



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ
ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΓΚΑΚΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΩΝ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΩΝ A1 ΚΑΙ A2 ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΠΗΞΗΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ VON WILLEBRAND

ΛΑΡΙΣΑ 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8119/1

Ημερ. Εισ.: 16-03-2010

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

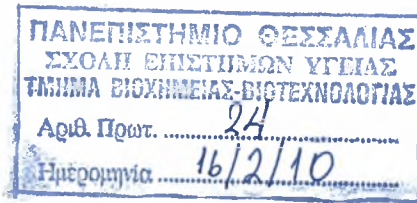
572.6

ΓΚΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087126



«Κλωνοποίηση, υπερέκφραση και μελέτη των επικρατειών A1 και A2 του παράγοντα πήξης του αίματος von Willebrand»

Τριμελής Επιτροπή

- Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Παπαδόπουλος Γεώργιος, Λέκτορας Βιοφυσικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- A.1. Νόσος von Willebrand*
- A.2. Εισαγωγή και βιολογικά χαρακτηριστικά*
- A.3. Δομή του γονιδίου*
- A.4. Βιοσύνθεση και πολυμερική δομή*
- A.5. Αποθήκευση, έκκριση και κυκλοφορία*
- A.6. Μοριακή δομή*
- A.7. Σχέση δομής λειτουργίας*
- A.8. Μοριακή δομή των Α-περιοχών*

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- B.1. Υλικά*
 - B.1.1. Χημικές ουσίες*
 - B.1.2. Κύτταρα*
 - B.1.3. Πλασμιδιακοί φορείς*
 - B.1.4. Θρεπτικά μέσα*
 - B.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα*
- B.2. Μέθοδοι*
 - B.2.1. Απομόνωση RNA από ιστούς*
 - B.2.2. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων*
 - B.2.3. RT-PCR για δημιουργία cDNA*
 - B.2.4. PCR για ενίσχυση των επικρατειών A1 και A2 του παράγοντα πήξης του αίματος von Willebrand*
 - B.2.5. Έλεγχος των PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης*
 - B.2.6. Gel Extraction*
 - B.2.7. Κλωνοποίηση των επικρατειών A1 και A2 στον φορέα pSCA και απευθείας μετασχηματισμός κυττάρων DH5α*

- B.2.8. Καλλιέργεια κυττάρων σε στερεό υπόστρωμα
- B.2.9. Καλλιέργεια κυττάρων σε υγρό υπόστρωμα
- B.2.10. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (*mini prep*)
- B.2.11. Κλωνοποίηση των επικρατειών A1 και A2 στον φορέα pSCA και απευθείας μετασχηματισμός κυττάρων BL21
- B.2.12. Δοκιμασίες υπερέκφρασης των πρωτεϊνών
- B.2.13. Σπάσιμο κυττάρων και συλλογή πρωτεϊνών
- B.2.14. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου
- B.2.15. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF-Western blot
- B.2.16. Καθαρισμός πρωτεϊνών με στήλη Ni
- B.2.17. Καθαρισμός πρωτεϊνών με στήλη GSH
- B.2.18. Πέψη GST ουράς με την πρωτεάση 3C
- B.2.19. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης κατά Bradford
- B.2.20. Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης ITC [51]

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Γ.1. Ενίσχυση του cDNA των A1 και A2 περιοχών του vWF
- Γ.2. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR στο βακτηριακό φορέα pSCA
- Γ.3. Κλωνοποίηση των περιοχών A1 και A2 του vWF στον βακτηριακό φορέα έκφρασης *pet49b*
- Γ.4. Αλληλούχιση των ανασυνδιασμένων φορέων έκφρασης
- Γ.5. Παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF
- Γ.6. Βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών
- Γ.7. Καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με στήλες Ni και GSH
- Γ.8. Πέψη της GST ουράς από την πρωτεάση 3C
- Γ.9. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών A1 και A2 με την μέθοδο της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης ITC.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε εξολοκλήρου στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας, Μοριακή Γενετική και Διαγνωστικοί Δείκτες. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα.Μαρία Κοντού, Λέκτορα Κλινικής Χημείας, για την ανάθεση της εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας, για τις πολύτιμες συμβουλές, καθώς και για τη συνεχή παρακολούθηση και επίμονη καθοδήγηση που μου έδειξε κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω, στην υποψήφια διδάκτωρ Ζωή Καρούλια για την πολύτιμη βοήθεια καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων, για τις πολύτιμες συμβουλές αλλά και για την ηθική υποστήριξη. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους δουλεύουν στο εργαστήριο για τη βοήθεια και την καλή συνεργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ρόλος του παράγοντα von Willebrand είναι καθοριστικός για την αιμόσταση, διότι αφενός είναι υπεύθυνος για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο του τραυματισμένου αγγείου και αφετέρου διατηρεί την ακεραιότητα του παράγοντα VIII της πήξης, με τον οποίο συνδέεται, προστατεύοντάς τον από πρωτεολυτική καταστροφή στην κυκλοφορία. Ελαττωμένη δράση του vWF, είτε λόγω ανεπαρκούς παραγωγής είτε λόγω παρουσίας δυσλειτουργικών μορφών του, προκαλεί αιμορραγική διάθεση. Αντίθετα, αυξημένη δράση του παράγοντα ως αποτέλεσμα διαταραχής του καταβολισμού του αυξάνει τον κίνδυνο θρομβώσεων.

Το πρώιμο προϊόν του γονιδίου του vWF, είναι μια πρωτεΐνη 2.813 αμινοξέων. Διαφορετικές πρωτεΐνες αντιστοιχούν στους τέσσερις τύπους επαναλαμβανόμενων περιοχών (D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, A4, D4, B, C1,C2) του cDNA, και είναι υπεύθυνες για διαφορετικά χαρακτηριστικά δέσμευσης του μορίου. Η A1-περιοχή αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 497-716 του ώριμου vWF και το αμινοτελικό άκρο της συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο της μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού ανάμεσα στις Cys509 και Cys695. Η θηλιά αυτή εμπλέκεται στην δέσμευση του vWF στον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα Ib των αιμοπεταλίων (GPIb). Η A2-περιοχή του vWF αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 717-909 και δεν περιέχει δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό της άκρο. Περιέχει μια φυσιολογική θέση πέψης μεταξύ των Tyr842 και Met843 την οποία αναγνωρίζει η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13 και συνδέεται με την φυσιολογική ανακύκλωση του vWF.

Από μελέτες φαίνεται πως η A2 περιοχή συνδέεται στην A1 και εμποδίζει την σύνδεση της στα αιμοπετάλια και άρα την πήξη του αίματος. Από αυτή την διαπίστωση προκύπτει ότι αν βρεθούν στοιχεία για την αλληλεπίδραση των δύο επικρατειών θα μπορούσαν να σχεδιαστούν κατάλληλα μόρια που θα συνδέονται στην A1-περιοχή, μιμούμενα τον τρόπο σύνδεσης της A2-περιοχής και έτσι θα εμποδίζεται η πήξη του αίματος. Συνεπώς τα μόρια αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αντιθρομβωτικοί παράγοντες.

Για να μελετηθεί λοιπόν η αλληλεπίδραση των επικρατειών A1 και A2, αυτές κλωνοποιήθηκαν και έπειτα οι αντίστοιχες πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν και καθαρίστηκαν. Στοιχεία για την αλληλεπίδραση τους δόθηκαν μέσω ενός πειράματος ITC.

ABSTRACT

The role of von Willebrand factor is decisive for because, firstly, it is responsible for the adhesion of platelets on the endothelium of a wounded vessel and what is more it maintains the integrity of coagulation factor VIII, with which it is connected, protecting it from proteolytical destruction during circulation. Decreased activity of vWF, either due to its insufficient production, or due to dysfunctional forms it may present, causes haemorrhagic disposition. However, increased activity of this factor as a result of a disorder in its catabolism increases the danger of thrombosis.

The early product of the vWF gene is a protein of 2.813 amino – acids. Different proteins correspond to the four types of repeated domains (D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, A4, D4, B, C1,C2) of cDNA, and are responsible for different characteristics of molecular binding. The A1 – domain corresponds to the residues 497 – 716 of the mature vWF, and its N – end binds to the C – end through a disulfide bond between Cys509 and Cys695. This loop is involved in the binding of vWF on the glycoprotein receptor Ib of the platelets (GPIb). The A2 – domain of vWF corresponds to the residues 717 – 909 and does not contain any disulfide bond between the N- end and the C – end. It contains a normal digestion site between Tyr842 and Met843 which is recognized by the metalloprotease ADMTS – 13 and is related to the normal feedback of vWF.

According to research, it appears that the A2 – domain binds to A1, which is thus prevented from binding to the platelets, resulting in blood not being coagulated. These findings lead to the conclusion that if elements correlating to the interaction of those two domains are found, suitable molecules could be created that will be bound to A1 – domain, imitating the way in which A2 – domain is bound and thus the coagulation of blood will be prevented. Consequently, these molecules could be used as antithrombotic factors.

In order to study the interaction of A1 and A2 – domains, they were cloned, over – expressed and purified. Information about their interaction was given through ITC experiment.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Νόσος von Willebrand

Το 1926 ο Erik von Willebrand περιέγραψε πρώτος μια διαταραχή της αιμόστασης η οποία μεταβιβάζοταν με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα, και της οποίας η κλινική εικόνα διαφοροποιούνταν από αυτή της αιμορροφιλίας. Ο ίδιος την χαρακτήρισε αρχικά ως «ψευδοαιμορροφιλία»[1] ενώ στη συνέχεια η νόσος έλαβε το όνομα του πρώτου ερευνητή.

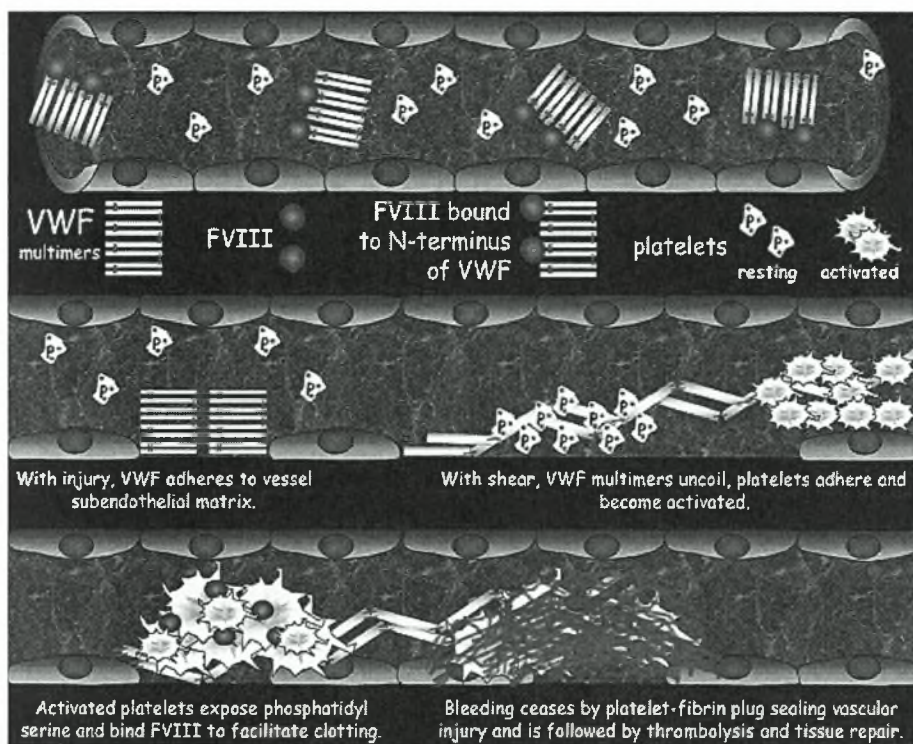
Η νόσος von Willebrand είναι η πιο συχνή κληρονομική διαταραχή της αιμόστασης με συχνότητα περίπου 1% παγκοσμίως[2]. Χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ετερογένεια στην κλινική της έκφραση. Η διάγνωσή της στηρίζεται σε τρεις παραμέτρους: το ατομικό ιστορικό αιμορραγιών δέρματος και βλεννογόνων, το οικογενειακό ιστορικό αιμορραγιών και την εργαστηριακή επιβεβαίωση ποσοτικών ή ποιοτικών διαταραχών του vWF.

Η κλινική εικόνα της νόσου χαρακτηρίζεται από αιμορραγίες δέρματος και βλεννογόνων, όπως επαναλαμβανόμενες ρινορραγίες, ουλορραγίες και εύκολη δημιουργία μωλώπων. Στις γυναίκες το μόνο σύμπτωμα της νόσου ενδέχεται να είναι η μηνορραγία, επομένως είναι απαραίτητη η λήψη λεπτομερούς γυναικολογικού ιστορικού.

Οι περισσότεροι τύποι της νόσου κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα. Ωστόσο, η φαινοτυπική κληρονομικότητα ποικίλλει, με αντίστοιχη ποικιλομορφία στη σοβαρότητα και το είδος των αιμορραγιών που παρατηρούνται στα μέλη της ίδιας οικογένειας. Υπάρχουν ακόμη και τύποι της νόσου που κληρονομούνται με τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης.

A.2. Εισαγωγή και βιολογικά χαρακτηριστικά

Ο ρόλος του παράγοντα von Willebrand είναι καθοριστικός για την αιμόσταση, διότι αφενός είναι υπεύθυνος για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο του τραυματισμένου αγγείου και αφετέρου διατηρεί την ακεραιότητα του παράγοντα VIII της πήξης, με τον οποίο συνδέεται, προστατεύοντάς τον από πρωτεολυτική καταστροφή στην κυκλοφορία. Ελαττωμένη δράση του vWF, είτε λόγω ανεπαρκούς παραγωγής είτε λόγω παρουσίας δυσλειτουργικών μορφών του, προκαλεί αιμορραγική διάθεση. Αντίθετα, αυξημένη δράση του παράγοντα ως αποτέλεσμα διαταραχής του καταβολισμού του αυξάνει τον κίνδυνο θρομβώσεων.



Εικ.1 VWF και φυσιολογική αιμόσταση

Σε σημεία αγγειακής βλάβης ο παράγοντας συνδέεται με το υπενδοθηλιακό ιστό κυρίως μέσω κολλαγόνου χάρη στην A3 περιοχή. Στη συνέχεια λειτουργεί ως υπόστρωμα για την σύνδεση των αιμοπεταλίων μέσω του υποδοχέα τους GPIIb₃ στην A1 περιοχή του παράγοντα και έτσι προωθείται η έναρξη του σχηματισμού θρόμβου [3]. Ωστόσο, λόγω της υψηλής ταχύτητας ροής του αίματος, η σύνδεση αυτή δεν είναι αρκετή για να ακινητοποιήσει πλήρως τα αιμοπετάλια. Η αρχική σύνδεση vWF-GPIIb₃ ενεργοποιεί τον υποδοχέα αIIbβ₃ της επιφάνειας των αιμοπεταλίων, ώστε να

συνδεθεί με την C1 περιοχή του vWF ολοκληρώνοντας την ακινητοποίηση των αιμοπεταλίων [4,5]. Στη συνέχεια, ο σύνδεσμος του $\alpha_{1\text{IB}}\beta_3$ με διάφορα άλλα μόρια συνδέσμων (vWF, ινωδογόνο κ.α.) οδηγεί στην συγκόλληση όλο και περισσότερων αιμοπεταλίων και την αύξηση του θρόμβου [5].

Εκτός από την δράση του αυτή, στην αρχική αιμόσταση ο vWF επιτελεί μια δεύτερη εξίσου σημαντική λειτουργία. Συνδέεται με τον FVIII προστατεύοντας τον από πρωτεολυτική καταστροφή στην κυκλοφορία, αυξάνοντας έτσι το χρόνο ημίσειας ζωής του από 2 σε 8-12 ώρες [6]. Σε καταστάσεις όπου παρατηρείται αύξηση του vWF όπως σε νεοπλασίες, σήψη, εγκυμοσύνη ή άσκηση, έχουμε παράλληλη αύξηση του FVIII [7].

Ο vWF και ο FVIII στην κυκλοφορία σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, με ένα μόριο FVIII να αντιστοιχεί σε κάθε μονομερές του vWF. Όταν το σύστημα πήξης ενεργοποιείται, η θρομβίνη σπάει το σύνδεσμο με αποτέλεσμα τη μετατροπή του FVIII στην ενεργοποιημένη μορφή του. Ο vWF αναστέλλει την αλληλεπίδραση του FVIII με πρωτεάσες του πηκτικού μηχανισμού, όπως ο παράγοντας IX, ο παράγοντας X και η πρωτεΐνη C, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την άκαιρη ενεργοποίηση του συστήματος πήξης.

A.3. Δομή του γονιδίου

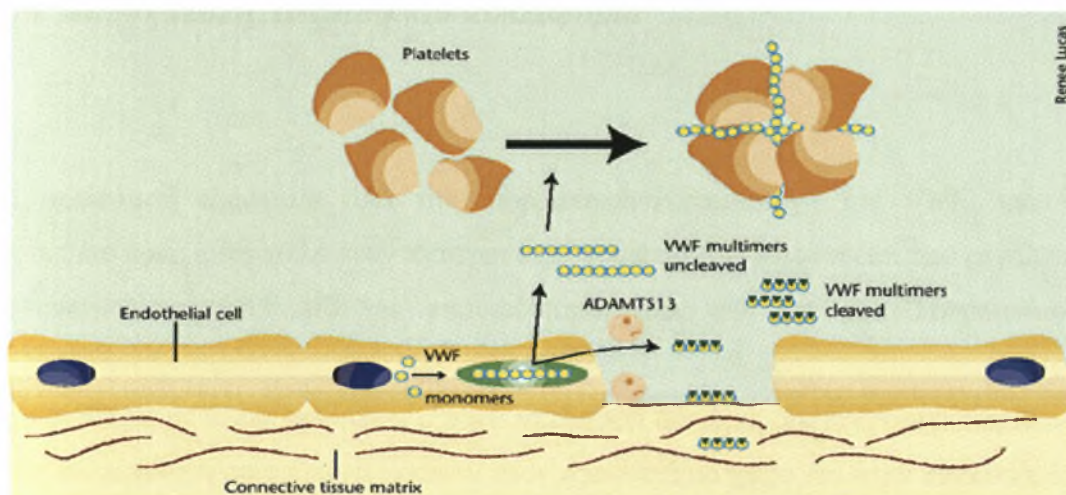
Ο vWF κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 [8,9]. Αποτελείται από 180 κιλοβάσεις και περιέχει 52 εξόνια [10]. Εκτός από τις A-περιοχές, το γονίδιο διαιρείται και σε άλλα τμήματα που κωδικοποιούν επαναλαμβανόμενες περιοχές που τείνουν να έχουν παρόμοιες αλληλουχίες συνόρων εξονίων- ιντρονίων. Στο χρωμόσωμα 22, υπάρχει μια περιοχή αντίγραφο της αλληλουχίας των εξονίων 23 έως 34 του γονιδίου του vWF [11,12]. Το ψευδογονίδιο αυτό αποτελείται από 21-29 κιλοβάσεις και κωδικοποιεί το 34% της αλληλουχίας του vWF περιέχοντας και τις A-περιοχές. Το γονίδιο του vWF και το ψευδογονίδιο έχουν απόκλιση μόνο 3,1%, κάτι που ίσως σημαίνει ότι το

ψευδογονίδιο προέκυψε πρόσφατα, ίσως 20-30 εκατομμύρια χρόνια πριν [12]. Από τότε που οι A-περιοχές αναγνωρίστηκαν στον vWF [13], ομόλογες A-περιοχές έχουν βρεθεί σε πολλές άλλες πρωτεΐνες όπως, την σερίνο-πρωτεάση συμπλήρωμα παράγοντα Β και το συγγενές συμπλήρωμα C2, δυο ομάδες ιντεγκρινών, τρεις υποδοχείς προσκόλλησης λευκοκυττάρων (Mac-1, LFA-1, p150) και δύο υποδοχείς κολλαγόνου και όλες τις τρεις αλυσίδες του κολλαγόνου τύπου VI. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστά 12 γονίδια που μαζί κωδικοποιούν τουλάχιστον 29 A-περιοχές σαν αυτές του vWF, συχνά μαζί με μη συγγενικά δομικά μοτίβα. Οι υψηλά επαναλαμβανόμενες δομές από τις οποίες αποτελείται το γονίδιο του vWF, δείχνουν ότι ο vWF έχει μια πολύπλοκη εξελικτική ιστορία που συνδέεται από επαναλαμβανόμενα τμήματα που έχουν προκύψει από διαιρέσεις γονιδίων, διπλασιασμούς και ανακατατάξεις εξονίων.

