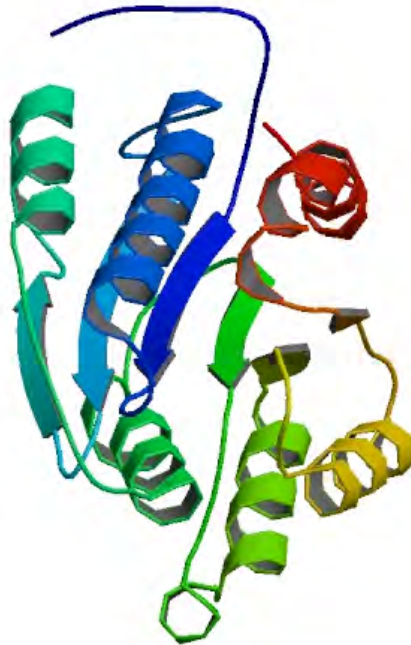


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΖΩΗ ΚΑΡΟΥΛΙΑ

Βιοχημικός - Βιοτεχνολόγος

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VON WILLEBRAND ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΙΣ
ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ



2011

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VON WILLEBRAND ΚΑΙ Ο
ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΙΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ

- **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Λεωνίδας Δημήτριος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία

Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

- **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Κοντού Μαρία

Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λεωνίδας Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος

Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νούνεσης Γεώργιος

Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Παπαδόπουλος Γεώργιος

Λέκτορας Βιοφυσικής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Χολή-Παπαδοπούλου Θεοδώρα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΖΩΗ ΚΑΡΟΥΛΙΑ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VON
WILLEBRAND ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΙΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ

Στους γονείς μου

ΖΩΗ ΚΑΡΟΥΛΙΑ, 2011

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VON WILLEBRAND ΚΑΙ Ο
ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΙΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: XXV

Συνολικός αριθμός σελίδων: 178

Αριθμός πινάκων: 21

Αριθμός εικόνων: 110

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 228

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο φυσιολογικός τρόπος άμυνας του οργανισμού που αναστέλλει την αιμορραγία των αιμοφόρων αγγείων μετά από βλάβες και εξασφαλίζει την ομαλή λειτουργία τους καλείται αιμόσταση. Όταν το τοίχωμα του αγγείου υποστεί βλάβη ή φλεγμονή, σχηματίζονται θρόμβοι μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας στην οποία συμμετέχουν τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι πρωτεΐνες πήξης και οι παράγοντες ινωδόλυσης, ώστε να μην προκαλείται γενικευμένη διαταραχή.

Ο παράγοντας von Willebrand (vWF) είναι μια μεγάλη πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη, υπεύθυνη για τη διακοπή της αιμορραγίας σε περίπτωση αγγειακής βλάβης. Αποτελείται από τις λειτουργικές πρωτεϊνικές επικράτειες (domain) D', D3, A1, A2, A3, D4, B1, B2, B3, C1, C2 και CK. Η επικράτεια A1 διαθέτει την περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα GPIIbα των αιμοπεταλίων που είναι το κύριο βήμα της προσκόλλησής τους σε εκτεθειμένους ιστούς και η επικράτεια A2 είναι σημαντική για τη φυσιολογική ανακύκλωση του vWF και την αποφυγή θρομβώσεων μιας και διαθέτει μια περιοχή πρωτεολυτικής πέψης που αναγνωρίζεται από τη μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13. Η πρόσδεση της επικράτειας A1 στον υποδοχέα GPIIbα αναστέλλει την πρωτεόλυση της A2, η οποία παρεμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου A1-GPIIbα. Πρόσφατες μελέτες πρότειναν την αλληλεπίδραση των επικρατειών A1 και A2 ως υπεύθυνη για την αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων. Συνεπώς, η μελέτη του μηχανισμού σχηματισμού του συμπλόκου A1-A2 θα μπορούσε να συμβάλει στο σχεδιασμό αντιθρομβωτικών φαρμάκων.

Τα ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν τις επικράτειες A1 και A2 του vWF κλωνοποιήθηκαν και εκφράστηκαν σε βακτηριακό σύστημα και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 υπερεκφράστηκαν και απομονώθηκαν, απουσία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που πραγματοποιούνται *in vivo*. Με

Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού, αναλύθηκε η δευτεροταγής δομή της κάθε πρωτεΐνης ξεχωριστά αλλά και του μίγματός τους και μελετήθηκε εμμέσως η αλληλεπίδρασή τους με ELISA. Τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 και A2 προσδιορίστηκαν με Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης και η αλληλεπίδρασή τους μελετήθηκε με Φασματοσκοπία Φθορισμού.

Με προσομοιώσεις μοριακών δυναμικών σχεδιάστηκαν τα τρία πιο πιθανά μοντέλα αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF και εντοπίστηκαν τα αμινοξέα της διεπιφάνειάς τους, οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ τους και τα κατάλοιπα της επικράτειας A2 που είναι πιο σημαντικά για τη σταθερότητά τους. Στην πρώτη διάταξη εντοπίστηκαν τα κατάλοιπα Glu¹⁵⁴⁹ και Glu¹⁵⁵⁴, στη δεύτερη το Glu¹⁶⁴⁰ και στην τρίτη τα Glu¹⁵¹¹, Glu¹⁵¹⁹, Glu¹⁵²² και Asp¹⁶⁶³. Μέσω της Θέση-Κατευθυνόμενης Σημειακής Μεταλλαξιγένεσης δημιουργήθηκε για την κάθε διάταξη μία μεταλλαγμένη πρωτεΐνη A2, όπου τα κατάλοιπα Glu¹⁵⁴⁹, Glu¹⁶⁴⁰ και Glu¹⁵¹¹ αντίστοιχα μετατράπηκαν σε αλανίνες. Οι τρεις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες A2 υπερεκφράστηκαν, απομονώθηκαν και μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της κάθε μίας με τη φυσιολογική επικράτεια A1 με Φασματοσκοπία Φθορισμού.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε από 22/2/2006 υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Σταθόπουλου Κωνσταντίνου και την καθοδήγηση των μελών της Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αρζόγλου Παντελεήμων και τη Λέκτορα κ. Κοντού Μαρία. Μετά την εκλογή του κ. Σταθόπουλου Κωνσταντίνου στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών, η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε από 16/12/2009 μέχρι 6/2011 υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λεωνίδα Δημητρίου και την καθοδήγηση των μελών της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τη Λέκτορα κ. Κοντού Μαρία και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταθόπουλο Κωνσταντίνο. Η διδακτορική διατριβή εστιάστηκε στη λειτουργική και δομική μελέτη του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 του παράγοντα von Willebrand (vWF) της πήξης του αίματος με σκοπό να διαλευκανθεί ο μηχανισμός σχηματισμού του.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λεωνίδα Δημήτριο για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις, το χρόνο, τη βοήθεια, το συνεχές ενδιαφέρον, την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Λέκτορα κ. Κοντού Μαρία, και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταθόπουλο Κωνσταντίνο για τις σημαντικές συμβουλές, τη βοήθεια, το χρόνο, το ενδιαφέρον και την ευκαιρία για την έναρξη και ολοκλήρωση της διατριβής. Ευχαριστώ πολύ από καρδιάς τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, υπήρξαν πολύτιμοι καθοδηγητές και μου δίδαξαν να σκέφτομαι και να ερευνώ.

Τις θερμές ευχαριστίες μου οφείλω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Χολή-Παπαδοπούλου Θεοδώρα, για την ουσιαστική συνεργασία και συνεισφορά, βοήθεια, εμπιστοσύνη και υποδοχή στο εργαστήριο της, τόσο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής όσο και παλιότερα, αποτελώντας για μένα πρότυπο δασκάλας και ανθρώπου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Λέκτορα Βιοφυσικής κ. Παπαδόπουλο Γεώργιο, για την ανεκτίμητη βοήθεια, τις εύστοχες ιδέες, το ενδιαφέρον και το χρόνο. Ιδιαίτερα ευχαριστώ το Διευθυντή Ερευνών Δρ. Νούνεση Γεώργιο για την εμπιστοσύνη και υποδοχή στο εργαστήριό του, την πολύτιμη συνεργασία και τη σημαντική βοήθεια. Ευχαριστώ πολύ το Λέκτορα κ. Μπαλατσό Νικόλαο για τη βοήθεια και την πρόθυμη αξιολόγηση του έργου μου.

