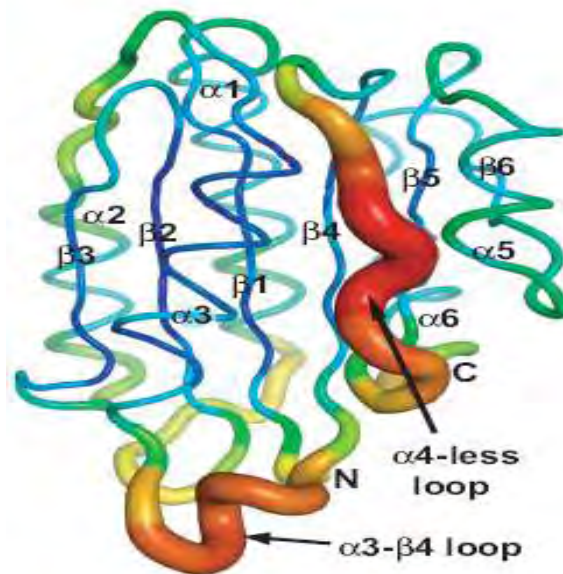




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΤΩΝ Α1 ΚΑΙ Α2
ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΩΝ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΗΞΗΣ VON
WILLEBRAND ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ»**



ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

Τριμελής Επιτροπή

- ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ, Επίκουρος Καθηγήτης Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγήτης Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ΝΟΛΗΣ ΗΛΙΑΣ, Συμβασιούχος Διδάσκων ΠΔ 407/80

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ.Κοντού Μαρία, Επίκουρο Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, πρωτίστως για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτορα Καρούλια Ζωή, για την καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθειά της τόσο κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και στην συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
A.1.1. Ο παράγοντας von Willebrand.....	5
A.2. Δομή και μοριακή βιολογία του vWF.....	6
A.2.1. vWF μια πολυμερής πρωτεΐνη.....	6
A.2.2. Δομή γονιδίου.....	7
A.3. Βιοσύνθεση του vWF.....	11
A.3.1. Ενδοθηλιακά κύτταρα.....	11
A.3.2. Μεγακαρυοκύτταρα.....	12
A.4. Αποθήκευση και έκκριση του vWF.....	13
A.4.1. Σωματίδια Weibel Palade.....	13
A.4.2. α-κοκκία αιμοπεταλίων.....	15
A.5. Οι λειτουργικές επικράτειες του vWF.....	16
A.6. Η σύνδεση του vWF με τον παράγοντα πήξης VIII.....	17
A.7. Η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13 και ο ρόλος της στην πήξη του αίματος.....	18
A.8. Συσχέτιση δομής και λειτουργίας των επικρατειών A1, A2 και A3.....	20
A.9. Σχεδιασμός πιθανών μοντέλων αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF.....	25
A.10. Μελέτη αλληλεπίδρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού.....	29
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	31
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
B.1. Αντιδραστήρια.....	32
B.2. Βακτηριακά στελέχη-πλασμιδιακοί φορείς.....	34
B.2.1. Το σύστημα Pet.....	34
B.2.2. Επιδεκτικά κύτταρα BL21(DE3) PlysS μετασηματισμένα με το πλασμίδιο.....	36
B.3. Μοριακές τεχνικές.....	37

B.3.1. Απομόνωση πλασμιδίων (mini-preps).....	37
B.3.2. Ενζυμικές πένψεις-κατεργασία πλασμιδιακών φορέων.....	38
B.4. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων και καλλιέργειες.....	38
B.4.1. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων και καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα.....	38
B.4.2. Καλλιέργεια κυττάρων σε υγρό υπόστρωμα.....	40
B.5. Υπερέκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	40
B.5.1. Χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου.....	40
B.5.1.2. Επιμέρους τεχνικές και διαλύματα.....	42
B.5.2. Αποκοπή πρόσθετων πεπτιδικών τμημάτων (His-tag, NusA tag), με χρήση πρωτεάσης TEV.....	44
B.6. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με μέθοδο Bradford.....	45
B.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (SDS Page).....	45
B.8. Φασματοσκοπικές τεχνικές.....	48
B.8.1. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (Circular Dichroism-CD).....	49
B.8.2. Φασματοσκοπία φθορισμού.....	50
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
Γ.1. Υπερέκφραση και απομόνωση πολυπεπτιδίων.....	52
Γ.1.1. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF.....	52
Γ.1.2. Απομόνωση της πρωτεάσης TEV.....	53
Γ.1.3. Υπερέκφραση και απομόνωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2(A,B,Γ).....	55
Γ.2. Μελέτη αλληλεπίδρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με φασματοσκοπία φθορισμού.....	58
Γ.3. Μελέτη αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της επικράτειας A2 του vWF A, B και Γ με την A1 φυσιολογικού τύπου με φασματοσκοπία φθορισμού.....	59
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Ο παράγοντας von Willebrand

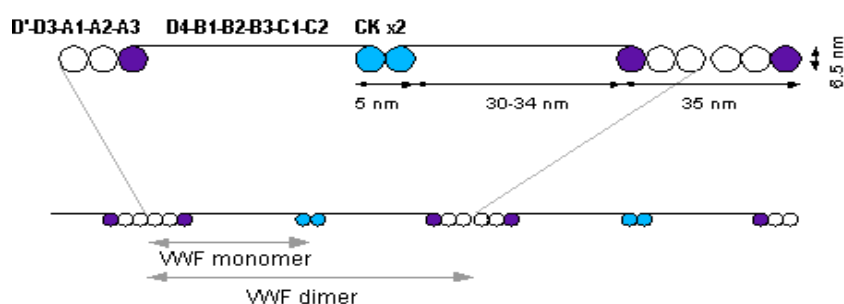
Ο παράγοντας vWF είναι μια μεγάλη πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη με διακριτούς ρόλους: α) Μεσολαβεί στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων και στον σχηματισμό θρόμβου στα σημεία όπου υπάρχει αγγειακός τραυματισμός και β) χρησιμεύει ως φορέας του παράγοντα πήξης VIII στο αίμα, όπου εντοπίζεται με την μορφή συμπλέγματος παράγοντα VIII/vWF. Και οι δύο λειτουργίες είναι απαραίτητες για την φυσιολογική παύση της αιμορραγίας (αιμόσταση). Ωστόσο σε παθολογικές καταστάσεις, ο vWF μπορεί να συμμετέχει σε διεργασίες που οδηγούν στην απόφραξη των αρτηριών (θρόμβωση). Εκ γενετής ανωμαλίες του vWF, οδηγούν στην πιο διαδεδομένη κληρονομήσιμη διαταραχή της αιμόστασης, την ασθένεια von Willebrand.

Αρχικά, κατά τον σχηματισμό θρόμβου ο vWF εντοπίζεται στην υπενδοθηλιακή μήτρα και απορροφάται ταχύτατα από τις εκτεθειμένες δομές του τραυματισμένου αγγείου, αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα του γλυκοπρωτεϊνικού υποδοχέα (GP) Ib-IX-V των αιμοπεταλίων. Αυτό πυροδοτεί την προσκόλληση των αιμοπεταλίων και δημιουργεί ένα σήμα που ενεργοποιεί τον υποδοχέα-σύμπλεγμα GPIIb-IIIa. Μέσω της λειτουργίας του ενεργοποιημένου υποδοχέα GB IIb-IIIa, τα αιμοπετάλια που προσκολλώνται στην περιοχή τραυματισμού εξαπλώνονται, η προσκόλληση γίνεται μη αντιστρεπτή και επιπλέον αιμοπετάλια επιστρατεύονται στον θρόμβο που μεγαλώνει. Αυτή η τελευταία διαδικασία διεκπεραιώνεται τόσο από vWF που κυκλοφορεί ελεύθερα στο αίμα, όσο και από vWF που απελευθερώνεται επί τόπου από διεγερμένα αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα. Καμιά από τις παραπάνω διαδικασίες δεν είναι αποκλειστική ευθύνη του vWF, καθώς άλλες συγκολλητικές πρωτεΐνες μπορούν να μεσολαβήσουν σε μια ή περισσότερες από αυτές, ανάλογα με τις τοπικές αιμοδυναμικές συνθήκες που επικρατούν. Ωστόσο κάτω από συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης που απαντάται σε μικρά αγγεία ή αρτηρίες με στένωση, ο vWF φαίνεται απόλυτα απαραίτητος για τον σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου [1,2].

A.2. Δομή και μοριακή βιολογία του vWF

A.2.1. vWF μια πολυμερής πρωτεΐνη

Ο ώριμος vWF έχει μια πολυμερής δομή και υφίσταται ως μια σειρά ολιγομερή τα οποία περιέχουν έναν μεταβλητό αριθμό υπομονάδων, ο οποίος κυμαίνεται από ένα ελάχιστο 2 υπομονάδων έως ένα μέγιστο 50-100 υπομονάδων (**Εικόνα A.1**). Αυτή η μοριακή οργάνωση παρέχει τη δυνατότητα για πολλαπλά σημεία σύνδεσης με τα αιμοπετάλια και τις ενδοθηλιακές δομές. Μεμονωμένες μονάδες κυμαίνονται σε μάζα από 500 kDa έως πάνω από 10.000kDa, το τελευταίο μέγεθος αποτελεί την μεγαλύτερη γνωστή διαλυτή πρωτεΐνη στο ανθρώπινο πλάσμα. Η ανομοιογένεια στα μεγέθη του vWF είναι μεγάλη και οφείλεται στην ύπαρξη μεταμεταφραστικών πρωτεολυτικών τροποποιήσεων, οι οποίες οδηγούν σε ολιγομερή που περιέχουν μεταβλητό μίγμα από τροποποιημένες υπομονάδες [3].



Εικόνα A.1: Ο πολυμερισμός του vWF

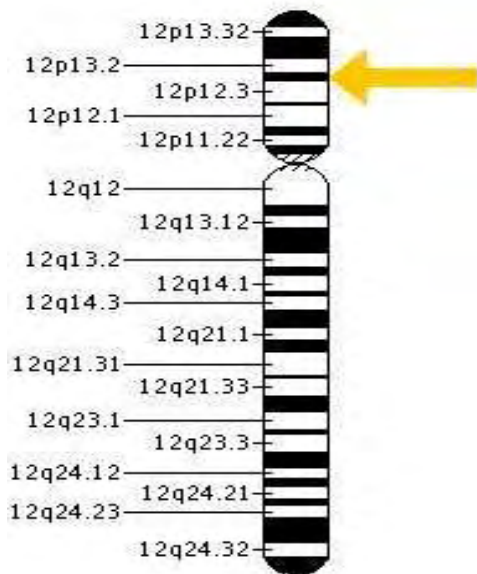
Τα μεγαλύτερα ολιγομερή του vWF, τα οποία είναι και τα πιο αποτελεσματικά στην πρόωση της προσκόλλησης και της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων, βρίσκονται σε κυτταρικά αποθηκευτικά κοκκία και εντοπίζονται μόνο παροδικά στο αίμα φυσιολογικών ενηλίκων. Αυτή η «απομόνωση» από την κυκλοφορία και η ρυθμιζόμενη απελευθέρωση σε ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη, διασφαλίζει την συμμετοχή πολύ δραστικών πολυμερών του vWF στην αιμόσταση, ενώ παράλληλα περιορίζει την παρουσία τους στο αίμα όπου θα μπορούσαν δυνητικά να προκαλέσουν τον σχηματισμό παθολογικών θρόμβων. Οι μηχανισμοί που περιορίζουν φυσιολογικά την συσσώρευση των μεγαλύτερων μορίων του vWF στην κυκλοφορία του αίματος

πρέπει να τίθενται σε εφαρμογή μόνο μετά τη γέννα, όπως μαρτυρούν τα «ασυνήθιστα μεγάλα» πολυμερή του vWF σε εμβρυακό και νεογνικό αίμα [4].

Η ώριμη υπομονάδα του vWF περιέχει 2.050 αμινοξικά κατάλοιπα και 22 πλευρικές υδατανθρακικές αλυσίδες, 10 από τις οποίες είναι συνδεδεμένες με δεσμούς O σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης και οι υπόλοιπες 12 με δεσμούς N σε κατάλοιπα ασπαραγίνης [5]. Η υπολογιζόμενη περιεκτικότητα υδατανθράκων του vWF κυμαίνεται μεταξύ 10 και 19% της συνολικής μάζας της ώριμης υπομονάδας, η οποία υπολογίζεται περίπου 278.000 daltons [5]. Ένα δομικό χαρακτηριστικό του vWF είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε κυστεΐνη, 169 από τα συνολικά 2.050 κατάλοιπα. Αυτά τα κατάλοιπα κυστεΐνης είναι ουσιώδη για τη δομή του vWF, γιατί συνδέουν τις υπομονάδες σε μια ανώτερη δομή [6]. Διαμοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί υφίστανται σε δύο περιοχές της ώριμης υπομονάδας του vWF, μια αμινο-τελική (κατάλοιπα 283-695) μια καρβόξυ-τελική περιοχή (κατάλοιπα 1908-2.050), οι οποίες περιέχουν 30 και 18 κατάλοιπα κυστεΐνης αντίστοιχα [6]. Δεν ανιχνεύονται ελεύθερες σουλφιδικές ομάδες στον vWF, οπότε θεωρείται ότι τα κατάλοιπα κυστεΐνης που δεν σχηματίζουν διαμοριακές «δισουλφιδικές γέφυρες», ενώνονται με ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς [6].

A.2.3. Δομή γονιδίου

Το γονίδιο του vWF αποτελείται από 180 κιλοβάσεις και περιέχει 52 εξώνια [7]. Εντοπίζεται στο άκρο του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 12 στην περιοχή 12p12-12pter (**Εικόνα A.2**) [8]. Το πρώτο εξώνιο περιέχει μόνο την 5'αμετάφραστη περιοχή και το αρχικό κωδικόνιο εντοπίζεται στο δεύτερο εξώνιο. Εντοπίζεται ένα τυπικό "TATA" box στην περιοχή ανοδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής, ωστόσο απουσιάζει η "ομοφωνία" "CCAAT" ή το "GC" box, που είναι τυπικά στοιχεία άλλων προαγωγέων. Η έκφραση του γονιδίου vW είναι αξιοσημείωτα ιστοειδική και περιορίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μεγακαρυοκύτταρα.



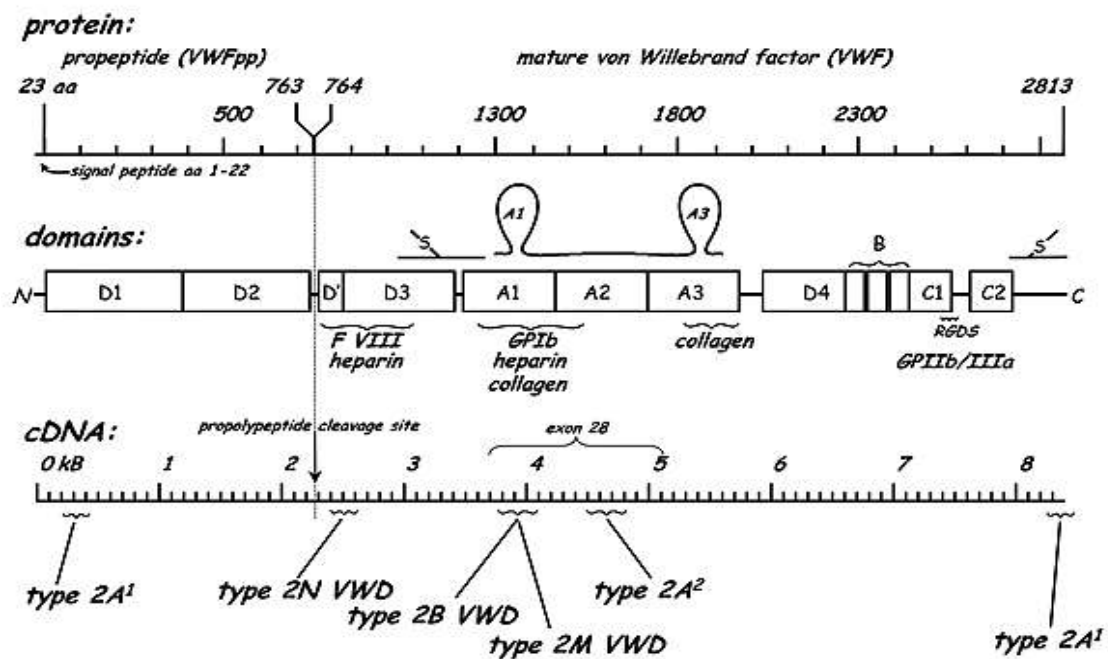
Εικόνα Α.2.: Εντοπισμός του γονιδίου του vWF στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 12.

Μια επιπλέον αλληλουχία υψηλά ομόλογη με το γονίδιο του vWF έχει εντοπιστεί στο χρωμόσωμα 22 με τη μέθοδο της διασταυρούμενης υβριδοποίησης και τη χρήση εσωτερικού θραύσματος cDNA του vWF [9]. Με γενωμική κλωνοποίηση και αλληλούχιση, το DNA έχει αναγνωρισθεί ως ένα μη επεξεργασμένο ψευδογονίδιο και αποτελεί έναν μερικό διπλασιασμό του vWF γονιδίου που επεκτείνεται από το εξόνιο 23 έως το εξόνιο 34. Οι δύο αλληλουχίες DNA είναι κατά 97% πανομοιότυπες, υποδεικνύοντας μια πολύ πρόσφατη εξελεκτική προέλευση του ψευδογονιδίου.

Το πρωταρχικό προϊόν της μετάφρασης του vWF είναι ένα πρόδρομο πολυπεπτιδίο 2.813 αμινοξέων, που αναφέρεται ως pre-pro-vWF. Αποτελείται από ένα σηματοδοτικό πεπτιδίο 22 καταλοίπων, ένα ασυνήθιστα μεγάλο προπεπτιδίο 741 καταλοίπων και μια ώριμη υπομονάδα 2.050 καταλοίπων [10]. Το προπεπτιδίο του vWF, που είχε προηγουμένως χαρακτηριστεί ως von Willebrand antigen II [11], είναι παρόν σε φυσιολογικό πλάσμα και στα αιμοπετάλια ως ένα ξεχωριστό είδος ανοσολογικά από το ώριμο vWF, αλλά όπως και ο τελευταίος, μειώνεται σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο von Willebrand.

Η βιολογική λειτουργία του von Willebrand antigen II μετά την αποκοπή του από τον ώριμο vWF είναι άγνωστη. Το μόριο περιέχει μια ενεργή περιοχή σύνδεσης του κολλαγόνου και αναστέλλει την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το κολλαγόνο. Έτσι πιθανολογείται ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του μεγέθους των θρόμβων, εξισορροπώντας την θρομβωτική δράση του vWF [12].

Το προπεπτίδιο και ο ώριμος vWF αποτελούνται σχεδόν εξολοκλήρου από τέσσερις τύπου επαναλαμβανόμενες περιοχές, τις A, B, C και D, οι οποίες είναι διατεταγμένες από το αμινο- προς το καρβοξυλικό άκρο με την εξής σειρά: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-C1-C2 (Εικόνα Α.3) [13]. Αυτή η δομή υποδηλώνει ότι γεγονότα διπλασιασμού ή/και ο μηχανισμός αναδιάταξης των εξωνίων, διαδραμάτισαν ένα σημαντικό ρόλο στην προέλευση του γονιδίου του vWF. Ωστόσο οι αλληλουχίες στα όρια των ιντρονίων-εξωνίων, δείχνουν μόνο περιορισμένες ομοιότητες ανάμεσα σε επαναλαμβανόμενες ομόλογες περιοχές, υποδεικνύοντας μια σύνθετη εξελεκτική διαδρομή.



Εικόνα Α.3: 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

Οι τέσσερις D περιοχές έχουν μήκος περίπου 360 κατάλοιπων και καθεμία περιέχει μεταξύ 32 και 36 κατάλοιπα κυστεΐνης. Το προπεπτίδιο του vWF αποτελείται από δύο D περιοχές, τις D1 και D2, και είναι παραπλήσιο με το αμινοτελικό άκρο τις ώριμης υπομονάδας του vWF, η οποία περιέχει μια κατατεταγμένη D' περιοχή (κατάλοιπα 1-102) που ακολουθείται από μια ολοκληρωμένη D3 περιοχή (κατάλοιπα 103-478). Οι D περιοχές παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομοιότητα αλληλουχίας και η θέση των περισσότερων κατάλοιπων κυστεΐνης είναι συντηρημένη, υποδεικνύοντας

ότι η τριτοταγής δομή των περιοχών αυτών μπορεί να είναι παρόμοιες. Ωστόσο κατάλοιπα κυστεΐνης στην D3 περιοχή πιθανόν να συμμετέχουν στον σχηματισμό διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών, απαραίτητοι για τον σχηματισμό των πολυμερών, ενώ τα κατάλοιπα κυστεΐνης των περιοχών D1, D', D2 και D4 σχηματίζουν αποκλειστικά ενδομοριακούς δεσμούς.

