



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗΣ  
ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ  $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ . ΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΩΣ  
ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ  
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ

ΑΛΕΞΙΑ Β. ΓΚΟΥΡΟΓΙΑΝΝΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014



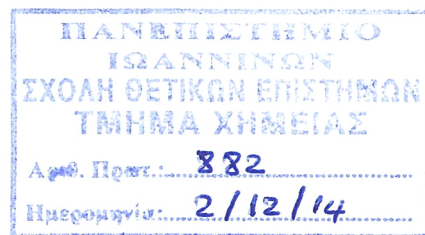
«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών  
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του  
συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2».







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**  
Εργαστήριο Βιοχημείας  
Τσουκάτος Δημόκριτος  
Καθηγητής Βιοχημείας



Ιωάννινα, 1-12-2014

Η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής του κας **Αλεξίας Γκουρογιάννη**, Χημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων την Δευτέρα 1 Δεκεμβρίου 2014, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο:

**«Πεπτιδικά ανάλογα της αιμοπεταλιακής ιντεγκρίνης αΠbβ3. Δράση τους ως αλλοστερικών αναστολέων της ενεργοποίησής της.»**

Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη, και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης, η δε κατάρτιση της υποψήφιας είναι ευρεία και ολοκληρωμένη. Με βάση τα παραπάνω η Εξεταστική Επιτροπή αποφάσισε να γίνει η απονομή του τίτλου του διδάκτορα από το Τμήμα Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων στην κα **Αλεξία Γκουρογιάννη** με βαθμό **Άριστα (10)**.

Με τιμή

Τα μέλη της εξεταστικής Επιτροπής

1. Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής Βιοχημείας Τμηματος Χημείας ΠΙ

2. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας Τμήματος Χημείας ΠΙ

3. Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας Τμήματος Χημείας ΠΙ

4. Μικρός Εμμανουήλ, Καθηγητής Φαρμακευτικού Τμήματος ΕΚΠΑ

5. Παπαμιχαήλ Εμμανουήλ, Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας ΠΙ

6. Κούκκου Άννα-Ειρήνη, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας Τμήματος Χημείας ΠΙ

7. Πάνου Ευγενία, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας Τμήματος Χημείας ΠΙ



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από το 2010 μέχρι το 2014.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημόκριτο Τσουκάτο, ο οποίος μου ανάθεσε το θέμα της παρούσας διατριβής και είχε την επίβλεψη και άμεση καθοδήγηση της διατριβής. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, ενθαρρύνοντάς με σε όλες τις δυσκολίες που προέκυπταν. Τον ευχαριστώ επίσης για τη συμμετοχή μου στο ερευνητικό πρόγραμμα συνεργασίας Ελλάδας-Γαλλίας PLATON και την οικονομική ενίσχυση, η οποία συνέβαλλε στην διεξαγωγή ορισμένου τμήματος του πειραματικού τμήματος της παρούσας διατριβής. Επίσης τον ευχαριστώ θερμά που μέσω αυτού του προγράμματος μου έδωσε την ευκαιρία να κατοικήσω για 3 μήνες στο Παρίσι και να παρακολουθήσω την διεξαγωγή πειραμάτων, αλλά και να αποκομίσω πολύτιμες συμβουλές και εμπειρίες από τους συναδέλφους του Εργαστηρίου INSERM U765, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques στο Παρίσι, τους οποίους ήθελα να ευχαριστήσω και ιδιαίτερα την καθηγήτρια και ερευνήτρια του INSERM U765, Christilla Bachelot-loza.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος της τριμελούς επιτροπής μου κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου, τις χρήσιμες συμβουλές του, την οικονομική ενίσχυση με τη συμμετοχή μου σε ερευνητικό πρόγραμμα χρηματοδότησης κατά τη διάρκεια της διατριβής μου και την άποψη συνεργασία μας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος της τριμελούς επιτροπής, κ. Βασίλειο Τσίκαρη, Καθηγητή του τμήματος Χημείας για την άποψη συνεργασία μας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της 7μελούς επιτροπής: κ. Εμμανουήλ Μικρό, Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Μανώλη Παπαμηχαήλ, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Αναπλ. Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τη κ. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπλ. Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική μου επιτροπή.

Η σύνθεση των πεπτιδίων που μελετώνται σε αυτή την εργασία έγινε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από τη Διδακτορική

Φοιτήτρια Βασιλική Κολόκα υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κα. Ευγενείας Πάνου-Πομώνη, της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Ελένης Μαλισιώβα και της υποψήφιας διδακτορικής φοιτήτριας Τρύπου Παρασκευής, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Βασιλείου Τσίκαρη, τις οποίες ευχαριστώ θερμά για την πάντα πρόθυμη διάθεση των πεπτιδίων και την άψογη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ θερμά το τμήμα Αιμοδοσίας και τις αιμοληψίες του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την πάντα πρόθυμη και άψογη συνεργασία του, αλλά και τους φίλους εθελοντές αιμοδότες που χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσαν να διεξαχθούν τα ερευνητικά πειράματα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους και φίλους μου Στελίνα Παπαδάκη, Βασίλειο Χαντζηχρήστο, Μαρία Τσουμάνη, Ηρακλή Μοσχονά για τη θετική συμβολή τους στον εργασιακό χώρο, για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την Καζεπίδου Ελευθερία, Βελιβάση Γλυκερία για το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε όλα τα χρόνια της διατριβής μου. Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Κώστα Τέλλη για τις χρήσιμες συμβουλές του και την πολύτιμη βοήθειά του σε κάθε πρόβλημα που προέκυπτε στο εργαστήριο.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου και στον άντρα μου, που με βοήθησαν τόσο σε ψυχολογικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο.

**Αλεξία Γκουρογιάννη**

**Ιωάννινα, 2014**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                                                 |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Πρόλογος - Ευχαριστίες                                                                          | i    |
| Περιεχόμενα                                                                                     | iii  |
| Συντμήσεις                                                                                      | x    |
| Σκοπός της Διατριβής                                                                            | xiii |
| <b>I) Θεωρητικό μέρος</b>                                                                       |      |
| <b>Κεφάλαιο 1. Η βιοχημεία των αιμοπεταλίων</b>                                                 |      |
| 1. Αιμοπετάλια                                                                                  | 1    |
| 1.1. Μορφολογία - Γενικά χαρακτηριστικά                                                         | 1    |
| 1.2. Δομή των αιμοπεταλίων                                                                      | 2    |
| 1.3. Λειτουργίες του αιμοπεταλίου                                                               | 7    |
| 1.3.1. Αιμόσταση                                                                                | 7    |
| 1.3.2. Προσκόλληση                                                                              | 9    |
| 1.3.3. Πρωτεΐνες προσκόλλησης                                                                   | 11   |
| 1.3.4. Ενεργοποίηση                                                                             | 14   |
| 1.3.5. Αγωνιστές των αιμοπεταλίων και οι υποδοχείς τους                                         | 16   |
| 1.3.6. Συσσώρευση αιμοπεταλίων-Σχηματισμός θρόμβου                                              | 23   |
| 1.3.7. Μηχανισμός Πήξης                                                                         | 26   |
| 1.3.8. Ινωδόλυση                                                                                | 27   |
| <b>Κεφάλαιο 2. Μηχανισμός της 'έξω-μέσα' σηματοδότησης της <math>\alpha_{IIb}\beta_3</math></b> |      |
| 2.1. Οι αιμοπεταλιακές ιντεγκρίνες - Γενικά χαρακτηριστικά                                      | 31   |
| 2.2. Γενικά χαρακτηριστικά της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$                                | 31   |
| 2.3. Ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$                                         | 33   |
| 2.4. 'Έξω - μέσα' δομική ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$                                 | 35   |
| 2.4.1. Εξωκυττάρια περιοχή της $\alpha_{IIb}\beta_3$                                            | 35   |
| 2.4.2. Σύνδεση του προσδέματος στην $\alpha_{IIb}\beta_3$                                       | 36   |
| 2.4.3. Διαμορφωτικές απαιτήσεις της εξωκυττάριας περιοχής κατά την ενεργοποίηση                 | 40   |

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5. Έξω - μέσα βιοσηματοδότηση ή σηματοδοτική ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$                                      | 46 |
| 2.5.1. Src, Syk και Csk κινάσες                                                                                            | 47 |
| 2.5.2. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)                                                                                           | 48 |
| 2.5.3. GTPασες Rho                                                                                                         | 48 |
| 2.5.4. Φωσφορυλίωση της $\beta_3$ κυτταροπλασματικής ουράς                                                                 | 49 |
| 2.5.5. Κινάση εστιακής προσκόλλησης (FAK)                                                                                  | 49 |
| 2.5.6. Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (ERK1/2)                                                 | 54 |
| <b>Κεφάλαιο 3. Μηχανισμός της ‘μέσα-έξω’ σηματοδότησης της <math>\alpha_{IIb}\beta_3</math></b>                            |    |
| 3. ‘Μέσα-έξω’ δομική ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$                                                                | 57 |
| 3.1. Δομικά χαρακτηριστικά του διαμεμβρανικού και κυτταροπλασματικού τμήματος                                              | 57 |
| 3.2. Ρύθμιση της ενεργοποίησης της $\alpha_{IIb}\beta_3$ από τα κυτταροπλασματικά άκρα της                                 | 60 |
| 3.3. Πρωτεΐνες που συνδέονται στα κυτταροπλασματικά άκρα της $\alpha_{IIb}\beta_3$ κατά την ‘μέσα-έξω’ δομική ενεργοποίηση | 61 |
| 3.4. ‘Μέσα - έξω’ βιοσηματοδότηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$                                                                | 64 |
| 3.5. Η δομή και λειτουργία της ταλίνης                                                                                     | 66 |
| 3.6. Πρόσδεση της ταλίνης στην $\beta_3$ κυτταροπλασματική ουρά                                                            | 69 |
| 3.7. Αλληλεπιδράσεις της ταλίνης με τη βινκουλίνη και την ακτίνη                                                           | 71 |
| 3.8. Ανταγωνισμός και φωσφορυλίωση                                                                                         | 72 |
| 3.9. Ο ρόλος της ταλίνης στις λειτουργίες του αιμοπεταλίου διαμέσου της $\alpha_{IIb}\beta_3$                              | 73 |
| <b>Κεφάλαιο 4. Η ιντεγκρίνη ως θεραπευτικός στόχος</b>                                                                     |    |
| 4. Θεραπευτική προσέγγιση της παθοφυσιολογίας των αιμοπεταλίων                                                             | 77 |
| 4.1. Η ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ από την ανακάλυψη έως τη θεραπεία                                                  | 77 |
| 4.2. GPIIb/IIIa ανταγωνιστές                                                                                               | 78 |
| 4.3. Αποτυχία των από του στόματος χορηγούμενων GPIIb/IIIa ανταγωνιστών                                                    | 79 |
| 4.4. Προσδεματο-μιμητικοί ανταγωνιστές της $\alpha_{IIb}\beta_3$ : Η λάθος στρατηγική για τον σωστό στόχο;                 | 80 |
| 4.5. Σύγχρονες, πολλά υποσχόμενες, θεραπευτικές προσεγγίσεις της $\alpha_{IIb}\beta_3$                                     | 82 |

|                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5.1. Καινούργιοι απβ3 ανταγωνιστές που στοχεύουν στην εξωκυττάρια περιοχή και διαμόρφωση της ιντεγκρίνης                     | 82  |
| 4.5.2. Τροποποίηση RGD αναλόγων και βιολογική τους δράση                                                                       | 85  |
| 4.5.3. Πιθανές αντιθρομβωτικές δράσεις προερχόμενες από την αναστολή της «έξω-μέσα» σηματοδότησης                              | 86  |
| 4.5.4. Η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης της ταλίνης με την απβ3 εμφανίζει αντιθρομβωτική δράση                                 | 88  |
| 4.5.5. Αναστολή της ενεργοποίησης in vivo, μέσω της παρεμπόδισης της 'μέσα-έξω' βιοσηματοδότησης, χωρίς αιμορραγικές επιπλοκές | 90  |
| <b>II) Πειραματικό μέρος</b>                                                                                                   |     |
| <b>Κεφάλαιο 5. Μεθοδολογίες</b>                                                                                                |     |
| 5.1. Σύσσωρευομετρία                                                                                                           | 91  |
| 5.1.1. Απομόνωση και παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων ανθρώπου                                                                  | 93  |
| 5.1.2. Έλεγχος βιολογικής δράσης πεπτιδίων με πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου                       | 100 |
| 5.2. Λύση των αιμοπεταλίων                                                                                                     | 104 |
| 5.3. Ανοσοκαταβύθιση (Immunoprecipitation, IP)                                                                                 | 105 |
| 5.4. Λύση των αιμοπεταλίων με SDS-EDTA                                                                                         | 111 |
| 5.5. Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)                                                                                             | 112 |
| 5.5.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)                                                            | 113 |
| 5.5.2. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβρανικό υπόστρωμα (Western Transfer)                                                    | 125 |
| 5.5.3. Χρώση και οπτική ανίχνευση των πρωτεϊνών της νιτροκυτταρίνης - Αποχρωματισμός και φύλαξη της μεμβράνης                  | 128 |
| 5.5.4. Επώαση πρωτεϊνών με αντισώματα - Αποτύπωση τους με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (immunodetection)       | 130 |
| 5.5.5. Επώαση πρωτεϊνών με αντισώματα                                                                                          | 134 |
| 5.5.6. Αποτύπωση πρωτεϊνών με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας                                                     | 138 |
| 5.5.7. Αποδέσμευση (Stripping) της μεμβράνης από παλιά αντισώματα - Δοκιμασία νέων αντισωμάτων                                 | 140 |
| 5.6. Απομόνωση και παρασκευή πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια ανθρώπου (PRP)                                                   | 143 |
| 5.7. Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC)                                                                                   | 145 |

|                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.7.1 Μελέτη της έκφρασης των PAC-1-FITC και anti-CD62p-PE αντισωμάτων                                                                      | 147 |
| 5.7.2. Μελέτη της πρόσδεσης του φθορισμένου ινωδογόνου Fg-FITC και έκφρασης της P-σελεκτίνης CD62p-PE στην ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ | 150 |
| 5.8. Καλλιέργεια και απομόνωση CHO (Chinese Hamster Ovary) κυττάρων                                                                         | 153 |
| 5.8.1. Προσδιορισμός της έκφρασης της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ στα CHO κύτταρα με κυτταρομετρία ροής                               | 157 |
| 5.9. Προσκόλληση CHO κυττάρων υπό ροή                                                                                                       | 158 |
| 5.10. Δημιουργία cDNA, επιμόλυνση και δημιουργία σταθερών CHO κυτταρικών κλώνων                                                             | 160 |
| Στατιστική ανάλυση                                                                                                                          | 161 |

### III) Αποτελέσματα

#### Κεφάλαιο Α. Η ανασταλτική δράση της 313-320 αλληλουχίας της εξωκυττάριας $\alpha_{IIb}$ υπομονάδας στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση και ενεργοποίηση

|                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Διερεύνηση των κρίσιμων αμινοξέων της 313-320 αλληλουχίας, ως προς τη βιολογική δράση, σε πλυμένα αιμοπετάλια                                                                           | 164 |
| 2. Η ανασταλτική δράση του YMESRADR στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής                                                                                      | 171 |
| 2.1. Η επίδραση του YMESRADR στη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$                                                                                             | 171 |
| 2.2. Η επίδραση του YMESRADR στην έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης                                                                                                                  | 174 |
| 2.3. Η επίδραση του YMESRADR στην έκφραση της P-σελεκτίνης                                                                                                                                 | 176 |
| 3. Η επίδραση του YMESRADR στην 'έξω-μέσα' δομική ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$                                                                                                   | 179 |
| 3.1. Η επίδραση του YMESRADR στη προσκόλληση CHO κυττάρων στο ινωδογόνο, υπό συνθήκες ροής                                                                                                 | 182 |
| 4. Η επίδραση του YMESRADR στην 'μέσα - έξω' σηματοδότηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$                                                                                                        | 188 |
| 4.1. Κινητική κατανομή της ταλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του YMESRADR ή του RGDS                           | 190 |
| 4.2. Κινητική κατανομή της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του YMESRADR ή του RGDS | 191 |
| 4.3. Κινητική μελέτη της συγκαταβύθισης (πρόσδεσης) ταλίνης-ιντεγκρίνης σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του YMESRADR ή του RGDS                                          | 192 |



**Κεφάλαιο Β. Το όξινο καρβόξυ-τελικό άκρο 1000-1008 της αιπβ ενδοκυττάριας υπομονάδας ως αναστολέας της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και ενεργοποίησης.**

|                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Οι δομικές προαπαιτήσεις της 1000-1008 αλληλουχίας που είναι υπεύθυνες για τη βιολογική του δράση                                                                               | 195 |
| 2. Η ανασταλτική δράση του pal-K-LEEDDEEGE στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής                                                                       | 198 |
| 2.1. Η επίδραση του pal-K-LEEDDEEGE στη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη αιπβ <sub>3</sub>                                                                                  | 199 |
| 2.2. Η επίδραση του pal-K-LEEDDEEGE στην έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης                                                                                                   | 200 |
| 2.3. Η επίδραση του pal-K-LEEDDEEGE στην έκφραση της P-σελεκτίνης                                                                                                                  | 202 |
| 3. Η επίδραση του pal-K-LEEDDEEGE στην ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση αιπβ <sub>3</sub>                                                                                                   | 204 |
| 3.1. Κινητική κατανομή της ταλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του pal-K-LEEDDEEGE                       | 206 |
| 3.2. Κινητική κατανομή της ιντεγκρίνης αιπβ <sub>3</sub> μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του pal-K-LEEDDEEGE | 207 |
| 3.3. Κινητική μελέτη της αλληλεπίδρασης ταλίνης-ιντεγκρίνης σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του pal-K-LEEDDEEGE ή του pal-scrambled                              | 208 |

**Κεφάλαιο Γ. Η συνεργιστική ανασταλτική δράση των pal-K-LEEDDEEGE και YMESRADR στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση και ενεργοποίηση**

|                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Η διερεύνηση για την εύρεση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης του pal-LEEDDEEGE και YMESRADR στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση                    | 211 |
| 2. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης του Pal-LEEDDEEGE και του YMESRADR στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής | 215 |
| 2.1. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης των αναστολέων στη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη αιπβ <sub>3</sub>                       | 216 |
| 2.2. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης των δύο αναστολέων στην έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης                                    | 218 |
| 2.3. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης των αναστολέων στην έκφραση της P-σελεκτίνης                                                       | 220 |
| 3. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης των δύο αναστολέων στην ‘μέσα - έξω’ δομική ενεργοποίηση της αιπβ <sub>3</sub>                       | 223 |

|                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1. Κινητική κατανομή της ταλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του Pal-LEEDDEEGE και YMESRADR              | 224 |
| 3.2. Κατανομή της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση Pal-LEEDDEEGE και YMESRADR | 225 |
| 3.3. Κινητική μελέτη της αλληλεπίδρασης ταλίνης-ιντεγκρίνης σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση Pal-LEEDDEEGE και YMESRADR                                             | 226 |
| 4. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης στη βιοσηματοδότηση των αιμοπεταλίων μέσω των κινασών FAK και ERK                                                                             | 227 |
| 4.1. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης στη φωσφορυλίωση της FAK κινάσης                                                                                                            | 228 |
| 4.2. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης στη φωσφορυλίωση της ERK κινάσης                                                                                                            | 229 |
| <b>Συζήτηση</b>                                                                                                                                                                      | 231 |
| <b>Περίληψη</b>                                                                                                                                                                      | 243 |
| <b>Abstract</b>                                                                                                                                                                      | 247 |
| <b>Βιβλιογραφία</b>                                                                                                                                                                  | 251 |
| <b>Ανακοινώσεις σε συνέδρια-Δημοσιεύσεις</b>                                                                                                                                         | 279 |

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

**Å** : (Άνγκστρομ) μονάδα μήκους ίση με 0,1 nm

**AA**: αραχιδονικό οξύ

**ADP**: διφωσφορική αδενοσίνη

**Ala (A)**: Αλανίνη

**Arg (R)**: Αργινίνη

**Asn (N)**: Ασπαράγινη

**Asp (D)**: Ασπαρτικό οξύ

**ATP**: τριφωσφορική αδενοσίνη

**C (Cys)**: Κυστεΐνη

**Ca<sup>2+</sup>**: ιόν ασβεστίου

**cAMP**: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

**CD40L**: Προσδέτης του CD40

**CD62p**: P-σελεκτίνη

**CHO**: (Chinese hamster ovary) ωοθήκη ινδικών χοιριδίων

**CMK**: (Human megakaryoblastic cell line)

**CT**: κυτταροπλασματικός

**CVD**: (Cardiovascular Disease) καρδιαγγειακή νόσος

**DAG**: Διακυλογλυκερόλη

**DTS**: Πυκνό σωληνοειδές σύστημα

**ECM**: Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία

**EM**: ( Electron Microscopy) Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

**FBS**: ορός εμβρύου μόσχου

**FAK**: κινάση εστιακής προσκόλλησης

**FDA**: (Food and Drug Administration) Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Αμερική)

**Fg**: Ινωδογόνο

**FRET**: Φθοριστικός συντονισμός ενεργειακής μεταφοράς

**Gi**: G-πρωτεΐνη αναστολέας της αδενυλοκυκλάσης

**Glu (E)**: Γλουταμινικό οξύ

**Gly (G)**: Γλυκίνη

**GP:** Γλυκοπρωτεΐνη

**GPCR:** Υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνη

**Gq:** G- πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C

**5-HT:** 5-υδροξυτρυπταμίνη

**ICAM-1:** Ενδοκυττάριο προσκολλητικό μόριο

**IP:** Ανοσοκαταβύθιση

**IP3:** 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη

**Ile (I):** Ισολευκίνη

**LIBS:** (ligand-induced binding site) Θέσεις πρόσδεσης επαγόμενες από το πρόσδεμα

**Lys (K):** Λυσίνη

**Met (M):** Μεθειονίνη

**Min:** λεπτά

**Mg<sup>2+</sup>:** ιόν μαγνησίου

**MLC:** ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης

**Mn<sup>2+</sup>:** ιόν μαγγανίου

**nm:** νανόμετρο ίσο με 10<sup>-9</sup> μέτρα

**NMR:** (Nuclear Magnetic Resonance) Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

**mRNA:** αγγελιαφόρο RNA

**OCS:** Ανοιχτό πολυκάναλο σύστημα

**PAF:** Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

**PARs:** (Protease activated receptors) Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες

**PCI:** διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση

**PDGF:** Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων

**Phe (F):** Φαινυλαλανίνη

**PI:** Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

**PI3:** 3- φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

**PI3K:** Κινάση της 3- φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

**PIP2:** 4,5- διφωσφορική φωσφατυδιλοϊνοσιτόλη

**PIPKIγ:** κινάση τύπου Ιγ της φωσφατυδιλοϊνοσιτόλης

**PKC:** Πρωτεϊνική κινάση C

**PLC:** Φωσφολιπάση C

**PLCβ:** Φωσφολιπάση C<sub>β</sub>

**PPP:** Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια

**Pro (P):** Προλίνη

**PRP:** Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

**PS:** Φωσφατιδυλοσερίνη

**PTB:** Πρόσδεση φωσφοτυροσινών

**Rpm:** στροφές ανά λεπτό

**Sec:** Δευτερόλεπτα

**Ser (S):** Σερίνη

**SFKs:** Οικογένεια κινασών της σερίνης

**Thr (T):** θρεονίνη

**TF:** Ιστικός παράγοντας

**TP:** Φωσφορυλάση της θυμιδίνης

**Trp (W):** Τρυπτοφάνη

**Tyr (Y) :** Τυροσίνη

**TxA<sub>2</sub>:** Θρομβοξάνιο A<sub>2</sub>

**Val (V):** Βαλίνη

**vWF:** Παράγοντας von Willebrand



## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Είναι γνωστό ότι, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αιμόσταση αλλά και τη θρόμβωση, μέσω της συσσώρευσης τους. Ο GPIIb/IIIa υποδοχέας, γνωστός και ως ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , είναι υπεύθυνος για τη συσσώρευση. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων πυροδοτεί μονοπάτια μεταγωγής σήματος (‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση), που οδηγούν στην αύξηση της συγγένειας της ιντεγκρίνης για το πρόσδεμα. Μετά τη πρόσδεση του ινωδογόνου, η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  επάγει σηματοδοτικά γεγονότα (‘έξω-μέσα’ σηματοδότηση), τα οποία ενισχύουν περαιτέρω τη συσσώρευση και το σχηματισμό του θρόμβου, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσουμε τον ρόλο των πεπτιδίων που προέρχονται από την  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδα της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Προσπάθειά μας ήταν να προσεγγίσουμε τους μηχανισμούς που διέπουν την ενεργοποίηση (inside-out) των αιμοπεταλίων και την πρόσδεση (outside-in) του προσδέματος μέσα από αυτά. Απώτερος σκοπός μας να κατανοήσουμε καλύτερα το ρυθμιστικό ρόλο της  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδας στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Έτσι, μελετήσαμε πεπτίδια αναστολείς που προέρχονται τόσο από την εξωκυττάρια  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδα όσο και από την ενδοκυττάρια, και ασχοληθήκαμε με το δραστικότερο από την κάθε κατηγορία: το  $\alpha_{IIb}$   $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$  πεπτίδιο, ως εξωκυττάριος και το pal- $^{1000}\text{LEEDDEEGE}^{1008}$ , ως ενδοκυττάριος αναστολέας. Έγινε προσπάθεια εύρεσης της σχέσης ανάμεσα στην ανασταλτική δράση του κάθε πεπτιδίου και την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλλά και τις αλληλεπιδράσεις του με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σηματοδότησης όπως της κυτταροσκελετικής πρωτεΐνης ταλίνης, της FAK και της ERK. Διερευνήσαμε και ερμηνεύσαμε τους διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης που εμπλέκονται τα παραπάνω πεπτίδια στην αναστολή της ενεργοποίησης της  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , καθώς και το ρόλο του όξινου 1000-1008 C-τελικού άκρου της  $\alpha_{IIb}$  κυτταροπλασματικής υπομονάδας αλλά και του 313-320 τμήματος της β-προπέλας της  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδας, περιοχή της κεφαλής της ιντεγκρίνης, στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση.

Ακόλουθο βήμα των παραπάνω αποτελεσμάτων, ήταν η διερεύνηση ύπαρξης τυχόν συνεργατικής δράσης των δύο παραπάνω αναστολέων ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και συσσώρευσης. Επιβεβαιώθηκε η συνεργατική τους δράση στην αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε συγκεντρώσεις, κατωφλίου ως προς την

αναστολή, πολύ χαμηλότερες από τις τιμές των  $IC_{50}$  τους. Επίσης, μελετήθηκε η παραπάνω συνεργατική δράση των αναστολέων και στα δύο μονοπάτια σηματοδότησης της ιντεγκρίνης και ερμηνεύτηκε ο μηχανισμός δράσης της συνεργατικότητας στην αναστολή της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης.

Οι μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενοι GPIIb/IIIa ανταγωνιστές της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης είναι προσδεματο-μιμητικοί, περιλαμβάνουν δηλαδή RGD ανάλογα, που στοχεύουν στη θέση πρόσδεσης του ινωδογόνου. Οι παραπάνω ανταγωνιστές όμως εμφάνισαν σοβαρά κλινικά προβλήματα, όπως η θρομβοπενία και τα αιμορραγικά επεισόδια, λόγω της ιδιότητας τους να επιφέρουν αλλαγή στην διαμόρφωση της ιντεγκρίνης, προερχόμενη από την ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση, η οποία έχει ως συνέπεια την ‘έξω-μέσα’ σηματοδότηση και τελικά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Γι’ αυτό το λόγο έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση της δομής και διαμόρφωσης της ιντεγκρίνης και το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί σε εναλλακτικές στρατηγικές αναστολής, στοχεύοντας σε διαφορετικές θέσεις δράσης και επιφέροντας έτσι ελάχιστες ή καθόλου διαμορφωτικές αλλαγές στην ιντεγκρίνη. Τέτοιοι αναστολείς καλούνται αλλοστερικοί και βρίσκονται ακόμα σε ερευνητικό επίπεδο ενώ έχουν μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα ζώων με σημαντική μείωση της θρόμβωσης, με σημαντικές βελτιώσεις στην αιμόσταση και επομένως μειωμένες επιπτώσεις στην αιμορραγία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας που χρησιμοποιεί το συνδυασμό του ενδοκυττάριου και του εξωκυττάριου αναστολέα, τα οποία έχουν διαφορετικό στόχο από τη θέση πρόσδεσης του ινωδογόνου, μπορούν να παρέχουν μια εναλλακτική φαρμακολογική προσέγγιση έναντι των RGD πεπτιδικών ανταγωνιστών, αλλά και μια καινοτόμα και ισχυρή θεραπευτική προσέγγιση σε παθολογικές ασθένειες, όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου ή το εγκεφαλικό.



# Η βιοχημεία των αιμοπεταλίων

## 1. Αιμοπετάλια

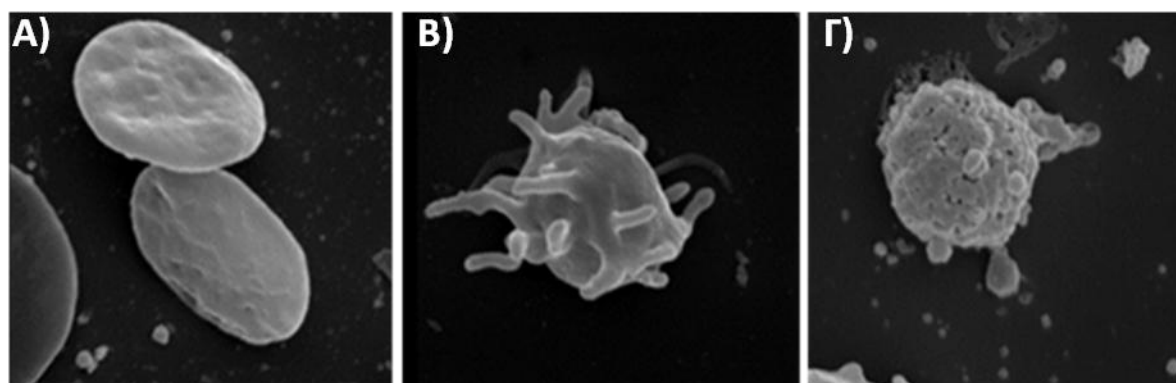
### 1.1. Μορφολογία - γενικά χαρακτηριστικά

Είναι τα μικρότερα σε μέγεθος κύτταρα του αίματος, τα οποία δημιουργούνται στο μυελό των οστών, όπως τα ερυθροκύτταρα και τα περισσότερα από τα λευκοκύτταρα. Παράγονται από τα μεγάλα σε μέγεθος κύτταρα του μυελού των οστών, τα μεγακαρυοκύτταρα. Κατά την ανάπτυξη τους τα μεγακαρυοκύτταρα, υφίστανται μια διαδικασία θραυσματοποίησης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση πάνω από 1000 αιμοπετάλια ανά μεγακαρυοκύτταρο [1, 2]. Είναι απύρρηνα, δισκοειδή σωματίδια με διάμετρο 2 - 4  $\mu\text{m}$ , πάχους 0.7  $\mu\text{m}$ , ο όγκος τους κυμαίνεται από 7-11 fl και αποτελούν το 0.5% του όγκου του αίματος. Ο αριθμός τους στο αίμα κυμαίνεται από 150.000-450.000 κύτταρα ανά  $\text{mm}^3$  ( $\mu\text{l}$ ) αίματος, ενώ η φυσιολογική διάρκεια ζωής τους είναι μεταξύ 7-10 ημερών, όπου στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται και καταστρέφονται από τα μακροφάγα του ήπατος και του σπλήνα [3]. Τα αιμοπετάλια επειδή δε διαθέτουν πυρήνα έχουν ελάχιστη ικανότητα για σύνθεση πρωτεϊνών. Επίσης, περιέχουν mRNA. Αν και απύρρηνα, τα αιμοπετάλια περιέχουν στο κυτταρόπλασμα διάφορα οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, ριβοσωμάτια, κυτταροσκελετό, καθώς και πολυάριθμα κοκκία, απαραίτητα για τη λειτουργία του αιμοπεταλίου και τη διατήρηση της φυσιολογικής αιμόστασης [4, 5].

Σε κατάσταση ηρεμίας τα αιμοπετάλια έχουν δισκοειδές σχήμα των οποίων η επιφάνεια δεν ξεπερνά τα 8  $\mu\text{m}^2$  και το οποίο υποστηρίζεται από τα μικρονημάτια που βρίσκονται στην επιφάνειά τους (Εικόνα 1.1A). Κατά την ενεργοποίησή τους όμως μέσω διαλυτών αγωνιστών όπως το ADP, η θρομβίνη ή το κολλαγόνο ή μέσω προσκόλλησης αλλάζουν σχήμα, αποκτούν ψευδοπόδια (Εικόνα 1.1B), τα οποία αποτελούν προεκτάσεις της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων, η επιφάνειά τους αυξάνεται μέχρι και τα 13  $\mu\text{m}^2$  [6] και απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους μέσω του συστήματος των μικροσωληνίσκων. Επίσης, διεγείρονται διάφοροι ενδοκυττάριοι μεταβολικοί οδοί, μεταβάλλεται η συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου, και τέλος ενεργοποιείται ο υποδοχέας-ιντεγκρίνη  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των

αιμοπεταλίων είναι η συσσώρευση και η προσκόλλησή τους στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο ή στον υπενδοθηλιακό χώρο.

Κατά την κυκλοφορία τους τα αιμοπετάλια τείνουν να συγκεντρώνονται στην περιφέρεια της αιματικής ροής και έτσι μπορούν να αναγνωρίσουν και να ανταποκριθούν γρήγορα σε οποιαδήποτε βλάβη του ενδοθηλίου. Η κύρια λειτουργία τους είναι η συσσώρευση η οποία γίνεται διάμεσου γεφυρών ινωδογόνου (Fg) παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ . Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται συσσωρεύματα μεταξύ των αιμοπεταλίων τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της αιμόστασης και της πήξης του αίματος. Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια εμπλέκονται σε διάφορες άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η φλεγμονή και η αθηροσκλήρωση [7, 8].



**Εικόνα 1.1.** Χαρακτηριστικό σχήμα αιμοπεταλίων σε ηρεμία (A), έπειτα από ενεργοποίηση (B) και σε κατάσταση απόπτωσης (Γ).

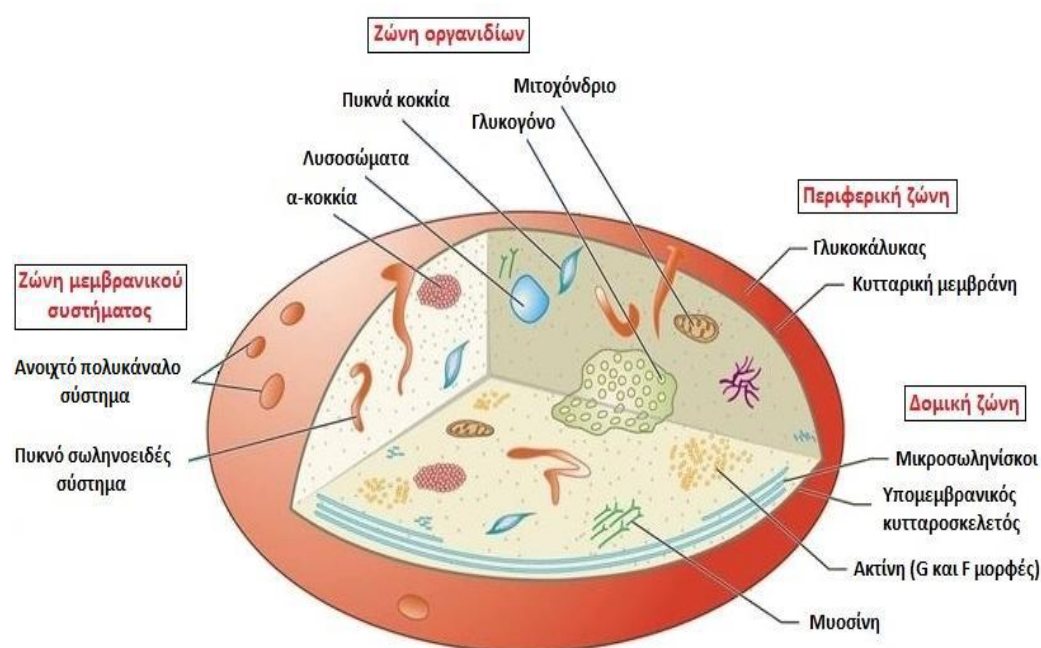
## 1.2. Δομή των αιμοπεταλίων

Η δομή των αιμοπεταλίων μπορεί να χωριστεί σε 4 μορφολογικές περιοχές: α) την περιφερική ζώνη, β) τη δομική ζώνη, γ) τη ζώνη των οργανιδίων και δ) το μεμβρανικό σύστημα. Κάθε μια από αυτές τις μορφολογικές ζώνες εμφανίζει συγκεκριμένες λειτουργίες (Εικόνα 1.2) [9].

**α) περιφερική ζώνη:** Αποτελείται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία φέρει εξωτερικά έναν ανεπτυγμένο γλυκοκάλυκα, ένα λεπτό στρώμα που συντίθεται από διάφορες γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια, πολυσακχαρίτες και προσροφημένες πρωτεΐνες του πλάσματος [10, 11]. Εξαιτίας του σιαλικού οξέος που είναι συνδεδεμένο με τις

πρωτεΐνες και τα λιπίδια, η μεμβράνη έχει ηλεκταρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η προσκόλληση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της κυκλοφορίας τους [12].

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων περιβάλλει εξωτερικά το κύτταρο, έχει πάχος 7-9 nm και εμφανίζει τη δομή της τυπικής φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας στην οποία βυθίζονται αρκετές γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια και χοληστερόλη [10, 13, 14]. Τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης είναι η σφιγγομυελίνη (SM) που καλύπτει το 17% της επιφάνειάς της, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) που καλύπτει το 27%, η φωσφατιδύλοσερίνη (PS) και η φωσφατιδύλοϊνositόλη (PI) που καλύπτουν το 10% και το 5% αντίστοιχα [15-17]. Τα φωσφολιπίδια είναι ασύμμετρα τοποθετημένα, γεγονός που βοηθάει στην αποφυγή της πήξης του αίματος υπό φυσιολογικές συνθήκες [18]. Επίσης, αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, όπως η PS και η PI που εκφράζονται κυρίως στο εσωτερικό της μεμβράνης διατηρούν την επιφάνεια των αιμοπεταλίων σε μια μη προθρομβωτική κατάσταση [19].



**Εικόνα 1.2.** Το δισκοειδές σχήμα του αιμοπεταλίου και τα διάφορα συστατικά του.

Η μεμβράνη ρυθμίζει επιλεκτικά τη δίοδο ουσιών από και προς το κυτταρόπλασμα. Έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει εξωκυττάρια μηνύματα και να μεταφέρει τις

πληροφορίες στα ενδοκυττάρια οργανίδια. Τα αιμοπετάλια εμφανίζουν διαμεμβρανικούς εξειδικευμένους υποδοχείς, οι οποίοι προσδένονται σε μια πληθώρα αγωνιστών και προσκολλητικών μορίων. Κύριοι εξ αυτών είναι οι ετεροδιμερείς πλούσιες σε λευκίνη γλυκοπρωτεΐνες (GPs) καθώς και οι ιντεγκρίνες [20]. Το στρώμα από τις γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειάς της συντελεί στην αποφυγή προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο φυσιολογικό ενδοθήλιο, αλλά και διευκολύνει την σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα, σε σημεία όπου υπάρχει βλάβη και ιδιαίτερα σε ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη, και ακόμα περισσότερο σε εκτεθειμένο κολλαγόνο, από βαθύτερα στρώματα του αγγειακού τοιχώματος [21].

**Πίνακας 1.1.** Οι κυριότεροι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς των αιμοπεταλίων, οι προσδέτες τους και οι βιολογικές λειτουργίες τους.

| <b><i>Gp Υποδοχείς</i></b>            | <b><i>Πρόσδεμα</i></b>                                         | <b><i>Βιολογική Λειτουργία</i></b> |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| GPIa/IIa ( $\alpha_2\beta_1$ , VLA-2) | Κολλαγόνο I,II                                                 | Προσκόλληση                        |
| GPIc/IIa ( $\alpha_5\beta_1$ )        | Φιβρονεκτίνη                                                   | Προσκόλληση                        |
| GP Ib/IX/V                            | vWF                                                            | Προσκόλληση                        |
| GP IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) | Ινωδογόνο, vWF<br>Φιβρονεκτίνη, Βιτρονεκτίνη<br>Θρομβοσπονδίνη | Συσσώρευση                         |
| GP IV (GPIIb)                         | Θρομβοσπονδίνη, Κολλαγόνο                                      | Προσκόλληση                        |
| GP VI                                 | Κολλαγόνο                                                      | Προσκόλληση, μετάδοση<br>σήματος   |
| Βιτρονεκτίνη ( $\alpha_v\beta_3$ )    | Ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη,<br>βιτρονεκτίνη,<br>vWF               | Προσκόλληση                        |
| VLA-6 ( $\alpha_6\beta_1$ )           | Λαμινίνη                                                       | Προσκόλληση                        |

**β) δομική ζώνη:** Ο ρόλος της δομικής ζώνης είναι να διατηρεί το τυπικό δισκοειδές σχήμα των αδρανών αιμοπεταλίων και να συμμετέχει ενεργά στις δομικές αλλαγές των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων καθώς και στην αποκοκκίωση τους [22]. Αποτελείται

από μικροσωληνίσκους, μικρονημάτια, γλυκογόνο και λεία και κεκαλυμένα κυστίδια, ενώ περικυκλώνεται από ένα δίκτυο από δομικές πρωτεΐνες. Πέρα από το υπομεμβρανικό συστατικό σύστημα νηματίων, υπάρχουν δύο επιπλέον συστήματα νηματίων στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων. Το ένα είναι το περιφερικό σπείραμα των μικροσωληνίσκων, το οποίο είναι το σύστημα υποστήριξης του κυτταροσκελετού. Το άλλο είναι το σύστημα ινιδίων της ακτομυοσίνης, ο κυτταροσκελετός, ο οποίος εμπλέκεται στην αλλαγή σχήματος, στην εσωτερική μεταλλαγή και τελικά στην συστολή του αιμοστατικού επιπωματισμού και στην σύμπτυξη του θρόμβου [23]. Στον κυτταροσκελετό, που αποτελεί το μεγαλύτερο οργανίδιο του κυττάρου, απαντάται κυρίως η ακτίνη και σε μικρότερο ποσοστό η μυοσίνη.

Το σύστημα των συσταλτών μικρονηματίων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία των αιμοπεταλίων. Σε αδρανή κύτταρα, μόνο τα μισά από τα μόρια ακτίνης συναθροίζονται σε νημάτια [24]. Ένα τμήμα από αυτά συνδέεται με το εσωτερικό της μεμβρανικής επιφάνειας και συνιστά τον υπομεμβρανικό σκελετό. Το μεγαλύτερο μέρος δημιουργεί τον κυτταροσκελετό των κυτοπλασματικών νηματίων ακτίνης, του οποίου η λειτουργία είναι διαφορετική από αυτή του υπομεμβρανικού. Σε ένα αδρανές κύτταρο λειτουργεί ως η μήτρα στην οποία βρίσκονται όλα τα οργανίδια και άλλα δομικά συστατικά και παραμένουν διαχωρισμένα τόσο μεταξύ τους όσο και από το κυτταρικό τοίχωμα [23]. Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ο κυτταροσκελετός περιορίζει τα περιφερικά σπειράματα των μικροσωληνίσκων και οδηγεί τα α και τα πυκνά κοκκία σε στενή σύνδεση στο κέντρο του κυττάρου [25]. Αν το ερέθισμα είναι ισχυρό, τα περιεχόμενα των κοκκίων εκκρίνονται στο εξωτερικό μέσω των καναλιών του ανοιχτού συστήματος (OCS), αφήνοντας πίσω μια πυκνή μάζα ακτομυοσίνης.

**γ) ζώνη των οργανιδίων:** αποτελείται από καλά σχηματισμένα οργανίδια τα οποία εκτείνονται κατά μήκος του κυτταροσκελετού του αιμοπεταλίου. Περιέχει τρεις τύπους αποθηκευτικών κοκκίων: τα α-κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσώματα [14].

Τα α κοκκία είναι τα κυριότερα και μεγαλύτερα κοκκία των αιμοπεταλίων με διάμετρο 200-500 nm [26, 27]. Υπάρχουν περίπου 50-80 α κοκκία/αιμοπετάλιο και αποτελούν το 10% του συνολικού όγκου του αιμοπεταλίου, δέκα φορές περισσότερο από τα πυκνά κοκκία [28]. Διαθέτουν σφαιρικό σχήμα με έναν πυρήνα στο κέντρο και προέρχονται από το δίκτυο Golgi [29]. Έχουν ένα πυκνό νουκλεοειδές, που περιέχει χημειοκίνες και γλυκοπρωτεΐνες, μια λιγότερο πυκνή περιοχή δίπλα στο νουκλεοειδές που περιέχει ινωδογόνο και μια περιφερική ζώνη που περιέχει τον παράγοντα vWF,

φιβρονεκτίνη, θρομβοσπονδίνη [30]. Πολλές πρωτεΐνες που παράγονται στα μεγακαρυοκύτταρα έχουν περάσει στα  $\alpha$ -κοκκία, όπως, η P-σελεκτίνη (CD62P), μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα και το ενδοθήλιο [31], ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF4), η θρομβοσπονδίνη, αυξητικοί παράγοντες (PDGF), το ενεργοποιητικό πεπτίδιο-2 των ουδετερόφιλων (NAP-2). Επίσης στα  $\alpha$ -κοκκία εμφανίζονται υποδοχείς προσκόλλησης αιμοπεταλίων, όπως η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , ο υποδοχέας GPVI, υποδοχείς προσκόλλησης αιμοπεταλίου-ενδοθηλίου όπως ο  $\alpha_v\beta_3$ , ο ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) [32, 33].

Τα πυκνά κοκκία (δ κοκκία) είναι μικρότερα σε μέγεθος, λιγότερα σε αριθμό και έχουν μεγάλη μορφολογική ποικιλομορφία. Η διάμετρος τους είναι 250 nm, ο αριθμός τους κυμαίνεται κατά μέσο όρο σε 4-8 ανά αιμοπετάλιο. Τα πυκνά κοκκία είναι πλούσια σε μικρά μόρια, τα οποία δεν είναι πρωτεΐνες και εκκρίνονται κατά την ενεργοποίηση, όπως τα νουκλεοτίδια αδενίνης (ATP, ADP), η σεροτονίνη, η ντοπαμίνη, η ισταμίνη καθώς και ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  [34, 35].

Στα αιμοπετάλια υπάρχουν πολύ λίγα λυσοσώματα, τα οποία προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα κατά την ωρίμανσή τους, πριν την ανάπτυξη των  $\alpha$ -κοκκίων [36]. Περιέχουν τουλάχιστον 13 όξινες υδρολάσες μαζί με τις καθεψίνη D και E, WAMP-1, LAMP-2 και CD63 [37]. Η λειτουργία τους στη φυσιολογία της αιμόστασης είναι άγνωστη. Το περιεχόμενό τους απελευθερώνεται με αυτό των άλλων κοκκίων όταν τα αιμοπετάλια εκτεθούν σε μεγάλο ερέθισμα αλλά οι όξινες υδρολάσες δεν εκκρίνονται στους τόπους αγγειακής ζημιάς *in vivo*. Περισσότερο, τα λυσοσώματα των αιμοπεταλίων λειτουργούν ως τμήματα ενδοσωμικής πέψης. Επίσης διαδραματίζουν ρόλο και στην απενεργοποίηση ή αποικοδόμηση της ηπαρίνης [5].

Τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης, αν και σε πολύ μικρό αριθμό, μιτοχόνδρια, τα οποία απαντώνται στο κυτταρόπλασμα. Αν και είναι δομικά πολύ απλά, συνεισφέρουν αρκετά στον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου καθώς σε αυτά λαμβάνουν χώρα η μεταβολική πορεία οξείδωσης λιπαρών οξέων, η φωσφορυλίωση και ο αναπνευστικός έλεγχος [14].

Ένα άλλο οργανίδιο στα αιμοπετάλια είναι το γλυκόσωμα, με σχήμα σφαιρικό ή ωοειδές και παρόμοιο σε μέγεθος με τα  $\alpha$  κοκκία. Εσωκλείεται από μεμβράνη και περιέχει στο εσωτερικό του κοκκία γλυκογόνου παρόμοια με αυτά που βρίσκονται διάσπαρτα στο κυτόπλασμα. Ο ρόλος τους παραμένει άγνωστος.

**δ) ζώνη μεμβρανικού συστήματος:** διακρίνεται από δυο ξεχωριστά περιβαλλόμενα από μεμβράνη σωληνοειδή συστήματα, το ανοιχτό σωληνοειδές σύστημα (OCS) και το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (DTS).

Το OCS απαρτίζεται από ελικοειδείς, σωληνοειδείς εγκολλώσεις της αιμοπεταλιακής μεμβράνης και επιτρέπει τη σύνδεση του κυτοσολίου του αιμοπεταλίου με το περιβάλλον μέσο. Διαμέσου του συστήματος αυτού γίνεται η είσοδος μορίων από το πλάσμα στα αιμοπετάλια καθώς και η εξωκύτωση. Κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου τα κανάλια αυτά παραμένουν ανοιχτά για την μετάβαση των ουσιών του ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου προς την εξωτερική επιφάνεια [38]. Τέλος, μπορεί να λειτουργήσει ως θέση αποθήκευσης για τις γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης [39].

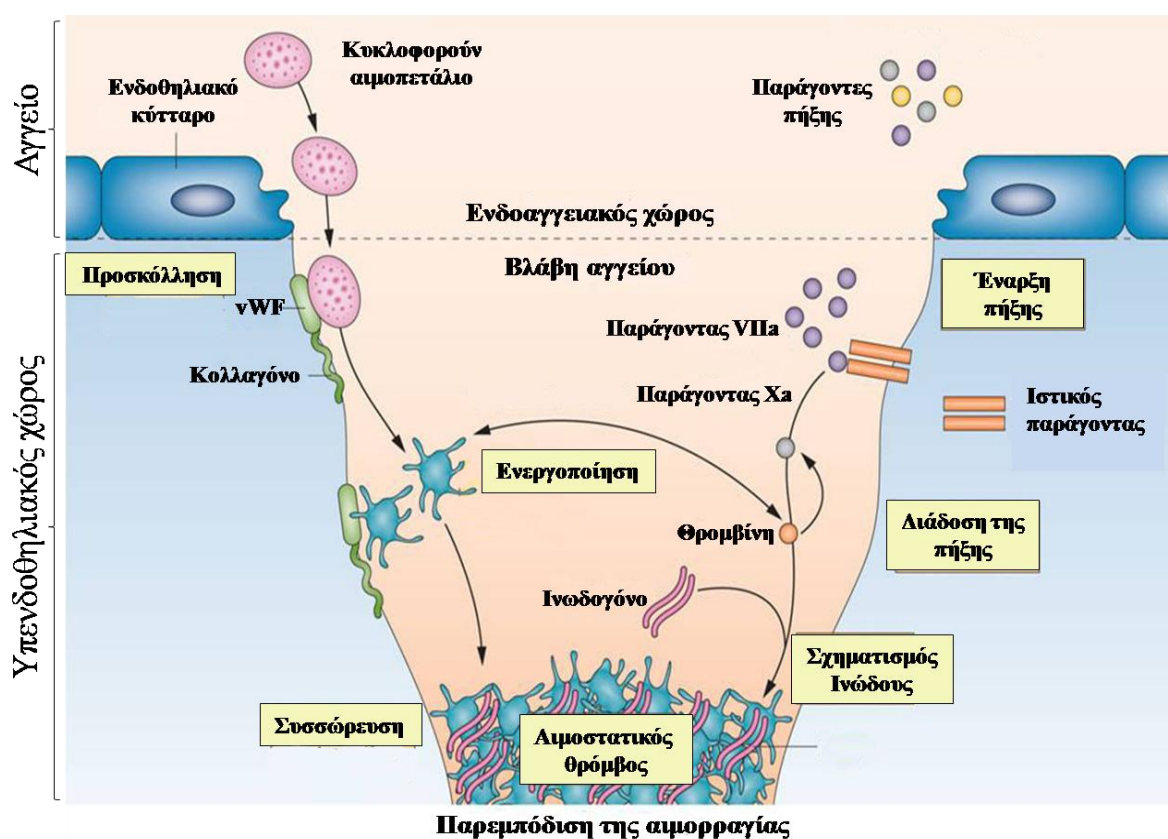
Το DTS είναι ένα μικρό, κλειστό ενδομεμβρανικό σύστημα, το οποίο αποθηκεύει ασβέστιο και μια σειρά σημαντικών, για τον έλεγχο της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου, ενζύμων όπως η αδενυλική κυκλάση (c-AMP) [38, 40]. Το πυκνό σωληνοειδές σύστημα, είναι το κύριο οργάνο που συμμετέχει στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (AA), το οποίο οδηγεί στην παραγωγή  $\text{TxA}_2$ , λευκοτριενίων, προσταγλανδινών και PAF, τα οποία συμμετέχουν με τη σειρά τους σε μια μεγάλη ποικιλία από φλεγμονώδεις αντιδράσεις [41].

### 1.3. Λειτουργίες του αιμοπεταλίου

#### 1.3.1. Αιμόσταση

Είναι ο φυσιολογικός μηχανισμός άμυνας του οργανισμού που αποσκοπεί στην επίσχεση της αιμορραγίας και στη διατήρηση ανοιχτού του αυλού των αγγείων, για την ομαλή ροή του αίματος. Κάτω από ιδανικά φυσιολογικές συνθήκες, το αίμα κυκλοφορεί σε ένα κλειστό σύστημα από αγγεία χωρίς καμιά διακοπή στη ροή και χωρίς να διαρρέει στους τριγύρω ιστούς. Η εμφάνιση τραύματος στα αγγειακά τοιχώματα όπως π.χ. εγκοπές, καταστρέφει την ακεραιότητα του αγγειακού τοιχώματος και επιτρέπει στο αίμα να διαρρεύσει στους τριγύρω ιστούς. Για να αποφευχθεί η απώλεια αίματος το περισσότερο δυνατό, τα αιμοπετάλια σε συνδυασμό με τα διαλυτά συστατικά του πλάσματος δημιουργούν τον αιμοστατικό θρόμβο, ο οποίος επιδιορθώνει τη βλάβη στο αγγειακό τοίχωμα και σταματά την αιμορραγία [42].

Κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες, η δημιουργία του αιμοστατικά ενεργού θρόμβου περιορίζεται στην περιοχή του αγγειακού τοιχώματος χωρίς αρνητικά αποτελέσματα στη ροή του αίματος και τη μεταφορά του στους υπόλοιπους ιστούς. Η δημιουργία του θρόμβου του αγγειακού τοιχώματος που οδηγεί στην καταστολή της αιμορραγίας ταξινομείται σε διάφορα στάδια ανάλογα με τη χρονική διάρκεια της διαδικασίας: i) πρωτογενή αιμόσταση, ii) δευτερογενή αιμόσταση και iii) ινωδόλυση. Κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς αιμόστασης τα αιμοπετάλια προσκολλώνται σε δομές στην περιοχή της αγγειακής βλάβης (προσκόλληση) και δημιουργούν τον πρωτογενή αιμοστατικό θρόμβο μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα αιμοπετάλια (συσσώρευση). Αυτός ο πρωτογενής πλούσιος σε αιμοπετάλια θρόμβος (λευκός θρόμβος) αποτρέπει προσωρινά την επιπλέον αιμορραγία αλλά είναι εύθραυστος και αποκόπτεται εύκολα [43].



Εικόνα 1.3. Η διαδικασία της αιμόστασης [44].

Μετά την ενεργοποίηση του πηκτικού καταρράκτη, δημιουργείται η θρομβίνη μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης από την προθρομβίνη. Η θρομβίνη με τη σειρά της επάγει τη δημιουργία του ινώδους μέσω διάσπασης του ινωδογόνου. Το ινώδες ενισχύει την



σταθερότητα της εύθραυστης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (δευτερογενής αιμοστατικός θρόμβος). Ο άκαμptos πλούσιος σε ινώδες θρόμβος (κόκκινος θρόμβος) δημιουργεί ένα σταθερό σφράγισμα στην αγγειακή βλάβη έναντι στη ροή του αίματος και αρχίζει τη διαδικασία θεραπείας (εικόνα 1.3) [44]. Η δημιουργία του θρόμβου της δευτερογενούς αιμόστασης ελέγχεται από ανασταλτικούς μηχανισμούς του καταρράκτη πήξης (αντιθρομβίνη III, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S και αναστολέας του μονοπατιού του ιστικού παράγοντα [TFP1]) [45, 46]. Κατά τη διαδικασία θεραπείας ένα τμήμα του αιμοστατικού θρόμβου διασπάται ξανά μέσω της ινωδολύσης.

Η αιμόσταση απαιτεί μια στενή αλληλεπίδραση μεταξύ του αγγειακού τοιχώματος, των αιμοπεταλίων και των παραγόντων πήξης του πλάσματος. Κάθε σύστημα έχει τους δικούς του προ- και αντιθρομβωτικούς παράγοντες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, αυτοί οι μηχανισμοί είναι σε ισορροπία κι έτσι αποτρέπουν την ανεξέλεγκτη αύξηση του θρόμβου [47]. Όταν η ισορροπία μετατοπιστεί προς τη προθρομβωτική κατάσταση δημιουργείται μια τάση για θρόμβωση (θρομβοφιλική διάθεση) [48]. Όταν κυριαρχούν οι αντιθρομβωτικοί και ινωδολυτικοί μηχανισμοί, ενισχύεται η αιμορραγία (αιμορραγική διάθεση) [49].

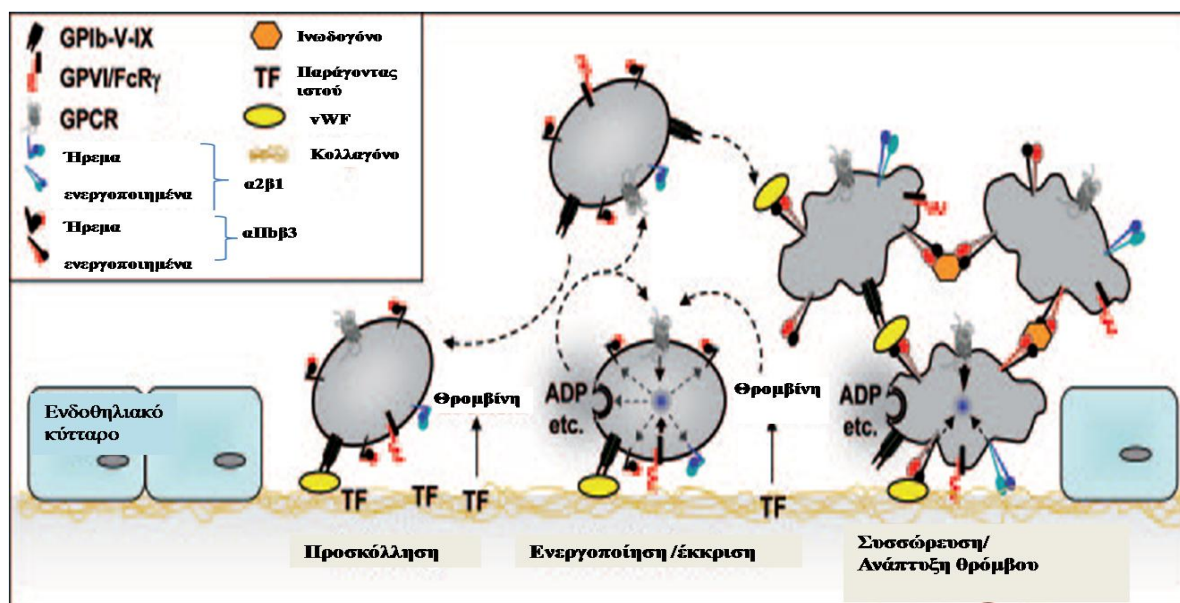
### 1.3.2. Προσκόλληση

Σε περίπτωση τραυματισμού του αρτηριακού τοιχώματος, προκαλείται η λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου και η έκθεση στον ενδοαγγειακό χώρο στοιχείων του ενδοθηλίου. Το πρώτο βήμα στον καταρράκτη της αιμόστασης είναι η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τη εκτεθειμένη εξωκυττάρια μήτρα του υπενδοθηλιακού χώρου (ECM) που περιέχει ένα μεγάλο αριθμό μακρομορίων όπως η λαμίνη, η φιβροεκτίνη, το κολλαγόνο και ο παράγοντας von Willebrand (vWF), η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση τους [50]. Ο μηχανισμός προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στις περιοχές αγγειακής βλάβης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις επικρατούσες ρεολογικές συνθήκες του αίματος.

Κάτω από υψηλές διατμητικές δυνάμεις, όπως στις μικρές αρτηρίες και αγγεία, η αρχική προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο εξωκυττάριο υπενδοθηλιακό χώρο απαιτεί την πρόσδεση του, ακινητοποιημένου στο κολλαγόνο, vWF [51]. Η σύνδεση του GPIIb-IX-V με τον vWF έχει γρήγορο ρυθμό αποκοπής και γι' αυτό δεν επαρκεί για μια σταθερή προσκόλληση, αλλά διατηρεί τα αιμοπετάλια κοντά στην επιφάνεια του

ενδοθηλίου, αν και συνεχώς μεταφέρεται σύμφωνα με την κατεύθυνση ροής του αίματος. Κατά την 'κύλιση', τα αιμοπετάλια έρχονται σε επαφή με τη θρομβογόνο πρωτεΐνη του ενδοθηλίου, το κολλαγόνο, μέσω του ανοσοσφαιρικού τύπου υποδοχέα προσκόλλησης GPVI. Ενώ ο GPVI ενώνεται με το κολλαγόνο μέσω χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης, πυροδοτεί ενδοκυττάρια σήματα που μετατρέπουν τις ιντεγκρίνες των αιμοπεταλίων σε καταστάσεις υψηλής συγγένειας για το πρόσδεμα και επάγουν την απελευθέρωση δευτερευόντων μεσολαβητών όπως το ADP και το θρομβοξανθίο  $A_2$  ( $TxA_2$ ). Αυτοί οι αγωνιστές μαζί με την τοπικά παραγόμενη θρομβίνη, συμβάλλουν στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, διεγείροντας υποδοχείς που συνδέονται με ετεροδιμερείς G πρωτεΐνες ( $G_q$ ,  $G_{12}/G_{13}$ ,  $G_i$ ), οι οποίες επάγουν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια και δρουν συνεργατικά στην επαγωγή της πλήρης ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου. Κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης διαλυτών αγωνιστών, αυτό μπορεί να είναι αρκετό για τη πλήρη ενεργοποίηση ανεξάρτητα από τη δράση του GPVI, όπως έχει φανεί πειραματικά σε ένα μοντέλο τραυματισμού αρτηρίας από λέιζερ σε ποντίκια, όπου ο σχηματισμός του θρόμβου συμβαίνει ανεξάρτητα από τον υποδοχέα του κολλαγόνου [52]. Η στενή προσκόλληση στον ενδοθηλιακό χώρο διαμεσολαβείται από υψηλής συγγένειας τύπου  $\beta_1$  ιντεγκρίνες, οι οποίες προσδένουν το κολλαγόνο ( $\alpha_2\beta_1$ ), την φιβρονεκτίνη ( $\alpha_5\beta_1$ ), την λαμνίνη ( $\alpha_6\beta_1$ ), καθώς και τελικά από την κύρια αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , η οποία αλληλεπιδρά με την φιβρονεκτίνη και τον ακινητοποιημένο, στο κολλαγόνο, παράγοντα vWF [51]. Το τελικό στάδιο της προσκόλλησης συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια κατανέμονται κατά μήκος του υπενδοθηλίου και στεγανοποιούν την εκτεθειμένη περιοχή του ενδοθηλίου από την έξοδο του αίματος.

Οι υποδοχείς προσκόλλησης αποτελούν τους εκκινητές «κλειδιά» της ενεργοποίησης στις θέσεις βλάβης, όπου τα αιμοπετάλια εκτίθενται στις πρωτεΐνες προσκόλλησης, που εκκρίνονται από το περιβάλλον της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ή από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Είναι πολύ ενδιαφέρον το ότι παρά τις αξιοσημείωτες διαφορές που εμφανίζουν στις λειτουργίες και στα μονοπάτια σηματοδότησής τους, αρκετοί από τους κύριους υποδοχείς μοιράζονται πολλές ομοιότητες στους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος. Για παράδειγμα, η σηματοδότηση μέσω του GPIIb-IX, GPVI και των ιντεγκρινών, περιλαμβάνουν τα μονοπάτια της οικογένειας των Src κινασών (SFKs) καθώς και των κινασών της PI3 ( $PI3Ks$ ) [53].



Εικόνα 1.4. Η προσκόλληση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο ενδοθήλιο [51].

### 1.3.3. Πρωτεΐνες προσκόλλησης

#### Παράγοντας von Willebrand (vWF)

Ο vWF είναι μια πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη προσκόλλησης, που βρίσκεται αποθηκευμένη στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων καθώς και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στην ώριμη του μορφή αποτελείται από υπομονάδες 275 kDa, οι οποίες ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς και σχηματίζουν πολυμερή τουλάχιστον 20.000 kDa. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από συντηρημένες δομές: D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2. Στον δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στα κατάλοιπα C1272-C1458 της A1 δομής βρίσκεται η θέση πρόσδεσης για τον GPIIb και την ηπαρίνη. Στην A3 δομή συνδέεται το κολλαγόνο, ενώ η C1 περιοχή περιέχει μια Arg-Gly-Asp (RGD) αλληλουχία που συνδέεται η αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη αIIbβ3. Η GPIIb-θέση πρόσδεσης του vWF δεν αποκαλύπτεται κάτω από συνθήκες ηρεμίας, αλλά προσδένεται με τον υποδοχέα όταν εκτίθεται σε υψηλές διατμητικές δυνάμεις ή ενεργοποιείται από μη φυσιολογικά κίνητρα. Ενδοκυτταρικά, πολλά διμερή ώριμων υπομονάδων vWF συναθροίζονται και σχηματίζουν μεγάλα πολυμερή έως 20 MDa. Τα μεγάλα πολυμερή του vWF, που εκφράζονται στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, έχουν μεγάλο θρομβογεννητικό δυναμικό αφού αποτελούν προθρομβωτικούς παράγοντες και προσδένονται ισχυρά στα

ενεργοποιημένα αιμοπετάλια [54, 55]. Ο διαλυτός vWF σε κυκλοφορία δεν αλληλεπιδρά με τον GPIb-IX-V, ενώ όταν ακινητοποιηθεί στο κολλαγόνο αποτελεί προσκολλητικό υπόστρωμα.

### Κολλαγόνο

Σε αντίθεση με τον vWF, το ενδοθηλιακό ινιδικό κολλαγόνο είναι ένα ισχυρό θρομβογεννητικό υπόστρωμα, αφού επάγει κατευθείαν την ισχυρή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και υποστηρίζει την προσκόλληση, συσσώρευση και ικανότητα πήξης μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών. Από τα περισσότερα από 20 είδη κολλαγόνου στο ανθρώπινο γονιδίωμα, τα ινιδικά τύπου I και III είναι τα κυριότερα συστατικά του ενδοθηλίου των αγγείων του αίματος. Επιπλέον, το αποτελούμενο από κολλαγόνο τύπου IV δίκτυο, είναι η κύρια μορφή της υπενδοθηλιακής μεμβράνης. Το κολλαγόνο αποτελείται από επαναλαμβανόμενα GXY μοτίβα (G: γλυκίνη, X: προλίνη, Y: υδρόξυ-πρόλίνη). Εκτός από τον GPIb και τον  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , που αλληλεπιδρούν με το κολλαγόνο μέσω του vWF, έχουν αναγνωριστεί 9 άλλοι υποδοχείς του κολλαγόνου στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, με κύριους τον ανοσοσφαιρικού τύπου GPVI και την ιντεγκρίνη  $\alpha_2\beta_1$ , οι οποίοι δεσμεύονται στο κολλαγόνο και συμβάλουν στην ενεργοποίηση [56-58]. Η συμμετοχή αυτών των δύο υποδοχέων στην αλληλεπίδραση κολλαγόνου-αιμοπεταλίου έχουν συζητηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι αν και ο GPVI εξυπηρετεί ως υποδοχέας ενεργοποίησης και είναι απαραίτητος για την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο, η ιντεγκρίνη  $\alpha_2\beta_1$  συνεισφέρει στην ισχυρή προσκόλληση και συνεισφέρει ελάχιστα στην ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου [56]. Η δέσμευση του κολλαγόνου στα αιμοπετάλια προκαλεί την ενεργοποίηση των Src και Syk κινασών της τυροσίνης, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση της  $PLC\gamma_2$  και τη δημιουργία πτυχωτών προεκτάσεων [59].

### Ινωδογόνο

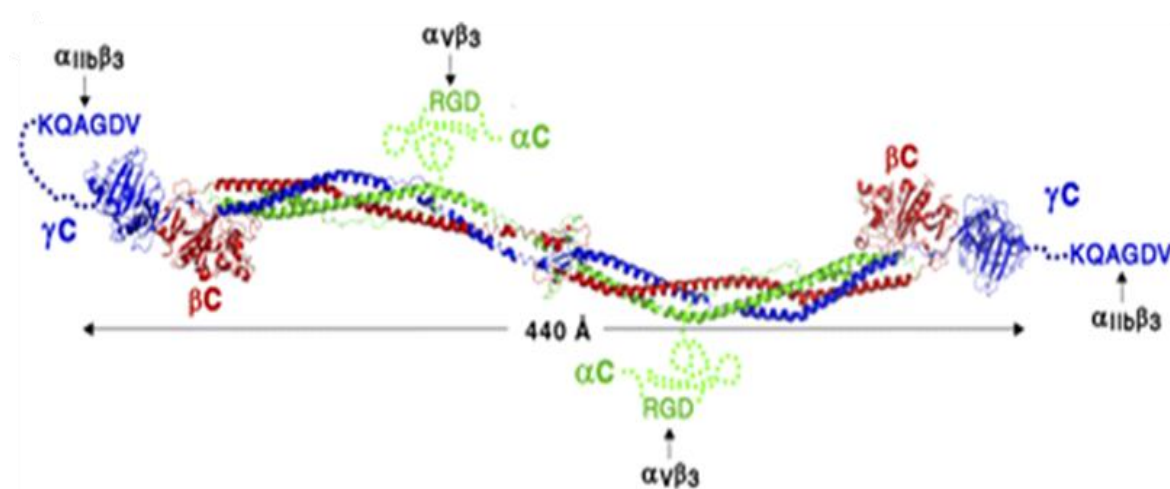
Είναι μια μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη (340 kD). Έχει χρόνο ημιζωής περίπου 3,5 - 4 μέρες και αποτελείται από δυο ίδιες υπομονάδες (ομοδιμερές μόριο) που η καθεμία περιλαμβάνει τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ( $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$ ) οι οποίες ενώνονται μεταξύ

τους με 29 δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι τρεις από τους 29 δισουλφιδικούς δεσμούς συνδέουν τις δύο υπομονάδες μεταξύ τους. Και οι 6 αλυσίδες συναντώνται στο κέντρο του μορίου του ινωδογόνου και σχηματίζουν το πεδίο E. Οι δυο εξωτερικές περιοχές καλούνται πεδία D. Η θρομβίνη, μια σερίνοπρωτεάση, μετατρέπει το διαλυτό ινωδογόνο σε μονομερή ινώδους, τα οποία πολυμερίζονται για να σχηματιστούν οι ίνες το ινώδους. Αυτές οι ίνες σχηματίζουν το δίκτυο του θρόμβου και λειτουργούν σαν το πρόσδεμα των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της ανάκλησης του θρόμβου [60]. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν έναν ειδικό υποδοχέα για το ινωδογόνο και το ινώδες στην επιφάνειά τους σε ένα μεγάλο αριθμό αντιτύπων, την ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [61].

Τρεις είναι οι θέσεις σύνδεσης του ινωδογόνου με την  $\alpha_{IIb}\beta_3$ : δύο RGD (Arg-Gly-Asp) θέσεις στην  $\alpha$  αλυσίδα και μια C-τελική περιοχή της  $\gamma$  αλυσίδας. Η RGD είναι μια ομόφωνη θέση πρόσδεσης της ιντεγκρίνης και αναγνωρίστηκε χρησιμοποιώντας συνθετικά πεπτίδια [62]. Οι RGD αλληλουχίες στο ινωδογόνο βρίσκονται στην Αα αλυσίδα στα κατάλοιπα 95-97 και 572-575 [63]. Η τρίτη θέση πρόσδεσης είναι το δωδεκαπεπτίδιο του C-τελικού άκρου της  $\gamma$  αλυσίδας (HHLGGAKQAGDV) [64, 65]. Η ιντεγκρίνη ενώνεται εξειδικευμένα στο παραπάνω C-τελικό άκρο, σχηματίζοντας τις γνωστές 'γέφυρες ινωδογόνου', αφού έχει αναγνωριστεί ότι ένα μόριο ινωδογόνου μπορεί να δεσμευτεί σε δύο ιντεγκρίνες διαφορετικών αιμοπεταλίων [66]. Η απόσταση ανάμεσα από τις θέσεις πρόσδεσης του ινωδογόνου στις ιντεγκρίνες είναι 440 Å [67]. Έγιναν πειράματα απομάκρυνσης του  $\gamma$ C δωδεκαπεπτιδίου και της QAGDV ή KQAGDV αλληλουχίας του αντίστοιχα, διατηρώντας την υπόλοιπη δομή και παρατηρήθηκε ότι η πρόσδεση του ινωδογόνου στην  $\alpha_{IIb}\beta_3$  μειώνεται όταν αφαιρείται η δομή του δωδεκαπεπτιδίου, ενώ απουσιάζει εντελώς όταν λείπει η δομή του πενταπεπτιδίου [68, 69]. Έτσι ενώ τα RGD πεπτίδια μπορούν να αναστέλλουν τη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη [70], η  $\gamma$ C περιοχή είναι αυτή που αναγνωρίζει η ιντεγκρίνη και ενεργοποιείται.

Η δομική βάση αυτών των παρατηρήσεων δεν είναι ακριβώς γνωστή, αλλά πειράματα πρόσδεσης παρουσία ανταγωνιστών δείχνουν ότι RGD-πεπτίδια και πεπτίδια της  $\gamma$  αλυσίδας δεν μπορούν να συνδεθούν συγχρόνως με την  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [71], υπονοώντας ότι τα RGD-πεπτίδια αναστέλλουν την πρόσδεση του ινωδογόνου στην  $\alpha_{IIb}\beta_3$  αποτρέποντας την αλληλεπίδραση του με την  $\gamma$  αλυσίδα. Παρόλα αυτά RGD-πεπτίδια αναστέλλουν την λειτουργία του  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in vitro και είναι κλινικά αποτελεσματικοί ανταγωνιστές της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in vivo [72]. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι θέσεις πρόσδεσης των παραπάνω δομών στην

$\alpha_{IIb}\beta_3$ . Μελέτες έδειξαν ότι το  $\gamma$ C δωδεκαπεπτίδιο σταυροσυνδέεται στην  $\alpha_{IIb}$ , ενώ το RGD εξαπεπτίδιο σταυροσυνδέεται τόσο στην  $\alpha_{IIb}$  όσο και στη  $\beta_3$  υπομονάδα [73].



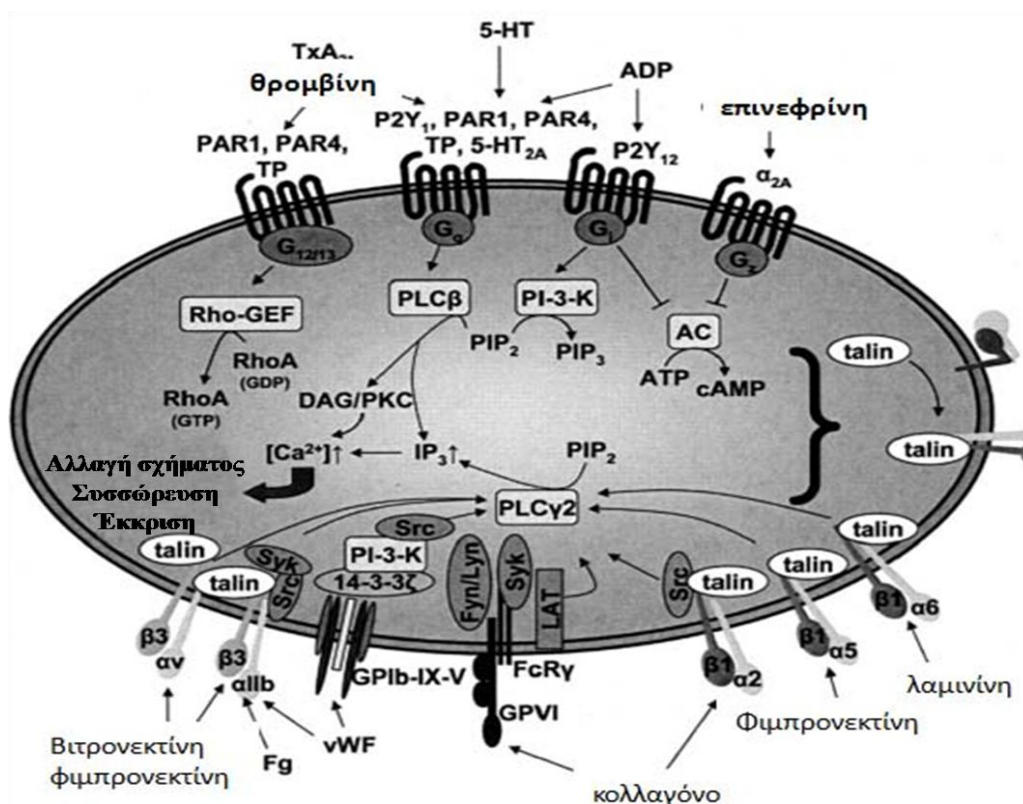
**Εικόνα 1.5.** Η δομή του ινωδογόνου και η αλληλουχία των C-τελικών  $\gamma$  υπομονάδων [67].

#### 1.3.4. Ενεργοποίηση

Η σηματοδότηση που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων κατηγοριοποιείται σε 3 στάδια: (1) αλληλεπίδραση των αγωνιστών με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους και πρώτη σηματοδότηση ενεργοποίησης, (2) ενδιάμεσα κοινά σηματοδοτικά γεγονότα και (3) ενεργοποίηση της κύριας μεμβρανικής ιντεγκρίνης. Η ενεργοποίηση είναι μια δυναμική διαδικασία και συγκεκριμένα τα αιμοπετάλια βασίζονται σε ενδογενείς μηχανισμούς ενίσχυσης των δευτερευόντων σημάτων για την επίτευξη ενός ικανοποιητικού επιπέδου απόκρισης στην αγγειακή βλάβη [53].

Μια ποικιλία διαλυτών αγωνιστών, που απελευθερώνονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα όπως το ADP, παράγονται κατά τη διάρκεια της πήξης όπως η θρομβίνη, ή της φλεγμονής όπως ο PAF, εμπλουτίζονται στη αθηρωματική πλάκα. Εξίσου σημαντικοί αγωνιστές όπως το ADP,  $TxA_2$ , η σεροτονίνη εκκρίνονται από τα διεγερμένα αιμοπετάλια και ενισχύουν την ενεργοποίηση και στρατολόγηση κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων. Οι παραπάνω αγωνιστές ενεργοποιούν μια οικογένεια υποδοχέων, που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs) και μεταφέρουν σήματα μέσω αυτών των ετεροδιμερών πρωτεϊνών [74]. Οι GPCRs είναι υποδοχείς με επτά διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του

αιμοπεταλιακού θρόμβου [74, 75]. Αν και οι αρχικοί σηματοδοτικοί μηχανισμοί των υποδοχέων διαφέρουν, συγκλίνουν σε κοινά ενδοκυττάρια σηματοδοτικά γεγονότα. Συγκεκριμένα, η  $PLC\beta$  ενεργοποιείται μέσω της  $G_q$  πρωτεΐνης [76]. Καταλύει την υδρόλυση της  $PIP_2$  προς  $IP_3$  και DAG, η οποία ενεργοποιεί την κινητοποίηση του ασβεστίου και την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), αντίστοιχα. Αναδιοργανώνεται ο κυτταροσκελετός της ακτίνης μέσω των  $G12a$  και  $G13a$ , το οποίο προωθεί το σχηματισμό λαμελποδίων και ψευδοποδίων και συνεπώς την αλλαγή σχήματος του αιμοπεταλίου. Μέσω της οικογένειας των  $G_{12}$  πρωτεϊνών αναστέλλεται η δράση του ενζύμου AC και συνεπώς η αύξηση των επιπέδων του cAMP, τα οποία είναι υψηλά κατά τη φυσιολογική λειτουργία του υπενενδοθηλιακού χώρου. Το ενδοκυττάριο ασβέστιο και η DAG ως δευτερεύοντες αγγελιοφόροι, ενεργοποιούν περαιτέρω το μόριο  $Ca/DAG$ -GEF1, το οποίο ενεργοποιεί τη σημαντική, για την ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , Rap1Ras πρωτεΐνη [77]. Τέλος, τα μονοπάτια ενεργοποίησης της PI3K, των Src κινάσων και της Rap1 πρωτεΐνης οδηγούν στην ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [75].



**Εικόνα 1.6.** Αιμοπεταλιακοί υποδοχείς και σημαντικά σηματοδοτικά μόρια που οδηγούν στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [51].

Η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , η κύρια αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη, είναι απαραίτητη για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και γι' αυτό εμπλέκεται κεντρικά στη θρόμβωση [78]. Η λειτουργία της στην συσσώρευση εξαρτάται από την ικανότητα της να υφίσταται ενεργοποίηση, να αλλάζει ραγδαία διαμόρφωση από χαμηλής συγγένειας για το πρόσδεμα σε υψηλής συγγένειας για το πρόσδεμα διαμόρφωση. Οι αλλαγή αυτή προέρχεται από ενδοκυττάρια σήματα, γνωστά ως 'μέσα – έξω' σηματοδότηση [79-81], η οποία λαμβάνει χώρα στα C-τελικά κυτταροπλασματικά άκρα. Αμέσως μετά αυθόρμητα, σχηματίζονται τα συσσωματώματα μέσω της σύνδεσης διμερούς ινωδογόνου σε ενεργοποιημένες ιντεγκρίνες γειτονικών αιμοπεταλίων. Έπειτα από την κατάληψη της ιντεγκρίνης, η πληροφορία μεταφέρεται μέσω της μεμβράνης και ξεκινά η 'έξω – μέσα' σηματοδότηση [80, 81]. Αυτές οι σηματοδοτικές πορείες θα συζητηθούν στα επόμενα κεφάλαια.

### 1.3.5. Αγωνιστές των αιμοπεταλίων και οι υποδοχείς τους

#### Θρομβίνη

Η θρομβίνη, αρχικά αναγνωρισμένη ως σερινοπρωτεάση με μορφή θρυψίνης, είναι ο πιο ισχυρός διαλυτός αγωνιστής των αιμοπεταλίων και είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες και τη σταθεροποίηση του πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου [82]. Ο ρόλος της αυτός έχει καθιερωθεί εδώ και 5 δεκαετίες. Η μετατροπή της προθρομβίνης στην 38-kD ενεργή πρωτεάση ( $\alpha$ -θρομβίνη) απαιτεί την στρατολόγηση ενός συμπλόκου προθρομβινάσης που αποτελείται από προθρομβίνη, τον παράγοντα πήξης  $Xa$  ( $FXa$ ) και τον ενεργό συμπαράγοντα  $Va$  στην επιφάνεια της φωσφολιπιδικής μεμβράνης, απαιτώντας επιπλέον ιόντα ασβεστίου [83]. Η θρομβίνη, αν και με την απουσία των παραπάνω προϊόντων του καταρράκτη της πήξης, βρέθηκε να είναι ισχυρός ενεργοποιητής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, πράγμα που δηλώνει το δυναμικό της στις κυτταρικές επιδράσεις εκτός από το ρόλο της στο σχηματισμό του θρόμβου [84].

Έχει βρεθεί ότι η θρομβίνη, ξεκινώντας μια σειρά από συντονισμένα γεγονότα, οδηγεί στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [85]. Παρόλο που οι άλλοι αγωνιστές μπορούν να προκαλέσουν υδρόλυση των φωσφοϊνοσιτιδίων, κανένας δε φαίνεται να δεσμεύεται τόσο αποτελεσματικά στη PLC, όσο η θρομβίνη.



Μπορεί να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των 0.1 nM. Από τη στιγμή της προσθήκης της μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, η συγκέντρωση του κυτοσολικού  $\text{Ca}^{2+}$  δεκαπλασιάζεται, πυροδοτώντας διάφορες, εξαρτώμενες από το  $\text{Ca}^{2+}$ , βιοχημικές οδούς, όπως η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης  $\text{A}_2$ . Επίσης ενεργοποιεί την κίνηση Rho οδηγώντας στην επαναδιευθέτηση της ακτίνης του κυτταροσκελετού και στην αλλαγή σχήματος του αιμοπεταλίου [86].

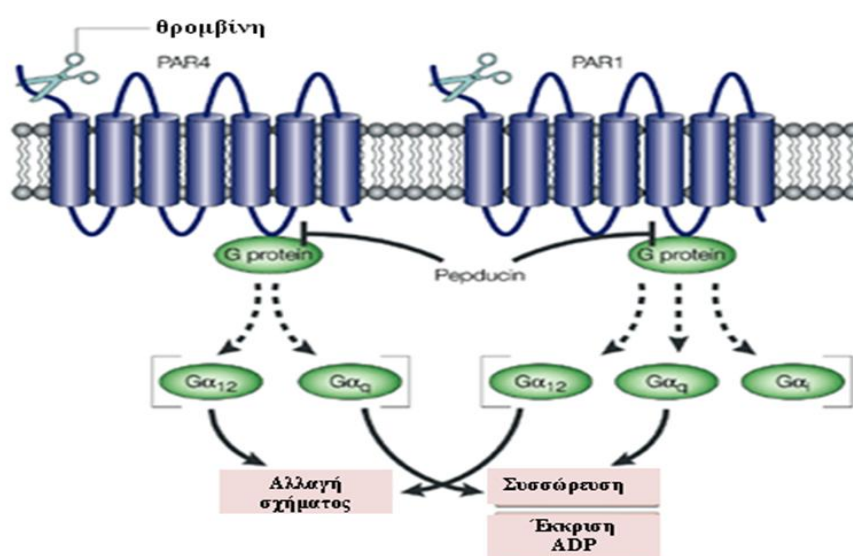
Η θρομβίνη ρυθμίζει την απελευθέρωση των 5-HT, ADP,  $\text{TxA}_2$  και άλλων συστατικών των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Επίσης ενεργοποιεί την αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , γεγονός που οδηγεί στην πρόσδεση του ινωδογόνου και του vWF και τελικά στη συσσώρευση [87]. Επίσης, μεσολαβεί στην μετατόπιση της P-σελεκτίνης και του CD40L στην μεμβράνη, πράγμα που διευκολύνει την πρόσδεση των αιμοπεταλίων στη ενδοθηλιακά κύτταρα [88]. Είναι ο μοναδικός παράγοντας που εξαρτάται από τη βιταμίνη K και μπορεί να δεσμεύεται σε εξειδικευμένους πρωτεϊνικούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων [89]. Τέλος, είναι ικανή να αναστέλλει την ενεργότητα της αδενυλικής κυκλάσης (AC) στα ανθρώπινα αιμοπετάλια, είτε άμεσα μέσω μέλους της οικογένειας Gi είτε έμμεσα μέσω του ADP [86, 90].

Η θρομβίνη ενεργοποιεί τα κύτταρα μέσω μιας μοναδικής τάξης υποδοχέων που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες της επιφάνειας των κυττάρων (PARs), οι οποίοι είναι μέλη μιας μεγαλύτερης οικογένειας υποδοχέων με 7 διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίοι συζεύγνυνται με G πρωτεΐνες [91, 92]. Η ενεργοποίηση γίνεται μέσω μιας εξωκυττάριας πρωτεολυτικής διάσπασης, η οποία αποκαλύπτει ένα νέο N-τερματικό άκρο που δρα ως δεσμευτικό πρόσδεμα, σε ένα ενδοκυττάριο σήμα μέσω  $\text{Gq}$ ,  $\text{G}_{12/13}$  και σε κάποιες περιπτώσεις μέσω Gi πρωτεϊνών [74, 93]. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν τον PAR1 και PAR4 υποδοχέα. Ο PAR1 μεσολαβεί στην ενεργοποίηση με χαμηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης (<0.1 nM), ενώ ο PAR4 συμμετέχει μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης (>30 nM) [94]. Και οι δύο υποδοχείς αυξάνουν το κυτοσολικό  $\text{Ca}^{2+}$  μέσω της διέγερσης της  $\text{Gq}$  και της PLC [89], συμμετέχουν στην διαμεμβρανική σηματοδότηση, όμως έχει προταθεί ότι σχηματίζουν ετεροδιμερή, στα οποία ο PAR1 δρα ως συμπαράγοντας του PAR4 [95].

Η μεγαλύτερη δραστηριότητα της θρομβίνης στην ενεργοποίηση του PAR1 οφείλεται μάλλον στη παρουσία μίας αλληλουχίας με δομή ιρουδίνης στο καρβοξυτελικό άκρο του, η οποία διευκολύνει τη πρόσδεση της θρομβίνης, ενώ αυτή απουσιάζει στον PAR4 [96]. Η θρομβίνη περιέχει στο μόριο της ειδικές περιοχές που επηρεάζουν τη

λειτουργικότητα του ενζύμου, οι οποίες εντοπίζονται μακριά από το ενεργό της κέντρο [97]. Συνθετικά πεπτίδια, όπως τα πεπτίδια του αγωνιστή της θρομβίνης TRAP-6 ή TRAP-14 (thrombin receptor agonist peptide-6/-14), είναι ικανά να ενεργοποιήσουν εξωγενώς τον υποδοχέα της θρομβίνης απουσία αυτής.

Εκτός από τους PAR υποδοχείς, ο GPIb-IX-V έχει αποδειχτεί ότι έχει μια συγγένεια πρόσδεσης με τη θρομβίνη και έχει βρεθεί να συμμετέχει στη σηματοδότηση της θρομβίνης [98, 99]. Όμως δεν φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση της, αφού η σηματοδότηση καταλύεται με την έλλειψη του κύριου υποδοχέα της PAR4 [100].



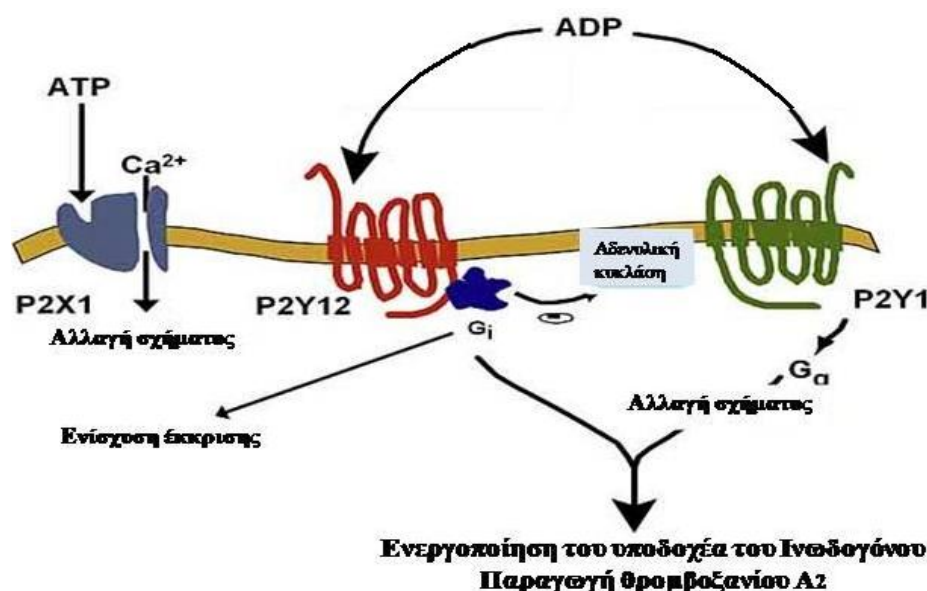
**Εικόνα 1.7.** Οι κύριοι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς της θρομβίνης (Τροποποιημένη από Bhatt D.L. et al.) [93].

## ADP

Οι περισσότεροι διαλυτοί αγωνιστές πυροδοτούν την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση μέσω των GPCRs υποδοχέων. Το ADP, που απελευθερώνεται από τα κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια είναι απαραίτητος ενισχυτής της ενεργοποίησης. Στα αιμοπετάλια εκφράζονται τρεις πουρινεργικοί υποδοχείς για το ADP, ο P2Y<sub>1</sub> και ο P2Y<sub>12</sub> και ο P2X<sub>1</sub>, οι οποίοι συνδέονται με G<sub>q</sub> και G<sub>i2/3</sub> αντίστοιχα [101]. Ο G<sub>q</sub>-συνδεδεμένος P2Y<sub>1</sub> ενεργοποιεί το μονοπάτι της Gα<sub>q</sub>/φωσφολιπάσης C (PLCβ) προς τη δημιουργία τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και διαλυλογλυκερόλης (DAG) [102]. Η IP3 κινητοποιεί το ασβέστιο από τις εσωτερικές αποθήκες του

κυττάρου, ενώ η DAG ενεργοποιεί τις ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Είναι υπεύθυνος για την επαγόμενη από το ADP αλλαγή του αιμοπεταλιακού σχήματος, όταν παρεμποδίζεται ο σχηματισμός του TxA<sub>2</sub> [103], συμμετέχει στην συσσώρευση σε απόκριση προς το κολλαγόνο καθώς και στην παραγωγή θρομβοξανίου A<sub>2</sub> [104].

Ο κεντρικός υποδοχέας, Gai<sub>2</sub> συνδεδεμένος [105], P2Y<sub>12</sub>, οδηγεί στην αναστολή δράσης της αδενυλικής κυκλάσης (AC), αποτελώντας σημαντική ένωση του σηματοδοτικού μονοπατιού που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> [106, 107]. Επίσης συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων cAMP [108], διευκολύνοντας έτσι την ενεργοποίηση από άλλους αγωνιστές, που αλλιώς θα εμποδίζονταν. Έχει αποδειχτεί ότι δεν μειώνει τα επίπεδα του cAMP, αλλά στην πραγματικότητα εμποδίζει την αύξηση των επιπέδων του, που προκαλείται από την προσταγλανδίνη PGE<sub>2</sub>. Ασθενείς που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα εμφανίζουν έλλειψη της επαγόμενης από το ADP συσσώρευσης [109]. Επίσης, η σηματοδότηση του συγκεκριμένου υποδοχέα διεγείρει την επιφανειακή έκφραση της P-σελεκτίνης [110]. Δεδομένου του δυναμικού του ρόλου στις αιμοπεταλιακές λειτουργίες και του ότι ανιχνεύεται μόνο στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη, αποτελεί φαρμακολογικό στόχο των θειενοπυριδινών (τικλοπιδίνη, κλοπιδογρέλη και πρασουγρέλη) και των αντιστρεπτών αναστολέων (τικαγρελόρη ή καγρελόρη) [111].



Εικόνα 1.8. Μοντέλο ενεργοποίησης μέσω του ADP υποδοχέα [104].

Ο  $P2X_1$ , πουργενικός υποδοχέας, ανιχνεύεται μόνο στα αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα. Ο ρόλος του είναι δύσκολο να μελετηθεί εξαιτίας της γρήγορης απευαισθητοποίησης του. Η ενεργοποίηση του  $P2X_1$  από το ATP οδηγεί στην εισροή εξωκυττάριου  $Ca^{2+}$ , συμβάλλοντας έτσι στην ενεργοποίηση λόγω αύξησης της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Αυτή η αύξηση δεν είναι αρκετή να προκαλέσει συσώρευση, αλλά βοηθά στην αλλαγή σχήματος του αιμοπεταλίου, ανεξάρτητα από αυτή που προκαλείται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα του ινωδογόνου [112].

### Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PAF) είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό γλυκεριναιθερικό φωσφολίπιδιο, που είναι ικανό να προκαλεί, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, ενεργοποίηση, συσώρευση και έκκριση των κοκκίων των αιμοπεταλίων [113]. Στην πρώτη θέση του γλυκερινικού σκελετού συνδέεται, με αιθερικό δεσμό, μια λιπαρή αλυσίδα που περιλαμβάνει συνήθως 16 ή 18 άτομα άνθρακα και είναι κορεσμένη ή ακόρεστη με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς, στη δεύτερη θέση βρίσκεται εστεροποιημένο ένα οξικό οξύ και στην τρίτη θέση υπάρχει μια ομάδα φωσφοχολίνης [114].

Αποτελεί ένα χημικό διαβιβαστή, με παρόμοια λειτουργικότητα με αυτή των ορμονών, των κυτοκινών και των ιντερλευκινών [115]. Ο PAF εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η φλεγμονή, ο σχηματισμός θρόμβου και οι αλλεργικές αντιδράσεις [116]. Στα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας δεν ανιχνεύεται, ενώ μετά την διέγερση παράγεται και εκκρίνεται ή εκφράζεται στην μεμβράνη αυτών. Στη συνέχεια ενεργοποιεί διαμέσου των ειδικών υποδοχέων του τα κύτταρα στόχους [117]. Ο υποδοχέας του PAF ελέγχεται από τη  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενη φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση της καλμοδουλίνης [118].

Τα αιμοπετάλια βιοσυνθέτουν PAF (κυμαίνεται από:  $0.25-3 \text{ pmoles}/10^8$  αιμοπετάλια) μετά την ενεργοποίησή τους από συγκεκριμένους αγωνιστές, όπως το ιονοφόρο  $Ca^{2+}$ , η θρομβίνη και το κολλαγόνο, ενώ παρουσία των αγωνιστών ADP και AA, τα κύτταρα δεν είναι σε θέση να παράγουν τον αγωνιστή [119]. Η δράση του στα αιμοπετάλια, έχει ως αποτέλεσμα την αποκοκκίωση, την αλλαγή σχήματος, τη συσώρευση, τη σύνθεση AA και  $TxA_2$  και την αύξηση του ενδοκυττάριου  $Ca^{2+}$ . Τα

αιμοπετάλια διαθέτουν μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων του PAF, ο οποίος στηρίζεται στη καταλυτική δράση του ενζύμου της ακετυλοϋδρολάσης του PAF (PAF-AH), το οποίο απομακρύνει την ακετυλοομάδα από την sn-2 θέση, και μπορεί να κατηγοριοποιηθεί στην κατηγορία των φωσφολιπασών, ως Lp-PLA<sub>2</sub> (lipoprotein-associated PLA<sub>2</sub>), παράγοντας έτσι τον ανενεργό μεταβολίτη lyso-PAF [120, 121].

### Θρομβοξανίο A<sub>2</sub>

Το θρομβοξανίο A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) είναι ένας σημαντικός δεύτερου κύματος ενεργοποιητής, που παράγεται και εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Η μετατροπή του αραχιδονικού οξέος προς τα ασταθή ενδοϋπεροξειδία PGG<sub>2</sub> και PGH<sub>2</sub> και με τη δράση της συνθάσης του θρομβοξανίου τελικά σε TxA<sub>2</sub>, γίνεται μέσω της δράσης του ενζύμου κυκλοοξυγενάση 1 (COX-1) [122, 123]. Η μετατροπή αυτή μπορεί να ανασταλεί μη αντιστρεπτά από το ακέτυλοσαλικυλικό οξύ, το οποίο παραμένει ακόμα το καλύτερο φάρμακο για τα καρδιαγγειακά συμβλήματα.

Το εκκρινόμενο TxA<sub>2</sub> ενεργοποιεί περαιτέρω τα αιμοπετάλια μέσω των G<sub>q</sub> και G<sub>12/13</sub> συνδεδεμένων υποδοχέων TP $\alpha$  και TP $\beta$ , συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση του κυτοσολικού Ca<sup>2+</sup>, στη στρατολόγηση των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων, στη μεταβολή του σχήματος και στην έκκριση των κοκκίων. Παρόλο που το mRNA για τους TP $\alpha$  και TP $\beta$  εντοπίζεται στα αιμοπετάλια, μόνο ο TP $\alpha$  εκφράζεται στα αιμοπετάλια, ενώ ο TP $\beta$  στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) [124, 125]. Οι επιδράσεις του TxA<sub>2</sub> στα αιμοπετάλια μεσολαβούνται κυρίως διαμέσου του TP $\alpha$  [126]. Έλλειψη αυτού του υποδοχέα οδηγεί σε καθυστερημένη συσσώρευση προερχόμενη από το κολλαγόνο, αιμορραγία και αστάθεια του θρόμβου [127]. Γενικά ο καθοριστικός ρόλος του TxA<sub>2</sub> είναι η ενίσχυση της αρχικής ενεργοποίησης με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση στη περιοχή της βλάβης [128]. Η δράση του είναι περιορισμένη στη περιοχή της βλάβης εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής στο πλάσμα και της δράσης που ασκεί στα γειτονικά αιμοπετάλια, η οποία γίνεται στα 30 sec μετά από την έκκρισή του.

## Επινεφρίνη

Συγκρινόμενη με τη θρομβίνη, η επινεφρίνη είναι ένας ασθενής ενεργοποιητής των ανθρώπινων αιμοπεταλίων, αφού δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει την PLC ή να προκαλέσει αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, όμως παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση και την αύξηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Οι αποκρίσεις της επινεφρίνης στα αιμοπετάλια μεσολαβούνται μέσω  $\alpha_{2A}$  αδρενεργικών υποδοχέων [129-131]. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι οι αιμοπεταλιακοί  $\alpha_{2A}$  αδρενεργικοί υποδοχείς συζεύγνυνται με  $G_i$  πρωτεΐνες της οικογένειας των  $G$  πρωτεϊνών αλλά όχι με τις  $G_q$  ή  $G_{12}$  [132]. Τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ποντίκια, η επινεφρίνη έχει την ικανότητα να ενισχύει την επίδραση των άλλων ενεργοποιητών. Δρα σε συνεργασία με άλλους αγωνιστές σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξάνοντας τη δραστική τους ικανότητα. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα της να αναστέλλει το σχηματισμό του cAMP. Σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν έφεραν τον αδρενεργικό υποδοχέα  $\alpha_2$ , η επινεφρίνη δεν μπορούσε να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια, η αιμορραγία ήταν χρονικά μέτρια παρατεταμένη και η δημιουργία του θρόμβου ήταν εξασθενημένη [133].

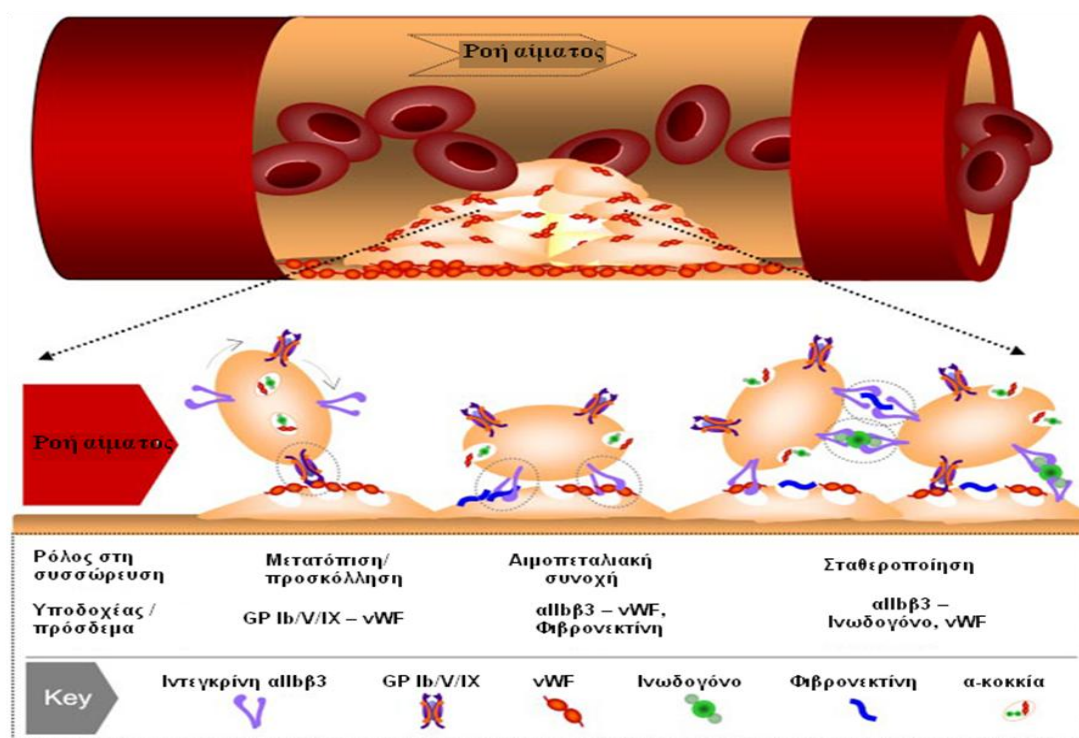
## Σεροτονίνη ή 5-υδροξύτρυπταμίνη (5-HT)

Ο υποδοχέας της σεροτονίνης ενεργοποιεί την PLC μέσω μιας  $G$ -πρωτεΐνης, οδηγώντας στην αύξηση του  $[Ca^{2+}]_i$  και τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Η αλληλουχία του ανθρωπίνου υποδοχέα έχει κλωνοποιηθεί και έχει βρεθεί ότι πρόκειται για έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα [134]. Εκτός από αγωνιστής των αιμοπεταλίων. Η 5-HT εντοπίζεται αποθηκευμένη στα πυκνά κοκκία [135] και εκκρίνεται κατά την ενεργοποίηση.

