombotic activity of a novel alphaIIb-specific alphaIIbbeta3 antagonist," *Blood*, vol. 114, no. 1, pp. 195–201, Jul. 2009.
- [40] K. Bledzka, S. S. Smyth, and E. F. Plow, "Integrin alphaIIb beta3: from discovery to efficacious therapeutic target.," *Circ. Res.*, vol. 112, no. 8, pp. 1189–200, Apr. 2013.
- [41] J. Tao, E. G. Arias-Salgado, C. González-Manchón, et al, "A 1063G→A mutation in exon 12 of glycoprotein (GP)IIb associated with a thrombasthenic phenotype: Mutation analysis of [324E]GPIIb," *Br. J. Haematol.*, vol. 111, pp. 965–973, 2000.
- [42] H. Ambo, T. Kamata, M. Handa, et al, "Novel point mutations in the alphaIIb subunit (Phe289→Ser, Glu324→Lys and Gln747→Pro) causing thrombasthenic phenotypes in four Japanese patients.," *Br. J. Haematol.*, vol. 102, pp. 829–840, 1998.
- [43] M. Ferrer, M. Fernández-Pinel, C. González-Manchón, et al, "A mutant (Arg327 → His) GPIIb associated to thrombasthenia exerts a dominant negative effect in stably transfected CHO cells," *Thromb. Haemost.*, vol. 76, pp. 292–301, 1996.
- [44] J. V. Mitsios, A. P. Tambaki, M. Abatzis, et al, "Effect of synthetic peptides corresponding to residues 313-332 of the alphaIIb subunit on platelet activation and fibrinogen binding to alphaIIb beta3," *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, pp. 855–862, 2004.
- [45] J. V Mitsios, G. Stamos, F. I. Rodis, et al, "Investigation of the role of adjacent amino acids to the 313-320 sequence of the alphaIIb subunit on platelet activation and fibrinogen binding to alphaIIbbeta3.," *Platelets*, vol. 17, no. 5, pp. 277–282, Aug. 2006.
- [46] R. J. Kok, A. J. Schraa, E. J. Bos, et al, "Preparation and Functional Evaluation of RGD-Modified Proteins as alpha beta3 Integrin Directed Therapeutics," *Bioconjug. Chem.*, vol. 13, no. 1, pp. 128–135, Jan. 2002.
- [47] J. Samanen, F. Ali, T. Romoff, et al, "Development of a small RGD peptide fibrinogen receptor antagonist with potent antiaggregatory activity in vitro.," *J. Med. Chem.*, vol. 34, pp. 3114–3125, 1991.
- [48] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Muller, et al, "Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 32, pp. 20233–20238, Aug. 1994.

- [49] N. D. Papamichael, E. M. Stathopoulou, V. D. Roussa, et al, "Effect of a Synthetic Peptide Corresponding to Residues 313 to 320 of the α IIb Subunit of the Human Platelet Integrin α IIb β 3 on Carotid Artery Thrombosis in Rabbits," vol. 329, no. 2, pp. 634–640, 2009.
- [50] E. J. Harfenist, M. A. Packham, and J. F. Mustard, "Effects of the cell adhesion peptide, Arg-Gly-Asp-Ser, on responses of washed platelets from humans, rabbits, and rats.," *Blood*, vol. 71, pp. 132–136, 1988.
- [51] R. M. Stanica, D. Benaki, F. I. Rodis, et al, "Structure – activity relationships of α IIb 313 – 320 derived peptide inhibitors of human platelet aggregation," no. July, pp. 1195–1202, 2008.
- [52] A. M. Krezel, G. Wagner, J. Seymour-Ulmer, and R. A. Lazarus, "Structure of the RGD protein decorsin: conserved motif and distinct function in leech proteins that affect blood clotting.," *Science*, vol. 264, pp. 1944–1947, 1994.
- [53] I. Ojima, S. Chakravarty, and Q. Dong, "Antithrombotic agents: From RGD to peptide mimetics," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 3, pp. 337–360, 1995.
- [54] B. Kieffer, G. Mer, A. Mann, and J. F. Lefèvre, "Structural studies of two antiaggregant RGDW peptides by ^1H and ^{13}C NMR.," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 44, pp. 70–79, 1994.
- [55] S. Kostidis, A. Stavrakoudis, N. Biris, et al, "The Relative Orientation of the Arg and Asp Side Chains Defined by a Pseudodihedral Angle as a Key Criterion for Evaluating the Structure – Activity Relationship of RGD," vol. 509, no. February, pp. 494–509, 2004.
- [56] T. Kimmerlin and D. Seebach, "'100 years of peptide synthesis': Ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to peptide assemblies," *J. Pept. Res.*, vol. 65, pp. 229–260, 2005.
- [57] A. Loffet, "Peptides as drugs: is there a market?," *J. Pept. Sci.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2002.
- [58] U.S. Food and Drug Administration. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm> (accessed Jan 23, 2014).
- [59] A. A. Kaspar and J. M. Reichert, "Future directions for peptide therapeutics development," *Drug Discovery Today*, vol. 18, pp. 807–817, 2013.
- [60] B. F. Choonara, Y. E. Choonara, P. Kumar, et al, "A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 32, no. 7, pp. 1269–1282, Aug. 2014.
- [61] V. Mäde, S. Els-Heindl, and A. G. Beck-Sickinger, "Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides," *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 10, pp. 1197–1212, 2014.
- [62] N. N. Salama, N. D. Eddington, and A. Fasano, "Tight junction modulation and its relationship to drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, pp. 15–28, 2006.
- [63] M. Werle and A. Bernkop-Schnürch, "Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs," *Amino Acids*, vol. 30, pp. 351–367, 2006.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 4^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] C. Fox, "Mosby's medical, nursing and allied health dictionary (6th edition)," *Accident and Emergency Nursing*, vol. 10, p. 113, 2002.
- [2] M. Bodanszky, *Peptide Chemistry A Practical Textbook*, 2nd Rev. E., New York, 1993.

- [3] L. Pauling, R. B. Corey, and H. R. Branson, "The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 37, pp. 205–211, 1951.
- [4] D. Pal and P. Chakrabarti, "Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations.," *J. Mol. Biol.*, vol. 294, pp. 271–288, 1999.
- [5] F. Albericio, "Developments in peptide and amide synthesis," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 8, pp. 211–221, 2004.
- [6] R. B. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, pp. 2149–2154, 1963.
- [7] S. Chandrudu, P. Simerska, and I. Toth, "Chemical methods for peptide and protein production.," *Molecules*, vol. 18, no. 4, pp. 4373–88, Jan. 2013.
- [8] K. H. Hsieh, M. M. Demaine, and S. Gurusidaiah, "Side reactions in solid-phase peptide synthesis and their applications," *Int J Pept Protein Res*, vol. 48, pp. 292–298, 1996.
- [9] R. B. Merrifield, "Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture)," vol. 24, no. 10, pp. 799–892, 1985.
- [10] R. A. Houghten, "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides : Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids Immunology : Houghten," vol. 82, no. August, pp. 5131–35, 1985.
- [11] H. M. Geysen, R. Meloent, and S. J. Bartelingt, "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid," vol. 81, no. July, pp. 3998–4002, 1984.
- [12] R. B. Merrifield, "Automated Synthesis of Peptides," *Sci.*, vol. 150, no. 3693, pp. 178–185, Oct. 1965.
- [13] V. Mäde, S. Els-Heindl, and A. G. Beck-Sickinger, "Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides," *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 10, pp. 1197–1212, 2014.
- [14] M. Lebl and J. Hachmann, "High-throughput peptide synthesis.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 298, pp. 167–194, 2005.
- [15] H. M. Yu, S. T. Chen, and K. T. Wang, "Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation," *J. Org. Chem.*, vol. 67, pp. 4781–4784, 1992.
- [16] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, et al, "A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity," *Nature*, vol. 354, no. 6348, pp. 82–84, Nov. 1991.
- [17] N. Sewald and H.D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, vol. 3. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002, pp. 3–527.
- [18] S. S. Wang, "p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 4, pp. 1328–1333, Feb. 1973.
- [19] D. Fancelli, M. C. Fagnola, D. Severino, and A. Bedeschi, "Solid phase synthesis of 2-substituted benzofurans via the palladium-catalysed heteroannulation of acetylenes," *Tetrahedron Lett.*, vol. 38, pp. 2311–2314, 1997.
- [20] P. Sieber, "An improved method for anchoring of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-amino acids to 4-alkoxybenzyl alcohol resins.," *Tetrahedron Letters*, vol. 28, pp. 6147–6150, 1987.
- [21] V. Krchňák, Z. Flegelová, A. S. Weichsel, and M. Lebl, "Polymer-supported Mitsunobu ether formation and its use in combinatorial chemistry," *Tetrahedron Lett.*, vol. 36, pp. 6193–6196, 1995.