Ακόμη, ευχαριστώ πολύ τους Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Μόσιαλο Γεώργιο και κ. Παναγιωτίδη Χρήστο για τη συνεργασία, τη σημαντική βοήθεια και υποδοχή στα εργαστήρια τους, τον Καθηγητή κ. Μαμούρη Ζήση για το ενδιαφέρον και την εκτίμηση και τη Λέκτορα Σαραφίδου Θεολογία για την πολύτιμη συνεισφορά. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Δρ. Θανάσσουλα Άγγελο, Κωττάκη Φίλιππο, Νόλη Ηλία, Νομικό Μιχαήλ, Παπαδόπουλο Αθανάσιο, Παπαχρήστου Ελένη και Τσαγκάλια Αικατερίνη και τους υποψήφιους Δρ. Θεοδωρίδου Μαρία, Κατσαρού Δήμητρα και Σταύρου Φιλήμωνα για την ανεκτίμητη βοήθεια σε ένα μεγάλο μέρος της διδακτορικής διατριβής, την άψογη συνεργασία και τη φιλία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω για την αλληλοβοήθεια και τη φιλία τη Γραφανάκη Αικατερίνη, τη Βούρκου Εργίνα και την Καντσάδη Αναστασία. Τέλος ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου, τον αδερφό μου και τον Αλέξανδρο για τη στήριξη, την υπομονή και την ενθάρρυνση να φέρνω εις πέρας όλους μου τους στόχους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	v
Πρόλογος.....	vi
Ευχαριστίες.....	vii
Κατάλογος πινάκων.....	xi
Κατάλογος εικόνων.....	xiii
Συντομογραφίες.....	xxiv
Εισαγωγή.....	1
1. Αιμόσταση.....	2
2. Η μοριακή δομή του vWF.....	4
3. Οι επικράτειες του vWF.....	5
3.1. Οι επικράτειες A του vWF.....	5
3.1.1. Η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13.....	8
3.2. Οι επικράτειες B του vWF.....	9
3.3. Οι επικράτειες C του vWF.....	9
3.4. Οι επικράτειες D του vWF.....	10
4. Η βιοσύνθεση και η δομή των πολυμερών του vWF.....	11
5. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του vWF.....	13
6. Αποθήκευση, έκκριση και κυκλοφορία του vWF.....	15
7. Ο βιολογικός ρόλος του vWF.....	16
7.1. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων.....	16
7.2. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων.....	19
7.3. Ο σχηματισμός συμπλόκου του vWF με τον FVIII.....	20
8. Η δομή της επικράτειας A1 του vWF.....	21
8.1. Η αλληλεπίδραση της επικράτειας A1 του vWF και του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων.....	24
8.1.1. Υπολογιστική πρόβλεψη πρόσδεσης της A1 επικράτειας του vWF στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων.....	25
8.1.2. Κρυσταλλογραφία ακτινών X του συμπλόκου της επικράτειας A1 του vWF και του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων.....	27
8.2. Περιοχές της επικράτειας A1 του vWF με ιδιότητες δέσμησης προσδετών.....	29
9. Η δομή της επικράτειας A2 του vWF.....	32
10. Η νόσος von Willebrand.....	35
11. Σχέσεις των λειτουργιών των επικρατειών A1 και A2 του vWF.....	38

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής.....	40
Υλικά και μέθοδοι.....	41
1. Αντιδραστήρια.....	42
2. Βακτηριακά στελέχη.....	44
3. Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pET.....	45
4. Πρωτεάσες.....	48
5. Κατασκευή cDNA αλυσίδας από ενδοθηλιακά κύτταρα.....	49
6. Κλωνοποίηση των γονιδίων που αντιστοιχούν στις επικράτειες A1 και A2 vWF.....	49
6.1. Σχεδιασμός των εκκινητών και ενίσχυση των γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	49
6.2. Κλωνοποίηση των γονιδίων σε πλασμιδιακούς φορείς.....	52
6.2.1. Κλωνοποίηση των γονιδίων στο φορέα pSC-A (TOPO-TA cloning).....	52
6.2.2. Κλωνοποίηση των γονιδίων στους φορείς έκφρασης.....	54
6.3. Προετοιμασία και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων.....	54
7. Θέση-Κατευθυνόμενη Σημειακή Μεταλλαξιγένεση.....	56
8. Επεξεργασία των πρωτεϊνών.....	58
8.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) και χρώση.....	58
8.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	60
8.2.1. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	62
8.3. Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων.....	63
9. Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	64
10. Δυναμική σκέδαση φωτός, DLS (Dynamic light scattering).....	65
11. Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry- ITC).....	66
12. Φασματοσκοπικές τεχνικές.....	69
12.1. Φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism – CD).....	70
12.2. Φασματοσκοπία φθορισμού	72
13. Υπολογιστική προσέγγιση του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 του vWF.....	73
13.1. Υπολογιστική πρόβλεψη πρόσδεσης (docking) – Το πρόγραμμα HEX.....	73
13.2. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics Simulations).....	73
13.3. Χαρακτηρισμός της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2	

του vWF.....	74
Αποτελέσματα.....	75
1. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	76
1.1. Ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2 του vWF στο φορέα pSC-A και στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	76
1.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	78
1.3. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF σε αποδιατακτικές συνθήκες	82
1.4. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	84
1.5. Δυναμική Σκέδαση Φωτός	86
1.6. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Elisa	87
1.7. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (ITC)	89
2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	91
2.1. Ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF και κλωνοποίησή τους στο φορέα pSC-A και στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	91
2.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	93
2.3. Απομόνωση της πρωτεάσης HRV 3C και αναζήτηση των βέλτιστων συνθηκών πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF	96
2.4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Φασματοσκοπία Φθορισμού	99
3. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60	102
3.1. Ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF και κλωνοποίησή τους στο φορέα έκφρασης pET-M60	102
3.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60	103
3.3. Απομόνωση της πρωτεάσης TEV και αναζήτηση των βέλτιστων συνθηκών πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF	105

3.4. Μελέτη των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Φασματοπλωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού (CD).....	106
3.5. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	109
4. Υπολογιστική μελέτη του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 του vWF	110
4.1. Σχεδιασμός των πιθανών μοντέλων αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF	110
4.2. Χαρακτηρισμός της διεπιφάνειάς αλληλεπίδρασης του συμπλόκου των μοντέλων A, B και Γ.....	112
5. Παραγωγή και μελέτη των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών της επικράτειας A2 του vWF κατά τα μοντέλα αλληλεπίδρασης A, B και Γ.....	116
5.1. Εισαγωγή μεταλλάξεων στο γονίδιο A2 του vWF.....	116
5.2. Κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ) του vWF στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	117
5.3. Υπερέκφραση και απομόνωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	118
5.4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της επικράτειας A2 του vWF A, B και Γ με την A1 φυσιολογικού τύπου με Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	121
Συζήτηση.....	125
Βιβλιογραφία.....	134
Abstract.....	152

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

1: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξικών καταλοίπων της επικράτειας A1 του vWF και του πεπτιδίου GPIba των αιμοπεταλίων μετά από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Διακρίνονται οι αλληλεπιδράσεις van der Waals (VDW) και οι δεσμοί υδρογόνου (H) (<i>Vasudevan et al. 2000</i>).....	26
2: Αντίδραση σύνθεσης cDNA αλυσίδας με τη μέθοδο PCR της αντίστροφης μεταγραφάσης.....	49
3: Εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2 του vWF στους φορείς έκφρασης.....	50
4: Αντίδραση PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF.....	50
5: Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF για την κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)......	51
6: Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)......	51
7: Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF και την κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	51
8: Αντίδραση ενοποίησης του προϊόντος PCR στο φορέα pSC-A.....	52
9: Αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>NdeI</i> και <i>XhoI</i>	53
10: Αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>BamHI</i> και <i>HindIII</i>	53
11: Αντίδραση πέψης των τμημάτων DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i>	53
12: Αντίδραση ενοποίησης ενθέματος στο φορέα έκφρασης.....	54
13: Εκκινητές για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων της επικράτειας A2 του vWF.....	56
14: Αντίδραση PCR για την εισαγωγή των μεταλλάξεων.....	56
15: Πρόγραμμα PCR για την εισαγωγή των μεταλλάξεων στο ένθεμα του γονιδίου A2 του vWF του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET-49b(+)......	57
16: Διαλύματα για την προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμίδου.....	58
17: Ποσοστά δευτεροταγούς δομής των κρυσταλλικών και εξισορροπημένων επικρατειών A1 και A2 του vWF σε μορφή συμπλόκου και μεμονωμένες.....	111

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εξώφυλλο: Η δομή τη επικράτειας A1 του vWF (*Fukuda et al. 2002*)

- 1:** Ο μηχανισμός της πήξης του αίματος μέσω της διαδοχικής ενεργοποίησης των παραγόντων που συμμετέχουν στο ενδογενές και στο εξωγενές μονοπάτι (*Hoffman et al. 2001*).....2
- 2:** Η μοριακή δομή του vWF (*Said 2004*).....4
- 3:** Οι επικράτειες A, B, C και D του vWF και οι περιοχές δέσμωσης που διαθέτουν.....5
- 4:** Σύγκριση της πρωτοταγούς και της δευτεροταγούς δομής των επικρατειών A του vWF. Διακρίνονται τα β ελάσματα (ροζ) και οι α έλικες (γαλάζιες). Συμβολίζονται οι δεκάδες (τελείες), το σημείο πέψης της πρωτεάσης ADAMTS13 (μαύρο βέλος), οι περιοχές γλυκοζυλίωσης (αστερίσκοι), τα κατάλοιπα που σχετίζονται με μεταλλάξεις στις περιπτώσεις vWD (κίτρινο), τα κατάλοιπα που δεν παρουσιάζουν ομοιότητες (μικρά γράμματα) και τα κατάλοιπα που απουσιάζουν (παύλες) (*Zhang et al. 2009*).....6
- 5:** Οι επικράτειες A του vWF και οι περιοχές πρόσδεσης που διαθέτουν.....7
- 6:** Οι επικράτειες A1 και η A3 του vWF διαθέτουν από έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών τους άκρων και δημιουργούνται βρόχοι μεταξύ των καταλοίπων Cys⁵⁰⁹-Cys⁶⁹⁵ και Cys⁹²³-Cys¹¹⁰⁹. Η A2 επικράτεια στερείται του δισουλφιδικού βρόχου7
- 7:** Η μοριακή δομή της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS13. Διακρίνεται η δομική περιοχή (MP), το τμήμα που μοιάζει με δυσιντεγκρίνη (Dis), οι οχτώ επαναλήψεις θρομβοσποντίνης τύπου 1 (TSP1), η πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή (Cys), η ενδιάμεση περιοχή (Sra) και οι δύο επικράτειες CUB (*Zheng et al. 2001*).....8
- 8:** Οι επικράτειες B του vWF.....9
- 9:** Οι επικράτειες C του vWF και η περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα GPIIb-IIIa των αιμοπεταλίων που διαθέτουν.....9
- 10:** Οι επικράτειες D του vWF και οι περιοχές πρόσδεσης που διαθέτουν.....10
- 11:** Ο σχηματισμός των ULvWF (*Denis et al. 2002*).....11
- 12:** Μεταφορά μηνυμάτων που ξεκινούν από την πρόσδεση του vWF στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και προκαλούν την ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb-IIIa των αιμοπεταλίων (*Berndt et al. 2001*).....18
- 13:** Ο μηχανισμός της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων κατά τη ροή του αίματος. Κατά τον τραυματισμό, ιδιαίτερα σε αγγεία με υψηλή διατμητική τάση, τα