### 1.3.6. Συσσώρευση αιμοπεταλίων – Σχηματισμός θρόμβου

Η συσσώρευση ορίζεται ως η διαδικασία της συγκόλλησης δύο ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Για περισσότερο από 3 δεκαετίες, οι παράγοντες που μεσολαβούσαν στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση φαινόταν εννοιολογικά απλοί, απαιτώντας ένα ερέθισμα για τα αιμοπετάλια (αγωνιστή), μια διαλυτή πρωτεΐνη προσκόλλησης (ινωδογόνο) και ένα μεμβρανικό υποδοχέα, την ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ή υποδοχέα GPIIb/IIIa, καταλήγοντας σε ένα απλό μοντέλο συσσώρευσης. Αν και αυτά τα βασικά στοιχεία παραμένουν θεμελιώδη, πρόσφατες τεχνικές ανακαλύψεις που επιτρέπουν την ανάλυση της συσσώρευσης *in vivo*, δηλώνουν ότι η συσσώρευση είναι μια περισσότερο πολύπλοκη και δυναμική διαδικασία από αυτή που είχε προβλεφτεί στο παρελθόν. Τώρα πλέον είναι κοινώς αποδεκτό ότι ένα βασικό χαρακτηριστικό που επηρεάζει την διαδικασία της συσσώρευσης είναι η ροή του αίματος, με αποδεικτικά στοιχεία ότι πραγματοποιούνται ξεχωριστοί μηχανισμοί συσσώρευσης υπό διαφορετικές τοιχωματικές διατμητικές δυνάμεις (shear stress) [136-139].

Μια σημαντική θεώρηση για την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και για την προσκόλληση γενικότερα είναι οι ρεολογικές συνθήκες (ταχύτητα του αίματος) στη θέση της αγγειακής βλάβης. Τα αιμοπετάλια εκτίθενται σε ένα μεγάλο εύρος αιμοδυναμικών συνθηκών *in vivo*. Ξεκινά από χαμηλό shear stress στις μικρές και μεγάλες φλέβες ( $<1000 \text{ s}^{-1}$ ), που σε αυτές τις συνθήκες η συσσώρευση πραγματοποιείται μέσω του διαλυτού ινωδογόνου, το οποίο συνδέει σταυρωτά τα αιμοπετάλια με την πρόσδεση του στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [140, 141]. Σε μεγαλύτερα shear stress ( $1000-10.000 \text{ s}^{-1}$ ), που παρατηρούνται κυρίως στην αρτηριακή κυκλοφορία ή σε περιοχές με αρτηριακή στένωση, η συσσώρευση γίνεται περισσότερο εξαρτώμενη από τον vWF, με το ινωδογόνο να παίζει υποστηρικτικό ρόλο στη σταθεροποίηση των συσσωματωμάτων [142]. Ο ακινητοποιημένος στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων vWF, είναι απαραίτητος για την έναρξη της shear stress - εξαρτώμενης συσσώρευσης μέσω της ταχείας πρόσδεσης του στη γλυκοπρωτεΐνη Ib (GPIb). Όμως η προσκόλληση αυτή είναι αντιστρεπτή, οδηγώντας στην μετατόπιση των αιμοπεταλίων σύμφωνα με την κατεύθυνση της ροής του αίματος. Σύμφωνα με πρόσφατα μοντέλα, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται μέσω της πρόσδεσης του vWF και/ή του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , οδηγώντας σε σταθερά συσσωματώματα.



**Εικόνα 1.9.** Συμμετοχή πολλαπλών αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέματος στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση υπό υψηλές ρεολογικές δυνάμεις [143].

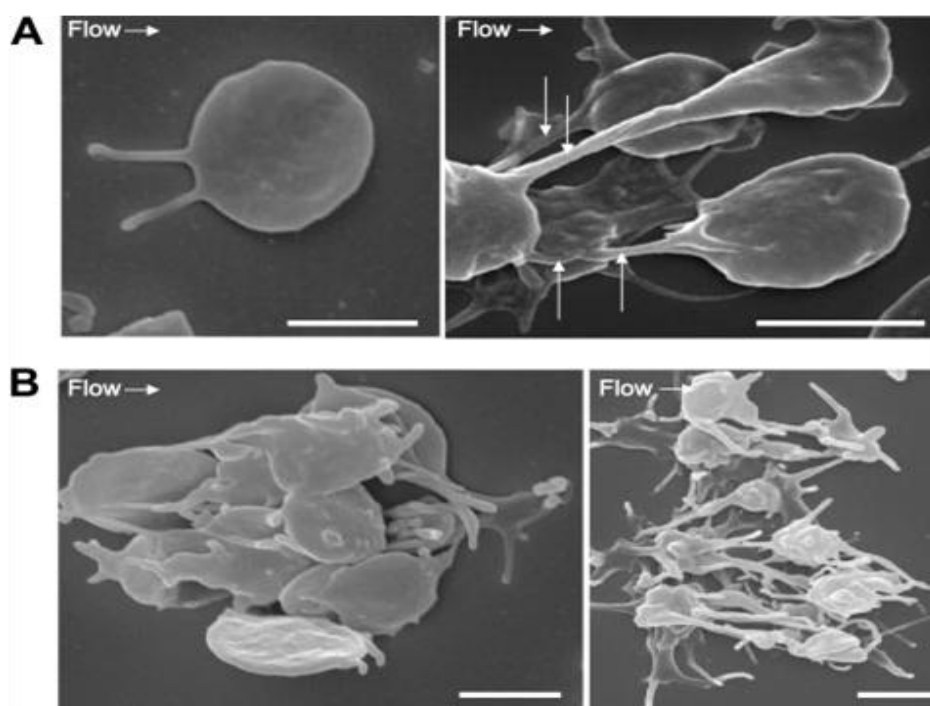
Πρόσφατες μελέτες έχουν ερμηνεύσει έναν μοναδικό μηχανισμό έναρξης της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, που συμβαίνει σε παθολογικές καταστάσεις όπως σοβαρή αγγειακή στένωση που παρατηρείται στην αθηροθρόμβωση, με πολύ υψηλά επίπεδα shear stress ( $>10.000 \text{ s}^{-1}$ ) [144]. Αυτός ο μηχανισμός συσσώρευσης πραγματοποιείται αποκλειστικά μέσω της πρόσδεσης του vWF στον GPIb υποδοχέα και δεν απαιτεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ή τη πρόσδεση του προσδέματος στην  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Ενώ η παραπάνω διαδικασία χρίζει ακόμα περεταίρω διερεύνηση, παρόλα αυτά προτείνει ότι υπό ορισμένες πειραματικές συνθήκες η vWF – GPIb αλληλεπίδραση μπορεί δυνητικά να διατηρεί τις αλληλεπιδράσεις των αιμοπεταλίων με θρομβογόνες επιφάνειες ανεξάρτητα από άλλες προσκολλητικές αλληλεπιδράσεις [145].

Πρόσφατες υψηλής ανάλυσης απεικονίσεις των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του θρόμβου προσέφεραν νέες γνώσεις για την διαδικασία της συσσώρευσης. Αποκάλυψαν ότι η ρεολογικά-εξαρτώμενη διαδικασία της συσσώρευσης αποτελείται από δύο φάσεις: i) μία αρχική αντιστρεπτή φάση, που συμβαίνει ανάμεσα σε δισκοειδή αιμοπετάλια και ii) μία ακόλουθη σταθερή φάση που σχετίζεται με αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση των κοκκίων τους. Ο σχηματισμός



συσσωματωμάτων από δισκοειδή αιμοπετάλια εξαρτάται από το shear stress και από τη διαταραγμένη ροή αίματος [145]. Η αρχική φάση της συσσώρευσης περιλαμβάνει προσκόλληση και των GPIb και  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , χωρίς την ύπαρξη ισχυρής ενεργοποίησης από το κυτοσολικό  $\text{Ca}^{2+}$  ή από διαλυτούς αγωνιστές όπως το ADP, το  $\text{TxA}_2$ , το κολλαγόνο ή τη θρομβίνη. Έτσι, τα συσσωματώματα αυτά είναι πάντα αντιστρεπτά και μετατρέπονται σε σταθερά με την ύπαρξη των παραπάνω αγωνιστών, από τους οποίους πιο ισχυρός είναι η θρομβίνη [146]. Βασικό χαρακτηριστικό της συσσώρευσης αυτής είναι η ανάπτυξη μεμβρανικών προσδέσεων, οι οποίες φαίνεται να παίζουν ρόλο στη κοντινή διατήρηση και εγγύτητα των αιμοπεταλίων (εικόνα 1.10) [143]. Οι μεμβρανικές προσδέσεις είναι λείοι κύλινδροι της λιπιδικής μεμβράνης, που δημιουργούνται στην επιφάνεια των δισκοειδών αιμοπεταλίων, υπό την επίδραση υψηλών αιμοδυναμικών δυνάμεων [145, 147].

Η πρόσδεση αυτή μπορεί να αποτελεί μηχανισμό, που να διευκολύνει την αυτοκρινή / παρακρινή διέγερση από τοπικά παραγόμενους αγωνιστές, να διατηρεί υψηλή συγκέντρωση σημάτων ενεργοποίησης μέσα στα όρια του αναπτυσσόμενου συσσωματώματος [148]. Επίσης μπορεί να διατηρεί την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με την επιφάνεια του θρόμβου χωρίς να απαιτείται ενεργοποίηση.



**Εικόνα 1.10.** Μεμβρανικές προσδέσεις που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίου-ECM και αιμοπεταλίου-αιμοπεταλίου. (Α) Ηλεκτρονική μικροσκοπία που απεικονίζει αιμοπετάλιο που

σχηματίζει μεμβρανικές προσδέσεις κατά την προσκόλληση στον ακινητοποιημένο vWF (1800 s<sup>1</sup>) (αριστερά). Η shear-stress εξαρτώμενη επαφή δισκοειδών αιμοπεταλίων περιλαμβάνει την ανάπτυξη μεμβρανικών προσδέσεων που φαίνονται με βέλη (δεξιά). (B) Αντιστρεπτή συσσώρευση δισκοειδών αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια συναθροίζονται γύρω από ένα κεντρικό ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο μέσω των μεμβρανικών προσδέσεων (αριστερά). Ανάπτυξη σταθερού αιμοπεταλιακού συσσωματώματος που σχετίζεται με την γνωστή αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και την προεκβολή ψευδοποδιών (δεξιά) [143]. Τροποποιημένη από τον Brass et al [148].

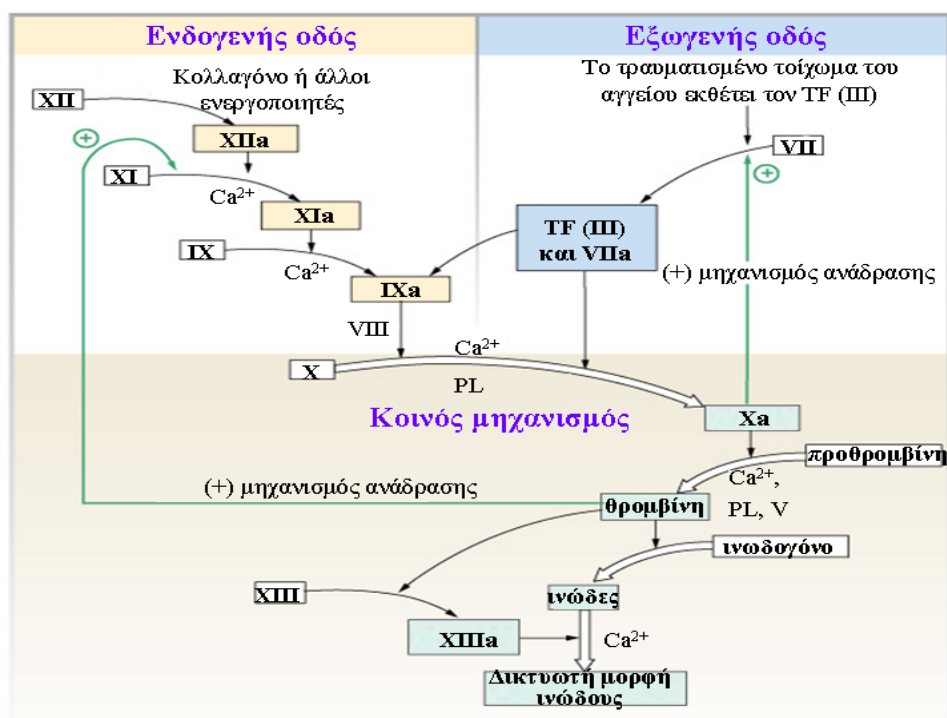
### 1.3.7. Μηχανισμός της πήξης

Κατά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στον υπενδοθηλιακό χώρο, σχηματίζεται ο πρωτογενής αιμοστατικός θρόμβος μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα αιμοπετάλια, ο οποίος όμως είναι εύθραυστος και αποκολλάται εύκολα από την τραυματισμένη περιοχή του αγγειακού τοιχώματος. Η σταθεροποίηση του πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου γίνεται κατά τη δευτερογενή αιμόσταση, που αρχίζει με την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης και το σχηματισμό της θρομβίνης και του ινώδους [149]. Σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία διαδραματίζει η έκφραση της P-σελεκτίνης στη μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, η οποία συμβάλλει στη προσκόλληση των αιμοπεταλίων με τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [150, 151].

Στη πήξη όλες οι πρωτεΐνες, εκτός από το ινωδογόνο, είναι πρωτεολυτικά ένζυμα, κυρίως σερινοπρωτεάσες στην ανενεργό τους μορφή ή συνένζυμα. Κατά την πήξη αυτές οι πρωτεάσες ενεργοποιούνται διαδοχικά ή μια μετά την άλλη. Οι ενεργοποιημένες μορφές των παραγόντων πήξης συμβολίζονται με το γράμμα a δίπλα στον λατινικό αριθμό. Η πήξη του αίματος μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια, τον σχηματισμό του μετατρεπτικού παράγοντα της προθρομβίνης, τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη και την μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες και ρυθμίζεται από αναστολείς (αντιθρομβίνη III, πρωτεΐνες CS) που εμποδίζουν τη δράση παραγόντων πήξης [152, 153].

Η πορεία της πήξης διακρίνεται στην ενδογενή και στην εξωγενή οδό (εικόνα 1.11). Στην εξωγενή οδό, έπειτα από ιστική βλάβη, ο TF (παράγοντας III) συνδέεται με την προκονβερίνη (παράγοντας VII) και με Ca<sup>2+</sup> σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που ενεργοποιεί τον παράγοντα X. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας Xa μαζί με τον

παράγοντα V και με  $\text{Ca}^{2+}$  σχηματίζουν τον μετατρεπτικό παράγοντα της προθρομβίνης [152]. Κατά την ενδογενή οδό, η οποία δεν οφείλεται σε ιστική βλάβη, ο παράγοντας XII, XI, η προκαλικρεΐνη και το μεγάλο μοριακού βάρους κινινογόνο (HMWK) δεσμεύονται σε αρνητικά φορτία του υπενδοθηλίου και επί της επιφάνειας των αιμοπεταλίων και οδηγεί στην ενεργοποίηση του παράγοντα V [154]. Η προθρομβίνη συνδέεται στα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των συσσωρευμένων αιμοπεταλίων, όπως η PS, μαζί με τον μετατρεπτικό παράγοντα της προθρομβίνης, που την μετατρέπει σε θρομβίνη. Η θρομβίνη προκαλεί την παραγωγή περισσότερου παράγοντα V και αυξάνει την παραγωγή του αντιαιμορροφιλικού παράγοντα (VIII) και ενεργοποιεί τον παράγοντα σταθεροποίησης του ινώδους (XIII). Ο παράγοντας αυτός μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες, το οποίο οδηγεί στη ενίσχυση του συσσωρεύματος.

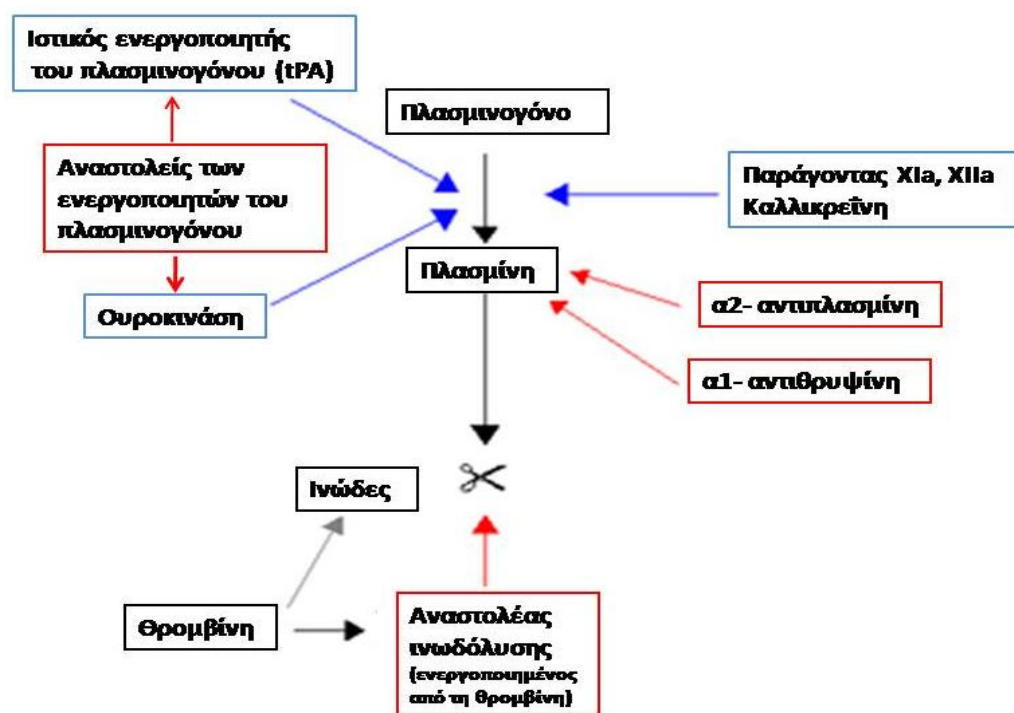


Εικόνα 1.11. Τα στάδια της πήξης του αίματος.

### 1.3.8. Ινωδόλυση

Παράλληλα με τη δημιουργία του θρόμβου, αρχίζει στον οργανισμό η διαδικασία της ινωδόλυσης, όπου το ινώδες αποικοδομείται από τη πλασμίνη σε προϊόντα μικρού μοριακού βάρους, τα οποία είναι διαλυτά μέσα στο πλάσμα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η προοδευτική λύση του θρόμβου και η αποκατάσταση της κυκλοφορίας

στο αγγείο μετά την επιδιόρθωση της βλάβης. Η πλασμίνη είναι ένα ισχυρό πρωτεολυτικό ένζυμο και σχηματίζεται από την ενεργοποίηση του προενζύμου πλασμινογόνου, από ενεργοποιητές του πλάσματος ή των ιστών, όπως ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tPA), ο παράγοντας XII, η καλλικρεΐνη και η ουροκινάση. Η πλασμίνη συνδέεται και διασπά το ινώδες σε μικρού μοριακού βάρους, θραύσματα. Μερικά από τα θραύσματα διατηρούν την ικανότητα να πολυμερίζονται και έτσι κάποια προϊόντα αποικοδόμησης, μπορούν να συναγωνιστούν τη θρομβίνη, δρώντας έτσι ως αναστολείς της δημιουργίας του θρόμβου. Μερικοί αναστολείς της πλασμίνης είναι η  $\alpha 1$ -αντιθρυψίνη, η  $\alpha 2$ -αντιπλασμίνη και η αντιθρομβίνη III. Γενικά, ο ινωδολυτικός μηχανισμός περιλαμβάνει μια σειρά πρωτεολυτικών αντιδράσεων, οι οποίες ρυθμίζονται από διάφορους ενεργοποιητές και αναστολείς. Στην εικόνα 1.12 φαίνεται συνοπτικά ο μηχανισμός της ινωδόλυσης.



**Εικόνα 1.12.** Ο μηχανισμός της ινωδόλυσης. Τα μπλε βέλη δηλώνουν ενεργοποίηση, ενώ τα κόκκινα αναστολή.

Το σύστημα ρυθμίζεται έτσι ώστε να απομακρύνονται μη επιθυμητοί θρόμβοι ινώδους, ενώ να παραμένει ινώδες στο σημείο του τραύματος, για τη διατήρηση της αιμόστασης [155]. Η ύπαρξη ινώδους έχει επιβεβαιωθεί στις αθηρωματικές αλλοιώσεις [156]. Ένας πιθανός βιολογικός μηχανισμός περιλαμβάνει την επαφή και την

ενσωμάτωση του ινωδογόνου στην αθηρωματική πλάκα, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε ινώδες και ακολούθως σε προϊόντα αποικοδόμησης του. Το ινωδογόνο καθώς και τα θραύσματα του διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [157]. Παράγοντες όπως το κάπνισμα, η υπέρταση, η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπερλιποπρωτεϊναιμία, η μεγάλη ηλικία, σχετίζονται με τη μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα [158]. Η ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας και στη συνέχεια η θρόμβωση οδηγούν στη κλινική εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου, η οποία αποτελεί η σημαντικότερη αιτία θανάτου στο δυτικό κόσμο.



## Μηχανισμός της ‘Εξω – Μέσα’ σηματοδότησης της $\alpha_{IIb}\beta_3$

### 2.1. Οι αιμοπεταλιακές ιντεγκρίνες - Γενικά χαρακτηριστικά

Οι ιντεγκρίνες ανακαλύφθηκαν από τον Hynes το 1987 και βρίσκονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα των σπονδυλωτών ενώ δεν ανιχνεύονται στα προκαρυωτικά κύτταρα, στα φυτά και τους μύκητες. Αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων που μεταφέρουν τόσο ενδοκυττάρια όσο εξωκυττάρια σήματα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, ενώνοντας, το εξωκυττάριο περιβάλλον με τον κυτταροσκελετό. Επίσης ρυθμίζουν την κυτταρική προσκόλληση, κινητικότητα και πρόοδο μέσω του κυτταρικού κύκλου [159, 160]. Υπάρχουν σαν ετεροδιμερή που αποτελούνται από μια  $\alpha$  και μια  $\beta$  υπομονάδα μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες. Στα θηλαστικά 18  $\alpha$  υπομονάδες μπορούν να ενωθούν με 8  $\beta$  υπομονάδες και να σχηματίσουν 24 διαφορετικές ιντεγκρίνες.

Η  $\alpha$  αλυσίδα είναι η μεγαλύτερη (120-180 Kd), ενώ η  $\beta$  είναι μικρότερη (90-100 Kd) και η κάθε μια διαπερνά τη κυτταρική μεμβράνη μόνο μια φορά. Η κάθε υπομονάδα έχει μια εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή που αποτελείται από ποικίλα αμινοξέα (>1600 αμινοξέα στο σύνολο των υπομονάδων), μια ενός σημείου διαμεμβρανική υδρόφοβη περιοχή που συνδέεται με μια σύντομη υψηλά διατηρημένη κυτταροπλασματική περιοχή ή ουρά (20-60 αμινοξέα στο σύνολο των υπομονάδων) [160, 161]. Ουσιαστικά οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς ‘2-πλευρών’, αφού η μία πλευρά είναι η εξωκυττάρια περιοχή, που αναδιπλώνεται και σχηματίζει θέση πρόσδεσης για ένα μεγάλο αριθμό προσδεμάτων και η άλλη πλευρά της προς το εσωτερικό του κυττάρου, αποτελεί την κυτταροπλασματική περιοχή που αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω συνδετικών πρωτεϊνών όπως η ταλίνη και η βινκουλίνη [162, 163]. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν 5  $\alpha$  και 2  $\beta$  υπομονάδες για το σχηματισμό των 5 διαφορετικών ιντεγκρινών ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ).

### 2.2. Γενικά χαρακτηριστικά της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$

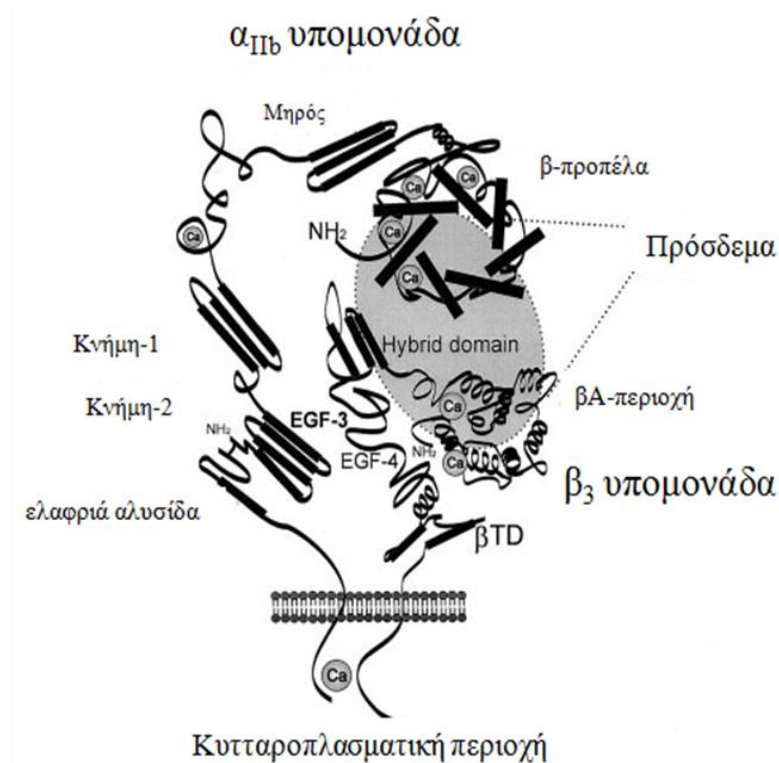
Η  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , γνωστή και ως γλυκοπρωτεΐνη GPIIb/IIIa, CD41/CD61 προέρχεται αποκλειστικά από τα μεγακαρυοκύτταρα, ενώ βρίσκονται περιστασιακά σε καρκινικά κύτταρα [164]. Πρόδρομα  $\alpha_{IIb}$  και  $\beta_3$  μονομερή βρίσκονται συναθροισμένα στο

ενδοπλασματικό δίκτυο των μεγακαρυοκυττάρων ενώ σχηματίζουν τελική ετεροδιμερή μορφή στο σύμπλεγμα Golgi [165]. Είναι η κύρια εκφραζόμενη στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη πρωτεΐνη, αφού εκφράζονται 80.000 αντίγραφα της στη μεμβράνη των μη διεγερμένων αιμοπεταλίων, αντιπροσωπεύοντας το 15% της συνολικής μεμβρανικής πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα ετεροδιμερή εκφράζονται στη μεμβράνη των α-κοκκίων, τα οποία μεταφέρονται στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης, αυξάνοντας έτσι την συνολική έκφρασή τους από 25% έως 50% [166]. Με βάση την υπολογιζόμενη αιμοπεταλιακή επιφάνεια, προκύπτει ότι τα μόρια της ιντεγκρίνης απέχουν μεταξύ τους λιγότερο από 200 Å [167].

Καθοριστικό χαρακτηριστικό της ιντεγκρίνης είναι η ικανότητα αναγνώρισης και πρόσδεσης πολλαπλών προσδεμάτων όπως το ινωδογόνο, ο vWF, η φιβρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη, το CD40L, με συνέπεια την αλλαγή της διαμόρφωσης και την ενεργοποίηση της. Είναι απολύτως αναγκαία για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, η οποία πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσής της με το ινωδογόνο και τον vWF [168].

Όπως και οι υπόλοιπες ιντεγκρίνες, η  $\alpha_{IIb}\beta_3$  είναι ένα  $\alpha/\beta$  ετεροδιμερές στο οποίο οι δύο υπομονάδες συνδέονται μη ομοιοπολικά για να δημιουργήσουν ένα σύμπλοκο 1:1. Κάθε υπομονάδα αποτελεί προϊόν ενός διαφορετικού γονιδίου του χρωμοσώματος 17, όπου τα δύο γονίδια βρίσκονται γειτονικά στην περιοχή q21-23. Αν και οι δύο υπομονάδες συντίθενται ως απλές γλυκοσυλιωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, η  $\alpha_{IIb}$  υφίσταται πρωτεολυτική σχάση σε μια βαριά και μια ελαφριά αλυσίδα, οι οποίες παραμένουν συνδεδεμένες με δισουλφιδικό δεσμό (Cys-9-Cys-826). Η  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδα (GPIIb, CD41), αποτελείται από 1008 αμινοξέα. Η βαριά αλυσίδα (116 kDa) είναι εξωκυττάρια και αποτελείται από 871 αμινοξέα, ενώ η ελαφριά (25 kDa) αποτελείται από 137 αμινοξέα και διαθέτει ένα μικρό εξωκυττάριο τμήμα με 21 αμινοξέα, ένα διαμεμβρανικό με 26 αμινοξέα και ένα μικρό κυτταροπλασματικό τμήμα με 20 αμινοξέα. Η  $\beta_3$  υπομονάδα (GPIIIa, CD61) είναι ένα πολυπεπτίδιο μονής αλυσίδας με 762 αμινοξέα, το οποίο περιλαμβάνει ένα μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα με 692 αμινοξέα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα με 23 αμινοξέα και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα με 48 αμινοξέα [169, 170].





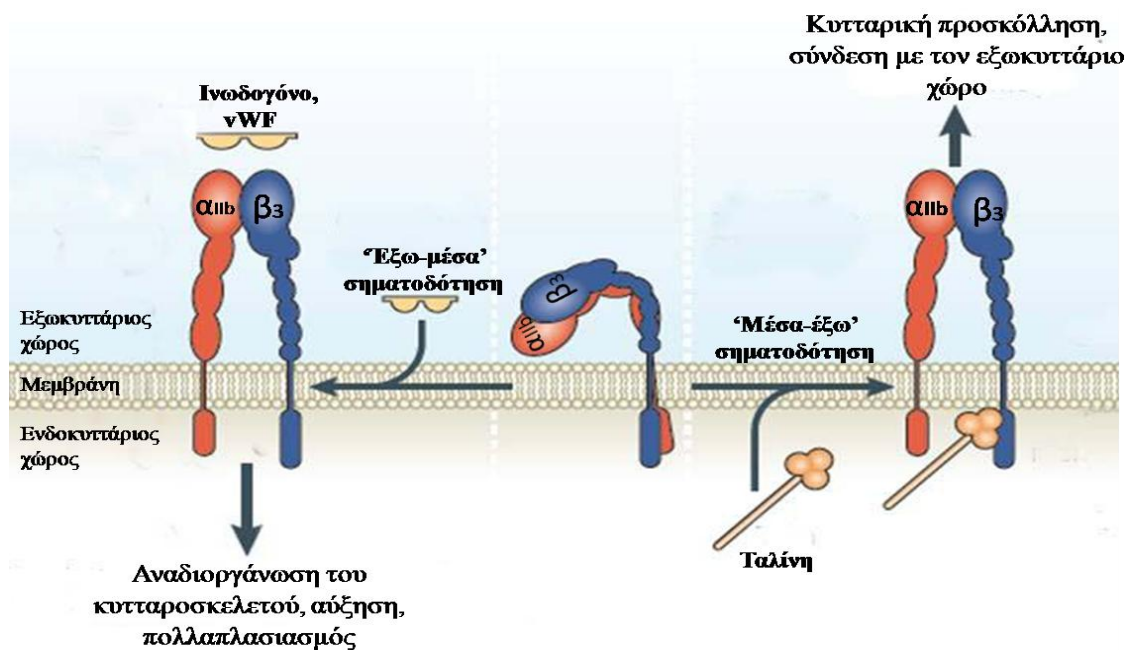
**Εικόνα 2.1.** Σχηματική απεικόνιση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [168]

### 2.3. Ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$

Η  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , ως η κύρια διαμεμβρανική ιντεγκρίνη, είναι γνωστό ότι διαδραματίζει κύριο ρόλο στη διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσώρευσης και στη πήξη του αίματος. Γι' αυτό και η δυσλειτουργία της χαρακτηρίζεται από διάφορες ασθένειες όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, περιφερική αρτηριακή νόσο και η αιμορραγική νόσος Glanzmann thrombasthenia [163, 171]. Συνεπώς, η διερεύνηση και κατανόηση της λειτουργίας της παρέχει τεράστιες δυνατότητες για τη διευκόλυνση του σχεδιασμού των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, θεραπευτικά ως προς τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης θρομβωτικών επεισοδίων. Ενεργοποιείται μέσω μιας διπλής κατεύθυνσης ενεργοποίησης, μέσω δύο μηχανισμών σηματοδότησης: της 'μέσα-έξω' και 'έξω-μέσα' σηματοδότησης, ενώ αναφέρεται ότι αυτά τα μονοπάτια είναι διακριτά έχοντας όμως κοινές επιδράσεις το ένα στο άλλο [172, 173].

Η 'μέσα-έξω' σηματοδότηση πυροδοτείται από ενδοκυττάρια σήματα και οδηγεί σε αυξημένη συγγένεια της ιντεγκρίνης ως προς το πρόσδεμα. Ένα τέτοιο σήμα είναι η

πρόσδεση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών στα ενδοκυττάρια τμήματα των υπομονάδων της ιντεγκρίνης. Κυριότερη από τις πρωτεΐνες που συνδέουν την ιντεγκρίνη με τον κυτταροσκελετό είναι η ταλίνη, η οποία ενεργοποιεί την ιντεγκρίνη μέσω της πρόσδεσης της με την  $\beta_3$  ενδοκυττάρια υπομονάδα [174]. Η ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση, επίσης, ελέγχει τις δυνάμεις προσκόλλησης και καθιστά ισχυρή την αλληλεπίδραση της ιντεγκρίνης με ECM, πράγμα που επιτρέπει στην ιντεγκρίνη να μεταδίδει τις ισχυρές δυνάμεις που απαιτούνται για την κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση των κυττάρων σε αυτή [175]. Από την άλλη πλευρά, η ‘έξω-μέσα’ σηματοδότηση, αναγνωρίζεται από την αλληλεπίδραση της κεφαλής της ιντεγκρίνης με το εξωκυττάριο πρόσδεμα ή με δισθενή κατιόντα που οδηγούν σε περαιτέρω δομικές αλλαγές, όπως το ‘ξεδίπλωμα’ της εξωκυττάριας δομής, τον διαχωρισμό των δύο υπομονάδων και την πυροδότηση ενδοκυττάριας μονοπατιών σηματοδότησης. Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω γεγονότων οδηγεί σε ενδοκυττάρια σήματα, τα οποία ελέγχουν την κυτταρική πολικότητα, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό (εικόνα 2.1) [175].

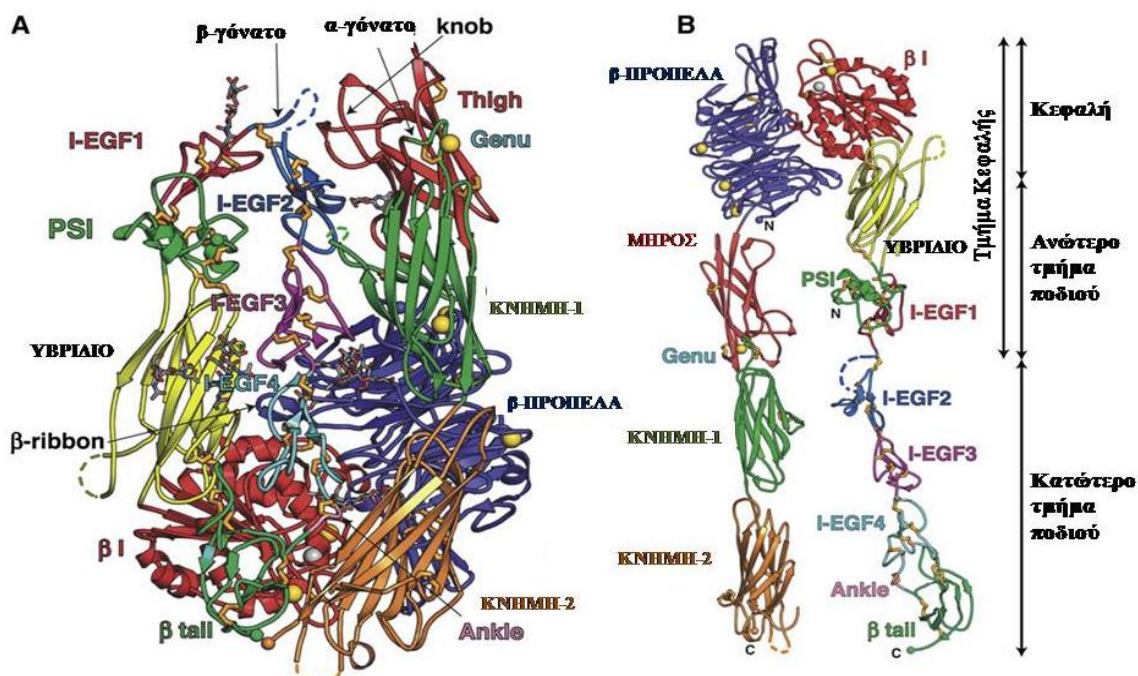


Εικόνα 2.1. Η αμφίδρομη ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [175].

## 2.4. 'Εξω-μέσα' δομική ενεργοποίηση της $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$

### 2.4.1. Εξωκυττάρια περιοχή της $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$

Το αρνητικό στίγμα εικόνων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκάλυψε μια σφαιροειδή κεφαλή περίπου 8x12 nm, που περιέχει τη θέση πρόσδεσης προσδέματος που στηρίζεται σε δύο εύκαμπτες, ραβδοειδείς προεκτάσεις περίπου 18 nm, οι οποίες διαπερνούν τη μεμβράνη μια φορά. Στο N-τελικό άκρο της  $\alpha_{\text{IIB}}$  υπομονάδας υπάρχει η περιοχή της  $\beta$ -προπέλας, η οποία αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μοτίβα 60 αμινοξέων, τα οποία διευθετούνται έτσι ώστε να σχηματίζουν 7 «λεπίδες» που εκτείνονται από έναν κεντρικό πυρήνα. Μέσα σε αυτές τις λεπίδες υπάρχουν 4 θέσεις δέσμευσης δισθενούς ιόντος, οι οποίες σχηματίζονται από οξυγόνα ασπαρτικών και ασπαραγινικών. Η υπόλοιπη  $\alpha_{\text{IIB}}$  υπομονάδα αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες περίπου 60–70 υπολειμμάτων κάθε μια στο N-τελικό τμήμα της και ακολουθείται από την περιοχή «μηρός» (thigh) και τις δύο «κνήμες» (calf) περιοχές. Ανάμεσα από την περιοχή του «μηρού» και της πρώτης «κνήμης» υπάρχει μια καμπή που επιτρέπει στην υπομονάδα να συμπιέζεται «γόνατο» (genu). [176].



**Εικόνα 2.2.** Κρυσταλλική δομή της εξωκυττάριας περιοχής της ιντεγκρίνης  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$  στην λυγισμένη ή κεκαμμένη (A) και στην εκτεταμένη, με συστρόφη των  $\alpha$ - και  $\beta$ - γονάτων,

διαμόρφωση (B). Τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  φαίνονται ως χρυσές και ασημένιες σφαίρες, ενώ οι περιοχές που απαρτίζουν τις δύο υπομονάδες αναπαρίστανται με διαφορετικά χρώματα [177].

Το αμινοτελικό τμήμα της  $\beta_3$  αποτελείται από δύο πεπλεγμένες δομικές περιοχές: την  $\beta\text{A}$  ή  $\beta\text{I}$  περιοχή που η αναδίπλωση της μοιάζει με την τύπου-I περιοχή της  $\alpha$  υπομονάδας η οποία εισέρχεται σε μια υβριδική περιοχή της οποίας η αναδίπλωση είναι παρόμοια με αυτήν της I-διαμόρφωσης των Ig περιοχών. Η υβριδική περιοχή ενώνεται με τη σειρά της με μια PSI περιοχή, η οποία περιέχει το N- άκρο της αλυσίδας [178]. Το C-τελικό άκρο της (PSI) περιοχής ενώνεται με 4 πρωτεασο-ανθεκτικές, όμοιες ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης (EGF) περιοχές, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο NMR [179]. Οι EGF-1 και EGF-2 (κατάλοιπα 453-529) δεν είναι καθαρά ορατές στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας, ενώ η EGF-3 (κατάλοιπα 532-562) και η EGF-4 (κατάλοιπα 563-605) σχηματίζουν μια καθαρά ορατή δομή, η οποία ενώνεται με μια μοναδική καρβόξυ-τελική δομική περιοχή  $\beta\text{TD}$  (κατάλοιπα 606-690) [180]. Η καμπή που επιτρέπει την  $\beta_3$  υπομονάδα να συμπιέζεται είναι ανάμεσα στην EGF-1 και EGF-2 περιοχή.

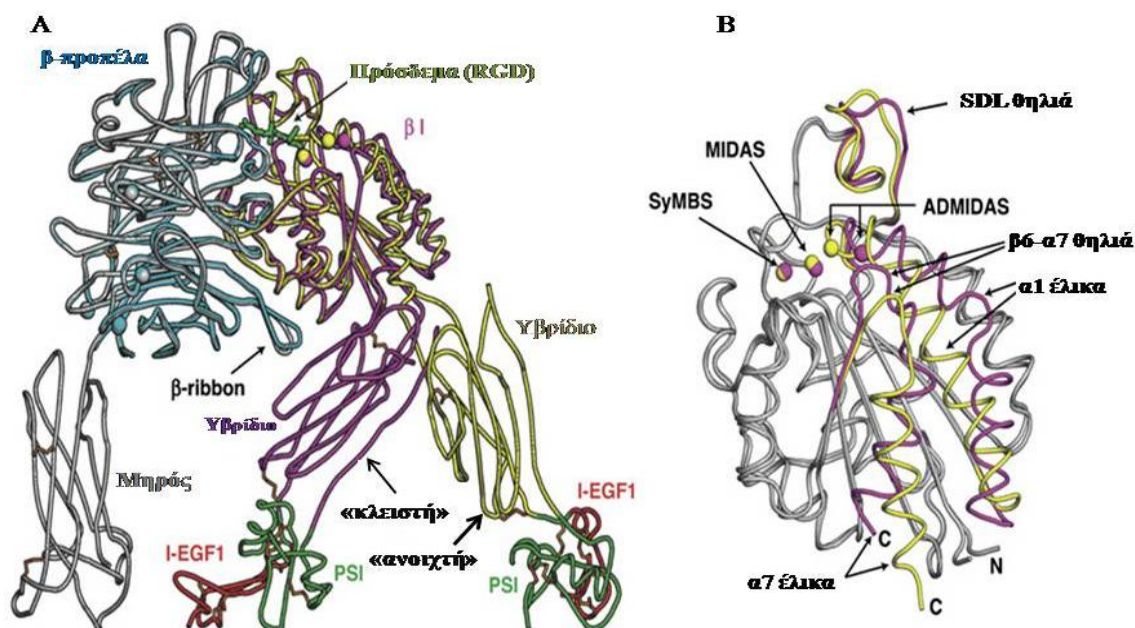
#### 2.4.2. Σύνδεση του προσδέματος στην $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$

Οι δύο υπομονάδες συγκεντρώνονται και σχηματίζουν μία σφαιρική κεφαλή που προκύπτει από την αλληλεπίδραση της 7-λεπιδόμορφης  $\beta$ -προπέλας της  $\alpha_{\text{IIB}}$  υπομονάδας (κατάλοιπα 1-438) και  $\beta\text{I}$  περιοχής της  $\beta_3$  υπομονάδας (κατάλοιπα 109-352) [181]. Η RGD αλληλουχία βρίσκεται στη σχισμή ανάμεσα στις δύο υπομονάδες, με το ένα άκρο που βρίσκεται η R να εισέρχεται στην πάνω αυλακία της  $\beta$ -προπέλας και το άλλο άκρο που βρίσκεται το D να προεξέχει ανάμεσα στις θηλιές της  $\beta\text{I}$  περιοχής. Η σχισμή αυτή αποτελεί θέση πρόσδεσης προσδεμάτων που περιέχουν την RGD αλληλουχία. Η περιοχή αυτή έχει μια θέση συναρμογής για δισθενή κατιόντα, σχηματίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες των  $\text{Asp}^{119}$ ,  $\text{Ser}^{121}$ ,  $\text{Ser}^{123}$ ,  $\text{Glu}^{220}$  και  $\text{Asp}^{251}$ , είναι αναγκαία για τη πρόσδεση του προσδέματος και ονομάζεται περιοχή προσκόλλησης εξαρτώμενη από μεταλλικά ιόντα (MIDAS). Γειτονικά της περιοχής MIDAS βρίσκεται η περιοχή ADMIDAS που σχηματίζεται από τα καρβονυλικά οξυγόνα της  $\text{Ser}^{123}$  και της  $\text{Met}^{335}$  και από τις πλευρικές αλυσίδες της  $\text{Asp}^{126}$  και της  $\text{Asp}^{127}$ . Η τρίτη περιοχή, ο καινοφανής

επαγόμενος από το πρόσδεμα τόπος δέσμευσης μετάλλου (LIMBS), δημιουργείται από τα αμινοξέα Asp<sup>158</sup>, Asn<sup>215</sup>, Asp<sup>217</sup>, Pro<sup>219</sup> και Glu<sup>220</sup> [182]. Υψηλή ηλεκτρονιακή πυκνότητα στις τρεις παραπάνω περιοχές, αποκαλύπτει ότι είναι κατειλημμένες, όταν δισθενή ιόντα Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup> είναι παρόντα (εικόνα 2.3). Ιόντα Mg<sup>2+</sup> στη κεντρική MIDAS περιοχή και Ca<sup>2+</sup> στις γειτονικές περιοχές έχουν προσδιοριστεί από τη χημεία συντονισμού, ενώ η υψηλή ηλεκτρονιακή πυκνότητα παρατηρείται στις περιοχές με τα ιόντα Ca<sup>2+</sup>. Αντίθετα στη κρυσταλλική δομή της α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>, απουσία του προσδέματος, μόνο ένα δισθενές κατιόν (Ca<sup>2+</sup> ή Mg<sup>2+</sup>) ήταν παρόν και ούτε η LIMBS ούτε η MIDAS περιοχή ήταν κατειλημμένες [176, 183].

Αφού αποδείχθηκε ότι η LIMBS περιοχή δεν σχετίζεται με τη πρόσδεση του προσδέματος, ή δεν είναι επαγόμενη από κάποιο δισθενές κατιόν, προτάθηκε νέα ονοματολογία. Έτσι η LIMBS περιοχή, ονομάστηκε από την ομάδα του Springer [177], ως συνεργιστική περιοχή πρόσδεσης μεταλλικού ιόντος SyMBS (synergistic metal binding site). Χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup> συνεργούν στη πρόσδεση του προσδέματος στην ιντεγκρίνη [184] και μελέτες με μεταλλάξεις έδειξαν ότι η SyMBS έχει θετικό ρυθμιστικό ρόλο στη πρόσδεση, καθώς είναι η υπεύθυνη περιοχή για τη συνεργία των ιόντων Ca<sup>2+</sup> [185, 186]. Είναι ιδιαίτερα ελκυστικό το εύρημα ότι τα σημαντικά ιόντα Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup> είναι προεγκατεστημένα πριν τη πρόσδεση του προσδέματος. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ca<sup>2+</sup>, η SyMBS συντονίζεται με χαμηλές συγκεντρώσεις Mg<sup>2+</sup> της MIDAS περιοχής για τη διευκόλυνση της πρόσδεσης του προσδέματος. Η πλευρική αλυσίδα του Asp στην Arg-Gly-Asp (RGD) αλληλουχία του προσδέματος συντονίζει άμεσα τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> της MIDAS περιοχής. Απουσία τέτοιων ιόντων, η προσέγγιση του Asp απωθείται ηλεκτροστατικά από το Glu<sup>220</sup>, Asp<sup>119</sup> και Asp<sup>251</sup> γύρω από τη MIDAS περιοχή. Επιπλέον, μετά τη πρόσδεση του προσδέματος, η SyMBS περιοχή αλλάζει στερεοχημική δομή και είναι δύσκολο να καταληφθεί από το δισθενές κατιόν [177].

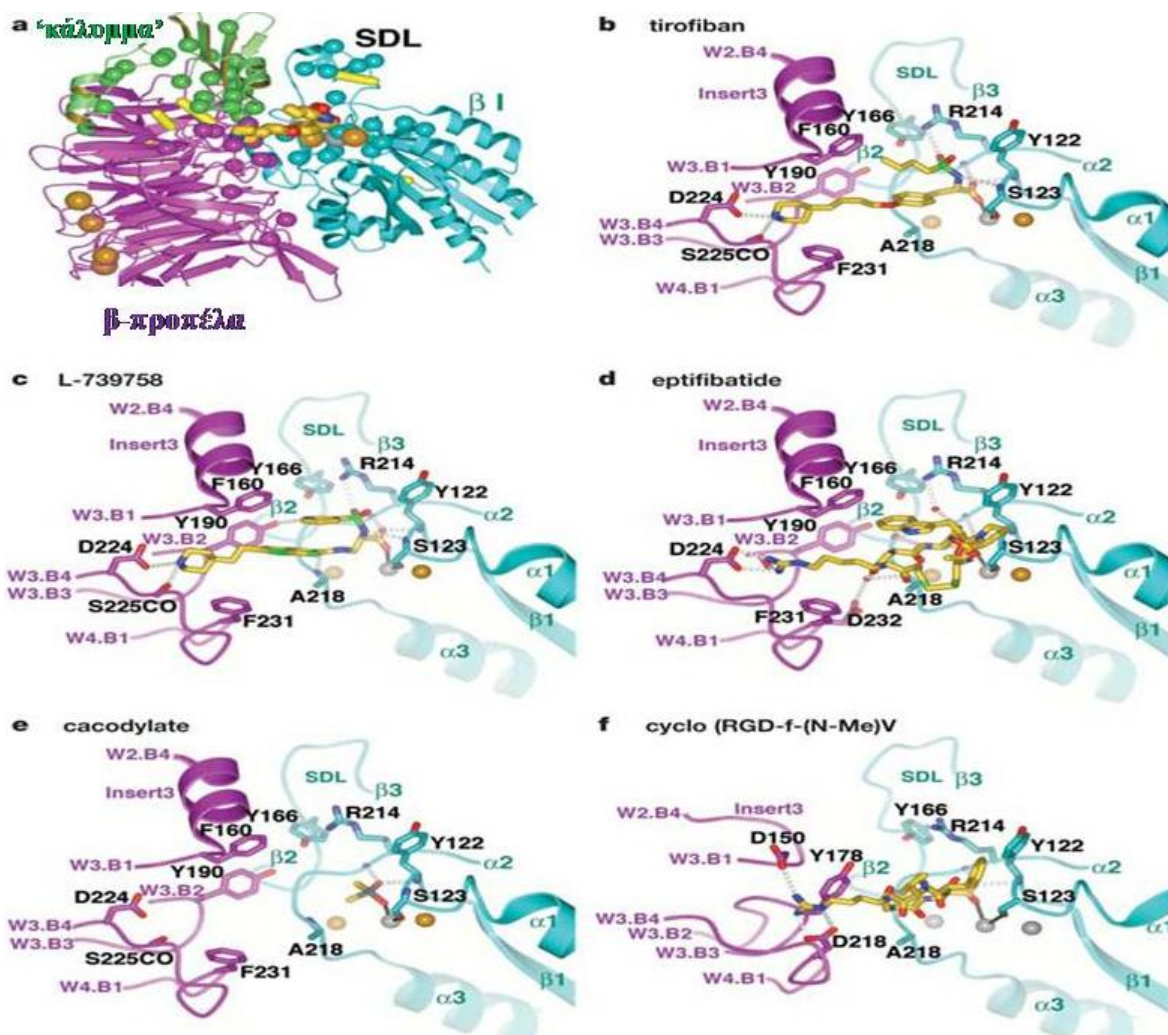




**Εικόνα 2.3.** (A) Υπέρθωση των δύο διαμορφώσεων της κεφαλής της ιντεγκρίνης, με κίτρινο στην «ανοιχτή» και «μωβ» κλειστή διαμόρφωση. (B) Η βI περιοχή σε μεγέθυνση. Τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  φαίνονται με κίτρινο και τα  $\text{Mg}^{2+}$  με μωβ. [177].

Σε μακρομοριακή κλίμακα, το πρόσδεμα συνδέεται στη περιοχή 'κάλυμμα' (cap) που αποτελείται από μία 'εξειδικευμένη-προσδιοριστική' θηλιά (SDL, specificity-determining) στην βI περιοχή της β<sub>3</sub> και από τέσσερις θηλιές της β-προπέλας της α<sub>IIb</sub>. Το 'κάλυμμα' είναι μία ιδιαίτερης σημασίας περιοχή, καθώς δεσμεύει το ινωδογόνο [181], αλλά και φαρμακευτικούς προσδέτες που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και θεραπεία της θρόμβωσης της στεφανιαίας αρτηρίας. Δύο τέτοια φάρμακα είναι τα tirofiban και eptifibatide [167], όπως επίσης και η ένωση L-739758 της Merck (εικόνα 2.4 a-d), η οποία ανταγωνίζεται τη σύνδεση του ινωδογόνου στη α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>. Αυτές οι ενώσεις αναπτύχθηκαν ως μιμητές της RGD αλληλουχίας, που βρίσκεται σε μια ευρεία ποικιλία προσδεμάτων των γλυκοπρωτεϊνικών ιντεγκρινών αλλά και στη α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>-δεσμευτική αλληλουχία του ινωδογόνου, KQAGDV. Κάθε φάρμακο έχει ένα βασικό τμήμα που μιμείται την R στην RGD αλληλουχία ή την K στην αλληλουχία ινωδογόνου, και μια καρβοξυλική ομάδα που μιμείται το D. Η επιλεκτικότητα για την α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> και την ανβ<sub>3</sub> παρέχεται από μια μεγαλύτερη και πιο σύντομη απόσταση αντίστοιχα, μεταξύ των βασικών και όξινων τμημάτων του πεπτιδομιμητικού (εικόνα 2.4 d,f), το οποίο μπορεί να ρυθμιστεί από τους περιορισμούς στο κυκλικό δακτύλιο που περιέχει τα υπολείμματα

βάσης και ασπαρτικού οξέος, και το μήκος του βασικού υπολείμματος της πλευρικής αλυσίδας [187, 188].



**Εικόνα 2.4.** Οι θέσεις πρόσδεσης για τους προσδεματο-μιμητικούς ανταγωνιστές και του ινωδογόνου στην κεφαλή της ιντεγκρίνης. α) Χαρτογράφηση των μεταλλάξεων της θέσης πρόσδεσης του ινωδογόνου στη  $\alpha_{11b}\beta_3$ . Τα C $\beta$  άτομα των καταλοίπων του ινωδογόνου, που δεσμεύονται, φαίνονται ως σφαίρες στο ίδιο χρώμα με αυτό των περιοχών στις οποίες είναι παρόντα. Σύνδεση των προσδεμάτων ή ψευδοπροσδεμάτων στη  $\alpha_{11b}\beta_3$  (b-e) και η δέσμευση του (f) κύκλο RGDfV στη  $\alpha_v\beta_3$ . Ο προσανατολισμός είναι ο ίδιος με αυτόν στην α. Οι α και β υπομονάδες παριστάνονται με μωβ και μπλε αντίστοιχα. Τα μικρά μόρια παριστάνονται ως σφαίρες και ράβδοι, με τον άνθρακα, το άζωτο, το οξυγόνο, τα άτομα θείου και αρσενικού χρωματισμένα με κίτρινο, μπλε, κόκκινο, πράσινο και γκρι αντίστοιχα. Οι δεσμοί υδρογόνου παριστάνονται ως διακεκομμένες γραμμές. Τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  παρουσιάζονται ως χρυσές και ασημένιες σφαίρες αντίστοιχα [181].

Οι δομές μας δείχνουν ότι αυτό συμβαίνει επειδή η βασική προσδέματος-μιμητική πλευρική αλυσίδα πρέπει να προεκταθεί περαιτέρω στη βαθύτερη β-προπέλας κοιλότητα της  $\alpha_{\text{IIB}}$  στον δεσμό υδρογόνου μεταξύ  $\alpha_{\text{IIB}}$ -Asp<sup>224</sup> (εικόνα 2.4 b-d), ενώ στην β-προπέλα της  $\alpha_{\text{V}}$  των υδρογόνο-δεσμευτικών υπολειμμάτων Asp<sup>150</sup> και Asp<sup>218</sup> είναι εγγύτερα στην πιο ρηχή κοιλότητά του (εικόνα 2.4 f). Επιπλέον, η Asp<sup>218</sup> της  $\alpha_{\text{V}}$  αντικαθίσταται από Phe<sup>231</sup> της  $\alpha_{\text{IIB}}$ , ευνοώντας τις επαφές με τα πιο μακριά αλειφατικά τμήματα (εικόνα 2.4 b-d,f) [181].

### 2.4.3. Διαμορφωτικές διεργασίες στην εξωκυττάρια περιοχή κατά την ενεργοποίηση

Η πρόσδεση των εξωκυττάρια προσδεμάτων στη κεφαλή της ιντεγκρίνης όπως το ινωδογόνο ή ο vWF, τα οποία γεφυρώνουν τα αιμοπετάλια και η βιτρονεκτίνη ή η φιβρονεκτίνη, οι οποίες έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη αιμοπεταλιακή συσσώρευση, επάγει δομικές αλλαγές, οι οποίες επιτρέπουν την μεταφορά ξεχωριστών και σαφών σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου [171]. Οι δομικές αλλαγές αφορούν την εξωκυττάρια περιοχή της ιντεγκρίνης και μετατρέπουν την ιντεγκρίνη από την κεκαμμένη, ανενεργή, με χαμηλή συγγένεια για το πρόσδεμα διαμόρφωση στην πλήρως ανοιγμένη, ενεργή, με υψηλή συγγένεια για το πρόσδεμα, διαμόρφωση. Η ενεργή της μορφή μπορεί επίσης να επάγεται από δισθενή κατιόντα όπως τα  $\text{Mn}^{2+}$  ή από μικρότερα προσδέματα που περιέχουν την RGD αλληλουχία [160]. Το γεγονός αυτό επιδεικνύει μια ραγδαία κινητική πολλαπλών σταδίων εντός περίπου 10 sec έπειτα από τη πρόσδεση του προσδέματος [189]. Πάνε σχεδόν 20 χρόνια από τότε που ανακαλύφθηκε ότι η πρόσδεση του προσδέματος σχετίζεται με διαμορφωτικές αλλαγές [190] και πάνω από μια δεκαετία που οι ιντεγκρίνες αναγνωρίστηκαν ως αλλοστερικές πρωτεΐνες [191]. Έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση αυτών των αλλαγών την τελευταία δεκαετία και πολλή συζήτηση σχετικά με την ακριβή φύση και το σχήμα των διαμορφωτικών αυτών αλλαγών. Δύο μοντέλα ενεργοποίησης προτάθηκαν σχεδόν ταυτόχρονα, το μοντέλο 'deadbolt' και το 'switchblade', όμως το ένα από τα δύο είναι το περισσότερο και ευρέως αποδεκτό.

Συμπαγή δομικά χαρακτηριστικά της ιντεγκρίνης  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$  στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων (σε ηρεμία και έπειτα από ενεργοποίηση) έχουν προκύψει από χάρτες επιτόπου, βασισμένα σε διασταυρωμένο ανταγωνισμό ανάμεσα σε αντισώματα κατά της

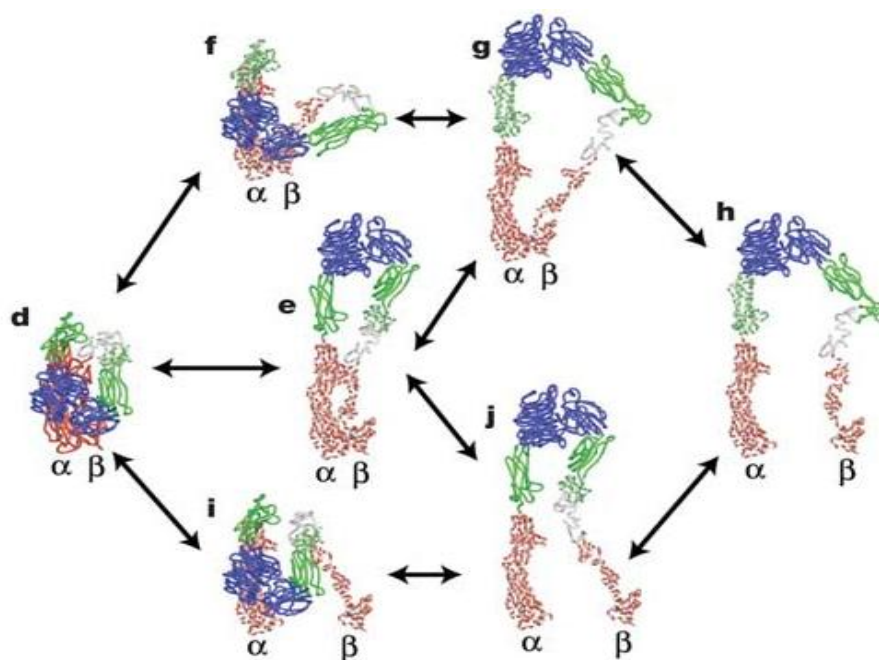


calf-2 περιοχής της  $\alpha_{IIB}$  και της  $\beta I$  περιοχής της  $\beta_3$  υπομονάδας. Σε κατάσταση ηρεμίας, τα δομικά χαρακτηριστικά της  $\alpha_{IIB}\beta_3$  συμφωνούν με την κλειστή, σε σχήμα 'V' της  $\alpha\beta_3$  ιντεγκρίνης [176]. Έπειτα από κρυσταλλογραφία δομής, στην ενεργοποιημένη μορφή της  $\alpha_{IIB}\beta_3$  παρατηρήθηκε η εικόνα των λυγισμένων 'γονάτων' των δύο υπομονάδων [179]. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι, οι διαμορφώσεις που ελήφθησαν από πειράματα αρνητικής χρώσης, μοιάζουν κυρίως μόνο με τη τρισδιάστατη  $20\text{ \AA}$  δομή της μη ενεργοποιημένης  $\alpha_{IIB}\beta_3$ , οι οποίες προέκυψαν από πειράματα ηλεκτρονικής κρυσταλλοσκοπίας [169]. Η κεφαλή της δομής, σύμφωνα με την παραπάνω τεχνική, φαίνεται να είναι προσοιτή στη πρόσδεση των προσδεμάτων και δε παρεμποδίζεται στερικτά από την μεμβράνη [192]. Επιπρόσθετη πληροφορία πάνω στις δομικές αλλαγές στην υψηλής συγγένειας για το πρόσδεμα ιντεγκρίνη, που προκύπτει από βιοφυσικές τεχνικές όπως η FRET ανάλυση (φθοριστικός συντονισμός ενεργειακής μεταφοράς), υποστηρίζει ότι μονοκλωνικά αντισώματα κατά της κεφαλής και των 'ποδιών' της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIB}\beta_3$  συνεχίζουν να συναγωνίζονται ακόμα και μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, με κορεσμένη συγκέντρωση αγωνιστών, που αποδεδειγμένα μετατρέπουν την ιντεγκρίνη στην ενεργό της μορφή [193]. Επίσης, οι τιμές της FRET ανάλυσης που ελήφθησαν μετά την ενεργοποίηση ήταν διαφορετικές μόνο κατά 20% από τις τιμές χωρίς ενεργοποίηση, δηλώνοντας ότι η απόσταση μεταξύ των επισημασμένων  $Fab$  τμημάτων των  $\alpha_{IIB}$  και  $\beta_3$  υπομονάδων αλλάζουν ελάχιστα μετά την ενεργοποίηση [194].

Τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στη θεωρία του 'deadbolt' μοντέλου ενεργοποίησης από ορισμένους ερευνητές. Σύμφωνα με το 'deadbolt' μοντέλο, μια θηλειά φουρκέτα στη  $\beta_3$  υπομονάδα, θα μπορούσε να λειτουργήσει ως «μανταλάκι» και να εμποδίζει το εκτόπισμα της  $\beta 6$ - $\alpha 7$  θηλείας της  $\beta I$  περιοχής και να διατηρείται έτσι η ιντεγκρίνη στην ανενεργή της διαμόρφωση (εικόνα 2.3 Α, «κλειστή»). Το παραπάνω μοντέλο όμως πολύ σύντομα αναθεωρήθηκε, αφού διαπιστώθηκε ότι απαιτείται επέκταση της εξωκυττάριας διαμόρφωσης για τη πρόσδεση του προσδέματος κατά την 'μέσα-έξω' ενεργοποίηση και ότι το μοντέλο 'deadbolt' δεν ρυθμίζει την ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIB}\beta_3$  [195].

Πρωτοπόρα ήταν η μελέτη της ομάδα του Xiao που ανακάλυψε ότι η διαμόρφωση της θέσης πρόσδεσης του προσδέματος στη κορυφή της  $\beta I$  περιοχής, οφείλεται σε μια μετατόπιση της  $\beta_3$  υβριδικής περιοχής προς τα έξω [181]. Το εκτόπισμα αυτό με τη μορφή εμβόλου προέρχεται από τη  $\alpha 7$ -έλικα της  $\beta I$  περιοχής και προκαλεί μια γωνία  $62^\circ$  ανάμεσα στην  $\beta I$  και την υβριδική περιοχή (εικόνα 2.3 Α «ανοιχτή») καθώς και μια

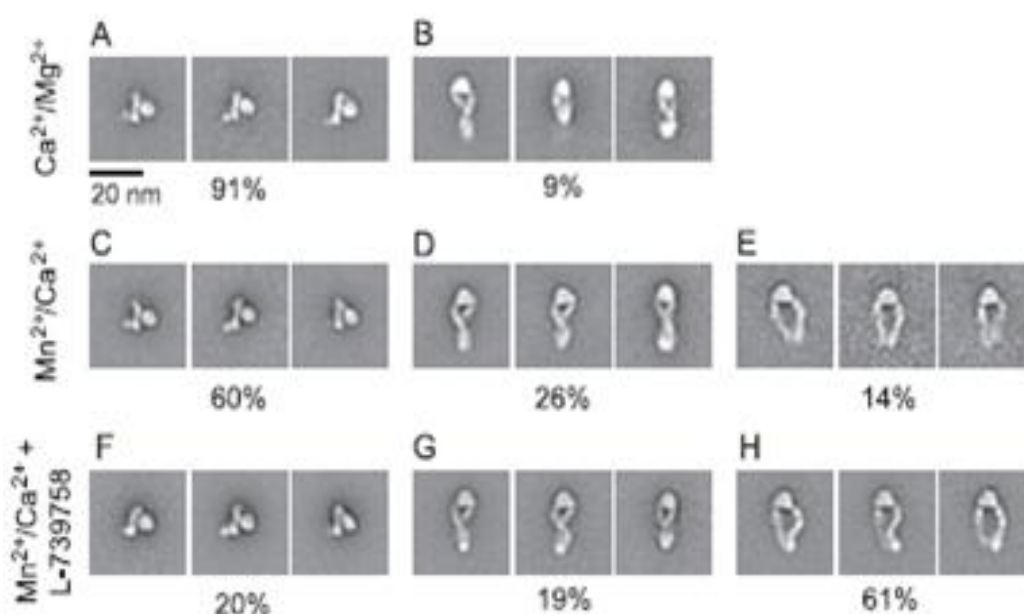
αύξηση κατά  $70 \text{ \AA}$  της απόστασης ανάμεσα στα γόνατα της  $\alpha_{IIb}$  και  $\beta_3$  υπομονάδας (εικόνα 2.5 d  $\rightarrow$  e  $\rightarrow$  g). Το εκτόπισμα προς τα έξω του ανώτερου τμήματος του  $\beta_3$  ποδιού θα μπορούσε εύκολα να συμβεί αν είχε προηγηθεί η επέκταση και των δύο ποδιών. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία δείχνει ότι κάτω από την PSI περιοχή, το  $\beta$  πόδι είναι εύκαμπτο κατά την «εκτεταμένη» μορφή, ενώ το  $\alpha$  πόδι όταν εκτείνεται υιοθετεί ένα ενιαίο προσανατολισμό [196]. Επίσης, ο τελικός διαχωρισμός των διαμεμβρανικών υπομονάδων (εικόνα 2.5 h) μπορεί να συμβεί είτε σαν ένα ύστερο γεγονός της διαδικασίας της ‘έξω-μέσα’ ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης ή να αποτελεί κλειδί της ‘μέσα-έξω’ ενεργοποίησης [196, 197].



**Εικόνα 2.5.** Τεταρτοταγείς δομές της εξωκυττάριας περιοχής της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  κατά την ενεργοποίηση. Προτεινόμενες ενδιάμεσες δομές σε ισορροπία μεταξύ των γνωστών διαμορφώσεων. Τα ανώτερα μονοπάτια μπορεί να οφείλονται από τη πρόσδεση του προσδέματος εξωτερικά του κυττάρου, ενώ τα κατώτερα μονοπάτια από ενδοκυττάρια σήματα, που διαχωρίζουν τις  $\alpha$  και  $\beta$  διαμεμβρανικές περιοχές [181].

Μεταλλάξεις που επάγουν το εκτόπισμα της υβριδικής περιοχής [198], αλλοστερική ενεργοποίηση ή ανασταλτικά μονοκλωνικά αντισώματα που προσδένονται στην υβριδική περιοχή [199], διασταυρωτές συνδέσεις με δισουλφιδικούς δεσμούς στη  $\beta 6$ - $\alpha 7$  θηλειά [200] και κόψιμο της  $\alpha 7$  έλικας της  $\beta I$  περιοχής [201], υποστηρίζουν το συμπέρασμα ότι η «κλειστή» και «πλήρως ανοιγμένη» διαμόρφωση της ιντεγκρίνης έχουν χαμηλή και υψηλή συγγένεια για το πρόσδεμα αντίστοιχα. Με τις παραπάνω

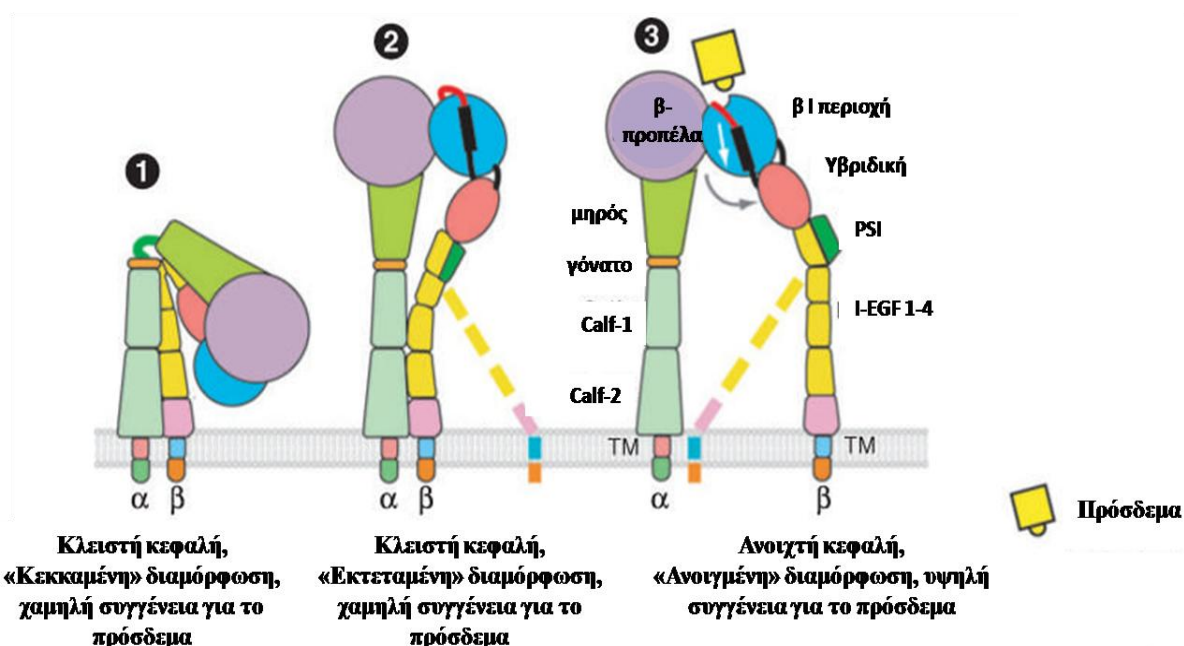
μεθόδους έρχονται να συμφωνήσουν η κρυσταλλογραφία δομής με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (EM) [196, 202, 203], το NMR [179] και μελέτες σκεδασμού μικρής γωνίας ακτινών-X(SAXS) [204, 205]. Με αυτές τις μεθόδους μελετήθηκε η μέση μοριακή διαφορά στην επέκταση ανάμεσα στην ενεργοποιημένη, με υψηλή συγγένεια για το πρόσδεμα, και στη μη ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη, με χαμηλή συγγένεια για το πρόσδεμα. Κατά την ενεργοποίηση παρατηρήθηκε επέκταση του μορίου της ιντεγκρίνης, ενώ έπειτα από ενεργοποίηση και επώαση με RGD-μιμητικό πρόσδεμα (L-739758, Merck), παρατηρήθηκε, σε μεγαλύτερο ποσοστό, άνοιγμα της κεφαλής και ώθηση προς τα έξω της  $\beta_3$  υβριδικής περιοχής (εικόνα 2.6) [205].



**Εικόνα 2.6.** Αντιπροσωπευτικές 2D εικόνες της ανέπαφης ιντεγκρίνης. DDM-διαλυτοποιημένη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  με προσθήκη  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  (A-B),  $Mn^{2+}$  και  $Ca^{2+}$  (C-E) και  $Mn^{2+}$  και  $Ca^{2+}$  και L-739758 (Merck) (F-H). Τα ποσοστά των μορίων της ιντεγκρίνης που απεικονίζονται με «κεκκαμένη» διαμόρφωση (A,C,F), με εκτεταμένη με κλειστή κεφαλή (B,D,G) και με εκτεταμένη με ανοιχτή κεφαλή (E,H) φαίνονται κάτω από τις αντίστοιχες εικόνες [205].

Δύο αποτελέσματα που προκύπτουν από τη προέκταση του εξωτερικού τμήματος της ιντεγκρίνης είναι ότι, κατά την εκτεταμένη μορφή, η θέση πρόσδεσης απέχει 150-200 Å από την μεμβράνη και προσανατολίζεται αντίθετα από αυτή και ότι μόνο σε αυτή τη μορφή η κεφαλή της ιντεγκρίνης μετατρέπεται σε υψηλής συγγένειας για το πρόσδεμα κατάσταση [206]. Μια πρόσφατη μελέτη έρχεται να συμφωνήσει με το άνοιγμα της κεφαλής μελετώντας τα στάδια ανοίγματος της, έπειτα από επώαση με

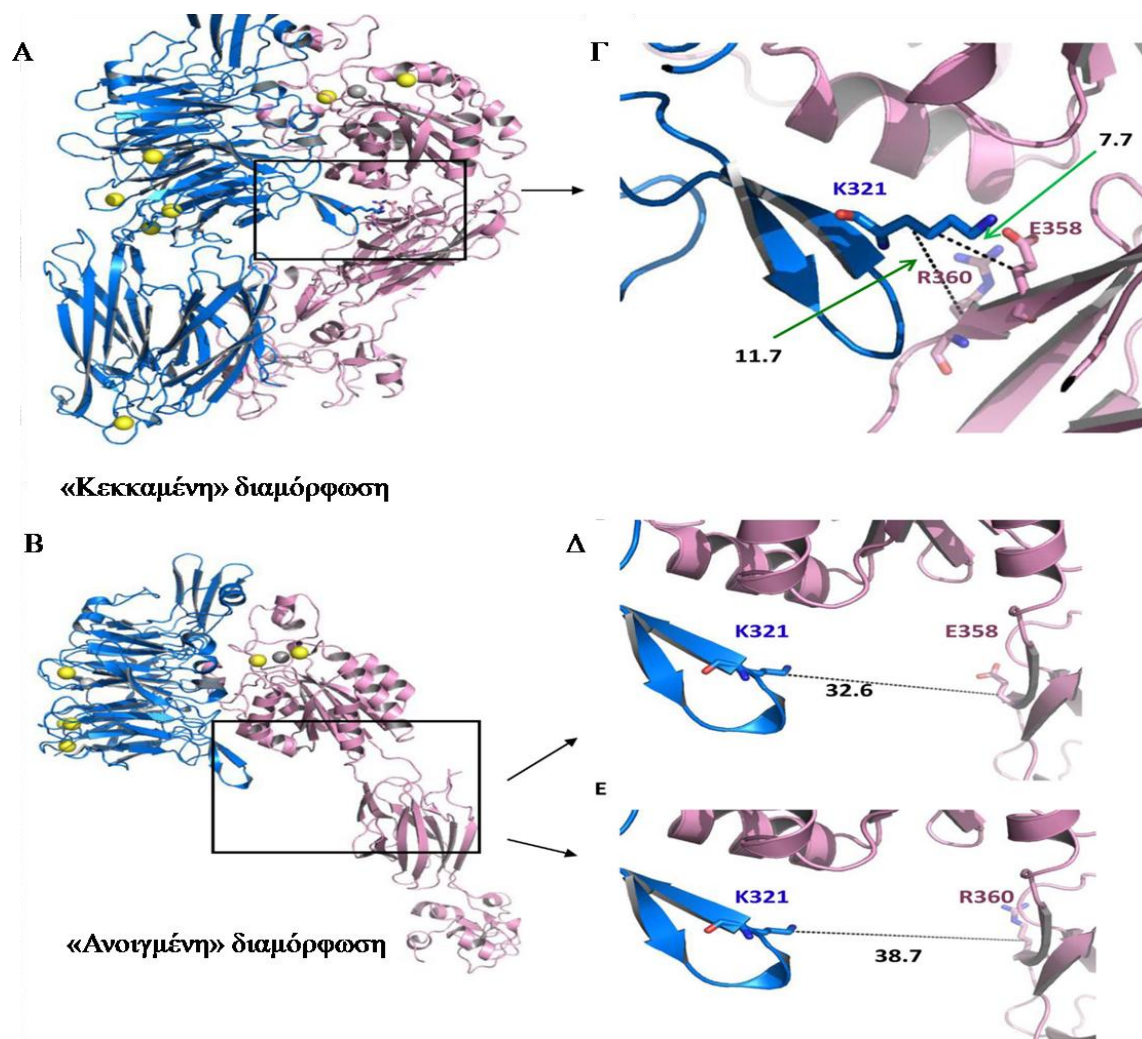
RGD-πρόσδεμα και ιόντα  $Mn^{2+}/Ca^{2+}$  [207]. Ανακάλυψε ότι η εξωκυττάρια περιοχή λαμβάνει οχτώ διαφορετικές RGD-προσδεσμένες διαμορφώσεις μέχρι το πλήρες άνοιγμα της κεφαλής, με κίνηση της  $\beta I$  περιοχής και με το εκτόπισμα προς τα έξω της υβριδικής περιοχής της  $\beta_3$  υπομονάδας [207]. Βασισμένοι στην υπεροχή του 'switchblade' μοντέλου και τα παραπάνω ευρήματα, προτάθηκε το μοντέλο, το οποίο αναπαρίσταται στην εικόνα 2.7.



**Εικόνα 2.7.** Αναδιαμορφώσεις της εξωκυττάριας δομής της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης [207]. Φαίνονται οι δυο διαμορφώσεις που λαμβάνει το χαμηλό τμήμα του  $\beta$  ποδιού και αυτές υφίστανται όταν τα  $\alpha$  και  $\beta$  διαμεμβρανικά τμήματα είναι ενωμένα ή διαχωρίζονται. Η μετάδοση του σήματος, ωστόσο, τόσο από τα μέσα προς τα έξω όσο και από τα έξω προς τα μέσα απαιτεί τον διαχωρισμό των διαμεμβρανικών και κυτταροπλασματικών περιοχών [197] [208].

Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας με αντισώματα ενεργοποίησης έδειξαν ότι η επέκταση της εξωκυττάριας δομής είναι επαρκής για να επάγει την προσκόλληση της και να επιτρέψει ένα σημαντικό μέρος των μορίων της ιντεγκρίνης να ισορροπούν στην υψηλής συγγένειας για το πρόσδεμα διαμόρφωση. Το σημείο αναφοράς για την ισορροπία μεταξύ της κλειστής και εκτεταμένης διαμόρφωσης και μεταξύ της εκτεταμένης με κλειστή και ανοιχτή κεφαλή εξαρτάται από τον τύπο της ιντεγκρίνης και μπορεί να εξηγήσει έτσι τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των ιντεγκρινών και στην ευαισθησία τους ως προς την ενεργοποίηση [209].

Πρόσφατη μελέτη επίσης έδειξε την αναγκαιότητα την κίνησης (swing-out) προς τα έξω της  $\beta_3$  υβριδικής περιοχής στην «ανοιγμένη» κατάσταση της ιντεγκρίνης για τη πρόσδεση του ινωδογόνου και την επίτευξη της ‘έξω-μέσα’ ενεργοποίησης της [210]. Δημιούργησαν μεταλλαγμένα μόρια ιντεγκρίνης εισάγοντας κυστεΐνες στη θέση των κρίσιμων, για την παραπάνω κίνηση, αμινοξέων της  $\beta$ -προπέλας και της υβριδικής περιοχής, έτσι ώστε να μην μπορούν να διασπαστούν οι δεσμοί που κρατάνε κοντά τις περιοχές αυτές δύο υπομονάδων, κατά την «κεκαμμένη» διαμόρφωση (εικόνα 2.8). Βρήκαν ότι, τα μόρια της μεταλλαγμένης ιντεγκρίνης δεν μπορούν να προσδεθούν με το ινωδογόνο έπειτα από ενεργοποίηση ή έπειτα από μετάλλαξη στην  $\alpha_{IIb}$  ενδοκυττάρια υπομονάδα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα να επάγει την ‘μέσα-έξω’ ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [197, 211]. Βρήκαν όμως ότι μπορούν να προσδεθούν με μικρότερα προσδέματα-ανταγωνιστές που περιέχουν την RGD αλληλουχία όπως η δισιντεγκρίνη, από το δηλητήριο φιδιού, κιστρίνη [212]. Τέλος, ανακάλυψαν ότι παρόλο που δεν μπορούν να προσδεθούν με το διαλυτό ινωδογόνο, μπορούν να προσδεθούν στο ακινητοποιημένο ινωδογόνο έχοντας όμως ως συνέπεια την επαγωγή ελαττωματικής ‘έξω-μέσα’ σηματοδότησης, η οποία δεν οδηγεί στην αναμενόμενη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού με την αλλαγή του σχήματος του αιμοπεταλίου και την παραγωγή ψευδοποδίων.



**Εικόνα 2.8.** Δομή της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  στην κεκαμμένη, με χαμηλή συγγένεια για το πρόσδεμα (A) και στην ανοιγμένη με υψηλή συγγένεια για το πρόσδεμα (B) διαμόρφωση [177]. Η  $\alpha_{IIb}$   $\beta$ -προπέλα φαίνεται με μπλε ενώ η  $\beta_3$  υβριδική περιοχή με ανοιχτό μωβ χρώμα. Γ) Στην κεκαμμένη διαμόρφωση η απόσταση μεταξύ του ατόμου του C $\beta$  του  $\alpha_{IIb}$ K321 και του  $\beta_3$ E358 και μεταξύ του  $\alpha_{IIb}$ K321 και  $\beta_3$ R360 είναι 7.7 και 11.7 Å αντίστοιχα. Δ, E) Στην ανοιγμένη διαμόρφωση οι παραπάνω αποστάσεις αλλάζουν σε 32.6 και 38.7 Å αντίστοιχα [210].

## 2.5. ‘Έξω - μέσα’ βιοσηματοδότηση ή σηματοδοτική ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$

Αμέσως μετά τη πρόσδεση του προσδέματος, πυροδοτείται ένας αριθμός από μοριακά και κυτταρικά γεγονότα τα οποία περιλαμβάνουν την ανασύνταξη της ακτίνης, την αλλαγή του σχήματος και την εξάπλωση του αιμοπεταλίου, τη μετανάστευση και επιβίωση, διαδικασίες που όλες μαζί συνθέτουν την ‘έξω-μέσα’ σηματοδότηση. Η πρόσδεση που ξεκινά αντιστρεπτά, σταδιακά γίνεται μη αντιστρεπτή και προωθεί διαμορφωτικές αλλαγές και τελικά τη δημιουργία και σταθεροποίηση συσσωματωμάτων



[163]. Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε κατάλοιπα τυροσίνης (Y) είναι το κύριο σηματοδοτικό γεγονός υπονοώντας ότι υπάρχουν βασικές σχέσεις μεταξύ ιντεγκρινών και ειδικών πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης και φωσφατασών.

### 2.5.1. Src, Syk και Csk κινάσες

Το πιο άμεσο σηματοδοτικό γεγονός αμέσως μετά τη σύνδεση του προσδέματος είναι η σύνδεση της  $G_{13}$  πρωτεΐνης στην ενδοκυττάρια ουρά της  $\beta_3$ . Η αλληλεπίδραση της  $G_{13}$  με τη  $\beta_3$  διεγείρει την ενεργοποίηση της οικογένειας των Src κινασών (SFKs), ξεκινώντας έτσι το SFK-εξαρτώμενο μονοπάτι της 'έξω-μέσα' σηματοδότησης [213]. Το μονοπάτι αυτό πραγματοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης δύο NXXY μοτίβων στη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική ουρά, το οποίο είναι κρίσιμα σημαντικό κατά την ενεργοποίηση αφού η φωσφορυλίωση έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη φυσική σύνδεση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  με τον κυτταροσκελετό [214]. Τα αιμοπετάλια περιέχουν αρκετά μέλη της οικογένειας SFKs με τη Src κινάση να είναι η πιο άφθονη [215]. Σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, η c-Src θεωρείται ότι παραμένει σε μια αυτοανασταλτική κατάσταση μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της περιοχής SH2 και της καρβοξυτελικής pTyr-529 και της περιοχής SH3 με μια έλικα από προλίνες στη περιοχή SH2 [216]. Η Tyr-529 παραμένει στη φωσφορυλιωμένη της κατάσταση από την πρωτεϊνική ρυθμιστική κινάση Csk, η οποία συνδέεται στην  $\alpha_{IIb}\beta_3$  στα αδρανή αιμοπετάλια [217]. Η αλληλεπίδραση του ινωδογόνου με την ιντεγκρίνη έχει ως αποτέλεσμα την διάσταση της Csk (και όχι της Src), προτείνοντας ότι η Src ενεργοποιείται μετά από τον επερχόμενο διαχωρισμό από την Csk, ανεξάρτητα από τον πολυμερισμό της ακτίνης. Επίσης αυτή η αλληλεπίδραση προάγει τη στρατολόγηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης της τυροσίνης 1B (PTP-1B) και SHP-2 στο σύμπλοκο  $\alpha_{IIb}\beta_3$ /c-Src/Csk, οδηγώντας στην αποδέσμευση της Csk από το σύμπλοκο, αποφωσφορυλίωση της Tyr-529 της c-Src και την ενεργοποίηση της c-Src [218].

Στα αιμοπετάλια και στα CHO κύτταρα, η Syk έχει αναγνωριστεί ως ο τρίτος τύπος πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης που ενεργοποιεί την ιντεγκρίνη. Στη πραγματικότητα η πρόσδεση του ινωδογόνου διεγείρει την άμεση σύνδεση της Syk με τη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική ουρά και την ενεργοποίηση της [219]. Η ενεργοποίηση της προηγείται του πολυμερισμού της ακτίνης και τα υποστρώματά της Vav1 και SLP-76 εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Γι αυτό η Syk συμμετέχει στην

εξάπλωση του αιμοπεταλίου. Η ενεργοποιημένη Src κινάση απαιτείται για την εξαρτώμενη από τη φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης, ενεργοποίηση της Syk και οι δύο μαζί παρέχουν τη μοριακή βάση για την παραγωγή σήματος από την ιντεγκρίνη στον κυτταροσκελετό [213].

### 2.5.2. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

Η οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών PKC φωσφορυλιώνει πολλές πρωτεΐνες σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης και είναι απαραίτητος μεσολαβητής στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση. Η οικογένεια αποτελείται από 12 ισομορφές. Οι γνωστές ισομορφές (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II και PKC $\gamma$ ) ρυθμίζονται από την DAG και το ενδοκυττάριο Ca<sup>2+</sup>, ενώ η PKC $\delta$  μέλος των καινούργιων ισομορφών της, δεν εξαρτάται από το ενδοκυττάριο Ca<sup>2+</sup>. Μια πρόσφατη έρευνα διατύπωσε ότι η δράση της PKC $\delta$ , όπως μετρήθηκε από τη φωσφορυλίωση και μεταφορά της στη μεμβράνη, έπεται από ενεργοποίηση προκαλούμενη από κολλαγόνο και θρομβίνη, ρυθμίζεται θετικά από την ‘έξω-μέσα’ ενεργοποίηση. Επίσης πυροδοτεί την σηματοδότηση των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από το μιτογόνο (MEK), της εξωκυττάριας ρυθμιστικής κινάσης (ERK) και της p38 MAPK [220]. Η PKC έχει αναγνωριστεί ως κυτταρικός υποδοχέας για την DAG ενώ η εξωγενής ενεργοποίηση της μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση απουσία αύξησης του κυτταρικού Ca<sup>2+</sup>.

### 2.5.3. GTPασες Rho

Οι GTPασες Rho ρυθμίζουν τη δημιουργία των δομών του κυτταροσκελετού ακτίνης, όπως τα φιλοπόδια, τα ψευδοπόδια, και τις εστιακές προσκολλήσεις. Η c-Src φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια κύρια πρωτεΐνη της RhoA GTPάσης, την p190 Rho GTPάση ενεργοποιητική πρωτεΐνη, η οποία αδρανοποιεί την RhoA. Η  $\beta_3$ -προσδεδεμένη c-Src αναστέλλει την RhoA στην αρχική φάση της εξάπλωσης του αιμοπεταλίου [221]. Η αναστολή της πρόσδεσης της c-Src ή η αφαίρεση της, σταματάει την μεσολαβούμενη από την ιντεγκρίνη εξάπλωση του αιμοπεταλίου σε CHO κύτταρα και αιμοπετάλια [222], η οποία μπορεί να αντιστραφεί από αναστολείς της RhoA, προτείνοντας έτσι ότι η αναστολή ενεργοποίησης της RhoA είναι κρίσιμη για την ‘έξω-μέσα’ ενεργοποίηση.



#### 2.5.4. Φωσφορυλίωση της $\beta_3$ κυτταροπλασματικής ουράς

Η 'έξω-μέσα' σηματοδότηση περιλαμβάνει την ICY δομή της  $\beta_3$  κυτταροπλασματικής ουράς. Αυτή η περιοχή περιέχει δύο αλληλουχίες με τυροσίνες, η κάθε μία σε ένα NXXY μοτίβο, χωρισμένες από 11 αμινοξέα. Η φωσφορυλίωση της ICY δομής συμβαίνει στα  $Y^{747}$  και  $Y^{759}$  κατά τη συσσώρευση ανεξάρτητα από τον αγωνιστή [214] και τα δύο μοτίβα ενώνονται σε θέσεις πρόσδεσης φωσφοτυροσινών (PTB) σηματοδοτικών πρωτεϊνών [223]. Οι τυροσίνες χρειάζονται για την εξάπλωση του αιμοπεταλίου και μεταφορά της ιντεγκρίνης στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης. Η φωσφορυλίωση προκαλεί την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης-διαμεσολαβητή της Ras σηματοδότησης, Shc και της κυτταροσκελετικής πρωτεΐνης μυσίνης με τη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική περιοχή. Στα πειράματα που έγιναν σε αιμοπετάλια ποντικών που τους έχει αφαιρεθεί η περιοχή φωσφορυλίωσης εμφανίστηκαν ελαττωματικοί θρόμβοι [224]. Κατά τη διάρκεια της προσκόλλησης στο ακινητοποιημένο ινωδογόνο επίσης λαμβάνει χώρα φωσφορυλίωση της τυροσίνης σε πολλά πρωτεϊνικά υποστρώματα (π.χ p95, p97 and p125 FAK) αλλά και της  $\beta_3$  κυτταροπλασματικής ουράς, παρόμοια με αυτή της συσσώρευσης. Υπάρχουν όμως πολλές πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέονται άμεσα με τα κυτταροπλασματικά άκρα της ιντεγκρίνης χωρίς να χρειάζεται φωσφορυλίωση. Κάποιες από αυτές είναι η  $\beta_3$ -ενδονεξίνη, η οποία αλληλεπιδρά με το NITY μοτίβο στα κατάλοιπα της  $\beta_3$  756-759, η CIB (calcium binding protein) που προσδένεται στην  $\alpha_{11b}$  κυτταροπλασματική ουρά και η κυτταροσκελετική πρωτεΐνη ταλίνη, η οποία ενώνεται κατευθείαν στα κυτταροπλασματικά άκρα της  $\alpha_{11b}\beta_3$  [224].

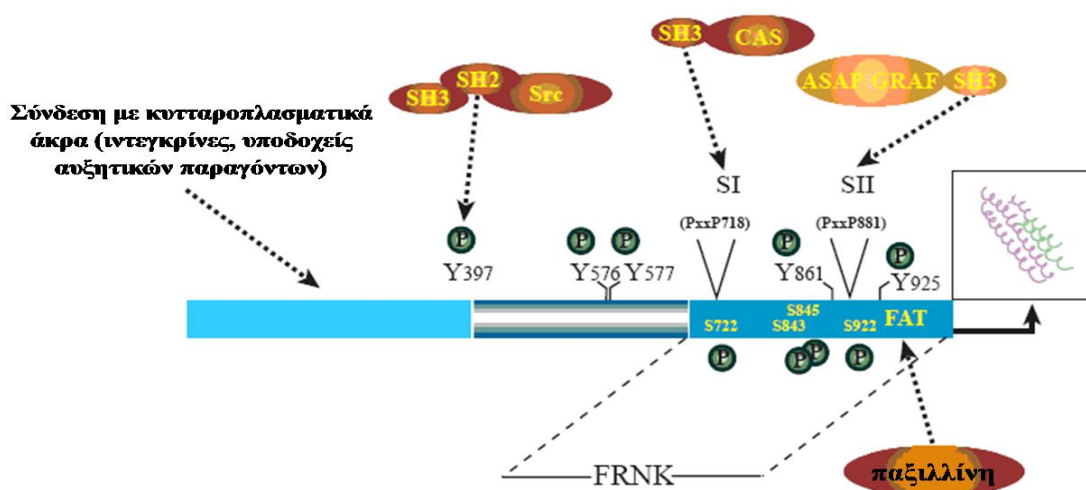
#### 2.5.5. Κινάση εστιακής προσκόλλησης (FAK)

##### Δομή και λειτουργία

Οι FAK και Pyk2 αποτελούν τα μοναδικά μέλη της οικογένειας των FAK πρωτεϊνικών κινάσων τυροσίνης εστιακής προσκόλλησης που δε συνδέονται με υποδοχέα. Η FAK εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς και κυτταρικούς τύπους και είναι καλά συντηρημένη στα είδη θηλαστικών και στους μικρότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς [225]. Το πρότυπο έκφρασης της Pyk2, η οποία εμφανίζει χαρακτηριστική ομοιότητα αλληλουχίας με την FAK, είναι πιο περιορισμένο και εκφράζεται σε υψηλά

επίπεδα στον εγκέφαλο και σε χαμηλότερα επίπεδα στο ήπαρ, τους νεφρούς, τη σπλήνα, τον πνεύμονα και κύτταρα αιματοποιητικής προέλευσης [226].

Η FAK αποτελείται από μια κεντρική καταλυτική περιοχή που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο μεγάλες N- και C- τελικές, μη καταλυτικές περιοχές. Η N-τελική περιοχή εμφανίζει ομοιότητες αλληλουχίας με μια οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν τις περιοχές FERM (four 1-ezrin-radixin-moesin). Τα μέλη αυτής της οικογένειας ενώνουν τις διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Η N-τελική περιοχή της FAK δεσμεύεται *in vitro* με αλληλουχίες της κυτταροπλασματικής περιοχής των υπομονάδων των β-ιντεγκρινών. Σε γενικές γραμμές, η FERM περιοχή δένει με την καταλυτική περιοχή που αναστέλλει αυτόματα τη δράση της κινάσης, αλλά επίσης αλληλεπιδρά με άλλα μόρια που ελέγχουν την σηματοδότηση της FAK. Τέλος, μπορεί να κατευθύνει την FAK σε τόπους συσσωματωμάτων ιντεγκρινών ή υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα [227].



**Εικόνα 2.9.** Η οργανωμένη δομή του μορίου της FAK και οι αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και υποδοχείς. Φαίνονται οι θέσεις αυτοφοσφορύλωσης της με κύρια την Y397 [227].

Η C-τελική (δέσμη 4 ελικών) περιοχή είναι πλούσια σε τόπους αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Μια αλληλουχία 100 καταλοίπων που ονομάζεται FAT (focal adhesion targeting) κατευθύνει τη FAK σε νεοσχηματισμένα και υπάρχοντα συμπλέγματα εστιακής προσκόλλησης. Οι αλληλουχίες μέσα στην περιοχή αυτή είναι απαραίτητες αλλά και επαρκείς για τη σηματοδότηση της FAK. Μελέτες με

κρυσταλλογραφία ακτίνων X και ανάλυση NMR της περιοχής FAT έδειξαν μια δομή τεσσάρων ελίκων που έχει κοινά γνωρίσματα με άλλες πρωτεΐνες προσκόλλησης όπως η βινκουλίνη και η Cas. Η περιοχή FAT αποτελεί επίσης τόπο δέσμευσης για την εστιακή πρωτεΐνης προσκόλλησης παξιλλίνη [228]. Αυτή η αλληλεπίδραση απαιτεί τη δομική ακεραιότητα της ελικοειδούς δομής και πραγματοποιείται με μεσολάβηση από δύο υδρόφοβα καλύμματα στις αντίθετες πλευρές των ελίκων. Λόγω του ότι η παξιλλίνη δεσμεύεται απευθείας στις κυτταροπλασματικές περιοχές των ιντεγκρινικών υποδοχέων, καθώς επίσης και στη βινκουλίνη, μπορεί να συμμετέχει με τη FAK στα συμπλέγματα προσκόλλησης. Επιπλέον, διάφορα ποικιλόμορφα της FAK τα οποία αποτυγχάνουν να δεσμεύσουν την παξιλλίνη *in vitro* εξακολουθούν να συμμετέχουν στην προσκόλληση *in vivo*, φαινόμενο που υποδεικνύει ότι ο μηχανισμός στρατολόγησης της FAK σε δομές προσκόλλησης απαιτεί περισσότερα από τη απλή δέσμευση της παξιλλίνης. Το C-τελικό άκρο της μη καταλυτικής περιοχής της FAK, γνωστό και ως FRNK (FAK-related-non-kinase), εκφράζεται ανεξάρτητα σε διάφορα κύτταρα και μπορεί να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της δραστηριότητας της κινάσης. Η έκφραση του FRNK είναι αυξημένη σε λεία μυϊκά κύτταρα και φαίνεται να αυξάνεται σε απόκριση αγγειακής βλάβης. Στα περισσότερα κύτταρα, η υπερέκφραση του FRNK αναστέλλει την κυτταρική εξάπλωση, την κυτταρική μετακίνηση και τη μεσολαβούμενη από τον αυξητικό παράγοντα σηματοδότηση στην κινάση MAP κινάσης.

Η κεντρική καταλυτική, με κατάλοιπα τυροσίνης, περιοχή εμφανίζει ομοιότητες στην αλληλουχία με άλλες κινάσες της τυροσίνης. Είναι πολύ ενδιαφέρον ότι, η κρυσταλλική δομή της περιοχής κινάσης της FAK αποκαλύπτει την παρουσία ενός δισουλφιδικού δεσμού στο N-τελικό λοβό της κινάσης. Αυτό αποτελεί ασυνήθιστο χαρακτηριστικό για τις κινάσες και θα μπορούσε να έχει ένα πιθανό ρόλο στη λειτουργία της κινάσης. Η συσσωμάτωση των ιντεγκρινών έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία φωσφορυλίωση της FAK στο κατάλοιπο της Tyr<sup>397</sup>, καθώς επίσης και σε διάφορους επιπλέον τόπους μέσα στη κεντρική περιοχή κινάσης και του C-τελικού άκρου. Ο παροδικός διμερισμός των μορίων της FAK οδηγεί σε ενδομοριακή φωσφορυλίωση της Tyr<sup>397</sup>. Η αυτοφωσφορυλίωση της Tyr<sup>397</sup> σχετίζεται με αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα της FAK και φαίνεται να είναι σημαντική για τη φωσφορυλίωση σε τυροσίνες σχετικών με την εστιακή προσκόλληση πρωτεϊνών. Επίσης, επιτρέπει την σύνδεση της Src, η οποία φωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα Tyr<sup>576</sup> και Tyr<sup>577</sup> της FAK, δύο έντονα συντηρημένα κατάλοιπα που βρίσκονται μέσα στην καταλυτική θηλιά της

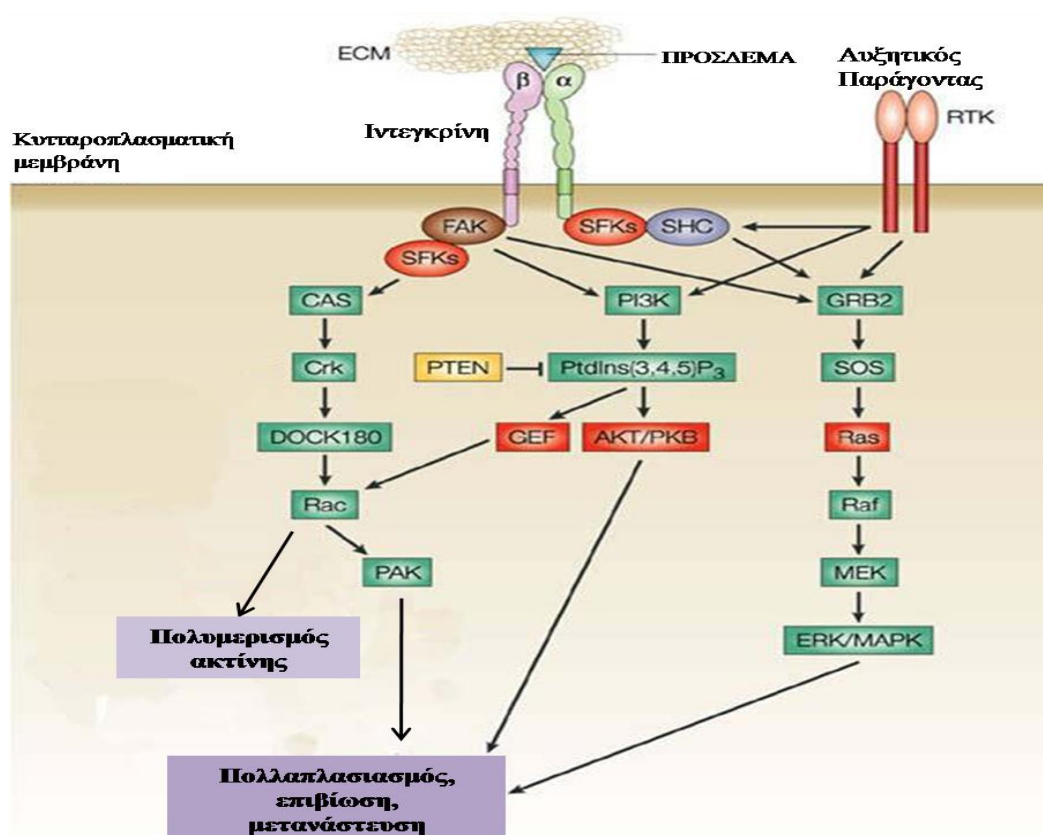
κεντρικής περιοχής (εικόνα 2.9). Η φωσφορυλίωση αυτών των καταλοίπων τυροσίνης είναι σημαντική για τη μέγιστη ενεργοποίηση της FAK που επάγεται από την προσκόλληση και την περαιτέρω σηματοδότηση [229].