- [22] B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz, and R. Frank, "An efficient method for anchoring fmoc-amino acids to hydroxyl-functionalised solid supports," *Tetrahedron Letters*, vol. 31, pp. 1701–1704, 1990.
- [23] J. Hachmann and M. Lebl, "Alternative to Piperidine in Fmoc Solid-Phase Synthesis," *J. Comb. Chem.*, vol. 8, no. 2, p. 149, Dec. 2005.
- [24] H.-F. Boeden, W. Büttner, C. Rupprich, et al, "Acylation of hydroxyl groups in polymers with carbonic acid derivatives in the presence of tertiary amines," *Die Makromol. Chemie*, vol. 193, no. 4, pp. 865–887, 1992.
- [25] C. D. Chang, A. M. Felix, M. H. Jimenez, and J. Meienhofer, "Solid-phase peptide synthesis of somatostatin using mild base cleavage of N alpha-9-fluorenylmethoxycarbonylamino acids," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 15, pp. 485–494, 1980.
- [26] J. Green and K. Bradley, "Studies on the acylation of hydroxy-functionalized resins using Fmoc amino acids activated using diisopropylcarbodiimide/HOBt or as acid fluorides," *Tetrahedron*, vol. 49, no. 20, pp. 4141–4146, 1993.
- [27] J. W. Van Nispen, J. P. Polderdijk, and H. M. Greven, "Suppression of side-reactions during the attachment of Fmoc-amino acids to hydroxymethyl polymers," *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas*, vol. 104, no. 3, pp. 99–100, 1985.
- [28] E. Pedroso, A. Grandas, M. A. Saralegui, et al, "Convergent solid phase peptide synthesis. I. Synthesis of protected segments on a hydroxymethylphenyloxymethyl resin using the base labile Fmoc α -amine protection. Model synthesis of LHRH," *Tetrahedron*, vol. 38, no. 9, pp. 1183–1192, 1982.
- [29] R. Sheppard, "The fluorenylmethoxycarbonyl group in solid phase synthesis," *J. Pept. Sci.*, vol. 9, pp. 545–552, 2003.
- [30] L. A. Carpino and G. Y. Han, "The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group," *J Org Chem*, vol. 37, pp. 3404–3409, 1972.
- [31] A. K. Tickler, C. J. Barrow, and J. D. Wade, "Improved preparation of amyloid-beta peptides using DBU as Nalpha-Fmoc deprotection reagent," *J. Pept. Sci.*, vol. 7, pp. 488–494, 2001.
- [32] F. W. Lichtenthaler, "Emil Fischer, His Personality, His Achievements, and His Scientific Progeny," *European J. Org. Chem.*, vol. 2002, no. 24, pp. 4095–4122, 2002.
- [33] M. Bergmann and L. Zervas, "Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese," *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)*, vol. 65, no. 7, pp. 1192–1201, 1932.
- [34] R. Paul, G. W. Anderson, and F. M. Callahan, "Some side reactions of nitro-L-arginine," *Sect. Title Amin. Acids, Pept. Proteins*, pp. 3347–3350, 1961.
- [35] Rink H, Sieber P, Raschdorf, "Conversion of NG-urethane protected arginine to ornithine in peptide solid phase synthesis," *Tetrahedron Lett.*, vol. 25, no. 6, pp. 621–624, 1984.
- [36] J. Beythien, S. Barthélémy, P. Schneeberger, and P. D. White, "A novel solid-phase linker strategy for the side-chain anchoring of arginine: an expeditious route to arginine 7-amido-4-methylcoumarins," *Tetrahedron Lett.*, vol. 47, no. 18, pp. 3009–3012, May 2006.
- [37] I. Photaki and A. Yiotakis, "N ω -linked arginine peptides," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, no. 3, pp. 259–264, 1976.
- [38] G. B. Fields and R. L. Noble, "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 35, pp. 161–214, 1990.
- [39] X. Li, T. Kawakami, and S. Aimoto, "Direct preparation of peptide thioesters using an Fmoc solid-phase method," *Tetrahedron Lett.*, vol. 39, pp. 8669–8672, 1998.

- [40] L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, et al, "The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant," *Tetrahedron Letters*, vol. 34, pp. 7829–7832, 1993.
- [41] R. Ramage, J. Green, and A. J. Blake, "An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: NG-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine," *Tetrahedron*, vol. 47, pp. 6353–6370, 1991.
- [42] C. D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, et al, "Preparation and properties of Nalpha-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert.-butyl side chain protection.," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 15, pp. 59–66, 1980.
- [43] E. Nicolás, E. Pedroso, and E. Girald, "Formation of aspartimide peptides in Asp-Gly sequences," *Tetrahedron Letters*, vol. 30, pp. 497–500, 1989.
- [44] R. S. Feinberg and R. B. Merrifield, "Modification of peptides containing glutamic acid by hydrogen fluoride-anisole mixtures. .gamma.-Acylation of anisole or the glutamyl nitrogen," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 97, no. 12, pp. 3485–3496, Jun. 1975.
- [45] M. Mergler and F. Dick, "The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part III," *J. Pept. Sci.*, vol. 11, pp. 650–657, 2005.
- [46] S. C. Vigil-Cruz and J. V Aldrich, "Unexpected aspartimide formation during coupling reactions using Asp(OAl) in solid-phase peptide synthesis," *Lett. Pept. Sci.*, vol. 6, pp. 71–75, 1999.
- [47] J. Ruczyński, B. Lewandowska, P. Mucha, and P. Rekowski, "Problem of aspartimide formation in Fmoc-based solid-phase peptide synthesis using Dmab group to protect side chain of aspartic acid," *J. Pept. Sci.*, vol. 14, pp. 335–341, 2008.
- [48] R. Behrendt, R. Marti, P. White, and C. Basava, "9th Annual Peptide Therapeutics Symposium," 2014, p. 32.
- [49] V. Cardona, "Application of Dmb-Dipeptides in the Fmoc SPPS of Difficult and Aspartimide-Prone Sequences.," *Int. J. Pept. Res. Ther.*, vol. 14, no. 4, pp. 285–292, 2008.
- [50] R. Pipkorn and B. Ekberg, "Histidine racemization in the synthesis of an analog of the luteinizing hormone releasing factor. Investigation by HPLC and enzymatic methods.," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 27, pp. 583–588, 1986.
- [51] A. R. Fletcher, J. H. Jones, W. I. Ramage, and A. V Stachulski, "The use of the N([small pi])-phenacyl group for the protection of the histidine side chain in peptide synthesis," *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, no. 0, pp. 2261–2267, 1979.
- [52] P. Sieber and B. Riniker, "Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group," *Tetrahedron Letters*, vol. 28, pp. 6031–6034, 1987.
- [53] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, and T. Tseggenidis, "Fmoc-His(Mmt)-OH und Fmoc-His(Mtt)-OH. Zwei neue histidin-derivative Nim-geschützt mit säure-hochempfindlichen gruppen. Darstellung, eigenschaften und einatz in der peptidsynthese," *Tetrahedron Lett.*, vol. 32, no. 4, pp. 475–478, Jan. 1991.
- [54] M. Mergler, F. Dick, B. Sax, et al, "Synthesis and Application of Fmoc-His (3-Bum) -OH †," vol. 510, pp. 502–510, 2001.
- [55] J. G. Adamson, M. A. Blaskovich, H. Groenevelt, and G. A. Lajoie, "Simple and convenient synthesis of tert-butyl ethers of Fmoc-serine, Fmoc-threonine, and Fmoc-tyrosine," *J. Org. Chem.*, vol. 56, no. 10, pp. 3447–3449, May 1991.
- [56] K. Barlos, D. Gatos, and S. Koutsogianni, "Fmoc/Trt-amino acids: comparison to Fmoc/tBu-amino acids in peptide synthesis," *J. Pept. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 194–200, 1998.
- [57] B. W. Erickson and R. B. Merrifield, "Acid stability of several benzylic protecting groups used in solid-phase peptide synthesis. Rearrangement of O-benzyltyrosine to 3-benzyltyrosine," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 11, pp. 3750–3756, May 1973.