Οι επαναλαμβανόμενες A περιοχές είναι εσωτερικώς τριπλασιασμένα μοτίβα και εκτείνονται στα κατάλοιπα 497-1111 της ώριμης υπομονάδας του vWF. Παρόμοια μοτίβα συναντούμε και σε άλλες πρωτεΐνες, ανάμεσα στις οποίες είναι ορισμένες ιντεγρίνες (Mac 1-1, LFA-1, p150, VLA-2) και συστατικά του συστήματος συμπληρώματος (C₂, παράγοντας B) [14]. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που περιέχουν τουλάχιστον μια A περιοχή, είναι η α-υπομονάδα της VLA-2 που αποτελεί συστατικό ενός ετεροδιμερούς συμπλέγματος υποδοχέα (γνωστός στα αιμοπετάλια ως GPIa-IIa), η οποία α-υπομονάδα αλληλεπιδρά με κολλαγόνο [15]. Επιπλέον ορισμένα από τα πολλαπλά αντίγραφα A περιοχών που περιέχονται στην α3 αλυσίδα του κολλαγόνου τύπου IV, πιθανόν να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με άλλου τύπου κολλαγόνου. Παρ' όλες τις ομοιότητες στην δέσμευση προσδετών, οι A περιοχές σε διαφορετικές πρωτεΐνες έχουν ξεκάθαρα εξελιχθεί επιπλέον, προσφέροντας διαφορετικές ιδιαιτερότητες αναγνώρισης.

Η A1 περιοχή του vWF περιέχει τον ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ Cys509-Cys695, ο οποίος σχηματίζει μια θηλιά 185 καταλοίπων, χωρίς να προσμετρούνται τα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης [16]. Επίσης η A3 περιοχή του vWF, περιέχει τον ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό, Cys923-Cys1109, σχηματίζοντας μια θηλιά παρόμοιου μήκους με την A1 περιοχή [6]. Η A2 περιοχή έχει παρόμοια αλληλουχία με τις περιοχές A1 και A3, ωστόσο δεν σχηματίζει δισουλφιδική θηλιά.

Η C περιοχή του vWF έχει μια αλληλουχία παρόμοια με την θρομβοσπονδίνη και το α-προκολλαγόνο τύπου I και III [17]. Επιπλέον η περιοχή C1 του vWF περιέχει την αλληλουχία Arg-Gly-Asp, η οποία θεωρείται ως η χαρακτηριστική αλληλουχία για τους υποδοχείς προσκόλλησης της υπεροικογένειας των ιντεγρινών, μέλη της οποίας επίσης αλληλεπιδρούν με την θρομβοσπονδίνη και το κολλαγόνο.

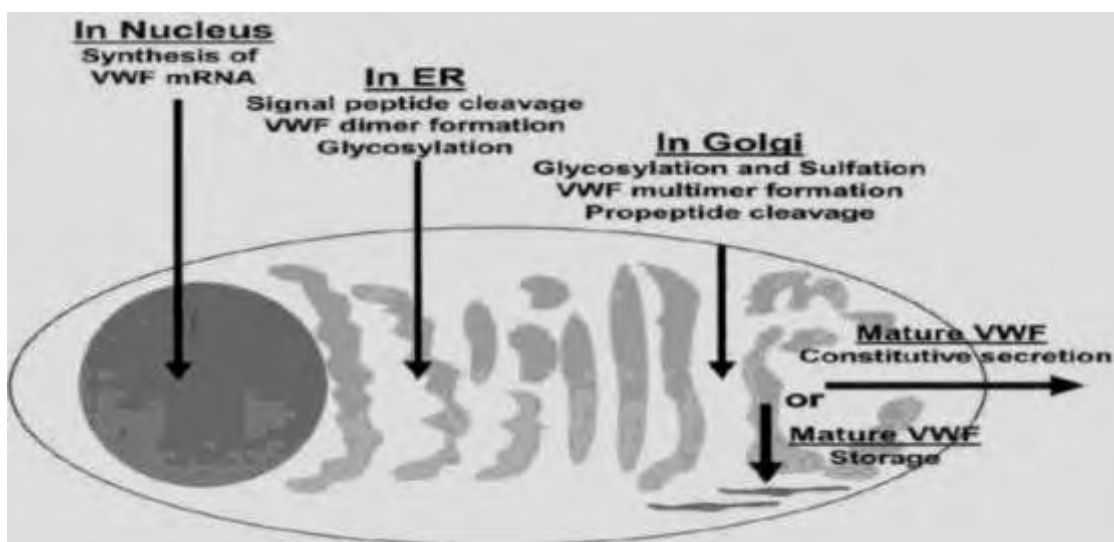
A.3. Βιοσύνθεση του vWF

A.3.1. Ενδοθηλιακά κύτταρα

Η περισσότερη γνώση που έχουμε σήμερα για την βιοσύνθεση του vWF προέρχεται από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων επιμολυσμένα με ετερόλογα κύτταρα. Αυτές οι μελέτες μας έχουν προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες, ωστόσο αυτές θα πρέπει να τις διαχειριζόμαστε με προσοχή, διότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από διαφορετικά τμήματα του αγγειακού συστήματος ενδέχεται να παρουσιάζουν διαφορές όσο αφορά την σύνθεση του vWF, την αποθήκευσή και την έκκρισή του.

Μετά την μετάφραση του mRNA, το πεπτίδιο που προκύπτει (pro-vWF) υπόκειται σε εκτεταμένες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις για να παραχθεί ο πολυμερής vWF (**Εικόνα A.4**)[18]. Το αρχικό βήμα είναι η σύνδεση των pro-vWF μονομερών για τον σχηματισμό διμερών μέσω των δισουλφιδικών δεσμών που σχηματίζονται στις καρβοξυλικές περιοχές τους. Επιπλέον, ορθή γλυκοζυλίωση με N-δεσμούς φαίνεται να είναι απαραίτητη για την σταθεροποίηση της διαμόρφωσης που διευκολύνει τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Φαίνεται ότι τουλάχιστον 151 κατάλοιπα της υπομονάδας του vWF, τα οποία ακολουθούν την C2 επικράτεια και χωρίς κάποια άλλη εμφανής ομόλογη εσωτερική περιοχή, είναι τα μόνα απαραίτητα για τον διμερισμό [19]. Ακολούθως κατά την διάρκεια ή μετά την διέλευση από την συσκευή Golgi, το προπεπτίδιο οδηγεί την διμερή ένωση σε δομές με υψηλότερο βαθμό οργάνωσης μέσω των συνδέσεων καταλοίπων κυστεΐνης της αμινοτελικής περιοχής της κάθε υπομονάδας. Η παρουσία δισθενών μεταλλικών ιόντων και όξινου pH είναι απαραίτητα για τον πολυμερισμό του vWF [18]. Ταυτόχρονη έκφραση προπεπτιδίων και ώριμου vWF σε διαφορετικά πλασμίδια μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των πολυμερών [20], υποδεικνύοντας τον ανεξάρτητο ρόλο του προπεπτιδίου στην διαδικασία αυτή, ακόμα κι όταν μέρος του ίδιου του προπεπτιδίου δεν περιέχει αλληλουχίες του ώριμου vWF. Συνήθως το προπεπτίδιο αποκόπτεται πριν από την έκκριση, ωστόσο αυτό δεν είναι προαπαιτούμενο για τον πολυμερισμό ή την έκκριση. Ταυτόχρονα με τον σχηματισμό του πολυμερούς vWF, η ώριμη υπομονάδα τροποποιείται με την προσθήκη 12 πλευρικών καρβοξυλικών αλυσίδων που συνδέονται με δεσμούς N και 10 πλευρικών καρβοξυλικών αλυσίδων που συνδέονται με δεσμούς O [21].

Η σύνδεση με μη ομοιοπολικό τρόπο με τον παράγοντα πήξης VIII αντιπροσωπεύει το τελικό βήμα στην επεξεργασία του συμπλέγματος VIII/vWF και πραγματοποιείται μετά την έκκριση του vWF των ενδοθηλιακών κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος. Το κύριο σημείο σύνθεσης *in vivo* του παράγοντα VIII είναι το ήπαρ, ο σπλήνας και τα νεφρά [22]. Η σύνθεση του παράγοντα VIII και του vWF σε διαφορετικά σημεία, υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών πραγματοποιείται αφού έχουν απελευθερωθεί από τα κύτταρα παραγωγής τους, πιθανότατα σε σημεία όπου τα διαφορετικά κύτταρα παραγωγής βρίσκονται σε εγγύτητα. Το προπεπτίδιο του vWF (vWAgII) φαίνεται να διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό μιας λειτουργικής θέσης σύνδεσης του παράγοντα VIII [23]. Ωστόσο η παρουσία μη επεξεργασμένου προπεπτιδίου, καταστρέφει την ικανότητα του vWF να συνδέεται με τον παράγοντα VIII [24].



Εικόνα Α.4: Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών τροποποιήσεων, του διμερισμού και του πολυμερισμού που υφίσταται το πρωταρχικό πολυπεπτίδιο στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

A.3.2. Μεγακαρυοκύτταρα

Η σύνθεση του vWF από τα μεγακαρυοκύτταρα δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς, υπάρχει όμως η υπόθεση ότι είναι αναλογικά όμοια με αυτή που έχει παρατηρηθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο μια μεγάλη διαφορά στη μετα-μεταφραστική επεξεργασία ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μεγακαρυοκύτταρα είναι ότι

στα τελευταία δεν υπάρχει μηχανισμός για συστηματική έκκριση και συνθέτουν vWF μόνο για να το αποθηκεύσουν στα α-κοκκία (α-granules).

A.4. Αποθήκευση και έκκριση του vWF

Σε αντίθεση με τις περισσότερες πρωτεΐνες, ο vWF μπορεί να ακολουθήσει περισσότερα από ένα μονοπάτια έκκρισης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα: είτε μέσω συστηματικής έκκρισης που συνδέεται άμεσα από με την σύνθεσή είτε ένα ρυθμιζόμενο μονοπάτι στο οποίο γίνεται αποθήκευση του ώριμου μορίου σε κατάλληλα κοκκία και εκκρίνεται έπειτα από ερέθισμα που δέχεται [25]. Στα μεγακαρυοκύτταρα μόνο το ρυθμιζόμενο μονοπάτι είναι λειτουργικό *in vivo*. Σε αντίθεση, η πλειοψηφία του παραγόμενου vWF στα καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα ακολουθεί το συστηματικό μονοπάτι. Η έκκριση του vWF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να ακολουθήσει δύο κατευθύνσεις, είτε να εισέλθει απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος, είτε να εισέλθει στην υπενδοθηλιακή μήτρα στα τοιχώματα του αγγείου. Τα δυο οργανίδια υπεύθυνα για την αποθήκευση του vWF είναι τα σωμάτια Weibel-Palade στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα α-κοκκία στα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια

A.4.1. Σωμάτια Weibel-Palade

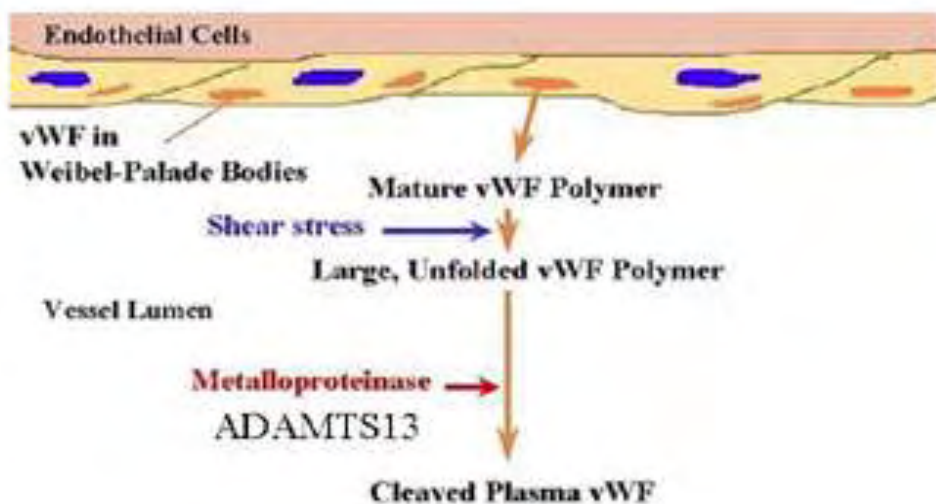
Αυτά τα οργανίδια έχουν σχήμα ραβδοειδές, υπάρχουν μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα και θεωρείται ότι προέρχονται από την συσκευή Golgi. Με ανάλυση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, φαίνεται να αποτελούνται από “σωληνάρια” παρατεταγμένα κατά μήκος, τα οποία περικλείονται από μια μεμβράνη. Αυτά τα “σωληνάρια” πιθανόν να είναι πολυμερισμένα μόρια vWF, στοιχισμένα σε μια κατά μήκος διάταξη [25]. Οι μηχανισμοί που καθορίζουν εάν το νεοσυντεθημένο μόριο vWF θα ακολουθήσει την συστηματική οδό ή αν θα αποθηκευτεί σε κοκκία, είναι άγνωστοι. Έχει προταθεί ότι το προπεπτίδιο του vWF διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον σχηματισμό των σωμάτων Weibel-Palade, ωστόσο τα πειραματικά αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα [26,27].

Μόνο μια ακόμη πρωτεΐνη φαίνεται να υπάρχει στα σωμάτια Weibel-Palade εκτός από τον vWF και το vWAgII (που θεωρείται ξεχωριστό μόριο, μετά την αποκοπή του

από τον πολυμερή vWF). Αυτή είναι η P-σελεκτίνη [28], ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης το οποίο εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις των λευκοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων.

Η ποσότητα του vWF που αποθηκεύεται στα σωμάτια Weibel-Palade αποτελείται από τα μεγαλύτερα πολυμερή της πρωτεΐνης, ενώ γενικά θεωρείται ότι τα μόρια του vWF που ακολουθούν το συστηματικό μονοπάτι (**Εικόνα Α.5**) δεν έχουν πολυμεριστεί στον ίδιο βαθμό. Μια ενδιαφέρουσα υπόθεση είναι ότι τα μόρια του vWF που εκκρίνονται από καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, είτε ακολουθούν το συστηματικό μονοπάτι είτε εκκρίνονται έπειτα από κάποιο ερέθισμα, αποτελούνται από σχετικά ομοιογενή μόρια, μεγαλύτερα από κάθε πολυμερές που συναντάται στο πλάσμα και η ετερογένεια στα πολυμερή του vWF διαμορφώνεται πάντα μετά την έκκριση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [29].

Η ρυθμιζόμενη έκκριση του vWF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, λαμβάνει χώρα μετά από ερεθισμό από διάφορους αγωνιστές, συμπεριλαμβανομένων της ισταμίνης, των οιστρογόνων, της θρομβίνης και του ινώδους. Τοπική έκκριση του ενδοθηλιακού vWF μπορεί επίσης να προκύψει σε περιοχές με φλεγμονή. Οι γ-ιντερφερόνες και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF) μπορούν να διαφοροποιήσουν την απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων, μειώνοντας την σύνθεση, αποθήκευση και έκκριση του vWF κατά τη διάρκεια φλεγμονής ή ανοσολογικής απόκρισης [30]. Διάφορες ουσίες που αλληλεπιδρούν με τα αγγεία, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την επινεφρίνη, προκαλούν επίσης έντονη έκκριση του vWF στην κυκλοφορία, αλλά δεν είναι αποτελεσματικές σε κυτταροκαλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι η δράση προκαλείται από έναν άγνωστο διαμεσολαβητή, που δεν είναι παρών στα *in vitro* πειράματα.



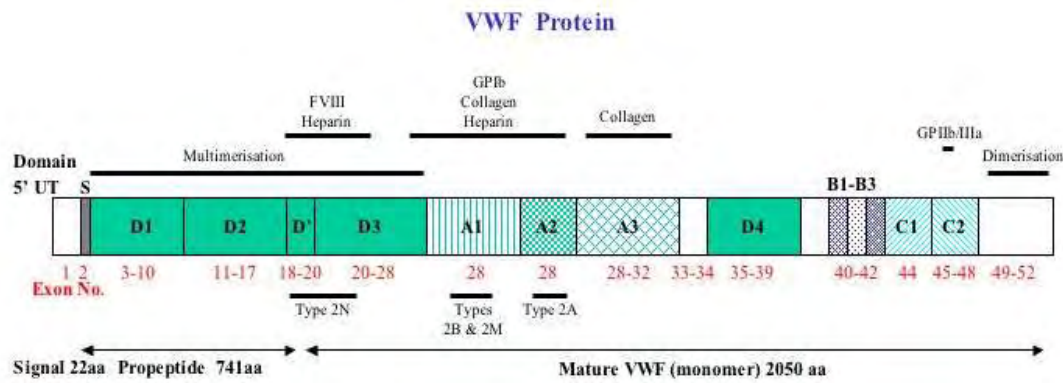
Εικόνα Α.5: Έκκριση του vWF από τα σωμάτια Weibel-Palade ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω της συστηματικής οδού.

A.4.2. α-κοκκία αιμοπεταλίων

Το δεύτερο σημείο αποθήκευσης του vWF βρίσκεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια μπορούν να αποθηκεύσουν έως και το 20% του συνολικού vWF που βρίσκεται στο αίμα και η μεγαλύτερη ποσότητα αυτού απελευθερώνεται στοχευμένα σε σημεία όπου υπάρχει τραυματισμός, έπειτα από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Αντίθετα με τα σωμάτια Weibel-Palade τα οποία πρωτίστως σχηματίζονται από vWF, τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν έναν αριθμό επιπλέον μορίων, μερικά από τα οποία είναι σημαντικά για την αιμόσταση, όπως π.χ. ινωδογόνο και θρομβοσπονδίνη. Η μελέτη των α-κοκκίων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνει την παρουσία σωληνοειδών δομών που μοιάζουν με τις αντίστοιχες δομές των σωματίων Weibel-Palade στα ενδοθηλιακά κύτταρα [31]. Ωστόσο στα α-κοκκία, σε αντίθεση με τα σωμάτια Weibel-Palade, αυτές οι δομές που θεωρείται ότι είναι πολυμερή του vWF αντιπροσωπεύουν ένα σχετικά μικρό κομμάτι των α-κοκκίων και εντοπίζονται συνήθως στην περιφέρειά τους.

A.5. Οι λειτουργικές πρωτεϊνικές επικράτειες του vWF

Ο παράγοντας vWF περιλαμβάνει πολλές πρωτεϊνικές επικράτειες των οποίων ο λειτουργικός ρόλος έχει αποσαφηνιστεί (**Εικόνα A.6**). Οι D'/D3 πρωτεϊνικές επικράτειες παρουσιάζουν μια περιοχή πρόσδεσης για τον παράγοντα FVIII του αίματος και την ηπαρίνη [32]. Επιπλέον οι D'/D3 επικράτειες αποτελούν πιθανές περιοχές πρόσδεσης για την P-σελεκτίνη, η οποία έχει βρεθεί ότι προσδένει προσφάτως απελευθερωμένα στην κυκλοφορία υπερμεγέθη πολυμερή του vWF στην επιφάνεια ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων [33]. Μέσω του μηχανισμού αυτής της πρόσδεσης εκτίθενται οι θέσεις κοπής της επικράτειας A2 για την ADAMTS-13 [34]. Η επικράτεια A1 διαθέτει την μοναδική περιοχή πρόσδεσης για την γλυκοπρωτεΐνη GPIIb των αιμοπεταλίων και περιέχει επιπρόσθετες θέσεις σύνδεσης για την ηπαρίνη, θειογλυκολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και για το δηλητήριο φιδιών του γένους bontrops, βοτροσετίνη (botrocetin) [35]. Επιπλέον φαίνεται να περιέχει θέσεις σύνδεσης και για το κολλαγόνο. Ωστόσο, δεν έχει ταυτοποιηθεί ο τύπος του κολλαγόνου που πιθανώς συνδέεται με την A1 [36]. Πιθανολογείται ο τύπος VI. Η επικράτεια A3 διαθέτει θέσεις σύνδεσης για το κολλαγόνο τύπου I και III [37]. Η επικράτεια C1 διαθέτει την αμινοξική αλληλουχία RGD η οποία αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Η επικράτεια A2 διαθέτει την θέση κοπής για την ADAMTS-13 κάτω από συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης που οδηγούν στην έκπτυξη αυτής της επικράτειας [38]. Επίσης τόσο στην επικράτεια A2 όσο και στην D3 μια τριπεπτιδική ακολουθία εμπλέκεται στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων μέσω σύνδεσης με τις β_2 ιντεγκρίνες. Η έκθεση των θέσεων σύνδεσης για την A1 όσο και για την A2 εξαρτώνται -σε ότι αφορά στην προσπελασιμότητά τους- τόσο από τις υδροδυναμικές δυνάμεις και συνθήκες που αναπτύσσονται εντός του αγγείου, όσο και από την ακινητοποίηση του vWF επί του ενδοθηλιακού τοιχώματος [39].