αιμοπετάλια προσκολλώνται παροδικά στον vWF του υποενδοθηλίου μέσω του υποδοχέα GPIIb. Η σύνδεση σταθεροποιείται και τα αιμοπετάλια ακινητοποιούνται μετά την αλληλεπίδραση του υποδοχέα GPIIb-IIIa ή $\alpha_{IIb}\beta_3$ με τον vWF (Ruggeri et al. 2007).....	18
14: Ο μηχανισμός της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Μετά την προσκόλλησή τους τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και προσδένεται σε αυτά το ινωδογόνο και ο vWF σχηματίζοντας το υπόστρωμα για τη συσσώρευση και άλλων αιμοπεταλίων και το σχηματισμό θρόμβου (Ruggeri et al. 2007).....	19
15: Στερεοδιαγράμμα σύγκρισης των δομών των επικρατειών A1(συνεχόμενες γραμμές) και A3 (διακεκομμένες γραμμές) του vWF. Διακρίνονται κάθε δέκα κατάλοιπα ξεκινώντας από το 506 (μικροί κύκλοι) και τα κατάλοιπα των κυστεϊνών που σχηματίζουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς (μεγάλοι κύκλοι) (Emsley et al. 1997).....	21
16: Η κύρια αλυσίδα της επικράτειας A1 του vWF. Διακρίνονται τα κατάλοιπα Cys που εμπλέκονται στον δισουλφιδικό δεσμό (κίτρινο), οι περιοχές με μεταλλάξεις vWD τύπου 2B (κόκκινο), τα μεταλλάγματα όπου παρατηρείται μειωμένη πρόσδεση βοτροσετίνης (botrocetin) (πράσινο), οι μεταλλάξεις όπου υπάρχει μειωμένη πρόσδεση ριστοσετίνης (ristocetin), αλλά φυσιολογική πρόσδεση βοτροσετίνης (botrocetin) (γαλάζιο και μαύρο) και η μετάλλαξη όπου παρατηρείται μειωμένη πρόσδεση στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων, αλλά φυσιολογική πρόσδεση βοτροσετίνης (botrocetin) (μπλε) (Emsley et al. 1998).....	22
17: Χωροπληρωτικό μοντέλο της μπροστά (a), άνω (b), κάτω (c) και δεξιά (d) πλευρά της επικράτειας A1 vWF. Όλα τα κατάλοιπα είναι χρωματισμένα γκριζα εκτός από τα κατάλοιπα που αντιστοιχούν σε Arg και Lys (μπλε), Asp και Glu (κόκκινα) και σε His (πράσινα). Διακρίνεται η προτεινόμενη περιοχή πρόσδεσης της μποτροσετίνης (B) και η πιθανή περιοχή πρόσδεσης της ηπαρίνης (κυκλωμένη) (Emsley et al. 1998).....	23
18: Ηλεκτροστατικά δυναμικά του συμπλόκου της επικράτειας A1 του vWF και του GPIIb υποδοχέα των αιμοπεταλίων. Συμβολίζεται το θετικό (μπλε) και το αρνητικό φορτίο (κόκκινο). Στο πάνω μέρος διακρίνεται το φορτίο του υποδοχέα GPIIb (η επικράτεια A1 συμβολίζεται με έλικα), ενώ στο κάτω μέρος διακρίνεται το φορτίο της επικράτειας A1 (ο υποδοχέας GPIIb συμβολίζεται με έλικα) (Huizinga et al. 2002).....	24

19: Προσομοίωση της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου Gly ²⁷¹ -Asp-Asp-Thr-Asp-Lys-Tyr-Asp-Tyr-Tyr ²⁷⁹ του υποδοχέα GPIIbα των αιμοπεταλίων και της επικράτειας A1 του vWF. Διακρίνονται τα κατάλοιπα της αλληλουχίας του υποδοχέα GPIIbα (πορτοκαλί), οι έλικες α3 (μπλε) και α4 (κόκκινο), οι υπόλοιπες α έλικες (μωβ), το β3 έλασμα (μπλε) και τα υπόλοιπα β ελάσματα (πράσινο) της επικράτειας A1 (<i>Vasudevan et al. 2000</i>).....	25
20: Τα κατάλοιπα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση της επικράτειας A1 του vWF με τον υποδοχέα GPIIbα των αιμοπεταλίων. Διακρίνεται η αλληλουχία του υποδοχέα GPIIbα (πορτοκαλί), η έλικα α4 (μωβ) και οι υπόλοιπες α έλικες (κόκκινο), το β3 έλασμα (μπλε) και τα υπόλοιπα β ελάσματα (πράσινο) και οι βρόχοι (μωβ) (<i>Vasudevan et al. 2000</i>).....	26
21: Η δομή της περιοχής του υποδοχέα GPIIbα των αιμοπεταλίων που αλληλεπιδρά με την επικράτεια A1. Διακρίνεται η αμινοτελική περιοχή και η β φουρκέτα (μπλε), το μοτίβο των περιοχών πλούσιων σε λευκίνες (πράσινο), η καρβοξυτελική περιοχή και ο β διακόπτης (κόκκινο) και οι δυσουλφιδικές γέφυρες (κίτρινο) (<i>Huizinga et al. 2002</i>).....	27
22: Στερεοδιάγραμμα της δομής του συμπλόκου του υποδοχέα GPIIbα των αιμοπεταλίων (πράσινο) και της επικράτειας A1 (μπλε) (<i>Huizinga et al. 2002</i>).....	28
23: Στερεοδιάγραμμα της αλληλεπίδρασης του β διακόπτη του υποδοχέα GPIIbα των αιμοπεταλίων με το έλασμα β3 της επικράτειας A1. Διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου (διακεκομμένες γραμμές) (<i>Huizinga et al. 2002</i>).....	28
24: Στερεοδιάγραμμα της δομής του διμερούς της ριστοσετίνης (ristocetin) σε σύμπλοκο με ένα πεπτίδιο (N-acetyl-Lys-d-Ala-d-Ala) (κίτρινο). Διακρίνεται το διπεπτίδιο (πράσινο), τα σάκχαρα (πορτοκαλί) και η μαννόζη (μπλε) (<i>Nahoum et al. 2009</i>).....	29
25: Οι δομές των συμπλόκων της επικράτειας A1 με τον υποδοχέα GPIIbα και τη βοτροσετίνη (botrocetin) και της επικράτειας A1 με τη βιτισετίνη (bitiscetin). Διακρίνεται ο υποδοχέας GPIIbα (πράσινο), η επικράτεια A1 (κόκκινο), οι α (ροζ) και β (μπλε) υπομονάδες των πρωτεϊνών (<i>Matsui et al. 2009</i>).....	31
26: Η δομή της επικράτειας A1 του vWF και σημαντικά αμινοξέα για την πρόσδεση της βοτροσετίνης (botrocetin) (Arg ⁶²⁹ , Arg ⁶³² , Arg ⁶³⁶ και Lys ⁶⁶⁷) και της βιτισετίνης (bitiscetin) (Arg ⁶³² , Lys ⁶⁶⁰ , Gln ⁶⁶⁶ και Lys ⁶⁷³) (<i>Esnouf et al. 1999</i>).....	31

27: Η τριτοταγής δομή της επικράτειας A2 του vWF, όπου διακρίνεται ο βρόχος $\alpha 4$ (ροζ) και η θέση πρωτεόλυσης της ADAMTS13 στο βρόχο $\alpha 3\beta 4$. Στη δεξιά εικόνα παρουσιάζεται υπέρθεση των επικρατειών A1 και A3 (Zhang <i>et al.</i> 2009).....	32
28: Η θέση πρωτεόλυσης της επικράτειας A2 από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13 μεταξύ των αμινοξέων Tyr ⁸⁴² (μπλε) και Met ⁸⁴³ (κόκκινο) (Zheng <i>et al.</i> 2009).....	32
29: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pET-29c(+)	46
30: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pET-49b(+)	47
31: Πλασμιδιακός χάρτης του Φορέα έκφρασης pET-M60	47
32: Βασική αρχή ITC πειράματος	66
33: Διάγραμμα φασμάτων απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων φαινυλαλανίνης (Phe), τυροσίνης (Tyr) και θρυπτοφάνης (Trp) στην περιοχή του υπεριώδους σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (nm)	69
34: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	76
35: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pSC-A με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>NdeI</i> και <i>XhoI</i>	76
36: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pSC-A και του φορέα έκφρασης pET-29c(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>NdeI</i> και <i>XhoI</i>	77
37: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET-29c(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>NdeI</i> και <i>XhoI</i> για τον εντοπισμό του ενθέματος των γονιδίων A1 και A2 του vWF	77
38: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων των ελέγχων υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A1 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	78
39: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων των ελέγχων υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	78
40: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων του ελέγχου της πρωτεΐνης A1 του vWF στα ιζήματα μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	79
41: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων του ελέγχου της πρωτεΐνης A2 του vWF στα ιζήματα μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	79