- [58] J. Sheehan and G. Hess, "A new method of forming peptide bonds," *J. Am. Chem.*, 1955.
- [59] J. Izdebski, M. Pachulska, and A. Orłowska, "N-cyclohexyl-N'-isopropylcarbodiimide: a hybrid that combines the structural features of DCC and DIC," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 44, pp. 414–419, 1994.
- [60] A. Arendt and A. M. Kołodziejczyk, "O- and N-acylureas in peptide synthesis by DCC method. New observations," *Tetrahedron Lett.*, vol. 19, no. 40, pp. 3867–3868, 1978.
- [61] S. Nozaki, "Effects of amounts of additives on peptide coupling mediated by a water-soluble carbodiimide in alcohols," *J. Pept. Res.*, vol. 54, pp. 162–167, 1999.
- [62] M. Smith, J. G. Moffatt, and H. G. Khorana, "Carbodiimides. VIII.1 Observations on the Reactions of Carbodiimides with Acids and Some New Applications in the Synthesis of Phosphoric Acid Esters," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, no. 23, pp. 6204–6212, Dec. 1958.
- [63] K. U. Prasad, M. A. Iqbal, and D. W. Urry, "Utilization of 1-hydroxybenzotriazole in mixed anhydride coupling reactions," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 25, pp. 408–413, 1985.
- [64] R. Subirós-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, et al, "Oxyma: An efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 15, pp. 9394–9403, 2009.
- [65] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, and C. Selve, "Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (B.O.P.)," *Tetrahedron Lett.*, vol. 16, no. 14, pp. 1219–1222, 1975.
- [66] J. Coste, D. Le-Nguyen, and B. Castro, "PyBOP: a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product," *Tetrahedron Lett.*, vol. 31, pp. 205–208, 1990.
- [67] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, and D. Gillessen, "New coupling reagents in peptide chemistry," *Tetrahedron Letters*, vol. 30, pp. 1927–1930, 1989.
- [68] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, and F. Albericio, "Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, no. 2, pp. 201–203, 1994.
- [69] A. El-Faham and F. Albericio, "COMU: A third generation of uronium-type coupling reagents," *J. Pept. Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 6–9, 2010.
- [70] R. Subiros-Funosas, A. El-Faham, and F. Albericio, "PyOxP and PyOxB: the Oxyma-based novel family of phosphonium salts," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 8, no. 16, pp. 3665–3673, 2010.
- [71] L. A. Carpino and A. El-Faham, "Effect of Tertiary Bases on O-Benzotriazolyluronium Salt-Induced Peptide Segment Coupling," *J. Org. Chem.*, vol. 59, pp. 695–698, 1994.
- [72] L. A. Carpino, D. Ionescu, and A. El-Faham, "Peptide Coupling in the Presence of Highly Hindered Tertiary Amines," *J. Org. Chem.*, vol. 61, pp. 2460–2465, 1996.
- [73] M. Bodanszky, S. S. Deshmane, and J. Martined, "Side Reactions in Peptide Synthesis. 11. Possible Removal of the 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl Group by the Amino Components during Coupling," *J. Org. Chem.*, vol. 44, pp. 1622–1625, 1979.
- [74] W. S. Hancock and J. E. Battersby, "A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid," *Anal. Biochem.*, vol. 71, no. 1, pp. 260–264, Mar. 1976.
- [75] V. Krchnak, J. Vagner, P. Safar, and M. Lebl, "Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid-base indicator," *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, vol. 53, pp. 2542–2548, 1988.
- [76] T. Vojkovsky, "Detection of secondary amines on solid phase," *Pept. Res.*, vol. 8, no. 4, pp. 236–237, 1995.

- [77] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, and P. I. Cook, "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides.," *Anal. Biochem.*, vol. 34, pp. 595–598, 1970.
- [78] V. K. Sarin, S. B. Kent, J. P. Tam, and R. B. Merrifield, "Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction.," *Anal. Biochem.*, vol. 117, pp. 147–157, 1981.
- [79] H. Choi and J. V. Aldrich, "Comparison of methods for the Fmoc solid-phase synthesis and cleavage of a peptide containing both tryptophan and arginine.," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 42, pp. 58–63, 1993.
- [80] A. G. Bonner, L. M. Udell, W. A. Creasey, et al, "Solid-phase precipitation and extraction, a new separation process applied to the isolation of synthetic peptides.," *J. Pept. Res.*, vol. 57, pp. 48–58, 2001.
- [81] D. S. King, C. G. Fields, and G. B. Fields, "A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis.," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 36, pp. 255–266, 1990.
- [82] J. Tam, M. Riemen, and R. Merrifield, "Mechanisms of aspartimide formation_1988_MerrifieldRB," *Pept. Res.*, vol. 1, pp. 6–18, 1988.
- [83] M. Bodanszky and J. Martinez, "Side Reactions in Peptide Synthesis," *Synthesis*, vol. 1981, pp. 333–356, 1981.
- [84] J. P. Tam, M. W. Riemen, and R. B. Merrifield, "Mechanisms of aspartimide formation: the effects of protecting groups, acid, base, temperature and time.," *Pept. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 6–18, 1988.
- [85] J. D. Wade, M. N. Mathieu, M. Macris, and G. W. Tregear, "Base-induced side reactions in Fmoc-solid phase peptide synthesis: Minimization by use of piperazine as N(α)-deprotection reagent," *Lett. Pept. Sci.*, vol. 7, pp. 107–112, 2000.
- [86] F. Rabanal, J. J. Pastor, E. Nicolás, F. Albericio, and E. Giralt, "Synthesis of aspartimide-free protected peptides on base-labile functionalized resins," *Tetrahedron Letters*, vol. 41, pp. 8093–8096, 2000.
- [87] S. Kostidis, P. Stathopoulos, N. I. Chondrogiannis, et al, "Aspartyl methyl ester formation via aspartimide ring opening: A proposed modification of the protocols used in Boc- and Fmoc-based solid-phase peptide synthesis," *Tetrahedron Lett.*, vol. 44, pp. 8673–8676, 2003.
- [88] A. Karlström and A. Undén, "A new protecting group for aspartic acid that minimizes piperidine-catalyzed aspartimide formation in fmoc solid phase peptide synthesis," *Tetrahedron Lett.*, vol. 37, pp. 4243–4246, 1996.
- [89] S. A. Palasek, Z. J. Cox, and J. M. Collins, "Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis," *J. Pept. Sci.*, vol. 13, pp. 143–148, 2007.
- [90] R. Subiros-Funosas, A. El-Faham, and F. Albericio, "Use of Oxyma as pH modulatory agent to be used in the prevention of base-driven side reactions and its effect on 2-chlorotriyl chloride resin.," *Biopolymers*, vol. 98, no. 2, pp. 89–97, 2012.
- [91] R. D. Dimarchi, J. P. Tam, S. B. Kent, and R. B. Merrifield, "Weak acid-catalyzed pyrrolidone carboxylic acid formation from glutamine during solid phase peptide synthesis. Minimization by rapid coupling.," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 19, pp. 88–93, 1982.
- [92] B. F. Gisin and R. B. Merrifield, "Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. A side reaction in solid-phase peptide synthesis.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 94, pp. 3102–3106, 1972.

