



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αποδιάταξη των επικρατειών A1, A2, A3 του παράγοντα von Willebrand
με άσκηση σταθερής δύναμης
κατά τη διάρκεια προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής**

Στάθη Βαία

Επιβλέπων: Δρ. Παπαδόπουλος Γεώργιος

Σεπτέμβριος 2010

**Αποδιάταξη των επικρατειών A1, A2, A3 του παράγοντα von Willebrand
με άσκηση σταθερής δύναμης
κατά τη διάρκεια προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής**

ΣΤΑΘΗ ΒΑΙΑ

A.M. : 1805374

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στην ομάδα Βιοφυσικής του εργαστηρίου Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Σεπτεμβρίου 2009-Σεπτεμβρίου 2010 υπό την επίβλεψη του κ. Παπαδόπουλου Γεώργιου.

Επιβλέπων: Δρ. Παπαδόπουλος Γεώργιος

Συνεπιβλέποντες: Δρ. Κοντού Μαρία

Δρ. Μπαλατσός Νικόλαος

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους μου συμπαραστάθηκαν στην υλοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας. Κατ' αρχήν, ευχαριστώ τον κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής του ομάδας και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε στην πορεία αυτής της εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συνεπιβλέποντες κ. Μαρία Κοντού και κ. Νικόλαο Μπαλατσό για την συμβολή τους στη διεκπεραίωση της διπλωματικής εργασίας. Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στον Στέφανο Πέντα για τις χρήσιμες συμβουλές του. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους συναδέλφους, την Αναστασία Χαϊδεμένου, την Μαρία Τζιαστούδη, τον Σταύρο Παπατζέλο, τον Ευάγγελο Τσιγαρίδα, τον Στέλιο Φλώρο για την άψογη συνεργασία και τη δημιουργία ευχάριστου κλίματος στην ερευνητική ομάδα. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και την αδελφή μου για την υλική και ηθική στήριξη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
A. ΜΟΡΙΑΚΗ & ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VON WILLEBRAND	6
1. ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ vWA1-GP Iba.....	10
2. Η ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑ A2	12
3. Η ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑ A3	15
B. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ & ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ	17
1. Η ΔΥΝΑΜΗ ΠΟΥ ΔΕΧΕΤΑΙ Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VON WILLEBRAND	22
C. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ	26
1. STEERED MOLECULAR DYNAMICS.....	26
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	32
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο παράγοντας von Willebrand (vWF) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται στο αίμα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως μεγάλα πολυμερή (ULVWF) ώστε να περιορίσει την αιμορραγία σε περιοχές τραυματισμού ενός αγγείου και βασικό ρόλο σε αυτό έχουν οι τρεις του επικράτειες A (A1, A2, A3). Μέσω της A3 προσδένεται στο κολλαγόνο ενώ παράλληλα η A1 αλληλεπιδρά με την αιμοπεταλιακή γλυκοπρωτεΐνη Iba (GPIIb) ώστε να συγκρατήσει στο σημείο τα αιμοπετάλια, δημιουργώντας θρόμβο. Το μέγεθος του θρόμβου ελέγχεται από τη μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13, η οποία διασπά τον δεσμό Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶, ο οποίος βρίσκεται βαθιά στον πυρήνα της A2, μειώνοντας το μέγεθος των ULVWF και τον αριθμό των προσκολλημένων αιμοπεταλίων. Κατά το επικρατέστερο μοντέλο οι εφελκυστικές δυνάμεις που επάγονται από τις διατμητικές τάσεις της ροής του αίματος προκαλούν την επιμήκυνση των ULVWF και την αποδιάταξη της A2 εκθέτοντας το σημείο πρωτεόλυσης. Προκειμένου να ελέγξουμε αυτό το μοντέλο ασκήσαμε σταθερές αποδιατακτικές δυνάμεις στο ένα άκρο των A2 και A3 σε μεμονωμένη κατάσταση και της A1 συνδεδεμένη με την GPIIb, με τη βοήθεια προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής, για να συγκρίνουμε τους μεταξύ τους χρόνους αποδιάταξης. Παράλληλα μελετήσαμε το πρότυπο αποδιάταξης της A2, ασκώντας δυνάμεις και στα δυο πρωτεϊνικά της άκρα.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυκλοφορία του αίματος επιτρέπει στα όργανα και τους ιστούς του σώματος να λειτουργούν σωστά, καθώς το αίμα μεταφέρει οξυγόνο, γλυκόζη, πρωτεΐνες, βιταμίνες, ένζυμα και ηλεκτρολύτες προς όλα τα κύτταρα του σώματος μέσω δαιδαλωδών και πολύπλοκων αγγειακών συστημάτων, τις αρτηρίες, τις φλέβες και τα τριχοειδή. Για να διατηρηθεί η ομαλή λειτουργία και να αποφευχθεί μια παθολογική κατάσταση, επιστρατεύεται ένα σύστημα πήξης και επιδιόρθωσης στο σημείο που προκαλείται βλάβη, που περιλαμβάνει ενδοθηλιακά αγγεία, τον κατάλληλο αριθμό λειτουργικών αιμοπεταλίων, μεγάλες συγκεντρώσεις του παράγοντα von Willebrand (von Willebrand Factor-vWF) και μια ποσότητα άλλων πρωτεϊνικών παραγόντων πήξης. Όταν ένα αγγείο τραυματίζεται ο λείος μυς στο τοίχωμα του αγγείου συσπάται για να ελαχιστοποιήσει το άνοιγμα. Με τη βοήθεια του vWF, τα αιμοπετάλια, που βρίσκονται στην κυκλοφορία, συγκρατούνται στο εκτεθειμένο κολλαγόνο στο τοίχωμα του τραυματισμένου αγγείου. Τα μοριακά μονοπάτια λύσης του θρόμβου κρατούν αυτό το σύστημα σε ισορροπία, βασικό ρόλο στα οποία έχει η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13.

Οι επιστήμες ζωής σήμερα, έχουν στη διάθεσή τους έναν όλο και αυξανόμενο όγκο πληροφοριών για τη μοριακή βάση των κυττάρων από την αλληλούχηση του γονιδιώματος των οργανισμών αλλά και την ατομική ανάλυση δομών μορίων που κατατίθενται σε βάσεις δεδομένων. Η τριδιάστατη δομή των βιολογικών μακρομορίων είναι απαραίτητη για την κατανόηση της λειτουργίας τους σε ατομικό επίπεδο. Η δομή επιλύεται με την βοήθεια της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και με NMR. Οι επιλυόμενες δομές διατίθενται στην επιστημονική κοινότητα από τη βάση δεδομένων PDB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=structure>) σε μορφή αρχείου που περιέχει τις συντεταγμένες των ατόμων. Με αφετηρία αυτές τις συντεταγμένες είναι δυνατόν χρησιμοποιώντας προγράμματα υπολογιστών να μελετήσουμε περαιτέρω τις ιδιότητες των βιολογικών μακρομορίων, όπως αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, σταθερότητα δομής κλπ.

Στο πλαίσιο της ανά χειράς εργασίας χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής NAMD καθώς και το πρόγραμμα οπτικοποίησης μοριακών δομών VMD για να μελετήσουμε την δομική συμπεριφορά των επικρατειών A1, A2, A3 του vWF υπό την επίδραση σταθερών δυνάμεων. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να ελεγχθεί το τρέχον μοντέλο ελέγχου του μεγέθους του vWF με αποδιάταξη της A2 και πρωτεόλυση από τον παράγοντα ADAMTS13.

A. ΜΟΡΙΑΚΗ & ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VON WILLEBRAND

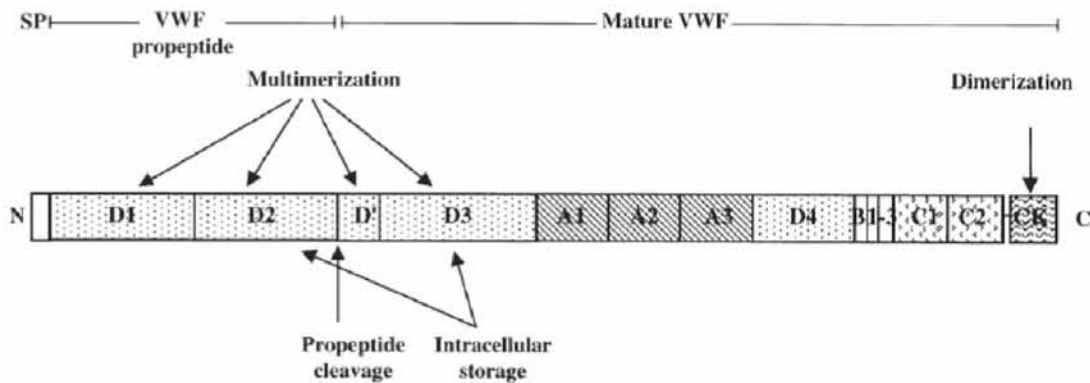
Ρόλος του παράγοντα von Willebrand

Ο παράγοντας von Willebrand έχει δύο σημαντικούς ρόλους στην αιμόσταση. Ο πρώτος είναι να δημιουργεί φράγματα αιμοπεταλίων σε σημεία όπου υπάρχει τραυματισμένος ιστός. Εκεί η πρωτεΐνη προσδένεται στο εκτεθειμένο ενδοθήλιο και αποτελεί τη γέφυρα ανάμεσα στην επιφάνεια και τα αιμοπετάλια [1,2,3]. Αυτή η λειτουργία προάγεται από την ιδιόμορφη δομή του vWF, τα πολυμερή του οποίου συγκρατούν τα αιμοπετάλια μετά από πρόσδεση στα γλυκοπρωτεϊνικά σύμπλοκα Ib/IX/V και IIb/IIIa της επιφάνειάς τους [2,3,4].

Ο δεύτερος ρόλος του vWF είναι να σχηματίζει στο πλάσμα ένα μη ομοιοπολικό σύμπλοκο με τον παράγοντα πήξης VIII, μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο στο χρωμόσωμα X και που είναι ελλιπής ή ελαττωματική στην αιμοφιλία A. Αυτό το μοριακό σύμπλοκο είναι απαραίτητο για την φυσιολογική λειτουργία του παράγοντα VIII, που σταθεροποιείται στην κυκλοφορία και προστατεύεται από την πρωτεολυτική απενεργοποίηση [1,2,3].

Δομή του παράγοντα von Willebrand

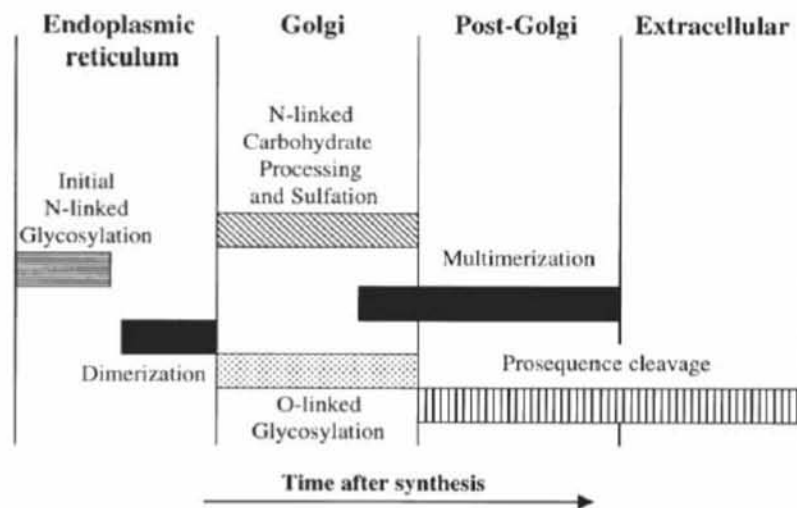
Το γονίδιο του παράγοντα von Willebrand (von Willebrand factor, vWF), 178 kbp βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 και αποτελείται από 52 εξώνια [2,4]. Ο vWF συντίθεται σαν ένα πρόδρομο μόριο 2813 αμινοξέων (pre-pro-vWF), που περιλαμβάνει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 22 αμινοξέων, ένα προπεπτίδιο 741 αμινοξέων και τον ώριμο παράγοντα που αποτελείται από 2050 αμινοξέα. Η δομή του, όπως φαίνεται στην εικόνα 1, έχει υψηλή επαναληψιμότητα και αποτελείται από ομόλογες υπομονάδες διατεταγμένες με σειρά: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK, από τις οποίες οι D1-D2 αποτελούν το προπεπτίδιο και οι D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK τον ώριμο παράγοντα [4,5]. Οι επικράτειες των τεσσάρων τύπων A, B, C, και D βρίσκονται σε πολλαπλά ομόλογα αντίγραφα ενώ υπάρχει μόνο μια CK (cystine knot-κόμπος κυστίνης) υπομονάδα [3,6].



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του πολυπεπτιδίου *pre-pro-von Willebrand factor*. Οι διαφορετικοί τύποι επικρατειών έχουν διαφορετικά μοτίβα, ενώ με βέλη καταδεικνύονται κεντρικά σημεία των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της πρωτεΐνης [4].

Βιοσύνθεση, αποθήκευση και έκκριση του παράγοντα von Willebrand

Οι μόνοι κυτταρικοί τύποι που συνθέτουν τον παράγοντα von Willebrand είναι τα ενδοθηλιακά και τα μεγακαρυοκύτταρα, ενώ και στα δύο λαμβάνουν χώρα τα στάδια επεξεργασίας του [3,4]. Μετά τη σύνθεση, το σηματοδοτικό πεπτίδιο αποκόπτεται και ο pro-vWF υφίσταται περαιτέρω μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύστημα Golgi, όπου συμβαίνει πολυμερισμός των διμερών του pro-vWF και αργότερα πρωτεόλυση, απελευθερώνοντας το προπεπτίδιο από την ώριμη πρωτεΐνη [2,4]. Αναλυτικά οι τροποποιήσεις που συμβαίνουν περιγράφονται στην εικόνα 2 παρακάτω.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων βιοσύνθεσης του vWF και ο κυτταρικός εντοπισμός τους [4].

Η πρωτεΐνη είναι πλούσια σε κυστεΐνες, που αναλογούν σε 234 από τα 2813 αμινοξέα στον pre-pro-vWF. Η δημιουργία δισουλφιδικού δεσμού ανάμεσα στις N-

τελικές D3 υπομονάδες και τις C-τελικές CK υπομονάδες δημιουργεί πολυμερή vWF που αποτελούνται από περισσότερα από 80 μονομερή. Η μάζα του πολυμερούς, συναρμολογούμενη από μονομερή του vWF των ~250 kDa, μπορεί να υπερβεί τα 20.000 kDa [2,4,6,7,8,6,9]. Ο παράγοντας vW κυκλοφορεί στο πλάσμα του αίματος στον άνθρωπο σε συγκεντρώσεις των 10 μg/ml [2]. Για να δράσει απαιτείται η πρόσδεσή του σε διάφορους παράγοντες, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες (GP) Ib και IIb/IIIa των αιμοπεταλίων, τα κολλαγόνα της εξωκυττάριας ουσίας, και η FVIII του πλάσματος, για τα οποία διαθέτει συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης [4].

Ο vWF που παράγεται στα μεγακαρυοκύτταρα αποθηκεύεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η πλειοψηφία του vWF εκκρίνεται ιδιοσυστατικά, ενώ τα εναπομείναντα, υψηλά ενεργά μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερή (UltraLargeVWF), αποθηκεύονται σε ειδικά ενδοθηλιακά κοκκία με δυνατότητα απελευθέρωσης, τα σωματίδια Weibel-Palade [4,7,8]. In vivo, τα επίπεδα του vWF στο πλάσμα παρουσιάζουν οξεία αύξηση κατά το αδρενεργικό στρες ή τη δημιουργία θρόμβου. Η έκκριση του παράγοντα από τα σωματίδια Weibel-Palade προϋποθέτει τη μεταφορά τους από το κυτταρόπλασμα στην επιφάνεια του κυττάρου και την απελευθέρωσή τους. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε απόκριση προς ενδοκυτταρική κινητοποίηση Ca^{2+} ή κυκλικό AMP [2,4].

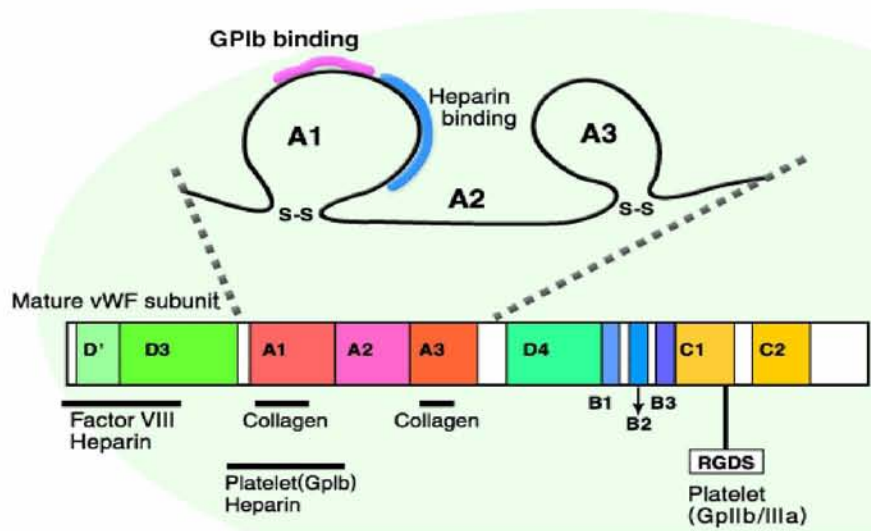
Σημεία ελέγχου της έκφρασης και της δράσης του vWF

Σε επίπεδο γονιδίου η έκφραση του vWF ελέγχεται με ιστο-ειδικό τρόπο. Υπάρχουν θετικά και αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία, όπως πυρηνικές πρωτεΐνες, στην περιοχή του υποκινητή ή στην 5' αμετάφραστη περιοχή που είναι υπεύθυνα για την μεταγραφή του γονιδίου ειδική ως προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ένας αξιοσημείωτος γενετικός παράγοντας που επηρεάζει τα επίπεδα του vWF, πέραν των διαφόρων πολυμορφισμών, είναι το σύστημα ομάδων αίματος ABO, με την ομάδα αίματος O να έχει τα μικρότερα κατά μέσο όρο επίπεδα του αντιγόνου vWF. Επίσης έχουν παρατηρηθεί in vivo αυξημένα επίπεδα του παράγοντα μετά από ενεργοποίηση από την ιντερλευκίνη 11 και μάλιστα σε μερικές παθολογικές καταστάσεις [4].

Η λειτουργία του vWF μπορεί επίσης να ρυθμιστεί μέσω ελέγχου του μεγέθους των πολυμερών, στο μεγάλο μοριακό βάρος των οποίων οφείλεται και η αιμοστατική του δράση. Έχουν αναγνωρισθεί δύο πρωτεΐνες που ελέγχουν το μέγεθος των πολυμερών του vWF. Η πρώτη είναι μια τριμερής γλυκοπρωτεΐνη, η θρομβοσπονδίνη-1, με κατασταλτική ενεργότητα, συντίθεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και στοχεύει ειδικά τα πολύ μεγάλα πολυμερή [4]. Η δεύτερη είναι η

μεταλοπρωτεάση ADAMTS13, της οικογένειας ADAMTS, που πρωτεολύει έναν πεπτιδικό δεσμό στην επικράτεια A2 μειώνοντας το μέγεθος των πολυμερών, αποτρέποντας τη δημιουργία θρόμβου [4,7]. Θα ασχοληθούμε με τη δράση της εκτενώς παρακάτω.

Οι επικράτειες A1, A2, A3 του παράγοντα von Willebrand διαμεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις «κλειδιά» για τη λειτουργία του. Η διαδοχική διάταξη αυτών των λειτουργικών επικρατειών υποδηλώνει ότι τουλάχιστον η μία ίσως επηρεάζει τη λειτουργία της γειτονικής της.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της ώριμης πρωτεΐνης και των θέσεων πρόσδεσης διαφόρων παραγόντων. Σε έμφαση οι τρεις επικράτειες A και η θέση των δισουλφιδικών δεσμών στις A1 και A3.

Στην ώριμη πρωτεΐνη η επικράτεια A1 αντιστοιχεί στα αμινοξέα 497 έως 716 και τα άκρα της συγκρατούνται με δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ της Cys509 και της Cys695. Η επικράτεια αυτή δεσμεύει την γλυκοπρωτεΐνη Iba (GPIba), έναν υποδοχέα της επιφάνειας των αιμοπεταλίων, με στόχο να συγκρατήσει τα αιμοπετάλια σε συνθήκες υψηλού shear stress. Η πρόσδεση αυτή του vWF δεν γίνεται τυχαία, αλλά απαιτούνται δομικές αλλαγές που επάγονται μετά από την πρόσδεση άλλων περιοχών στο κολλαγόνο του υπονεδοθηλίου. Η επικράτεια A1, επίσης, έχει συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης για την ηπαρίνη και σουλφατίδια και μια ακόμα θέση για το κολλαγόνο (εικόνα 3). Η πρόσδεση στο κολλαγόνο επιτρέπει την αλληλεπίδραση με τον GPIba, ενώ η ηπαρίνη την εμποδίζει [3,5,10].

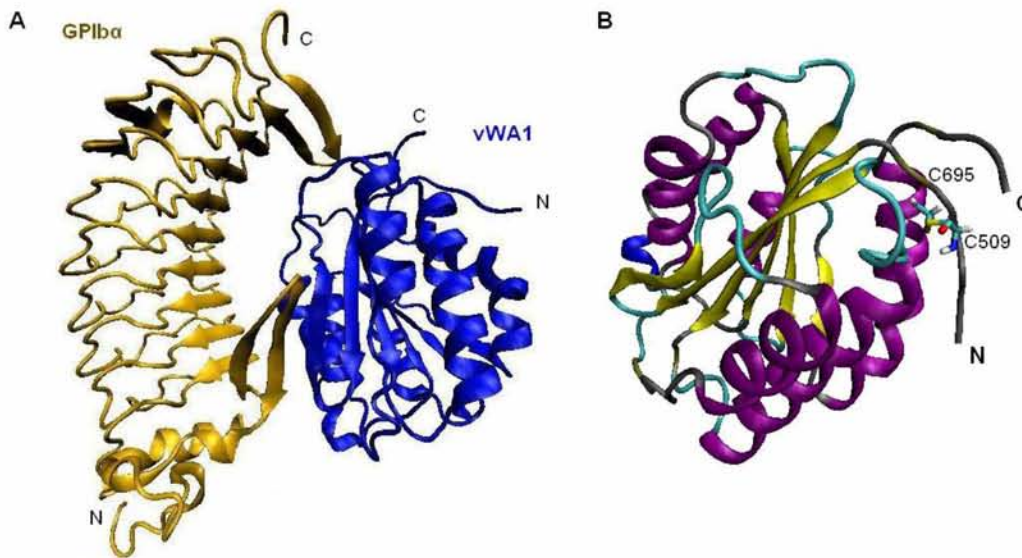
Η επικράτεια A2 στην ώριμη πρωτεΐνη εκτείνεται από το αμινοξύ 717 έως το 909 και δεν περιέχει δισουλφιδικό δεσμό που να λειτουργεί ως γέφυρα ανάμεσα στο N-τελικό και στο C-τελικό άκρο, αντίστοιχο με της επικράτειας A1 και της A3, όπως

θα δούμε παρακάτω. Όμως διαθέτει έναν δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στις δύο γειτονικές κυστεΐνες Cys906-Cys907. Περιέχει μια θέση πρωτεόλυσης, Tyr842-Met843 (αντίστοιχα η αρίθμηση στον pro-vWF, Tyr1605-Met1606), για τη μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13, η οποία ρυθμίζει το μέγεθος των ULVWF [3].

Η επικράτεια A3 εκτείνεται από το αμινοξύ 910 έως το 1111 και τα άκρα της συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στις κυστεΐνες 923 και 1109. Περιέχει την κύρια θέση πρόσδεσης για τα ινώδη κολλαγόνα τύπου I και III [3,5,6,11,12].

1. ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ vWA1-GP Iba

Ο πολυμερής vWF όταν βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος δεν προσδένεται σθεναρά στα αιμοπετάλια. Όταν όμως τραυματιστεί το τοίχωμα του αγγείου, ακινητοποιείται στο εκτεθειμένο ενδοθήλιο και επιτρέπει την συγκράτηση των κυκλοφορούντων στο αίμα αιμοπεταλίων. Αυτή η προφανής επαγωγική πρόσδεση in vivo σχετίζεται με την πρόσδεση του vWF στο κολλαγόνο ή σε άλλα υποενδοθηλιακά συστατικά η οποία μαζί με την επίδραση του shear stress, προκαλεί τις απαιτούμενες δομικές αλλαγές ώστε ο παράγοντας να γίνει προσβάσιμος στους αιμοπεταλιακούς υποδοχείς [10,13,14]. Η επικράτεια A1 του vWF προσδένει την γλυκοπρωτεΐνη GPIIb, μέρος του συμπλόκου GPIIb-IX-V της επιφάνειας των αιμοπεταλίων καθώς επίσης και την ιντεγκρίνη αIIbβ3 (GPIIb/IIIa), ενώ έχει και μια θέση πρόσδεσης για το ινώδες κολλαγόνο τύπου IV [10,13,15]. Η πρόσδεση vWA1-GPIIb είναι που κυρίως προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τα οποία παρουσιάζουν ακολούθως στην επιφάνειά τους τις GPIIb/IIIa, οι οποίες δημιουργούν μια πιο ισχυρή και σταθερή αλληλεπίδραση τόσο με τον vWF όσο και με το ινώδες κολλαγόνο [8,10,12,15].



Εικόνα 4: Τριδιάστατη γραφική αναπαράσταση: Της αλληλεπίδρασης της αιμοπεταλιακής GPIIba (κίτρινο) με την επικράτεια A1 του vWF (μπλε) **(A)**. Της δευτεροταγούς δομής της επικράτειας A1 και του καίριου δισουλφιδικού δεσμού Cys509-Cys695 **(B)**.