42: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από ελέγχους υπερέκφρασης στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	80
43: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A1 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	81
44: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A2 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	81
45: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των απομονωμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	81
46: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των συμπυκνωμένων κλασμάτων των απομονωμένων πρωτεϊνών διαλυμάτων A1 και A2 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	81
47: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A1 του vWF παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	82
48: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A2 του vWF παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	82
49: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A1 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	83
50: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A2 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	83
51: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από απομόνωση σε αποδιατακτικές συνθήκες	83
52: Γραφικές παραστάσεις χρωματογραφίας μοριακής διήθησης των πρωτεϊνικών διαλυμάτων A1 και A2 του vWF	84

53: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεϊνικού διαλύματος A1 του vWF που αντιστοιχούν στις κορυφές των απορροφήσεων του διαγράμματος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.....	85
54: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων του πρωτεϊνικού διαλύματος A2 του vWF που αντιστοιχούν στις κορυφές των απορροφήσεων του διαγράμματος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.....	85
55: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων των κλασμάτων μοριακής διήθησης που περιέχουν τις επιθυμητές πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF και χρώση με νιτρικό άργυρο.....	85
56: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	85
57: Γραφική παράσταση της διασποράς του πρωτεϊνικού διαλύματος A1 του vWF κατά την ένταση. Στην τελευταία στήλη έχει υπολογιστεί η διασπορά. Στον άξονα y αντιστοιχεί το μέγεθος (nm) και στον άξονα x το ποσοστό % της έντασης. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 0.1 mg/ml.....	86
58: Γραφική παράσταση της διασποράς του πρωτεϊνικού διαλύματος A2 του vWF κατά την ένταση. Στην τελευταία στήλη έχει υπολογιστεί η διασπορά. Στον άξονα y αντιστοιχεί το μέγεθος (nm) και στον άξονα x το ποσοστό % της έντασης. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 0.1 mg/ml.....	87
59: Γραφική παράσταση της απορρόφησης (A) και των αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (0.5-5μM) μετά από ανίχνευση με αντίσωμα έναντι της επικράτειας A2 και Γραφική παράσταση της απορρόφησης (A) και της αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (0.25-4 μM) καθηλωμένης στα κελία με την προσθήκη σταθερής συγκέντρωσης της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (1 μM) (μπλε καμπύλη), γραφική παράσταση της απορρόφησης (A) και της σταθερής συγκέντρωσης ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (0.25 μM) καθηλωμένης στα κελία με την προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (0.25-4 μM) (ροζ καμπύλη). Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε ανίχνευση με αντίσωμα έναντι της A2 επικράτειας	88
60: Scatchard plot.	88
61: Γραφική παράσταση της ενθαλπίας και της μοριακής αναλογίας των ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης.....	89

62: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	91
63: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψων του ανασυνδυασμένου φορέα pSC-A με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>BamHI</i> και <i>HindIII</i>	91
64: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pSC-A και του φορέα pET-49b(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>BamHI</i> και <i>HindIII</i>	92
65: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET-49b(+) για τον εντοπισμό των ενθεμάτων των γονιδίων A1 και A2 του vWF με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>BamHI</i> και <i>HindIII</i>	92
66: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A1 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	93
67: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	94
68: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαΐστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	95
69: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A1 του vWF με χρωματογραφία αχιστείας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	95
70: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A2 του vWF με χρωματογραφία αχιστείας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	95
71: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαΐστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	96
72: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεάσης HRV 3C με χρωματογραφία αχιστείας	96
73: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF από την πρωτεάση HRV 3C σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες	97

74: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων των διαδοχικών απομονώσεων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με χρωματογραφία αγκιστείας μετά την πρωτεόλυση.....	98
75: Γραφικές παραστάσεις των σημάτων φθορισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (A) και A2 (B) του vWF ξεχωριστά σε συνάρτηση με αυξανόμενη συγκεντρώσεις (έως 12 μM) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.....	99
76: Συνάρτηση των φασμάτων φθορισμού και της μοριακής αναλογίας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF. Σημειώνονται τα σήματα φθορισμού (κουκίδες) και η ευθεία που θα προέκυπτε αν δεν υπήρχε αλληλεπίδραση.....	100
77: Γραφική παράσταση των φασμάτων φθορισμού και της αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (έως 15 μM) προστιθέμενης σε σταθερή συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (1 μM) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.....	101
78: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	102
79: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 12% των πέψεων των γονιδίων A1 και A2 του vWF και του φορέα έκφρασης T-M60 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i>	102
80: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% του ανασυνδυασμένου φορέα έκφρασης pET-M60 και των διαγνωστικών πέψεων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i>	103
81: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF σε κύτταρα έκφρασης μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	103
82: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	104
83: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60 με χρωματογραφία συγγένειας.....	104
84: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	104

85: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης TEV με χρωματογραφία συγγένειας.....	105
86: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων ελέγχου πρωτεόλυσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF από την πρωτεάση TEV σε διαφορετικούς χρόνους και θερμοκρασίες.....	105
87: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά την πρωτεόλυση.....	106
88: Ανάλυση φάσματος CD των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (0.15 mg/ml) (A) και A2 (0.15 mg/ml) (B) του vWF, όπου παρουσιάζεται το ποσοστό συμμετοχής κάθε στοιχείου της δευτεροταγούς δομής ανάλογα με το εύρος του φάσματος. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η καμπύλη που προέκυψε θεωρητικά από τη σύνθεση αυτών των στοιχείων.....	107
89: Ανάλυση φάσματος CD του μίγματος των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF, όπου παρουσιάζεται το ποσοστό συμμετοχής κάθε στοιχείου της δευτεροταγούς δομής ανάλογα με το εύρος του φάσματος. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η καμπύλη που προέκυψε θεωρητικά από τη σύνθεση αυτών των στοιχείων.....	108
90: Φάσματα CD των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (μαύρο) και A2 (μπλε) του vWF και του συμπλόκου τους (κόκκινο) στην περιοχή του άπω υπεριώδους.....	109
91: Συνάρτηση φασμάτων φθορισμού και αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (6 μM) προστιθέμενης σε σταθερή συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (2 μM) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.....	110
92: Τα τρία πιθανότερα μοντέλα αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 (λευκό) και A2. Διακρίνονται οι πιθανές διατάξεις της επικράτειας A2 του vWF, A (πορτοκαλί), B (μωβ) και Γ (γαλάζιο).....	111
93: Το μοντέλο A του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF, όπως σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα VMD. Διακρίνονται τα κατάλοιπα της διεπιφάνειας Glu ¹⁵⁴⁹ (γαλάζιο) και Glu ¹⁵⁵⁴ (πράσινο) και τα αμινοτελικά (μπλε) και καρβοξυτελικά άκρα (κόκκινο).....	115
94: Το μοντέλο B του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF, όπως σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα VMD. Διακρίνεται το κατάλοιπο της διεπιφάνειας Glu ¹⁶⁴⁰ (γαλάζιο) και τα αμινοτελικά (μπλε) και καρβοξυτελικά άκρα (κόκκινο).....	115

95: Το μοντέλο Γ του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF, όπως σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα VMD. Διακρίνονται τα κατάλοιπα της διεπιφάνειας Glu ¹⁵¹¹ (μωβ), Glu ¹⁵¹⁹ (γαλάζιο) Glu ¹⁵²² (κίτρινο) και Asp ¹⁶⁶³ (πράσινο) και τα αμινοτελικά (μπλε) και καρβοξυτελικά άκρα (κόκκινο).....	116
96: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ) του vWF για την κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	117
97: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των πέψεων του φορέα έκφρασης pET-M60 και των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ) του vWF με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i>	117
98: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψεων του ανασυνδυασμένου φορέα έκφρασης pET-M60 με τα μεταλλαγμένα ενθέματα του γονιδίου A2 (A, B και Γ) του vWF με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i>	118
99: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων υπερέκφρασης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	118
100: Ανοσοποτύπωση και ανίχνευση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	119
101: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των εκλουσμάτων των απομονωμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A, B και Γ του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	119
102: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% και ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών.....	120
103: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεόλυσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF από την πρωτεάση TEV.....	120
104: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων των απομονωμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF μετά την πρωτεόλυση.....	120
105: Φάσματα φθορισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (μαύρο), A2 (ροζ), A (κόκκινο), B (μπλε) και Γ (πράσινο) του vWF ξεχωριστά σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις στην περιοχή εκπομπής 315-450 nm. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 280 nm.....	121