### Η FAK ως διακόπτης πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών

Η φωσφορυλίωση στην Tyr<sup>397</sup> δημιουργεί μια υψηλής συγγένειας θέση δέσμευσης για την περιοχή SH2 της οικογένειας κινάσων Src και οδηγεί στην στρατολόγηση και ενεργοποίηση της Src μέσω δημιουργίας ενός συμπλέγματος διμερούς κινάσης. Η Tyr<sup>397</sup>-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της FAK και η στρατολόγηση της Src έχουν εμπλακεί στην επαρκή φωσφορυλίωση τυροσίνης των επιπλέον τόπων στη FAK καθώς επίσης και των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στη FAK, Cas και παξιλλίνη. Η φωσφορυλίωση της Tyr<sup>397</sup> φαίνεται επίσης να είναι σημαντική για τη στρατολόγηση άλλων πρωτεϊνών που περιέχουν SH2 περιοχή, συμπεριλαμβανομένων και της 85 kDa υπομονάδας της φωσφοϊνοσιτιδικής κινάσης 3 (PI3-κινάση) και της φωσφολιπάσης C (PLC-γ). Τέλος, η Tyr<sup>861</sup> φωσφορυλιώνεται έντονα σε διάφορες καταστάσεις του κυττάρου. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση της Tyr<sup>861</sup> μπορεί να ενισχύσει τη φωσφορυλίωση της Tyr<sup>397</sup> [230]. Η FAK περιέχει τέσσερις τύπους φωσφορυλίωσης σερίνης μέσα στην C-τελική περιοχή (Ser<sup>722, 843, 846, 910</sup>). Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης σερίνης στη ρύθμιση της λειτουργίας της FAK δεν είναι πλήρως κατανοητός. Όμως, η γειτνίαση αυτών των φωσφορυλιωμένων καταλοίπων σερίνης στις θέσεις αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης κινεί το ενδιαφέρον και προτείνει ένα ρόλο για τη φωσφορυλίωση σερίνης στη ρύθμιση της δέσμευσης/σταθερότητας του καταρράκτη των σηματοδοτικών πρωτεϊνών.

Η C-τελική περιοχή περιέχει πολλαπλές θέσεις αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Πέρα από τη θέση δέσμευσης της παξιλλίνης στη περιοχή FAT, δύο επιπλέον θέσεις πλούσιες σε προλίνη αποτελούν τύπους αναγνώρισης πρωτεϊνών που περιέχουν την περιοχή SH3 (SI και SII εικόνα 2.9). Ο SI παρέχει το κύριο δεσμευτικό μοτίβο που αναγνωρίζεται από την περιοχή SH3 της Cas, μιας πολυλειτουργικής πρωτεΐνης. Με τη συσσωμάτωση των ιντεγκρινών, η Cas τοποθετείται στα συμπλέγματα προσκόλλησης και φωσφορυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης. Το μοτίβο του SII δεσμεύει τις περιοχές SH3 δύο ρυθμιστών των μικρών GTPασών, της GRAF: μια GAP (GTPase activating protein) για τη Rho και της ASAP1: μια GAP για την Arf1 και την Arf6. Η

δέσμευση της ASAP και/ή της GRAF στην FAK φαίνεται να είναι σημαντική για τη σύνδεση της σηματοδότησης του συμπλέγματος προσκόλλησης με την ρύθμιση των μικρών GTP-δεσμευτικών πρωτεϊνών στις οικογένειες Rho και Arf, πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού.



**Εικόνα 2.10.** Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ‘έξω-μέσα’ βιοσηματοδότηση καθώς και ο κεντρικός ρόλος της FAK [231].

### Συνεργατικά σήματα με αυξητικούς παράγοντες

Οι ιντεγκρίνες παρέχουν συνεργατικά σήματα για τη προαγωγή επαρκούς ενεργοποίησης του αυξητικού παράγοντα στο μονοπάτι της MAP κινάσης. Αν και η προσκόλληση των κυττάρων στις πρωτεΐνες της ECM απουσία αυξητικών παραγόντων ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της MAP κινάσης, η παρεμπόδιση του σήματος της ιντεγκρίνης αναστέλλει χαρακτηριστικά την ικανότητα των αυξητικών παραγόντων να ενεργοποιήσουν επαρκώς τον καταρράκτη Raf, MEK-Erk [232]. Τα συνεργατικά σήματα από τις ιντεγκρίνες απαιτούν την FAK, αφού η έκφραση της συνεχώς ενεργοποιημένης FAK αναιρεί την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της MAP κινάσης. Επιπλέον,

αποδείξεις εστιάζουν στο ρόλο της Rac και PAK στη συνεργατική σηματοδότηση. Η κυτταρική προσκόλληση ενεργοποιεί τη μετατόπιση της Rac στη μεμβράνη και την επακόλουθη ενεργοποίηση της PAK. Η ενεργοποίηση της PAK, μέσω φωσφορυλίωσης στη Ser<sup>298</sup> προωθεί μια σταθερή σύνδεση των συστατικών του μονοπατιού της σηματοδότησης της MAP κινάσης.

#### 2.5.6. Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (ERK1/2)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από το μιτογόνο (MAPK) αποτελούν μια οικογένεια κινασών σερίνης – θρεονίνης που ενεργοποιούνται από πολλά εξωκυττάρια ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων και ορμονών. Τέσσερις διαφορετικές υποομάδες της οικογένειας έχουν περιγραφεί και είναι οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (ERKs), οι c-Jun NH2-τελικές κινάσες (JNKs), η ERK5/big MAP kinase (BMK1) και η ομάδα των p38 πρωτεϊνικών κινασών. Από τις παραπάνω, οι ERK1/ERK2 (p44<sup>MAPK</sup> και p42<sup>MAPK</sup>), p38, και c-Jun NH2-τελική κινάση έχουν αναγνωριστεί στα αιμοπετάλια και φαίνεται να ενεργοποιούνται όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται από διαφορετικούς αγωνιστές όπως η θρομβίνη και το κολλαγόνο [233].

Ο καταρράκτης της ERK περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες δουλεύουν διαδοχικά. Η πρώτη από αυτές είναι μια ισομορφή της Raf, κοινώς η Raf-1, η ενεργοποίηση της οποίας απαιτεί την Ras. Η Raf φωσφορυλιώνεται σε αρκετά κατάλοιπα, ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει δύο κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης για την ενεργοποίηση κινασών που ενεργοποιούν κατευθείαν τις ERKs. Αυτές οι κινάσες γνωστές και σαν MAPK/ERK κινάσες (MEKs) ή κινάσες της MAP κινάσης (MEK1/2). Αν και είναι διπλής ειδικότητας κινάσες, δηλαδή φωσφορυλιώνουν είτε τυροσίνη ή θρεονίνη, είναι πολύ εκλεκτικοί για τους στόχους τους, τις MAP κινάσες. Οι MEK1 και MEK2 φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν μόνο τις ERK1 και ERK2 αντίστοιχα (εικόνα 2.10). Ο καταρράκτης των MAPK ενεργοποιείται από εξωκυττάρια σήματα μέσω της κατάληψης αρκετών μεμβρανικών υποδοχέων, όπως ο υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης, υποδοχείς κυτοκινών, GPCRs και ιντεγκρίνες. Έγινε μελέτη της ενεργοποίησης της ERK από το ADP μέσω του Gq-συζευγμένου P2Y1 και του Gi-συζευγμένου P2Y12 και βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση των P2Y υποδοχέων είχε ως

αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της ERK2 από το 1<sup>ο</sup> λεπτό της ενεργοποίησης και έπειτα, ανεξάρτητα όμως από την ‘έξω-μέσα’ σηματοδότηση. Επίσης βρέθηκε ότι η ERK2 παίζει σημαντικό ρόλο στην από το ADP επαγόμενη παραγωγή του TxA<sub>2</sub> [234].

Τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης έρευνας αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση των MAPK πραγματοποιείται μέσω δύο διακριτών φάσεων, παίζοντας η κάθε μία διαφορετικό ρόλο στην αιμοπεταλιακή λειτουργία. Η πρόσδεση του προσδέματος στην α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> επάγει ένα πιο αργό στάδιο της ‘έξω-μέσα’ σηματοδότησης μέσω της φωσφορυλίωσης της ERK, η οποία είναι σημαντική για την φωσφορυλίωση της MLC και την ανάκληση του θρόμβου. Επίσης, η ταχεία ενεργοποίηση της ERK, επαγόμενη από αγωνιστή, είναι σημαντική για την έκκριση των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Η παραπάνω ενεργοποίηση της ERK κατά τη συσσώρευση είναι αρχική και παροδική, και φαίνεται να ρυθμίζεται αρνητικά από την αλληλεπίδραση του προσδέματος με την ιντεγκρίνη, αφού η επαγόμενη από τον vWF και τη θρομβίνη, φωσφορυλίωση της ERK ενισχύεται σημαντικά με την παρουσία αναστολέων της ιντεγκρίνης (RGDS) ή μονοκλωνικού anti-α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> αντισώματος [235, 236]. Υπήρξαν πρόσφατα στοιχεία ότι η κατάληψη της α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> ξεκινάει την αποφωσφορυλίωση της ERK2 και της MLC, η οποία μπορεί να εξυπηρετεί ως ένας μηχανισμός απενεργοποίησης της ιντεγκρίνης μέσω των MAPK. Σύμφωνα με το παραπάνω, παρατηρήθηκε μια παροδική μείωση της φωσφορυλίωσης της ERK σε αιμοπετάλια προσκολλημένα σε πλακίδια στρωμένα με ινωδογόνο, η οποία παρήρθε μετά τα 10 λεπτά [237]. Έτσι προκύπτει ότι η αρνητική ρύθμιση των MAPK είναι μόνο αρχική και παροδική μετά την πρόσδεση του προσδέματος στην ιντεγκρίνη και πιο σημαντικό είναι ότι η πρόσδεση αυτή προκαλεί μια καθυστερημένη αλλά παρατεταμένη ενεργοποίηση της ERK. Αυτή η καθυστερημένη ενεργοποίηση δεν μπορεί να προέρχεται από τη δευτερογενή αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση (από το ADP ή το TxA<sub>2</sub>), διότι η παρουσία αναστολέα του P2Y<sub>12</sub> και του ενζύμου COX (ασπιρίνη) δεν επηρέασε καθόλου αυτό το αποτέλεσμα. Έτσι προκύπτει το συμπέρασμα ότι η επίδραση του προσδέματος στην ιντεγκρίνη στην ενεργοποίηση της ERK είναι διφασική, αποτελούμενη από μια πρώιμη ανασταλτική και μια μετέπειτα διεγερτική φάση [237].

Τέλος, ο καταρράκτης των ERKs μπορεί να ενεργοποιηθεί από ενδοκυττάρια σήματα, όπως η εξάντληση των αποθεμάτων του ενδοκυττάριου Ca<sup>2+</sup>. Η ενεργοποίηση αυτή είναι ανεξάρτητη και μπλοκάρεται από το εξωκυττάριο Ca<sup>2+</sup>, ενώ συμμετέχει στην

ενεργοποίηση των SMCE (store-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry) στα ανθρώπινα αιμοπετάλια [234, 238].



## Μηχανισμός της ‘μέσα – έξω’ σηματοδότησης της $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$

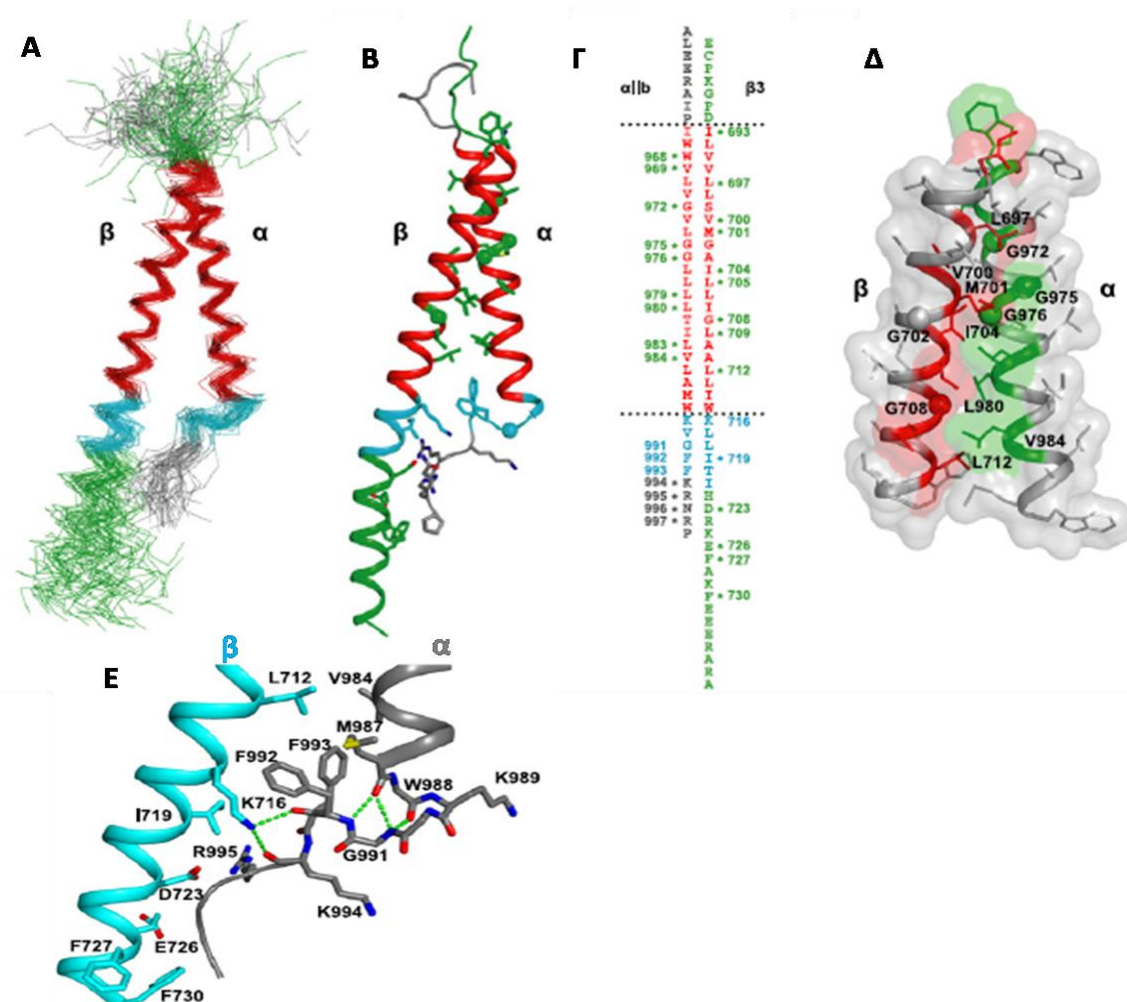
### 3. ‘Μέσα-έξω’ δομική ενεργοποίηση της $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$

#### 3.1. Δομικά χαρακτηριστικά του διαμεμβρανικού και κυτταροπλασματικού τμήματος

Σειρά πειραμάτων έχει δείξει ότι σήματα μεταφέρονται αμφίδρομα διαμέσου της μεμβράνης μέσω των διαμεμβρανικών τμημάτων των  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδων [197, 239]. Η πρόσφατα προσδιοριζόμενη δομή του  $\beta$  διαμεμβρανικού τμήματος δεν περιορίζεται στα αμινοξικά κατάλοιπα μεταξύ του Asp<sup>692</sup> και της Lys<sup>716</sup> στην εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια πλευρά αντίστοιχα, αλλά τα πέντε υδροφοβικά αμινοξέα μετά τη Lys<sup>716</sup> που αποτελούν μέρος της αποτελούμενης από 29 αμινοξέα  $\beta_3$  διαμεμβρανικής  $\alpha$ -έλικας, σχηματίζουν μια στροφή της έλικας προς τη μεμβράνη [172]. Η  $\alpha_{\text{Ib}}$  διαμεμβρανική υπομονάδα εκθέτει ένα παρόμοιο μοτίβο υδροφοβικότητας. Η δομή του  $\alpha_{\text{Ib}}$  διαμεμβρανικού τμήματος είναι μια ευθύγραμμη έλικα, η οποία τελειώνει στη Lys<sup>989</sup> προς την ενδοκυττάρια πλευρά, ενώ τα τέσσερα μη πολικά αμινοξέα που ακολουθούν σχηματίζουν μια θηλειά και οι Phe<sup>992</sup> και Phe<sup>993</sup> συστρέφονται προς το λιπιδιακό μεμβρανικό κέντρο (εικόνα 3.1 B, E). Επίσης, η  $\alpha_{\text{Ib}}$  διαμεμβρανική έλικα, που αποτελείται από 24 αμινοξέα διαπερνά τη διπλοστοιβάδα της μεμβράνης χωρίς να σχηματίζει κάποια στροφή [240].

Οι δύο διαμεμβρανικές έλικες ξεκινούν από το εξωκυττάριο χώρο της μεμβράνης όντας οι αποστάσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων πολύ μικρές. Οδηγούμενοι από τις αλληλεπιδράσεις αναδίπλωσης από τα τρία απόμακρα αμινοξικά κατάλοιπα  $\alpha_{\text{Ib}}$  (Gly<sup>972</sup>),  $\alpha_{\text{Ib}}$  (Gly<sup>976</sup>) και  $\beta_3$  (Gly<sup>708</sup>) και του ότι το μήκος των δύο ελίκων είναι άνισο, οι δύο διαμεμβρανικές έλικες διασχίζουν την μεμβράνη σχηματίζοντας γωνία  $25\pm 3^\circ$  (εικόνα 3.1 Δ). Τα παραπάνω, οδηγούν σε μία απώλεια επαφής των δύο ελίκων στη  $\beta_3$  L<sup>712</sup>. Αυτή η απώλεια αντισταθμίζεται με την ύπαρξη των δύο  $\alpha_{\text{Ib}}$  (Phe<sup>992</sup>-Phe<sup>993</sup>) μεταξύ των ελίκων, η οποία προκύπτει από τη στροφή του απόμακρου C-τελικού κυτταροπλασματικού άκρου της  $\alpha_{\text{Ib}}$  (εικόνα 3.1 E). Οι αρωματικοί δακτύλιοι των δύο  $\alpha_{\text{Ib}}$  Phe έρχονται κοντά με τον αρωματικό δακτύλιο της  $\beta_3$  Trp<sup>715</sup> και τη  $\beta_3$  Ile<sup>719</sup>. Έχει αποδειχθεί ότι πεπτίδια που μιμούνται την αλληλουχία της διαμεμβρανικής περιοχής της

$\alpha_{IIb}$  επάγουν την μέσω της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  συσσώρευση των αιμοπεταλίων, υποστηρίζοντας το ρόλο της διαμεμβρανικής περιοχής στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [241].

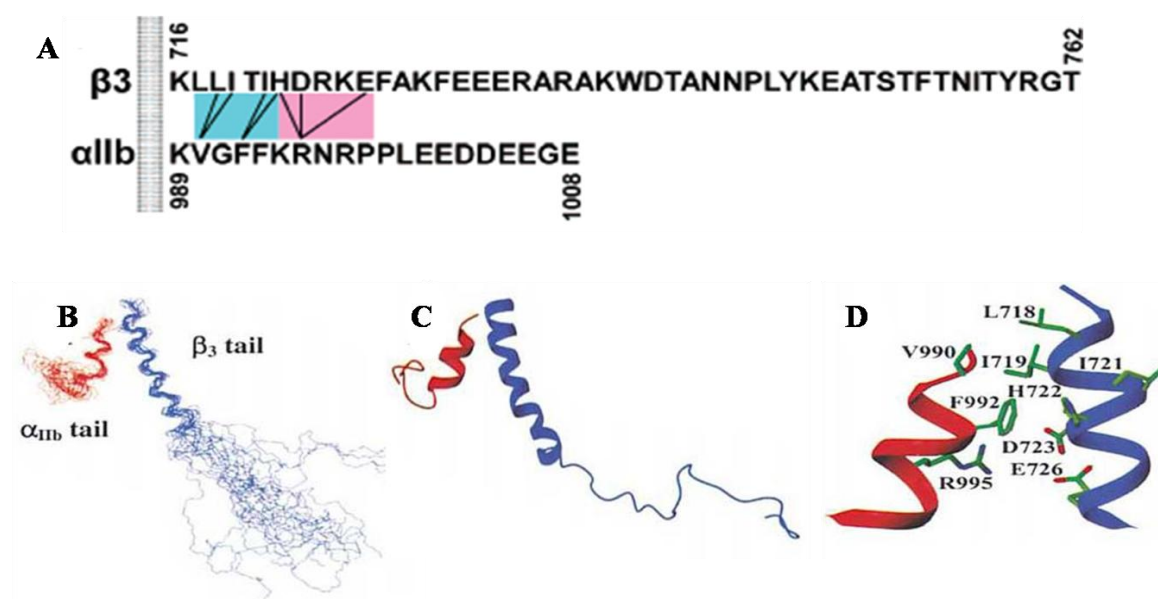


**Εικόνα 3.1.** Δομή της διαμεμβρανικής περιοχής της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . (Α-Δ) Φαίνονται οι πλευρικές αλυσίδες των  $\alpha_{IIb}$  και  $\beta_3$  διαμεμβρανικών υπομονάδων. Οι άνθρακες των γλυκινών που βρίσκονται στη κορυφή των διασταυρούμενων διαμεμβρανικών περιοχών φαίνονται με πράσινο (Δ) καθώς και τα 23 υδροφοβικά αμινοξέα που απαρτίζουν τις διαμεμβρανικές έλικες φαίνονται με κόκκινο χρώμα (Α,Β,Γ). Τα αμινοξέα, τα οποία βρίσκονται πλησίον της μεμβράνης (12-18 Å) από το κέντρο της μεμβράνης απεικονίζονται με γαλάζιο χρώμα [242].

Παρόλο που οι κυτταροπλασματικές (CT) δομικές περιοχές είναι πολύ μικρότερες από τις εξωκυττάρειες, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ιντεγκρίνης. Η  $\alpha_{IIb}$  CT περιοχή αποτελείται από 20 αμινοξέα (K<sup>989</sup>-E<sup>1008</sup>) και η  $\beta_3$  CT περιοχή από 47

(K<sup>716</sup>-T<sup>762</sup>). Οι CTs περιοχές μεσολαβούν στα σηματοδοτικά γεγονότα της ιντεγκρίνης μέσω δομικών και χωρικών αναδιαμορφώσεων των δομών τους και/ή μέσω αλληλεπιδράσεων με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες [243]. Η δομή NMR της α<sub>IIb</sub> CT περιοχή αποκαλύπτει μια κοντινή στη μεμβράνη ελικοειδή μορφή, που ακολουθείται από μια στροφή που σχηματίζουν τα δύο κατάλοιπα P<sup>998</sup> και P<sup>999</sup>.

Αντιθέτως, ολόκληρη η δομή της β<sub>3</sub> CT περιοχής είναι α-έλικα. Η β<sub>3</sub> CT περιοχή εμφανίζει δύο α-ελικοειδή μοτίβα (K<sup>716</sup>-R<sup>734</sup> και K<sup>748</sup>-T<sup>755</sup>), δύο NXXY μοτίβα (NPLY<sup>747</sup>, NITY<sup>759</sup>). Τα μοτίβα αυτά εξυπηρετούν ως θέσεις αναγνώρισης για πρωτεΐνες που περιέχουν θέσεις πρόσδεσης φωσφοτυροσινών (PTB), πράγμα που έχουν πολλές ενδοκυττάρια πρωτεΐνες. Η ταλίνη φαίνεται να αναγνωρίζει το NPLY<sup>747</sup> και έτσι φαίνεται να αλληλεπιδρά με το κοντινό στη μεμβράνη β<sub>3</sub> CT τμήμα [244]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι α<sub>IIb</sub> και β<sub>3</sub> CT αλληλουχίες σχηματίζουν ένα σταθερό σύμπλεγμα και έχουν προταθεί διαφορετικοί μηχανισμοί για το πώς αυτό το σύμπλεγμα διαταράσσεται για την έναρξη της ‘μέσα-έξω’ ενεργοποίησης.



**Εικόνα 3.2.** Οι αμινοξικές αλληλουχίες των α<sub>IIb</sub> και β<sub>3</sub> κυτταροπλασματικών ουρών καθώς και οι κοντινές στη μεμβράνη ηλεκτροστατικές (μωβ), μεταξύ των α<sub>IIb</sub> R<sup>995</sup> - β<sub>3</sub> H<sup>722</sup>, α<sub>IIb</sub> R<sup>995</sup> - β<sub>3</sub> D<sup>723</sup> και α<sub>IIb</sub> R<sup>995</sup> - β<sub>3</sub> Glu<sup>726</sup> και υδροφοβικές (μπλε), α<sub>IIb</sub> V<sup>990</sup> - β<sub>3</sub> L<sup>718</sup>, α<sub>IIb</sub> V<sup>990</sup> - β<sub>3</sub> I<sup>719</sup>, α<sub>IIb</sub> F<sup>922</sup> - β<sub>3</sub> I<sup>721</sup> και α<sub>IIb</sub> F<sup>922</sup> - β<sub>3</sub> H<sup>722</sup> αλληλεπιδράσεις (A,D). Δομική αναπαράσταση των α<sub>IIb</sub> και β<sub>3</sub> κυτταροπλασματικών ουρών με υπέρθεση backbone (B) και διάγραμμα Ribbon (C) [174, 245].

### 3.2. Ρύθμιση της ενεργοποίησης της $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ από τα κυτταροπλασματικά άκρα της

Οι κυτταροπλασματικές (CT), διατηρημένες κοντά στη μεμβράνη, δομικές αλληλουχίες περιορίζουν την ιντεγκρίνη στην ανενεργή της μορφή σχηματίζοντας διεπαφή αλληλεπιδράσεων και οδήγησαν στη σκέψη ότι ίσως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση. Η αποκοπή της  $\alpha_{\text{Ib}}$  μετά το N<sup>996</sup> δεν είχε καμία επίδραση στην ενεργοποίηση ενώ μετά το G<sup>991</sup> επέφερε δραστική ενεργοποίηση, αποκαλύπτοντας το κρίσιμο ρόλο της <sup>991</sup>GFFKR<sup>995</sup> αλληλουχίας στην ενεργοποίηση [246]. Αυτό επιβεβαιώνεται και από μια άλλη ομάδα, η οποία επέδρασε παλμιτοϋλιομένο πεπτίδιο pal-<sup>989</sup>KVGFFKR<sup>995</sup> σε ανθρώπινα αιμοπετάλια, και έδειξε ότι ενεργοποιεί την  $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$  οδηγώντας σε αιμοπεταλιακή συσσώρευση [247]. Παρομοίως μελετήθηκε και η <sup>717</sup>LLITIH<sup>723</sup> της  $\beta_3$  CT ουράς και βρέθηκε ότι η απαλοιφή ενός ή περισσότερων αμινοξέων της επιφέρει ενεργοποίηση [248] και προτάθηκε από την ομάδα αυτή, ότι η διάσπαση της γέφυρας άλατος μεταξύ του  $\alpha_{\text{Ib}}$  R<sup>995</sup> και του  $\beta_3$  D<sup>723</sup> είναι αυτή που ευθύνεται για την ενεργοποίηση. Με βάση αυτό το συμπέρασμα, η διπλή ταυτόχρονη αλλαγή του R<sup>995</sup> → D και του D<sup>723</sup> → R διατήρησε την ιντεγκρίνη στην ανενεργή της μορφή. Μια άλλη NMR έρευνα [174] χρησιμοποιώντας  $\alpha_{\text{Ib}}$  και  $\beta_3$  CT πεπτίδια έδειξε ότι η διατήρηση των δύο κοντινών στη μεμβράνη κυτταροπλασματικών άκρων διατηρείται επίσης με υδροφοβικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανόμενης και της γέφυρας άλατος (εικόνα 3.2).

Τα απόμακρα από τη μεμβράνη  $\alpha_{\text{Ib}}$  και  $\beta_3$  CT τμήματα φαίνεται να εμπλέκονται στον έλεγχο της ενεργοποίησης. Στη  $\beta_3$ , σημειακές μεταλλάξεις των Y<sup>747</sup>/A, S<sup>752</sup>/P, ή αποκοπές ολόκληρων τμημάτων που ξεκινούν από τα F<sup>754</sup> ή Y<sup>747</sup> ή T<sup>741</sup>, ολοκληρωτικά εμπόδισαν την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [249]. Η στροφή που σχηματίζεται στην  $\alpha_{\text{Ib}}$  CT ουρά λόγω των δύο P<sup>998</sup> και P<sup>999</sup> καθιστά ικανή την αλληλεπίδραση του απόμακρου C-τελικού με το κοντινό στη μεμβράνη τμήμα N-τελικό τμήμα, διατηρεί την  $\alpha_{\text{Ib}}$  CT δομική αλληλουχία σε ‘κλειστή’ διαμόρφωση, ενώ η διπλή μετάλλαξη των δύο προλινών προκαλεί ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [250]. Ενώ έχουν γίνει αρκετές έρευνες πάνω στο καλά διατηρημένο GFFKR μοτίβο της  $\alpha_{\text{Ib}}$ , τα τελευταία χρόνια ξεκίνησε η μελέτη του απόμακρου  $\alpha_{\text{Ib}}$  CT τμήματος. Η έρευνα ξεκίνησε πριν λίγα χρόνια από το δικό μας εργαστήριο, μελετώντας την επίδραση του όξινου απόμακρου τμήματος της  $\alpha_{\text{Ib}}$  CT <sup>1000</sup>LEEDDEEGE<sup>1008</sup> στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Βρέθηκε ότι το παλμιτοϋλιομένο πεπτίδιο pal-K-LEEDDEEGE είναι ένας ισχυρός αναστολέας

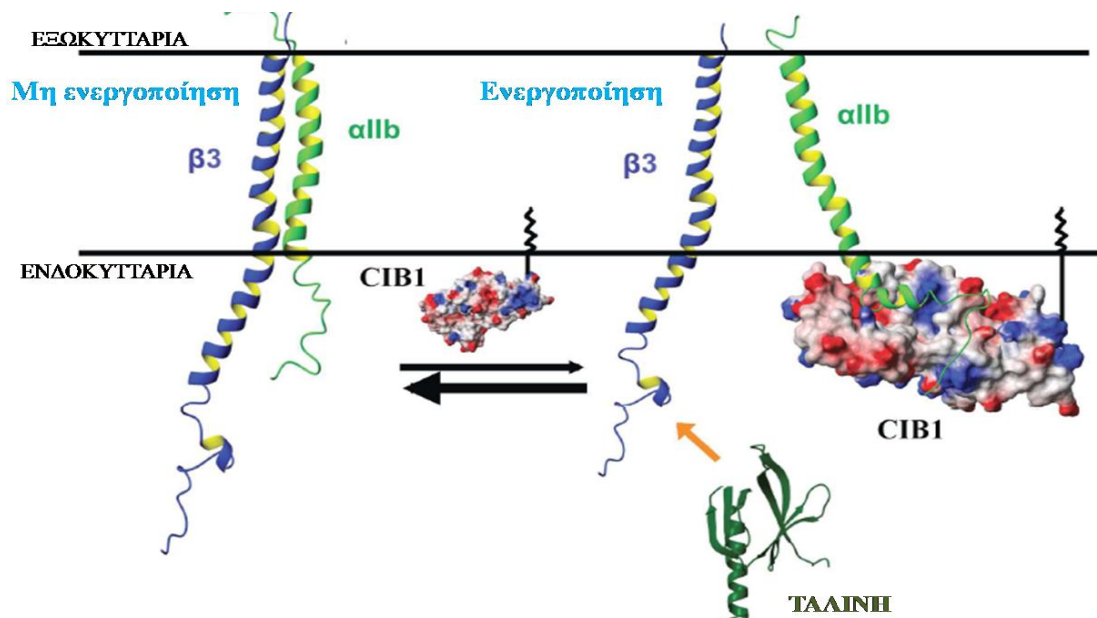
της ενεργοποίησης και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων [251]. Πολύ πρόσφατα, μελετήθηκε από την ομάδα του Li A. et al το απόμακρο από την μεμβράνη, μετά την GFFKR αλληλουχία,  $\alpha_{IIb}$  κυτταροπλασματικό άκρο και βρέθηκε να συμμετέχει στην «μέσα-έξω» ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [252]. Η αφαίρεση της όξινης αλληλουχίας μείωσε την επαγόμενη, από μετάλλαξη στη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική αλληλουχία (D723R), ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης σε CHO κύτταρα, ανέστειλε την επαγόμενη από θρομβίνη ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , ενώ δεν επηρέασε την «έξω-μέσα» ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης.

### 3.3. Πρωτεΐνες που συνδέονται στα κυτταροπλασματικά άκρα της $\alpha_{IIb}\beta_3$ κατά την 'μέσα-έξω' δομική ενεργοποίηση

Πάνω από 20 κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί ότι προσδένονται στα  $\alpha_{IIb}$  και  $\beta_3$  CT τμήματα της ιντεγκρίνης [253]. Εκτός από την ταλίνη, υπάρχουν αρκετές που συνδέονται με τη  $\beta_3$ , όπως η  $\alpha$ -ακτινίνη, η μυοσίνη και η φιλαμίνη, οι οποίες συνδέουν την ιντεγκρίνη με τον κυτταροσκελετό και διαδραματίζουν ρόλο στη 'μέσα-έξω' ενεργοποίηση εκτός από το γνωστό τους ρόλο στην 'έξω-μέσα' ενεργοποίηση. Κάποιες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις ρυθμίζονται από μετα-μεταφραστική τροποποίηση της  $\beta_3$  CT ουράς, διαδικασία που περιλαμβάνει αναδίπλωση, κόψιμο ή φωσφορυλίωση, για να γίνει η πρωτεΐνη ώριμη και λειτουργική. Όπως για παράδειγμα η πρόσδεση της μυοσίνης στη  $\beta_3$  απαιτεί τη φωσφορυλίωση των  $Y^{747}$  και  $Y^{759}$ , η πρόσδεση της SHC απαιτεί τη  $Y^{759}$  φωσφορυλίωση ενώ μπορεί να διαταραχτεί από την φωσφορυλίωση της  $T^{753}$ . Η αλληλεπίδραση της φιλαμίνης με τη πλούσια σε T,  $\beta_3$  CT, περιοχή αναστέλλεται από την φωσφορυλίωση της  $T^{753}$ , ενώ η πρόσδεση της c-Src κινάσης δεν απαιτεί καμία τροποποίηση, προτείνοντας ότι πιθανόν να κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στις  $\beta_3$  CT-αλληλεπιδράσεις [171]. Η  $\beta_3$ -ενδονεξίνη έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την απόμακρη από τη μεμβράνη NITY περιοχή της  $\beta_3$  CT ουράς. Συγκαταβύθιση της  $\beta_3$ -ενδονεξίνης με την ιντεγκρίνη εμφανίστηκε κατά την πρόσδεση του προσδέματος με την ιντεγκρίνη [254].

Αρκετές είναι και οι πρωτεΐνες που έχουν αναγνωριστεί ότι προσδένονται με την  $\alpha_{IIb}$  CT ουρά. Προσδένονται στη κοντινή στη μεμβράνη περιοχή και για αυτό μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Μια από αυτές είναι η CIB1, η οποία είναι γνωστή ως ρυθμιστική πρωτεΐνη και αποτελείται από 4 θέσεις

πρόσδεσης ασβεστίου γνωστές ως EF-hands, από τις οποίες όμως μόνο οι EF-III και EF-IV προσδένουν δισθενή κατιόντα. Συνδέεται στην  $\alpha_{IIb}$  <sup>983</sup>LVLAMWKVGFFKRN<sup>997</sup>, η οποία περιλαμβάνει μέρος της διαμεμβρανικής και κοντινής στη μεμβράνη CT περιοχής. Επίσης είναι μυριστουλιωμένη στο N-τελικό της άκρο και αυτό φαίνεται να δρα ως άγκυρα στη μεμβράνη. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε ηρεμία, ιόντα  $Mg^{2+}$  είναι παρόντα στο κυτταρόπλασμα, επιτρέποντας να είναι παρούσα η αναδιπλωμένη μορφή  $Mg^{2+}$ -CIB1. Κατά την ενεργοποίηση, ιόντα  $Ca^{2+}$  εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα, αυξάνεται η συγκέντρωση του  $Ca^{2+}$  και έτσι αυτά παίρνουν τη θέση των ιόντων  $Mg^{2+}$  και σχηματίζεται η  $Ca^{2+}$ -CIB1. Η CIB1 διαμέσου της αλληλεπίδρασης της με τη  $\alpha_{IIb}$  διαταράσσει την σύνδεση των  $\alpha_{IIb}$  και  $\beta_3$ , που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [255]. Επίσης, φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης, με το να ανταγωνίζεται την ταλίνη με τη σύνδεση της στην  $\alpha_{IIb}$ . Πρόσφατη έρευνα αποκάλυψε ότι ο μηχανισμός δράσης της  $Ca^{2+}$ -CIB1 είναι παρόμοιος με αυτόν της ταλίνης, όπου η αλληλεπίδραση της  $Ca^{2+}$ -CIB1 με την  $\alpha_{IIb}$  διασπά το ετεροδιμερές της ιντεγκρίνης και έτσι προκαλείται η ενεργοποίηση της (εικόνα 3.3). Εναλλακτικά, διατηρεί την ιντεγκρίνη στην ενεργοποιημένη της κατάσταση, καλύπτοντας την θέση αλληλεπίδρασης της  $\alpha_{IIb}$  με τη  $\beta_3$  CT ουρά [256].



**Εικόνα 3.3.** Δομικό μοντέλο του προτεινόμενου μηχανισμού δράσης της  $Ca^{2+}$ -CIB1 στη ρύθμιση ενεργοποίησης της  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Η  $\alpha_{IIb}$  CT αλληλεπιδρά με την CIB1, με την N-τελική α-έλικα να εισέρχεται στο υδρόφοβο τμήμα του C- λοβού της CIB1 και το C-τελικό αρνητικά φορτισμένο τμήμα να έρχεται σε επαφή με τον N-λοβό της CIB1. Έτσι οι δύο κυτταροπλασματικές ουρές

διαχωρίζονται, ενώ η ενεργοποίηση που προκαλείται είναι παρόμοια με αυτή που προκαλεί η ταλίνη, η οποία όμως προσδένεται στη  $\beta_3$  CT [256].

Η ICln είναι μια άλλη ρυθμιστική και πολυλειτουργική πρωτεΐνη, που είναι απαραίτητη για την ρύθμιση του όγκου του κυττάρου, αφού έχει βρεθεί ότι σχηματίζει ένα ομοδιμερές κανάλι ιόντων χλωρίου ( $\text{Cl}^-$ ). Ένας άλλος λειτουργικός ρόλος της είναι η ρύθμιση της  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  μέσω του KVGFFKR μοτίβου [257], ενώ έχει βρεθεί ότι ένα καινούργιο συνθετικό πεπτίδιο προερχόμενο από την παραπάνω αλληλουχία (KVGAAKR) και αντιστοιχεί στην αλληλουχία αναγνώρισης της ICln, αναστέλλει την λειτουργία του αιμοπεταλίου μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης. Έτσι, η αλληλεπίδραση της ICln με το πεπτίδιο μπορεί να αποτελεί βασικό σκοπό στην αναζήτηση φαρμακοφόρων και στην ανάπτυξη αντιθρομβωτικών φαρμάκων. Η αλληλεπίδραση της ICln με την  $\alpha_{\text{IIb}}$  CT αποτελεί ένα καθυστερημένο ‘μέσα-έξω’ σηματοδοτικό γεγονός, στο οποίο συμπεριλαμβάνεται η ανακατανομή της από το κυτταροσκελετικό διαμέρισμα των εν ηρεμία αιμοπεταλίων προς τη περιοχή της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης. Η ICln- $\alpha_{\text{IIb}}$  αλληλεπίδραση ρυθμίζεται από, οδηγούμενες από την ενεργοποίηση, αλλαγές που υφίστανται στη δομή της [258].

Τα αιμοπετάλια εκφράζουν αρκετές φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης καθώς και μια λίμνη από καταλυτικές υπομονάδες της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1c), η οποία αλληλεπιδρά με την ιντεγκρίνη  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  και συγκεκριμένα με την καλά διατηρημένη  $^{989}\text{KVG}^{992}\text{F}$  αλληλουχία της  $\alpha_{\text{IIb}}$  CT ουράς. Έκτος από το γνωστό ρόλο της  $^{989}\text{KVG}^{992}\text{F}$  στη διατήρηση της ιντεγκρίνης στην ανενεργή της μορφή, θεωρείται ότι αποτελεί αγκυροβόλιο για την PP1c. Όταν βρίσκεται προσδεσμένη, είναι στην ανενεργή της κατάσταση όπως και η ιντεγκρίνη, ενώ έπειτα από ενεργοποίηση με θρομβίνη ή με τη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη, επέρχεται η διάσταση της από την  $\alpha_{\text{IIb}}$  CT και η ταυτόχρονη ενεργοποίηση όπως προκύπτει και από την αποφωσφορυλίωση του υποστρώματος της PP1c, της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Με την αναστολή της πρόσδεσης του προσδέματος στην ιντεγκρίνη, μπλοκάρεται η διάσταση της και καταστέλλεται η ενεργοποίηση της. Αυτή η έρευνα αποκαλύπτει ένα καινούργιο ρόλο για την ιντεγκρίνη, όπου στην  $\alpha_{\text{IIb}}$  CT περιοχή εντοπίζεται ο μηχανισμός για την έναρξη και τη προσωρινή διατήρηση της ικανότητας της ρυθμιστικής σηματοδότησης της φωσφατάσης [259]. Τελικά, η αλληλεπίδραση της PP1c με την ιντεγκρίνη, ίσως θα

μπορούσε να επηρεάζει και την αλληλεπίδραση και άλλων διαμορφωτών της ιντεγκρίνης όπως η CIB ή της πρόσφατα αναγνωρισμένης πρωτεΐνης, ICIn, αφού οι θέσεις πρόσδεσης των παραπάνω αλληλεπικαλύπτονται.

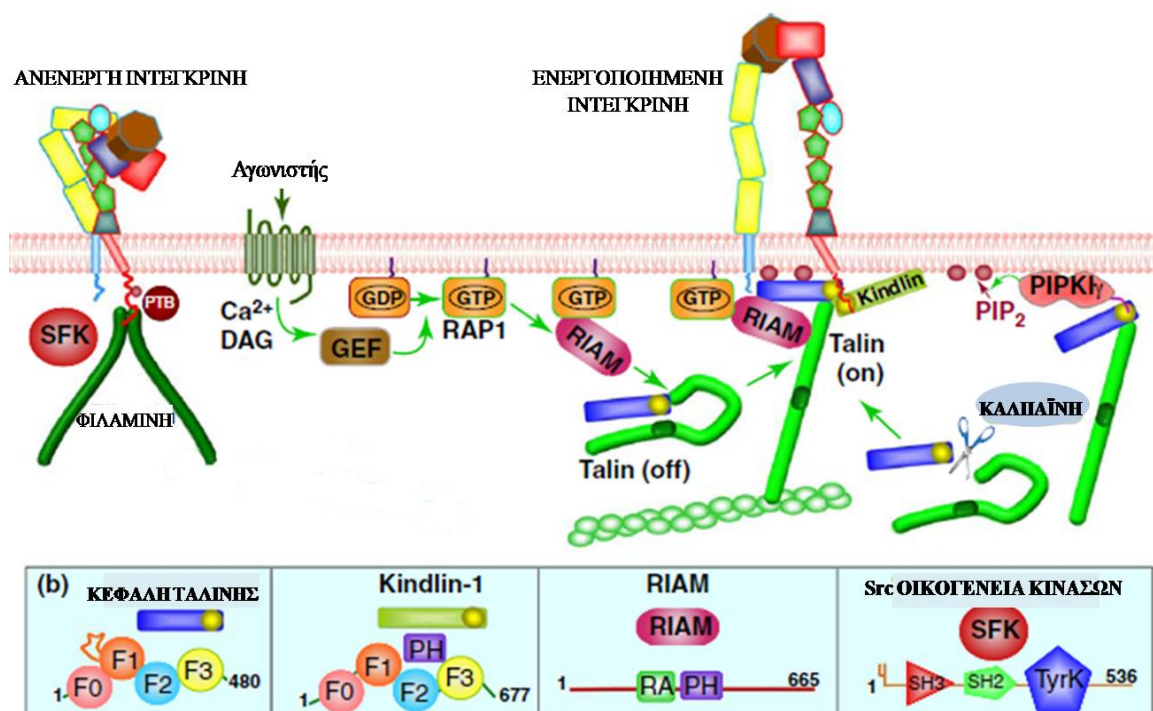
### 3.4. 'Μέσα – έξω' βιοσηματοδότηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$

Η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης περιλαμβάνει πυροδοτούμενα, ενδιάμεσα σηματοδοτικά γεγονότα και τελικά την αλληλεπίδραση της με ενδοκυττάριους ρυθμιστές, οι οποίοι αλλάζουν την συγγένεια της ιντεγκρίνης για το πρόσδεμα (ινωδογόνο ή vWF). Η συγγένεια αυτή αυξάνεται κατά την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης και επιτυγχάνεται μέσω του μηχανισμού της γνωστής 'μέσα-έξω' σηματοδότησης ή ενεργοποίησης, έπειτα από τη σύνδεση πρωτεϊνών – κλειδιά στα κυτταροπλασματικά άκρα. Ανάμεσα από αυτές πρωτεΐνες, που προσδένονται στην ιντεγκρίνη και τη συνδέουν με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, είναι η κυτταροσκελετική πρωτεΐνη ταλίνη, η πρόσδεση της οποίας, τουλάχιστον *in vitro*, είναι ικανή να προκαλέσει ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  και επέκταση της εξωτερικής της διαμόρφωσης, [260].

Οι ενδοκυτταρικές αντιδράσεις είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν τη πρόσδεση της ιντεγκρίνης στον κυτταροσκελετό και τη στρατολόγηση σηματοδοτικών μορίων. Οι διαδικασίες αυτές πραγματοποιούνται μέσω των κυτταροπλασματικών άκρων της ιντεγκρίνης, τα οποία αποτελούν εστιακά σημεία για την έναρξη της σηματοδότησης [246] και ρυθμίζουν την κατάσταση ενεργοποίησης του υποδοχέα αφού αποτελούν υποστρώματα για τις ενδοκυττάριες κινήσεις. Ο πιο γνωστός καταρράκτης της 'μέσα – έξω' ενεργοποίησης ξεκινά με τη πρόσδεση της θρομβίνης στον PAR-1 (proteinase-activated receptor), που βρίσκεται στη μεμβράνη του αιμοπεταλίου. Η σύνδεση αυτή διεγείρει την υδρόλυση φωσφολιπιδίων, η οποία οδηγεί στη δημιουργία της IP3 και της DAG. Η IP3 οδηγεί στην αύξηση του ενδοκυττάριου  $Ca^{2+}$ , η οποία μαζί με την DAG ενεργοποιούν το CALDAG-GEFI. Αυτές με τη σειρά τους μετατρέπουν την κωδικοποιημένη RAP1 πρωτεΐνη από την GDP-RAP1 μορφή στην ενεργοποιημένη, προσδεδεμένη στη μεμβράνη GTP-RAP1. Η ενεργοποίηση αυτή στρατολογεί τον τελεστή της GTP-RAP1, τον RIAM (RAP1-GTP-interacting adaptor molecule), καθώς και την κυτταροσκελετική πρωτεΐνη ταλίνη προς τη μεμβράνη. Αυτή η μεταφορά



διευκολύνει τη πρόσδεση της ταλίνης στη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική ουρά και συνεπώς την ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [175, 261].



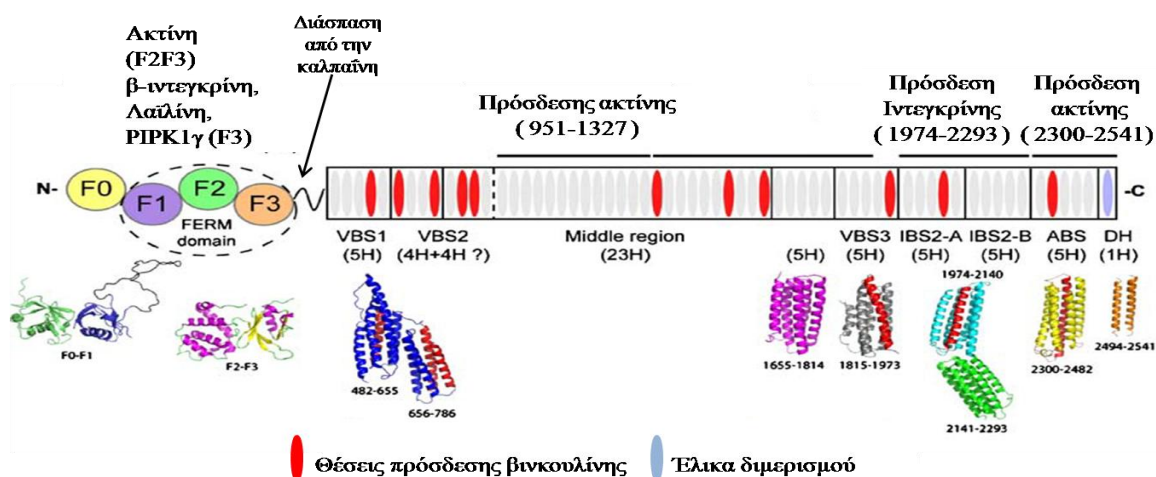
**Εικόνα 3.4.** Απλοποιημένη εκδοχή της ‘μέσα-έξω’ ενεργοποίησης μέσω της ενεργοποίησης της ταλίνης. Η ανενεργή κατάσταση της ιντεγκρίνης σταθεροποιείται με τη πρόσδεση της φιλαμίνης ή άλλων πρωτεϊνών που περιέχουν PTB δομή και από τη φωσφορυλίωση της  $\beta_3$  ουράς από την Src οικογένεια κινασών [173].

Σχετικά, αλλά παράλληλα μονοπάτια ενεργοποίησης της ταλίνης και μεταφοράς της στη μεμβράνη περιλαμβάνουν την PIP2 (4,5- διφωσφορική φωσφατυδιλινοσιτόλη) και την καλπαΐνη. Η εντοπισμένη συγκέντρωση της PIP2 αυξάνεται από τη διεγερμένη δραστηριότητα του ενζύμου της PIPKIγ (κινάση τύπου Ιγ της φωσφατυδιλινοσιτόλης) οδηγώντας έτσι στην πρόσδεση της ταλίνης με τη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική ιντεγκρίνη. Η PIPKIγ επίσης προωθεί την μετατόπιση της ταλίνης στη μεμβράνη με μια άμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στη C- τελική περιοχή της PIPKIγ και στην F3 περιοχή της ταλίνης (εικόνα 3.4) [262]. Η αποκοπή της ταλίνης από την διεγερμένη από το  $Ca^{2+}$  πρωτεάση, καλπαΐνη, πιστεύεται ότι ελευθερώνει τη δραστική κεφαλή της ταλίνης [263], αν και η αποκοπή αυτή επίσης προάγει την ουβικουίτινωση και την αποδόμηση της κεφαλής αυξάνοντας τη συγγένεια για την (SMURF1). Η φωσφορυλίωση της κεφαλής

από την εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση 5 (CDK5) αναστέλλει την αποικοδόμηση αυτή [264].

### 3.5. Η δομή και λειτουργία της ταλίνης

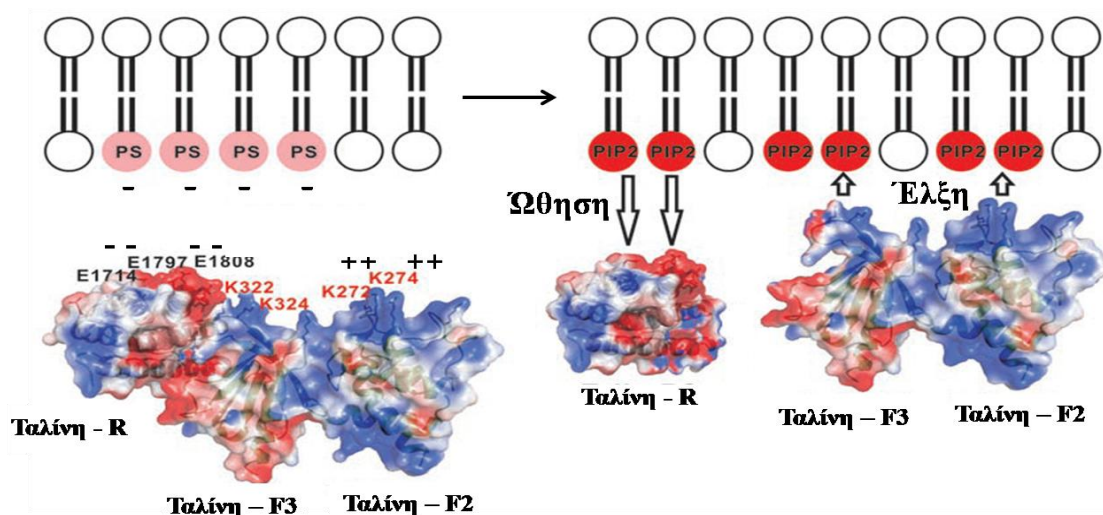
Η ταλίνη υπάρχει σε αρκετά μεγάλη ποσότητα στα ανθρώπινα αιμοπετάλια (~ 3%-8% επί της συνολικής αιμοπεταλιακής πρωτεΐνης) [265]. Είναι μια μεγάλη (~ 2541αμινοξέα, 270 kDa), αντιπαράλληλη ομοδιμερής πρωτεΐνη, που αποτελείται από μια N-τελική σφαιρική κεφαλή (~ 50 kDa) και ένα μακρύ ευέλικτο C-τελικό ραβδοειδές, ελικοειδές τμήμα ή αλλιώς ουρά (~ 220 kDa) (εικόνα 3.5). Η κεφαλή (Ταλίνη-H) περιέχει μια FERM δομική αλληλουχία (Four – point – one/erzin/radixin/moesin homology domain), αποτελείται από περίπου 300 κατάλοιπα και αποτελείται από τις F0, F1, F2 και F3 περιοχές. Οι F0 και F1 περιοχές εμφανίζουν δομή ουβικουιτίνης και σχηματίζουν μια γραμμική διευθέτηση με τις F1-F3 περιοχές, η οποία είναι αντίθετη με τις υπόλοιπες FERM δομικές πρωτεΐνες [266]. Η F3 έχει μια ομόλογη με την PTB δομή και συνδέεται άμεσα με την  $\beta_3$ -κυτταροπλασματική ουρά, σχηματίζοντας διεπαφή με το NPxY μοτίβο [267] και με μια κοντινή στη μεμβράνη έλικα της  $\beta_3$  ουράς. Η κεφαλή περιέχει θέσεις πρόσδεσης για και την λαϊλίνη και την F- ακτίνη καθώς και για μόρια που ρυθμίζουν το δυναμικό της εστιακής προσκόλλησης (FA) όπως η PIPK1 $\gamma$  και η FAK, αν και δεν είναι σαφής ακόμα η βιοφυσική της σύνδεση [268].



**Εικόνα 3.5.** Διαγραμματική αναπαράσταση της δομής της ταλίνης, στο οποίο φαίνονται οι θέσεις πρόσδεσης των διαφόρων πρωτεϊνών [269]

Η ουρά της ταλίνης (ταλίνη-R) αποτελείται από 62 έλικες, οι οποίες είναι οργανωμένες σε δέσμες α-ελίκων και καταλήγουν σε μια έλικα στη C-τελική περιοχή, που περιέχει αλληλουχία διμερισμού και έτσι σχηματίζεται ένα παράλληλο ομοδιμερές. Μπορεί να αλληλεπιδρά με την βινκουλίνη σε πολλαπλές θέσεις, με την β-ιντεγκρίνη και με την ακτίνη σε δύο διαφορετικές θέσεις. Μελέτες βιοφυσικές και EM έχουν δείξει ότι η ταλίνη υφίσταται σε διαφορετικές διαμορφωτικές καταστάσεις: σαν μονομερές και διμερές, καθώς και σε ανοιχτή και αυτοανεσταλμένη – κλειστή διαμόρφωση. Μελέτες που έγιναν σε ανθρώπινα αιμοπετάλια έδειξαν ότι η ταλίνη κυρίως υφίσταται ως ένα αντιπαράλληλο ομοδιμερές [270], ενώ ο διμερισμός της είναι σημαντικός για τη λειτουργία της πρόσδεσης της ακτίνης [271].

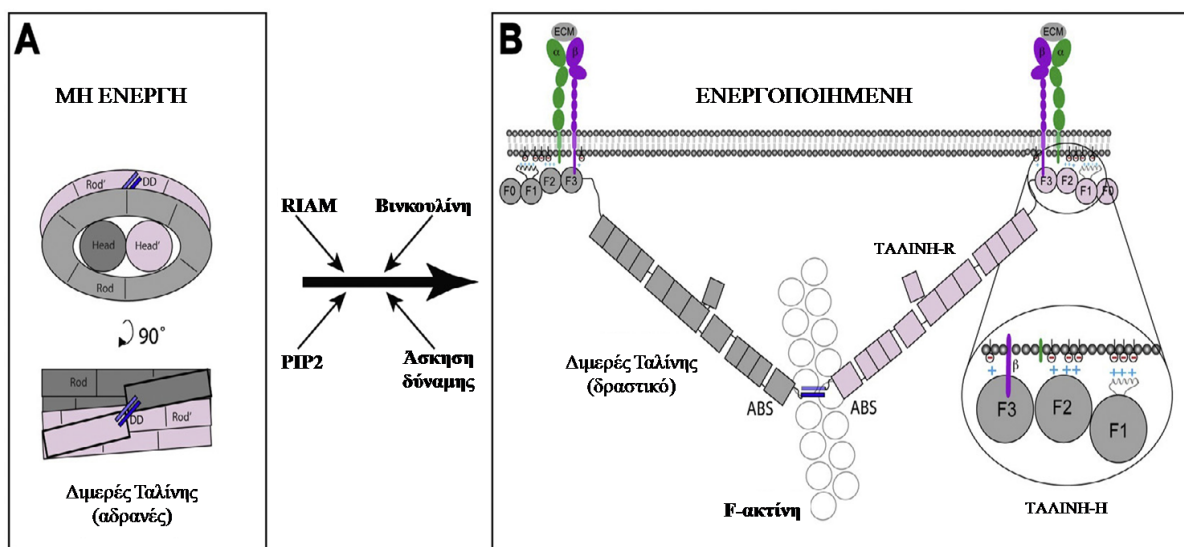
Στα εν ηρεμία αιμοπετάλια η κατανομή της ταλίνης είναι τυχαία και διάχυτη, βρίσκεται στην αυτοανεσταλμένη της κατάσταση μακριά από τη μεμβράνη και τα κυτταροπλασματικά άκρα της ιντεγκρίνης. Η ουρά παίζει σημαντικό ρόλο στο να συγκρατεί δομικά τη πρόσδεση της κεφαλής στη μεμβράνη και στην β-ιντεγκρίνη [272]. Με την ενεργοποίηση όμως, όπως περιγράφεται στη 3.4 παράγραφο, η μεταφορά της ταλίνης στη μεμβράνη είναι ραγδαία. Η μελέτη της κρυσταλλικής δομής της μαζί με μελέτες πρόσδεσης NMR προτείνουν ένα στερεοχημικό και ηλεκτροστατικό μηχανισμό που ευνοεί την αυτοανεσταλμένη κατάσταση της ταλίνης. Ειδικότερα, προέκυψε ότι η ουρά εμποδίζει τις F2-F3 περιοχές της κεφαλής να συνδεθούν στη μεμβράνη και αυτό γιατί το αρνητικό φορτίο της απωθείται από το αρνητικό φορτίο των φωσφατιδυλοσερίνων, συστατικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης προς το κυτταρόπλασμα. Η περιοχή αυτή εμπλουτίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις αρνητικά φορτισμένης PIP<sub>2</sub>, οι οποίες ασκούν μια ελκτική δύναμη στη θετικά φορτισμένη F2-F3 κεφαλή της ταλίνης. Η παραπάνω αλληλεπίδραση επιφέρει αλλαγή στη διαμορφωτική κατάσταση της ταλίνης, τη μετατρέπει στην ενεργή της διαμόρφωση μέσω ενός μηχανισμού «έλξης - ώθησης» (εικόνα 3.6) [272].



**Εικόνα 3.6.** Η πλούσια σε PIP2 μεμβράνη αλληλεπιδρά ευνοϊκά με τις F2-F3 περιοχές της κεφαλής της ταλίνης και προωθεί το «ξεδίπλωμα» του μορίου της ταλίνης. Η μη διεγερμένη επιφάνεια της μεμβράνης αποκρούει την αυτοανεσταλμένη ταλίνη (αριστερά) και ο μηχανισμός «έλξης - ώθησης» από τη πλούσια σε PIP2 μεμβράνη (δεξιά). Με μπλε είναι οι θετικά φορτισμένη περιοχή, ενώ με κόκκινο η αρνητικά φορτισμένη [272].

Τα πιο πρόσφατα δεδομένα, που αφορούν το μοντέλο του μορίου της ταλίνης, το απεικονίζουν ως συμπαγές, σε σχήμα ντόνατ (donut-shaped) με την ουρά να σχηματίζει ένα δακτύλιο και τη κεφαλή της να καλύπτει το κενό στο εσωτερικό (εικόνα 3.7A). Αυτό το μοντέλο βασίζεται σε συνδυασμό πειραμάτων EM, μικρής γωνίας σκέδασης ακτίνων X, NMR και τη δομή των ήδη γνωστών θραυσμάτων της ταλίνης [273]. Με δεδομένο αυτό το μοντέλο, συνεπάγεται ότι πρέπει να γίνουν μεγάλες κινήσεις για να προσδεθεί η βινκουλίνη σε αυτήν και αυτή στην β-ιντεγκρίνη [273]. Οι προερχόμενες από την ακτίνη μηχανικές δυνάμεις φαίνεται να παίζουν ρόλο στην έκθεση των θέσεων πρόσδεσης της βινκουλίνης πάνω στη ταλίνη, αλλά ακόμα οι χωροχρονικές και μοριακές λεπτομέρειες παραμένουν ασαφείς. Πρόσφατα επίσης βρέθηκε ότι το μόριο RIAM μπορεί να αρχικά να προσδεθεί στην ουρά, εκεί όπου προσδένεται και η βινκουλίνη, να την φέρει κοντά στην ιντεγκρίνη και έπειτα να αντικατασταθεί από την βινκουλίνη κατά τη συγκρότηση της εστιακής προσκόλλησης [274]. Η καλπαΐνη, μια εξαρτώμενη από το  $\text{Ca}^{2+}$  πρωτεάση, διασπά έναν πεπτιδικό δεσμό ελευθερώνοντας τη κεφαλή και επιτρέποντας την να συνδεθεί με μεγαλύτερη συγγένεια στη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική ουρά. Όμως η διάσπαση από την καλπαΐνη δεν απαιτείται για τη RIAM - προερχόμενη ενεργοποίηση της

ιντεγκρίνης [275] και ο ρόλος της προσανατολίζεται περισσότερο στην ρύθμιση της δημιουργίας της εστιακής προσκόλλησης.



**Εικόνα 3.7.** Σχηματική απεικόνιση της αδρανούς, (A) και δραστήιας ταλίνης (B). Στο βέλος απεικονίζονται τα πιθανά μονοπάτια για την ενεργοποίηση της. Τα μονομερή της ταλίνης απεικονίζονται με γκρι και μωβ, η έλικα διμερισμού με μπλε και οι θέσεις πρόσδεσης της ακτίνης (ABS) στο C-τελικό άκρο της ουράς [273].

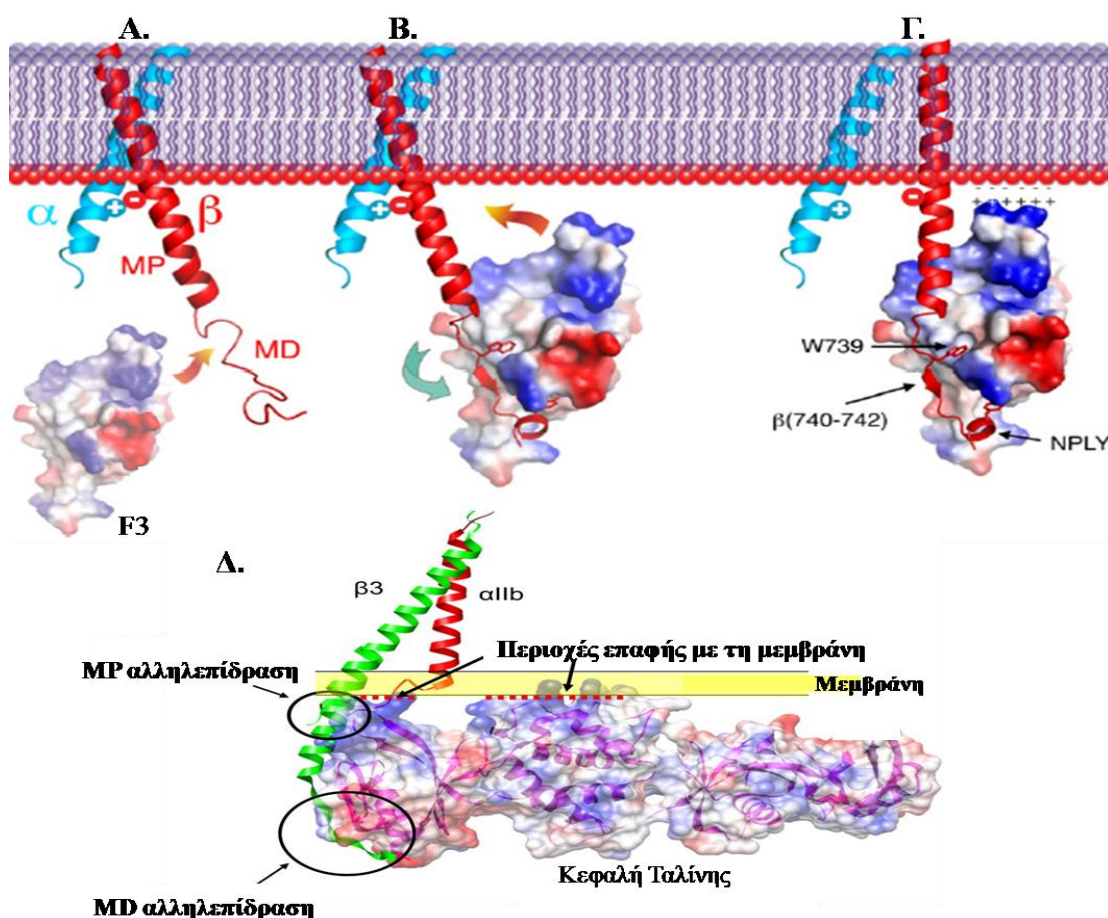
### 3.6. Πρόσδεση της ταλίνης στην $\beta_3$ κυτταροπλασματική ουρά

Η πρόσδεση της ταλίνης στα  $\beta$  κυτταροπλασματικά άκρα ενεργοποιεί την ιντεγκρίνη και αυξάνει τη συγγένεια της ως προς το πρόσδεμα [276], βασικό βήμα στη προσκόλληση, μετανάστευση και άλλες παθοφυσιολογικές αποκρίσεις. Οι F2 και F3 περιοχές δεσμεύονται στη  $\beta_3$  CT ουρά, αν και η συγγένεια της F3 είναι μεγαλύτερη, αφού περιέχει μια PTB περιοχή, ικανή να συνδεθεί και να ενεργοποιήσει την ιντεγκρίνη [277]. Η F3 αλληλεπιδρά με δύο περιοχές της  $\beta_3$  CT ουράς. Αλληλεπιδρά με την ακολουθία  $^{744}\text{NPLY}^{747}$  ( $^{739}\text{WDTANNPLYDEA}^{750}$ ) της απόμακρης από τη μεμβράνη  $\beta_3$  CT ουράς (MD), χρησιμοποιώντας το S5 πτυχωτό φύλλο καθώς και τα υδροφοβικά  $\text{R}^{358}$ ,  $\text{A}^{360}$ , and  $\text{Y}^{377}$  της F3, αλληλεπίδραση η οποία θεωρείται ισχυρή. Οποιαδήποτε μετάλλαξη στην ιντεγκρίνη ή στη ταλίνη που διακόπτει αυτή την ισχυρή αλληλεπίδραση καταργεί την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [278, 279]. Έπειτα από την ισχυρή αλληλεπίδραση συμβαίνει η αλληλεπίδραση με την κοντινή στη μεμβράνη  $\beta_3$  αλληλουχία  $^{722}\text{HDRKEFAKFEEER}^{726}$  (MP), η οποία θεωρείται ασθενής αλληλεπίδραση. Αυτές οι διαδοχικές αλληλεπιδράσεις υποστηρίζονται από την παρατήρηση ότι η ταλίνη



μπορεί να προσδένεται στη  $\beta 3$  ακόμα και όταν η ασθενής αλληλεπίδραση διαταράσσεται σε ένα σύστημα όπου η μεμβράνη είναι ανύπαρκτη [278]. Εάν η ισχυρή ή η ασθενής αλληλεπίδραση συμβαίνει διαδοχικά ή ταυτόχρονα δεν είναι σαφές [280].

Η ασθενής αλληλεπίδραση εξαρτάται από την παρουσία της ισχυρής αλληλεπίδρασης. Εκτός από τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις στην σταθεροποίηση της πρόσδεσης της ταλίνης στην ιντεγκρίνη και στην ενεργοποίηση της, συμβάλλει και η αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων F2 και F3 [278, 281] και F1 [282] περιοχών με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της μεμβράνης.



**Εικόνα 3.8.** Μοντέλο της επαγόμενης από την ταλίνη ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης. (Α) Η F3 περιοχή, απελευθερωμένη από την ουρά, συνδέεται στη  $\beta 3$  MD περιοχή (κόκκινο) όμως οι διεπαφές των  $\alpha$  και  $\beta$  παραμένει ανέπαφη (Β). Η F3 αλληλεπιδρά με την MP περιοχή, διασπά τη γέφυρα άλατος ανάμεσα στις δύο CT περιοχές (C) και δημιουργούνται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της F3 και της μεμβράνης [278]. Η πρόσδεση αυτή αλλάζει το προσανατολισμό των  $\alpha$  και  $\beta$  διαμεμβρανικών ελίκων, ενώ έχει ως αποτέλεσμα της δημιουργία στερεοχημικής παρεμπόδισης ανάμεσα στη ταλίνη και την  $\alpha_{IIb}$ . (Δ) Η κεφαλή

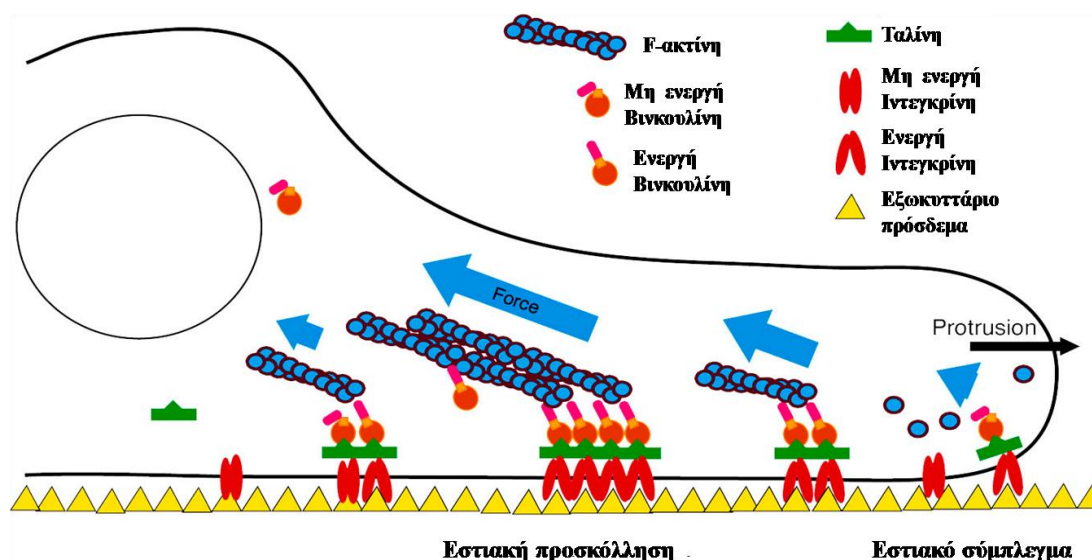
αλληλεπικαλύπτεται με την CT ουρά της  $\alpha_{IIb}$  στη δομή Rosetta, υποδηλώνοντας δυνητική στερεοχημική παρεμπόδιση [283].

Εκτός από την θέση πρόσδεσης στην κεφαλή (IBS-1), κατέχει και μια δεύτερη θέση πρόσδεσης (IBS-2) η οποία βρίσκεται στην αμινοξικό τμήμα 1974-2293 της ουράς και βρέθηκε να έχει παρόμοια συγγένεια πρόσδεσης με τη  $\beta_3$ -ιντεγκρίνη όπως και η θέση πρόσδεσης της κεφαλής [284]. Όμως η θέση IBS-2 εμποδίζεται από τα C-τελικά αμινοξέα κάνοντας τη συγγένεια της ουράς πιο ασθενή από αυτή της κεφαλής. Βρέθηκε μια συγγένεια των 34.5 nM της ουράς για τη  $\beta_3$ -ιντεγκρίνη [285], η οποία είναι μεγαλύτερη από τη δημοσιευμένη για τη κεφαλή συγγένεια [286]. Έτσι προτάθηκε ότι υπάρχουν δύο ανασταλτικοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την σύνδεση ταλίνης-ιντεγκρίνης και ότι η θέση πρόσδεσης IBS-1 ενεργοποιεί την ιντεγκρίνη, ενώ η IBS-2 σταθεροποιεί τη σύνδεση ταλίνης-ιντεγκρίνης, ελευθερώνοντας τη κεφαλή να αλληλεπιδράσει με άλλα μόρια όπως η PIPKIγ [287].

### 3.7. Αλληλεπιδράσεις της ταλίνης με τη βινκουλίνη και την ακτίνη

Στα κύτταρα η βινκουλίνη βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στην αυτοανестаλμένη της μορφή, ενώ στις περιοχές εστιακής προσκόλλησης βρίσκεται τόσο στην ενεργή της όσο και στην αυτοανестаλμένη της μορφή [288]. Στην ενεργή της μορφή αλληλεπιδρά με τη ταλίνη και την F-ακτίνη. Στην ουρά της ταλίνης υπάρχουν 11 κρυμμένες θέσεις σύνδεσης της βινκουλίνης, που για την έκθεσή τους απαιτείται άσκηση δύναμης από το σύμπλεγμα ιντεγκρίνης/ταλίνης/ακτίνης [289]. Η βινκουλίνη εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της ταλίνης, αφού η έκφραση της δομής της Vd1, η οποία συνδέεται με την ταλίνη, έχει δείξει ότι προωθεί τη μεγέθυνση της εστιακής προσκόλλησης μέσω ενός μηχανισμού που βασίζεται στη πρόσδεση της στη ταλίνη και είναι ανεξάρτητη από την συστολή της ακτομυοσίνης. Δηλαδή, μια υπόθεση είναι ότι η ενεργή βινκουλίνη κλειδώνει την ταλίνη στην ενεργοποιημένη της μορφή στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης και έτσι επάγεται η στρατολόγηση περεταίρω μορίων βινκουλίνης και ταλίνης και άρα η αύξηση της προσκόλλησης. Έτσι δημιουργείται μια ιδανική πλατφόρμα για την στρατολόγηση άλλων FA συστατικών και πρόσδεση στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (εικόνα 3.9) [290].

Η ταλίνη έχει θέσεις πρόσδεσης για την ακτίνη στη κεφαλή (F2 και F3 περιοχές) και δύο απόμακρες θέσεις στο C-τελικό άκρο της ουράς [291], οι οποίες μαζί συνιστούν το THATCH (Talin/HIP1R/Sla2p) διμερές που αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 2300-2541 της ουράς [271]. Η πρόσδεση της ακτίνης απαιτεί το διμερισμό της ταλίνης. EM πειράματα έδειξαν ότι το THATCH διμερές συνδέεται με 3 μονομερή ακτίνης κατά μήκος του βήματος της ίδιας έλικας της νηματώδης ακτίνης. Πιθανώς, η ικανότητα της ταλίνης να δεσμεύει την ακτίνη, οφείλεται στη παρουσία των άλλων δύο θέσεων πρόσδεσης της ακτίνης.



**Εικόνα 3.9.** Μοντέλο αλληλεπίδρασης ταλίνης-βινκουλίνης-ακτίνης. Η βινκουλίνη εκτίθεται και ενεργοποιείται από τις δυνάμεις που ασκούνται από το μηχανισμό της ακτομυοσίνης και κατέχει ισχυρό ρόλο στην σύνδεση της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό [290].

### 3.8. Ανταγωνισμός και φωσφορυλίωση

Το σύμπλοκο ταλίνης-ιντεγκρίνης μπορεί να αλλάξει από αρνητικούς ρυθμιστές της ενεργοποίησης που ανταγωνίζονται την ταλίνη, όπως η φιλαμίνη, αφού δομικές αναλύσεις ανακάλυψαν επικάλυψη στις θέσεις πρόσδεσης των δύο πρωτεϊνών, εξηγώντας έτσι πώς ο ανταγωνισμός τους μπορεί να ρυθμίζει την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [292]. Η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης στο  $^{744}\text{NPxY}^{747}$  μοτίβο της  $\beta_3$  μειώνει τη πρόσδεση της ταλίνης, ενώ αυξάνει τη πρόσδεση άλλων μορίων όπως η Shc και η Dok1, οι οποίες προσδένονται στη φωσφορυλιωμένη  $\beta_3$  CT ουρά [293]. Η



Dok1 συνδέεται στη φωσφορυλιωμένη στη  $Y^{747}$  με μεγαλύτερη συγγένεια από την ταλίνη, μειώνοντας έτσι την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης.

Η ταλίνη αποτελεί ένα *in vitro* υπόστρωμα της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) στα αιμοπετάλια και η ενεργοποίηση από τη θρομβίνη οδηγεί στη δυνατότητα διακίνησης της ταλίνης από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη. Φωσφορυλιώνεται από την PKC σε κατάλοιπα S και T στη κεφαλή της [294] και αποτελεί υπόστρωμα για την CdK5 [264]. Πειράματα φασματομετρίας μάζας αποκάλυψαν 30 θέσεις φωσφορυλίωσης στη ταλίνη [295], αλλά μόνο ελάχιστα δεδομένα υποστηρίζουν τη λειτουργική σημασία σε αυτή τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Η φωσφορυλίωση στη  $S^{425}$  της κεφαλής από τη CdK5, εμποδίζει τη πρόσδεση και ουβικουϊτίνωση από την Smurf1. Ωστόσο, η φυσιολογική σημασία της φωσφορυλίωσης της ταλίνης όσον αφορά τις επιπτώσεις στις σχετιζόμενες με την ιντεγκρίνη δράσεις είναι λιγότερο σαφής. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλίωσης της κεφαλής της ταλίνης από την PKC, η οποία σχετίζεται με την ανακατανομή της ταλίνης, αλλά είναι ανεξάρτητη από την πρωτεολυτική διάσπαση και την αλληλεπίδραση με την ιντεγκρίνη [296]. Έχει επίσης προταθεί ότι η φωσφορυλίωση της ταλίνης από την PKC ίσως να αναμειγνύεται στην αποσυναρμολόγηση της εστιακής προσκόλλησης [297].

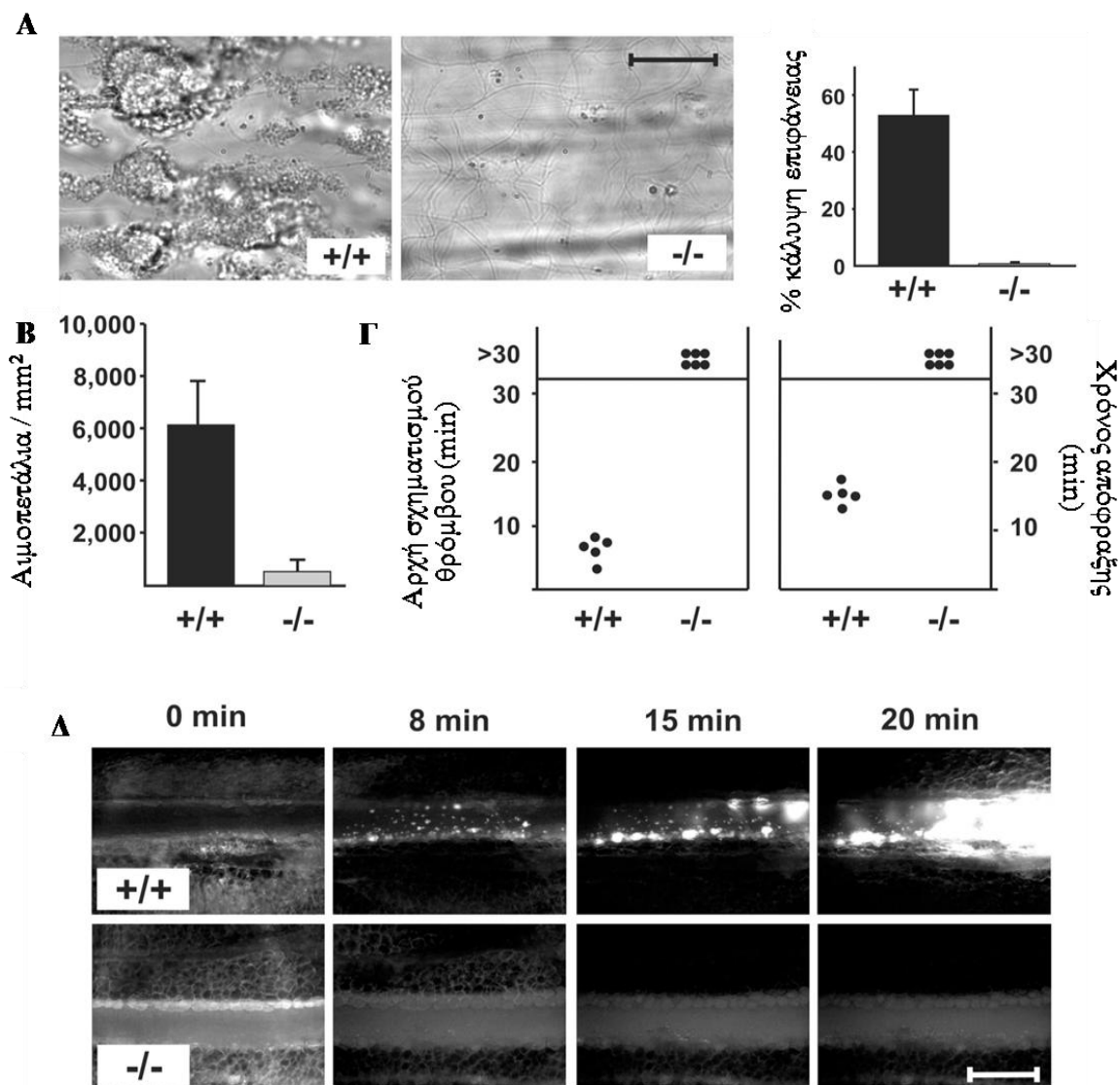
### 3.9. Ο ρόλος της ταλίνης στις λειτουργίες του αιμοπεταλίου μέσω της $\alpha_{IIb}\beta_3$

Η πρόσδεση της ταλίνης στη  $\beta_3$ -ιντεγκρίνη είναι αρκετή αλλά και αναγκαία για την ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [260]. Συνολικά γενετική αφαίρεση του γονιδίου της ταλίνης σε ποντίκια οδήγησε σε θνησιμότητα στην αρχική φάση της εμβρυικής ανάπτυξης [298]. Αργότερα, ακολούθησε μελέτη [299] σε ώριμα ποντίκια με επαγωγή αποτελεσματικής και μόνιμης διαγραφής του γονιδίου της ταλίνης ( $Tln^{-/-}$ ) σε όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων και των μεγακαρυοκυττάρων [300].

Αρχικά διερευνήθηκαν οι συνέπειες της παραπάνω διαγραφής στη λειτουργία της αιμόστασης, με πειράματα μέτρησης του χρόνου αιμορραγίας. Στα φυσιολογικά ποντίκια ο χρόνος αιμορραγίας ήταν  $7.3 \pm 2.2$  min, ενώ στα  $Tln^{-/-}$  ποντίκια ήταν μεγαλύτερος από 15 min. Έτσι προέκυψε ότι η ταλίνη είναι αναγκαία για την αναχαίτιση της αιμορραγίας έπειτα από τραυματισμό και το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώθηκε από τη μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων, ο οποίος ήταν ίδιος και στις δύο ομάδες. Επίσης, έγιναν πειράματα συσσωρευομετρίας με διάφορους αγωνιστές και στα  $Tln^{-/-}$  αιμοπετάλια δεν

παρατηρήθηκε καθόλου συσσώρευση, αν και όλοι οι αγωνιστές προκάλεσαν την ενεργοποίηση και αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων. Επίσης στα  $Tln^{-/-}$  αιμοπετάλια δεν παρατηρήθηκε πρόσδεση του ινωδογόνου. Η μη πρόσδεση του ινωδογόνου οφείλεται στην βλάβη της «μέσα-έξω» ενεργοποίησης, αφού το  $Mn^{2+}$ , γνωστό ως εξωγενής ενεργοποιητής των  $\beta_1$  και  $\beta_3$  ιντεγκρινών [301, 302], επέφερε τη πρόσδεση του ινωδογόνου και στις δύο ομάδες.

Η  $\alpha_{IIb}\beta_3$  παίζει ρόλο στη στενή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην ECM, όπου δρα συνεργατικά με την  $\alpha_2\beta_1$  ιντεγκρίνη, τον υποδοχέα του κολλαγόνου [141, 303]. Τα  $Tln^{-/-}$  αιμοπετάλια δεν κατάφεραν να προσκολληθούν σε επιφάνεια στρωμένη με κολλαγόνο ούτε σε κολλαγόνο τύπου I, διαδικασία που μεσολαβείται από την  $\alpha_2\beta_1$  σε αντίθεση με τα φυσιολογικά. Έτσι προκύπτει ότι εκτός από την βλάβη στην ενεργοποίηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , παρατηρείται βλάβη και στην ενεργοποίηση της  $\alpha_2\beta_1$ . Τέλος, μελετήθηκε η δημιουργία παθολογικού θρόμβου *in vivo*, με τον τραυματισμό μεσεντερικής αρτηρίας με  $FeCl_3$  (εικόνα 3.10 Δ). Τα  $Tln^{-/-}$  αιμοπετάλια προσκολλήθηκαν μόνο παροδικά στη θέση βλάβης, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός θρόμβου και η ροή του αίματος ήταν ομαλή κατά τη διάρκεια καταγραφής της ροής. Έτσι η ταλίνη φαίνεται να είναι επίσης αναγκαία για τη διαδικασία της προσκόλλησης μέσω των  $\beta_1$  και  $\beta_3$  ιντεγκρινών [304].



**Εικόνα 3.10.** A) Ελαττωματική προσκόλληση των  $Tln^{-/-}$  αιμοπεταλίων. Ολικό αίμα από φυσιολογικά και  $Tln^{-/-}$  ποντίκια εγχύθηκε σε επιφάνεια καλυμμένη με κολλαγόνο με ταχύτητα ροής  $1000\text{ s}^{-1}$ . Το διάγραμμα με το ποσοστό κάλυψης επιφάνειας, προέκυψε από το πέρας της έγχυσης (4 min). In vivo ανάλυση των  $Tln^{-/-}$  αιμοπεταλίων κατά τη θρόμβωση. B) Τα αιμοπετάλια που προσκολλήθηκαν έπειτα από σχηματισμό θρόμβου με  $\text{FeCl}_3$  έπειτα από 5 min. Δ) In vivo βίντεο μικροσκοπία, όπου φαίνεται ή έναρξη σχηματισμού του θρόμβου (7 min) και η έναρξη απόφραξης του αγγείου (15 min) στα φυσιολογικά (πάνω σειρά), σε αντίθεση με τα  $Tln^{-/-}$  αιμοπετάλια (κάτω σειρά), τα οποία αναπαρίστανται στο διάγραμμα Γ [299].



## Η ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ως θεραπευτικός στόχος

### 4. Θεραπευτική προσέγγιση της παθοφυσιολογίας των αιμοπεταλίων

#### 4.1. Η ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ από την ανακάλυψη έως τη θεραπεία

Το 1882 ο Ιταλός γιατρός Giulio Bizzozzero, ο οποίος ανακάλυψε τα αιμοπετάλια ως στοιχείο του αίματος, παρατήρησε ότι είχαν μια τάση να συσσωρεύονται και πιθανώς να συμβάλλουν στη διαδικασία της θρόμβωσης. 40 χρόνια αργότερα ο Ελβετός γιατρός Eduard Glanzmann περιέγραψε μια ομάδα ασθενών, οι οποίοι εμφάνισαν ελαττωματική συσσώρευση που σχετίζεται με αιμορραγική διάθεση. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου μισού του 20ου αιώνα, πολλοί ερευνητές θέλησαν να ρίξουν φως στην κυτταρική και μοριακή βάση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Έτσι καθιερώθηκε ότι η κύρια αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  μεσολαβεί στη διαδικασία αυτή και δρα ως υποδοχέας, που με τη πρόσδεση του προσδέματος σε αυτόν, μπορεί να γεφυρώνει τα αιμοπετάλια μεταξύ τους [305].

Η υπερβολική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μετά τη ρήξη της πλάκας υπερνικά τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της αιμόστασης και οδηγεί στη δημιουργία υψηλών επιπέδων θρομβίνης και το σχηματισμό αποφρακτικού θρόμβου στη περιοχή της ρήξης [306]. Πραγματικά, η υπερβολική συσσώρευση σχετίζεται άμεσα με τη παθοφυσιολογία της καρδιαγγειακής νόσου (CVD), όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η ασταθής και σταθερή στηθάγχη και το ισχαιμικό επεισόδιο. Κάθε χρόνο από το 1900 οι θάνατοι από CVD στην Αμερική ξεπερνούσαν τους θανάτους από άλλες σοβαρές ασθένειες όπως ο καρκίνος, χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις και τροχαία. Η θεραπεία της νόσου έχει προοδεύσει σημαντικά όπως προκύπτει από την κατά 30,6% μείωση των θανάτων από CVD από το 1998 μέχρι το 2008 [307].

Με την καθιερωμένη απόδειξη για τον κεντρικό ρόλο που κατέχει η συσσώρευση στην θρόμβωση, η αναστολή της διαδικασίας αυτής αποτέλεσε ελκυστικό στόχο για τη δημιουργία φαρμάκων με σκοπό τη μείωση της θνησιμότητας από CVD. Κατά τα τέλη του 1970 και αρχές του 1980, η κατανόηση της μοριακής βάσης της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης εστίασε την προσοχή στο σημαντικό ρόλο της ιντεγκρίνης  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  και πρότεινε ότι αυτός ο υποδοχέας αποτελεί ένα λογικό στόχο της αντιθρομβωτικής θεραπείας. Προσδέματα που προσδένονται στην ιντεγκρίνη και μεσολαβούν στη

συσσώρευση είναι το ινωδογόνο και ο vWF, ενώ τα υπόλοιπα προσδέματα συμβάλλουν στη ρύθμιση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης [168]. Κοινό και επικρατές χαρακτηριστικό των προσδεμάτων είναι η παρουσία σε αυτά ενός ή περισσότερων όξινων RGD αλληλουχιών. Η RGD αλληλουχία μπορεί να αναστέλλει τη πρόσδεση των προαναφερθέντων προσδεμάτων στην ιντεγκρίνη και συνεπώς την συσσώρευση [308, 309]. Έτσι, RGD-πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο εκκίνησης για το σχεδιασμό των α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> ανταγωνιστών [310].

Επομένως, η παραπάνω λογική αποτέλεσε το θεμέλιο για την ανάπτυξη μιας νέας αντιθρομβωτικής στρατηγικής και από τα τέλη του 1980 και αρχές του 1990, οι περισσότερες φαρμακοβιομηχανίες ξεκίνησαν μεγάλα οικονομικά προγράμματα για την ανάπτυξη α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> ανταγωνιστών. Η προσέγγιση ξεκίνησε με την ανάπτυξη αντισωμάτων ή πεπτιδίων που προσδέονται στην ιντεγκρίνη [64, 311, 312], τα οποία αποτέλεσαν τους πρόδρομους ανταγωνιστές για αυτούς που τελικά χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των ασθενών.

#### 4.2. GPIIb/IIIa ανταγωνιστές

Οι α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> ανταγωνιστές αναπτύχθηκαν με σκοπό την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, όμως παράλληλα τη διατήρηση του αιμοπεταλιακού μονοστρώματος στην θέση αγγειακού τραύματος. Πολλοί ενδοφλέβιοι χορηγούμενοι ανταγωνιστές αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν σε κλινικές δοκιμές, όμως 3 από αυτούς πήραν την έγκριση από τον FDA. Απέχουν πολύ στο σχεδιασμό ο ένας από τον άλλο (αντισώματα, πεπτίδια, μη πεπτιδικά μόρια), ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς από τουλάχιστον 8.000.000 ασθενείς μέχρι σήμερα [313]. Είναι σημαντικό ότι η ορθολογική στόχευση της ιντεγκρίνης και η κλινική αποτελεσματικότητα των ανταγωνιστών καθιέρωσαν τον κεντρικό τους ρόλο στη διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση (PCI).

Συνοπτικά, ο πρώτος που παράχθηκε και εγκρίθηκε το 1994 και χρησιμοποιήθηκε για τη πρόληψη ισχαιμικών επιπλοκών έπειτα από αγγειοπλαστική, είναι το Abciximab (ReoPro) [314]. Είναι ένα 48 kDa Fab τμήμα ενός χιμαιρικού ανθρώπινου ή ποντικίσιου μονοκλωνικού αντισώματος, που ο επίτοπος του είναι μια αλληλουχία που βρίσκεται κοντά στην MIDAS περιοχή της β<sub>3</sub> [315]. Έχει μεγάλη συγγένεια σύνδεσης για τα αιμοπετάλια και η σύνδεση είναι μη αντιστρεπτή. Ο δεύτερος ανταγωνιστής, ο οποίος πήρε έγκριση το 1998 για τη θεραπεία ασθενών με ACS και αυτούς που υποβάλλονται

σε PCI, είναι το Eptifibatide (Integrilin). Είναι ένα συνθετικό επταπεπτίδιο βασισμένο στην KGD αλληλουχία της βαρβουρίνης, μιας δισιντεγκρίνης από το δηλητήριο φιδιών [316]. Συνδέεται αποκλειστικά στην  $\alpha_{IIb}\beta_3$  και αναστέλλει ισχυρά και αντιστρεπτά την συσσώρευση μέσω της αναστολής πρόσδεσης του ινωδογόνου [317]. Η δραστηριότητα του βελτιώθηκε με κυκλοποίηση του με δισουλφιδικό δεσμό. Ο τρίτος ανταγωνιστής είναι το Tirofiban (Aggrastat), το οποίο πήρε και αυτό έγκριση το 1998 μετά από κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με ACS. Είναι ένα πεπτιδομιμητικό ανάλογο τυροσίνης που περιέχει την RGD αλληλουχία και προσδένεται εξειδικευμένα στην  $\alpha_{IIb}\beta_3$  των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Αναστέλλει τη συσσώρευση του PRP έχοντας  $IC_{50}$  31-66 nM αναλόγως τον αγωνιστή [318].

Ωστόσο, οι χρησιμοποιούμενοι ανταγωνιστές έχουν σοβαρά μειονεκτήματα, εκτός του ότι χορηγούνται ενδοφλεβίως. Η αιμορραγία είναι η κύρια επιπλοκή των παραπάνω ανταγωνιστών και είναι πιο συχνή με τη χρήση τους σε σχέση με άλλους αναστολείς των αιμοπεταλίων [319]. Εκτός από την αιμορραγία, η θρομβοπενία [320] και κάποιες σοβαρές αντιδράσεις έπειτα από την επαναχορήγηση τους αποτελούν σοβαρά μειονεκτήματα [321]. Αν και τα οφέλη των ανταγωνιστών δεν ήταν τα αναμενόμενα σε όλες τις κλινικές μελέτες, παραμένουν ένα ισχυρό θεραπευτικό συμπλήρωμα σε υψηλού κινδύνου και ασταθείς ασθενείς που υποβάλλονται σε PCI [305].

#### 4.3. Αποτυχία των από του στόματος χορηγούμενων GPIIb/IIIa ανταγωνιστών

Από του στόματος δραστηκοί  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ανταγωνιστές αναπτύχθηκαν με την ελπίδα ότι θα παρείχαν μακροχρόνια καταστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και συνεπώς δευτερογενή πρόληψη της CVD. Τέσσερις τέτοιοι ανταγωνιστές, έφτασαν σε επίπεδο δοκιμών σε 5 μεγάλες, φάσης III, κλινικές μελέτες [322] και αρκετοί άλλοι με ενθαρρυντικά προκλινικά προφίλ βρισκόταν υπό φαρμακευτική αγωγή. Όμως, προς έκπληξη και απογοήτευση όλων καμιά από τις 5 μελέτες δεν είχε ωφέλιμα αποτελέσματα και οι 4 από αυτές τερμάτισαν πρόωρα εξαιτίας ανεπιθύμητων παρενεργειών. Μια συνδυαστική ανάλυση επιβεβαίωσε αυτή την έλλειψη αποτελεσματικότητας και αποκάλυψε μια ιδιαίτερα σημαντική αύξηση (35%) σε θνησιμότητα στους 45.523 ασθενείς που συμμετείχαν σε αυτές τις μελέτες [323]. Αυτό το αρνητικό κλινικό αποτέλεσμα τερμάτισε και ακύρωσε όλα τα προγράμματα ανάπτυξης φαρμάκων αυτής

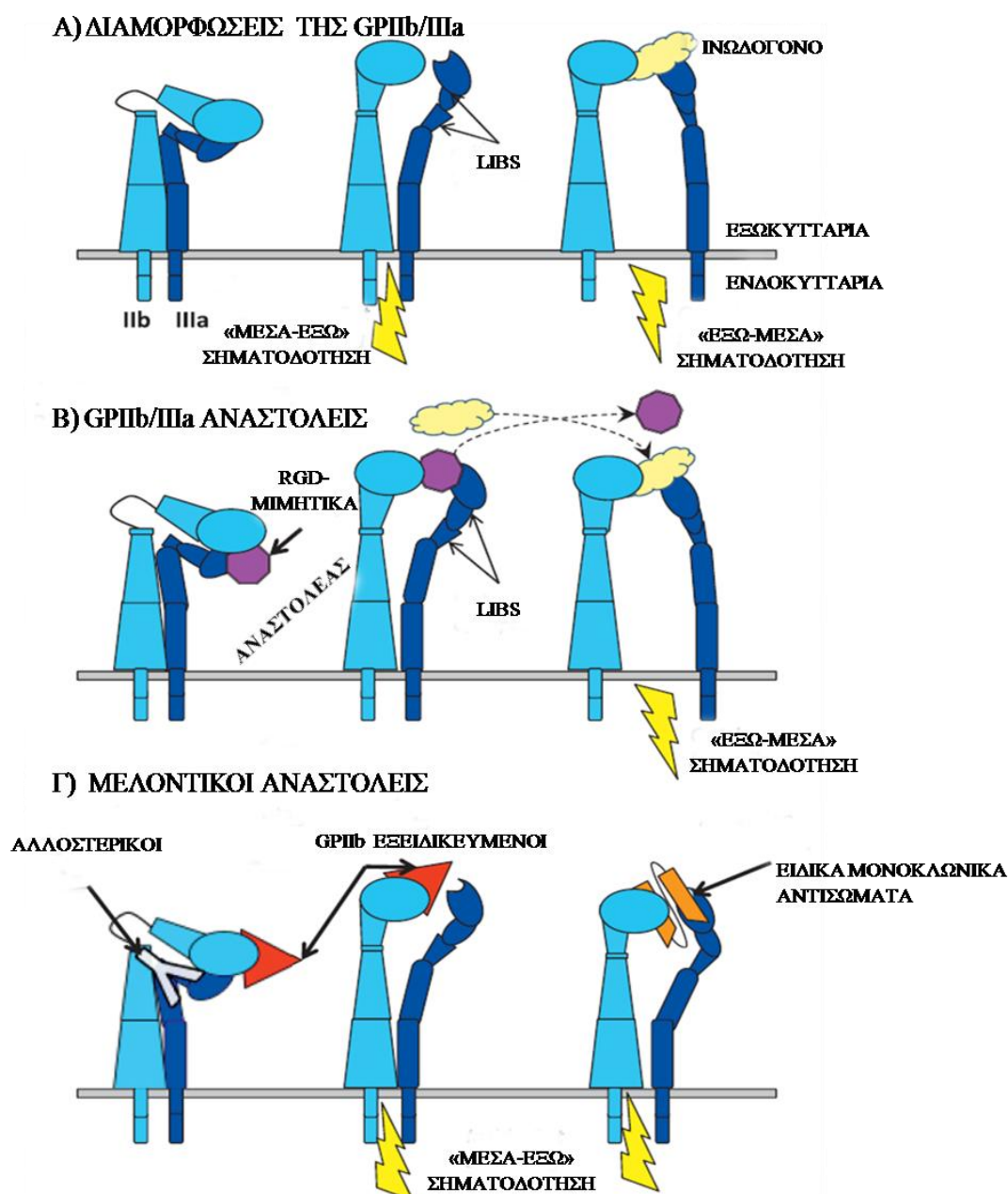
της κατηγορίας και οδήγησε σε μεγάλες οικονομικές απώλειες φαρμακευτικών εταιρειών [322].

#### 4.4. Προσδεματο-μιμητικοί ανταγωνιστές της $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ : Η λάθος στρατηγική για τον σωστό στόχο;

Τα αρνητικά αποτελέσματα από τη χρήση των  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  ανταγωνιστών δημιούργησαν ερωτηματικά τόσο για την διερεύνηση των κατάλληλων ανταγωνιστών όσο και για τον προσανατολισμό της θεραπείας. Όμως, υπάρχουν ολοένα αυξανόμενες ενδείξεις ότι δεν είναι ο στόχος αλλά η στρατηγική προσέγγισης του στόχου, η οποία προκάλεσε προβλήματα και πλέον βασίζεται στη καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας και λειτουργίας της ιντεγκρίνης υπόσχοντας εναλλακτική προσέγγιση, η οποία βρίσκεται υπό ανάπτυξη [324, 325].

Όπως προαναφέρθηκε, οι δύο R(K)GD-βασισμένοι ανταγωνιστές: το tirofiban και το eptifibatide μιμούνται απευθείας τη θέση πρόσδεσης του ινωδογόνου, ενώ ο τρίτος προσδεματο-μιμητικός: το μονοκλωνικό αντίσωμα abciximab συνδέεται κοντά στη θέση πρόσδεσης του ινωδογόνου. Οι ιντεγκρίνες δρουν ως 'αισθητήρες' και αναγνωρίζουν τη πρόσδεση του προσδέματος με αλλαγές στη διαμορφωτική τους κατάσταση, το οποίο μεταφέρεται σαν ένα, από τα έξω προς τα μέσα, σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου [160]. Μια συνέπεια της επαγόμενης αλλαγής στη διαμόρφωση της εξωκυττάριας δομής της ιντεγκρίνης είναι η έκθεση των αποκαλούμενων, επαγόμενων από το πρόσδεμα θέσεων πρόσδεσης LIBS (εικόνα 4.1). Ένα μικρό ποσοστό ασθενών έχουν αναπτύξει κυκλοφορούντα αντισώματα και μετά τη χορήγηση των αναστολέων μπορεί να πραγματοποιηθεί οξεία ανοσολογική αντίδραση, προκαλώντας θρομβοπενία [326]. Χρησιμοποιώντας της έκθεση των LIBS σαν μέτρο της διαμορφωτικής αλλαγής της ιντεγκρίνης, το abciximab επέφερε μικρότερη πρόσδεση των αντισωμάτων anti-LIBS στην ιντεγκρίνη, σε σχέση με τους άλλους δύο [327]. Ένα άλλο είδος ανταγωνιστών είναι οι μικρού μορίου προσδεματο-μιμητικοί αναστολείς, με σχετικά μικρό χρόνο ημιζωής, οι οποίοι συνδέονται αλλά και αποσυνδέονται συνεχώς με αποτέλεσμα να επάγουν μια υψηλής συγγένειας για το πρόσδεμα διαμόρφωση. Όταν η συγκέντρωση του φαρμάκου είναι υψηλή, τότε αυτό ανταγωνίζεται πλήρως τις θέσεις πρόσδεσης. Όταν η συγκέντρωση μειώνεται, η ιντεγκρίνη παραμένει στην ενεργοποιημένη της διαμόρφωση (εικόνα 4.1B) [328].