Η θέση πρόσδεσης της GPIIba στον vWF περιλαμβάνει την N-τελική β-φουρκέτα, η οποία αλληλεπιδρά με θηλιές της επικράτειας A1, τις 8 LRRs (Leucine-Rich Repeats-επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη) και μια C-τελική ανιοντική περιοχή που περιέχει τρεις τυροσίνες στις θέσεις 276, 278, και 279, οι οποίες επιδέχονται θείωση και αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα Lys569, Arg571, Lys572, Arg573 της A1 [10,16]. Η δέσμευση τους έχει μικρό χρόνο ημιζωής και από μόνη της δεν παρέχει μη αντιστρεπτή προσκόλληση. Σε σχέση με την αποτελεσματική προσκόλληση των αιμοπεταλίων αυτό δείχνει ότι η κινητική της αρχικής πρόσδεσης με τον vWF πρέπει να είναι γρήγορη, παρέχοντας τη δυνατότητα για τη δημιουργία των πιο σταθερών δεσμών μέσω της ιντεγκρίνης που γενικά απαιτούν περισσότερο χρόνο [10,13]. Βέβαια, η πολυσθενής επιφάνεια των αιμοπεταλίων έρχεται σε επαφή με μια μεγάλη πυκνότητα ακινητοποιημένων επικρατειών A1 και έτσι η πιθανότητα για κάθε αιμοπετάλιο σύναψης ενός ισχυρού δεσμού αυξάνεται σημαντικά, όταν παράλληλα οι διατμητικές δυνάμεις του αίματος τα συγκεντρώνουν προς το τοίχωμα του αγγείου [10].

Όμως η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στον vWF ρυθμίζει έμμεσα και την πρωτεόλυση από τον ADAMTS13. Σε πειράματα με μεταλλαγμένες επικράτειες A2 ως προς την παρουσία ή την απουσία της επικράτειας A1 ή της A3 παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της επικράτειας A1 μείωνε εμφανώς το ρυθμό και την έκταση της διάσπασης του υποστρώματος, ενώ η παρουσία της επικράτειας A3 δεν είχε κάποια

αξιοσημείωτη επίπτωση. Η πρόσδεση ακόμα και ενός αμινοτελικού τμήματος του GPIIb στην επικράτεια A1 ήταν αρκετό για να προάγει την πέψη της γειτονικής επικράτειας A2 από τον ADAMTS13. Φαίνεται ότι χαρακτηριστικά της επικράτειας A1 εμποδίζουν τη διάσπαση από τον ADAMTS13 πιθανότατα σταθεροποιώντας τη φυσική διαμόρφωση της A2 ή περιορίζοντας τη δέσμευση του ADAMTS13. Έτσι, η επικράτεια A1 εμποδίζει τη διάσπαση της γειτονικής της A2 ενώ ο GPIIb μπορεί να μετριάσει αυτή την παρεμπόδιση. Μια ισχυρά ηλεκτραρνητική επιφάνεια του GPIIb προσδένεται σε μεγάλη ηλεκτροθετική πλευρά της A1 και αυτή η πρόσδεση διευκολύνει την αναγνώριση από τον ADAMTS13 δίνοντας ενδεχομένως ένα νέο σημείο δέσμευσής του στον GPIIb ή αποκαλύπτοντας ένα κρυφό σημείο δέσμευσης στην επικράτεια A2 ή μειώνοντας ανεπιθύμητες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις [17].

2. Η ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑ A2

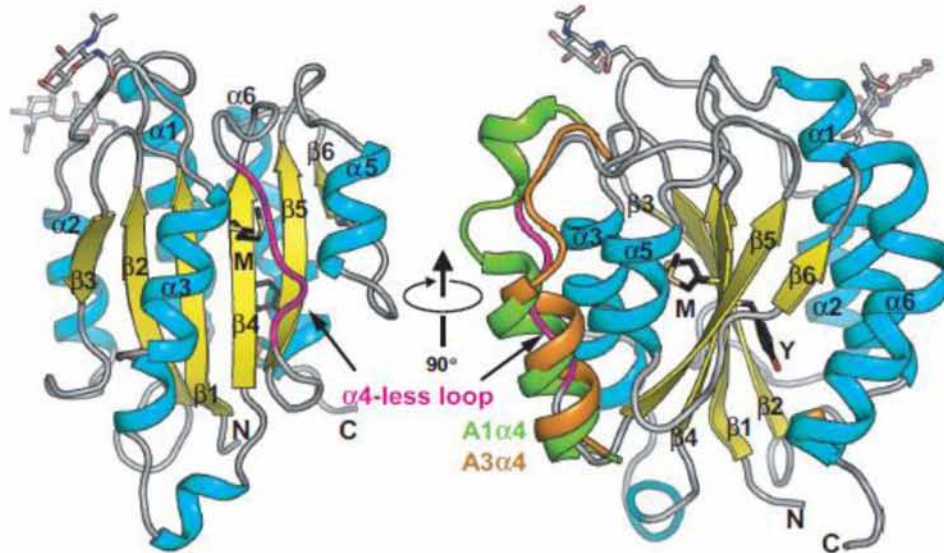
Η κρυσταλλική δομή της επικράτειας A2 φανερώνει ενδιαφέρουσες εξελικτικές προσαρμογές, που της προσέδωσαν την δυναμο-εξαρτώμενη ιδιότητά της. Διαθέτει μοναδικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στις άλλες A επικράτειες του παράγοντα von Willebrand όπως μια θηλιά αντί της α4-έλικας, έναν σπάνιο δισουλφιδικό δεσμό αλλά και μια *cis*-προλίνη [18].

Γενική δομή της επικράτειας A2

Ως τώρα, υπάρχουν λίγες μελέτες για πρωτεΐνες που έχουν εξελιχθεί ώστε να αποδιατάσσονται με την επίδραση διατμητικής τάσης. Η δομή της επικράτειας A2 έχει άμεση ανάμειξη στην αποδιάταξή της και στο πως οι υδροδυναμικές δυνάμεις και η πρωτεόλυση από τον ADAMTS13 ρυθμίζουν το μέγεθος και κατά συνέπεια την αιμοστατική δυναμική των συγκαταμερών του vWF *in vivo* [18].

Η αναδίπλωση της A2 μοιάζει αρκετά με αυτήν των άλλων επικρατειών A, με α-έλικες και β-φύλλα αλλά διαφέρει αρκετά στην αλληλουχία. Ο υδροφοβικός πυρήνας β-φύλλου περιέχει β-κλώνους σε σειρά β3-β2-β1-β4-β5-β6, με τον β3 να είναι αντιπαράλληλος προς τους άλλους. Στις επικράτειες A του vWF αυτό το β-φύλλο περικλείεται από 6 αμφιπαθείς α-έλικες. Ωστόσο, η A2 δεν διαθέτει την α4-έλικα, που διαθέτουν οι A1 και A3, (εικόνα 5) και αντ' αυτής υπάρχει ένας μεγάλος βρόγχος ανάμεσα στον C-τελικό β4-κλώνο και τον N-τελικό β5-κλώνο και γι αυτό αποκαλείται «βρόγχος χωρίς α4» (α4-less loop). Η έλλειψη αυτής της έλικας σε σχέση με τις ομόλογες επικράτειες της A2 είναι αποτέλεσμα εξέλιξης. Καθώς στην Βιολογία ισχύει: «*μια μορφή εξελίσσεται για να προσαρμοστεί στη λειτουργία*», συνάγεται ότι αυτή η διαφορά προέκυψε λόγω της ιδιότητας της επικράτειας A2 να αποδιατάσσεται με εφαρμογή δύναμης. Άρα, υπάρχει μια προφανής προσθετική

λειτουργία του βρόγχου στο να επιβραδύνει ίσως την επαναδιάταξη, συγκρινόμενη με τις άλλες vWA επικράτειες που περιέχουν α4-έλικες [18].



Εικόνα 5: Τριδιάστατη γραφική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της επικράτειας A2. Τα σημεία N-γλυκοζυλιωμένων δεσμών καθώς και ο δεσμός Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ (M) που πρωτεολύει ο ADAMTS13 αναπαριστώνται ως sticks [18].

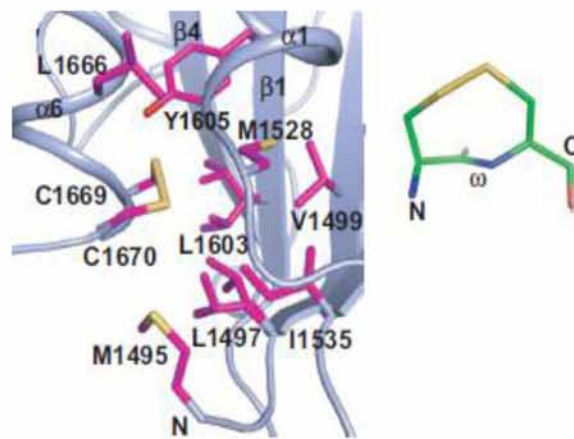
Ο πεπτιδικός δεσμός Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ που πρωτεολύει ο ADAMTS13 βρίσκεται στο κέντρο του β-φύλλου, κοντά στο μέσο του κεντρικού β4-κλώνου, δηλαδή βαθειά κρυμμένος στον υδροφοβικό πυρήνα της επικράτειας A2 (εικόνα 5). Οι πλευρικές αλυσίδες του β4-κλώνου και από τις δύο πλευρές παρουσιάζουν ελαφριά συσπείρωση. Κατά συνέπεια αυτή η διάταξη υποδηλώνει ότι για να γίνει η πρωτεόλυση από τον ADAMTS13, η επικράτεια A2 πρέπει να αποδιαταχθεί τουλάχιστον ως το σημείο που βρίσκεται ο δεσμός. Σε ένα πλήρες πολυμερές του παράγοντα von Willebrand, η δύναμη έκτασης θα μεταφερθεί στο αμινικό και στο καρβοξυλικό άκρο της A2 από τις επικράτειες A1 και A3 μέσω O-γλυκοζυλιωμένων δεσμών. Όμως, είναι πιο πιθανό η αποδιάταξη να γίνει από το C-τελικό άκρο παρά από το N-τελικό διότι το καρβοξυλικό λόγω θέσης μπορεί να μετακινηθεί πιο εύκολα καθώς βρίσκεται στο εξωτερικό της επικράτειας, ενώ το αμινικό που βρίσκεται στον β1-κλώνο είναι στον πυρήνα της επικράτειας περιστοιχιζόμενο από τους άλλους β-κλώνους [7,18]. Η δομή της σχηματίζει ένα αυλάκι που ίσως είναι σχεδιασμένο να χωρίζεται σε δύο κομμάτια για να προστατεύσει τα άλλα μέρη του μορίου. Ωστόσο, πρόσφατες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής και μελέτες με οπτικές λαβίδες (optical tweezers) επιβεβαίωσαν την πρώτη υπόθεση, ότι δηλαδή η επικράτεια A2 αποδιατάσσεται σταδιακά από το καρβοξυλικό της άκρο, με την

α6-έλικα να αποσπάται πρώτη, ακολουθούμενη από τον β6-κλώνο και την α5-έλικα [14].

Ιδιαιτερότητες της επικράτειας A2 σε σχέση με τις ομόλογες A1 & A3

Η επικράτεια A2 έχει μεγάλη ομολογία με τις γειτονικές της A1 και A3, αλλά δε διαθέτει έναν δισουλφιδικό δεσμό στο εσωτερικό της επικράτειας που να συνδέει το C-τελικό με το N-τελικό άκρο, και να την προστατεύει από αποδιάταξη. Αυτό είναι ένα ακόμα στοιχείο που φανερώνει τον ρόλο της διατμητικής δύναμης στην αποδιάταξή της. Ωστόσο, η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της αποκάλυψε την ύπαρξη ενός δισουλφιδικού δεσμού ανάμεσα στις γειτονικές κυστεΐνες C1669 και C1670 στο C-τελικό άκρο της α6-έλικας. Ένας δισουλφιδικός δεσμός τέτοιου τύπου είναι σπάνιος, καθώς σχηματίζεται ένας οκταμελής δακτύλιος που κάμπτεται τον σκελετό (backbone) του μορίου σε μια ασυνήθιστη περιορισμένη διαμόρφωση και πιθανώς επηρεάζει την αποδιάταξη της (εικόνα 6). Στην κρυσταλλική δομή, ο

δισουλφιδικός δεσμός αλληλεπιδρά άμεσα με τον υδροφοβικό πυρήνα της επικράτειας, υποδηλώνοντας ότι σταθεροποιεί τη διάταξή της [14,18]. Πράγματι, πειράματα στα οποία συγκριθήκαν μόρια της επικράτειας A2 με δισουλφιδικό δεσμό ως προς εκείνα που δε διέθεταν, παρουσίασαν μειωμένη πρωτεόλυση αλλά και δέσμευση στον ADAMTS13, ενώ μελέτες κυκλικού διχρωισμού έδειξαν ότι η



Εικόνα 6: Ο δισουλφιδικός δεσμός των γειτονικών κυστεϊνών C1669-C1670 στον υδροφοβικό πυρήνα (αριστερά) και ο οκταμελής δακτύλιος που σχηματίζει (δεξιά)[18].

επικράτεια A2 που διέθετε δισουλφιδικό δεσμό είναι πιο ανθεκτική στη θερμική αποδιάταξη [14]. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν τον σημαντικό ρόλο των ενωμένων με δισουλφιδικό δεσμό γειτονικών κυστεϊνών στη σταθερότητα της επικράτειας A2 του vWF. Επίσης, αυτός ο δισουλφιδικός δεσμός βρίσκεται ακριβώς δίπλα σε ένα βασικό σημείο για την πρόσδεση της επικράτειας Spacer του ADAMTS13, το οποίο περιλαμβάνει τα αμινοξέα E1660-R1668, όπως θα δούμε παρακάτω. Μελέτη με οπτικές λαβίδες, προτείνει ότι ο δισουλφιδικός δεσμός επηρεάζει κυρίως τον αρχικό διαχωρισμό της α6-έλικας και έτσι ρυθμίζει άμεσα την έκθεση της στην επικράτεια Spacer [14].

Ένα ακόμα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της επικράτειας A2 είναι η *Cis*-Pro¹⁶⁴⁵ που διαθέτει, η οποία ίσως έχει κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στην επαναδιάταξή της όταν

βρίσκεται σε εξωκυτταρικό περιβάλλον. Ενδοκυτταρικά η ισομερίωση (*cis-trans*) της προλίνης λειτουργεί σαν ένας διακόπτης σε κάποιες σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Μια τέτοια υπόθεση έγινε διότι μια προλίνη βρίσκεται σε παρόμοια θέση στις επικράτειες A1 και A3 αλλά είναι *trans*. Η μετατροπή του δεσμού Trp¹⁶⁴⁴-Pro¹⁶⁴⁵ από *cis* σε *trans*, με τη βοήθεια των διατμητικών δυνάμεων, θα μπορούσε να επιβραδύνει την επαναδιάταξη της επικράτειας A2 ώστε να διευκολύνει την πρωτεόλυση από τον ADAMTS13 στα σημεία επούλωσης του τραυματισμένου αγγείου αλλά και να αποτελέσει ένα σήμα για την A2 του πολυμερούς του vWF σε περιπτώσεις παρατεταμένης αποδιάταξης [7,18].

Τέλος, μια κύρια διαφορά της A2 από την επικράτεια A1 είναι ότι η πρώτη έχει στην επιφάνειά της μια πιο ισοροπημένη κατανομή των θετικών και αρνητικών φορτίων σε σχέση με την επιφάνεια της A1 που είναι κυρίως θετικά φορτισμένη. Επιπλέον, από τις τρεις επικράτειες A, η A2 είναι η μόνη που έχει δύο πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης στις N1515 και N1574, όπως φαίνονται στην εικόνα 4, οι οποίες μάλιστα είναι αρκετά συντηρημένες, κάτι που ίσως να έχει λειτουργική σημασία [3].

Παλαιότερες μελέτες υποστήριξαν, ότι η επικράτεια A2 ίσως ρυθμίζει έμμεσα την αλληλεπίδραση vWA1-GPIIb. Σε νεότερες μελέτες, όπου μελετήθηκε η ενεργότητα πρόσδεσης της επικράτειας A2 στην A1 με τη χρήση ανασυνδυασμένων επικρατειών A και μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb), διαπιστώθηκε ότι η A2 αναγνωρίζει την διαμόρφωση που παίρνει η A1 για να προσδεθεί με τον GPIIb όταν ο vWF είναι ακινητοποιημένος, λειτουργώντας ως αναστολέας της αλληλεπίδρασης GPIIb-vWF και μειώνοντας έτσι τον αριθμό των αιμοπεταλίων που συγκρατούνταν σε συνθήκες διατμητικής τάσης. Με βάση τα παραπάνω θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε, ότι η A2 και ο GPIIb προσδένονται στην ίδια θέση στην A1. Ωστόσο άλλα πειράματα υπέδειξαν, ότι πιθανώς οι δύο θέσεις πρόσδεσης για την A2 και τον GPIIb αλληλεπικαλύπτονται σε κάποιο βαθμό [5]. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση αυτών των δύο επικρατειών θα μπορούσε να έχει έναν αμοιβαίο ρυθμιστικό μηχανισμό.

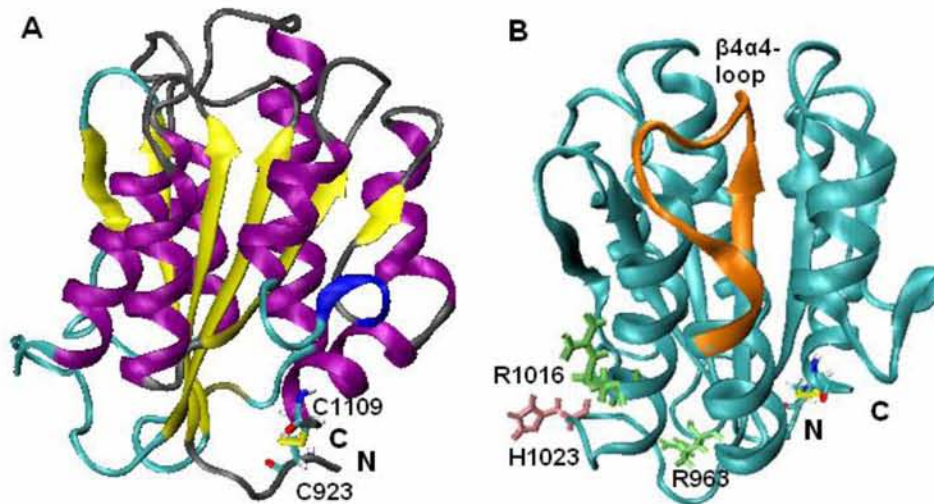
3. Η ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑ A3

Η επικράτεια A3 του παράγοντα von Willebrand είναι υπεύθυνη για την πρόσδεσή του στο σημείο τραυματισμού του αγγείου. Συγκεκριμένα διαθέτει θέσεις πρόσδεσης για τα ινώδη κολλαγόνα τύπου I και III [2,3,5,6,12]. Η θέση πρόσδεσης στο κολλαγόνο δεν είναι απολύτως γνωστή. Παλαιότερα είχε προταθεί ότι το σημείο πρόσδεσης βρισκόταν στο πάνω μέρος, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 7, κατ' ομολογία με τις υπομονάδες I των ιντεγγρινών a1b1 και a2b1.

Όμως, η πάνω επιφάνεια της επικράτειας A3 είναι αρκετά ομαλή και παρόλο που είναι διατηρημένο το μοτίβο MIDAS, δεν είναι αναγκαία η μεσολάβηση μεταλλικού ιόντος για την πρόσδεση στο κολλαγόνο. Αυτό αποδεικνύεται από μεταλλάξεις στο μοτίβο, οι οποίες δεν εμπόδισαν την πρόσδεση [6,19].

Οι Huizinga *et al.*[11] προσδιορίζοντας την κρυσταλλική δομή της επικράτειας A3, υπέδειξαν μια πιθανή θέση αλληλεπίδρασής της με το κολλαγόνο. Αυτή βρέθηκε χάρη σε ασθενή με μειωμένη ενεργότητα vWF λόγω ενός IgM αντισώματος, που εμπόδιζε την αλληλεπίδραση ανάμεσα στον παράγοντα von Willebrand και το κολλαγόνο [20]. Ανάλυση του αντιγονικού επιτόπου υπέδειξε τα αμινοξέα 1036–1047 (β4α4 βρόγχο) που βρίσκονται στην C-τελική πλευρά του β-φύλλου. Αυτή η περιοχή είναι σχετικά λεία και περιέχει μια μεγάλη αρνητικά φορτισμένη περιοχή, δύο ξέχωρα θετικά φορτία και μια υβροφοβική θέση. Η ηλεκτρωνητική περιοχή προφανώς έρχεται σε επαφή με θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα του κολλαγόνου [11].

Όμως οι Romijn *et al.*[6] κρυσταλλώνοντας το σύμπλοκο της επικράτειας A3 με το τμήμα Fab του αντισώματος RU5, που επίσης εμπόδιζε την πρόσδεση στο κολλαγόνο, και με σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή που αναγνωρίζει το RU5, προσδιόρισαν αμινοξικά κατάλοιπα στην κάτω επιφάνεια της επικράτειας που εμπλέκονται στην πρόσδεση στο κολλαγόνο. Συγκεκριμένα, απαραίτητη στη διαδικασία είναι η His1023, ενώ η Arg963 και η Arg1016 έχουν επικουρικό ρόλο (εικόνα 7). Αυτά τα αμινοξέα, η μετάλλαξη των οποίων μείωνε τη δυνατότητα πρόσδεσης, βρίσκονται στους βρόγχους α3β4 και α1β2 και στην α3-έλικα, αντίστοιχα. Μάλιστα ο ρόλος της His1023 είναι τόσο καίριος που η μετάλλαξη H1023A είχε παρόμοιο αποτέλεσμα με πείραμα στο οποίο έλλειπε ολόκληρη η επικράτεια A3. Τα συγκεκριμένα αμινοξέα που είναι θετικά φορτισμένα, προφανώς δημιουργούν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα του κολλαγόνου. Επίσης τόσο η His1023 όσο και τα πλευρικά της αμινοξέα παρουσιάζουν πολλαπλές θέσεις/διατάξεις στις διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές της επικράτειας A3, κάτι που σημαίνει ότι η προσκόλληση στο κολλαγόνο εμπλέκει έναν μηχανισμό ο οποίος να προσαρμόζει τη δομή της επικράτειας ώστε να ταιριάζει [6]. Ωστόσο, όπως κάθε πρωτεΐνη με παρόμοια αναδίπλωση στο χώρο με την A3, το ενεργό κέντρο ή το σημείο πρόσδεσης βρίσκεται στην C-τελική πλευρά του β-φύλλου. Οπότε τα γειτονικά αμινοξέα της His1023 ίσως είναι ένα πρώτο σημείο αλληλεπίδρασης και αναγνώρισης.



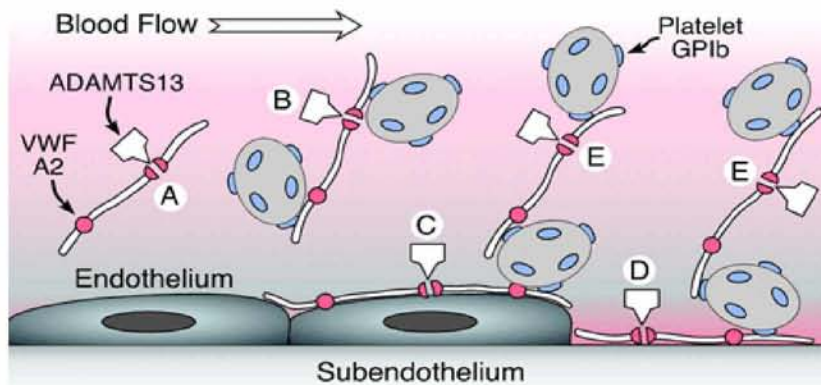
Εικόνα 7: Τριδιάστατη αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της επικράτειας A3. Διακρίνεται ο δισουλφιδικός δεσμός ανάμεσα στην N-τελική Cys923 και στην C-τελική Cys1109, που συγκρατεί ενωμένα τα άκρα της επικράτειας (A). Με πορτοκαλί φαίνεται ο βρόγχος β4α4 που παίζει ρόλο στην πρόσδεση στο κολλαγόνο καθώς και η His1023 καθώς και οι Arg963, Arg1016 (B).

Το πάνω μέρος της επικράτειας A3 μπορεί να μην παίζει ρόλο στην πρόσδεση στο κολλαγόνο, μπορεί ωστόσο να εμπλέκεται σε άλλες αλληλεπιδράσεις, όπως στη δέσμευση της επικράτειας A1. Έχει προταθεί ότι αυτό συμβαίνει ώστε να ενεργοποιηθεί η A1 για την πρόσδεση της γλυκοπρωτεΐνης Ib (GPIb) [6,21].

B. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ & ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ

Μετά από τραυματισμό του τοιχώματος ενός αγγείου τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν στο αίμα τα ULVWF. Αμέσως μετά ένα μέρος των εκκρινόμενων ULVWF προσδένεται τοπικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα από τα οποία και απελευθερώνεται αλλά και μέσω των επικρατειών A3 προσδένεται στο κολλαγόνο στα σημεία τραυματισμού του ιστού, με στόχο να ακινητοποιηθούν ώστε να μπορέσουν να συγκρατήσουν τα αιμοπετάλια και κατά συνέπεια να δημιουργηθεί θρόμβος και να διακοπεί η αιμορραγία. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η συγκράτηση των αιμοπεταλίων γίνεται μέσω σύνδεσης της γλυκοπρωτεΐνης Iba της επιφάνειάς τους με την επικράτεια vWA1 [7,9]. Ωστόσο, εάν τα πολυμερή συνεχίζουν να συσσωρεύονται στο σημείο του τραύματος θα δημιουργηθεί εκτεταμένος θρόμβος και διακοπή της φυσιολογικής κυκλοφορίας του αίματος. Κάτι τέτοιο αποτρέπει από τη μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13, η οποία πρωτεολύοντας έναν μόνο πεπτιδικό δεσμό στην επικράτεια vWA2 διασπά τα πολυμερή του vWF ελαττώνοντας το μέγεθός τους και αποτρέποντας τη

δημιουργία θρόμβου. Αυτό συμβαίνει δύο ώρες μετά από την απελευθέρωση των ULVWF στην κυκλοφορία του αίματος [7,8].



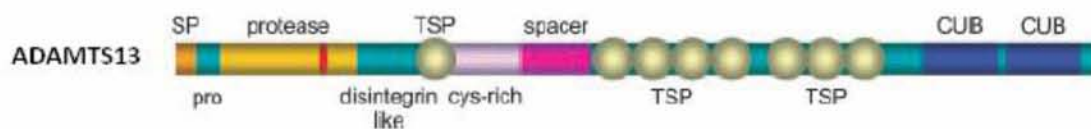
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού προσκόλλησης του vWF-αιμοπεταλίου στο εκτεθειμένο ενδοθήλιο και η πρωτεόλυση της vWA2 από τον ADAMTS13.