106: Φάσματα φθορισμού μέσου μήκους κύματος εκπομπής προς τη μοριακή αναλογία των μιγμάτων των πρωτεϊνών A1/(A1+A2), A1/(A1+A), A1/(A1+B) και A1/(A1+Γ) (μαύρες κουκκίδες) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm. Διακρίνονται οι τιμές που θα προέκυπταν αν δεν υπήρχε αλληλεπίδραση (κόκκινες κουκκίδες).....	122
107: Φάσματα φθορισμού μέσου μήκους κύματος εκπομπής ως προς τη μοριακή αναλογία των πρωτεϊνών μιγμάτων των πρωτεϊνών A1/(A1+A2), A1/(A1+A), A1/(A1+B) και A1/(A1+Γ) μετά την αφαίρεση των θεωρητικών τιμών σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.....	123
108: Η δομή του συμπλόκου του υποδοχέα GPIba των αιμοπεταλίων και της επικράτειας A1 του vWF και η σύγκρισή του με την ελεύθερη επικράτεια A1 (μη προσδεδεμένη στον υποδοχέα). Α) Η δομή του συμπλόκου, όπου διακρίνεται ο υποδοχέας GPIba των αιμοπεταλίων (πράσινο), η επικράτεια A1 (κίτρινο) και τα κατάλοιπα κυστεϊνών (κίτρινες σφαίρες). Β) Υπέρθωση του συμπλόκου και ελεύθερη επικράτεια A1 (άσπρο). Διακρίνονται οι περιοχές της επικράτειας A1 που διαφέρουν (κόκκινο) (<i>Dumas et .2004</i>).....	126
109: Η δομή της επικράτειας A2 του vWF. Διακρίνονται οι α έλικες, τα β ελάσματα και με β οι βρόχοι α4 και α3β4 (<i>Zhang et al. 2009</i>).....	127
110: Υπολογιστική προσέγγιση του συμπλόκου αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF κατά τα τρία πιθανότερα μοντέλα Α, Β και Γ, όπως σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα VMD. Διακρίνονται οι διαφορετικές διατάξεις της επικράτειας A2 (κόκκινο).....	132

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADAMTS	Μεταλλοπρωτεάση και δυσιντεγκρίνη με μοτίβο θρομβοσποντίνης 1
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
CD	Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού
CUB	Πρωτεΐνες C1r/C1s, Uegf και Bmp1
DAC	Διακυλογλυκερόλη
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός
dsDNA	Υπερελικωμένο δίκλωνο DNA
ELISA	Συζευγμένη με ένζυμο τεχνική ανοσοαπορρόφησης
Expasy	Ειδικό σύστημα ανάλυσης πρωτεϊνών
FI	Ινωδογόνο
FII	Προθρομβίνη
FIII	Ιστικός παράγοντας
FIV	Ασβέστιο
FV	Προαξελλερίνη
FVI	Αξελλερίνη
FVII	Προκομβερτίνη
FVIII	Αντιαιμοφιλικός παράγοντας A
FIX	Παράγοντας Christmas ή αντιαιμοφιλικός παράγοντας B
FX	Παράγοντας Stuart-Prower
FXI	Πρόδρομος θρομβοπλαστίνη πλάσματος
FXII	Παράγοντας Hageman
FXIII	Σταθεροποιητικός παράγοντας ινικής
GPIba	Υποδοχέας γλυκοπρωτεΐνης Iba
GPIa-IIa	Υποδοχέας ιντεγκρίνης α2β1
GPIIb-IIIa	Υποδοχέας ιντεγκρίνης αIIbβ3
GSH	Ανηγμένη γλουταθειόνη
HRV (3C)	Ανθρώπινος ρινοϊός 3C
HRP	Ραφανιδική υπεροξειδάση
ITC	Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης
IP3	Τριφωσφορική ινοσιτόλη
IPTG	Ισοπροπυλ-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη

LRPI	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LRR	Μοτίβο με περιοχές πλούσιες σε λευκίνη
MMBK	Κινησιογόνο υψηλού μοριακού βάρους
OPD	Ο-φαινυλαινεδιαμίνη
PMSF	Φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο
PVDF	Πολύ-βινυλο-δι-φθορίδιο
PKC	Πρωτεϊνική κινάση C
RGD	Μοτίβο των αμινοξέων Arg-Gly-Asp
RMSD	Ρίζα μέσης τετραφωνικής απόκλισης
RPM	Κύκλοι ανά λεπτό
TEV	Ιός του καπνού
TIL	Επικράτειες που μιμούνται τους αναστολείς θρυψίνης
TSP1	Θρομβοσπονδίνη τύπου 1
TTP	Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα
ULvWF	Πολυμερή vWF μεγάλου μοριακού βάρους
VDW	Αλληλεπιδράσεις van der Waals
vWF	Παράγοντας von Willebrand
vWD	Νόσος von Willebrand

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

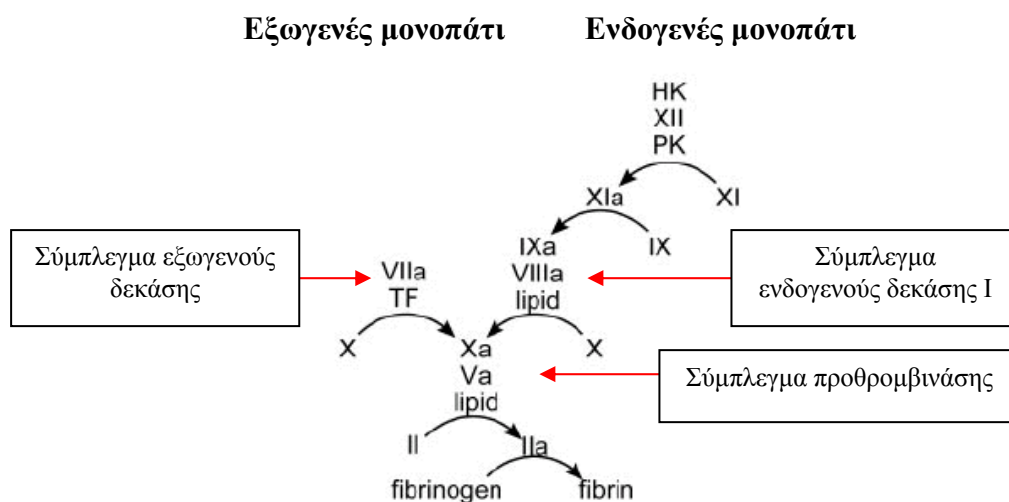
1. Η αιμόσταση

Η έννοια της ζωής στους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με ένα οργανωμένο σύστημα μεταφοράς που καλείται κυκλοφορικό και συμβάλλει σημαντικά στην ομοιόσταση. Το κυκλοφορικό σχετίζεται με λειτουργίες του οργανισμού, όπως την προμήθεια των κυττάρων με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα, των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού και άλλων κυτταρικών εκκριμάτων, τη μεταφορά ουσιών, όπως ορμονών, καθώς και με την κατανομή του νερού, των διαλυμένων ουσιών και της θερμοκρασίας. Στο κυκλοφορικό σύστημα συμπεριλαμβάνονται το αίμα και το καρδιαγγειακό σύστημα που αποτελείται από ένα δίκτυο αγωγών και μία αντλία, την καρδιά, για την κυκλοφορία του αίματος. Το αίμα αποτελείται από το πλάσμα που καταλαμβάνει το 55% και περιέχει 93% νερό και 7% αέρια, άλατα, πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες και από τα κύτταρα που διακρίνονται σε ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια. Τα λευκοκύτταρα αποτελούνται από τα κοκκώδη λευκοκύτταρα στα οποία ανήκουν τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα και τα εωσινόφιλα και από τα άκκωκα λευκοκύτταρα στα οποία περιέχονται τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα. Το σύνολο σχεδόν της μάζας των διαλυμένων συστατικών αποτελείται από πρωτεΐνες (70 g/l) (*Furie et al. 2005*).

Η προσπάθεια για αποφυγή της απώλειας και διατήρησης του αίματος σε υγρή μορφή οδήγησε στην εξέλιξη του μηχανισμού της αιμόστασης. Η αιμόσταση αποτελεί ένα φυσιολογικό τρόπο άμυνας του οργανισμού μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η αναστολή της αιμορραγίας των αιμοφόρων αγγείων όταν υποστούν βλάβες και εξασφαλίζεται η ομαλή λειτουργία τους (*Monroe et al. 2001*). Στην αποτελεσματική λειτουργία του συνολικού μηχανισμού, από τον οποίο είναι εξαρτημένη η επιβίωση των διάφορων οργανισμών, συμμετέχουν το τοίχωμα του αγγείου, τα αιμοπετάλια, οι παράγοντες πήξης, οι αναστολείς των παραγόντων πήξης και οι αναστολείς της ινωδόλυσης. Στο μηχανισμό της αιμόστασης διακρίνονται τέσσερα στάδια (*Kjalke et al. 2001, Monroe et al. 2002*).

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η σύσπαση του αγγείου στο σημείο της βλάβης και η προσκόλληση των αιμοπεταλίων (*Kuharsky et al. 2001*). Η αγγειοσύσπαση προκαλείται από την παρουσία αμινών, που εκλύονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια και μεταφέρονται στο σημείο του τραυματισμού μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η σύσπαση εξαναγκάζει τα χείλη

του τραύματος να προσεγγίσουν και διευκολύνει την επίσχεση της αιμορραγίας (Hoffman et al. 1994). Στο δεύτερο στάδιο της αιμόστασης λαμβάνει χώρα η απόκριση των αιμοπεταλίων στο ερέθισμα. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούμενα κυρίως από το απογυμνωμένο (απενδοθηλιωμένο) τοίχωμα των αγγείων κινούνται χημειοτακτικά στο σημείο της βλάβης πριν από όλα τα κυτταρικά στοιχεία και συσσωρεύονται στην περιοχή του τραύματος (Oliver et al. 1999, Hoffman et al. 2003). Στο τρίτο στάδιο της αιμόστασης επιτελείται η πήξη του αίματος (Giesen et al. 1999, Briedé et al. 2001). Με ένα σύνολο αλληλοδιάδοξης ενεργοποίησης των πρωτεϊνών του πλάσματος (παραγόντων πήξης) ενεργοποιείται το ενδογενές και το εξωγενές μονοπάτι της πήξης και σχηματίζονται τρία ενζυμικά συμπλέγματα (σύμπλεγμα εξωγενούς δεκάσης, σύμπλεγμα ενδογενούς δεκάσης και σύμπλεγμα προθρομβινάσης) που καταλήγουν στην παραγωγή της θρομβίνης και στο σχηματισμό της ινικής που αποφράσσει τον τραυματισμό του αγγείου και οδηγεί σε μόνιμη επίσχεση του τραύματος (**Εικόνα 1**) (Salemink et al. 1999, Bogdanov et al. 2003).