**Εικόνα 4.1.** Μοντέλα των διαμορφωτικών καταστάσεων της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ή υπό την παρουσία αναστολέων. Α) Κατά τη ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση, αλλάζει η εξωκυττάρια διαμόρφωση, αυξάνεται η συγγένεια πρόσδεσης για το πρόσδεμα και με τη πρόσδεση του ινωδογόνου, επάγεται η ‘έξω-μέσα’ σηματοδότηση. Β) Οι RGD-μιμητικοί αναστολείς είναι ικανοί να προσδεθούν στην ανενεργή διαμόρφωση, αλλά επάγουν επίσης και την επέκταση της ιντεγκρίνης. Γ) Οι μελλοντικοί θεραπευτικοί αναστολείς περιλαμβάνουν αλλοστερικούς παράγοντες που διατηρούν την ιντεγκρίνη στην ανενεργή της μορφή,  $\alpha_{IIb}$  εξειδικευμένοι αναστολείς που δεν επάγουν πλήρως την επέκταση της ιντεγκρίνης και ειδικά αντισώματα που εμποδίζουν πλήρως τη δέσμευση του ινωδογόνου [329].

#### 4.5. Σύγχρονες, πολλά υποσχόμενες, θεραπευτικές προσεγγίσεις της $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

Είναι σαφές και αδιαμφισβήτητος ο σημαντικός ρόλος της ιντεγκρίνης στη συσσώρευση και το σχηματισμό θρόμβου. Δεδομένης της αρχής ότι η στόχευση της ιντεγκρίνης παραμένει μια καλή στρατηγική, μερικοί ερευνητές κατευθύνθηκαν στο να προσδιορίσουν νέους  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  ανταγωνιστές, οι οποίοι θα μπορούσαν να μην επάγουν δομικές αναδιαμορφώσεις με την πρόσδεσή τους στην ιντεγκρίνη ή την διάστασή τους από αυτήν και με αυτό τον τρόπο θα μπορούσαν να συμβάλλουν λιγότερο ή καθόλου στην αιμορραγία ή θρομβοπενία σε ορισμένους ασθενείς. Δύο πιθανές προσεγγίσεις έχουν προταθεί για την επίτευξη του παραπάνω στόχου: Βρίσκοντας αναστολείς, οι οποίοι προσδένονται στην εξωκυττάρια περιοχή, όπως οι σημερινοί  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  ανταγωνιστές, χωρίς όμως να προωθούν αλλαγές στην εξωκυττάρια διαμόρφωση της  $\beta_3$  υπομονάδας και συνεπώς τη πρόσδεση του προσδέματος, ή βρίσκοντας αναστολείς, οι οποίοι εμποδίζουν την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης με την αλληλεπίδραση τους με τις κυτταροπλασματικές υπομονάδες της ιντεγκρίνης [305, 330].

##### 4.5.1. Καινούργιοι $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ανταγωνιστές που στοχεύουν στην εξωκυττάρια περιοχή και διαμόρφωση της ιντεγκρίνης

Οι έρευνες ξεκίνησαν με σκοπό τη χαρτογράφηση της περιοχής της  $\alpha_{\text{IIb}}$  υπομονάδας, στην οποία συνδέεται η HHLGGAKQAGDV αλληλουχία της  $\gamma$  αλυσίδας ινωδογόνου, με σκοπό την ανάπτυξη νέων αναστολέων της συσσώρευσης μέσω ενός εναλλακτικού μη-RGD μονοπατιού, το οποίο ακολουθούν οι  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  ανταγωνιστές. Η έρευνα ξεκίνησε από το δικό μας εργαστήριο [331] και αποκάλυψε όχι μόνο την  $^{313}\text{YMESRADRKLAEVGRVYLFL}^{332}$  αλληλουχία της  $\alpha_{\text{IIb}}$  ως πιθανή περιοχή αλληλεπίδρασης με το ινωδογόνο, αλλά και την προερχόμενη από την παραπάνω αλληλουχία αναστολή της ενεργοποίησης της  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  μέσω ενός εξαρτώμενου από την «έξω-μέσα» σηματοδότηση μονοπατιού. Η σπουδαιότητα της περιοχής 313-332 στη πρόσδεση του ινωδογόνου φαίνεται και από το γεγονός ότι δύο αντικαταστάσεις αμινοξέων (E324K και R327H) που οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις, εμφανίζονται στους ασθενείς με Glanzmann θρομβασθένεια [332-334].

Ακολούθησαν πειράματα από την ερευνητική ομάδα του Mitsios et al., πάλι από ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας, χρησιμοποιώντας συνθετικά διαδοχικά

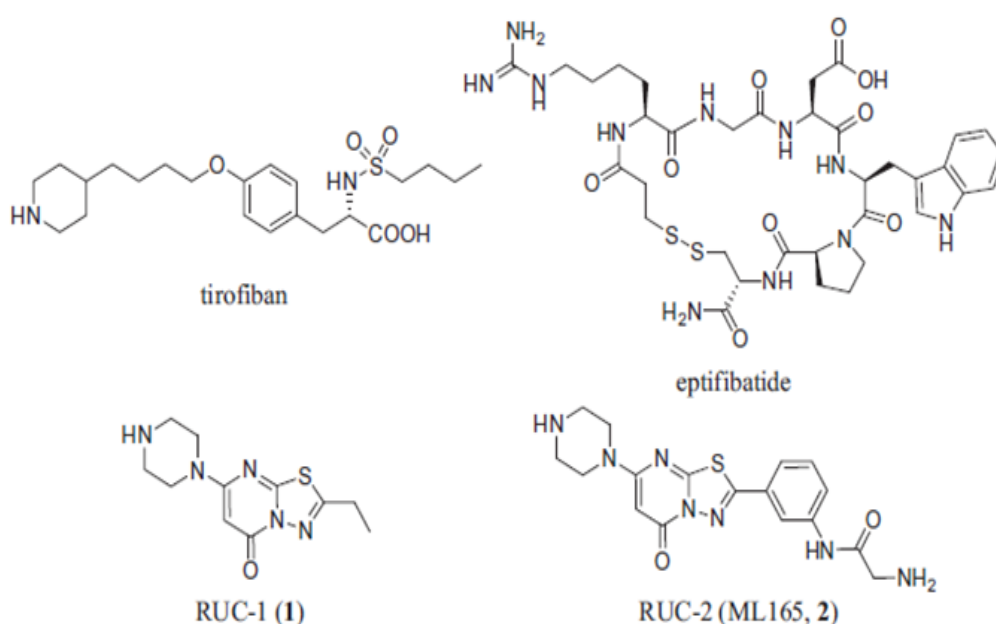
οκταπεπτίδια προερχόμενα από την παραπάνω αλληλουχία και προέκυψε ότι μόνο αυτά που περιείχαν την RAD αλληλουχία εμφάνισαν αυξημένη βιολογική δράση, με το  $^{313}\text{YMESRADR}^{320}$  να εμφανίζει την καλύτερη ανασταλτική δράση [335]. Φάνηκε να αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ανθρώπινο PRP, την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης και τη πρόσδεση του ινωδογόνου σε αυτήν, αποτελέσματα που οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι μπορεί να αλληλεπιδρά με το πρόσδεμα παρά με την ιντεγκρίνη.

Τέλος, μελετήθηκε, από την ίδια ερευνητική ομάδα, η δράση του οκταπεπτιδίου *in vivo* σε πειραματικά επαγόμενη αρτηριακή θρόμβωση σε κουνέλια [336]. Η χορήγηση του σε διάφορες δόσεις από 3 έως 15 mg/kg παρέτεινε την λειτουργική ροή της καρωτιδικής αρτηρίας και δεν παρατηρήθηκε έμφραξη της μέχρι το τέλος της διαδικασίας (90 min μετά την ηλεκτρική διέγερση). Επίσης ανέστειλε και *ex vivo* την συσσώρευση των αιμοπεταλίων των κουνελιών καθώς και το μέγεθος του θρόμβου. Τα παραπάνω όμως ευρήματα παρατηρήθηκαν στις δόσεις των 12 και 15 mg/kg. Τέλος, δεν επηρέασε κάποια παράμετρο της διαδικασίας της πήξης ή της αιμόστασης στα φυσιολογικά κουνέλια.

Και άλλες ερευνητικές ομάδες, αναγνωρίζοντας το κρίσιμο ρόλο της  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  στη θρόμβωση και τις συνέπειες της στην ανθρώπινη υγεία, επιδίωξαν να βρουν  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  ανταγωνιστές που να ανταγωνίζονται τη πρόσδεση του ινωδογόνου χωρίς όμως να αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή σηματοδότηση. Οι δύο κύριες διαμορφωτικές αλλαγές της ιντεγκρίνης είναι η επέκταση και το άνοιγμα της κεφαλής, όπου η  $\beta_3$  υβριδική περιοχή απομακρύνεται από την  $\alpha_{\text{IIb}}$   $\beta$ -προπέλα στη περιοχή της σύνδεσής τους. Αυτή η περιοχή αποτελεί τη θέση δέσμευσης του προσδέματος και κρυσταλλικές μελέτες της περιοχής αυτής με το eptifibatide ή το tirofiban ή άλλους RGD-ανταγωνιστές, καθώς και με πεπτίδιο που αντιστοιχεί στη  $\gamma$ -αλυσίδα του ινωδογόνου, αναγνώρισαν ένα κοινό μηχανισμό πρόσδεσης που περιλαμβάνει το  $\text{D}^{224}$  της  $\alpha_{\text{IIb}}$  με την R ή τη K της ένωσης και συντονίζοντας το ιόν  $\text{Mg}^{2+}$  της MIDAS στη  $\beta_3$  υπομονάδα μέσω ενός από τα άτομα O του καρβοξυλίου του D της ένωσης [67, 181]. Επειδή η έγκαιρη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου με  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  ανταγωνιστές μπορεί να εμποδίσει τη καρδιακή βλάβη [337], θα ήταν πολύ επιθυμητό να υπήρχαν από το στόματος παράγοντες που θα αναστέλλουν την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης, αλλά όχι την εξωκυττάρια διαμόρφωση.

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε από μια άλλη ερευνητική ομάδα ένα μικρό μόριο  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  αναστολέας με όνομα RUC-1 (MB: 265), το οποίο αναγνωρίστηκε με διαλογή υψηλής απόδοσης, μία μέθοδο που βασίζεται στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο

ακίνητοποιημένο ινωδογόνο [338, 339]. Είναι αποκλειστικά εξειδικευμένο για την  $\alpha_{IIb}\beta_3$  και έχει αντιθρομβωτική δράση τόσο σε μεγάλα όσο και σε μικρά αγγεία ποντικών, όταν χορηγείται σε δόση 25.6 mg/kg. Το RUC-1 διαφέρει από τα RGD-βασιζόμενα eptifibatide και tirofiban ως προς την έκθεση λιγότερων LIBS θέσεων στη  $\beta_3$  όπως ανιχνεύεται από τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs), προτείνοντας έτσι ότι δημιουργεί μικρότερες διαμορφωτικές αλλαγές στη  $\beta_3$  υπομονάδα [338, 340]. Μελέτες σύνδεσης με τη βοήθεια υπολογιστή επιβεβαιωμένες με προσομοίωση μοριακών δυνάμεων, δείχνει ότι η RUC-1 συνδέεται αποκλειστικά στην  $\alpha_{IIb}$  (εικόνα 4.1Γ), παρέχοντας μια πιθανή εξήγηση για τη μειωμένη ικανότητα της να εκθέτει LIBS θέσεις [339, 340].



**Εικόνα 4.2.** Χημικές δομές των tirofiban, eptifibatide, RUC-1 και RUC-2 [341].

Για την περαιτέρω διερεύνηση της θέσης πρόσδεσης και τη συσχέτιση ανάμεσα στο μηχανισμό πρόσδεσης και την επαγωγή διαμορφωτικών αλλαγών στην ιντεγκρίνη, συντέθηκαν διάφορα παράγωγα του RUC-1. Ένα από αυτά, το RUC 2, βρέθηκε να είναι 100 φορές πιο δραστικό ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και έτσι επιλέχτηκε για επιπλέον αξιολόγηση [342]. Είναι λίγο μεγαλύτερο από το RUC-1 (MB:385) (εικόνα 4.2), αλλά παραμένει κάτω από το κατωφλικό μοριακό βάρος (500g/mol), που χρησιμοποιείται για τις από του στόματος χορηγούμενες θεραπευτικές ουσίες. Διατηρεί πολλές ιδιότητες του RUC-1, συμπεριλαμβανομένης της εξειδίκευσης ως προς την  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Έχει την ίδια ικανότητα να μειώνει την επαγωγή LIBS θέσεων στη  $\beta_3$  και συνεπώς να επιφέρει μικρές αλλαγές στην διαμόρφωση της εξωκυττάριας περιοχής.

Με βάση τη παραπάνω υπόθεση και σε αντίθεση με τα αποτελέσματα με τη χρήση των eptifibatide και tirofiban, το RUC 2 δεν προκάλεσε την επέκταση της ιντεγκρίνης καθώς επίσης εμπόδισε την πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη [342]. Το RUC-2 υποβάλλεται σε επιπρόσθετες προκλινικές μελέτες για να εκτιμηθεί η καταλληλότητα του για χρήση σε ασθενείς με STEMI πριν τη νοσοκομειακή περίθαλψη και νοσηλεία [313].

Μια άλλη δυναμική εναλλακτική προσέγγιση είναι η παρεμπόδιση μονάχα της ενεργοποιημένης μορφής της ιντεγκρίνης (εικόνα 4.1 Γ). Η ομάδα του Schwarz M. et al. [326, 343] δημιούργησε ανθρώπινα, μονής αλυσίδας αντισώματα (sc Fv), τα οποία συνδέονται μόνο στην ενεργοποιημένη μορφή της ιντεγκρίνης. Αυτά τα μικρά, ανασυνδυασμένα τμήματα αντισώματος αποτελούνται από ελαφριές και βαριές αλυσίδες αντισωμάτων, τα οποία μαζί δημιούργησαν ένα απλό μόριο, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον από τη φαρμακευτική βιομηχανία [343, 344]. Αυτά τα anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$  αντισώματα δοκιμάστηκαν *in vivo* και *in vitro* και έδειξαν ότι δεν επάγουν την έκθεση των LIBS, πράγμα που κάνει τη θρομβοπενία λιγότερο πιθανή. Επιπλέον, δεν επάγουν τη πρόσδεση του ινωδογόνου και την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [343].

#### 4.5.2. Τροποποίηση RGD αναλόγων και βιολογική τους δράση

Η ύπαρξη της RGD αλληλουχίας ως περιοχή πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIb/IIIa έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και τη μελέτη RGD αναλόγων, πολλά από τα οποία παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση. Με τη πρώτη ματιά, δυο αλληλεπιδράσεις φαίνεται να είναι το κλειδί στο RGD σαν σημείο αναγνώρισης: το Asp αλληλεπιδρά με ένα μεταλλικό ιόν στη β υπομονάδα της ιντεγκρίνης, ενώ η παράπλευση αλυσίδα της Arg εκτείνεται σε αντίθετη κατεύθυνση για να σχηματίσει γέφυρα άλατος με ένα ή δύο Asp της α υπομονάδας της [345]. Για το λόγο αυτό η RGD αλληλουχία έχει διερευνηθεί εκτενώς. Το μικρό μέγεθος της RGD αλληλουχίας έχει ως συνέπεια τη μεγάλη ευκινησία του μορίου της σε διαλύματα. Η ευκινησία αυτή σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η RGD αλληλουχία είναι ένα γενικό μοτίβο που αναγνωρίζουν τουλάχιστον οι μισές ιντεγκρίνες, που έχουν ταυτοποιεί μέχρι σήμερα, καθιστούν πολύ δύσκολο το σχεδιασμό ισχυρών και εξειδικευμένων αναστολέων του υποδοχέα GPIIb/IIIa.

Τα περισσότερα δραστικά RGD, πεπτιδικά ή μη ανάλογα, χαρακτηρίζονται από μία διαμόρφωση παραμορφωμένης β-στροφής τύπου II. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γραμμικό τετραπεπτίδιο RGDW, στο οποίο η β-στροφή σταθεροποιείται με δεσμό υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλίου της Arg και του αμιδικού πρωτονίου της Trp [346]. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της σχέσης διαμόρφωσης-βιολογικής δράσης, που προέκυψαν από ισχυρούς μη πεπτιδικούς αναστολείς [253] της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον GPIIb/IIIa, έχει προταθεί ότι, το μοντέλο της β-στροφής αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό, λειτουργώντας ως περιορισμός για τη σχετική διευθέτηση των δραστικών πλευρικών αλυσίδων.

Ένας τρόπος που χρησιμοποιήθηκε για τη μείωση της διαμορφωτικής ελευθερίας είναι η κυκλοποίηση των αναλόγων. Ο σχηματισμός δισουλφιδικής γέφυρας είναι μία συνηθισμένη μέθοδος, η οποία δεν “παγώνει” μόνο τη διαμόρφωση, αλλά προστατεύει το μόριο από τη δράση διαφόρων πρωτεασών στον οργανισμό. Η εισαγωγή του δισουλφιδικού δεσμού και η στερεοχημεία της Cys υπήρξαν δυο πολύ σημαντικοί παράγοντες για τη σταθεροποίηση του κατάλληλου προσανατολισμού των παράπλευρων αλυσίδων της Arg και του Asp [347]. Οι ισχυρές διαμορφωτικές αλλαγές που επιβλήθηκαν στα ανάλογα επηρέασαν τη βιολογική δράση τους. Η διαμορφωτική μελέτη των αναλόγων έδειξε ότι δεν ικανοποιούν το κριτήριο της β-στροφής, αντίθετα οι παράπλευρες αλυσίδες της Arg και του Asp προσανατολίζονται προς την ίδια πλευρά του πεπτιδικού σκελετού.

#### 4.5.3. Πιθανές αντιθρομβωτικές δράσεις προερχόμενες από την αναστολή της ‘έξω-μέσα’ σηματοδότησης

Η αλληλεπίδραση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  με το ινωδογόνο προωθεί την μέσω της Src εξάπλωση του αιμοπεταλίου, μονοπάτι της «έξω-μέσα» σηματοδότησης. Σημειακές μεταλλάξεις της  $\beta_3$  CT ουράς (S752P ή Y747A) ή αποκοπή ολόκληρης αλληλουχίας της ( $\Delta 724$ ) σε ανθρώπινα [348, 349] και ποντίκισια [350] αιμοπετάλια είχαν ως αποτέλεσμα σοβαρή αιμορραγία λόγω της διαταραχής της ‘μέσα-έξω’ σηματοδότησης. Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν οι επιπτώσεις στη ‘έξω-μέσα’ σηματοδότηση χρησιμοποιώντας ποντίκια με τροποποίηση της  $\beta_3$  ( $\Delta 760-762$ ), δηλαδή με αφαίρεση της RGT αλληλουχίας [222].

Η c-Src αλληλεπιδρά με την ιντεγκρίνη με ένα τρόπο εξαρτώμενο της SH3 περιοχής της και συνδέεται με τα C-τελικά  $^{760}\text{RGT}^{762}$  κατάλοιπα και ενεργοποιείται μετά τη πρόσδεση του ινωδογόνου [351-353]. Η ταλίνη και η c-Src διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση ενώ η πρόσδεσή τους δεν αλληλοαναιρείται [352]. Η εξάπλωση των αιμοπεταλίων ποντικών *ex vivo* είναι ελαττωματική έπειτα από μετάλλαξη των  $^{760}\text{R}$  ή  $^{762}\text{T}$  σε A [350] και όταν αιμοπετάλια ανθρώπου επωαστούν με το διαπερατό από τη μεμβράνη myr-RGT πεπτίδιο, αναστέλλεται η προσκόλληση και εξάπλωση τους στο ακινητοποιημένο ινωδογόνο καθώς και η ανάκληση του θρόμβου. Επίσης, αναστέλλεται η επαγόμενη, από το ADP, τη ριστορεκτίνη και τη θρομβίνη, συσσώρευση καθώς και η αλληλεπίδραση της c-Src με τη  $\beta_3$  CT ουρά. Τέλος, το παραπάνω πεπτίδιο ανέστειλε την φωσφορυλίωση των  $\text{Y}^{747}$  and  $\text{Y}^{759}$  της  $\beta_3$  CT ουράς. Έτσι η διατάραξη της Src- $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  αλληλεπίδρασης και η επιλεκτική αναστολή της «έξω-μέσα» σηματοδότησης της ιντεγκρίνης προτείνουν μια πιθανή αντιθρομβωτική στρατηγική, που μπορεί να αποτελεί μια ορθολογική βάση για το σχεδιασμό νέων αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων χωρίς αιμορραγικές συνέπειες [354].

Ενώ τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν το ρόλο του  $\beta_3$  C-τελικού άκρου στην ‘έξω-μέσα’ σηματοδότηση, η παραπάνω έρευνα συνεχίστηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης αυτής στην αιμόσταση και τη θρόμβωση *in vivo* [222]. Παράχθηκαν  $\beta_3$  τροποποιημένα ποντίκια ( $\Delta 760-762$ ), τα οποία ήταν ζωντανά και γόνιμα, με φυσιολογικά αποτελέσματα στις εξετάσεις αίματος. Τα αιμοπετάλια τους εμφάνισαν μειωμένη φωσφορυλίωση σε Y κατάλοιπα της c-Src καθώς και της  $\text{Y}^{747}$  στη  $\beta_3$  και ελαττωμένη εξάπλωση. Αντίθετα με τα φυσιολογικά, τα τροποποιημένα φάνηκαν προστατευμένα από θρόμβωση καρωτίδας μετά από τραύμα του αγγείου με  $\text{FeCl}_3$ , κανένα δεν εμφάνισε αυθόρμητη αιμορραγία ή υπερβολική αιμορραγία μετά το χειρουργείο ή αναιμία. Η πρόσδεση του ινωδογόνου στα αιμοπετάλια ήταν φυσιολογική έπειτα από κορεσμένη συγκέντρωση αγωνιστή του PAR4 ή κολλαγόνου. Οι μέχρι σήμερα διαθέσιμοι αγωνιστές αναστέλλουν τη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη. Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν μια εναλλακτική αντιθρομβωτική προσέγγιση στοχεύοντας στην  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  σηματοδότηση μέσω του απόμακρου τμήματος της  $\beta_3$  κυτταροπλασματικής ουράς.

#### 4.5.4. Η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης ταλίνης - $\beta_3$ ιντεγκρίνης εμφανίζει αντιθρομβωτική δράση

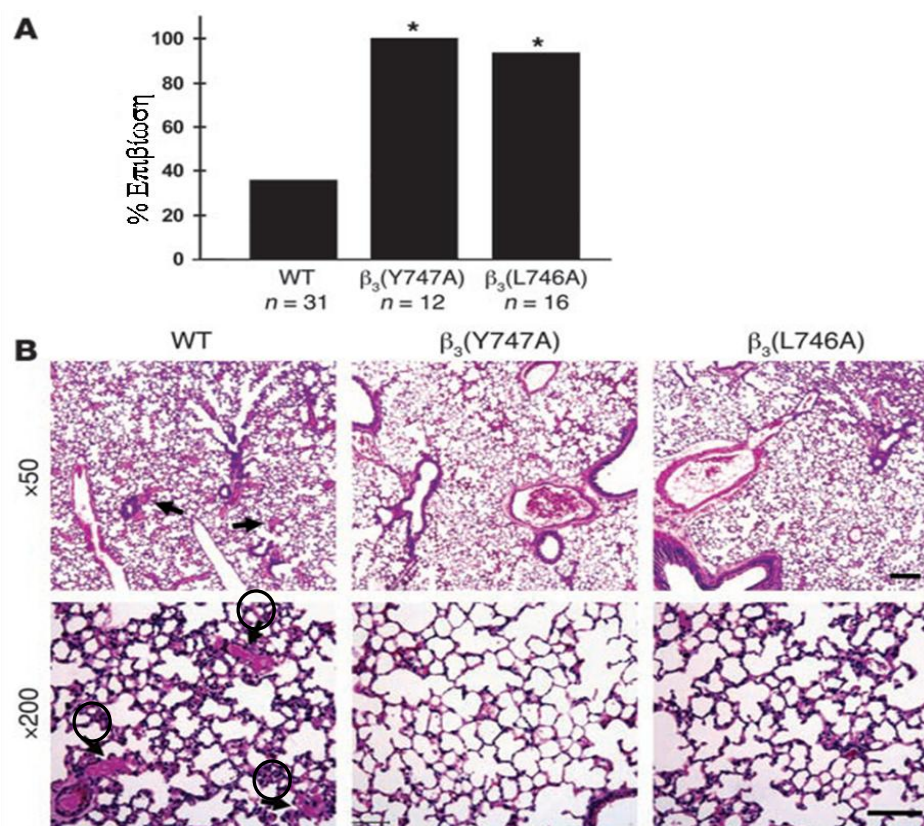
Πρόσφατες μελέτες με συστήματα μοντέλου, δείχνουν ότι η πρόσδεση της ταλίνης στη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική ουρά είναι ένα τελικό βήμα στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης [175] και έχουν οριστεί κρίσιμα δομικά χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης [279]. Λαμβάνοντας τα παραπάνω δεδομένα, η ερευνητική ομάδα του Petrich B.G et al. θέλησε να μελετήσει και *in vivo* τις συνέπειες της διακοπής της παραπάνω πρόσδεσης [355]. Έτσι, δημιούργησε ποντίκια με σημειακές μεταλλάξεις στη  $\beta_3$  ουρά, οι οποίες εμποδίζουν την πρόσδεση της ταλίνης και άλλων πρωτεϊνών στη  $\beta_3$ . Συγκεκριμένα, η πρώτη μετάλλαξη ήταν η  $\beta_3$  ( $Y^{747}A$ ) η οποία διαταράσσει τη πρόσδεση της ταλίνης, της φιλαμίνης και της c-Src και η δεύτερη ήταν η  $\beta_3$  ( $L^{746}A$ ) η οποία επιλεκτικά διαταράσσει μόνο την αλληλεπίδραση της ταλίνης και τα αποτελέσματα της έρευνας είναι τα ακόλουθα.

Και τα δύο στελέχη των μεταλλαγμένων ποντικών φάνηκαν προστατευμένα από πνευμονική θρόμβωση μετά από ενδοφλέβια ένεση κολλαγόνου και επινεφρίνης (εικόνα 4.3). Επίσης, τα  $\beta_3$  ( $L^{746}A$ ) ποντίκια φάνηκαν ανθεκτικά στην θρόμβωση της καρωτιδικής αρτηρίας από  $FeCl_3$ . Αντίθετα, τα  $\beta_3$  ( $L^{746}A$ ) ποντίκια κατά 95% εμφάνισαν αντίσταση στη παθολογική αιμορραγία, όπως προέκυψε από την γαστρεντερική αιμορραγία και την αναιμία, που εμφανίστηκε στο 53% των  $\beta_3$  ( $Y^{747}A$ ) και σε όλα τα μη τροποποιημένα ποντίκια. Τα αιμοπετάλια και από τα δύο στελέχη έδειξαν μειωμένη, επαγόμενη από αγωνιστή, πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη, η πρώτη *in vivo* απόδειξη που δηλώνει την εξαρτώμενη από την ταλίνη ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης στα θηλαστικά.

Όμως η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ακινητοποιημένο ινωδογόνο κάτω από στατικές συνθήκες δεν επηρεάστηκε από τις μεταλλάξεις, δηλώνοντας ότι η  $\alpha_{IIb}\beta_3$  των αιμοπεταλίων των τροποποιημένων ποντικών διατηρεί την ίδια ικανότητα πρόσδεσης με αυτή των φυσιολογικών. Ενώ και οι δύο ομάδες εμφάνισαν διαταραγμένη ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης, τα αιμοπετάλια των  $\beta_3$  ( $L^{746}A$ ) ποντικών ήταν ικανά να εξαπλωθούν στο ινωδογόνο και εμφάνισαν φωσφορυλίωση της FAK όταν η ιντεγκρίνη ενεργοποιήθηκε εξωγενώς από  $MnCl_2$ . Έτσι τα  $\beta_3$  ( $L^{746}A$ ) ποντίκια εμφάνισαν επιλεκτική βλάβη της «μέσα-έξω» σηματοδότησης, που απαιτείται για την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης, εν τούτοις όμως τα αιμοπετάλια διατηρούν την ικανότητα να



αναπαράγουν σήματα από το εξωκυττάριο προς το ενδοκυττάριο περιβάλλον, τα οποία απαιτούνται για την εξάπλωση του αιμοπεταλίου.



**Εικόνα 4.3.** Τα τροποποιημένα ποντίκια φαίνονται να προστατεύονται από μικροαγγειακή θρόμβωση. (A) Στα ποντίκια χορηγήθηκε ενδοφλέβια 800  $\mu\text{g/kg}$  κολλαγόνου και 60  $\mu\text{g/kg}$  επινεφρίνης και καταγράφηκαν για 30 min. (B) Αντιπροσωπευτικές τομές έπειτα από χρώση πνευμόνων, φυσιολογικών ποντικών που πέθαναν κατά τη διαδικασία της πειραματικής θρόμβωσης και των τροποποιημένων ποντικών που επέζησαν αλλά θανατώθηκαν μετά το πέρας του πειράματος. Μικροθρόμβοι εμφανίστηκαν στους πνεύμονες των φυσιολογικών, ενώ οι πνεύμονες των τροποποιημένων ποντικών ήταν καθαροί [355].

Τα παραπάνω αποτελέσματα καθιερώνουν την σημαντικότητα της ταλίνης στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης και δείχνουν ότι η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης τους μπορεί να έχει μια ισχυρή αντιθρομβωτική δράση και όφελος ανοίγοντας ένα θεραπευτικό παράθυρο στον ανταγωνισμό της ιντεγκρίνης [355].

#### 4.5.5. Αναστολή της *in vivo* ενεργοποίησης μέσω της παρεμπόδισης της ‘μέσα-έξω’ βιοσηματοδότησης

Τελικό βήμα της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης και της «μέσα-έξω» σηματοδότησης είναι η πρόσδεση της ταλίνης αρχικά στην  $\beta_3$  NPxY περιοχή, η οποία με τη σειρά της επάγει και σταθεροποιεί την πρόσδεση της ταλίνης στην κοντινή στη μεμβράνη περιοχή [278]. Σε αυτή τη πολύ πρόσφατη μελέτη, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις δύο σημαντικών μεταλλάξεων στο μόριο της ταλίνης στη θρόμβωση και την αιμόσταση *in vivo* [356]. Για τον έλεγχο της λειτουργικής σημασίας των δύο παραπάνω αλληλεπιδράσεων στην αιμοπεταλιακή λειτουργία, η ερευνητική ομάδα δημιούργησε γενετικά τροποποιημένα (knock-in mice) ποντίκια, που εκφράζουν μεταλλαγμένα μόρια ταλίνης, με διαταραχή της ικανότητας να αλληλεπιδρούν με την κοντινή στη μεμβράνη περιοχή (L325R) και με τη μακρινή στη μεμβράνη περιοχή (W359A) [356]. Τόσο η (L325R) όσο και η (W359A) μετάλλαξη σε CHO κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης [276, 279]. Όμως, η ομάδα του Nakazawa et al έδειξε πρόσφατα ότι η (W359A) μετάλλαξη σε μια κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεγακαρυοβλαστικών κυττάρων (CMK) αναστέλλει την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης σε μικρότερο βαθμό από ότι η (L325R) μετάλλαξη [357].

Πράγματι, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι στα αιμοπετάλια οι μεταλλάξεις αυτές προσδίδουν ενδιαφέρουσες λειτουργικές διαφορές. Η διακοπή της αλληλεπίδρασης ταλίνης-ιντεγκρίνης στα (L325R) ποντίκια, ανέστειλε ολοκληρωτικά την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, ενώ στα (W359A) η ενεργοποίηση αναστάλθηκε σημαντικά όχι όμως πλήρως. Όσον αφορά την  $\text{FeCl}_3$ -επαγόμενη θρόμβωση, και οι δύο ομάδες προστατεύτηκαν από το σχηματισμό θρόμβου, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά. Όμως αν και οι δύο ομάδες προστατεύτηκαν από το σχηματισμό θρόμβου, τα (W359A) ποντίκια εμφάνισαν πολύ καλύτερες αιμοστατικές λειτουργίες και έχασαν σημαντικά λιγότερο αίμα από τα (L325R) ποντίκια, προτείνοντας έτσι ότι τα ποντίκια που εκφράζουν την (W359A) μετάλλαξη, υποστηρίζουν το σχηματισμό αιμοστατικά λειτουργικού θρόμβου. Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι η μερική αναστολή πρόσδεσης της ταλίνης στη  $\beta_3$  NPxY αλληλουχία, που έχει ως συνέπεια την καθυστέρηση της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης, θα μπορούσε να παρέχει μια θεραπευτική προσέγγιση στη θεραπεία των θρομβωτικών παθήσεων, διατηρώντας όμως παράλληλα την πρωτογενή αιμόσταση [356].

# Μεθοδολογίες

## 5.1. Συσσωρευομετρία

### Αρχή μεθόδου

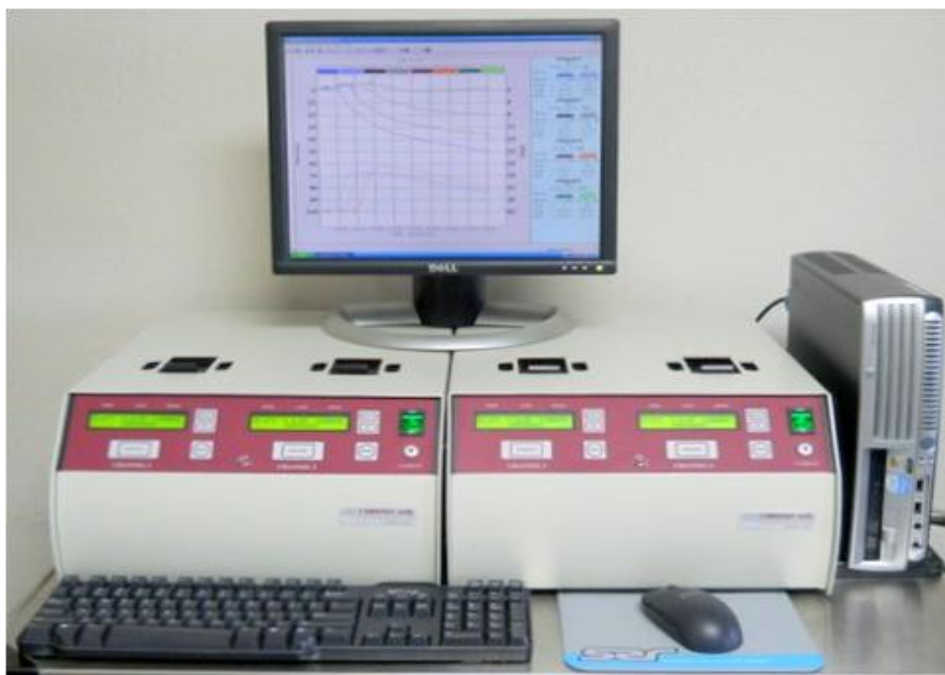
Η συνήθης μέθοδος για τη διάγνωση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων είναι ο προσδιορισμός της συσσώρευσής τους βάσει της νεφελομετρικής μεθόδου κατά Born. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η οπτική πυκνότητα ενός εναιωρήματος σωματιδίων εξαρτάται από τον αριθμό των σωματιδίων και όχι από το μέγεθός τους [358]. 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.

Το συσσωρευόμετρο είναι ένα φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος με δύο θέσεις δειγμάτων που θερμαίνονται στους 37°C (προς μίμηση των *in vivo* συνθηκών) (εικόνα 5.1). Μια ακτίνα υπέρυθρου φωτός περνά μέσα από μία κυψελίδα που περιέχει πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια και μέσα από τη δεύτερη που περιέχει πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια ή μέσα από μια κυψελίδα με πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια και μια δεύτερη που περιέχει διάλυμα εναιώρησης αιμοπεταλίων. Φωτοδίοδοι σιλικόνης ανιχνεύουν το φως που πέρασε μέσα από τις δυο κυψελίδες. Τα δείγματα αναδεύονται διότι η επαφή μεταξύ των αιμοπεταλίων είναι απαραίτητη για την *in vitro* συσσώρευσή τους.

Η διαδικασία της συσσώρευσης καταγράφεται φωτομετρικά, αναπαρίσταται ως κατερχόμενη καμπύλη, καθώς η συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων κρίνεται βάσει των αλλαγών στην εκπομπή του φωτός. Η καταγραφή της συσσώρευσης σταματά στα 4 min καθώς έχει βρεθεί ότι οι περισσότεροι αγωνιστές προκαλούν μέγιστη συσσώρευση μέσα σε 2 – 3 min από την προσθήκη τους. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να παρέχει μια συνεχή εικόνα της συμπεριφοράς των αιμοπεταλίων και να διακρίνει την πρωτογενή και τη δευτερογενή συσσώρευση. Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι οι *in vitro* δοκιμασίες δεν αντανakλούν πάντα την *in vivo* λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων (π.χ. οι συνεχόμενες φυγοκεντρήσεις μπορεί να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των αιμοπεταλίων και την επακόλουθη συσσωρευομετρία).

Η καταγραφή της *in vitro* συσσώρευσης χαρακτηρίζεται από :

- την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων (μικρή ανερχόμενη καμπύλη, μείωση διαπερατότητας)
- την μέγιστη αύξηση στη διαπερατότητα του φωτός που προκαλείται από τον αγωνιστή (%συσσώρευση)
- τον ρυθμό της συσσώρευσης (% μεταβολή συσσώρευσης ανά min).
- την πρωτογενή συσσώρευση (κατερχόμενη καμπύλη, αύξηση διαπερατότητας) η οποία οδηγεί είτε σε αποσυσσώρευση (ανερχόμενη καμπύλη, μείωση διαπερατότητας) είτε σε ένα σταθερό πλατώ (ευθεία γραμμή, σταθερή διαπερατότητα) είτε περνά ένα πλατώ και προχωρά στη δεύτερη φάση της συσσώρευσης (δευτερογενής συσσώρευση)
- την δευτερογενή συσσώρευση, που συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια εκκρίνουν τα συστατικά των κοκκίων τους τα οποία προκαλούν επιπρόσθετη συσσώρευση (δεύτερη κατερχόμενη καμπύλη, επιπρόσθετη αύξηση διαπερατότητας).



**Εικόνα 5.1.** Διάταξη συσσωρευομέτρου (Aggregometer).

### 5.1.1. Απομόνωση και παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων ανθρώπου

Κατά την αιμοληψία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

α) Πολλά φάρμακα επιδρούν στη λειτουργία των αιμοπεταλίων γι' αυτό και οι δότες θα πρέπει να μην έχουν κάνει χρήση αυτών τις προηγούμενες 14 μέρες. Συγκεκριμένες φαρμακευτικές ουσίες όπως η ασπιρίνη, άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και αντισταμινικά, μπορεί να επηρεάσουν τις συσσωρευτικές ικανότητες των αιμοπεταλίων,

β) Η αιμοληψία πρέπει να γίνεται σε χαλαρό για το δότη, περιβάλλον. Το stress πιθανόν να επηρεάσει τα επακόλουθα πειράματα,

γ) Κατά την αιμοληψία και την πειραματική επεξεργασία τους τα αιμοπετάλια πρέπει να αποθηκεύονται σε πλαστικά σωληνάκια πολυαιθυλενίου, πολυκαρβοξυλίου ή γυαλιού με σιλικονούχο επικάλυψη (το γυαλί από μόνο του μπορεί να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια). Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν σωληνάκια πολυπροπυλενίου,

δ) Τα αιμοπετάλια είναι προτιμότερο να διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37 °C σε όλα τα πειραματικά βήματα. Σε συνθήκες ζέστης τα δείγματα μετά την αιμοληψία τοποθετούνταν σε κυπελάκι με κρύο νερό,

ε) Το αίμα σαν σωματικό υγρό που είναι θεωρείται πηγή μετάδοσης ασθενειών. Γι' αυτό κατά την αιμοληψία και τον πειραματικό χειρισμό του αίματος τα γάντια θεωρούνται απαραίτητα,

στ) Το αίμα πρέπει να εισέρχεται ελεύθερα και χωρίς βία στα σωληνάκια με το αντιπηκτικό έτσι ώστε να αποφευχθεί η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η ήπια ανάμιξη αίματος – αντιπηκτικού πρέπει να ακολουθείται αμέσως μετά την αιμοληψία.

Ορισμένοι παράγοντες του πλάσματος είναι δυνατόν να επηρεάσουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Τέτοιοι είναι πρωτεΐνες, ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και η δράση της θρομβίνης που μπορεί να προκαλέσει συσώρευσή τους. Για να διαπιστωθεί ο ρόλος των παραγόντων αυτών στη βιολογική δράση των πεπτιδίων, τα τελευταία εξετάζονται σε πλυμένα αιμοπετάλια δηλαδή ελεύθερα από στοιχεία του πλάσματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια κατά την πλύση τους. Τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. Κάθε βήμα έκπλυσης απαιτεί προσεκτική αναδιασπορά του ιζήματος των αιμοπεταλίων και δεν συνίσταται η παρατεταμένη έκθεση του ιζήματος χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας έκπλυσης και πριν την έναρξη των πειραμάτων συσώρευσης μπορούμε να αφήσουμε το τελικό εναιώρημα για

10 – 15 λεπτά προκειμένου να "ηρεμήσουν" τα αιμοπετάλια. Η διαδικασία έκπλυσης έχει γίνει σωστά, όταν με ελαφριά ανακίνηση του δοκιμαστικού σωλήνα διαπιστώσουμε την παρουσία σχηματισμών (σαν λευκό συννεφάκι) στο τελικό εναιώρημα και όταν προκαλείται συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά 65–75 % με αγωνιστές, όπως η θρομβίνη σε μια τελική της συγκέντρωση στα 0.2 U/ml.

### Αντιδραστήρια-Όργανα

- Απυράση (Sigma)
- PGE<sub>1</sub> (Προσταγλανδίνη E<sub>1</sub>, Sigma)
- Απόλυτη Αιθανόλη (Riedel de Haën)
- HEPES (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, 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 (NaHCO<sub>3</sub>, M.B. 84.01 g/mol, Fluka-Garanite)
- Εξαένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, M.B. 203.31 g/mol, Sigma)
- Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, M.B. 137.99 g/mol, Merck)
- Γλυκόζη (D (+) C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, MB : 180.16 gr/mole, Fluka).
- Διένυδρο κιτρικό νάτριο (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>•2H<sub>2</sub>O, MB : 294.1 g/mol, Merck)
- Ένυδρο κιτρικό οξύ (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>•H<sub>2</sub>O, MB : 210 gr/mole)
- Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, MB : 147 g/mol, Sigma)
- Χλωριούχο ασβέστιο CaCl<sub>2</sub> (M.B. 110.99 g/mol, Merck)
- Διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH)
- Οξαλικό αμμώνιο ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, MB: 142.11 g/mol, Mallinckrod)
- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z320)
- Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)

### 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 μοιράζεται σε erppendorf τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

**Διάλυμα προσταγλανδίνης E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>):** 5 mgr προσταγλανδίνης E<sub>1</sub> διαλύονται σε 5 ml αιθανόλη. Η PGE<sub>1</sub> ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (AC) οδηγώντας σε αύξηση των επιπέδων του κυκλικού AMP (cAMP) και στην αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Το διάλυμα μοιράζεται σε erppendorf τα οποία σφραγίζονται με παραφίλμ λόγω της πτητικής ιδιότητας της αιθανόλης. Η αποθήκευσή τους γίνεται 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. Χρησιμοποιείται στη μέτρηση των αιμοπεταλίων.

**Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου:** Φτιάχνουμε διάλυμα CaCl<sub>2</sub> συγκέντρωσης 1M. Η διάλυση της ουσίας γίνεται σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

**Διάλυμα έκπλυσης αιμοπεταλίων (Tampon de lavage) (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 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), 7.56 % w/v ένυδρο κιτρικό οξύ (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O), 0.294 % w/v ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) και 0.203 % w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O). Οι ουσίες διαλύονται σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 ml και αποθηκεύεται στους -20°C.

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι δεκαπλάσιες (10X) από αυτές που χρησιμοποιούμε κατά την έκπλυση των αιμοπεταλίων (1X). Γι' αυτό πριν από αυτήν γίνεται αραίωση του παραπάνω διαλύματος με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.5 με διάλυμα NaOH. Τα αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4°C.

#### **Διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων (Tampon de resuspension) (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 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), 0.1 % w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), 2.38 % w/v HEPES (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S), και 0.42 % w/v όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO<sub>3</sub>). Οι ουσίες διαλύονται σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 ml και αποθηκεύεται στους -20°C.

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι δεκαπλάσιες (10X) από αυτές που χρησιμοποιούμε κατά την έκπλυση των αιμοπεταλίων (1X). Γι' αυτό πριν από αυτήν γίνεται αραίωση του παραπάνω διαλύματος με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7.35 με διάλυμα NaOH. Τα αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4°C.

#### **Πειραματική διαδικασία**

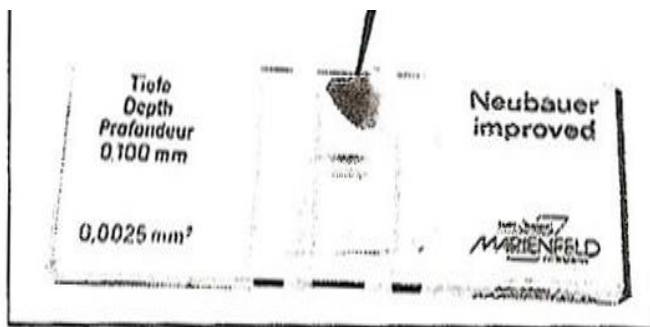
Η προετοιμασία των πλυμένων αιμοπεταλίων από το ολικό αίμα με την τροποποιημένη μέθοδο των Mustard [360], περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Λαμβάνουμε δείγμα αίματος σε αντιπηκτικό, όπου έχουμε προσθέσει 10μl απυράση, ώστε η τελική της συγκέντρωση στο δείγμα να είναι 1 U/ml. Επίσης προσθέτουμε και 1μl προσταγλανδίνης E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>).
2. Ζυγοσταθμίζουμε το προς φυγοκέντρωση δείγμα.
3. Φυγοκεντρούμε το δείγμα σε φυγόκεντρο πάγκου στις 900 στροφές το λεπτό (rpm) (126 x g) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μεταφέρουμε προσεκτικά το υπερκείμενο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) σε άλλο σωλήνα πολυπροπυλενίου. Κατά την μεταφορά προσέχουμε να μην γίνει ανάμιξη του PRP με το υποκείμενο στρώμα λευκών ή ερυθρών αιμοσφαιρίων.
5. Μετρούμε τον όγκο του PRP που έχουμε απομονώσει και τον συμπληρώνουμε ως τα 10 ml με διάλυμα έκπλυσης (1X pH 6.5). Επίσης, προσθέτουμε στο διάλυμα 1.5 μl



- απυράσης (τελική συγκέντρωση 0.015 U/ml) και 3.5 μl PGE<sub>1</sub>(αραιωμένης) (τελική συγκέντρωση 0.1 μM). Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.
6. Ζυγοσταθμίζουμε το προς φυγοκέντρωση σωλήνα.
  7. Το φυγοκεντρούμε σε φυγόκεντρο πάγκου στις 2500 rpm (975 x g) για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
  8. Ετοιμάζουμε σωληνάκι πολυπροπυλενίου με 10 ml διαλύματος έκπλυσης (1X pH 6.5) (έχουμε ξεπαγώσει και ρυθμίσει το pH του διαλύματος), στο οποίο έχουμε προσθέσει 1.5 μl απυράσης (τελική συγκέντρωση 0.015 U/ml) και 3.5 μl PGE<sub>1</sub>(αραιωμένης) (τελική συγκέντρωση 0.1 μM). Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.
  9. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αποχύνουμε απότομα το υπερκείμενο και αυτό που απομένει είναι ένα λευκό ίζημα.
  10. Αναδιασπείρουμε αμέσως και προσεχτικά το ίζημά μας με το διάλυμα του βήματος 8. Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.
  11. Ζυγοσταθμίζουμε το προς φυγοκέντρωση σωλήνα.
  12. Το φυγοκεντρούμε σε φυγόκεντρο πάγκου στις 2500 rpm (975 x g) για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
  13. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αποχύνουμε απότομα το υπερκείμενο και αυτό που απομένει είναι ένα λευκό ίζημα.
  14. Αναδιασπείρουμε αμέσως και προσεχτικά το ίζημά μας με το διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων (1X pH 7.35) (έχουμε ξεπαγώσει και ρυθμίσει το pH του διαλύματος). Προσθέτουμε όγκο διαλύματος εναιώρησης περίπου ίσο με το 1/3 του όγκου του P.R.P του σωλήνα του βήματος 5. Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.
  15. Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο εναιώρημα. Αυτό γίνεται με μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων με την πλάκα Neubauer. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:
    - α) αναμιγνύουμε ήπια σε erppendorf 10 μl PRP με 190 μl διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 1 % βάρος κατ' όγκο (w/v) (αραίωση 1 : 20),
    - β) καλύπτουμε την πλάκα Neubauer 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) μεταφέρουμε από 10  $\mu\text{l}$  του αραιωμένου διαλύματος στις δύο εσοχές της πλάκας (ενδεικτική εικόνα 5.2),

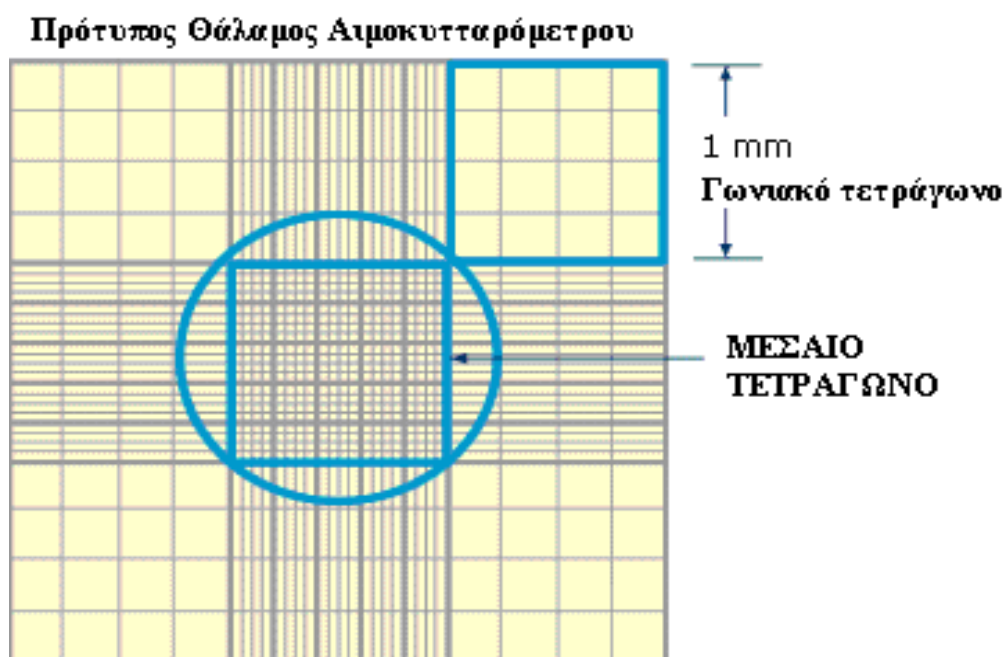


Εικόνα 5.2. Πλάκα Neubauer

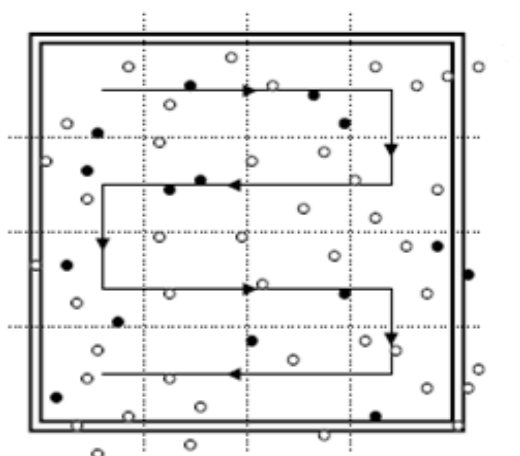
- δ) κλείνουμε την πλάκα σε τρυβλίο Petri που περιέχει υγρό βαμβάκι (υγρό περιβάλλον) για 15 λεπτά,
- ε) τοποθετούμε την πλάκα σε οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου και μετράμε τα αιμοπετάλια στη μεγέθυνση 40 – 45x του αντικειμενικού φακού προσέχοντας να μην εφάπτεται η καλυπτρίδα με αυτόν.

**Μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων και υπολογισμός της συγκέντρωσής τους με την πλάκα Neubauer.**

Όπως φαίνεται παρακάτω στο 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. Μετράμε τα κύτταρα σε 5 από τα μετρίου μεγέθους τετράγωνα και προτιμάμε τα τέσσερα γωνιακά και το μεσαίο τετράγωνο (εικόνα 5.3 και 5.4).



**Εικόνα 5.3.** Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (haemocytometer)



**Εικόνα 5.4.** Η μέτρηση γίνεται με τη διάταξη που δείχνει το σχήμα. Μετράμε τα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τη περιμετρική πάνω οριζόντια γραμμή και τα κύτταρα που βρίσκονται επάνω στην αριστερή κάθετη γραμμή. Δεν μετράμε αυτά που ακουμπούν επάνω στην κάτω και στην δεξιά γραμμή.

Τα μικρά τετράγωνα έχουν πλευρά  $1/20 \text{ mm}$  και ο χώρος της πλάκας μέτρησης έχει βάθος  $1/10 \text{ mm}$ . Ο όγκος επομένως του αραιωμένου διαλύματος αιμοπεταλίων σε ένα μικρό τετράγωνο είναι  $1/4000 \text{ mm}^3$ . Εμείς μετράμε 80 μικρά τετράγωνα οπότε τα

αιμοπετάλια βρίσκονται σε όγκο  $80/4000 \text{ mm}^3$  ή  $1/50 \text{ mm}^3$ . Επειδή η αραιώση 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 να υπολογίσουμε πόσα αιμοπετάλια υπάρχουν σε  $1 \text{ mm}^3$  δείγματος, πολλαπλασιάζουμε τον αριθμό των αιμοπεταλίων που βρήκαμε στα 80 πολύ μικρά τετράγωνα με το 1000 ή αλλιώς:

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

16. Προσθέτουμε στο διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων τόσο όγκο διαλύματος εναιώρησης των αιμοπεταλίων (1X pH 7.35), ώστε η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στην κυψελίδα συσσωρευομετρίας να ισούται με 250.000/ $\mu\text{l}$ . Ανακινούμε ήπια τα συστατικά του σωλήνα.
17. Λίγο πριν αρχίσουν τα πειράματα συσσωρευομετρίας αφήνουμε το τελικό εναιώρημα των αιμοπεταλίων σε ηρεμία για 10 με 15 λεπτά, αφού προστεθεί πρώτα ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου ( $\text{CaCl}_2$ ), ώστε η τελική συγκέντρωση του στο εναιώρημα να ισούται με 1mM.

#### 5.1.2. Έλεγχος βιολογικής δράσης πεπτιδίων με πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου

Δεδομένου ότι τα πεπτίδια που αντιστοιχούν σε ενδοκυττάριας αλληλουχίες (ενδοκυττάρια), σε αντίθεση με αυτά που αντιστοιχούν σε εξωκυττάριας αλληλουχίες (εξωκυττάρια), για να δράσουν πρέπει να διαπεράσουν τη λιπιδική κυτταρική μεμβράνη, τα ενδοκυττάρια παλμιτοϋλιώθηκαν με τη προσθήκη παλμιτικού ανυδρίτη, για να μπορέσουν να διαπεράσουν τη μεμβράνη και να εισέλθουν στα αιμοπετάλια.

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση κατά Merrifield ακολουθώντας την μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής [361, 362].

## Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά

- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, MB: 58.44 g/mol, Merck)
- Θρομβίνη (Thrombin, Sigma)
- Φυσιολογικός Ορός (0.9 %) (0.9% Sodium chloride NaCl, Fresenius Kabi)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide, DMSO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, MB : 78.13, Ferak Berlin)
- Πεπτίδιο RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser, C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>, MB: 433.4 g/mol, 5mg Sigma)
- Συσσωρευόμετρο (Whole blood Lumi – Aggregometer, model 700-4DR, Chrono – Log)
- Καταγραφικό (Aggrolink, Chrono – Log)
- Μαγνητάκια συσσώρευσης (Stir bars siliconized, Chrono – Log # 311)
- Πλαστικές κυψελίδες συσσώρευσης (Chrono – Log)
- Αυτόματες πιπέττες (eppendorf)
- Ακρορύγχια (tips)

## Διαλύματα εργασίας

**Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε χλωριούχο νάτριο (phosphate buffer saline, PBS) 10 mM, pH=7.4:** Φτιάχνουμε διάλυμα φωσφορικών τελικής συγκέντρωσης 10 mM σε χλωριούχο νάτριο (140 mM). Διαλύουμε 8.1816 g χλωριούχο νάτριο (NaCl), 1.38 g ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O) και 1.7795 gr δις-ένυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) σε 800 ml απεσταγμένο νερό. Ρυθμίζεται το pH στα 7.4 και προσθέτουμε επιπλέον νερό σε τελικό όγκο 1 λίτρο (L). Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

**Διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO):** Έτοιμο διάλυμα του εμπορίου (Dimethyl Sulfoxide, DMSO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, MB : 78.13 άνυδρο, 0.03% H<sub>2</sub>O, Ferak Berlin)

**Διάλυμα αγωνιστή θρομβίνης (Thrombin):** Φτιάχνουμε διάλυμα αγωνιστή θρομβίνης αρχικής συγκέντρωσης 20 Units ανά ml (U/ml). Διαλύουμε ένα φιαλίδιο λυοφιλοποιημένης θρομβίνης από πλάσμα ανθρώπου σε 500 μl φυσιολογικού ορού (0.9 % Sodium chloride). Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs και αποθηκεύεται στους -80 °C. Κατά τη χρήση της η θρομβίνη διατηρείται σε πάγο.

**Διάλυμα πεπτιδίου RGDS:** Το στερεό πεπτίδιο φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Το RGDS παραλαμβάνεται από το εμπόριο κλεισμένο σε αεροστεγές φιαλίδιο που περιέχει 5mg πεπτιδίου και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Το RGDS διαλυτοποιείται σε 461  $\mu\text{L}$  PBS (10mM, pH=7.4) με τελική συγκέντρωση 25 mM. Το διάλυμα διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε κλάσματα των 50 $\mu\text{L}$ . Στα πειράματα συσσωρευομετρίας δοκιμάστηκε σε μέγιστη συγκέντρωση 900  $\mu\text{M}$  και ο χρόνος επώασης με τα αιμοπετάλια ήταν 2 λεπτά.

### Διαλυτοποίηση πεπτιδίων των οποίων εξετάστηκε η δράση τους

Τα πεπτίδια της μελέτης διαλυτοποιήθηκαν ως εξής:

- **Εξωκυττάρια πεπτίδια:** Όλα τα πεπτίδια, τα οποία αντιστοιχούν στη 313-320 αλληλουχία της εξωκυττάριας  $\alpha_{\text{IIB}}$  υπομονάδας, έπειτα από τις τροποποιήσεις τους (όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο A των αποτελεσμάτων), διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10mM, pH=7.4, έτσι ώστε η αρχική συγκέντρωση να ισούται με 25mM (stock). Η διάλυση των πεπτιδίων έγινε υπό ανάδευση σε vortex έτσι ώστε να προκύψει διαυγές διάλυμα. Πριν τη διάλυση, τα πεπτίδια αποθηκεύονται στους  $-4^{\circ}\text{C}$ , ενώ μετά τη διάλυση στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- **Ενδοκυττάρια πεπτίδια:** Η διαλυτοποίηση όλων των παλμιτοϋλιομένων πεπτιδίων που αντιστοιχούν σε διάφορες περιοχές της ενδοκυττάριας  $\alpha_{\text{IIB}}$  υπομονάδας (όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο B των αποτελεσμάτων), έγινε σε DMSO, έτσι ώστε η αρχική τους συγκέντρωση να ισούται με 16,6 mM (stock). Η τελική περιεκτικότητα του DMSO στη κυψελίδα πρέπει να είναι μικρότερη του 1% (v/v), λόγω της τοξικότητας του ως προς τα αιμοπετάλια. Η διάλυση των πεπτιδίων έγινε υπό ανάδευση σε vortex έτσι ώστε να προκύψει διαυγές διάλυμα. Πριν τη διάλυση, τα πεπτίδια αποθηκεύονται στους  $-4^{\circ}\text{C}$ , ενώ μετά τη διάλυση δεν επαναχρησιμοποιούνται.

**Πειραματική πορεία**

Για τη διαπίστωση της βιολογικής δράσης των πεπτιδίων με συσσωρευομετρία σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου με την τροποποιημένη μέθοδο Mustard, ακολουθούμε τα εξής βήματα:

1. Ανοίγουμε το συσσωρευόμετρο μισή ώρα πριν τη δοκιμή των πεπτιδίων για να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους 37°C.
2. Ανοίγουμε το πρόγραμμα Aggrolink. Επιλέγω Aggregometer→Run Test και γράφω τα στοιχεία του πεπτιδίου και του αγωνιστή, που θέλουμε να ελέγξουμε.
3. Ετοιμάζουμε μια σειρά από γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματά μας. Καθεμιά φέρει από ένα μαγνητάκι.
4. Ετοιμάζουμε ένα δείγμα από 500 μl τελικού διαλύματος εναιώρησης των αιμοπεταλίων 1X pH 7.35, και το τοποθετούμε στη θέση “Reference” του οργάνου. Το δείγμα αυτό δε φέρει μαγνητάκι και παραμένει στη θέση αυτή μέχρι να τελειώσει το πείραμα.
5. Ετοιμάζουμε ένα δείγμα (resting) το οποίο περιέχει μόνο το τελικό εναιώρημα αιμοπεταλίων και το διαλύτη του πεπτιδίου του οποίου θέλουμε να βρούμε τη βιολογική δράση, χωρίς τη προσθήκη αγωνιστή για να διαπιστώσουμε ότι τα αιμοπετάλια μας δεν είναι ενεργοποιημένα.
6. Ετοιμάζουμε ένα *δείγμα αναφοράς* (τυφλό) το οποίο περιέχει τελικό εναιώρημα αιμοπεταλίων και το διαλύτη του πεπτιδίου του οποίου θέλουμε να βρούμε τη βιολογική δράση. Τοποθετούμε το δείγμα στη θέση “PRP” του οργάνου. Η προσθήκη του διαλύματος του αγωνιστή γίνεται 2 λεπτά μετά την εισαγωγή του δείγματος στο όργανο. Ο τελικός όγκος στην κυψελίδα ισούται με 500 μl.
7. Πατάμε ταυτόχρονα το OK στην οθόνη και το baseline στο όργανο. Παρατηρούμε τη συσσώρευση του δείγματος για 4 λεπτά.
8. Καταγράφουμε και τυπώνουμε την % συσσώρευση του δείγματος αναφοράς (ακολουθούμε τα εξής βήματα: Aggregometer → Stop Test, Edit→Set Start and Stop Times, με το κέρσορα μεταφέρω την κάθετη γραμμή της καμπύλης στο ύψωμα που σχηματίζεται και στο τέλος της συσσώρευσης →OK, Edit→Compute Slope and amplitude→OK, →Calculate results →Save → Print→OK, Aggregometer →Start New patient.

9. Ετοιμάζουμε τις αραιώσεις των πεπτιδίων που έχουμε ξεπαγώσει. Ανακινούμε σε κυκλικό αναδευτήρα (vortex)
10. Εισάγουμε το αιώρημα των αιμοπεταλίων και το διάλυμα του πεπτιδίου στην κυψελίδα συσσώρευσης. Θέλοντας να διαπιστώσουμε την επίδραση του χρόνου επώασης στη δραστητικότητα των πεπτιδίων, επώασαμε τα τελευταία με τα αιμοπετάλια για διαφορετικούς χρόνους. Η επώαση γίνεται σε ειδικούς υποδοχείς του οργάνου, όπου η θερμοκρασία είναι 37 °C.
11. Μετά την επώαση και την εισαγωγή του δείγματος στη θέση “P.R.P” του οργάνου εισάγουμε το διάλυμα του αγωνιστή μετά από δύο λεπτά.
12. Παρατηρούμε τη συσσώρευση του δείγματος για 4 λεπτά.
13. Καταγράφουμε και τυπώνουμε την % συσσώρευση του δείγματος του πεπτιδίου.

**Υπολογισμός του ποσοστού (%) αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλεί το πεπτίδιο.**

Το ποσοστό της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλεί κάθε φορά το πεπτίδιο που δοκιμάζουμε δίνεται από την σχέση :

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

Όλα τα πεπτίδια δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις και προσδιορίστηκε η τιμή IC<sub>50</sub> (Inhibitory Concentration 50%) η οποία ορίζεται ως η συγκέντρωση του πεπτιδίου που προκαλεί το 50% της μέγιστης ανασταλτικής δράσης του.

## 5.2. Λύση των αιμοπεταλίων

Πεπτίδια με σημαντική ανασταλτική δράση (80–90% αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων) μπορούν 1) να αναστείλουν το μηχανισμό της «από τα μέσα προς τα έξω» σηματοδότησης, μέσω της επίδρασής τους στις ενδοκυττάριες πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων και 2) να επιδράσουν στη φωσφοτυροσυλίωση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων, οι οποίες συμμετέχουν σε μηχανισμούς σηματοδότησης,



τα οποία μπορούν να φανούν ηλεκτροφορητικά. Για τη διαπίστωση αυτή, τα αιμοπετάλια πρέπει να απελευθερωθούν από την κυτταρική τους μεμβράνη. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο για τη διάχυση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών και την ανάπτυξή τους σε πηκτή ηλεκτροφόρησης. Η αποδιάταξη της κυτταρικής μεμβράνης για την πρώτη κατηγορία γίνεται με ήπιο ρυθμιστικό διάλυμα λύσεως. Ακολουθεί η μέθοδος της ανοσοκαταβύθισης (IP) και ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blotting). Για τη δεύτερη κατηγορία η αποδιάταξη γίνεται με ισχυρό διάλυμα λύσεως και ακολουθεί η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blotting).

### 5.3. Ανοσοκαταβύθιση (Immunoprecipitation, IP)

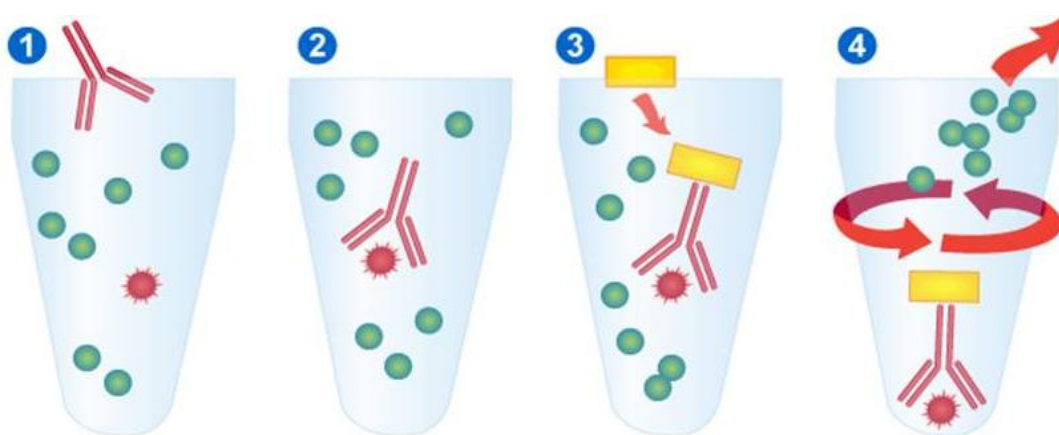
#### Εισαγωγή

Η ανοσοκαταβύθιση (IP) είναι μια συνήθως χρησιμοποιημένη τεχνική κατά την οποία καταβυθίζεται (με τη μορφή ιζήματος συνήθως) σε ένα διάλυμα το αντιγόνο (πρωτεΐνη ή πεπτίδιο) που θα μελετηθεί, με τη βοήθεια ενός αντισώματος που αναγνωρίζει το συγκεκριμένο αντιγόνο. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται για να απομονωθεί και να καθαριστεί, ως ένα βαθμό η προς μελέτη πρωτεΐνη από το υπόλοιπο μίγμα (διάλυμα).

Το όνομα της τεχνικής είναι λανθασμένο δεδομένου ότι η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου ή της πρωτεΐνης με το αντίσωμα δεν προκαλεί την καθίζηση. Η “καθίζηση” προκαλείται από μια δεσμευτική πρωτεΐνη ανοσοσφαιρινών, όπως η πρωτεΐνη A ή η G, που ακινητοποιείται σε μια στερεά υποστήριξη τις μπίλιες ή σφαιρίδια αгарόζης ή σεφαρόζης. Αυτές οι δεσμευτικές πρωτεΐνες (A ή G) αρχικά απομονώθηκαν από βακτήρια και αναγνώριζαν μια μεγάλη ποικιλία αντισωμάτων. Αφού δεσμευτεί η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη A ή G με το αντίσωμα-αντιγόνο, τότε το σύμπλοκο κατακρημνίζεται, πλένεται πολλές φορές για να απομακρυνθούν τυχόν πρωτεΐνες, οι οποίες δεν δεσμεύτηκαν ειδικά και σφιχτά με το αντίσωμα και αφαιρείται. Μετά την αφαίρεση των καταβυθισμένων πρωτεϊνών ακολουθεί η ανάλυση τους με διάφορες τεχνικές όπως ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), φασματοσκοπία μάζας, ανοσοαποτύπωση (western blotting) και άλλες.

Η IP χρησιμοποιείται συνήθως σε ποικίλες εφαρμογές: για να καθορίσει τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών αντιγόνων, για να μελετήσει τις πρωτεΐνες/πρωτεΐνης

αλληλεπιδράσεις, για να καθορίσει τη συγκεκριμένη ενζυμική ενεργότητα, για να ελέγξει τις πρωτεϊνικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και για να καθορίσει την παρουσία και την ποσότητα πρωτεϊνών. Η τεχνική IP επιτρέπει επίσης την ανίχνευση των σπάνιων πρωτεϊνών που ειδάλλως θα ήταν δύσκολο να ανιχνευθούν δεδομένου ότι μπορούν να συγκεντρωθούν μέχρι 10.000-πτυχές από την ανοσοκαταβύθιση. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω η ανοσοκαταβύθιση είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος κατά την οποία η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος καθαρίζεται επιλεκτικά από ένα πολυσύνθετο μίγμα, χρησιμοποιώντας ένα ειδικό αντίσωμα. Πιο κάτω φαίνεται συνοπτικά η σχηματική απεικόνιση των σταδίων της ανοσοκαταβύθισης (εικόνα 5.5)



1. Προσθήκη αντισώματος κατά της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος
2. Πρόσδεση αντισώματος στη πρωτεΐνη ενδιαφέροντος
3. Προσθήκη πρωτεΐνης A ή G, που κάνει το σύμπλεγμα αντισώματος – πρωτεΐνης αδιάλυτο
4. Με φυγοκέντρηση καταβυθίζεται το σύμπλεγμα με μορφή ιζήματος

**Εικόνα 5.5.** Απεικόνιση της δέσμευσης του αντιγόνου από το αντίσωμα έπειτα από την προσθήκη A ή G πρωτεΐνης.

Αυτή η τεχνική παρέχει γρήγορα και απλά μέσα να χωριστεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη από ολόκληρο το κύτταρο λύσης ή την καλλιέργεια. Επιπλέον, κάποιος μπορεί να χρησιμοποιήσει την ανοσοκαταβύθιση για να επιβεβαιώσει τα βιοχημικά χαρακτηριστικά ταυτότητας ή μελέτης, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, και τα επίπεδα έκφρασης μιας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Η διαδικασία μπορεί να διαιρεθεί σε διάφορα στάδια:

1. Προετοιμασία δειγμάτων
2. Προκαθαρισμό
3. Επώαση αντισωμάτων/σχηματισμός του συμπλόκου αντιγόνου - αντισώματος
4. Καθίζηση
5. Ανάλυση από SDS-PAGE

Το βήμα 2 ενσωματώνεται στη διαδικασία για να χαμηλώσει το ποσό μη συγκεκριμένων μολυσματικών παραγόντων στο κύτταρο λύσης και για να αφαιρέσει τις πρωτεΐνες με την υψηλή συγγένεια για τη πρωτεΐνη G ή A. Η επιλογή του διαλύματος λύσης είναι κρίσιμη και εξαρτώμενη από τη φύση της πρωτεΐνης που μελετάται. Το NP-40, ένα μη ιοντικό απορρυπαντικό, είναι το συνηθέστερα χρησιμοποιημένο απορρυπαντικό στο διάλυμα λύσης κυττάρων. Αυξάνοντας την αλατισμένη συγκέντρωση, μειώνοντας την απολυμαντική συγκέντρωση, ή αλλάζοντας το απορρυπαντικό σε Triton X-100, Saponin, Digitonin, CHAPS κ.λπ. είναι μέτρα που μπορούν να ληφθούν για να βελτιστοποιήσουν τους όρους για ανοσοκαταβύθιση.

#### Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά

- **Χλωριούχο νάτριο:** Sodium chloride – NaCl, MB: 58.44 gr/mole, Merck.
- **Υδροξυμεθυλο-τρικ-αμινομεθάνιο (Tris-base):** Tris (Hydroxymethyl) – aminomethan,  $H_2NC(CH_2OH)_3$ , M.B: 121.14 gr/mole, electrophoresis Purity Reagent, BioRad.
- **Το με νάτριο άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS):** Sodium Dodecyl Sulphate salt,  $C_{12}H_{25}NaO_4S$ , M.B: 288.38 gr/mole, Calbiochem
- **Γλυκερόλη (Glycerol):**  $CH_2OHCHOHCH_2OH$ , M.B: 92.895 gr/mole, Carlo Erba
- **Μπλε της Βρωμοφαινόλης (Bromophenolblau):** M.B: 669.97 gr/mole, Ferak Berlin
- **EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure):**  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ , M.B: 292.25 gr/mole, Merck
- **NP-40 (Nonidet P40 Substitute):** Nonylphenylpolyethylene glycol, Fluka 74385
- **EGTA (Ethylen glycol-bis(2-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid):** M.B: 380.35 gr/mole, Sigma
- **Βαναδικά:** M.B: 121.93 gr/mole

- **Leupeptin trifluoroacetate salt:** MB: 426.6 g/mol, Sigma
- **Pefabloc** (4-[2-aminoethyl] benzenesulfonyl fluoride-hydrochloride) MB: 279g/mol, Merck
- **Aprotinin:** From Bovine Lung, MB: 6512.42 g/mol, Sigma
- **Anti-talin:** monoclonal anti-talin antibody produced in mouse, Sigma
- **Πρωτεΐνης A-sepharose:** Protein A-sepharose From Staphylococcus aureus, Sigma
- **2-μερκαπτοαιθανόλη:** 2-mercaptoethanol, Electrophoresis reagent  $\geq 98\%$ ,  $C_2H_6OS$ , (HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), M.B: 78.13 gr/mole, 25 ml, Sigma.

### Διαλύματα εργασίας

**Ρυθμιστικό Tris-base 0.5M pH 6.8:** 30.3g Tris (MW: 121.14) σε 500 ml διαλύματος. Ρυθμίζουμε το pH στο 6.8. Διατηρούμε το διάλυμα στους 4°C.

#### Ρυθμιστικό Laemmli 4X:

|                        | <b>4X</b>  |                                                    |
|------------------------|------------|----------------------------------------------------|
| Tris                   | 0,25 M     | 5 ml του Tris 0,5M pH 6.8                          |
| SDS                    | 8%         | 2 g                                                |
| Γλυκερόλη              | 40%        | 10 ml                                              |
| Μπλε της Βρωμοφαινόλης | 0,02 mg/ml | 100 $\mu$ l του 5mg/ml<br>(0,0025g σε 500 $\mu$ l) |
| EDTA                   | 1 mM       | 9.2 mg                                             |
| H <sub>2</sub> O       | -          | 9,9 ml                                             |
|                        |            | Συνολικός όγκος 25 ml                              |

#### Ρυθμιστικό λύσεως NP-40 3X:

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| Tris-base 150 mM pH 7.4 | 908,5 mg |
| NaCl 450mM              | 1315 mg  |
| NP-40 3%                | 1,5 ml   |

σε 50 ml H<sub>2</sub>O. Αποθήκευση στους 4°C. (NP-40 Nonidet P40 FLUKA 74385)

**Ρυθμιστικό λύσεως NP-40 3X+ αναστολείς:**

Σε 10ml NP-40 3X προσθέτουμε πριν τη χρήση στο παγόλουτρο

|                           |                         |
|---------------------------|-------------------------|
| EGTA 3 mM                 | 150 $\mu$ l των 200 mM  |
| Βαναδικά 3mM              | 150 $\mu$ l των 200 mM  |
| Pefablock                 | 300 $\mu$ l των 100 mM  |
| Λιουπεπτίνη 15 $\mu$ g/ml | 15 $\mu$ l των 10 mg/ml |
| Απροτινίνη                | 15 $\mu$ l των 10 mg/ml |

**Ρυθμιστικό Laemmli 1X:** Διάλυμα που αποτελείται από ρυθμιστικό Laemmli 4X και νερό σε αναλογία 1/3 αντίστοιχα.

**Ρυθμιστικό λύσεως NP-40 1X+ αναστολείς:** Διάλυμα που αποτελείται από ρυθμιστικό λύσεως NP-40 4X+ αναστολείς και νερό σε αναλογία 1/2 αντίστοιχα.

**Προετοιμασία της πρωτεΐνης A-sepharose (Sigma P-3391)**

- Εφυδατώνουμε τις μπίλιες με απεσταγμένο νερό (1g σε 4 ml H<sub>2</sub>O)
- Μεταφέρουμε σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα χρησιμοποιώντας πιπέττα με τυπάκι που έχει μεγάλο ακροφύσιο
- Τον αφήνουμε 10 min στον πάγο
- Φυγοκεντρούμε στις 1500 rpm για 2-4 min
- Ξεπλένουμε τρεις φορές με ddH<sub>2</sub>O(4ml ddH<sub>2</sub>O-φυγοκέντρωση)
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- Παραλαμβάνουμε τις μπίλιες σε ίσο όγκο του Ρυθμιστικού λύσεως NP-40/ 0.02% αζίδιο του νατρίου (0.001g NaN<sub>3</sub> σε 5 ml NP-40)
- Χωρίζουμε το διάλυμα σε μικρές ποσότητες και φυλάσσουμε στους 4°C (προαιρετικό).

**Πειραματική πορεία**

Για την παραλαβή των δειγμάτων ακολουθούμε τα εξής βήματα:

1. Προετοιμάζουμε τα πλυμένα αιμοπετάλια σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στη παράγραφο 5.1.1.
2. Αναδιασπείρουμε σε συγκέντρωση 250.000 αιμοπετάλια/μl.
3. Ενεργοποιούμε τα αιμοπετάλια στο aggregometer σύμφωνα με το πείραμα. (resting, platelets +Thrombin, platelets + αναστολέα).

Η πορεία που ακολουθούμε για την διαδικασία της ανοσοκαταβύθισης είναι η ακόλουθη: [Όλα τα πειράματα εις διπλούν (προαιρετικά) και στο παγόλουτρο]

1. Διαλυτοποιούμε τα αιμοπετάλια κατευθείαν στη κυψελίδα της συσσωρευομετρίας με το ρυθμιστικό διάλυμα λύσεως NP-40 3X + αναστολείς (1 όγκος ρυθμιστικό για 2 όγκους αιμοπεταλίων). Μόλις το δείγμα διαυγαστεί το μεταφέρουμε σε erppendorf και το διατηρούμε στους 4° ή το φυλάσσουμε στους -20°C.
2. Φυγοκεντρούμε στους 4°C στις 14000 στροφές.
3. Παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο στους 4°C.
4. Παραλαμβάνουμε το ίζημα, το ξεπλένουμε 2 φορές με το ρυθμιστικό λύσεως NP-40 1X + αναστολείς, προσθέτουμε Laemmli 1X [(τελικός όγκος ίσος με το μισό του αρχικού δείγματος (250 μl)], 2-μερκαπτοαιθανόλη 5% (v/v) και καταψύχουμε στους -20°C.
5. Στο υπερκείμενο προσθέτουμε το αντίσωμα της πρωτεΐνης που θέλουμε να καταβυθίσουμε (2.5 – 5 μg/ml).
6. Αναδεύουμε τουλάχιστον για 2h στους 4 °C.
7. Προσθέτουμε 40 μl πρωτεΐνης A ή 30 μl μπίλιες (προσέχουμε το τυπάκι της πιπέττας να έχει μεγάλο ακροφύσιο, το κόβουμε).
8. Αναδεύουμε τουλάχιστον για 1h στους 4°C.
9. Πραγματοποιούμε το λιγότερο 3-5 εκπλύσεις με ρυθμιστικό λύσης (NP40 + αναστολείς).
10. Φυγοκεντρούμε 4° C για 1-2min 14000 rpm.
11. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο (Προσεχτικά μην πάρουμε μπίλιες, το τυπάκι της πιπέττας να έχει στενό ακροφύσιο).
12. Φυλάσσουμε το πρώτο υπερκείμενο και αποθηκεύουμε στους -20°C.

13. Μετά την τελευταία έκπλυση απομακρύνουμε όλο το υπερκείμενο, προσθέτουμε Laemmli 1X (250μl), 2-μερκαπτοαιθανόλη 5% (v/v) και καταψύχουμε στους -20°C.
14. Ακολουθεί η διαδικασία της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης και της ανοσοαποτύπωσης που θα περιγραφεί στη συνέχεια.

#### 5.4. Λύση των αιμοπεταλίων με SDS-EDTA

##### Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά

- Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)
- Το με νάτριο άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS): Dodecylsulfate sodium salt, SDS, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, M.B = 288.38 g/mole, Calbiochem.
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (το άλας με κάλιο) (K<sub>2</sub>EDTA): Ethylenediaminetetraacetic Acid (dipotassium salt), C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>K<sub>2</sub>, M.B = 368.4 g/mole, Sigma.
- Πιπέττες Pasteur με πουάρ
- Αυτόματες πιπέττες
- Eppendorf

##### Διαλύματα εργασίας

**Διάλυμα SDS 10% w/v, K<sub>2</sub>EDTA 5mM:** Διαλύουμε 5 g SDS και 0.092 g K<sub>2</sub>EDTA σε 50 ml απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και αποθήκευσή του σε θερμοκρασία δωματίου.

##### Πειραματική πορεία

Τα δείγματα που επιλέγουμε για επίδραση του παραπάνω διαλύματος περιέχουν:

1. Αιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων σε τελικό όγκο 500μl.
2. Αιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων και αγωνιστή σε τελικό όγκο 500μl.

3. Αιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων, ανασταλτικό πεπτίδιο και αγωνιστή σε τελικό όγκο 500μl.

4. Αιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων, ανασταλτικά πεπτίδια σε τελικό όγκο 500μl.

Η επίδραση του διαλύματος SDS 10% w/v, K<sub>2</sub> 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 παραπάνω δείγματα εισάγουμε από 125 μl του διαλύματος SDS - K<sub>2</sub>EDTA, (αναλογία 1 όγκος διαλύματος SDS - K<sub>2</sub>EDTA 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.

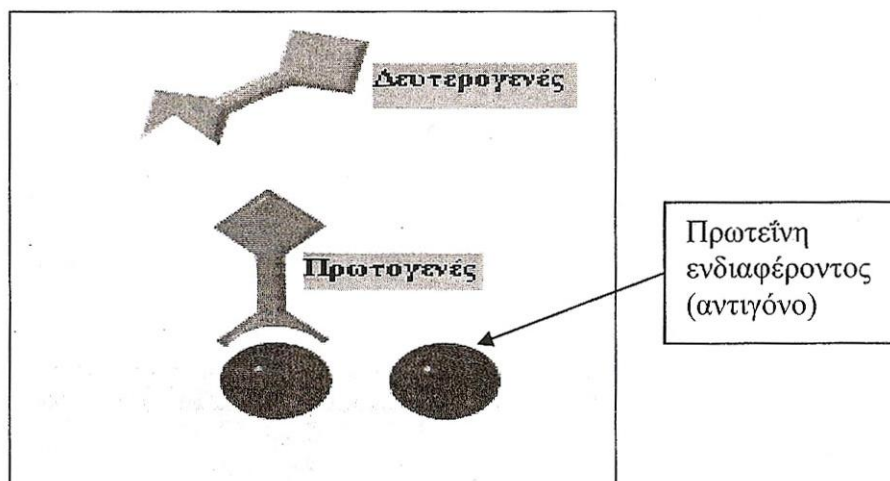
## 5.5. Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)

### Εισαγωγή

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 πηγάματος, εφόσον βέβαια είναι διαθέσιμο ένα ειδικό αντίσωμα δηλαδή μόριο ανοσοσφαιρίνης που αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη αυτή. Η αρχή και η πειραματική ακολουθία της τεχνικής αυτής παρουσιάζει πολλά κοινά σημεία με την τεχνική υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων κατά Southern (E. M. Southern, 1974) από την οποία άλλωστε έλαβε και το όνομά της (Western, W. N. Burnette, 1981). Η ολοκλήρωση της τεχνικής απαιτεί τρία στάδια:

- α) ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών (συνήθως 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).





**Εικόνα 5.6.** Απεικόνιση ανίχνευσης της πρωτεΐνης με επίδραση πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος.

Επιγραμματικά 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 μόνον ποιοτική (παρουσία ή απουσία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης), αλλά και ποσοτική (συνολική ποσότητα ή συγκέντρωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης) και δομική (μοριακό μέγεθος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης).

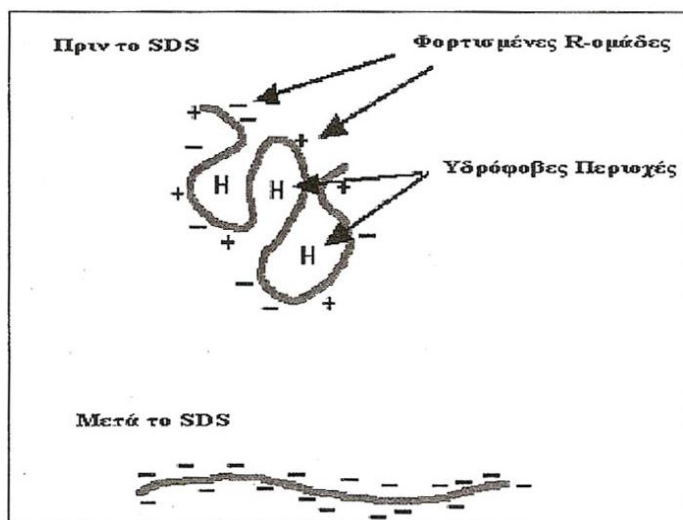
### 5.5.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE).

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια που έχουν καθαρό φορτίο, θετικό ή αρνητικό, το οποίο εξαρτάται από το τελικό άθροισμα των φορτίων των αμινοξέων από τα οποία αποτελούνται. Έτσι, αν σε ένα διάλυμα μιας πρωτεΐνης εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο η πρωτεΐνη θα μετακινηθεί προς το θετικό ή αρνητικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το καθαρό φορτίο της, το μέγεθός της και το σχήμα της. Η τεχνική αυτή ονομάζεται ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση δηλαδή είναι μια μέθοδος κατά την οποία φορτισμένα μόρια τα οποία βρίσκονται σ' ένα διάλυμα, κυρίως πρωτεΐνες, μεταναστεύουν με βάση το φορτίο κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Κάτω

από δεδομένες ηλεκτροφορητικές συνθήκες (τύπος πηκτής, pH, θερμοκρασία, διαφορά δυναμικού) η μετακίνηση του μακρομορίου είναι προκαθορισμένη. Η απόσταση η οποία διανύεται είναι γνωστή ως βαθμός σχετικής κινητικότητας (Relative Mobility Value = Rf). Με την ηλεκτροφόρηση διαχωρίζουμε τις πρωτεΐνες ενός μείγματος ανάλογα με το μέγεθος (και / ή το φορτίο).

Σε όλους τους τύπους ηλεκτροφόρησης, η κινητικότητα των μορίων εξαρτάται: α) από την τιμή της διαφοράς δυναμικού που εφαρμόζεται (ευθέως ανάλογη), β) από το καθαρό ηλεκτρικό φορτίο του μορίου (ευθέως ανάλογη) και γ) από τη μοριακή τριβή, λόγω μεγέθους και σχήματος του μορίου (αντιστρόφως ανάλογη). Υπό δεδομένες συνθήκες ηλεκτρικού πεδίου η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων εξαρτάται μόνον από τους παράγοντες β) και γ) επιγραμματικά, μεγαλύτερη κινητικότητα εμφανίζουν μόρια με μεγαλύτερη τιμή καθαρού ηλεκτρικού φορτίου, μικρότερο μέγεθος (μοριακό βάρος) και σφαιρικότερο σχήμα.

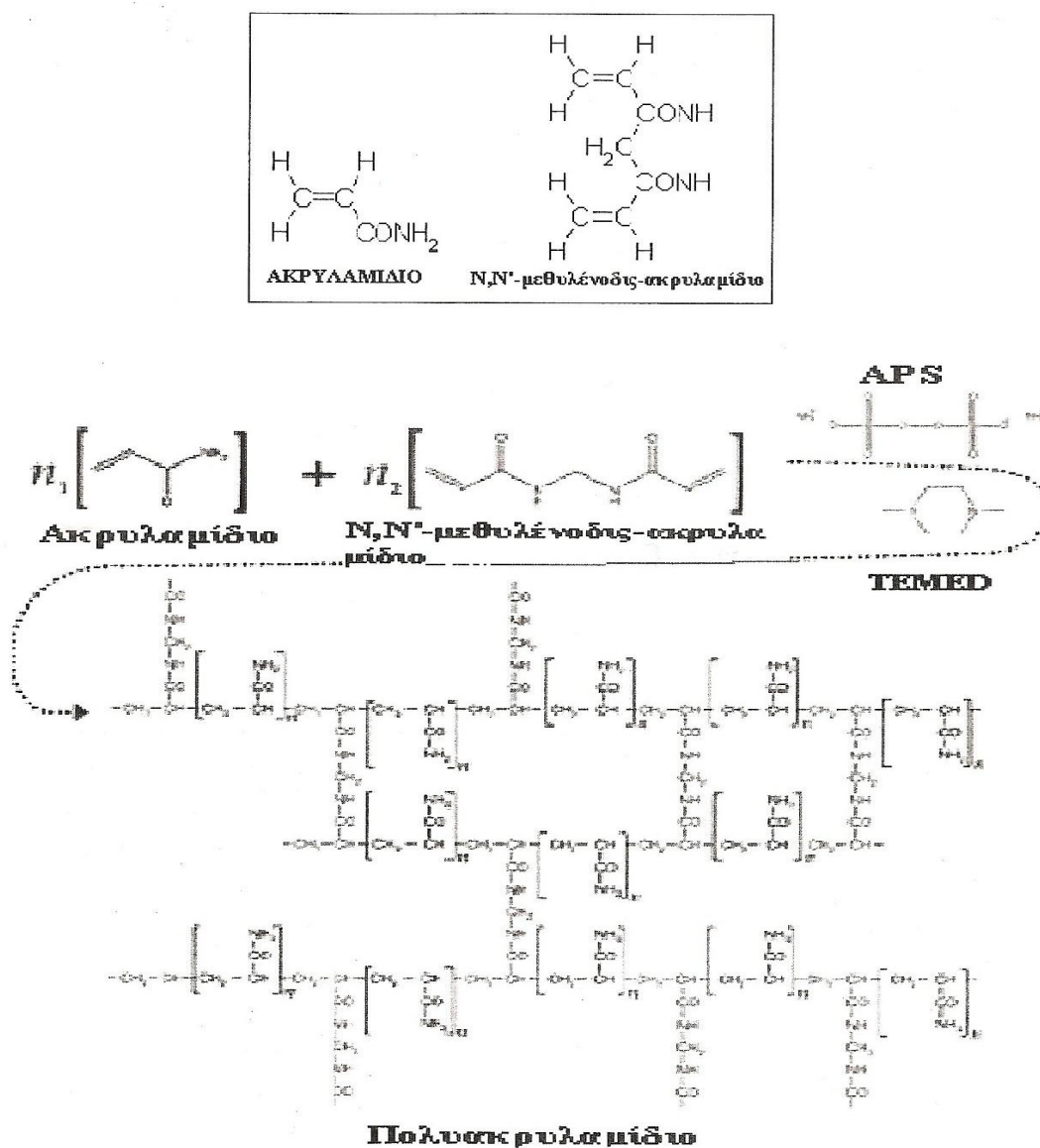
Για να πετύχουμε διαχωρισμό των πρωτεϊνών του μείγματος ανάλογα με το μέγεθός τους και μόνο, θα πρέπει: α) να καταστρέψουμε την τριτοταγή δομή τους με αποδιατακτικούς παράγοντες και β) να τις δώσουμε φορτίο ανάλογο του μεγέθους τους και ανεξάρτητο του αρχικού φορτίου που έχει μια φυσική πρωτεΐνη. Στα μέσα του 1960 αναπτύχθηκε μια μέθοδος γνωστή ως SDS – ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS–PAGE, Sodium Dodecyl Sulphate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) η οποία επέτρεψε υψηλό βαθμό ανάλυσης των πρωτεϊνών. Το SDS (το με νάτριο άλας του θεικού δωδεκυλίου) είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που καταστρέφει όλες τις μη ομοιοπολικές (διαμοριακές και ενδομοριακές) αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών. Δεσμεύεται στις κύριες αλυσίδες, σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο αρνητικό φορτίο περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης καθίσταται αμελητέο (εικόνα 5.7). Επειδή σε πολλές περιπτώσεις υπάρχουν και δισουλφιδικοί (-S-S) δεσμοί στις πρωτεΐνες, προσθέτουμε μαζί με το SDS και περίσσεια ελεύθερης θειόλης (β-μερκαπτοαιθανόλη), η οποία σε συνδυασμό με υψηλές θερμοκρασίες (συνήθως 100 °C) ανάγει τους δεσμούς αυτούς.



**Εικόνα 5.7.** Επίδραση του μορίου SDS στη δομή και το φορτίο της πρωτεΐνης.

Τελικά επέρχεται πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες είναι έντονα ανιονικές σε ουδέτερο pH. Στις ανωτέρω συνθήκες ο διαχωρισμός εξαρτάται μόνον από το μοριακό μέγεθος (μοριακό βάρος), διότι η αναλογία καθαρού φορτίου προς μοριακό μέγεθος έχει την ίδια τιμή για όλα τα πρωτεϊνικά μόρια (όλα φέρουν συνδεδεμένη μία ομάδα SDS ανά 2 περίπου ομάδες αμινοξέων).

Το πήγμα πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιείται προκύπτει από τον πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου σε αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου οι οποίες διασυνδέονται με ομοιοπολικές γέφυρες  $N,N'$  – μεθυλένο – δις – ακρυλαμιδίου. Τα μόρια ακρυλαμιδίου είναι σταθερά ως μονομερή άλλα πολυμερίζονται ταχύτατα παρουσία ενός συστήματος δημιουργίας ελευθέρων ριζών. Κατά κανόνα το σύστημα πολυμερισμού λειτουργεί με παραγωγή ελευθέρων ριζών από υπερθεϊκό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) και καταλύτη το  $N,N,N',N'$  – τετραμεθυλο – αιθυλένο – διαμίνη (TEMED) (εικόνα 5.8).



**Εικόνα 5.8.** Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου παρουσία APS και με καταλύτη το TEMED.

Έτσι, η πηκτή λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός διαχωρίζοντας τα μόρια ως προς το μέγεθος. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια μένουν ακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Το μέγεθος των πόρων της πηκτής μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου (μικρότερο μέγεθος σχηματιζόμενων πόρων), τόσο μικρότερα τα μοριακά βάρη πρωτεϊνών που είναι δυνατόν να διαχωριστούν ικανοποιητικά. Ενδεικτικά, πηγματα που περιέχουν 7.5-8% (w/v) ακρυλαμιδίου επιτρέπουν ικανοποιητικό

ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό στην περιοχή 45–200 kDa, πηγμένα με 12 % (w/v) ακρυλαμίδιου στην περιοχή 14–70 kDa και πηγμένα με 20 % (w/v) ακρυλαμίδιου στην περιοχή 5–45 kDa.

### Ετοιμασία πηκτής διαχωρισμού (separating gel) – πηκτής επιστοιβάξης (stacking gel).

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης περιγράφηκε από το Laemmli, το 1970 και αφορά το κατακόρυφο σύστημα των γυάλινων πλακών. Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη: την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel ή running gel). Η πηκτή επιστοιβάξης διαφέρει από την κυρίως πηκτή ηλεκτροφόρησης (πηκτή διαχωρισμού) ως προς τη συγκέντρωση ακρυλαμίδιου (μικρή συγκέντρωση, συνήθως 3–6% w/v), την ιονική ισχύ (συνήθως υποτριπλάσια) και το pH (6.8 έναντι 8.8). Ο ρόλος της είναι να επαυξάνει τη διακριτική ικανότητα διαχωρισμού μέσω δημιουργίας λεπτότερων πρωτεϊνικών ζωνών. Στην πηκτή επιστοιβάξης συσσωρεύονται ταυτόχρονα οι πρωτεΐνες σε μια στιβάδα, ώστε να εισέρχονται ταυτόχρονα στη δεύτερη πηκτή, όπου και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός τους.

### Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά

- **Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)**
- **Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl):** Hydrochloric acid fuming 37 %, Merck.
- **Υδροξυμεθυλο–τρης–αμινομεθάνιο (Tris–base):** Tris (Hydroxymethyl)–aminomethan, H<sub>2</sub>NC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, M.B = 121.14 gr/mole, electrophoresis Purity Reagent, BioRad.
- **Ακρυλαμίδιο:** Acrylamide, CH<sub>2</sub>CHCONH<sub>2</sub>, M.B = 71.08 gr/mole, Merck.
- **N,N'–μεθυλενο–δισ–ακρυλαμίδιο:** Bis–acrylamide, N,N'–Methylenediacrylamide, C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M.B = 154.17 gr/mole, Merck.
- **Το με νάτριο άλας του θειϊκού δωδεκυλίου (SDS):** Sodium Dodecyl Sulphate salt, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, M.B = 288.38 gr/mole, Calbiochem.
- **N,N,N',N' – τετραμεθυλο – αιθυλενο – διαμίνη (TEMED) :** N,N,N',N' – tetramethylethylenediamine, υγρό στους 4°C, 5ml, BioRad.

- **Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS):** Ammonium PerSulfate,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , M.B: 228.20 gr/mole, BioRad.
- **Ισοβουτανόλη:** Isobutanol, 2-methyl-1-propanol,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{OH}$ , M.B: 74.12 gr/mole, Ferak.
- **Απόλυτη Αιθανόλη :** Ethanol Absolut, Riedel de Haën.

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε το Ηλεκτροφορητικό σύστημα Mini – PROTEAN II Cell (BioRad) που περιλαμβάνει :

- Μικρές γυάλινες πλάκες 7.3 cm X 10.2 cm (2)
- Μεγάλες γυάλινες πλάκες 8.3 cm X 10.2 cm (2)
- Διαχωριστές (spacers) πάχους 1.5 mm (4)
- Κάρτα ευθυγράμμισης (alignment card)
- Βάση στήριξης πλακών
- Ελάσματα καουτσούκ (χρώματος γκρι) (2)
- Χτένι 10 φρεατίων πάχους 1.5 mm (2)
- Σύστημα σταθεροποίησης πλακών με σφιγκτήρες
- Δεξαμενή ηλεκτροφόρησης
- Σύστημα ηλεκτροδίων
- Καπάκι σύνδεσης με τα ηλεκτρόδια
- Τροφοδοτικό ρεύματος PowerPac 1000, Power Supply



**Εικόνα 5.9.** Ηλεκτροφορητικό σύστημα Mini – PROTEAN II Cell (BioRad)

**Διαλύματα εργασίας**

- **Διάλυμα Tris–base 1.5 M, pH 8.8** : Φτιάχνουμε διάλυμα Tris – base τελικής συγκέντρωσης 1.5 M σε απεσταγμένο νερό. Αρχικό pH = 10.94. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στα 8.8 με HCl. Αποθήκευση του διαλύματος στους 4°C.
- **Διάλυμα Tris–base 0.5 M, pH 6.8** : Φτιάχνουμε διάλυμα Tris – base τελικής συγκέντρωσης 0.5 M σε απεσταγμένο νερό. Αρχικό pH = 10.76. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στα 6.8 με HCl. Αποθήκευση του διαλύματος στους 4°C.
- **Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% βάρος κατ’ όγκο, δις – ακρυλαμιδίου 0.8% βάρος κατ’ όγκο - acrylamide 30% (w/v) , bis 0.8% (w/v)** : Παίρνουμε το διάλυμα έτοιμο από το εμπόριο σε σκουρόχρωμο δοχείο. Το αποθηκεύουμε στους 4°C.
- **Διάλυμα SDS 10% βάρος κατ’ όγκο (w/v)** : Φτιάχνουμε διάλυμα SDS 10 % w/v σε απεσταγμένο νερό. Προσέχουμε να φοράμε γάντια και μάσκα λόγω της τοξικότητας της ουσίας. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Ίσως χρειαστεί θέρμανση του διαλύματος πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10% βάρος κατ’ όγκο (w/v):** Φτιάχνουμε διάλυμα APS 10% w/v σε απεσταγμένο νερό. Αναδεύουμε το διάλυμα. *Φτιάχνεται λίγο πριν τη χρήση του.*

**Διάλυμα – πηκτική διαχωρισμού ή διαδρομής (Separating Gel ή Running Gel)  
7,5%, 0.5625 M Tris, pH 8.8**

Σε ποτήρι ζέσεως των 50 ml εισάγουμε (ποσότητες για 2 gel) :

|                                                   | 7,5%   | 8%     | 12%    |
|---------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| <i>ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΝΕΡΟ</i>                           | 9,7 ml | 6,7 ml | 4,1 ml |
| <i>ΔΙΑΛΥΜΑ Tris- Base 1.5 M pH 8.8</i>            | 5,0 ml | 7,5 ml | 7,5 ml |
| <i>ΔΙΑΛΥΜΑ Acryl 30 % (w/v) – bis 0.8 % (w/v)</i> | 5,0 ml | 5,4 ml | 8,0 ml |
| <i>ΔΙΑΛΥΜΑ SDS 10 % (w/v)</i>                     | 200 μl | 200 μl | 200 μl |
| <i>TEMED</i>                                      | 10 μl  | 14 μl  | 14 μl  |
| <i>ΔΙΑΛΥΜΑ APS 10 % (w/v)</i>                     | 100 μl | 200 μl | 200 μl |

Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι αρκετός για να φτιάξουμε δυο πηκτές. Δεν αναδεύουμε ισχυρά τα συστατικά του διαλύματος. Τελευταία προστίθενται τα APS και TEMED, αφού δρουν καταλυτικά στον πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου.

#### Διάλυμα – πηκτή επιστοιβαξης (Stacking Gel) 4.875%, 0.1875 M Tris, pH 6.8

Σε ποτήρι ζέσεως των 50 ml εισάγουμε (ποσότητες για 2 gel) :

|                                                   |         |
|---------------------------------------------------|---------|
|                                                   | 4.875%, |
| <i>ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΝΕΡΟ</i>                           | 3.5 ml  |
| <i>ΔΙΑΛΥΜΑ Tris – Base 0.5 M pH 6.8</i>           | 3,0 ml  |
| <i>ΔΙΑΛΥΜΑ Acryl 30 % (w/v) – bis 0.8 % (w/v)</i> | 1,3 ml  |
| <i>ΔΙΑΛΥΜΑ SDS 10 % (w/v)</i>                     | 80 μl   |
| <i>TEMED</i>                                      | 8 μl    |
| <i>ΔΙΑΛΥΜΑ APS 10 % (w/v)</i>                     | 80 μl   |

Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι αρκετός για να φτιάξουμε δυο πηκτές. Δεν αναδεύουμε ισχυρά τα συστατικά του διαλύματος. Τελευταία προστίθενται τα APS και TEMED, αφού δρουν καταλυτικά στον πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου.

#### Πειραματική πορεία

**Στήσιμο συσκευής – προετοιμασία πηκτών ηλεκτροφόρησης.** Χρησιμοποιείται το ηλεκτροφορητικό σύστημα Mini-PROTEAN II Cell (BioRad). Τα βήματα που ακολουθούμε κατά το στήσιμο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και την ετοιμασία των πηκτών είναι τα εξής:

1. Ξεπλένουμε όλα τα εξαρτήματα του ηλεκτροφορητικού συστήματος πρώτα με νερό βρύσης και στη συνέχεια με απεσταγμένο νερό. Τις γυάλινες πλάκες τις ξεπλένουμε επιπλέον με αιθανόλη 70% προσέχοντας να μην έχουν μείνει υπολείμματα από προηγούμενα πειράματα. Στεγνώνουμε καλά.