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα I.A.2, στην αναδιπλωμένη κατάσταση της επικράτειας A2 ο πεπτιδικός δεσμός Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ που υδρολύεται, είναι απροσπέλαστος από την πρωτεάση. Για να γίνει προσβάσιμος θα πρέπει να αλλάξει η δομή της A2. Αυτό είναι εφικτό χάρη στη φύση του μορίου καθώς βρίσκεται υπό την επίδραση εφελκυστικών δυνάμεων (force-sensing domain). Δηλαδή οι διατμητικές τάσεις της ροής του αίματος (fluid shear stress) ασκούνται στον αυξανόμενο θρόμβο, πλούσιο σε αιμοπετάλια, και προκαλούν την επιμήκυνση των ULVWF και κατά συνέπεια αποδιάταξη της A2 επικράτειας [7,8].

Η επίτευξη ισορροπημένης ρύθμισης της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων αποτελεί πρόκληση κάτω από τις συνθήκες που επικρατούν στο αίμα. Ο vWF και ο ADAMTS13 υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις, περίπου 10 μg/ml και 1μg/ml αντίστοιχα, σε σύγκριση με τη συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο πλάσμα που είναι 80.000 μg/ml. Παρ' όλα αυτά, ο vWF είναι το μόνο γνωστό υπόστρωμα για τον ADAMTS13 στο πλάσμα, παρά το γεγονός ότι ο ADAMTS13 είναι ιδιосуστατικά ενεργός και δεν έχει κανένα γνωστό αναστολέα in vivo. Επιπλέον, ο vWF ανθίσταται στον ADAMTS13 έως ότου υποβληθεί στην αυξημένη διατμητική τάση της ροής του αίματος [9]. Η στοιχειομετρία πρόσδεσης δείχνει, ότι κάθε μόριο του ADAMTS13 προσδένεται σε ένα μονομερές ή διμερές του vWF. Έτσι σε ένα πολυμερές vWF μπορούν να προσδεθούν αρκετά μόρια ADAMTS13 σε συνθήκες επαρκών διατμητικών τάσεων [22].

Η επικράτεια με δράση μεταλλοπρωτεάσης, του ADAMTS13 είναι αυτή που υδρολύει τον δεσμό Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ της vWA2 [9,23] (εικόνα 9). Αφαιρέσεις

εκατέρωθεν του δεσμού εμπόδισαν την πρωτεόλυση, αποδεικνύοντας ότι η επικράτεια Μεταλλοπρωτεάσης αλληλεπιδρά και με πλευρικά του δεσμού αμινοξέα [23]. Ωστόσο, σε αυτόν τον μηχανισμό παρουσιάζει ενδιαφέρον το πως ο ADAMTS13 προσδένεται στην A2, όταν η τελευταία δεν έχει σταθερή δομή αλλά αντίθετα δυναμική και μάλιστα αποδιαταγμένη και επιμήκη. Η πρόσδεση γίνεται απευθείας στην επικράτεια A2, στην οποία έχουν επικεντρωθεί και οι περισσότερες μελέτες, ωστόσο μπορεί και οι παρακείμενες A1 και A3 να συμμετέχουν στην αναγνώριση από τον ADAMTS13 και να ρυθμίζουν την ενεργότητά του ανεξάρτητα από τη διατμητική τάση του υγρού [9,17,22]. Οι επικράτειες Spacer και Cys-rich αλλά και οι TSP και CUB είναι τα γνωστότερα και πιο μελετημένα σημεία συμπληρωματικής πρόσδεσης του ADAMTS13 (εικόνα 9). Κάθε μια από αυτές τις αλληλεπιδράσεις αυξάνει την ειδικότητα πρόσδεσης. Πράγματι, καρβοξυτελικές αφαιρέσεις στον ADAMTS13, μετά τις επικράτειες Spacer, Cys-rich, TSP, Disintegrin-like, Μεταλλοπρωτεάση προκαλούν σταδιακή μείωση στην ενεργότητα της πρωτεάσης. Παρόμοια επίδραση έχουν και αφαιρέσεις στο καρβοξυτελικό άκρο της επικράτειας A2. Άρα όλες οι παραπάνω επικράτειες φαίνεται να αλληλεπιδρούν με ένα εκτεταμένο τμήμα της vWA2 [23,24].



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των επικρατειών της ADAMTS13 [25].

Έρευνες, που βασίστηκαν σε πειράματα μεταλλαξιγένεσης και κινητικών αναλύσεων, υποστηρίζουν ό,τι η διάσπαση του δεσμού Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ εξαρτάται από την αλληλεπιδράση της επικράτειας Spacer του ADAMTS13 με την περιοχή E¹⁶⁶⁰APDLVLQRR¹⁶⁶⁸ στο C-τελικό άκρο, δηλαδή στην α5-έλικα της επικράτειας A2 που απέχει περίπου 50 αμινοξέα από τη θέση του δεσμού. Στην αρχή πιστεύονταν ότι και αυτή η περιοχή βρισκόταν κρυμμένη στην αναδιπλωμένη A2, όπως ο δεσμός που διασπάται, αφού σε πειράματα ο ADAMTS13 μπορούσε να προσδεθεί στα πολυμερή του vWF μόνο όταν αυτά προσροφούνταν σε μια επιφάνεια ή είχαν υποστεί επεξεργασία με χαοτροπικούς παράγοντες. Κάτι τέτοιο όμως απορρίφθηκε όταν κρυσταλλώθηκε η επικράτεια A2 και αποκαλύφθηκε η τριτοταγής δομή της. Η απαλοιφή της επικράτειας Spacer από τον ADAMTS13 ή της καρβοξυτελικής αυτής περιοχής του vWF μείωναν τον ρυθμό διάσπασης. Η εξειδίκευση αυτού του μοναδικού μηχανισμού εξαρτάται από την επαγόμενη από διάταξη αποδιάταξη της

ούτε σταθερή θέση κατά την αποδιάταξη, επομένως για να αλληλεπιδρούν με τον ADAMTS13, πρέπει ο τελευταίος να είναι μάλλον σχετικά εύκαμπτος και να μπορεί να τροποποιεί τις σχέσεις ανάμεσα στις γειτονικές επικράτειές του που προσδένονται στον vWF, καθώς η πρωτεόλυση δεν εξαρτάται από μια σταθερή απόσταση ανάμεσα στον δεσμό Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ και στις βοηθητικές θέσεις πρόσδεσης.

Η επικράτεια A1 του vWF, από την άλλη, ρυθμίζει τη δράση της μεταλλοπρωτεάσης μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού, παρέχοντας ένα σημείο πρόσδεσης για την ενεργοποίηση συμπαραγόντων. Έχει αποδειχθεί ότι η επικράτεια A1 εμποδίζει την διάσπαση της παρακείμενης επικράτειας A2, αλλά αυτό το εμπόδιο μπορεί να υπερπηδηθεί μετά από την αλληλεπίδραση της A1 με την GPIIb ή με γλυκοζαμινογλυκάνες, καθώς μετά την πρόσδεση αλλάζει η διαμόρφωσή της. Κάτι τέτοιο ενισχύεται και από το γεγονός ότι η μετάλλαξη στην επικράτεια A1, που προκαλεί την ασθένεια von Willebrand τύπου 2B, σταθεροποιεί την τροποποιημένη δομή και επιταχύνει τη διάσπαση της γειτονικής επικράτειας A2. Έτσι, αυτή η πρόσδεση συμπαραγόντων στον vWF εμφανίζεται να τροποποιεί αλλοστερικά την επικράτεια A2, συμβάλλοντας στην έκθεση του κρυμμένου δεσμού και της καρβοξυτελικής περιοχής [9].

Το σύστημα vWF-ADAMTS13 φαίνεται να είναι το μοναδικό που χρησιμοποιεί την αποδιάταξη μιας πρωτεΐνης επαγόμενης από τάση, ως σήμα απαραίτητο για αναδραστική αναστολή, που στην περίπτωση αυτή γίνεται με πρωτεόλυση. Ωστόσο, παρόμοιοι μηχανισμοί, ενδεχομένως να έχουν αναπτυχθεί εξελικτικά και να εδράζονται συγκεκριμένα και αυτοί στο κυκλοφορικό σύστημα, όπου και υπάρχει αυξημένη διατμητική τάση σε παθολογικές καταστάσεις.[9]

1. Η ΔΥΝΑΜΗ ΠΟΥ ΔΕΧΕΤΑΙ Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VON WILLEBRAND

Ο παράγοντας von Willebrand, η μεγαλύτερη γνωστή διαλυτή πρωτεΐνη, δέχεται και τη μεγαλύτερη δύναμη σε σχέση με τις υπόλοιπες ελεύθερες πρωτεΐνες του αγγειακού συστήματος. Αυτή η εκατοκτική δύναμη ασκείται στην επικράτεια A2 λόγω της υδροδυναμικής και της γενικότερης διαμόρφωσης των πολυμερών του vW. Η διατμητική τάση της ροής του αίματος αυξάνεται από το τοίχωμα προς το κέντρο. Η υδροδυναμική δύναμη που δέχεται ο ακινητοποιημένος vW στο τοίχωμα του αγγείου είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που δέχεται ο διαλυτός, καθώς σχετίζεται με την έκταση της επιφάνειάς του.

Η διατμητική τάση που ασκείται μετά το οριακό σημείο των 50 dyn/cm², εξουδετερώνει τις ελκτικές δυνάμεις και υπερσχύουν οι υδροδυναμικές δυνάμεις έκτασης που προκαλούν την περιοδική επιμήκυνση και συρρίκνωση του διαλυτού vW. Η περιστροφική ροή κάνει τα μόρια να κατρακυλούν, ωστόσο οι ελκτικές δυνάμεις ανάμεσα στα μονομερή τα συγκρατούν.

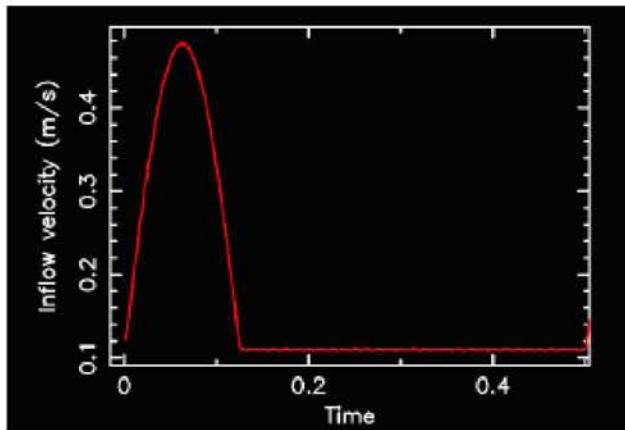
Για ένα πολυμερές με N μονομερή, που έχει υποστεί έκταση, η εφελκυστική δύναμη που δέχεται ένα μονομερές αυξάνεται με την απόσταση από το κοντινότερο άκρο του πολυμερούς και η δύναμη στο μέσο του πολυμερούς είναι ανάλογη του N². Η δύναμη αυξάνεται με το τετράγωνο του μήκους, καθώς τόσο το μέγεθος του πολυμερούς όσο και η διαφορά της ταχύτητας στα δύο άκρα του πολυμερούς, αυξάνονται με το μήκος. Αυτή είναι μια δευτερεύουσα επίδραση της δύναμης όχι μόνο στην αποδιάταξη της επικράτειας A2 αλλά και εξηγεί την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των μακρύτερων πολυμερών στη συγκρότηση αιμοπεταλίων.

Σε υγιή αγγεία και σε μέγιστη διατμητική τάση που φθάνει τα 100 dyn/cm² (shear rate of 5000 s⁻¹), η εφελκυστική δύναμη υπολογίστηκε ότι φθάνει τα 10 pN στο μέσο ενός πολυμερούς αποτελούμενο από 200 μονομερή του vW, τον μέγιστο αριθμό μονομερών που μπορούν να συγκρατηθούν σε ένα πολυμερές στην κυκλοφορία.

Ένας ακόμα παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι αυτός της επιμήκυνσης από τη ροή, καθώς κοντά στο σημείο αιμορραγίας η ροή από διατμητική, με χαρακτηριστικά περιστροφής και επιμήκυνσης, μεταβάλλεται κυρίως σε επιμήκυνσης. Αν και το πρότυπο ροής είναι γενικά περίπλοκο, η γενική εικόνα είναι ότι η κύλιση και οι αλληλοδιάδοχοι κύκλοι συρρίκνωσης τείνουν να εξαλείφονται και να υπερσχύει η επίδραση της επιμήκυνσης στον παράγοντα. Ενώ ευθυγράμμιση του παράγοντα με την κύρια κατεύθυνση της επιμήκυνσης θα μπορούσε να αυξήσει την εφελκυστική δύναμη κατά 10 φορές [7].

Η συμπεριφορά της ροής του αίματος εξαρτάται άμεσα από τη γεωμετρία σε κάθε σημείο του αγγείου, δηλαδή τις κυρτώσεις, τις στενώσεις, τη διασταλτικότητα των τοιχωμάτων ή και τις διακλαδώσεις. Το απλούστερο μοντέλο είναι αυτό της σταθερής ροής. Ωστόσο, στο κυκλοφορικό σύστημα, η περιοδική φύση του καρδιακού κύκλου προκαλεί μια κυμαινόμενη ροή του αίματος με επίσης περιοδικές αυξομειώσεις που αντιστοιχούν στις συστολές και διαστολές τις καρδιάς. Το παραπάνω προφανώς έχει συνέπειες στην ταχύτητα και την πίεση του αίματος [28].

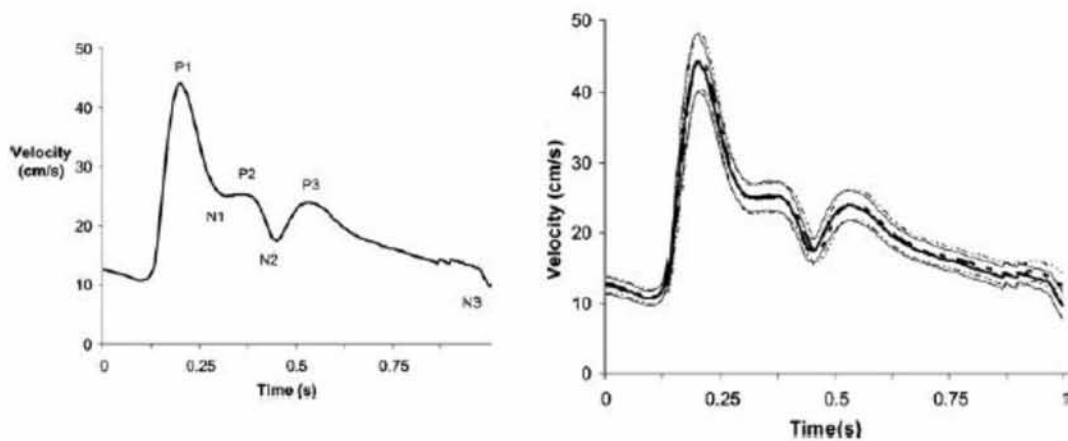
Το πρότυπο ροής που λάβαμε υπόψη για την ταχύτητα του αίματος και κατ' επέκταση τον υπολογισμό της δύναμης που ασκεί, είναι αυτό που χρησιμοποιήθηκε σε μελέτες της ροής στην καρωτίδα με τη μέθοδο Smoothed Particle Hydrodynamics. Δηλαδή ενός φυσιολογικού παλμού με κολποειδές προφίλ. Πιο



Διάγραμμα 1: Προσεγγιστικό προφίλ της ταχύτητας της ροής του αίματος κατά τη διάρκεια ενός καρδιακού κτύπου [28].

αναλυτικά, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1, για μια περίοδο 0.5s που αντιστοιχεί σε έναν ταχύ καρδιακό παλμό 120 κτύπων το λεπτό (ή 2Hz), η μέγιστη ταχύτητα είναι 0.5m/s και η ελάχιστη 0.1m/s. Σε μια σταθερή κατάσταση, η ταχύτητα ροής θα είναι 0.15m/s [28]. Για τις ανάγκες της προσομοίωσης δεχθήκαμε την μέγιστη ταχύτητα του αίματος κοντά στη συστολή, δηλαδή 0.5m/s.

Κάτι τέτοιο επιβεβαιώνεται και από μια μελέτη στην οποία αναλύθηκε η κυματομορφή της ταχύτητας του αίματος στην οφθαλμική αρτηρία 10 υγιών ατόμων, με Colour Doppler Ultrasonography. Η αρχική μέτρηση όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2, παρουσιάζει τις ίδιες τιμές και παρόμοια διακύμανση με τις παραπάνω (διάγραμμα 1) [29].



Διάγραμμα 2: Στην εικόνα φαίνεται η τυπική γραφική παράσταση (αριστερά) και η μέση 10 υγιών ατόμων με 95% διάστημα εμπιστοσύνης (έντονη γραμμή-δεξιά) που λαμβάνεται από το Doppler OA [29].

Η ζητούμενη δύναμη υπολογίστηκε από την εξίσωση για την drag force:

$$F_D = 0.5 C_D \rho u^2 A$$

Όπου:

- C_D , ο συντελεστής αντίστασης, ο οποίος θα είναι μεταξύ αυτού ενός λεπτού δίσκου (παράλληλου προς την ροή $C_D = 0.004$) και αυτού μιας σφαίρας ($C_D = 0.45$). Για την περίπτωση δίσκου ελλειπτικής διατομής, όπως ενός αγγείου, έχουμε $C_{D,ελ} = C_{D,σφ}/9$. Άρα, $C_D = 0.45/9 = 0.05$.
- ρ , η πυκνότητα του ρευστού και συγκεκριμένα η πυκνότητα του ολικού αίματος $\rho_A = 1060 \text{ kg/m}^3$
- $u = 0.5 \text{ m/s} = 0.005 \text{ Å/ps}$ είναι η ταχύτητα της ροής του αίματος
- A , το εμβαδόν της μετωπικής επιφάνειας των θρομβοκυττάρων. Αφού ο όγκος του θρομβοκυττάρου είναι $V: \sim 2.4 \mu^3$, τότε το εμβαδόν της διατομής θα είναι $A: \sim 1.5 \mu^2 = 1.5 \times (10^{-6})^2 = 1.5 \times 10^{-12} \text{ m}^2$, όταν: $a = 1.2 \mu\text{m}$, $b = 1.2 \mu\text{m}$, $c = 1.2/3 \mu\text{m}$

Έτσι,

$$\begin{aligned}
 \text{η δύναμη αντίστασης } F_D &= 0.5 \times 0.05 \times (1060 \text{ kg/m}^3) \times (0.5 \text{ m/s})^2 \times (1.5 \times 10^{-12} \text{ m}^2) \\
 &= 0.025 \times (1060 \text{ kg/m}^3) \times (0.25 \text{ m}^2/\text{s}^2) \times (1.5 \times 10^{-12} \text{ m}^2) \\
 &= (26.5 \text{ kg/m}^3) \times (0.25 \text{ m}^2/\text{s}^2) \times (1.5 \times 10^{-12} \text{ m}^2) \\
 &= (6.625 \text{ kg/ms}^2) \times (1.5 \times 10^{-12} \text{ m}^2) \\
 &= 9.94 \times 10^{-12} \text{ kg} \cdot \text{m/s}^2
 \end{aligned}$$

$$=9.94 \times 10^{-12} \text{ N}$$

$$=9.94 \text{ pN}$$

Επειδή $1 \text{ kcal/mol} = 69.479 \text{ pN} \cdot \text{\AA} \Rightarrow 1 \text{ pN} = 0.0144 \text{ kcal/mol}\text{\AA}$, θα έχουμε

$$9.94 \text{ pN} = 0.143 \text{ kcal/mol}\text{\AA}$$

Σε κάθε περίπτωση η δύναμη από τη ροή του αίματος που θεωρείται ότι δέχονται οι επικράτειες A και συγκεκριμένα η A2, είναι της τάξης των 10pN. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μια τέτοια δύναμη θα ήταν πολύ χρονοβόρο να προσεγγισθεί πειραματικά μέσω προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Για αυτό το λόγο ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των τεσσάρων δυνάμεων. Στο πρώτο σύστημα της επικράτειας A2 (πείραμα 1) έγιναν 5 πανομοιότυπες πειραματικές διαδικασίες με μόνη διαφορά στην τιμή της δύναμης, δηλαδή 1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN για τους χρόνους 1.5ns, 2ns, 2.5ns, 4ns, 6.2ns, αντίστοιχα. Στο δεύτερο σύστημα (πείραμα 3) ασκήθηκαν αρχικά 800pN, αλλά μετά τα πρώτα 2.5ns αυξήσαμε τη δύναμη στα 1400pN για τα επόμενα 4.8ns ώστε να επιταχυνθεί η διαδικασία, χωρίς φυσικά κάτι τέτοιο να αλλάζει το πρότυπο αποδιάταξης.

Στα βιομοριακά συστήματα του συμπλόκου vWA1-GPIba και της επικράτειας A3 εφαρμόσαμε δύναμη 800pN για το χρονικό διάστημα των 3ns ώστε να συγκριθούν με το σύστημα του πειράματος 1 της A2 στο οποίο ασκήθηκαν επίσης 800pN.

C. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ

Τον τρόπο αποδιάταξης των τριών επικρατειών A του παράγοντα von Willebrand ερευνήσαμε με Κατευθυνόμενες Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Steered Molecular Dynamics Simulations-SMD), εφαρμόζοντας σταθερή μηχανική δύναμη. Οι προσομοιώσεις αυτές εκτελέστηκαν με το πρόγραμμα NAMD (Scalable Molecular Dynamics) [30], ενώ τα βιομοριακά συστήματα, όπως θα περιγραφούν παρακάτω, κατασκευάστηκαν με τη βοήθεια και του VMD (Visual Molecular Dynamics) [31]. Και τα δύο διανέμονται δωρεάν από το Πανεπιστήμιο του Illinois.

Το NAMD είναι ένας κώδικας παράλληλης μοριακής δυναμικής, σχεδιασμένος για την προσομοίωση μεγάλων βιομοριακών συστημάτων, υψηλών απαιτήσεων. [32,33] Το VMD είναι ένα πρόγραμμα μοριακών γραφικών σχεδιασμένο για την οπτικοποίηση και ανάλυση των βιοπολυμερών, δηλαδή των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων, των λιπιδίων και των μεμβρανών. Είναι συμβατό με τα AMBER, Charmm, DLPOLY, Gromacs, MMTK, NAMD, X-PLOR, και πολλά άλλα πακέτα [34].

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής χρησιμοποιούνται όταν χρειάζεται να υπολογιστούν οι δυναμικές ή οι εξισορροπημένες καταστάσεις βιομορίων, όταν αυτό δεν είναι εφικτό με πειραματικές μεθόδους. Κάθε δυναμική διαδικασία έχει μια χαρακτηριστική χρονική κλίμακα και ενεργειακό εύρος. Τα μακρομόρια γενικά, και οι πρωτεΐνες συγκεκριμένα διαθέτουν ένα μεγάλο εύρος κινήσεων από ατομικές διακυμάνσεις, που είναι γρήγορες και τοπικές, έως εκείνες που αφορούν όλο το μόριο και είναι αργές όπως η αναδίπλωση ή η αποδιάταξή του. Με τις προσπάθειες να ξεκινούν τη δεκαετία του '50, έως το 1977 που πραγματοποιήθηκε η πρώτη προσομοίωση πρωτεΐνης, μέχρι και σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές προσομοιώσεων [33,35].

1. STEERED MOLECULAR DYNAMICS

Πειραματικές μέθοδοι που εφαρμόζουν μηχανικές τάσεις προκειμένου να μελετηθεί αποδιάταξη ενός μακρομορίου είναι η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (atomic force microscopy-AFM), οι οπτικές λαβίδες (optical tweezers), ο βιομεμβρανικός ανιχνευτής δυνάμεων (biomembrane force probe-BFP), καθώς και με τα πειράματα μέτρηση δυνάμεων μεταξύ επιφανειών (surface force apparatus-SFA). Με τη μέθοδο των SMD, δηλαδή Κατευθυνόμενων Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής πραγματοποιούμε αντίστοιχα πειράματα *in silico*, δηλαδή μέσω προσομοίωσης σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Εφαρμόζοντας εξωτερικές δυνάμεις στα μόρια της προσομοίωσης, πέραν εκείνων που ασκούνται φυσιολογικά στο εσωτερικό των ατόμων. Με τη μέθοδο αυτή εξετάζουμε τις μηχανικές ιδιότητες των μακρομορίων.

Μπορούμε επίσης να επιταχύνουμε διαδικασίες που στη φύση είναι αρκετά αργές όπως η αποδιάταξη βιομορίων [32,36,37]. Οι SMD ως τώρα συνεισφέρουν σημαντικά στη μελέτη αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέτη ή στον προσδιορισμό των ελαστικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών [36].

Οι SMD μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε εφαρμόζοντας μία σταθερή δύναμη σε ένα άτομο ή σε ένα σύνολο ατόμων είτε με σταθερή ταχύτητα κατά την οποία χρησιμοποιείται κινούμενο αρμονικό δυναμικό (ελατήριο). Στη δεύτερη περίπτωση η δύναμη μεταβάλλεται στη διάρκεια του χρόνου της προσομοίωσης. Μπορεί επίσης να εφαρμοστεί δύναμη σε μέρη του συστήματος ώστε να προκαλέσει περιστροφικές κινήσεις των επιμέρους υπομονάδων ενός βιομορίου [32]. Απαιτείται, λοιπόν, ο καθορισμός τόσο της δύναμης αλλά και της κατεύθυνσής της, από την οποία θα εξαρτηθεί και το μονοπάτι αποδιάταξης. Όπως συμβαίνει και στα πειράματα AFM ή οπτικών λαβίδων, στις προσομοιώσεις SMD η δύναμη εφαρμόζεται στα άκρα της πρωτεΐνης. Η κατεύθυνσή της όμως μπορεί να επιλεγεί αυθαίρετα ή να οριστεί η καλύτερη δυνατή, ανάλογα με τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης ή ολόκληρου του βιομοριακού συστήματος. Πρωτεΐνες που δέχονται μηχανικές δυνάμεις έχουν συνήθως πολλές επικράτειες, συνδεδεμένες μεταξύ τους ως μια γραμμική αμινοξική αλληλουχία. Λόγω περιορισμένης υπολογιστικής ισχύος, είμαστε αναγκασμένοι να μελετήσουμε την απόκριση στην εφελκυστική δύναμη κάθε μιας επικράτειας ξεχωριστά [36].