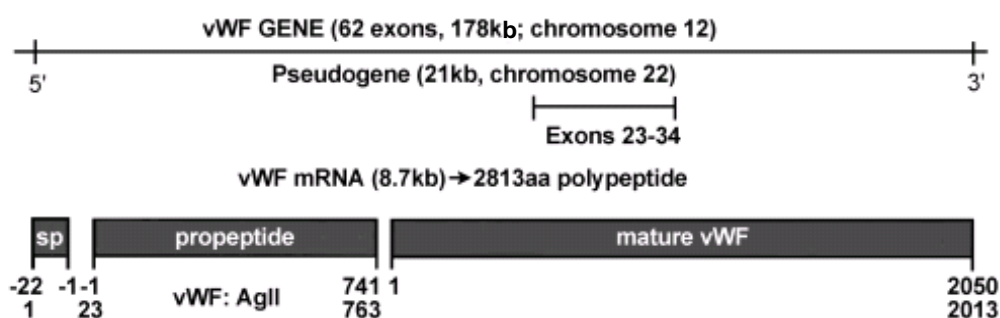
Εικόνα 1: Ο μηχανισμός της πήξης του αίματος μέσω της διαδοχικής ενεργοποίησης των παραγόντων που συμμετέχουν στο ενδογενές και στο εξωγενές μονοπάτι (Monroe et al. 2002).

Η αιμόσταση δεν οδηγεί σε γενικευμένη διαταραχή, γιατί ως ενιαίο φαινόμενο αυτοελέγχεται. Στο τελευταίο στάδιο της ινωδόλυσης παράγεται η πρωτεάση πλασμίνη από το προένζυμο πλασμινογόνο και αποκαθίστανται οι βλάβες με την πρωτεόλυση του ινώδους, τη λύση του θρόμβου και την ομαλοποίηση του ενδοθηλιακού τοιχώματος των αγγείων (Hoffman et al. 2001).

2. Η μοριακή δομή του von Willebrand Factor

Ο παράγοντας von Willebrand (vWF) είναι μια πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της αιμόστασης. Αποτελείται από τις επικράτειες A, B, C και D και κυκλοφορεί στο πλάσμα σε συγκέντρωση ~10 μg/mL (Souto *et al.* 2003, Lenting *et al.* 2004). Η ομοιόσταση του vWF αποτελεί απαραίτητο χαρακτηριστικό ελέγχου του μηχανισμού της αιμόστασης, καθώς η ελαττωμένη δράση του είτε λόγω ανεπαρκούς παραγωγής είτε λόγω παρουσίας δυσλειτουργικών μορφών, προκαλεί αιμορραγική διάθεση και η αυξημένη δράση του ενισχύει τον κίνδυνο θρομβώσεων (Lenting *et al.* 2007).

Ο vWF κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 12. Το γονίδιο αποτελείται από 178 kb, διαθέτει 62 εξόνια και κωδικοποιεί mRNA μεγέθους 9 kb. Στο χρωμόσωμα 22 εντοπίζεται και ένα ψευδογονίδιο (21 kb), που παρουσιάζει απόκλιση κατά 3.1% από το γονίδιο του vWF και κωδικοποιεί περίπου το 34% της πρόδρομης αλληλουχίας του (Mancuso *et al.* 1991). Το αρχικό προϊόν του γονιδίου του vWF είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 2.813 αμινοξέα. Συντίθεται ως προ-προ-vWF, μια πρόδρομη πολυπεπτιδική αλυσίδα που παρουσιάζει τη δομή των επαναλαμβανόμενων επικρατειών S-D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο (Ruggeri *et al.* 2005) (**Εικόνα 2**).



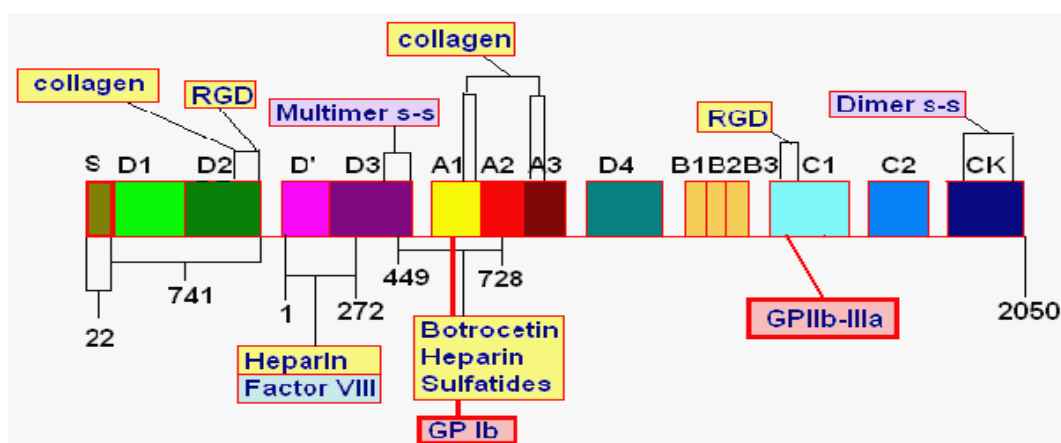
Εικόνα 2: Η μοριακή δομή του vWF (Said 2004).

Μετά από πρωτεολυτικές τροποποιήσεις το μόριο του vWF διασπάται σε ένα πεπτίδιο-σηματοδότη 22 αμινοξέων που αντιστοιχεί στην περιοχή S και σε δύο πολυπεπτίδια. Το ένα πολυπεπτίδιο είναι το προπεπτίδιο vWF που είναι γνωστό και ως αντιγόνο II του vWF, διαθέτει τις επικράτειες D1 και D2 και αποτελείται από 741

αμινοξέα. Το δεύτερο πολυπεπτίδιο είναι το ώριμο μόριο του vWF που αποτελείται από όλες τις υπόλοιπες επικράτειες και συνολικά 2050 αμινοξέα (Titani et al. 1986, Martin et al. 2007). Η αρίθμηση αρχίζει από το πρώτο αμινοξύ του ώριμου πεπτιδίου, οπότε το 764^ο κατάλοιπο του πρόδρομου μορίου αποτελεί το πρώτο αμινοξύ της ώριμης πρωτεΐνης (Ruggeri et al. 2004) (Εικόνα 2).

3. Οι επικράτειες του vWF

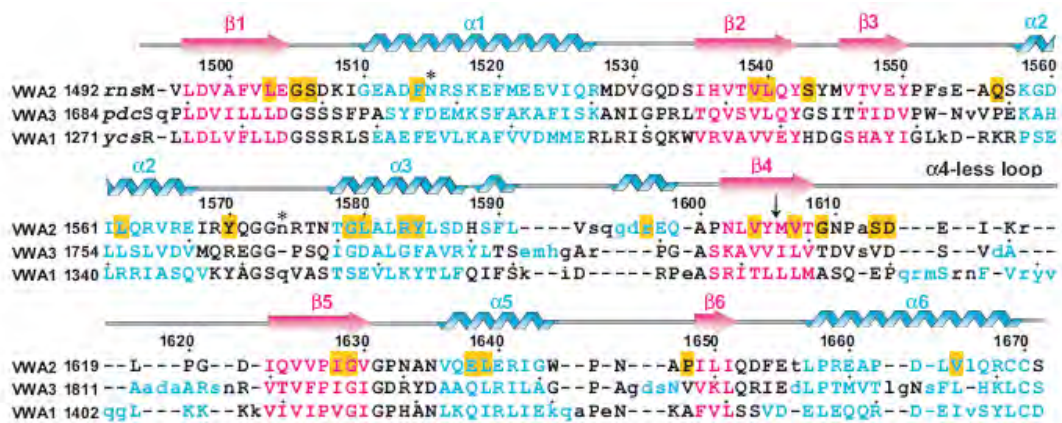
Στις επικράτειες του vWF αντιστοιχούν επαναλαμβανόμενες περιοχές που είναι υπεύθυνες για διαφορετικές λειτουργίες δέσμευσης του μορίου (Εικόνα 3) (Mendolicchio et al. 2005). Ο πρόδρομος προ-προ-vWF διαθέτει τις τέσσερις επαναλαμβανόμενες δομές (A-B-C-D) σε 2 έως 5 επαναλήψεις την καθεμία. (Bonthron et al. 1986, Verweij et al. 1986).



Εικόνα 3: Οι επικράτειες A, B, C και D του vWF και οι περιοχές δέσμευσης που διαθέτουν.

3.1. Οι επικράτειες A του vWF

Οι επαναλαμβανόμενες επικράτειες A αποτελούν εσωτερικά τριπλά μοτίβα των καταλοίπων του ώριμου vWF και διακρίνονται στις A1, A2 και A3 και παρουσιάζουν ομοιότητες στην πρωτοταγή και δευτεροταγή τους δομή (Εικόνα 4) (Zhang et al. 2009).