2. Τοποθετούμε τις γυάλινες πλάκες (ένα ζεύγος για κάθε πηκτή) τη μία πάνω στην άλλη και στις δυο πλάγιες άκρες τους τοποθετούμε τους δυο διαχωριστές (spacers) πάχους 1.5 mm έτσι ώστε να είναι παράλληλοι μεταξύ τους.
3. Μεταφέρουμε τις γυάλινες πλάκες στο σύστημα σταθεροποίησης με σφιγκτήρες. Με τους σφιγκτήρες να ακουμπάνε στον πάγκο, η μεγαλύτερη πλάκα τοποθετείται πρώτα και από πάνω της η μικρότερη. Για να είναι παράλληλοι οι διαχωριστές χρησιμοποιούμε και την κάρτα ευθυγράμμισης μεταξύ των πλακών. Σφίγγουμε όσο χρειάζεται. Προσέχουμε η κάτω επιφάνεια πλακών – διαχωριστών να είναι τελείως λεία.
4. Μεταφέρουμε το παραπάνω σύστημα στη βάση στήριξης των πλακών, όπου έχουν τοποθετηθεί ελάσματα καουτσούκ (γκρι χρώματος) που εξασφαλίζουν στεγανότητα.
5. Μια πιπέττα βάζουμε λίγο απεσταγμένο νερό μεταξύ των πλακών και σημειώνουμε με μη ανεξίτηλο μαρκαδόρο τη στάθμη του. Αφήνουμε για 15-20 λεπτά και παρατηρούμε αν έχουμε διαρροή. Αν έχουμε διαρροή επαναλαμβάνουμε τα βήματα από το 1.
6. Αφαιρούμε το απεσταγμένο νερό με απότομη κίνηση.
7. Εισάγουμε το χτένι ανάμεσα στις δυο πλάκες και με μη ανεξίτηλο μαρκαδόρο σημειώνουμε μια απόσταση 1cm κάτω από το δόντι του χτενιού. Αφαιρούμε το χτένι.
8. Ετοιμάζουμε το διάλυμα διαχωρισμού ή διαδρομής όπως περιγράφηκε στη σελ. 112.
9. Με μία πιπέττα τοποθετούμε αμέσως την πρώτη πηκτή έως το σημείο του σταδίου 7. Προσέχουμε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα που πιθανώς παρεμποδίσουν τον πολυμερισμό.
10. Προσθέτουμε μια λεπτή στιβάδα ισοβουτανόλης η οποία απορροφάει το νερό που “βγάζει” η πηκτή. Επιπλέον την αποτρέπουμε από το να έρθει σε επαφή με τον αέρα.
11. Μετατοπίζοντας το σύστημα προς το πλάι σιγουρευόμαστε ότι έχει πήξει η πηκτή καθώς παραμένει ακίνητη.
12. Αποχύνουμε απότομα την ισοβουτανόλη.
13. Ξεπλένουμε την πάνω επιφάνεια της πηκτής με απεσταγμένο νερό το οποίο και απομακρύνουμε.
14. Ετοιμάζουμε το διάλυμα επιστοίβαξης όπως περιγράφηκε στη σελ. 118.
15. Με μια πιπέττα τοποθετούμε αμέσως τη δεύτερη πηκτή ως τη μισή απόσταση από την κορυφή των πλακών.

16. Εισάγουμε προσεχτικά το χτένι.
17. Συμπληρώνουμε τα κενά ανάμεσα στα δόντια με το διάλυμα της πηκτής προσέχοντας να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα.
18. Αφήνουμε να πολυμεριστεί η πηκτή για 40–50 λεπτά.
19. Στο διάστημα αυτό ετοιμάζουμε τα δείγματά μας.

Ετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων – Διάλυμα πρότυπων μοριακών βαρών – Διάλυμα ροής ηλεκτροφόρησης – Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνικών δειγμάτων.

#### Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά

- **Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)**
- **Υδροξυμεθυλο-τρικ-αμινομεθάνιο (Tris-base):** Tris (Hydroxymethyl) – aminomethan, H<sub>2</sub>NC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, M.B = 121.14 g/mole, electrophoresis Purity Reagent, BioRad.
- **Το με νάτριο άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS):** Sodium Dodecyl Sulphate salt, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, M.B = 288.38 g/mole, Calbiochem.
- **Κυανό της βρωμοφαινόλης:** Bromphenolblau, pH 3 – 4.6, C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S, M.B = 669.97 g/mole, 5g, Ferak Berlin.
- **Γλυκερόλη :** Glycerol, 1,2,3 – propanetriol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, (HOCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH), M.B = 92.10, 1kg, Henkel.
- **2-μερκαπτοαιθανόλη:** 2-mercaptoethanol, Electrophoresis reagent ≥ 98 %, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, (HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), M.B = 78.13 g/mole, 25 ml, Sigma.
- **Γλυκίνη :** Glycine, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>, (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), M.B = 75.07 g/mole, Merck.

#### Διαλύματα εργασίας

**Διάλυμα Tris-base 0.5M pH 6.8:** Όπως περιγράφηκε στη σελ. 108, 119.

**Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Laemmli buffer 4X):** Όπως περιγράφηκε στη σελ. 108.

### Ετοιμασία δειγμάτων:

Ξεπαγώνουμε τα πρωτεϊνικά μας δείγματα. Τα ανακινούμε σε κυκλικό αναδευτήρα. Αφού ανοίξουμε με μία βελόνα 2-3 τρύπες στο καπάκι του κάθε eppendorf, τα βράζουμε για 10 λεπτά στους 100°C σε βραστήρα για eppendorf. Ανακινούμε τα δείγματα σε κυκλικό αναδευτήρα και ετοιμαζόμαστε για τη φόρτωση τους. Μετά τη χρήση τους τα δείγματα τυλίγονται σε παραφίλμ και αποθηκεύονται στους -20°C.

**Διάλυμα πρότυπων μοριακών βαρών:** Έτοιμο διάλυμα από το εμπόριο. Σε κάθε πηκτή ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται το διάλυμα πρότυπων μοριακών βαρών σαν δείγμα αναφοράς μοριακών βαρών. Οι πρωτεΐνες αυτές καλύπτουν την περιοχή μοριακών βαρών που μας ενδιαφέρει. Το ξεπαγώνουμε πριν τη χρήση του.

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Μυοσίνη                 | 199 kDa |
| B-γαλακτοζαμίνη         | 116 kDa |
| Αλβουμίνη βοδιού        | 97 kDa  |
| Αλβουμίνη αυγού         | 54 kDa  |
| Καρβονική ανυδράση      | 37 kDa  |
| Αναστολέας της τρυψίνης | 29 kDa  |
| Λυσοζύμη                | 20 kDa  |
| Αποπροτονίνη            | 7 kDa   |

| <b>BIO-RAD</b> <b>Prestained SDS-PAGE Standards</b><br><b>Broad Range</b><br><b>Catalog 161-0318, Control 310005521</b> |                                               |                                               |                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Protein                                                                                                                 | Calibrated<br>MW (daltons)<br>on Tris-HCl gel | Calibrated<br>MW (daltons)<br>on Bis-Tris gel | Calibrated MW<br>(daltons) on<br>Tris-Acetate gel |
| Myosin                                                                                                                  | 198,844                                       | 195,785                                       | 197,603                                           |
| β-galactosidase                                                                                                         | 115,700                                       | 104,020                                       | 110,271                                           |
| Bovine serum albumin                                                                                                    | 96,743                                        | 59,840                                        | 72,274                                            |
| Ovalbumin                                                                                                               | 53,541                                        | 41,675                                        | 44,495                                            |
| Carbonic anhydrase                                                                                                      | 37,134                                        | 27,855                                        | 31,600                                            |
| Soybean trypsin inhibitor                                                                                               | 29,134                                        | 21,168                                        |                                                   |
| Lysozyme                                                                                                                | 19,540                                        | 15,223                                        |                                                   |
| Aprotinin                                                                                                               | 6,905                                         | 6,501                                         |                                                   |

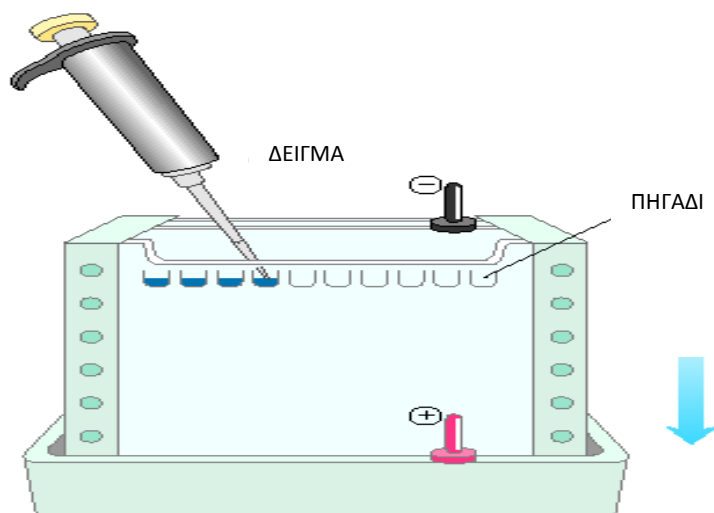
CL1610318 Rev B  
Bio-Rad Laboratories • 2000 Alfred Nobel Drive • Hercules, CA 94547

**Διάλυμα ροής ηλεκτροφόρησης (running buffer) 10X:** Φτιάχνουμε διάλυμα ροής ηλεκτροφόρησης σε δεκαπλάσια συγκέντρωση (10X). Αυτό περιέχει Tris – base 250mM, γλυκίνη 1900mM και SDS 35mM. Η διάλυση των ουσιών γίνεται σε απεσταγμένο νερό. Πριν από τη χρήση του αραιώνουμε το διάλυμα 10 φορές με απεσταγμένο νερό (ώστε να προκύψει διάλυμα 1X) και ρυθμίζουμε το pH του στα 8.3 με HCl. Το διάλυμα 1X επαναχρησιμοποιείται, αφού ελέγξουμε το pH προηγουμένως. Τα διαλύματα (10X και 1X) φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Πειραματική πορεία

1. Αφαιρούμε το χτένι απότομα (κάθετα) προσέχοντας να μη χαλάσουν τα φρεάτια φόρτωσης.

2. Αποσυνδέουμε το σύστημα των πλακών από τη βάση στήριξής του και το συνδέουμε με το σύστημα που φέρει τα δυο ηλεκτρόδια. Έτσι, σχηματίζεται ένα εσωτερικό διαμέρισμα ηλεκτροφόρησης το οποίο εισάγεται μέσα στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης.
3. Γεμίζουμε όλους τους χώρους της δεξαμενής (εσωτερικό και εξωτερικό διαμέρισμα) με διάλυμα ροής ηλεκτροφόρησης (το stacking gel δεν πρέπει να στεγνώσει) και φροντίζουμε να μην επικοινωνεί το ρυθμιστικό διάλυμα εσωτερικού – εξωτερικού διαμερίσματος.
4. Με μια πιπέτα εισάγουμε προσεχτικά περίπου 30-40  $\mu\text{l}$  από τα δείγματά μας και 5  $\mu\text{l}$  από το διάλυμα πρότυπων μοριακών βαρών στις θέσεις των φρεατίων φόρτωσης.



**Εικόνα 5.10.** Φόρτωση δειγμάτων στα πηγαδάκια (wells)

5. Τοποθετούμε το καπάκι σύνδεσης με τα ηλεκτρόδια πάνω στη συσκευή προσέχοντας το κόκκινο ηλεκτρόδιο (άνοδος) να ταιριάζει με τον κόκκινο υποδοχέα και το μαύρο (κάθοδος) με το μαύρο.
6. Συνδέουμε τη συσκευή με τροφοδοτικό ρεύματος. Η ηλεκτροφόρηση διενεργείται υπό την επίδραση πεδίου σταθερής τάσης 120 V (Ανοίγω το τροφοδοτικό, επιλέγω manual, const V, συμπληρώνω την ένδειξη 120 και πατάω το δρομέα).
7. Όταν η χρωστική φτάσει στη βάση του συστήματος των πλακών, σταματάμε την ηλεκτροφόρηση (πατώντας πρώτα το χεράκι, έπειτα κλείνω τη συσκευή βγάζω τα ηλεκτρόδια και τέλος το καπάκι σύνδεσης).

### 5.5.2. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβρανικό υπόστρωμα (Western Transfer)

Ο χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης μόνο ως προς το μοριακό της βάρος δεν είναι αρκετός. Χρειάζεται και η ταυτοποίησή της από ένα ειδικό αντίσωμα. Γι' αυτό το λόγο οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου στη νιτροκυτταρίνη με ηλεκτροφόρηση. Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης είναι ένα στερεό υπόστρωμα με υψηλή ικανότητα δέσμευσης των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ικανοποιητική ευαισθησία της μεθόδου.

#### Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά

- Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)
- Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl): Hydrochloric acid fuming 37 %, Merck.
- Απόλυτη Αιθανόλη: Ethanol Absolut, Riedel de Haën.
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης: Hybond-ECL nitrocellulose membrane, 15cm X 20cm, RPN1520D, Amersham, Biosciences.
- Γάντια
- Κουπάκια πλαστικά
- Λαβίδα
- Γυάλινος κυλινδρικός σωλήνας
- Ψαλίδι
- Διηθητικό χαρτί

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Ηλεκτροφορητικής Μεταφοράς Mini Trans – Blot Transfer Cell (BioRad) που περιλαμβάνει :

- Σχάρα μεταφοράς (cassette) (2)
- Σπόγγοι διαστάσεων 8 cmX 11cm (fiber pad) (4)
- Δεξαμενή ηλεκτρομεταφοράς
- Παγοκολώνα
- Σύστημα ηλεκτροδίων
- Καπάκι σύνδεσης με τα ηλεκτρόδια
- Τροφοδοτικό ρεύματος PowerPac 200, Power Supply

### Διαλύματα εργασίας

**Διάλυμα ροής ηλεκτροφόρησης (running buffer) 10X:** Όπως περιγράφηκε στη σελ. 123.

**Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer pH 8.3):** Το διάλυμα αυτό περιέχει Tris – base 25mM, γλυκίνη 190mM, SDS 3.5mM και 20% αιθανόλη (v/v). Για να φτιάξουμε το διάλυμα αυτό αραιώνουμε το διάλυμα ροής ηλεκτροφόρησης (10X) δέκα φορές σε απεσταγμένο νερό και υπολογίζουμε και τελική περιεκτικότητα 20% αιθανόλη όγκο κατ' όγκο (v/v) στον αραιωμένο όγκο. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 8.3. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί, αφού ελέγξουμε το pH προηγουμένως.

### Πειραματική πορεία

Κατά την ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβρανικό υπόστρωμα (μεμβράνη νιτροκυτταρίνης) ακολουθούμε τα εξής βήματα:

1. Πριν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση (15-20 λεπτά πριν κλείσουμε το τροφοδοτικό) ετοιμάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και γεμίζουμε με αυτό μικρά πλαστικά κουπάκια στα οποία εμβαπτίζουμε και εξισορροπούμε:
  - α) 2 κομμάτια νιτροκυτταρίνης που έχουμε κόψει σε μέγεθος που αντιστοιχεί σε αυτό των σπόγγων (8cm X 11cm). Στους χειρισμούς της νιτροκυτταρίνης φοράμε πάντα γάντια και χρησιμοποιούμε λαβίδα. Η νιτροκυτταρίνη σε όλα τα μετέπειτα στάδια πρέπει να διατηρείται υγρή.
  - β) 4 κομμάτια διηθητικό χαρτί στο παραπάνω μέγεθος,
  - γ) 4 σπόγγους (fiber pad) και
  - δ) τις 2 σχάρες μεταφοράς.
2. Μόλις τελειώσει η ηλεκτροφόρηση αποσυνδέουμε τις γυάλινες πλάκες από τις θέσεις στήριξής τους.
3. Χρησιμοποιώντας τον ένα διαχωριστή (spacer) σαν μοχλό αποκολλούμε προσεκτικά τη μία πλάκα από την πηκτική.
4. Αφαιρούμε και απορρίπτουμε την περιοχή που αντιστοιχεί στην πηκτική επιστοιβάξης.
5. Κόβουμε την υπόλοιπη πηκτική σε μια άκρη για να ξέρουμε μετέπειτα ποιες ζώνες αντιστοιχούν στα δείγματα που έχουμε φορτώσει. Σε αυτό μας βοηθάνε οι

προχρωματισμένες ζώνες του διαλύματος προτύπων μοριακών βαρών που είναι ευδιάκριτες.

6. Κόβουμε ακριβώς με τον ίδιο τρόπο και τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που αντιστοιχεί στην παραπάνω πηκτή.
7. Μεταφέρουμε με τα δάκτυλα (φορώντας γάντια) την πηκτή σε διάλυμα μεταφοράς.
8. Παράλληλα συναρμολογούμε την σχάρα μεταφοράς (cassette) ως εξής:

#### Κάθοδος (-)

Σκουρόχρωμη πλευρά της  
σχάρας

Στρώμα σπόγγου (fiber pad)

Διεθητικό χαρτί

**Πηκτή πολυακρυλαμίδιου**

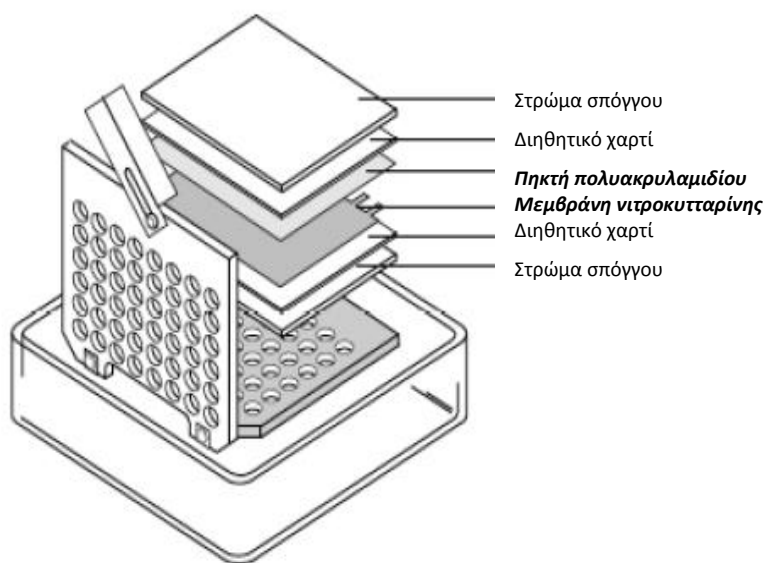
**Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Διεθητικό χαρτί

Στρώμα σπόγγου (fiber pad)

Λευκή πλευρά της σχάρας

#### Άνοδος (+)



Κάθε φορά που προσθέτουμε οποιοδήποτε από τα παραπάνω στρώματα περνάμε από πάνω τους 4–5 φορές ένα καθαρό γυάλινο κυλινδρικό σωλήνα για να φύγουν οι φυσαλίδες αέρα. Επίσης, προσέχουμε τα διαδοχικά στρώματα να εφαρμόζουν απόλυτα και να μην προεξέχουν μεταξύ τους.

9. Κλείνουμε τη σχάρα και τοποθετούμε το “sandwich” στο σύστημα με τα ηλεκτρόδια, ώστε η άνοδος (+) της σχάρας να αντιστοιχεί στο κόκκινο και η κάθοδος (-) στο μαύρο τοίχωμα του συστήματος.
10. Γεμίζουμε τη δεξαμενή ηλεκτρομεταφοράς ως το μέσον με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.
11. Εισάγουμε στη δεξαμενή το σύστημα των ηλεκτροδίων με τη σχάρα και στο πλάι βάζουμε την παγοκολώνα για να αποφύγουμε το βράσιμο του διαλύματος (η παγοκολώνα βρίσκεται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

12. Τοποθετούμε το καπάκι σύνδεσης με τα ηλεκτρόδια πάνω στη συσκευή προσέχοντας το κόκκινο ηλεκτρόδιο (άνοδος) να ταιριάζει με τον κόκκινο υποδοχέα και το μαύρο (κάθοδος) με το μαύρο.

13. Συνδέουμε τη συσκευή με το τροφοδοτικό ρεύματος και γίνεται ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών της πηκτής προς τη μεμβράνη νιτροκυταρίνης υπό την επίδραση πεδίου σταθερής έντασης 0.15A για τρεις ώρες. Για μεμβράνες PVDF η ηλεκτρομεταφορά γίνεται υπό την επίδραση σταθερής τάσης 90V για μία ώρα (Ανοίγω τη συσκευή, επιλέγω const A ή const V, ανάλογα τη μεμβράνη θα χρησιμοποιήσω, συμπληρώνω τη τιμή και πατώ το δρομέα).

### 5.5.3. Χρώση και οπτική ανίχνευση των πρωτεϊνών της νιτροκυταρίνης – Αποχρωματισμός και φύλαξη της μεμβράνης

#### Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά

- **Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)**
- **Χλωριούχο νάτριο:** Sodium chloride – NaCl, MB : 58.44 gr/mole, Merck.
- **Υδροξυμεθυλο–τρης–αμινομεθάνιο (Tris–base):** Tris(Hydroxymethyl)–aminomethan, H<sub>2</sub>NC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, M.B=121.14gr/mole, electrophoresis Purity Reagent, BioRad.
- **Tween 20:** Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, BioRad.
- **Γάντια**
- **Κουπάκια πλαστικά**
- **Λαβίδα**
- **Ανακινούμενη βάση ανάδευσης**
- **Ανεξίτηλος μαρκαδόρος**
- **Φωτοτυπούμενη διαφάνεια**

#### Διαλύματα εργασίας

**Διάλυμα χρωστικής Rouge Ponceau:** Έτοιμο διάλυμα από το εμπόριο. Ponceau S Solution, 0.1% Ponceau S (w/v) in 5% acetic acid (v/v), C<sub>22</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>13</sub>S<sub>4</sub>, M.B = 760.56 gr/mole, Sigma.



**Διάλυμα Tween 20 – TBS ή TTBS 10X :** Το διάλυμα αυτό περιέχει : 200mM Tris – base, χλωριούχο νάτριο (NaCl) σε τελική συγκέντρωση 1370mM και 2% (v/v) Tween 20. Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος. Το διάλυμα TTBS 10X αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

**Διάλυμα αποχρωματισμού της νιτροκυτταρίνης Tween 20–TBS ή TTBS 1X pH 7.4:** Αραιώνουμε το διάλυμα TTBS 10X σε απεσταγμένο νερό δέκα φορές για να προκύψει διάλυμα αποχρωματισμού TTBS 1X. Ρυθμίζουμε το pH του τελευταίου διαλύματος στο 7.4 με HCl. Το διάλυμα TTBS 1X αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί.

### Πειραματική πορεία

Για να έχουμε μια εικόνα του συνόλου των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στη νιτροκυτταρίνη, ακολουθεί η χρώση της ως εξής :

1. Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς αποσυνδέουμε τη συσκευή από το τροφοδοτικό (πατώντας πρώτα το δρομέα, έπειτα κλείνω τη συσκευή βγάζω τα ηλεκτρόδια και τέλος το καπάκι σύνδεσης).
2. Αποσυναρμολογούμε τη σχάρα μεταφοράς. Σε αυτό το στάδιο μπορούμε να ελέγξουμε κατά πόσο η μεταφορά ολοκληρώθηκε με επιτυχία με βάση το δείγμα των προχρωματισμένων προτύπων πρωτεϊνών : επιτυχής μεταφορά σημαίνει ότι οι ζώνες των προτύπων πρωτεϊνών θα πρέπει να έχουν αποσπαστεί από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου και να είναι ορατές μόνο πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι ζώνες αυτές είναι χρωματισμένες μπλε.
3. Με λαβίδα και φορώντας γάντια εισάγουμε τη νιτροκυτταρίνη σε κουπάκι που περιέχει διάλυμα χρωστικής ώστε να καλυφθεί πλήρως.
4. Ανακινούμε ήπια τη μεμβράνη για 1 λεπτό.
5. Ξεπλένουμε τη νιτροκυτταρίνη με απεσταγμένο νερό μέχρι να γίνουν εμφανείς οι ζώνες των πρωτεϊνών.
6. Στεγνώνουμε τη νιτροκυτταρίνη σε διηθητικό χαρτί.
7. Με ανεξίτηλο μαρκαδόρο σημειώνουμε τις ζώνες των προτύπων μοριακών βαρών (έχουν χρώμα μπλε).

8. Βγάζουμε μια φωτοτυπία ή σαρώνουμε (scanning) τη μεμβράνη, αφού ακουμπήσουμε και τις δύο πλευρές της σε διαφάνεια. Όλοι οι χειρισμοί γίνονται με γάντια.
9. Σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης αποχρωματίζουμε καλά τη νιτροκυτταρίνη εξισορροπώντας τη σε διάλυμα αποχρωματισμού, για 30 λεπτά με αλλαγές του διαλύματος κάθε 10 λεπτά.
10. Στεγνώνουμε τη μεμβράνη και τη φυλάμε σε διηθητικό χαρτί.
11. Σε αυτή τη στεγνή κατάσταση μπορεί να παραμείνει η μεμβράνη μέχρι τα πειράματα επώασής της με τα αντισώματα.

#### 5.5.4. Επώαση πρωτεϊνών με αντισώματα – Αποτύπωση τους με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (immunodetection)

Μια στατιστική επισκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας στο γνωστικό πεδίο της Βιοχημείας έχει δείξει ότι πάνω από το 25 % των δημοσιευμένων ερευνητικών εργασιών χρησιμοποιούν ανοσοχημικές τεχνικές, δηλαδή στηρίζονται στη χρήση αντισωμάτων ως ερευνητικών εργαλείων. Τα αντισώματα (antibodies) ή ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins, Ig) είναι πρωτεΐνες παραγόμενες και εκκρινόμενες από τα Β λεμφοκύτταρα, οι οποίες λειτουργούν ως εξειδικευμένος μηχανισμός άμυνας σε περιπτώσεις ιικών ή βακτηριακών λοιμώξεων ή κακοήθους μετασχηματισμού (νεοπλασίας). Στις περιπτώσεις αυτές κάθε ενεργοποιημένο Β λεμφοκύτταρο παράγει ένα συγκεκριμένο (ειδικό) τύπο αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη μοριακή περιοχή (επίτοπο) πάνω σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Αντιγόνο (antigen) είναι ένα οποιοδήποτε μόριο (π.χ μια βακτηριακή πρωτεΐνη) το οποίο παρουσιάζεται στο ανοσολογικό σύστημα κατά τη διαδικασία της λοίμωξης ή της νεοπλαστικής ανάπτυξης και αναγνωρίζεται σαν ξένο (foreign), ώστε να ενεργοποιήσει τον αντίστοιχο κλώνο Β λεμφοκυττάρων. Η αντίδραση δέσμευσης αντιγόνου – αντισώματος, η οποία παρουσιάζει υψηλό βαθμό εξειδίκευσης (specificity) και συγγένειας (affinity) (σταθερές διάστασης,  $K_D$  μεταξύ  $10^{-6}$  και  $10^{-10}$  M), χρησιμοποιείται εργαστηριακά για τον ποιοτικό και/ή ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων αντιγόνων (συνήθως πρωτεϊνών).

Στην εργαστηριακή εφαρμογή η έννοια του αντιγόνου αναφέρεται σε οποιοδήποτε πρωτεϊνικό ή άλλο μόριο που αναγνωρίζεται και μπορεί να ανιχνευθεί από ειδικά

αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά μπορεί να είναι μονοκλωνικά (monoclonal) ή πολυκλωνικά (polyclonal) και παρασκευάζονται με μεθόδους τεχνητής ανοσολογικής ενεργοποίησης πειραματόζων, ενίοντας το ίδιο το (επιθυμητό) μόριο “αντιγόνου” ως ανοσογόνο (immunogen), ώστε να επάγει την ανοσολογική απόκριση και σύνθεση αντισωμάτων από το πειραματόζωο.

Στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης όταν χρησιμοποιούνται πολυκλωνικά αντισώματα η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται από τα ενδιάμεσα στάδια δέσμευσης μη ειδικών θέσεων (blocking) και έκπλυσης της περίσσειας αντισώματος (washing), τα οποία περιορίζουν στο ελάχιστο την “ψευδώς θετική” εμφάνιση σήματος λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης με μη ειδικές αντιγονικές θέσεις (cross-reactivity). Προϊόντα (μη ειδικής) διασταυρούμενης αντίδρασης είναι κατά κανόνα ανιχνεύσιμα με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, ως ζώνες διαφορετικού μοριακού βάρους από την ειδική πρωτεϊνική ζώνη που εξετάζεται. Για τον περιορισμό του φαινομένου των διασταυρούμενων αντιδράσεων, τα παρασκευάσματα πολυκλωνικών αντισωμάτων (ορού ανοσοποιηθέντων πειραματόζων που περιέχει αντισώματα, δηλαδή αντιορού, antiserum) καθαρίζονται π.χ. με χρωματογραφία συγγένειας. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα, (τα οποία αναγνωρίζουν έναν μόνο επίτοπο πάνω στο αντιγόνο), η παρεμπόδιση από (μη ειδικές) διασταυρούμενες αντιδράσεις μειώνεται σε σημαντικό βαθμό.

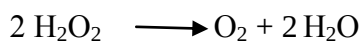
Η δέσμευση των ειδικών θέσεων πρωτεΐνης με το ειδικό αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα) (primary antibody binding) ακολουθείται από τη δέσμευση των θέσεων του πρώτου αντισώματος με αντί-ανοσοσφαιρινικό αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο (secondary antibody binding). Προσθήκη του κατάλληλου ενζυμικού υποστρώματος και οπτική ανίχνευση του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης γίνεται με χημειοφωταύγεια, δηλαδή το προϊόν της αντίδρασης εκπέμπει σήμα φωτός έτσι ώστε να εμφανιστεί το σήμα πάνω σε ειδικό φιλμ (το σήμα αυτό είναι οι ζώνες που θέλουμε να βρούμε). Ένα πρότυπο μοντέλο φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

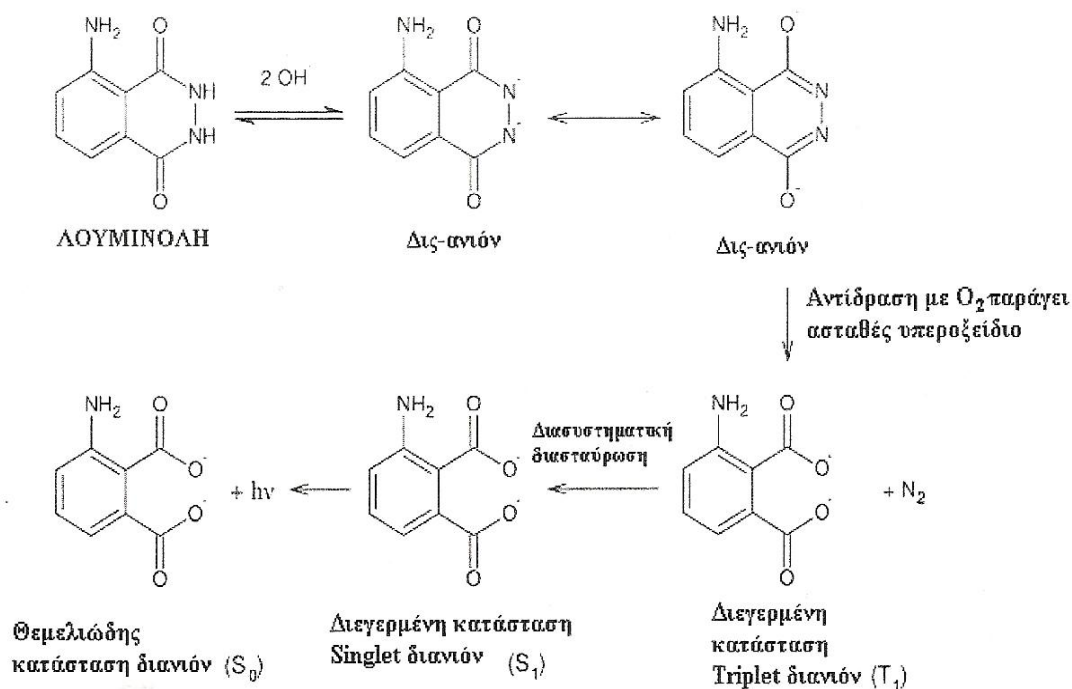


**Εικόνα 5.11.** Ανίχνευση πρωτεϊνικής ζώνης με τη βοήθεια πρωτογενούς αντισώματος, δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με ένζυμο και με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

Σαν φωταύγεια ορίζεται η εκπομπή φωτός κατά τη μετάβαση ενός μορίου από τη διεγερμένη κατάσταση στη θεμελιώδη. Όταν η διεγερση του μορίου είναι το αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης, το φαινόμενο ονομάζεται χημειοφωταύγεια. Για την ανίχνευση του σήματος με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο ECL. Στο αντιδραστήριο αυτό περιέχεται λουμινόλη ένα κυκλικό διακυλοϋδραζίδιο, το οποίο παρουσία υπεροξειδάσης και  $\text{H}_2\text{O}_2$ , σε αλκαλικό περιβάλλον, οξειδώνεται με ταυτόχρονη μετάβασή του στη διεγερμένη κατάσταση. Το μόριο μεταπίπτει στη θεμελιώδη κατάσταση με ταυτόχρονη εκπομπή κυανού φωτός σε μήκος κύματος 428 nm, το οποίο ανιχνεύεται με έκθεση σε ευαίσθητο φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η ενίσχυση του σήματος επιτυγχάνεται επιτελώντας την οξείδωση της λουμινόλης παρουσία υποκατεστημένων φαινολών οι οποίες ενισχύουν το σήμα περίπου 1000 φορές και επιμηκύνουν το χρόνο εκπομπής. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η αντίδραση της οξείδωσης της λουμινόλης με τη βοήθεια του  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Για να δράσει η λουμινόλη και να ενεργοποιηθεί για να εκπέμψει μπλέ φως χρειάζεται τη βοήθεια ενός οξειδωτικού μέσου, που στην περίπτωση αυτή είναι ένα διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

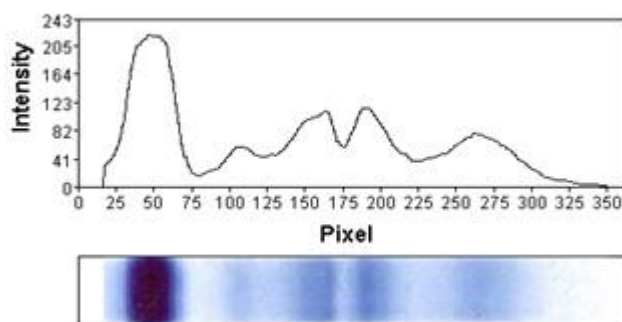




**Εικόνα 5.12.** Αντίδραση της λουμινόλης με  $O_2$  και παραγωγή ασταθών προϊόντων της με αποτέλεσμα την εκπομπή κυανού φωτός (χημειοφωταύγεια).

### Έκθεση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης υπολογίζονται μέσω μιας τιμής διαγράμματος, η οποία αντιστοιχεί στο εμβαδόν της πρωτεϊνικής ζώνης. Η μέτρηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών κλασμάτων γίνεται με πυκνόμετρο και χρήση του προγράμματος image master ID Prime.



**Εικόνα 5.13.** Χαρακτηριστική εικόνα μέτρησης της πρωτεϊνικής ζώνης έπειτα από ηλεκτροφόρηση.

### 5.5.5. Επώαση πρωτεϊνών με αντισώματα

Μετά τη μεταφορά της πρωτεΐνης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης ακολουθεί επώαση με το ειδικό αντίσωμα που ταυτοποιεί την πρωτεΐνη. Για να αυξήσουμε την ευαισθησία της μεθόδου το σύμπλοκο πρωτεΐνης – αντισώματος στη νιτροκυτταρίνη ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός δεύτερου αντισώματος. Το δεύτερο αντίσωμα είναι σημασμένο με ένζυμο και δένεται στο πρώτο αντίσωμα. Παρακάτω αναφέρονται τόσο τα πρωτογενή, όσο και τα δευτερογενή αντισώματα.

#### Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά

- **Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)**
- **Κουπάκια πλαστικά**
- **Γάλα αποβουτυρωμένο σε σκόνη στιγμιαίας διάλυσης:** Carnation Nestle, Instant nonfat dry milk.
- **Δοκιμαστικοί σωλήνες**
- **Θερμοκολλητικό:** Alex Pak, Impulse Sealer
- **Νάilon πλαστικά:** Alex Pak, Impulse Sealer
- **Ανακινούμενη βάση ανάδευσης**
- **Ψαλίδι**

#### Πρωτογενή αντισώματα

- **Ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ενδοκυττάριας πρωτεΐνης ταλίνης.** Monoclonal Anti-talin, clone 8D4 mouse ascites fluid της Sigma. Αποθήκευση στους – 20°C
- **Ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του μεμβρανικού αιμοπεταλιακού υποδοχέα CD41a (GpIIb/IIIa).** Mab to CD41 gpIIb /IIIa της Biodesign International. Αποθήκευση στους – 20°C.

- **Ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα Τάξης IgG<sub>1</sub> ενάντια στη πρωτεΐνη FAK ποντικίσιας προέλευσης:** FAK (H-1) : sc-1688, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Αποθήκευση αντισώματος στους 4°C.
- **Κουνελίσιο πολυκλωνικό αντίσωμα ενάντια στην πρωτεΐνη ERK 1 προερχόμενη από αρουραίο:** ERK 1 (K-23): sc-94, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Αποθήκευση αντισώματος στους 4°C.
- **Κουνελήσιος αντιορός που περιέχει το αντίσωμα Anti-phospho-FAK (Tyr397) ή (Tyr567):** Anti-phospho-FAK (Tyr397) ή (Tyr567) (rabbit antiserum), UPSTATE. Αποθήκευση αντισώματος στους - 20°C.
- **Ποντικίσιο Μονοκλωνικό Αντίσωμα Τάξης IgG<sub>2a</sub> ενάντια στη φωσφορυλιωμένη Tyr-204 της πρωτεΐνης ERK 1 ανθρώπινης προέλευσης:** p-ERK (E-4), sc-7383, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Αποθήκευση αντισώματος στους 4°C.

### Δευτερογενή αντισώματα

**Αντιορός Αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικίου συζευγμένο με ραφαδινική υπεροξειδάση τάξης IgG :** goat anti – mouse IgG – HRP (horseradish – peroxidase) sc 2031, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Αποθήκευση αντισώματος στους 4°C.

**Αντιορός Αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με ραφαδινική υπεροξειδάση τάξης IgG:** goat anti-rabbit IgG-HRP (horseradish-peroxidase) sc-2030, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Αποθήκευση αντισώματος στους 4°C.

### Διαλύματα εργασίας

**Διάλυμα αποχρωματισμού της νιτροκυτταρίνης Tween 20 – TBS ή TTBS 1X pH 7.4 :** Όπως περιγράφηκε παραπάνω στη σελ. 129.

**Διάλυμα γάλακτος 5% βάρος κατ' όγκο (w/v):** Φτιάχνουμε διάλυμα γάλακτος αποβουτυρωμένου σε σκόνη στιγμιαίας διάλυσης περιεκτικότητας 5% (w/v) σε διάλυμα αποχρωματισμού TTBS 1X. Αναδεύουμε σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα του γάλακτος χρησιμοποιείται για την κάλυψη των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων της μεμβράνης (θέσεων όπου δεν έχουν προσδεθεί πρωτεΐνες) με περίσσεια μη ειδικών πρωτεϊνών (blocking agents).

**Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος anti-talin:** Σε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύουμε 15  $\mu$ l αντισώματος σε 10 ml TTBS 1X pH 7.4 (αραίωση 1:750 φορές). Η αρχική συγκέντρωση του αντισώματος ισούται με 0.5 mg/ml. Η τελική του συγκέντρωση ισούται με 0.75 $\mu$ g/ml. Ανακινούμε ήπια. Το αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα αποθηκεύεται στους 4°C και επαναχρησιμοποιείται.

**Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος anti-CD41:** Διαλυτοποιείται σε 1 ml δις-απεσταγμένο νερό. Σε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύουμε 10  $\mu$ l αντισώματος σε 10 ml TTBS 1X pH 7.4 (αραίωση 1:1000 φορές). Η αρχική συγκέντρωση του αντισώματος ισούται με 0.2 mg/ml. Η τελική του συγκέντρωση ισούται με 0.2 $\mu$ g/ml. Ανακινούμε ήπια. Το αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα αποθηκεύεται στους 4°C και επαναχρησιμοποιείται.

**Διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος goat anti-mouse IgG-HRP:** Σε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύουμε 4  $\mu$ l goat anti – mouse IgG – HRP αντισώματος σε 40ml TTBS 1X pH 7.4 (αραίωση 1:10.000 φορές). Η αρχική συγκέντρωση του αντισώματος ισούται με 200 $\mu$ g/0.5ml. Η τελική του συγκέντρωση ισούται με 0.04 $\mu$ g/ml. Το διάλυμα δεν επαναχρησιμοποιείται.

### Πειραματική πορεία

Η επώαση της νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές και το δευτερογενές αντίσωμα περιλαμβάνει τα εξής βήματα :

1. Η στεγνή νιτροκυτταρίνη εμβαπτίζεται και εξισορροπείται σε διάλυμα αποχρωματισμού σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης για 30 λεπτά.
2. Στο παραπάνω διάστημα φτιάχνουμε το διάλυμα του γάλακτος.
3. Εμβαπτίζουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε κουπάκι που περιέχει το διάλυμα γάλακτος και την ανακινούμε σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (blocking).



4. Ξεπλένουμε (washing) τη νιτροκυτταρίνη, από τις πρωτεΐνες του γάλακτος που δε δεσμεύτηκαν, 4 φορές με διάλυμα αποχρωματισμού με αλλαγές του διαλύματος κάθε 5 λεπτά. Η μεμβράνη βρίσκεται σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Ετοιμάζουμε νάilon σακουλάκι διαστάσεων 9cm X 12cm και θερμοκολλούμε, όπου χρειαστεί, τις τρεις πλευρές του. Αφήνουμε ανοιχτή τη μία (τη μεγαλύτερη πλευρά).
6. Ετοιμάζουμε το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος.
7. Εισάγουμε το παραπάνω διάλυμα στο νάilon προσέχοντας να μην έχουμε διαρροή.
8. Φορώντας γάντια εισάγουμε προσεχτικά τη νιτροκυτταρίνη μέσα στο σακουλάκι.
9. Με προσεχτικές κινήσεις (για να μη χυθεί το αντίσωμα) θερμοκολλούμε την ανοιχτή πλευρά του νάilon προσέχοντας να μην αφήσουμε φυσαλίδες αέρα μέσα σε αυτό.
10. Αφού σιγουρευτούμε ότι δεν έχουμε διαρροή αντισώματος από το σφραγισμένο νάilon, το μεταφέρουμε μέσα σε κουπάκι.
11. Επωάζουμε τη νιτροκυτταρίνη με το πρωτογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης (first antibody incubation).
12. Κόβουμε τη μια άκρη του νάilon και αποχύνουμε το διάλυμα του αντισώματος σε δοκιμαστικό σωλήνα που αποθηκεύουμε στους 4°C.
13. Ξεπλένουμε (washing) τη νιτροκυτταρίνη, από την περίσσεια του αδέσμευτου ή μη ειδικά δεσμευμένου αντισώματος, 5 φορές με διάλυμα αποχρωματισμού με αλλαγές του διαλύματος κάθε 10 λεπτά. Η μεμβράνη βρίσκεται σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Ετοιμάζουμε το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος.
15. Μεταφέρουμε το διάλυμα σε κουπάκι όπου εμβαπτίζουμε και εξισορροπούμε τη νιτροκυτταρίνη.
16. Επωάζουμε τη μεμβράνη με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης (second antibody incubation).
17. Ξεπλένουμε (washing) τη νιτροκυτταρίνη, από την περίσσεια του αδέσμευτου ή μη ειδικά δεσμευμένου αντισώματος, 5 φορές με διάλυμα αποχρωματισμού με αλλαγές του διαλύματος κάθε 10 λεπτά. Η μεμβράνη βρίσκεται σε ανακινούμενη βάση ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου.

18. Στεγνώνουμε τη μεμβράνη σε διηθητικό χαρτί και ετοιμάζουμε το αντιδραστήριο της χημειοφωταύγειας.

#### 5.5.6. Αποτύπωση πρωτεϊνών με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

**Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά**

- Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)
- Κουπάκια πλαστικά
- Λαβίδα
- Ψαλίδι
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Διηθητικό χαρτί
- Λεκάνες πλαστικές ή γυάλινες
- Κασέτα τοποθέτησης του φιλμ: Hypercassette, 18 cm X 24 cm RPN 1642, Amersham Life Science.
- Ευαίσθητο φωτογραφικό φιλμ: Hyperfilm ECL High Performance chemiluminescence film 18 cm X 24 cm RPN 2103H, Amersham Life Science.

**Διαλύματα εργασίας**

**Αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας (ECL):** Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus NEL 103, PerkinElmer Life Sciences, Inc. Η εμπορική συσκευασία περιέχει 2 αντιδραστήρια: α) το διάλυμα λουμινόλης (Enhanced Luminol Reagent) που βρίσκεται σε σκουρόχρωμο δοχείο και β) το διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (Oxidizing Reagent) που βρίσκεται σε λευκό δοχείο. Το αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας αποθηκεύεται στους 4°C. Μετά την ανάμιξη των επιμέρους αντιδραστηρίων σε αναλογία 1 : 1 όγκο κατ' όγκο (v/v) (απαιτούνται τουλάχιστον 0.125 ml μείγματος για κάθε cm<sup>2</sup> της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης), το μείγμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για 4 – 5 φορές.

**Διάλυμα σταθεροποίησης σήματος:** Kodak X-Ray Fixer AL4 20lt (Cat 5071071). Γίνεται αραιώση 1:4 (v/v) και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα επαναχρησιμοποιείται 4-5 φορές.

**Διάλυμα ανάπτυξης σήματος:** Kodak X-Ray Developer LX24 20lt (Cat 5070933). Γίνεται αραιώση 1:4 (v/v) και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα επαναχρησιμοποιείται 3-4 φορές.

**Διάλυμα αποχρωματισμού της νιτροκυτταρίνης Tween 20–TBS ή TTBS 1X pH 7.4:** Όπως περιγράφηκε παραπάνω στη σελ.127.

### Πειραματική πορεία

Η αντίγνωση της ενζυμικής αντίδρασης γίνεται με υπόστρωμα που εκπέμπει χημειοφωταύγεια. Η έκθεση του φωτογραφικού φιλμ στη χημειοφωταύγεια που εκπέμπεται από το σύμπλοκο πρωτεΐνης – πρώτου αντισώματος – δεύτερου σημασμένου αντισώματος γίνεται ως εξής:

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύουμε σε αναλογία 1 : 1 (v/v) 7 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου και 7 ml διαλύματος λουμινόλης. Ανακινούμε ήπια το διάλυμα.
2. Σε κουπάκι που περιέχει το παραπάνω μείγμα εισάγουμε τη στεγνή νιτροκυτταρίνη (προσέχουμε το κουπάκι να έχει περίπου τις ίδιες διαστάσεις με τη μεμβράνη).
3. Επωάζουμε τη μεμβράνη με το αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ανακινώντας το κουπάκι ήπια για ένα λεπτό (κατά την ανακίνηση αυτή προσέχουμε να εμποτίζεται όλη η επιφάνεια της μεμβράνης με το αντιδραστήριο).
4. Απομακρύνουμε την περίσσεια του αντιδραστηρίου ακουμπώντας τη μία άκρη της μεμβράνης σε διηθητικό χαρτί.
5. Εισάγουμε τη μεμβράνη μέσα στην κασέτα και την περιβάλλουμε ανάμεσα στις δυο διαφάνειές της που βρίσκονται μόνιμα κολλημένες σε αυτήν (προσέχουμε να μην περιέχονται φυσαλίδες ανάμεσα στην επιφάνεια της μεμβράνης και αυτήν της διαφάνειας).
6. Μεταφερόμαστε αμέσως στο σκοτεινό θάλαμο και ανάβουμε το φωτισμό ασφαλείας (χρώματος κόκκινο).
7. Κόβουμε το φιλμ σε διαστάσεις λίγο μεγαλύτερες από αυτές της μεμβράνης. Επίσης κόβουμε τη μία του άκρη για να ξέρουμε ποια είναι η σωστή απεικόνιση των πρωτεϊνών στο φιλμ.

8. Τοποθετούμε το φιλμ μέσα στην κασέτα και πάνω από τη διαφάνεια που περιβάλλει τη μεμβράνη (προσέχουμε οι κομμένες άκρες φιλμ-μεμβράνης να ταυτίζονται).
9. Κλείνουμε καλά την κασέτα για 20 δευτερόλεπτα.
10. Με λαβίδα βγάζουμε το φιλμ από την κασέτα και το εισάγουμε κατευθείαν σε λεκάνη που περιέχει διάλυμα ανάπτυξης του σήματος, μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες.
11. Με λαβίδα μεταφέρουμε το φιλμ σε λεκάνη που περιέχει διάλυμα σταθεροποίησης του σήματος για 2 λεπτά και το ανακινούμε ήπια.
12. Ξεπλένουμε το φιλμ με νερό της βρύσης.
13. Παρατηρούμε τις ζώνες που έχουν αποτυπωθεί στο φιλμ. Αν δεν πάρουμε ικανοποιητικό σήμα τότε επαναλαμβάνουμε το στάδιο 9 με νέο φιλμ αφήνοντας το περισσότερη ώρα μέσα στην κασέτα (τα στάδια 7–13 γίνονται μέσα στο σκοτεινό θάλαμο).
14. Αφήνουμε το φιλμ να στεγνώσει καλά.
15. Ξεπλένουμε τη νιτροκυτταρίνη με διάλυμα αποχρωματισμού.
16. Στεγνώνουμε τη μεμβράνη και τη φυλάμε για περαιτέρω επεξεργασία.

#### 5.5.7. Αποδέσμευση (Stripping) της μεμβράνης από παλιά αντισώματα – Δοκιμασία νέων αντισωμάτων

Στα πειράματά μας εξετάσαμε την επίδραση των πεπτιδίων στη φωσφοτυροσυλίωση συγκεκριμένων ενδοκυττάριων πρωτεϊνών όπως της FAK και της ERK. Για το σκοπό αυτό πρέπει πάνω στην ίδια μεμβράνη που έχουμε επιδράσει τα αντισώματα κατά των φωσφοτυροσινών των FAK και ERK, να επιδράσουμε και τα αντισώματα κατά μόνο των δυο αυτών πρωτεϊνών. Έτσι μπορούμε να έχουμε συγκριτικά αποτελέσματα. Για να το πετύχουμε αυτό “ξεγυμνώνουμε” (stripping) τη μεμβράνη από τα παλιά αντισώματα και την επωάζουμε κάθε φορά με νέα.

#### Αντιδραστήρια – όργανα – υλικά

- Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)
- Χλωριούχο νάτριο: Sodium chloride – NaCl, MB: 58.44 gr/mole, Merck.

- **Υδροξυμεθυλο-τρεις-αμινομεθάνιο (Tris-base):** Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan,  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ , M.B:121.14 gr/mole, electrophoresis Purity Reagent, BioRad.
- **Tween 20:** Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, BioRad.
- **Γλυκίνη :** Glycine,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ , ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), M.B: 75.07 gr/mole, Merck.
- **Το με νάτριο άλας του θεικού δωδεκυλίου (SDS):** Sodium Dodecyl Sulphate salt,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ , M.B: 288.38 gr/mole, Calbiochem
- **Γάντια**
- **Κουπάκια πλαστικά**
- **Λαβίδα**
- **Ανακινούμενη βάση ανάδευσης**

#### Διαλύματα εργασίας

**Διάλυμα χρωστικής Rouge Ponceau:** Όπως περιγράφηκε στη σελ. 128.

**Διάλυμα Tween 20 – TBS ή TTBS 10X:** Όπως περιγράφηκε στη σελ. 129.

**Διάλυμα αποχρωματισμού της νιτροκυτταρίνης Tween 20 – TBS ή TTBS 1X pH 7.4:** Όπως περιγράφηκε στη σελ. 129.

**Διάλυμα αποδέσμευσης (stripping buffer) pH 2.2:** Φτιάχνουμε διάλυμα αποδέσμευσης της μεμβράνης από παλιά αντισώματα, το οποίο περιέχει: γλυκίνη σε τελική συγκέντρωση 0.2M, SDS σε περιεκτικότητα 0.1% βάρος κατ' όγκο (w/v) και Tween 20 σε περιεκτικότητα 1% όγκο κατά όγκο (v/v). Η διάλυση των ουσιών γίνεται σε απεσταγμένο νερό. Ιδιαίτερη προφύλαξη απαιτείται κατά το χειρισμό του SDS. Ακολουθεί ανάδευση των συστατικών του διαλύματος. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 2.2 με HCl. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

**Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος anti-phospho-FAK (Tyr397) ή (Tyr567) :** Σε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύουμε 20  $\mu\text{l}$  αντισώματος σε 10 ml TTBS 1X pH 7.4 (αραίωση 1:500 φορές). Ανακινούμε ήπια. Το αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα αποθηκεύεται στους 4°C και επαναχρησιμοποιείται.

**Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος anti-phospho-ERK (E-4), sc-7383:** Σε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύουμε 10  $\mu\text{l}$  αντισώματος σε 10 ml TTBS 1X pH 7.4 (αραίωση

1:1000 φορές). Ανακινούμε ήπια. Το αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα αποθηκεύεται στους 4°C και επαναχρησιμοποιείται. Η αρχική συγκέντρωση του αντισώματος ισούται με 200μg/ml. Η τελική του συγκέντρωση ισούται με 0.4 μg/ml.

**Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος FAK (H-1): sc-1688:** Σε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύουμε 20 μl αντισώματος σε 10 ml TTBS 1X pH 7.4 (αραίωση 1:500 φορές). Ανακινούμε ήπια. Το αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα αποθηκεύεται στους 4°C και επαναχρησιμοποιείται. Η αρχική συγκέντρωση του αντισώματος ισούται με 200μg/ml. Η τελική του συγκέντρωση ισούται με 0.4 μg/ml.

**Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος ERK 1 (K-23): sc-94:** Σε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύουμε 20 μl αντισώματος σε 10 ml TTBS 1X pH 7.4 (αραίωση 1:500 φορές). Ανακινούμε ήπια. Το αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα αποθηκεύεται στους 4°C και επαναχρησιμοποιείται. Η αρχική συγκέντρωση του αντισώματος ισούται με 200μg/ml. Η τελική του συγκέντρωση ισούται με 0.4 μg/ml.

**Διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος goat anti-mouse IgG-HRP:** Σε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύουμε 4 μl goat anti – mouse IgG-HRP αντισώματος σε 40 ml TTBS 1X pH 7.4 (αραίωση 1:10.000 φορές). Η αρχική συγκέντρωση του αντισώματος ισούται με 200μg/0.5ml. Η τελική του συγκέντρωση ισούται με 0.04μg/ml. Το διάλυμα δεν επαναχρησιμοποιείται.

**Διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος goat anti-rabbit IgG-HRP:** Σε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύουμε 4 μl goat anti – rabbit IgG – HRP αντισώματος σε 40 ml TTBS 1X pH 7.4 (αραίωση 1:10.000 φορές). Η αρχική συγκέντρωση του αντισώματος ισούται με 200μg/0.5 ml. Η τελική του συγκέντρωση ισούται με 0.04μg/ml. Το διάλυμα δεν επαναχρησιμοποιείται.

### Πειραματική πορεία

Η διαδικασία της αποδέσμευσης (stripping) των πρωτεϊνών από ένα σύμπλοκο πρωτογενούς – δευτερογενούς αντισώματος και η δέσμευση ενός νέου περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Ξεπλένουμε τη στεγνή νιτροκυτταρίνη με απεσταγμένο νερό.

2. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος αποχρωματισμού και εμβαπτίζουμε και εξισορροπούμε σε αυτό τη μεμβράνη υπό συνεχή ανάδευση (ανακινούμενη βάση ανάδευσης) και για 30 λεπτά με αλλαγή στα 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος αποδέσμευσης και εμβαπτίζουμε και εξισορροπούμε σε αυτό τη μεμβράνη υπό συνεχή ανάδευση (ανακινούμενη βάση ανάδευσης) και για 1.5 ώρα με αλλαγή κάθε 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Προαιρετικά μπορούμε να διαπιστώσουμε την ύπαρξη των πρωτεϊνών στη μεμβράνη με εισαγωγή της για 1 λεπτό σε διάλυμα χρωστικής Rouge Ponceau.

5. Ξεπλένουμε καλά τη μεμβράνη με διάλυμα αποχρωματισμού .

6. Επωάζουμε τις μεμβράνες σε κουπάκι με διάλυμα γάλακτος σε ανακινούμενη βάση για μία ώρα

7. Δοκιμάζουμε τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα ακολουθώντας τα βήματα που περιγράφηκαν παραπάνω (σελ. 137-138, βήμα 4 με 18).

8. Ακολουθεί η μέθοδος της αποτύπωσης πρωτεϊνών των μεμβρανών με τη τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (σελ. 136-138, βήμα 1 με 16).

## 5.6. Απομόνωση και παρασκευή πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια ανθρώπου (PRP)

### Αντιδραστήρια - Όργανα

- **Κιτρικό οξύ** ( $C_6H_8O_7$ , M.B.:192.13, Merck)
- **Κιτρικό νάτριο** ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$ , M.B.:294.10, Merck)
- **D(+) Γλυκόζη** ( $HOCH_2CH(CHOH)_4O$ , M.B.:180.16, Fluka)
- **Οξαλικό αμμώνιο** ( $(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$ , M.B.:142.11, Mallinckrodt)
- **Φυγόκεντρος πάγκου** (Hermle, Z 320)
- **Αιμοκυτταρόμετρο**: πλάκα Neubauer.
- **Οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου**: Olympus
- **Συσσωρευόμετρο** (μοντέλο 560, Chrono-log Corp)

### Διαλύματα εργασίας

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD)**. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 95.
- **Διάλυμα 1% οξαλικού αμμωνίου**. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 95.

**Πειραματική διαδικασία**

1. Συλλέγονται 10 mL περιφερικού φλεβικού αίματος σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD σε αναλογία 1:9 (v:v)
2. Ακολουθεί μία φυγοκέντρηση στις 900 rpm (120 x g), για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Λαμβάνουμε περίπου τα 2/3 του όγκου του PRP που έχουμε απομονώσει, μεταφέροντάς το προσεκτικά σε άλλο σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Κατά τη μεταφορά, προσέχουμε να μη γίνει ανάμειξη του PRP με το υποκείμενο στρώμα των λευκών, ή ερυθρών αιμοσφαιρίων.
3. 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). Μετρούμε τον όγκο του PPP που έχουμε απομονώσει, μεταφέροντάς το σε άλλο σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Κατά τη μεταφορά, προσέχουμε πάλι να μη γίνει ανάμειξη του PPP με το υποκείμενο στρώμα των λευκών, ή ερυθρών αιμοσφαιρίων.
4. Σε ένα erppendorf προσθέτουμε 190  $\mu\text{L}$  οξαλικού αμμωνίου και 10  $\mu\text{L}$  PRP. Αναδεύουμε ελαφρά με το χέρι (χτυπώντας με το δάχτυλο το erppendorf) μέχρι να διαλυθεί καλά όλη η ποσότητα του PRP στο οξαλικό αμμώνιο και τοποθετούμε στη συνέχεια 10  $\mu\text{L}$  από το μείγμα σε κάθε σταυρό της πλάκας Neubauer, προσέχοντας η λήψη των 10  $\mu\text{L}$  να γίνει από το κέντρο της ποσότητας του μείγματος στο erppendorf και όχι από την επιφάνεια ή τον πάτο. Η αντικειμενοφόρος πλάκα αφήνεται κατόπιν να επωαστεί για 15 λεπτά σε τρυβλίο με υγρό περιβάλλον (επιτυγχάνεται με μικρό κομμάτι βαμβάκι που βρέχεται και τοποθετείται στο τρυβλίο).
5. Πραγματοποιείται μέτρηση των αιμοπεταλίων στο οπτικό μικροσκόπιο και σε μεγέθυνση (40x). Συγκεκριμένα μετρούνται 5 μετρίου μεγέθους τετράγωνα του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου της πλάκας Neubauer. Γνωρίζοντας ότι το καθένα από τα 5 τετράγωνα καταλαμβάνει όγκο  $0.004 \text{ mm}^3$  μπορούμε με τον παρακάτω τύπο να υπολογίσουμε τον συνολικό αριθμό των αιμοπεταλίων του PRP ανά  $\text{mm}^3$  ή ανά  $\mu\text{L}$ .

$$\frac{(\text{Μέση τιμή αιμοπεταλίων των 5 τετραγώνων}) \times 1 \text{ mm}^3 \times 20}{0.004 \text{ mm}^3}$$

$$0.004 \text{ mm}^3$$



6. Στη συνέχεια με βάση τον αριθμό που βρίσκουμε υπολογίζουμε την ποσότητα του PRP με την οποία πρέπει να αραιωθεί το ομόλογο του PRP έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων να είναι 250.000 αιμοπετάλια/mm<sup>3</sup> ή αιμοπετάλια/μL. Ο απαιτούμενος όγκος V<sub>PRP</sub> που απαιτείται για την αρραίωση προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση:

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

Όπου A.A. : ο αριθμός των αιμοπεταλίων ανά mm<sup>3</sup> στο αρχικό PRP, V<sub>PRP</sub> : ο όγκος του PRP, V<sub>ολικό</sub> : ο όγκος του PRP και του PPP που πιθανόν να προστεθεί για την προσαρμογή της συγκέντρωσης.

## 5.7. Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC)

### Εισαγωγή – Αρχή μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια γρήγορη, ποσοτική, δυναμική και πολυπαραμετρική τεχνική, η οποία ταυτόχρονα μετράει και μετά αναλύει πολλαπλά φυσικά χαρακτηριστικά κυττάρων, καθώς ρέουν σε μία ρευστή ουσία μέσω μιας ακτίνας φωτός. Σχεδιάστηκε για να ενισχύσει τη μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων με χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών [363, 364]. Το κυτταρόμετρο ροής είναι ένα όργανο για την ανίχνευση και τη μέτρηση του ποσού φθορίζουσας χρώσης επί σωματιδίων και αποτελείται από μια ή περισσότερες πηγές laser για την παροχή ενέργειας διέγερσης καθώς και από μια σειρά ανιχνευτών για τη μέτρηση των προκύπτοντων εκπομπών φθορισμού. Δυο επιπλέον ανιχνευτές μετρούν δυο φυσικές παραμέτρους των σωματιδίων ανεξάρτητα από τον φθορισμό και οι οποίες είναι: η πρόσθια σκέδαση (forward-angle light scatter) που είναι ανάλογη με το μέγεθος του σωματιδίου και η πλάγια σκέδαση (side-angle light scatter) που είναι ανάλογη με την κοκκίωση των κυττάρων [363-365].

Κάθε κυτταρόμετρο ροής αποτελείται από τρία συστήματα: ένα ρευστό, ένα οπτικό και ένα ηλεκτρονικό. Το σύστημα των ρευστών μεταφέρει τα σωματίδια μέσω ρεύματος στην ακτίνα του λέιζερ. Το οπτικό σύστημα αποτελείται από λέιζερ τα οποία φωτίζουν τα σωματίδια και από οπτικά φίλτρα που κατευθύνουν τα σήματα φωτός στους

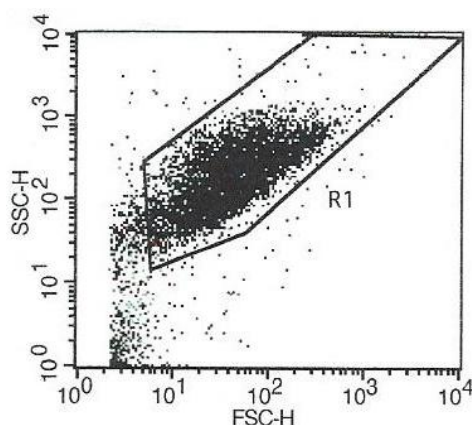
κατάλληλους ανιχνευτές. Το ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει τα ανιχνευμένα σήματα φωτός σε ηλεκτρονικά σήματα ώστε να επεξεργαστούν από τον υπολογιστή.

Για τη μέτρηση των δειγμάτων αυτό που απαιτείται αρχικά είναι το δείγμα να βρίσκεται σε μορφή κυτταρικού εναιωρήματος. Κάθε κύτταρο μεγέθους μεταξύ 0.2-150  $\mu\text{M}$  είναι κατάλληλο για ανάλυση. Τα προς εξέταση κύτταρα επισημαίνονται με ένα ή περισσότερα μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν σημειωθεί με τις κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές και το δείγμα υφίσταται κατεργασία. Ουσιαστικά, ο στόχος είναι τα αντισώματα να συνδεθούν στην επιφάνεια των κυττάρων με τα αντίστοιχα αντιγόνα. Κατόπιν τα κύτταρα εκπλένονται για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος και αναλύονται με το κυτταρόμετρο ροής. Το ποσό του φθορισμού και οι δείκτες σκέδασης καταγράφονται για κάθε κύτταρο και οι πληροφορίες αναλύονται με πρόγραμμα υπολογιστή. Το κυτταρόμετρο ροής έχει ως πηγή φωτός μια ακτίνα laser Αργού, η οποία παράγει φως ισχύος 15mW και μήκος κύματος 488nm. Ταυτόχρονα όμως καθώς προσπίπτει πάνω στα κύτταρα σκεδάζεται στο χώρο. Το σκεδαζόμενο φως μετράται από το κυτταρόμετρο ροής σε μικρή γωνία ( $1-19^\circ$ ), πρόσθια σκέδαση, αλλά και σε  $90^\circ$  πλάγια σκέδαση.

Το επόμενο βήμα στην ανάλυση είναι ο προσδιορισμός των αντιγόνων των κυττάρων μέσω των παραγόμενων σημάτων φθορισμού, από τα σημειωμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Για να παρατηρηθεί το φαινόμενο του φθορισμού, οι φθορίζουσες ουσίες απαιτούν μια πηγή ενέργειας συγκεκριμένου μήκους κύματος, δηλαδή ακτινοβολία, η οποία προέρχεται από laser με πλεονέκτημα την παραγωγή μονοχρωματικής και σταθερής ακτινοβολίας. Οι φθορίζουσες χρωστικές αφού διεγερθούν από την ακτινοβολία ίδιου μήκους κύματος (laser 488nm) εκπέμπουν σε διάφορα μήκη κύματος, μεγαλύτερα της διέγερσης. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται και διεγείρονται από laser 488 nm, είναι η φλουροσκεΐνη (FITC), η Perinidin Chlorophyll Protein (PerCP) και η φυκοερυθρίνη (PE) εκπέμπουν σε μήκη κύματος 530nm/30, 650 nm και 585nm/42 αντίστοιχα [363-365].

Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται ως διαγράμματα δύο παραμέτρων (πλάγια σκέδαση ως προς πρόσθια σκέδαση) όπου τα κύτταρα διαχωρίζονται σε διάφορους πληθυσμούς ανάλογα με το μέγεθος και την κοκκίωση, ως διαγράμματα μεγέθους ως προς την ένταση φθορισμού ενός φθοριοχρώματος, ως διαγράμματα δύο διαφορετικών φθοριοχρωμάτων ή ως ιστογράμματα όπου αναπαρίστανται τα συμβάματα ως προς την ένταση φθορισμού ενός φθοριοχρώματος.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιούμε είναι 1<sup>ov</sup> το anti-CD62p-PE που αναγνωρίζει την έκφραση της P-σελεκτίνης. Αυτή πρόκειται για ένα πολυπεπτίδιο 140 kDa που αποτελεί συστατικό της μεμβράνης των α-κοκκίων και μεταφέρεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων κατά την ενεργοποίησή τους [366, 367], 2<sup>ov</sup> το PAC-1-FITC που είναι ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  μόνο στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια πάνω ή δίπλα στον υποδοχέα του ινωδογόνου και η οποία πραγματοποιείται μέσω της αλληλουχίας RYD [368-370], ενώ δεν αναγνωρίζει τη μη ενεργοποιημένη του μορφή του υποδοχέα [368]. 3<sup>ov</sup> το anti-fibrinogen-FITC, το οποίο προσδένεται στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  μόνο κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και όχι στα εν ηρεμία αιμοπετάλια [371].



**Εικόνα 5.14.** Αντιπροσωπευτική εικόνα πληθυσμού αιμοπεταλίων με βάση την FSC και την SSC που προκύπτει από το κυτταρόμετρο ροής. Ο πληθυσμός των αιμοπεταλίων βρίσκεται στην επιλεγμένη περιοχή R1.

### 5.7.1. Μελέτη της έκφρασης των PAC-1-FITC και anti-CD62p-PE αντισωμάτων

#### Αντιδραστήρια-όργανα

- Anti-CD62p-PE (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- PAC-1-FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- IgG1-FITC (Beckman Coulter)
- IgG1-PE (Beckman Coulter)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου (Becton Dickinson, San Jose, CA)

- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Λογισμικό Cell Quest Software (Becton Dickinson, San Jose, CA)

#### Διαλύματα εργασίας – αγωνιστών

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD).** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 95.
- **Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 95.
- **Διάλυμα 10 mM PBS pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 101.
- **Διάλυμα 1mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP)** της Sigma. Η συγκέντρωση του stock είναι 10 mM. Διαλύουμε 0.2 mL ADP σε 1.8 mL φυσιολογικό ορό για να παρασκευάσουμε substock συγκέντρωσης 1 mM. Το παρασκεύασμα χωρίζεται σε κλάσματα των 50  $\mu$ L τα οποία φυλάσσονται στους -80 °C.
- **Διάλυμα 1 mM TRAP-14** (Thrombin-receptor activating peptide με 14 αμινοξέα, HOOC-SFLLRNPNDKYEPF-NH<sub>2</sub>, Sigma). Η διάλυση έγινε σε φυσιολογικό ορό, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 1mM. Το παρασκεύασμα χωρίζεται σε κλάσματα των 50  $\mu$ L τα οποία φυλάσσονται στους -80 °C.

#### Διαλύματα Πεπτιδίων

- **Διαλύματα ενδοκυττάρων πεπτιδίων.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 102.
- **Διαλύματα εξωκυττάρων πεπτιδίων.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 102.
- **Διάλυμα Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS).** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 102.

#### Πειραματική διαδικασία

Παρασκευάζεται PRP όπως περιγράφεται στη παράγραφο 5.5. Στη συνέχεια προετοιμάζουμε eppendorfs στα οποία προσθέτουμε: Στο eppendorf **1**: 90  $\mu$ L PRP (συγκέντρωσης 250.000 αιμ/μL) και 10  $\mu$ L από το διαλύτη του πεπτιδίου του οποίου θέλουμε να βρούμε τη βιολογική δράση. Στο eppendorf **2**: 90  $\mu$ L PRP, 5  $\mu$ L από το διαλύτη του πεπτιδίου και 5  $\mu$ L αγωνιστή ADP ή TRAP σε τελική συγκέντρωση 50  $\mu$ M. Στο eppendorf **3**: 90  $\mu$ L PRP, 5  $\mu$ L πεπτιδίου στην συγκέντρωση που μας ενδιαφέρει ή του RGDS (τελική συγκέντρωση 1 mM) 5  $\mu$ L από το διαλύτη του πεπτιδίου. Στο eppendorf **4**:

90  $\mu$ l PRP, 5  $\mu$ l πεπτιδίου στην συγκέντρωση που μας ενδιαφέρει ή του RGDS και 5  $\mu$ l αγωνιστή TRAP-14 ή ADP σε τελική συγκέντρωση 50  $\mu$ M. Ακολουθεί επώαση των erppendorf για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου ή για 4 min στους 37° C, αφού πρώτα έχουμε ανοίξει τρύπες στο πώμα των erppendorf για την καλή οξυγόνωση των κυττάρων.

Στη συνέχεια προετοιμάζουμε ειδικά σωληνάκια της Becton Dickinson. Στα σωληνάκια προστίθενται στα άκρα του πυθμένα διαδοχικά, 5  $\mu$ l αντισώματος PAC-1-FITC και 5  $\mu$ l αντισώματος anti-CD62p-PE με προσοχή, ώστε να μην αναμιχθούν. Επίσης σε δύο διαφορετικά σωληνάκια προστίθενται: 5  $\mu$ l από το ισοτυπικό control IgG1-FITC και 5  $\mu$ l αντισώματος anti-CD62p-PE στο ένα και στο άλλο 5  $\mu$ l από το ισοτυπικό control IgG1-PE και 5  $\mu$ l αντισώματος PAC-1-FITC. Στα παραπάνω σωληνάκια του κυτταρομέτρου προστίθενται 5  $\mu$ l δείγματος από τα erppendorfs 1 και 2. Τέλος, σε όλα τα σωληνάκια συμπληρώνουμε μέχρι τα 50  $\mu$ l με PBS 10 mM pH 7.4. Στη συνέχεια τα σωληνάκια περιστρέφονται αργά για την ήπια ανάμιξη αντισωμάτων και δείγματος. Ακολουθεί επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και έπειτα προστίθενται 450  $\mu$ l διαλύματος PBS 10 mM. Αμέσως ακολουθεί η ανάλυση στο κυτταρόμετρο. Η απορρόφηση του δείγματος στο κυτταρόμετρο γίνεται με χαμηλή ροή (12  $\mu$ l  $\pm$  3  $\mu$ l/min) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση από τον υπολογιστή.

### Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Πρώτα εξετάζονται τα σωληνάκια με τα ισοτυπικά control από τα οποία, οι τιμές που προκύπτουν οφείλονται στο μη-ειδικό φθορισμό και αφαιρούνται από τις τιμές που προκύπτουν από τα φθορισμένα αντισώματα που χρησιμοποιούμε τόσο στα ενεργοποιημένα όσο και στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Στα σωληνάκια με τα δείγματα από τα erppendorfs 1 και 2 προσδιορίζεται το ποσοστό (% Gated) των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων αντίστοιχα. Στα σωληνάκια με τα δείγματα από τα erppendorfs 3 και 4 προσδιορίζεται το ποσοστό (% Gated) των πεπτιδίων αναστολέων χωρίς ή με ενεργοποίηση. Αρχικά υπολογίζεται το ποσοστό ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων απουσία του ή των αναστολέων μέσω του ποσοστού αύξησης των MFI των αντισωμάτων PAC-1 και CD62p. Γενικά και για τα δύο αντισώματα αντίστοιχα ισχύει:

$$\frac{(\text{MFI ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων}) - (\text{MFI μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων})}{(\text{MFI μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων})} \times 100$$

Κατόπιν υπολογίζουμε το % ποσοστό της αναστολής της πρόσδεσης των αντισωμάτων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων με τον παρακάτω τύπο:

$$\frac{\text{Ποσοστό (ενεργοπ. αιμοπεταλίων)} - \text{Ποσοστό (πεπτιδίου αναστολέα)}}{\text{Ποσοστό (ενεργοπ. αιμοπεταλίων)}} \times 100\%$$

**5.7.2. Μελέτη της πρόσδεσης του φθορισμένου ινωδογόνου Fg-FITC και έκφρασης της P-σελεκτίνης CD62p-PE στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$**

#### Αντιδραστήρια-όργανα

- Anti-CD62P-PE (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Fg-FITC (Dako glostrup) ή 3 mg/ml Διάλυμα φθορισμένου με FITC ινωδογόνου (Fg-FITC) (Molecular Probes), το οποίο διαλύεται σε διάλυμα  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.3
- IgG1-FITC (Beckman Coulter)
- IgG1-PE (Beckman Coulter)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Λογισμικό Cell Quest Software (Becton Dickinson, San Jose, CA)

#### Διαλύματα εργασίας – αγωνιστών

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κυττρικών (ACD).** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 95.
- **Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 95.
- **Διάλυμα 10 mM PBS pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 97.

- **Διάλυμα 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3.** Ζυγίζονται 0.42 g στερεού NaHCO<sub>3</sub> και διαλύονται σε 50 ml απεσταγμένο νερό. Ρύθμιση του pH στο 8.3. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 3 mg/ml φθορισμένου με FITC ινωδογόνου (Fg-FITC).** Το εμπορικά διαθέσιμο φιαλίδιο περιέχει 5 mg Fg-FITC το οποίο διαλύεται σε 1.67 ml NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3, το οποίο περιέχει ως συντηρητικό 2 mM NaN<sub>3</sub>. Το διάλυμα διατηρείται στους -80°C τυλιγμένο σε αλουμινόχαρτο σε κλάσματα των 50μL.
- **Διάλυμα 1mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) της Sigma.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 141.
- **Διάλυμα 1 mM TRAP-14 της Sigma.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 143.

#### Διαλύματα Πεπτιδίων

- **Διαλύματα ενδοκυττάρων πεπτιδίων.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 102.
- **Διαλύματα εξωκυττάρων πεπτιδίων.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 102.
- **Διάλυμα Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS).** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 102.

#### Πειραματική διαδικασία

Παρασκευάζεται PRP όπως περιγράφεται στη παράγραφο 5.5. Στη συνέχεια προετοιμάζουμε eppendorf στα οποία προσθέτουμε: Στο eppendorf **1**: 85 μl PRP (συγκέντρωσης 250.000 αιμ/μl), 0.15 mg/ml ή 5 μl αντισώματος Fg-FITC και το 10 μl διαλύτη του πεπτιδίου του οποίου θέλουμε να βρούμε τη βιολογική δράση. Στο eppendorf **2**: 85 μl PRP, 0.15 mg/ml Fg-FITC ή 5 μl αντισώματος Fg-FITC, 5 μl από το διαλύτη του πεπτιδίου και 5 μl ADP ή TRAP σε τελική συγκέντρωση 50 μM. Στο eppendorf **3**: 85 μl PRP, 0.15 mg/ml Fg-FITC ή 5 μl αντισώματος Fg-FITC, 5 μl από το πεπτίδιο στην συγκέντρωση που μας ενδιαφέρει ή το RGDS (τελική συγκέντρωση 1 mM) και 5 μl από το διαλύτη του πεπτιδίου. Στο eppendorf **4**: 85 μl PRP, 0.15 mg/ml ή 5 μl αντισώματος Fg-FITC, 5 μl από το πεπτίδιο στην συγκέντρωση που μας ενδιαφέρει ή το RGDS και 5 μl από το ADP ή TRAP σε τελική συγκέντρωση 50 μM. Ακολουθεί

επώαση 20 min σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37° C για 4 min, αφού πρώτα έχουμε ανοίξει τρύπες στο πώμα των erppendorf για την καλή οξυγόνωση των κυττάρων.

Στη συνέχεια προετοιμάζουμε ειδικά σωληνάκια της Becton Dickinson. Στα σωληνάκια προστίθενται στα άκρα του πυθμένα 5 μl αντισώματος anti-CD62-PE και 5 μl δείγματος από τα erppendorf με προσοχή, ώστε να μην αναμιχθούν. Επίσης σε δύο διαφορετικά σωληνάκια προστίθενται: 5 μl από το ισοτυπικό control IgG1-FITC και 5 μl αντισώματος anti-CD62p-PE στο ένα και στο άλλο 5 μl από το ισοτυπικό control IgG1-PE και 5 μl αντισώματος anti-CD62p-PE. Στα παραπάνω σωληνάκια του κυτταρομέτρου προστίθενται 5 μl δείγματος από τα erppendorfs 1 και 2. Έπειτα, σε όλα τα σωληνάκια συμπληρώνουμε μέχρι τα 50 μl με PBS 10 mM pH 7.4. Στη συνέχεια τα σωληνάκια περιστρέφονται αργά για την ανάμιξη αντισώματος και δείγματος. Ακολουθεί επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστίθενται 450 μl διαλύματος PBS 10 mM. Αμέσως ακολουθεί ανάλυση στο κυτταρόμετρο. Η απορρόφηση του δείγματος γίνεται με χαμηλή ροή (12 μl ± 3 μl/min) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση από τον υπολογιστή.

### Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Πρώτα εξετάζονται τα σωληνάκια με τα ισοτυπικά control από τα οποία, οι τιμές που προκύπτουν οφείλονται στο μη-ειδικό φθορισμό και αφαιρούνται από τις τιμές που προκύπτουν από τα φθορισμένα αντισώματα που χρησιμοποιούμε τόσο στα ενεργοποιημένα όσο και στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Στα σωληνάκια με τα δείγματα από τα erppendorfs 1 και 2 προσδιορίζεται το ποσοστό (% Gated) των μη ενεργοποιημένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων αντίστοιχα. Στα σωληνάκια με τα δείγματα από τα erppendorfs 3 και 4 προσδιορίζεται το ποσοστό (% Gated) των πεπτιδίων αναστολέων χωρίς ή με ενεργοποίηση. Αρχικά υπολογίζεται το ποσοστό ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων απουσία του ή των αναστολέων μέσω του ποσοστού αύξησης των MFI των αντισωμάτων Fg και CD62p. Γενικά και για τα δύο αντισώματα αντίστοιχα ισχύει:

$$\frac{(\text{MFI ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων}) - (\text{MFI μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων})}{(\text{MFI μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων})} \times 100$$



Κατόπιν υπολογίζουμε το % ποσοστό της αναστολής της πρόσδεσης των αντισωμάτων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων με τον παρακάτω τύπο:

$$\frac{\text{Ποσοστό (ενεργοποιημένων αιμοπετ.)} - \text{Ποσοστό (πεπτιδίου αναστ.)}}{\text{Ποσοστό (ενεργοποιημένων αιμοπετ.)}} \times 100\%$$

## 5.8. Καλλιέργεια και απομόνωση CHO (Chinese Hamster Ovary) κυττάρων

### Αντιδραστήρια - Όργανα

- IMDM Glutamax (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, GIBCO) θρεπτικό μέσο. Διατηρείται στους 4 °C
- 10% ορός εμβρύου μόσχου (FBS, GIBCO). Διατηρείται στους -20 °C
- 200 mM L- γλουταμίνη (GIBCO). Διατηρείται στους -20 °C
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (GIBCO). Διατηρείται στους -20 °C
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS απουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (10X, Dulbecco's, Biowhittaker, Walkersville, MD)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide for molecular biology, M.B. 78.13, Sigma)
- T75 φλάσκες (75 cm<sup>2</sup>)
- Κρυοφιαλίδια (2 ml)
- Φυσιολογικός ορός
- dH<sub>2</sub>O αποστειρωμένο
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 5,10 και 25 ml (Costar, Corning Incorporated)
- Φίλτρα διήθησης 0,20 μ (Corning Incorporated)
- Αποστειρωμένοι κωνικοί βαθμονομημένοι σωλήνες των 50ml (Corning)
- Σύριγγες, γάντια
- Αιμοκυτταρόμετρο malassez
- Θάλαμος νηματοειδούς ροής (NUAIRE)
- Κλίβανος επώασης με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> (NUAIRE)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος

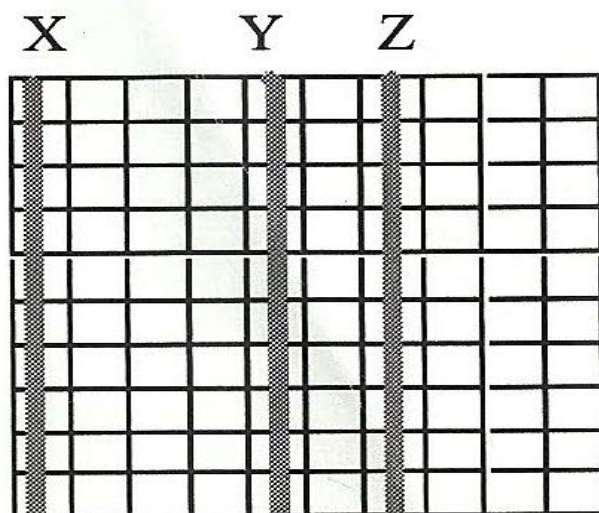
## 1. Θρεπτικό μέσο CHO Κυττάρων

### Διαλύματα

- Διάλυμα 0.5mM EDTA σε PBS 1X (Gibco-BRL)
- Διάλυμα PBS (1X): 100ml διαλύματος PBS (10X) διαλύονται σε 900 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- IMDM Glutamax θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό: Στα 500 ml του εμπορικά διαθέσιμου IMDM Glutamax προστίθενται 5 ml πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη.
- Τελικό θρεπτικό μέσο CHO κυττάρων: Αποτελείται από 178 ml IMDM Glutamax θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό, 20 ml FBS και 2 ml L- γλουταμίνης (2 mM)
- Διάλυμα παγώματος: Σε ορό FBS προστίθεται κατάλληλος όγκος DMSO, ώστε να προκύψει διάλυμα 10% DMSO

## 2. Ανακαλλιέργεια CHO κυττάρων

1. Η ανάπτυξη των CHO κυττάρων γίνεται σε T75 φλάσκες
2. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων από τη φλάσκα
3. Εκπλύσεις των κυττάρων με προθερμασμένο PBS 1X 2 φορές (περίπου 7ml)
4. Προσθήκη 3 ml διαλύματος EDTA (0.5mM, σε PBS 1X)
5. Αναποδογυρίζουμε τη φλάσκα και την αφήνουμε στο θάλαμο επώασης στους 37 °C για 6-7 min για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα
6. Χτυπάμε ήπια τον πάτο της φλάσκας για να βεβαιωθούμε ότι ξεκόλλησαν όλα τα κύτταρα και τα παρατηρούμε στο μικροσκόπιο για να βεβαιωθούμε ότι έχουνε αποκολληθεί.
7. Προσθέτουμε 7 ml PBS 1X, αναδεύουμε και μεταφέρουμε το διάλυμα με τα κύτταρα σε 50 ml σωληνάριο τύπου falcon
8. Μέτρηση των κυττάρων: Μετά την αποκόλληση των κυττάρων και την αναδιασπορά τους σε PBS 1X, παίρνουμε 10 μl από το διάλυμα αυτό και τα τοποθετούμε κάτω από την καλυπτρίδα του αιμοκυτταρόμετρου malassez.



Εικόνα 5.15. Αιμοκυτταρόμετρο malassez.

Μετράμε τα κύτταρα που βρίσκονται στις 3 κατακόρυφες στήλες και ο αριθμός τους προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων} = (X+Y+Z) / 3 \times 10.000 \times \text{όγκο κυττάρων}$$

9. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1100 rpm για 5 min.
10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα στο κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου.
11. Προσθέτουμε για παράδειγμα 1 ml ( $4 \times 10^5$  κύτταρα / ml) διαλύματος κυττάρων σε μία καινούργια φιάσκα και συμπληρώνουμε μέχρι τα 14 ml με θρεπτικό μέσο αν επιθυμούμε να κάνουμε το πείραμα μετά από 3 ημέρες \*.

\*Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων έτσι ώστε να γίνει το πείραμα

μία μέρα μετά:  $1.2 \times 10^6$  κύτταρα / ml,

δύο μέρες μετά:  $7.5 \times 10^5$  κύτταρα / ml

τρεις μέρες μετά:  $4 \times 10^5$  κύτταρα / ml

τέσσερις μέρες μετά:  $3 \times 10^5$  κύτταρα / ml

12. Τοποθετούμε τα κύτταρα πίσω στον κλίβανο για να αναπτυχθούν.

### 3. Ψύξη των CHO κυττάρων σε υγρό άζωτο

Για τη ψύξη των κυττάρων, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων από τις T75 φλάσκες
2. Πλύσεις των κυττάρων με προθερμασμένο PBS 1X (2 φορές).
3. Προσθήκη 2 ml διαλύματος EDTA (0.5mM, σε PBS 1X) και επώαση για 6-7 λεπτά στον θάλαμο επώασης, στους 37°C (τα ελέγχουμε μέχρι να ξεκολλήσουν).
4. Χτυπάμε ήπια τη φλάσκα για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και επιβεβαιώνουμε το γεγονός στο μικροσκόπιο
5. Προσθήκη 8 ml PBS 1X, ανάμειξη και μεταφορά των κυττάρων σε ένα 50 ml σωληνάριο τύπου falcon όπου και αναδεύονται.
6. Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 1100 rpm για 5 λεπτά.
7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 1 ml θρεπτικού διαλύματος ορού FBS/10% DMSO και μεταφορά αυτών σε κατάλληλα σωληνάκια ψύξεως των 2 ml (κρυοφιαλίδια)
8. Τοποθέτηση των κυττάρων στους -20 °C για 1 ώρα
9. Μεταφορά των κρυοφιαλιδίων στους -80 °C για ολόκληρη νύχτα
10. Για την αποθήκευση των κυττάρων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε υγρό άζωτο ή στους -130 °C.

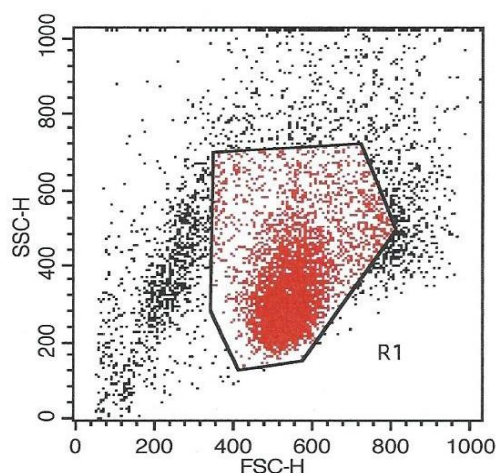
### 4. Αναδιασπορά των CHO κυττάρων μετά την απόψυξη

1. Παραλαμβάνουμε το κρυοφιαλίδιο από το υγρό άζωτο και προσεχτικά τοποθετούμε τον πάτο του στο υδατόλουτρο στους 37 °C (σιγουρευόμαστε ότι το καπάκι του φιαλιδίου δεν επικοινωνεί με το νερό)
2. Όταν τα κύτταρα έχουν ξεπαγώσει, τα μεταφέρουμε σε 50 ml σωληνάριο τύπου falcon, το οποίο περιέχει περίπου 15 ml διαλύματος ορού FBS/10% DMSO
3. Ακολουθεί καλή αναδιασπορά των κυττάρων και φυγοκέντρηση στις 1100 rpm για 5 min
4. Απομάκρυνση του θρεπτικού διαλύματος με DMSO και επαναδιασπορά των κυττάρων σε φρέσκο τελικό θρεπτικό μέσο και μεταφορά τους σε T75 φλάσκα.

### 5.8.1. Προσδιορισμός της έκφρασης της ιντεγκρίνης $\alpha_{\text{Iib}}\beta_3$ στα CHO κύτταρα με κυτταρομετρία ροής

#### Διαλύματα-Αντιδραστήρια

- Hank's balanced salt solution (HBSS, Biowhittaker, Walkersville, MD)
  - CD41a-PE αντίσωμα
  - IgG-PE αντίσωμα
1. Ετοιμάζουμε τα κύτταρα όπως περιγράφεται παραπάνω στην ενότητα 2: Ανακαλλιέργεια των κυττάρων στις σελ. 150-151.
  2. Αφού τα κύτταρα έχουν μετρηθεί και φυγοκεντρηθεί, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος HBSS έτσι ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml.
  3. Σε σωληνάκι κυτταρομέτρου προσθέτουμε 62.5  $\mu\text{l}$  ( $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml), 62.5  $\mu\text{l}$  HBSS και 5  $\mu\text{l}$  από το αντίσωμα CD41a ή το αντίσωμα IgG-PE, συνολικά 130  $\mu\text{l}$  τελικού όγκου.
  4. Επωάζονται για 20 min στους 4 °C, σκεπασμένα με αλουμινόχαρτο.
  5. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 min στις 1100 rpm (το υπερκείμενο απομακρύνεται αναποδογυρίζοντας τα σωληνάκια σε διηθητικό χαρτί για να μην αποκολληθεί το ίζημα).
  6. Πλένουμε τα κύτταρα με 300  $\mu\text{l}$  διαλύματος HBSS, τα φυγοκεντρούμε και τα επαναιωρούμε σε τελικό όγκο 350  $\mu\text{l}$  διαλύματος HBSS.
  7. Ακολουθεί ανάλυση στο κυτταρόμετρο ροής. Η απορρόφηση του δείγματος γίνεται με χαμηλή ροή ( $12 \mu\text{l} \pm 3 \mu\text{l}/\text{min}$ ) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση από τον υπολογιστή.



**Εικόνα 5.16.** Αντιπροσωπευτική εικόνα πληθυσμού CHO κυττάρων με βάση την FSC και την SSC σε κυτταρόμετρο ροής.

### 5.9. Προσκόλληση CHO κυττάρων υπό ροή

#### Διαλύματα εργασίας

- Stock διαλύματος ινωδογόνου σε φιλτραρισμένο TBS 1X(Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, pH=7.4,) με αρχική συγκέντρωση 5 mg/ml. Αραιώνουμε το stock με TBS 1X, έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα 10 µg/ml.
- IMDM Glutamax (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, GIBCO) θρεπτικό μέσο. Διατηρείται στους 4 °C.
- Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος- αιθανόλης, HCL-EtOH (1:1 v/v).
- dH<sub>2</sub>O αποστειρωμένο.
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 5,10 και 25 ml (Costar, Corning Incorporated)
- Γυάλινες αποστειρωμένες καλυπτρίδες
- Αποστειρωμένοι κωνικοί βαθμονομημένοι σωλήνες των 50ml (Corning)
- Σύριγγες, γάντια
- Θάλαμος νηματοειδούς ροής
- Διάλυμα πεπτιδίου YMESRADR σε PBS 1X(10mM)
- Διάλυμα πεπτιδίου YMESRAAR σε PBS 1X (10mM)
- Abciximab (Reopro) (2 mg/ml)

**Πειραματική πορεία:**

1. Καθαρίζουμε τις γυάλινες καλυπτρίδες στο θάλαμο νηματοειδούς ροής σε συνθήκες αποστείρωσης σε διάλυμα HCL-EtOH (1:1 v/v) για 20 λεπτά και ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό.
2. Επιστρώνουμε τις καλυπτρίδες με 1 ml διαλύματος ινωδογόνου (10μg/ml) και επωάζονται στους 37 °C για τουλάχιστον 2 ώρες ή εναλλακτικά επωάζονται στους 4 °C overnight. Κατά τη διάρκεια της επώασης φυλάσσονται σε πλαστικά κουτιά μέσα σε περιβάλλον υγρασίας.
3. Τα κύτταρα καλλιεργούνται με τον προαναφερθέντα τρόπο. Η συγκέντρωση των κυττάρων είναι  $1.2 \times 10^6$  κύτταρα / ml και αναδιασπείρονται σε IMDM θρεπτικό μέσο χωρίς τη προσθήκη FBS.
4. Ορισμένα δείγματα κυττάρων επώαστηκαν για 20 λεπτά με 250 ή 500 μM από τα εξεταζόμενα πεπτίδια ή με 5 μg/ml Reopro πριν την έναρξη του πειράματος στους 37 °C.
5. Γεμίζουμε το κανάλι έγχυσης (πάχος ίσο με 200μM) με θρεπτικό μέσο και στην άκρη του συνδέουμε πλαστικό σωλήνα.
6. Τοποθετούμε τις επιστρωμένες, με το ινωδογόνο, καλυπτρίδες πάνω στο κανάλι έγχυσης και τις στεγνώνουμε προσεχτικά με διηθητικό χαρτί, βεβαιώνοντας ότι δεν έχουν παγιδευτεί φυσαλίδες με αέρα.
7. Τοποθετούμε το κανάλι προσεχτικά στη μεταλλική του υποστήριξη αναποδογυρίζοντας το και το ασφαλίζουμε με μεταλλικές βίδες.
8. Εγχέουμε θρεπτικό μέσο στο κανάλι έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες.
9. Από τη μία πλευρά τοποθετούμε μια πλαστική σύριγγα των 2ml και από την άλλη ένα πλαστικό σωλήνα για τα απόβλητα.
10. Ρυθμίζουμε την αντλία Harvard στο σωστό ρυθμό έγχυσης (π.χ.  $25 \text{ s}^{-1}$  αντιστοιχούν σε 50 μl/min ταχύτητα διάτμησης,  $50 \text{ s}^{-1}$  αντιστοιχούν σε 100 μl/min ταχύτητα διάτμησης).
11. Τα κύτταρα οπτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα 10x αντικειμενικό φακό αντίθεσης Hoffman Modulation μαζί με ένα ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Οι εικόνες καταγράφηκαν σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας ενσωματωμένη φωτογραφική μηχανή. Ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων μετρήθηκε σε

μια χρονική πορεία 10 λεπτών χρησιμοποιώντας Histolab και Archimed λογισμικό (Microvision Instruments, Evry, France).

Υπολογισμός της αναστολής της προσκόλλησης % =

$$\frac{\text{Προσκολλημένα κύτταρα (χωρίς αναστολέα) - Προσκολλημένα κύτταρα (με αναστολέα)}}{\text{Προσκολλημένα κύτταρα (χωρίς αναστολέα)}} \times 100\%$$

### 5.10. Δημιουργία cDNA, επιμόλυνση και δημιουργία σταθερών CHO κυτταρικών κλώνων

Τα CHO κύτταρα δεν εκφράζουν την ιντεγκρίνη  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$  στη μεμβράνη τους, αλλά με τη χρήση ανασυνδυασμένου DNA (rDNA), το οποίο περιέχει γονίδιο που κωδικοποιεί την ιντεγκρίνη, δημιουργούνται κυτταρικοί κλώνοι, οι οποίοι εκφράζουν μόρια ιντεγκρίνης στη μεμβράνη τους. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν κλώνοι μετασχηματισμένων CHO κυττάρων οι οποίοι εκφράζουν την άγριου τύπου ( $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$  WT) ή τη μεταλλαγμένη  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3^{\text{M}}$  ή  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3^{\text{IM}}$  ιντεγκρίνη.

Οι μεταλλάξεις στα μόρια της ιντεγκρίνης, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση συμπληρωματικού DNA (cDNA). Τα cDNAs που κωδικεύουν τις μεταλλάξεις  $\alpha_{\text{IIB}}$  R<sup>317</sup>A/D<sup>319</sup>A/R<sup>320</sup>A ( $\alpha_{\text{IIB}}^{\text{3M}}$ ) ή  $\beta_3$  K<sup>384</sup>A ( $\beta_3^{\text{1M}}$ ), δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο μετάλλαξης Quikchange site-directed. Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των δημιουργημένων μεταλλαγμάτων πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο της αυτοματοποιημένης αλληλούχισης. Συνοπτικά, το πλήρες cDNA που κωδικεύει τις μεταλλάξεις εισέρχεται σε φάγο, ο οποίος χρησιμοποιείται για τη μεταφορά του γενετικού υλικού, που περιέχει τα επιθυμητά γονίδια των διαφορετικών μορφών των ιντεγκρινών, στα πλασμίδια των βακτηρίων. Η επιμόλυνση των CHO κυττάρων, με τα επιθυμητά πλασμίδια των βακτηρίων, έγινε με τη μέθοδο Lipofectamine [372] και τα θετικά ως προς την επιμόλυνση κύτταρα ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για τη μεμβρανική έκφραση της μεταλλαγμένης ιντεγκρίνης  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ , χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα P12-73. Οι κυτταρικοί κλώνοι που τελικά επιλέχθηκαν ήταν



αυτοί που είχαν μεμβρανική έκφραση της μεταλλαγμένης ιντεγκρίνης συγκρίσιμη με αυτή των κυτταρικών κλώνων με την άγριου τύπου ιντεγκρίνη.

### **Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού SPSS 20.0. Οι τιμές εκφράστηκαν ως η μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD) ή μέση τιμή  $\pm$  S.E.M. Η σύγκριση των τιμών έγινε χρησιμοποιώντας το student's t-test. Σε κάθε περίπτωση το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε ως  $p < 0.05$ .



# Αποτελέσματα

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

### Η ανασταλτική δράση της 313-320 αλληλουχίας της εξωκυττάριας $\alpha_{IIb}$ υπομονάδας στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση και ενεργοποίηση

Είναι γνωστό ότι η 313-320 αλληλουχία ανήκει στη β-προπέλα της  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδας, η οποία μαζί με την βΙ και την υβριδική περιοχή της  $\beta_3$  υπομονάδας σχηματίζουν την κεφαλή της ιντεγκρίνης. Η μελέτη της ανασταλτικής δράσης της 313-320 αλληλουχίας ξεκίνησε πριν από αρκετά χρόνια από το εργαστήριο μας [335] και βρέθηκε ότι αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση από διάφορους αγωνιστές καθώς και την πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη. Επίσης βρέθηκε ότι η RAD αλληλουχία είναι υπεύθυνη για την έκφραση της ανασταλτικής αυτής δράσης.

Σκοπός μας ήταν να διερευνήσουμε περαιτέρω το μηχανισμό δράσης καθώς και το ρόλο της παραπάνω αλληλουχίας στα στάδια ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Για το σκοπό αυτό, αρχικά, έγινε μελέτη των κρίσιμων αμινοξέων της αλληλουχίας αυτής ως προς την έκφραση της βιολογικής της δράσης. Έτσι, εκτός από το οκταπεπτίδιο που αντιστοιχεί στην 313-320 αλληλουχία, YMESRADR, μελετήθηκαν τροποποιημένα σε διαφορετικές θέσεις με αλανίνη (A) οκταπεπτίδια: YMESRAAR, YMESAADR, YMESRADA, το μετατοπισμένο κατά ένα αμινοξύ οκταπεπτίδιο  $^{314}\text{MESRADRK}^{321}$ , το οκταπεπτίδιο, που αντιστοιχεί στην 313-320 αλληλουχία αλλά με όλα τα αμινοξέα σε D-διαμόρφωση, ymesradr καθώς και ένα κυκλικό ανάλογο του 313-320 πεπτιδίου, το (S,S)-YMECRADCR-NH<sub>2</sub>, σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Τα πεπτίδια που μελετήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω στον πίνακα 1. Επίσης, μελετήθηκε και ο γνωστός προσδεματο-μιμητικός αναστολέας, το RGDS πεπτίδιο, ο οποίος ανταγωνίζεται τη θέση πρόσδεσης του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη, για την εύρεση του IC<sub>50</sub> του αλλά και την επαλήθευση του μηχανισμού δράσης του στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης και συνεπώς στη συσσώρευση.

Τα παραπάνω πεπτίδια συντέθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και Πεπτιδοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαλισιώβα Ελένη και την υποψήφια διδακτορική φοιτήτρια Τρύπου Παρασκευή. Στον

παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα πεπτίδια που μελετήθηκαν με τη μέθοδο της συσσωρευομετρίας

**Πίνακας 1.** Συνθετικά πεπτίδια προερχόμενα από την  $\alpha_{\text{IIb}}$  εξωκυττάρια υπομονάδα που εξετάστηκαν στη παρούσα μελέτη.

| A/A | Εξωκυττάρια υπομονάδα           | Πεπτίδια που εξετάστηκαν                |
|-----|---------------------------------|-----------------------------------------|
| 1   | $\alpha_{\text{IIb}}$ (313-320) | YMESRADR-OH                             |
| 2   |                                 | ymesradr-OH                             |
| 3   |                                 | YMESRAAR-OH                             |
| 4   |                                 | YMESAADR-OH                             |
| 5   |                                 | YMESRADA-OH                             |
| 6   |                                 | $^{314}\text{MESRADRK}^{321}\text{-OH}$ |
| 7   |                                 | (S,S)-YMECRADCR-NH <sub>2</sub>         |

#### 1. Διερεύνηση των κρίσιμων αμινοξέων της 313-320 αλληλουχίας, ως προς τη βιολογική δράση, σε πλυμένα αιμοπετάλια

Η λειτουργία των αιμοπεταλίων μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες του πλάσματος, όπως τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και διάφορες πρωτεΐνες (πρωτεάσες, θρομβίνη). Για το λόγο αυτό, η βιολογική δράση των πεπτιδίων εξετάστηκε σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια, δηλαδή αιμοπετάλια ελεύθερα από τα στοιχεία του πλάσματος, μιας και έχουν προκύψει από διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε σαν αγωνιστής η θρομβίνη σε τελική συγκέντρωση 0.2 U/ml. Ο χρόνος επώασης των πεπτιδίων με τα αιμοπετάλια ήταν 2 λεπτά, ακολούθησε η προσθήκη της θρομβίνης και η δράση του πεπτιδίου καταγράφηκε για 4 λεπτά. Η διάλυση όλων των πεπτιδίων έγινε σε PBS 10mM (όπως αναφέρεται στη σελ. 98). Η δράση των παρακάτω τροποποιημένων με αλανίνη πεπτιδίων καθώς και του αρχικού οκταπεπτιδίου έχει μελετηθεί μόνο σε ανθρώπινο PRP από προηγούμενη ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας [373]. Η σύγκριση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων παρουσία του

πεπτιδίου και αυτής απουσία του πεπτιδίου (τυφλό), μας δίνει μια πρώτη εικόνα της ανασταλτικής ή μη δράσης του σε πειράματα συσσωρευομετρίας.