Οι εσωτερικές δυνάμεις που δέχεται κάθε άτομο μέσα στο σύστημα υπολογίζονται με απλές μαθηματικές εξισώσεις. Για παράδειγμα, ο νόμος του Hooke χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει δεσμικές αλληλεπιδράσεις ενώ τα μη δεσμικά άτομα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ανελαστικές συμπαγείς σφαίρες ή να αλληλεπιδρούν σύμφωνα με το δυναμικό Lennard-Jones. Με αυτά τα μοντέλα, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής επιλύουν τις εξισώσεις της κίνησης του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα, γνωστόν ως θεμελιώδη νόμο της μηχανικής,

$$\mathbf{F} = m \mathbf{a}$$

Όπου:

- \mathbf{F} , η δύναμη που ασκείται σε ένα σώμα
- m , η μάζα του σώματος
- \mathbf{a} , η επιτάχυνση του σώματος [33].

Τα μοριακά συστήματα είναι κβαντομηχανικά και άρα οι κινήσεις τους περιγράφονται από τις εξισώσεις του Schrödinger. Επειδή όμως είναι δύσκολο να

λυθούν για μεγάλης κλίμακας συστήματα, όπως τα βιολογικά μακρομόρια, οι κινήσεις αυτές αντιμετωπίζονται κλασσικά.

Η ολοκλήρωση αυτών των εξισώσεων αποδίδει μια «τροχιά» που περιγράφει τις θέσεις και τις ταχύτητες των ατόμων όπως αυτές διαμορφώνονται σε κάθε χρονική στιγμή. Έτσι, από αυτήν την «τροχιά», μπορούν να προσδιοριστούν οι μέσες τιμές. Η μέθοδος είναι αιτιοκρατική, καθώς αν οι θέσεις και οι ταχύτητες κάθε ατόμου είναι γνωστές, τότε μπορεί να προβλεφθεί μια μελλοντική ή μια παρελθούσα. Η αριθμητική ολοκλήρωση γίνεται με τη μέθοδο των Πεπερασμένων Διαφορών (Finite Differences Method), που χρησιμοποιεί τα δεδομένα σε μια χρονική στιγμή t για να προβλέψει τις συντεταγμένες και τις ταχύτητες των ατόμων στη χρονική στιγμή $t+dt$, όπου dt ένα μικρό χρονικό διάστημα. Έτσι, η θέση στο βήμα $n+1$ δίνεται από:

$$\mathbf{r}_{n+1} = \mathbf{r}_n + \mathbf{v}_n dt + \mathbf{F}_n / 2m dt^2 + O(dt^3)$$

όπου, v_n η πρώτη παράγωγος της θέσης r_n , κοκ

Οι μεγάλης εμβέλειας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι πολύ σημαντικές λόγω της ύπαρξης πολικών και φορτισμένων χημικών ομάδων που επηρεάζουν τη φύση και τη λειτουργία των πρωτεϊνικών μορίων [33]. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ανάμεσα σε δύο φορτία δίνεται από το νόμο του Coulomb:

$$V_{\text{elec}} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_1 q_2}{r}$$

Όπου q_1, q_2 , τα ηλεκτρικά φορτία των δύο σωμάτων, ϵ_r , η διηλεκτρική σταθερά, ϵ_0 η διαπερατότητα του κενού και r , η σχετική απόσταση ανάμεσα στα δύο σώματα [35].

Η προσθήκη διαλύτη περιφερειακά του πρωτεϊνικού μορίου που μελετάται έχει σπουδαία επίδραση τόσο δομικά όσο και θερμοδυναμικά για κάθε άτομο ξεχωριστά αλλά και για το σύστημα συνολικά. Τα μόρια του διαλύτη επηρεάζουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, συνήθως μειώνοντάς τις. Όταν η προσομοίωση εκτελείται με άμεση παρουσία μορίων διαλύτη, τότε η ϵ_r ισούται με 1. Όταν ο αριθμός των φορτίων του συστήματος αυξάνεται, ο αριθμός των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων θα αυξηθεί και αυτός [33,35].

Συναρτήσεις Ολικής Δυναμικής Ενέργειας (Force Field Functions)

Σε μία προσομοίωση μοριακής δυναμικής που περιλαμβάνει όλα τα άτομα του βιομορίου, είναι ευνόητο ότι κάθε άτομο δέχεται μία συνισταμένη δύναμη που καθορίζεται από ένα σύνολο δυνάμεων οι οποίες προκύπτουν από την

αλληλεπίδραση αυτού του ατόμου με τα άτομα του υπόλοιπου συστήματος. Το NAMD χρησιμοποιεί μία κοινή συνάρτηση ολικής δυναμικής ενέργειας, που αποτελείται από τους ακόλουθους όρους:

$$U_{\text{total}} = U_{\text{bond}} + U_{\text{angle}} + U_{\text{dihedral}} + U_{\text{vdW}} + U_{\text{Coulomb}}.$$

Οι πρώτοι τρεις όροι περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε έκταση, κάμψη και στροφή των δεσμών. Δηλαδή,

$$U_{\text{bond}} = \sum_{\text{bonds } i} k_i^{\text{bond}} (r_i - r_{0i})^2,$$

$$U_{\text{angle}} = \sum_{\text{angles } i} k_i^{\text{angle}} (\theta_i - \theta_{0i})^2,$$

$$U_{\text{dihedral}} = \sum_{\text{dihedral } i} \begin{cases} k_i^{\text{dihedral}} [1 + \cos(n_i \phi_i - \gamma_i)], & n_i \neq 0 \\ k_i^{\text{dihedral}} (0_i - \gamma_i)^2 & n = 0, \end{cases}$$

Όπου:

- *bonds* (δεσμοί), υπολογίζεται κάθε ομοιοπολικός δεσμός στο σύστημα
- *angles* (γωνίες), είναι οι γωνίες ανάμεσα σε κάθε ζευγάρι ομοιοπολικών δεσμών που μοιράζονται ένα συγκεκριμένο άτομο και
- *dihedral* (δίεδρος) περιγράφει ζεύγη ατόμων που χωρίζονται από ακριβώς τρεις ομοιοπολικούς δεσμούς και με τον κεντρικό δεσμό να υπόκειται στη γωνία στρέψης ϕ

Οι τελευταίοι δύο όροι της συνάρτησης περιγράφουν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε μη δεσμικά ζεύγη ατόμων. Δηλαδή,

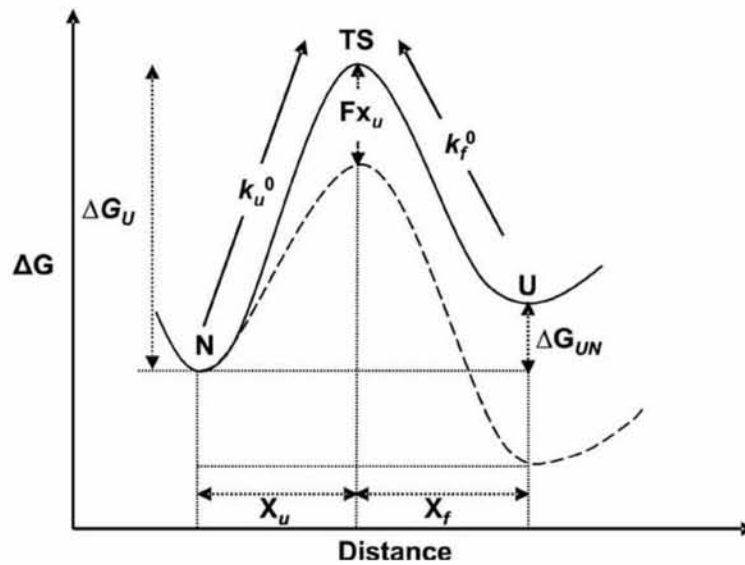
$$U_{\text{vdW}} = \sum_i \sum_{j>i} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right],$$

$$U_{\text{Coulomb}} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}},$$

οι οποίες είναι οι δυνάμεις Van der Waals και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις αντιστοίχως [32].

Ελεύθερη Ενέργεια

Σε ένα σύστημα είτε εφαρμοστεί SMD με σταθερή ταχύτητα είτε με σταθερή δύναμη, η επίδραση στην αποδιάταξη της πρωτεΐνης ερμηνεύεται με όρους ελεύθερης ενέργειας. (Διάγραμμα 3)



Διάγραμμα 3: Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας κατά την αποδιάταξη πρωτεΐνης απουσία (συνεχόμενη γραμμή) και παρουσία (διακεκομμένη γραμμή) δύναμης. Εφαρμογή δύναμης F , προκαλεί μεταβολή των επιπέδων ενέργειας. Αυτό σταθεροποιεί τη μεταβατική κατάσταση (transition state-TS) και την αποδιαταγμένη κατάσταση (unfolded state-U) αλλά δεν έχει καμία επίδραση στη φυσιολογική κατάσταση (native state-N). Ελάττωση του ενεργειακού φράγματος αποδιάταξης (ΔG_U) κατά Fx_u αυξάνει εκθετικά τη σταθερά της ταχύτητας αποδιάταξης (k_u^0) αλλά μειώνει εκθετικά τη σταθερά της ταχύτητας αναδίπλωσης (k_f^0). x_u και x_f είναι η απόσταση της μεταβατικής κατάστασης κατά μήκος της συντεταγμένης της αντίδρασης για το μονοπάτι αποδιάταξης και αναδίπλωσης, αντίστοιχα [38].

Όταν δεν εφαρμόζεται καμία δύναμη, η χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση της πρωτεΐνης είναι η φυσιολογική, αναδιπλωμένη. Για να φθάσει την αποδιπλωμένη κατάσταση, η πρωτεΐνη πρέπει να υπερβεί ένα υψηλό ενεργειακό φράγμα. Το ύψος του φράγματος (ΔG_U) σχετίζεται με τον ρυθμό με τον οποίο η πρωτεΐνη θα αποδιαταχθεί, λόγω θερμικών διακυμάνσεων. Με την εφαρμογή δύναμης F , το ενεργειακό τοπίο θα ορίζεται από τη συνάρτηση $-Fx(\cos\theta)$, όπου x , η απόσταση από την φυσιολογική κατάσταση και θ , η γωνία ανάμεσα στην ευθεία της x και στη δύναμη. Έτσι, το μεταβατικό φράγμα θα μειωθεί κατά $\Delta G_U - Fx_u$, όπου x_u , η απόσταση ανάμεσα στη φυσική (native well) και στη μεταβατική κατάσταση. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα η πρωτεΐνη να περάσει τη μεταβατική κατάσταση και να αποδιαταχθεί. Η εκθετική αύξηση στη σταθερά της ταχύτητας αποδιάταξης υπό την επίδραση δύναμης ($k_u^{(F)}$), περιγράφεται ως εξής:

$$k_u^{(F)} = \omega e^{-\frac{\Delta G_u - Fx_u}{k_B T}}$$

όπου, ω , ο προεκθετικός παράγοντας, k_B , η σταθερά Boltzmann και T , η θερμοκρασία. Οπότε διατυπώνεται και έτσι:

$$k_u^{(F)} = k_u^{(0F)} e^{\frac{Fx_u}{k_B T}}$$

όπου, $k_u^{(0F)}$, η ενδογενής σταθερά της ταχύτητας αποδιάταξης υπό την επίδραση μηδενικής δύναμης [38].

Γενικές παράμετροι προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής εκτελούνται με έναν αριθμό παραμέτρων που κρατούν το σύστημα σταθερό κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων και διατηρούν τις επιθυμητές συνθήκες. Οι σημαντικότερες, που εφαρμόστηκαν και στην παρούσα μελέτη, είναι οι παρακάτω:

- Καθώς η πρωτεΐνη περικλείεται συνήθως σε μια σφαιρική ή στην περίπτωση μας, κυλινδρική διάταξη διαλύτη (νερού), ασκούνται οριακές συνθήκες (boundary conditions) στα μόρια για να συγκρατήσουν την κυλινδρική δομή και τον δεδομένο όγκο [35].
- Ο υπολογισμός όλων των μη-δεσμικών αλληλεπιδράσεων είναι απαγορευτικός, κάνοντας τις προσομοιώσεις εργοβόρες υπολογιστικά. Γι' αυτό το λόγο εφαρμόζεται ένα κατώφλι (cutoff), γνωστό ως σφαιρική περικοπή (spherical truncation). Οι αλληλεπιδράσεις πέρα από την απόσταση του cutoff, για παράδειγμα 12Å, αγνοούνται [33,39].
- Μια ακόμη δυνατότητα του NAMD είναι η άσκηση Δυναμικής Langevin (Langevin dynamics), η οποία εισάγει επιπλέον αποσβεστικές δυνάμεις, επειδή το σύστημα διαταράσσεται λόγω της τριβής μεταξύ των μορίων του. Μιμείται το ιξώδες του διαλύτη, χωρίς να αποτελεί ένα πλήρες μοντέλο του, καθώς δεν συνυπολογίζει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και το υδροφοβικό φαινόμενο. Επίσης, ρυθμίζει τη θερμοκρασία σαν ένας θερμοστάτης, ώστε να προσεγγίσει το κανονικό στατιστικό σύνολο (canonical ensemble) [39,40].

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η μελέτη των αποδιατακτικών ιδιοτήτων των επικρατειών A του παράγοντα von Willebrand έγινε με κατευθυνόμενες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (SMD). Κάθε επικράτεια μελετήθηκε μεμονωμένα αλλά σε όμοια συστήματα και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε τρεις άξονες:

Πείραμα 1^ο: Σκοπός ήταν να υπολογιστεί ο χρόνος που θα χρειαζόταν η επικράτεια A2 για να αποδιαταχθεί από τη δύναμη του αίματος. Ωστόσο, δεν ασκήθηκε αυτή (10pN) γιατί θα ήταν ιδιαίτερα χρονοβόρο. Εκτελέσαμε πέντε SMD αποδιατάξεις με πέντε διαφορετικές δυνάμεις, 1000pN, 800pN, 700pN, 600pN και 500pN. Έτσι, θα μπορούσε να μετρηθεί ο χρόνος που απαιτεί έκαστη για να φθάσει σε ένα κοινό σημείο αποδιάταξης και κατόπιν να κατασκευαστεί η αντίστοιχη γραφική παράσταση της καμπύλης, η προέκταση της οποίας θα μας έδινε τον χρόνο που χρειάζεται η δύναμη του αίματος για να αποδιατάξει την επικράτεια A2. Οι δυνάμεις ασκήθηκαν στο C-τελικό άκρο της επικράτειας, για τους λόγους που αναλύθηκαν στην ενότητα I.A.2.

Πείραμα 2^ο: Για να είναι δυνατή η αποδιάταξη της επικράτεια A2 υπό την επίδραση των διατμητικών τάσεων από την ροή του αίματος, θα πρέπει η A2 να είναι πιο ευάλωτη από τις επικράτειες A1 και A3. Επίσης, θα πρέπει η δύναμη που ασκείται από το αιμοπετάλιο στην A1 μέσω του GPIIb να μην διαταράσσει την αλληλεπίδραση της A1 με τον GPIIb. Προκειμένου να συγκριθεί η ευστάθεια των τριών επικρατειών υπό την επίδραση εφελκυστικών δυνάμεων καθώς και του συμπλόκου vWA1-GPIIb, πραγματοποιήσαμε SMD αποδιάταξης (800pN) τόσο στο σύμπλοκο vWA1-GPIIb όσο και στην A3.

Πείραμα 3^ο: Ωστόσο, για να διαλευκανθεί αν επιβεβαιώνονται οι ισχυρισμοί από τις ως τώρα μελέτες για το πρότυπο αποδιάταξης της επικράτειας A2 (ενότητα I.A.2) εφαρμόσαμε δύναμη 800pN στο N-τελικό άκρο αυτή τη φορά σε ένα νέο σύστημα όμοιων ιδιοτήτων, για να συγκριθεί με το αντίστοιχο σύστημα 800 pN, επί του C-τελικού άκρου.

Για τη μελέτη ενός βιομορίου με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής απαιτείται η τριδιάστατη κρυσταλλική δομή του. Μια τέτοια μπορεί να προκύψει από κρυσταλλογραφία ακτίνων X, πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR), ή μοντελοποίηση (homology modeling). Τόσο οι επικράτειες A2 και A3 όσο και το σύμπλοκο vWA1-GPIIb έχουν κρυσταλλωθεί και καταχωρηθεί στην Protein Data Bank, από όπου και ανακτήθηκαν, με ονομασία αρχείου pdb *3GXB* [18], *1A03* [41] και *1SQ0* [42] αντιστοίχως. Το αρχείο τύπου pdb, όπως δημοσιοποιείται στην

Protein Data Bank, περιέχει συντεταγμένες των ατόμων (x,y,z) και λοιπές πληροφορίες για το πρωτεϊνικό μόριο.

Για να αξιοποιηθεί ένα τέτοιο αρχείο σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής από τα προγράμματα NAMD και VMD, υπέστη ορισμένες τροποποιήσεις με το πρόγραμμα psfgen, μέρος του πακέτου του NAMD. Παράλληλα δημιουργήθηκε και το δεύτερο απαραίτητο αρχείο σε μια προσομοίωση, τύπου psf, ένα αρχείο τοπολογίας, το οποίο περιγράφει τη δομή της πρωτεΐνης και συγκεκριμένες παραμέτρους σχετικές με την εφαρμοζόμενη συνάρτηση ολικού δυναμικού (force field).

Script 1: Δημιουργία αρχείου pdb και psf συμβατό με τα προγράμματα. Όπου X, το όνομα κάθε αρχείου.

```
#package require psfgen
topology top_all27_prot_na.inp
alias residue HIS HSE
alias residue HOH TIP3
alias atom ILE CD1 CD
alias atom TIP3 O OH2
#alias atom ALA O OT1
#alias atom ALA OXT OT2
segment A {
pdb X_initial.pdb
first none
last none
}
coordpdb X_initial.pdb A
guesscoord
writepdb X.pdb
writepsf X.psf
#resetpsf
```

Στην επικράτεια A3 και στο σύμπλοκο A1-GPIba δημιουργήθηκαν και οι απαραίτητοι δισουλφιδικοί δεσμοί που ενώνουν τα άκρα των επικρατειών A.

Να σημειωθεί, ότι μετά από αυτή τη διαδικασία το αρχείο pdb διαθέτει τα άτομα υδρογόνου (H), οι συντεταγμένες των οποίων έλλειπαν από το αντίστοιχο αρχείο της κρυσταλλογραφίας εξαιτίας των πρακτικών περιορισμών της.

Τόσο για την παραπάνω διαδικασία όσο και γι' αυτές που ακολούθησαν χρειαστήκαμε δύο ανεξάρτητα από τα βιομορικά συστήματα αρχεία. Αυτά είναι το

top_all27_prot_na.inp, αρχείο τοπολογίας που προσδιορίζει τους τύπους των ατόμων για το force field (ονόματα ατόμων, τύποι, δεσμοί, φορτία αμινοξέων και ό,τι χρειάζεται για τη σύνδεση των αμινοξέων) και το par_all27_prot_na.inp, αρχείο παραμέτρων που παρέχει ένα χάρτη των δεσμικών και μη-δεσμικών αλληλεπιδράσεων για διάφορους συνδυασμούς ατόμων που βρίσκονται στο πρώτο καθώς και συγκεκριμένες παραμέτρους για όλους τους δεσμούς, τις γωνίες, τα δίεδρα, τις δυνάμεις Van der Waals.

Ενυδάτωση

Μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής του πρωτεϊνικού μορίου στο κενό δεν αποτελεί ικανοποιητική προσομοίωση των πραγματικών συνθηκών. Γι' αυτό τοποθετήσαμε τα πρωτεϊνικά μόρια σε ένα διαλύτη κυλινδρικού σχήματος και ορισμένου μεγέθους. Αυτός ο διαλύτης ήταν μόρια νερού και ασκούσε τον ρόλο του πλάσματος του αίματος στην περίπτωση μας. Το σχήμα επιλέχθηκε, έτσι ώστε το άκρο που αποδιτάσσεται να κατευθύνεται κατά μήκος του άξονα του κυλίνδρου, ενώ το μέγεθος επιλέχθηκε έτσι ώστε να περικλείει ικανοποιητικά το μόριο και να επιτραπεί αποδιάταξη τέτοιας έκτασης που να είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων. Τα μόρια νερού κατανεμήθηκαν τυχαία και με ορισμένη πυκνότητα σύμφωνα με τα παρακάτω script. Αυτή η διαδικασία έγινε μέσω του VMD στο οποίο φορτώσαμε τα αρχεία psf και pdb του προηγούμενου σταδίου κάθε πρωτεϊνικού συστήματος.

Script 2: Προσθήκη διαλύτη κυλινδρικού σχήματος περιφερειακά του πρωτεϊνικού μορίου. Όπου X, το όνομα κάθε αρχείου.

```
Water Cylinder tcl Script
proc center_of_mass {selection} {
    if {[$selection num] <= 0} {
        error "center_of_mass: needs a selection with atoms"
    }
    set com [veczero]
    set mass 0
    # [$selection get {x y z}] returns the coordinates {x y z}
    # [$selection get {mass}] returns the masses
    foreach coord [$selection get {x y z}] m [$selection get mass] {
        set mass [expr $mass + $m]
        set com [vecadd $com [vecscale $m $coord]]
    }
    if {$mass == 0} {
```

```

        error "center_of_mass: total mass is zero"
    }
    return [vecscale [expr 1.0/$mass] $com]
}
set psf      X.psf
set pdb      X.pdb
set box      X_solv_c_box
set psfDrop  X_solv_c.psf
set pdbDrop  X_solv_c.pdb
package require psfgen
f
resetpsf
mol load psf $psf pdb $pdb
set sel [atomselect top all]
set center {xyz}
foreach {xmass ymass zmass} $center { break }
set num0 9999
set Rmin 0.0
while {$num0 != 0} {
    set Rmin [expr $Rmin +1.0]
    set probSel [atomselect top "not (sqr(x-$xmass) + sqr(y-$ymass) +
sqr(z-$zmass)
<= sqr($Rmin))"]
    set num0 [$probSel num]
    puts "$num0 $Rmin"
}
package require solvate
set all X
set Rmin [expr $Rmin + $all ]
set xmin [expr $xmass -$Rmin]
set xmax [expr $xmass +$Rmin]
set ymin [expr $ymass -$Rmin]
set ymax [expr $ymass +$Rmin]
set zmin [expr $zmass -$Rmin]
set zmax [expr $zmass +$Rmin]
puts " $xmin $ymin $zmin $xmax $ymax $zmax"
set min "$xmin $ymin $zmin"
set max "$xmax $ymax $zmax"
set minmax [list $min $max]

```



```

set pad 3.0
solvate $psf $pdb -o $box -minmax $minmax
mol delete top
resetpsf
mol load psf ${box}.psf pdb ${box}.pdb
readpsf ${box}.psf
coordpdb ${box}.pdb
set selDel [atomselect top "not (sqr(x-$xmass) + sqr(y-$ymass)
<= sqr(35))" ]
puts " not within [$selDel num]"
set testSel [atomselect top "not (sqr(x-$xmass) + sqr(y-$ymass) +
sqr(z-$zmass) <= sqr($Rmin)) and (not water)"]
puts " not within and not water [$testSel num]"
if { [$testSel num] != 0 } {
    puts "ERROR: there are [$testSel num] non water molecules outside the
shell"
    puts "EXIT"
    exit
}
set dellist [$selDel get {segid resid}]
set dellist [lsort -unique $dellist]
foreach record $dellist {
    foreach {segid resid} $record { break }
    delatom $segid $resid
}
writepsf $psfDrop
writepdb $pdbDrop
file delete ${box}.psf ${box}.pdb combine.pdb combine.psf
puts "CENTER OF MASS IS AT: $center"
puts "SPHERE RADIUS:          $Rmin"
#exit

```

Για την επικράτεια A2 προέκυψε ένας κύλινδρος με κέντρο μάζας στο σημείο (0.41 0.65 -40.76), μήκος κυλίνδρου 180Å και ακτίνα 35Å. Για το σύμπλοκο vWA1-GPIba ο κύλινδρος είχε κέντρο μάζας στο σημείο (50.96 92.47 20.59), μήκος 142Å και ακτίνα 43Å και για την επικράτεια A3 ο κύλινδρος είχε κέντρο μάζας στο σημείο (-9.67 -0.32 9.09), μήκος 98Å και ακτίνα 36Å. Για το σύστημα της επικράτειας A2 του 3^{ου} πειράματος δημιουργήθηκε κύλινδρος με κέντρο μάζας στο σημείο (0.41 0.65 -50.76), μήκος 206Å και ακτίνα 34Å. Όπως καταλαβαίνουμε ο

κύλινδρος που κατασκευάστηκε για την επικράτεια A3 ήταν πολύ μικρότερος για πρακτικούς λόγους αφού είχαμε ήδη συλλέξει δεδομένα από τη συμπεριφορά της επικράτειας A1, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.

Προσθήκη Ιόντων

Σε όλα τα παραπάνω συστήματα ήταν απαραίτητη η προσθήκη ιόντων, τόσο ανιόντων όσο και κατιόντων, σε τέτοια αναλογία ώστε το νερό να αποκτήσει περισσότερα χαρακτηριστικά ενός βιολογικού περιβάλλοντος αλλά κυρίως για να καταστήσουν το σύστημα ηλεκτρικά ουδέτερο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με το πρόσθετο (plugin) του προγράμματος VMD «autoionize» το οποίο πρόσθεσε συγκεκριμένο αριθμό ιόντων νατρίου (Na^+) και χλωρίου (Cl^-), σε τυχαίες θέσεις, αλλά λαμβάνοντας υπόψη τις ελάχιστες αποστάσεις μεταξύ ιόντων και μορίων αλλά και μεταξύ δύο ιόντων, ενώ με ειδικούς αλγόριθμους τοποθετήθηκαν θετικά ιόντα σε ηλεκτραρνητικές κοιλότητες και αρνητικά ιόντα σε θετικά φορτισμένες[40].

Στο κύριο σύστημα της επικράτειας A2 του πειράματος 1, προστέθηκαν 104 ιόντα Νατρίου και 94 ιόντα Χλωρίου. Στο σύστημα του συμπλόκου vWA1-GPIba προστέθηκαν 110 ιόντα Νατρίου και 109 ιόντα Χλωρίου και το σύστημα της επικράτειας A3 απέκτησε 56 ιόντα Νατρίου και 53 ιόντα Χλωρίου. Και τέλος, στο σύστημα της επικράτειας A2 του 3^{ου} πειράματος προστέθηκαν 112 ιόντα Νατρίου και 102 ιόντα Χλωρίου.