- [93] E. Pedroso, A. Grandas, H. X. De, et al, "Dioxopiperazine formation in solid phase peptide synthesis using p-alkoxybenzyl ester resins and Fmoc-amino acids," *Tetrahedron Lett.*, vol. 27, pp. 743–6, 1986.
- [94] P. M. Fischer, "Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry," *Journal of Peptide Science*, vol. 9, pp. 9–35, 2003.
- [95] C. Chiva, M. Vilaseca, E. Giralt, and F. Albericio, "An HPLC-ESMS study on the solid-phase assembly of C-terminal proline peptides," *J. Pept. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 131–140, 1999.
- [96] M. C. Khosla, R. R. Smeby, and F. M. Bumpus, "Failure sequence in solid-phase peptide synthesis due to the presence of an N-alkylamino acid.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 94, pp. 4721–4724, 1972.
- [97] M. Meldal, T. Bielfeldt, S. Peters, et al, "Susceptibility of glycans to beta-elimination in Fmoc-based O-glycopeptide synthesis.," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 43, pp. 529–536, 1994.
- [98] Y. Han, F. Albericio, and G. Barany, "Occurrence and minimization of cysteine racemization during stepwise solid-phase peptide synthesis," *J. Org. Chem.*, vol. 62, pp. 4307–4312, 1997.
- [99] M. M. Joullié and K. M. Lassen, "Evolution of amide bond formation," *Arkivoc*, vol. 2010, no. viii, pp. 189–250, 2010.
- [100] Y. M. Angell, J. Alsina, F. Albericio, and G. Barany, "Practical protocols for stepwise solid-phase synthesis of cysteine-containing peptides.," *J. Pept. Res.*, vol. 60, pp. 292–299, 2002.
- [101] A. Di Fenza, M. Tancredi, C. Galoppini, and P. Rovero, "Racemization studies of Fmoc-Ser(tBu)-OH during stepwise continuous-flow solid-phase peptide synthesis," *Tetrahedron Lett.*, vol. 39, pp. 8529–8532, 1998.
- [102] T. Kaiser, G. J. Nicholson, H. J. Kohlbau, and W. Voelter, "Racemization studies of Fmoc-Cys(Trt)-OH during stepwise Fmoc-Solid phase peptide synthesis," *Tetrahedron Lett.*, vol. 37, no. 8, pp. 1187–1190, Feb. 1996.
- [103] C. T. Mant, Y. Chen, Z. Yan, et al, "HPLC analysis and purification of peptides.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 386, pp. 3–55, 2007.
- [104] L. Yu, T. P. Conrads, and T. D. Veenstra, "Mass Spectrometry Instrumentation," *Instrumentation*, vol. 45, pp. 89–148, 2005.
- [105] G. Caprioli, M.R., Malorni, A., Sindona, "Mass Spectrometry in Biomolecular Sciences," *Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 475, 1996.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 5^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] V. K. Sarin, S. B. Kent, J. P. Tam, and R. B. Merrifield, "Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction.," *Anal. Biochem.*, vol. 117, pp. 147–157, 1981
- [2] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, and P. I. Cook, "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides.," *Anal. Biochem.*, vol. 34, pp. 595–598, 1970.
- [3] E. Schaffner-Reckinger, V. Gouon, C. Melchior, S. Plançon, and N. Kieffer, "Distinct involvement of $\beta 3$ integrin cytoplasmic domain tyrosine residues 747 and 759 in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphotyrosine signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, pp. 12623–12632, 1998.
- [4] G. V Born, "Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.," *J. biol. Chem.*, no. 194, pp. 927–9, 1962.

- [5] J. F. Mustard, D. W. Perry, N. G. Ardlie, "Preparation of Suspensions of Washed Platelets from Humans," *Br. J. Haematol.*, vol. 22, no. 2, pp. 193–204, 1972.
- [6] A. D. Michelson, "Flow cytometry: a clinical test of platelet function.," *Blood*, vol. 87, no. 12, pp. 4925–4936, Jun. 1996.
- [7] A. Larsson and T. L. Lindahl, "Inhibition of fibrinogen binding to platelets by MK-852, a new GPIIb/IIIa antagonist.," *Ups. J. Med. Sci.*, vol. 99, no. 2, pp. 121–129, 1994.
- [8] S. Honda, Y. Tomiyama, A. J. Pelletier, et al, "Topography of ligand-induced binding sites, including a novel cation-sensitive epitope (AP5) at the Amino terminus, of the human integrin $\beta 3$ subunit," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 11947–11954, 1995.
- [9] W. N. Burnette, "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with the antibody and radioiodinated protein A.," *Anal. Biochem.*, vol. 112, pp. 195–203, 1981.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 6^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] R. M. Stanica, D. Benaki, F. I. Rodis, E. Mikros, D. Tsoukatos, A. Tselepis, and V. Tsikaris, "Structure – activity relationships of α IIb 313 – 320 derived peptide inhibitors of human platelet aggregation," no. July, pp. 1195–1202, 2008.
- [2] J. Zhu, B. H. Luo, T. Xiao, C. Zhang, N. Nishida, and T. A. Springer, "Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces," *Mol. Cell*, vol. 32, pp. 849–861, 2008.
- [3] P. Legendre, A. Salsmann, J. Rayes, O. Trassard, N. Kieffer, and D. Baruch, "CHO cells expressing the high affinity α IIb β 3T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 4, pp. 236–246, 2006.
- [4] W. B. Mitchell, J. Li, M. Murcia, N. Valentin, P. J. Newman, and B. S. Coller, "Mapping early conformational changes in α IIb and β 3 during biogenesis reveals a potential mechanism for α IIb β 3 adopting its bent conformation.," *Blood*, vol. 109, pp. 3725–3732, 2007.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 7^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- [1] T. Xiao, J. Takagi, B. S. Coller, J.-H. Wang, and T. A. Springer, "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics.," *Nature*, vol. 432, no. 7013, pp. 59–67, Nov. 2004.
- [2] M. Cheng, J. Li, A. Negri, and B. S. Coller, "Swing-out of the $\beta 3$ hybrid domain is required for α IIb β 3 priming and normal cytoskeletal reorganization, but not adhesion to immobilized fibrinogen.," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e81609, Jan. 2013.
- [3] P. C. Armstrong and K. Peter, "GPIIb/IIIa inhibitors: from bench to bedside and back to bench again.," *Thromb. Haemost.*, vol. 107, no. 5, pp. 808–14, May 2012.
- [4] N. Biris, M. Abatzis, J. V. Mitsios, et al, "Mapping the binding domains of the α IIb subunit. A study performed on the activated form of the platelet integrin α IIb β 3," *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, no. 18, pp. 3760–3767, Sep. 2003.
- [5] N. D. Papamichael, E. M. Stathopoulou, V. D. Roussa, et al, "Effect of a Synthetic Peptide Corresponding to Residues 313 to 320 of the α IIb Subunit of the Human Platelet Integrin α IIb β 3 on Carotid Artery Thrombosis in Rabbits," vol. 329, no. 2, pp. 634–640, 2009.
- [6] A. N. Vomund, S. Stuhlsatz-Krouper, J. Dimitry, Y. Song, and W. A. Frazier, "A naturally occurring extracellular α - β clasp contributes to stabilization of β 3 integrins in a bent, resting conformation," *Biochemistry*, vol. 47, no. 44, pp. 11616–11624, 2008.