Cis-ρυθμιστικές περιοχές του αμέσως πρόημου προαγωγέα και του πρώτου εξονίου του γονιδίου του vWF και πολύπλοκα ρυθμιστικά μεταγραφικά μονοπάτια έχει βρεθεί πως είναι υπεύθυνα για την έκφραση του vWF στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια [11,14].

A.4. Βιοσύνθεση και πολυμερική δομή

Η σύνθεση του vWF γίνεται αποκλειστικά στα μεγακαρυοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Το αρχικό παράγωγο είναι ένα πολυπεπτίδιο αποτελούμενο από ένα πεπτίδιο, ένα προπεπτίδιο και μια ώριμη υποομάδα. Τα δυο τελευταία αποτελούν το πρόωρο μονομερές του vWF κατασκευάζεται από τέσσερις τύπους περιοχών που ορίζονται από συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων (domains), οι οποίες είναι ικανές για σύνδεση με μόρια συνδέσμων που απαντώνται στα αιμοπετάλια (GPIb_a και GPIIb/IIIa), το υπενδοθήλιο (κολλαγόνο) και το αίμα (FVIII).



Εικ.2. Τα Ultra Large vWF (ULvWF) αποτελούν τις πιο δραστικές μορφές του παράγοντα. Τα προπεπτίδια αποκόπτονται από τα πολυμερή, των οποίων οι ώριμες μορφές είναι πλέον έτοιμες προς έκκριση

Μετά την μεταγραφή στον πυρήνα των κυττάρων η πρόδρομη μορφή του vWF εξέρχεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου υπόκειται μια αρχική γλυκοζυλίωση, ενώ τα μονομερή ενώνονται σε διμερή μέσω δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των καρβοξυτελικών άκρων τους [15]. Τα διμερή μεταφέρονται στα σωμάτια Golgi όπου με τη μεσολάβηση των προπεπτιδίων σχηματίζονται τα πολυμερή. Τα μεγαλύτερα σε μέγεθος πολυμερή χαρακτηρίζονται ως Ultra Large vWF (ULvWF) και αποτελούν τις πιο δραστικές μορφές του παράγοντα. Στη συνέχεια τα προπεπτίδια αποκόπτονται από τα πολυμερή, των οποίων οι ώριμες μορφές είναι πλέον έτοιμες προς έκκριση (Εικ 2).

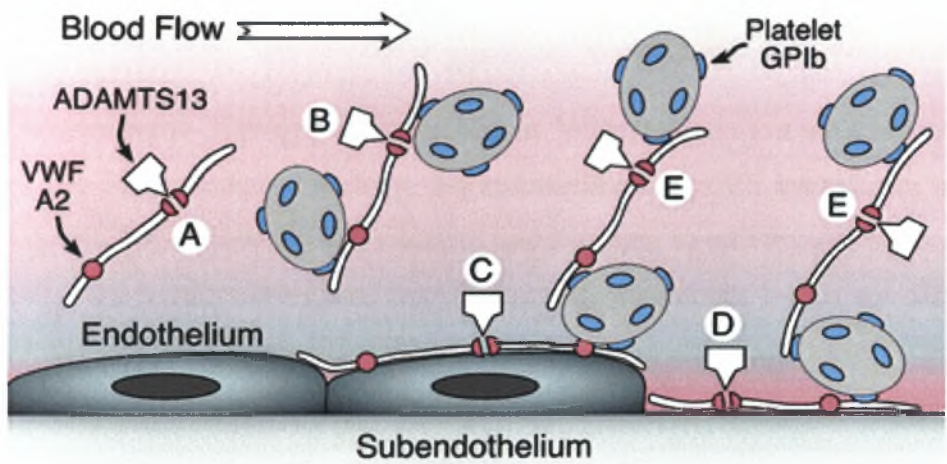
Η δράση του vWF είναι ευθέως ανάλογη του μεγέθους των πολυμερών του, αν και ο λόγος δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ίσως ο πολυμερισμός να αυξάνει τον αριθμό των περιοχών πρόσδεσης ανά μόριο vWF.

A.5. Αποθήκευση, έκκριση και κυκλοφορία

Η αιμόσταση εξαρτάται από την ισορροπημένη συμμετοχή του vWF, και η ισορροπία αυτή αντανακλά έναν ανταγωνισμό ανάμεσα στη βιοσύνθεση των μεγάλων πολυμερών του vWF και την αποικοδόμηση τους από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13.

Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες ο vWF ακολουθεί δύο δρόμους έκκρισης: ο πρώτος είναι μια σταθερή συνεχόμενη έκκριση στον εξωκυττάριο χώρο και στην κυκλοφορία (περίπου το 90% του παραγόμενου παράγοντα), ενώ ο δεύτερος συνίσταται σε αποθήκευση του παράγοντα σε εκκριτικά κοκκία -σωμάτια Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων ή στα α κοκκία των μεγακαρυοκυττάρων- με σκοπό την έκκριση σε δεύτερο χρόνο ως απάντηση σε ερεθίσματα, όπως είναι η θρομβίνη, η δεσμοπρεσσίνη και η διατμητική τάση [15,16]. Στα μεγακαρυοκύτταρα μόνο ο δεύτερος δρόμος είναι ενεργός και κατά συνέπεια ο vWF που κυκλοφορεί στο πλάσμα προέρχεται ουσιαστικά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [16].

Στην κυκλοφορία τα πολυμερή έχουν χρόνο ημίσειας ζωής 12-20 ώρες [17] και απομακρύνονται με μηχανισμό ανεξάρτητο του μεγέθους τους. Τα ULvWF των αποθηκευτικών κοκκίων ανιχνεύονται μικρότερα πολυμερή τα οποία περιέχουν και κατακερματισμένες ώριμες μορφές του vWF [18]. Το μέγεθος των πολυμερών στην κυκλοφορία εξαρτάται από την πρωτεόλυση τους από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13. Η ADAMTS-13 διασπά τον δεσμό ανάμεσα στην Tyr1605 και την Met1606 εσωτερικά της A2-περιοχής [20, 21]. Η διάσπαση αυτή δίνει δύο τμήματα, ένα 176 KDa και ένα 140KDa, και είναι υπεύθυνος για τα δορυφορικά τμήματα που βρίσκονται στα άκρα του vWF σε πηκτώματα πολυμερών [22, 23]. Στα αιμοπετάλια δεν εντοπίζονται αυτά τα προϊόντα αποικοδόμησης [23], κάτι που είναι σύμφωνο με την απομόνωση του vWF από την δράση της ADAMTS-13 στα αιμοπετάλια (Εικ.3).

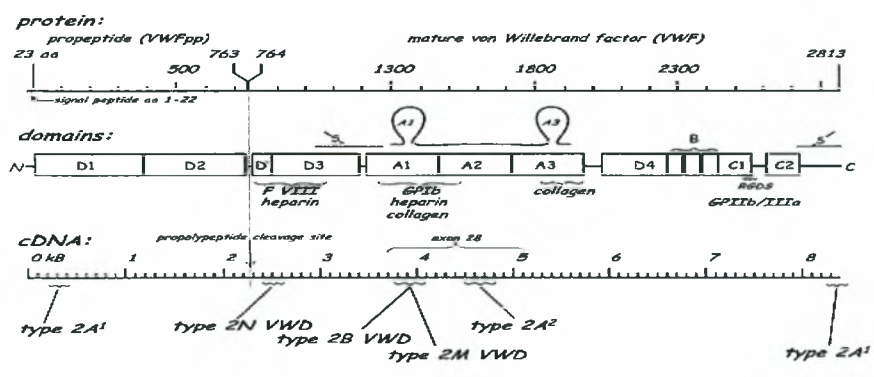


Εικ.3.

A.6. Μοριακή δομή

Το πρώτο προϊόν του γονιδίου του vWF, είναι μια πρωτεΐνη 2.813 αμινοξέων που αποτελείται από ένα πεπτιδιο-οδηγό 22 αμινοξέων, ένα μεγάλο προ-πεπτιδιο 741 αμινοξέων και τον κύριο μορίου vWF που αποτελείται από 2.050 αμινοξέα.

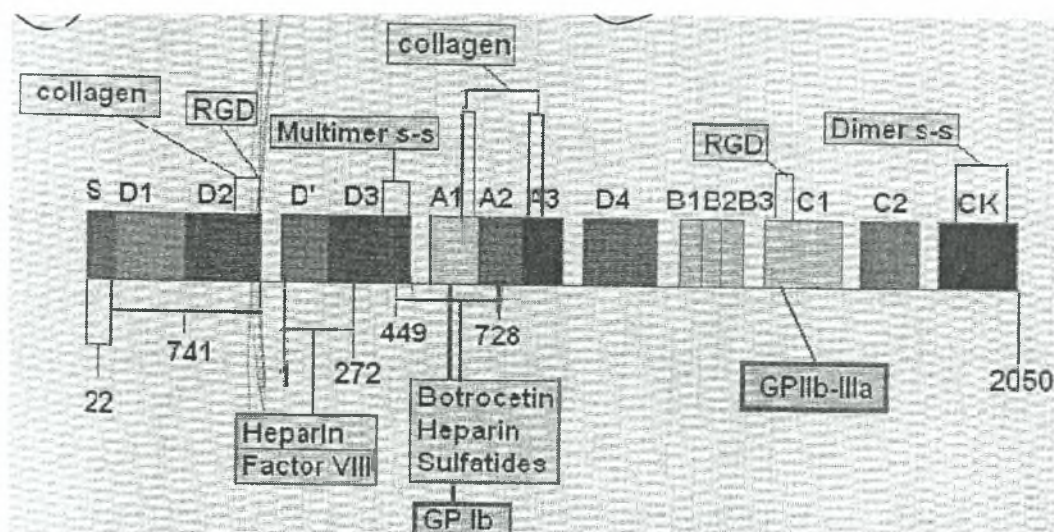
Σε μια αρίθμηση που ξεκινάει από το πρώτο αμινοξύ του πεπτιδιο-οδηγού, το 764 είναι το πρώτο αμινοξύ της ώριμης πρωτεΐνης. Διαφορετικές πρωτεΐνες αντιστοιχούν στους τέσσερις τύπους επαναλαμβανόμενων περιοχών (D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, A4, D4, B, C1, C2) του cDNA, και είναι υπεύθυνες για διαφορετικά χαρακτηριστικά δέσμευσης του μορίου [11, 24] (Εικ.4).



Εικ.4 Το πρώτο προϊόν του γονιδίου του vWF, είναι μια πρωτεΐνη 2.813 αμινοξέων. Διαφορετικές πρωτεΐνες αντιστοιχούν στους τέσσερις τύπους επαναλαμβανόμενων περιοχών του cDNA, και είναι υπεύθυνες για διαφορετικά χαρακτηριστικά δέσμευσης του μορίου

A.7. Σχέση δομής λειτουργίας

Οι τέσσερις D- περιοχές προσεγγίζουν τα 360 κατάλοιπα και κάθε μία περιέχει από 32 έως 36 κατάλοιπα κυστείνης. Το προπεπτίδιο του vWF απαρτίζεται από δύο D-περιοχές, την D1 και την D2, και είναι ακριβώς πριν το αμινοτελικό άκρο του ώριμου vWF, που περιέχει ένα μέρος της D'-περιοχής (κατάλοιπα 1-102) και ολόκληρη την D3-περιοχή (κατάλοιπα 103-478).



Εικ.5. Διαφορετικές πρωτεΐνες αντιστοιχούν στους τέσσερις τύπους επαναλαμβανόμενων περιοχών του cDNA, και είναι υπεύθυνες για διαφορετικά χαρακτηριστικά δέσμευσης του μορίου

Οι D-περιοχές εμφανίζουν σημαντικές αλληλουχικές ομοιότητες μεταξύ τους, και η τοποθέτηση των περισσότερων καταλοίπων κυστείνης είναι συντηρημένη, κάτι που υποδεικνύει ότι η τριτοταγής δομή των περιοχών αυτών ίσως είναι η ίδια. Τα κατάλοιπα Cys στην D3-περιοχή φαίνεται να συμμετέχουν σε έναν διαμοριακό δισουλφιδικό δεσμό απαραίτητο για την διαμόρφωση των πολυμερών, ενώ αυτά των D1, D', D2, D4 περιοχών εμπλέκονται αποκλειστικά σε ενδομοριακούς δεσμούς [25].

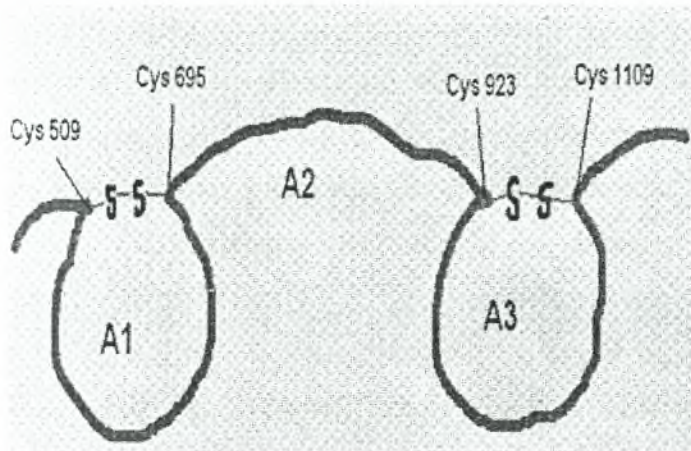
Το προπεπτίδιο του vWF φαίνεται να απαιτείται για την φυσιολογική διαμόρφωση των πολυμερών.

Σε μελέτες, διαγραφή του προπεπτιδίου του vWF φαίνεται να εμποδίζει τον πολυμερισμό [26, 27, 28], ενώ μεταλλάξεις που οδηγούν σε κατάργηση της αποκοπής του προπεπτιδίου όχι [26, 28]. Αυτή η παρατήρηση, δείχνει ότι το προπεπτίδιο του vWF μπορεί άμεσα να καταλύσει τον σχηματισμό δισουλφιδικών στα πολυμερή του vWF [26, 29].

Οι επαναλαμβανόμενες Α-περιοχές είναι εσωτερικά μοτίβα τριπλετών αποτελούμενα από τα κατάλοιπα 497-1111 του ώριμου vWF. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μοτίβα σαν τις Α-περιοχές είναι παρόντα και σε άλλες πρωτεΐνες, όπως κάποιες ιντεγκρίνες (Mac-1, LFA-1, p150,95, VLA-2), ή σε συστατικά συμπλόκων όπως διαφόρων τύπων κολλαγόνου ή του παράγοντα Β. Μεταξύ των πρωτεϊνών που περιέχουν τουλάχιστον μια Α-περιοχή, είναι η VLA-2, η Α-περιοχή της οποίας είναι μέρος ενός ετεροδιμερούς συμπλόκου (γνωστό στα αιμοπετάλια ως GP Ia-ha) που αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο. Επιπροσθέτως, μερικά από τα πολλά αντίγραφα της Α-περιοχής στην α3(VI) αλυσίδα του κολλαγόνου τύπου VI μπορεί επίσης να συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με άλλα είδη κολλαγόνου. Σύμφωνα με αυτές τις ομοιότητες στο δέσιμο των προσδετών, οι Α-περιοχές σε διάφορες πρωτεΐνες σαφώς εμπλέκονται σε εξειδικευμένες αναγνωρίσεις [25].

Η Α1-περιοχή του vWF περιέχει έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys509-Cys695 που δημιουργεί μια θηλιά 185 καταλοίπων. Στην θηλιά αυτή περιέχονται θέσεις δέσμησης για διάφορα μακρομόρια, συμπεριλαμβανομένου και του υποδοχέα GPIb των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα η περιοχή ανάμεσα στα κατάλοιπα 559-566 (β3 περιοχή) και στα κατάλοιπα 594-603 (α3 έλικα), φαίνεται να είναι αυτές που αλληλεπιδρούν με εξειδικευμένα κατάλοιπα του υποδοχέα GPIb. Σε διάλυμα, ο ανθρώπινος vWF δεν δεσμεύεται αυθόρμητα στον GPIb. Αυτή η αντίδραση, προωθείται φυσιολογικά από την δέσμηση του vWF στο υπενδοθηλιακό συνδετικό ιστό [30], ενώ *in vitro*, η δέσμηση του vWF με τον GPIb μπορεί να προαχθεί με το αντιβιοτικό ristocetin [26]. Η προωθούμενη από το ristocetin συνάθροιση των αιμοπεταλίων αποτελεί και την βάση πολλών κλινικών δοκιμών της λειτουργίας του vWF [31]. Διακριτά τμήματα της Α1-περιοχής μεσολαβούν στην προωθούμενη από το ristocetin δέσμηση του vWF με τον GPIb των αιμοπεταλίων [32]. Το δηλητήριο πολλών οχιών του γένους Bothrops, ειδικά οι Bothrops jararaea, περιέχει μια πρωτεΐνη που ονομάζεται “bothrocetin” που επίσης προωθεί την αλληλεπίδραση του vWF με τον GPIb [33]. Η “bothrocetin” δένεται άμεσα στην Α1-περιοχή μέσα στην θηλιά που δημιουργείται από τις Cys509- Cys695 [34]. Αυτή η ίδια περιοχή περιέχει διακριτές θέσεις δέσμησης για την ηπαρίνη [26], τα σουλφίδια [35, 36] και το κολλαγόνο [28]. Παρά τις κάποιες δομικές ομοιότητες, η ηπαρίνη και τα σουλφίδια δεν δεσμεύονται συναγωνιστικά στον vWF [35]. Μια δεύτερη θέση δέσμησης κολλαγόνου είναι τοποθετημένη στην Α3-περιοχή [26]. Η Α3-περιοχή περιέχει επίσης έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys923-Cys1109,

που δημιουργεί μια θηλιά ίδιου μήκους με αυτής της A1-περιοχής [37]. Η A2-περιοχή του vWF είναι παρόμοια με τις A1 και A2 περιοχές σε πρωτοταγές αλληλουχικό επίπεδο αλλά στερείται της διατηρημένης δισουλφιδικής θηλιάς (Εικ.6).