**Πίνακας 2.** Ανασταλτική δράση των εξωκυττάρων πεπτιδικών αναλόγων της α<sub>IIb</sub> υπομονάδας σε δοσοεξαρτώμενα πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια.

| Πεπτίδιο                               | Αγωνιστής           | Χρόνος επώασης (min.) | Συγκέντρωση (μM) | Συσσώρευση (%) | Αναστολή (%) | IC <sub>50</sub> |
|----------------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|----------------|--------------|------------------|
| <b>YMESRADR</b>                        | Θρομβίνη (0.2U/ml)  | 2                     | 500              | 0              | 100          | 100 ±10 μM       |
|                                        |                     |                       | 300              | 10             | 87±4         |                  |
|                                        |                     |                       | 250              | 19             | 78±3         |                  |
|                                        |                     |                       | 150              | 28             | 60±7         |                  |
|                                        |                     |                       | 100              | 39             | 53±9         |                  |
|                                        |                     |                       | 75               | 62             | 28±5         |                  |
|                                        |                     |                       | 50               | 69             | 15±4         |                  |
|                                        |                     |                       | 20               | 76             | 9±3          |                  |
| <i>ymesradr</i>                        |                     |                       | 1000             | 50             | 40           | >1000 μM         |
|                                        |                     |                       | 750              | 70             | 15           |                  |
|                                        |                     |                       | 500              | 76             | 10           |                  |
| <b>(S,S)-YMECRADC R-NH<sub>2</sub></b> | Θρομβίνη (0.2 U/ml) | 2                     | 1000             | 0              | 100          | 325 ±15 μM       |
|                                        |                     |                       | 700              | 13             | 85±5         |                  |
|                                        |                     |                       | 500              | 26             | 71±4         |                  |
|                                        |                     |                       | 400              | 39             | 59±5         |                  |
|                                        |                     |                       | 300              | 52             | 49±5         |                  |
|                                        |                     |                       | 250              | 70             | 20           |                  |
| <b>RGDS</b>                            | Θρομβίνη (0.2U/ml)  | 2                     | 1000             | 0              | 100          | 68±5 μM          |
|                                        |                     |                       | 750              | 8              | 90±4         |                  |
|                                        |                     |                       | 500              | 14             | 82±2         |                  |
|                                        |                     |                       | 300              | 18             | 78±2         |                  |
|                                        |                     |                       | 200              | 19             | 75±3         |                  |
|                                        |                     |                       | 100              | 27             | 70±2         |                  |
|                                        |                     |                       | 50               | 57             | 35±3         |                  |
|                                        |                     |                       | 20               | 65             | 22±1         |                  |

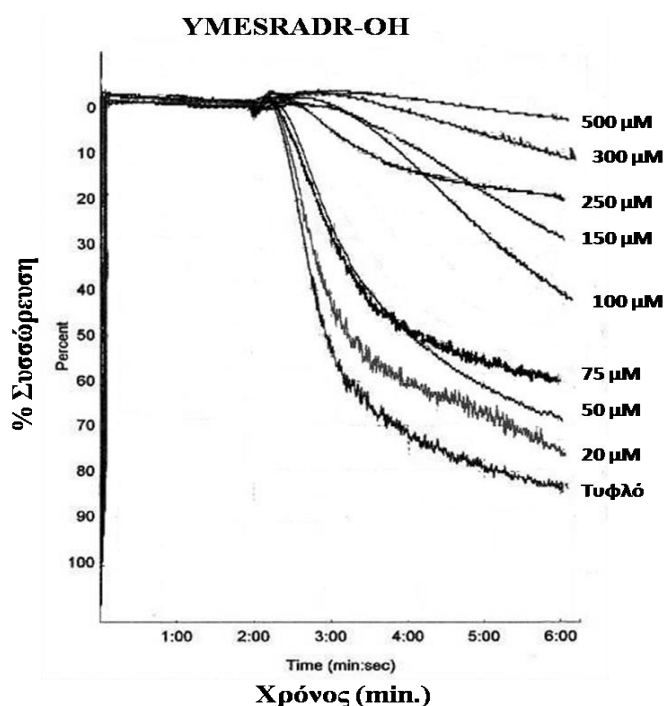
[οι τιμές της αναστολής εκφράζονται ως η μέση τιμή ± S.D, που προέκυψε από 3 τουλάχιστον διαφορετικά πειράματα (n=3)].

**Πίνακας 3.** Ανασταλτική δράση των τροποποιημένων με Α πεπτιδικών αναλόγων της α<sub>IIb</sub> υπομονάδας από πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια.

| Πεπτίδιο | Αγωνιστής              | Χρόνος<br>επώασης<br>(min.) | Συγκέντρωση<br>(μM) | Αναστολή<br>(%) |
|----------|------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------|
| YMESAADR | Θρομβίνη<br>(0.2 U/ml) | 2                           | 500                 | 0               |
| YMESRAAR |                        |                             | 500                 | 0               |
| YMESRADA |                        |                             | 500                 | 42 ± 2          |
|          |                        |                             | 250                 | 20 ± 3          |
| MESRADRK |                        |                             | 500                 | 0               |

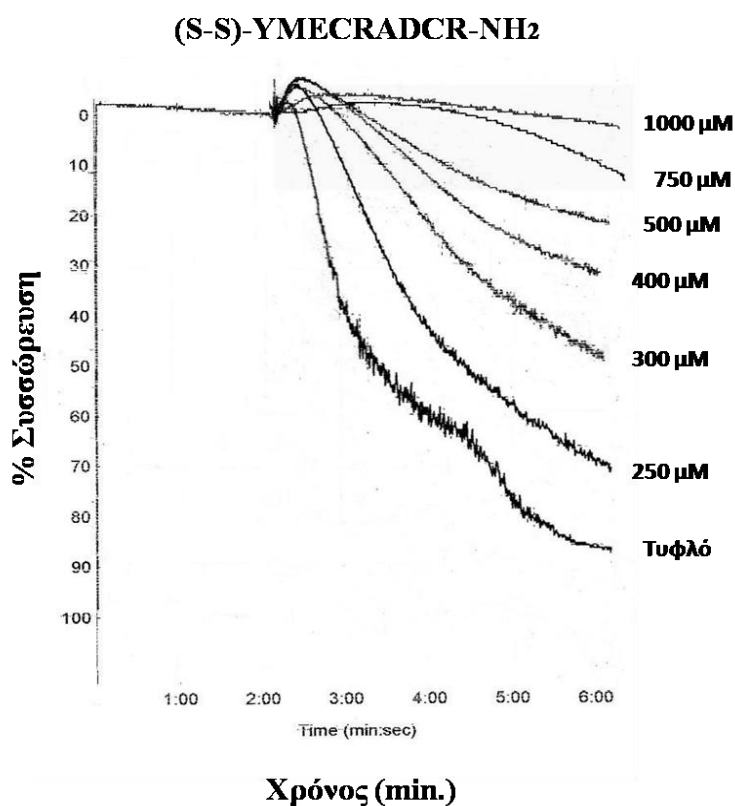
[οι τιμές της αναστολής εκφράζονται ως η μέση τιμή ± SD, που προέκυψε από 3 διαφορετικά πειράματα (n=3)].

I) Καμπύλες συσώρευσης ενεργοποιημένων με θρομβίνη αιμοπεταλίων παρουσία του πεπτιδίου YMESRADR

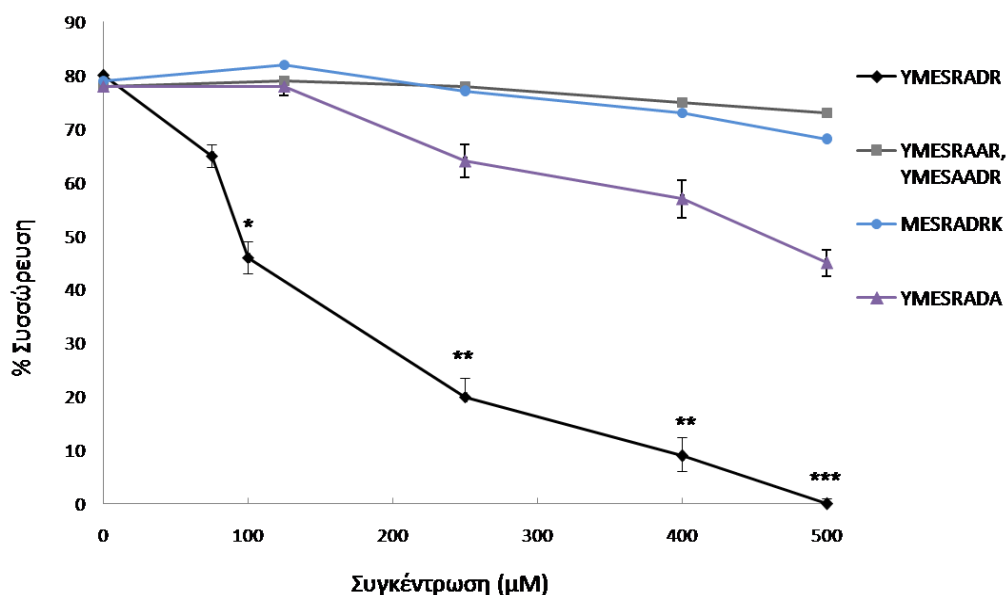


**Εικόνα Α.1.** Καμπύλες συσώρευσης αιμοπεταλίων. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσώρευσης όπου εμφανίζεται η ανασταλτική δράση του πεπτιδίου YMESRADR σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε ανθρώπινα πλυμένα αιμοπετάλια. Ο χρόνος επώασης πεπτιδίου-αιμοπεταλίων είναι 2 λεπτά πριν τη προσθήκη του αγωνιστή.

II) Καμπύλες συσσώρευσης ενεργοποιημένων με θρομβίνη αιμοπεταλίων παρουσία του πεπτιδίου (S-S)-YMECRADCR-NH<sub>2</sub>

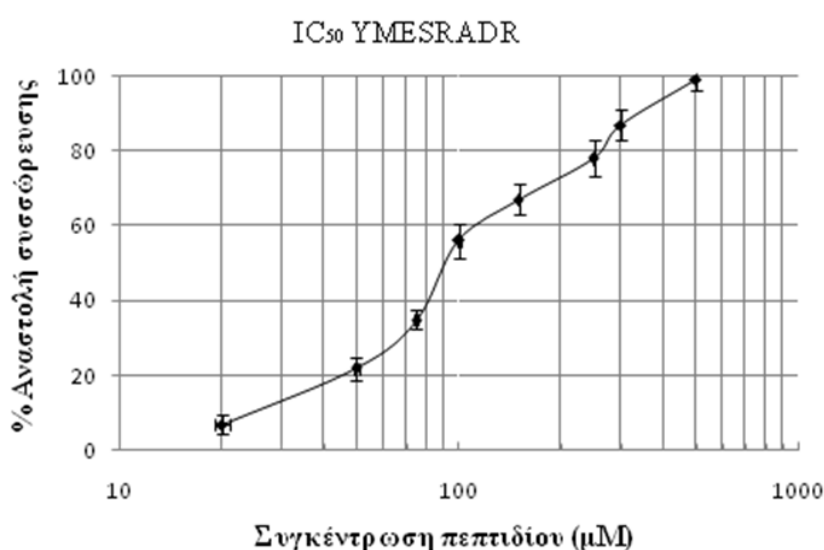


**Εικόνα Α.2.** Καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης όπου εμφανίζεται η ανασταλτική δράση του πεπτιδίου (S-S)-YMECRADCR-NH<sub>2</sub> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε ανθρώπινα πλυμένα αιμοπετάλια. Ο χρόνος επώασης πεπτιδίου- αιμοπεταλίων είναι 2 λεπτά πριν τη προσθήκη του αγωνιστή.



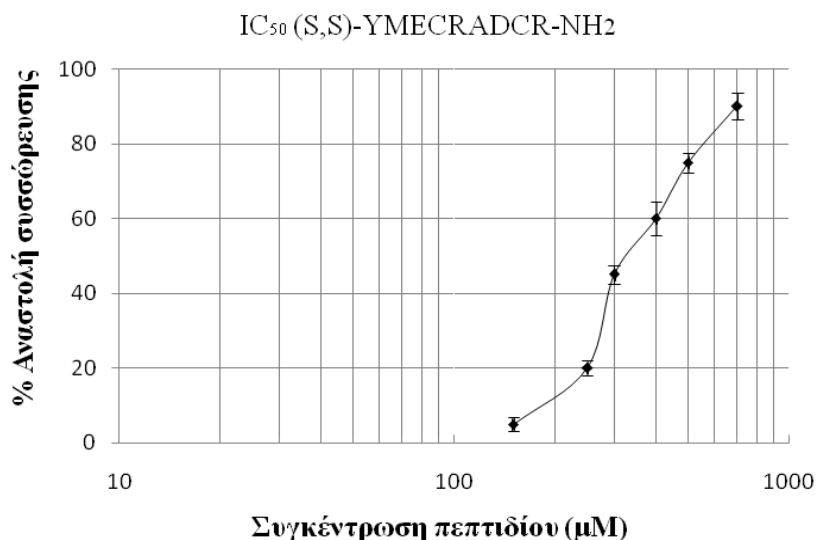
**Εικόνα Α.3.** Επίδραση των YMESRADR, YMESRAAR, YMESRADA, MESRADRK στη συσσωρευση των αιμοπεταλίων. Πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου επώαστηκαν με τον διαλύτη των πεπτιδίων (0 μM) ή με τα τροποποιημένα πεπτίδια σε διαφορετες συγκεντρώσεις για 2 min, ακολούθησε ενεργοποίηση με θρομβίνη (0.2 U/ml), η οποία καταγράφηκε για 4 min. Το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  SD τριών πειραμάτων \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  σε σχέση με τα αιμοπετάλια που έχουν επωαστεί με το διαλύτη (0 μM).

III)  $IC_{50}$  των πεπτιδίων YMESRADR και (S,S)-YMECRADCR- $NH_2$  σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου

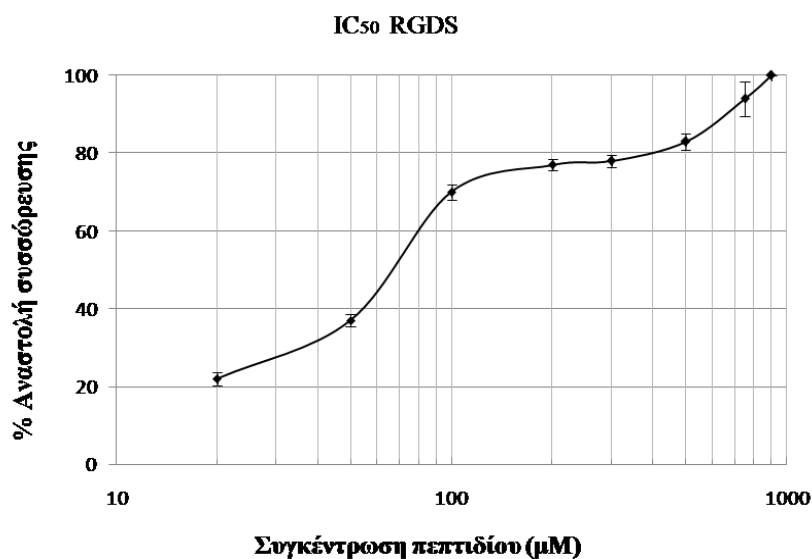


**Εικόνα Α.4.**  $IC_{50}$  και δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδής καμπύλη αναστολής του πεπτιδίου YMESRADR σε πειράματα συσσωρευομετρίας πλυμένων αιμοπεταλίων.





**Εικόνα Α.5.**  $IC_{50}$  και δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδής καμπύλη αναστολής του πεπτιδίου (S,S)-YMECRADCR-NH<sub>2</sub> σε πειράματα συσσωρευομετρίας πλυμένων ανθρώπινων αιμοπεταλίων.



**Εικόνα Α.6.**  $IC_{50}$  και δοσοεξαρτώμενη σιγμοειδής καμπύλη αναστολής του πεπτιδίου RGDS σε πειράματα συσσωρευομετρίας πλυμένων ανθρώπινων αιμοπεταλίων

Από τον πίνακα 2 και τις εικόνες Α.1, Α.4 προκύπτει ότι το πεπτίδιο YMESRADR είναι ένας δραστικός αναστολέας της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με  $IC_{50}$  ίσο με  $100 \pm 10 \mu M$ . Αντίθετα, από τον πίνακα 2 και την εικόνα Α.2, Α.5 το κυκλικό ανάλογο της παραπάνω αλληλουχίας (S,S)-YMECRADCR-NH<sub>2</sub> έδειξε να αναστέλλει τη συσσώρευση αλλά σε αρκετά μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με το YMESRADR,

με  $IC_{50}$  ίσο με 325  $\mu M$ , περίπου τρεις φορές υψηλότερο από αυτό που αντιστοιχεί στο αρχικό οκταπεπτίδιο. Τα τροποποιημένα με αλανίνη πεπτίδια στις θέσεις 317, 319 καθώς και το μετατοπισμένο κατά ένα αμινοξύ MESRADRK στα 500  $\mu M$  δεν εμφάνισαν καμία δραστηριότητα ως προς την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 2 και την εικόνα Α.3. Μόνο το τροποποιημένο με Α στη θέση 320 έδειξε να διατηρεί μια σχετικά σημαντική ανασταλτική δράση. Τέλος, το *ymesradr* πεπτίδιο, φάνηκε να χάνει τελείως τη δραστηριότητα του σε σχέση με το YMESRADR, με  $IC_{50} > 1000 \mu M$ .

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Το  $^{313}YMESRADR^{320}$  οκταπεπτίδιο αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με  $IC_{50} = 100 \mu M$
- Η αλλαγή της στερεοχημείας των αμινοξέων της αλληλουχίας  $\alpha_{Ib}$  313-320 από L- σε D-διαμόρφωση οδήγησε σε απώλεια της βιολογικής δράσης του.
- Το  $R^{320}$  δεν φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη βιολογική δράση της αλληλουχίας, όμως η παρουσία του συμβάλλει στην αύξηση της ανασταλτικής δράσης.
- Το αμινοξύ  $Y^{313}$  είναι αναγκαίο στην έκφραση της ανασταλτικής δράσης του οκταπεπτιδίου, αφού η αφαίρεση του επέφερε απώλεια της ανασταλτικής δράσης.
- Τα αμινοξέα  $R^{317}$  και  $D^{319}$  διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην ανασταλτική δράση του οκταπεπτιδίου, αφού η τροποποίησή τους με Α επέφερε απώλεια της ανασταλτικής δράσης.

- Η κυκλοποίηση της RAD αλληλουχίας, ανάμεσα σε 2 C, δεν επέφερε βελτίωση της βιολογικής δράσης της 313-320 αλληλουχίας. Επίσης φαίνεται ότι η S<sup>316</sup> του μητρικού αναλόγου, η οποία αντικαταστάθηκε με C, δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογική δράση του αναλόγου.
- Το RGDS αποτελεί ισχυρό αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με IC<sub>50</sub> = 68 μM.

## 2. Η ανασταλτική δράση του YMESRADR στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια αξιόπιστη μέθοδος, μέσω της οποίας μελετάται η έκφραση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με τη χρήση φθορισμένων αντισωμάτων: i) της P-σελεκτίνης (CD62p-PE), η οποία αποτελεί δείκτη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και προσκόλλησης τους στο ενδοθήλιο. Κατά την ενεργοποίηση τους εκκρίνεται από τα α-κοκκία και μεταφέρεται στη μεμβράνη, όπου και εκφράζεται, ii) του PAC-1-FITC, ο οποίος ανιχνεύεται και εκφράζεται μόνο πάνω στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> και iii) το Fg-FITC που ανιχνεύει το ινωδογόνο, το οποίο προσδένεται στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Με βάση τα αποτελέσματα της συσσωρευομετρίας που ανέδειξαν το κρίσιμο ρόλο των αμινοξέων της 313-320 αλληλουχίας στην αναστολή της συσσώρευσης, ακολούθησε η διερεύνηση του ρόλου της στην αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης.

### 2.1. Η επίδραση του YMESRADR στη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>

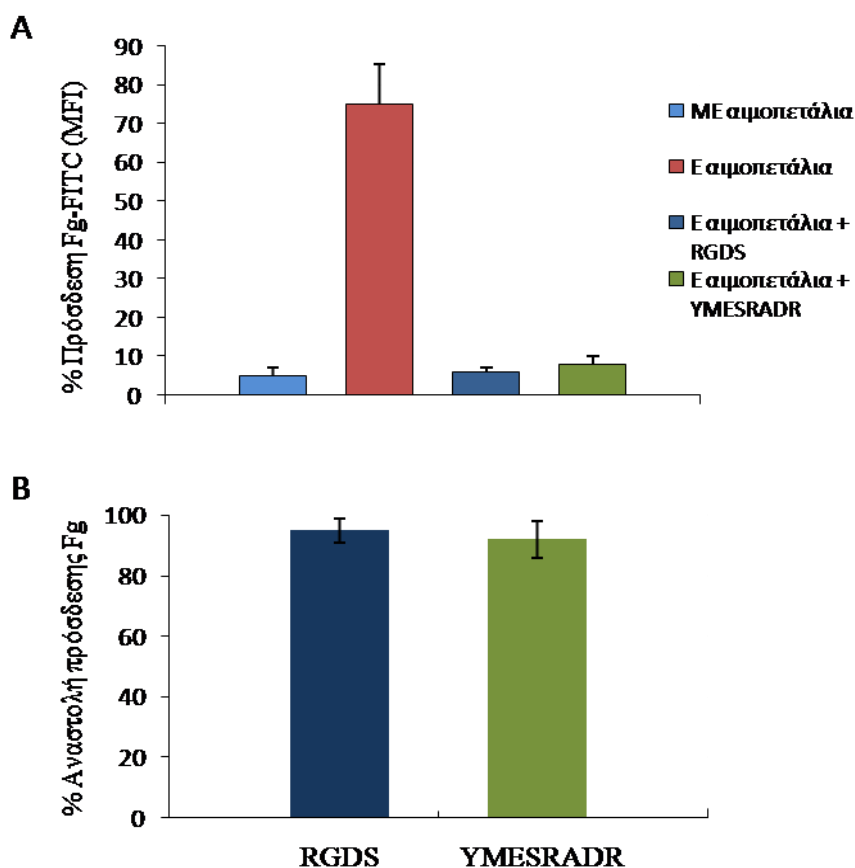
Έγιναν πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα οποία μελετήθηκε η επίδραση του ισχυρότερου πεπτιδίου αναστολέα YMESRADR στα 500 μM στη πρόσδεση του φθορισμένου ινωδογόνου (Fg-FITC) στην ιντεγκρίνη, καθώς και του προσδεματο-

μιμητικού πεπτιδίου RGDS στα 900  $\mu\text{M}$ , το οποίο αποδεδειγμένα αναστέλλει τη παραπάνω πρόσδεση. Τα αιμοπετάλια (PRP) ενεργοποιήθηκαν με αγωνιστή TRAP-14 σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$ .

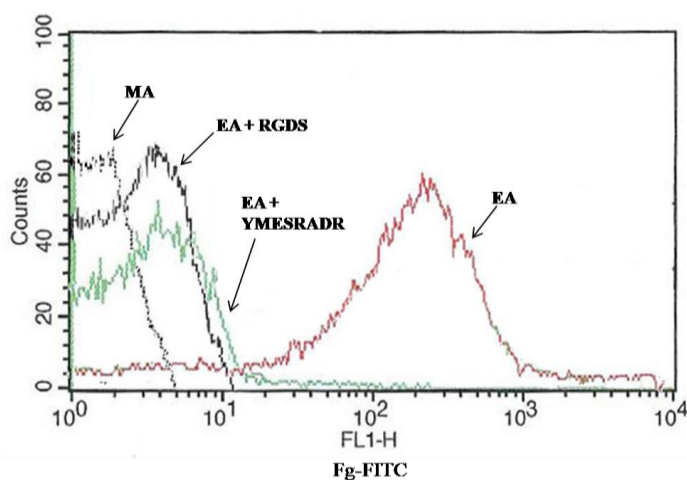
**Πίνακας 4.** Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στη πρόσδεση του Fg-FITC στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή της με αγωνιστή TRAP-14.

| Πεπτίδια | Συγκέντρωση ( $\mu\text{M}$ ) | Αγωνιστής                   | Πρόσδεση Fg-FITC (M.F.I.) | Αναστολή πρόσδεσης Fg-FITC (%) |
|----------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| -        | -                             | -                           | 5 $\pm$ 2                 | -                              |
| -        | -                             | TRAP-14 (50 $\mu\text{M}$ ) | 75 $\pm$ 10               | -                              |
| RGDS     | 900                           |                             | 6 $\pm$ 1                 | 95 $\pm$ 4                     |
| YMESRADR | 500                           |                             | 8 $\pm$ 2                 | 92 $\pm$ 6                     |

[Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  SD, n=3]



**Εικόνα Α.7. Α.** Μέση ένταση φθορισμού της πρόσδεσης του Fg-FITC σε μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (PRP) υπό την επίδραση του RGDS στα 900  $\mu$ M ή του YMESRADR στα 500  $\mu$ M. ΜΕ αιμοπετάλια: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14. **Β.** Αναστολή της πρόσδεσης του φθορισμένου ινωδογόνου σε ενεργοποιημένα, με TRAP-14, αιμοπετάλια από τα πεπτιδικά ανάλογα.



**Εικόνα Α.8.** Χαρακτηριστική εικόνα κυτταρομετρίας της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην πρόσδεση του Fg-FITC. MA: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, EA: ενεργοποιημένα

αιμοπετάλια με TRAP-14, **EA + RGDS**: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + RGDS (900  $\mu$ M), **EA+YMESRADR**: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια+YMESRADR (500  $\mu$ M).

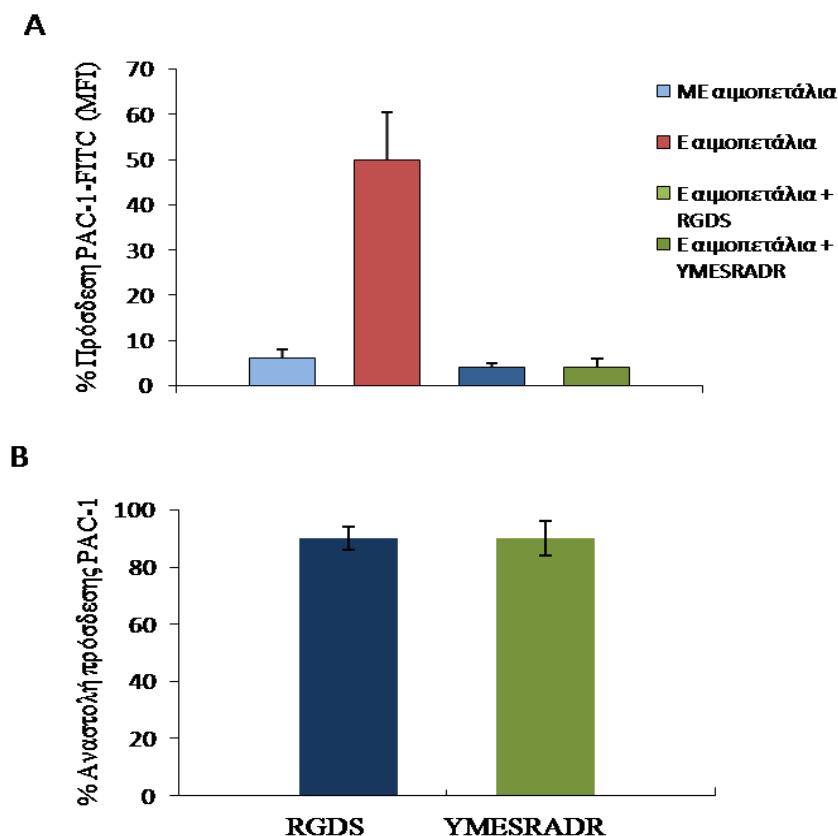
## 2.2. Η επίδραση του YMESRADR στην έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης

Έγιναν πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα οποία μελετήθηκε η επίδραση του YMESRADR στα 500  $\mu$ M στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης μέσω της πρόσδεσης του PAC-1 στην ιντεγκρίνη καθώς και του προσδεματο-μιμητικού πεπτιδίου RGDS πεπτιδίου στα 900  $\mu$ M, του οποίου η ανασταλτική δράση είναι γνωστή. Τα αιμοπετάλια (PRP) ενεργοποιήθηκαν με αγωνιστή TRAP-14 σε συγκέντρωση 50  $\mu$ M.

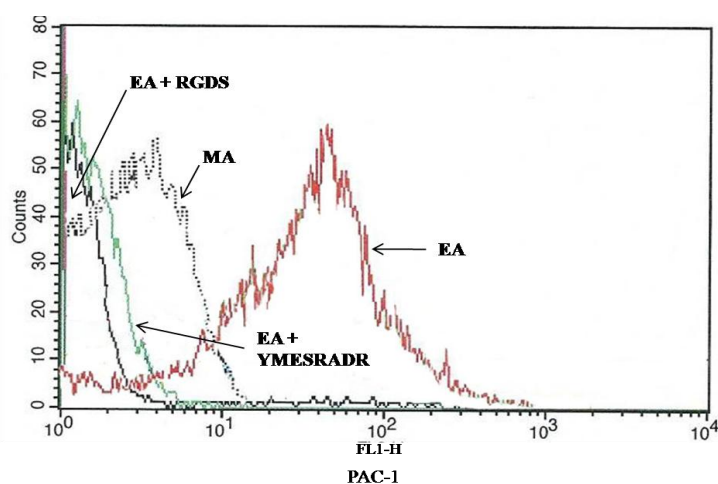
**Πίνακας 5.** Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στην έκφραση του PAC-1 στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή της με αγωνιστή TRAP-14.

| Πεπτίδια | Συγκέντρωση ( $\mu$ M) | Αγωνιστής            | Έκφραση PAC-1-FITC (M.F.I.) | Αναστολή έκφρασης PAC-1-FITC (%) |
|----------|------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| -        | -                      | -                    | 6 $\pm$ 3                   | -                                |
| -        | -                      | TRAP-14 (50 $\mu$ M) | 50 $\pm$ 12                 | -                                |
| RGDS     | 900                    |                      | 4 $\pm$ 1                   | 90 $\pm$ 3                       |
| YMESRADR | 500                    |                      | 4 $\pm$ 2                   | 90 $\pm$ 5                       |

[Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  SD, n=3]



**Εικόνα Α.9.** **A.** Μέση ένταση φθορισμού της πρόσδεσης του PAC-1-FITC σε μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (PRP) υπό την επίδραση του RGDS στα 900  $\mu$ M ή του YMESRADR στα 500  $\mu$ M. ME αιμοπετάλια: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14. **B.** Αναστολή της πρόσδεσης του αντισώματος PAC-1 στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ενεργοποιημένων, με TRAP-14, αιμοπεταλίων από τα πεπτιδικά ανάλογα.



**Εικόνα Α.10.** Χαρακτηριστική εικόνα κυτταρομετρίας της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην έκφραση του υποδοχέα (έκφραση PAC-1). MA: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, EA:

ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14, **EA + RGDS**: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + RGDS (900  $\mu$ M), **EA+YMESRADR**: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + YMESRADR (500  $\mu$ M).

### 2.3. Η επίδραση του YMESRADR στην έκφραση της P-σελεκτίνης

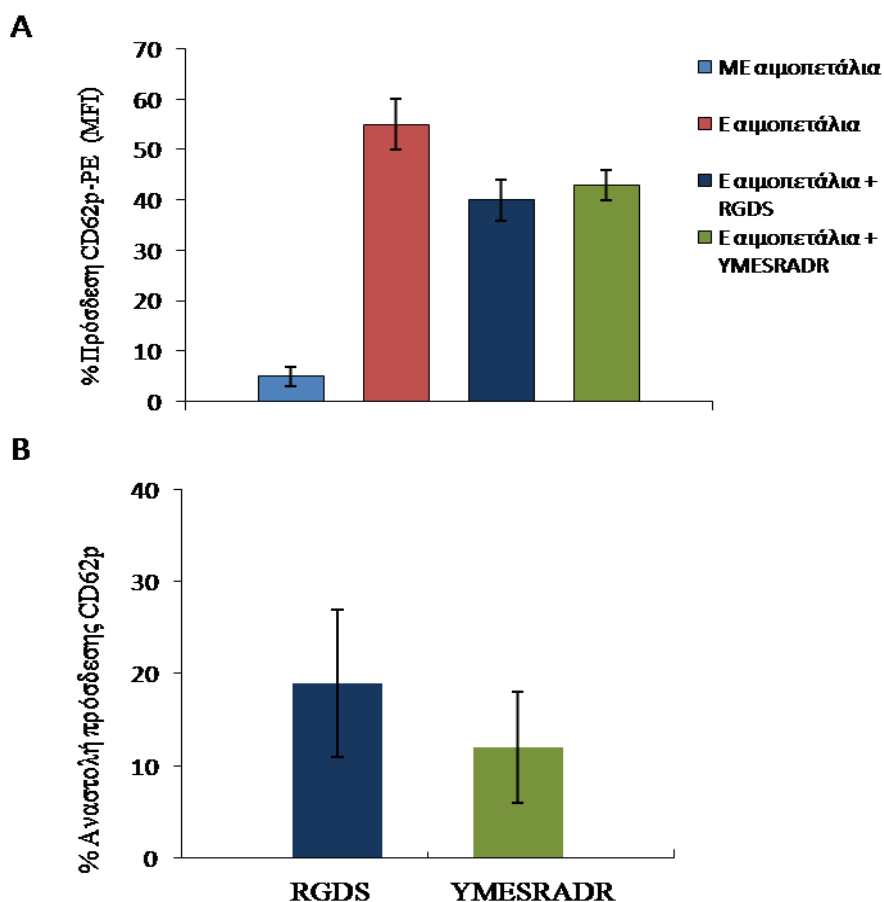
Έγιναν πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα οποία μελετήθηκε της η επίδραση του YMESRADR στα 500  $\mu$ M καθώς και του προσδεματο-μιμητικού πεπτιδίου RGDS πεπτιδίου στα 900  $\mu$ M στην έκφραση της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης. Τα αιμοπετάλια (PRP) ενεργοποιήθηκαν με αγωνιστή TRAP-14 σε συγκέντρωση 50 $\mu$ M.

**Πίνακας 6.** Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στην έκφραση της p-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή της με αγωνιστή TRAP-14.

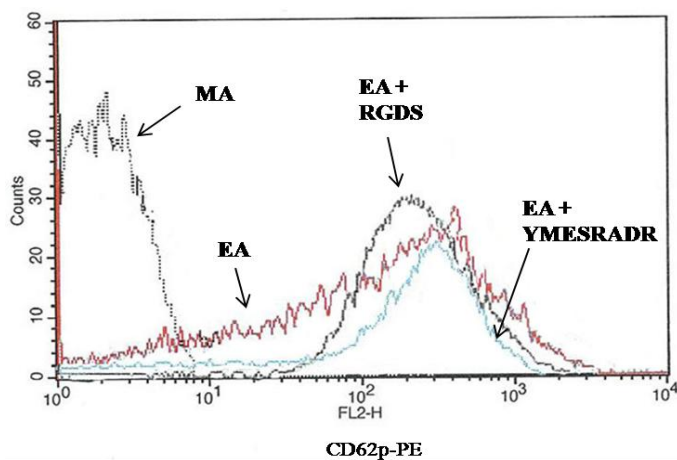
| Πεπτίδια | Συγκέντρωση ( $\mu$ M) | Αγωνιστής            | Έκφραση CD62p-PE (M.F.I.) | Αναστολή έκφρασης CD62p-PE (%) |
|----------|------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------------|
| -        | -                      | -                    | 5 $\pm$ 3                 | -                              |
| -        | -                      | TRAP-14 (50 $\mu$ M) | 55 $\pm$ 5                | -                              |
| RGDS     | 900                    |                      | 42 $\pm$ 4                | 18 $\pm$ 8                     |
| YMESRADR | 500                    |                      | 43 $\pm$ 3                | 10 $\pm$ 6                     |

[Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  SD, n=3]





**Εικόνα A.11. Α.** Μέση ένταση φθορισμού της πρόσδεσης της CD62p-PE σε μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (PRP) υπό την επίδραση του RGDS στα 900  $\mu$ M ή του YMESRADR στα 500  $\mu$ M. ME αιμοπετάλια: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14. **Β.** Αναστολή της έκφρασης της P-σελεκτίνης στην επιφάνεια ενεργοποιημένων, με TRAP-14, αιμοπεταλίων από τα πεπτιδικά ανάλογα.



**Εικόνα A.12.** Χαρακτηριστική εικόνα κυτταρομετρίας της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην έκφραση της P-σελεκτίνης (έκφραση CD62P). **MA:** μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, **EA:**

ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14, **EA + RGDS**: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + RGDS (900  $\mu$ M), **EA+YMESRADR**: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + YMESRADR (500  $\mu$ M).

#### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

➤ Το YMESRADR έδειξε να αναστέλλει πλήρως την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, αφού ανέστειλε εξολοκλήρου τη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  έπειτα από ενεργοποίηση με Trap-14. Το RGDS αποτελεί ισχυρό αναστολέα της πρόσδεσης του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη, πράγμα το οποίο συμφωνεί και με τη βιβλιογραφία.

➤ Το YMESRADR, παρουσία του Trap-14, έδειξε να αναστέλλει την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης μέσω της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 (έκφραση ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης). Το RGDS αποτελεί ισχυρό αναστολέα της έκφρασης της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης, το οποίο συμφωνεί και με τη βιβλιογραφία.

➤ Το YMESRADR δεν εμφάνισε σχεδόν καμία επίδραση στην έκκριση των  $\alpha$ -κοκκίων των αιμοπεταλίων που συμβαίνει κατά την ενεργοποίηση, αφού δεν κατάφερε να αναστείλει τη έκφραση της p-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια έπειτα από ενεργοποίηση με Trap-14. Παρόμοιο αποτέλεσμα έδειξε και το RGDS, το οποίο συμφωνεί με το μεγαλύτερο μέρος της πρόσφατης βιβλιογραφίας\*.

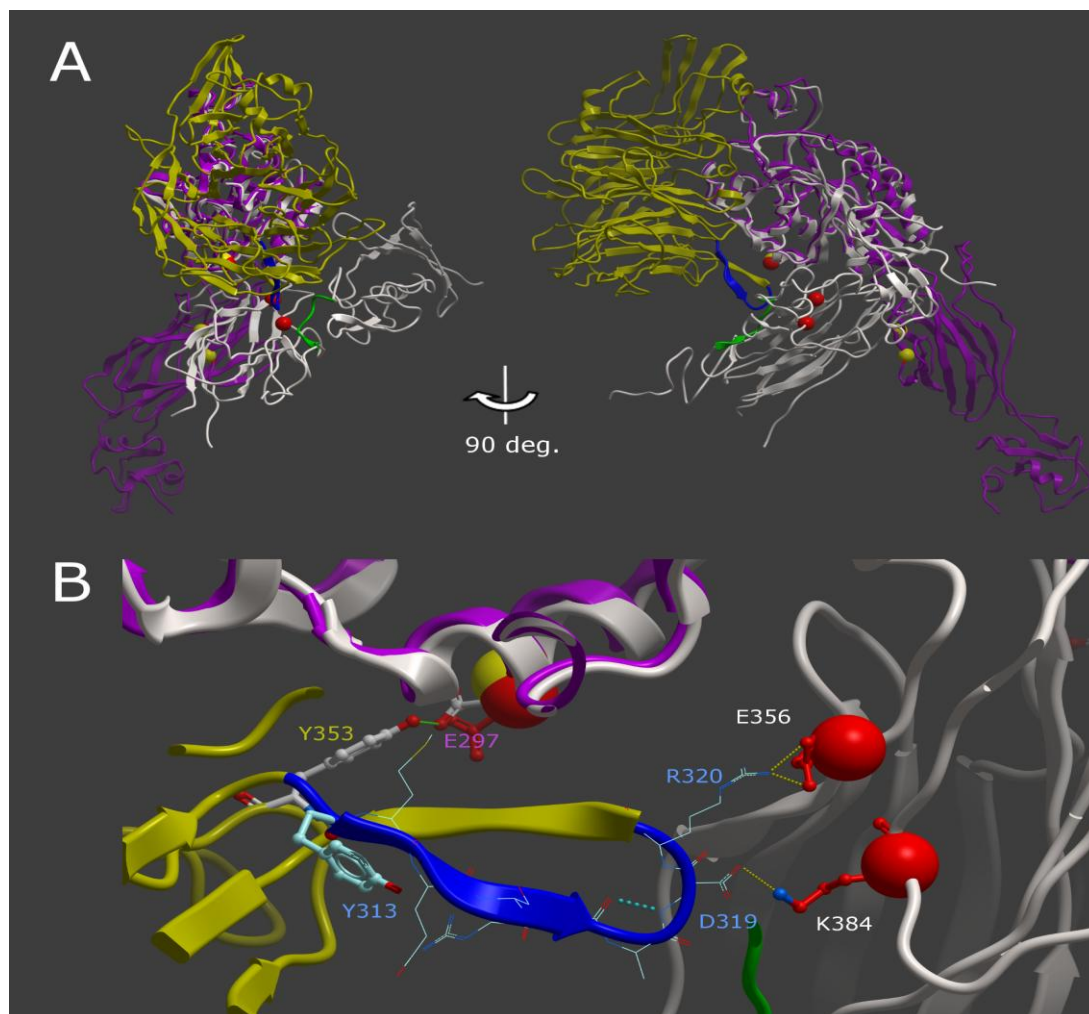
\* [374], [375]

### 3. Η επίδραση του YMESRADR στην 'έξω-μέσα' δομική ενεργοποίηση της $\alpha_{IIB}\beta_3$

Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο ενδοθήλιο αποτελεί φυσιολογική διαδικασία για την επίσχεση της αιμορραγίας, η οποία επιφέρει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την αλλαγή της εξωκυττάριας διαμόρφωσης της  $\alpha_{IIB}\beta_3$ , τη πρόσδεση της με το ινωδογόνο και τελικά την συσσώρευση για τη δημιουργία του σταθερού αιμοπεταλιακού θρόμβου. Η πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη πυροδοτεί ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία περιλαμβάνονται στην 'έξω-μέσα' ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Για τη διερεύνηση του ρόλου του YMESRADR στη παραπάνω διαδικασία μελετήσαμε CHO κύτταρα, τα οποία εκφράζουν σε μεγάλο ποσοστό αιμοπεταλιακές πρωτεΐνες, όπως η  $\alpha_{IIB}\beta_3$ , στην επιφάνειά τους και χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διερεύνηση των μηχανισμών ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης καθώς και για θεραπευτικούς σκοπούς.

Έγινε μελέτη της κρυσταλλικής δομής της εξωκυττάριας περιοχής της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIB}\beta_3$  στη «κεκκαμένη» διαμόρφωση της και έδειξαν ότι η YMESRADR αλληλουχία σχηματίζει μια β-φουρκέτα, η οποία εκτείνεται από τη λεπίδα 5 της β-προπέλας της  $\alpha_{IIB}$  και λειτουργεί ως φουρκέτα «μανταλάκι» που συγκρατεί κοντά την παραπάνω  $\alpha_{IIB}$  περιοχή με την βI και την υβριδική περιοχή της  $\beta_3$  υπομονάδας [Lee H.W. et al, under publication]. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η «φουρκέτα» αυτή βρέθηκε στη διεπαφή μεταξύ των περιοχών της β-προπέλας και της βI, οι οποίες συγκροτούν τη κεφαλή της ιντεγκρίνης [εικόνα A.13 (A)].

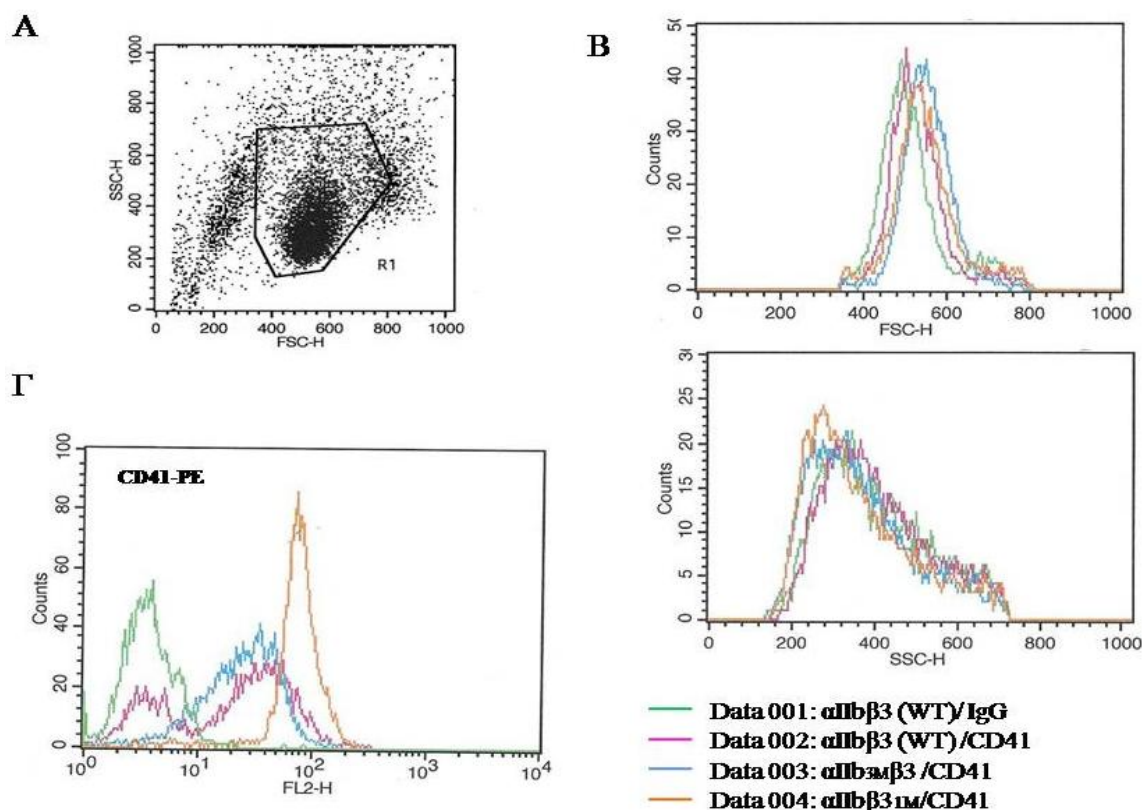
Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της συσσωρευομετρίας που αφορούν την διερεύνηση των κρίσιμων αμινοξέων της 313-320 υπομονάδας, και σε συνδυασμό με πειράματα μελέτης της κρυσταλλικής δομής της εξωκυττάριας περιοχής της  $\alpha_{IIB}\beta_3$ , βρέθηκε ότι αμινοξέα της YMESRADR αλληλουχίας δημιουργούν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα τόσο της βI όσο και της υβριδικής περιοχής της  $\beta_3$  ταυτόχρονα, με τη μορφή γεφυρών άλατος όπως: D319( $\alpha_{IIB}$ )-K384( $\beta_3$ ) και R320( $\alpha_{IIB}$ )-E356( $\beta_3$ ), πράγμα το οποίο συμβαίνει μόνο κατά την λυγισμένη διαμόρφωση της  $\beta_3$ . Επίσης υπάρχουν και άλλες επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραπάνω περιοχών, εκτός της YMESRADR αλληλουχίας, μια εκ των οποίων είναι και η Y353( $\alpha_{IIB}$ )-E297( $\beta_3$ ) [εικόνα A.13 (B)].



**Εικόνα Α.13.** (Α) Κρυσταλλική δομή της κεφαλής της ιντεγκρίνης. Οι δύο όψεις της κεφαλής (περιστροφή 90° σε κάθετο άξονα). Η φουρκέτα «μανταλάκι» (μπλε, YMESRADR μοτίβο) αναπαρίσταται στην β-προπέλα της  $\alpha_{1b}$ . Τα τρία αμινοξέα της  $\beta_3$  που αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα της φουρκέτας, τα οποία έχουν μεταλλαχθεί στη παρούσα μελέτη φαίνονται ως σφαίρες. Οι σφαίρες αυτές ανάλογα με τη διαμόρφωση της  $\beta_3$  αναπαρίστανται με διαφορετικό χρώμα (κόκκινο για τη «κεκκαμένη» και κίτρινο για την «εκτεταμένη»). (Β) Λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης της μοντελοποιημένης  $\alpha_{1b}$  φουρκέτας με τη  $\beta_3$  υπομονάδα. Το μοντέλο περιλαμβάνει τη δομή της β-προπέλας (κίτρινο) και τη  $\beta_3$  στη «σκυφτή» διαμόρφωση (άσπρο). Η φουρκέτα (μπλε μοτίβο, YMESRADR) αλληλεπιδρά με την  $\beta_3$  υβριδική περιοχή (άσπρο, δεξιά πλευρά του σχήματος) μέσω δύο γεφυρών άλατος:  $D^{319}(\alpha_{1b})-K^{384}(\beta_3)$  και  $R^{320}(\alpha_{1b})-E^{356}(\beta_3)$ . Επιπλέον οι δύο παραπάνω περιοχές αλληλεπιδρούν μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ των  $Y^{353}(\alpha_{1b})-E^{297}(\beta_3)$ . Χρήση της εικόνας έπεται από την άδεια του συγγραφέα [Lee H W et al, under publication].

Με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μοντελοποίηση της  $\alpha_{\text{Ib}}$  313-320 περιοχής, τα πιο κρίσιμα αμινοξέα φαίνεται να είναι τα: D319 και R320, αφού αλληλεπιδρούν με αμινοξέα της  $\beta_3$  υπομονάδας κατά την ανενεργή μορφή του υποδοχέα. Από τη συσσωρευομετρία προέκυψε ότι εξίσου κρίσιμο αμινοξύ είναι το R317, αφού η μετάλλαξη του οδήγησε σε πλήρη απώλεια της ανασταλτικής δράσης της αλληλουχίας YMESRADR. Για να ισχυροποιήσουμε επιπλέον το παραπάνω μηχανιστικό μοντέλο, μελετήσαμε μετασχηματισμένους κλώνους CHO κυττάρων που εκφράζουν την ιντεγκρίνη  $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$  στην άγριου τύπου μορφή της ( $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$  WT) καθώς και με μεταλλάξεις, είτε στην  $\alpha_{\text{Ib}}$  είτε στη  $\beta_3$  υπομονάδα, στα κρίσιμα αμινοξέα που προέκυψαν από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε τους κυτταρικούς κλώνους  $\alpha_{\text{Ib}}\beta_{3\text{IM}}\beta_3$  που παρουσιάζουν μια τριπλή μετάλλαξη: R317A+D319A+R320A στην  $\alpha_{\text{Ib}}$  υπομονάδα και εκφράζονται με την άγριου τύπου  $\beta_3$  υπομονάδα της ιντεγκρίνης και τους κλώνους  $\alpha_{\text{Ib}}\beta_{3\text{IM}}$  που παρουσιάζουν τη μονή μετάλλαξη K384A στην  $\beta_3$  υπομονάδα και εκφράζονται με την άγριου τύπου  $\alpha_{\text{Ib}}$  υπομονάδα. Τα πειράματα και τα αποτελέσματα που περιλαμβάνει η εργασία είναι αυτά που ακολούθησαν μετά τη μετάλλαξη των CHO κυττάρων, αφού η μετάλλαξη έγινε από άλλη ερευνητική ομάδα στο εργαστήριο του τμήματος Φαρμακευτικής του INSERM UMR\_S, στο Παρίσι. Παρόλα αυτά η μετάλλαξη περιγράφεται συνοπτικά στο πειραματικό μέρος, (§ 5.10).

Ακολούθησε μελέτη και σύγκριση των μεταλλαγμένων και μη κυττάρων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Έγινε σε όλα τα κύτταρα προσδιορισμός της ιντεγκρίνης με τη χρήση του αντισώματος anti-CD41-PE καθώς και του μεγέθους και της κοκκίωσης τους. Τα κύτταρα εμφανίζουν πλήρη ομοιότητα ως προς το μέγεθος και την κοκκίωση τους, καθώς επίσης σε όλα τα κύτταρα υπάρχει έκφραση της ιντεγκρίνης (anti-CD41), αποτελέσματα τα οποία φαίνονται παρακάτω στην εικόνα A.14.



**Εικόνα A.14.** Χαρακτηριστικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής που φαίνεται (Α) ο πληθυσμός των CHO κυττάρων, (Β) η απεικόνιση του μεγέθους των κυττάρων (πάνω δεξιά) και της δομής τους (κάτω δεξιά), τα οποία είναι σχεδόν πανομοιότυπα για όλα τα στελέχη των CHO κυττάρων και (Γ) η έκφραση της ιντεγκρίνης στα άγριου τύπου και στα μεταλλαγμένα στελέχη των CHO κυττάρων, παρουσία του IgG-PE.

### 3.1. Η επίδραση του YMESRADR στη προσκόλληση CHO κυττάρων στο ινωδογόνο, υπό συνθήκες ροής

CHO κύτταρα με άγριου τύπου ή μεταλλαγμένη ιντεγκρίνη, εγχύθηκαν με τη βοήθεια αντλίας σε γυάλινες πλάκες επιστρωμένες με ινωδογόνο (10μg/ml) υπό ταχύτητες ροής 60-200 μl/min, για την παραγωγή ρυθμού διάτμησης από 30-100 s<sup>-1</sup> έτσι ώστε να επιλεγεί ο σωστός ρυθμός διάτμησης. Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης σχετίζεται με σταθεροποίηση της πρόσδεσης της με το ινωδογόνο υπό ρυθμούς διάτμησης ανάμεσα από 30 and 100 s<sup>-1</sup> [376].

Στη παρούσα μελέτη βρέθηκε η αύξηση του ρυθμού διάτμησης οδηγεί σε ελάττωση της προσκόλλησης της ιντεγκρίνης. Επίσης, βρέθηκε ότι τα κύτταρα που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες ιντεγκρίνες εμφανίζουν μεγαλύτερη προσκόλληση στις ταχύτητες  $50 \text{ s}^{-1}$  and  $75 \text{ s}^{-1}$  από αυτά που εκφράζουν την άγριου τύπου ιντεγκρίνη, ενώ στα  $100 \text{ s}^{-1}$ , μόνο τα κύτταρα με την  $\alpha\text{Ib}\beta3_{1\text{M}}$  ιντεγκρίνη εμφάνισαν μια υπολειμματική προσκόλληση (Πίνακας 7). Οι διαφορές της κυτταρικής προσκόλλησης υπό διάτμηση, που παρατηρούνται, πιθανώς να οφείλονται σε καταστάσεις διαφορετικής ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης  $\alpha\text{Ib}\beta3$  έπειτα από τις μεταλλάξεις.

**Πίνακας 7.** Αντιπροσωπευτικός πίνακας προσκόλλησης των CHO κυττάρων σε ενδεικτικούς ρυθμούς διάτμησης.

| CHO<br>κύτταρα<br>(κύτταρα/ml) | Κλώνος<br>$\alpha\text{Ib}\beta3$   | Ρυθμός<br>διάτμησης<br>( $\text{s}^{-1}$ ) | Προσκολλημένα<br>Κύτταρα<br>(μ.ο./πλάκα) |
|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|
| $1,25 \times 10^6$             | $\alpha\text{Ib}\beta3$ (WT)        | 30                                         | $65 \pm 15$                              |
|                                | $\alpha\text{Ib}_{3\text{M}}\beta3$ |                                            | $70 \pm 10$                              |
|                                | $\alpha\text{Ib}\beta3_{1\text{M}}$ |                                            | $80 \pm 5$                               |
|                                | $\alpha\text{Ib}\beta3$ (WT)        | 50                                         | $25 \pm 10$                              |
|                                | $\alpha\text{Ib}_{3\text{M}}\beta3$ |                                            | $35 \pm 5$                               |
|                                | $\alpha\text{Ib}\beta3_{1\text{M}}$ |                                            | $49 \pm 10$                              |
|                                | $\alpha\text{Ib}\beta3$ (WT)        | 75                                         | $10 \pm 5$                               |
|                                | $\alpha\text{Ib}_{3\text{M}}\beta3$ |                                            | $20 \pm 10$                              |
|                                | $\alpha\text{Ib}\beta3_{1\text{M}}$ |                                            | $39 \pm 8$                               |
|                                | $\alpha\text{Ib}\beta3$ (WT)        | 100                                        | -                                        |
|                                | $\alpha\text{Ib}_{3\text{M}}\beta3$ |                                            | -                                        |
|                                | $\alpha\text{Ib}\beta3_{1\text{M}}$ |                                            | $20 \pm 6$                               |

[Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  SD, n=3]

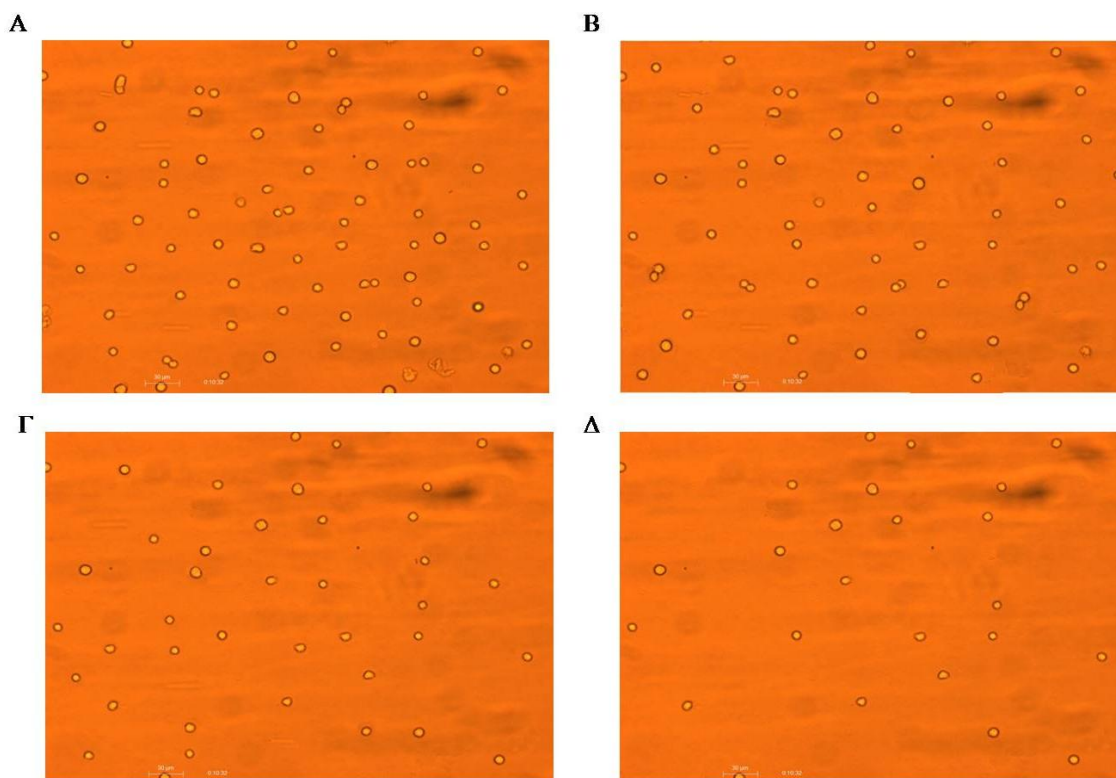
Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, όλα τα πειράματα διερεύνησης της ανασταλτικής δράσης του πεπτιδίου στη πρόσδεση της ιντεγκρίνης με το ινωδογόνο, διεξήχθησαν υπό συνθήκες διατμητικής ροής ίσης με  $30 \text{ s}^{-1}$ . Δείγματα κυττάρων επώαστηκαν για 20 min με το YMESRADR σε συγκεντρώσεις των 250 ή 500  $\mu\text{M}$ , ή με

το YMESRAAR στα 500  $\mu\text{M}$ , ή με τον GrIIb/IIIa αναστολέα που χρησιμοποιείται στο εμπόριο, Reopro (abciximab) σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g/ml}$ , πριν από την έγχυση τους σε ρυθμό διάτμησης 30 $\text{s}^{-1}$ . Ο αριθμός προσκολλημένων κυττάρων καταγράφηκε έπειτα από 10λεπτη έγχυση με 10x μεγεθυντικό φακό σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσκόλλησης υπό ροή συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 8.** Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων της  $\alpha_{\text{IIb}}$  313-320 αλληλουχίας στη προσκόλληση CHO κυττάρων, τα οποία εκφράζουν την άγριου τύπου **WT**  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  υπό συνθήκες ροής.

| Πεπτίδιο | Συγκέντρωση ( $\mu\text{M}$ ) | Ρυθμός διάτμησης   | Προσκολλημένα κύτταρα | Αριθμός πλακών | Κύτταρα / πλάκα | Αναστολή (%) |
|----------|-------------------------------|--------------------|-----------------------|----------------|-----------------|--------------|
| -        | -                             | 30 $\text{s}^{-1}$ | 748                   | 8              | 93,5            | -            |
| YMESRADR | 500                           |                    | 443                   | 10             | 44,3            | 52,6         |
|          | 250                           |                    | 601                   | 10             | 60,1            | 35,7         |
|          | 125                           |                    | 630                   | 10             | 63              | 32,6         |
|          | 62.5                          |                    | 903                   | 10             | 90,3            | 3,4          |
| YMESRAAR | 500                           |                    | 782                   | 10             | 82,3            | 11,9         |
|          | 250                           |                    | 721                   | 8              | 90,1            | 3,6          |
| Reopro   | 5 $\mu\text{g/ml}$            |                    | 52                    | 10             | 5,2             | 94,4         |
| -        | -                             |                    | 756                   | 8              | 94,5            | -            |
| YMESRADR | 500                           |                    | 358                   | 10             | 35,8            | 62,12        |
|          | 250                           |                    | 490                   | 10             | 49              | 48,15        |
|          | 125                           |                    | 567                   | 7              | 81              | 14,29        |
|          | 62.5                          |                    | 693                   | 8              | 86,6            | 8,33         |
| YMESRAAR | 500                           |                    | 720                   | 8              | 90              | 4,7          |
|          | 250                           |                    | 760                   | 8              | 95              | 0            |
| -        | -                             |                    | 723                   | 11             | 72,3            | -            |
| YMESRADR | 500                           |                    | 354                   | 12             | 29,5            | 59,1         |
|          | 250                           |                    | 494                   | 13             | 38,0            | 34,8         |
|          | 125                           |                    | 558                   | 11             | 50,7            | 13           |
|          | 62.5                          |                    | 601                   | 11             | 54,6            | 6,3          |
| YMERAAAR | 500                           |                    | 580                   | 10             | 72              | 0            |
|          | 250                           |                    | 583                   | 10             | 73              | 0            |





**Εικόνα A.15.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες προσκόλλησης CHO κυττάρων, τα οποία εκφράζουν την άγριου τύπου ιντεγκρίνη, προερχόμενες από την ίδια επιστρωμένη με ινωδογόνο πλάκα, κατά τη διάρκεια έγχυσης τους υπό ρυθμό διάτμησης  $30 \text{ s}^{-1}$  και αφού έχουν επωαστεί για 20 min με Α) τον διαλύτη των πεπτιδίων (PBS), Β) με το YMESRAAR στα 500  $\mu\text{M}$ , Γ) με το YMESRADR στα 250  $\mu\text{M}$ , και με το Δ) και με το YMESRADR στα 500  $\mu\text{M}$ .

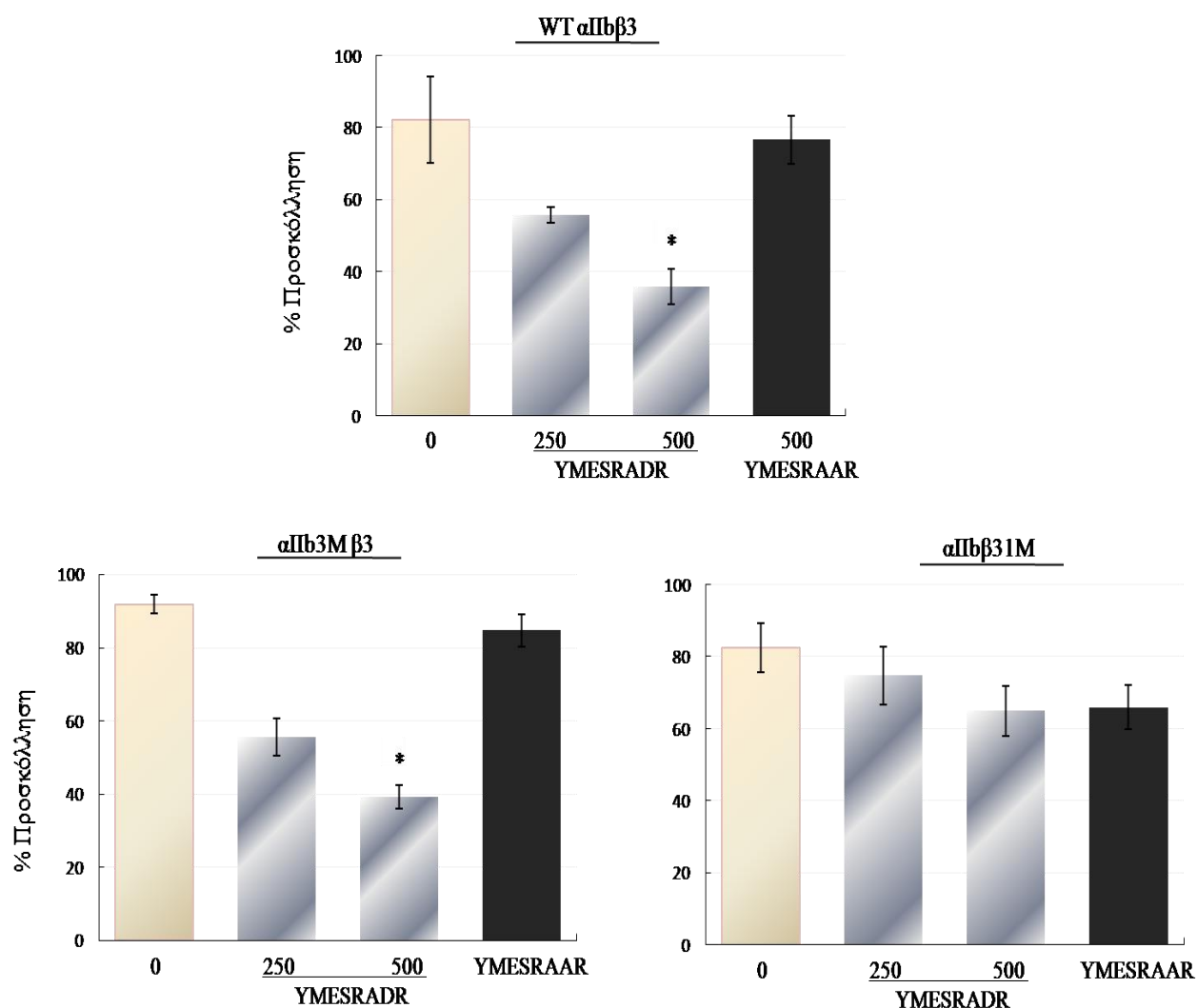
**Πίνακας 9.** Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στη προσκόλληση CHO κυττάρων, τα οποία εκφράζουν τη μεταλλαγμένη  $\alpha_{\text{PI3M}}\beta_3$  υπό συνθήκες ροής.

| Πεπτίδιο | Συγκέντρωση ( $\mu\text{M}$ ) | Ρυθμός διάτμησης | Προσκολλημένα κύτταρα | Αριθμός πλακών | Κύτταρα / πλάκα | Αναστολή (%) |
|----------|-------------------------------|------------------|-----------------------|----------------|-----------------|--------------|
| -        | -                             |                  | 756                   | 8              | 94,5            | -            |
| YMESRADR | 500                           |                  | 490                   | 11             | 44,5            | 52,9         |
|          | 250                           |                  | 819                   | 13             | 63,05           | 33,3         |
| YMESRAAR | 500                           |                  | 693                   | 8              | 86,6            | 8,33         |
|          | 250                           |                  | 697                   | 8              | 87,1            | 7,8          |
| Reopro   | 5 $\mu\text{g/ml}$            |                  | 23                    | 6              | 3,8             | 95,9         |

| Πεπτίδιο | Συγκέντρωση (μM) | Ρυθμός διάτμησης   | Προσκολλημένα κύτταρα | Αριθμός πλακών | Κύτταρα / πλάκα | Αναστολή (%) |
|----------|------------------|--------------------|-----------------------|----------------|-----------------|--------------|
| -        | -                | 30 s <sup>-1</sup> | 715                   | 8              | 89,4            | -            |
| YMESRADR | 500              |                    | 355                   | 9              | 39,4            | 55,9         |
|          | 250              |                    | 412                   | 9              | 45,8            | 48,7         |
| YMESRAAR | 500              |                    | 610                   | 8              | 76,3            | 14,6         |
|          | 250              |                    | 681                   | 8              | 85,1            | 4,8          |
| -        | -                |                    | 641                   | 7              | 91,6            | -            |
| YMESRADR | 500              |                    | 304                   | 9              | 33,7            | 63,2         |
|          | 250              |                    | 462,4                 | 8              | 57,8            | 36,8         |
| YMERAAAR | 500              |                    | 729                   | 8              | 91,1            | 0            |
|          | 250              |                    | 748                   | 8              | 93,5            | 0            |

**Πίνακας 10.** Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στη προσκόλληση CHO κυττάρων, τα οποία εκφράζουν την μεταλλαγμένη α<sub>11b</sub>β<sub>31M</sub> υπό συνθήκες ροής.

| Πεπτίδιο | Συγκέντρωση (μM) | Ρυθμός διάτμησης   | Προσκολλημένα κύτταρα | Αριθμός πλακών | Κύτταρα / πλάκα | Αναστολή (%) |
|----------|------------------|--------------------|-----------------------|----------------|-----------------|--------------|
| -        | -                | 30 s <sup>-1</sup> | 666                   | 7              | 95,1            | -            |
| YMESRADR | 500              |                    | 548                   | 8              | 68,6            | 28,0         |
|          | 250              |                    | 610                   | 7              | 87,1            | 8,41         |
| YMESRAAR | 500              |                    | 689                   | 10             | 68,9            | 27,58        |
|          | 250              |                    | 709                   | 8              | 88,6            | 6,85         |
| Reopro   | 5 μg/ml          |                    | 59                    | 10             | 5,9             | 93,8         |
| -        | -                |                    | 645                   | 9              | 71,6            | -            |
| YMESRADR | 500              |                    | 878                   | 17             | 51,6            | 27,9         |
|          | 250              |                    | 599                   | 10             | 59,9            | 11,7         |
| YMESRAAR | 500              |                    | 542                   | 10             | 54,2            | 24,3         |
|          | 250              |                    | 636                   | 10             | 63,6            | 11,1         |
| -        | -                |                    | 804                   | 10             | 80,4            | -            |
| YMESRADR | 500              |                    | 820                   | 11             | 74,5            | 7,33         |
|          | 250              |                    | 771                   | 10             | 77,1            | 4,1          |
| YMERAAAR | 500              |                    | 754                   | 10             | 75,4            | 6,2          |
|          | 250              |                    | 790                   | 10             | 79              | 1,7          |



**Εικόνα Α.16.** Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού της προσκόλλησης των CHO κυττάρων, τα οποία εκφράζουν είτε την άγριου τύπου ιντεγκρίνη, είτε τη μεταλλαγμένη ιντεγκρίνη αIbβ3Mβ3 ή αIbβ31M έπειτα από έγχυση τους υπό ροή 30 s<sup>-1</sup> στο ινωδογόνο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος προσκολλημένων κυττάρων/ πεδίο. Το γράφημα ράβδων δείχνει κατά πόσο αλλάζει η προσκόλληση των κυττάρων που έχουν επωαστεί με τα πεπτίδια σε σύγκριση με αυτά που έχουν επωαστεί με τον διαλύτη των πεπτιδίων (στήλη 0). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± S.E.M και προέκυψαν από 3 πειράματα. \* p<0.01.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Το YMESRADR ανέστειλε σημαντικά τη προσκόλληση των CHO κυττάρων, τα οποία εκφράζουν την άγριου τύπου ή τη μεταλλαγμένη  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ , στο ινωδογόνο με στατιστική σημαντικότητα σε συγκέντρωση 500  $\mu\text{M}$ . Το τροποποιημένο YMESRAAR στα 500  $\mu\text{M}$  δεν εμφάνισε απολύτως καμία επίδραση.
- Το YMESRADR δεν ανέστειλε τη προσκόλληση των CHO κυττάρων, τα οποία εκφράζουν τη μεταλλαγμένη  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_{31\text{M}}$ .
- Το αμινοξύ  $\text{D}^{319}$  διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη πρόσδεση του οκταπεπτιδίου στην ιντεγκρίνη, αφού δεν εμφάνισε καμία ανασταλτική δράση στη προσκόλληση των CHO κυττάρων που εκφράζουν την μετάλλαξη K384/A στη  $\beta_3$  υπομονάδα της ιντεγκρίνης ( $\alpha_{\text{IIB}}\beta_{31\text{M}}$ ).
- Πιθανώς, το οκταπεπτίδιο να συναγωνίζεται την  $\alpha_{\text{IIB}}$  αλληλουχία 313-320, να προσδένεται στην ιντεγκρίνη και να αλληλεπιδρά με τη υβριδική περιοχή της  $\beta_3$  υπομονάδας, διατηρώντας την ιντεγκρίνη στην «κεκκαμένη» διαμόρφωση, αποκαθιστώντας τις  $\text{D}^{319}(\alpha_{\text{IIB}})\text{-K}^{384}(\beta_3)$  και  $\text{R}^{320}(\alpha_{\text{IIB}})\text{-E}^{356}$  γέφυρες άλατος.
- Η ανασταλτική δράση του οκταπεπτιδίου πιθανώς να οφείλεται στην άμεση αλληλεπίδραση του με τη  $\beta_3$  υπομονάδα, εμποδίζοντας τη διαμορφωτική αλλαγή της εξωκυττάριας δομής της ιντεγκρίνης και όχι στην αρχικά θεωρημένη αλληλεπίδραση της με το ινωδογόνο \*.

\* [331]

#### 4. Η επίδραση του YMESRADR στην ‘μέσα-έξω’ δομική ενεργοποίηση της $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$

##### Εισαγωγή

Όπως είδαμε στο θεωρητικό μέρος, ένας από τους μηχανισμούς ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης είναι η ‘μέσα - έξω’ δομική ενεργοποίηση. Κύριο και καθοριστικό βήμα της

αποτελεί η πρόσδεση της ταλίνης στο  $\beta_3$  κυτταροπλασματικό άκρο της  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , η οποία έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό των κυτταροπλασματικών υπομονάδων. Αυτό, από πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι αναγκαίο και συμβάλει στην αλλαγή της εξωκυττάριας διαμόρφωσης και στη προέκταση των εξωκυττάρων υπομονάδων της, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειας της για το πρόσδεμα. Σχεδόν ταυτόχρονα με τη πρόσδεση της ταλίνης στο  $\beta_3$  κυτταροπλασματικό άκρο, πραγματοποιείται και η πρόσδεση της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό. Έτσι, με τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις, πραγματοποιείται και η σύνδεση της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό.

Στη παρούσα μελέτη θέλαμε να μελετήσουμε το ρόλο και τη δράση ενός εξωκυττάριου αναστολέα, προερχόμενο από την  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδα, στη ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση. Για να εξετάσουμε την *οπτική ή μη* πρόσδεση της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό υπό την δράση του ανασταλτικού πεπτιδίου YMESRADR, δείγματα πλυμένων αιμοπεταλίων επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοκαταβύθισης (IP) και ανοσοαποτύπωσης (WB) (όπως περιγράφεται στη § 5.3, 5.4). Τα δείγματα των αιμοπεταλίων επωάστηκαν με τον αναστολέα σε συγκέντρωση 500μM, το οποίο προκαλεί το 100% της αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης καθώς επίσης και με το RGDS πεπτίδιο σε συγκέντρωση 900μM, το οποίο είναι γνωστό και αποδεδειγμένο ότι αναστέλλει 100% την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Ως πρωτογενές αντίσωμα και στις δύο μεθόδους, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό, κατά της ταλίνης, αντίσωμα (anti-talin), το οποίο αναγνωρίζει ένα επίτοπο πάνω στο μόριο της ταλίνης (206 kD).

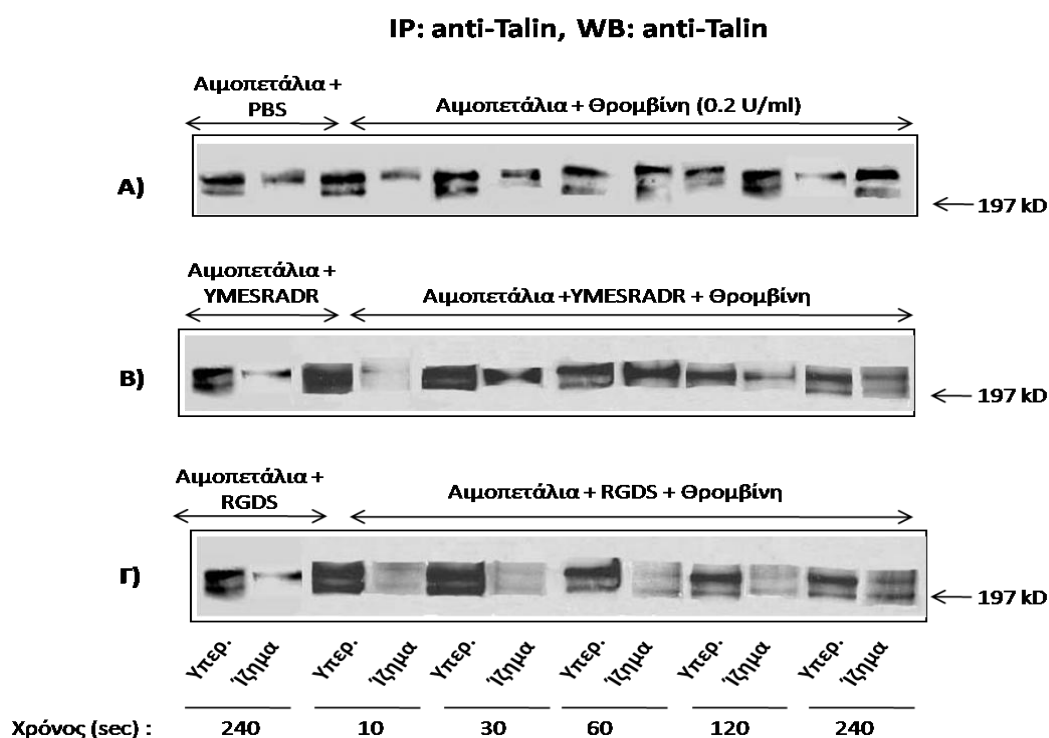
Εκτός από την κυτταροπλασματική ταλίνη μελετήθηκε και η οπτική ανίχνευση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Για να εξετάσουμε την *οπτική ή μη* πρόσδεση της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό υπό την δράση του YMESRADR, πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν με τον αναστολέα σε συγκέντρωση 500μM και ως πρωτογενές αντίσωμα και στις δύο μεθόδους, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ιντεγκρίνης (anti-CD41), το οποίο αναγνωρίζει ένα επίτοπο πάνω στην  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδα της (136 kD).

Επίσης, μελετήθηκε και η συγκαταβύθιση ταλίνης-υποδοχέα υπό τη δράση του αναστολέα. Η συγκαταβύθιση αυτή, αποτυπώνει οπτικά τη πρόσδεση της ταλίνης στην ιντεγκρίνη. Για να εξετάσουμε την *οπτική ή μη* πρόσδεση της ταλίνης με την ιντεγκρίνη υπό την δράση του αναστολέα, πλυμένα αιμοπετάλια επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοκαταβύθισης (IP) και ανοσοαποτύπωσης (WB). Τα δείγματα των αιμοπεταλίων επωάστηκαν με τον αναστολέα YMESRADR σε συγκέντρωση 500μM ή με το RGDS

στα 900  $\mu\text{M}$ . Ως πρωτογενές αντίσωμα στην μέθοδο της ανοσοκαταβύθισης χρησιμοποιήθηκε το anti-CD41 και στην μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης το anti-talin.

Όλη η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές χρονικές στιγμές δράσης του αναστολέα όπως τα 10 sec, 30 sec, 60 sec, 120 sec και 240 sec. Εν συντομία, τα αιμοπετάλια επώαστηκαν με ή χωρίς τον αναστολέα για 2 min, αμέσως μετά ακολούθησε ενεργοποίησή τους με θρομβίνη (0.2 U/ml) και η ενεργοποίηση διακόπηκε με ήπιο διάλυμα λύσεως στις παραπάνω χρονικές στιγμές αντίστοιχα. Παρακάτω φαίνονται αντιπροσωπευτικά φιλμ όπως αυτά προκύπτουν από την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά την επώασή τους με τα αντισώματα.

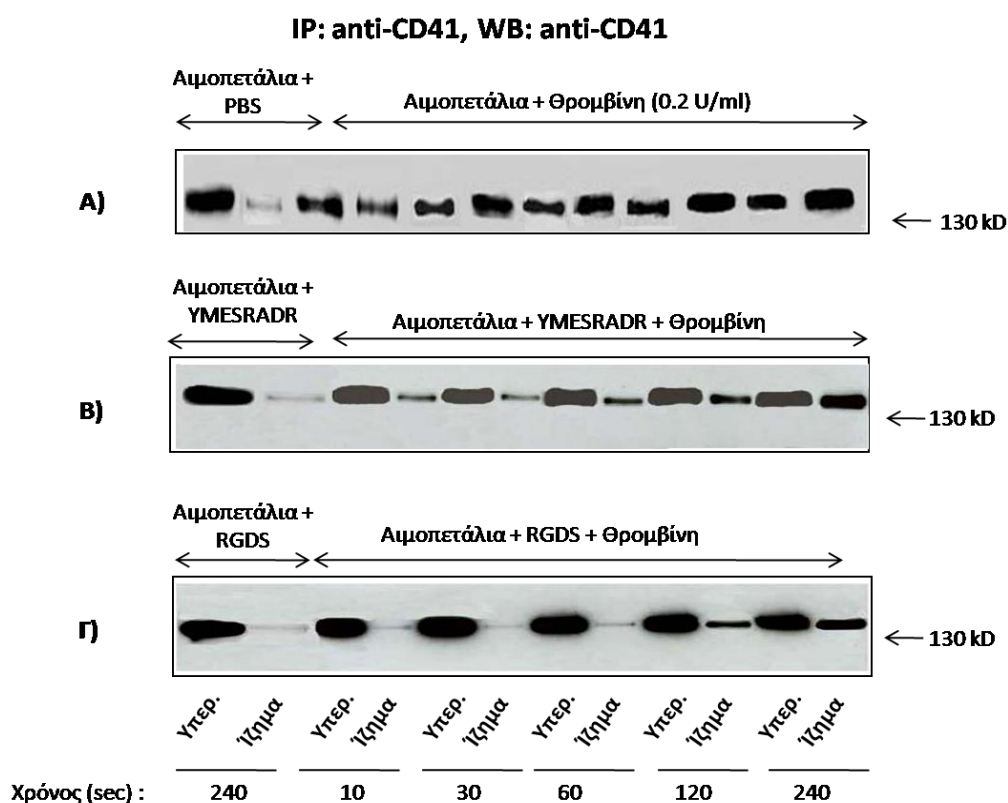
#### 4.1. Κινητική κατανομή της ταλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του YMESRADR ή του RGDS



**Εικόνα Α.17.** Απεικόνιση της κατανομής της ταλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με PBS (Α), YMESRADR (500  $\mu\text{M}$ ) (Β), RGDS (900  $\mu\text{M}$ ) (Γ) για 2 min, έπειτα ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη και ακολούθησε η λύση τους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ενεργοποίησης (sec). Μετά από φυγοκέντρωση τους, τα

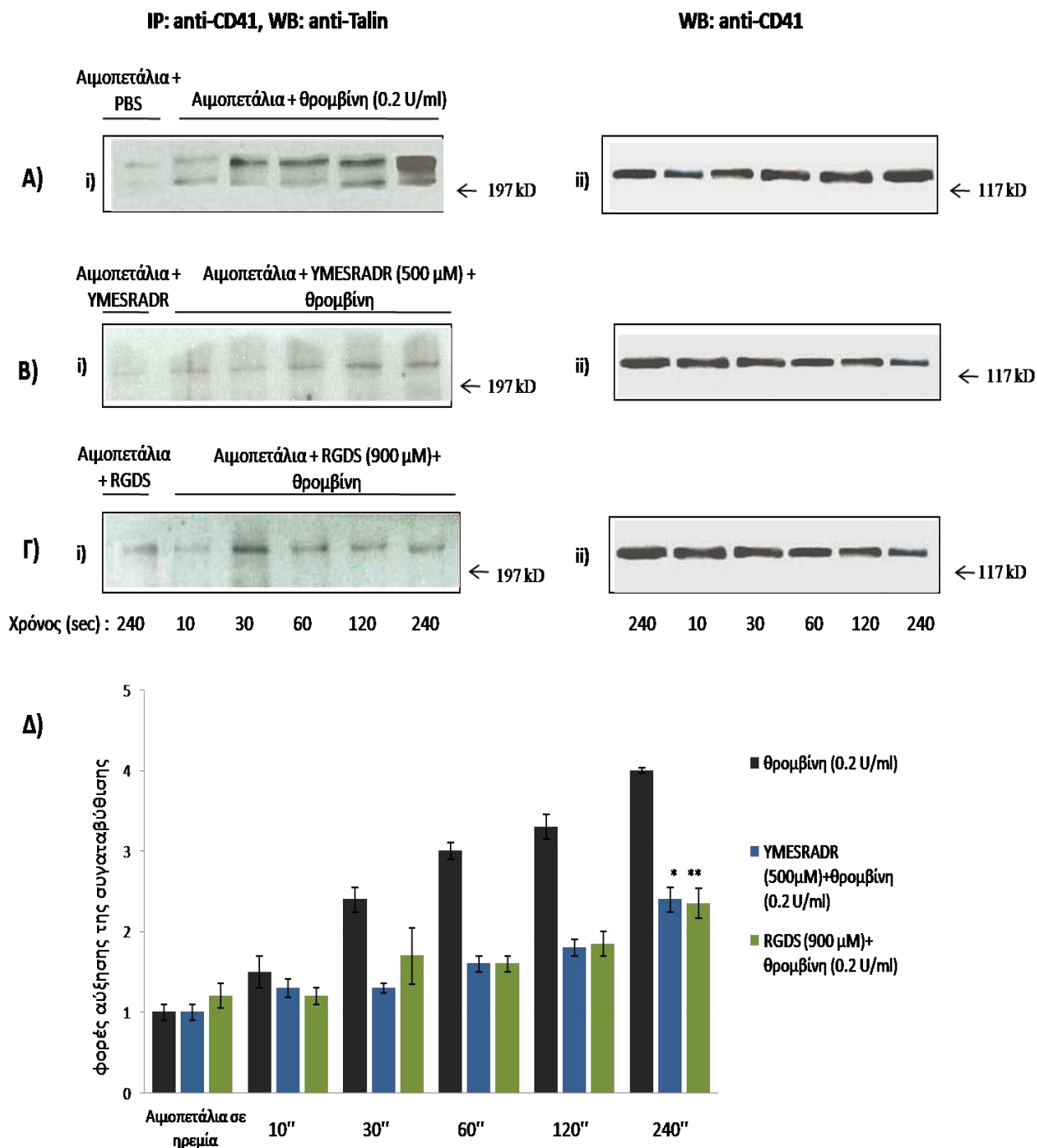
κυτταροπλάσματα (υπερκείμενα) ανοσοκαταβυθίστηκαν με anti-CD41 και ανοσοαποτυπώθηκαν όπως και τα ιζήματα με anti-CD41. Δεξιά με βέλη φαίνονται τα πρότυπα μοριακά βάρη.

4.2. Κινητική κατανομή της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του YMESRADR ή του RGDS



**Εικόνα Α.18.** Απεικόνιση της κατανομής της ιντεγκρίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με PBS (Α), YMESRADR (500  $\mu$ M) (Β), RGDS (900  $\mu$ M) (Γ) για 2 min, έπειτα ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη και ακολούθησε η λύση τους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ενεργοποίησης (sec). Μετά από φυγοκέντρωση τους, τα κυτταροπλάσματα (υπερκείμενα) ανοσοκαταβυθίστηκαν με anti-CD41 και ανοσοαποτυπώθηκαν όπως και τα ιζήματα με anti-CD41. Δεξιά με βέλη φαίνονται τα πρότυπα μοριακά βάρη.

### 4.3. Κινητική μελέτη της συγκαταβύθισης (πρόσδεσης) ταλίνης-ιντεγκρίνης σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του YMESRADR ή του RGDS



**Εικόνα Α.19.** Απεικόνιση της επίδρασης του YMESRADR ή του RGDS στην συγκαταβύθιση ταλίνης-ιντεγκρίνης. Πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια επωάστηκαν με PBS (A), ή με τον αναστολέα YMESRADR (500 μM) (B), ή με το RGDS (900 μM) για 2 min και ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη 0.2 U/ml για διάφορες χρονικές στιγμές. Έγινε λύση των αιμοπεταλίων στις



παραπάνω χρονικές στιγμές, ακολούθησε φυγοκέντρωση και τα υπερκείμενα ανοσοκαταβυθίστηκαν με anti-CD41. Έγινε ανοσοαποτύπωση των υπερκείμενων με anti-talin (Ai, Bi, Gi), ενώ οι ίδιες μεμβράνες μετά από αποδέσμευση τους ανοσοαποτυπώθηκαν με anti-CD41(Aii, Bii, Gii). Δεξιά με βέλη φαίνονται τα πρότυπα μοριακά βάρη. Δ) Οι πρωτεϊνικές μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν με πυκνομέτρηση (densitometry). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.03$  σε σχέση με τα αιμοπετάλια σε ηρεμία.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Κατά την ενεργοποίηση, η οποία επάγει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, η ιντεγκρίνη και η ταλίνη αλληλεπιδρούν σταδιακά με τον κυτταροσκελετό. Επίσης, παρατηρείται αλληλεπίδραση της ταλίνης με την ιντεγκρίνη, η οποία ισχυροποιείται με τη πάροδο της ενεργοποίησης.
- Το YMESRADR έδειξε να μην αναστέλλει την αλληλεπίδραση της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό ακόμα και στο 4 min της ενεργοποίησης. Παρόμοια δράση εμφάνισε και το RGDS.
- Το YMESRADR έδειξε να μην αναστέλλει την αλληλεπίδραση της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό ακόμα και στο 4 min της ενεργοποίησης. Το ίδιο αποτέλεσμα έδειξε και η επίδραση με τον αναστολέα RGDS.
- Το YMESRADR όπως και το RGDS έδειξαν να καθυστερούν αλλά να μην αναστέλλουν αποφασιστικά την αλληλεπίδραση ταλίνης-ιντεγκρίνης.



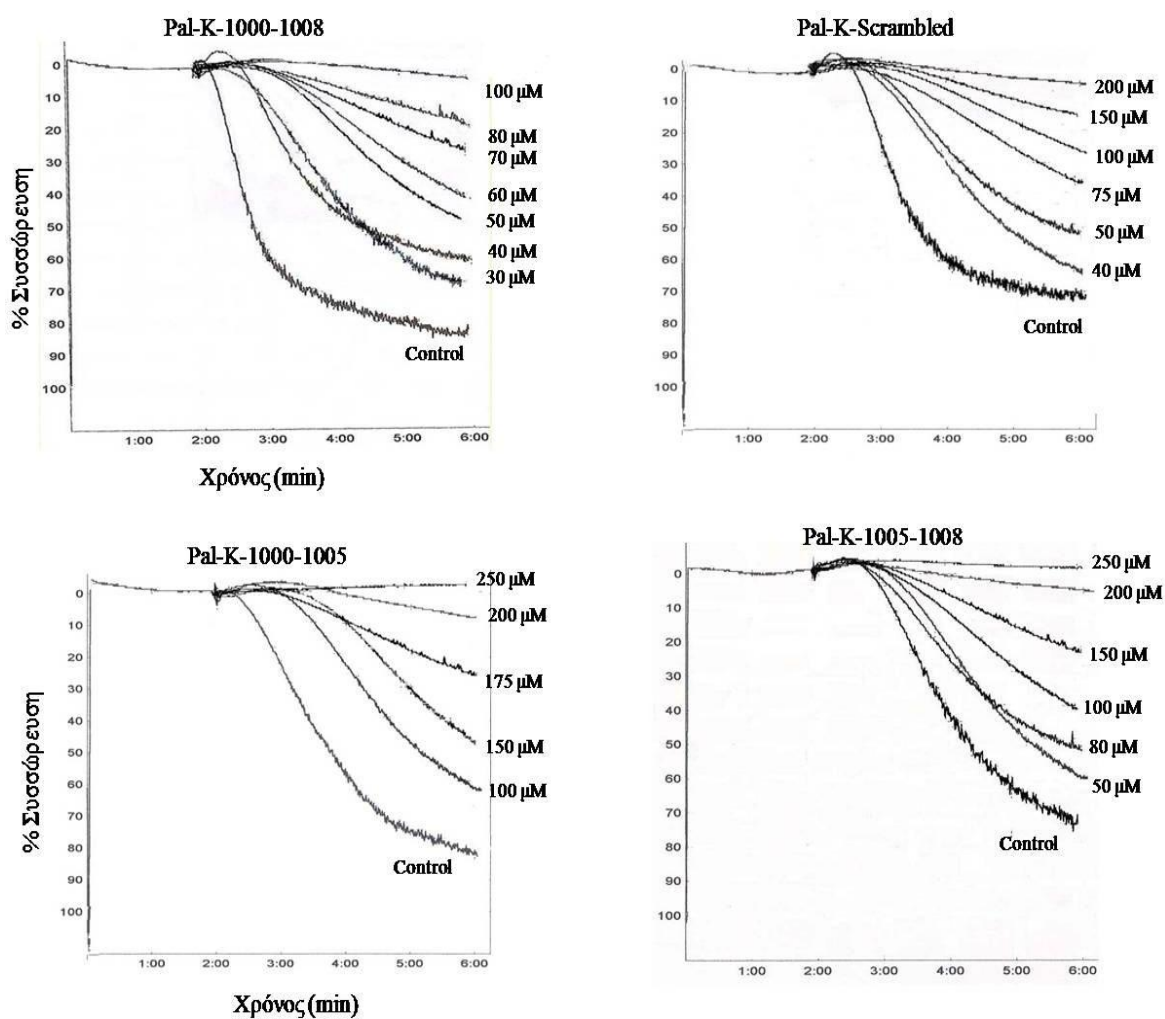
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β

Το όξινο καρβοξύ-τελικό άκρο 1000-1008 της  $\alpha_{\text{IIb}}$  ενδοκυττάριας υπομονάδας ως αναστολέας της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και ενεργοποίησης.

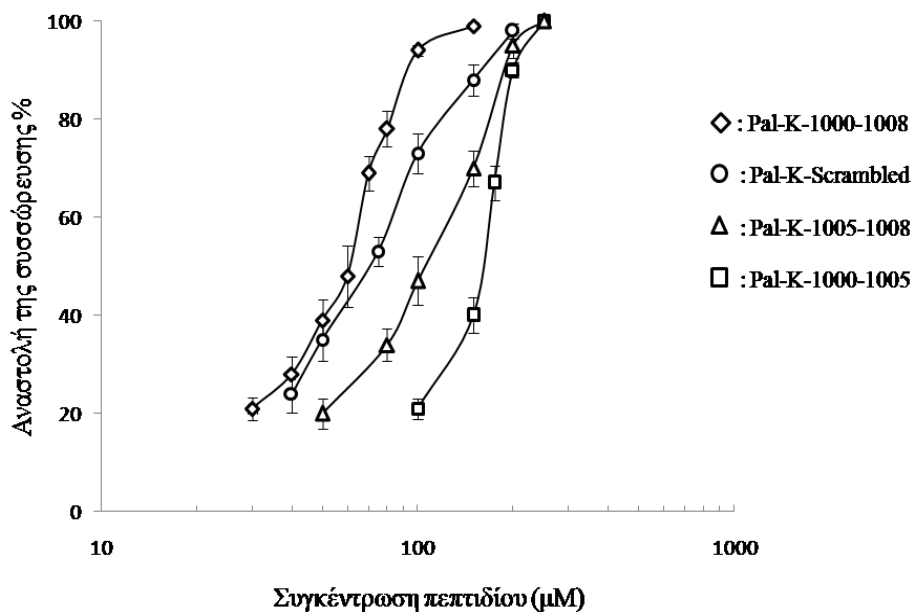
### 1. Οι δομικές προαπαιτήσεις της 1000-1008 αλληλουχίας που είναι υπεύθυνες για τη βιολογική του δράση

Η διερεύνηση των κρίσιμων αμινοξέων της αλληλουχίας  $^{1000}\text{LEEDDEEGE}^{1008}$ , η οποία αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, ξεκίνησε στη μεταπτυχιακή μου διατριβή. Μελετήθηκε το παλμιτοϋλιομένο πεπτίδιο που αντιστοιχεί στη παραπάνω αλληλουχία pal-K-LEEDDEEGE (Pal-1000-1008) ως προς τη δράση του στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Το  $\text{IC}_{50}$  του σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια βρέθηκε ιδιαίτερα χαμηλό, ίσο με 65  $\mu\text{M}$  με αγωνιστή τη θρομβίνη, σε συγκέντρωση 0.2 U/ml και ίσο με 20  $\mu\text{M}$  με αγωνιστή το pal-KVGFFKR, ο οποίος αποδεδειγμένα αποτελεί ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$ . Επίσης μελετήθηκαν τα τροποποιημένα, σε διάφορες θέσεις, με αλανίνη πεπτίδια που αντιστοιχούν στη παραπάνω όξινη καρβοξύ-τελική αλληλουχία: pal-1001/A, pal-1003/A, pal-1004/A και pal-1005/A, το pal-K-GDDEELEE (pal-scrambled) πεπτίδιο (αμινοξέα με ανακατεμένη σειρά) της 1000-1008 αλληλουχίας, και 2 μικρότερες πεπτιδικές αλληλουχίες: pal- $^{1000}\text{LEEDDE}^{1005}$  και pal- $^{1005}\text{EEGE}^{1008}$ , τα οποία αποτελούν τμήματα της όξινης 1000-1008 αλληλουχίας. Τα παραπάνω πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια χρησιμοποιώντας αγωνιστή τη θρομβίνη σε συγκέντρωση 0.2 U/ml. Τα πεπτίδια διαλυτοποιήθηκαν όλα σε DMSO (όπως περιγράφεται στη § 5.1.2.). Ο χρόνος επώασης πριν τη προσθήκη του αγωνιστή ήταν 2 min. Η διαδικασία της συσσώρευσης καταγράφηκε για 4 min.

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προέκυψαν οι δόσοεξαρτώμενες καμπύλες συσσώρευσης των pal-1000-1008, pal-scrambled, pal-1000-1005 και pal-1005-1008, οι οποίες φαίνονται παρακάτω στην εικόνα B.1 καθώς και οι σιγμοειδείς τους καμπύλες για τον υπολογισμό του  $\text{IC}_{50}$  τους, οι οποίες αναπαρίστανται στην εικόνα B.2. Τα  $\text{IC}_{50}$  των πεπτιδίων pal-scrambled, pal-1000-1005 και pal-1005-1008 βρέθηκαν ίσα με 90  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  και 120  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα. Επίσης μελετήθηκαν τα τροποποιημένα με αλανίνη πεπτίδια της 1000-1008 αλληλουχίας στις κρίσιμες συγκεντρώσεις των 100 και 50  $\mu\text{M}$  και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 11.



**Εικόνα Β.1.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσωρευσης αιμοπεταλίων, όπου εμφανίζεται η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων pal-1000-1008, pal-scrambled, pal-1000-1005 ή pal-1005-1008 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε ανθρώπινα πλυμένα αιμοπετάλια. Ο χρόνος επώασης πεπτιδίου – αιμοπεταλίων είναι 2 min πριν τη προσθήκη της θρομβίνης (0.2 U/ml).



**Εικόνα Β.2.** Δοσοεξαρτώμενες σιγμοειδείς καμπύλες αναστολής των πεπτιδίων pal-1000-1008, pal-scrambled, pal-1000-1005 και pal-1005-1008 για τον υπολογισμό των  $\text{IC}_{50}$  των πεπτιδίων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  S.D,  $n=3$ .

**Πίνακας 11.** Ανασταλτική δράση των τροποποιημένων με Α πεπτιδίων που αντιστοιχούν στην  $\alpha_{\text{IIb}}$  1000-1008 αλληλουχία σε πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου με αγωνιστή τη θρομβίνη (0.2 U/ml)

| Πεπτίδιο        | Αλληλουχία<br>αμινοξέων | Συγκέντρωση<br>( $\mu\text{M}$ ) | Αναστολή<br>(%) |
|-----------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Pal-K-1000-1008 | Pal-K-<br>LEEDDEEGE     | 100                              | 95 $\pm$ 5      |
|                 |                         | 50                               | 38 $\pm$ 5      |
| Pal-K-1001/A    | Pal-K-<br>LAEDDEEGE     | 100                              | 84 $\pm$ 5      |
|                 |                         | 50                               | 55 $\pm$ 5      |
| Pal-K-1003/A    | Pal-K-<br>LEEADDEEGE    | 100                              | 90 $\pm$ 5      |
|                 |                         | 50                               | 57 $\pm$ 5      |
| Pal-K-1004/A    | Pal-K-<br>LEEDAEDEGE    | 100                              | 80 $\pm$ 5      |
|                 |                         | 50                               | 49 $\pm$ 5      |
| Pal-K-1005/A    | Pal-K-<br>LEEDDAEAGE    | 100                              | 92 $\pm$ 5      |
|                 |                         | 50                               | 58 $\pm$ 5      |

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

➤ Το συνολικό φορτίο, το μέγεθος αλλά και η πρωτοταγής δομή του πεπτιδίου LEEDDEEGE διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκφραση της ισχυρής ανασταλτικής του δράσης και κανένα από τα αμινοξέα ξεχωριστά δε φαίνεται να ενισχύει τη συνολική αυτή δράση.

➤ Η περαιτέρω μελέτη του πιο δραστικού πεπτιδίου αναστολέα, που αντιστοιχεί στη 1000-1008 αλληλουχία, έγινε στα 100  $\mu\text{M}$ , αφού μετά από έρευνα διαπιστώθηκε ότι σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από τα 100  $\mu\text{M}$ , επηρεάζεται σημαντικά το pH του αιωρήματος των αιμοπεταλίων.

## 2. Η ανασταλτική δράση του pal-K-LEEDDEEGE στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής

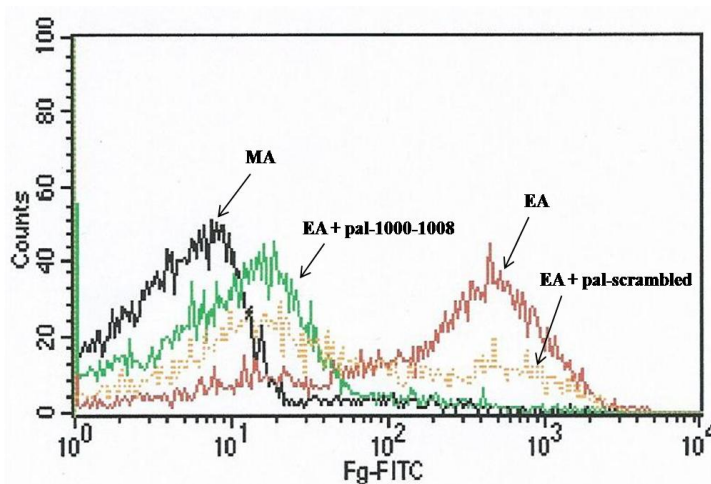
Με βάση τα αποτελέσματα της συσσωρευομετρίας που ανέδειξαν το κρίσιμο ρόλο των αμινοξέων της ενδοκυττάριας αλληλουχίας στην αναστολή της συσώρευσης, ακολούθησε η διερεύνηση του ρόλου της στην αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Έγιναν πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα οποία μελετήθηκε η επίδραση του ενδοκυττάριου πεπτιδίου αναστολέα pal-LEEDDEEGE (pal-1000-1008) στα 100  $\mu\text{M}$  στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση σε σύγκριση με αυτή του pal-GDDELEEEE (pal-scrambled) στην ίδια συγκέντρωση. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια αξιόπιστη μέθοδος, μέσω της οποίας μελετάται η έκφραση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με τη χρήση φθορισμένων αντισωμάτων (όπως περιγράφεται στη § 5.7).