- [7] J. V. Mitsios, A. P. Tambaki, M. Abatzis, et al, "Effect of synthetic peptides corresponding to residues 313-332 of the α IIb subunit on platelet activation and fibrinogen binding to α IIb β 3," *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, pp. 855–862, 2004.
- [8] S. Honda, Y. Tomiyama, A. J. Pelletier, et al, "Topography of ligand-induced binding sites, including a novel cation-sensitive epitope (AP5) at the Amino terminus, of the human integrin β 3 subunit," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 11947–11954, 1995.
- [9] J. Zhu, J. Zhu, and T. A. Springer, "Complete integrin headpiece opening in eight steps," *J. Cell Biol.*, vol. 201, pp. 1053–1068, 2013.
- [10] J. M. Derrick, D. B. Taylor, R. G. Loudon, and T. K. Gartner, "The peptide LSARLAF causes platelet secretion and aggregation by directly activating the integrin α IIb β 3," *Biochem. J.*, vol. 325 (Pt 2, pp. 309–313, 1997.
- [11] R. Galati, A. Verdina, G. Falasca, and A. Chersi, "Increased resistance of peptides to serum proteases by modification of their amino groups," *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 58, no. 7–8, pp. 558–561, 2003.
- [12] L. Jaenicke, "Methods of Enzymatic Analysis. Bd. 5. Enzymes 3: Peptidases, Proteinases and Their Inhibitors. Hrsg. von H.-U. Bergmeyer und H. Fritz. 3. Aufl. Verlag Chemie GmbH, Weinheim – Deerfield Beach – Florida/USA – Basel 1984. XXVII, 598 S., geb. DM 270,-," *Chemie unserer Zeit*, vol. 18, no. 6, p. 214, 1984.
- [13] J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri, and S. Curry, "Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin," *J. Mol. Biol.*, vol. 353, no. 1, pp. 38–52, 2005.
- [14] F. Yang, Y. Zhang, and H. Liang, "Interactive association of drugs binding to human serum albumin," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 3, pp. 3580–3595, 2014.
- [15] N. A. Kratochwil, W. Huber, F. Müller, M. Kansy, and P. R. Gerber, "Predicting plasma protein binding of drugs: A new approach," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 64, no. 9, pp. 1355–1374, 2002.
- [16] F. Nadal, S. Lévy-Toledano, F. Grelac, J. P. Caen, J. P. Rosa, and M. Bryckaert, "Negative regulation of mitogen-activated protein kinase activation by integrin α IIb β 3 in platelets," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 22381–22384, 1997.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

▪ Δημοσίευσεις σε επιστημονικά περιοδικά

W.H. Lee, E.S Reckinger, D.C Tsoukatos, K. Aylward, V. Moussis, V. Tsikaris, **P. Trypou**, M. Egot, D. Baruch, N. Keifer, C. Bachelot-Loza. “Inhibition of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ligand binding by an αIIb peptide that clasps the hybrid domain to the βI domain of $\beta 3$ ”. Accepted PlosOne, (07/2015).

P. Trypou and V. Tsikaris. “Targeting the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$: A new class of inhibitors”. Mini Review, under preparation.

▪ Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια

- **83rd European Atherosclerosis Society Congress (EAS), 22-23/5/2015, Γλασκόβη, Ηνωμένο Βασίλειο**

“Cyclic antithrombotic agents with non-RGD like activity”

P. Trypou, V. Moussis, E. Malisiova, V. Chantzichristos, D. Tsoukatos, A.D Tselepis, V. Tsikaris

Proceedings: Atherosclerosis, under publication

- **Advanced Learning on Platelets & Thrombosis International Course (ALPIC), 20/3-22/3/2015, Παλαιός Άγιος Αθανάσις, Ελλάδα**

“Peptide analogues, derived from the extracellular domain of αIIb , as allosteric inhibitors of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activation”

A. Gkourogianni, S. Papadaki, **P. Trypou**, E. Malisiova, V. Moussis, V. Tsikaris, D. Tsoukatos

Proceedings: Oral Presentation OP02

- **33rd European Peptide Symposium (EPS), 31/8 – 9/5 2014, Σόφια, Βουλγαρία**

“Inhibition of human platelet aggregation using αIIb derived peptides that maintain $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in its low affinity state”

Paraskevi Trypou, Wen Hwa Lee, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Demokritos C. Tsoukatos, Kelly Aylward, Vassilios Moussis, Vassilios Tsikaris, Eleni Malisiova, Alexia Gkourogianni, Styliani Papadaki, Marion Egot, Dominique Baruch, Nelly Kieffer and Christilla Bachelot-Loza.

Proceedings: Journal of Peptide Science, 2014;20 (1):S234

- **82nd European Atherosclerosis Society Congress (EAS), 31/5-3/6 2014, Μαδρίτη, Ισπανία**

“Inhibition of human platelet aggregation using αIIb derived peptides that maintain αIIbβ3 in its low affinity state”

Paraskevi Trypou, Wen Hwa Lee, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Demokritos C. Tsoukatos, Kelly Aylward, Vassilios Moussis, Vassilios Tsikaris, Eleni Malisiova, Alexia Gkourogianni, Styliani Papadaki, Marion Egot, Dominique Baruch, Nelly Kieffer and Christilla Bachelot-Loza.

Proceedings: Atherosclerosis, Vol. 235, Issue 2, e265, Published in issue: August, 2014

- **Advanced Learning on Platelets & Thrombosis International Course, 7-9/3 2014, Μέτσοβο, Ελλάδα**

“Investigation of the critical amino acids of the YMESRADR peptide corresponding to 313-320 sequence of the αIIb subunit of integrin αIIbβ3, responsible for its antiplatelet activity”

S. Papadaki, A. Gourogianni, **P.Trypou**, E. Malisiova, V. Mousis, V. Tsikaris, D. Tsoukatos.

Proceedings: Oral presentation OP03

■ Ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

- **3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής, Ι.Μ.Ε.Θ.Α, 24-25/4/2015, Αθήνα**

«Πεπτιδικά ανάλογα, προερχόμενα από την εξωκυττάρια αΙΙb υπομονάδα της ιντεγκρίνης αΙΙbβ3, ως αλλοστερικοί αναστολείς της ενεργοποίησης της»

Σ. Παπαδάκη, Α. Γκουρογιάννη, Π. Τρύπου, Ε. Μαλισιώβα, Β. Μούσης, Β. Τσίκαρης, Δ. Τσουκάτος

Proceedings: Προφορική ανακοίνωση

- **6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Αθηροσκλήρωσης, 4-6/12/2014, Αθήνα**

«Συνθετικά ανάλογα της αλληλουχίας 313-320 της εξωκυττάριας αΙΙb υπομονάδας του υποδοχέα αΙΙbβ3, ως αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης»

Σ. Παπαδάκη, Π. Τρύπου, Α. Γκουρογιάννη, Ε. Μαλισιώβα, Β. Μούσης, Β. Τσίκαρης, Δ. Τσουκάτος

Proceedings: Poster

- **2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής Ι.Μ.Ε.Θ.Α, 11-12/4 2014, Αθήνα**

«Ιντεγκρίνη αΙΙbβ3: Συνθετικά ανάλογα της αλληλουχίας 313-320 της εξωκυττάριας αΙΙb υπομονάδας, ως αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης»

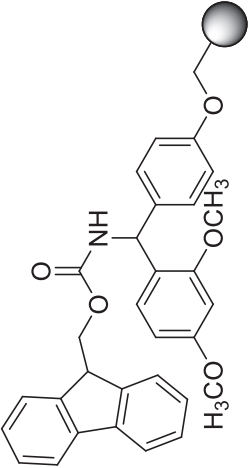
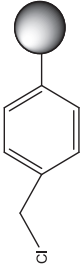
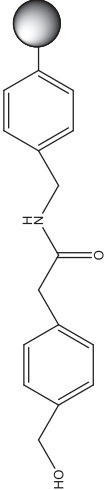
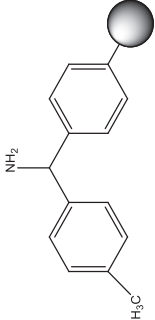
Σ. Παπαδάκη, Α. Γκουρογιάννη, Π. Τρύπου, Ε. Μαλισιώβα, Β. Μούσης, Β. Τσίκαρης, Δ. Τσουκάτος.