Εικόνα Α.6: Διαφορετικές πρωτεϊνικές επικράτειες αντιστοιχούν στους τέσσερις τύπους επαναλαμβανόμενων περιοχών του cDNA, και είναι υπεύθυνες για διαφορετικά χαρακτηριστικά δέσμευσης του μορίου

Α.6. Η σύνδεση του vWF με τον παράγοντα πήξης VIII

Ο vWF κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένος με μη ομοιοπολικό δεσμό με τον παράγοντα VIII. Η αλληλεπίδραση αυτή τον προστατεύει από πρωτεόλυση στην κυκλοφορία, αυξάνοντας έτσι τον χρόνο ημιζωής του από 2 σε 8-10 ώρες [40]. Ο vWF και ο VIII στη κυκλοφορία σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, με ένα μόριο VIII να αντιστοιχεί σε κάθε μονομερές του vWF. Όταν το σύστημα πήξης ενεργοποιείται, η θρομβίνη αποσυνθέτει τους δύο παράγοντες, με αποτέλεσμα τη μετατροπή του VIII στην ενεργοποιημένη μορφή αυτού, την VIIIa. Ο vWF αναστέλλει την αλληλεπίδραση του VIII με τις πρωτεάσες του μηχανισμού πήξης, όπως τον παράγοντα IX, τον παράγοντα X και την πρωτεΐνη C, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την ενεργοποίηση του συστήματος πήξης [41]. Συνοψίζοντας, ο παράγοντας vWF συμμετέχει στις τέσσερις παρακάτω κύριες λειτουργίες:

α. προκαλεί την προσκόλληση των αιμοπεταλίων σε περιοχές αγγειακής βλάβης, μέσω της σύνδεσής του με τον υποδοχέα των αιμοπεταλίων GrIb/IX (μέσω της επικράτειας A1) και με το κολλαγόνο του αγγειακού τοιχώματος (μέσω της επικράτειας A3).

β. διευκολύνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, εξαιτίας της δέσμευσής του (μέσω της επικράτειας C1) με τον υποδοχέα GrIIIb/IIIa των αιμοπεταλίων.

γ. προσδέεται με τον παράγοντα FVIII και τον προστατεύει από πρωτεολυτική αποικοδόμηση, η οποία επιτελείται από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C στη κυκλοφορία του αίματος.

δ. συμμετέχει στην ενίσχυση του καταρράκτη αντιδράσεων της πήξεως, όταν αυτός έχει ήδη εκκινήσει, μέσω της σύνδεσης του σε άλλους ενεργοποιημένους παράγοντες όπως η θρομβίνη.

A.7. Η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13 και ο ρόλος της στην πήξη του αίματος

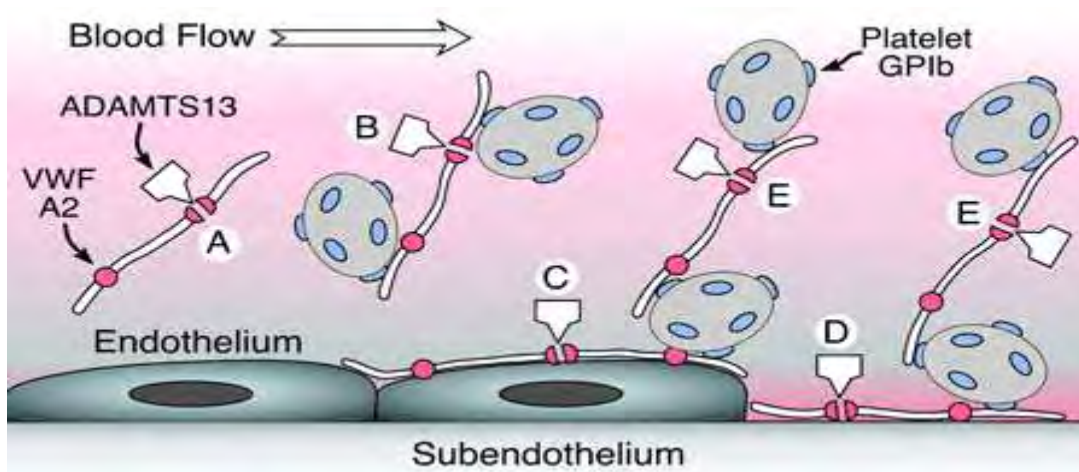
Τα πολύ μεγάλα πολυμερή του vWF που περιέχονται στα αποθηκευτικά κοκκία παρατηρούνται συνήθως σε υγιείς ενήλικες [42]. Μπορούν να παρατηρηθούν μετά από επαγωγή της σύνθεσης και απελευθέρωσης του vWF σε συνθήκες που απαιτείται μεγάλη ποσότητα αυτού καθώς και μεγάλη δραστικότητα, όπως σε περιπτώσεις αιμορραγίας [41]. Ο κύριος μηχανισμός που ρυθμίζει το μέγεθος των πολυμερών του vWF και συνεπώς και την δραστικότητά τους είναι η πρωτεόλυση. Η μεταλλοπρωτεάση που κόβει την A2 επικράτεια του vWF στον δεσμό Tyr1605-Met1606 (δημιουργώντας δυο τμήματα των 176 kDa και 140 kDa που εντοπίζονται στην φυσιολογική κυκλοφορία) είναι η ADAMTS-13, μια μεταλλοπρωτεάση που ανήκει στην οικογένεια των ντισιντεγκρινών (disintegrins) και περιέχει μοτίβα χαρακτηριστικά της θρομβοσπονδίνης I, [43]. Μεταλλάξεις της οδηγούν σε χρόνια υποτροπιάζουσα θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, γεγονός που υπογραμμίζει τον καθοριστικό της ρόλο στην ρύθμιση της δράσης του vWF στην μικροαγγειακή κυκλοφορία (**Εικόνα A.7**)

Πέρα από τον περιορισμό της κυκλοφορίας των μεγάλων πολυμερών του vWF στην κυκλοφορία η ADAMTS13 περιορίζει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων στην μικροκυκλοφορία και τον σχηματισμό μικροθρόμβων μέσω της κοπής της αποδιαταγμένης επικράτειας A2 του ακινητοποιημένου στο τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα vWF. Η αποδιάταξη της επικρατείας A2 και η αποκάλυψη της θέσης κοπής στην περίπτωση αυτή προκαλείται από την υψηλή διατμητική τάση (2000 s^{-1}) που επικρατεί κοντά στο τοίχωμα των αγγείων [44]. Το γονίδιο της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9q34, έχει μήκος 37 kb και περιέχει 29 εξόνια. Η σύνθεσή της γίνεται κυρίως στα διάμεσα κύτταρα του ηπατικού παρεγχύματος. Η ώριμη ADAMTS-13

αποτελείται από 1427 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 190 kDa (μεγαλύτερο από το προβλεπόμενο 147 kDa, λόγω των 10 θέσεων γλυκοζυλίωσης που διαθέτει). Έχει 3 δισουλφιδικούς δεσμούς που συνδέουν τις ακόλουθες κυστεΐνες: Cys155-Cys208, Cys202-Cys281, and Cys242-Cys265 [45]. Φυσιολογικά, η πρωτεάση κυκλοφορεί σε σύμπλεγμα με τον πολυμερή παράγοντα vWF. Όμως η πρόσδεσή της δεν συνοδεύεται από πρωτεόλυση γιατί ο δεσμός Tyr1605-Met1606 βρίσκεται βαθιά μέσα στον πυρήνα του κεντρικού β-φύλλου με αποτέλεσμα να μη είναι προσπελάσιμος. Για την κοπή της A2 είναι απαραίτητη η σύνδεση της ADAMTS-13 με Zn^{2+} ή Ca^{2+} καθώς και η εκπτώχυσή της είτε εντός του ρέοντος πλάσματος είτε επί του τοιχώματος του αγγείου κάτω από συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης. Προσδένεται στον ακινητοποιημένο vWF με στοιχειομετρία 1:2 (ένα μόριο ADAMTS13 προσδένει 2 μόρια vWF. Η αντίδραση φτάνει σε ισορροπία μετά από 2 ώρες και ο χρόνος ημισείας ζωής της αποσύνδεσης είναι 4 ώρες. Η υπολογισμένη Kd για την σύνδεση της ADAMTS13 στον vWF είναι περίπου 14 nM ενώ η Km περίπου 16 nM [45]. Η κοπή της A2 από την πρωτεάση ρυθμίζεται από την GP1ba, την παρουσία ηπαρίνης, ιόντων χλωρίου, αιμοσφαιρίνης και συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου. Ο ρυθμός κοπής του μεταλλάγματος A2A3 είναι 10 φορές υψηλότερος σε σχέση με την δομή A1A2A3, γεγονός που υποδεικνύει, ότι η επικράτεια A1 αναστέλλει την πρόσβαση της ADAMTS13 στην θέση αποκοπής. Η αναστολή αυτή μπορεί να ανατραπεί μέσω της αλληλεπίδρασης του vWF με την GP1ba ή την ηπαρίνη. Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη-6, και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων, αναστέλλουν την κοπή των ULvWF κάτω από συνθήκες ροής. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν έναν πιθανό σύνδεσμο μεταξύ φλεγμονής και θρόμβωσης και μπορούν να έχουν θεραπευτική σημασία. Η θρομβίνη και ο παράγοντας πήξης Xa, καθώς και η πλασμίνη ρυθμίζουν την δράση της ADAMTS13 στο πλάσμα και επομένως τον σχηματισμό θρόμβου, καθώς την πρωτεολύουν [34]. Η ADAMTS13 αποδομείται πρωτεολυτικά μετά την ενεργοποίηση της πήξης γεγονός που αποτελεί έναν αυτορυθμιστικό ανατροφοδοτικό μηχανισμό της αιμόστασης.

Ακόμα και σε συγκεντρώσεις τέσσερις φορές μεγαλύτερες από την συγκέντρωση της in vivo η ADAMTS13 δεν μπορεί να αποκόψει την επικράτεια A2 in vitro, ωστόσο μετά από επώαση 16 ωρών αυτό είναι δυνατόν να συμβεί αλλά όχι στην γνωστή θέση Tyr1605-Met1606. Ωστόσο, η κοπή της επικράτειας A2 είναι δυνατή ακόμα και in vitro χωρίς την ακινητοποίηση του vWF ή την εφαρμογή διατμητικής τάσης, με την

χρήση ουρίας σε συγκέντρωση 1 M ως μετουσιωτικού παράγοντα του υποστρώματος A2 [45]. Η διαδικασία αυτή απαιτεί περισσότερες από 24 ώρες επώασης.



Εικόνα A.7: Απομόνωση vWF από την δράση της ADAMTS-13

A. Διάσπαση του δεσμού ανάμεσα στην Tyr842 και την Met843 της A2-περιοχής από την ADAMTS-13, B. Δημιουργία συμπλόκου του υποδοχέα GPIb των αιμοπεταλίων με την A2-περιοχή του vWF, C. Προσκόλληση του συμπλόκου στο υπενδοθήλιο, D. Απομάκρυνση του συμπλόκου από το υπενδοθήλιο, E. Κυκλοφορία του συμπλόκου στην αιματική ροή

A.8. Συσχέτιση δομής και λειτουργίας των επικρατειών A1, A2 και A3

Οι επαναλαμβανόμενες επικράτειες A αποτελούνται εσωτερικά από τρία όμοια τμήματα και συμμετέχουν στον σχηματισμό των καταλοίπων 497 - 1111 της ώριμης υπομονάδας του vWF. Μοτίβα που μοιάζουν με τις επικράτειες A, βρίσκονται και σε άλλες πρωτεΐνες, όπως στις ιντεγκρίνες (Mac-1, LFA-1, p150,95, VLA-2), στα συστατικά του εξωκυτταρικού υλικού (πρωτεΐνη του περιβλήματος του χόνδρου, κολλαγόνο τύπου VI), και στα συστατικά του συμπληρώματος (C2, παράγοντας B) [35].

Η επικράτεια A1 αντιστοιχεί στα αμινοξέα 497 έως 716 του ώριμου vWF και η δομή της φαίνεται στην **Εικόνα A.8**. Η επικράτεια A1 του vWF παρουσιάζει έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στην Cys 509 - Cys 595, και έτσι σχηματίζεται μια περιοχή 185 καταλοίπων μεταξύ των δύο συζευγμένων κυστεϊνών. Η συνολική αναδίπλωση της επικράτειας A1 είναι παρόμοια με την αναδίπλωση της επικράτειας A3 και της επικράτειας I των ιντεγκρινών [46]. Παρόλη την ομοιότητα με

την αντίστοιχη επικράτεια των ιντεγκρινών δεν παρουσιάζει αντίστοιχο μοτίβο σύνδεσης μετάλλου. Η συνολική κατανομή του φορτίου στην επιφάνειά του είναι ανομοιογενής με τόσο θετικές όσο και αρνητικά φορτισμένες περιοχές. Ωστόσο, αυτή η ανομοιογένεια είναι πιο περιορισμένη σε σύγκριση με την αντίστοιχη της επικράτειας A3. Ένας μεγάλος αριθμός φορτισμένων αμινοξέων σχηματίζουν ένα εκτεταμένο δίκτυο ιοντικών γεφυρών, το οποίο εξηγεί σε σημαντικό βαθμό και την μεγάλη σταθερότητα αυτής της επικράτειας [47]. Η κύρια λειτουργία της A1 επικρατείας είναι η σύνδεση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με την γλυκοπρωτεΐνη GPIIb της επιφάνειας των αιμοπεταλίων στην περίπτωση αγγειακής βλάβης και έκθεσης υπενδοθηλιακού κολλαγόνου, καθώς και η σύνδεση με το κολλαγόνο τύπου VI [48]. Η σύνδεση αυτή ενισχύει την ικανότητα προσκόλλησης του εκδιπλωμένου vWF σε περιοχές αγγειακής βλάβης, καθώς αυτή διαμεσολαβείται κατά κύριο λόγο από την επικράτεια A3. Η αλληλεπίδραση του vWF με συστατικά του υπενδοθηλιακού ιστού (όπως για παράδειγμα το κολλαγόνο) σε περιοχές αγγειακής βλάβης ή η αλλαγή της διαμόρφωσης του vWF υπό την επίδραση υδροδυναμικών δυνάμεων προκαλεί την έκθεση του κέντρου πρόσδεσης του A1 για τον υποδοχέα GPIIb. Η πρωτοταγής δομή του ώριμου vWF καταδεικνύει, ότι η πρωτεϊνική επικράτεια A1 βρίσκεται σε πλευρική επαφή με την επικράτεια D3 εγγύς της αμινοτελικής περιοχής και με την επικράτεια A2 εγγύς της καρβοξυτελικής περιοχής [48]. Μέχρι σήμερα, μόνο οι επικράτειες A1 και A3 θεωρούνται ότι εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του vWF με την γλυκοπρωτεΐνη των αιμοπεταλίων GPIIb. Η GPIIb είναι το κεντρικό συστατικό του συμπλέγματος του υποδοχέα επιφανείας των αιμοπεταλίων που αποτελείται από τις γλυκοπρωτεΐνες Iba, Ibβ, IX, και V. Μέσω αυτής της γλυκοπρωτεΐνης ακινητοποιείται το σύμπλεγμα στον κυτταροσκελετό του αιμοπεταλίου [36]. Η λειτουργία της πρόσδεσης στην A1 διαμεσολαβείται από τα τελευταία 290 αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής της GPIIb. Οι επικράτειες D1 και οι D2 προφυλάσσουν την A1 από την αλληλεπίδραση με την GPIIb καλύπτοντάς τον. Παρόλα αυτά έχει υποδειχθεί, ότι η παρακείμενη επικράτεια A2 μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην τροποποίηση της δραστηριότητας πρόσδεσης της επικράτειας A1 [49]. Η θέση πρόσδεσης της A1 με την γλυκοπρωτεΐνη GP Ib-IX-V βρίσκεται μέσα στην περιοχή που ορίζεται από την αμινοξική ακολουθία 480-718. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα που συμμετέχουν σε αυτήν την αλληλεπίδραση είναι τα Leu-480, Val-481 και Gly-718. Η περιοχή αυτή περιέχει τον ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό της A1 (μεταξύ των αμινοξέων Cys-509-Cys-695) και δημιουργεί μια ιδιαίτερα θετικά φορτισμένη περιοχή μέσα στον βρόχο της A1

και δυο μη συνεχόμενες ανιοντικές πλευρικές ακολουθίες, οι οποίες περιέχουν θέσεις που έχουν υποστεί τροποποίηση μέσω γλυκοζυλίωσης με σιαλικό οξύ. Τα αμινοξέα που έχουν υποστεί αυτήν την τροποποίηση είναι τα 468, 485, 492, 493, 500, 705, και 714. Επίσης η αλληλουχία Asp-514-Glu-542, η οποία βρίσκεται μέσα στον βρόχο που ορίζεται από τον δισουλφιδικό δεσμό, συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με την GP Ib-IX-V [35]. Άλλες περιοχές μέσα στον βρόχο της A1 έχουν ταυτοποιηθεί ως θέσεις που αλληλεπιδρούν με σουλφατίδες της κυτταρικής επιφανείας, κολλαγόνο τύπου III και VI, ηπαρίνη και υπενδοθηλιακές ηπαράνες [48]. Η επικράτεια A1 αλληλεπιδρά επίσης με πρωτεΐνες που προκαλούν την ενεργοποίηση του vWF, όπως πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί από δηλητήρια φιδιών (συγκεκριμένα οι botrocetin, biticetin και jaracetin). Παρόμοια ενεργοποίηση προκαλεί και το βακτηριακό γλυκοπεπτίδιο ριστοσετίνη.

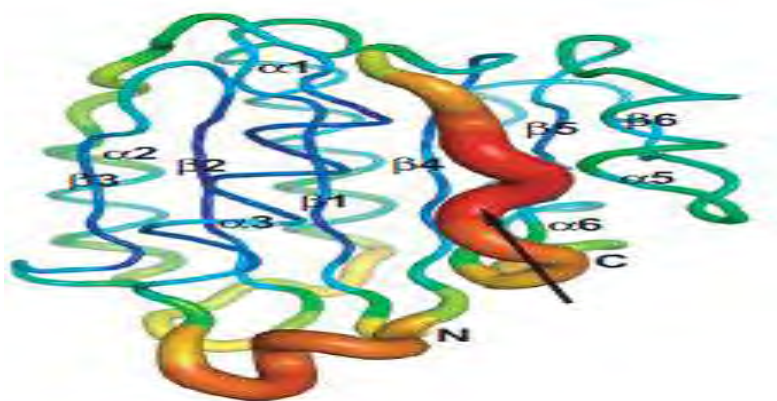


Εικόνα A.8: Η δομή της A1 επικράτειας του vWF

Η επικράτεια A2, η δομή της οποίας φαίνεται στην **Εικόνα A.9**, εκτείνεται από το κατάλοιπο 717 μέχρι το κατάλοιπο 909 και δεν περιέχει καμία δισουλφιδική γέφυρα ανάμεσα στο N και στο C τελικό άκρο (αν και υπάρχει μία γέφυρα ανάμεσα στη Cys 906 και στη Cys 907) η οποία παίζει τον ρόλο της τροποποίησης των μηχανικών ιδιοτήτων της A2 και της κλίμακας των δυνάμεων εντός των οποίων τελείται η αποδιάταξη της [50]. Η κύρια επιφανειακή διαφορά ανάμεσα στην επικράτεια A2 και στην A1, είναι ότι η πρώτη έχει μία μεγαλύτερη κατανομή από θετικά και αρνητικά φορτία στην επιφάνειά της, ενώ η A1 είναι κυρίως θετικά φορτισμένη στην επιφάνειά της [50]. Η επικράτεια A2 παρουσιάζει έναν σημαντικό αριθμό δομικών προσαρμογών σε σύγκριση με τις επικράτειες A1 και A3, έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η επιμήκυνσή της σε ένα σαφώς ορισμένο εύρος τάσεων. Λειτουργεί με αυτόν τον τρόπο

ως ένας αισθητήρας τάσης. Ένα χαρακτηριστικό και ασυνήθιστο εύρημα της επικράτειας A2 είναι ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των γειτονικών κυστεϊνών Cys1669 and Cys1670. Ο δεσμός αυτός αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο του υδρόφοβου πυρήνα της επικράτειας A2. Ένας αριθμός μορίων νερού βρίσκονται κρυμμένα στο εσωτερικό της δομής, με κυριότερο εύρημα ένα δίκτυο τριών μορίων νερού σε υδρόφιλη περιοχή του πυρήνα. Επιπλέον η επικράτεια A2 παρουσιάζει μια cis-Pro στην θέση 1645 (Pro1645). Η προλίνη αυτή σχηματίζει πεπτιδικό δεσμό με την Trp1644. Στην περίπτωση που η A2 είναι εκδίπλωμένη, ο ισομερισμός του δεσμού αυτού σε trans καθυστερεί την αναδίπλωση και διευκολύνει την δράση της ADAMTS-13. Στην περίπτωση του πολυμερούς του vWF η δύναμη επιμήκυνσης μεταδίδεται από τις επικράτειες A1 και A3 δια μέσου θέσεων Ο-γλυκοζυλίωσης στα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα της επικράτειας A2. Η εκδίπλωση ξεκινάει από το καρβοξυτελικό άκρο καθώς τα δομικά στοιχεία αυτής της περιοχής λόγω της τοπολογίας τους μπορούν να απομακρυνθούν ένα προς ένα διαδοχικά από τον πυρήνα της επικράτειας με την εφαρμογή δύναμης.

Οι δομικές διαφορές της επικράτειας A2 σε σύγκριση με την A1 και A3, δηλαδή ο βρόχος $\alpha 4$, η έλλειψη δισουλφιδικού δεσμού που να συνδέει μεγάλο μήκος ακολουθίας -όπως στην περίπτωση των επικρατειών A1 και A3- και η παρουσία της cis-Pro1645 δίνουν την δυνατότητα στην επικράτεια A2 να μπορεί να υποστεί επιμήκυνση με την εφαρμογή δύναμης, σε ένα στενό εύρος τιμών διατμητικής τάσης και συγκεκριμένα των δυνάμεων που επικρατούν στα αγγεία μικρής διαμέτρου [50].