Εικ.6. Η περιοχές A1 και η A3 περιέχουν από έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των N και C τελικών τους άκρων που δημιουργούν από μια θηλιά. Η A2-περιοχή του vWF είναι παρόμοια με τις A1 και A2 περιοχές σε πρωτοταγές αλληλουχικό επίπεδο αλλά στερείται της διατηρημένης δισουλφιδικής θηλιάς

Μεταλλαξιγένεση στον vWF δείχνει ότι μέρος της καρβοξυτελικής έλικας της A2-περιοχής, μακριά από το δεσμό Tyr- Met, είναι υπεύθυνο για την γρήγορη πέψη από την ADAMTS-13 [38]. Έτσι, οι πλούσιες σε Cys περιοχές της ADAMTS-13 ίσως αλληλεπιδρούν με μια βοηθητική θέση δέσμησης της A2-περιοχής του vWF. Η ADAMTS-13 φαίνεται επίσης να ρυθμίζεται από δομές του vWF έξω από την A2-περιοχή. Για παράδειγμα, η A1-περιοχή αναστέλλει την πέψη της παρακείμενης A2-περιοχής πολλών γενετικώς ανασυνδιασμένων υποστρωμάτων της ADAMTS-13, ενώ η αναστολή δεν πραγματοποιείται όταν η ηπαρίνη ή ένα κομμάτι του GPIIb των αιμοπεταλίων δεσμεύεται στην A1-περιοχή [39]. Παρόμοια ρυθμιστική λειτουργία έχει προταθεί και για την A3-περιοχή του vWF και των CUB-περιοχών της ADAMTS-13 [40, 41, 42]. Αυτά τα δεδομένα, προτείνουν ότι η δέσμηση του vWF στα αιμοπετάλια ίσως προάγει την πέψη της A2-περιοχής από την ADAMTS-13, προσθέτοντας στην ανατροφοδοτική αναστολή του vWF που στηρίζεται στην θρόμβωση αιμοπεταλίων. Επίσης η A2-περιοχή αλληλεπιδρά με την A1, εμποδίζοντας την να προσδεθεί στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και αναστέλλει έτσι την πήξη του αίματος.

Οι C-περιοχές του vWF έχουν παρόμοια αλληλουχία με την θρομβοσπονδίνη και τα α-προκολλαγόνα τύπου I και III. Οι θέσεις δέσμησης στον vWF του GPIIb-IIIa

συμπλόκου των δραστικών αιμοπεταλίων έχει τοποθετηθεί στην αλληλουχία Arg-Gly-Asp-Ser(1747), δίπλα στο καρβοξυτελικό άκρο της C1-περιοχής [26]. Η αλληλουχία Arg-Gly-Asp υπολογίζεται ως το σήμα της θέσης αναγνώρισης ή υποδοχέας προσκόλλησης της υπεροικογένειας των ιντεγκρινών, μέλη της οποίας μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με την θρομβοσπονδίνη και το κολλαγόνο και απαντώνται σε πρωτεΐνες που επίσης δεσμεύονται στο GPIIb-IIIa. Αρκετές άλλες ιντεγκρίνες εκτός του GPIIb-IIIa, περιλαμβάνουν και υποδοχείς που αναγνωρίζουν την αλληλουχία Arg-Gly-Asp μέσω προσδετών τους, όμως δεν δένονται στον vWF. Αυτή η αλληλεπίδραση ευθύνεται για την δραστικότητα προσκόλλησης κυττάρων των πρωτεϊνών αυτών [43].

Η μόνη πληροφορία για τις λειτουργίες των B-περιοχών είναι ότι μια κατάλληλη διαμόρφωση της B2-περιοχής που εξαρτάται κάποια κρίσιμα κατάλοιπα Cys, ίσως είναι υπεύθυνη για την φυσιολογική πρωτεολυτική επεξεργασία των πολυμερών του vWF από την ADAMTS-13, δηλαδή την πέψη της Tyr1605-Met2606 στην A2-περιοχή. Μετάλλαξη των Cys αυτών σε Phe στη θέση 2362 σχετίζεται με εναλλακτικά πολυμερή και ένα μη φυσιολογικό πρωτεολυτικό μονοπάτι [44].

A.8. Μοριακή δομή των A-περιοχών

Οι A1, A2 και A3 περιοχές είναι το κλειδί για τις μακρομοριακές αλληλεπιδράσεις του vWF.

Η A1-περιοχή αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 497-716 του ώριμου vWF και το αμινοτελικό άκρο της συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο της μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού ανάμεσα στις Cys509 και Cys695. Η θηλιά αυτή εμπλέκεται στην δέσμευση του vWF στον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα Ib των αιμοπεταλίων (GPIb). Η δέσμευση αυτή όμως δεν γίνεται αυθόρμητα, διαμορφωτικές αλλαγές φαίνεται να αποκαλύπτονται στις περιοχές του vWF μετά την δέσμευση του, μέσω άλλων τμημάτων του, στο κολλαγόνο. Η A1-περιοχή του vWF περιέχει επίσης διακριτές θέσεις δέσμευσης για την ηπαρίνη, τα σουλφίδια και το κολλαγόνο. Η

δέσμευση του vWF στο κολλαγόνο επιτρέπει την αλληλεπίδραση με τον GPIb, ενώ η δέσμευση του vWF με την ηπαρίνη την αναστέλλει.

Η A2-περιοχή του vWF αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 717-909 και δεν περιέχει δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό της άκρο. Περιέχει μια φυσιολογική θέση πέψης μεταξύ των Tyr842 και Met843 [46, 47] την οποία αναγνωρίζει η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13 και συνδέεται με την φυσιολογική ανακύκλωση του vWF.

Η A3-περιοχή του vWF αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 910-1111 και το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της συνδέονται με έναν δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys923 και Cys1109 [48]. Αυτή περιέχει την κύρια θέση δέσμευσης για τους διάφορους τύπους κολλαγόνου [49, 50].

A.9. Στόχος Εργασίας

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν να κλωνοποιηθούν, να υπερεκφραστούν και να καθαριστούν οι A1 και A2 επικράτειες του παράγοντα πήξης του αίματος vWF, ώστε να μελετηθεί η αλληλεπίδρασή τους. Από μελέτες φαίνεται πως η A1-επικράτεια αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα GPIb των αιμοπεταλίων προωθώντας την πήξη του αίματος. Αντίθετα η A2-επικράτεια φαίνεται να προσδένεται στην A1 εμποδίζοντας την να προσδεθεί στον GPIb και άρα έχει ανασταλτική δράση στην πήξη του αίματος. Μαθαίνοντας λοιπόν περισσότερα για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF, θα ανοίξουν νέοι δρόμοι για την ανάπτυξη καινούριων αντιθρομβωτικών μηχανισμών που θα δρουν άμεσα εναντίον του σχηματισμού του συμπλόκου A1-GPIb. Έτσι αφού η A2 έχει δραστηριότητα αναστολέα του παραπάνω συμπλόκου, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα αντιθρομβωτικό μέσο, αφού μπορεί να παραχθεί εύκολα και γρήγορα από βακτήρια ή φυτά μιας και δεν απαιτεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις για την ανασταλτική της δράση. Επίσης γνωρίζοντας τον τρόπο αλληλεπίδρασης των δύο περιοχών A1 και A2, θα μπορούσαν να σχεδιαστούν μόρια που μιμούμενα την A2 πρωτεΐνη, θα συνδέονταν στην A1 εμποδίζοντας την πρόσδεσή της στον GPIb και άρα την πήξη του αίματος. Έτσι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαλυτοί αντιθρομβωτικοί παράγοντες.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. Υλικά

B.1.1. Χημικές ουσίες

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν την απαιτούμενη αναλυτική καθαρότητα και αγοράστηκαν από τις ακόλουθες εταιρίες:

Fluka (Seelzer, Germany), Applichem GmbH (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Riedel-de Haen (Seelzer, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), New England Biolabs (Hertfordshire, U.K.), BioRad (Calif, USA), Macherey-Nagel GmbH & Co (Duren, Germany), Invitrogen (Groningen, Nederland).

B.1.2. Κύτταρα

Strataclone™ Solopack Competent Cells

Πρόκειται για κύτταρα DH5a που παρέχονται από το Strataclone PCR Cloning Kit της Stratagene και διαθέτουν την ικανότητα έκφρασης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία απαιτείται για την κυκλοποίηση των γραμμικών μορίων DNA που παράγονται κατά την διάρκεια του καταλυόμενου από την τοποισομεράση I ligation. Επίσης, τα κύτταρα αυτά υποστηρίζουν την επιλογή βάσει των μπλε και άσπρων αποικιών όταν μετασχηματιστούν με το πλασμίδιο pSCA, το οποίο παρέχεται από το ίδιο kit και εξασφαλίζουν μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης.

BL21

Πρόκειται για επιδεκτικά κύτταρα E. Coli που περιέχουν πλασμίδια που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Μετασχηματίζονται με τον ανασυνδυασμένο φορέα p_{et49b} και επιτρέπεται η έκφραση μεγάλων ποσοτήτων της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Παρασκευάζονται μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- 100ml καλλιέργειας των κυττάρων αυτών μοιράζονται σε δύο αποστειρωμένα και παγωμένα falcons των 10ml και τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm στους 4 °C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται
- Σε κάθε φυγοκεντρικό σωλήνα προστίθενται 30ml διαλύματος MgCl₂-CaCl₂ (80mM/20mM) και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- Το περιεχόμενο των φυγοκεντρικών σωλήνων φυγοκεντρείται στις 4.000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C. Και πάλι απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Σε κάθε φυγοκεντρικό σωλήνα προστίθενται 2ml παγωμένου διαλύματος CaCl₂ 0.1M, αναδιαλύεται το ίζημα και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.
- Εισάγονται 70μl DMSO σε κάθε falcon και ακολουθεί ανάδευση. Έπειτα αφήνονται για 15 λεπτά στον πάγο.
- Προστίθενται άλλα 70μl DMSO και μετά από ήπια ανάδευση μοιράζεται η ποσότητα των κυττάρων (200μl ανά σωλήνα 1.5ml) και τοποθετούνται προς φύλαξη στους -80 °C.

Rosetta

Πρόκειται για στέλεχος κυττάρων E. Coli που περιέχουν πλασμίδια που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και χλωραμφαινικόλη. Το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε ότι αφορά στην έκφραση ανασυνδυασμένων ανθρώπινων πρωτεϊνών. Η ιδιότητα αυτή του στελέχους αυτού οφείλεται σε δύο χαρακτηριστικά του:

- Φέρει ένα αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του lacUV5 υποκινητή. Έτσι μπορεί να παράγει

πρωτεΐνες που οι κωδικές του αλληλουχίες έχουν κλωνοποιηθεί σε φορείς έκφρασης *pet*, όπου η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης γίνεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της RNA πολυμεράσης του φάγου T7.

- Φέρει το πλασμίδιο «pRARE» το οποίο φέρει γονίδια επιλεγμένων tRNAs τα οποία αντιστοιχούν σε κωδικόνια τα οποία αν και είναι συχνά στις ανθρώπινες πρωτεΐνες, είναι σχετικά σπάνιες στα βακτηριακά γονίδια. Έτσι η παρουσία του pRARE στα κύτταρα Rossetta τα καθιστούν τα πλέον ικανά να παράγουν ανασυνδυασμένες ανθρώπινες πρωτεΐνες σε πολύ μεγαλύτερα ποσά σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο του είδους.

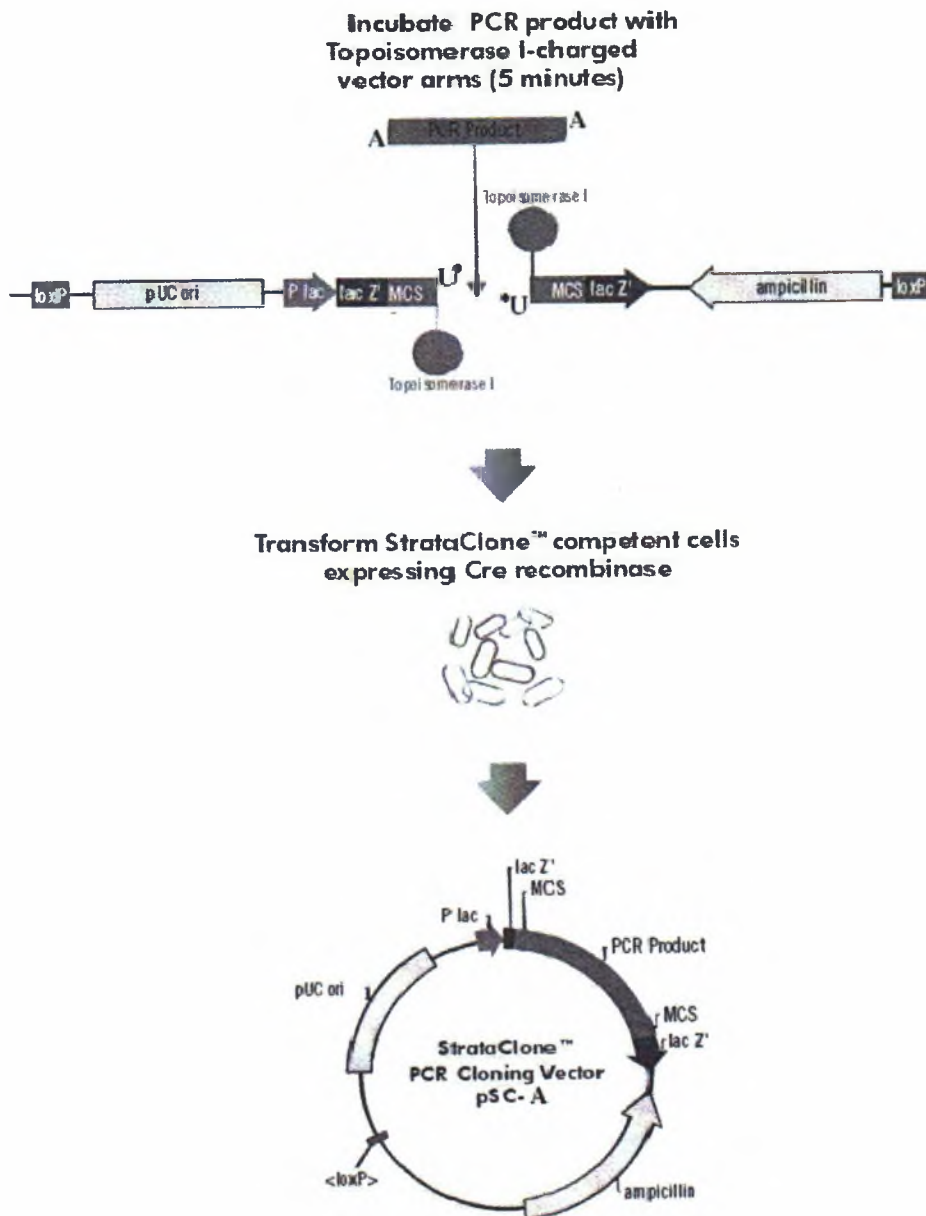
B.1.3. Πλασμυδιακοί φορείς

pSC-A (Stratagene)

Πρόκειται για πλασμυδιακό φορέα μεγέθους 3.5kb που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση γονιδίων. Η διαδικασία της κλωνοποίησης με τον συγκεκριμένο φορέα εκμεταλλεύεται τις συνδυασμένες δράσεις της τοποισομεράσης I από τον ιό Vaccinia και της ρεκομπινάσης Cre από τον βακτηριοφάγο P1. In vivo, η τοποισομεράση I συμμετάχει στην αντιγραφή του DNA χαλαρώνοντας και επανασυνδέοντας τις έλικες του DNA. Η ρεκομπινάση Cre καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ των δύο loxP αλληλουχιών αναγνώρισης.

Το μίγμα φορέων που παρέχεται με το PCR cloning kit της Stratagene περιέχει βραχίονες DNA δύο ειδών, καθένας από τους οποίους στο ένα άκρο του φέρει μια τοποισομεράση I και στο άλλο μια περιοχή αναγνώρισης loxP. Τα φορτισμένα με την τοποισομεράση άκρα διαθέτουν μια προεξοχή τροποποιημένης ουριδίνης (U*). Με αυτόν τον τρόπο ενισχυμένα με PCR προϊόντα τα οποία φέρουν 3'- A προεξοχές μπορούν να ενωθούν αποτελεσματικά με τους παραπάνω βραχίονες μέσω σχηματισμού δεσμών A-U*, ακολουθούμενου από την σύνδεση των αλυσίδων DNA με την βοήθεια της τοποισομεράσης I. Το γραμμικό μόριο DNA που προκύπτει, στην συνέχεια μετασχηματίζει επιδεικτικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα σύνθεσης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία με την σειρά της ανασυνδυάζει τις περιοχές loxP στα

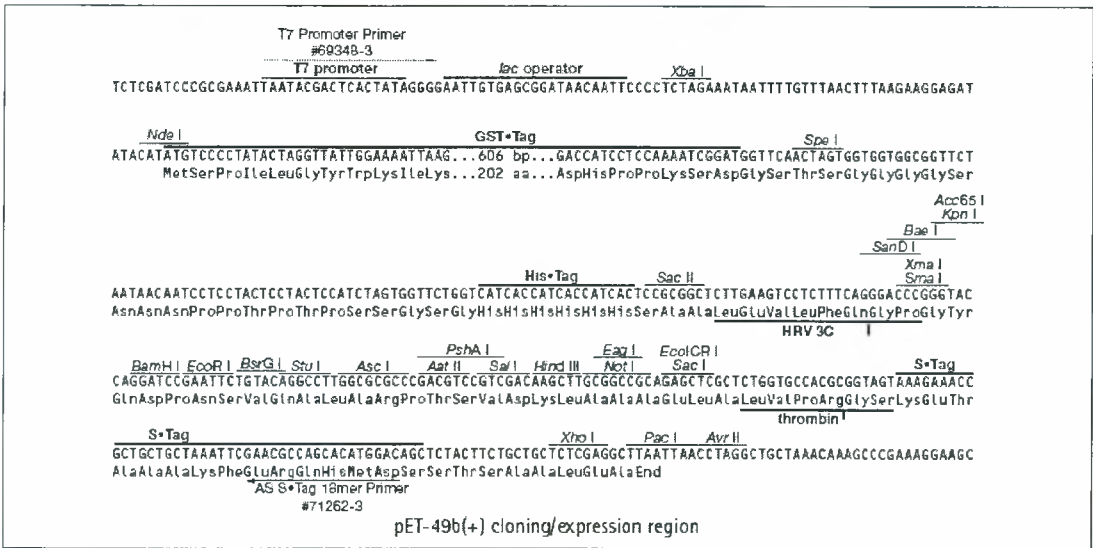
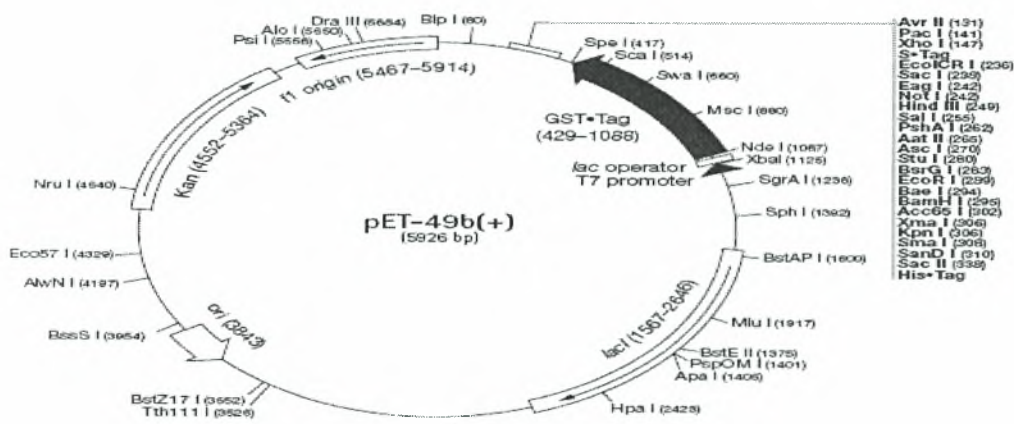
άκρα του γραμμικού μορίου. Έτσι, σχηματίζεται ο κυκλικός φορέας pSC-A που έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο παρουσία αμπικιλίνης και περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ) προκειμένου να είναι δυνατή η επιλογή με white/blue screening.