Ελαχιστοποίηση Ενέργειας

Το πρώτο ουσιαστικό βήμα για την προετοιμασία του συστήματος σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής είναι αυτό της ελαχιστοποίησης ενέργειας. Ο σκοπός αυτής της διαδικασίας δεν είναι να βρούμε ένα πραγματικό ολικό ενεργειακό ελάχιστο, αλλά να προσαρμόσουμε τη δομή στο force field, να βελτιώσουμε την κατανομή των μορίων του διαλύτη και να χαλαρώσουμε πιθανές πολυμερικές ασυμβατότητες λόγω λανθασμένων συντεταγμένων κατά τη δημιουργία του αρχείου psf.

Η ελαχιστοποίηση ενέργειας ελέγχεται με το αρχείο configuration. Αυτό το αρχείο περιέχει τις κατάλληλες παραμέτρους και οδηγίες που χρειάζεται να παράσχουμε στο πρόγραμμα NAMD για να πραγματοποιήσει την ελαχιστοποίηση της δυναμικής ενέργειας του αρχείου pdb που επιθυμούμε. Αυτό το αρχείο pdb θα είναι αυτό που προέκυψε από την προσθήκη και των ιόντων στο σύστημα, και το αντίστοιχο αρχείο psf.

Script 3: Ελαχιστοποίηση Ενέργειας. Όπου **X**, το όνομα κάθε αρχείου.

```
# NAMD CONFIGURATION FILE FOR MINIMIZATION
# protocol params
# initial config
coordinates X_ion.pdb
temperature 310K
seed 12345
outputEnergies 1
outputname X_min
binaryoutput no
timestep 1.0
structure X_ion.psf
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na.inp
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
switching on
switchdist 8.0
cutoff 12.0
pairlistdist 13.5
margin 0.0
stepspercycle 20
minimize 5000
```

Οι παραπάνω συνθήκες εφαρμόστηκαν τόσο για το σύστημα της επικράτειας A2 (πείραμα1,2) όσο και για αυτό της A1 με τον GPIba αλλά και της επικράτειας A3 (πείραμα 2). Για το δεύτερο σύστημα της A2 (πείραμα 3) εφαρμόσαμε switchdist 10.0, cutoff 12.0 και pairlistdist 14.0 καθώς και 4000 βήματα. Αυτές οι αλλαγές δεν επηρέασαν τη φύση του μορίου και οι ελαχιστοποίηση ενέργειας ήταν εξίσου αποτελεσματική.

Εξισορρόπηση

Η εξισορρόπηση πραγματοποιείται με βάση την επίλυση της εξίσωσης του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα για κάθε άτομο, και έχει ως αποτέλεσμα την εξισορρόπηση της ολικής ενέργειας. Δηλαδή, μέρος της κινητικής ενέργειας πρέπει να μετατραπεί σε δυναμική [40]. Τότε οι ταχύτητες και η πίεση θα έχουν κατανομηθεί επίσης σωστά στο σύστημα. Όλα τα παραπάνω εξαρτώνται από τη διάρκεια της διαδικασίας. Στην δικιά μας πειραματική διαδικασία λίγα μόνο βήματα αρκούσαν, 30ps για τα δύο συστήματα της επικράτειας A2 και αυτό της επικράτειας A3, και 60ps για το

σύμπλοκο vWA1-GPIba ώστε καθένα να ισορροπηθεί. Επίσης σε όλες εφαρμόστηκαν κυλινδρικές οριακές συνθήκες (cylindrical boundary conditions). Πέρα από τις κυλινδρικές οριακές συνθήκες, που εξαρτιόνταν αποκλειστικά από τη γεωμετρία του κυλίνδρου, οι συνθήκες του force field ήταν απολύτως ίδιες. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στα αρχεία configuration παρατίθεται παρακάτω (script 4).

*Script 4: Εξισορρόπηση συστημάτων. Όπου **X**, το όνομα κάθε αρχείου και **A**, διαφορετικές τιμές παραμέτρων.*

```
structure X_ion.psf
coordinates X_min.coor
set temperature 310
set outputname X_eq
firsttimestep 0
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na.inp
temperature $temperature
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
cutoff 12.
switching on
switchdist 10.
pairlistdist 14
timestep 2.0
rigidBonds all
nonbondedFreq 1
fullElectFrequency 2
stepspercycle 10
langevin on
langevinDamping 5
langevinTemp $temperature
langevinHydrogen off
outputName $outputname
restartfreq 500
dcdfreq 500
outputEnergies 100
outputPressure 100
cylindricalBC on
```

```

cylindricalBCCenter xyz
cylindricalBCAxis z
cylindricalBCr1 A
cylindricalBCl1 A
cylindricalBCK1 5.0
cylindricalBCexp1 2
reinitvels $temperature;
run 15000;

```

Steered Molecular Dynamics (SMD) με σταθερή δύναμη (constant force)

Με τις Steered Molecular Dynamics εφαρμόσαμε συγκεκριμένη και σταθερή δύναμη καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου της προσομοίωσης στο ένα άκρο του πρωτεϊνικού μορίου και κρατήσαμε σταθερό ένα άλλο. Ασκήθηκαν σε όλες οριακές κυλινδρικές συνθήκες και η θερμοκρασία επίσης ήταν σταθερή στους 310K (37°C), τη θερμοκρασία του σώματος, και όχι υψηλότερη που θα μπορούσε να αποδιατάξει τα μόρια. Παρακάτω, το script 5 δείχνει τις συνθήκες κάθε προσομοίωσης. Σημειώνεται, ότι τα βήματα αντιστοιχούν στο πρώτο μέρος της αποδιάταξης και όχι στον συνολικό χρόνο και παρατίθενται ως ενδεικτικά των υπόλοιπων παραμέτρων που έμεναν πάντα ίδιες εκτός από το κέντρο μάζας το οποίο υπολογιζόταν εκ νέου. Όπως στο στάδιο της εξισορρόπησης έτσι και σε αυτό, της εφαρμογής smd, οι συνθήκες του force field σε κάθε σύστημα είναι απολύτως ίδιες εκτός από τις συνθήκες των κυλινδρικών οριακών συνθηκών και την κατεύθυνση της δύναμης που εξαρτιόνταν από τη θέση του πρωτεϊνικού μορίου στον κύλινδρο.

*Script 5: SMD σταθερής δύναμης. Όπου **X**, το όνομα κάθε αρχείου και **A**, διαφορετικές τιμές παραμέτρων.*

```

structure X_ion.psf
coordinates X_min.coor
bincoordinates X_eq_c.coor
set temperature 310
set outputname X_smd_c_r_800_a
firsttimestep 0
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na.inp
temperature $temperature
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
cutoff 12.

```



```
switching on
switchdist 10.
pairlistdist 14
timestep 2.0
rigidBonds all
nonbondedFreq 1
fullElectFrequency 2
stepspercycle 10
langevin on
langevinDamping 5
langevinTemp $temperature
langevinHydrogen off
outputName $outputname
restartfreq 500
dcdfreq 500
outputEnergies 100
outputPressure 100
cylindricalBC on
cylindricalBCcenter xyz
cylindricalBCaxis z
cylindricalBCr1 A
cylindricalBCl1 A
cylindricalBCK1 5.0
cylindricalBCexp1 2
fixedAtoms on
fixedAtomsForces on
fixedAtomsFile X_fixed-smd_atom_800_a.ref
fixedAtomsCol B
#constraints on
#consexp 2
consref X_fixed-smd_atom_800_a.ref
conskfile X_fixed-smd_atom_800_a.ref
conskcol 0
constraintScaling 1.0
constantforce yes
consforcefile X_fixed-smd_atom_800_a.ref
SMDDir xyz
SMDDOutputFreq 10
```

```

minimize 50
reinitvels $temperature;
run 500000;

```

Ακλόνητα & Smd άτομα

Τα άτομα στα οποία ασκήθηκαν οι δυνάμεις καθώς και αυτά που παρέμειναν ακίνητα ορίζονταν σε ένα εξωτερικό αρχείο τύπου .ref. Στην επικράτεια A2 του 1^{ου} πειράματος, στο οποίο μελετούνταν ο χρόνος που απαιτείται για αποδιάταξη κάτω από την επίδραση της δύναμης του αίματος, ορίσαμε ως ακίνητο άτομο το N-τελικό της άκρο, δηλαδή το Ca άτομο της μεθειονίνης Met1495, και ασκήθηκε δύναμη στο C-τελικό άκρο, που είναι το Ca άτομο της προλίνης Pro1672. Στο δεύτερο σύστημα που δημιουργήθηκε για την επικράτεια A2 (3^ο πείραμα) έγινε η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή ασκήθηκε δύναμη στην Met1495 και ήταν ακίνητη η Pro1672, αφού ο σκοπός ήταν η μελέτη της αποδιάταξης αν η δύναμη ασκούνταν στο άκρο που αναμένονταν λόγω της γειννίας με την επικράτεια A1.

Στο σύμπλοκο vWA1-GPIba ασκήθηκε δύναμη στο C-τελικό άκρο της επικράτειας A1, δηλαδή το Ca άτομο της προλίνης Pro703, που είναι αυτό που συνδέεται άμεσα με την επικράτεια A2. Ακλόνητα κρατήθηκαν όλα τα άτομα του σκελετού της γλυκοπρωτεΐνης Iba, δηλαδή τα άτομα τύπου Ca, C, O, N, δεδομένου ότι η GPIba είναι πρωτεΐνη της επιφάνειας των αιμοπεταλίων. Στην επικράτεια A3 ασκήθηκε δύναμη στο αμινοτελικό της άκρο δηλαδή το Ca άτομο της Cys923 και διατηρήθηκε ακλόνητο το Ca άτομο της καρβοξυτελικής Cys1109.

Παράμετροι Σύγκρισης του Βαθμού Αποδιάταξης

Από τις προσομοιώσεις αυτό που λαμβάνουμε είναι μεγάλες «τροχιές» που περιέχουν τη θέση των ατόμων του συστήματος για κάθε πλαίσιο (frame). Αυτό αξιοποιείται οπτικά, αλλά για να μετρήσουμε ποσοτικά την πρόοδο των προσομοιώσεων υπολογίσαμε το RMSD (root mean square deviation), το πλήθος των γειτονικών αλληλεπιδράσεων των αμινοξέων (native contacts), τη μεταβολή του ποσοστού της δευτεροταγούς δομής καθώς και τις ενέργειες για κάθε στιγμή.

RMSD (root mean square deviation)

Το RMSD είναι ένα αριθμητικό μέτρο της διαφοράς στις θέσεις των ατόμων του σκελετού ενός μακρομορίου. Ορίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$RMSD_{\alpha}(t_j) = \sqrt{\frac{\sum_{\alpha=1}^{N_{\alpha}} (\vec{r}_{\alpha}(t_j) - \langle \vec{r}_{\alpha} \rangle)^2}{N_{\alpha}}}$$

όπου:

- N_{α} , ο αριθμός των ατόμων των οποίων οι θέσεις συγκρίνονται
- N_t , ο αριθμός των χρονικών βημάτων για τα οποία συγκρίνονται οι θέσεις των ατόμων
- $\vec{r}_{\alpha}(t_j)$, η θέση του ατόμου α τη χρονική στιγμή t_j
- $\langle \vec{r}_{\alpha} \rangle$, είναι η μέση τιμή της θέσης του ατόμου α ως προς το οποίο συγκρίνονται οι θέσεις των $\vec{r}_{\alpha}(t_j)$ και ορίζεται ως:

$$\langle \vec{r}_{\alpha} \rangle = \frac{1}{N_t} \sum_{j=1}^{N_t} \vec{r}_{\alpha}(t_j)$$

[43]

Για τον υπολογισμό του συγκρίναμε τις «τροχιές» κάθε προσομοίωσης με την αντίστοιχη αρχική δομή, αυτή μετά την ελαχιστοποίηση ενέργειας. Η διαδικασία εκτελέστηκε στο VMD με το παρακάτω script (script 6):

Script 6: υπολογισμός RMSD

```
set outfile [open rmsd.txt w];
set nf [molinfo top get numframes]
set frame0 [atomselect top "protein and backbone and noh" frame 0]
# rmsd calculation loop
for {set i 1} {$i < $nf} {incr i} {
    set sel [atomselect top "protein and backbone and noh" frame $i]
    $sel move [measure fit $sel $frame0]
    puts $outfile "[measure rmsd $sel $frame0]"
}
close $outfile
```

Native Contacts

Οι γειτονικές αλληλεπιδράσεις (native contacts) αφορούν την επαφή των πλευρικών αλυσίδων δύο αμινοξικών καταλοίπων που γειτνιάζουν στην τριδιάστατη δομή, αλλά όχι στην αμινοξική αλληλουχία. Κατά την αποδιάταξη το ποσοστό αυτών αλλάζει και μπορούμε να το υπολογίζουμε με το παρακάτω script (script 7) μέσω του VMD, συγκρίνοντας την αρχική δομή με κάθε πλαίσιο της «τροχιάς» κατά την αποδιάταξη των μορίων.

Script 7: Native Contacts. Όπου A: ο αριθμός των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Η A2 επικράτεια αποτελούνταν από 178 αμινοξέα, στο σύμπλοκο vWA1-GPIba διαιρέσαμε μόνο με τον αριθμό των αμινοξέων της επικράτειας A1 που ήταν ίσος με 198, αφού ο GPIba δε συμμετείχε στη χάλαση, ενώ τέλος η A3 επικράτεια αποτελούνταν από 187 αμινοξικά κατάλοιπα.

```
set outfile [open ntres.txt w]
set nf [molinfo top get numframes]
for {set i 1 } {$i < $nf } { incr i } {
set sel1 [atomselect top "backbone and name CA" frame $i]
set vnt [measure contacts 6 $sel1]
set nvnt [llength [lindex $vnt 0]]
set avnt [expr $nvnt/A]
$sel1 delete
puts $outfile "$i $nvnt $avnt"
}
close $outfile
```

Ποσοστό Δευτεροταγούς Δομής

Και σε αυτόν τον δείκτη συγκρίθηκε η αρχική δομή κάθε συστήματος με κάθε πλαίσιο της «τροχιάς» των προσομοιώσεων για να υπολογιστεί για κάθε χρονική στιγμή το ποσοστό των αμινοξέων που βρισκόταν σε α-έλικες καθώς και το αντίστοιχο ποσοστό των αμινοξέων που βρισκόταν σε β-φύλλα. Η διαδικασία έγινε στο VMD με τη χρήση του παρακάτω script (script 8).

Script 8: Υπολογισμός ποσοστού της δευτεροταγούς δομής. Όπου A: ο αριθμός των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Όμοια με παραπάνω.

```
set outfile [open helperc300.txt w];
set nf [molinfo top get numframes]
set mdcd [molinfo top]
# helix calculation loop
for {set i 1 } {$i < $nf } { incr i } {
    set selpr [atomselect $mdcd "backbone" frame $i]
    $selpr writepdb temp.pdb
mol load pdb temp.pdb
set selh [atomselect top "backbone and helix and name CA"]
set selb [atomselect top "backbone and sheet and name CA"]
    set helnum [$selh num]
```



```
set perhelnum [expr $helnum/A]
set betnum [$selb num]
set percbetnum [expr $betnum/A]
puts $outfile "$i $helnum $perhelnum $betnum $percbetnum"
puts $i
$selpr delete
$selh delete
$selb delete
set temp [molinfo top]
mol delete $temp
}
close $outfile
```

Ενέργειες

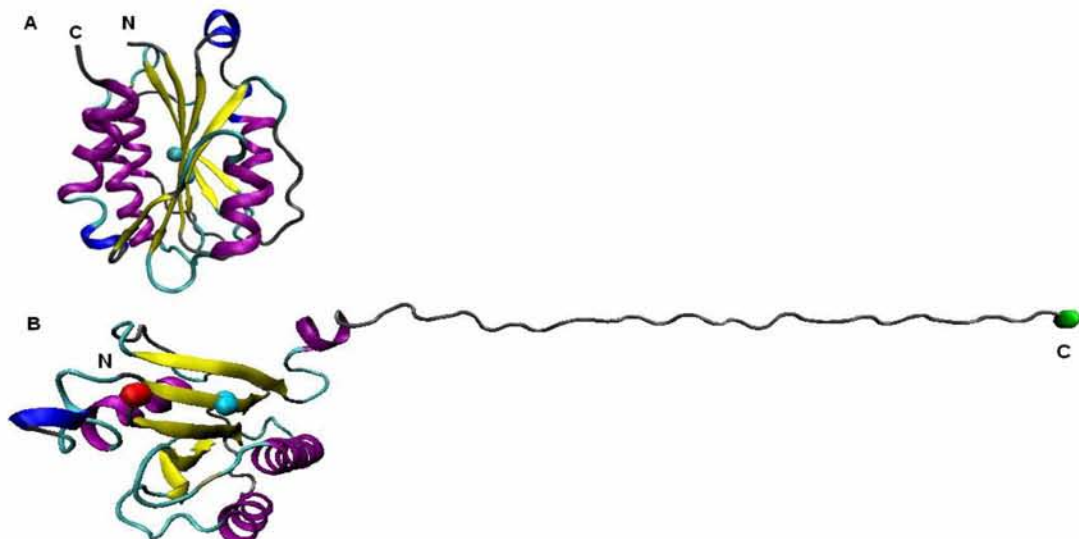
Με τη βοήθεια του VMD και του NAMD, υπολογίστηκαν οι ενέργειες: Ολική, Van der Waals, Ηλεκτροστατική, οι Μη Δεσμικές Ενέργειες (άθροισμα Ηλεκτροστατικής και Van der Waals) καθώς και οι Dihedral, Bond, Angle, Improper, και Conformational (Bond, Angle, Dihedral, Improper) από την «τροχιά» κάθε προσομοίωσης.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Η παρουσίαση και ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης θα ακολουθήσει τη σειρά της πειραματικής διαδικασίας (ενότητα II). Πρώτα, παρουσιάζεται η μελέτη της επικράτειας A2 ως προς τον χρόνο της αποδιάταξής της. Δηλαδή η εύρεση του χρόνου που απαιτείται για να αποδιαταχθεί υπό τη δύναμη του αίματος (10pN). Ο χρόνος αυτός υπολογίζεται από τη γραφική παράσταση πέντε πολλαπλάσιων δυνάμεων που ασκήθηκαν πειραματικά (1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN) στο C-τελικό άκρο. Θα ακολουθήσει η σύγκριση των αποδιατάξεων των επικρατειών A μεταξύ τους υπό την επίδραση εφελκυστικής δύναμης (800pN). Στο τέλος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης του προτύπου αποδιάταξης της επικράτειας A2, όταν ασκήθηκε δύναμη (800pN) στο N-τελικό άκρο της και διατηρήθηκε ακλόνητο το C-τελικό σε μια αντίστροφη διαδικασία αυτή τη φορά.

Επίδραση εφελκυστικής δύναμης στην επικράτεια A2

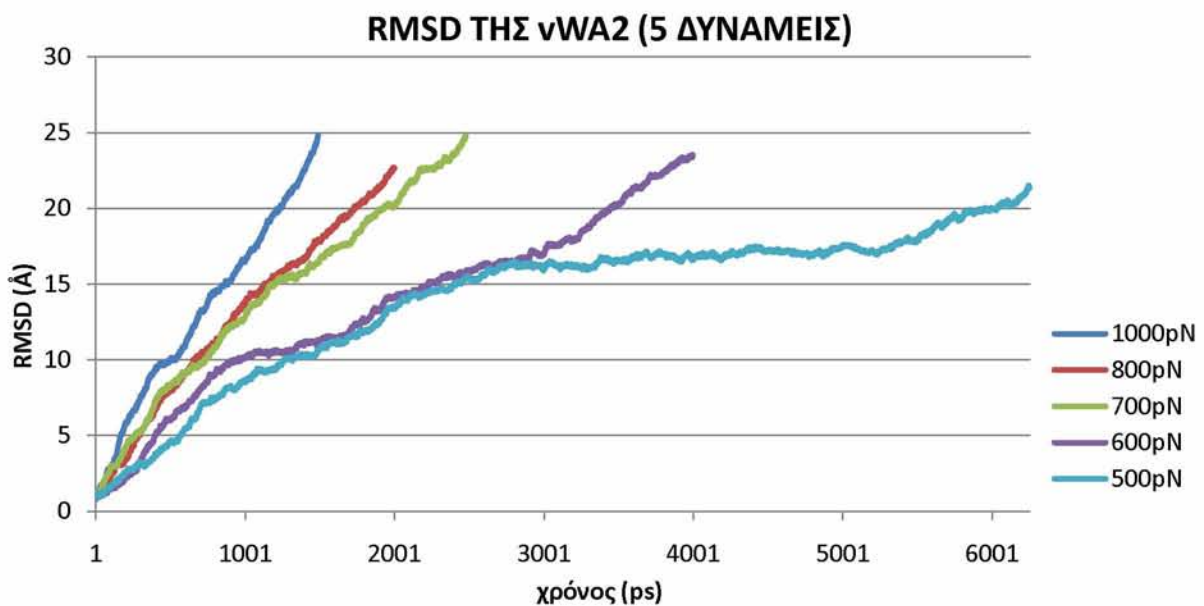
Το πρότυπο αποδιάταξης που επέδειξαν και οι πέντε δυνάμεις ήταν πανομοιότυπο και φαίνεται στην εικόνα 11.B, ενώ η μόνη τους διαφορά ήταν στο χρόνο που χρειάστηκαν για να επιτύχουν τον ίδιο βαθμό αποδιάταξης. Η έκταση της αποδιάταξης επιλέχθηκε εμπειρικά, ώστε να α) μας δίνει μια σαφή εικόνα για τον χρόνο που απαιτεί, β) να εξάγονται συμπεράσματα συγκρίσιμα με τη βιβλιογραφία και γ) να προκύπτει σύστημα ικανό να προσομοιωθεί σε εύλογο χρονικό διάστημα.



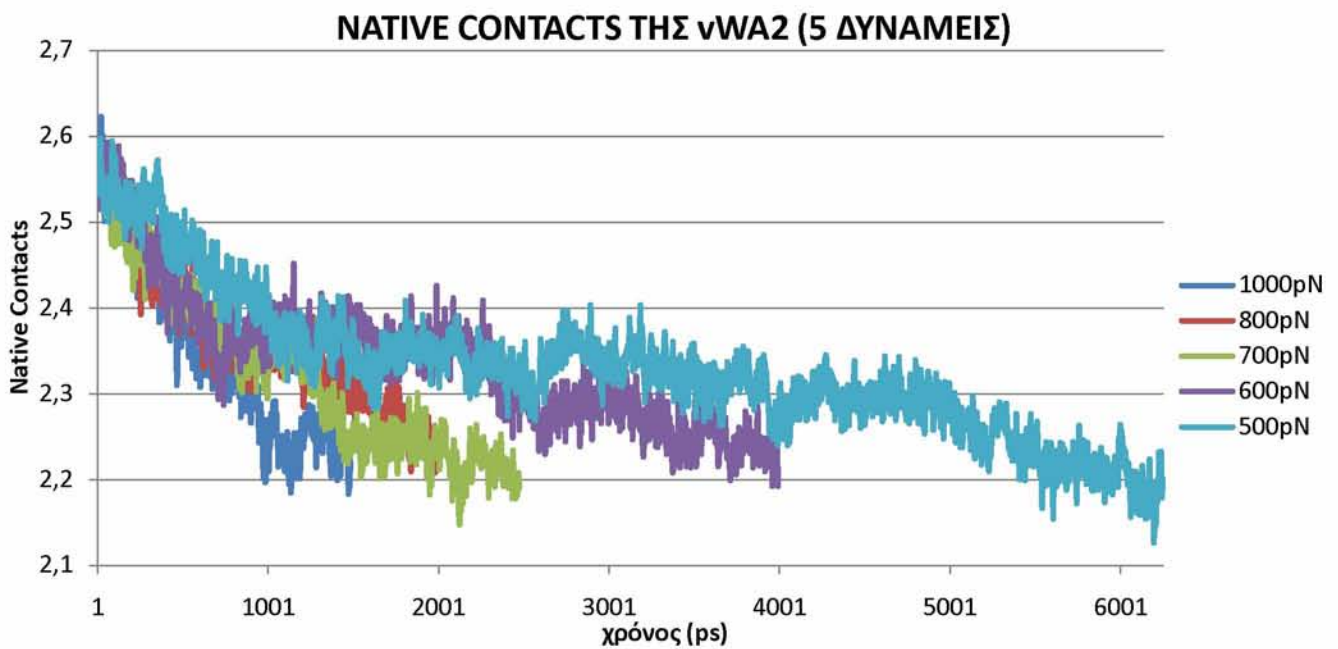
Εικόνα 11: Η δευτεροταγής δομή της επικράτειας A2: Στην αναδιπλωμένη μορφή της, με τον πεπτιδικό δεσμό που πρωτεολύεται (γαλάζιο) **(A)**. Στην αποδιαταγμένη μορφή της μετά από εφαρμογή δύναμης στο C-τελικό άκρο (πράσινο) με κρατημένο ακίνητο το N-τελικό άκρο (κόκκινο) **(B)**.

Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 11, στην μερικώς αποδιαταγμένη δομή της A2, όχι μόνο ο δεσμός Tyr1605-Met1606 είναι πλέον καλύτερα προσβάσιμος από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13 αλλά και οι υπόλοιπες θέσεις πρόσδεσης της τελευταίας, όπως αναλύονται στην ενότητα I.B, είναι σε αρκετά κοντινή απόσταση για αλληλεπίδραση. Ο τρόπος αποκάλυψης του υδροφοβικού πυρήνα της A2 και της έκτασης του C-τελικού άκρου ήταν αναμενόμενος τόσο με βάση τη βιβλιογραφία όσο και με βάση τη «λογική» των κατευθυνόμενων προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής.

Η ανάλυση της γραφικής αναπαράστασης της αποδιάταξης μας δίνει μια ποιοτική εκτίμηση για την συμπεριφορά της επικράτειας A2 υπό την επίδραση σταθερής δύναμης. Για μια ποσοτική παρουσίαση της πορείας της αποδιάταξης κατασκευάσαμε τα διαγράμματα του RMSD, του αριθμού των γειτονικών αλληλεπιδράσεων, του ποσοστού του πρωτεϊνικού μορίου σε α-έλικες και β-φύλλα καθώς και των ενεργειών, VdW, μη δεσμικές, Ολική.