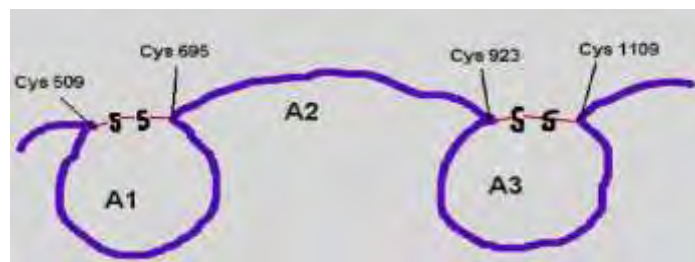


Εικόνα A.9: Η δομή της περιοχής A2 του vWF

Η επικράτεια A3, η δομή της οποίας φαίνεται στην εικόνα A.10., του vWF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην σύνδεση του vWF στο τραυματισμένο αγγείο και

στον σχηματισμό θρόμβου μέσω της σύνδεσής της με το κολλαγόνο τύπου I και III του εκτεθειμένου υπενδοθηλιακού ιστού [37]. Η επικράτεια A3 έχει μοριακό βάρος περίπου 20 kDa και αντιστοιχεί στην αμινοξική ακολουθία 920-1111 του μονομερούς του vWF. Ο δισουλφιδικός δεσμός βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων Cys923 και Cys1109 και συνδέει το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο. Η συνολική δομή της A3 προσομοιάζει με την δομή των ιντεγκρινών CR3 and LFA-1, καθώς μοιράζονται κοινά δομικά μοτίβα τα οποία είναι υπεύθυνα για την σύνδεση του κολλαγόνου [51]. Συγκεκριμένα η επικράτεια A3 παρουσιάζει το μοτίβο DXSXS (Asp934, Ser936 και Ser938), το οποίο δυνητικά φέρει την δυνατότητα σύνδεσεως ιόντων μετάλλου (όπως Mg^{2+} και Mn^{2+}). Η σύνδεση αυτών των ιόντων μετάλλων με τα αντίστοιχα μοτίβα των ιντεγκρινών εμπλέκεται στην ενεργοποίησή τους και την σύνδεση τους με τους συνδέτες τους (όπως ακολουθίες κολλαγόνου). Το μοτίβο αυτό μπορεί να αποτελεί ένα γενικότερο μοτίβο σύνδεσης μετάλλων που είναι απαραίτητο για την λειτουργία των ιντεγκρινών και πιθανώς και της A3. Παρόλο που το μοτίβο αυτό χηλικής δέσμευσης μετάλλων ανευρίσκεται και στην A3 δεν έχει καταστεί δυνατό τα ταυτοποιηθεί ο ρόλος μιας τέτοιας πιθανής δέσμευσης μετάλλων σε ότι αφορά στην λειτουργία δέσμευσης κολλαγόνου από την A3. Είναι αμφίβολο προς το παρόν αν η χηλική σύνδεση μετάλλων στον A3 παρουσιάζει κάποιον λειτουργικό η δομικό ρόλο.

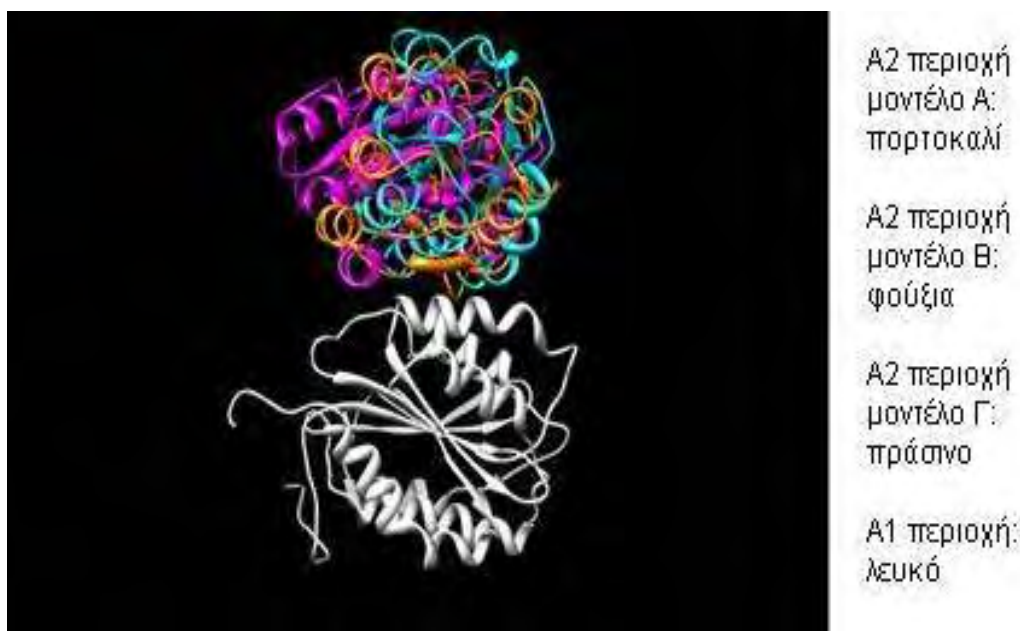
Η προσπελάσιμη από τον διαλύτη επιφάνεια της A3 είναι κυρίως υδροφιλική εκτός από περιορισμένες περιοχές στην οπίσθια και την κάτω επιφάνεια του μορίου. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν κυρίως σε αυτήν την υδρόφοβη επιφάνεια είναι τα Val984, Val985, Pro986, Leu994 και Val997 [52]. Η πρόσθια επιφάνεια του μορίου, που περιέχει την περιοχή που φέρεται ως υπεύθυνη για την σύνδεση του κολλαγόνου, είναι επίσης κυρίως υδρόφοβη. Η κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων στην επιφάνεια του μορίου είναι ιδιαίτερα ασύμμετρη [51].



Εικόνα A.10.: Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου A1-A2-A3 με αναπαράσταση τοπογραφίας των δισουλφιδικών δεσμών της A1 και A3 επικράτειας.

A.9. Σχεδιασμός πιθανών μοντέλων αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF

Για την εκτέλεση της παρούσας εργασίας προηγήθηκε η μελέτη για τα ακριβή σημεία αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF καθώς και η δομή του συμπλόκου τους με την εφαρμογή της πρόβλεψης πρόσδεσης «docking» σε συνδυασμό με προσομοιώσεις ΜΔ. Με τη χρήση του προγράμματος HEX, στο εργαστήριο του κ. Γεώργιου Παπαδόπουλου, προέκυψαν τα 18 πιθανά μοντέλα αλληλεπίδρασης. Από αυτά εντοπίστηκαν τα 3 ενεργειακά ευνοϊκότερα μοντέλα συμπλόκου που ονομάστηκαν Α, Β και Γ (Εικόνα Α.11)



Εικόνα Α.11: Τα τρία πιθανότερα μοντέλα αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών A1 (λευκό) και A2.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός της διεπιφάνειας (Πίνακας Α.1) του συμπλόκου και προσδιορίστηκαν τα αμινοξέα που συμμετέχουν σε αυτήν. Από αυτά τα κατάλοιπα Glu¹⁵⁴⁹ και Glu¹⁵⁵⁴ του μοντέλου Α, Glu¹⁶⁴⁰ του μοντέλου Β και Glu¹⁵¹¹, Glu¹⁵¹⁹, Glu¹⁵²² και Asp¹⁶⁶³ του μοντέλου Γ της επικράτειας Α2 που συμμετέχουν στο σχηματισμό ιοντικών γεφυρών θεωρήθηκαν τα πιο

αποφασιστικά για τη σταθερότητα του συμπλόκου καθώς εντοπίζονται στην κεντρική περιοχή της αλληλεπίδρασης (Πίνακες A.2, A.3) [53].

Ιδιότητες της διεπιφάνειας	A	B	Γ
Εμβαδόν της διεπιφάνειας (Å ²)	752	733	657
Πλήθος καταλοίπων στην διεπιφάνεια	24	19	18
% πολικών καταλοίπων της διεπιφάνειας	42	32	11
% μη-πολικών καταλοίπων της διεπιφάνειας	25	37	33
% φορτισμένων καταλοίπων της διεπιφάνειας	30	33	56
Δεσμοί υδρογόνου	8	8	8
Ιοντικές γέφυρες	23	23	40
Όγκος χάσματος (Å ³)	4003	3628	4509

Πίνακας A.1: Οι παράμετροι της διεπιφάνειας των μοντέλων αλληλεπίδρασης A, B και Γ των επικρατειών A1 και A2 του νWF, όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ProtorP.

A		B		Γ	
A1	A2	A1	A2	A1	A2
Lys ¹³⁶²	Met ¹⁵⁴⁵	Lys ¹³⁶²	Arg ¹⁶¹⁸	Glu ¹³⁵⁹	Glu ¹⁵¹¹
Leu ¹³⁶⁵	Val ¹⁵⁴⁶	Leu ¹³⁶⁵	Gln ¹⁶²⁴	Lys ¹³⁶²	Ala ¹⁵¹²
Phe ¹³⁶⁶	Thr ¹⁵⁴⁷	Phe ¹³⁶⁶	Val ¹⁶²⁶	Tyr ¹³⁶³	Asn ¹⁵¹⁵
Gln ¹³⁶⁷	Val ¹⁵⁴⁸	Ser ¹³⁷⁰	Val ¹⁶³⁶	Leu ¹³⁶⁵	Arg ¹⁵¹⁶
Ser ¹³⁷⁰	Glu ¹⁵⁴⁹	Lys ¹³⁷¹	Gln ¹⁶³⁷	Phe ¹³⁶⁶	Glu ¹⁵¹⁹
Lys ¹³⁷¹	Tyr ¹⁵⁵⁰	Ile ¹³⁷²	Glu ¹⁶⁴⁰	Gln ¹³⁶⁷	Phe ¹⁵²⁰
Ile ¹³⁷²	Pro ¹⁵⁵¹	Pro ¹³⁷⁵	Trp ¹⁶⁴⁴	Ser ¹³⁷⁰	Glu ¹⁵²²
Asp ¹³⁷³	Ser ¹⁵⁵³	Arg ¹³⁷⁹	Pro ¹⁶⁴⁵	Lys ¹³⁷¹	Glu ¹⁵²³
Pro ¹³⁷⁵	Glu ¹⁵⁵⁴	Arg ¹³⁹⁵	Asn ¹⁶⁴⁶	Arg ¹³⁹⁵	Gln ¹⁵²⁶
Arg ¹³⁹⁵	Gln ¹⁵⁵⁶	Asn ¹³⁹⁶	Ala ¹⁶⁴⁷	Asn ¹³⁹⁶	Arg ¹⁵²⁷
Asn ¹³⁹⁶	Asp ¹⁵⁶⁰	Val ¹³⁹⁸	Pro ¹⁶⁴⁸	Arg ¹³⁹⁹	Lys ¹⁵⁶²
Val ¹³⁹⁸	Arg ¹⁵⁶⁴	Arg ¹³⁹⁹	Leu ¹⁶⁵⁰	Tyr ¹⁴⁰⁰	Arg ¹⁵⁶⁶
Arg ¹³⁹⁹	Arg ¹⁵⁶⁹	Tyr ¹⁴⁰⁰	Arg ¹⁶⁵⁹	Gln ¹⁴⁰²	Phe ¹⁶⁵⁴
Tyr ¹⁴⁰⁰	Tyr ¹⁵⁷⁰	Gln ¹⁴⁰²	Glu ¹⁶⁶⁰	Lys ¹⁴⁰⁶	Glu ¹⁶⁵⁵

Gln ¹⁴⁰²	Gln ¹⁵⁷¹	Gly ¹⁴⁰³	Asp ¹⁶⁶³	Lys ¹⁴⁰⁷	Pro ¹⁶⁵⁸
Gly ¹⁴⁰³	Leu ¹⁵⁸⁰	Lys ¹⁴⁰⁶	Leu ¹⁶⁶⁶		Arg ¹⁶⁵⁹
Lys ¹⁴⁰⁶	Arg ¹⁵⁸³	Lys ¹⁴⁰⁷	Gln ¹⁶⁶⁷		Pro ¹⁶⁶²
Lys ¹⁴⁰⁷	Tyr ¹⁵⁸⁴	Lys ¹⁴⁰⁸	Arg ¹⁶⁶⁸		Asp ¹⁶⁶³
	Asp ¹⁵⁸⁷		Cys ¹⁶⁶⁹		
	His ¹⁵⁸⁸				
	Ser ¹⁵⁸⁹				
	Leu ¹⁵⁹¹				
	Ser ¹⁵⁹³				
	Gln ¹⁵⁹⁴				

Πίνακας A.2: Τα κατάλοιπα που εντοπίζονται στη διεπιφάνεια των μοντέλων αλληλεπίδρασης A, B και Γ του νWF, όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ProtorP.

A		B		Γ	
A1	A2	A1	A2	A1	A2
Lys ¹³⁶²	– Asp ¹⁵⁸⁷	Lys ¹³⁷¹	– Glu ¹⁶⁶⁰	Glu ¹³⁵⁹	– Arg ¹⁶⁵⁹
Lys ¹³⁷¹	– Asp ¹⁵⁶⁰	Lys ¹³⁷¹	– Asp ¹⁶⁶³	Lys ¹³⁶²	– Glu ¹⁶⁵⁵
Lys ¹³⁷¹	– Glu ¹⁵⁵⁴	Arg ¹³⁹⁵	– Gln ¹⁶³⁷	Phe ¹³⁶⁶	– Arg ¹⁵¹⁶
Ile ¹³⁷²	– Glu ¹⁵⁵⁴	Arg ¹³⁹⁵	– Glu ¹⁶⁴⁰	Gln ¹³⁶⁷	– Arg ¹⁵¹⁶
Arg ¹³⁹⁵	– Asp ¹⁵⁸⁷	Arg ¹³⁹⁹	– Glu ¹⁶⁴⁰	Lys ¹³⁷¹	– Glu ¹⁵¹¹
Lys ¹⁴⁰⁶	– Arg ¹⁵⁶⁹	Lys ¹⁴⁰⁶	– Cys ¹⁶⁶⁹	Arg ¹³⁹⁵	– Asp ¹⁶⁶³
Lys ¹⁴⁰⁶	– Tyr ¹⁵⁷⁰	Lys ¹⁴⁰⁶	– Gln ¹⁶²⁴	Arg ¹³⁹⁹	– Pro ¹⁶⁵⁸
Lys ¹⁴⁰⁶	– Glu ¹⁵⁴⁹	Lys ¹⁴⁰⁶	– Arg ¹⁶⁶⁸	Arg ¹³⁹⁹	– Glu ¹⁵²³
Lys ¹⁴⁰⁷	– Glu ¹⁵⁵⁴	Lys ¹⁴⁰⁷	– Glu ¹⁶⁶⁰	Lys ¹⁴⁰⁶	– Glu ¹⁵²²
Lys ¹⁴⁰⁷	– Glu ¹⁵⁴⁹	Lys ¹⁴⁰⁷	– Asp ¹⁶⁶³	Lys ¹⁴⁰⁷	– Glu ¹⁵¹⁹

Πίνακας A.3: Οι δέκα πιο σημαντικές ιοντικές γέφυρες που αναπτύσσονται στις διεπιφάνειες των μοντέλων A, B και Γ του νWF, όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα FastContact

Για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης, σχεδιάστηκαν σημειακές μεταλλάξεις σε κατάλοιπα (**Πίνακας A.4**), οι οποίες πιθανόν να οδηγήσουν σε αλλαγές στερεοδιατάξεων των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση σε διαφορετική αλληλεπίδραση στην διεπιφάνεια του συμπλόκου.

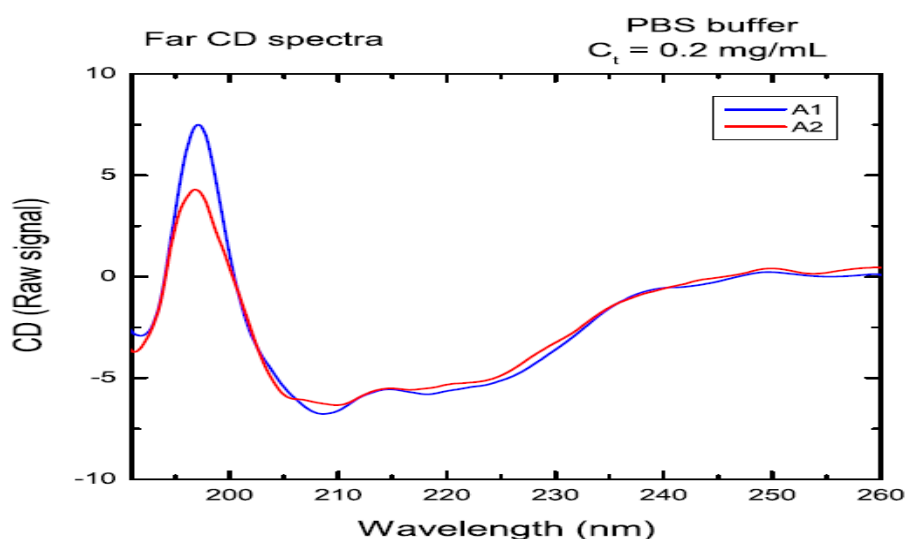
Μοντέλο	Σημειακή Μετάλλαξη	Μετάλλαξη Αμινοξέος
A	GAG→GCG	Glu ¹⁵⁴⁹ → Ala ¹⁵⁴⁹
B	GAG→GCG	Glu ¹⁶⁴⁰ → Ala ¹⁶⁴⁰
Γ	GAG→GCA	Glu ¹⁵¹¹ → Ala ¹⁵¹¹

Πίνακας A.4: Σχεδιασμός μεταλλάξεων του γονιδίου A2 του vWF στα μοντέλα A, B και Γ

A.10. Μελέτη αλληλεπίδρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

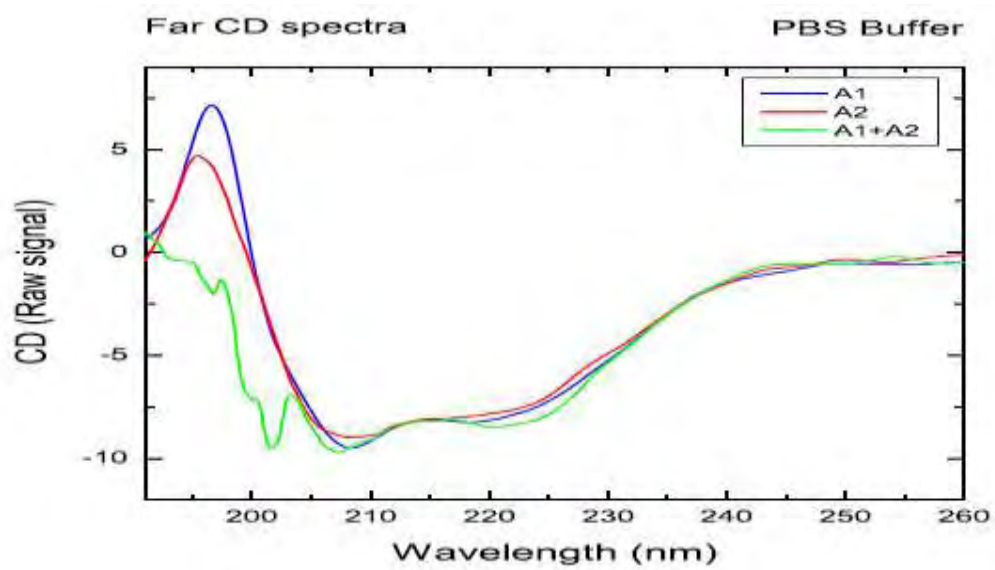
Στα πλαίσια προηγηθείσας εργασίας [53] τα γονίδια A1 και A2 του vWF ενισχύθηκαν, κλωνοποιήθηκαν σε φορέα έκφρασης pET-M60 που μετασχημάτισαν επιδεικτικά κύτταρα έκφρασης E.coli BL21(DE3) και ακολούθησε η υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2.

Έπειτα από τις απομονωμένες πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF, λήφθηκαν ξεχωριστά καταγραφές φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού (Εικόνα A.12). Τα φάσματα CD καταγράφηκαν στην περιοχή του άπω υπεριώδους σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS(1x) και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 0,2mg/ml. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1nm.



Εικόνα A.12: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού των πρωτεϊνών A1 και A2

Ακολούθησε η λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού του ισομοριακού μίγματος των πρωτεϊνών A1 και A2 στις παραπάνω συνθήκες, για να διαπιστωθεί η μεταξύ τους αλληλεπίδραση (Εικόνα A.13). Η καμπύλη που προκύπτει από το ισομοριακό μίγμα, δεν συμπίπτει με τις καμπύλες των πρωτεϊνών A1 και A2, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι A1 και A2 επικράτεις αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, σχηματίζοντας σύμπλοκο με διαφορές στην δευτεροταγή δομή.