Εικ.7. Σύνοψη της μεθόδου στην οποία στηρίζεται ο μετασχηματισμός με την βοήθεια του Strataclone kit της Strtagene

pET-49b

Ο φορέας αυτός έχει σχεδιαστεί για την κλωνοποίηση και υψηλού επιπέδου έκφραση πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με μια GST ουρά η οποία μπορεί να κοπεί με την πρωτεάση 3C. Η GST ουρά χρησιμοποιείται ως συνέχεια πρωτεϊνών που επιλέγεται να εκφραστούν σε κύτταρα E. Coli, και έχει ως στόχο την αύξηση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών στόχων και βέβαια τον καθαρισμό τους με ακινητοποιημένη γλουταθειόνη και την τελική έκλουσή τους με ανηγμένη γλουταθειόνη. Ο θέση ένθεσης είναι επίσης διαθέσιμη για πρωτείνες εμπλουτισμένες με ουρά His στο N-τελικό τους άκρο. Το πλασμίδιο περιέχει επίσης έναν ισχυρό προαγωγέα T7lac, την κωδική αλληλουχία για την πέψη από την πρωτεάση 3C και την μετακίνηση έτσι των N-τελικών συνδεδεμένων ουρών και μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης που περιέχει διάφορες θέσεις κοπής από ένζυμα περιορισμού.



Εικ.8. Χάρτης περιορισμού του πλασμιδιακού φορέα pET-49b

B.1.4. Θρεπτικά μέσα

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) pH 7.2

<i>Αντιδραστηρίο</i>	<i>Τυπική αναλογία (g/l)</i>
Tryptone	10.0
Yeast extract	5.0

Για τελικό όγκο θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

LB Broth 25g

Απιονισμένο H₂O

- Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar) pH 7.2

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τυπική αναλογία (g/l)</i>
Tryptone	10.0
Yeast extract	5.0
Άγαρ	15.0

Για τελικό όγκο στερεού θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

LB agar 40g

Απιονισμένο H₂O

- SOC medium (υγρό θρεπτικό μέσο) pH 7 για τελικό όγκο 100ml

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tryptone	2g
Yeast extract	0.5g
NaCl 1M	1ml
KCl 1M	0.25ml
δ/μα Mg ²⁺ 2M *	1ml
Γλυκόζη 2M	1ml

*20.33g MgCl₂-H₂O + 24.65g MgSO₄

B.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (50x) για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tris base	242g
Οξικό Οξύ	57.1ml
EDTA 0.5M pH 8	100ml
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι 1L

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (50x) για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Trizma base	54g
Βορικό οξύ	27.5g
EDTA 0.5M pH 8	20ml
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι 1L

- ❖ Running Buffer (10x) για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tris base pH 8.3	15g
Γλυκίνη	72g
SDS	5g
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι 1L

- ❖ Transfer Buffer για την μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tris base pH 8.3	3.03g
Γλυκίνη	14.4g
Μεθανόλη	200ml
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι 1L

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα loading buffer (6x) για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Bromophenol Blue	0.09%
Xylene Cyanol	0.09%
Γλυκερόλη	60%
EDTA	60mM

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (2x) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tris HCL pH 6.8	50mM
SDS	2%
Bromophenol Blue	0.1%
Γλυκερόλη	10%

B.2. Μέθοδοι

B.2.1. Απομόνωση RNA από ενδοθηλιακά κύτταρα

Μετά τη συλλογή των ενδοθηλιακών κυττάρων και την κατάλληλη συντήρησή τους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, το πρώτο στάδιο της μελέτης περιλαμβάνει την απομόνωση RNA από τους ιστούς. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για τον σκοπό αυτό είναι αυτή της σταδιακής εκχύλισης του RNA με οργανικούς διαλύτες και περιλαμβάνει συνολικά 6 στάδια:

1. Λύση κυττάρων: προκειμένου να επιτευχθεί λύση των κυττάρων του ομογενοποιημένου ιστού, προστίθεται αρχικά στα κύτταρα συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος μετουσίωσης (Solution D). Προστίθεται αρχικά 500 μl διαλύματος μετουσίωσης, ενώ ακολουθεί διαδοχικά προσθήκη: 50μl 2M οξικού νατρίου (pH 4.0), 500μl όξινης φαινόλης (pH 4.5) και 100μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Μετά τις παραπάνω προσθήκες, το δείγμα υποβάλλεται σε έντονη ανακίνηση (Vortex) για 10-20 δευτερόλεπτα, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στους $0-4^{\circ}\text{C}$ (πάγο) για 15 λεπτά. Για τον πλήρη διαχωρισμό των φάσεων, το δείγμα στην συνέχεια φυγοκεντρείται στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Εκχύλιση RNA: μετά την παραπάνω φυγοκέντρωση, εντοπίζονται δύο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκεείμενη στοιβάδα) συλλέγεται προσεκτικά με πλαστική πιπέττα Pasteur και τοποθετούνται σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000μl). Ακολουθεί επανεκχύλιση του RNA με προσθήκη 500μl όξινης φαινόλης (pH 4.5) και 100μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Στη συνέχεια ακολουθεί έντονη ανακίνηση (Vortex) και ακολούθως φυγοκέντρωση στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4°C .
3. Απομάκρυνση φαινόλης: μετά την παραπάνω φυγοκέντρωση, εντοπίζονται δύο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκεείμενη στοιβάδα) συλλέγεται προσεκτικά με πλαστική πιπέττα Pasteur και τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf (100-1000 μl). Για την απομάκρυνση

της φαινόλης ακολουθεί προσθήκη 100μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Ακολουθεί έντονη ανακίνηση (Vortex) για 15 λεπτά και αμέσως μετά φυγοκέντρηση στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.

4. Κατακρήμνιση RNA: μετά τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου σταδίου, σε κάθε σωληνάριο εντοπίζονται δύο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκείμενη στοιβάδα) συλλέγεται προσεκτικά με πλαστική πιπέττα Pasteur και τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf (100-1000μl). Με στόχο την αφυδάτωση και κατακρήμνιση του RNA, ακολουθεί προσθήκη 250μl ισοπροπανόλης. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται στους -20°C για 20 λεπτά και φυγοκεντρώνονται στις 12500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση, πραγματοποιείται κατακρήμνιση του RNA στη βάση του σωληναρίου, αφού η ισοπροπανόλη απομακρυνθεί προσεκτικά με απόχυση. Έχοντας την όψη ιζήματος (pellet), το RNA στη βάση του σωληναρίου «ξεπλένεται» με 500μl αιθανόλης 70%. Ακολουθεί ήπια ανάδευση στο ρότορα για 5 λεπτά, και έπειτα φυγοκέντρηση στις 12500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση, τα RNA απομονώνεται με απόχυση της υπερκείμενης αιθανόλης και στέγνωμα στον αέρα.
5. Διάλυση και διατήρηση δειγμάτων RNA: μετά την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης, το προκύπτων RNA διαλύεται σε 50μl ddH₂O, και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

B.2.2. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων

Μετά την απομόνωση του RNA, ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο της φασματοφωτομέτρησης. Αρχικά πραγματοποιείται μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου με ddH₂O και στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) του RNA, μετά από αραιώση ποσού δείγματος σε διάλυμα προσδιορισμού συγκέντρωσης (Concentration Buffer). Τυπικά οι αραιώσεις που

χρησιμοποιούνται είναι 20μl RNA σε 900μl διαλύματος προσδιορισμού συγκέντρωσης.

Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρείται σε μήκη κύματος 260nm και 280nm, ενώ ο λόγος OD_{260}/OD_{280} καταγράφεται για τον προσδιορισμό της καθαρότητας των δειγμάτων. Από την οπτική πυκνότητα στα 260nm υπολογίζεται η συγκέντρωση του RNA σύμφωνα με τον τύπο: $1OD = 40\mu g/ml$. Στη συνέχεια, με βάση τις καταγεγραμμένες τιμές του λόγου OD_{260}/OD_{280} του φασματοφωτομέτρου, προσδιορίζεται η καθαρότητα του.

B.2.3.RT-PCR για δημιουργία cDNA

Μετά την απομόνωση του RNA του προηγούμενου σταδίου, ακολουθεί η σύνθεση του αντίστοιχου cDNA με τη μέθοδο PCR της Αντίστροφης Μεταγραφάσης (RT-PCR). Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον σκοπό αυτό είναι αυτό της SuperscriptTM III RNA H⁻ Reverse Transcriptase, ενώ τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθείται είναι αυτά του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρείας (InvitrogenTM). Το μίγμα της RT-PCR συνολικού όγκου 13μl χρησιμοποιείται για 1ng-5μg ολικού RNA (ή 1ng-500ng mRNA), και περιείχε:

Oligo dTs	: 1 μl
mRNA	: 2 μl
10mM dNTPs	: 1 μl
ddH ₂ O	: 9 μl
Σύνολο	: 13 μl

Μετά την ανάμειξη των παραπάνω συστατικών, το μίγμα επωάζεται στους 65°C για 5 λεπτά ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη του RNA.

Μετά την παραπάνω επώαση, το μίγμα μεταφέρεται γρήγορα σε πάγο όπου διατηρείται για 5 λεπτά, ώστε να ακολουθήσει στη συνέχεια η προσθήκη των ενζύμων.

Το ρυθμιστικό διάλυμα των ενζύμων που χρησιμοποιείται και που προστίθεται σε κάθε δείγμα, περιεχει:

5X Ρυθμιστικό Διάλυμα Σύνθεσης cDNA:	2 μl
0,1 M DTT:	3 μl
RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl):	1 μl
Superscript™ II (200 U/μl):	1 μl
Σύνολο:	7 μl

Μετά την προσθήκη των παραπάνω συστατικών, ακολουθεί ελαφρά ανακίνηση (πιπετάρισμα) και επώαση στους 55°C για 50 λεπτά. Τέλος, ο τερματισμός της δράσης των ενζύμων πραγματοποιείται με επώαση του μίγματος στους 70°C για 15 λεπτά.

Το προκύπτων δείγμα cDNA συνολικού όγκου 20μl φυλάσσεται στους -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί για τη μεγέθυνση των περιοχών A1 και A2 του *vWF*.

B.2.4. PCR για ενίσχυση των επικρατειών A1 και A2 του παράγοντα πήξης του αίματος von Willebrand

● Προετοιμασία μιγμάτων PCR: για τις PCR μεγεθύνσεις των περιοχών A1 και A2 του *vWF* χρησιμοποιήθηκαν 2μl cDNA για την κάθε μία. Κάθε σωληνάριο PCR και σε συνολικό όγκο 20μl περιείχε:

10x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	2μl
25Mm dNTPs	0,4μl
Taq Πολυμεράση	1μl
forward primer (100 pmol/μl)	1 μl
reversed primer (100 pmol/μl)	1 μl
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	12,6μl
cDNA	2μl
Σύνολο	20μ

Το ζεύγος εκκινητών (forward και reversed primers) που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεγέθυνση της A1-περιοχής του vWF, είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

Forward primer : 5'-CTAGGATCCGGACCTGGTCTTCCTGCTGGAT -3'

Reversed primer: 5'-ACAAAGCTTTCAGATCTCGTCCCTTTGCTGCTCC -3'

Το ζεύγος εκκινητών (forward και reversed primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την μεγέθυνση της A2-περιοχής του vWF είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

forward primer : 5'- CCAGGA TCCCACCATGGGGCCCAAGAGG -3'

reversed primer: 5'- CGCAAGCTTCTACTGCAGCACCAGGTC-3'

● Συνθήκες Θερμικής Έναρξης PCR: Οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι PCR για την μεγέθυνση των περιοχών A1 και A2 του vWF, είναι οι ακόλουθες:

Για την A1-περιοχή

1. Μετουσίωση (Denaturation): 94 °C για 4 min
2. Μετουσίωση (Denaturation): 94 °C για 45 sec
3. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 68 °C για 45 sec
4. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72 °C για 1,5 min
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη 39 κύκλων.
6. Διακοπή δράσης ενζύμου: 72 °C για 20 min

Για την A2-περιοχή

1. Μετουσίωση (Denaturation): 95 °C για 4 min
2. Μετουσίωση (Denaturation): 95 °C για 30 sec
3. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 69 °C για 45 sec
4. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72 °C για 1,5 min
5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη 39 κύκλων.
6. Διακοπή δράσης ενζύμου: 72 °C για 20 min

20 λεπτά πριν το τέλος της κάθε PCR αντίδρασης προστίθεται 1μl Taq πολυμεράσης ώστε να προστεθούν πολυA άκρα στα άκρα κάθε περιοχής.

Μετά την ολοκλήρωση της PCR αντίδρασης διεξάγεται ο έλεγχος των προϊόντων με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.

B.2.5. Έλεγχος των PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων της PCR, τα προκύπτοντα προϊόντα υποβάλλονται σε έλεγχο, με την μέθοδο της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή απλής αγαρόζης 1,5% σε 1X TBE ή TAE. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε ~75V τάσης και σε ~90mA ηλεκτρικού ρεύματος, και διαρκεί 20-30 λεπτά.

Σε κάθε εφαρμογή ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντων χρησιμοποιούνται όλη η ποσότητα των προϊόντων, αφού πρώτα είχε προηγηθεί ανάμειξή τους με 4 μl διαλύματος φόρτωσης ηλεκτροφόρησης (loading buffer). Μετά τη φόρτωση των PCR προϊόντων στην πηκτή αγαρόζης, ακολουθούσε φόρτωση (5μl) δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (100bp της εταιρείας “InvitrogenTM”), με στόχο το συγκριτικό προσδιορισμό μεγέθους των PCR προϊόντων.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρεται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (2UVTM Transilluminator) για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

B.2.6. Gel Extraction

Μέσω της διαδικασίας του gel extraction, απομονώνονται τα προϊόντα της PCR αντίδρασης μετά την ηλεκτροφόρησή τους και καθαρίζονται από τα υπολείμματα της αγαρόζης. Η διαδικασία ξεκινάει κόβοντας τις ζώνες που εμφανίζονται στο σωστό

μοριακό βάρος με μεταλλική λεπίδα. Οι απομονωμένες ζώνες υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε επεξεργασία και καθαρισμό με το σύστημα καθαρισμού “NucleoSpin Extract II Kit”.

Μεταφέρεται η κομμένη ζώνη σε καθαρό eppendorf και προστίθενται σε αυτό 300μl αντιδραστηρίου NT. Ακολουθεί επώαση του μίγματος στους 50°C μέχρι να λιώσει η πηκτή αγαρόζης, για να επιτευχθεί αυτό παράλληλα το μίγμα ανακινείται έντονα (Vortex). Όταν ολοκληρωθεί το προηγούμενο στάδιο, το περιεχόμενο του eppendorf μεταφέρεται στην στήλη καθαρισμού και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000 rcf. Με την διαδικασία αυτή, το DNA συγκρατείται στη στήλη, η οποία στη συνέχεια ξεπλένεται προσθέτοντας 600μl αντιδραστηρίου NT3 και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000 rcf, ώστε να φύγουν όλα τα υπολείμματα αγαρόζης, χρωστικής κ.α. και ξανά ακολουθεί φυγοκέντηση ώστε να φύγει και η περίσσεια NT3. Στο επόμενο στάδιο γίνεται η έκλυση του DNA από την στήλη, (αφού αυτή μεταφερθεί σε καθαρό eppendorf), με 30μl του αντιδραστηρίου NE και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 rcf.

B.2.7. Κλωνοποίηση των επικρατειών A1 και A2 στον φορέα pSCA και απευθείας μετασχηματισμός κυττάρων DH5a

Οι primers για την ενίσχυση των περιοχών A1 και A2, έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε αυτές να μπορούν άμεσα να κλωνοποιηθούν στον βοηθητικό φορέα pSCA. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται το “Strataclone kit” της εταιρίας Stratagene, το οποίο περιέχει το ένζυμο τοποισομεράση.

Η ένθεση των περιοχών στον φορέα πραγματοποιείται σε μια αντίδραση που

περιέχει: Buffer	3μl
cDNA	2μl
vector(pSCA)	1μl

και απαιτεί επώαση του παραπάνω μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί απευθείας μετασχηματισμός DH5α κυττάρων τα οποία περιέχονται στο ίδιο kit. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται μεταφέροντας 2μl της παραπάνω αντίδρασης στα κύτταρα και προκαλώντας σε αυτά θερμικό σοκ, ώστε να ενσωματώσουν τον ανασυνδυασμένο φορέα. Έτσι τα κύτταρα επωάζονται για 20 λεπτά στον πάγο, μεταφέρονται για 45 δευτερόλεπτα στους 42 °C και επιστρέφουν στον πάγο για άλλα 2 λεπτά. Στα κύτταρα, μετά το θερμικό σοκ στο οποίο υποβάλλονται, προστίθενται 250μl SOC (247,5μl SOB + 2,5μl γλυκόζη). Στο θρεπτικό αυτό μέσο, τα κύτταρα αναδεύονται για 1 ώρα στους 37 °C.

B.2.8. Καλλιέργεια κυττάρων σε στερεό υπόστρωμα

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα μεταφέρονται σε τριβλίο που έχει στρωθεί με στερεό θρεπτικό μέσο LB-agar.

Το στερεό αυτό θρεπτικό μέσο, σχηματίζεται αφού διαλυθούν 4g του σε 100ml H₂O. Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να αναδευτεί και να αποστειρωθεί. Σε 20ml από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται 20μl του αντιβιοτικού αμπικιλίνη (επιλέγεται γιατί ο φορέας pSCA είναι ανθεκτικός σε αυτό). Η ποσότητα αυτή στρώνεται στο τριβλίο και αφού πήξει, προστίθενται 40μl X-gal και τα μετασχηματισμένα κύτταρα. Το τριβλίο μένει ανάποδα για περίπου 14 ώρες στους 37 °C.

Στο τριβλίο μετα το πέρας των απαραίτητων ωρών έχουν αναπτυχθεί μπλέ και άσπρες αποικίες. Μονό οι άσπρες αποτελούνται από μετασχηματισμένα κύτταρα.