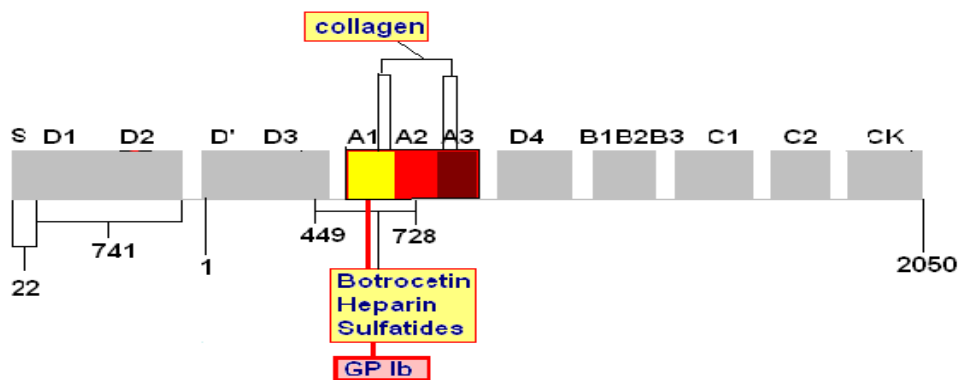


Εικόνα 4: Σύγκριση της πρωτοταγούς και της δευτεροταγούς δομής των επικρατειών A του vWF. Διακρίνονται τα β ελάσματα (ροζ) και οι α έλικες (γαλάζιες). Συμβολίζονται οι δεκάδες (τελείες), το σημείο πέψης της πρωτεάσης ADAMTS13 (μαύρο βέλος), οι περιοχές γλυκοζύλιωσης (αστερίσκοι), τα κατάλοιπα που σχετίζονται με μεταλλάξεις στις περιπτώσεις vWD (κίτρινο), τα κατάλοιπα που δεν παρουσιάζουν ομοιότητες (μικρά γράμματα) και τα κατάλοιπα που απουσιάζουν (παύλες) (Zhang et al. 2009).

Η επικράτεια A1 περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Glu⁴⁹⁷-Gly⁷¹⁶ και είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του vWF στον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα Ib των αιμοπεταλίων (GPIIb) (Mohri et al. 1989, Fujimura et al. 1991) (**Εικόνα 5**). Παράλληλα, διαθέτει διαφορετικές διακριτές θέσεις δέσμευσης για την ηπαρίνη, τα σουλφατίδια που ανήκουν στην οικογένεια των σουλφολιπιδίων, το κολλαγόνο, το αντιβιοτικό ριστοσετίνη (ristocetin) και τις πρωτεΐνες βοτροσετίνη (botrocetin) και βιτισετίνη (bitiscetin) (Mohri et al. 1988, Sugimoto et al. 1991, Lankhof et al. 1995, Emsley et al. 1998). Παρά τις δομικές ομοιότητες και τα αρνητικά φορτία που παρουσιάζουν η ηπαρίνη και τα σουλφατίδια, δε δεσμεύονται ανταγωνιστικά στον vWF (Roberts et al 1986, Fujimura et al. 1987, Christophe et al. 1991).

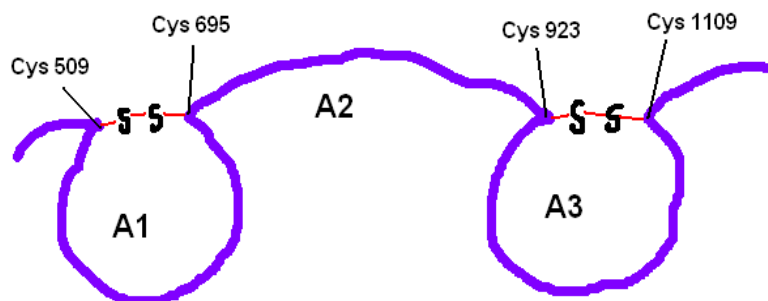
Η επικράτεια A2 αποτελείται από τα κατάλοιπα Pro⁷¹⁷-Gly⁹⁰⁹ (Fujikawa et al. 2001, Gerritsen et al. 2001). Μεταξύ των καταλοίπων Tyr⁸⁴²-Met⁸⁴³ της επικράτειας A2 εντοπίζεται μια περιοχή πρωτεόλυσης από τη μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13 που βρίσκεται φυσιολογικά στην κυκλοφορία και μετατρέπει τα μεγάλα πολυμερή του vWF σε μικρότερα (Sadler et al. 1998, Nishio et al. 2004) (**Εικόνα 5**). Πολλά μόρια της πρωτεάσης έχουν τη δυνατότητα να ασκούν τη δράση τους σε κάθε πολυμερές μόριο vWF που μπορεί να αποτελείται ακόμη και από σαράντα επικράτειες A2 (Majerus et al. 2005).

Η επικράτεια A3 περιλαμβάνει τα κατάλοιπα από Glu⁹¹⁰-Leu¹¹¹¹ και διαθέτει την κύρια περιοχή πρόσδεσης για το ινώδες κολλαγόνο τύπου I και III (Shelton-Inloes *et al.* 1986) (Εικόνα 5). Η πρόσδεση του κολλαγόνου εντοπίζεται στο αμινοτελικό τμήμα της επικράτειας A3 στην περιοχή μεταξύ των καταλοίπων Lys⁹⁴⁸-Met⁹⁹⁸ (Romijn *et al.* 2003). Η πρόσδεση του κολλαγόνου τύπου I, III και IV σε υποδοχείς των αιμοπεταλίων σε συνθήκες διαμητικής τάσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη συγκέντρωση των ιόντων Mg (Cruz *et al.* 1995). Πιθανώς η πρόσδεση στην επικράτεια A3 επιτυγχάνεται με παρόμοιο μηχανισμό (Jenkins *et al.* 1998).



Εικόνα 5: Οι επικράτειες A του vWF και οι περιοχές πρόσδεσης που διαθέτουν.

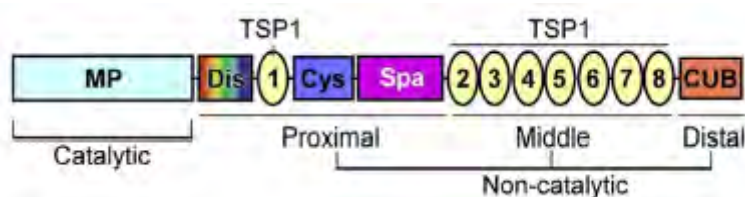
Τα κατάλοιπα Cys⁵⁰⁹-Cys⁶⁹⁵ του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου της επικράτειας A1 του vWF συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό σχηματίζοντας ένα βρόχο 185 καταλοίπων (χωρίς να υπολογίζονται τα δύο κατάλοιπα των κυστεϊνών) (Titani *et al.* 1986, Bonthron *et al.* 1986). Ίδιου μήκους δισουλφιδικός βρόχος σχηματίζεται μεταξύ των καταλοίπων Cys⁹²³-Cys¹¹⁰⁹ της επικράτειας A3 (Marti *et al.* 1987, Andrews *et al.* 1989), αλλά δεν παρατηρείται στην A2 (Zheng *et al.* 2001, Levy *et al.* 2001) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Οι επικράτειες A1 και η A3 του vWF διαθέτουν από έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών τους άκρων και δημιουργούνται βρόχοι μεταξύ των καταλοίπων Cys⁵⁰⁹-Cys⁶⁹⁵ και Cys⁹²³-Cys¹¹⁰⁹. Η A2 επικράτεια στερείται του δισουλφιδικού βρόχου.

3.1.1. Η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13

Η ADAMTS13 ανήκει στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών ADAMTS (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type-1 motif) που σχετίζονται συνήθως με την αποικοδόμηση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (*Tortorella et al. 1999, Sandy et al. 2001*). Η ADAMTS13 είναι Zn^{+2}/Ca^{+2} εξαρτώμενη πρωτεάση και η μειωμένη δράση της σχετίζεται με συστηματική μικροαγγειακή θρόμβωση, χαρακτηριστικό της θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας (TTP) (*Tsai et al. 1998, Furlan et al. 1999, Moake et al. 2002*). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεάση εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 9q34 (*Nishio et al. 2004*). Η ADAMTS13 αποτελείται από το πεπτιδίο σηματοδότη S, το προπεπτιδίο P, τη δομική περιοχή, το τμήμα που μοιάζει με δυσιντεγκρίνη, οχτώ επαναλήψεις θρομβοσποντίνης τύπου 1 (TSP1), μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, την ενδιάμεση περιοχή και δύο επικράτειες CUB, οι μεταλλάξεις των οποίων σχετίζονται με TTP και η ονομασία τους αποτελεί ακρωνύμιο των πρωτεϊνών όπου εντοπίστηκαν αρχικά (C1r/C1s, Uegf και Bmp1) (**Εικόνα 7**) (*Colige et al. 1999, Fernandes et al. 2001, Cal et al. 2002*).