Εικόνα A.13: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού των πρωτεϊνών A1, A2 και του συμπλόκου τους

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, έχει αποδειχθεί ότι η A1 επικράτεια του vWF αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα GB1ba των αιμοπεταλίων και πυροδοτεί τον σχηματισμό θρόμβου, ενώ αντίθετα η A2 επικράτεια του vWF αλληλεπιδρά με την A1, παρεμποδίζοντας την πρόσδεση της τελευταίας στα αιμοπετάλια. Παράλληλα η A1 αναστέλλει την πρωτεόλυση της A2 από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13.

Είναι λοιπόν προφανές, ότι η αποσαφήνιση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης των περιοχών A1 και A2, μπορεί να οδηγήσει στον σχεδιασμό μορίων και φαρμάκων που μιμούμενα την A2 περιοχή θα παρεμπόδιζαν τον σχηματισμό θρόμβου, οπότε θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαλυτοί αντιθρομβωτικοί παράγοντες.

Η πρόοδος που έχει συντελεσθεί μέχρι τώρα, με τον σχεδιασμό τριών πιθανών μοντέλων αλληλεπίδρασης μεταξύ των A1 και A2 περιοχών μέσω προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (παράγραφος A.9.) καθώς και η καταγραφή φασματοπλωσιμετρίας κυκλικού διχρωϊσμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF, που απέδειξε τον σχηματισμό συμπλόκου, επιτρέπουν την παραπέρα μελέτη, μέσω του σχεδιασμού μεταλλαγμάτων της A2 περιοχής και τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων με την A1 περιοχή με φασματοσκοπία φθορισμού. Στην παρούσα εργασία θα προχωρήσουμε στην υπερέκφραση και την απομόνωση τριών μεταλλαγμάτων της A2 περιοχής (A, B και Γ) και της επικράτειας A1 του vWF, ώστε μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού να προσπαθήσουμε να διαλευκάνουμε τον μηχανισμό αλληλεπίδρασής τους.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. Αντιδραστήρια

Acetic Acid (*Merck, Germany*)

Acrylamide (*Applichem, Germany*)

Agar (*Sigma-Aldrich, Germany*)

Agarose 4B (*Macherey-Nagel, France*)

Ampicillin (*Sigma-Aldrich, Germany*)

APS (*Sigma-Aldrich, Germany*)

ATP (*Fluka, Germany*)

Bromophenol Blue (*Fluka, Germany*)

BSA (*New England Biolabs, UK*)

Coomasie Brilliant Blue (*Fluka, Germany*)

Dialysis Tubes (*Sigma-Aldrich, Germany*)

DMSO (*Sigma-Aldrich, Germany*)

EcoRI-HF (20,000 U/ml) (*New England Biolabs, UK*)

EDTA (*Panreac, Spain*)

EDTA Free Tablets (*Roche, UK*)

Ethanol (*Merck, Germany*)

Extract II (*Macherey-Nagel, France*)

Glucose (*Sigma-Aldrich, Germany*)

Glycerol (*Merck, Germany*)

Glycine (*Sigma-Aldrich, Germany*)

Hydrochloric Acid (*Merck, Germany*)

Imidazole (*Merck, Germany*)

IPTG (*Fermentas, Lithuania*)

Kanamycin (*Sigma-Aldrich, Germany*)

LB Agar (*Scharlau, Germany*)

LB Broth (*Scharlau, Germany*)

Lysozyme (*Sigma-Aldrich, Germany*)

Magnesium Chloride (*Panreac, Spain*)

2-Mercaptoethanol (*Sigma-Aldrich, Germany*)

Methanol (*Merck, Germany*)

Ni-NTA beads (*Qiagen, The Netherlands*)

Ni Superflow beads (*GE Healthcare, UK*)

Nucleospin Plasmid (*Macherey-Nagel, France*)

PMSF (*Merck, Germany*)

2-Propanol (*Merck, Germany*)

Protein Ladder (*New England Biolabs, UK- Invitrogen-UK*)

Sall-HF (20,000 U/ml) (*New England Biolabs, UK*)

SDS (*Sigma Aldrich, Germany*)

Sephadex G-50 (*GE Healthcare, UK*)

Sodium Chloride (*Merck, Germany*)

Sodium Hydrogen Phosphate (*Merck, Germany*)

Sodium Phosphate (*Merck, Germany*)

T4 DNA Ligase (20,000 U) (*New England Biolabs, UK*)

TEMED (*Sigma Aldrich, Germany*)

Tris Base (*Merck, Germany*)

Vivaspin 15 (*Santorius Stedim Biotech, Germany*)

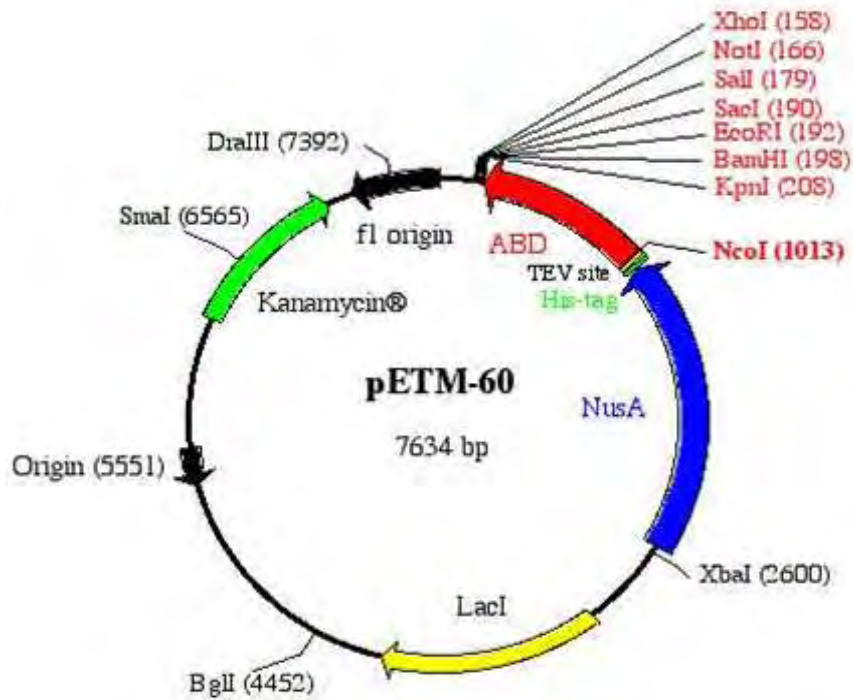
B.2. Βακτηριακά στελέχη-πλασμιδιακοί φορείς

Για την εκτέλεση της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pETM60 που περιέχει τις αλληλουχίες των μεταλλαγμάτων A, B και Γ ξεχωριστά. Η παραλαβή επιθυμητών ανασυνδυασμένων φορέων pETM60, απαιτεί τον σχεδιασμό των μεταλλαγμάτων με την μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης σημείου, το μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων XL1-Blue, τον πολλαπλασιασμό τους, την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με τις μεθόδους “mini prep” και “gel extraction” και τέλος εισαγωγή των επιθυμητών αλληλουχιών στο φορέα PetM 60 με ligation. Η διαδικασία αυτή εκτελέστηκε από την διδάκτορα Καρούλια Ζωή, στο εργαστήριο Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας του τμήματος B&B του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κ. Κοντού Μαρία.

B.2.1. Το σύστημα pET

Το σύστημα pET αποτελεί ένα από τα καλύτερα συστήματα για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα κύτταρα E.coli, εξασφαλίζοντας υψηλά επίπεδα έκφρασης και αυστηρό έλεγχο στο βασικό επίπεδο της μετάφρασης.

Στον φορέα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία (pETM60), τα γονίδια των προς έκφραση πρωτεϊνών βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή T7 και του καταστολέα της λακτόζης. Η χρωμοσωμική ένθεση του τμήματος DE3 βακτηριοφάγου στα κύτταρα E.coli, περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση, το οποίο επίσης ελέγχεται από τον καταστολέα της λακτόζης. Η έκφραση του εκάστοτε πολυπεπτιδίου επιτελείται λοιπόν κατ' αποκλειστικότητα από την T7 RNA πολυμεράση, κατόπιν ρύθμισης με προσθήκη ισοπροπυλ-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοζιδίου (IPTG). Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η πρόωρη έκφραση και επιτυγχάνεται υψηλή απόδοση (**Εικόνα B.1**)



Εικόνα Β.1: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pET-M60.

Οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από τον φορέα pETM60, είναι συνδεδεμένες στο αμινοτελικό τους άκρο με μια ουρά 6 ιστιδινών (His-tag), που προσφέρει το πλεονέκτημα της εύκολης απομόνωσης και καθαρισμού των πρωτεϊνών σε στήλη αγκιστείας Ni, και ένα πολυπεπίδιο NusA-tag (πρωτεΐνη συνοδός), που συμβάλλει στην σταθεροποίηση της τριτοταγούς δομής μεγάλων πρωτεϊνών και αυξάνει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Η απομάκρυνση των επιτόπων NusA-tag και εξαιστιδίνης μπορεί να γίνει εύκολα με αποκοπή, αφού στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη υπάρχει θέση αναγνώρισης της πρωτεάσης TEV. Ο φορέας pETM60 προσφέρει επίσης ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη, ώστε να γίνεται εύκολα η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε μια καλλιέργεια.

B.2.2. Επιδεικτικά κύτταρα BL21(DE3) PLysS

Το είδος των κυττάρων *Escherichia coli* BL21 χρησιμοποιείται συνήθως ως αποδέκτης για πρωτεϊνική έκφραση και καθαρισμό. Τα BL21 κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πρωτεϊνικούς φορείς έκφρασης που είναι υπό έλεγχο του T7 υποκινητή, όπως οι φορείς PET. Αυτό το είδος των κυττάρων περιέχει το T7 γονίδιο βακτηριοφάγων 1, που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση υπό έλεγχο του υποκινητή lacUV5. Το πλασμίδιο PLysS κωδικοποιεί τη λυσοζύμη T7, η οποία καθιστά την T7 RNA πολυμεράση ανενεργή προσδένοντάς την. Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με την προσθήκη IPTG, οδηγεί σε πλεόνασμα της πολυμεράσης σε ενεργή μορφή.

Η παρασκευή των BL21 επιδεικτικών κυττάρων βασίζεται στο πρωτόκολλο CaCl₂ Competent Cells και η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Καλλιέργεια κυττάρων σε 3ml LB θρεπτικό υλικό (από αποικίες κυττάρων που έχουν μεγαλώσει σε τρυβλίο με LB άγαρ θρεπτικό υλικό) και επώαση στους 37° C στις 210rpm για 16 ώρες
- Καλλιέργεια κυττάρων σε 100ml LB θρεπτικό υλικό (1 ml από την καλλιέργεια των 3ml) και επώαση στους 37° C στις 210rpm έως ότου η O.D._{595nm} φτάσει 0,4
- Μόλις γίνει η O.D._{595nm} 0,4 γίνεται μεταφορά των κυττάρων σε αποστειρωμένους σωλήνες των 50ml και τοποθέτηση αυτών για 10 λεπτά στον πάγο
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στους 4° C στις 4000rpm για 10 λεπτά
- Απόρριψη υπερκείμενου και τοποθέτηση των σωλήνων κατακόρυφα για 1 λεπτό ώστε να φύγει η περίσσεια του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 30ml παγωμένου διαλύματος MgCl₂-CaCl₂ (αναλογία 80% MgCl₂ και 20% CaCl₂) σε κάθε σωλήνα
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στους 4° C στις 4000rpm για 10 λεπτά
- Τοποθέτηση των σωλήνων κατακόρυφα για 1 λεπτό ώστε να φύγει η περίσσεια του υπερκείμενου
- Προσθήκη 2ml CaCl₂ (συγκέντρωσης 0,1M) σε κάθε σωλήνα
- Προσθήκη 70μl DMSO και ανάδευση ελαφρώς για 15 λεπτά στον πάγο
- Προσθήκη 70μl DMSO και ανάδευση ελαφρώς και γρήγορη διανομή των κυττάρων σε σωλήνες των 200μl
- Αποθήκευση στους -80° C

B.3. Μοριακές τεχνικές

B.3.1. Απομόνωση πλασμιδίων (mini-preps)

Για την εκτέλεση της παρούσας εργασίας είναι απαραίτητη η απομόνωση των πλασμιδίων, η ενζυμική κατεργασία τους και η κλωνοποίηση των γονιδίων σε πλασμίδια pET-60M.

Η απομόνωση των πλασμιδίων επιτυγχάνεται με την χρήση του kit «Nucleospin Plasmid» με την εξής διαδικασία:

- Καλλιέργεια 5ml βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB
- Φυγοκέντρηση για 30s στις 11.000rpm σε RT. Απόχυση υπερκείμενου και διατήρηση ιζήματος
- Προσθήκη 250μl αντιδραστηρίου A1 (4°C) και έντονη ανακίνηση
- Προσθήκη 250μl αντιδραστηρίου A2 και ήπια ανάδευση
- Επώαση του μίγματος για 5min σε RT.
- Προσθήκη 300μl αντιδραστηρίου A3 και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση για 10min στις 11.000rpm σε RT
- Μεταφορά υπερκείμενου σε στήλες καθαρισμού των 2ml
- Φυγοκέντρηση για 1min στις 11.000rpm σε RT
- Προσθήκη 600μl αντιδραστηρίου A4
- Φυγοκέντρηση για 1min στις 11.000rpm σε RT
- Απόρριψη υπερκείμενου και φυγοκέντρηση για 1min στις 11.000rpm σε RT
- Μεταφορά στήλης σε καθαρούς σωλήνες των 1,5ml
- Προσθήκη 20μl αντιδραστηρίου AE για να γίνει έκλουση
- Φυγοκέντρηση για 1min στις 11.000rpm σε RT
- Προσθήκη 10μl του αντιδραστηρίου AE
- Φυγοκέντρηση για 1min στις 11.000rpm σε RT
- Αποθήκευση στους -20°C για περαιτέρω χρήση

B.3.2. Ενζυμικές πέψεις-κατεργασία πλασμιδιακών φορέων

Προκειμένου να εισαχθούν τα γονίδια των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2, και των μεταλλαγμάτων τους, στους φορείς pET-M60 πραγματοποιήθηκαν διπλές πέψεις με περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-HF* και *Sall-HF*, ώστε να δημιουργηθούν αλληλεπικαλυπτόμενα άκρα (sticky ends), ως εξής:

DNA	20μg
<i>EcoRI</i> Buffer	10X
<i>EcoRI-HF</i>	2U
<i>Sall-HF</i>	2U
Τελικός όγκος	20μl

Έπειτα ακολούθησε κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2, καθώς και των μεταλλαγμάτων τους, στο φορέα έκφρασης pET-M60 και η κατάλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των γραμμικών φορέων και των ενθεμάτων πραγματοποιήθηκε με προσθήκη T4 λιγάσης.

B.4. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων και καλλιέργειες

B.4.1. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων και καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα

Τα επιδεκτικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εισαγωγή σε αυτά πλασμιδιακού DNA, στην περίπτωση μας του ανασυνδυασμένου φορέα pET-M60. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων γίνεται ως εξής:

- Σε 50μl επιδεκτικών κυττάρων προστίθενται 50ng πλασμιδιακού DNA
- Παραμονή στον πάγο για 20min
- Heat shock στους 42°C για 45s
- Ψύξη στον πάγο για 2min

- Προσθήκη 800μl θρεπτικού υλικού LB
- Επώαση στους 37oC για 1h, ώστε να αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα
- Φυγοκέντρωση στα 13.000g για 1min
- Απόχυση μέρους του υπερκείμενου και επαναϊώρηση των κυττάρων σε 100μl LB

Έπειτα τα μετασχηματισμένα κύτταρα μεταφέρονται σε τρυβλία που έχουν στρωθεί με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB-agar ως εξής:

- Σε 20ml θρεπτικού υλικού LB-agar προστίθενται 20μl αντιβιοτικού καναμυκίνη
- Στρώνουμε στο τρυβλίο την παραπάνω ποσότητα θρεπτικού υλικού
- Αφού πήξη το θρεπτικό υλικό προσθέτουμε τα μετασχηματισμένα κύτταρα
- Το τρυβλίο επωάζεται για 16h στους 37oC

Μετά το πέρας της επώασης, στο τρυβλίο έχουν αναπτυχθεί μπλε και άσπρες αποικίες. Επιλέγουμε μόνο τις άσπρες αποικίες γιατί αυτές αποτελούνται από μετασχηματισμένα κύτταρα.

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω διαδικασίες έχουν σύσταση

Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) pH 7.2

Εκχύλισμα ζύμης	0,5% w/v
Τρυπτόνη	1,0% w/v
NaCl	1,0% w/v

Στέρεο θρεπτικό μέσο (LB-agar) pH 7.2

Εκχύλισμα ζύμης	0,5% w/v
Τρυπτόνη	1,0% w/v
NaCl	1,0% w/v
Άγαρ	1,5% w/v

B.4.2. Καλλιέργεια κυττάρων σε υγρό υπόστρωμα

Σκοπός της διεργασίας αυτής είναι η καλλιέργεια και ο πολλαπλασιασμός μόνο των μετασχηματισμένων κυττάρων. Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- Μεταφορά επιλεγμένων λευκών αποικιών σε σωλήνα με 5ml θρεπτικού υλικού LB.
- Προσθήκη αντιβιοτικού καναμυκίνη
- Ο σωλήνας επωάζεται στους 37°C μέχρι η O.D._{595nm} φθάσει 0,6 προστίθεται IPTG (0,1mM)
- Η επώαση συνεχίζεται για 16h στους 16°C

B.5. Υπερέκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Η διαδικασία της υπερέκφρασης και καθαρισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (A1, A2 και TEV) περιλαμβάνει την καλλιέργεια μεγάλων ποσοτήτων μετασχηματισμένων κυττάρων, την συλλογή τους με φυγοκέντρηση, την λύση των κυττάρων και την απομόνωσή των επιθυμητών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας ιόντων νικελίου.

B.5.1. Χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην δέσμευση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από σφαιρίδια συμπλοκοποιημένων ιόντων νικελίου (Ni-NTA). Τα ιόντα αυτά έχουν την ικανότητα δέσμευσης της ουράς 6 ιστιδινών (His-tag) που έχουν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στο αμινοτελικό τους άκρο, κατόπιν έκφρασής τους από μετασχηματισμένα κύτταρα με το πλασμίδιο pET-M60.

Αναλυτικά τα βήματα της μεθόδου είναι τα εξής:

- Σε θρεπτικό υλικό 1000ml γίνεται προσθήκη 10ml μετασχηματισμένων κυττάρων BL21, που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pETM60.
- Επώαση της καλλιέργειας για περίπου 3-4h στους 37°C, στις 210rpm.
- Όταν η O.D._{595nm} λάβει την τιμή 0.6 προστίθεται IPTG (0,1mM)
- Επώαση της καλλιέργειας για 16h στους 16°C, στις 150-180rpm.
- Διανομή των κυττάρων σε σωλήνες των 50ml και φυγοκέντρηση για 10min στους 4°C, στις 4.000rpm.

- Συλλογή του ιζήματος και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Τοποθέτηση κυττάρων στον πάγο και προσθήκη διαλύματος λύσης κυττάρων.
- Αναδιάλυση κυττάρων στο διάλυμα λύσης, μέσα στον πάγο
- Τοποθέτηση των κυττάρων στον πάγο για 1h και διάσπαση τους με υπέρηχους (sonication), έως ότου γίνει διαφανές το μίγμα.
- Διανομή των κυττάρων σε σωλήνες των 1,5ml και φυγοκέντρωση για 20min στους 4°C, στις 14.500rpm.
- Συλλογή υπερκείμενου, που περιέχει την πρωτεΐνη, και απόρριψη ιζήματος που περιέχει τα συστατικά των κυττάρων.
- Εξισορρόπηση στήλης με διάλυμα εξισορρόπησης (buffer N)
- Ανάμιξη εξισορροπημένης στήλης με υπερκείμενο διάλυμα του προηγούμενου βήματος, σε σωλήνα των 15ml.
- Ανάδευση και επώαση της στήλης για 2h στους 4°C για να δεθεί η ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη στην στήλη.
- Πακετάρισμα του μίγματος ρητίνης-πρωτεϊνών στην κατάλληλη στήλη
- Συλλογή των δειγμάτων που περιέχουν τις μη-προσδεμένες στη στήλη πρωτεΐνες (flow through)
- Διαδοχικές πλύσεις 10 όγκων στήλης με διαλύματα wash20 και wash30.
- Συλλογή των δειγμάτων που περιέχουν τρίτες πρωτεΐνες ή ανασυνδυσασμένες πρωτεΐνες χαλαρά συνδεδεμένες στην στήλη.
- Έκλυση της στήλης με διάλυμα έκλυσης, για να αποσυνδεθούν οι ανασυνδυσασμένες πρωτεΐνες από τα σφαιρίδια Ni.
- Συλλογή των δειγμάτων σε σωλήνες των 1,5ml.
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου των δειγμάτων flow through, wash20, wash30 και των εκλούσεων για να διαπιστωθεί η ποσοτική και ποιοτική σύσταση των δειγμάτων σε πρωτεΐνες.
- Συλλογή εκλουσμάτων και συμπύκνωση τους με PEG ή φίλτρα Vivaspin 15 (MB 10.000), εάν κριθεί απαραίτητο (αν η συγκέντρωση της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης στα δείγματα έκλυσης είναι χαμηλή).
- Διαπίδυση των δειγμάτων έκλυσης για 16h στους 4°C στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.
- Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C

B.5.1.2. Επιμέρους τεχνικές και διαλύματα

Λύση κυττάρων με υπέρηχους (sonication)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται για στην λύση μεγάλων ποσοτήτων κυττάρων. Τα κύτταρα αιωρούνται σε διάλυμα λύσης pH=8, που έχει την παρακάτω σύσταση:

b-mercaptoethanol	1mM
Roche inhibitor	1 ταμπλέτα/50ml
Lysozyme	200mg/100ml
Imidazole	20mM
NaH ₂ PO ₄	50mM
NaCl	500mM

Η λυσοζύμη είναι το ένζυμο που βοηθά στην λύση των κυττάρων, το NaCl ρυθμίζει την ιοντική ισχύ ώστε να διευκολύνεται η διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών μετά την λύση των κυττάρων, η β-μερκαπταιθανόλη είναι αναγωγικός παράγοντας, ενώ ο Roche inhibitor είναι μίγμα αναστολέων πρωτεασών, για την προστασία των πρωτεϊνών από πρωτεάσες που απελευθερώνονται μετά την λύση των κυττάρων.