B.2.9. Καλλιέργεια κυττάρων σε υγρό υπόστρωμα

Αφού επιλεγεί μια άσπρη αποικία από το τριβλίο, μεταφέρεται σε περίπου 5ml υγρού θρεπτικού μέσου LB. Το θρεπτικό αυτό μέσο δημιουργείται αφού διαλυθούν 25g LB

σε 1L H₂O και το προκύπτων διάλυμα αναδευτεί καλά και αποστειρωθεί. Και σε αυτήν την διαδικασία προστίθεται το αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

Το θρεπτικό μέσο με την λευκή αποικία που έχει μεταφερθεί σε αυτό επωάζεται για περίπου 14-16 ώρες στους 37 °C. Μέσω της διαδικασίας αυτής καλλιεργούνται μόνο κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με τον ανασυνδιασμένο φορέα.

B.2.10. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep)

Από τα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί και έχουν μετασχηματιστεί από τον ανασυνδιασμένο φορέα σε αυτό το στάδιο πρέπει να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας το kit “Nucleospin Plasmid”. Σε πρώτο στάδιο φυγοκεντρώντας την καλλιέργεια στις 11.000 rcf για 1 λεπτό ώστε να μείνουν τα κύτταρα με την μορφή ιζήματος στο πυθμένα του σωληναρίου, ενώ το υπερκείμενο που αποτελεί το θρεπτικό μέσο στο οποίο είχαν αναπτυχθεί τα κύτταρα, αποχύνεται. Αφού το ίζημα στεγνώσει, προστίθενται 250μl του αντιδραστηρίου A1 και το μίγμα ανακινείται έντονα (Vortex) μέχρι το ίζημα να διαλυθεί πλήρως. Στο επόμενο στάδιο προστίθενται 250μl του αντιδραστηρίου A2, ακολουθεί ήπια ανάδευση και το μίγμα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθενται 300μl του αντιδραστηρίου A3 και το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 11.000 rcf, το υπερκείμενο μεταφέρεται στην στήλη καθαρισμού και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000 rcf, ώστε να συγκρατηθεί το DNA σ’ αυτήν.

Ακολουθεί ξέπλυμα της στήλης με 400μl του αντιδραστηρίου A4 και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 rcf, ώστε να φύγουν τα υπολείμματα των υπολοίπων συστατικών των κυττάρων ή και η περίσσεια των αντιδραστηρίων. Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό eppendorf και γίνεται έκλυση του DNA με 20μl του αντιδραστηρίου AE και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 rcf. Το πλασμιδιακό DNA φυλλάσσεται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Για τον έλεγχο της απομόνωσης του σωστού πλασμιδίου μπορεί να γίνει πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII και μέσω ηλεκτροφόρησης του προϊόντος να φανεί αν προκύπτουν οι σωστές ζώνες. Επίσης μέρος του πλασμιδιακού DNA που

προκύπτει στέλνεται για αλληλούχιση ώστε να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται όντως για ανασυνδυασμένο φορέα με την σωστή A1/A2 περιοχή του vWF.

B.2.7. Κλωνοποίηση των επικρατειών A1 και A2 στον φορέα pet49b

Για να κλωνοποιηθούν οι A1 και A2 περιοχές στον φορέα έκφρασης pet49b, θα πρέπει τόσο το DNA των περιοχών αυτών όσο και ο φορέας να αποκτήσουν τα κατάλληλα άκρα ώστε να μπορέσουν στο επόμενο στάδιο να ενωθούν με την βοήθεια του ενζύμου λιγάση. Για να πραγματοποιηθεί αυτό γίνεται πέψη των παραπάνω αλληλουχιών με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII. Για να είναι τα ένζυμα αυτά συμβατά χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο BSA. Η αντίδραση πέψης πραγματοποιείται σε μια αντίδραση τελικού όγκου 20μl που περιέχει:

A1/A2/pet49b	10μl
HindIII	1μl
BamHI	1μl
BSA	2μl
Buffer 2	2μl
H ₂ O	4μl
Vt	20μl

Το μίγμα αυτό επωάζεται για 2-3 ώρες στους 37 °C. Για να ελεγχθεί αν τα A1, A2 και pet49b έχουν κοπεί από τα ένζυμα, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του μίγματος και έπειτα gel extraction των ζωνών που αντιστοιχούν στις κομμένες αλληλουχίες.

Ο ανασυνδυασμός του φορέα έκφρασης pet49b με τις περιοχές A1 και A2 του vWF γίνεται χρησιμοποιώντας το ένζυμο λιγάση σε ένα μίγμα που περιέχει:

A1/A2	10μl
Pet49b	6μl
ATP	2μl
Λιγάση	2μl
Buffer	2μl
Vt	20μl

Το μίγμα επωάζεται στους 16 °C overnight.

Ακολουθεί μετασχηματισμός κυττάρων BL21 μεταφέροντας σε περίπου 200μl κυττάρων 5ml του μίγματος που έχει προκύψει από τον ανασυνδυασμό. Για να γίνουν τα κύτταρα δεκτικά στον ανασυνδυασμένο φορέα πραγματοποιείται θερμικό σοκ με επώαση αρχικά στον πάγο για 30 λεπτά, έπειτα στους 42 °C για 1 λεπτό και ξανά στον πάγο για 2 λεπτά. Στο μίγμα προστίθενται 250μl SOC και μεταφέρεται στους 37 °C όπου αναδεύεται για περίπου 1 ώρα. Τα κύτταρα που προκύπτουν στρώνονται σε τριβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο. Αυτήν την φορά χρησιμοποιείται το αντιβιοτικό καναμυκίνη (7,5μl), αφού ο φορέας *ret49b* είναι ανθεκτικός σε αυτό. Μετά από περίπου 14 ώρες που το τριβλίο παραμένει ανάποδα στους 37 °C , έχουν αναπτυχθεί λευκές αποικίες που αποτελούνται από κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί από τον ανασυνδυασμένο φορέα. Μία από αυτές επιλέγεται και προστίθεται σε περίπου 5ml υγρού θρεπτικού μέσου το οποίο περιέχει 3μl του αντιβιοτικού καναμυκίνη. Σε αυτό, τα κύτταρα καλλιεργούνται καθώς αναδεύονται overnight στους 37 °C.

Και πάλι μέρος των κυττάρων που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία, χρησιμοποιείται για να γίνει έλεγχος και να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται όντως για ανασυνδυασμένο φορέα με την σωστή A1/A2 περιοχή. Αυτό γίνεται αφού απομονωθεί το πλασμιδιακό τους DNA και σταλεί για αλληλούχιση.

B.2.12. Δοκιμασίες υπερέκφρασης των πρωτεϊνών

Από την καλλιέργεια που προέκυψε από την προηγούμενη διαδικασία μεταφέρεται ποσότητα περίπου 1ml σε κωνική φιάλη που περιέχει περίπου 100ml υγρού θρεπτικού μέσου που επίσης περιέχει το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Αυτό γίνεται σε τόσες κωνικές φιάλες όσες οι συνθήκες επώασης [διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου επώασης και συγκέντρωσης IPTG (Isopropyl Thio Galactosyl)] που επιλέγεται να δοκιμαστούν. Με τον τρόπο αυτό γίνεται δυνατό να διευκρινιστούν οι συνθήκες που επιτρέπουν την καλύτερη έκφραση των πρωτεϊνών.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής, πρώτα οι ανακαλλιέργειες επωάζονται στους 37 °C μέχρι το OD₅₉₅ να φτάσει το 0,6. Τότε προστίθεται σε κάθε κωνική φιάλη

η διαφορετική ποσότητα IPTG και κάθε μία παραμένει για επώαση στις συνθήκες που έχουν επιλεγεί. Το IPTG, δρα ως επαγωγέας της έκφρασης του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης της οποίας ο προαγωγέας στο πλασμίδιο *ret49b* βρίσκεται μπροστά από τον πολυσυνδέτη. Η έκφραση του γονιδίου αυτού στα κύτταρα του *E.coli* αναστέλλεται από τον καταστολέα LacIQ. Το IPTG δεσμεύεται και απομακρύνει τον καταστολέα από το DNA, επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία με την σειρά της θα αναγνωρίσει τον προαγωγέα της στο πλασμίδιο και θα μεταγράψει τα γονίδια που βρίσκονται μετά από αυτόν, που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι ένα εκ των A1 και A2 περιοχών του *vWF*.

B.2.13. Σπάσιμο κυττάρων και συλλογή πρωτεϊνών

Οι καλλιέργειες που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία αφού μεταφερθούν σε falcon, φυγοκεντρώνονται στις 4.000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C για 20 λεπτά, ώστε τα κύτταρα να μαζευτούν στον πυθμένα των falcon και το θρεπτικό μέσο να παραμείνει ως υπερκείμενη φάση και να αποχυθεί.

Τα κύτταρα ομογενοποιούνται σε 1ml διαλύματος ομογενοποίησης (50mM Tris, 300mM NaCl, 5mM MgCl₂) και προστίθεται μικρή ποσότητα λυσοζύμης που προκαλεί μερική λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων και 5mM PMSF (αναστολείς πρωτεασών). Στο διάλυμα αυτό και σε θερμοκρασία 0-4°C (παγος), τα κύτταρα μένουν για περίπου 1 ώρα. Ακολουθεί σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους (sonicator) και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, για 30 λεπτά στους 4 °C , ώστε να διαχωριστεί το υπερκείμενο από το ίζημα.

B.2.14. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση της υπερκείμενης φάσης που προέκυψε από την προηγούμενη διαδικασία, σε πηκτή ακρυλαμίδιου 12%. Αυτή, αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, την πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ
H ₂ O	4.9 ml
Ακρυλαμίδιο 37%	6ml
Tris (pH 8,8)	3.8ml
SDS 10%	0.15ml
APS 10%	0.15ml
TEMED	6μl

Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 12%

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ
H ₂ O	3.4ml
Ακρυλαμίδιο 37%	0.83ml
Tris (pH 6,8)	0.63ml
SDS 10%	0.05ml
APS 10%	0.05ml
TEMED	5μl

Σύσταση πηκτής συγκέντρωσης 12%

Η πηκτή συγκέντρωσης συγκεντρώνει την ποσότητα των δειγμάτων που έχει φορτωθεί στα πηγαδάκια, ενώ στην πηκτή διαχωρισμού οι πρωτεΐνες που περιέχονται στα δείγματα χωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Αρχικά η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για να ευθυγραμμιστεί η επιφάνεια της πηκτής.

Αφού η πηκτική διαχωρισμού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται ακριβώς από πάνω της, η πηκτική συγκέντρωσης.

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτική περιλαμβάνει την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού 3x (Tris pH 6.5 62.5mM, SDS 2%, Γλυκερόλη 25%, ddH₂O 0.01%) και την μετουσίωση των πρωτεϊνών που επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100 °C για 4 λεπτά. Ακολουθώντας φορτώνονται τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακού βάρους στις ειδικές υποδοχές της πηκτικής και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (10x: 72g γλυκίνη, 15g Tris, 5g SDS, 500ml ddH₂O). Εφαρμόζεται τάση 150V, η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διαρκεί περίπου 45 λεπτά και αφού τελειώσει, η πηκτική διαχωρισμού βάφεται με διάλυμα χρωματισμού (coomassie brilliant blue 0.25g, ισοπροπανόλη 25ml, οξικό οξύ 10ml, ddH₂O 65ml). Μετά τον χρωματισμό, ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτικής με 10% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ. Στο τέλος της διαδικασίας είναι ευδιάκριτες οι ζώνες των πρωτεϊνών εξαιτίας της μπλέ χρωστικής Coomassie Brilliant Blue, ενώ είναι δυνατός και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους τους μέσω της σύγκρισης των ζωνών με τον μάρτυρα μοριακού βάρους.

B.2.15. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF -Western blot

Για την επιβεβαίωση των ζωνών στην πηκτική ακρυλαμιδίου που αντιπροσωπεύουν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες, γίνεται μεταφορά τους από την πηκτική σε μεμβράνη PVDF με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού σε αυτές. Οι πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν αρνητικό φορτίο λόγω της σύνδεσής του με το SDS, υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την άνοδο. Έτσι, μεταφέρονται διαμέσου της πηκτικής και καθλώνονται στο πλέγμα της μεμβράνης με την βοήθεια υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται η ανίχνευση των καθλωμένων πρωτεϊνών με την χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.

Αρχικά μια μεμβράνη PVDF, ίδιων διαστάσεων με την πηκτή πολυακρυλαμιδίου, ενεργοποιείται καθώς εμβαπτίζεται για 5 λεπτά σε μεθανόλη και στην συνέχεια εξισορροπείται στο διάλυμα μεταφοράς (3.03g Tris, 14.4g Glycin, 200ml Methanol, 1L ddH₂O). Στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζεται και η πηκτή καθώς και 6 χαρτιά τύπου Whatmann 3MM και 2 σφουγγαράκια. Ακολουθεί η διάταξη της μεταφοράς που αποτελείται κατά σειρά από: 1 σφουγγαράκι, 3 υγρά χαρτιά τύπου Whatmann, την πηκτή πολυακρυλαμιδίου, την μεμβράνη, 3 υγρά χαρτιά τύπου Whatmann και άλλο 1 σφουγγαράκι. Η διάταξη αυτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, με τέτοιον τρόπο ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται προς την πλευρά της ανόδου. Η μεταφορά γίνεται στα 150V για 1,5 ώρα.

Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη επώαζεται σε διάλυμα μη ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών (2.5g σκόνη άπαχου γάλακτος, 50ml PBS) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (blocking). Κατόπιν, η μεμβράνη ξεπλένεται δύο φορές με PBS και έπειτα επώαζεται με το πρωτεΐν αντισώμα (Anti-GST Goat) που έχει διαλυθεί σε διάλυμα μη ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών, το οποίο αναγνωρίζει την υπό μελέτη καθηλωμένη πρωτεΐνη, για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με το PBS και έπειτα γίνεται επώαση με το δεύτερο αντισώμα (Anti-Goat), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντισώμα, αναγνωρίζει και δεσμεύει τις ανοσοσφαιρίνες IgG του πρώτου αντισώματος και είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση από αγριοράπανο (HRP) που σαν υπόστρωμα έχει την χλωροναφθόλη. Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται με PBS δυο φορές,

Προκειμένου να γίνει η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών που είναι δεσμευμένες με το πρωτεΐν αντισώμα, η μεμβράνη επώαζεται σε διάλυμα εμφάνισης το οποίο περιέχει χλωροναφθόλη διαλυμένη σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 0.5g/ml και στο οποίο προστίθεται H₂O₂ 30%. Η χλωροναφθόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση HRP παρουσία H₂O₂, δίνοντας ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα στις περιοχές που είναι δεσμευμένο το δεύτερο αντισώμα. Για να τερματιστεί η αντίδραση, η μεμβράνη ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό.

B.2.16. Καθαρισμός πρωτεϊνών με στήλη Ni

Το υπερκείμενο στο οποίο περιέχεται η υπό μελέτη πρωτεΐνη, μπορεί να κλασματοποιηθεί περνώντας το από μια στήλη Ni. Αυτή κατακρατά την πρωτεΐνη μέσω σύνδεσης της ουράς ιστιδινών που περιέχει (εξαιτίας του φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί) με τα άτομα του νικελίου. Η διαδικασία ξεκινάει εξισορροπώντας την στήλη με 10 όγκους του διαλύματος ομογενοποίησης των κυττάρων. Έπειτα από την στήλη περνάει το υπερκείμενο που περιέχει την προς ανάλυση πρωτεΐνη. Κατακρατούνται όσες πρωτεΐνες περιέχουν ουρά His και οι υπόλοιπες περνάνε στο flow through. Στη συνέχεια, η στήλη ξεπλένεται με 10 όγκους του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε και προηγουμένως στο οποίο όμως έχει προστεθεί ιμιδαζόλη σε τελική συγκέντρωση 20mM, έτσι ώστε να φύγουν πρωτεΐνες που ίσως έχουν κατακρατηθεί ασθενώς (wash). Για την ανάκτηση της υπό μελέτη πρωτεΐνης γίνεται έκλυση της με το ίδιο πάλι διάλυμα αυτή την φορά όμως με περίσσεια ιμιδαζόλης (300mM). Η ιμιδαζόλη δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα Ni ανταγωνιζόμενη τις His-tagged πρωτεΐνες. Έτσι η προς ανάλυση πρωτεΐνη ανακτάται. Ο έλεγχος των κλασμάτων που προκύπτουν γίνεται με ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

B.2.17. Καθαρισμός πρωτεϊνών με στήλη GSH

Οι υπό μελέτη πρωτεΐνες κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), ώστε η πρωτεΐνη που θα προκύψει να αποτελεί προϊόν σύντηξης με αυτή. Έτσι ο καθαρισμός της πρωτεΐνης μπορεί να γίνει με στήλη αγχιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε αδρανές υλικό.

Η συγγένεια των σφαιριδίων γλουταθειόνης με το τμήμα της τρανσφεράσης της S-γλουταθειόνης που βρίσκεται στην πρωτεΐνη επιτρέπει την πρόσδεσή της στα

σφαιρίδια. Έτσι γίνεται δυνατός ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από το εκχύλισμα. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με την προσθήκη διαλύματος ελεύθερης ανηγμένης γλουταθειόνης σε περίσσεια, η οποία δημιουργεί δισουλφιδικούς δεσμούς με την προσδεσμεμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνη, αποδεσμεύοντας την πρωτεΐνη από αυτά.

Η διαδικασία ξεκινάει με εξισορρόπηση των σφαιριδίων (100μl σφαιριδίων για 200ml αρχικής καλλιέργειας) με 10 όγκους του διαλύματος στο οποίο είχαν ομογενοποιηθεί τα κύτταρα επι 3 φορές. Κάθε φορά το μίγμα σφαιριδίων- διαλύματος ομογενοποίησης ανακινείται ελαφρά και φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στις 3.000 rpm για 3 λεπτά και το υπερκείμενο αποχύνεται. Στο επόμενο στάδιο, στα εξισορροπημένα πλέον σφαιρίδια προστίθεται το διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων) και επωάζεται στους 4 °C υπό ήπια ανάδευση για 2 περίπου ώρες. Στο στάδιο αυτό έρχεται σε επαφή η GST-ουρά της πρωτεΐνης με τα σφαιρίδια της στήλης και έτσι μπορεί να δεσμευτεί στην γλουταθειόνη της στήλης. Αφού περάσουν οι 2 ώρες το μίγμα φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στις 3.000 rpm και το υπερκείμενο απομακρύνεται (flow through). Αυτό, περιέχει τις πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στην στήλη, αυτές δηλαδή που δεν περιέχουν GST-ουρά. Ακολουθούν τρεις πλύσεις της στήλης με 3 όγκους του διαλύματος ομογενοποίησης των κυττάρων και κάθε φορά φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 3.000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου (wash) , ώστε να ξεπλυθεί η στήλη και να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που μπορεί ασθενώς να έχουν κατακρατηθεί στη στήλη. Στο τελευταίο στάδιο, εκλύονται οι επιθυμητές πρωτεΐνες που έχουν κατακρατηθεί στην στήλη. Η έκλυση γίνεται με τρεις πλύσεις της στήλης με τρεις όγκους διαλύματος ομογενοποίησης των κυττάρων στο οποίο έχουν προστεθεί 10mM γλουταθειόνης και το pH του έχει ρυθμιστεί στο 7-8. Η γλουταθειόνη του διαλύματος ανταγωνίζεται την GST ουρά των πρωτεϊνών που έχουν κατακρατηθεί στην στήλη για τα σφαιρίδια αυτής και έτσι προκαλεί την έκλυσή τους. Σε κάθε έκλυση γίνεται φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 3.000rpm και συλλέγεται το υπερκείμενο (elution).