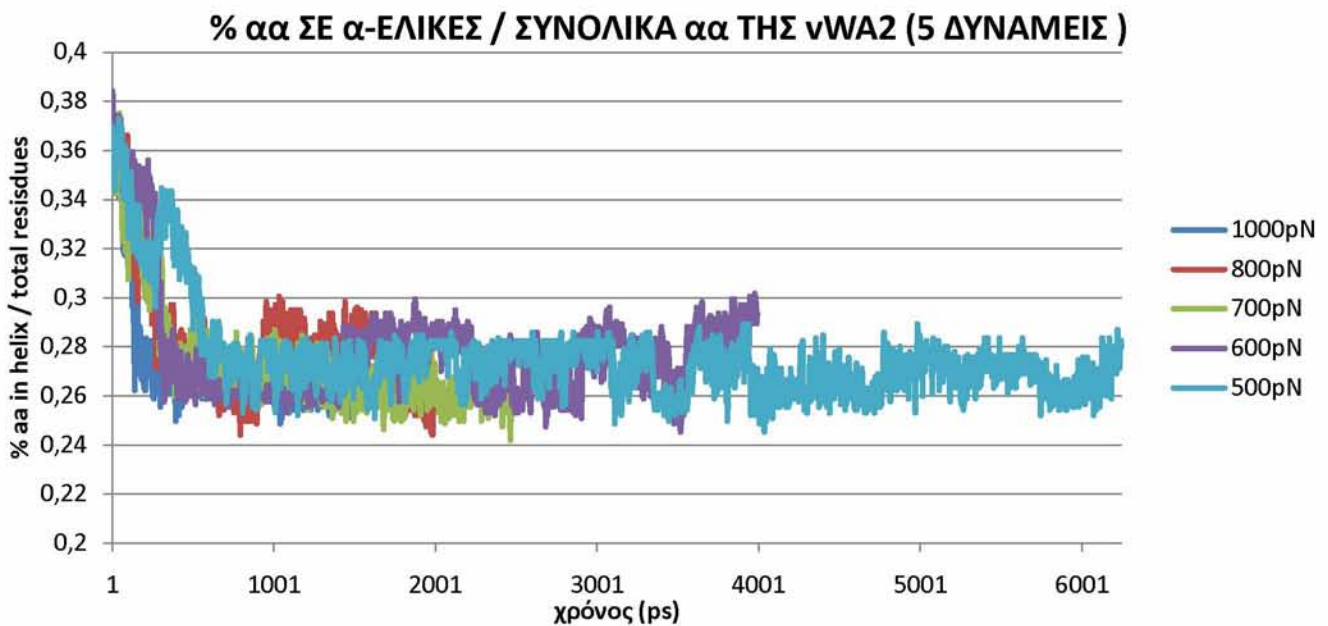


Διάγραμμα 4: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής του RMSD για καθένα από τα 5 πανομοιότυπα συστήματα της vWA2 υπό την επίδραση των 1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN έκαστο, κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD έως ότου φθάσουν σε ένα δεδομένο σημείο αποδιάταξης.

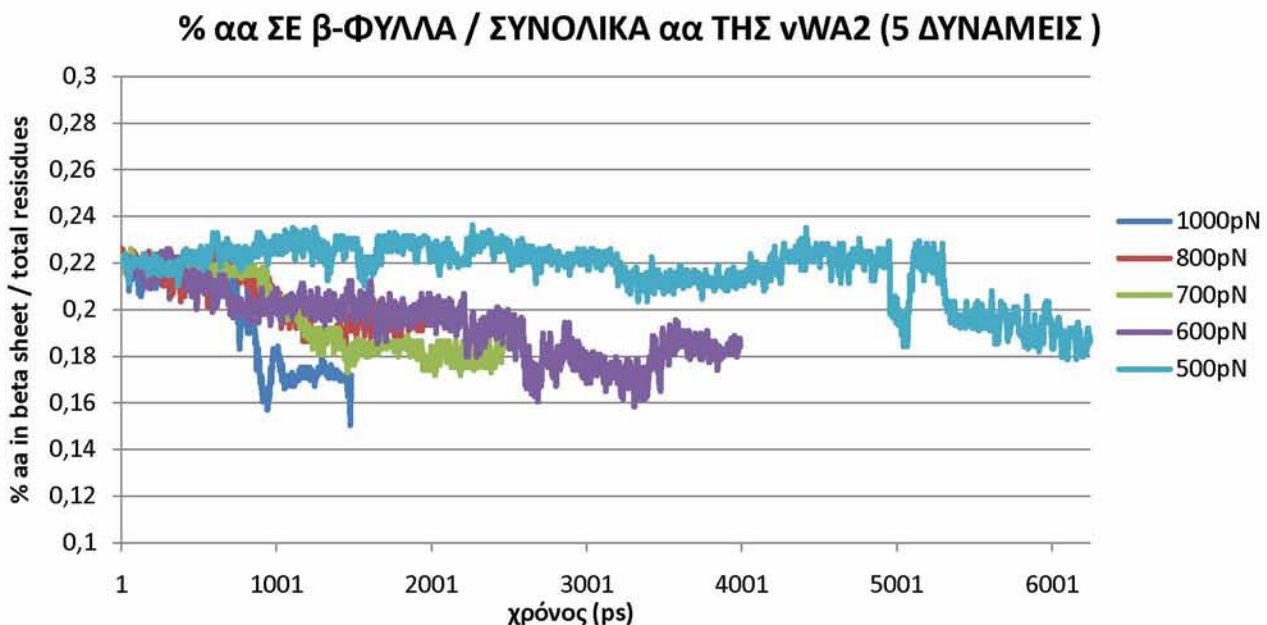


***Διάγραμμα 5:** Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής των γειτονικών αλληλεπιδράσεων (native contacts) για καθένα από τα 5 πανομοιότυπα συστήματα της vWA2 υπό την επίδραση των 1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN έκαστο, κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD έως ότου φθάσουν σε ένα δεδομένο σημείο αποδιάταξης.*

Παρατηρούμε ότι οι μεταβολές τόσο του RMSD όσο και των γειτονικών αλληλεπιδράσεων για καθένα από τα πέντε συστήματα είναι ίδιες αλλά παρατηρούνται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Δηλαδή επιβεβαιώνεται αυτό που παρατηρούμε και οπτικά, ότι οι διαφορετικές δυνάμεις προκαλούν τον ίδιο τρόπο αποδιάταξης αλλά σε σχετικά ανάλογο χρόνο.

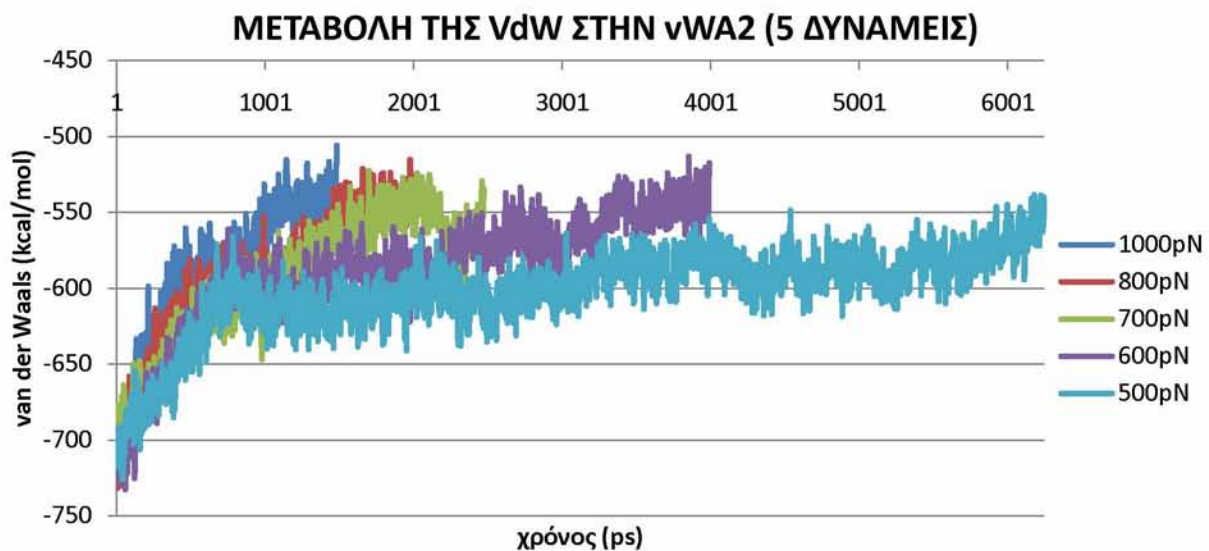


Διάγραμμα 6: Συγκριτικό διάγραμμα του ποσοστού των αμινοξέων που βρίσκονται σε α-έλικες για καθένα από τα 5 πανομοιότυπα συστήματα της νWA2 υπό την επίδραση των 1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN έκαστο, κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD έως ότου φθάσουν σε ένα δεδομένο σημείο αποδιάταξης.



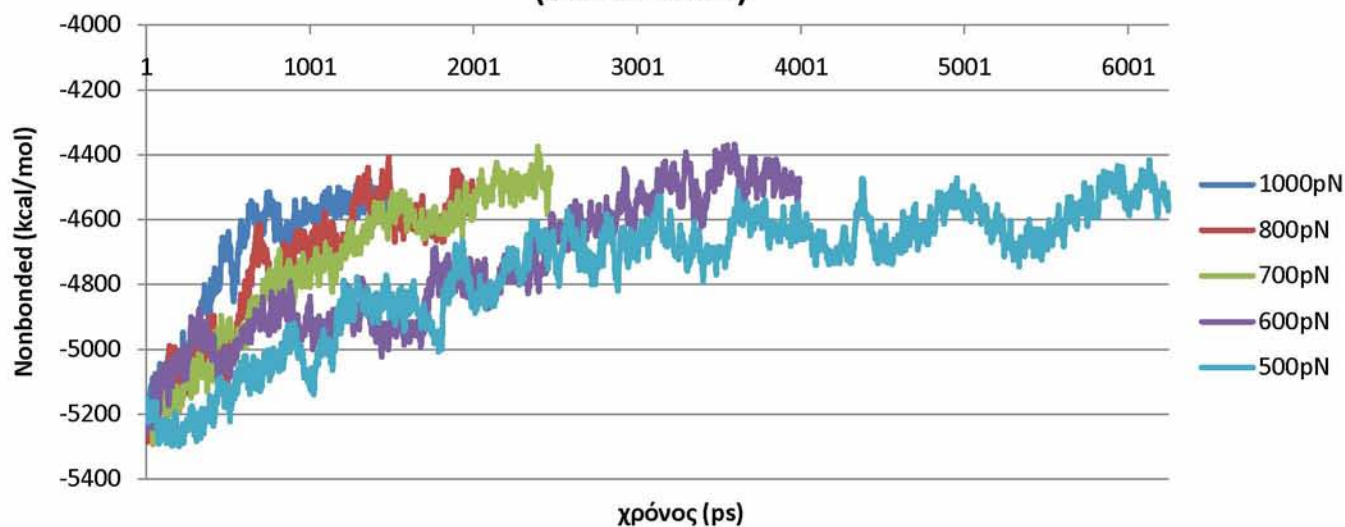
Διάγραμμα 7: Συγκριτικό διάγραμμα του ποσοστού των αμινοξέων που βρίσκονται σε β-φύλλα για καθένα από τα 5 πανομοιότυπα συστήματα της νWA2 υπό την επίδραση των 1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN έκαστο, κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD έως ότου φθάσουν σε ένα δεδομένο σημείο αποδιάταξης.

Το ποσοστό δευτεροταγούς δομής της επικράτειας $vWA2$, όπως αναλύθηκε παραπάνω στα διαγράμματα 6 και 7, φανερώνει τη μείωση που επιφέρει η αποδιάταξη σε δευτεροταγείς δομές. Έτσι, βλέπουμε ότι υπήρχε μια μεγάλη μείωση σε α -έλικες, οι οποίες μάλιστα στην αναδιπλωμένη δομή κατείχαν κατά 10% μεγαλύτερο ποσοστό από τα β -φύλλα, καθώς και ότι το ποσοστό των τελευταίων δεν φαίνεται να μεταβλήθηκε ιδιαίτερα, γιατί το σημείο μέχρι το οποίο προσομοιώθηκε η αποδιάταξη, δεν διέθετε παρά ένα πολύ μικρό β -φύλλο. Ακόμη βλέπουμε ότι για τις δυνάμεις αυτές δεν υπήρξε ιδιαίτερη δυσκολία να αποσυσπειρώσουν την α -έλικα αλλά δε συνέβη το ίδιο και για το β -φύλλο, με τις μικρότερες δυνάμεις να δυσκολεύονται όλο και περισσότερο.



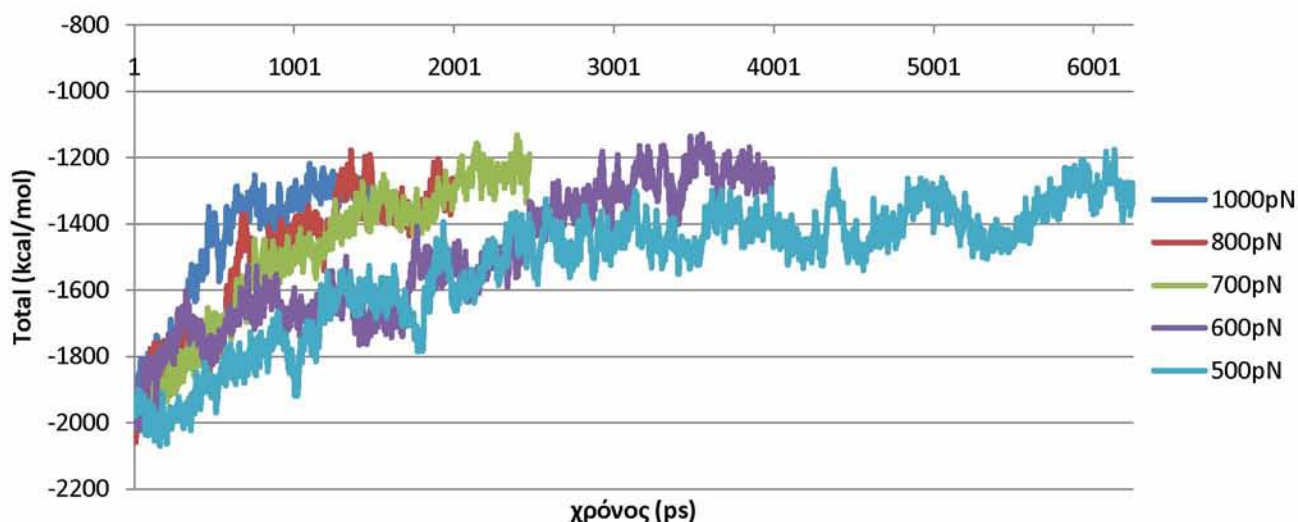
***Διάγραμμα 8:** Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής της ενέργειας Van der Waals για καθένα από τα 5 πανομοιότυπα συστήματα της $vWA2$ υπό την επίδραση των 1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN έκαστο, κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD έως ότου φθάσουν σε ένα δεδομένο σημείο αποδιάταξης.*

ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΗ ΔΕΣΜΙΚΩΝ ΕΝΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΗΝ νWA2 (5 ΔΥΝΑΜΕΙΣ)



Διάγραμμα 9: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής των μη δεσμικών ενεργειών (Van der Waals, Ηλεκτροστατικές) για καθένα από τα 5 πανομοιότυπα συστήματα της νWA2 υπό την επίδραση των 1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN έκαστο, κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD έως ότου φθάσουν σε ένα δεδομένο σημείο αποδιάταξης.

ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΤΗΝ νWA2 (5 ΔΥΝΑΜΕΙΣ)



Διάγραμμα 10: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής της ολικής ενέργειας για καθένα από τα 5 πανομοιότυπα συστήματα της νWA2 υπό την επίδραση των 1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN έκαστο, κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD έως ότου φθάσουν σε ένα δεδομένο σημείο αποδιάταξης.

Οι ενέργειες όπως παριστάνονται στα διαγράμματα 8, 9 και 10, παραπάνω, παρουσιάζουν στο μισό του πρώτου nanosecond μια απότομη αύξηση. Στη συνέχεια η Van der Waals ισορροπείται γύρω από μια τιμή, ενώ οι μη δεσμικές ενέργειες συνεχίζουν να παρουσιάζουν μια σχετική αύξηση στη διάρκεια του χρόνου. Αφού οι μη δεσμικές ενέργειες είναι η Van der Waals και οι ηλεκτροστατικές, καταλαβαίνουμε ότι η αύξηση που παρατηρούμε στις πρώτες (διάγραμμα 9) οφείλεται στις αυξανόμενες ηλεκτροστατικές συν τη σταθερή τιμή της Van der Waals. Οι ενέργειες Dihedral, Bond, Angle, Improper, Conformational που επίσης υπολογίστηκαν, δεν παρατίθενται διότι δεν παρουσίασαν καμία σημαντική μεταβολή κατά τις προσομοιώσεις. Αυτός είναι λοιπόν ο λόγος που η ολική ενέργεια των συστημάτων παρουσιάζει την ίδια μεταβολή με τις μη δεσμικές, αυξημένα κατά το άθροισμα των υπολοίπων σταθερών ενεργειών.

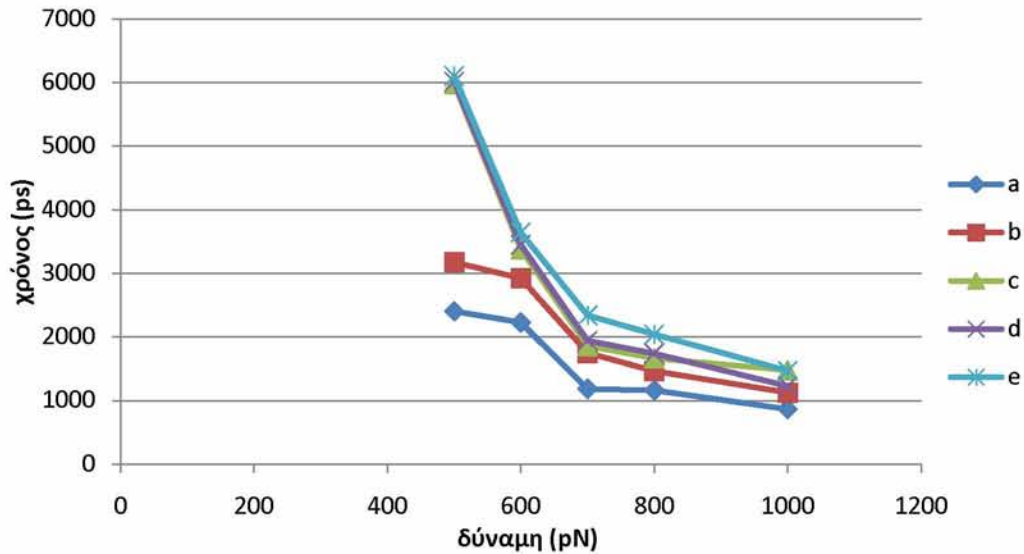
Είδαμε, λοιπόν, ότι και οι 5 διαφορετικές δυνάμεις παρουσιάζουν τα ίδια χαρακτηριστικά αποδιάταξης, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, με μόνη διαφορά το χρόνο που χρειάστηκε καθενιά για να φθάσει στο συγκεκριμένο σημείο, όπως φαίνεται στην εικόνα 11.B. Έτσι, όπως υποτέθηκε αρχικά στο σχεδιασμό του πειράματος, η εξίσωση της καμπύλης χρόνου-δύναμης βασισμένη στα πέντε προσομοιωμένα συστήματα θα μας δώσει τον αντίστοιχο χρόνο που χρειάζεται η εφελκυστική δύναμη της ροής του αίματος για να επιτύχει την ίδια διαδικασία και να αποκαλύψει το δεσμό πρωτεόλυσης στην επικράτεια A2. Για να έχουμε ακριβέστερη αναπαράσταση της καμπύλης, μετρήσαμε το χρόνο που απαιτήσαν οι πέντε δυνάμεις για να φθάσουν σε πέντε διαφορετικά σημεία του μονοπατιού αποδιάταξης. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Οι χρόνοι που απαιτήθηκαν από τις πέντε δυνάμεις F (1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN) για να αποδιάταξουν την vWA2 έως πέντε τυχαία επιλεγμένα σημεία (a,b,c,d,e) από την πορεία της αποδιάταξης.

Δύναμη [pN]	Χρόνος [ps]				
	a	b	c	d	e
500	2402	6015	3176	5980	6103
600	2228	3449	2922	3378	3641
700	1181	1940	1751	1861	2339
800	1159	1741	1462	1665	2039
1000	862	1226	1122	1478	1468

Το διάγραμμα που προκύπτει φαίνεται παρακάτω (διάγραμμα 11).

Πρότυπο διάγραμμα χρόνου-δύναμης



Διάγραμμα 11: Διαγραμματική απεικόνιση του χρόνου που χρειάστηκαν οι πέντε δυνάμεις (1000pN, 800pN, 700pN, 600pN, 500pN) για να αποδιάταξουν την vWA2 έως πέντε σημεία (a,b,c,d,e) από την πορεία της αποδιάταξης.

Στο διάγραμμα 11 βλέπουμε, ότι ανάμεσα σε αυτά τα πέντε σημεία που αντιπροσωπεύουν διαφορετικές φάσεις της αποδιάταξης ο τύπος της καμπύλης διαφέρει. Αυτό οφείλεται στο ότι κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης αποδιατασσόταν διαφορετικές δομές τις vWA2, α-έλικας, μικρού β-φύλλου, ή και καθόλου διαμόρφωσης δευτεροταγούς δομής. Επίσης, η καμπύλη δεν είναι γραμμική, αλλά της μορφής:

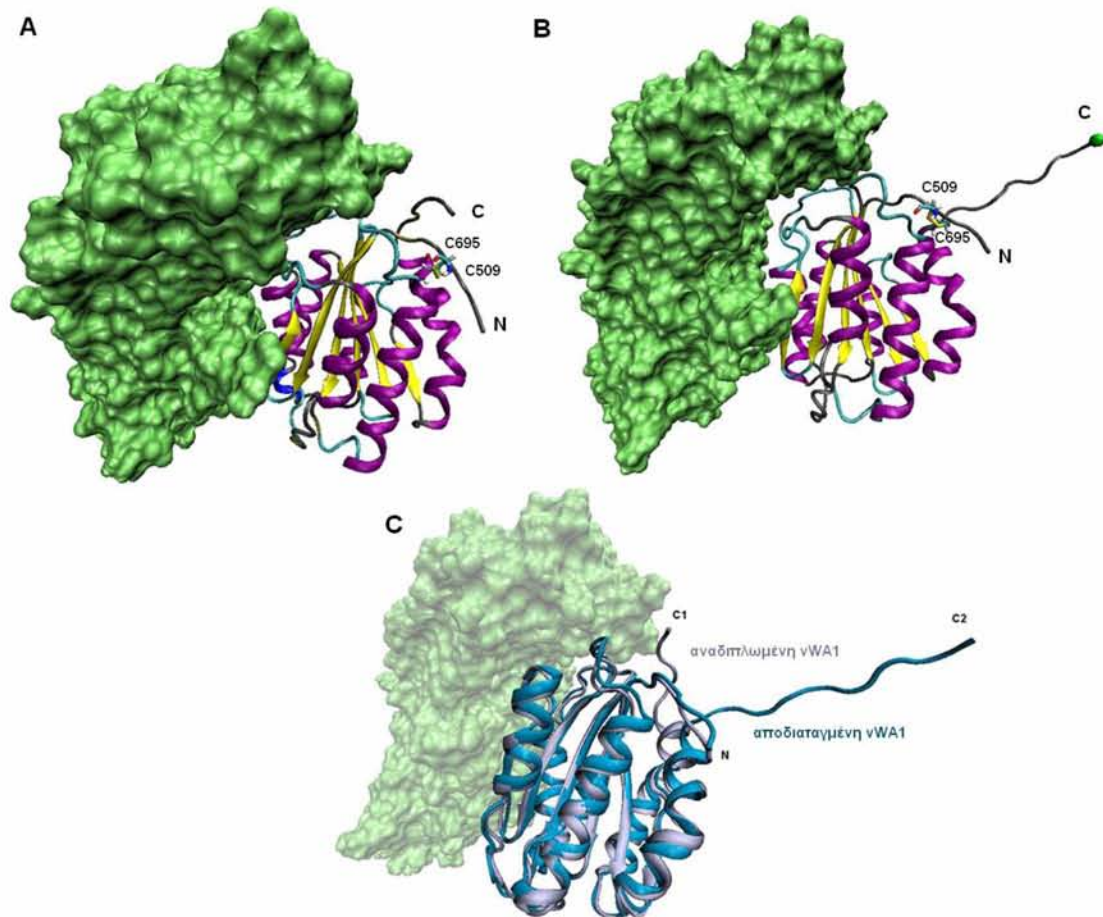
$$t = \frac{3.4 \times 10^{10}}{F^{2.5}},$$

όπου, t , ο χρόνος που χρειάζεται μια δύναμη F , για να αποδιάταξει την vWA2.

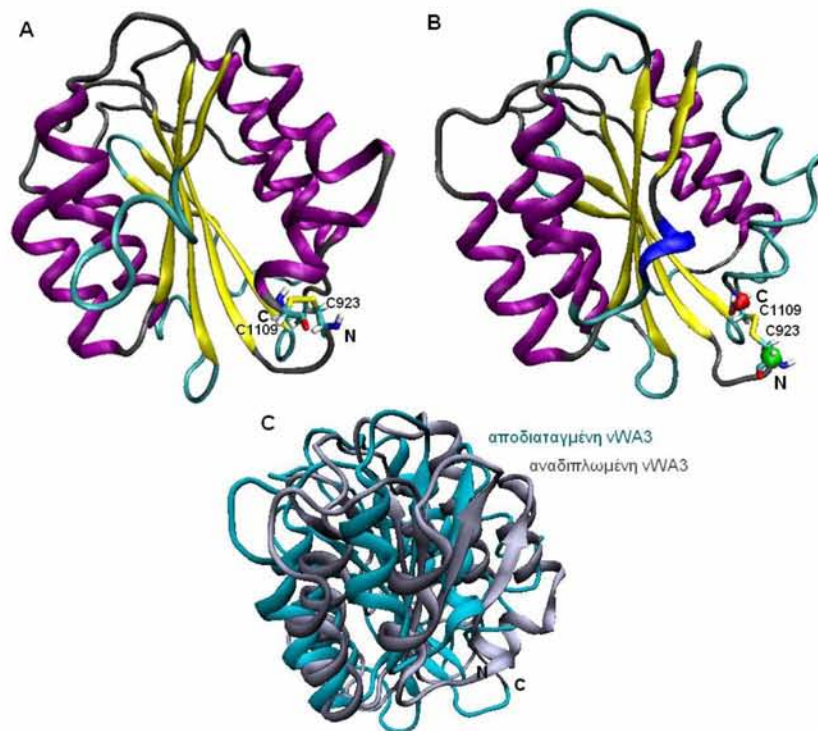
Έχοντας λάβει, εμπειρικά, ως περισσότερο αντιπροσωπευτική την καμπύλη e (διάγραμμα 11), υπολογίσαμε ότι η δύναμη του αίματος, 10pN (ενότητα I.B.1), χρειάζεται για να αποδιάταξει την vWA2, όπως φαίνεται στην εικόνα 11.B, περίπου 100μs!