## 2.1. Η επίδραση του pal-K-LEEDDEEGE στη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$

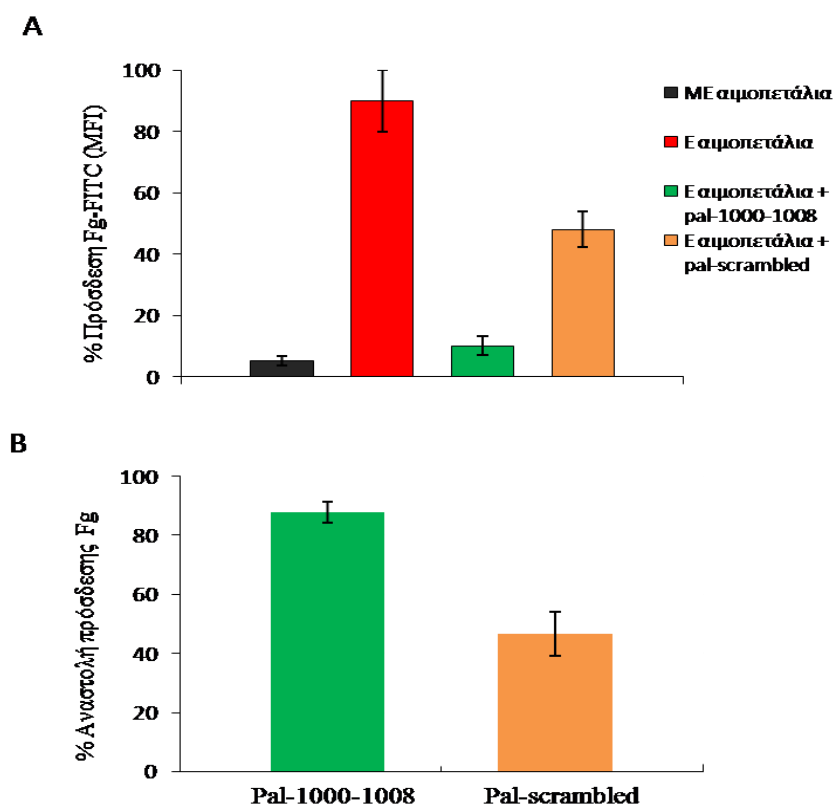
Έγιναν πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα οποία μελετήθηκε η επίδραση του πεπτιδίου αναστολέα pal-1000-1008 στα 100  $\mu$ M στη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη, καθώς και του pal-scrambled στην ίδια συγκέντρωση. Τα αιμοπετάλια (PRP) ενεργοποιήθηκαν με αγωνιστή ADP σε συγκέντρωση 50  $\mu$ M.

**Πίνακας 12.** Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στη πρόσδεση του Fg-FITC στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή τους με αγωνιστή ADP

| Πεπτίδια      | Συγκέντρωση ( $\mu$ M) | Αγωνιστής        | Πρόσδεση Fg-FITC (M.F.I.) | Αναστολή πρόσδεσης Fg-FITC (%) |
|---------------|------------------------|------------------|---------------------------|--------------------------------|
| -             | -                      | -                | 5 $\pm$ 1,5               | -                              |
| -             | -                      | ADP (50 $\mu$ M) | 90 $\pm$ 10               | -                              |
| Pal-1000-1008 | 100                    |                  | 10 $\pm$ 3                | 87 $\pm$ 5                     |
| Pal-scrambled | 100                    |                  | 46 $\pm$ 5                | 45 $\pm$ 7                     |



**Εικόνα Β.3.** Χαρακτηριστική εικόνα κυτταρομετρίας της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην πρόσδεση του Fg-FITC. **MA** (μαύρη γραμμή): μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, **EA** (κόκκινη γραμμή): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ADP, **EA + pal-scrambled** (πορτοκαλί γραμμή): Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + pal-scrambled (100  $\mu$ M), **EA + pal-1000-1008**: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + pal-1000-1008 (100  $\mu$ M).



**Εικόνα B.4. A.** Μέση ένταση φθορισμού της πρόσδεσης του Fg-FITC σε μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (PRP) υπό την επίδραση του pal-1000-1008 ή του pal-scrambled στα 100  $\mu$ M. ΜΕ αιμοπετάλια: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ADP. **B.** Αναστολή της πρόσδεσης του φθορισμένου ινωδογόνου σε ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια από τα πεπτιδικά ανάλογα.

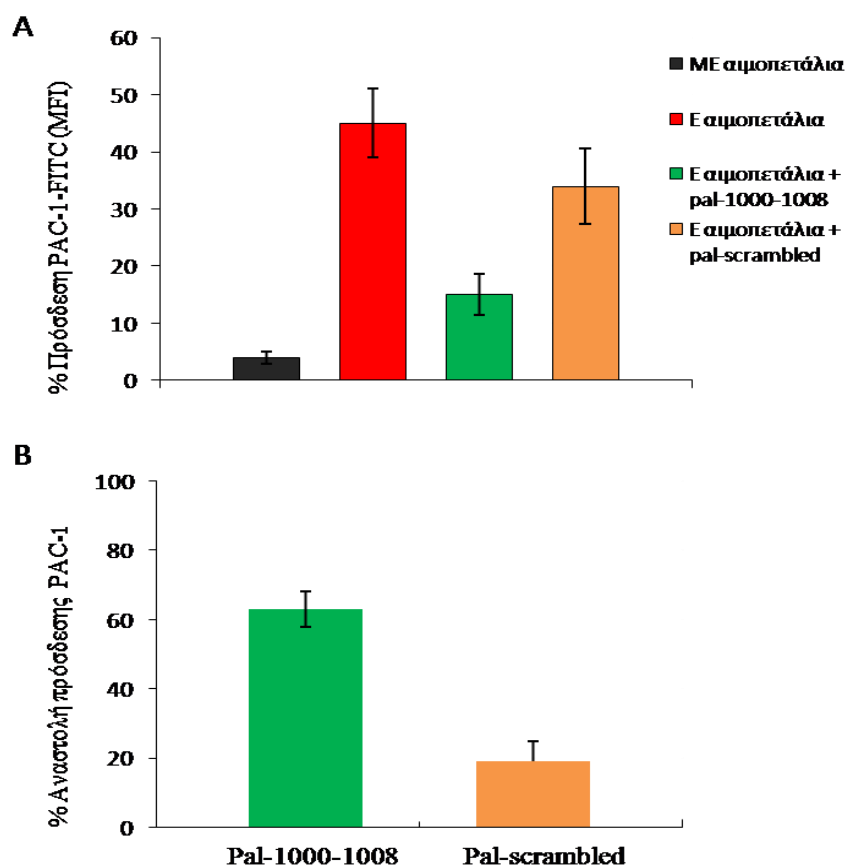
## 2.2. Η επίδραση του pal-K-LEEDDEEGE στην έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης

Έγιναν πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα οποία μελετήθηκε η επίδραση του pal-1000-1008 στα 100  $\mu$ M και του pal-scrambled στην ίδια συγκέντρωση, στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  όπως εκφράζεται με τη πρόσδεση του PAC-1 σε αυτήν. Τα αιμοπετάλια (PRP) ενεργοποιήθηκαν με αγωνιστή ADP σε συγκέντρωση 50  $\mu$ M.

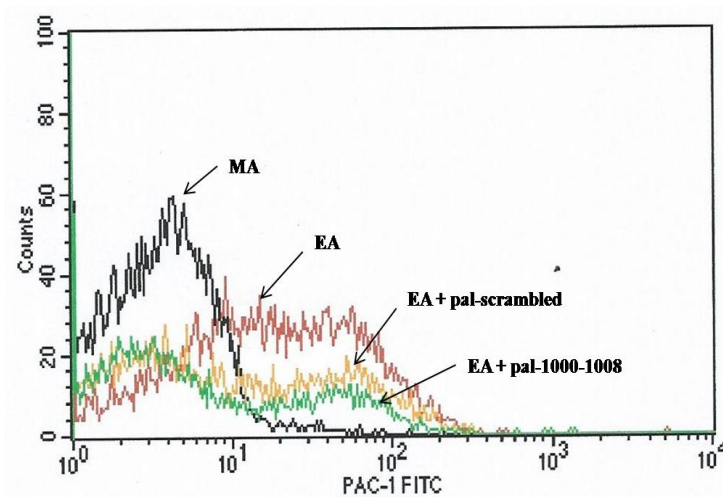


**Πίνακας 13.** Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στην έκφραση του PAC-1 στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή τους με αγωνιστή ADP

| Πεπτίδια      | Συγκέντρωση (μM) | Αγωνιστής      | Έκφραση PAC-1-FITC (M.F.I.) | Αναστολή έκφρασης PAC-1-FITC (%) |
|---------------|------------------|----------------|-----------------------------|----------------------------------|
| -             | -                | -              | 4±1                         | -                                |
| -             | -                | ADP<br>(50 μM) | 45±7                        | -                                |
| Pal-1000-1008 | 100              |                | 15±5                        | 63±5                             |
| Pal-scrambled | 100              |                | 33±4                        | 18±6                             |



**Εικόνα Β.5. Α.** Μέση ένταση φθορισμού της πρόσδεσης του PAC-1-FITC σε μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (PRP) υπό την επίδραση του pal-1000-1008 ή του pal-scrambled στα 100 μM. ΜΕ αιμοπετάλια: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ADP. **Β.** Αναστολή της πρόσδεσης του αντισώματος PAC-1 στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ενεργοποιημένων, με ADP, αιμοπεταλίων από τα πεπτιδικά ανάλογα.



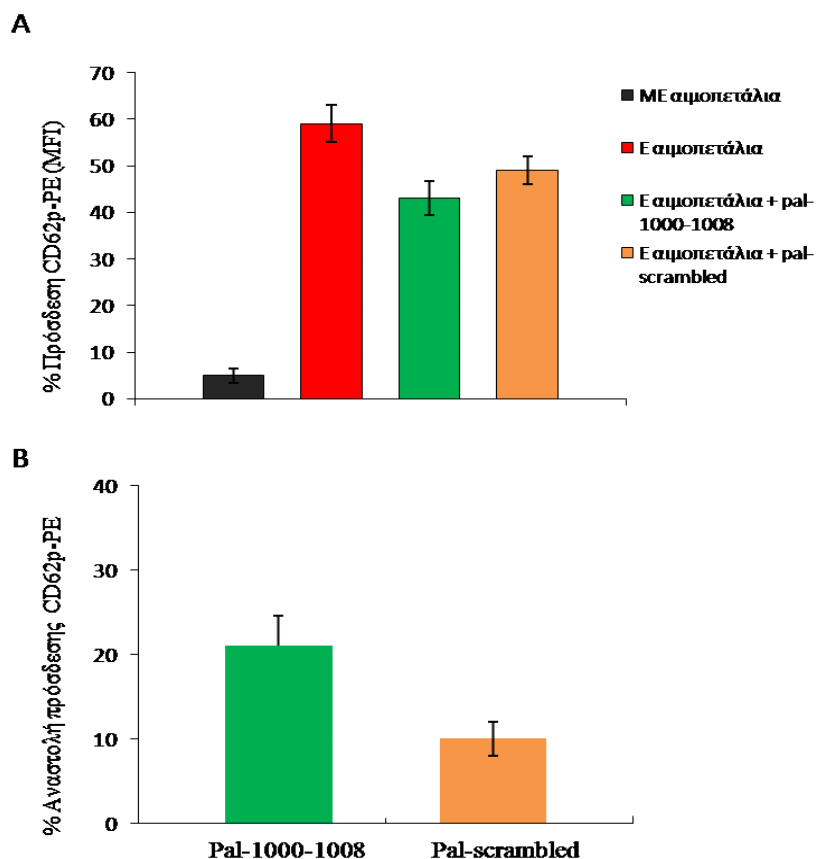
**Εικόνα Β.6.** Χαρακτηριστική εικόνα κυτταρομετρίας της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην έκφραση του υποδοχέα (έκφραση PAC-1). **MA** (μαύρη γραμμή): μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, **EA** (κόκκινη γραμμή): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ADP, **EA + pal-1000-1008** (πράσινη γραμμή): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + pal-1000-1008 (100  $\mu$ M), **EA + pal-scrambled** (πορτοκαλί γραμμή): Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + pal-scrambled (100  $\mu$ M).

### 2.3. Η επίδραση του pal-K-LEEDDEEGE στην έκφραση της P-σελεκτίνης

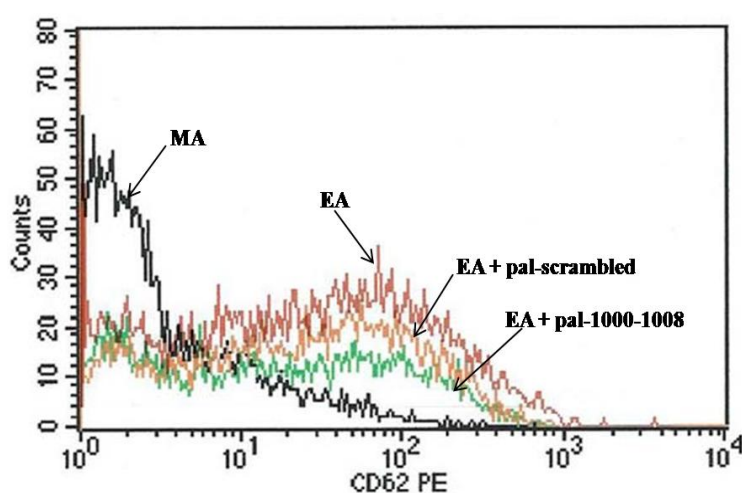
Έγιναν πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα οποία μελετήθηκε η επίδραση του pal-1000-1008 στα 100  $\mu$ M και του pal-scrambled στην ίδια συγκέντρωση στην έκφραση της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης. Τα αιμοπετάλια (PRP) ενεργοποιήθηκαν με αγωνιστή ADP σε συγκέντρωση 50  $\mu$ M.

**Πίνακας 14.** Ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στην έκφραση της p-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή τους με αγωνιστή ADP.

| Πεπτίδια      | Συγκέντρωση ( $\mu$ M) | Αγωνιστής        | Έκφραση CD62p-PE (M.F.I.) | Αναστολή έκφρασης CD62p-PE(%) |
|---------------|------------------------|------------------|---------------------------|-------------------------------|
| -             | -                      | -                | 6 $\pm$ 1,5               | -                             |
| -             | -                      | ADP (50 $\mu$ M) | 59 $\pm$ 4                | -                             |
| Pal-1000-1008 | 100                    |                  | 40 $\pm$ 3                | 21 $\pm$ 4                    |
| Pal-scrambled | 100                    |                  | 46 $\pm$ 3                | 10 $\pm$ 2                    |



**Εικόνα B.7. Α.** Μέση ένταση φθορισμού της πρόσδεσης της CD62p-PE σε μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (PRP) υπό την επίδραση του pal-1000-1008 ή του pal-scrambled στα 100  $\mu$ M. ME αιμοπετάλια: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ADP. **Β.** Αναστολή της έκφρασης της Ρ-σελεκτίνης στην επιφάνεια ενεργοποιημένων, με ADP, αιμοπεταλίων από τα πεπτιδικά ανάλογα.



**Εικόνα B.8.** Χαρακτηριστική εικόνα κυτταρομετρίας της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην έκφραση της Ρ-σελεκτίνης (έκφραση CD62P). **MA:** μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, **EA:** ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ADP, **EA + pal-scrambled:** ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + pal-

scrambled (100  $\mu$ M), **EA + pal-1000-1008**: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + pal-1000-1008 (100  $\mu$ M).

#### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Το pal-1000-1008 ανέστειλε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, αφού ανέστειλε σχεδόν εξολοκλήρου τη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  έπειτα από ενεργοποίηση με ADP. Το pal-scrambled αντίθετα, στην ίδια συγκέντρωση, εμφάνισε μια σημαντικά μειωμένη ανασταλτική δράση στη πρόσδεση του ινωδογόνου.
- Το pal-1000-1008, έδειξε να αναστέλλει σημαντικά την έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης με την αναστολή πρόσδεσης του PAC-1, έπειτα από ενεργοποίηση με ADP. Το pal-scrambled αντίθετα, στην ίδια συγκέντρωση, εμφάνισε μια σημαντικά μειωμένη ανασταλτική δράση στην έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης.
- Το pal-1000-1008 εμφάνισε μια σημαντικά μειωμένη επίδραση στην έκκριση των  $\alpha$ -κοκκίων των αιμοπεταλίων, αφού ανέστειλε σε μικρό βαθμό την έκφραση της p-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια έπειτα από ενεργοποίηση με ADP. Ακόμα πιο μειωμένη δράση εμφάνισε το pal-scrambled.

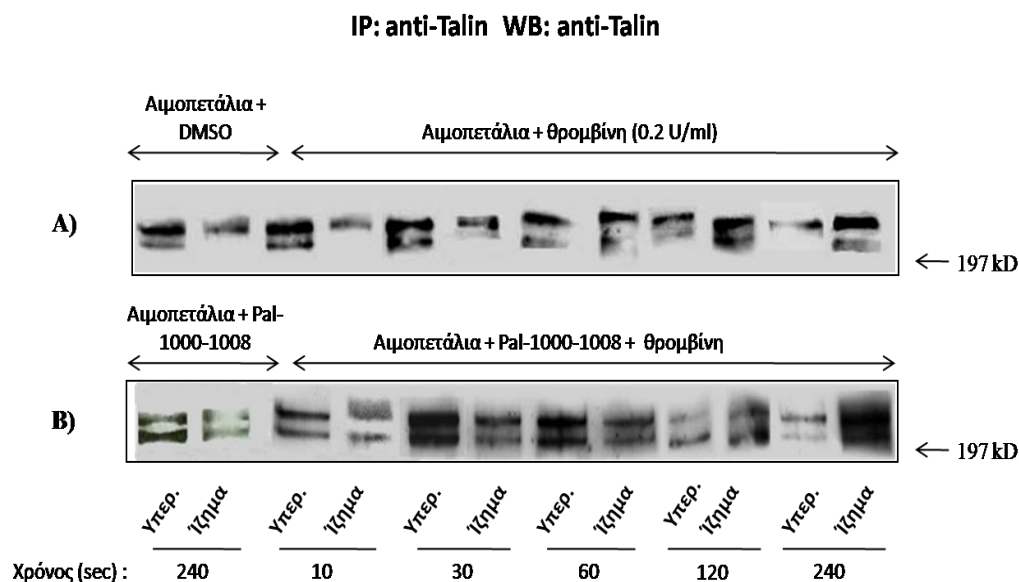
### 3. Η επίδραση του pal-K-LEEDDEEGE στην ‘μέσα-έξω’ δομική ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$

Έπειτα από την επιβεβαίωση της ανασταλτικής δράσης του ενδοκυττάριου πεπτιδίου στην ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, επόμενος στόχος μας ήταν η διερεύνηση του ρόλου του στη πρόσδεση της ταλίνης με την  $\beta_3$  υπομονάδα, τη πρόσδεση της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό και τέλος τη πρόσδεση της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό, στάδια τα οποία είναι καθοριστικά και απαραίτητα με βάση τη βιβλιογραφία για την ‘μέσα-έξω’ βιοσηματοδότηση της ιντεγκρίνης.

Δείγματα πλυμένων αιμοπεταλίων επωάστηκαν με το πεπτίδιο αναστολέα pal-1000-1008 ή το pal-scrambled σε συγκέντρωση 100μM και επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοκαταβύθισης (IP) και ανοσοαποτύπωσης (WB) (όπως περιγράφεται στη § 5.3, 5.4). Στα παραπάνω δείγματα, μελετήθηκε η *οπτική ή μη* πρόσδεση της ταλίνης ή της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό καθώς και της ταλίνης με την ιντεγκρίνη (όπως περιγράφεται στη σελ.182-184).

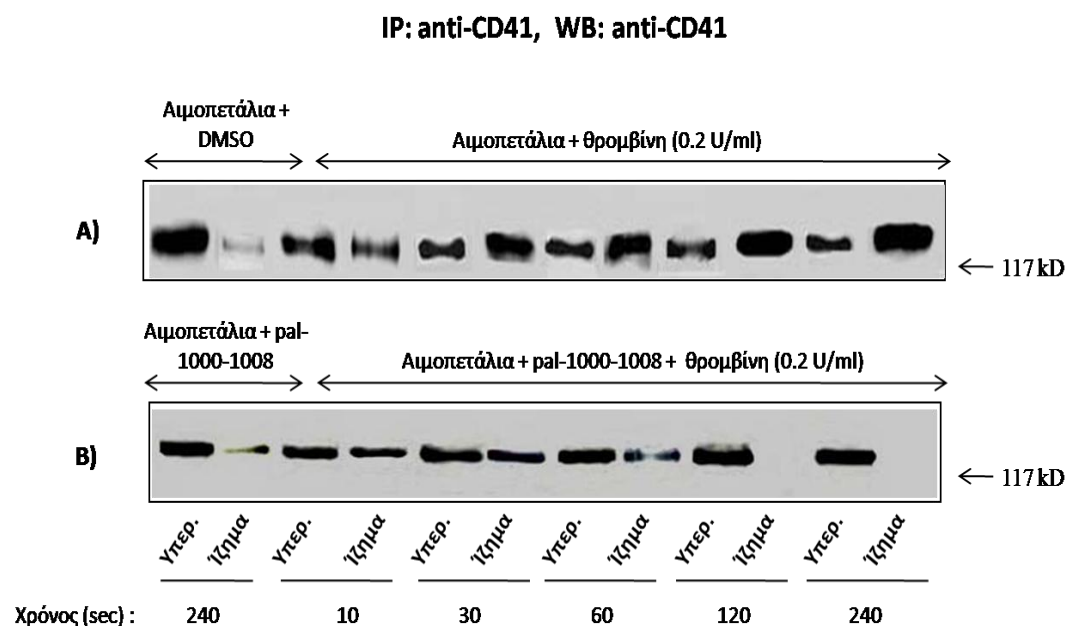
Όλη η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές χρονικές στιγμές δράσης του pal-1000-1008 όπως τα 10 sec, 0.5 min, 1 min, 2 min και 4 min, ενώ για το pal-scrambled στα 4 min. Εν συντομία, αιμοπετάλια επωάστηκαν με ή χωρίς τον αναστολέα για 2 min, αμέσως ακολούθησε ενεργοποίησή τους με θρομβίνη (0.2 U/ml) και η ενεργοποίηση διακόπηκε με ήπιο διάλυμα λύσεως στις παραπάνω χρονικές στιγμές αντίστοιχα. Παρακάτω φαίνονται αντιπροσωπευτικά φιλμ όπως αυτά προκύπτουν από την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά την επώασή τους με τα αντισώματα.

### 3.1. Κινητική κατανομή της ταλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του pal-K-LEEDDEEGE



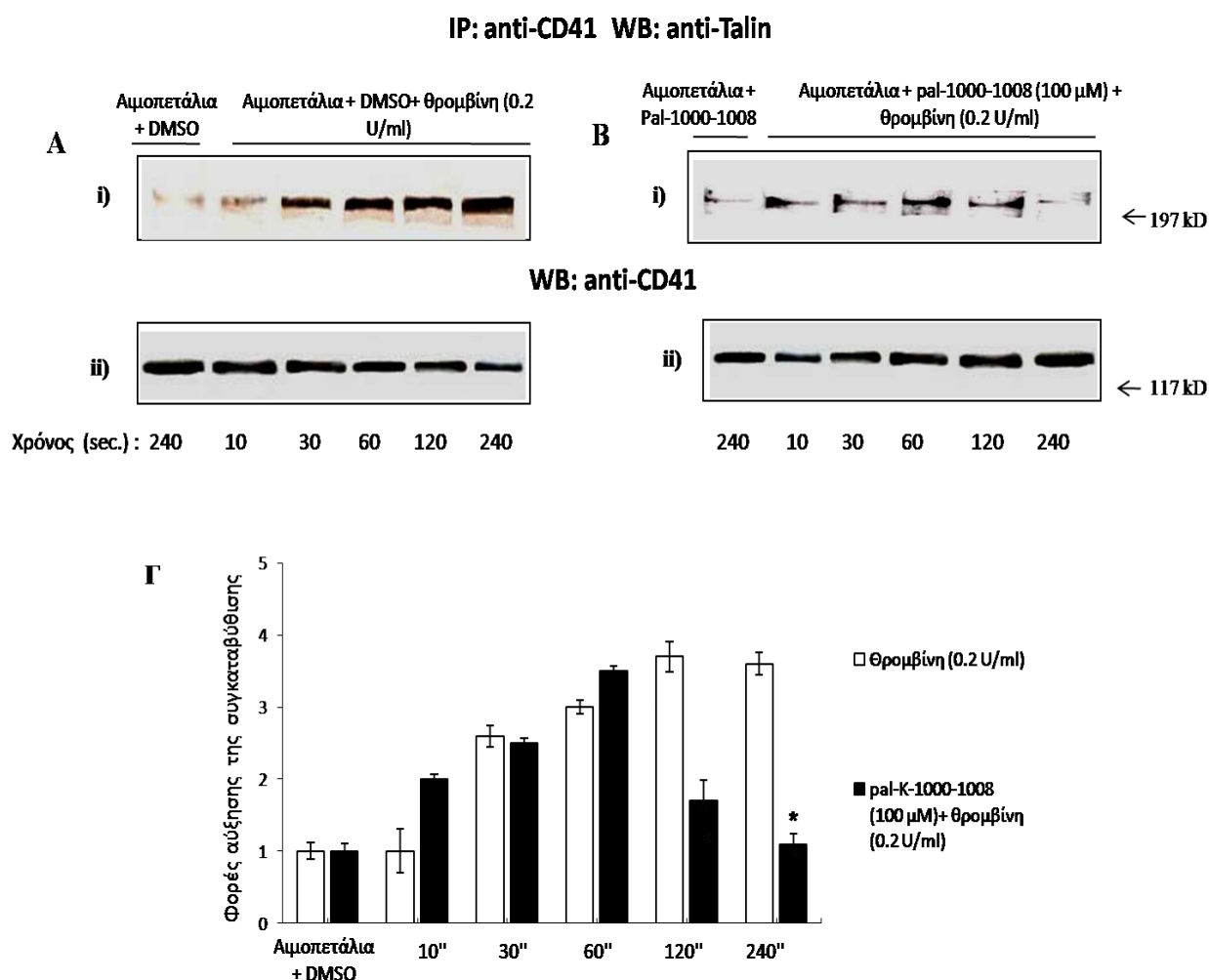
**Εικόνα Β.9.** Απεικόνιση της κατανομής της ταλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με DMSO (A) ή με pal-1000-1008 (100  $\mu$ M) (B) για 2 min, έπειτα ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη και ακολούθησε η λύση τους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ενεργοποίησης (sec). Μετά από φυγοκέντρηση τους, τα κυτταροπλάσματα (υπερκείμενα) ανοσοκαταβυθίστηκαν με anti-CD41 και ανοσοαποτυπώθηκαν όπως και τα ιζήματα με anti-CD41. Δεξιά με βέλη φαίνονται τα πρότυπα μοριακά βάρη.

### 3.2. Κινητική κατανομή της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του pal-K-LEEDDEEGE



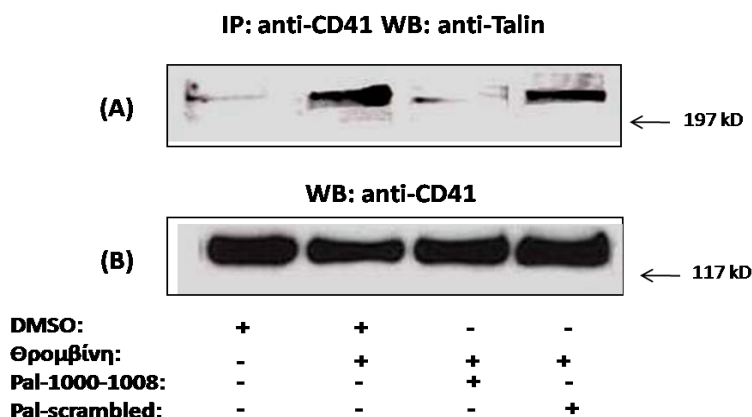
**Εικόνα Β.10.** Απεικόνιση της κατανομής της ιντεγκρίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με DMSO (A) ή με pal-1000-1008 (100  $\mu$ M) (B) για 2 min, έπειτα ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη και ακολούθησε η λύση τους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ενεργοποίησης (sec). Μετά από φυγοκέντρηση τους, τα κυτταροπλάσματα (υπερκείμενα) ανοσοκαταβυθίστηκαν με anti-CD41 και ανοσοαποτυπώθηκαν όπως και τα ιζήματα με anti-CD41. Δεξιά με βέλη φαίνονται τα πρότυπα μοριακά βάρη.

### 3.3. Κινητική μελέτη της αλληλεπίδρασης ταλίνης-ιντεγκρίνης σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του pal-K-LEEDDEEGE ή του pal-scrambled



**Εικόνα B.11.** Απεικόνιση της επίδρασης του Pal-1000-1008 στην συγκαταβύθιση ταλίνης-ιντεγκρίνης. Πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια επωάστηκαν με DMSO (A) ή με τον αναστολέα Pal-1000-1008 (B) για 2 min και ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη 0.2 U/ml για διάφορες χρονικές στιγμές. Έγινε λύση των αιμοπεταλίων στις παραπάνω χρονικές στιγμές, ακολούθησε φυγοκέντρηση και τα κυτταροπλάσματα (υπερκείμενα) ανοσοκαταβυθίστηκαν με anti-CD41 (Ai και Bi). Έγινε ανοσοαποτύπωση των υπερκείμενων με anti-talin, ενώ οι ίδιες μεμβράνες ανοσοαποτυπώθηκαν με anti-CD41 για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων (Aii και Bii). Δεξιά με βέλη φαίνονται τα πρότυπα μοριακά βάρη. Οι πρωτεϊνικές μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν με πυκνομέτρηση (Γ). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.001$  σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.



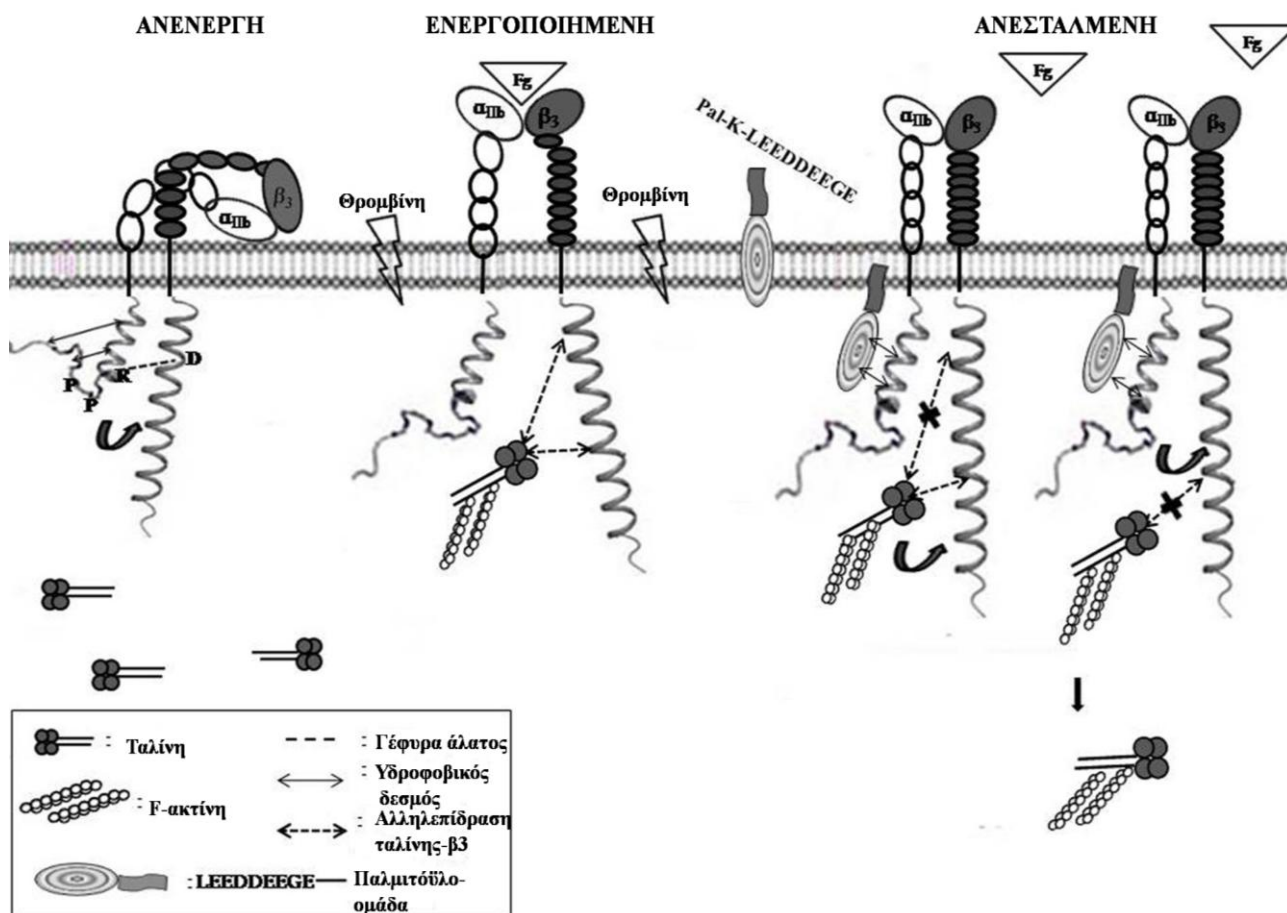


**Εικόνα B.12.** Σύγκριση της επίδρασης του pal-1000-1008 και pal-scrambled στην αλληλεπίδραση ταλίνης-ιντεγκρίνης. Πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν με DMSO, 100  $\mu$ M pal-1000-1008 ή pal-scrambled για 2 min και ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη (0.2 U/ml) για 4 min. Τα κυτταροπλάσματα των παραπάνω δειγμάτων ανοσοκαταβύθιστηκαν με anti-CD41 και ανοσοαποτυπώθηκαν με anti-talin. Η ίδια μεμβράνη ανοσοαποτυπώθηκε με anti-CD41 για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. Δεξιά με βέλη φαίνονται τα πρότυπα μοριακά βάρη.

#### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Κατά την ενεργοποίηση, η οποία επάγει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, η ιντεγκρίνη και η ταλίνη αλληλεπιδρούν σταδιακά με τον κυτταροσκελετό. Επίσης, παρατηρείται αλληλεπίδραση της ταλίνης με την ιντεγκρίνη, η οποία ισχυροποιείται με τη πάροδο της ενεργοποίησης.
- Το pal-1000-1008 δεν ανέστειλε την πρόσδεση της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό, όμως ανέστειλε ολοκληρωτικά την πρόσδεση της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό από το δεύτερο λεπτό της ενεργοποίησης και έπειτα.
- Η αλληλεπίδραση ταλίνης-ιντεγκρίνης, υπό τη δράση του pal-1000-1008, φαίνεται να διαταράσσεται από το δεύτερο λεπτό της ενεργοποίησης και αναστέλλεται πλήρως στο τέταρτο λεπτό. Αντίθετα, το pal-scrambled στην ίδια συγκέντρωση με το pal-1000-1008 δεν κατάφερε να αναστείλει την παραπάνω αλληλεπίδραση ούτε στο τέταρτο λεπτό της ενεργοποίησης.

Τέλος, τα αποτελέσματα της μελέτης της δράσης του ενδοκυττάριου πεπτιδίου αναστολέα pal-LEEDDEEGE συνοψίζονται στο παρακάτω σχήμα:



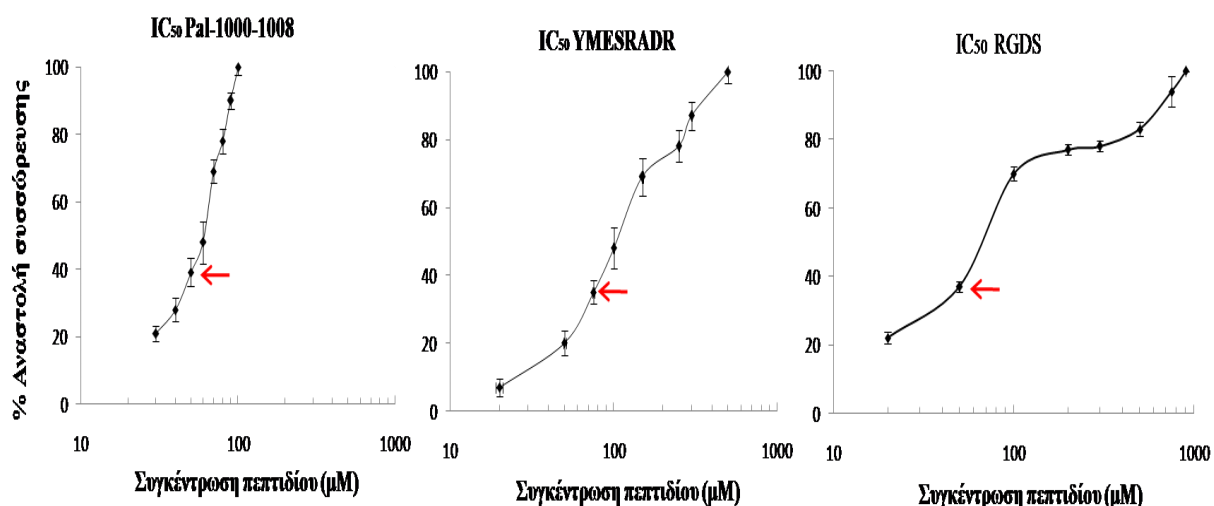
**Εικόνα Β.13.** Σχηματικό μοντέλο του προτεινόμενου μηχανισμού δράσης του ενδοκυττάριου αναστολέα pal-K-LEEDDEEGE στη πρόσδεση της ταλίνης στον υποδοχέα  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , αλλά και τη πρόσδεση του με τον κυτταροσκελετό. Ο υποδοχέας βρίσκεται στην ανενεργή του μορφή λόγω των υδρόφοβων, ηλεκτροστατικών και στερικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του κοντινού στη μεμβράνη KVGFFKR κυτταροπλασματικού  $\alpha_{IIb}$  τμήματος και του απόμακρου LEEDDEEGE κυτταροπλασματικού άκρου. Επίσης η  $\beta_3$  υπομονάδα ενώνεται με την  $\alpha_{IIb}$  μέσω μιας γέφυρας άλατος μεταξύ του  $\beta_3 D^{723}$  και της  $\alpha_{IIb} R^{995}$ . Με την επίδραση της θρομβίνης, ο υποδοχέας ενεργοποιείται, ανοίγουν τα κυτταροπλασματικά του άκρα, η προσδεσμένη με τον κυτταροσκελετό, ταλίνη προσδένεται στη  $\beta_3$  υπομονάδα και πυροδοτείται η ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση. Το πεπτίδιο αναστολέας φαίνεται να συναγωνίζεται το απόμακρο τμήμα της  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδας ως προς τη σύνδεση του με τη KVGFFKR περιοχή, να επαναφέρει τον υποδοχέα στην ανενεργό του μορφή και να επιφέρει την απομάκρυνση της ταλίνης από τη  $\beta_3$  υπομονάδα [377].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

Η συνεργιστική ανασταλτική δράση των pal-K-LEEDDEEGE και YMESRADR στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση και ενεργοποίηση.

### 1. Η διερεύνηση για την εύρεση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης του pal-LEEDDEEGE και YMESRADR στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση

Μετά τον υπολογισμό των  $IC_{50}$  των προερχόμενων από την  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδα πεπτιδίων αναστολέων, σκοπός μας ήταν να εξεταστεί η τυχόν ύπαρξη συνεργατικότητας τους στις κρίσιμες συγκεντρώσεις έναρξης της ανασταλτικής τους δράσης. Έγινε επώαση των δύο αναστολέων σε διάφορες συγκεντρώσεις, μικρότερες από το  $IC_{50}$  τους, για να βρεθεί η μέγιστη συνεργιστική δράση ως προς την αναστολή της συσσώρευσης. Στον παρακάτω πίνακα 15 φαίνονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις διαφορετικές δοκιμές επώασης του κάθε πεπτιδίου ξεχωριστά, σε συγκεντρώσεις μικρότερες από το  $IC_{50}$  τους ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δοκιμές επώασης και των δύο πεπτιδίων αναστολέων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κατωφλίου τους ως προς την αναστολή.



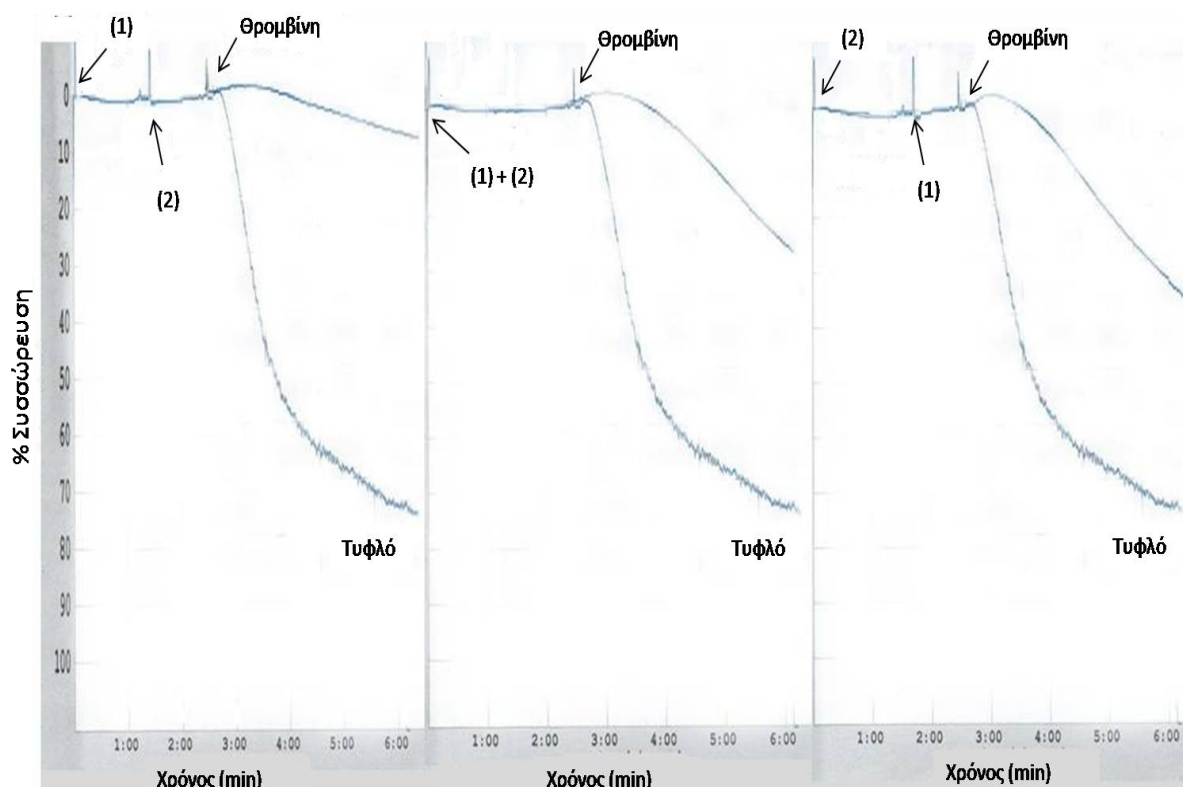
**Εικόνα Γ.1.** Σιγμοειδείς καμπύλες της αναστολής της συσσώρευσης των πεπτιδίων αναστολέων. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τη συγκέντρωση κατωφλίου ως προς την αναστολή του κάθε πεπτιδίου.

**Πίνακας 15.** Η ανασταλτική δράση του ενδοκυττάριου ή εξωκυττάριου αναστολέα καθώς και η συνεργιστική ανασταλτική τους δράση, ως προς την αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων ανθρώπινων αιμοπεταλίων

|                     | Συγκέντρωση (μM) |          | Αναστολή (%) |
|---------------------|------------------|----------|--------------|
|                     | Pal-K-LEEDDEEGE  | YMESRADR |              |
| Θρομβίνη (0.2 U/ml) | 50               | -        | 33           |
|                     | 30               | -        | 21           |
|                     | -                | 75       | 34           |
|                     | -                | 50       | 20           |
|                     | 50               | 75       | <b>95</b>    |
|                     | 50               | 50       | 45           |
|                     | 30               | 75       | 70           |
|                     | 30               | 50       | 39           |

Έπειτα από δοκιμές σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κατωφλίου ως προς την αναστολή των δύο πεπτιδίων-αναστολέων, βρέθηκαν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις, οι οποίες επιφέρουν σχεδόν 100% αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Από τον παραπάνω πίνακα η συγκέντρωση του ενδοκυττάριου αναστολέα είναι τα 50 μM, ενώ του εξωκυττάριου τα 75 μM. Αυτές οι συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν στην περεταίρω μελέτη της συνεργιστικής τους δράσης.

Εκτός από τις συγκεντρώσεις, θέλαμε να δούμε αν παίζει ρόλο i) η σειρά επώασης των αναστολέων καθώς και ii) ο χρόνος δράσης τους. Έτσι, τους δοκιμάσαμε με διαφορετική σειρά και διαφορετικό χρόνο επώασης όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.2. Η επώαση τους έγινε είτε με διαφορετική διαδοχική σειρά προσθήκης, δηλαδή πρώτα το ενδοκυττάριο και μετά το εξωκυττάριο ή και αντίστροφα, είτε ταυτόχρονα, πριν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ο χρόνος επώασης τους ήταν από 1 έως 2 min πριν τη προσθήκη του αγωνιστή. Στην εικόνα Γ.2. αναπαρίστανται οι συσσωρεύσεις που προκύπτουν από τη διαφορετική σειρά επώασης τους.



**Εικόνα Γ.2.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσώρευσης ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων με 0.2 U/ml θρομβίνη και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων υπό την επίδραση του πεπτιδίου Pal-K-LEEDDEEGE (1) στα 50  $\mu$ M και του πεπτιδίου YMESRADR (2) στα 75  $\mu$ M με διαφορετική σειρά επώασης.

Η μέγιστη ανασταλτική συνεργιστική δράση προέκυψε από την διαδοχική επώαση των αιμοπεταλίων πρώτα με τον ενδοκυττάριο και έπειτα από 1 min με τον εξωκυττάριο αναστολέα. Στα 2 min συνολικής επώασης, ακολούθησε ενεργοποίηση με 0.2 U/ml θρομβίνη και η ενεργοποίηση καταγράφηκε για 4 min.

Επίσης, στη θέση του εξωκυττάριου αναστολέα δοκιμάστηκε το προσδεματομimητικό πεπτίδιο RGDS στην συγκέντρωση κατωφλίου ως προς την αναστολή, η οποία είναι τα 50  $\mu$ M και τέλος δοκιμάστηκε το πεπτίδιο RGDS, στην προαναφερθείσα συγκέντρωση, μαζί με το YMESRADR για τη διερεύνηση πιθανής αθροιστικής δράσης. Τα αποτελέσματα των παραπάνω δοκιμών αναπαρίστανται στον πίνακα 16.

**Πίνακας 16.** Η ανασταλτική δράση που προέκυψε από το συνδυασμό του ενδοκυττάριου pal-LEEDDEEGE με τον εξωκυττάριο αναστολέα YMESRADR ή με τον RGDS και του YMESRADR με τον RGDS, στις συγκεντρώσεις κατωφλίου τους ως προς την αναστολή.

|               | Χρόνος προσθήκης                   |                    |                     | Συσώρευση (%) | Αναστολή (%) |
|---------------|------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------|--------------|
|               | 0 min                              | 1 min              | 2 min               |               |              |
| Πεπτίδιο (μM) | YMESRADR (75)                      | Pal-LEEDDEEGE (50) | Θρομβίνη (0.2 U/ml) | 40            | 52           |
|               | Pal-LEEDDEEGE (50)                 | YMESRADR (75)      |                     | 6             | <b>95</b>    |
|               | Pal-LEEDDEEGE (50) + YMESRADR (75) | -                  |                     | 35            | 57           |
|               | Pal-LEEDDEEGE (50)                 | RGDS (50)          |                     | 25            | 68           |
|               | RGDS (50)                          | Pal-LEEDDEEGE (50) |                     | 33            | 60           |
|               | Pal-LEEDDEEGE (50) + RGDS (50)     | -                  |                     | 31            | 62           |
|               | YMESRADR (75)                      | RGDS (50)          |                     | 45            | 45           |
|               | RGDS (50)                          | YMESRADR (75)      |                     | 45            | 45           |
|               | YMESRADR (75) + RGDS (50)          | -                  |                     | 50            | 38           |

[Οι παραπάνω τιμές αποτελούν το μέσο όρο που προέκυψε από 4 διαφορετικά πειράματα]

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι η προσθήκη πρώτα του pal-LEEDDEEGE και έπειτα η προσθήκη του YMESRADR, στις κατωφλικές τους συγκεντρώσεις, επιφέρει σχεδόν 100% , ανασταλτική δράση. Οποιοσδήποτε άλλος συνδυασμός αναστολέων με διαφορετική σειρά προσθήκης τους δεν επιφέρει παρόμοιο αποτέλεσμα.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Η σειρά προσθήκης των αναστολέων στα αιμοπετάλια, πριν από την ενεργοποίησή τους, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.
- Ο συνδυασμός του pal-LEEDDEEGE με το RGDS, στις συγκεντρώσεις κατωφλίου ως προς την αναστολή, προκαλεί μικρότερη ανασταλτική δράση από αυτή που προκαλεί ο pal-LEEDDEEGE με το YMESRADR.
- Η επώαση του YMESRADR με το RGDS δε φαίνεται να προκαλεί αθροιστική δράση ως προς την αναστολή της συσσώρευσης.

## 2. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης του Pal-LEEDDEEGE και του YMESRADR στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής

Επόμενο βήμα ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της συνεργιστικής δράσης των δύο αναστολέων ως προς την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση με πειράματα κυτταρομετρίας ροής. Σε αυτά τα πειράματα μελετήθηκε α) η πρόσδεση του φθορισμένου ινωδογόνου (Fg-FITC) στην ιντεγκρίνη, β) η έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης (PAC-1) και γ) η μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης (CD62p-PE).

Αιμοπετάλια (PRP) επώστηκαν πρώτα με τον ενδοκυττάριο αναστολέα pal-LEEDDEEGE (pal-1000-1008) σε συγκέντρωση 50  $\mu$ M, 1 λεπτό αργότερα ακολούθησε επώαση με τον εξωκυττάριο αναστολέα YMESRADR σε συγκέντρωση 75  $\mu$ M και στο 2 λεπτό συνολικής επώασης, ακολούθησε ενεργοποίηση με τον αγωνιστή TRAP-14 σε συγκέντρωση 50  $\mu$ m. Η ενεργοποίηση διήρκεσε 5 λεπτά και ακολούθησε αμέσως ανάλυση στο κυτταρόμετρο. Οι πειραματικές συνθήκες των πειραμάτων της συσσωρευομετρίας και της κυτταρομετρίας ροής (σειρά και χρόνος επώασης των

αναστολέων) ήταν οι ίδιες. Επίσης η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και με τον RGDS αναστολέα, τα αποτελέσματα του οποίου χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρο σύγκρισης.

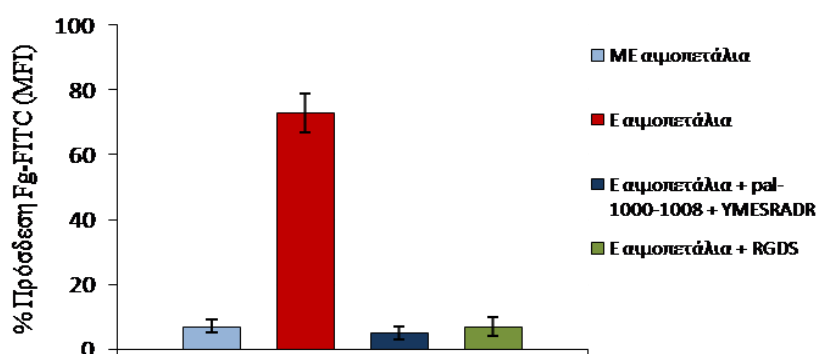
## 2.1. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης των αναστολέων στη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

**Πίνακας 17.** Συνεργιστική ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στη πρόσδεση του Fg-FITC στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή τους με αγωνιστή TRAP-14.

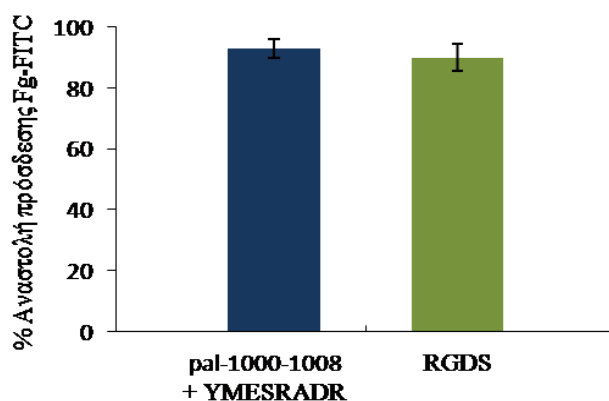
| Πεπτίδια                 | Συγκέντρωση (μM) | Αγωνιστής       | Πρόσδεση Fg-FITC (M.F.I.) | Αναστολή πρόσδεσης Fg-FITC (%) |
|--------------------------|------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------------|
| -                        | -                | -               | 7±2                       | -                              |
| -                        | -                | TRAP-14 (50 μM) | 73±6                      | -                              |
| Pal-1000-1008 + YMESRADR | 50 + 75          |                 | 5±2                       | 93±3                           |
| RGDS                     | 900              |                 | 7±3                       | 90±5                           |



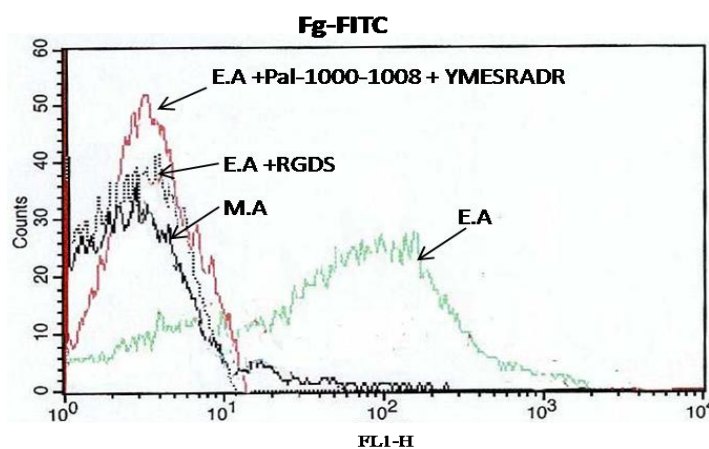
A



B



**Εικόνα Γ.3. Α.** Μέση ένταση φθορισμού της πρόσδεσης του Fg-FITC σε ME, Ε αιμοπετάλια (PRP), Ε αιμοπετάλια υπό την επίδραση του pal-1000-1008 (50  $\mu$ M) + YMESRADR (75  $\mu$ M) ή του RGDS (900  $\mu$ M). ME αιμοπετάλια: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14. **Β.** Αναστολή της πρόσδεσης του φθορισμένου ινωδογόνου σε ενεργοποιημένα με TRAP-14 αιμοπετάλια από τα πεπτιδικά ανάλογα



**Εικόνα Γ.4.** Χαρακτηριστική εικόνα κυταρομετρίας της συνεργιστικής ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην πρόσδεση του Fg-FITC. **ΜΑ** (μαύρη γραμμή): μη ενεργοποιημένα

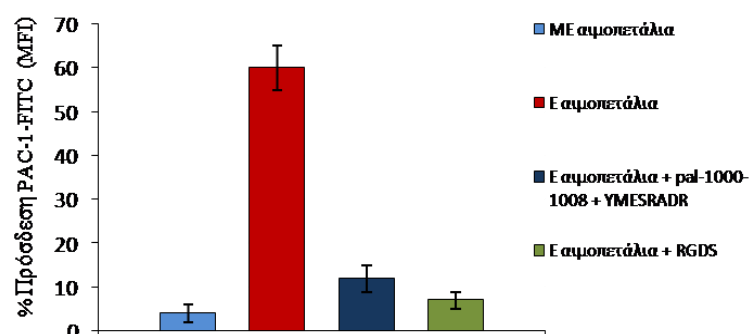
αιμοπετάλια, **E.A** (πράσινη γραμμή): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14, **EA + RGDS** (διακεκομμένη γραμμή): Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + RGDS (900  $\mu$ M), **E.A + pal-1000-1008+YMESRADR** (κόκκινη γραμμή): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + pal-1000-1008 (50  $\mu$ M)+ YMESRADR (75 $\mu$ M)

## 2.2. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης των δύο αναστολέων στην έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης

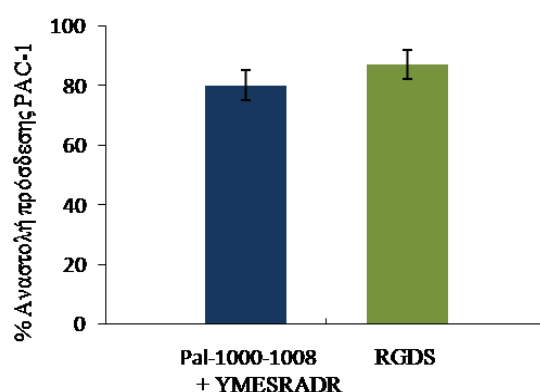
**Πίνακας 18.** Συνεργιστική ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στην έκφραση του Fg-FITC στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή τους με αγωνιστή TRAP-14.

| Πεπτίδια                 | Συγκέντρωση ( $\mu$ M) | Αγωνιστής            | Έκφραση PAC-1-FITC (M.F.I.) | Αναστολή έκφρασης PAC-1-FITC (%) |
|--------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| -                        | -                      | -                    | 4 $\pm$ 2                   | -                                |
| -                        | -                      | TRAP-14 (50 $\mu$ M) | 60 $\pm$ 5                  | -                                |
| Pal-1000-1008 + YMESRADR | 50 + 75                |                      | 12 $\pm$ 3                  | 80 $\pm$ 5                       |
| RGDS                     | 900                    |                      | 7 $\pm$ 2                   | 87 $\pm$ 5                       |

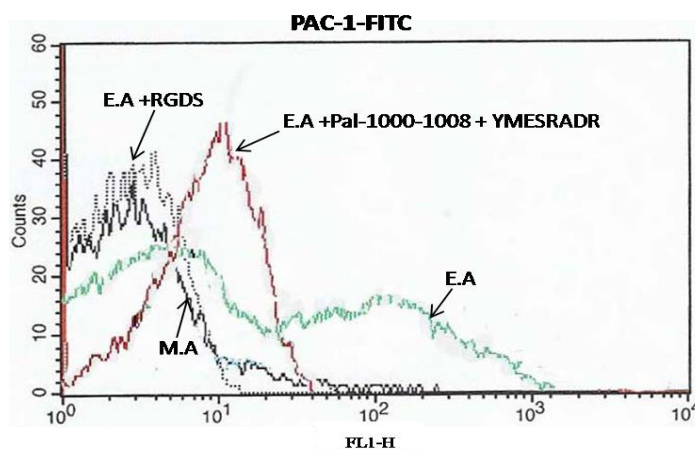
A



B



**Εικόνα Γ.5. Α.** Μέση ένταση φθορισμού της πρόσδεσης του PAC-1-FITC σε μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (PRP) υπό την επίδραση του pal-1000-1008 (50μM) + YMESRADR (75 μM) ή του RGDS (900 μM). ME αιμοπετάλια: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14. **Β** Αναστολή της πρόσδεσης του αντισώματος PAC-1 στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ενεργοποιημένων, με TRAP-14, αιμοπεταλίων από τα πεπτιδικά ανάλογα.



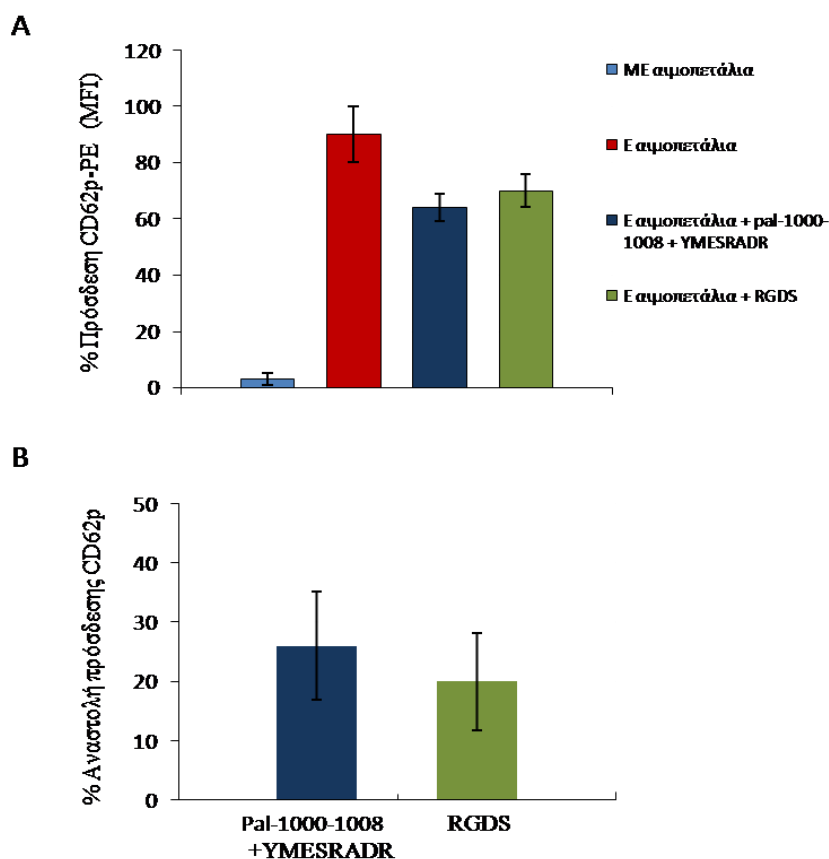
**Εικόνα Γ.6.** Χαρακτηριστική εικόνα κυτταρομετρίας της συνεργιστικής ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην έκφραση του PAC-1-FITC. **MA** (μαύρη γραμμή): μη ενεργοποιημένα

αιμοπετάλια, **E.A** (πράσινη γραμμή): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14, **EA + RGDS** (διακεκομμένη γραμμή): Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + RGDS (900  $\mu$ M), **E.A + pal-1000-1008+ YMESRADR** (κόκκινη γραμμή): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + pal-1000-1008 (50  $\mu$ M)+ YMESRADR (75 $\mu$ M)

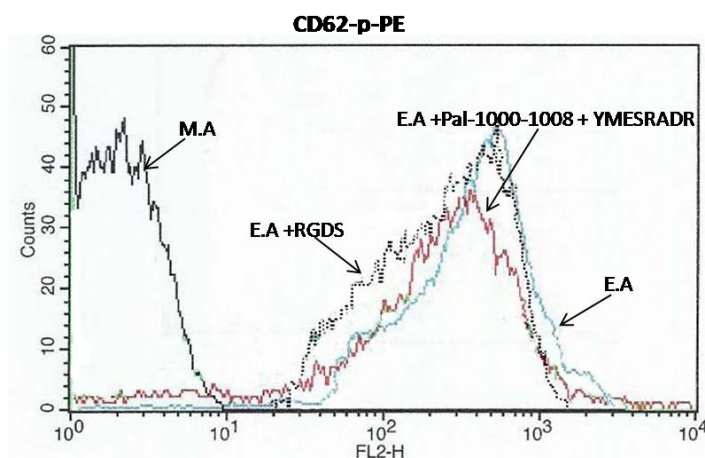
### 2.3. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης των αναστολέων στην έκφραση της P-σελεκτίνης

**Πίνακας 19.** Συνεργιστική ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στην έκφραση της p-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή τους με αγωνιστή TRAP-14.

| Πεπτίδια                 | Συγκέντρωση ( $\mu$ M) | Αγωνιστής            | Έκφραση CD62p-PE (M.F.I.) | Αναστολή έκφρασης CD62p-PE (%) |
|--------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------------|
| -                        | -                      | -                    | 3 $\pm$ 2                 | -                              |
| -                        | -                      | TRAP-14 (50 $\mu$ M) | 90 $\pm$ 10               | -                              |
| Pal-1000-1008 + YMESRADR | 50 + 75                |                      | 64 $\pm$ 5                | 26 $\pm$ 9                     |
| RGDS                     | 900                    |                      | 70 $\pm$ 6                | 20 $\pm$ 8                     |



**Εικόνα Γ.7. Α.** Μέση ένταση φθορισμού της πρόσδεσης της CD62p-PE σε ME αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια (PRP), Ε αιμοπετάλια υπό την επίδραση του pal-LEEDDEEGE (50  $\mu$ M) + YMESRADR (75  $\mu$ M), η του RGDS (900  $\mu$ M). ME αιμοπετάλια: μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, Ε αιμοπετάλια: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14. **Β.** Αναστολή της έκφρασης της P-σελεκτίνης στην επιφάνεια ενεργοποιημένων, με TRAP-14, αιμοπεταλίων από τα πεπτιδικά ανάλογα.



**Εικόνα Γ.8.** Χαρακτηριστική εικόνα κυτταρομετρίας της συνεργιστικής ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων στην έκφραση της p-σελεκτίνης. **MA** (μαύρη γραμμή): μη ενεργοποιημένα

αιμοπετάλια, **E.A** (πράσινη γραμμή): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με TRAP-14, **EA + RGDS** (διακεκομμένη γραμμή): Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + RGDS (900  $\mu$ M), **E.A + pal-1000-1008+ YMESRADR** (κόκκινη γραμμή): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια + pal-1000-1008 (50  $\mu$ M)+ YMESRADR (75 $\mu$ M).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Ο συνδυασμός του pal-LEEDDEEGE με το YMESRADR ανέστειλε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, αφού ανέστειλε εξολοκλήρου τη πρόσδεση του ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  έπειτα από ενεργοποίηση με TRAP-14.
- Ο συνδυασμός του pal-LEEDDEEGE με το YMESRADR έδειξε να αναστέλλει σημαντικά την έκφραση της ενεργοποιημένης ιντεγκρίνης με την αναστολή πρόσδεσης του PAC-1, έπειτα από ενεργοποίηση με TRAP-14.
- Ο συνδυασμός του pal-LEEDDEEGE με το YMESRADR δεν εμφάνισε συνεργιστική ανασταλτική δράση ως προς την έκκριση των  $\alpha$ -κοκκίων των αιμοπεταλίων που συμβαίνει κατά την ενεργοποίηση, αφού δεν κατάφερε να αναστείλει την έκφραση της p-σελεκτίνης σε σημαντικό βαθμό έπειτα από ενεργοποίηση με Trap-14.

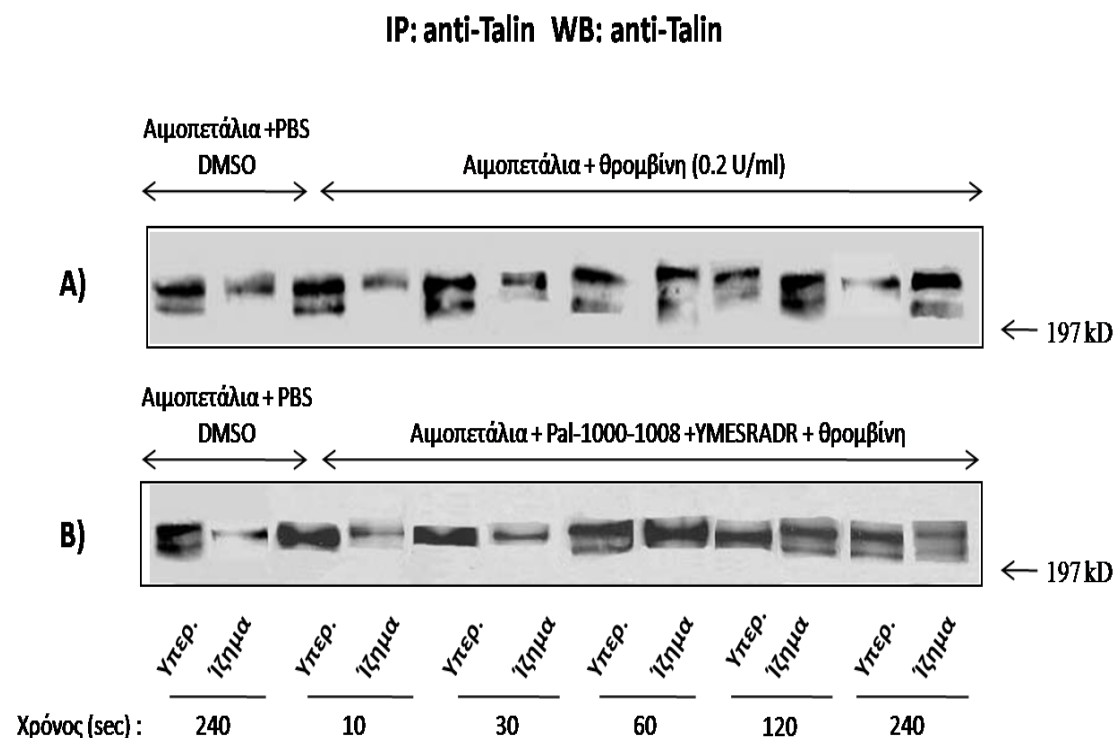
### 3. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης των δύο αναστολέων στην ‘μέσα - έξω’ δομική ενεργοποίηση της $\alpha_{I\text{Ib}}\beta_3$

Έπειτα από την επιβεβαίωση της συνεργιστικής ανασταλτικής δράσης στην ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, επόμενος στόχος μας ήταν η διερεύνηση του ρόλου της συνεργιστικής αυτής δράσης στη πρόσδεση της ταλίνης με την  $\beta_3$  υπομονάδα καθώς και τη πρόσδεση της ταλίνης και της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό, στάδια τα οποία είναι καθοριστικά και απαραίτητα με βάση τη βιβλιογραφία για την ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση της ιντεγκρίνης.

Δείγματα πλυμένων αιμοπεταλίων έπειτα από την επίδραση των αναστολέων, επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοκαταβύθισης (IP) και ανοσοαποτύπωσης (WB) (όπως περιγράφεται στη § 5.3, 5.4). Στα παραπάνω δείγματα, μελετήθηκε η *οπτική ή μη* πρόσδεση της ταλίνης ή της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό καθώς και της ταλίνης με την ιντεγκρίνη (όπως περιγράφεται στη σελ.182-184).

Όλη η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές χρονικές στιγμές δράσης των αναστολέων, όπως τα 10 sec, 0.5 min, 1 min, 2 min και 4 min. Εν συντομία, αιμοπετάλια επωάστηκαν αρχικά με τον ενδοκυττάριο αναστολέα pal-1000-1008 σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$ , έπειτα από 1 min με τον εξωκυττάριο αναστολέα YMESRADR σε συγκέντρωση 75  $\mu\text{M}$ , αμέσως ακολούθησε ενεργοποίησή τους με θρομβίνη (0.2 U/ml) και η ενεργοποίηση διακόπηκε με ήπιο διάλυμα λύσεως στις παραπάνω χρονικές στιγμές αντίστοιχα. Παρακάτω φαίνονται αντιπροσωπευτικά φιλμ όπως αυτά προκύπτουν από την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά την επώασή τους με τα αντισώματα.

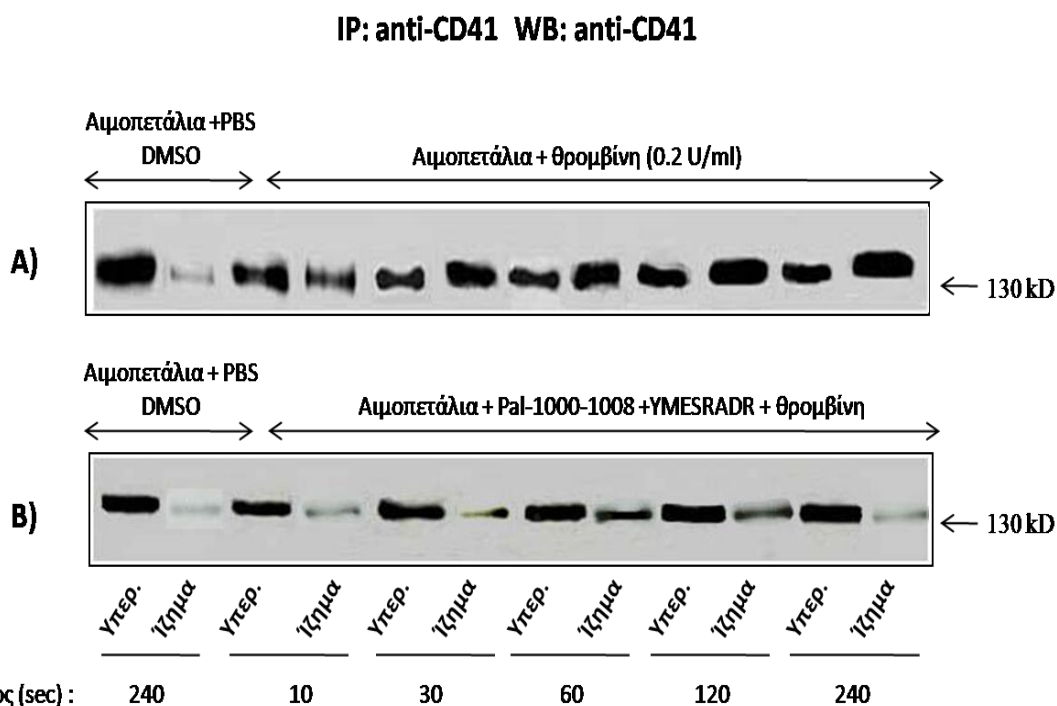
### 3.1. Κινητική κατανομή της ταλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση του Pal-LEEDDEEGE και YMESRADR



**Εικόνα Γ.33.** Απεικόνιση της κατανομής της ταλίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με PBS και DMSO (A) ή με pal-1000-1008 (50  $\mu$ M) και YMESRADR (75  $\mu$ M) (B) για 2 min, έπειτα ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη (0.2 U/ml) και ακολούθησε η λύση τους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ενεργοποίησης (sec). Μετά από φυγοκέντρηση τους, τα κυτταροπλάσματα (υπερκείμενα) ανοσοκαταβυθίστηκαν με anti-CD41 και ανοσοαποτυπώθηκαν όπως και τα ιζήματα με anti-CD41. Δεξιά με βέλη φαίνονται τα πρότυπα μοριακά βάρη.

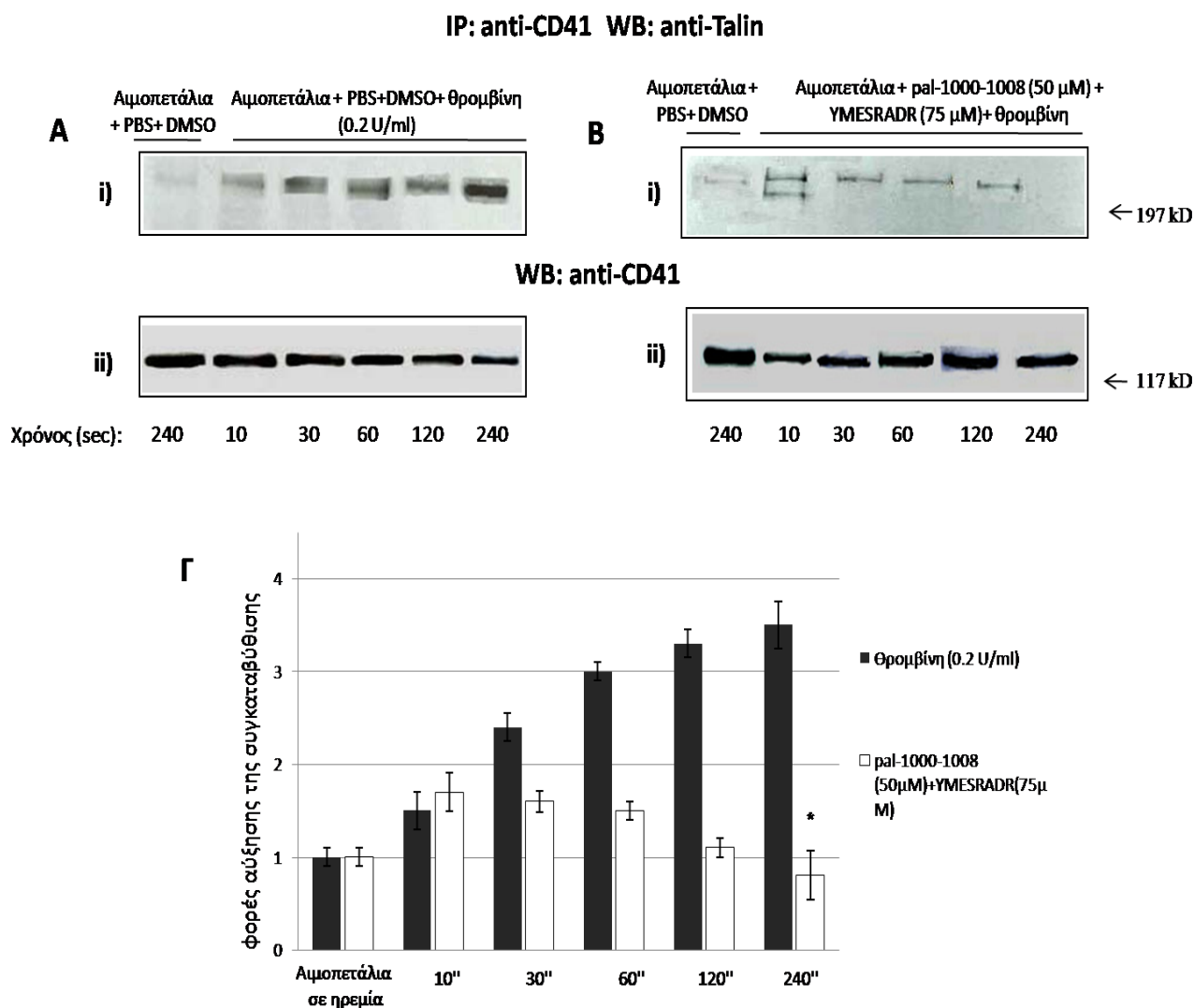


### 3.2. Κινητική κατανομή της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση Pal-LEEDDEEGE και YMESRADR



**Εικόνα Γ.34.** Απεικόνιση της κατανομής της ιντεγκρίνης μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του κυτταροσκελετού. Πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν με PBS και DMSO (A) ή με pal-1000-1008 (50  $\mu$ M) και YMESRADR (75  $\mu$ M) (B) για 2 min, έπειτα ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη (0.2 U/ml) και ακολούθησε η λύση τους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ενεργοποίησης (sec). Μετά από φυγοκέντρηση τους, τα κυτταροπλάσματα (υπερκείμενα) ανοσοκαταβυθίστηκαν με anti-CD41 και ανοσοαποτυπώθηκαν όπως και τα ιζήματα με anti-CD41. Δεξιά με βέλη φαίνονται τα πρότυπα μοριακά βάρη

### 3.3. Κινητική μελέτη της αλληλεπίδρασης ταλίνης-ιντεγκρίνης σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ή χωρίς τη δράση Pal-LEEDDEEGE και YMESRADR



**Εικόνα Γ.35.** Απεικόνιση της επίδρασης του Pal-1000-1008 και του YMESRADR στην συγκαταβύθιση ταλίνης-ιντεγκρίνης. Πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια επωάστηκαν με PBS και DMSO (A) ή με τους αναστολείς Pal-1000-1008 (50 μM) και YMESRADR (75 μM) (B) για 2 min και ενεργοποιήθηκαν με θρομβίνη 0.2 U/ml για διάφορες χρονικές στιγμές. Έγινε λύση των αιμοπεταλίων στις παραπάνω χρονικές στιγμές, ακολούθησε φυγοκέντρηση και τα κυτταροπλάσματα (υπερκείμενα) ανοσοκαταβύθιστηκαν με anti-CD41 (Ai και Bi). Έγινε ανοσοαποτύπωση των υπερκείμενων με anti-talin, ενώ οι ίδιες μεμβράνες ανοσοαποτυπώθηκαν με anti-CD41 για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων(Aii και Bii). Δεξιά με βέλη φαίνονται

τα πρότυπα μοριακά βάρη. (Γ) Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.003$  σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Είναι γνωστό ότι κατά την ενεργοποίηση, επάγεται η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και η ιντεγκρίνη και η ταλίνη αλληλεπιδρούν σταδιακά με τον κυτταροσκελετό. Επίσης, παρατηρείται αλληλεπίδραση της ταλίνης με την ιντεγκρίνη, η οποία ισχυροποιείται με τη πάροδο της ενεργοποίησης.
- Ο συνδυασμός των αναστολέων δεν ανέστειλε την πρόσδεση της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό, όμως κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης παρατηρείται μειωμένη πρόσδεση της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό, η οποία αναστέλλεται στο 4 λεπτό της ενεργοποίησης.
- Η αλληλεπίδραση ταλίνης-ιντεγκρίνης, μετά από τη συνεργιστική δράση, φαίνεται να αναστέλλεται πλήρως στο 4 λεπτό της ενεργοποίησης.

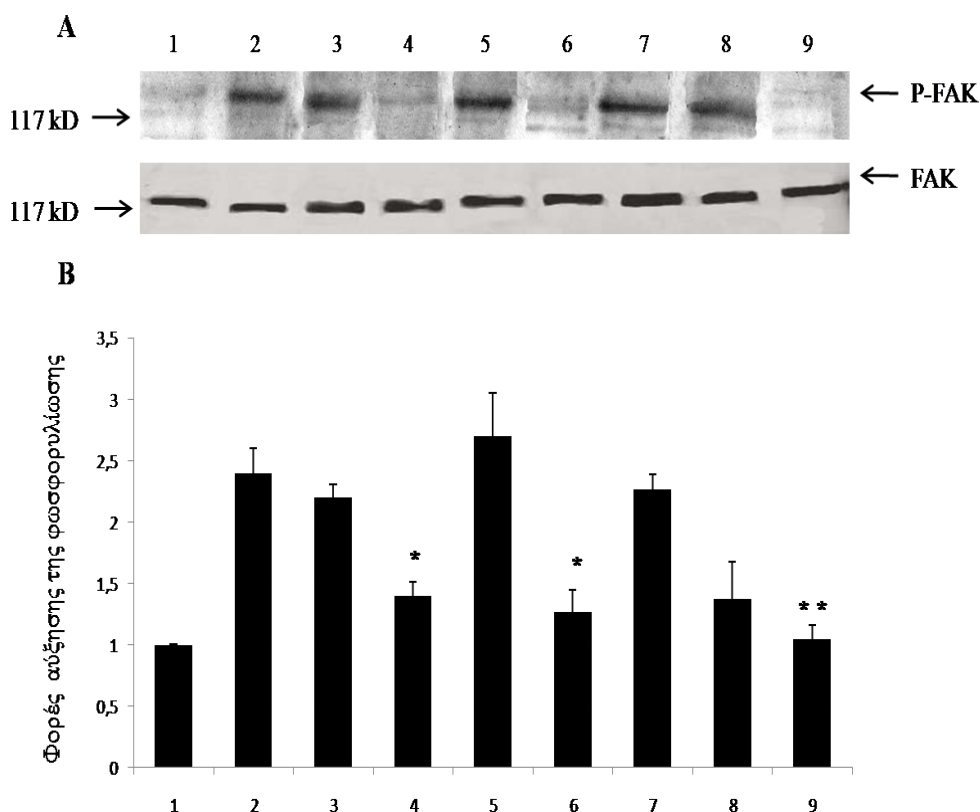
#### 4. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης στη βιοσηματοδότηση των αιμοπεταλίων μέσω των κινασών FAK και ERK

Αφού επιβεβαιώθηκε η συνεργατική δράση των δύο αναστολέων ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και συσώρευσης, στόχος μας ήταν να διερευνηθεί η δράση τους στη φωσφορυλίωση των κύριων σηματοδοτικών πρωτεϊνών FAK και ERK. Η φωσφορυλίωση αυτών των πρωτεϊνών είναι αποτέλεσμα της ‘έξω-μέσα’ βιοσηματοδότησης της ιντεγκρίνης, η οποία πυροδοτεί πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών που έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές λειτουργίες του αιμοπεταλίου. Η φωσφορυλίωση της FAK είναι ένα μετα-συσσωρευματικό γεγονός και εξαρτάται από την ένταση της συσώρευσης, ενώ η φωσφορυλίωση της ERK συμβαίνει κατά το πρώτο “κύμα” της “επαγόμενης από αγωνιστές” φωσφορυλίωσης τυροσινών, κατά την

συσσώρευση είναι αρχική και παροδική, είναι ανεξάρτητη της ιντεγκρίνης  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , ενώ έχει βρεθεί ότι RGD αναστολείς ενισχύουν την φωσφορυλίωση της. Ο έλεγχος έγινε με τη μέθοδο της WB. Δείγματα αιμοπεταλίων επώαστηκαν με τα πεπτίδια αναστολείς για 2 min, ακολούθησε ενεργοποίηση τους με θρομβίνη για 4 min και λύση των αιμοπεταλίων για την απελευθέρωση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών. Τα σημεία φωσφορυλίωσης που ελέγχθηκαν, με εξειδικευμένα αντισώματα, ήταν τα κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται στη θέση 576 (Tyr576) για την πρωτεΐνη FAK και στη 204 (Tyr 204) για την πρωτεΐνη ERK.

Παρακάτω φαίνονται αντιπροσωπευτικά φιλμ όπως αυτά προκύπτουν από την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά την επώασή τους με τα αντισώματα. Η πρωτεΐνη FAK έχει μοριακό βάρος 125kD ενώ η ERK 44kD. Τα πρότυπα μοριακά βάρη σημειώνονται αριστερά με βέλη

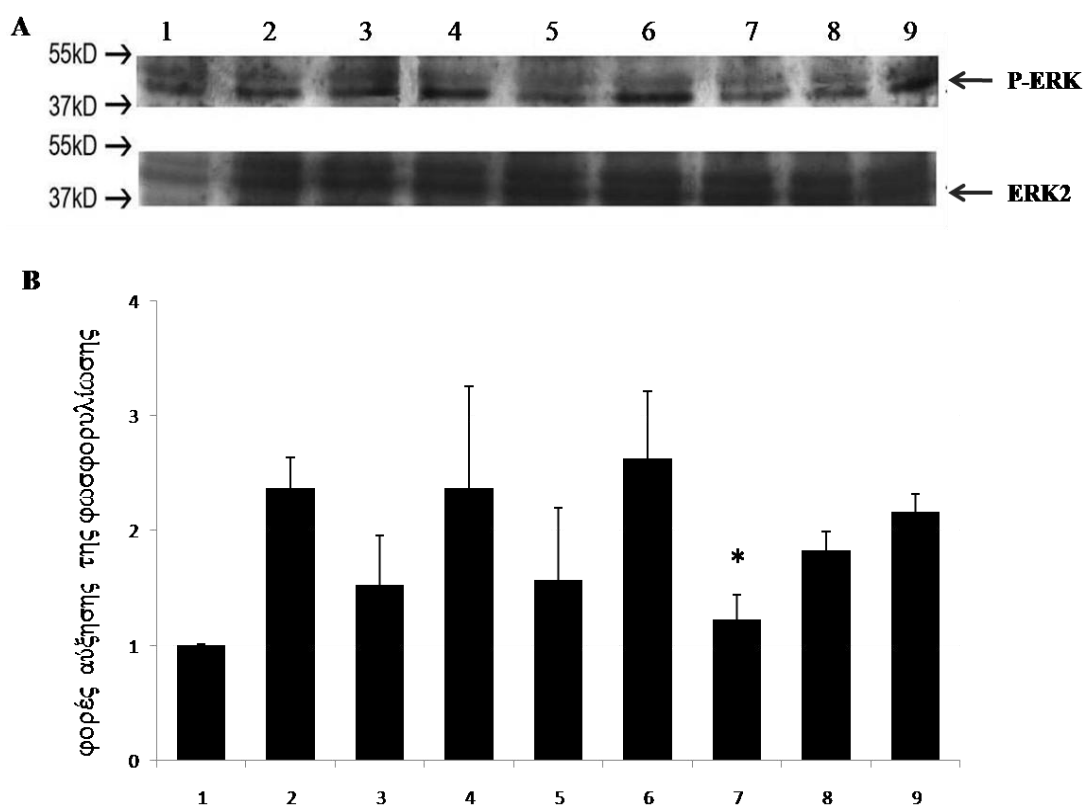
#### 4.1. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης στη φωσφορυλίωση της FAK κινάσης



**Εικόνα Γ.36.** Απεικόνιση της συνεργιστικής δράσης του συνδυασμού του ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου αναστολέα, στις συγκεντρώσεις κατωφλίου ως προς την αναστολή, στη

φωσφορυλίωση της FAK. **A)** Μη ενεργοποιημένα πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια (1), ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με θρομβίνη (0.2 U/ml) (2), αιμοπετάλια που επώαστηκαν με RGDS (90  $\mu$ M) (3), με RGDS (900  $\mu$ M) (4), με pal-1000-1008 (50  $\mu$ M) (5), με pal-1000-1008 (100  $\mu$ M) (6), με YMESRADR (75  $\mu$ M) (7), με YMESRADR (500  $\mu$ M) (8) και με pal-K-LEEDDEEGE (50  $\mu$ M) και YMESRADR (75  $\mu$ M) (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 FAK (anti-p-FAK). Η ίδια μεμβράνη, μετά από διαδικασία αποδέσμευσης αντισωμάτων (stripping), επώαστηκε με αντίσωμα κατά της FAK (anti-FAK). **B)** Οι στήλες προέκυψαν από 3 διαφορετικά πειράματα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.02$  σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

#### 4.2. Η επίδραση της συνεργιστικής δράσης στη φωσφορυλίωση της ERK κινάσης



**Εικόνα Γ.37.** Απεικόνιση της συνεργιστικής δράσης του συνδυασμού του ενδοκυττάριου και εξωκυττάριου αναστολέα, στις συγκεντρώσεις κατωφλίου ως προς την αναστολή, στη φωσφορυλίωση της ERK. **A)** Μη ενεργοποιημένα πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια (1), ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με θρομβίνη (0.2 U/ml) (2), αιμοπετάλια που επώαστηκαν με pal-1000-1008 (100  $\mu$ M) (3), με pal-1000-1008 (50  $\mu$ M) (4), με YMESRADR (500  $\mu$ M) (5), με

YMESRADR (75  $\mu$ M) (6), με pal-K-LEEDDEEGE (50  $\mu$ M) και YMESRADR (75  $\mu$ M) (7), με RGDS (90  $\mu$ M) (8), με RGDS (900  $\mu$ M) (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 (anti-ERK). **B)** Οι στήλες προέκυψαν από 3 διαφορετικά πειράματα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.04$  σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

#### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Η συνεργιστική δράση επιβεβαιώθηκε και από τον έλεγχο της φωσφορυλίωσης της FAK, αφού ο συνδυασμός των πεπτιδίων επέφερε αναστολή της κινάσης σε μεγαλύτερο βαθμό από το RGDS στη μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση.
- Παρόμοιο συμπέρασμα προκύπτει και από τη φωσφορυλίωση της ERK, η οποία αναστέλλεται με τη χρήση του συνδυασμού πεπτιδίων σε συγκεντρώσεις όπου το καθένα χωριστά δεν φαίνεται να έχει προκαλέσει το ίδιο αποτέλεσμα.
- Ο μηχανισμός δράσης, ως προς την αναστολή της συσσώρευσης, των δύο αναστολέων είναι διαφορετικός από αυτόν του RGDS, αφού το RGDS στη μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση δεν επάγει αναστολή της φωσφορυλίωσης της ERK.

## Συζήτηση

Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση και έτσι αποτελούν αρχικοί στόχοι για την αντιμετώπιση της αθηροθρόμβωσης. Η αιμόσταση και η θρόμβωση είναι δυναμικές διαδικασίες, οι οποίες προϋποθέτουν μια συντονισμένη σειρά γεγονότων, που περιλαμβάνουν μεμβρανικούς αιμοπεταλιακούς υποδοχείς, αμφίδρομα ενδοκυττάρια σήματα και την απελευθέρωση αιμοπεταλιακών πρωτεϊνών. Οι ετεροδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες, οι ιντεγκρίνες, αποτελούν μια έντονα εκφραζόμενη οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων, η οποία συνδέει την εξωκυττάρια μήτρα με τον κυτταροσκελετό και αυτές εξυπηρετούν ως σηματοδοτικά μόρια προς τις δύο κατευθύνσεις [160, 378].

Η κυρίαρχη ιντεγκρίνη της αιμοπεταλιακής επιφάνειας, η  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , μεσολαβεί στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω δέσμευσης του ινωδογόνου του πλάσματος και εξυπηρετεί ως ο κυρίαρχος υποδοχέας για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην εξωκυττάρια μήτρα *in vivo*. Η συγγένεια που εμφανίζει για τα προσδέματα ρυθμίζεται από τριτοταγείς και τεταρτοταγείς αλλαγές στη διαμόρφωσή τους που μεταδίδονται από τις κυτταροπλασματικές ουρές στις εξωκυττάριας περιοχές κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την αδρανή στην ενεργοποιημένη μορφή. Αυτή η διαδικασία αποτελεί την ‘μέσα - έξω’ σηματοδότηση (inside-out) της ιντεγκρίνης. Η κατάληψη του υποδοχέα αποτελεί έναρξη για περαιτέρω δομικές μεταβολές και μετάγει σήματα μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη συγκρότηση των υποδοχέων και την στρατολόγηση σηματοδοτικών μορίων στις κυτταροπλασματικές περιοχές της ιντεγκρίνης. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως ‘έξω - μέσα’ σηματοδότηση (outside-in).

Ο ρόλος της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  είναι σημαντικός για την επίσχεση της αιμορραγίας σε τόπους αγγειακής βλάβης, αφού οι κληρονομικές ανωμαλίες στον αριθμό των  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ή τη λειτουργία προκαλούν αιμορραγική διάθεση στους ασθενείς με θρομβασθένεια Glanzmann [379]. Επίσης, ρυθμίζει τη διαδικασία της θρόμβωσης μέσω της ενεργοποίησής της, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καρδιαγγειακά εμφράγματα ή αιμορραγικά επεισόδια [380]. Ο επιτακτικός ρόλος της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  για την αιμόσταση και την θρόμβωση έχει μελετηθεί εντατικά σε ανθρώπους και ζώα. Η αλλαγή της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  από μια κατάσταση χαμηλής συγγένειας για το πρόσδεμα σε υψηλή θεωρείται το τελικό μονοπάτι της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Συνεπώς, ο μοριακός μηχανισμός που

#### IV) Συζήτηση

ρυθμίζει αυτή τη διαδικασία αποτελεί στόχο των αντιθρομβωτικών παραγόντων και έχει μελετηθεί εντατικά για περισσότερο από δύο δεκαετίες. Τα πιο εκτενώς μελετημένα και κλινικά αντιθρομβωτικά φάρμακα μέχρι στιγμής που στοχεύουν στην ιντεγκρίνη είναι οι  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ανταγωνιστές, οι οποίοι ανταγωνίζονται και εμποδίζουν έτσι τη πρόσδεση του ινωδογόνου [168], χωρίς όμως να εμποδίζουν την επέκταση της εξωκυττάριας διαμόρφωσης της ιντεγκρίνης.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η ιντεγκρίνη στην ενεργοποιημένη της μορφή δεσμεύει το ινωδογόνο μέσω δύο αλληλουχιών αναγνώρισης: την RGD, η οποία απαντάται και στους υπόλοιπους προσδέτες της ιντεγκρίνης όπως ο vWF, η βιτρονεκτίνη και η φιβρονεκτίνη και την HHLGGAKQAGDV, η οποία βρίσκεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της  $\gamma$  αλυσίδας του ινωδογόνου. Η έρευνα αυτή ξεκίνησε από προηγούμενους ερευνητές του εργαστηρίου μας, οι οποίοι ανακάλυψαν την  $\alpha_{IIb}$  313–332 ( $Y^{313}MESRADRKLAEVGRVYLF^{332}$ ) περιοχή ως πιθανή θέση αλληλεπίδρασης με το ινωδογόνο [331] και λίγο αργότερα αποδείχθηκε ότι η YMESRADR αλληλουχία διατηρεί την ίδια ανασταλτική δράση ως προς τη συσσώρευση και την πρόσδεση του ινωδογόνου, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι αλληλεπιδρά με το ινωδογόνο και όχι με την ιντεγκρίνη [335]. Η αλληλουχία YMESRADR αποτελεί απαραίτητη λειτουργική περιοχή και συνδέει τις  $\beta_2$  και  $\beta_3$  αντιπαράλληλες πτυχές της λεπίδας W5 της υπομονάδας  $\alpha_{IIb}$ . Η υποκατάσταση των καταλοίπων  $Y^{313}$ ,  $M^{314}$ ,  $E^{315}$  ή  $S^{316}$  από κατάλοιπα αλανίνης δεν επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα του οκταπεπτιδίου. Το μοτίβο RADR από πειράματα σε ανθρώπινο PRP φαίνεται ότι είναι το πιο ουσιώδες για τη βιολογική δραστηριότητα της περιοχής 313-320 [373].

Παίρνοντας τη σκυτάλη από τους παλαιότερους ερευνητές του εργαστηρίου μας και θέλοντας να πιστοποιήσουμε την παραπάνω θεωρία, μελετήσαμε το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην 313-320  $\alpha_{IIb}$  αλληλουχία, YMESRADR, σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια, δηλαδή αιμοπετάλια ελεύθερα από διάφορους παράγοντες του πλάσματος που μπορεί να επηρεάσουν τη λειτουργία τους. Επίσης, θέλοντας να διαπιστώσουμε τα κρίσιμα αμινοξέα της 313-320 αλληλουχίας, ως προς την έκφραση της βιολογικής της δράσης στην αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, μελετήσαμε τα τροποποιημένα με αλανίνη σε διαφορετικές θέσεις πεπτίδια: YMESRAAR, YMESAADR, YMESRADA, το μετατοπισμένο κατά ένα αμινοξύ πεπτίδιο MESRADRK, το *ymesradr* (όλα τα αμινοξέα σε D-διαμόρφωση) και ένα κυκλικό ανάλογο με σταθεροποίηση της RAD αλληλουχίας (S,S)-YMECRADCR. Σε πλυμένα



αιμοπετάλια χρησιμοποιήσαμε ως αγωνιστή τη θρομβίνη (0.2 U/ml) και υπολογίστηκε ο συντελεστής  $IC_{50}$  που αποτελεί δείκτης της ανασταλτικότητας των πεπτιδίων. Το YMESRADR βρέθηκε ιδιαίτερα δραστικό με  $IC_{50}$  ίσο με  $100 \pm 10 \mu M$ , λίγο μεγαλύτερο από το  $IC_{50}$  του γνωστού  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ανταγωνιστή, RGDS, το οποίο είναι ίσο με  $68 \pm 5 \mu M$ . Το (S,S)-YMECRADCR βρέθηκε λιγότερο δραστικό με  $IC_{50}$  ίσο με  $325 \pm 15 \mu M$ , το *ymesradr* καθόλου δραστικό με  $IC_{50} > 1000 \mu M$  και τα υπόλοιπα πεπτίδια δεν εμφάνισαν καθόλου ανασταλτική δράση στα 500  $\mu M$ , με εξαίρεση το YMESRADA, το οποίο στα 500  $\mu M$  εμφάνισε αναστολή της συσώρευσης ίση με 42%. Από τα αποτελέσματα της εργασίας προκύπτει η σημαντικότητα των  $R^{317}$ ,  $D^{319}$ ,  $R^{320}$  και  $Y^{313}$  στην έκφραση της ανασταλτικής δράσης, όπως και της στεreoχημείας των αμινοξέων της αλληλουχίας και της διαμόρφωσης της στο χώρο.

Επόμενος στόχος ήταν η διερεύνηση της ανασταλτικής του δράσης στην ενεργοποίηση της ίδιας της ιντεγκρίνης. Πιστοποιήθηκε με πειράματα κυτταρομετρίας ροής, από τα οποία προέκυψε ότι το πεπτίδιο ανέστειλε τη πρόσδεση του φθορισμένου ινωδογόνου στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη, ανέστειλε τη πρόσδεση του PAC-1 στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη ενώ δεν φάνηκε να επηρεάζει την έκκριση των  $\alpha$ -κοκκίων των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, αφού δεν ανέστειλε τη πρόσδεση της p-σελεκτίνης.

Η δράση του οκταπεπτιδίου αποτέλεσε το έναυσμα της παρούσας εργασίας για τη περεταίρω μελέτη του μηχανισμού δράσης του στα δύο προαναφερθέντα μονοπάτια ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης. Τελικό στάδιο της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης αποτελεί η πρόσδεση της με το ινωδογόνο, η οποία πυροδοτεί ένα καταρράκτη ενδοκυττάρων σημάτων ('έξω-μέσα' σηματοδότηση), τα οποία στοχεύουν στη σταθεροποίηση της αιμοπεταλιακής συσώρευσης. Η μελέτη της δομικής 'έξω-μέσα' ενεργοποίησης έγινε με τη διερεύνηση της προσκόλλησης CHO κυττάρων στο ινωδογόνο υπό συνθήκες ροής. Έπειτα από πειράματα μοντελοποίησης της εξωκυττάριας δομής της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  στην «κεκκαμένη» διαμόρφωση [Lee H W et.al, under publication], από τα οποία προέκυψε η αλληλεπίδραση της 313-320 αλληλουχίας με τη  $\beta_3$  υβριδική περιοχή μέσω της  $(\alpha_{IIb})D^{319}-(\beta_3)K^{384}$  γέφυρας άλατος και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της συσσωρευομετρίας, μελετήσαμε μετασχηματισμένους κλώνους CHO κυττάρων οι οποίοι εκτός από την άγριου τύπου ιντεγκρίνη εξέφρασαν και μεταλλαγμένη, στα κρίσιμα αμινοξέα, ιντεγκρίνη. Οι μεταλλάξεις ήταν είτε μια τριπλή μετάλλαξη στη  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδα της ιντεγκρίνης: R317A/D319A/R320A ( $\alpha_{IIb3M}\beta_3$ ) ή μια μονή μετάλλαξη K384A στη ( $\alpha_{IIb}\beta_{31M}$ ).

#### IV) Συζήτηση

Όλοι οι παραπάνω κυτταρικοί κλώνοι μελετήθηκαν ως προς την προσκόλληση τους στο ινωδογόνο υπό συνθήκες ροής, μέσω της ιντεγκρίνης, έπειτα από επώαση τους με το YMESRADR (500  $\mu$ M). Βρέθηκε ότι το YMESRADR ανέστειλε σημαντικά τη προσκόλληση των CHO κυττάρων που εκφράζουν την άγριου τύπου και την  $\alpha_{\text{IIB}\beta 3}$  στο ινωδογόνο, ενώ δεν κατάφερε να αναστείλει τη προσκόλληση των κυττάρων που εκφράζουν την  $\alpha_{\text{IIB}\beta 3\text{IM}}$ . Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι πιθανώς το οκταπεπτιδίο να συναγωνίζεται και να αντικαθιστά την 313-320 αλληλουχία, να αλληλεπιδρά με την υβριδική περιοχή, να αποκαθιστά τη προαναφερθείσα γέφυρα άλατος και να διατηρεί την ιντεγκρίνη στη «κεκαμμένη» διαμόρφωση. Επομένως, η ανασταλτική δράση του οκταπεπτιδίου πιθανώς να οφείλεται στη παραπάνω αλληλεπίδραση και όχι στην αρχικά θεωρημένη αλληλεπίδραση του με το ινωδογόνο [331]. Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα, για τη δράση του YMESRADR, είναι πιθανό να επισημαίνουν μια νέα ικανή θεραπευτική προσέγγιση στη παρεμπόδιση της αλλαγής της εξωκυττάριας διαμόρφωσης.

Εξίσου καθοριστική και ταυτόχρονη πορεία ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης είναι η ‘μέσα-έξω’ ενεργοποίηση της ή σηματοδότηση. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να αναστείλουμε την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με την εξειδικευμένη διακοπή της πορείας της ‘μέσα-έξω’ σηματοδότησης με την χρήση πεπτιδικών αναλόγων που προέρχονται από την  $\alpha_{\text{IIB}}$  υπομονάδα της ιντεγκρίνης.

Σύμφωνα με την θεωρία, όταν ο υποδοχέας βρίσκεται στην ανενεργή του μορφή τα κυτταροπλασματικά άκρα των δυο υπομονάδων του, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, τόσο με υδρόφοβες, αλλά κυρίως με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια η  $\alpha_{\text{IIB}\beta 3}$  βρίσκεται σε χαμηλής συγγένειας διαμόρφωση και δεν είναι ικανή να δεσμεύσει προσδέτες, ενώ με το μηχανισμό αυτό αλλάζει η διαμόρφωσή της σε υψηλής συγγένειας και μπορούν οι προσδέτες να δεσμευτούν σε αυτήν. Κατά την ενεργοποίηση, μέσα στο αιμοπετάλιο, συμβαίνει ένας καταρράχτης βιοχημικών διεργασιών. Ξεκινάει με την ενεργοποίηση ισομορφών της φωσφολιπάσης C, πράγμα που απαιτεί την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης από αγωνιστές, που εκκρίνονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Έπειτα από μια σειρά ενεργοποιήσεων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, ενεργοποιείται η ενδοκυττάρια πρωτεϊνοκινάση C (PKC), η οποία φωσφορυλιώνει μια σειρά σηματοδοτικών πρωτεϊνών, μια από τις οποίες είναι η κυτταροσκελετική πρωτεΐνη ταλίνη. Έτσι τα ‘μέσα-έξω’ σηματοδοτικά μονοπάτια τροποποιούν τη συγγένεια της ιντεγκρίνης,

ρυθμίζοντας την αλληλεπίδραση της με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες όπως η ταλίνη, η οποία προσδένεται στο β-κυτταροπλασματικό άκρο της ιντεγκρίνης.