Όλα τα στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης ελέγχονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%.

B.2.18. Πέψη GST ουράς με την πρωτεάση 3C

Η πέψη της GST ουράς από τις υπό μελέτη πρωτεΐνες γίνεται «δένοντας» αυτές στην στήλη GSH και προσθέτοντας την πρωτεάση 3C σε αυτήν. Η πρωτεάση 3C που επιλέχτηκε είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη δεσμευμένη και αυτή με μια GST ουρά.

Αφού η στήλη εξισορροπηθεί με το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεάση (Tris, NaCl), προστίθεται η πρωτεάση και τα elution που προέκυψαν από την προηγούμενη διαδικασία και περιέχουν μόνο τις υπό μελέτη πρωτεΐνες και αφήνεται για 2 περίπου ώρες στους 4 °C υπό ήπια ανάδευση. Στις 2 αυτές ώρες, δρα η πρωτεάση και κόβει την GST ουρά που είναι συνδεδεμένη στην πρωτεΐνη και επίσης αλληλεπιδρούν οι πρωτεΐνες που περιέχουν GST με τα σφαιρίδια της στήλης. Έτσι στην στήλη θα συγκρατηθούν, η 3C και η ποσότητα της πρωτεΐνη που δεν κόπηκε καθώς και οι GST-ουρές. Το ξέπλυμα της στήλης γίνεται με το ίδιο διάλυμα (Tris, NaCl), τα wash που προκύπτουν περιέχουν όποια πρωτεΐνη δεν έχει GST ουρά, δηλαδή την υπό μελέτη πρωτεΐνη από την οποία όμως έχει κοπεί η ουρά.

B.2.19. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης κατά Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πρωτεΐνη πραγματοποιείται με την μέθοδο Bradford και την χρήση του αντιδραστηρίου BioQuant της Merck. Η προς μέτρηση πρωτεΐνη αντιδρά με το αντιδραστήριο σε περίσσεια προς σχηματισμό έγχρωμης ένωσης. Σε ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων η ποσότητα της σχηματιζόμενης έγχρωμης ένωσης είναι ανάλογη της ποσότητας της αρχικής ουσίας. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος με την μέθοδο αυτή, είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την πρωτεϊνική συγκέντρωση, με την χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Αρχικά, μετράται η απορρόφηση μιας σειράς πρότυπων διαλυμάτων BSA (Αλβουμίνη Βόειου Ορού) στα 595nm. Συγκεκριμένα, σε 20μl από το κάθε δείγμα

γνωστής συγκέντρωσης (0,2-1,4 mg/ml) προστίθεται 1ml διαλύματος Bradford. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και μέτρηση απορρόφησης στα 595nm έπειτα από 5 λεπτά. Από τις μετρήσεις που προκύπτουν διαμορφώνεται η πρότυπη καμπύλη. Ακολούθως, μετράται η απορρόφηση του προς ανάλυση δείγματος και βάση της πρότυπης καμπύλης γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης

B.2.20. Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης ITC [51]

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των δύο επικρατιών A1 και A2 του παράγοντα πήξης του αίματος vWF χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Θερμιδομετρίας Ισόθερμης Τιτλοδότησης ITC.

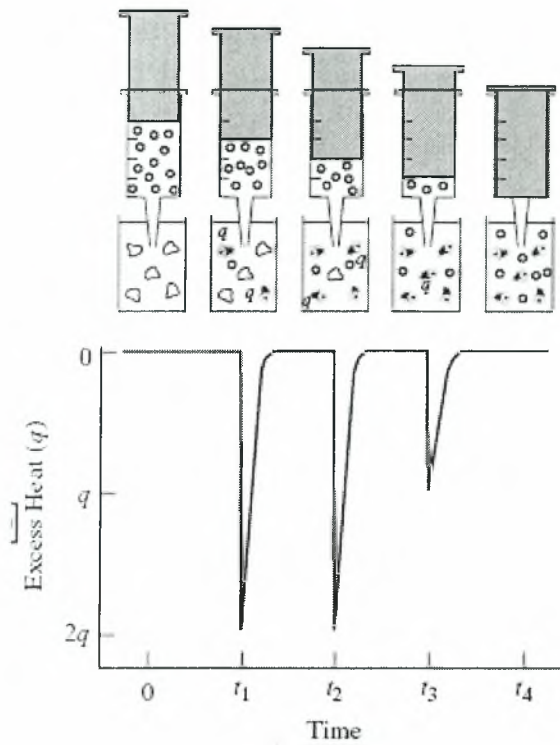
Πρόκειται για την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τη μελέτη της θερμοχημείας αλληλεπιδρώντων μορίων. Μετρά απ' ευθείας το ποσό της θερμότητας που απορροφάται ή απελευθερώνεται κατά μία αντίδραση ανάμιξης δύο η περισσοτέρων συστατικών. Στην πιο απλή περίπτωση, ένας προσδέτης (Ligand, L) εισάγεται σε ένα διάλυμα πρωτεΐνης (P), έτσι ώστε αυτά τα δύο να συνδεθούν και να δημιουργήσουν ένα απλό δυάδικο σύμπλοκο (PL). Η προκύπτουσα απελευθέρωση ή απορρόφηση θερμότητας από την αντίδραση εξαρτάται από την ενθαλπία σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία $[\Delta H(T)]$ και από τον αριθμό των mole του δημιουργούμενου συμπλόκου (n_{PL} , το οποίο εξαρτάται από τον όγκο V του δείγματος και τη συγκέντρωση του συμπλόκου [PL]).

$$q = \Delta H^0(T)n_{PL} = \Delta H^0(T)V[PL]$$

Σε ένα πραγματικό πείραμα τιτλοδοτούμε μία σταθερή ποσότητα πρωτεΐνης κατά αυξανόμενα διαστήματα, χρησιμοποιώντας μικρότερα ποσά προσδέτη σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, και έτσι η επιφάνεια κάτω από κάθε κορυφή είναι η θερμότητα που απορροφάται ή απελευθερώνεται στο χρονικό διάστημα i (q_i) για το ποσό του προσδέτη που προσετέθει σε αυτό το διάστημα (Εικ.9). Επομένως,

για κάθε βήμα i κατά την τιτλοδότηση, η $i^{\text{η}}$ περιοχή κάτω από την κορυφή κατά την τιτλοδότηση είναι

$$q_i = \Delta H^0(T)V[P_T] \left(\frac{K_a[L]_i}{1 + K_a[L]_i} - \frac{K_a[L]_{i-1}}{1 + K_a[L]_{i-1}} \right)$$



Εικ.9. Σε ένα πραγματικό πείραμα τιτλοδοτούμε μία σταθερή ποσότητα πρωτεΐνης κατά αυξανόμενα διαστήματα, χρησιμοποιώντας μικρότερα ποσά προσδέτη σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, και έτσι η επιφάνεια κάτω από κάθε κορυφή είναι η θερμότητα που απορροφάται ή απελευθερώνεται στο χρονικό διάστημα i (q_i) για το ποσό του προσδέτη που προσετέθει σε αυτό το διάστημα

Σε ένα τυπικό πείραμα ITC, στο κελί του δείγματος τοποθετείται η ουσία με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος ή σε περίπτωση χαμηλής διαθεσιμότητας κάποιου από τα δύο αλληλεπιδρώντα μόρια η ουσία με την χαμηλότερη συγκέντρωση. Η πειραματική μεταβλητή που καταγράφεται σε μια ισόθερμη τιτλοδότηση είναι η παρεχόμενη σε κελιά ισχύς ώστε αυτά να διατηρούν την θερμοκρασία τους σταθερή σαν συνάρτηση του χρόνου. Στο κελί αναφοράς βυθίζεται σύριγγα που περιέχει διάλυμα του

αλληλεπιδρώντος μορίου, η οποία προσαρμόζεται σε ένα ρομποτικό βραχίονα που εκτελεί προκαθορισμένες εγχύσεις στο κελί του δείγματος με εξαιρετική ακρίβεια. Κατά την έκχυση του διαλύματος της σύριγγας στο κελί του δείγματος έχουμε έκλυση ή απορρόφηση θερμότητας, ανάλογα με το αν η αντίδραση για τον σχηματισμό συμπλόκου είναι εξώθερμη ή ενδόθερμη αντίστοιχα.

Η ισχύς που παρέχεται κατά την διάρκεια μιας τιτλοδότησης είναι ανάλογη του ποσοστού των μορίων της σύριγγας που αλληλεπιδρούν με τα μόρια του κελιού αναφοράς. Κατά τις πρώτες εκχύσεις, όλα ή τα περισσότερα μόρια της σύριγγας δεσμεύονται σε μόρια του κελιού αναφοράς, φαινόμενο που καταγράφεται με ισχυρά ενδόθερμα ή εξώθερμα σήματα. Καθώς εξελίσσεται η τιτλοδότηση και αυξάνεται η ποσότητα των μορίων της σύριγγας που έχουν μεταφερθεί στο κελί του δείγματος, οι διαθέσιμες θέσεις δέσμευσης ελαττώνονται και κατά συνέπεια μικραίνει και το μέγεθος των καταγραφόμενων κορυφών.

Τα θερμοδυναμικά μεγέθη που δίνονται από την παραπάνω τεχνική είναι η στοιχειομετρία της αντίδρασης (N) που δείχνει την αναλογία των αλληλεπιδρώντων μορίων, η σταθερά σύνδεσης (Kb) που δείχνει πόσο ισχυρή είναι η δέσμευση, η μεταβολή στην ενθαλπία (ΔH_b) που δείχνει την μεταβολή του ενεργειακού περιεχομένου του συστήματος κατά την σύνδεση και η μεταβολή στην εντροπία (ΔS_b) που δείχνει την μεταβολή στην τάξη του συστήματος κατά την σύνδεση. Σε συνδυασμό με δομικά στοιχεία και άλλες τεχνικές, οι θερμοδυναμικές αυτές πληροφορίες παρέχουν μια ολοκληρωμένη εικόνα για την αλληλεπίδραση και βοηθούν στην αναγνώριση κρίσιμων στοιχείων για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των δύο μορίων.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. Ενίσχυση του cDNA των A1 και A2 περιοχών του vWF

Το πρώτο βήμα της όλης πειραματικής διαδικασίας εστιάστηκε στην απομόνωση RNA από ενδοθηλιακά κύτταρα και την σύνθεση του αντίστοιχου cDNA, ώστε να ενισχυθούν τα τμήματα που κωδικοποιούν τις A1 και A2 περιοχές του παράγοντα πήξης του αίματος vWF, με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές που υβριδίζονταν με τις επιλεγμένες αλληλουχίες-στόχους και επέτρεπαν τον πολλαπλασιασμό της περιοχής αυτής. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε σύμφωνα με τους εξής κοινά αποδεκτούς κανόνες

- Το μήκος ενός εκκινητή πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 17-28 νουκλεοτιδίων
- Το ποσοστό των βάσεων GC στην αλληλουχία του εκκινητή θα πρέπει να είναι ίσο με το 50-60% του συνολικού
- Τα 3' άκρα των εκκινητών πρέπει να τελειώνουν σε G, C ή GC έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η μη αποκόλλησή του από τις περιοχές επικάθισης στην περιοχή του ενδιαφέροντος
- Τα T_m των δύο εκκινητών θα πρέπει να είναι σε σχετικά παρόμοιες θερμοκρασίες και να εντοπίζονται στο εύρος των 55-80 °C
- Ο σχεδιασμός των διμερών ανάμεσα στους εκκινητές, αλλά και των δευτεροταγών δομών τύπου φουρκέτας στον ίδιο εκκινητή, πρέπει να αποφεύγεται
- Η επανάληψη άνω των τριών G ή C στο 3' άκρο πρέπει να αποφεύγεται, ώστε να εξασφαλίζεται η αποφυγή μη σωστής επικάθισης των εκκινητών σε άλλες νουκλεοτιδικές περιοχές που είναι πλούσιες σε G ή C
- Οι εκκινητές μετά τον σχεδιασμό τους θα πρέπει να ελέγχονται με βιοπληροφορική ανάλυση για την εξασφάλιση της εξειδίκευσης τους προς τη συγκεκριμένη περιοχή για την οποία σχεδιάστηκαν (ανάλυση κατά BLAST)

Με βάση λοιπόν αυτά τα χαρακτηριστικά σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές, οι οποίοι υβριδίζονταν στις κατάλληλες περιοχές του cDNA του vWF. Επιπλέον, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να φέρουν θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII, έτσι ώστε κατά την αντίδραση της PCR να εισάγονται στα προϊόντα οι αντίστοιχες αλληλουχίες και να καθίσταται δυνατή η περαιτέρω κλωνοποίηση τους στους βακτηριακούς πλασμιδιακούς φορείς.

A1 primers

Forward

5-CTA **GGA TCC** G AC CTG GTC TTC CTG CTG GAT-3

↓ ↑
BamH I for frame

Reversed

5-ACA **AAG CTT** TCA GAT CTC GTC CCT TTG CTG CTC C-3

↓ ↑
Hind III stop

A2 primers

Forward

5-CCA **GGA TCC** C AC CAT GGG GCC CAA GAG G-3

↓ ↑
BamH I for frame

Reversed

5-CGC **AAG CTT** CTA CTG CAG CAC CAG GTC-3

↓ ↑
Hind III stop

Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για την διεξαγωγή της PCR αντίδρασης ήταν οι εξής:

Για την A1 περιοχή

Θερμοκρασία αποδιάταξης **94 °C** Χρόνος αποδιάταξης **45sec**

Θερμοκρασία υβριδισμού **68 °C** Χρόνος υβριδισμού **45sec**

Θερμοκρασία πολυμερισμού **72 °C** Χρόνος πολυμερισμού **1,5min**

Αριθμός κύκλων **39**

Για την A2 περιοχή

Θερμοκρασία αποδιάταξης **95 °C** Χρόνος αποδιάταξης **30sec**

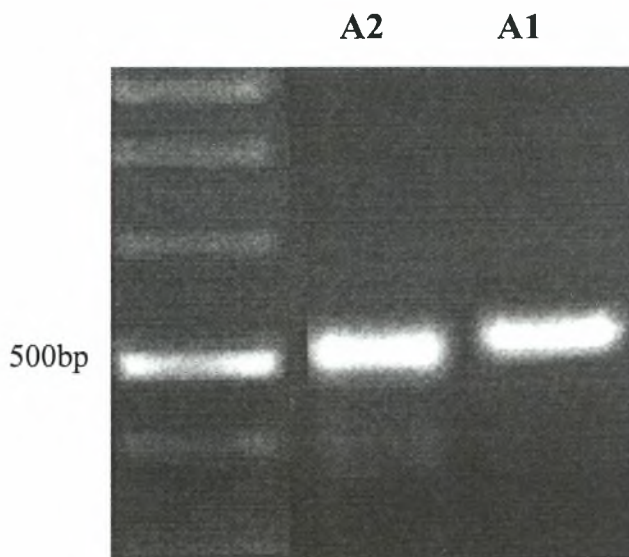
Θερμοκρασία υβριδισμού **69 °C** Χρόνος υβριδισμού **45sec**

Θερμοκρασία πολυμερισμού **72 °C** Χρόνος πολυμερισμού **1min**

Αριθμός κύκλων **39**

Στο τέλος της PCR αντίδρασης προστίθονταν 1μl Ταq πολυμεράσης και ακολουθούσε επώαση στους 72 °C για 20 λεπτά, έτσι ώστε να προστεθούν στα προϊόντα A άκρα και να διευκολύνεται η κλωνοποίηση τους στον βακτηριακό φορέα pSCA

Τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης 1.5% ώστε να ελεγχθεί το μοριακό τους βάρος. Το αναμενόμενο μοριακό βάρος είναι για την A1 657bp και για την A2 576bp (Εικ. 10)



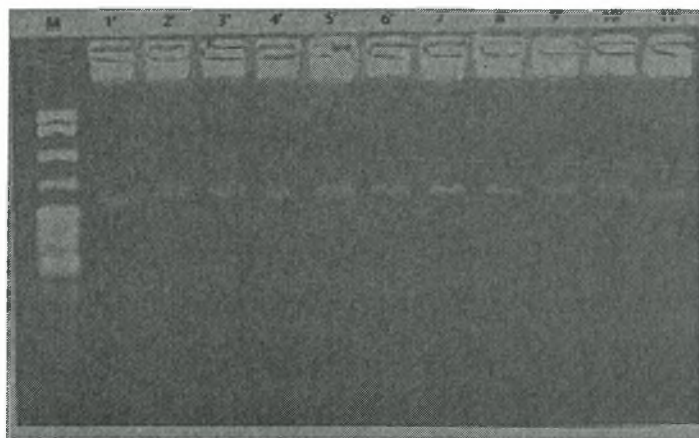
Εικ.10. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 1.5%. Στην διαδρομή 1 φαίνεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, στην διαδρομή 2 το ενισχυμένο προϊόν που αντιστοιχεί στην A2 περιοχή του vWF (576bp) και στην διαδρομή 3 το ενισχυμένο προϊόν που αντιστοιχεί στην A1 περιοχή του vWF (657bp)

Γ.2. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR στο βακτηριακό φορέα pSC-A

Επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR στον πλασμιδιακό φορέα pSCA. Συγκεκριμένα, τα προϊόντα της PCR με το σωστό μοριακό βάρος, αφού απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από την πηκτή αγαρόζης με το kit NucleoSpin ExtractII της εταιρίας Macherey-Nagel, χρησιμοποιήθηκαν σε μια αντίδρασης σύνδεσης με τον φορέα με την βοήθεια του ενζύμου τοποισομεράσης. Η κλωνοποίηση διευκολύνεται και από τον υβριδισμό μεταξύ των 3' A προεκβολών των προϊόντων της PCR και των 3' T προεκβολών του pSCA. Τα προϊόντα της κλωνοποίησης, η οποία επιτελεστεί όπως περιγράφεται στην παράγραφο Β.2.7., χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων DH5a.

Τα DH5a κύτταρα επώαστηκαν σε τρυβλία, που περιέχουν θρεπτικό υλικό μαζί με το αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη, καθώς ο φορέας pSCA φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σ' αυτό), στους 37 °C. Στο τρυβλίο περιέχονταν ακόμη και μια ποσότητα της ουσίας X-gal, έτσι ώστε να διαφοροποιηθούν οι αποικίες που έχουν μετασχηματιστεί από αυτές που δεν μετασχηματίστηκαν (άσπρες/μπλε αποικίες). Στη συνέχεια 6 λευκές αποικίες A1/pSCA και 8 αποικίες A2/pSCA επιλέχθηκαν, καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνη στους 37 °C, ώστε να απομονωθεί το πλασμιδιακό τους υλικό (mini-preps), προκειμένου να διαπιστωθεί η εισαγωγή του προϊόντος της PCR στον βακτηριακό φορέα. Επίσης μέρος της υγρής καλλιέργειας αποθηκεύτηκαν στους -80 °C σε μορφή stock γλυκερόλης. Ο έλεγχος εισαγωγής πραγματοποιήθηκε με πέψη των απομονωμένων δειγμάτων πλασμιδιακού DNA με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (BamHI και HindIII). Με τον τρόπο αυτό, θα κοβόταν μόνο οι κλώνοι στους οποίους είχε ενσωματωθεί το επιθυμητό ένθεμα. Τα προϊόντα των αντιδράσεων πέψης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5%. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαίωσε ότι όλοι οι κλώνοι από τους A1/pSCA και όλοι οι κλώνοι από τους A2/pSCA περιείχαν τα επιθυμητά ενθέματα, καθώς οι θετικοί κλώνοι εμφάνιζαν μετά την πέψη το κατάλληλο κομμάτι (657bp και 576bp) και παράλληλα με τον γραμμικό φορέα κλωνοποίησης (Εικ. 11). Οι θετικοί κλώνοι

στάλθηκαν για αλληλούχιση ώστε να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται για τα σωστά ενθέματα.