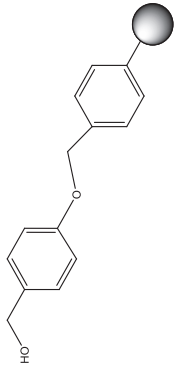
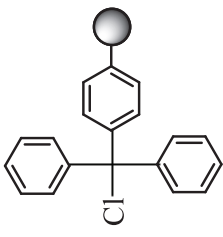
Proceedings: Poster

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: Τα 20 φουσικά αμινοξέα

<chem>NC(Cc1c[nH]cn1)C(=O)O</chem> His	<chem>NC(Cc1ccccc1)C(=O)O</chem> Phe	<chem>NC(C)C(=O)O</chem> Ala	<chem>NC(CCS)C(=O)O</chem> Cys	<chem>NC(C)C(=O)O</chem> Gly	<chem>NC(CCC(=O)O)C(=O)O</chem> Glu	<chem>NC(CCC(=O)O)C(=O)O</chem> Asp
<chem>NC(CCCCNC(=O)O)C(=O)O</chem> Arg	<chem>NC(CCCc1c[nH]c2ccccc12)C(=O)O</chem> Trp	<chem>NC(CSC)C(=O)O</chem> Met	<chem>NC(CCC(=O)N)C(=O)O</chem> Asn	<chem>NC(CCO)C(=O)O</chem> Ser	<chem>NC(Cc1ccc(O)cc1)C(=O)O</chem> Tyr	<chem>NC(CCC(=O)O)C(=O)O</chem> Glu
<chem>NC(CCCCNC(=O)O)C(=O)O</chem> Lys	<chem>NC(Cc1c[nH]c2ccccc12)C(=O)O</chem> Trp	<chem>NC(C)C(=O)O</chem> Val	<chem>NC(CCC(=O)N)C(=O)O</chem> Asn	<chem>NC(CCO)C(=O)O</chem> Ser	<chem>NC(CCC(=O)O)C(=O)O</chem> Glu	<chem>NC(CCC(=O)O)C(=O)O</chem> Asp

Βασικά αμινοξέα
 Μη πολικά αμινοξέα
 Πολικά αμινοξέα
 Όξινα αμινοξέα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες ρητίνες στη πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης					
Όνομα	Τύπος	Στρατηγική	Δεσμός	Διάλυμα αποκοπής	Ελεύθερη μορφή
Rink Amide ρητίνη [1], [2]		Fmoc	Αιθερικός	Διάλυμα 50% TFA/DCM θερμ/σία δοματίου	Αμιδική μορφή
Ρητίνη Merrifield [3]		Boc	Εστερικός δεσμός	Ισχυρά οξέα (HF)	C-τελικό καρβοξύλιο
Ρητίνη PAM [4], [5]		Boc	Εστερικός δεσμός	Άνυδρο HF	C-τελικό καρβοξύλιο
Ρητίνη MBHA [6]		Boc	Αμιδικός δεσμός	Ισχυρά οξέα (HF)	Αμιδική μορφή

Wang Ρητίνη [7], [8], [9]		Fmoc	Εστερικός δεσμός	TFA	C-τελικό καρβοξύλιο
2- χλωροτρίτυ λο ρητίνη [10], [11]		Fmoc	Εστερικός δεσμός	<1% TFA	C-τελικό καρβοξύλιο

[1] H. Rink, "Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin," *Tetrahedron Letters*, vol. 28, pp. 3787–3790, 1987.

[2] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, and H. Köster, "A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides," *Tetrahedron Letters*, vol. 30, pp. 4645–4648, 1989.

[3] M. V. Anuradha and B. Ravindranath, "Ultrasound in peptide synthesis. 3. Zinc-salt assisted anchoring of carboxylic acids to Merrifield resin," *Tetrahedron*, vol. 51, pp. 5671–5674, 1995.

[4] A. R. Mitchell, A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, S. B. H. Kent, M. Engelhard, R. B. Merrifield, and R. B. Merrifield, "A New Synthetic Route to tert-Butyloxycarbonylaminoacyl-4- (oxymethyl)phenylacetamidomethyl-resin, an Improved Support for Solid-Phase Peptide Synthesis," *J. Org. Chem.*, vol. 43, pp. 2845–2852, 1978.

[5] A. R. Mitchell, A. R. Mitchell, B. W. Erickson, M. N. Ryabtsev, M. N. Ryabtsev, R. S. Hodges, R. S. Hodges, R. B. Merrifield, and R. B. Merrifield, "tert -Butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)- phenylacetamidomethyl-Resin, a More Acid-Resistant Support for Solid-Phase Peptide Synthesis," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 98, pp. 7351–7356, 1976.

[6] G. R. Matsueda and J. M. Stewart, "A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides," *Peptides*, vol. 2, pp. 45–50, 1981.

[7] S.-S. Wang, "p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 4, pp. 1328–1333, Feb. 1973.

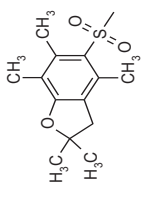
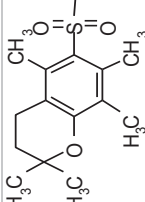
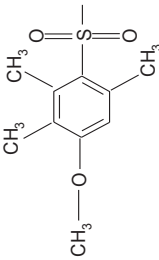
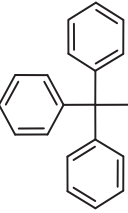
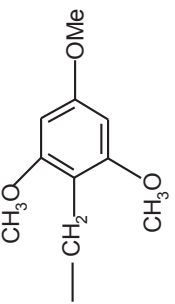
[8] G. Lu, S. Mojsos, J. P. Tam, and R. B. Merrifield, "Improved synthesis of 4-alkoxybenzyl alcohol resin," *J. Org. Chem.*, vol. 46, pp. 3433–3436, 1981.

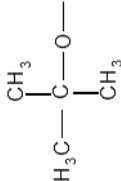
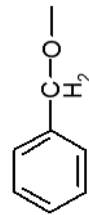
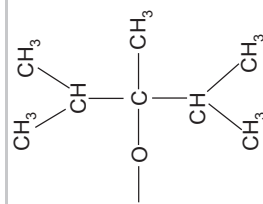
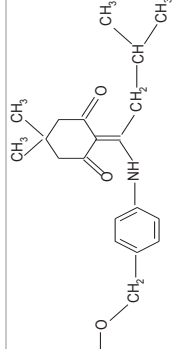
[9] F. Albericio and G. Barany, "Application of N,N-dimethylformamide dineopentyl acetal for efficient anchoring of N alpha-9-fluorenylmethoxycarbonylamino acids as p-alkoxybenzyl esters in solid-phase peptide synthesis," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 23, pp. 342–349, 1984.

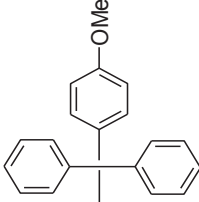
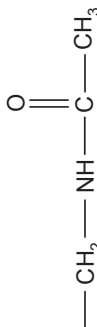
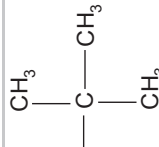
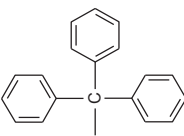
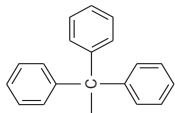
[10] K. Barlos, D. Gatos, S. Kutsogianni, G. Papaphotou, C. Poulos, and T. Tseganidis, "Solid phase synthesis of partially protected and free peptides containing disulphide bonds by simultaneous cysteine oxidation-release from 2-chlorotriptyl resin," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 38, pp. 562–568, 1991.

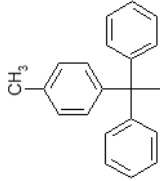
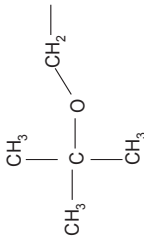
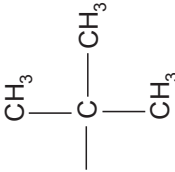
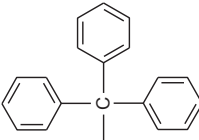
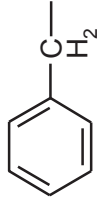
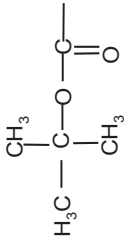
[11] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, and G. Stavropoulos, "2-Chlorotriptyl chloride resin," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 37, pp. 513–520, 1991.

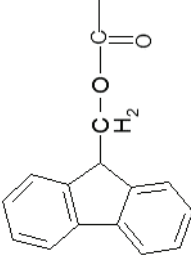
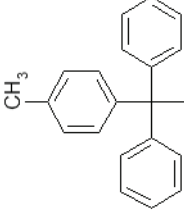
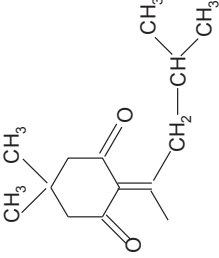
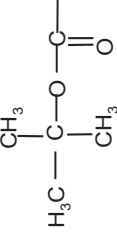
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III: Οι κυριότερες προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων στα N^α-Fmoc προστατευμένα αμινοξέα.