Επίδραση εφελκυστικής δύναμης στις επικράτειες A1, A3

Αφού μελετήσαμε το πρότυπο αποδιάταξης της επικράτειας A2, ερευνήσαμε και την επίδραση εφελκυστικής δύναμης και στις άλλες επικράτειες A, A1 και A3 (2^ο πείραμα), καθώς, όπως αναλύθηκε στην ενότητα I.A, γειτνιάζουν στην ώριμη λειτουργική πρωτεΐνη, επηρεάζοντας η μια την άλλη εκδηλώνοντας ενδεχομένως παρόμοια χαρακτηριστικά, αλλά και είναι ομόλογες δομικά.



Εικόνα 12: Το σύμπλοκο vWA1-GPIIbα: στην αναδιπλωμένη κατάσταση **(A)**, μετά την άσκηση 800pN στο C-τελικό άκρο (πράσινο) της vWA1 για 3ns **(B)**. Με κίτρινο (sticks) τονίζεται ο δισουλφιδικός δεσμός Cys⁵⁰⁹-Cys⁶⁹⁵. Σύγκριση της αρχικής (ασημί) και της δομής κατόπιν smd (κυανό) για τον εντοπισμό μεταβολών **(C)**.

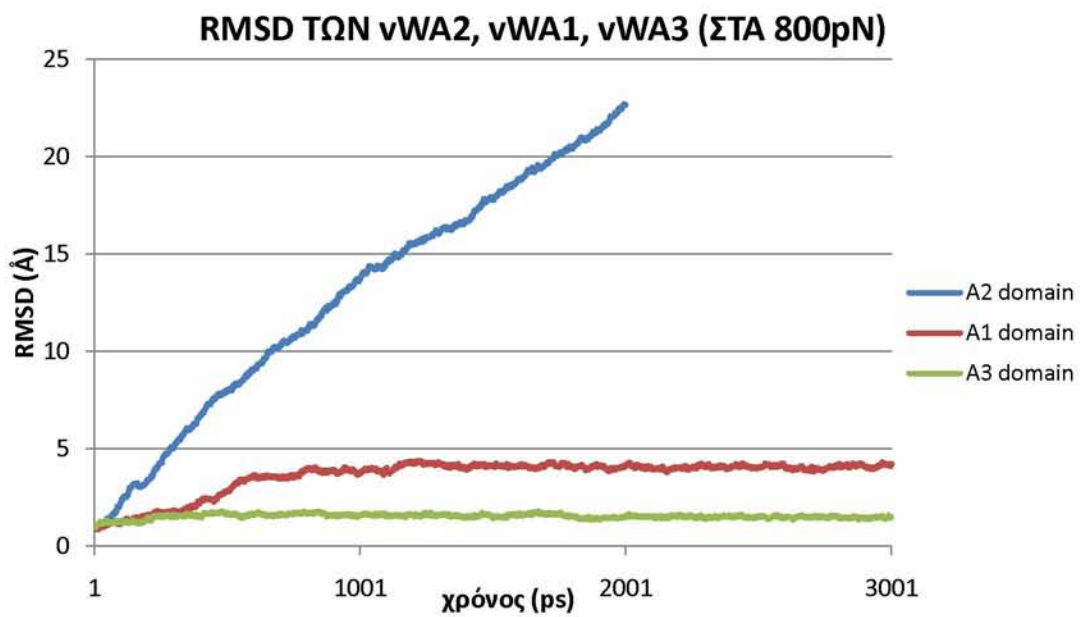


Εικόνα 13: Η επικράτεια A3. Αναδιπλωμένη **(A)**. Μετά την άσκηση 800pN στο N-τελικό άκρο (πράσινο) της vWA1 για 3ns, έχοντας ακλόνητο το C-τελικό άκρο (κόκκινο) **(B)**. Με κίτρινο (sticks) τονίζεται ο δισουλφιδικός δεσμός Cys⁹²³-Cys¹¹⁰⁹. Σύγκριση της αρχικής (ασημί) και της δομής κατόπιν smd (κυανό) για τον εντοπισμό μεταβολών **(C)**.

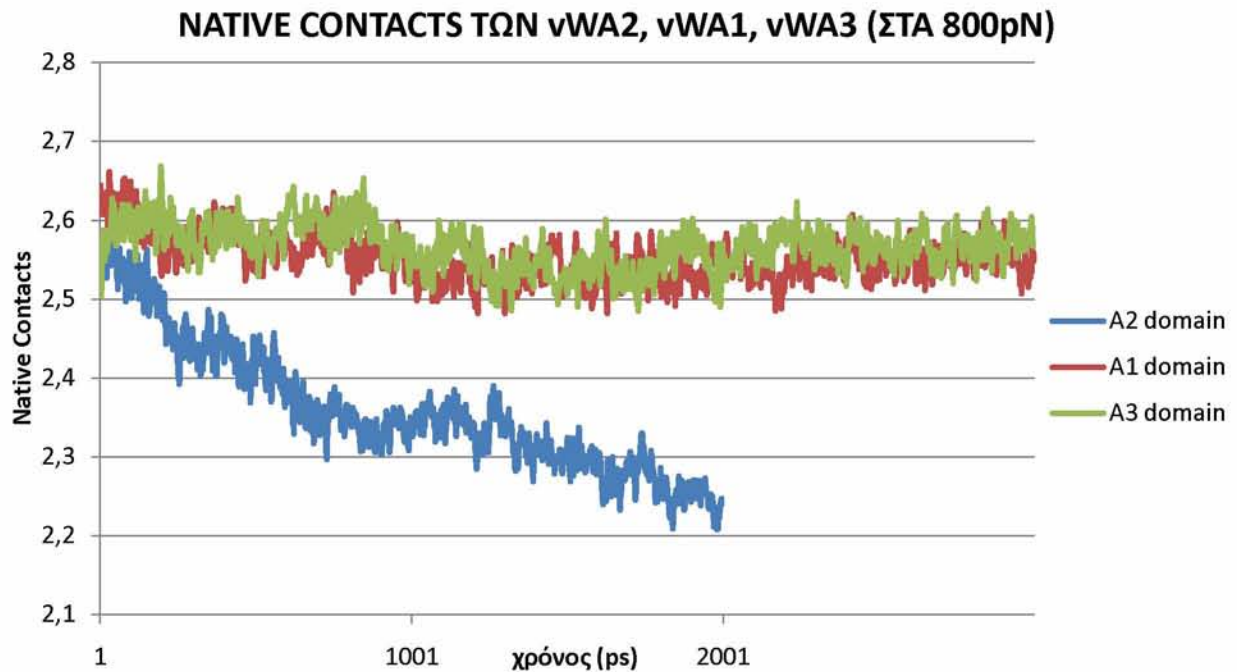
Συγκρίνοντας αυτές τις δύο επικράτειες, A1 και A3, ως προς τις μεταβολές που παρουσίασαν υπό την επίδραση 800pN για 3ns, βλέπουμε ότι η επικράτεια A3 είναι πιο επιρρεπής σε ανάλογες διατμητικές τάσεις. Ένα παρόμοιο συμπέρασμα προέκυψε και από μελέτες στις οποίες μελετήθηκε η αποδιάταξη των επικρατειών A σε ουρία, έναν άκρως αποδιατακτικό παράγοντα [12]. Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται στην εικόνα 13.B, παρατηρούμε στην C-τελική α-έλικα της A3, μια ελαφριά χάλαση της δομής, παρόλο που βρίσκεται κοντά στο ακλόνητο άκρο των προσομοιώσεων. Αντίθετα, δεν παρατηρείται αλλαγή της N-τελικής περιοχής, προφανώς λόγω της ισχυρά συγκρατημένης δομής της β-επιφάνειας. Ωστόσο, ολόκληρη η επικράτεια κατάφερε να μετακινηθεί μέσα στον διαλύτη (εικόνα 13.C) σε αντίθεση με την A1 επικράτεια. Η τελευταία βρισκόταν κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων σε ισχυρή αλληλεπίδραση με τον GPIIb₃, κάτι που έκανε ακόμα δυσκολότερη την κίνησή της ακόμα και υπό την επίδραση της δύναμης. Ο ουσιαστικότερος λόγος όμως που εμπόδισε τόσο την A1 όσο και την A3 να αποδιαταχθούν, όπως η A2, είναι οι δισουλφιδικοί δεσμοί Cys⁵⁰⁹-Cys⁶⁹⁵ και Cys⁹²³-Cys¹¹⁰⁹ στα πρωτεϊνικά άκρα κάθε μιας αντίστοιχα. Στην επικράτεια A1 μόνο το C-

τελικό τμήμα πέρα από τον δισουλφιδικό δεσμό επηρεάστηκε από τη δύναμη, ενώ στην επικράτεια A3 που ο δεσμός ένωνε τα άκρα εμποδίστηκε κάθε παρόμοια κίνηση. Η απουσία ενός αντίστοιχου δεσμού στην A2 είναι το χαρακτηριστικό που δίνει στην τελευταία τις ξεχωριστές, αποδιατακτικές λόγω τάσης ιδιότητες.

Όπως στο πρώτο πείραμα έτσι και σε αυτό, για να έχουμε μια σαφή εικόνα της αποδιάταξης υπολογίστηκαν οι ίδιες παράμετροι και τα συγκριτικά διαγράμματα για τις τρεις επικράτειες A παρατίθεται παρακάτω. Φυσικά για το σύμπλοκο νWA1-GPIba, υπολογίστηκαν μόνο ως προς τις μεταβολές τις επικράτειας A1.



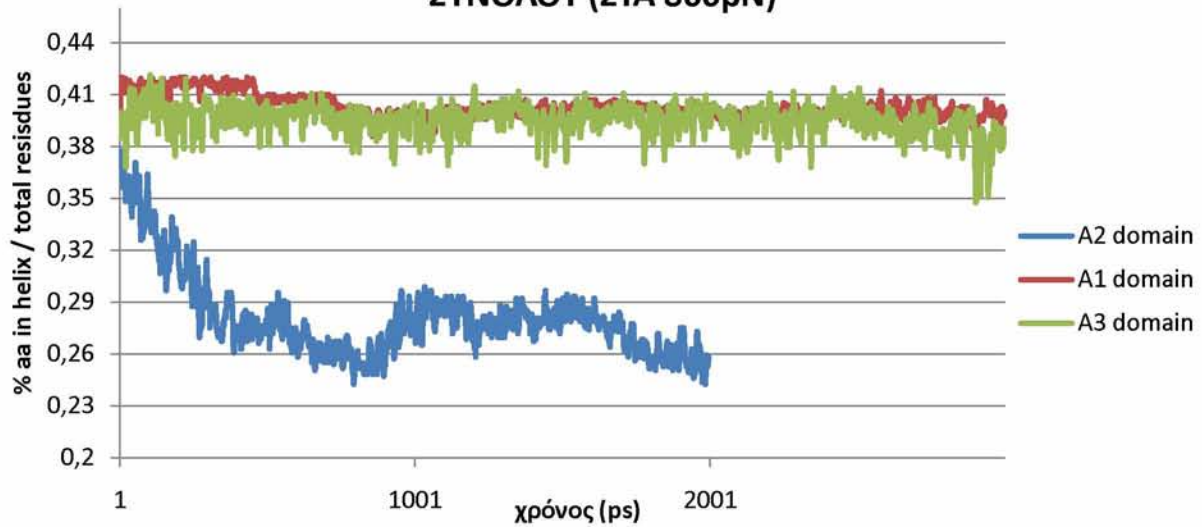
Διάγραμμα 12: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής του RMSD κάθε επικράτειας A κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD.



Διάγραμμα 13: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής τον αριθμό των γειτονικών αλληλεπιδράσεων (native contacts) κάθε A επικράτειας κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD.

Για την επικράτεια A2 τόσο η αύξηση του RMSD (διάγραμμα 12) όσο και η μείωση των γειτονικών αλληλεπιδράσεων (διάγραμμα 13) ήταν δραματικές σε σχέση με τις πολύ μικρές μεταβολές των A1 και A3. Ωστόσο το RMSD της A1 παρουσιάζει μια απότομη αύξηση στο μισό του πρώτου nanosecond και μετά σταθεροποιείται. Αυτή η αύξηση οφείλεται στο C-τελικό άκρο του μορίου μετά τον δισουλφιδικό δεσμό στο οποίο ασκούνταν η σταθερή δύναμη 800pN και ήταν ελεύθερο να κινηθεί. (εικόνα 12.B)

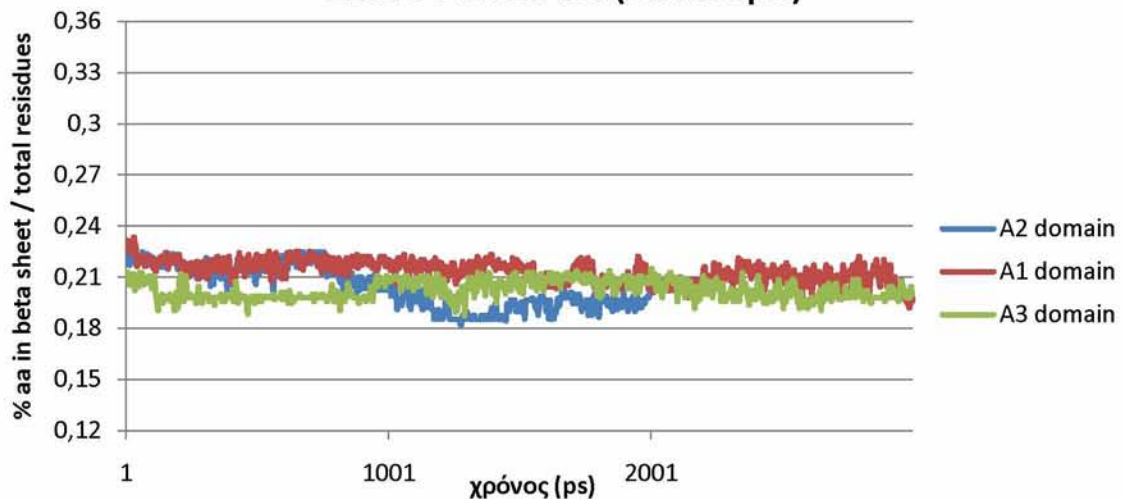
% ΤΩΝ αα ΤΩΝ νWA2, νWA1, νWA3 ΣΕ α-ΕΛΙΚΕΣ ΕΠΙ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ (ΣΤΑ 800pN)



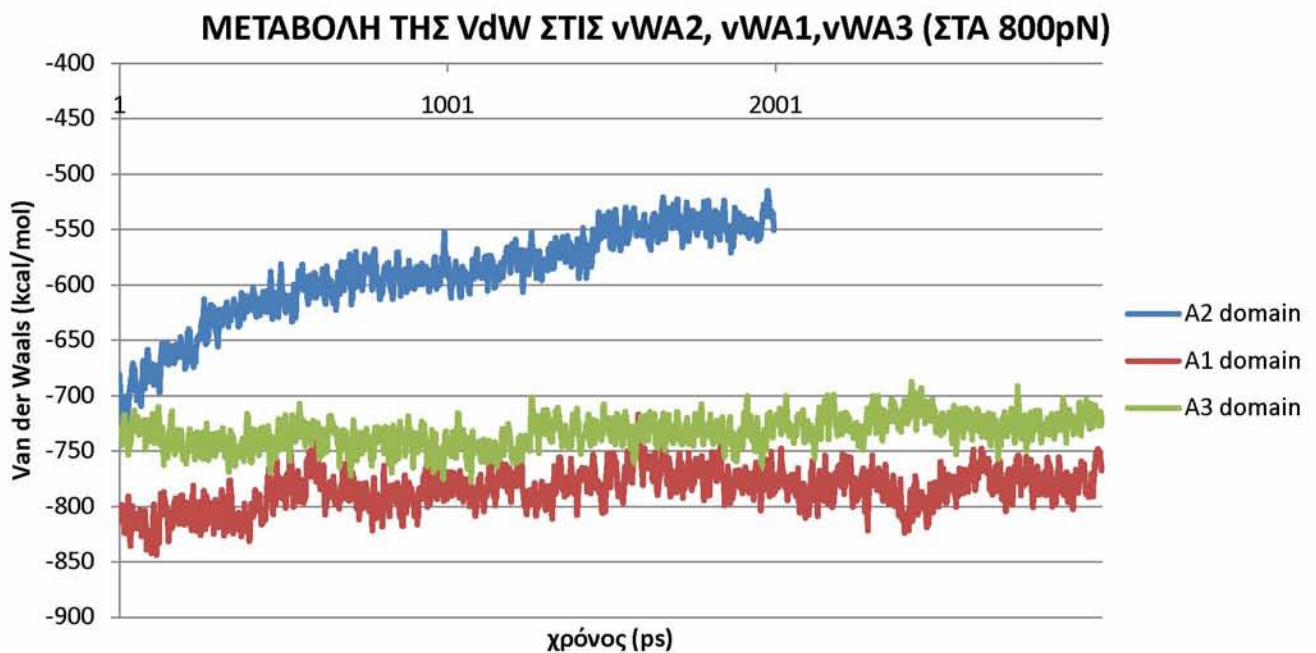
Διάγραμμα 14: Συγκριτικό διάγραμμα των αμινοξέων που βρίσκονται σε α-έλικες για κάθε A επικράτεια κατά τις προσομοιώσεις SMD.

Είναι ξεκάθαρο (διάγραμμα 14) ότι η επικράτεια A2 αποδιατάχθηκε και μάλιστα μια περιοχή της που περιείχε περισσότερο δομές έλικας. Η επικράτεια A3 αν και δε μεταβλήθηκε όπως η επικράτεια A1, έχασε όμως την οργανωμένη δομή της C-τελικής α-έλικας και σε αυτό οφείλονται οι μεγαλύτερες διακυμάνσεις από την A1.

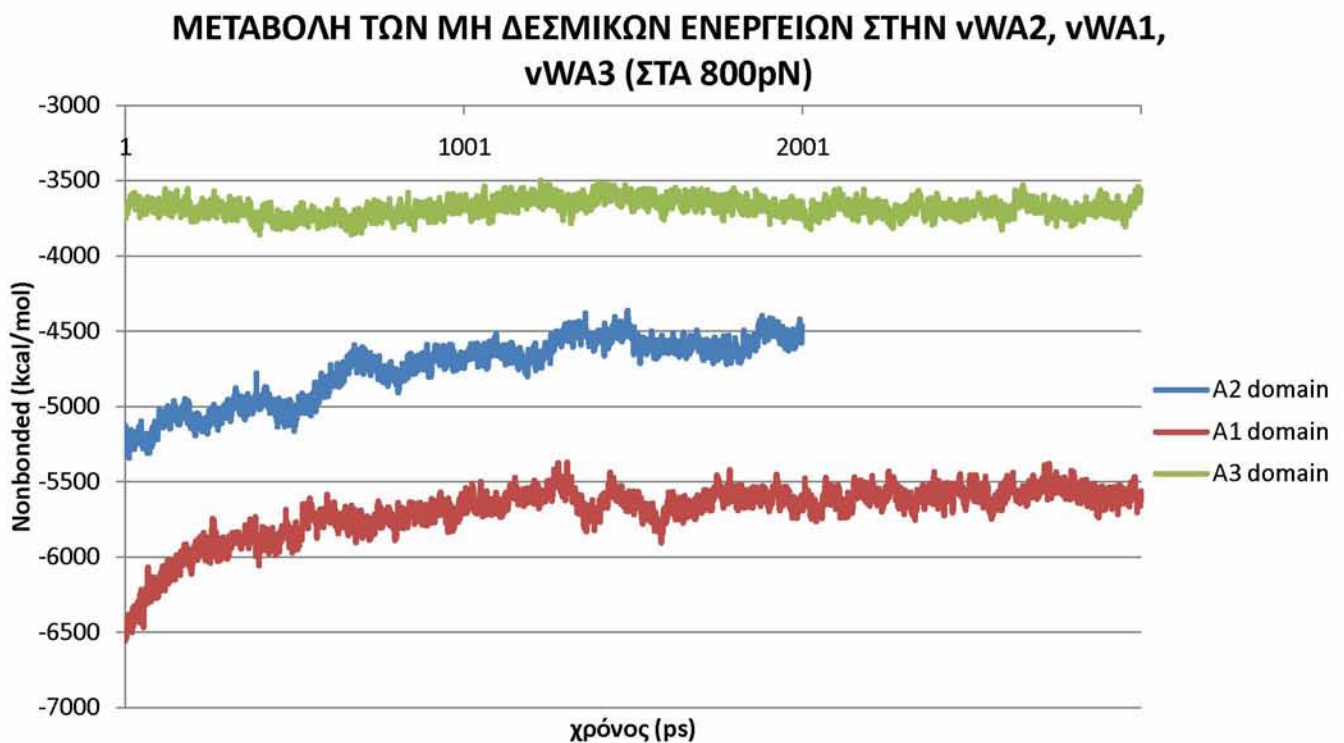
% ΤΩΝ αα ΤΩΝ νWA2, νWA1-GPIβα, νWA3 ΣΕ β-ΦΥΛΛΑ ΕΠΙ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ (ΣΤΑ 800pN)



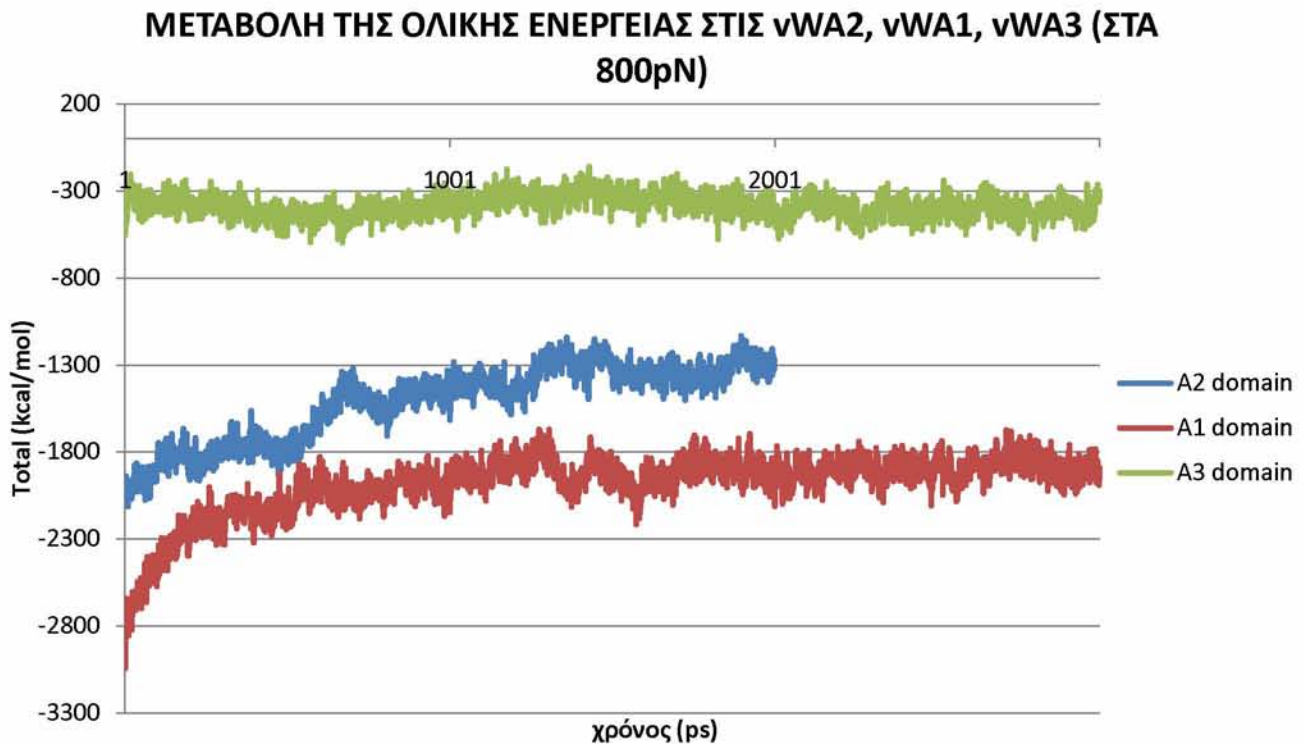
Διάγραμμα 15: Συγκριτικό διάγραμμα των αμινοξέων που βρίσκονται σε β-φύλλα για κάθε A επικράτεια κατά τις προσομοιώσεις SMD.



Διάγραμμα 16: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής της ενέργειας Van der Waals σε κάθε επικράτεια A κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD.



Διάγραμμα 17: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής των μη δεσμικών ενεργειών (Van der Waals, Ηλεκτροστατική) σε κάθε επικράτεια A κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD.



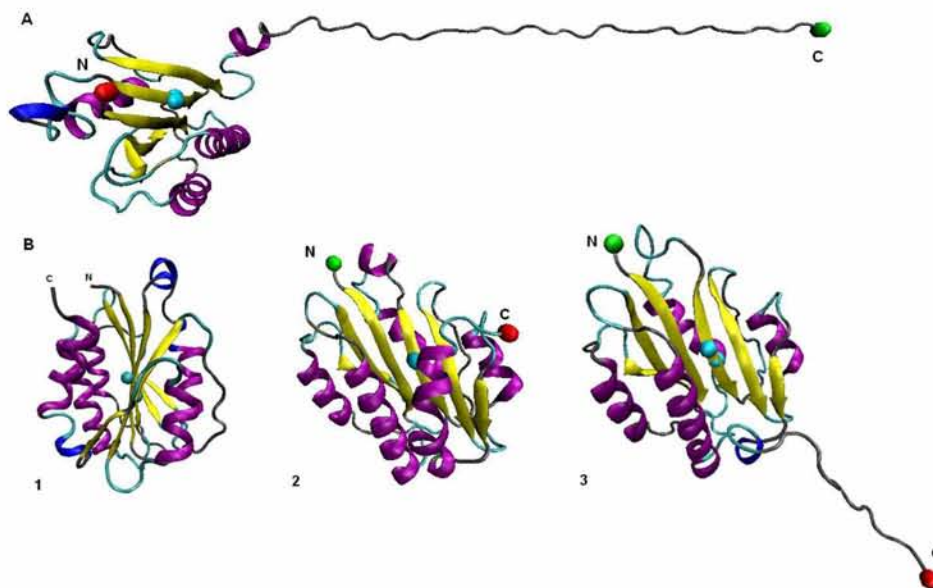
Διάγραμμα 18: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής της ολικής ενέργειας σε κάθε επικράτεια A κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων SMD.