Εικ. 11. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης των ανασυνδιασμένων φορέων με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII. Στις διαδρομές 1 έως 4 φαίνονται οι κομμένοι κλώνοι των A1/pSCA ενώ στις διαδρομές 5 έως 11 οι κομμένοι κλώνοι A2/pSCA

Γ.3. Κλωνοποίηση των περιοχών A1 και A2 του vWF στον βακτηριακό φορέα έκφρασης pet49b

Ένας θετικός κλώνος A1/pSCA και ένας θετικός κλώνος A2/pSCA επώαστηκαν με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII, προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης κοπή των ενθεμάτων από τους πλασμιδιακούς φορείς pSCA. Τα προϊόντα των αντιδράσεων πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5%, απομονώθηκαν τα τμήματα της πηκτής τα οποία περιείχαν τα ενθέματα μεγέθους 657bp και 576bp αντίστοιχα για τις περιοχές A1 και A2 του vWF και ενσωματώθηκαν στον φορέα έκφρασης pet49b, με την βοήθεια της T4 DNA λιγάσης, ο οποίος είχε υποστεί διάνοιξη με τα ένζυμα BamHI και HindIII. Λόγω του κατάλληλου σχεδιασμού των εκκινητών, οι κωδικές αλληλουχίες των A1 και A2 περιοχών του vWF θα βρίσκονται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με αλληλουχίες του πλασμιδιακού φορέα που κωδικοποιούν η μία, μια «ουρά» 6 ιστιδινών (His) και η άλλη μια «ουρά» GST. Οι ανασυνδυασμένοι φορείς

έκφρασης που προέκυψαν, εισήχθησαν σε δεκτικά κύτταρα BL21, με σκοπό να ελεγχθεί η επιτυχία της ένθεσης και έπειτα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα απομονωμένα δείγματα του πλασμιδιακού DNA επώαστηκαν με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII, έτσι ώστε να εξακριβωθεί ποια από αυτά περιείχαν τα ενθέματα. Μετά την κοπή, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5%, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της κοπής και η παρουσία των σωστών σε μέγεθος ενθεμάτων. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαίωσαν την εισαγωγή των επιθυμητών τμημάτων σε όλους τους επιλεγμένους κλώνους, καθώς τα κατάλληλα κομμάτια 657bp και 576bp αντίστοιχα εμφανίζονται, παράλληλα με τους γραμμικούς φορείς έκφρασης, σε όλες τις διαδρομές.

Γ.4. Αλληλούχιση των ανασυνδιασμένων φορέων έκφρασης

Στο σημείο αυτό κρίθηκε απαραίτητη η αλληλούχιση των ανασυνδιασμένων φορέων A1/pet49b και A2/pet49b, προκειμένου να εξακριβωθεί ότι τα προϊόντα της PCR, που κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pSCA και εισήχθησαν τελικά στον φορέα έκφρασης pet49b, κωδικοποιούν όντως τις περιοχές A1 και A2 του vWF και δεν φέρουν κάποια μετάλλαξη. Παρά το γεγονός ότι ο αρχικός σχεδιασμός των εκκινητών της PCR ήταν σωστός και το μέγεθος των προϊόντων ήταν το αναμενόμενο, εντούτοις ο έλεγχος των αλληλουχιών ήταν αναγκαίος για τους εξής λόγους:

- Για να εξακριβωθεί ότι η Taq πολυμεράση δεν έκανε κάποιο λάθος κατά την αντίδραση ενίσχυσης των αλληλουχιών-στόχων
- Για να διαπιστωθεί ότι οι εκκινητές επικάθησαν στις σωστές θέσεις και ενισχύθηκαν οι σωστές αλληλουχίες-στόχοι
- Για να επιβεβαιωθεί ότι οι αλληλουχίες των ενθεμάτων βρίσκονται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την αλληλουχία του φορέα έκφρασης που κωδικοποιεί

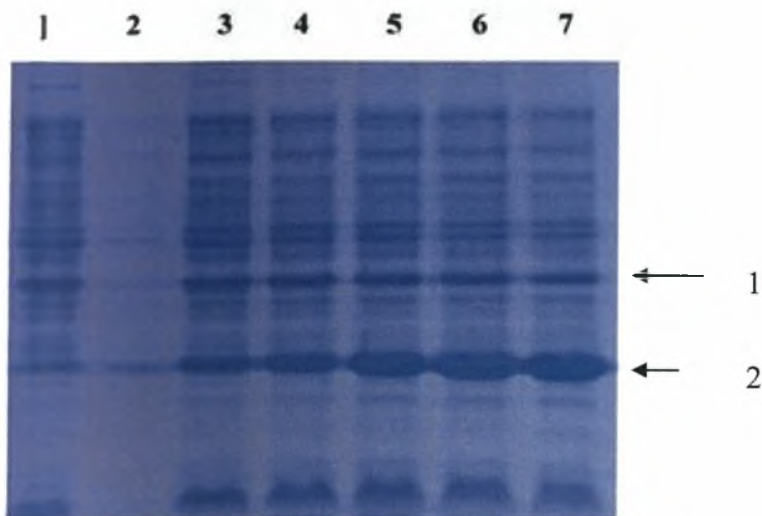
τις His και GST «ουρές» και θα παραχθούν οι πρωτεΐνες A1 και A2, συντηγμένες με τις «ουρές» His και GST

Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν κάποιοι από τους θετικούς κλώνους, οι οποίοι αναπτύχθηκαν και υποβλήθηκαν σε κατάλληλη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδίων υψηλής καθαρότητας. Τα καθαρά πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχιση και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αλληλουχία των ενθεμάτων άνηκε όντως στις περιοχές A1 και A2 του vWF.

Γ.5. Παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF

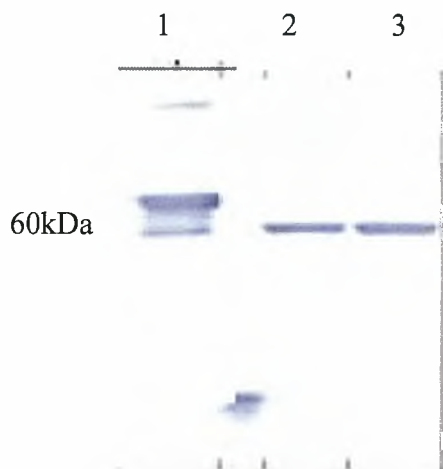
Στο σημείο αυτό, οι αλληλουχημένοι φορείς A1/pet49b και A2/pet49b χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli* του στελέχους BL21, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, μικρής κλίμακας καλλιέργειες των κυττάρων αυτών επωάστηκαν στις απαιτούμενες συνθήκες και όταν το OD τους έφτασε το 0.6 ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με την προσθήκη IPTG. Συγκεκριμένα, καλλιέργειες επωάστηκαν στους 16 °C και 37 °C για 3h, 5h και 16h. Σε κάθε μία από αυτές τις περιπτώσεις προστέθηκε IPTG σε συγκέντρωση 0.1mM, 0.5mM και 1mM. (Εικ.13).

Μετά την επαγωγή τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, επωάστηκαν με διάλυμα ομογενοποίησης και αφού σπάσανε με υπερήχους φυγοκεντρήθηκαν ώστε να συλλεχθούν οι εκφρασμένες πρωτεΐνες στην υπερκείμενη φάση. Αυτές αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου- SDS 12%, η οποία βάφτηκε με την χρωστική Coomassie και παρατηρήθηκε η ύπαρξη μίας ζώνης στα σωστά μοριακά βάρη όπου αναμενόταν οι A1 και A2 περιοχές του vWF (Εικ. 12).



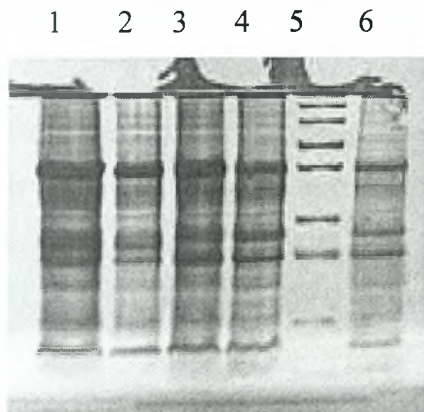
Εικ.12. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου SDS 12%. Στην εικόνα στην διαδρομή 2 φαίνεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Το βέλος 1 δείχνει τις πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF (περίπου 60kDa) στις σειρές 2 ,3 και 4,5,6 αντίστοιχα, ενώ το βέλος 2 δείχνει την έκφραση της GST ουράς (περίπου 25kDa).

Προκειμένου να εξακριβωθεί ότι επρόκειτο για τις σωστές πρωτεΐνες, πραγματοποιήθηκε και ανοσοαποτύπωση τύπου Western, όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που θα αναγνώριζε ειδικά την GST «ουρά». Όπως φαίνεται και στην εικόνα το anti-GST αντίσωμα έδωσε αποτύπωμα στις αναμενόμενες θέσεις (περίπου 60kDa) (Εικ. 13)



Εικ.13 Στην εικόνα αυτή φαίνεται το αποτύπωμα που προκύπτει μετά από ανοσοαποτύπωση τύπου Western. Στις διαδρομές 2 και 3 χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα antiGST και έδωσε αποτύπωμα στις αναμενόμενες θέσεις για τις A1 και A2 περιοχές αντίστοιχα σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακών βαρών που φαίνεται στην σειρά 1.

Από τα αποτελέσματα, φάνηκε ότι καλύτερη έκφραση των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε σε συνθήκες επώασης των καλλιιεργειών στους 16 °C για 16h με συγκέντρωση IPTG 0.1mM.



Εικ. 14 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου SDS 12%. Στην εικόνα αυτή φαίνονται η δοκιμασίες υπερέκφρασης. Συγκεκριμένα:

Στην διαδρομή 1 πρόκειται για τις πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά από επώαση στους 16 °C για 16h και συγκέντρωση IPTG 0.1mM.

Στην διαδρομή 2 πρόκειται για τις πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά από επώαση στους 16 °C για 5h και συγκέντρωση IPTG 0.1mM.

Στην διαδρομή 3 πρόκειται για τις πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά από επώαση στους 37°C για 16h και συγκέντρωση IPTG 0.1mM.

στην διαδρομή 4 πρόκειται για τις πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά από επώαση στους 37°C για 5h και συγκέντρωση IPTG 0.1mM.

στην διαδρομή 5 ο μάρτυρας μοριακών βαρών.

στην διαδρομή 6 είναι οι πρωτεΐνες πριν την προσθήκη IPTG και αρα πριν την επαγωγή υπερέκφρασης.

Γ.6. Βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, θεωρήθηκε απαραίτητο να δοκιμαστεί και ο μετασχηματισμός κυττάρων του στελέχους Rosetta.

Βακτηριακές καλλιέργειες των μετασχηματισμένων κυττάρων Rosetta αναπτύχθηκαν στις κατάλληλες συνθήκες (37 °C) μέχρι το OD να φτάσει το 0.6 και έπειτα ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με προσθήκη 0.1mM IPTG και overnight επώαση στους 16 °C. Ο έλεγχος της έκφρασης των

πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή ακρυλαμιδίου 12%. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα του στελέχους Rossetta, ήταν σε θέση να εκφράζουν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες όπως και τα BL21, αλλά δεν έδιναν ιδιαίτερα υψηλότερη ή ταχύτερη παραγωγή. Έτσι, επιλέχθηκαν τα κύτταρα του στελέχους BL21 για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα.

Αναπτύχθηκαν λοιπόν καλλιέργειες 8L των μετασηματισμένων κυττάρων BL21 για την κάθε μία από τις δύο πρωτεΐνες και αφού ακολούθησε επώασή τους στις συνθήκες που επιλέχθηκαν στα προηγούμενα στάδια, συλλέχθηκαν οι πρωτεΐνες σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε στην παράγραφο B.2.13.

Επίσης για να αυξηθεί η διαλυτότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών δοκιμάστηκε και η επεξεργασία τους με το αντιδραστήριο sarcosyl το οποίο όπως φαίνεται από διάφορες μελέτες χρησιμοποιείται ευρέως για τον λόγο αυτό. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε απαιτούσε λύση των κυττάρων με ένα lysis buffer που περιείχε 50mM Tris pH 8, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1% NP-40 στο οποίο προστίθεται PMSF και λυσοζύμη και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 1 ώρα. Έπειτα προστίθενται 5mM DTT και μετά από επώαση για 15min σε RT ακολουθεί και η πρόσθεση 1,5% sarcosyl και ακολούθως επώαση 30min σε RT. Έπειτα η διαδικασία είναι ίδια με αυτή της παραγράφου B.2.13.

Η ηλεκτροφόρηση σε SDS πηκτή ακρυλαμιδίου 12% των πρωτεϊνών που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία δεν φάνηκε αύξηση της διαλυτότητας των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε τέτοιο βαθμό ώστε να επιλεγεί τελικά η χρησιμοποίηση του αντιδραστηρίου sarcosyl για την λύση των κυττάρων.

Γ.7. Καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με στήλες Ni και GSH

Για να απομονωθούν οι υπό μελέτη πρωτεΐνες από το μίγμα των πρωτεϊνών που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο ακολούθησε καθαρισμός τους με στήλη Ni.

Εφόσον οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν περιέχουν μια ουρά 6His θεωρήθηκε ότι θα συγκρατούνταν στην στήλη και μετά από την έκλουσή τους από αυτήν θα διαχωριζόταν από τις υπόλοιπες του μίγματος. Μετά το τέλος της διαδικασίας που περιγράφεται στην παράγραφο *B.2.14*, αφού ακολούθησε έλεγχος του προϊόντος που προέκυψε σε πηκτή ακρυλαμιδίου 12%, έγινε φανερό ότι ο καθαρισμός δεν ήταν ο αναμενόμενος. Ίσως επειδή στο μίγμα των πρωτεϊνών περιεχόταν και άλλες πρωτεΐνες που περιείχαν κάποιες His, συγκρατήθηκαν και αυτές στην στήλη και έτσι το προϊόν έκλουσης περιείχε και άλλες πρωτεΐνες πέραν των επιθυμητών.

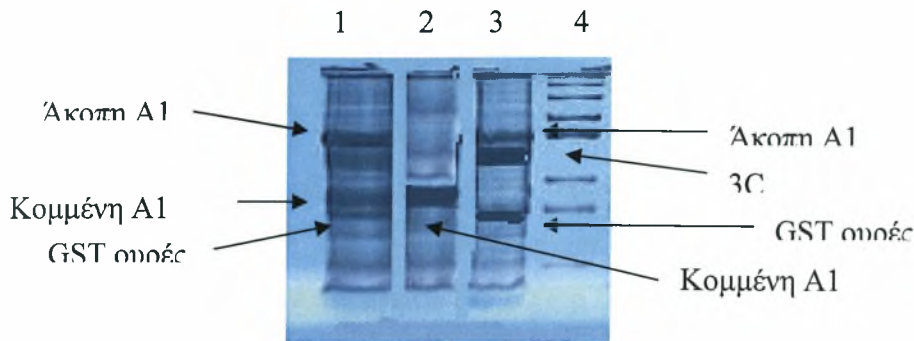
Για να επιτευχθεί λοιπόν καλύτερος καθαρισμός επιλέχτηκε να περάσει το μίγμα των πρωτεϊνών από στήλη GSH. Οι υπό μελέτη πρωτεΐνες περιέχουν πέραν της ουράς των 6His και μια GST ουράς. Έτσι θα συγκρατούνταν στη στήλη GSH και μετά την έκλυση με γλουταθειόνη θα απομονωνόταν από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του μίγματος. Ο έλεγχος των προϊόντων έκλουσης έγινε σε πηκτή ακρυλαμιδίου 12% και φάνηκε ότι ο καθαρισμός γινόταν με επιτυχία. Στο προϊόν έκλουσης υπήρχαν η πρωτεΐνη A1 ή A2 συνδεδεμένη με την GST ουρά, μια ποσότητα κομμένης πρωτεΐνης, καθώς και μια ποσότητα της GST ουράς.

Γ.8. Πέψη της GST ουράς από την πρωτεάση 3C

Το επόμενο βήμα ήταν να κοπεί η GST ουρά από τις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Για να πραγματοποιηθεί αυτό επιλέχτηκε η πρωτεάση 3C. Μετά από δοκιμές φάνηκε ότι η πρωτεάση είναι λειτουργική σε αναλογία 1:20 (πρωτεάση: πρωτεΐνη). Επιλέχτηκε ένα πρωτόκολλο (παρ *B.2.18*.) μέσω του οποίου έγιναν εφικτά τόσο η πέψη της GST ουράς όσο και η απομόνωση της κομμένης πλέον πρωτεΐνης από τα υπόλοιπα κλάσματα (GST ουρά, πρωτεάση 3C, άκοπη πρωτεΐνη).

Εφόσον όλα τα προαναφερθέντα κλάσματα πέραν της κομμένης πρωτεΐνης περιέχουν GST θα κατακρατηθούν στην στήλη και τελικά μόνο η κομμένη πρωτεΐνη θα περάσει από αυτήν (flow through). Από τον ηλεκτροφόρηση λοιπόν του flow

through σε πηκτή ακρυλαμιδίου 12% φάνηκε ότι πραγματικά απομονωνόταν η κομμένη πρωτεΐνη. (Εικ. 14).



Εικ. 14. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου 12% των αποτελεσμάτων καθαρισμού με στήλη γλουταθειόνης. Στην διαδρομή 1 φαίνονται οι πρωτεΐνες πριν περάσουν από την στήλη. Στην διαδρομή 2 είναι το flow through όπου περνάει μόνο η κομμένη πρωτεΐνη, ενώ στην διαδρομή 3 είναι το προϊόν της έκλουσης όπου φαίνονται οσες πρωτεΐνες κρατήθηκαν στην στήλη, δηλαδή περιείχαν GST και είναι η άκοπη, η 3C και οι GST ουρές. Στην διαδρομή 4 φαίνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών.