Η ταλίνη είναι μια αρκετά μεγάλη πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 270 kDa, αλλά εμφανίζεται να είναι 235 kDa στα πηκτώματα.. Είναι πολύ άφθονη στα αιμοπετάλια, με αντιπροσώπευση μεγαλύτερη από το 3% της συνολικής πρωτεΐνης των αιμοπεταλίων. Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι, κατά τρόπο ενδιαφέροντα, η υπομοριακή διανομή της ταλίνης αλλάζει εντυπωσιακά όταν ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια για να γίνουν συγκολλητικά. Σε καταστάσεις ηρεμίας, η μη αυτοκόλλητη ταλίνη εκθέτει μια ομοιόμορφη, κυτταροπλασματική διανομή. Εντούτοις, κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η ταλίνη μεταφέρεται σε μια απόμακρη υπομεμβρανική θέση. Μέσα σε 1 λεπτό από την ενεργοποίηση με θρομβίνη, το 36% της κυψελοειδούς ταλίνης βρίσκεται σε απόσταση 40 nm από τη μεμβράνη πλάσματος και θα μπορούσε επομένως να συνδεθεί στη μεμβράνη. Η σύνδεση με τη μεμβράνη γίνεται με φωσφορυλίωση της στα υπολείμματα σερίνης/θρεονίνης που είναι κυρίως στη κεφαλή της ταλίνης. Αυτή η ρυθμισμένη ανακατανομή της ταλίνης στη περιφέρεια των αιμοπεταλίων τοποθετεί τη ταλίνη μέσα σε μια θέση όπου μπορεί να συμμετέχει στην ανάπτυξη της συγκολλητικής δυνατότητας στην ενεργοποίηση αιμοπεταλίων μέσω της πρόσδεσης της στη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική υπομονάδα της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  και συγκεκριμένα στο κοντινό στη μεμβράνη NPxY μοτίβο, παρόν στη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική ουρά της ιντεγκρίνης.

Στη παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια εύρεσης της σχέσης ανάμεσα στην ανασταλτική δράση του YMESRADR στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης και στην επίδραση του στην αλληλεπίδραση της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό, της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό και της ταλίνης με την ιντεγκρίνη. Οι παραπάνω σχέσεις μελετήθηκαν με τρόπο κινητικό για την καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας της ταλίνης. Έγιναν πειράματα ανοσοκαταβύθισης όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της ταλίνης (anti-talin) ή κατά της  $\alpha_{IIb}$ -ιντεγκρίνης (anti-CD41) σε δείγματα πλυμένων ανθρώπινων αιμοπεταλίων και ανοσοαποτύπωση αυτών σε μεμβρανικό υπόστρωμα με τα αντίστοιχα αντισώματα. Για την αλληλεπίδραση ταλίνης-ιντεγκρίνης έγινε ανοσοκαταβύθιση στα κυτταροπλάσματα με anti-CD41 και ανοσοαποτύπωση τους με anti-talin.

Σε εφησυχασμένα αιμοπετάλια, όπως η ταλίνη έτσι και ο υποδοχέας εκθέτουν μια ομοιόμορφη κατανομή στο κυτταροδιάλυμα. Σε ενεργοποιημένα με θρομβίνη αιμοπετάλια για 5 διαφορετικές χρονικές στιγμές (10, 30, 60, 120, 240 sec), η ταλίνη

#### IV) Συζήτηση

αλλάζει εντυπωσιακά θέση και από τα 30 sec της ενεργοποίησης και έπειτα, αρχίζει να μεταφέρεται σε μια απόμακρη υπομεμβρανική θέση, δηλαδή να προσδένεται στον κυτταροσκελετό. Το ίδιο φαινόμενο «συμπεριφοράς» παρατηρείται και με την ιντεγκρίνη. Επίσης από τα 30 sec της ενεργοποίησης αρχίζει να παρατηρείται η αλληλεπίδραση ταλίνης-  $\beta_3$  ιντεγκρίνης. Σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, έπειτα από επώαση με 500  $\mu\text{M}$  YMESRADR ή με 900  $\mu\text{M}$  RGDS για 2 λεπτά, δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική αναστολή της αλληλεπίδρασης ταλίνης με τον κυτταροσκελετό, της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό καθώς και της συγκαταβύθισης ταλίνης -  $\beta_3$  ιντεγκρίνης. Συνεπώς μπορούμε να πούμε ότι ο εξωκυττάριος αναστολέας YMESRADR δεν αναστέλλει το μονοπάτι της ‘μέσα-έξω’ σηματοδότησης.

Συνέχεια της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση ενός άλλου ισχυρού αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης προερχόμενος από την ενδοκυττάρια  $\alpha_{\text{IIb}}$  υπομονάδα, η οποία αποτελεί συνέχεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Ο αναστολέας αυτός αντιστοιχεί στην όξινη C-τελική 1000-1008 αλληλουχία της  $\alpha_{\text{IIb}}$  ενδοκυττάριας υπομονάδας, για τον οποίον λίγα είναι τα δεδομένα στο ερευνητικό πεδίο. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κοντινής στη μεμβράνη περιοχής  $\alpha_{\text{IIb}}$  989-995 περιοχής και του όξινου C-τελικού άκρου 1000-1008 παρέχουν τη δομική σταθερότητα που έχει ο υποδοχέας στην κατάσταση ηρεμίας του μέσω μιας γέφυρας άλατος μεταξύ του  $\beta_3\text{D}^{723}$  και της  $\alpha_{\text{IIb}}$  R<sup>995</sup> [248] [174]. Συνεπώς οι δύο παραπάνω περιοχές φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία της ιντεγκρίνης  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  και κατά συνέπεια στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Πράγματι μια σειρά από βιβλιογραφικά δεδομένα υπογραμμίζουν τη σημασία τους. Για το πλησίον στη μεμβράνη τμήμα της  $\alpha_{\text{IIb}}$  κυτταροπλασματικής υπομονάδας 989-995 έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα και έχει αποδείξει ότι είναι μια καλά διατηρημένη αλληλουχία με διαμόρφωση  $\alpha$ -έλικας που κρατά την ιντεγκρίνη στην ανενεργή της μορφή. Απαλοιφή η μετάλλαξη της αλληλουχίας αυτής καθιστά την ιντεγκρίνη συνεχώς ενεργή. Έρευνες που έγιναν έδειξαν ότι το παλμιτουϊλιόμενο-<sup>989</sup>KVGFFKR<sup>995</sup> ενεργοποιεί πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου επάγοντας τη συσσώρευσή τους [247]. Για το απόμακρο από τη μεμβράνη 1000-1008 τμήμα της  $\alpha_{\text{IIb}}$  κυτταροπλασματικής ουράς βρέθηκε, έπειτα από πειράματα συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια, ότι αποτελεί ισχυρό αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με  $\text{IC}_{50} = 65 \mu\text{M}$ . Το μικρό  $\text{IC}_{50}$  οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το pal-1000-1008 έχει εξειδικευμένη δράση και με κάποιο τρόπο διακόπτει την ενεργοποίηση της  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . Επομένως ο ρόλος του όξινου C-τελικού άκρου

της  $\alpha_{IIb}$  φαίνεται να είναι σημαντικός στη λειτουργία του διαμορφωτικού διακόπτη, που σχηματίζει η κυτταροπλασματική περιοχή της υπομονάδας  $\alpha_{IIb}$ . Δηλαδή φαίνεται ότι το pal-1000-1008 'κλειδώνει' τις δυο κυτταροπλασματικές ουρές διατηρώντας την ιντεγκρίνη σε μη ενεργοποιημένη διαμόρφωση. Έτσι μπορεί να ειπωθεί ότι ανταγωνίζεται τη δράση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών όπως η ταλίνη, που δρα στη  $\beta_3$  κυτταροπλασματική ουρά και ενεργοποιεί την ιντεγκρίνη, πράγμα που διερευνήθηκε στην παρούσα μελέτη και θα συζητηθεί παρακάτω.

Για να διαπιστωθούν οι δομικές προαπαιτήσεις ή τα κρίσιμα αμινοξέα της 1000-1008 αλληλουχίας, δοκιμάστηκαν τα παλμιτουϊλιομένα, τροποποιημένα με αλανίνη σε διάφορες θέσεις,  $\alpha_{IIb}$  -1000-1008 πεπτίδια: E1001/A, D1003/A, D1004, E1005/A σε κρίσιμες ως προς την αναστολή συγκεντρώσεις, το pal-scrambled (pal- GDDEELEEDE) πεπτίδιο και 2 μικρότερα πεπτίδια, τμήματα της 1000-1008 αλληλουχίας: pal-1000-1005 (pal-LEEDDE) και το pal -1000-1005 (pal-EEGE). Όλα τα παραπάνω πεπτίδια εμφάνισαν μικρότερη ανασταλτική δράση, οπότε το συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι το συνολικό μέγεθος και φορτίο του πεπτιδίου LEEDDEEGE διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκφραση της ισχυρής ανασταλτικής δράσης και κανένα από τα αμινοξέα χωριστά δεν ενισχύει αυτή τη δράση. Επίσης, ουσιαστικό ρόλο διαδραματίζει και η αλλά και η πρωτοταγής δομή του, αφού το pal-scrambled εμφάνισε μεγαλύτερο  $IC_{50}$  από αυτό του pal-1000-1008.

Ακολούθησε η διερεύνηση της ανασταλτικής του δράσης στην ενεργοποίηση της ίδιας της ιντεγκρίνης. Πιστοποιήθηκε με πειράματα κυτταρομετρίας ροής, από τα οποία προέκυψε ότι το pal-1000-1008 σε συγκέντρωση 100  $\mu M$ , ανέστειλε σε σημαντικό βαθμό τη πρόσδεση του φθορισμένου ινωδογόνου στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη, τη πρόσδεση του PAC-1 στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη ενώ δεν φάνηκε να επηρεάζει την έκκριση των  $\alpha$ -κοκκίων των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, αφού δεν ανέστειλε τη πρόσδεση της p-σελεκτίνης.

Πως όμως συνδέεται η ανασταλτική δράση του πεπτιδίου με τους μηχανισμούς σηματοδότησης των αιμοπεταλίων και ειδικά με την από μέσα προς τα έξω ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης; Για να χαρακτηρίσουμε τη συμμετοχή του στη 'μεσα-έξω' ενεργοποίηση μελετήσαμε την επίδραση του στην αλληλεπίδραση της ταλίνης με ενεργοποιημένο κυτταροσκελετό, της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό και της ταλίνης με την ιντεγκρίνη. Η διαδικασία αυτή περιγράφηκε προηγουμένως στη σελίδα 230, στην οποία μελετήθηκε η επίδραση του YMESRADR στις παραπάνω αλληλεπιδράσεις.

#### IV) Συζήτηση

Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία με τις ίδιες χρονικές στιγμές ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων έπειτα από 2 λεπτά επώασης με 100  $\mu\text{M}$  του pal-1000-1008.

Σε εφησυχασμένα αιμοπετάλια όπως η ταλίνη έτσι και ο υποδοχέας εκθέτουν μια ομοιόμορφη κατανομή στο κυτταροδιάλυμα. Σε ενεργοποιημένα με θρομβίνη αιμοπετάλια για 5 διαφορετικές χρονικές στιγμές (10, 30, 60, 120, 240 sec), η ταλίνη αλλάζει εντυπωσιακά θέση και από τα 30 sec της ενεργοποίησης και έπειτα, αρχίζει να προσδένεται στον κυτταροσκελετό. Το ίδιο φαινόμενο «συμπεριφοράς» παρατηρείται και με την ιντεγκρίνη. Επίσης από τα 30 sec της ενεργοποίησης αρχίζει να παρατηρείται η αλληλεπίδραση ταλίνης-  $\beta_3$  ιντεγκρίνης. Ο αναστολέας pal-1000-1008 στα 100  $\mu\text{M}$  δεν ανέστειλε την αλληλεπίδραση της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό αλλά ανέστειλε την αλληλεπίδραση της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό από τα 120 sec της ενεργοποίησης και έπειτα. Επίσης, κατάφερε να αναστείλει ολοκληρωτικά την αλληλεπίδραση της ταλίνης με τη  $\beta_3$  υπομονάδα της ιντεγκρίνης στα 240 sec της ενεργοποίησης. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το παλμιτοϋλιωμένο πεπτίδιο  $\alpha_{\text{IIb}}$  1000-1008 δρα σαν μοριακός διακόπτης παρεμποδίζοντας την πρόσδεση της κυτταροπλασματικής ταλίνης στον υποδοχέα  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  [377] όπως αναπαρίσταται σχηματικά στην εικόνα B.13, στο κεφάλαιο B της ενότητας των αποτελεσμάτων. Έχει προταθεί και από άλλους ερευνητές [355] ότι η ρύθμιση της αλληλεπίδρασης ταλίνης-ιντεγκρίνης πιθανώς να αποτελεί ελκυστικός στόχος για την ανάπτυξη αντιθρομβωτικών φαρμάκων. Η προσέγγιση αυτή με τη χρήση του ενδοκυττάριου αναστολέα είναι υποσχόμενη για την ανάπτυξη τέτοιων φαρμάκων.

Από όλα τα παραπάνω γίνεται σαφής ο ανασταλτικός ρόλος των pal-1000-1008 και YMESRADR. Τι συμβαίνει όμως όταν προσθέτουμε το ενδοκυττάριο αλλά και το εξωκυττάριο πεπτίδιο μαζί; Για να εξεταστεί αν τα δύο πεπτίδια εμφανίζουν συνεργατική δράση, εξετάστηκε αρχικά η αναστολή που προκαλεί το καθένα μόνο του ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια σε διάφορες συγκεντρώσεις, μικρότερες από τις συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στο  $\text{IC}_{50}$  τους. Εκτός από τη δοκιμή σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, δοκιμάστηκε και η διαφορετική διαδοχική σειρά προσθήκης και συνεπώς επώασης στα αιμοπετάλια πριν την ενεργοποίησή τους. Τα δύο πεπτίδια εμφάνισαν συνεργιστική δράση ως προς την αναστολή της συσσώρευσης όταν η σειρά επώασης ήταν πρώτα το ενδοκυττάριο και μετά το εξωκυττάριο και όχι με αντίθετη σειρά ή ταυτόχρονη επώαση τους, όπως φαίνεται αναλυτικότερα στον πίνακα

16 του κεφαλαίου Γ της ενότητας των αποτελεσμάτων. Πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 50  $\mu\text{M}$  pal-1000-1008 και 75  $\mu\text{M}$  YMESRADR, ενεργοποιήθηκαν με 0.2 U/ml θρομβίνης και η αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων ήταν σχεδόν 100%.

Έπειτα από τη διερεύνηση της συνεργιστικής δράσης ως προς την αναστολή της συσώρευσης θέλαμε να διαπιστώσουμε αν η συνεργιστική αυτή δράση υφίσταται και στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Ο έλεγχος έγινε με πειράματα κυτταρομετρίας ροής, ακολουθώντας ακριβώς τις ίδιες συνθήκες την ίδια σειρά και τους ίδιους χρόνους επώασης των αναστολέων όπως και στα πειράματα της συσσωρευομετρίας. Η συνεργιστική δράση των αναστολέων παρατηρήθηκε και στην αναστολή ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης, αφού παρατηρήθηκε σχεδόν ολοκληρωτική αναστολή της πρόσδεσης του φθορισμένου ινωδογόνου στην ιντεγκρίνη και πολύ σημαντική αναστολή πρόσδεσης του PAC-1 στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη. Όμως ο συνδυασμός των αναστολέων δεν κατάφερε να αναστείλει σε σημαντικό βαθμό τη πρόσδεση της p-σελεκτίνης.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ήταν και η διερεύνηση της συνεργιστικής δράσης ως προς την αναστολή της 'μέσα-έξω' σηματοδότησης, έπειτα από την εύρεση της συνεργιστικής δράσης ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσώρευσης και ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης. Έγιναν πειράματα ανοσοκαταβύθισης και ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα κατά της ταλίνης ή της ιντεγκρίνης για την εύρεση της αλληλεπίδρασης της ταλίνης ή της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό αντίστοιχα, έπειτα από επώαση ενεργοποιημένων πλυμένων αιμοπεταλίων με τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις των αναστολέων. Δεν παρατηρήθηκε αναστολή της αλληλεπίδρασης της ταλίνης με τον κυτταροσκελετό, όμως παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αναστολή της αλληλεπίδρασης της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό στα 240 sec της ενεργοποίησης. Αξιοσημείωτο είναι επίσης, ότι σε αιμοπετάλια τα οποία επώαστηκαν με τον συνδυασμό των αναστολέων που επιφέρει την ολοκληρωτική αναστολή της συσώρευσης, παρατηρήθηκε αποφασιστική αναστολή της αλληλεπίδρασης ταλίνης –  $\beta_3$  ιντεγκρίνης στα 240 sec της ενεργοποίησης, αποτέλεσμα όμοιο με αυτό που εμφάνισε η επίδραση του pal-1000-1008 σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$ .

Σε ότι αφορά την από έξω προς τα μέσα σηματοδότηση (outside-in signaling) διακρίνουμε δυο στάδια: την αρχή μετάδοσης του σήματος, που αφορά αμέσως μετά την πρόσδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα και την μετασυσσωρευτική μετάδοση του σήματος. Στο πρώτο στάδιο εμπλέκονται πρωτεϊνικές κινάσες, όπως η Syk και η Src.

#### IV) Συζήτηση

Αυτές με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες, που μεταφέρουν σήματα στον κυτταροσκελετό. Στο δεύτερο στάδιο και κατά την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού συμμετέχουν άλλες πρωτεΐνες, όπως η Rac, η PAK, η κινάση της PI-3 (PI-3 Kinase). Σημαντικό ρόλο στο μετασυσσωρευτικό αυτό στάδιο παίζουν η φωσφορυλίωση της  $\beta_3$  υπομονάδας στις θέσεις 747Y και 759Y, η φωσφολιπάση  $C_\gamma$  και η  $\alpha$ -ακτινίνη. Η φωσφορυλίωση της  $\beta_3$  υπομονάδας βοηθάει στην ενεργοποίηση της της μυοσίνης σταθεροποιώντας έτσι το αιμοπεταλιακό συσσωμάτωμα. Η  $PLC_\gamma$  βοηθάει στη γένεση της DAG και της  $IP_3$  ενισχύοντας τη συσσωμάτωση, ενώ η  $\alpha$ -ακτινίνη περιέχει θέσεις πρόσδεσης για τη βινκουλίνη (vinculin), ενώ η  $\alpha$ -ακτινίνη φωσφορυλιώνεται πιθανόν με τη συμμετοχή της FAK, της οποίας η ενεργοποίηση εξαρτάται από τον πολυμερισμό της ακτίνης [381]. Μια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η προσθήκη του κυκλικού RGD πεπτιδίου μειώνει σημαντικά την ήδη φωσφορυλιωμένη FAK σε σχέση με αυτή λόγω της θρομβίνης [382].

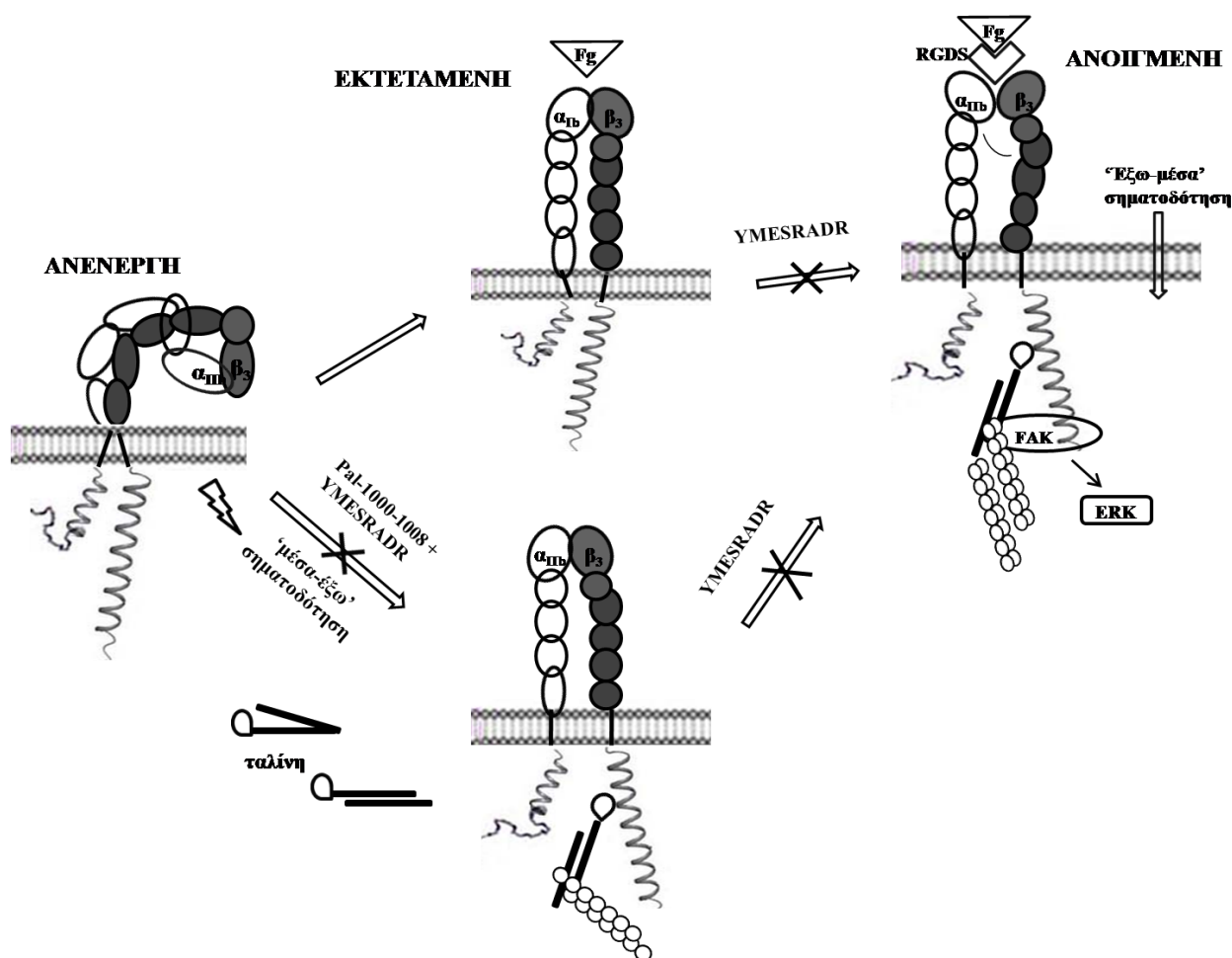
Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης, όπου χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα της p-FAK. Ο συνδυασμός των αναστολέων φάνηκε να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της FAK, σε συγκεντρώσεις τέτοιες που το κάθε πεπτίδιο από μόνο του δεν ήταν ικανό να αναστείλει τη φωσφορυλίωση. Ο συνδυασμός επίσης ανέστειλε σε μεγαλύτερο βαθμό τη φωσφορυλίωση της FAK από τον RGDS αναστολέα στη μέγιστη ανασταλτική του συγκέντρωση.

Με την από έξω προς τα μέσα σηματοδότηση εμπλέκεται και το μονοπάτι των MAP κινασών, όπου οι πρωτεΐνες ERK 1 και ERK 2 ενεργοποιούνται με διαδοχικές φωσφορυλίωσεις μέσω άλλων κινασών, όπως της Raf και της MEK. Έχει βρεθεί ότι μέγιστη φωσφοτυροσιλίωση και ενεργοποίηση της ERK 2 (42Kd) εμφανίζεται αργά κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων από θρομβίνη. Εξάλλου, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω ενός RGDS πεπτιδίου οδήγησε σε διπλασιασμό της φωσφορυλίωσης της. Αυτό γιατί κατά την αιμοπεταλιακή συσσώρευση ο  $\alpha_{IIb}\beta_3$  υποδοχέας με κάποιο τρόπο αποτρέπει την επαγόμενη από θρομβίνη φωσφορυλίωση της ERK 2 [235]. Σε ό,τι αφορά την πρωτεΐνη ERK φαίνεται να συμμετέχει τόσο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα (inside-out signaling), όσο και στην 'έξω - μέσα' σηματοδότηση (outside-in signaling). Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης με εξειδικευμένα αντισώματα κατά της φωσφοτυροσιλιωμένης ERK (p-ERK), έδειξαν ότι ο συνδυασμός των αναστολέων, στις συγκεντρώσεις κατωφλίου ως προς την αναστολή, ανέστειλε την φωσφορυλίωση της



ERK 2 σε μεγαλύτερο βαθμό από το κάθε ένα πεπτίδιο στη μέγιστη του συγκέντρωση ως προς την αναστολή. Το RGDS ανάλογο, όπως είναι γνωστό και από τη βιβλιογραφία, δεν ανέστειλε τη φωσφορυλίωση της ERK.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του εξωκυττάριου αναστολέα στη μέγιστη ανασταλτική του συγκέντρωση καθώς και ο συνδυασμός του ενδοκυττάριου με τον εξωκυττάριο αναστολέα απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα.



**Εικόνα.1.** Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του συνδυασμού των, προερχόμενων από την  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδα της ιντεγκρίνης, pal-LEEDDEEGE και YMESRADR αναστολέων στην διπλής κατεύθυνσης ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , καθώς και του εξωκυττάριου αναστολέα YMESRADR στις δύο σηματοδοτικές πορείες ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης. Με X αναπαρίσταται η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων στα αντίστοιχα μονοπάτια σηματοδότησης.

#### *IV) Συζήτηση*

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο συνδυασμός των αναστολέων δρα ως ένα μη RGD ανάλογο, επάγει την αναστολή της ιντεγκρίνης με αλλοστερικό τρόπο και έτσι μπορεί να παρέχει μια εναλλακτική φαρμακολογική προσέγγιση, η οποία θα αποκλείει τα μειονεκτήματα των RGD  $\alpha_{IIb}\beta_3$  – ανταγωνιστών. Τέλος, μπορεί για τον παραπάνω λόγο να αποτελεί μια ικανή θεραπευτική προσέγγιση στη θρόμβωση.

# Περίληψη

## Πεπτιδικά ανάλογα της αιμοπεταλιακής ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Δράση τους ως αλλοστερικοί αναστολείς της ενεργοποίησης της

Αλεξία Β. Γκουρογιάννη

Διδακτορική Διατριβή

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ο σχηματισμός του αιμοπεταλιακού θρόμβου είναι μια αναγκαία, φυσιολογική αλλά και παθολογική αντίδραση που εξαρτάται από την ικανότητα των αιμοπεταλίων να συσσωρεύονται. Η αιμοπεταλιακή συσσώρευση μεσολαβείται από την αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa). Στα εφησυχασμένα αιμοπετάλια η  $\alpha_{IIb}\beta_3$  βρίσκεται στην ανενεργή της κατάσταση μη μπορώντας να αλληλεπιδράσει με το διαλυτό ινωδογόνο. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  επάγει το διαχωρισμό των κυτταροπλασματικών της ουρών μέσω της πρόσδεσης της ταλίνης στη  $\beta_3$  υπομονάδα, καθώς και διαμορφωτικές αλλαγές στην ιντεγκρίνη, οι οποίες αυξάνουν δραματικά τη συγγένεια της ιντεγκρίνης για το πρόσδεμα. Έπειτα από τη πρόσδεση του ινωδογόνου, επάγεται η ‘έξω-μέσα’ σηματοδότηση της, η οποία ενισχύει περαιτέρω την ενεργοποίηση και τη σταθεροποίηση του θρόμβου. Η αύξηση της συγγένειας της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  για το πρόσδεμα βασίζεται σε διαμορφωτικές αλλαγές, γνωστές ως ‘επέκταση’ της ιντεγκρίνης στα γόνατα, διαχωρισμός των υπομονάδων της και μια κίνηση προς τα έξω της διεπαφής ανάμεσα στη βΙ και υβριδική περιοχή της  $\beta_3$  υπομονάδας, μετατρέποντας τη κεφαλή από «κλειστή» σε «ανοιχτή» διαμόρφωση, διευκολύνοντας τη πρόσδεση του ινωδογόνου.

Έχει αποδειχτεί ότι οκταπεπτίδιο που αντιστοιχεί στη 313-320 αλληλουχία της β-προπέλας της  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδας αποτελεί ισχυρό αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Μετά από πειράματα κρυσταλλοποίησης της εξωκυττάριας περιοχής της ιντεγκρίνης στην ανενεργή διαμόρφωση, φάνηκε ότι η YMESRADR αλληλουχία λειτουργεί ως μια θηλειά, φουρκέτα «μανταλάκι» που συγκρατεί κοντά τη βΙ και

υβριδική περιοχή της  $\beta_3$  υπομονάδας διαμέσου των:  $D^{319}(\alpha_{IIb})-K^{384}(\beta_3)$  και  $R^{320}(\alpha_{IIb})-E^{356}(\beta_3)$  γεφυρών άλατος. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η περεταίρω διερεύνηση και εξήγηση του μηχανισμού της ανασταλτικής δράσης του  $^{313}YMESRADR^{320}$  πεπτιδίου στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Οι δομικές προαπαιτήσεις της περιοχής αυτής ως προς την έκφραση της βιολογικής της δράσης μελετήθηκε i) με τη μέθοδο της συσσωρευομετρίας σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια, ii) με πειράματα κυτταρομετρίας ροής, iii) με πειράματα προσκόλλησης CHO κυττάρων στο ακινητοποιημένο ινωδογόνο υπό συνθήκες ροής και iv) με τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της ταλίνης με την ιντεγκρίνη έπειτα από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη.

Στη παρούσα εργασία, φάνηκε ότι το YMESRADR ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τη πρόσδεση του ινωδογόνου και του PAC-1 στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη, η υποκατάσταση με αλανίνη αμινοξέων σε διαφορετικές θέσεις της 313-320 αλληλουχίας, τόνισε τη σημασία των  $D^{319}$ ,  $R^{317}$ ,  $R^{320}$  και  $Y^{313}$  ως προς την ανασταλτική δράση του πεπτιδίου. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της προσκόλλησης των CHO κυττάρων στο ινωδογόνο έπειτα από επώαση τους με 500  $\mu M$  YMESRADR, ενώ σε CHO κύτταρα που εξέφρασαν τη μετάλλαξη  $\beta_3 K^{384}/A$  δεν παρατηρήθηκε η παραπάνω αναστολή. Τέλος, έπειτα από πειράματα ανοσοαποτύπωσης φάνηκε ότι το οκταπεπτίδιο δεν επηρέασε καθόλου την αλληλεπίδραση της ταλίνης με τη  $\beta_3$ -ιντεγκρίνη, η οποία επάγεται κατά την ενεργοποίηση από θρομβίνη. Έτσι, από τα παραπάνω προκύπτει ότι η θηλειά αυτή διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ιντεγκρίνης στην ανενεργή της μορφή, πράγμα το οποίο εμποδίζει την αλλαγή στη διαμόρφωση της ιντεγκρίνης που επάγεται κατά την κατάληψη της από το πρόσδεμα.

Από προηγούμενα πειράματα βρέθηκε ότι, ένα λιπιδιακά τροποποιημένο πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην όξινη, ενδοκυττάρια, απόμακρη από τη μεμβράνη  $^{1000}LEEDDEEGE^{1008}$  αλληλουχία (pal-1000-1008) της  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδας αποτελεί πολύ ισχυρό αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και έπειτα από μελέτες, σε τροποποιημένα με αλανίνη πεπτίδια της ίδιας αλληλουχίας, βρέθηκε ότι το συνολικό φορτίο, μέγεθος και η πρωτοταγής δομή του διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο ως προς την έκφραση της βιολογικής του δράσης. Έπειτα από πειράματα κυτταρομετρίας ροής φάνηκε ότι το pal-1000-1008 στα 100  $\mu M$  ανέστειλε τη πρόσδεση του ινωδογόνου και του PAC-1 σε ενεργοποιημένα από ADP αιμοπετάλια.

Ακολούθησε η διερεύνηση του μηχανισμού της ανασταλτικής δράσης ως προς τη πρόσδεση της ταλίνης με την ιντεγκρίνη, βήμα ικανό και αναγκαίο στη ‘μέσα-έξω’ σηματοδότηση της ιντεγκρίνης. Η πρόσδεση της ταλίνης επάγει το διαχωρισμό των κυτταροπλασματικών  $\alpha_{IIb}$  και  $\beta_3$  άκρων, το οποίο αποδεδειγμένα ενεργοποιεί την ιντεγκρίνη. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το pal-1000-1008 τροποποίησε τη παραπάνω αλληλεπίδραση. Με την παρουσία του πεπτιδίου, η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται παροδική και σταματά από το δεύτερο λεπτό της ενεργοποίησης και έπειτα. Έτσι, με την αναστολή της αλληλεπίδρασης ταλίνης-ιντεγκρίνης, το πεπτίδιο φαίνεται να αποκαθιστά τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην  $\alpha_{IIb}$  και  $\beta_3$  υπομονάδα και να επαναφέρει έτσι την ισορροπία που υπάρχει στην ανενεργή μορφή της ιντεγκρίνης και στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Αυτή η προσέγγιση της ιντεγκρίνης, μέσω ενδοκυττάρων αναστολέων, μπορεί να είναι πολλά υποσχόμενη για την ανάπτυξη μελλοντικών αντιθρομβωτικών φαρμάκων.

Ο τελικός στόχος της παρούσας διατριβής, ήταν η διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης του ενδοκυττάριου με τον εξωκυττάριο αναστολέα στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση και ενεργοποίηση, στη ‘μέσα-έξω’ ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης καθώς και στη φωσφορυλίωση των δύο σηματοδοτικών πρωτεϊνών όπως η FAK και η ERK. Τα πεπτίδια σε συγκεντρώσεις κατωφλίου ως προς την αναστολή φάνηκαν να είναι ικανά να προκαλούν σχεδόν 100% αναστολή της συσσώρευσης. Η επώαση πρώτα με το pal-1000-1008 στα 50  $\mu$ M και έπειτα με το YMESRADR στα 75  $\mu$ M έδειξε συνεργιστική ανασταλτική δράση ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Η συνεργιστική ανασταλτική τους δράση ως προς τη πρόσδεση του ινωδογόνου και του PAC-1 στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια έδειξε την ικανότητα τους να αναστέλλουν την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Επιπλέον θέλαμε να διερευνήσουμε το μηχανισμό της παραπάνω αναστολής ως προς την αναστολή της αλληλεπίδρασης της ταλίνης με την  $\beta_3$ -ιντεγκρίνη. Πολύ ενδιαφέρον παρουσίασε το αποτέλεσμα το οποίο έδειξε ότι η συνεργιστική δράση των πεπτιδίων ανέστειλε την παραπάνω αλληλεπίδραση με αποφασιστικό τρόπο στο 4 λεπτό της ενεργοποίησης. Η φωσφορυλίωση της FAK είναι ένα μετα-συσσωρευματικό γεγονός, ενώ η δράση της ERK δεν εξαρτάται από την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωση της αυξάνεται από τους RGD- ανταγωνιστές της πρόσδεσης του ινωδογόνου. Ο συνδυασμός των πεπτιδίων, στις συγκεντρώσεις κατωφλίου ως προς την αναστολή, ανέστειλε τη φωσφορυλίωση της FAK αλλά και της ERK2.

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι η αλλοστερική αναστολή, επαγόμενη από τον συνδυασμό του όξινου ενδοκυττάριου αναστολέα μαζί με τον εξωκυττάριο, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να παρέχει μια εναλλακτική φαρμακολογική προσέγγιση έναντι των μέχρι τώρα RGD πεπτιδικών ανταγωνιστών της ιντεγκρίνης καθώς και μια δυναμική θεραπευτική προσέγγιση στο σχηματισμό του θρόμβου και σε παθολογικές ασθένειες.

# Abstract

## Peptide analogs of platelet integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . Their action as allosteric inhibitors of its activation

Alexia V. Gkourogianni

Doctoral Dissertation

Department of Chemistry, University of Ioannina

Platelet thrombus formation is an essential, physiological and pathological reaction that depends on platelets' ability to aggregate. Platelet aggregation is mediated by the platelet integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  (GPIIb/IIIa). In resting platelets the integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  is in a low-affinity state, unable to interact with soluble fibrinogen. During platelet activation, inside-out signalling induces cytoplasmic tail separation through talin binding to  $\beta_3$  tail and conformational changes of the integrin that dramatically increase its affinity for the ligand. Following fibrinogen binding, integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , generates "outside-in" signals which further enhance platelet activation and contribute to thrombus consolidation and stabilization. Integrin affinity increase relies on several major conformational changes, namely integrin extension at the knees, leg separation, and a  $\beta_3$  subunit swing-out motion at the interface between the  $\beta\text{I}$  and hybrid domains, converting the headpiece from the 'closed' to 'open' conformation, thus facilitating ligand binding by the headpiece.

It has been proved that the octapeptide YMESRADR derived from the  $\beta$ -propeller domain of integrin  $\alpha_{\text{IIb}}$  is an active inhibitor of platelet aggregation. It was also shown crystallography modelling analysis, that it is able to act as a substitute for the  $\beta$ -ribbon by forming a clasp restraining the  $\beta_3$  hybrid and  $\beta\text{I}$  domains in a closed conformation through the salt bridges: D<sup>319</sup>( $\alpha_{\text{IIb}}$ )-K<sup>384</sup>( $\beta_3$ ) and R<sup>320</sup>( $\alpha_{\text{IIb}}$ )-E<sup>356</sup>( $\beta_3$ ). The purpose of this study was to investigate further and explain the mechanism of the inhibitory effect of the YMESRADR octapeptide on integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  activation. The inhibitory effect of the peptide and its structural requirements for its inhibitory activity was tested i) in light-transmission aggregometry in human washed platelets ii) in flow cytometry experiments,

iii) in CHO cells adhesion under flow conditions and iv) in upon thrombin-induced talin recruitment to platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

Our experimental data showed that the octapeptide inhibited thrombin-induced platelet aggregation, fibrinogen and PAC-1 binding to activated platelets, alanine replacement or deletion of the amino acids of the octapeptide underline the importance of D<sup>319</sup>, R<sup>317</sup>, R<sup>320</sup>, as well as Y<sup>313</sup> for the inhibitory activity of the peptide. YMESRADR at 500  $\mu$ M also strongly impaired adhesion onto fibrinogen under flow of CHO cells expressing either the wild type receptor or the receptor with mutations in the  $\alpha_{IIb}$   $\beta$ -ribbon. Additionally, the octapeptide at the above concentration was unable to inhibit adhesion of CHO cells expressing the  $\beta_3$ K<sup>384</sup>/A mutant, demonstrating the important role played by the salt bridge between D<sup>319</sup>-K<sup>384</sup> ( $\beta_3$ ) in the octapeptide's inhibitory activity. Finally, after western blotting experiments it was shown that the octapeptide did not affect the association of talin with the integrin  $\beta_3$  cytoplasmic tail, which occurs during platelet activation induced by thrombin. Our data and those of the literature highlight the important role of the  $\alpha_{IIb}$   $\beta$ -ribbon in maintaining the closed inactive conformation of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  by securing the hinge angle between the  $\beta$ I and the hybrid domain. This precludes conformational changes necessary for the extension of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  to its high-affinity ligand-binding state.

It was previously shown by our experiments, that a lipid-modified platelet permeable peptide, which corresponds to the intracellular acidic membrane distal sequence <sup>1000</sup>LEEDDEEGE<sup>1008</sup> of  $\alpha_{IIb}$ , pal-1000-1008, potently inhibits thrombin induced human platelet aggregation and after alanine-scanning test of this amino-acid sequence we concluded that, the total charge, size and peptide's complete primary structure play an important role in the expression of the biological activity and none of the residues seems to support the entire activity. After flow cytometry experiments, we showed that pal-1000-1008 peptide at 100  $\mu$ M significantly inhibited PAC-1 and fibrinogen binding to ADP-activated platelets.

The investigation of the mechanism of the above binding inhibition through the inhibitory activity of the peptide on talin binding to the  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , necessary and sufficient step of the inside-out signaling of the integrin was followed. Talin binding breaks the clasp between the  $\alpha$  and  $\beta$  cytoplasmic tails, induces integrin cytoplasmic tail separation, resulting in integrin activation, by inducing significant changes in the integrin structure. Our results showed that, pal-K-1000-1008 modified the association of talin with the



integrin  $\beta_3$  cytoplasmic tail, which occurred during platelet activation induced by thrombin. In presence of the peptide, this association becomes transient and begins to disappear from the second min of aggregation and then. Thus, by inhibiting talin-integrin interaction, the peptide seems to rearrange  $\alpha$ - $\beta$  tail associations, and to restore the equilibrium of the inactive state of the integrin, leading to platelet aggregation inhibition. It has been suggested that modulation of integrin–talin interactions may provide an attractive target for antithrombotics. The intracellular peptide approach of the present study could be promising for the development of future anti-thrombotic drugs.

Our final aim of the present thesis was the investigation of the existence of a synergistic inhibitory effect of the intra- and extracellular peptide on platelet activation and aggregation, on integrin inside-out signalling as well as on the phosphorylation of signalling proteins FAK and ERK. The peptides, at threshold inhibitory concentrations, added consecutively, were able to provoke almost full inhibition of platelet aggregation. The incubation, firstly with pal-K-1000-1008 at 50  $\mu$ M followed by YMESRADR at 75  $\mu$ M, showed also a synergistic inhibitory activity on platelet activation. Their synergistic inhibitory effect on fibrinogen and on PAC-1 binding to activated platelets shows their ability to inhibit, when added consequently, the activation of the integrin. Furthermore, we wanted to investigate the mechanism of the above binding inhibition through the inhibitory activity of the peptides on talin binding to the  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Interestingly, we found that the synergistic effect of the peptides inhibited the association of talin with  $\beta_3$  integrin at the fourth min of activation by thrombin. FAK phosphorylation is a post-aggregation event. ERK activation is independent from platelet aggregation and its phosphorylation and activity are enhanced by fibrinogen competitive RGD-peptide inhibitors. The combination of peptides, at the above concentrations, inhibited FAK phosphorylation as well as ERK2 phosphorylation.

In conclusion, this study shows for the first time, that an allosteric inhibition of  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , induced by the use of the intracellular in combination with the extracellular peptide inhibitor, at threshold inhibitory concentrations, may provide an alternative pharmacological approach to the current  $\alpha_{IIb}\beta_3$  RGD-like antagonists and provide new potential therapeutic approach to thrombus formation and pathological diseases.



## Βιβλιογραφία

1. Bluteau D, Lordier L, Di Stefano A, Chang Y, Raslova H, Debili N, Vainchenker W. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2009, **7 Suppl 1**:227-234.
2. Machlus KR, Thon JN, Italiano JE, Jr. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *British journal of haematology* 2014, **165**:227-236.
3. Frojmovic MM, Panjwani R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophysical journal* 1976, **16**:1071-1089.
4. George JN. Platelets. *Lancet* 2000, **355**:1531-1539.
5. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *International journal of laboratory hematology* 2013, **35**:254-261.
6. White J, Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. Basic Principles and Clinical Practice. Anatomy and structural organization of the platelet. Hemostasis and Thrombosis. 1994.
7. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine* 2002, **8**:1227-1234.
8. Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 2003, **28**:257-264.
9. Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *Journal of cardiovascular translational research* 2013, **6**:299-309.
10. Behnke O. The morphology of blood platelet membrane systems. *Series haematologica* 1970, **3**:3-16.
11. White JG. The substructure of human platelet microtubules. *Blood* 1968, **32**:638-648.
12. Collier BS. Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1983, **416**:693-708.
13. Sixma JJ, Lips PM. Isolation of platelet membranes. A review. *Thrombosis and haemostasis* 1978, **39**:328-337.
14. Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handbook of experimental pharmacology* 2012:3-22.
15. Schick PK, Kurica KB, Chacko GK. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *The Journal of clinical investigation* 1976, **57**:1221-1226.
16. Perret B, Chap HJ, Douste-Blazy L. Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases

- and a rapid method for membrane isolation. *Biochimica et biophysica acta* 1979, **556**:434-446.
17. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochimica et biophysica acta* 1983, **736**:57-66.
  18. Comfurius P, Senden JM, Tilly RH, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RF. Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochimica et biophysica acta* 1990, **1026**:153-160.
  19. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thrombosis and haemostasis* 2002, **88**:186-193.
  20. Ginsberg MH, Xiaoping D, O'Toole TE, Loftus JC, Plow EF. Platelet integrins. *Thrombosis and haemostasis* 1993, **70**:87-93.
  21. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of leukocyte biology* 2008, **83**:536-545.
  22. Pollard TD. Actin. *Current opinion in cell biology* 1990, **2**:33-40.
  23. Escolar G, Krumwiede M, White JG. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *The American journal of pathology* 1986, **123**:86-94.
  24. Fox JE, Phillips DR. Inhibition of actin polymerization in blood platelets by cytochalasins. *Nature* 1981, **292**:650-652.
  25. White JG, Radha E, Krumwiede M. Isolation of circumferential microtubules from platelets without simultaneous fixation. *Blood* 1986, **67**:873-877.
  26. Sixma JJ, Slot JW, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. *Methods in enzymology* 1989, **169**:301-311.
  27. Harrison P, Savidge GF, Cramer EM. The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *British journal of haematology* 1990, **74**:125-130.
  28. Koseoglu S, Flaumenhaft R. Advances in platelet granule biology. *Current opinion in hematology* 2013, **20**:464-471.
  29. Jones OP. Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles. *The Anatomical record* 1960, **138**:105-113.
  30. Troxler M, Dickinson K, Homer-Vanniasinkam S. Platelet function and antiplatelet therapy. *The British journal of surgery* 2007, **94**:674-682.
  31. Holmsen H. Significance of testing platelet functions in vitro. *European journal of clinical investigation* 1994, **24 Suppl 1**:3-8.
  32. Berger G, Masse JM, Cramer EM. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood* 1996, **87**:1385-1395.
  33. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* 2009, **23**:177-189.
  34. Skaer RJ, Emmines JP, Peters PD. Platelet dense bodies: a quantitative microprobe analysis. *Journal of cell science* 1976, **20**:441-457.

35. Martin JH, Carson FL, Race GJ. Calcium-containing platelet granules. *The Journal of cell biology* 1974, **60**:775-777.
36. Stenberg PE. Ultrastructural organization of maturing megakaryocytes. *Progress in clinical and biological research* 1986, **215**:373-386.
37. Dangelmaier CA, Holmsen H. Determination of acid hydrolases in human platelets. *Analytical biochemistry* 1980, **104**:182-191.
38. White JG. Interaction of membrane systems in blood platelets. *The American journal of pathology* 1972, **66**:295-312.
39. Michelson AD. Thrombin-induced down-regulation of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 1992, **18**:18-27.
40. Cutler L, Rodan G, Feinstein MB. Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPases in the dense tubular system of human blood platelets. *Biochimica et biophysica acta* 1978, **542**:357-371.
41. Gerrard JM, White JG, Peterson DA. The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. *Thrombosis and haemostasis* 1978, **40**:224-231.
42. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews* 2011, **25**:155-167.
43. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nunez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 2009, **94**:700-711.
44. Bourdounis A, Stasinou T, Kachrilas S, Papatsoris AG, Buchholz N, Masood J. Thromboprophylaxis and bleeding diathesis in minimally invasive stone surgery. *Nature reviews Urology* 2014, **11**:51-58.
45. DelGiudice LA, White GA. The role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in health and disease states. *Journal of veterinary emergency and critical care* 2009, **19**:23-29.
46. Hackeng TM, Rosing J. Protein S as cofactor for TFPI. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009, **29**:2015-2020.
47. Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood reviews* 2009, **23**:225-229.
48. Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Annals of internal medicine* 2003, **138**:128-134.
49. Adams RL, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology* 2009, **14**:462-470.
50. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is

- present in the atherosclerotic lesion. *The Journal of clinical investigation* 1996, **97**:1715-1722.
51. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008, **28**:403-412.
  52. Furie B, Furie BC. In vivo thrombus formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007, **5 Suppl 1**:12-17.
  53. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010, **30**:2341-2349.
  54. Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* 1986, **46**:185-190.
  55. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1997, **29**:91-105.
  56. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003, **102**:449-461.
  57. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, de Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2004, **2**:561-573.
  58. Kauskot A, Hoylaerts MF. Platelet receptors. *Handbook of experimental pharmacology* 2012:23-57.
  59. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2005, **3**:1752-1762.
  60. Rooney MM, Farrell DH, van Hemel BM, de Groot PG, Lord ST. The contribution of the three hypothesized integrin-binding sites in fibrinogen to platelet-mediated clot retraction. *Blood* 1998, **92**:2374-2381.
  61. Parise LV, Phillips DR. Reconstitution of the purified platelet fibrinogen receptor. Fibrinogen binding properties of the glycoprotein IIb-IIIa complex. *The Journal of biological chemistry* 1985, **260**:10698-10707.
  62. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987, **238**:491-497.
  63. Doolittle RF, Watt KW, Cottrell BA, Strong DD, Riley M. The amino acid sequence of the alpha-chain of human fibrinogen. *Nature* 1979, **280**:464-468.
  64. Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J. 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* 1984, **23**:1767-1774.
  65. Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**:16637-16643.
  66. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2005, **3**:1894-1904.

67. Springer TA, Zhu J, Xiao T. Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen gammaC peptide by the platelet integrin alphaIIb beta3. *The Journal of cell biology* 2008, **182**:791-800.
68. Kloczewiak M, Timmons S, Bednarek MA, Sakon M, Hawiger J. Platelet receptor recognition domain on the gamma chain of human fibrinogen and its synthetic peptide analogues. *Biochemistry* 1989, **28**:2915-2919.
69. Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**:10729-10732.
70. Gartner TK, Bennett JS. The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. *The Journal of biological chemistry* 1985, **260**:11891-11894.
71. Bennett J, Shattil S, Power J, Gartner T. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor. Differential effects of alpha and gamma chain fibrinogen peptides on the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1988 **263**:12948-12953.
72. Bennett JS. Novel platelet inhibitors. *Annual review of medicine* 2001, **52**:161-184.
73. Santoro SA, Lawing WJ, Jr. Competition for related but nonidentical binding sites on the glycoprotein IIb-IIIa complex by peptides derived from platelet adhesive proteins. *Cell* 1987, **48**:867-873.
74. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation research* 2006, **99**:1293-1304.
75. Woulfe D, Yang J, Prevost N, O'Brien P, Fortna R, Tognolini M, Jiang H, Wu J, Brass LF. Signaling receptors on platelets and megakaryocytes. *Methods in molecular biology* 2004, **273**:3-32.
76. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2009, **7**:1057-1066.
77. Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, Housman DE, Graybiel AM. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nature medicine* 2004, **10**:982-986.
78. French DL, Seligsohn U. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors and Glanzmann's thrombasthenia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000, **20**:607-610.
79. Miranti CK, Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature cell biology* 2002, **4**:E83-90.
80. Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 2002, **31**:485-516.
81. Liddington RC, Ginsberg MH. Integrin activation takes shape. *The Journal of cell biology* 2002, **158**:833-839.
82. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiological reviews* 2013, **93**:327-358.

83. Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annual review of biochemistry* 1988, **57**:915-956.
84. Davey MG, Luscher EF. Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets. *Nature* 1967, **216**:857-858.
85. Eidt JF, Allison P, Noble S, Ashton J, Golino P, McNatt J, Buja LM, Willerson JT. Thrombin is an important mediator of cyclic coronary blood flow variations due to platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries. *Transactions of the Association of American Physicians* 1988, **101**:125-136.
86. Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF. Platelet signaling. *Handbook of experimental pharmacology* 2012:59-85.
87. Watts IS, Keery RJ, Lumley P. Differential ability of agonists to express distinct pools of fibrinogen (GpIIb/IIIa) receptors which can mediate the aggregation of human platelets. *Thrombosis and haemostasis* 1989, **62**:955-961.
88. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998, **391**:591-594.
89. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2013, **11**:2-16.
90. Barr AJ, Brass LF, Manning DR. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**:2223-2229.
91. Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**:11023-11027.
92. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiological reviews* 2004, **84**:579-621.
93. Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nature reviews Drug discovery* 2003, **2**:15-28.
94. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *The Journal of clinical investigation* 1999, **103**:879-887.
95. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr., Tam C, Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 1998, **394**:690-694.
96. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**:6642-6646.



97. De Candia E, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, De Cristofaro R. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**:4692-4698.
98. Ramakrishnan V, DeGuzman F, Bao M, Hall SW, Leung LL, Phillips DR. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**:1823-1828.
99. Keuren JF, Wielders SJ, Ulrichts H, Hackeng T, Heemskerk JW, Deckmyn H, Bevers EM, Lindhout T. Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through protease-activated receptor-1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005, **25**:1499-1505.
100. Hamilton JR, Cornelissen I, Coughlin SR. Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2004, **2**:1429-1435.
101. Murugappa S, Kunapuli SP. The role of ADP receptors in platelet function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2006, **11**:1977-1986.
102. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 1997, **389**:183-186.
103. Mangin P, Ohlmann P, Eckly A, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2004, **2**:969-977.
104. Jin J, Quinton TM, Zhang J, Rittenhouse SE, Kunapuli SP. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A(2) generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin alpha(IIb)beta(3) and ADP receptors. *Blood* 2002, **99**:193-198.
105. Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**:46035-46042.
106. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**:8070-8074.
107. Quinton TM, Kim S, Dangelmaier C, Dorsam RT, Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. *The Biochemical journal* 2002, **368**:535-543.
108. Ohlmann P, Laugwitz KL, Nurnberg B, Spicher K, Schultz G, Cazenave JP, Gachet C. The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *The Biochemical journal* 1995, **312** ( Pt 3):775-779.

109. Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Martinez C, Lecchi A, Conley PB, Ware J, Ruggeri ZM. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor of a patient with congenital bleeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**:1978-1983.
110. Storey RF, Judge HM, Wilcox RG, Heptinstall S. Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin. *Thrombosis and haemostasis* 2002, **88**:488-494.
111. Porto I, Giubilato S, De Maria GL, Biasucci LM, Crea F. Platelet P2Y<sub>12</sub> receptor inhibition by thienopyridines: status and future. *Expert opinion on investigational drugs* 2009, **18**:1317-1332.
112. Rolf MG, Brearley CA, Mahaut-Smith MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X<sub>1</sub> purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thrombosis and haemostasis* 2001, **85**:303-308.
113. Siraganian RP, Osler AG. Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. II. Evidence for basophil involvement. *Journal of immunology* 1971, **106**:1252-1259.
114. Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *Journal of lipid research* 1993, **34**:691-702.
115. Imaizumi TA, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *Journal of internal medicine* 1995, **238**:5-20.
116. Koltai M, Braquet PG. Involvement of PAF in atherogenesis. Brief review. *Agents and actions Supplements* 1992, **37**:333-339.
117. Kroegel C, Yukawa T, Westwick J, Barnes PJ. Evidence for two platelet activating factor receptors on eosinophils: dissociation between PAF-induced intracellular calcium mobilization degranulation and superoxides anion generation in eosinophils. *Biochemical and biophysical research communications* 1989, **162**:511-521.
118. Burgers JA, Akkerman JW. Regulation of the receptor for platelet-activating factor on human platelets. *The Biochemical journal* 1993, **291 ( Pt 1)**:157-161.
119. Chignard M, Le Couedic JP, Tence M, Vargaftig BB, Benveniste J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature* 1979, **279**:799-800.
120. Blank ML, Lee T, Fitzgerald V, Snyder F. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *The Journal of biological chemistry* 1981, **256**:175-178.
121. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**:17895-17898.
122. Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacology & therapeutics* 1991, **49**:153-179.

123. Patrono C, Garcia Rodriguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *The New England journal of medicine* 2005, **353**:2373-2383.
124. Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *The Journal of clinical investigation* 1996, **97**:949-956.
125. Habib A, FitzGerald GA, Macclouf J. Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**:2645-2651.
126. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *The American journal of cardiology* 1991, **68**:11B-15B.
127. Thomas DW, Mannon RB, Mannon PJ, Latour A, Oliver JA, Hoffman M, Smithies O, Koller BH, Coffman TM. Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2. *The Journal of clinical investigation* 1998, **102**:1994-2001.
128. Brass LF, Shaller CC, Belmonte EJ. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *The Journal of clinical investigation* 1987, **79**:1269-1275.
129. Rao AK, Willis J, Kowalska MA, Wachtfogel YT, Colman RW. Differential requirements for platelet aggregation and inhibition of adenylate cyclase by epinephrine. Studies of a familial platelet alpha 2-adrenergic receptor defect. *Blood* 1988, **71**:494-501.
130. Kaywin P, McDonough M, Insel PA, Shattil SJ. Platelet function in essential thrombocythemia. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet alpha-adrenergic receptors. *The New England journal of medicine* 1978, **299**:505-509.
131. Motulsky HJ, Insel PA. [3H]Dihydroergocryptine binding to alpha-adrenergic receptors of human platelets. A reassessment using the selective radioligands [3H]prazosin, [3H]yohimbine, and [3H]rauwolscine. *Biochemical pharmacology* 1982, **31**:2591-2597.
132. Woulfe D, Jiang H, Mortensen R, Yang J, Brass LF. Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**:23382-23390.
133. Pozgajova M, Sachs UJ, Hein L, Nieswandt B. Reduced thrombus stability in mice lacking the alpha2A-adrenergic receptor. *Blood* 2006, **108**:510-514.
134. Saltzman AG, Morse B, Whitman MM, Ivanshchenko Y, Jaye M, Felder S. Cloning of the human serotonin 5-HT2 and 5-HT1C receptor subtypes. *Biochemical and biophysical research communications* 1991, **181**:1469-1478.

135. Pletscher A. The 5-hydroxytryptamine system of blood platelets: physiology and pathophysiology. *International journal of cardiology* 1987, **14**:177-188.
136. Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *The Journal of clinical investigation* 1998, **101**:479-486.
137. Frojmovic MM. Platelet aggregation in flow: differential roles for adhesive receptors and ligands. *American heart journal* 1998, **135**:S119-131.
138. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F *et al.* A revised model of platelet aggregation. *The Journal of clinical investigation* 2000, **105**:783-791.
139. Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood* 1999, **94**:172-178.
140. Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thrombosis and haemostasis* 1997, **78**:611-616.
141. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998, **94**:657-666.
142. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996, **84**:289-297.
143. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007, **109**:5087-5095.
144. Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB, Reininger AJ. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* 2006, **108**:1903-1910.
145. Maxwell MJ, Westein E, Nesbitt WS, Giuliano S, Dopheide SM, Jackson SP. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood* 2007, **109**:566-576.
146. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2002, **100**:148-152.
147. Dopheide SM, Maxwell MJ, Jackson SP. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood* 2002, **99**:159-167.
148. Brass LF, Zhu L, Stalker TJ. Minding the gaps to promote thrombus growth and stability. *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**:3385-3392.
149. Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007, **5 Suppl 1**:95-101.
150. Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends in molecular medicine* 2004, **10**:179-186.
151. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 1998, **91**:1318-1324.

152. Edgington TS, Dickinson CD, Ruf W. The structural basis of function of the TF. VIIa complex in the cellular initiation of coagulation. *Thrombosis and haemostasis* 1997, **78**:401-405.
153. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Mechanisms involved in platelet procoagulant response. *Advances in experimental medicine and biology* 1993, **344**:195-207.
154. Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *The New England journal of medicine* 1992, **326**:800-806.
155. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British journal of haematology* 2005, **129**:307-321.
156. Di Minno G, Mancini M. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction. *Arteriosclerosis* 1990, **10**:1-7.
157. Lassila R, Peltonen S, Lepantalo M, Saarinen O, Kauhanen P, Manninen V. Severity of peripheral atherosclerosis is associated with fibrinogen and degradation of cross-linked fibrin. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1993, **13**:1738-1742.
158. Dawson S, Henney A. The status of PAI-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review. *Atherosclerosis* 1992, **95**:105-117.
159. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**:21785-21788.
160. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002, **110**:673-687.
161. Faull RJ, Ginsberg MH. Inside-out signaling through integrins. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1996, **7**:1091-1097.
162. Otey CA, Pavalko FM, Burridge K. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *The Journal of cell biology* 1990, **111**:721-729.
163. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004, **104**:1606-1615.
164. Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**:3363-3369.
165. Duperray A, Berthier R, Chagnon E, Ryckewaert JJ, Ginsberg M, Plow E, Marguerie G. Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *The Journal of cell biology* 1987, **104**:1665-1673.
166. Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, Ruggeri ZM. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 1987, **70**:475-483.
167. Collier BS. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *The Journal of clinical investigation* 1997, **99**:1467-1471.
168. Quinn MJ, Byzova TV, Qin J, Topol EJ, Plow EF. Integrin alphaIIb beta3 and its antagonism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003, **23**:945-952.

169. Adair BD, Yeager M. Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIb beta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**:14059-14064.
170. Du X, Ginsberg MH. Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thrombosis and haemostasis* 1997, **78**:96-100.
171. Ma YQ, Qin J, Plow EF. Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007, **5**:1345-1352.
172. Lau TL, Partridge AW, Ginsberg MH, Ulmer TS. Structure of the integrin beta3 transmembrane segment in phospholipid bicelles and detergent micelles. *Biochemistry* 2008, **47**:4008-4016.
173. Anthis NJ, Campbell ID. The tail of integrin activation. *Trends in biochemical sciences* 2011, **36**:191-198.
174. Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, Hu B, Haas T, Plow E, Qin J. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 2002, **110**:587-597.
175. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010, **11**:288-300.
176. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 2001, **294**:339-345.
177. Zhu J, Luo BH, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA. Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Molecular cell* 2008, **32**:849-861.
178. Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA. A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**:40252-40254.
179. Beglova N, Blacklow SC, Takagi J, Springer TA. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nature structural biology* 2002, **9**:282-287.
180. Calvete JJ. Structures of integrin domains and concerted conformational changes in the bidirectional signaling mechanism of alphaIIb beta3. *Experimental biology and medicine* 2004, **229**:732-744.
181. Xiao T, Takagi J, Collier BS, Wang JH, Springer TA. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 2004, **432**:59-67.
182. Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA. Integrins, cations and ligands: making the connection. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2003, **1**:1642-1654.

183. Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002, **296**:151-155.
184. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 1987, **51**:813-819.
185. Chen J, Salas A, Springer TA. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. *Nature structural biology* 2003, **10**:995-1001.
186. Mould AP, Barton SJ, Askari JA, Craig SE, Humphries MJ. Role of ADMIDAS cation-binding site in ligand recognition by integrin alpha 5 beta 1. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**:51622-51629.
187. Scarborough RM, Gretler DD. Platelet glycoprotein IIb-IIIa antagonists as prototypical integrin blockers: novel parenteral and potential oral antithrombotic agents. *Journal of medicinal chemistry* 2000, **43**:3453-3473.
188. Gottschalk KE, Kessler H. The structures of integrins and integrin-ligand complexes: implications for drug design and signal transduction. *Angewandte Chemie* 2002, **41**:3767-3774.
189. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current opinion in cell biology* 2003, **15**:547-556.
190. Frelinger AL, 3rd, Cohen I, Plow EF, Smith MA, Roberts J, Lam SC, Ginsberg MH. Selective inhibition of integrin function by antibodies specific for ligand-occupied receptor conformers. *The Journal of biological chemistry* 1990, **265**:6346-6352.
191. Mould AP. Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *Journal of cell science* 1996, **109 ( Pt 11)**:2613-2618.
192. Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Current opinion in cell biology* 2007, **19**:495-507.
193. Calzada MJ, Alvarez MV, Gonzalez-Rodriguez J. Agonist-specific structural rearrangements of integrin alpha IIb beta 3. Confirmation of the bent conformation in platelets at rest and after activation. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**:39899-39908.
194. Coutinho A, Garcia C, Gonzalez-Rodriguez J, Lillo MP. Conformational changes in human integrin alphaIIb beta3 after platelet activation, monitored by FRET. *Biophysical chemistry* 2007, **130**:76-87.
195. Zhu J, Boylan B, Luo BH, Newman PJ, Springer TA. Tests of the extension and deadbolt models of integrin activation. *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**:11914-11920.
196. Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002, **110**:599-511.

197. Luo BH, Springer TA, Takagi J. A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS biology* 2004, **2**:e153.
198. Luo BH, Springer TA, Takagi J. Stabilizing the open conformation of the integrin headpiece with a glycan wedge increases affinity for ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**:2403-2408.
199. Mould AP, Barton SJ, Askari JA, McEwan PA, Buckley PA, Craig SE, Humphries MJ. Conformational changes in the integrin beta A domain provide a mechanism for signal transduction via hybrid domain movement. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**:17028-17035.
200. Luo BH, Takagi J, Springer TA. Locking the beta3 integrin I-like domain into high and low affinity conformations with disulfides. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**:10215-10221.
201. Yang W, Shimaoka M, Chen J, Springer TA. Activation of integrin beta-subunit I-like domains by one-turn C-terminal alpha-helix deletions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**:2333-2338.
202. Nishida N, Xie C, Shimaoka M, Cheng Y, Walz T, Springer TA. Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity* 2006, **25**:583-594.
203. Iwasaki K, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Fujisawa Y, Kikuchi M, Sekiguchi K, Yamada T. Electron tomography reveals diverse conformations of integrin alphaIIb beta3 in the active state. *Journal of structural biology* 2005, **150**:259-267.
204. Mould AP, Symonds EJ, Buckley PA, Grossmann JG, McEwan PA, Barton SJ, Askari JA, Craig SE, Bella J, Humphries MJ. Structure of an integrin-ligand complex deduced from solution x-ray scattering and site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**:39993-39999.
205. Eng ET, Smagghe BJ, Walz T, Springer TA. Intact alphaIIb beta3 integrin is extended after activation as measured by solution X-ray scattering and electron microscopy. *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**:35218-35226.
206. Luo BH, Springer TA. Integrin structures and conformational signaling. *Current opinion in cell biology* 2006, **18**:579-586.
207. Zhu J, Zhu J, Springer TA. Complete integrin headpiece opening in eight steps. *The Journal of cell biology* 2013, **201**:1053-1068.
208. Zhu J, Carman CV, Kim M, Shimaoka M, Springer TA, Luo BH. Requirement of alpha and beta subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood* 2007, **110**:2475-2483.
209. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology* 2007, **25**:619-647.



210. Cheng M, Li J, Negri A, Collier BS. Swing-out of the beta3 hybrid domain is required for alphaIIb beta3 priming and normal cytoskeletal reorganization, but not adhesion to immobilized fibrinogen. *PLoS one* 2013, **8**:e81609.
211. Kim M, Carman CV, Springer TA. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 2003, **301**:1720-1725.
212. Dennis MS, Henzel WJ, Pitti RM, Lipari MT, Napier MA, Deisher TA, Bunting S, Lazarus RA. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, **87**:2471-2475.
213. Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *The Journal of cell biology* 2002, **157**:265-275.
214. Jenkins AL, Nannizzi-Alaimo L, Silver D, Sellers JR, Ginsberg MH, Law DA, Phillips DR. Tyrosine phosphorylation of the beta3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions. *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**:13878-13885.
215. Golden A, Nemeth SP, Brugge JS. Blood platelets express high levels of the pp60c-src-specific tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, **83**:852-856.
216. Young MA, Gonfloni S, Superti-Furga G, Roux B, Kuriyan J. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 2001, **105**:115-126.
217. Okada M, Nada S, Yamanashi Y, Yamamoto T, Nakagawa H. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *The Journal of biological chemistry* 1991, **266**:24249-24252.
218. Su J, Muranjan M, Sap J. Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts. *Current biology : CB* 1999, **9**:505-511.
219. Woodside DG, Obergfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS, Shattil SJ, Ginsberg MH. Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Current biology : CB* 2001, **11**:1799-1804.
220. Yacoub D, Theoret JF, Villeneuve L, Abou-Saleh H, Mourad W, Allen BG, Merhi Y. Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release. *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**:30024-30035.
221. Arthur WT, Petch LA, Burridge K. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Current biology : CB* 2000, **10**:719-722.
222. Ablooglu AJ, Kang J, Petrich BG, Ginsberg MH, Shattil SJ. Antithrombotic effects of targeting alphaIIb beta3 signaling in platelets. *Blood* 2009, **113**:3585-3592.

223. van der Geer P, Pawson T. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends in biochemical sciences* 1995, **20**:277-280.
224. Phillips DR, Prasad KS, Manganello J, Bao M, Nannizzi-Alaimo L. Integrin tyrosine phosphorylation in platelet signaling. *Current opinion in cell biology* 2001, **13**:546-554.
225. Fox GL, Rebay I, Hynes RO. Expression of DFak56, a Drosophila homolog of vertebrate focal adhesion kinase, supports a role in cell migration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**:14978-14983.
226. Avraham S, London R, Fu Y, Ota S, Hiregowdara D, Li J, Jiang S, Pasztor LM, White RA, Groopman JE *et al.* Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**:27742-27751.
227. Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of cell science* 2003, **116**:1409-1416.
228. Hayashi I, Vuori K, Liddington RC. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nature structural biology* 2002, **9**:101-106.
229. Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Molecular and cellular biology* 1999, **19**:4806-4818.
230. Leu TH, Maa MC. Tyr-863 phosphorylation enhances focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *Oncogene* 2002, **21**:6992-7000.
231. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews Molecular cell biology* 2004, **5**:816-826.
232. Aplin AE, Juliano RL. Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *Journal of cell science* 1999, **112 ( Pt 5)**:695-706.
233. Li Z, Xi X, Du X. A mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin alpha IIb beta3. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**:42226-42232.
234. Garcia A, Shankar H, Murugappan S, Kim S, Kunapuli SP. Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets. *The Biochemical journal* 2007, **404**:299-308.
235. Nadal F, Levy-Toledano S, Grelac F, Caen JP, Rosa JP, Bryckaert M. Negative regulation of mitogen-activated protein kinase activation by integrin alphaIIb beta3 in platelets. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**:22381-22384.
236. McNicol A, Shibou TS, Pampolina C, Israels SJ. Incorporation of map kinases into the platelet cytoskeleton. *Thrombosis research* 2001, **103**:25-34.

237. Flevaris P, Li Z, Zhang G, Zheng Y, Liu J, Du X. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood* 2009, **113**:893-901.
238. Rosado JA, Sage SO. Role of the ERK pathway in the activation of store-mediated calcium entry in human platelets. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**:15659-15665.
239. Partridge AW, Liu S, Kim S, Bowie JU, Ginsberg MH. Transmembrane domain helix packing stabilizes integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in the low affinity state. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**:7294-7300.
240. Lau TL, Dua V, Ulmer TS. Structure of the integrin  $\alpha$ IIb transmembrane segment. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**:16162-16168.
241. Yin H, Litvinov RI, Vilaire G, Zhu H, Li W, Caputo GA, Moore DT, Lear JD, Weisel JW, Degrado WF *et al.* Activation of platelet  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by an exogenous peptide corresponding to the transmembrane domain of  $\alpha$ IIb. *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**:36732-36741.
242. Zhu J, Luo BH, Barth P, Schonbrun J, Baker D, Springer TA. The structure of a receptor with two associating transmembrane domains on the cell surface: integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Molecular cell* 2009, **34**:234-249.
243. Qin J, Vinogradova O, Plow EF. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS biology* 2004, **2**:e169.
244. Vinogradova O, Vaynberg J, Kong X, Haas TA, Plow EF, Qin J. Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**:4094-4099.
245. Ma YQ, Yang J, Pesho MM, Vinogradova O, Qin J, Plow EF. Regulation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation by distinct regions of its cytoplasmic tails. *Biochemistry* 2006, **45**:6656-6662.
246. O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *The Journal of cell biology* 1994, **124**:1047-1059.
247. Aylward K, Meade G, Ahrens I, Devocelle M, Moran N. A novel functional role for the highly conserved alpha-subunit KVGFFKR motif distinct from integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation processes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2006, **4**:1804-1812.
248. Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**:6571-6574.
249. Xi X, Bodnar RJ, Li Z, Lam SC, Du X. Critical roles for the COOH-terminal NITY and RGT sequences of the integrin  $\beta$ 3 cytoplasmic domain in inside-out and outside-in signaling. *The Journal of cell biology* 2003, **162**:329-339.

250. Leisner TM, Wencel-Drake JD, Wang W, Lam SC. Bidirectional transmembrane modulation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 conformations. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**:12945-12949.
251. Koloka V, Christofidou ED, Vaxevelis S, Dimitriou AA, Tsikaris V, Tselepis AD, Panou-Pomonis E, Sakarellos-Daitsiotis M, Tsoukatos DC. A palmitoylated peptide, derived from the acidic carboxyl-terminal segment of the integrin  $\alpha$ IIb cytoplasmic domain, inhibits platelet activation. *Platelets* 2008, **19**:502-511.
252. Li A, Guo Q, Kim C, Hu W, Ye F. Integrin  $\alpha$  tail distal of GFFKR participates in inside-out  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2014.
253. Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of cell science* 2000, **113 ( Pt 20)**:3563-3571.
254. Kashiwagi H, Schwartz MA, Eigenthaler M, Davis KA, Ginsberg MH, Shattil SJ. Affinity modulation of platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by  $\beta$ 3-endonexin, a selective binding partner of the  $\beta$ 3 integrin cytoplasmic tail. *The Journal of cell biology* 1997, **137**:1433-1443.
255. Tsuboi S. Calcium integrin-binding protein activates platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**:1919-1923.
256. Huang H, Vogel HJ. Structural basis for the activation of platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by calcium- and integrin-binding protein 1. *Journal of the American Chemical Society* 2012, **134**:3864-3872.
257. Larkin D, Murphy D, Reilly DF, Cahill M, Sattler E, Harriott P, Cahill DJ, Moran N. ICln, a novel integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-associated protein, functionally regulates platelet activation. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**:27286-27293.
258. Raab M, Parthasarathi L, Treumann A, Moran N, Daxecker H. Differential binding of ICln in platelets to integrin-derived activating and inhibitory peptides. *Biochemical and biophysical research communications* 2010, **392**:258-263.
259. Vijayan KV, Liu Y, Li TT, Bray PF. Protein phosphatase 1 associates with the integrin  $\alpha$ IIb subunit and regulates signaling. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**:33039-33042.
260. Ye F, Hu G, Taylor D, Ratnikov B, Bobkov AA, McLean MA, Sligar SG, Taylor KA, Ginsberg MH. Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *The Journal of cell biology* 2010, **188**:157-173.
261. Lee HS, Lim CJ, Puzon-McLaughlin W, Shattil SJ, Ginsberg MH. RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**:5119-5127.
262. de Pereda JM, Wegener KL, Santelli E, Bate N, Ginsberg MH, Critchley DR, Campbell ID, Liddington RC. Structural basis for phosphatidylinositol phosphate kinase type I $\gamma$  binding to talin at focal adhesions. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**:8381-8386.

263. Franco SJ, Huttenlocher A. Regulating cell migration: calpains make the cut. *Journal of cell science* 2005, **118**:3829-3838.
264. Huang C, Rajfur Z, Yousefi N, Chen Z, Jacobson K, Ginsberg MH. Talin phosphorylation by Cdk5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitylation and cell migration. *Nature cell biology* 2009, **11**:624-630.
265. O'Halloran T, Beckerle MC, Burridge K. Identification of talin as a major cytoplasmic protein implicated in platelet activation. *Nature* 1985, **317**:449-451.
266. Elliott PR, Goult BT, Kopp PM, Bate N, Grossmann JG, Roberts GC, Critchley DR, Barsukov IL. The Structure of the talin head reveals a novel extended conformation of the FERM domain. *Structure* 2010, **18**:1289-1299.
267. Calderwood DA, Fujioka Y, de Pereda JM, Garcia-Alvarez B, Nakamoto T, Margolis B, McGlade CJ, Liddington RC, Ginsberg MH. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**:2272-2277.
268. Critchley DR, Gingras AR. Talin at a glance. *Journal of cell science* 2008, **121**:1345-1347.
269. Roberts GC, Critchley DR. Structural and biophysical properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Biophysical reviews* 2009, **1**:61-69.
270. Goldmann WH, Bremer A, Haner M, Aeby U, Isenberg G. Native talin is a dumbbell-shaped homodimer when it interacts with actin. *Journal of structural biology* 1994, **112**:3-10.
271. Gingras AR, Bate N, Goult BT, Hazelwood L, Canestrelli I, Grossmann JG, Liu H, Putz NS, Roberts GC, Volkmann N *et al.* The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin. *The EMBO journal* 2008, **27**:458-469.
272. Song X, Yang J, Hirbawi J, Ye S, Perera HD, Goksoy E, Dwivedi P, Plow EF, Zhang R, Qin J. A novel membrane-dependent on/off switch mechanism of talin FERM domain at sites of cell adhesion. *Cell research* 2012, **22**:1533-1545.
273. Goult BT, Xu XP, Gingras AR, Swift M, Patel B, Bate N, Kopp PM, Barsukov IL, Critchley DR, Volkmann N *et al.* Structural studies on full-length talin1 reveal a compact auto-inhibited dimer: implications for talin activation. *Journal of structural biology* 2013, **184**:21-32.
274. Goult BT, Zacharchenko T, Bate N, Tsang R, Hey F, Gingras AR, Elliott PR, Roberts GC, Ballestrem C, Critchley DR *et al.* RIAM and vinculin binding to talin are mutually exclusive and regulate adhesion assembly and turnover. *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**:8238-8249.
275. Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA, Puzon-McLaughlin W, Lafuente EM, Boussiotis VA, Shattil SJ *et al.* Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Current biology : CB* 2006, **16**:1796-1806.

276. Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 2003, **302**:103-106.
277. Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, Alvarez BG, Fujioka Y, Liddington RC, Ginsberg MH. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**:21749-21758.
278. Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH, Campbell ID. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 2007, **128**:171-182.
279. Garcia-Alvarez B, de Pereda JM, Calderwood DA, Ulmer TS, Critchley D, Campbell ID, Ginsberg MH, Liddington RC. Structural determinants of integrin recognition by talin. *Molecular cell* 2003, **11**:49-58.
280. Ye F, Kim C, Ginsberg MH. Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2011, **9 Suppl 1**:20-25.
281. Anthis NJ, Wegener KL, Ye F, Kim C, Goult BT, Lowe ED, Vakonakis I, Bate N, Critchley DR, Ginsberg MH *et al.* The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *The EMBO journal* 2009, **28**:3623-3632.
282. Goult BT, Bouaouina M, Elliott PR, Bate N, Patel B, Gingras AR, Grossmann JG, Roberts GC, Calderwood DA, Critchley DR *et al.* Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: a role in integrin activation. *The EMBO journal* 2010, **29**:1069-1080.
283. Ye F, Kim C, Ginsberg MH. Reconstruction of integrin activation. *Blood* 2012, **119**:26-33.
284. Gingras AR, Ziegler WH, Bobkov AA, Joyce MG, Fasci D, Himmel M, Rothmund S, Ritter A, Grossmann JG, Patel B *et al.* Structural determinants of integrin binding to the talin rod. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**:8866-8876.
285. Rodius S, Chaloin O, Moes M, Schaffner-Reckinger E, Landrieu I, Lippens G, Lin M, Zhang J, Kieffer N. The talin rod IBS2 alpha-helix interacts with the beta3 integrin cytoplasmic tail membrane-proximal helix by establishing charge complementary salt bridges. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**:24212-24223.
286. Yan B, Calderwood DA, Yaspan B, Ginsberg MH. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**:28164-28170.
287. Ellis SJ, Pines M, Fairchild MJ, Tanentzapf G. In vivo functional analysis reveals specific roles for the integrin-binding sites of talin. *Journal of cell science* 2011, **124**:1844-1856.
288. Chen H, Cohen DM, Choudhury DM, Kioka N, Craig SW. Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. *The Journal of cell biology* 2005, **169**:459-470.
289. del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 2009, **323**:638-641.

290. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *The Journal of cell biology* 2007, **179**:1043-1057.
291. Critchley DR. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annual review of biophysics* 2009, **38**:235-254.
292. Kiema T, Lad Y, Jiang P, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Ylanne J, Calderwood DA. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Molecular cell* 2006, **21**:337-347.
293. Anthis NJ, Haling JR, Oxley CL, Memo M, Wegener KL, Lim CJ, Ginsberg MH, Campbell ID. Beta integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**:36700-36710.
294. Litchfield DW, Ball EH. Phosphorylation of the cytoskeletal protein talin by protein kinase C. *Biochemical and biophysical research communications* 1986, **134**:1276-1283.
295. Ratnikov B, Ptak C, Han J, Shabanowitz J, Hunt DF, Ginsberg MH. Talin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *Journal of cell science* 2005, **118**:4921-4923.
296. Bertagnolli ME, Locke SJ, Hensler ME, Bray PF, Beckerle MC. Talin distribution and phosphorylation in thrombin-activated platelets. *Journal of cell science* 1993, **106 ( Pt 4)**:1189-1199.
297. Turner CE, Pavalko FM, Burridge K. The role of phosphorylation and limited proteolytic cleavage of talin and vinculin in the disruption of focal adhesion integrity. *The Journal of biological chemistry* 1989, **264**:11938-11944.
298. Monkley SJ, Zhou XH, Kinston SJ, Giblett SM, Hemmings L, Priddle H, Brown JE, Pritchard CA, Critchley DR, Fassler R. Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2000, **219**:560-574.
299. Nieswandt B, Moser M, Pleines I, Varga-Szabo D, Monkley S, Critchley D, Fassler R. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**:3113-3118.
300. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 1995, **269**:1427-1429.
301. Masumoto A, Hemler ME. Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic differences between adhesion to CS1/fibronectin and to vascular cell adhesion molecule-1. *The Journal of biological chemistry* 1993, **268**:228-234.
302. Yan B, Hu DD, Knowles SK, Smith JW. Probing chemical and conformational differences in the resting and active conformers of platelet integrin alpha(IIb)beta(3). *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**:7249-7260.
303. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1

- integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO journal* 2001, **20**:2120-2130.
304. Gruner S, Prostredna M, Schulte V, Krieg T, Eckes B, Brakebusch C, Nieswandt B. Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. *Blood* 2003, **102**:4021-4027.
  305. Bledzka K, Smyth SS, Plow EF. Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circulation research* 2013, **112**:1189-1200.
  306. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* 2008, **359**:938-949.
  307. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS *et al*. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012, **125**:188-197.
  308. Ruoslahti E. Integrins. *The Journal of clinical investigation* 1991, **87**:1-5.
  309. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annual review of biochemistry* 1988, **57**:375-413.
  310. Egbertson MS, Chang CT, Duggan ME, Gould RJ, Halczenko W, Hartman GD, Laswell WL, Lynch JJ, Jr., Lynch RJ, Manno PD *et al*. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 2. Optimization of a tyrosine template as a mimic for Arg-Gly-Asp. *Journal of medicinal chemistry* 1994, **37**:2537-2551.
  311. Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *The Journal of clinical investigation* 1983, **72**:325-338.
  312. Plow EF, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie GA, Ginsberg MH. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, **82**:8057-8061.
  313. Collier BS. Translating from the rivers of Babylon to the coronary bloodstream. *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**:4293-4299.
  314. Collier BS, Scudder LE. Inhibition of dog platelet function by in vivo infusion of F(ab')<sub>2</sub> fragments of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood* 1985, **66**:1456-1459.
  315. Artoni A, Li J, Mitchell B, Ruan J, Takagi J, Springer TA, French DL, Collier BS. Integrin  $\beta$ 3 regions controlling binding of murine mAb 7E3: implications for the mechanism of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**:13114-13120.
  316. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991, **65**:359-362.



317. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Rose JW, Phillips DR, Nannizzi L, Arfsten A, Campbell AM, Charo IF. Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *The Journal of biological chemistry* 1993, **268**:1066-1073.
318. Barrett JS, Murphy G, Peerlinck K, De Lepeleire I, Gould RJ, Panebianco D, Hand E, Deckmyn H, Vermeylen J, Arnout J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MK-383, a selective non-peptide platelet glycoprotein-IIb/IIIa receptor antagonist, in healthy men. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1994, **56**:377-388.
319. Hanna EB, Rao SV, Manoukian SV, Saucedo JF. The evolving role of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in the setting of percutaneous coronary intervention strategies to minimize bleeding risk and optimize outcomes. *JACC Cardiovascular interventions* 2010, **3**:1209-1219.
320. Aster RH. Immune thrombocytopenia caused by glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Chest* 2005, **127**:53S-59S.
321. Bougie DW, Wilker PR, Wuitschick ED, Curtis BR, Malik M, Levine S, Lind RN, Pereira J, Aster RH. Acute thrombocytopenia after treatment with tirofiban or eptifibatide is associated with antibodies specific for ligand-occupied GPIIb/IIIa. *Blood* 2002, **100**:2071-2076.
322. Cox D. Oral GPIIb/IIIa antagonists: what went wrong? *Current pharmaceutical design* 2004, **10**:1587-1596.
323. Chew DP, Bhatt DL, Sapp S, Topol EJ. Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation* 2001, **103**:201-206.
324. Kristensen SD, Wurtz M, Grove EL, De Caterina R, Huber K, Moliterno DJ, Neumann FJ. Contemporary use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Thrombosis and haemostasis* 2012, **107**:215-224.
325. Lip GY, Huber K, Andreotti F, Arnesen H, Airaksinen KJ, Cuisset T, Kirchhof P, Marin F, European Society of Cardiology Working Group on T. Management of antithrombotic therapy in atrial fibrillation patients presenting with acute coronary syndrome and/or undergoing percutaneous coronary intervention/ stenting. *Thrombosis and haemostasis* 2010, **103**:13-28.
326. Schwarz M, Rottgen P, Takada Y, Le Gall F, Knackmuss S, Bassler N, Buttner C, Little M, Bode C, Peter K. Single-chain antibodies for the conformation-specific blockade of activated platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  designed by subtractive selection from naive human phage libraries. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004, **18**:1704-1706.
327. Schwarz M, Katagiri Y, Kotani M, Bassler N, Loeffler C, Bode C, Peter K. Reversibility versus persistence of GPIIb/IIIa blocker-induced conformational change of GPIIb/IIIa

- (alphaIIb beta3, CD41/CD61). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2004, **308**:1002-1011.
328. Hantgan RR, Stahle MC. Integrin priming dynamics: mechanisms of integrin antagonist-promoted alphaIIb beta3: PAC-1 molecular recognition. *Biochemistry* 2009, **48**:8355-8365.
  329. Armstrong PC, Peter K. GPIIb/IIIa inhibitors: from bench to bedside and back to bench again. *Thrombosis and haemostasis* 2012, **107**:808-814.
  330. Estevez B, Shen B, Du X. Targeting Integrin and Integrin Signaling in Treating Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014.
  331. Biris N, Abatzis M, Mitsios JV, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Tsoukatos D, Tselepis AD, Michalis L, Sideris D, Konidou G *et al.* Mapping the binding domains of the alpha(IIb) subunit. A study performed on the activated form of the platelet integrin alpha(IIb) beta(3). *European journal of biochemistry / FEBS* 2003, **270**:3760-3767.
  332. Ambo H, Kamata T, Handa M, Kawai Y, Oda A, Murata M, Takada Y, Ikeda Y. Novel point mutations in the alphaIIb subunit (Phe289-->Ser, Glu324-->Lys and Gln747-->Pro) causing thrombasthenic phenotypes in four Japanese patients. *British journal of haematology* 1998, **102**:829-840.
  333. Ferrer M, Fernandez-Pinel M, Gonzalez-Manchon C, Gonzalez J, Ayuso MS, Parrilla R. A mutant (Arg327-->His) GPIIb associated to thrombasthenia exerts a dominant negative effect in stably transfected CHO cells. *Thrombosis and haemostasis* 1996, **76**:292-301.
  334. Tao J, Arias-Salgado EG, Gonzalez-Manchon C, Iruin G, Butta N, Ayuso MS, Parrilla R. A 1063G-->A mutation in exon 12 of glycoprotein (GP)IIb associated with a thrombasthenic phenotype: mutation analysis of [324E]GPIIb. *British journal of haematology* 2000, **111**:965-973.
  335. Mitsios JV, Tambaki AP, Abatzis M, Biris N, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Soteriadou K, Goudevenos J, Elisaf M, Tsoukatos D *et al.* Effect of synthetic peptides corresponding to residues 313-332 of the alphaIIb subunit on platelet activation and fibrinogen binding to alphaIIb beta3. *European journal of biochemistry / FEBS* 2004, **271**:855-862.
  336. Papamichael ND, Stathopoulou EM, Roussa VD, Tsironis LD, Kotsia AP, Stanica RM, Moussis V, Tsikaris V, Katsouras CS, Tselepis AD *et al.* Effect of a synthetic peptide corresponding to residues 313 to 320 of the alphaIIb subunit of the human platelet integrin alphaIIb beta3 on carotid artery thrombosis in rabbits. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2009, **329**:634-640.
  337. Hassan AK, Jukema JW, van der Laarse A, Hasan-Ali H, Wolterbeek R, van der Kley F, Spano F, Atsma DE, Schalij MJ. Incidence, patient characteristics and predictors of aborted myocardial infarction in patients undergoing primary PCI: prospective study comparing pre- and in-hospital abciximab pretreatment. *EuroIntervention : journal of*

*EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2009, **4**:662-668.

338. Blue R, Murcia M, Karan C, Jirouskova M, Collier BS. Application of high-throughput screening to identify a novel  $\alpha$ IIb-specific small-molecule inhibitor of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-mediated platelet interaction with fibrinogen. *Blood* 2008, **111**:1248-1256.
339. Blue R, Kowalska MA, Hirsch J, Murcia M, Janczak CA, Harrington A, Jirouskova M, Li J, Fuentes R, Thornton MA *et al.* Structural and therapeutic insights from the species specificity and in vivo antithrombotic activity of a novel  $\alpha$ IIb-specific  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 antagonist. *Blood* 2009, **114**:195-201.
340. Zhu J, Zhu J, Negri A, Provasi D, Filizola M, Collier BS, Springer TA. Closed headpiece of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and its complex with an  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-specific antagonist that does not induce opening. *Blood* 2010, **116**:5050-5059.
341. Jiang JK, McCoy JG, Shen M, LeClair CA, Huang W, Negri A, Li J, Blue R, Harrington AW, Naini S *et al.* A novel class of ion displacement ligands as antagonists of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 receptor that limit conformational reorganization of the receptor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2014, **24**:1148-1153.
342. Zhu J, Choi WS, McCoy JG, Negri A, Zhu J, Naini S, Li J, Shen M, Huang W, Bougie D *et al.* Structure-guided design of a high-affinity platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 receptor antagonist that disrupts Mg(2)(+) binding to the MIDAS. *Science translational medicine* 2012, **4**:125ra132.
343. Schwarz M, Meade G, Stoll P, Ylanne J, Bassler N, Chen YC, Hagemeyer CE, Ahrens I, Moran N, Kenny D *et al.* Conformation-specific blockade of the integrin GPIIb/IIIa: a novel antiplatelet strategy that selectively targets activated platelets. *Circulation research* 2006, **99**:25-33.
344. Hagemeyer CE, von Zur Muhlen C, von Elverfeldt D, Peter K. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents. *Thrombosis and haemostasis* 2009, **101**:1012-1019.
345. Bella J, Berman HM. Crystallographic evidence for C  $\alpha$ -H...O=C hydrogen bonds in a collagen triple helix. *Journal of molecular biology* 1996, **264**:734-742.
346. Kieffer B, Mer G, Mann A, Lefevre JF. Structural studies of two antiaggregant RGDW peptides by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. *International journal of peptide and protein research* 1994, **44**:70-79.
347. Kouki A, Mitsios JV, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Tselepis AD, Tsikaris V, Tsoukatos DC. Highly constrained cyclic (S,S)-CXaaC-peptides as inhibitors of fibrinogen binding to platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2005, **3**:2324-2330.
348. Chen YP, Djaffar I, Pidard D, Steiner B, Cieutat AM, Caen JP, Rosa JP. Ser-752-->Pro mutation in the cytoplasmic domain of integrin  $\beta$ 3 subunit and defective activation of platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (glycoprotein IIb-IIIa) in a variant of Glanzmann

- thrombasthenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**:10169-10173.
349. Wang R, Shattil SJ, Ambruso DR, Newman PJ. Truncation of the cytoplasmic domain of beta3 in a variant form of Glanzmann thrombasthenia abrogates signaling through the integrin alpha(IIb)beta3 complex. *The Journal of clinical investigation* 1997, **100**:2393-2403.
  350. Zou Z, Chen H, Schmaier AA, Hynes RO, Kahn ML. Structure-function analysis reveals discrete beta3 integrin inside-out and outside-in signaling pathways in platelets. *Blood* 2007, **109**:3284-3290.
  351. Arias-Salgado EG, Lizano S, Sarkar S, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**:13298-13302.
  352. Arias-Salgado EG, Lizano S, Shattil SJ, Ginsberg MH. Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin beta cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**:29699-29707.
  353. Reddy KB, Smith DM, Plow EF. Analysis of Fyn function in hemostasis and alphaIIb beta3-integrin signaling. *Journal of cell science* 2008, **121**:1641-1648.
  354. Su X, Mi J, Yan J, Flevaris P, Lu Y, Liu H, Ruan Z, Wang X, Kieffer N, Chen S *et al.* RGT, a synthetic peptide corresponding to the integrin beta 3 cytoplasmic C-terminal sequence, selectively inhibits outside-in signaling in human platelets by disrupting the interaction of integrin alpha IIb beta 3 with Src kinase. *Blood* 2008, **112**:592-602.
  355. Petrich BG, Fogelstrand P, Partridge AW, Yousefi N, Ablooglu AJ, Shattil SJ, Ginsberg MH. The antithrombotic potential of selective blockade of talin-dependent integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) activation. *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**:2250-2259.
  356. Stefanini L, Ye F, Snider AK, Sarabakhsh K, Piatt R, Paul DS, Bergmeier W, Petrich BG. A talin mutant that impairs talin-integrin binding in platelets decelerates alphaIIb beta3 activation without pathological bleeding. *Blood* 2014, **123**:2722-2731.
  357. Nakazawa T, Tadokoro S, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for alpha(IIb)beta(3) activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Experimental hematology* 2013, **41**:79-90 e71.
  358. Born GV, Dearnley R, Foulks JG, Sharp DE. Quantification of the morphological reaction of platelets to aggregating agents and of its reversal by aggregation inhibitors. *The Journal of physiology* 1978, **280**:193-212.
  359. Holme S, Sixma JJ, Wester J, Holmsen H. ADP-induced refractory state of platelets in vitro. II. Functional and ultra studies on gel filtered platelets. *Scandinavian journal of haematology* 1977, **18**:267-278.

360. Mustard JF, Perry DW, Ardlie NG, Packham MA. Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *British journal of haematology* 1972, **22**:193-204.
361. Stewart JM, Young, J.D: **Principles of Peptide Synthesis**, 2nd edn. Rockford: Pierce Chemical Company; 1998.
362. Atherton E, Sheppard, R.C: **Solid phase peptide synthesis: a practical approach**. Oxford, England; 1989.
363. Marti GE, Stetler-Stevenson M, Bleesing JJ, Fleisher TA. Introduction to flow cytometry. *Seminars in hematology* 2001, **38**:93-99.
364. Herzenberg LA, De Rosa SC. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunology today* 2000, **21**:383-390.
365. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *The American journal of cardiology* 2009, **103**:20A-26A.
366. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 1989, **73**:1109-1112.
367. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *The Journal of cell biology* 1985, **101**:880-886.
368. Abrams CS, Ruggeri ZM, Taub R, Hoxie JA, Nagaswami C, Weisel JW, Shattil SJ. Anti-idiotypic antibodies against an antibody to the platelet glycoprotein (GP) IIb-IIIa complex mimic GP IIb-IIIa by recognizing fibrinogen. *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**:2775-2785.
369. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996, **87**:4925-4936.
370. Taub R, Gould RJ, Garsky VM, Ciccarone TM, Hoxie J, Friedman PA, Shattil SJ. A monoclonal antibody against the platelet fibrinogen receptor contains a sequence that mimics a receptor recognition domain in fibrinogen. *The Journal of biological chemistry* 1989, **264**:259-265.
371. Larsson A, Lindahl TL. Inhibition of fibrinogen binding to platelets by MK-852, a new GPIIb/IIIa antagonist. *Upsala journal of medical sciences* 1994, **99**:121-129.
372. Schaffner-Reckinger E, Gouon V, Melchior C, Plancon S, Kieffer N. Distinct involvement of beta3 integrin cytoplasmic domain tyrosine residues 747 and 759 in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphotyrosine signaling. *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**:12623-12632.
373. Stanica RM, Benaki D, Rodis FI, Mikros E, Tsoukatos D, Tselepis A, Tsikaris V. Structure-activity relationships of alphaIIb 313-320 derived peptide inhibitors of human platelet aggregation. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 2008, **14**:1195-1202.

374. Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb-IIIa. *Cardiovascular research* 2000, **45**:437-446.
375. Bassler N, Loeffler C, Mangin P, Yuan Y, Schwarz M, Hagemeyer CE, Eisenhardt SU, Ahrens I, Bode C, Jackson SP *et al.* A mechanistic model for paradoxical platelet activation by ligand-mimetic alphaIIb beta3 (GPIIb/IIIa) antagonists. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007, **27**:e9-15.
376. Legendre P, Salsmann A, Rayes J, Trassard O, Kieffer N, Baruch D. CHO cells expressing the high affinity alpha(IIb)beta3 T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2006, **4**:236-246.
377. Gkourogianni A, Egot M, Koloka V, Moussis V, Tsikaris V, Panou-Pomonis E, Sakarellos-Daitsiotis M, Bachelot-Loza C, Tsoukatos DC. Palmitoylated peptide, being derived from the carboxyl-terminal sequence of the integrin alpha cytoplasmic domain, inhibits talin binding to alphabeta. *Platelets* 2013.
378. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001, **2**:793-805.
379. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood* 1990, **75**:1383-1395.
380. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *The New England journal of medicine* 1992, **326**:310-318.
381. Izaguirre G, Aguirre L, Hu YP, Lee HY, Schlaepfer DD, Aneskievich BJ, Haimovich B. The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**:28676-28685.
382. Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR. Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3-(GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**:10811-10815.

## **Δημοσιεύσεις - Ανακοινώσεις σε ελληνικά και διεθνή Συνέδρια**

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις σε συνέδρια.

### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ**

**Platelets. 2013 Nov 18.**

**Palmitoylated peptide, being derived from the carboxyl-terminal sequence of the integrin  $\alpha$ IIb cytoplasmic domain, inhibits talin binding to  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.**

Gkourogiani A, Egot M, Koloka V, Moussis V, Tsikaris V, Panou-Pomonis E, Sakarellos-Daitsiotis M, Bachelot-Loza C, Tsoukatos D

### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

- **4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης, 13-16 Οκτωβρίου 2010**

Πεπτίδια προερχόμενα από το ενδοκυττάριο τμήμα της  $\alpha$ IIb υπομονάδας. Πιθανός μηχανισμός δράσης τους ως αναστολέων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης

**Α. Γκουρογιάννη, Κ. Κιουπτσή, Β. Κολόκα, Β. Τσίκαρης, Ε. Πάνου, Μ. Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτη, Δ. Τσουκάτος**  
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Πρακτικά 4<sup>ο</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Αθηροσκλήρωσης, 2010, σελίδα 41  
(Προφορική παρουσίαση)

- **21<sup>st</sup> international Thrombosis Congress, July 6-9 2010, Milan, Italy**

Palmitoylated peptides, derived from the acidic carboxyl-terminal segment of the integrin  $\alpha$ IIb cytoplasmic domain, as platelet activation inhibitor

A. Vasilios Gourogiani<sup>1</sup>, K. Kiouptsi<sup>1</sup>, V. Koloka<sup>1</sup>, V. Tsikaris<sup>1</sup>, E. Panou-Pomonis<sup>1</sup>, M. Sakarellos-Daitsiotis<sup>1</sup>, C. Bachelot-Loza<sup>2</sup>, D.C. Tsoukatos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sector of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, Ioannina, Greece

<sup>2</sup> INSERM U 765 Faculte de Pharmacie, Paris, France

Proceedings of the 21<sup>st</sup> International Congress on Thrombosis, The start of a New Era for Antithrombotic Agents, 2010, page A7, OC247

**(Oral communication)**

- **63<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και μοριακής Βιολογίας, 9-11 Νοεμβρίου 2012, Ηράκλειο Κρήτης.**

Palmitoylated peptide, having being derived from the carboxyl-terminal sequence of the integrin  $\alpha$ IIb cytoplasmic domain, inhibits talin binding to  $\alpha$ IIb $\beta$ 3

**Gkourogianni A.**, Koloka V., Moussis V., Tsikaris V., Panou-Pomonis E., Sakarellos-Daitsiotis M., Tsoukatos D.C.

Department of Chemistry, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Poster P50

- **3<sup>rd</sup> Hellenic Scientific event on Platelets and Thrombosis, ALPIC 2013, January 18-20, 2013, Metsovo, Greece.**

A PALMITOYLATED PEPTIDE DERIVED FROM THE CARBOXYL-TERMINAL SEQUENCE OF THE INTEGRIN  $\alpha$ IIb CYTOPLASMIC DOMAIN, INHIBITS TALIN BINDING TO  $\alpha$ IIb $\beta$ 3

A.Gkourogianni<sup>1</sup>, M. Egot<sup>2</sup>, V. Koloka<sup>1</sup>, V. Moussis<sup>1</sup>, V. Tsikaris<sup>1</sup>, E. Panou-Pomonis<sup>1</sup>, M. Sakarellos-Daitsiotis<sup>1</sup>, C. Bachelot-Loza<sup>2</sup>, D.C. Tsoukatos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sector of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, Ioannina, Greece



<sup>2</sup> INSERM U 765 Faculte de Pharmacie, Paris, France

Proceedings of the ALPIC 2013, page 10, (Short Oral Presentation)

- **Συνέδριο μεταπτυχιακών σπουδών τμήματος Χημείας 2013, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 28-30 Μαρτίου 2013**

Πεπτίδια προερχόμενα από το ενδοκυττάριο τμήμα της αIIb υπομονάδας της ιντεγκρίνης αIIbβ<sub>3</sub>, ως αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Μηχανισμός δράσης τους.

**Αλεξία Γκουρογιάννη<sup>1</sup>**, Κλυταιμίστρα Κιουπτσή<sup>1</sup>, Βασιλική Κολόκα<sup>2</sup>, Βασίλειος Μούσσης<sup>2</sup>, Βασίλειος Τσίκαρης<sup>2</sup>, Ευγενεία Πάνου-Πομώνη<sup>2</sup>, Μαρία Σακαρέλλου-Δαιτσιώτη<sup>2</sup>, Christilla Bachelot-Loza<sup>3</sup>, Δημόκριτος Τσουκάτος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα; <sup>2</sup>Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα;

<sup>3</sup>INSERM U 765, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 Av de l'Observatoire, Paris, France

Πρόγραμμα και βιβλίο περιλήψεων του συνεδρίου, σελίδα 44 (Προφορική παρουσίαση).

- **1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης – Αντιθρομβωτικής αγωγής, 12-13 Απριλίου 2013, Αθήνα.**

Παλμιτοϋλιομένο πεπτίδιο, προερχόμενο από το καρβόξυ-τελικό άκρο της ενδοκυττάριας αλληλουχίας της αIIb υπομονάδας της ιντεγκρίνης αIIbβ<sub>3</sub>, αναστέλλει την πρόσδεση της ταλίνης στην ιντεγκρίνη.

Α. Γκουρογιάννη<sup>1</sup>, Β. Κολόκα<sup>2</sup>, Β. Μούσσης<sup>2</sup>, Β. Τσίκαρης<sup>2</sup>, Ε. Πάνου-Πομώνη<sup>2</sup>, Μ. Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτη<sup>2</sup>, C. Bachelot-Loza<sup>3</sup>, Δ. Τσουκάτος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα,

<sup>2</sup>Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, <sup>3</sup>INSERM U 765, Faculte des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

Poster 11

Πεπτιδικοί αναστολείς προερχόμενοι από την αIIb υπομονάδα της ιντεγκρίνης αIIbβ3: Ο μηχανισμός δράσης και ο ρόλος τους στην φωσφορυλίωση των FAK και ERK.

A. Γκουρογιάννη<sup>1</sup>, K. Κιουπτσή<sup>1</sup>, B. Κολόκα<sup>2</sup>, B. Μούσσης<sup>2</sup>, B. Τσίκαρης<sup>2</sup>, E. Πάνου-Πομώνη<sup>2</sup>, M. Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτη<sup>2</sup>, C. Bachelot-Loza<sup>3</sup>, Δ. Τσουκάτος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα,

<sup>2</sup>Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα,

<sup>3</sup>INSERM U 765, Faculte des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

Poster 12