Οι υπέρηχοι εφαρμόζονται για 4-6 χρονικά διαστήματα των 20s, έως ότου το διάλυμα να γίνει διαφανές και μειωθεί το ιξώδες του, ενώ ενδιάμεσα μεσολαβεί παύση 1min στο παγόλουτρο, ώστε να αποφεύγεται η υπερθέρμανση. Οι πρωτεΐνες του κυττάρου βρίσκονται στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρωση.

Διαπίδυση

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για την απομάκρυνση συστατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων από τα πρωτεϊνικά δείγματα. Μια μεμβράνη Visking dialysis tubing, βράζεται σε κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ και έπειτα προστίθενται σε αυτήν τα δείγματα των εκλούσεων που περιέχουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Η διαπίδυση πραγματοποιείται overnight στους 4°C σε διάλυμα διαπίδυσης (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT) με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση.

Buffer N (διάλυμα εξισορρόπησης) pH=8

NaCl 500mM

NaH₂PO₄ 50mM

Buffer wash20 (διάλυμα πλύσης) pH=8

Imidazole 20mM

NaH₂PO₄ 50mM

NaCl 500mM

Buffer wash30 (διάλυμα πλύσης) pH=8

Imidazole 30mM

NaH₂PO₄ 50mM

NaCl 500mM

Elution Buffer (διάλυμα έκλουσης) pH=8

Imidazole 250mM

NaH₂PO₄ 50mM

NaCl 500mM

B.5.2. Αποκοπή των τμημάτων ετικέτας (His-tag, NusA-tag), με χρήση πρωτεάσης TEV

Σε αυτό το στάδιο οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (A1 και A2) περιέχουν τα πεπτιδικά τμήματα εξαιστιδίνης (His-tag) και NusA-tag, που βοηθούν στην απομόνωση και την διαλυτότητα των πρωτεϊνών, αντίστοιχα. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες υποβλήθηκαν σε πέψη με την πρωτεάση TEV για την απομάκρυνση των ετικετών αυτών. Η πρωτεάση αυτή αναγνωρίζει και διασπά τον πεπτιδικό δεσμό ENLYFQG. Ο σκοπός της διεργασίας αυτής είναι η απομόνωση καθαρών πρωτεϊνών A1 και A2 χωρίς τα επιπλέον πεπτιδικά τμήματα και τα βήματα είναι τα εξής:

- Εξισορρόπηση της στήλης ιόντων νικελίου (Ni-NTA) με διάλυμα εξισορρόπησης (NaCl 500mM, NaH₂PO₄ 50mM).
- Επώαση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 που λήφθηκαν από την προηγούμενη διεργασία με πρωτεάση TEV, στην στήλη ιόντων νικελίου (Ni-NTA) σε αναλογία πρωτεάσης/πρωτεϊνών 1/10 .
- Ήπια ανάδευση για 2h στους 4°C. Στο διάστημα αυτό η πρωτεάση TEV αποκόπτει τις His-tag ουρές των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα οι πρωτεΐνες προσδένονται στην στήλη μέσω της His-tag ουράς.
- Πακετάρισμα του μίγματος ρητίνης-πρωτεϊνών στην κατάλληλη στήλη
- Συλλογή δειγμάτων που περιέχουν τις κομμένες πρωτεΐνες (flow through).
- Διαδοχικές πλύσεις με διαλύματα wash20 και wash30 και συλλογή δειγμάτων.
- Έκλυση στήλης με elution buffer και συλλογή δειγμάτων.
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου των δειγμάτων flow through, wash20, wash30 και των εκλούσεων για να διαπιστωθεί η ποσοτική και ποιοτική σύσταση των δειγμάτων σε πρωτεΐνες.
- Αποθήκευση των δειγμάτων flow through, που περιέχουν τις κομμένες πρωτεΐνες, στους -80°C σε διάλυμα γλυκερόλης 30% για περαιτέρω χρήση.

B.6. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πρωτεΐνη πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford με τη χρήση του αντιδραστηρίου Quick Start™ Bradford της εταιρείας Bio-Rad. 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 τη μέθοδο αυτή, είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την πρωτεϊνική συγκέντρωση, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Αρχικά, μετράται η απορρόφηση μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων BSA (Bovine Serum Albumin) στα 595nm. Συγκεκριμένα, σε 20μl από το κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης (0,2- 1,4 mg/ml) προστίθενται 980μl διαλύματος Bradford. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση απορρόφησης στα 595nm έπειτα από 5 λεπτά. Ακολούθως, μετράται η απορρόφηση του προς ανάλυση δείγματος και με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

B.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (SDS Page)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων ή σωματιδίων και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος, για τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο και για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους (M.B.), ενώ ως δείγματα μπορεί να είναι οτιδήποτε μπορεί να κουβαλάει φορτίο. Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές

ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (SDS Page), είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τον διαχωρισμό και την ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων, ενώ παράλληλα συνδυάζεται εύκολα και αποτελεσματικά με άλλες μεθόδους, πχ ανοσοαποτύπωση κατά western. Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης είναι χημικά αδρανείς και διάφανες με πόρους που δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης με το αντιδραστήριο N,N' -methylenebisacrylamide. Το μίγμα (ακρυλαμίδης, Tris-HCl, SDS, APS, TEMED) χύνεται μέσα σε καλούπια και οι πηκτές είναι επίπεδες, ανάμεσα σε 2 επίπεδα γυαλιά με σφραγισμένα τα πλαϊνά άκρα τους, ενώ τα δείγματα τοποθετούνται σε οπές (wells) στο πάνω μέρος της πηκτής. Στην SDS PAGE ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται 2 πηκτές, η πηκτή διαχωρισμού (separating gel) και η πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel). Η πηκτή επιστοιβάξης έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από την πηκτή διαχωρισμού, στην οποία γίνεται και ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του δείγματος. Οι δυο αυτοί παράμετροι, δηλαδή η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και ρυθμιστικού επιτρέπει σε δείγματα με μεγάλους όγκους να συμπυκνωθούν στην πρώτη πηκτή (stacking gel) πριν εισέλθουν στη δεύτερη πηκτή όπου και θα διαχωριστούν. Αυτό βελτιώνει κατά πολύ την ανάλυση καθώς ο διαχωρισμός όλων των πρωτεϊνών του δείγματος ξεκινάει από το ίδιο σημείο.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου 12% και η διαδικασία έχει ως εξής:

- Συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
- Κατασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού και τοποθέτησή του στα καλούπια.
- Πήξη του πηκτώματος διαχωρισμού, αφού πρώτα τοποθετηθεί ένα στρώμα ισοπροπανόλης στην κορυφή.
- Παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβάξης και τοποθέτησή του στα καλούπια.
- Ετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών (loading buffer) και θέρμανση στους $100^{\circ}C$ για 1-2min.

- Φόρτωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στα φρεάτια του πηκτώματος επιστοιβάξης.
- Ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, υπό την παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος (running buffer), στα 90mA για 1h περίπου.
- Χρώση του πηκτώματος με διάλυμα coomasie για 15min.
- Εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με το διάλυμα αποχρωματισμού.

Για την εκτέλεση της παραπάνω διεργασίας, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα και υλικά:

Separating gel 12% (πήκτωμα διαχωρισμού) 20ml

Acrylamid	30%
Tris-HCl (pH 8.8)	1,5mM
SDS	10%
APS	10%
TEMED	0,08ml
dH ₂ O	Μέχρι 20ml

Stacking gel 4% (πήκτωμα επιστοιβάξης) 10ml

Acrylamid	30%
Tris-HCl (pH 6.8)	1mM
SDS	10%
APS	10%
TEMED	0,1ml
dH ₂ O	Μέχρι 10ml

Running Buffer (10x)

Tris HCl	25mM
Glycine	0,2M
SDS	35mM
dH ₂ O	Μέχρι 1Lt

Loading Buffer (2x)

Bromophenol Blue	0,1%
b-mercaptoethanol	5%
Glycerol	10%
SDS	2%
Tris-HCL (pH 6.8)	50mM

Διάλυμα χρωστικής κυανού Coomasie

Χρωστική Coomasie	0,25%
Acetic acid	10%
Methanol	45%

Διάλυμα αποχρωματισμού

Acetic acid	10%
Methanol	45%

B.8. Φασματοσκοπικές τεχνικές

Στη μελέτη της δομής των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται ευρέως οι μεταβάσεις των ηλεκτρονίων των απομακρυσμένων ηλεκτρονιακών τροχιακών που παρατηρούνται κατά την απορρόφηση ακτινοβολίας. Τα φάσματα απορρόφησης των πρωτεϊνών σε θερμοκρασία δωματίου αποτελούνται από τη στατιστική άθροιση των πραγματοποιούμενων μεταβάσεων που αφορούν τις αρωματικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων. Το φάσμα απορρόφησης αποτελεί ένα γραμμικό συνδυασμό απορρόφησης των αμινοξέων φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και θρυπτοφάνης και συνήθως γίνονται οι μετρήσεις στην περιοχή της μέγιστης απορρόφησης στα 280 nm. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής στο ίδρυμα ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

B.8.1. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (Circular Dichroism – CD)

Η φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί να αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμη στον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών και στη μελέτη των δομικών μεταβολών λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων στην περιοχή του άπω υπεριώδους. Μετρώντας την επαγόμενη ελλειπτικότητα θ στην πόλωση που προκαλεί μια οπτικά ενεργός ουσία σε γραμμικά πολωμένο φως, σε συνάρτηση του μήκους κύματος λ μπορούν να διακριθούν τα διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά ενός μορίου σε διάλυμα.

Το δείγμα τοποθετείται σε κυψελίδα από την οποία διέρχονται γραμμικά πολωμένες δέσμες φωτός με δεξιόστροφες και αριστερόστροφες συνιστώσες της ίδιας αρχικής έντασης I_0 . Από τις τελικές τιμές έντασης I_L και I_R της εξερχόμενης ακτινοβολίας υπολογίζεται η διαφορά των απορροφήσεων A_L και A_R και η ελλειπτικότητα θ (σε μοίρες):

$$\theta = 2.303(A_L - A_R) \frac{180}{4\pi}$$

Ο κυκλικός διχρωϊσμός θ_λ της πρωτεΐνης σαν συνάρτηση του μήκους κύματος λ υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\theta_\lambda = \sum F_{i,\lambda} S_{\lambda,i} + \theta_{\text{όρυβος}}$$

Όπου $F_{i,\lambda}$ το κλάσμα συμμετοχής του κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής i στην πρωτεϊνική διαμόρφωση και $S_{\lambda,i}$ η ελλειπτικότητα του χαρακτηριστικού φάσματος κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής i .

Πραγματοποιήθηκε καταγραφή φάσματος της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χωριστά και στη συνέχεια του μίγματός τους. Χρησιμοποιήθηκε το φασματοπολωσίμετρο JASCO-715 (*JASCO Corporation*) και κυψελίδα χαλαζία με οπτική διαδρομή 1 cm. Τα φάσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος CDNN και υπολογίστηκε το ποσοστό των χαρακτηριστικών διαμόρφωσης των πεπτιδίων, στηριζόμενο σε πειραματικές τιμές πρωτεϊνών γνωστού ποσοστού έλικας.

B.8.2. Φασματοσκοπία φθορισμού

Η εκπομπή φωτός σαν αποτέλεσμα της διέγερσης του υλικού από την απορρόφηση ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος καλείται φθορισμός. Τα αρωματικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών απορροφούν στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους σε διακριτά μήκη κύματος και παρουσιάζουν χαρακτηριστικά φάσματα φθορισμού. Η παρουσία αρωματικών καταλοίπων στην αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεΐνης προκαλεί αλλαγή στην ένταση φθορισμού ή μετατόπιση στο μήκος κύματος κατά την πρωτεϊνική αναδίπλωση. Όσο λιγότερο πολικό είναι το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη, τόσο πιο ισχυρή είναι η ένταση του φθορισμού και τόσο πιο χαμηλό το μήκος κύματος του μέγιστου εκπομπής.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 χρησιμοποιήθηκε η διάταξη PTI QuantaMaster 3500. Αρχικά καταγράφηκε το φάσμα φθορισμού της κάθε πρωτεΐνης χωριστά στο μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της θρυπτοφάνης (280 nm) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε λήψη φάσματος φθορισμού του μίγματος των δύο πρωτεϊνών στις ίδιες συνθήκες. Η συγκέντρωση της μιας πρωτεΐνης διατηρήθηκε σταθερή και ακολούθησε η προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης της άλλης. Κατά την αλληλεπίδρασή τους παρατηρήθηκε σταδιακή μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Η περιγραφή της διαδικασίας μοιάζει με μια αντιστρεπτή αντίδραση της μορφής $N \leftrightarrow U$, όπου N η διαμόρφωση της πρωτεΐνης και U η διαμόρφωση του συμπλόκου των δύο πρωτεϊνών. Η σταθερά ισορροπίας δίνεται από τη σχέση:

$$K_U = X_U / X_N$$

Όπου X_i το γραμμομοριακό κλάσμα του πρωτεϊνικού πληθυσμού στη δομική κατάσταση i .

Η προσθήκη της δεύτερης πρωτεΐνης προκαλεί αλλαγή των πρωτεϊνικών πληθυσμών στο διάλυμα και μεταβολή της σταθεράς K_U . Η παρακολούθηση των αλλαγών των φασμάτων φθορισμού που συνόδευσαν την προσθήκη της δεύτερης πρωτεΐνης επέτρεψε τον υπολογισμό της αναλογίας των δύο πρωτεϊνών και της σταθεράς χημικής ισορροπίας.

Οι μεταβολές των φασμάτων φθορισμού σχεδόν πάντα αφορούν παραμέτρους Θ_i που μεταβάλλονται γραμμικά με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών πληθυσμών. Σε συνδυασμό με τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ισχύει:

$$\Theta_{obs} = \frac{\Theta_N + \alpha_N [C_{ΑΠΟΔ}] + (\Theta_U + \alpha_U [C_{ΑΠΟΔ}]) e^{\frac{-\Delta G_{D-N}^{H_2O} + m[C_{ΑΠΟΔ}]}{RT}}}{1 + e^{\frac{-\Delta G_{D-N}^{H_2O} + m[C_{ΑΠΟΔ}]}{RT}}}$$

Όπου Θ_{obs} η πειραματικά παρατηρούμενη μεταβλητή και Θ_i η τιμή της μεταβλητής στη δομική κατάσταση i .

Η εξίσωση χρησιμοποιείται για τη μη γραμμική προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων και τον υπολογισμό των παραμέτρων $\Delta G_{D-N}^{H_2O}$ (μεταβολή ελεύθερης ενέργειας) και m_{D-N} (γραμμικής σταθεράς αναλογίας cal/mol/M) που χαρακτηρίζουν την πρωτεϊνική αποδίπλωση.

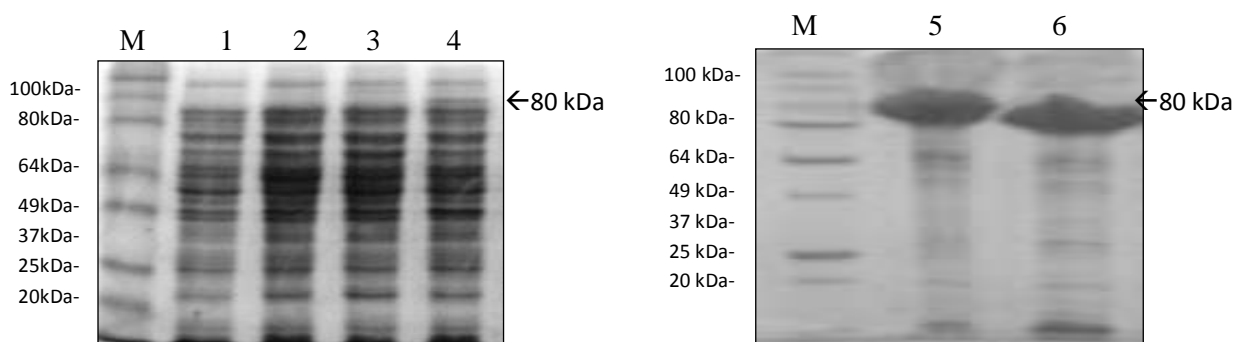
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. Υπερέκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών

Γ.1.1. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων έκφρασης BL21 με ανασυνδυασμένα πλασμίδια pET-M60, που είχε αποδειχθεί με αλληλούχιση ότι διέθεταν τα ενθέματα των γονιδίων A1 και A2 του vWF. Ο μετασχηματισμός έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο B.3.1. και ακολούθησε η καλλιέργεια των μετασχηματισμένων επιδεκτικών κυττάρων (λευκές αποικίες) σε υγρό υπόστρωμα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο B.3.2.

Κατόπιν έγινε επαγωγή της υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με την προσθήκη 0,1mM IPTG και επώαση για 16h στους 16°C. Ακολούθησε λύση κυττάρων με υπέρηχους, μέσα σε διάλυμα λύσης κυττάρων, η σύσταση του οποίου αναφέρεται στην παράγραφο B.4.1.2. και παραλαβή των κυτταρικών εκχυλισμάτων τα οποία ηλεκτροφορούνται σε πήκτη SDS-PAGE. (Εικόνα Γ.1)



M: Μάρτυρας

1: A1, πριν την προσθήκη IPTG

2: A1, 0,1mM IPTG, 16h, 16°C υπερεκφραζόμενο

3: A2, 0,1mM IPTG, 16h, 16°C υπερεκφραζόμενο

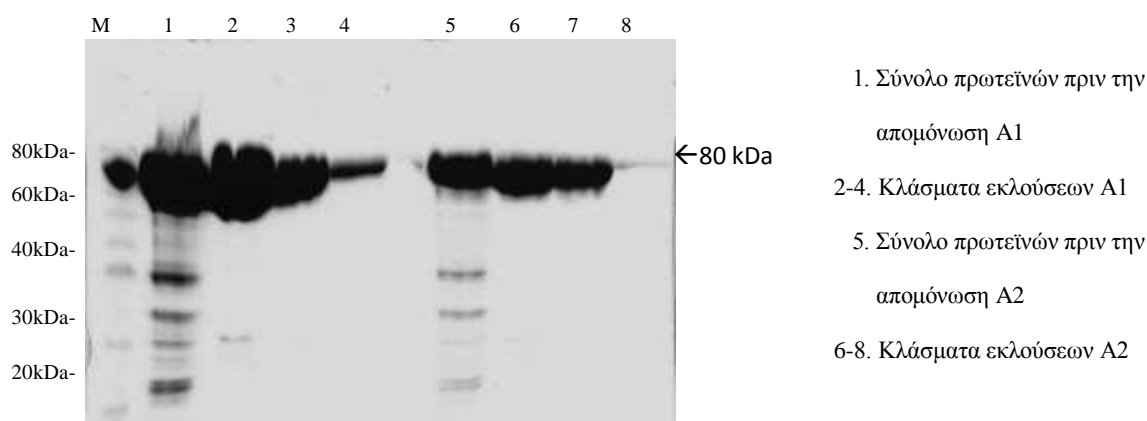
4: A2, πριν την προσθήκη IPTG

5: A1, 0,1mM IPTG, 16h, 16°C ίζημα

6: A2, 0,1mM IPTG, 16h, 16°C ίζημα

Εικόνα Γ.1.: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF. Οι επιθυμητές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa.