Οι ενέργειες που υπολογίστηκαν φανερώνουν και αυτές τον βαθμό αποδιάταξης κάθε επικράτειας A. Στην A2 παρατηρείται μια ξεκάθαρη αύξηση ενώ οι A1 και A3 ήταν σταθερές εκτός από την απότομη αύξηση που παρουσίασε η A1 από τα πρώτα βήματα, λόγω της κίνησης του C-τελικού άκρου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω και φαίνεται στην εικόνα 12.B. Οι ενέργειες Ηλεκτροστατική, Dihedral, Bond, Angle, Improper, Conformational που επίσης υπολογίστηκαν, δεν παρατίθενται διότι δεν παρουσίασαν καμία σημαντική μεταβολή κατά τις προσομοιώσεις.

Επίδραση εφελκυστικής δύναμης στην A2 εφαρμοζόμενη στο N-τελικό άκρο

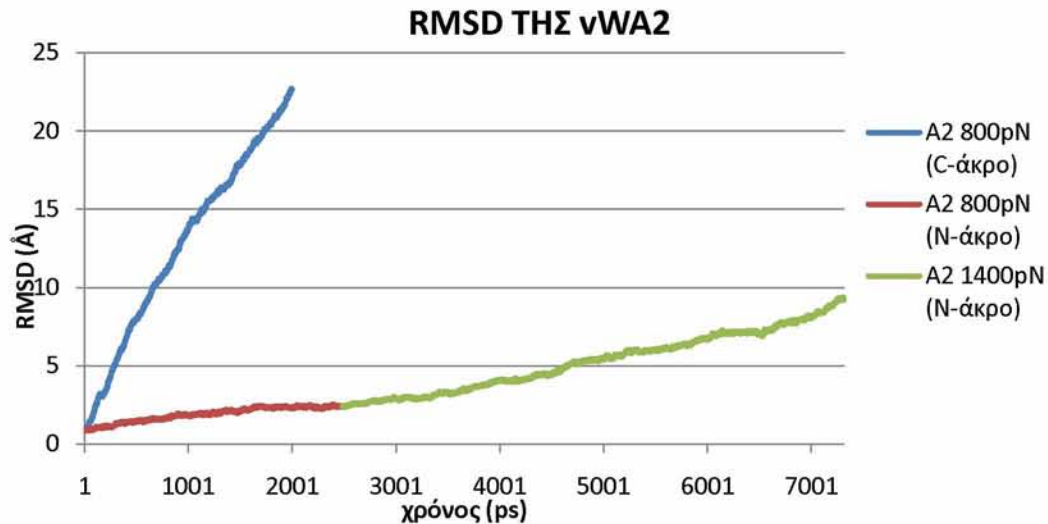
Μελετώντας την αποδιατακτική συμπεριφορά των επικρατειών A, υπό την επίδραση δύναμης, είδαμε ότι μόνο η επικράτεια A2 είναι ευάλωτη σε αλλαγές χάρη στα μοναδικά χαρακτηριστικά της. Εφαρμόσαμε δύναμη στο C-τελικό της άκρο καθώς

Στον τελευταίο κύκλο πειραμάτων (3^ο πείραμα) όταν η δύναμη πλέον εφαρμόστηκε στο N-τελικό άκρο το αποτέλεσμα ήταν αναπάντεχο! Η αποδιάταξη παρουσίασε την ίδια συμπεριφορά ξεκινώντας πάλι από το C-τελικό, αλλά με πολύ μεγάλη χρονική καθυστέρηση. Έτσι, ενώ δύναμη 800pN για 2ns προκάλεσε στην πρώτη περίπτωση αποδιάταξη μεγάλης έκτασης, που φαίνεται στην εικόνα 14.A, στη δεύτερη περίπτωση κατάφερε μόνο να επιμηκύνει ελαφρώς τη δομή και να μεταβάλει το C-τελικό (εικόνα 14.B2). Αυξάνοντας τη δύναμη στα 1400pN για τα επόμενα 4,8ns (εικόνα 14.B3) φάνηκε ξεκάθαρα ότι η αποδιάταξη θα ακολουθήσει το ίδιο μονοπάτι.

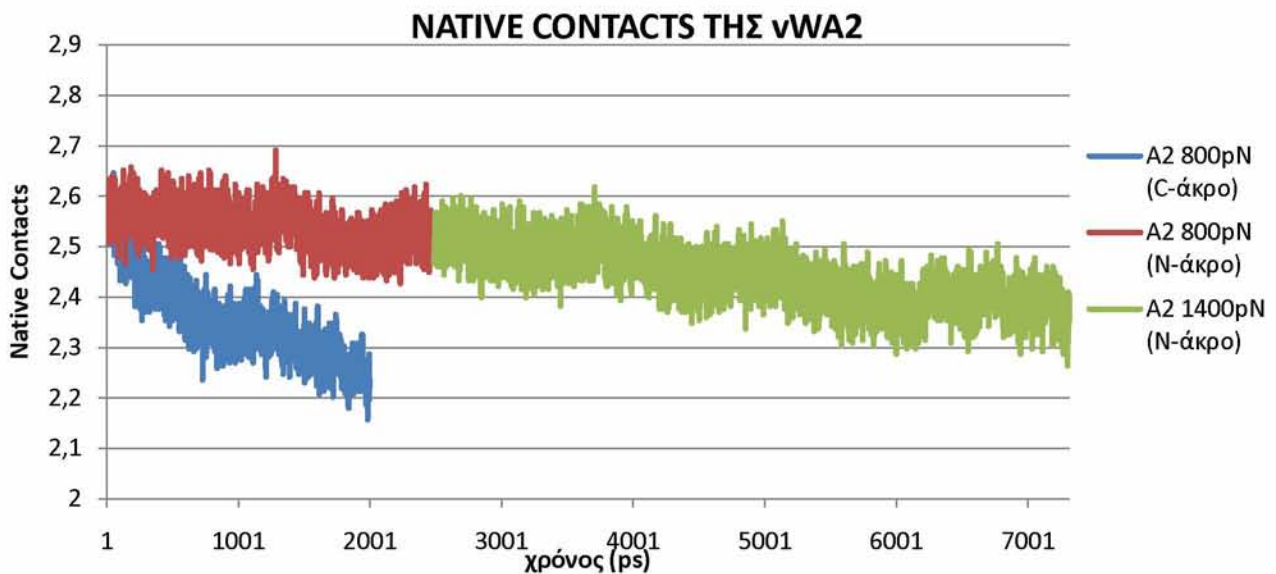


Εικόνα 14: Η δευτεροταγής δομή της επικράτειας A2, με τον πεπτιδικό δεσμό που πρωτεολύεται (γαλάζιο). Στην αποδιαταγμένη μορφή της μετά από εφαρμογή δύναμης 800pN στο C-τελικό άκρο (πράσινο) με κρατημένο ακίνητο το N-τελικό άκρο (κόκκινο) για 2ns (**A**). Στην **B**, **1**. Η αναδιπλωμένη αρχική δομή της, **2**. μετά από προσομοιώσεις SMD με σταθερή δύναμη 800 pN για 2.5ns, **3**. στο τέλος των 7.3ns αφού για τα τελευταία 4.8ns ασκούσαν δύναμη 1400pN στο N-τελικό άκρο (πράσινο) και διατηρούνταν ακίνητο το C-τελικό άκρο (κόκκινο). Φαίνεται ξεκάθαρα, ότι η επικράτεια A2 υπό την επίδραση σταθερής δύναμης αποδιατάσσεται ξεκινώντας από το C-τελικό άκρο

Για να εκφραστεί αυτή η συμπεριφορά ποσοτικά υπολογίστηκαν οι παράμετροι RMSD (διάγραμμα 19), γειτονικές αλληλεπιδράσεις (διάγραμμα 20) και το ποσοστό δευτεροταγούς δομής (διάγραμμα 21,22).

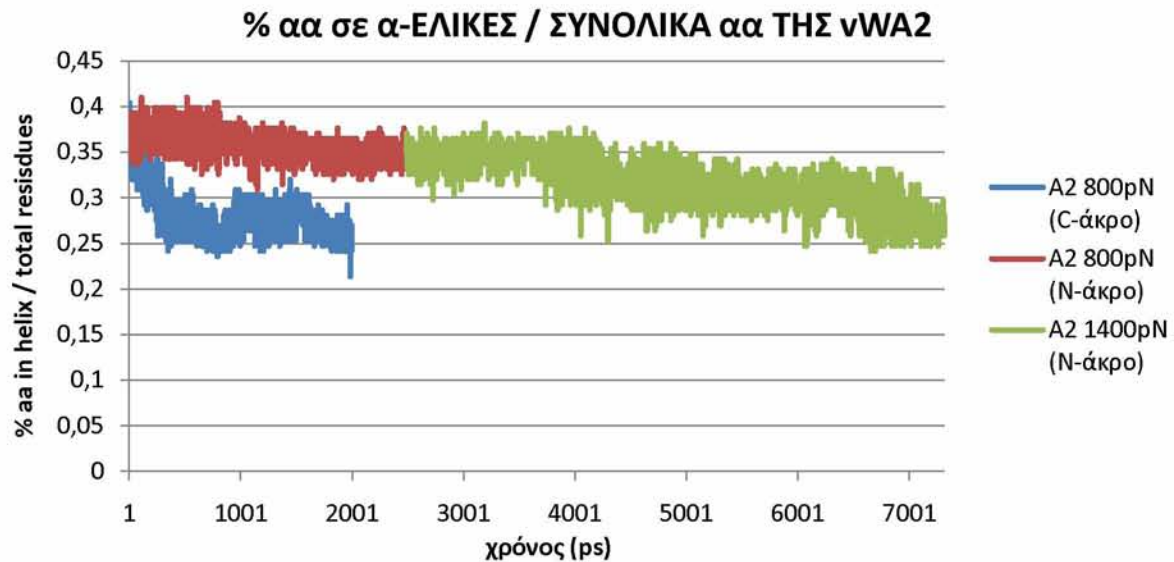


Διάγραμμα 19: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής του RMSD της A2, με εφαρμογή δύναμης στο C-τελικό άκρο και στο N-τελικό άκρο, έως τα πρώτα 2ns όταν ασκούνταν και στα δύο συστήματα δύναμη 800pN. Μετά τα 2.5ns βλέπουμε τη μεταβολή του RMSD στην A2 (εφαρμογή δύναμης στο N-τελικό άκρο) στο οποίο πλέον ασκούνταν 1400pN.

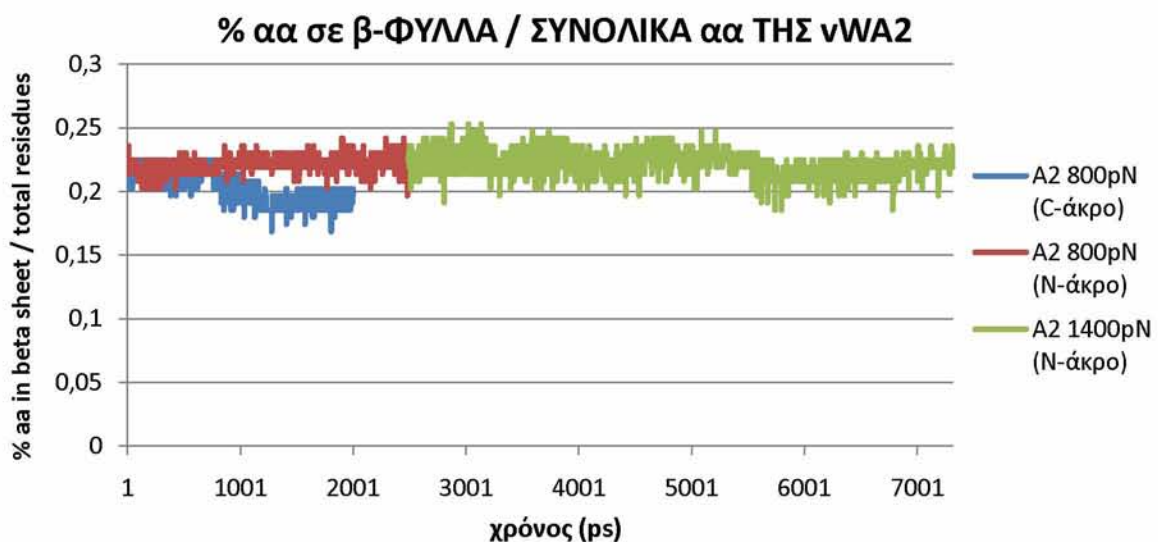


Διάγραμμα 20: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής του αριθμού των γειτονικών αλληλεπιδράσεων (native contacts) της A2 με εφαρμογή δύναμης στο C-τελικό άκρο και στο N-τελικό άκρο, έως τα πρώτα 2ns όταν ασκούνταν και στα δύο συστήματα δύναμη 800pN. Μετά τα 2.5ns βλέπουμε τη μεταβολή του RMSD στην A2 (εφαρμογή δύναμης στο N-τελικό άκρο) στο οποίο πλέον ασκούνταν 1400pN.

Είναι ξεκάθαρο, ότι για να αποκαλυφθεί ο δεσμός Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ όταν η αποδιάταξη ξεκινά από το N-τελικό άκρο απαιτείται ίσως περισσότερο και από τον τριπλάσιο χρόνο!



Διάγραμμα 21: Συγκριτικό διάγραμμα του ποσοστού των αμινοξέων που βρίσκονται σε α-έλικες στα συστήματα A2(εφαρμογή δύναμης στο C-τελικό άκρο) και A2 (εφαρμογή δύναμης στο N-τελικό άκρο), της vWA2, μέχρι τα πρώτα 2ns που ασκούνταν και στα δύο 800pN και μετά τα 2.5ns την πορεία του A2 (δύναμη στο N-τελικό άκρο) υπό την επίδραση 1400pN πλέον.



Διάγραμμα 22: Συγκριτικό διάγραμμα του ποσοστού των αμινοξέων που βρίσκονται σε β-φύλλα στα συστήματα A2(εφαρμογή δύναμης στο C-τελικό άκρο) και A2 (εφαρμογή δύναμης στο N-τελικό άκρο), της vWA2, μέχρι τα πρώτα 2ns που ασκούνταν και στα δύο 800pN και μετά τα 2.5ns την πορεία του A2 (δύναμη στο N-τελικό άκρο) υπό την επίδραση 1400pN πλέον.

Και στα διαγράμματα ποσοστού δευτεροταγούς δομής (διαγράμματα 21,22) λαμβάνουμε την ίδια εικόνα. Για να επιτευχθεί χάλαση των δομών α-έλικας χρειάστηκε σχετικά τριπλάσιος χρόνος, έχοντας μάλιστα υπόψη ότι η διαδικασία επιταχύνθηκε μετά τα πρώτα 2.5ns. Οι δομές β-φύλλων αν και δεν αποσυσπειρώθηκαν στο χρονικό διάστημα της προσομοίωσης, παρουσίασαν όμως μεγαλύτερη διακύμανση γεγονός που οφείλεται στο ότι το άκρο που δεχόταν την δύναμη βρισκόταν στο κεντρικό β-φύλλο αυτής της προστατευμένης β-επιφάνειας, με αποτέλεσμα να την παρασύρει και όχι να την αποδιατάσει.

Έτσι, ο πιθανότερος μηχανισμός αποδιάταξης είναι αυτός που πρώτα το C-τελικό άκρο αποσπάται υπό την επίδραση εφελκυστικής δύναμης.

Συμπερασματικά, λοιπόν, μπορούμε να πούμε, ότι η επικράτεια A2 του παράγοντα von Willebrand αποδιατάσσεται με ένα πρότυπο που μοιάζει με το ξετύλιγμα ενός κουβαριού, ξεκινώντας από το καρβοξυτελικό της άκρο, έως ότου αποκαλυφθεί ο πεπτιδικός δεσμός Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ που πρωτεολύεται από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13, με την τελευταία να διαθέτει πολλαπλές επικράτειες που αλληλεπιδρούν με C-τελικές περιοχές της A2. Οπότε, είναι πιθανό ο ADAMTS13 να αναγνωρίζει και να πρωτεολύει όχι την πλήρως αποδιαταγμένη επικράτεια αλλά μια ενδιάμεσα αποδιαταγμένη κατάσταση της. Η διατμητική τάση (shear stress) που συνεπάγεται η ροή του αίματος ασκεί στα πολυμερή του παράγοντα von Willebrand μια δύναμη της τάξης των 10pN και ο χρόνος που υπολογίστηκε ότι χρειάζεται για να αποδιατάξει την επικράτεια A2 είναι περίπου 100μs.

Είδαμε επίσης ότι από τις τρεις επικράτειες A, A1, A2, A3, του παράγοντα von Willebrand η A2 είναι η πιο ευάλωτη σε εξωτερικές μηχανικές δυνάμεις, και αυτό οφείλεται στα μοναδικά χαρακτηριστικά της σε σχέση με τις άλλες δύο, αλλά κυρίως στην απουσία δισουλφιδικού δεσμού που να συγκρατεί ενωμένα τα πρωτεϊνικά άκρα της. Η μελέτη μας επιβεβαιώνει σε γενικές γραμμές το κυρίαρχο μέχρι σήμερα μοντέλο για τον ρόλο των διατμητικών τάσεων στην πρόσβαση του ADAMTS13 στην θέση πρωτεόλυσης της επικράτειας A2.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Allan Platt. Understanding and treating disorders of the clotting system. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 2007; 20:21-26
- [2] Pier Mannuccio Mannucci. von Willebrand Factor : A Marker of Endothelial Damage?. *Journal of the American Heart Association*, 1998;18;1359-1362
- [3] P. Vincent Jenkins, K. John Pasi, and Stephen J. Perkins. Molecular Modeling of Ligand and Mutation Sites of the Type A Domains of Human von Willebrand Factor and Their Relevance to von Willebrand's Disease. *Blood*, 1998;91(6): 2032-2044
- [4] Cécile V. Denis. Molecular and Cellular Biology of von Willebrand Factor. *International Journal of Hematology*, 2002; 75: 3-8
- [5] C. Martin, L. D. Morales, M. A. Cruz. Purified A2 domain of von Willebrand factor binds to the active conformation of von Willebrand factor and blocks the interaction with platelet glycoprotein Iba. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007; 5: 1363-1370
- [6] Roland A.P. Romijn, Barend Bouma, Winnifred Wuyster, Piet Gros, Jan Kroon, Jan J. Sixma, Eric G. Huizinga. Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand Factor A3-domain. *Journal of Biological Chemistry*, 2001; 276(13): 9985-9991
- [7] Xiaohui Zhang, Kenneth Halvorsen, Cheng-Zhong Zhang, Wesley P. Wong, Timothy A. Springer. Mechanoenzymatic Cleavage of the Ultralarge Vascular Protein von Willebrand Factor. *Science*, 2009; 324: 1330- 1334
- [8] Sara Zanardelli, James T. B. Crawley, Chan K. N. Chan Kwo Chion, Jonathan K. Lam, Roger J. S. Preston, David A. Lane. ADAMTS13 Substrate Recognition of von Willebrand Factor A2 Domain. *Journal of biological chemistry*, 2006; 281(3): 1555-1563
- [9] Weiqiang Gao, Patricia J. Anderson[†], Elaine M. Majerus, Elodee A. Tuley, J. Evan Sadler. Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *PNAS*, 2006; 103(50): 19099-19104
- [10] Shuji Miura, Chester Q. Li, Zhaofeng Cao, Huifang Wang, Mark R. Wardell, J. Evan Sadler. Interaction of von Willebrand Factor Domain A1 with Platelet Glycoprotein Iba-(1-289). *The journal of biological chemistry*, 2000; 275(11): 7539-7546
- [11] Eric G Huizinga, R Martijn van der Plas, Jan Kroon, Jan J Sixma, Piet Gros. Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure*, 1997; 5(9):1147-1156
- [12] Matthew Auton, Miguel A. Cruz and Joel Moake. Conformational Stability and Domain Unfolding of the Von Willebrand Factor A Domains. *Elsevier*, 2006; 366: 986-1000
- [13] Armin J. Reininger, Harry F. G. Heijnen, Hannah Schumann, Hanno M. Specht, Wolfgang Schramm, Zaverio M. Ruggeri. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand

- factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*, 2006; 107(9): 3537–3545
- [14] Brenda M Luken, Luke YN Winn, Jonas Emsley, David A Lane, James TB Crawley. The importance of vicinal cysteines, C1669 and C1670, for von Willebrand factor A2 domain function. *Blood*, 2009; 10.1182: 1-10
- [15] Z. M. Ruggeri. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003; 1: 1335-1342
- [16] Sarah Uff, Jeannine M. Clemetson, Tim Harrison, Kenneth J. Clemetson, Jonas Emsley. Crystal Structure of the Platelet Glycoprotein Ib N terminal Domain Reveals an Unmasking Mechanism for Receptor Activation. *The journal of biological chemistry*, 2002; 277: 35657–35663
- [17] Kenji Nishio, Patricia J. Anderson, X. Long Zheng, J. Evan Sadler. Binding of platelet glycoprotein Ib to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *PNAS*, 2004; 101(29): 10578–10583
- [18] Qing Zhang, Yan-Feng Zhou, Cheng-Zhong Zhang, Xiaohui Zhang, Chafen Lu, Timothy A. Springer. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *PNAS*, 2009; 106(23): 9226–9231
- [19] Zaverio M. Ruggeri. Von Willebrand factor: Looking back and looking forward. *Thromb Haemost*, 2007; 98: 55–62
- [20] Perry J.J. van Genderen, Tom Vink, Jan J. Michiels, Mars B. van 't Veer, Jan J. Sixma, Huub H.D.M. van Vliet. Acquired von Willebrand Disease Caused by an Autoantibody Selectively Inhibiting the Binding of von Willebrand Factor to Collagen. *Blood*, 1994; 84(10): 3378-3384
- [21] Bernadette Obert, Anne Houllier, Dominique Meyer, Jean-Pierre Girma. Conformational Changes in the A3 Domain of von Willebrand Factor Modulate the Interaction of the A1 Domain With Platelet Glycoprotein Ib. *Blood*, 1999; 93(6): 1959-1968
- [22] Elaine M. Majerus, Patricia J. Anderson, J. Evan Sadler. Binding of ADAMTS13 to von Willebrand Factor. *The journal of biological chemistry*, 2005; 280(23): 21773–21778
- [23] Weiqiang Gao, Patricia J. Anderson, J. Evan Sadler. Extensive contacts between ADAMTS13 exosites and von Willebrand factor domain A2 contribute to substrate specificity. *Blood*, 2008; 112: 1713- 1719
- [24] Jing-Jiang Wu, Kazuo Fujikawa, Brad A. McMullen, Dominic W. Chung. Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. *PNAS*, 2006; 103(49): 18470–18474
- [25] Gallia G. Levy, David G. Motto, David Ginsburg. ADAMTS13 turns 3. *Blood*, 2005; 106: 11- 17

- [26] Koichi Kokame, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata. VWF73, a region from D1596 to R1668 of vonWillebrand factor, provides a minimal substrate forADAMTS-13. *Blood*, 2004; 103: 607-612
- [27] Sarah Porter, Ian M. Clark, Lara Kevorkian Dylan R. Edwards. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.*, 2005; 386: 15-27
- [28] Matthew Sinnott, Paul W. Cleary, Mahesh Prakash. An investigation of pulsatile blood flow in a bifurcation artery using a grid-free method. *Fifth International Conference on CFD in the Process Industries*, 2006
- [29] Christopher J. Lockhart, Andrew J. Gamble, Derrick Rea, Sinead Hughes, R. Canice McGivern, Clive Wolsley, Michael Steverson, Mark T. Harbinson, Richard D. Plumb, Gary E. McVeigh. Nitric oxide modulation of ophthalmic artery blood flow velocity waveform morphology in healthy volunteers. *Clinical Science*, 2006; 111: 47-52
- [30] James C. Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kale, and Klaus Schulten. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 2005; 26:1781-1802
- [31] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., VMD-Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 1996; 14: 33-38.
- [32] James C. Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elisabeth Villa Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kale , Klaus Schulten. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 2005; 26: 1781-1802
- [33] Stewart A. Adcock, J. Andrew McCammon. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chemical Reviews*, 2006; 106(5): 1589-1615
- [34] VMD User's Guide, Version 1.8.7. University of Illinois and Beckman Institute, 2009
- [35] Schneider, T.D. Theory of molecular machines. I. Channel capacity of molecular machines. *Journal of Theoretical Biology*, 1991; 148: 83-123.
- [36] Barry Isralewitz, Jerome Baudry, Justin Gullingsrud, Dorina Kosztin, and Klaus Schulten. Steered molecular dynamics investigations of protein function. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2001; 19: 13-25
- [37] Linxi Zhang, Tingting Sun, Jun Cheng, Haizhu Ma. A steered molecular dynamics study on peptide sequence prediction from force-extension profiles. *Elsevier*, 2007; 48: 3013-3020
- [38] David J. Brockwell. Force Denaturation of Proteins – an Unfolding Story. *Current Nanoscience*, 2007; 3: 3-15
- [39] NAMD User's Guide, Version 2.6b2. University of Illinois and Beckman Institute, 2006

- [40] Tamar Schlick, *Molecular Modeling and Simulation*, 2nd Edition. Springer, 2002; 21: 435–438
- [41] Jadwiga Bienkowska, Miguel Cruz, Andrew Atiemo, Robert Handin, and Robert Liddington. The von Willebrand Factor A3 Domain Does Not Contain a Metal Ion-dependent Adhesion Site Motif. *Journal of biological chemistry*, 1997; 272(40): 25162–25167
- [42] John J. Dumas, Ravindra Kumar, Thomas McDonagh, Francis Sullivan, Mark L. Stahl, William S. Somers, and Lidia Mosyak. Crystal Structure of the Wild-type von Willebrand Factor A1-Glycoprotein Ib_β Complex Reveals Conformation Differences with a Complex Bearing von Willebrand Disease Mutations. *The journal of biological chemistry*, 2004; 279(22): 23327–23334
- [43] NAMD Tutorial, University of Illinois at Urbana-Champaign, Computational Biophysics Workshop, 2009