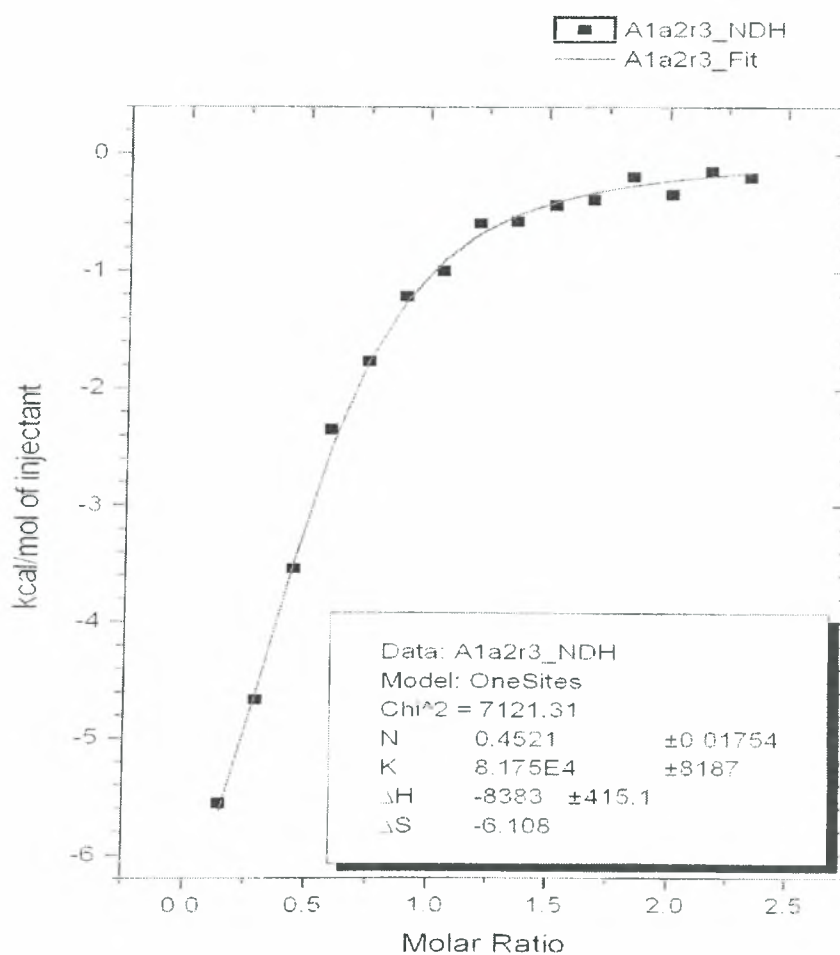
Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθει καθαρισμός των επιθυμητών πρωτεϊνών σε συγκέντρωση 0.6μg/ml για την Α1 και 0.8μg/ml για την Α2.

Για να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται για τις σωστές πρωτεΐνες, η μπάντα που προέκυψε από την παραπάνω ηλεκτροφόρηση κόπηκε από την πηκτή ακρυλαμιδίου και στάλθηκε για mass spectrometry μια διαδικασία αλληλούχισης πρωτεϊνών. Τα πεπτίδια που προέκυψαν επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για τις επιθυμητές πρωτεΐνες:

AFVVDMMER
 VAVVEYHDGSHAYIGLK
 VAVVEYHDGSHAYIGLKDR
 YAGSQVASTSEVLK
 YAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSK
 YTLFQIFSK
 KVIVIPVGIGPHANLK
 VIVIPVGIGPHANLK
 AFVLSSVDELEQQR

Γ.9. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών A1 και A2 με την μέθοδο της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης ITC

Οι καθαρές πρωτεΐνες A1 και A2 που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία στάλθηκαν για μελέτη της αλληλεπίδρασής τους μέσω ενός πειράματος θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης ITC όπου στο κελί του δείγματος τοποθετήθηκε η A1 πρωτεΐνη ενώ η σύριγγα έγχυε την πρωτεΐνη A2. Από το παραπάνω πείραμα προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα (Εικ.15).



Εικ.15. Κ αμπύλες ITC για την αλληλεπίδραση των επικρατειών A1 και A2 του παράγοντα πήξης του αίματος vWF.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα οι πρωτεΐνες A1 και A2 του παράγοντα πήξης του αίματος vWF που καθάρισαν είναι λειτουργικές και αλληλεπιδρούν σε στοιχειομετρία $N=0.4521$, που σημαίνει ότι περίπου δύο μόρια A1 αντιδρούν με 1 μόριο A2 και η σταθερά σύνδεσης K_b είναι $1/8.177 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, δηλαδή $K_b=1.22 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$, ενώ η δέσμευση της πρωτεΐνης A2 στην A1 είναι μια αντίδραση που εννοείται από την ενθαλπία

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο λόγος που επιλέξαμε να ασχοληθούμε με τον παράγοντα πήξης του αίματος vWF και ιδιαίτερα τις επικράτειες A1 και A2 είναι ο ιδιαίτερος ρόλος που έχουν στην αιμόσταση. Ο vWF είναι αφενός υπεύθυνος για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο των τραυματισμένων αγγείων και αφετέρου διατηρεί την ακεραιότητα του παράγοντα VIII της πήξης, με τον οποίο συνδέεται, προστατεύοντάς τον από πρωτεολυτική καταστροφή στην κυκλοφορία. Η A1 περιοχή φαίνεται πως δεσμεύεται με τον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα των αιμοπεταλίων GPIb προωθώντας έτσι την πήξη του αίματος, ενώ αντίθετα η A2 περιοχή συνδέεται στην A1 εμποδίζοντας την σύνδεση της στον GPIb και άρα την πήξη του αίματος. Επίσης η A2 περιέχει και μια θέση πέψης για την πρωτεάση ADAMTS-13 που συνδέεται με την φυσιολογική ανακύκλωση του vWF.

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση, η υπερέκφραση και η μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF. Η ανάγκη μελέτης αυτών των επικρατειών προέκυψε από αποτελέσματα άλλων μελετών που υποδεικνύουν ότι η A2 περιοχή προσδένεται στην A1 και εμποδίζεται έτσι η σύνδεσή της στα αιμοπετάλια και άρα η πήξη του αίματος. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα αν βρεθούν στοιχεία για την αλληλεπίδραση των δύο επικρατειών θα μπορούσαν να σχεδιαστούν κατάλληλα μόρια που θα συνδέονται στην A1 περιοχή, μιμούμενα τον τρόπο σύνδεσης της A2 περιοχής ώστε να εμποδίζουν την πήξη του αίματος. Συνεπώς τα μόρια αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαλυτοί αντιθρομβωτικοί παράγοντες.

Η σύνθεση του vWF γίνεται αποκλειστικά στα μεγακαρυοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 2.813 αμινοξέων. Η A1 περιοχή αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 497-716, ενώ η A2 περιοχή στα κατάλοιπα 717-909. Για τον λόγο αυτό, αφού απομονώθηκε RNA από ενδοθηλιακά κύτταρα και συντέθηκε το αντίστοιχο cDNA σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι primers, ώστε με την μέθοδο της PCR να ενισχυθούν οι περιοχές A1 και A2. Τα ενισχυμένα αυτά προϊόντα κλωνοποιήθηκαν στον βοηθητικό βακτηριακό φορέα pSCA με TA-κλωνοποίηση και έγινε απευθείας μετασχηματισμός κυττάρων DH5a (Strataclone kit, Stratagene). Τελικά οι κωδικές περιοχές των A1 και A2 επικρατειών κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιακό φορέα έκφρασης pet49b, μετά από πέψη με τις ενδονουκλεάσες

περιορισμού BamHI και HindIII προκειμένου να παραχθούν ανασυνδυασμένες A1 και A2 περιοχές που θα φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μια ουρά His και μια GST ουρά. Οι ουρές αυτές είναι χρήσιμες για τον μετέπειτα καθαρισμό των πρωτεϊνών αυτών με στήλες Ni και γλουταθειόνης. Με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς που μετά από αλληλούχηση επιβεβαιώθηκε ότι περιείχαν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες, μετασηματίστηκαν κύτταρα BL21 και Rosetta ώστε αυτές να εκφραστούν. Αφού διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν ιδιαίτερες διαφορές στην απόδοση των δύο στελεχών, χρησιμοποιήθηκαν τελικά τα απλούστερα BL21 για την παραγωγή των A1 και A2 περιοχών του vWF σε μεγάλη κλίμακα. Ακολούθησαν διάφορες δοκιμασίες υπερέκφρασης των πρωτεϊνών αυτών, που περιλάμβαναν διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG και διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους επώασης, ώστε να καθοριστούν οι συνθήκες που επιτρέπουν την καλύτερη έκφρασή τους. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως μεγαλύτερη έκφραση πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση IPTG 0,1mM και overnight επώαση στους 16 °C.

Καθώς στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών είχαν εισαχθεί ουρές His και GST ακολούθησαν καθαρισμοί των παραγόμενων πρωτεϊνών με στήλες Ni και γλουταθειόνης. Η πρώτη στήλη θα συγκρατούσε όσες πρωτεΐνες περιείχαν His και άρα και τις υπό μελέτη. Όμως ο καθαρισμός δεν ήταν ικανοποιητικός και έτσι ακολούθησε καθαρισμός με στήλη γλουταθειόνης που έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Επόμενο βήμα στην πειραματική διαδικασία ήταν να αποκοπεί η GST-ουρά που είχε προστεθεί στις A1 και A2 πρωτεΐνες. Αυτό έγινε χρησιμοποιώντας την ανασυνδυασμένη πρωτεάση 3C που περιείχε επίσης GST-ουρά. Η πέψη των A1 και A2 πρωτεϊνών από την 3C έγινε πάνω σε στήλη γλουταθειόνης. Έτσι επιτεύχθηκε τόσο η πέψη των GST ουρών όσο και η απομόνωση των κομμένων πλέον πρωτεϊνών, αφού η στήλη συγκράτησε όσες πρωτεΐνες περιείχαν GST-ουρές, δηλαδή την 3C, τις άκοπες A1 και A2 καθώς και τις ουρές GST, ενώ άφησε να περάσουν οι κομμένες A1 και A2. Οι απομονωμένες κομμένες πρωτεΐνες αφού πρώτα στάλθηκαν για mass spectrometry, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται για τις A1 και A2 περιοχές του vWF, στάλθηκαν για ένα πείραμα ITC ώστε να μελετηθεί η αλληλεπίδρασή τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι A1 και A2 πρωτεΐνες που καθαρίσαμε είναι λειτουργικές και δημιουργούν σύμπλοκο σε μια ενθαλπικά καθοδηγούμενη αντίδραση με στοιχειομετρία 0.4521 που υποδηλώνει ότι 2 μόρια A1 πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν με 1 μόριο A2 πρωτεΐνης ώστε να σχηματιστεί σύμπλοκο με σταθερά σύνδεσης $K_b = 1.22 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$. Οι θερμοδυναμικές αυτές πληροφορίες

παρέχουν μια εικόνα για την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών και βοηθούν στην αναγνώριση κρίσιμων στοιχείων του τρόπου αλληλεπίδρασης των δύο μορίων.

Οι πληροφορίες αυτές είναι χρήσιμες ώστε να μπορέσουν να σχεδιαστούν διαλυτοί αντιθρομβωτικοί παράγοντες, δηλαδή μόρια που θα μιμούνται την A2 και θα αλληλεπιδρούν όσο πιο σταθερά γίνεται με την A1 αναστέλλοντας την δέσμευσή της στον υποδοχέα των αιμοπεταλίων GPIb και έτσι την πήξη του αίματος. Ακόμη η στοιχειομετρία της αντίδρασης δίνει πληροφορίες για την απαιτούμενη ποσότητα των παραπάνω μορίων που πρέπει να χορηγηθεί ώστε να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Βέβαια επιπλέον δεδομένα είναι απαραίτητα για μελέτη της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών και για αυτό κρίνεται απαραίτητη η συνέχεια της έρευνας με πειράματα φθορισμού, μεταλλαξιγένεσης και σίγουρα κρυστάλλωσης τους ώστε να υπάρξει μια σαφέστερη εικόνα της δομής και της δράσης των δύο πρωτεϊνών.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. von Willebrand E.A. *Hereditar pseudoheemofili. Finska Lakaresallskaptets Handlingar* 1926, 672:7-112
2. Rodeghiero F., Castaman G., Dini E. *Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. Blood* 1987, 69:454-9
3. Savage B., Saldivar E., Ruggeri ZM. *Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. Cell* 1996, 84:289-97
4. Goto S., Salomon DR., Iked Y., Ruggeri ZM. *Characterization of the unique mechanism mediating the shear- dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. J. Biol Chem* 1995, 270:23352-61
5. Ruggeri ZM., Dent JA., Saldivar E. *Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. Blood* 1999, 94:172-8
6. Brinkhous KM., Sandberg H., Garris JB., Mattsson C., Palm M., Griggs T. *Purified human factor VIII procoagulant protein: comparative hemostatic response after infusions into hemophilic and von Willebrand disease dogs. Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82:8752-6
7. Lombardi R., Mannucci PM., Seghatchian MJ., Garcia V., Coppola R. *Alterations of factor VIII von Willebrand factor in clinical conditions associated with an increase in its plasma concentration. Br J Haematol* 1981, 49:61-8
8. Ginsburg D., Handin R.I., Bonthron D.T., Donfon T.A., Bruns G.A., Latt S.A., Orkin S.H. *Science* 1985, 228:1401-1406
9. Verweij C.L., de Vries C.J.M, Distel B, van Zonneveld A.J., van Kessel A.G., van Mourik J.A., Pannekoek H. *Nucleic Acids Res* 1985, 13:4699-4717
10. Mancuso D.J., Tuley E.A., Westfield L.A., Worrall N.K., Sbelton-Inloes B.B., Sorace J.M., Alevy Y.G., Sadler J.E. *J. Biol. Chem.* 1989, 264:19514-19527
11. Giancarlo Castman, Augusto B. Federici, Francesco Rodeghiero, Pier Mannuccio Mannucci. *Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. Haematologica* 2003, 88:94-108
12. Mancuso D.J., Tuley EA., Westfeld LA., Lester-Mancuso TL., Le Beau MM., Sorace JM. *Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. Biochemistry* 1991, 30:253-69

13. Charles A. Wittaker, Richard O. Hynes. *Distribution and Evolution of von Willebrand/Integrin A domains: Widely Dispersed Domains with Roles in Cell Adhesion and Elsewhere*. *Molecular Biology of the Cell* 2002, 264:19514-19527
14. Ruggeri ZM. *Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation*. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001, 14:257-79
15. Wagner DD. *Cell Biology of von Willebrand factor*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1990, 6:217-46
16. Mayadas TN., Wagner DD. *Von Willebrand factor biosynthesis and processing*. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1991, 614:156-66
17. Dobrkovska A., Krzensk U., Chediak JR. *Pharmacokinetics efficacy and safety of Humate-P in von Willebrand disease*. *Haemophilia* 1998, 4 Suppl 3:33-9
18. Zimmerman TS., Dent JA., Ruggeri ZM., Nannini LH. *Subunit composition of plasma von Willebrand factor: cleavage in present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers*. *J. Clin Invest* 1986, 77:947-51
19. Xie L., Chesteman CN., Hogg PJ. *Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1*. *J. Exp. Med.* 2001, 193:1341-9
20. Tsai HM., Sussman II., Nagel RL. *Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma*. *Blood* 1994, 83:2171-9
21. Dent JA., Galbusera M., Ruggeri ZM. *Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit*. *J. Clin Invest* 1991, 88:774-82
22. Furlan M., Robles R., Afolter D., Meyer D., Baillod P., Lammle B. *Triplet structure of von Willebrand factor prevents proteolytic degradation of high molecular weight multimers*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1993, 90:7503-7
23. Kokame K., Matsumoto M., Fujimura Y., Miyata T. *VW73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13*. *Blood* 2004, 103:607-12
24. Goodeve A., Eikenbood JC., Ginsburg D., Hilbert L., Mazurier C., Peake IR. *A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor*. *Thromb Haemost* 2001, 85:929-31
25. Zaverio M. Ruggeri, Jerry Ware. *Von Willebrand Factor*. *FASEBJ* 1993, 7:308-316

26. J. Evan Sadler. Minireview: von Willebrand Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1991, Vol. 866, No 34, Issue of December 5, pp 22777-22780
27. Verweij C.L., Hart M., Pannekoek H. *EMBO J.* 1987, 6:2885-2890
28. Wise R.J., Pittman D.D., Handin R.J., Orkin S.H. *Cell* 1988, 52:229-236
29. Mayadas T.N., Wagner D.D. *J. Biol. Chem.* 1989, 264:13497-13503
30. Weiss H.J., *Ann N.Y. Acad. Sci* 1991, 614:125-137
31. Sadler J.E., in the *Metabolic Basis of Inherited Disease* 1989, (Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D.) 6th Ed, pp 2171-2188 McGraw-Hill book Ca, N.Y.
32. Mohri H., Fujimura Y., Shima M., Yoshioka A., Houghten R.A., Ruggeri Z.M., Zimmerman T.S. *J. Biol. Chem.* 1988, 263:17901-17904
33. Fujimura Y., Holland I.Z., Rurperi Z.M., Zimmerman T.S. *Blood* 1987, 70:985-988
34. Andrews K., Gorman J.J., Booth W.J., Corino G.L., Castaldi P.A., Berndt M.C. *Biochemistry* 1989, 28:8326-8336
35. Roberts D.D., Williams S.B., Gralnick H.R., Ginsbure V. *J. Biol. Chem.* 1986, 261:3306-3309
36. Christophe O., Obert B., Meyer D., Girma J.P. *Thromb. Haemostasis* 1991, 65:797
37. Marti T., Roesselet S., Titani K., Walsh K.A. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* 1987, 26:8099-8109
38. Nishio K., Anderson P.J., Zheng X.L., Sadler J.E. Binding of platelet glycoprotein Iba to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS-13. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2004, 101:10578-83
39. Dong J.F., Moake J.L., Bernardo A., Fujikawa K., Ball C., Nolasco L., Lopez J.A., Cruz M.A. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J. Biol. Chem* 2003, 278:29633-9
40. Majerus E.M., Anderson P.J., Sadler J.E. Characterization of the binding interaction between ADAMTS-13 and vWF. *Blood* 2004, 104:150a
41. Zhang W., Motto D., Ginsburg D. ADAMTS-13 binds vWF via its C-terminal CUB2 domain. *Blood* 2004, 104:39a
42. Alessandra Casonatol, Luigi De Marco, Lisa Gallinarol. Maryta Sztukowskal, Mario Mazzuccato, Monica Battiston, Antonio Pagnal, Zaverio M. Ruggeri. Altered von Willebrand factor subunit proteolysis and multimer processing with the Cys2362Phe mutation in the B2 domain. 2007
43. D' Souza S.E., Ginsberg M.H., Plow E.F. *Trends Biochem* 1991, 16:246-250

44. Sugimoto M., Mohri H., McClintock R.A., Ruggeri ZM. Identification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with botrocetin. *J. Biol. Chem* 1991, 266:18172
45. P. Vincent Jenkins, K. John Pasi, Stephen J. Perkins. Molecular Modeling of Ligand and Mutatio Sites of the Type A Domains of Human von Willebrand Factor and Their Relevance to von Willebrand's Disease. *Blood Vol 91 No 6 (March 15) 1998, pp 2032-2044*
46. Furlan M., Robles R., Lamie B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996, 87:4223-34
47. Dent JA., Berkowitz SD., Ware J., Kasper CK., Ruggeri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1990, 87:6306
48. Shelton-Inloes BB., Titani K., Sadler JE. cDNA sequences for human vWF reveal five types of repeated domain and five protein sequence polymorphisms. *Biochemistry* 25:3164,986
49. Cruz MA., Yuan H., Lee JR., Wise RJ., Hardin RI. Interaction of the vWF with collagen. *J. Biol. Chem.* 270:10822,995
50. Lankhof H., van Hoeij M., Schiphorst ME., Bracke M., Wu Y-P., Vink T., de Groot PG. Sixma JJ:A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost* 1996, 75:950
51. Velazquez-Campoy A., Y. Kiso, and E. Freire "The Binding Energetics of First and Second Generation HIV-1 Protease Inhibitors: Implications for Drug Design," *Arch Biochim Biophys.* 2001, 390: 169–175.