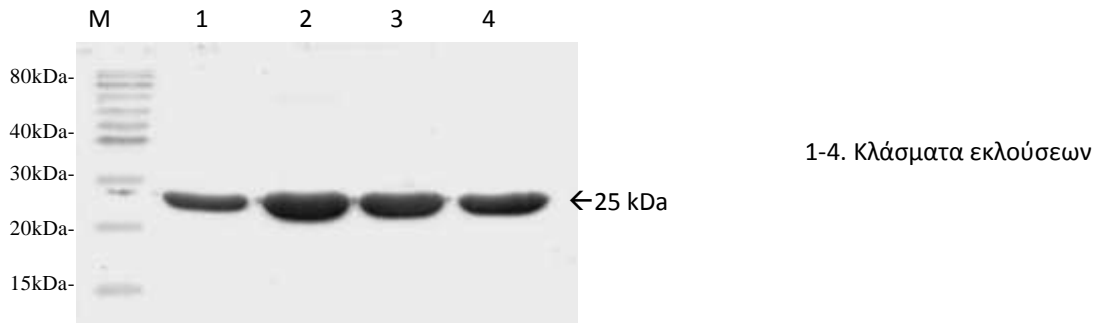
Έπειτα το εκχύλισμα των κυττάρων «επωάστηκε» με τα σφαιρίδια της στήλης Ni-NTA, που είχε ως τελικό αποτέλεσμα την καθήλωση των A1 και A2 μέσω των ιστιδινών που είχαν προστεθεί. Ακολουθούν εκλούσεις με ιμιδαζόλιο και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% v/v (**Εικόνα Γ.2**). Η σύσταση των διαλυμάτων και αναλυτικά η διαδικασία περιγράφονται στις παραγράφους B.4.1.2. και B.4.1. αντίστοιχα.



Εικόνα Γ.2.: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF. Οι επιθυμητές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa.

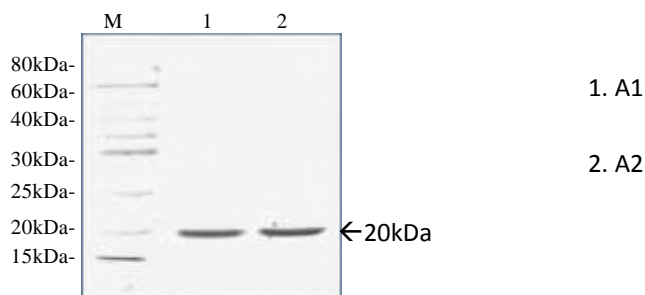
Γ.1.2. Απομόνωση της πρωτεάσης TEV και πρωτεόλυση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF

Η πρωτεάση TEV απομονώθηκε με στήλη Ni-NTA κάτω από τις ίδιες συνθήκες με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 (παράγραφος Γ.1.1.). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% v/v (**Εικόνα Γ.3**).



Εικόνα Γ.3: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεάσης TEV με χρωματογραφία συγγένειας. Η TEV εντοπίστηκε στο αναμενόμενο μέγεθος των 25kDa

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε διαπίδυση των εκλουσμάτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 σε διάλυμα βέλτιστης δράσης της πρωτεάσης για 18h στους 4°C και αναλογία πρωτεάσης/πρωτεϊνών 1mg/10mg. Κατά την διάρκεια της επώασης η πρωτεάση TEV κόβει τις ετικέτες His-Tag, οι οποίες παραμένουν προσκολλημένες στη στήλη νικελίου. Οπότε η έκπλυση του μίγματος πρωτεϊνών-ρητίνης, οδηγεί στην συλλογή των επιθυμητών πρωτεϊνών A1 και A2 (παράγραφος B.4.2.). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων (**Εικόνα Γ.4**)

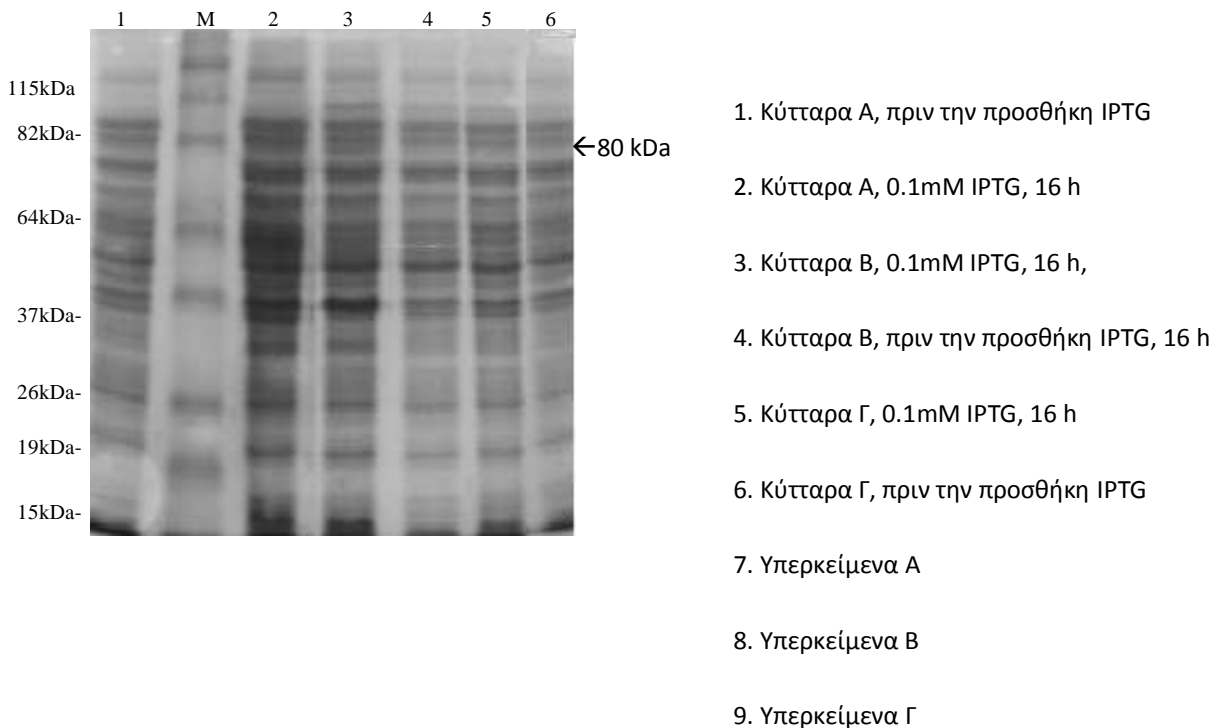


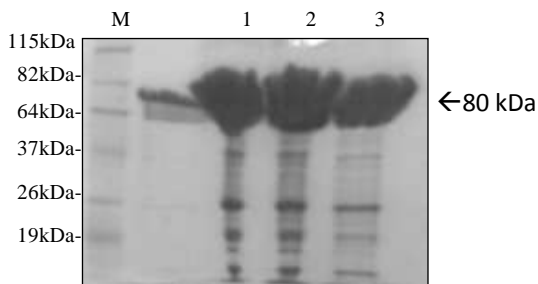
Εικόνα Γ.4: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά την πρωτεόλυση. Οι επιθυμητές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στα αναμενόμενα μεγέθη των 20 kDa.

Γ.1.3. Υπερέκφραση και απομόνωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2(A,B και Γ)

Όπως και στις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 φυσιολογικού τύπου (παράγραφος Γ.3.1.), πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων έκφρασης BL21 με ανασυνδυασμένα πλασμίδια, που είχε αποδειχθεί με αλληλούχηση ότι διέθεταν τα ενθέματα των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ).

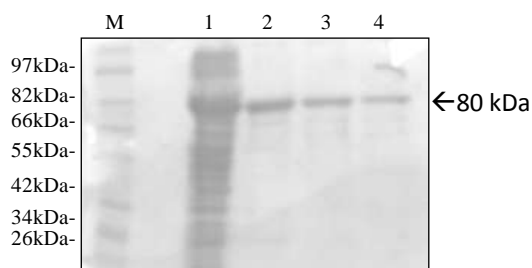
Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A, B και Γ με την προσθήκη 0,1mM για 16h στους 16°C κι έπειτα λύση κυττάρων με υπέρηχους, μέσα σε διάλυμα λύσης κυττάρων (B.4.1.2.) και παραλαβή των κυτταρικών εκχυλισμάτων τα οποία ηλεκτροφορούνται σε πήκτη SDS-PAGE 12% v/v (Εικόνα Γ.5).





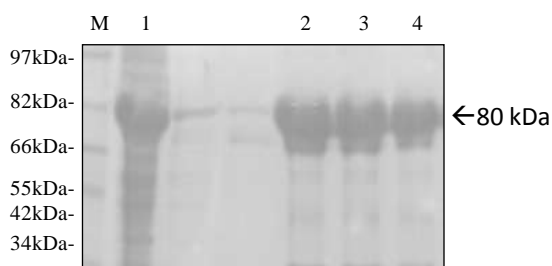
Εικόνα Γ.5: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων υπερέκφρασης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF

Έπειτα το εκχύλισμα των κυττάρων «επωάστηκε» με τα σφαιρίδια της ρητίνης Ni-NTA, που είχε ως τελικό αποτέλεσμα την καθήλωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A, B και Γ μέσω της ετικέτας εξαϊστιδίνης. Ακολούθησαν εκλούσεις με ιμιδαζόλιο και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% v/v (Εικόνες Γ.6, Γ.7 και Γ.8).



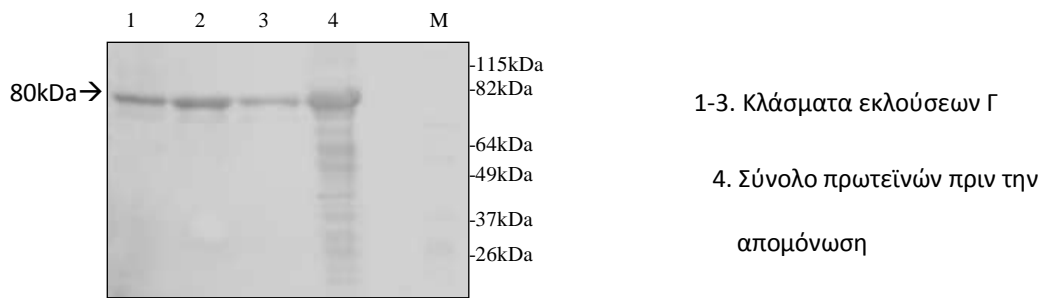
1. Σύνολο πρωτεϊνών πριν την απομόνωση
2-4. Κλάσματα εκλούσεων A

Εικόνα Γ.6: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης A του vWF. Η επιθυμητή πρωτεΐνη εντοπίστηκε στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa.



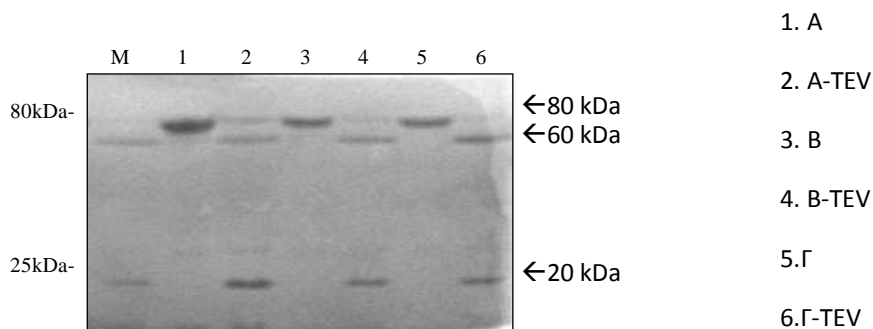
1. Σύνολο πρωτεϊνών πριν την απομόνωση
2-4. Κλάσματα εκλούσεων B

Εικόνα Γ.7: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης B του vWF. Η επιθυμητή πρωτεΐνη εντοπίστηκε στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa.



Εικόνα Γ.8: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Γ του vWF. Η επιθυμητή πρωτεΐνη εντοπίστηκε στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa.

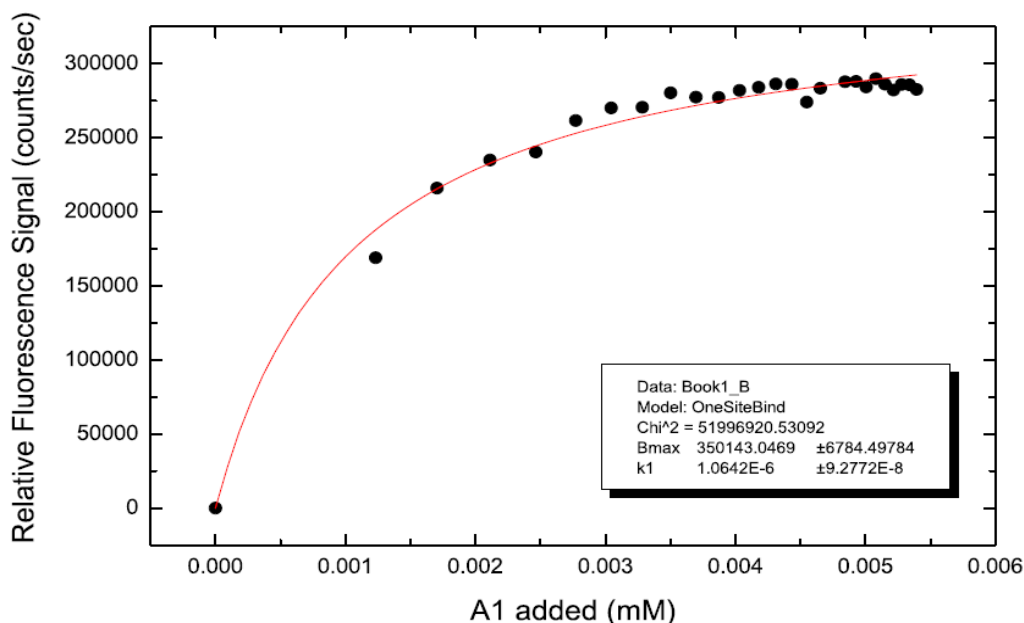
Ακολούθησε πρωτεόλυση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A, B και Γ με την πρωτεάση TEV, όπως έγινε και με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 (παράγραφος Γ.1.2.). Κατόπιν χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας Ni-NTA για την απομόνωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% v/v (**Εικόνα Γ.9**).



Εικόνα Γ.9: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεόλυσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF από την πρωτεάση TEV. Οι επιθυμητές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 20 kDa

Γ.2. Μελέτη αλληλεπίδρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με φασματοσκοπία φθορισμού

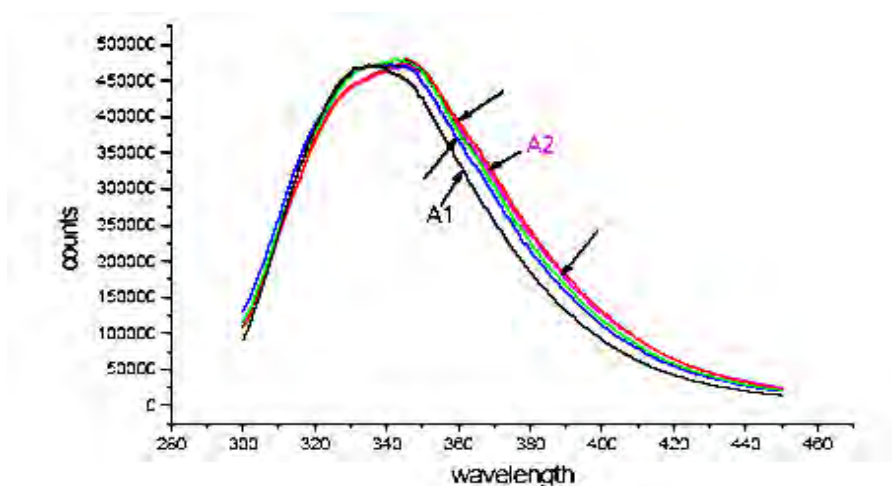
Έπειτα πραγματοποιήθηκε η μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF σε συνάρτηση με τη μεταβολή της έντασης του σήματος φθορισμού. Οι πρωτεΐνες μελετήθηκαν σε διάλυμα 50 mM Tris (pH 7.5), 300 mM NaCl και το φάσμα φθορισμού καταγράφηκε στο μήκος κύματος 280 nm, όπου παρουσιάζεται η διέγερση των καταλοίπων θρυπτοφάνης. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης A2 παρέμενε σταθερή (2 μ M) και ακολουθούσε η προσθήκη της A1 σε αυξανόμενη συγκέντρωση έως 6 μ M. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα (Εικόνα Γ.12) καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης A1 στο πρωτεϊνικό διάλυμα αυξάνεται και το σήμα φθορισμού λόγω της έντονης αλληλεπίδρασης των δομών της A1 και της A2. Οπότε η σχηματιζόμενη καμπύλη επιβεβαιώνει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών και είναι δυνατός ο υπολογισμός της σταθεράς αποσύνδεσης του συμπλόκου (1 μ M)



Εικόνα Γ.12: Καμπύλη φασματοσκοπίας φθορισμού για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2

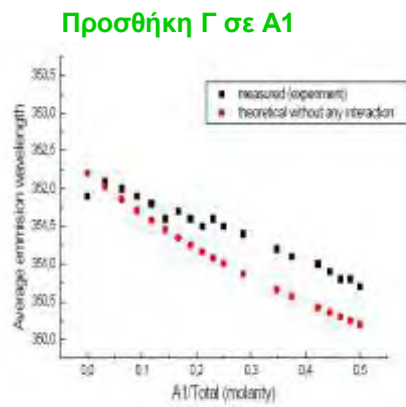
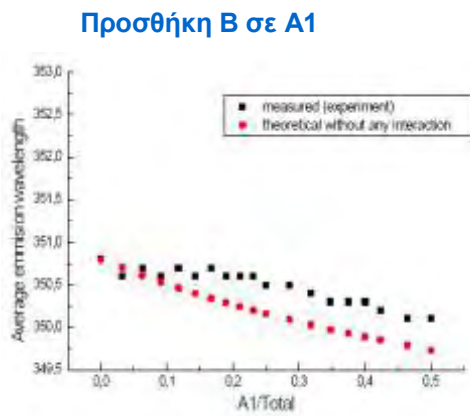
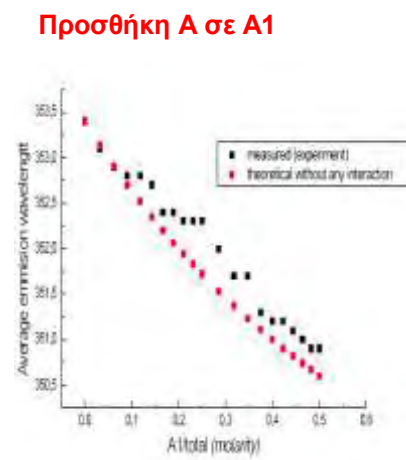
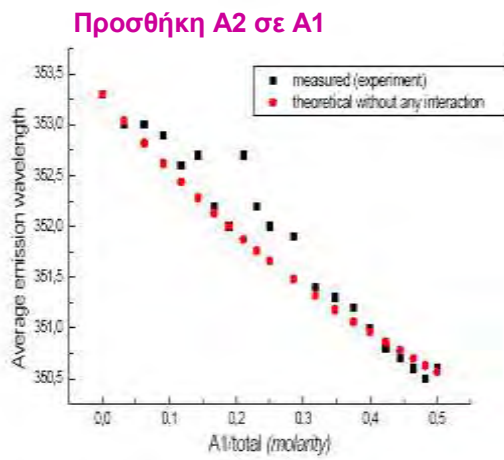
Γ.3. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της επικράτειας A2 του vWF A, B και Γ με την A1 φυσιολογικού τύπου με φασματοσκοπία φθορισμού

Το φάσμα των πρωτεϊνών φυσιολογικού τύπου και των τριών μεταλλαγμάτων ξεχωριστά καταγράφηκε σε μήκη κύματος 280 nm έως 450 nm και σχεδιάστηκε η γραφική παράσταση όπου όλες οι πρωτεΐνες παρουσίασαν μέγιστο σήμα εκπομπής στην περιοχή του μήκους κύματος 340-350 nm (Εικόνα Γ.13)



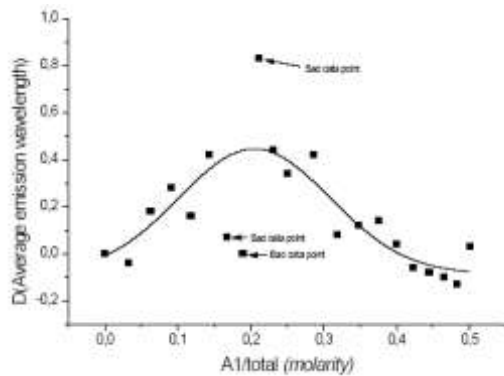
Εικόνα Γ.13: Γραφική παράσταση φασμάτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (μαύρο), A2 (ροζ), A (κόκκινο), B (μπλε) και Γ (πράσινο) του vWF σε μήκη κύματος 280-450 nm. Παρουσιάζεται σε κάθε περίπτωση το μέγιστο φάσμα εκπομπής στα 340-350 nm.

Ακολούθησε η καταγραφή φασμάτων φθορισμού των μιγμάτων της κάθε μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με την ανασυνδυασμένη A1 φυσιολογικού τύπου σε συνάρτηση με τη μετατόπιση του μήκους κύματος. Στην κυβελίδα προστέθηκε σταθερή συγκέντρωση της πρωτεΐνης A1 και ακολούθησε η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων των A2 (φυσιολογικού τύπου), και των τριών μεταλλαγμάτων της A2: δηλαδή A, B και Γ ξεχωριστά. Η μοριακή αναλογία των μιγμάτων των πρωτεϊνών $A1/(A1+A2)$, $A1/(A1+A)$, $A1/(A1+B)$ και $A1/(A1+Γ)$ μελετήθηκε έως την τιμή 0.5. Μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψαν οι γραφικές παραστάσεις του μέσου μήκους κύματος εκπομπής (nm) και των μοριακών αναλογιών των πρωτεϊνών παρουσία και απουσία των θεωρητικών τιμών(Εικόνες Γ.14 και Γ.15).