Αμινοξύ	Ονομασία	Συντομογρ.	Χημικός Τύπος	Συνθήκες Αποπροστασίας	Αναφορές
Arg	2,2,4,6,7-Πενταμεθυλο-διδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλομάδα	Pbf		95% TFA	[1]
Arg	2,2,5,7,8 Πενταμεθυλο-χρωμανο-6-σουλφονυλομάδα	Pmc		95% TFA	[2]
Arg	4-Μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλοφαινυλο-σουλφονυλομάδα	Mtr		95% TFA, 35°C	[3]
Asn, Gln	Τριτυλομάδα	Trt		95% TFA	[4], [5]
Asn, Gln	2,4,6-τριμεθοξυβενζυλομάδα	Tmob		95% TFA	[5], [6]

Asp, Glu	t-Bουτοξυομάδα	OtBu		95% TFA	[7]
Asp, Glu	Βενζυλοξυομάδα	OBzl		H ₂ /Pd, HF	[8]
Asp, Glu	Αλλυλοξυομάδα	OAlI	-O-CH ₂ -CH=CH ₂	Pd(PPh ₃) ₄ σε CHCl ₃ /AcOH/NMM	[9], [10]
Asp, Glu	2,3,4-τριμεθυλ-πεντ-3-οξυομάδα	ODie		95% TFA	[11]
Asp, Glu	1-(4,4-διμεθυλ-2,6-διοξο-κυκλοεξυλιδεν)3-μεθυλ-βουτυλ-βενζυλοξυομάδα	ODmab		2% N ₂ H ₄ H ₂ O/DMF	[12], [13]

Cys	4-μεθοξυτρυπτολομάδα	Mmt		1% TFA παρουσία 5% TIS	[14], [15]
Cys	Ακεταμιδομεθυλομάδα	Acm		Hg(II), Ag(I), I ₂ , TL(III)	[16], [17]
Cys	t-Βουτυλομάδα	tBu		HF στους 20 °C, TFMSA και Hg/H ₂ S, (CF ₃ COO) ₃ TI/TFA	[18]
Cys	Τρυπτολομάδα	Trt		95% TFA παρουσία 5% TIS	[18], [16], [19]
His	Τρυπτολομάδα	Trt		95% TFA	[20]

His	4-Μεθυλοστριτυλομάδα	Mtt		5% TFA	[14]
His	t-Βουτοξυμεθυλομάδα	Bum		95% TFA	[21]
Ser, Thr, Tyr	t-Βουτυλομάδα	tBu		60% TFA	[22]
Ser, Thr, Tyr	Τριτυλομάδα	Ttt		1,1% TFA	[23], [24]
Ser, Thr, Tyr	Βενζυλομάδα	Bzl		HF, καταλυτική υδρογόνωση και αναγωγή με Na σε υγρή NH ₃ .	[25]
Lys, Trp	t-Βουτοξυκαρβονυλομάδα	Boc		95% TFA	[26]

Lys	Φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ ομάδα	Fmoc		Βασικές συνθήκες	[27]
Lys	4-Μεθυλοτριτυλομάδα	Mtt		1-2% TFA, CH ₃ COOH/CF ₃ CH ₂ OH	[28], [29]
Lys	1-(4,4-διμεθυλ-2,6-διοξο- κυκλοεξυλιδεν)3-μεθυλ- βουτυλομάδα	ivDde		2% υδραζίνη	[30]
Trp	t-Βουτοξυκαρβονυλομάδα	Boc		95% TFA	[31]

Βιβλιογραφία

- [1] L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, E.-S. M. E. Mansour, H. Wenschuh, and F. Albericio, "The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant," *Tetrahedron Letters*, vol. 34, pp. 7829–7832, 1993.
- [2] R. Ramage, J. Green, and A. J. Blake, "An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: NG-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine," *Tetrahedron*, vol. 47, pp. 6353–6370, 1991.
- [3] E. Atherton, R. C. Sheppard, and J. D. Wade, "Side chain protected N[small alpha]-fluorenylmethoxycarbonylamino-acids for solid phase peptide synthesis. N[small alpha]-Fluorenylmethoxycarbonyl-NG-4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulphonyl-L-arginine," *J. Chem. Soc. {c} Chem. Commun.*, no. 19, pp. 1060–1062, 1983.
- [4] M. Friede, S. Denery, J. Neimark, S. Kieffer, H. Gausepohl, and J. P. Briand, "Incomplete TFA deprotection of N-terminal trityl-asparagine residue in fmoc solid-phase peptide chemistry," *Pept. Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 145–147, 1992.
- [5] P. Sieber and B. Riniker, "Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis," *Tetrahedron Lett.*, vol. 32, pp. 739–742, 1991.
- [6] D. Shah, A. Schneider, S. Babler, R. Gandhi, E. Van Noord, and E. Chess, "Alkylation of tryptophan during deprotection of Tmob-protected carboxamide side chains," *Pept. Res.*, vol. 5, no. 4, pp. 241–244, 1992.
- [7] C. D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, and J. D. Haug, "Preparation and properties of Nalpa-9-fluorenylmethoxycarbonylamino bearing tert.-butyl side chain protection," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 15, pp. 59–66, 1980.
- [8] N. L. Benoiton, "A synthesis of isoasparagine from β -benzyl aspartate," *Can. J. Chem.*, no. 40, pp. 570–572, 1962.
- [9] G. T. Bourne, W. D. F. Meutermaans, P. F. Alewood, R. P. McGeary, M. Scanlon, A. A. Watson, and M. L. Smythe, "A Backbone Linker for BOC-Based Peptide Synthesis and On-Resin Cyclization: Synthesis of Stylostatin 1," *J. Org. Chem.*, vol. 64, no. 9, pp. 3095–3101, Apr. 1999.
- [10] J. Tulla-Puche and G. Barany, "On-Resin Native Chemical Ligation for Cyclic Peptide Synthesis 1,2," *J. Org. Chem.*, vol. 69, no. 12, pp. 4101–4107, Jun. 2004.
- [11] M. Mergler and F. Dick, "The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part III," *J. Pept. Sci.*, vol. 11, pp. 650–657, 2005.
- [12] W. C. Chan, B. W. Bycroft, D. J. Evans, and P. D. White, "A novel 4-aminobenzyl ester-based carboxy-protecting group for synthesis of atypical peptides by Fmoc-But solid-phase chemistry," *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, p. 2209, 1995.
- [13] T. Conroy, K. A. Jolliffe, and R. J. Payne, "Efficient use of the Dmab protecting group: applications for the solid-phase synthesis of N-linked glycopeptides," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 7, no. 11, pp. 2255–2258, Jun. 2009.
- [14] K. Barlos, D. Gatos, O. Hatz, N. Koch, and S. Koutsogianni, "Synthesis of the very acid-sensitive Fmoc-Cys(Mmt)-OH and its application in solid-phase peptide synthesis," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 47, pp. 148–153, 1996.
- [15] A. K. Galande, R. Weissleder, and C.-H. Tung, "An effective method of on-resin disulfide bond formation in peptides," *J. Comb. Chem.*, vol. 7, no. 2, pp. 174–177, 2005.
- [16] N. Fujii, A. Otaka, S. Funakoshi, K. Bessho, and H. Yajima, "New procedure for the synthesis of cystine-peptides by oxidation of S-substituted cysteine-peptides with thallium(III) trifluoroacetate," *J. Chem. Soc. {c} Chem. Commun.*, no. 3, pp. 163–164, 1987.
- [17] M. Bodanszky and M. A. Bednarek, "Derivatives of S-9-fluorenylmethyl-L-cysteine," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 20, pp. 434–437, 1982.
- [18] S. N. McCurdy, "The investigation of Fmoc-cysteine derivatives in solid phase peptide synthesis," *Pept. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 147–152, 1989.
- [19] T. Kaiser, G. J. Nicholson, H. J. Kohlbaun, and W. Voelter, "Racemization studies of Fmoc-Cys(Trt)-OH during stepwise Fmoc-Solid phase peptide synthesis," *Tetrahedron Lett.*, vol. 37, no. 8, pp. 1187–1190, Feb. 1996.
- [20] P. Sieber and B. Riniker, "Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group," *Tetrahedron Letters*, vol. 28, pp. 6031–6034, 1987.