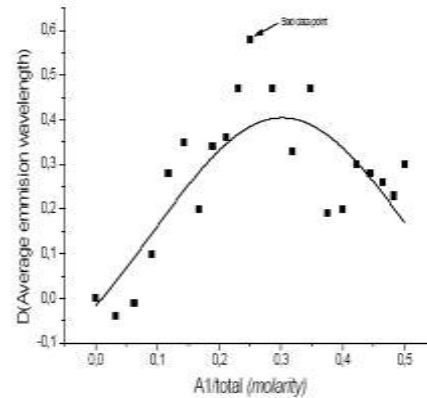


Εικόνα Γ.14: Γραφικές παραστάσεις μέσου μήκους κύματος εκπομπής (nm) ως προς τη μοριακή αναλογία των πρωτεϊνών $A1/(A1+A2)$, $A1/(A1+A)$, $A1/(A1+B)$ και $A1/(A1+Γ)$ του νWF (μαύρες κουκκίδες). Διακρίνονται οι τιμές που θα προέκυπταν αν δεν υπήρχε αλληλεπίδραση (κόκκινες κουκκίδες).

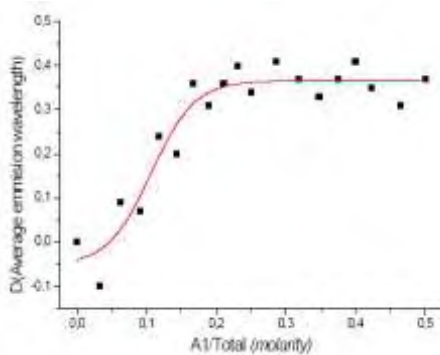
Προσθήκη A2 σε A1



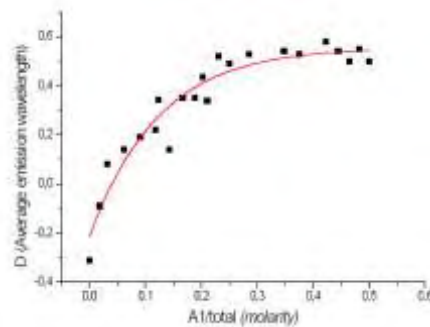
Προσθήκη A σε A1



Προσθήκη B σε A1



Προσθήκη Γ σε A1



Εικόνα Γ.15: Γραφικές παραστάσεις μέσου μήκους κύματος εκπομπής (nm) ως προς τη μοριακή αναλογία των πρωτεϊνών $A1/(A1+A2)$, $A1/(A1+A)$, $A1/(A1+B)$ και $A1/(A1+\Gamma)$ του νWF μετά την αφαίρεση των θεωρητικών τιμών.

Από τις παραπάνω γραφικές παραστάσεις, προκύπτει ότι και τα τρία μοντέλα μεταλλάξεων που μελετήθηκαν (A, B και Γ) για την πρωτεΐνη A2, αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη A1 φυσιολογικού τύπου αφού σε κάθε περίπτωση καταγράφηκε μετατόπιση του μέσου μήκους κύματος εκπομπής, ενώ αν δεν υπήρχε αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών θα προέκυπταν ευθείες γραμμές της μετατόπισης του μήκους κύματος σε συνάρτηση με τη μοριακή τους αναλογία. Επίσης γίνεται φανερό ότι η καμπύλη που προέκυψε από τη μελέτη του μοντέλου A μοιάζει περισσότερο με αυτήν των πρωτεϊνών φυσιολογικού τύπου, ενώ οι καμπύλες των μοντέλων B και Γ μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ενδιαφέρον για τον παράγοντα vWF έχει αυξηθεί αισθητά τα τελευταία χρόνια. Καταρχάς υπέστη δυνατή η επίλυση κρυσταλλογραφικά της δομής των κύριων επικρατειών A1, A2 και A3 που συμμετέχουν στον σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου στα μικρά αγγεία. Επιπλέον επισημάνθηκε ο κυρίαρχος ρόλος του παράγοντα αυτού στην πήξη του αίματος. Ο vWF κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένος με μη ομοιοπολικό δεσμό με τον παράγοντα VIII. Η αλληλεπίδραση αυτή προστατεύει τον παράγοντα VIII από πρωτεόλυση στην κυκλοφορία, αυξάνοντας έτσι τον χρόνο ημιζωής του. Ο vWF και ο VIII στη κυκλοφορία σχηματίζουν ένα σύμπλοκο και ο vWF αναστέλλει την αλληλεπίδραση του VIII με τις πρωτεάσες του πηκτικού μηχανισμού. Επίσης η περιοχή A1 του vWF έχει την ικανότητα να προσδέεται στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και να πυροδοτεί τον σχηματισμό θρόμβου στα τραυματισμένα μικρά αγγεία.

Πρόσφατα η αποκάλυψη της δομής της A2 επικράτειας μέσω κρυσταλλογραφίας X, αποκάλυψε τον σημαντικό ρόλο της στην ρύθμιση της αιμόστασης. Η A2 περιοχή έχει μια θέση πρωτεόλυσης από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13, της οποίας ο ρόλος είναι να περιορίζει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων στην μικροκυκλοφορία και τον σχηματισμό μικροθρόμβων μέσω της κοπής της εκπτυχωμένης επικράτειας A2 του ακινητοποιημένου στο τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα vWF. Επίσης η A2 παρεμποδίζει την πρόσδεση της A1 στα αιμοπετάλια, ενώ η A1 αναστέλλει την πρωτεόλυση της A2. Αυτές οι ιδιότητες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών στην αποσαφήνιση της αλληλεπίδρασης των περιοχών A1 και A2, κάτι που θα οδηγούσε στην δημιουργία φαρμάκων που θα μιμούταν την A2 περιοχή και θα παρεμπόδιζαν τον σχηματισμό θρόμβου.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός του μηχανισμού αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF. Γι' αυτό το σκοπό τα γονίδια που κωδικοποιούν τις A1 και A2 επικράτειες και είχαν ενισχυθεί από ενδοθηλιακά κύτταρα σε προηγούμενη εργασία [53], υπέστησαν πέψη από τα ένζυμα EcoRI-HF και SalI-HF και κλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pET-60M, ώστε σε βακτηριακό σύστημα να παραχθούν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που θα φέρουν στο αμινοτελικό άκρο τους εξαϊστιδίνες και μια πρωτεΐνη συνοδό (chaperon). Ο λόγος που επιλέχθηκε

ο φορέας pET-M60, είναι διότι η πρωτεΐνη συνοδός συμβάλλει στη διαλυτότητα καθώς επίσης και στη σωστή αναδίπλωση σε λειτουργικές μορφές των πρωτεϊνών, ενώ η εξαΐσταδίνη συμβάλλει στην απομόνωση των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας, ενώ απομακρύνεται εύκολα από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες αφού αποτελεί πρωτεολυτικό στόχο της πρωτεάσης TEV. Ακολούθησε επαγωγή των βακτηριακών καλλιεργειών με IPTG, για να ενισχυθεί η υπερέκφρασή τους, και η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 με χρωματογραφία συγγένειας. Η ίδια διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της πρωτεάσης TEV. Στη συνέχεια επώασθησαν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 με την πρωτεάση TEV σε αναλογία πρωτεάσης πρωτεΐνης 1/10 και τέλος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας για την απομόνωση των επιθυμητών πρωτεϊνών.

Ο υψηλός βαθμός καθαρότητας των πρωτεϊνών επέτρεψε την ποσοτική καταγραφή της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών του vWF με φασματοσκοπία φθορισμού, σε μήκος κύματος που πραγματοποιείται η διέγερση των καταλοίπων θρυπτοφάνης. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι η πρωτεΐνη A1 αλληλεπιδρά και σχηματίζει σύμπλοκο με την A2.

Έπειτα, λήφθηκαν τα αποτελέσματα από προηγούμενη εργασία [53] για την ακριβή αλληλεπίδραση των επικρατειών A1 και A2 του vWF και τη δομή του συμπλόκου που προκύπτει μέσω προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (παράγραφος A.9). Από αυτά μελετήθηκαν τα 3 πιθανότερα μοντέλα αλληλεπιδράσεων των επικρατειών A1 και A2, βάση βιοχημικών και ενεργειακών προσεγγίσεων, που ονομάστηκαν A, B και Γ.

Στα μοντέλα αυτά πραγματοποιήθηκε στοχευμένη μεταλλαξιγένεση με τη μέθοδο της Θέση-Κατευθυνόμενης Σημειακής Μεταλλαξιγένεσης στα κατάλοιπα Glu¹⁵⁴⁹, Glu¹⁶⁴⁰ και Glu¹⁵¹¹ της πρωτεΐνης A2 των μοντέλων A,B και Γ αντίστοιχα, επειδή θεωρήθηκε ότι τα κατάλοιπα αυτά μετέχουν ισχυρά στη σταθεροποίηση των συμπλόκων, αφού σχηματίζουν γέφυρες ιόντων στην κεντρική περιοχή αλληλεπίδρασης. Αφού προηγήθηκε ενίσχυση των μεταλλαγμένων γονιδίων [53], πραγματοποιήθηκαν πέψεις στα μεταλλαγμένα γονίδια με τα ένζυμα EcoRI-HF και

Sall-HF και κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET-M60. Έπειτα πραγματοποιήθηκε επαγωγή των βακτηριακών καλλιεργειών με IPTG και η απομόνωση των μεταλλαγμάτων με χρωματογραφία συγγένειας. Ακολούθησε η καταγραφή της εκπομπής των φασμάτων φθορισμού των μιγμάτων του κάθε μεταλλάγματος με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη A1 φυσιολογικού τύπου σε συνάρτηση με τη μετατόπιση του μήκους κύματος.

Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε μετατόπιση του μέσου μήκους κύματος και αλληλεπίδραση μεταξύ της κάθε μεταλλαγμένης πρωτεΐνης και της A1 φυσιολογικού τύπου. Οι σημειακές μεταλλάξεις των καταλοίπων Glu¹⁵⁴⁹, Glu¹⁶⁴⁰ και Glu¹⁵¹¹ της επικράτειας A2 των μοντέλων Α, Β και Γ αντίστοιχα φαίνεται ότι δεν είναι αρκετές ώστε να επιτευχθεί η αναστολή του σχηματισμού του συμπλόκου. Ίσως οι μεταλλάξεις περισσότερων καταλοίπων που έχουν προταθεί ότι μετέχουν στη διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης των επικρατειών αποσταθεροποιήσει τα μοντέλα των συμπλόκων.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Weiss, H. J., Hawiger, J., Ruggeri, Z. M., Turitto, V. X, Thiagarajan, P., and Hoffmann, T. (1989) Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. *J. Clin. Invest.* 83, 288-297
2. Ikeda, Y, Hand a, M., Kawano, K., Kamata, T., Murata, M., Araki, Y., Anbo, H., Kawai, Y, Watanabe, K., Itagaki, I., Sakai, K., and Ruggeri, Z. M. (1991) The role of von Willebrand Factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J. Clin. Invest.* 87, 1234-1240
3. Dent, J. A., Galbusera, M, and Ruggeri, Z. M. (1991) Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J. Clin. Invest.* 88, 774-782
4. Weinstein, M. J., Blanchard, R., Moake, J. L., Vosburgh, E., and Moise, K. (1989) Fetal and neonatal von Willebrand factor (vWF) is unusually large and similar to the vWF in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 72, 68-72
5. Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Ashida, K., Walsh, K. A., Chopek, M. W, Sadler, J. E., and Fujikawa, K. (1986) Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 25, 3171-3184
6. Marti, T., Roessellet, S., Titani, K., and Walsh, K. A. (1987) Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* 26, 8099-8109
7. Mancuso, D. J., Tuley, E. A., Westfield, L. A., Worrall, N. K., Shelton-Inloes, B. B., Sorace, J. M., Alevy, Y G., and Sadler, J. E. (1989) Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 264, 19514-19527
8. Ginsburg, D., Handin, R. I., Bonthron, D. T, Donlon, T. A., Bruns, G. A. P., Latt, S. A., and Orkin, S. H. (1985) Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 228, 1401-1406
9. Mancuso, D. J., Tuley, E. A., Westfield, L. A., Lester-Mancuso, T. L., Le Beau, M. M, Sorace, J. M., and Sadler, J. E. (1991) Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 30, 253-269
10. Bonthron, D. T., Handin, R. I., Kaufman, R. J., Wasley, L. C, Orr, E. C, Mitsock, L. M., Ewenstein, B., Loscalzo, J., Gins-burg, D., and Orkin, S. H. (1986) Structure of pre-pro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nairn (London)* 324, 270-273
11. Fay, R J., Kawai, Y., Wagner, D. D., Ginsburg, D., Bonthron, D., Ohlsson-Wilhelm, B. M., Chavin, S. I., Abraham, G. N., Handin, R. I., Orkin, S. H., Montgomery, R. R., and Marder, V. J. (1986) Propolypeptide of von Willebrand factor circulates in blood and is identical to von Willebrand antigen II. *Science* 232, 995-998
12. Takagi, J., Fujisawa, T., Sekiya, R, and Saito, Y. (1991) Collagen-binding domain within bovine propolypeptide of von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 266, 5575-5579
13. Shelton-Inloes, B. B., Titani, K., and Sadler, J. E. (1986) cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms. *Biochemistry* 25, 3164-3171

14. Colombatti, A., and Bonaldo, R (1991) The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* 77, 2305-2315
15. Kunicki, T. J., Nugent, D. J., Staats, S. J., Orzechowski, R. P., Wayner, E. A., and Carter, W G. (1988) The human fibroblast class II extracellular matrix receptor mediates platelet adhesion to collagen and is identical to the platelet glycoprotein Ia-IIa complex. *J. Biol. Chem* 263, 4516-4519
16. Mohri, H., Fujimura, Y, Shima, M., Yoshioka, A., Houghten, R. A., Ruggeri, Z. M., and Zimmerman, T. S. (1988) Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 263, 17901-17904
17. Hunt, Lois, T, and Barker, W. C. (1987) von Willebrand factor shares a distinctive cysteine-rich domain with thrombospondin and procollagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 876-882
18. Mayadas, T. N., and Wagner, D. D. (1991) von Willebrand factor biosynthesis and processing. *Ann. N Y. Acad Sci.* 614, 153-166
19. Voorberg, J., Fontijn, R., Calafat, J., Janssen, H., van Mourik, J. A., and Pannekoek, H. (1991) Assembly and routing of von Willebrand factor variants: the requirements for disulfide-linked dimerization reside within the carboxy-terminal 151 amino acids. *J. Cell Biol.* 113, 195-205
20. Wise, R. J., Pittman, D. D., Handin, R. I., Kaufman, R. J., and Orkin, S. H. (1988) The propeptide of von Willebrand factor in-dependently mediates the assembly of von Willebrand mul-timers. *Cell* 52, 229-236
21. Carew, J. A., Browning, P. J., and Lynch, D. C. (1990) Sulfation of von Willebrand factor. *Blood* 76, 2530-2539
22. Wion, K. L., Kelly, D., Summerfield, J. A., Tuddenham, E. G. D., and Lawn, R. M. (1985) Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature (London)* 317, 726-728
23. Leyte, A., Voorberg, J., van Schijndel, H. B., Duim, B., Pannekoek, H., and van Mourik, J. A. (1991) The pro-polypeptide of von Willebrand factor is required for the formation of a functional factor VHI-binding site on mature von Willebrand factor. *Biochem. J.* 274, 257-261
24. Wise, R. J., Dorner, A. J., Krane, M., Pittman, D. D., and Kaufman, R. J. (1991) The role of von Willebrand factor mul-timers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. *J. Biol. Chem.* 266, 21948-21955
25. Wagner, D. D. (1989) Storage and secretion of von Willebrand factor. In *Coagulation and Bleeding Disorders. The Role of Factor VIII and von Willebrand Factor* (Zimmerman, T. S., and Ruggeri, Z. M., eds) pp. 161-180, Marcel Dekker, New York
26. Wagner, D. D., Saffaripour, S., Bonfanti, R., Sadler, J. E., Cramer, E. M., Chapman, B., and Mayadas, T. N. (1991) Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor polypeptide. *Cell* 64, 403-413
27. Voorberg, J., Fontijn, R., van Mourik, J. A., and Pannekoek, H. (1991) Multimeric von Willebrand factor directs storage in non-endothelial transfected monkey kidney CV-1 cells. *Thromb. Haemost.* 65, 969-969 (abstr.)

28. McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L., and Bainton, D. F. (1989) GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84, 92-99
29. Tsai, H-M., Nagel, R. L., Hatcher, V B., and Sussman, I. I. (1989) Endothelial cell-derived high molecular weight von Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 980-985
30. Tannenbaum, S. H., and Gralnick, H. R. (1990) 7-Interferon modulates von Willebrand factor release by cultured human endothelial cells. *Blood* 75, 2177-2184
31. Cramer, E. M., Meyer, D., le Menn, R., and Breton-Gorius, J. (1985) Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet α -granule resembling that of Weibel-Palade bodies. *Blood* 66, 710-713
32. de Wit, T.R., and van Mourik, J.A. (2001). Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol* 14, 241-255.
33. Andrews, R.K., and Berndt, M.C. (2008). Platelet adhesion: a game of catch and release. *J Clin Invest* 118, 3009-3011
34. Moriki, T., Maruyama, I.N., Igari, A., Ikeda, Y., and Murata, M. (2010). Identification of ADAMTS13 peptide sequences binding to von Willebrand factor. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 783-788.
35. Cruz, M.A., Diacovo, T.G., Emsley, J., Liddington, R., and Handin, R.I. (2000). Mapping the glycoprotein Ib-binding site in the von willebrand factor A1 domain. *J Biol Chem* 275, 19098-19105.
36. Huizinga, E.G., Schouten, A., Connolly, T.M., Kroon, J., Sixma, J.J., and Gros, P. (2001). The structure of leech anti-platelet protein, an inhibitor of haemostasis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 1071-1078.
37. Lisman, T., Raynal, N., Groeneveld, D., Maddox, B., Peachey, A.R., Huizinga, E.G., de Groot, P.G., and Farndale, R.W. (2006). A single high-affinity binding site for von Willebrand factor in collagen III, identified using synthetic triple-helical peptides. *Blood* 108, 3753-3756.
38. Dong, J.F., Moake, J.L., Nolasco, L., Bernardo, A., Arceneaux, W., Shrimpton, C.N., Schade, A.J., McIntire, L.V., Fujikawa, K., and Lopez, J.A. (2002). ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 100, 4033-4039.
39. Reininger, A.J. (2008). Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia* 14 Suppl 5, 11-26.
40. Sadler, J.E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 67, 395-424.
41. Franchini, M., and Lippi, G. (2006). Von Willebrand factor and thrombosis. *Ann Hematol* 85, 415-423.
42. Hannah, M.J., Williams, R., Kaur, J., Hewlett, L.J., and Cutler, D.F. (2002). Biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Semin Cell Dev Biol* 13, 313-324.

43. Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B., and Chung, D. (2001). Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 98, 1662-1666.
44. Wu, J.J., Fujikawa, K., McMullen, B.A., and Chung, D.W. (2006). Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18470-18474.
45. Shelat, S.G., Smith, P., Ai, J., and Zheng, X.L. (2006). Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance in vivo. *J Thromb Haemost* 4, 1707-1717.
46. De Luca, M., Facey, D.A., Favaloro, E.J., Hertzberg, M.S., Whisstock, J.C., McNally, T., Andrews, R.K., and Berndt, M.C. (2000). Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain: analysis with monoclonal antibodies reveals distinct binding sites involved in recognition of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and ristocetin-dependent activation. *Blood* 95, 164-172.
47. Mohri, H., Fujimura, Y., Shima, M., Yoshioka, A., Houghten, R.A., Ruggeri, Z.M., and Zimmerman, T.S. (1988). Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 263, 17901-17904.
48. Dumas, J.J., Kumar, R., McDonagh, T., Sullivan, F., Stahl, M.L., Somers, W.S., and Mosyak, L. (2004). Crystal structure of the wild-type von Willebrand factor A1-glycoprotein Ibalph complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations. *J Biol Chem* 279, 23327-23334.
49. Martin, C., Morales, L.D., and Cruz, M.A. (2007). Purified A2 domain of von Willebrand factor binds to the active conformation of von Willebrand factor and blocks the interaction with platelet glycoprotein Ibalph. *J Thromb Haemost* 5, 1363-1370.
50. Zhang, Q., Zhou, Y.F., Zhang, C.Z., Zhang, X., Lu, C., and Springer, T.A. (2009a). Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9226-9231.
51. Huizinga, E.G., Martijn van der Plas, R., Kroon, J., Sixma, J.J., and Gros, P. (1997). Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure* 5, 1147-1156.
52. Obert, B., Houllier, A., Meyer, D., and Girma, J.P. (1999). Conformational changes in the A3 domain of von Willebrand factor modulate the interaction of the A1 domain with platelet glycoprotein Ib. *Blood* 93, 1959-1968.
53. Karoulia Z., Papadopoulos G., Nomikos M., Thanassoulas A., Choli Papadopoulou T., Nounessis G., Stathopoulos C., Kontou M. and Leonidas D.D. (2010). Expression and purification of the A1 and A2 domains of the von Willebrand factor. Biophysical and biochemical characterization of their intramolecular interactions