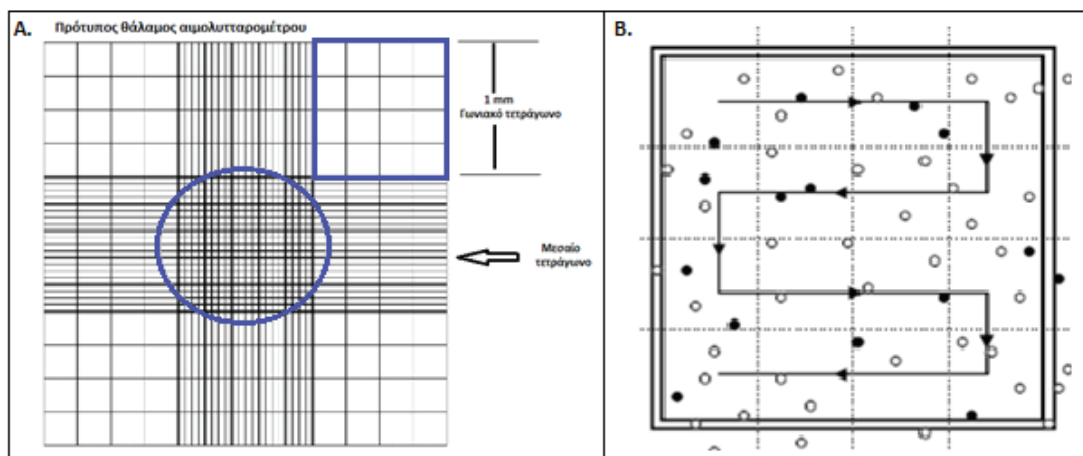
- [21] R. Colombo, F. Colombo, and J. H. Jones, "Acid-labile histidine side-chain protection: the N([small pi])-t-butoxymethyl group," *J. Chem. Soc.*, *Chem. Commun.*, no. 5, pp. 292–293, 1984.
- [22] J. G. Adamson, M. A. Blaskovich, H. Groenevelt, and G. A. Lajoie, "Simple and convenient synthesis of tert-butyl ethers of Fmoc-serine, Fmoc-threonine, and Fmoc-tyrosine," *J. Org. Chem.*, vol. 56, no. 10, pp. 3447–3449, May 1991.
- [23] K. BARLOS, D. GATOS, and S. KOUTSOGIANNI, "Fmoc/Trt-amino acids: comparison to Fmoc/tBu-amino acids in peptide synthesis," *J. Pept. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 194–200, 1998.
- [24] M. P. Coba, D. Turyn, and C. Peña, "Synthesis and immunogenic properties of phosphopeptides related to the human insulin receptor," *J. Pept. Res.*, vol. 61, no. 1, pp. 17–23, 2003.
- [25] B. W. Erickson and R. B. Merrifield, "Acid stability of several benzylic protecting groups used in solid-phase peptide synthesis. Rearrangement of O-benzyltyrosine to 3-benzyltyrosine," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 11, pp. 3750–3756, May 1973.
- [26] N. Zinieris, L. Leondiadis, and N. Ferderigos, "Nalpa-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution," *J. Comb. Chem.*, vol. 7, no. 1, pp. 4–6, 2005.
- [27] L. A. Carpino and G. Y. Han, "The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group," *J. Org. Chem.*, vol. 37, pp. 3404–3409, 1972.
- [28] D. Li and D. L. Elbert, "The kinetics of the removal of the N-methyltrityl (Mtt) group during the synthesis of branched peptides," *J. Pept. Res.*, vol. 60, pp. 300–303, 2002.
- [29] L. Bourel, O. Carion, H. Gras-Masse, and O. Melnyk, "The deprotection of Lys(Mtt) revisited," *J. Pept. Sci.*, vol. 6, pp. 264–270, 2000.
- [30] S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, and W. C. Chan, "An appraisal of new variants of Dde amine protecting group for solid phase peptide synthesis," *Tetrahedron Lett.*, vol. 39, pp. 1603–1606, 1998.
- [31] H. Choi and J. V. Aldrich, "Comparison of methods for the Fmoc solid-phase synthesis and cleavage of a peptide containing both tryptophan and arginine," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 42, pp. 58–63, 1993.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV: Πειραματική διαδικασία για τη μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων με την πλάκα Neubauer

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια :

- α) Ήπια ανάμιξη σε eppendorf 10 μl PRP με 190 μl διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 1 % βάρος κατ' όγκο (w/v) (αραίωση 1 : 20),
- β) Η πλάκα Neubauer καλύπτεται με μια καλυπτρίδα αφήνοντας ελεύθερες τις δυο εσοχές. (Για το σκοπό αυτό τοποθετούμε από μια σταγόνα νερού στα πλάγια της πλάκας για να κολλήσει ευκολότερα η καλυπτρίδα),
- γ) 10 μl του αραιωμένου διαλύματος μεταφέρονται στις δύο εσοχές της πλάκας,
- δ) Κλείσιμο της πλάκας σε τριβλίο Petri που περιέχει υγρό βαμβάκι (υγρό περιβάλλον) για 15 λεπτά,
- ε) Η πλάκα τοποθετείται σε οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου και μετριοούνται τα αιμοπετάλια στη μεγέθυνση 40 – 45X του αντικειμενικού φακού προσέχοντας να μην εφάπτεται η καλυπτρίδα με αυτόν.

- Μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων και υπολογισμός της συγκέντρωσής των με την πλάκα Neubauer: Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, η περιοχή με τις γραμμώσεις στο αιμοκυτταρόμετρο διαιρείται σε 9 μεγάλα τετράγωνα με πλευρά 1mm το καθένα. Το κεντρικό μεγάλο τετράγωνο υποδιαιρείται σε άλλα 25 τετράγωνα μετρίου μεγέθους και το καθένα από αυτά υποδιαιρείται σε άλλα 16 μικρά τετράγωνα. Τα κύτταρα μετρούνται σε 5 από τα μετρίου μεγέθους τετράγωνα (δηλαδή τα κύτταρα που είναι μέσα σε 16 μικρά τετράγωνα) και προτιμάτε τα τέσσερα γωνιακά και το μεσαίο τετράγωνο.



Σχήμα: Α) Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (haemocytometer). Β) Η μέτρηση γίνεται με τη διάταξη που δείχνει το σχήμα. Μετριοούνται τα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τη περιμετρική πάνω οριζόντια γραμμή και τα κύτταρα που βρίσκονται επάνω στην αριστερή κάθετη γραμμή. Δεν μετριοούνται αυτά που ακουμπούν επάνω στην κάτω και στην δεξιά γραμμή.

Τα μικρά τετράγωνα έχουν πλευρά $1/20$ mm και ο χώρος της πλάκας μέτρησης έχει βάθος $1/10$ mm. Ο όγκος επομένως του αραιωμένου διαλύματος αιμοπεταλίων σε ένα μικρό τετράγωνο είναι $1/4000$ mm³. Μετριοούνται 80 μικρά τετράγωνα οπότε τα αιμοπετάλια

βρίσκονται σε όγκο $80/4000 \text{ mm}^3$ ή $1/50 \text{ mm}^3$. Επειδή η αραίωση του PRP είναι 20 φορές, τα αιμοπετάλια που μετρήθηκαν αντιστοιχούν ουσιαστικά με $1/50 \times 1/20$ ή σε $1/1000 \text{ mm}^3$.

Για τον υπολογισμό των αιμοπεταλίων που υπάρχουν σε 1 mm^3 PRP, πολλαπλασιάζεται ο αριθμός των αιμοπεταλίων που έχει βρεθεί στα 80 πολύ μικρά τετράγωνα με το 1000 ή αλλιώς χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος :

$\text{Συγκέντρωση αιμοπεταλίων στο PRP} = \text{άθροισμα αιμοπεταλίων στα 5 μεσαία τετράγωνα} \times 1000 \text{ (αιμοπετάλια / } \mu\text{l)}.$