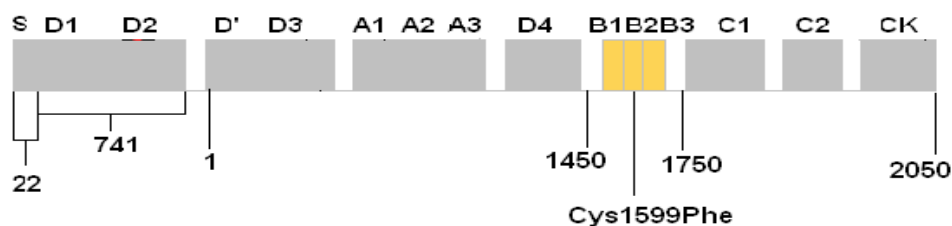


Εικόνα 7: Η μοριακή δομή της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS13. Διακρίνεται η δομική περιοχή (MP), το τμήμα που μοιάζει με δυσιντεγκρίνη (Dis), οι οχτώ επαναλήψεις θρομβοσποντίνης τύπου 1 (TSP1), η πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή (Cys), η ενδιάμεση περιοχή (Spa) και οι δύο επικράτειες CUB (*Zheng et al. 2001*).

Η δομική περιοχή είναι απαραίτητη για τα δράση της πρωτεάσης και οι επαναλήψεις TSP1, η ενδιάμεση περιοχή και οι επικράτειες CUB μετέχουν στο μηχανισμό της πρωτεόλυσης (*Tortorella et al. 2000*). Ένα πεπτιδίο της πρώτης επικράτειας CUB αλληλεπιδρά με τον vWF αναστέλλοντας την πρωτεόλυση (*Zheng et al 2001, Levy et al 2001, Soejima et al 2001, Majerus et al 2005*). Η ενδιάμεση περιοχή και οι πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεϊνών που αλληλεπιδρούν με την επικράτεια A2 μετέχουν στην αναγνώριση του vWF (*Kokame et al. 2002, Zheng et al. 2003, Soejima et al. 2003, Hurskainen et al. 1999, Fujikawa et al. 2001*).

3.2. Οι επικράτειες B του vWF

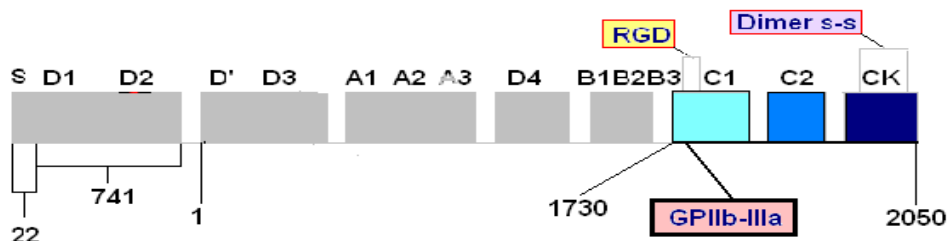
Λίγα είναι γνωστά για τις B επικράτειες του vWF, B1, B2 και B3 (Glu¹⁴⁵⁰-Thr¹⁷⁵⁰) (Εικόνα 8). Η μετάλλαξη του καταλοίπου Cys¹⁵⁹⁹ της επικράτειας B2 σε Phe σχετίζεται με σημαντικές μεταβολές των πολυμερών του vWF και μη φυσιολογική πρωτεόλυση από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13 (Casonatol et al. 2007).



Εικόνα 8: Οι επικράτειες B του vWF.

3.3. Οι επικράτειες C του vWF

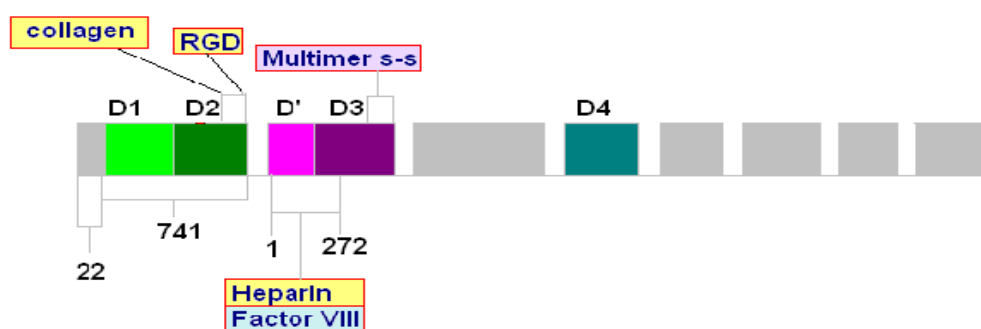
Οι επικράτειες C του vWF ονομάζονται C1, C2 και CK και περιλαμβάνουν τα κατάλοιπα Arg¹⁷³⁰-Lys²⁰⁵⁰ (Εικόνα 9). Η περιοχή C1 εντοπίζεται στα κατάλοιπα Lys¹⁶⁶⁶-Leu¹⁷³², η περιοχή C2 στα κατάλοιπα Glu¹⁸¹⁷-Leu¹⁸⁸² και η περιοχή CK στα κατάλοιπα Cys¹⁹⁶¹-Ser²⁰⁴⁹. Η περιοχή CK που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο είναι πλούσια σε κυστεΐνες και συμμετέχει στο σχηματισμό των διμερών του vWF. Η αλληλουχία Arg-Gly-Asp (RGD), που εντοπίζεται στην επικράτεια C1 μεταξύ των καταλοίπων 1744-1746 αποτελεί τη θέση αναγνώρισης του υποδοχέα των αιμοπεταλίων GPIIb-IIIa. Στον υποδοχέα GPIIb-IIIa δεσμεύεται επίσης το ινωδογόνο που διαθέτει την αμινοξική αλληλουχία RGD (D'Souza et al. 1991).



Εικόνα 9: Οι επικράτειες C του vWF και η περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα GPIIb-IIIa των αιμοπεταλίων που διαθέτουν.

3.4. Οι επικράτειες D του vWF

Στις επικράτειες D του πρόδρομου vWF περιλαμβάνονται οι D1, D2, D', D3 και D4 που παρουσιάζουν ομοιότητες στην αμινοξική τους αλληλουχία και διαθέτουν 32 έως 36 κατάλοιπα κυστεΐνης η καθεμία (**Εικόνα 10**). Το προπεπτίδιο του vWF απαρτίζεται από τις επικράτειες D1 (Arg³⁴-Cys³⁴⁸) και D2 (Phe³⁹⁶-Cys⁷⁰⁷) που εντοπίζονται ακριβώς πριν από το αμινοτελικό άκρο του ώριμου vWF. Στον ώριμο vWF εντοπίζεται ένα μέρος της επικράτειας D' (Met¹-Val¹⁰²), η D3 (Thr¹⁰³-Gly⁴⁷⁸) και η D4 (Val¹¹⁸⁶-Val¹³⁹⁰) μεταξύ των επικρατειών A και B.

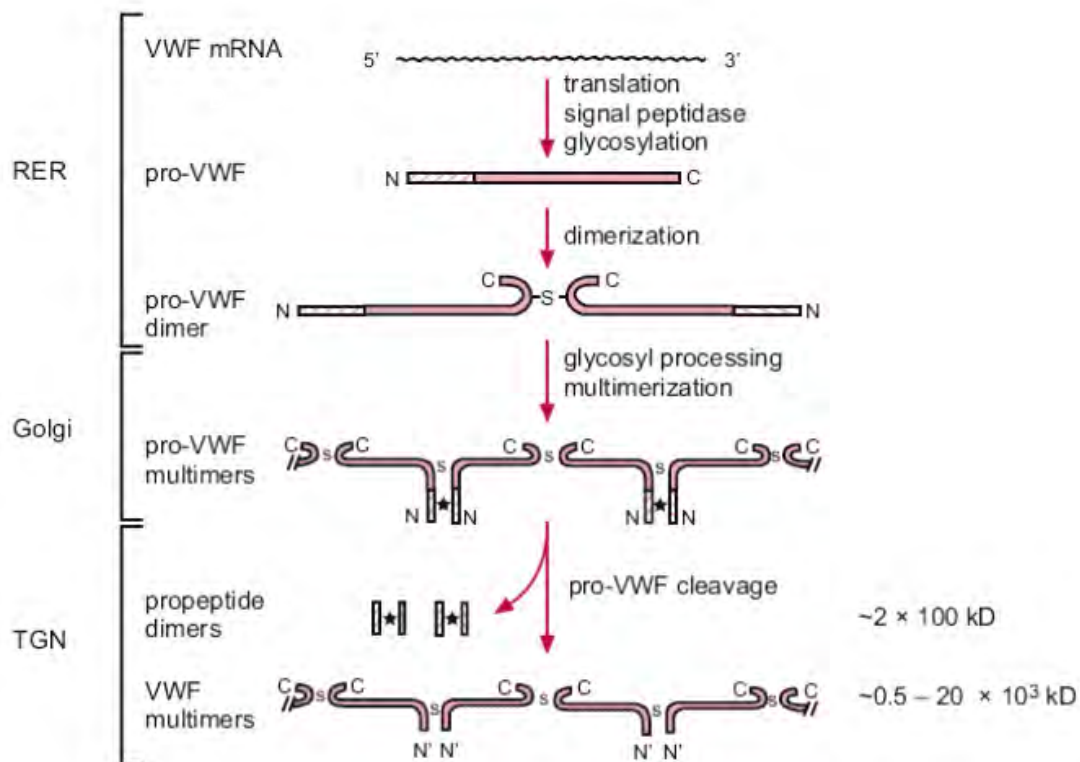


Εικόνα 10: Οι επικράτειες D του vWF και οι περιοχές πρόσδεσης που διαθέτουν.

Τα κατάλοιπα των κυστεϊνών της επικράτειας D3 συμμετέχουν σε διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς κατά τη δημιουργία των πολυμερών του vWF, ενώ αυτά των D1, D', D2 και D4 εμπλέκονται αποκλειστικά σε ενδομοριακούς δεσμούς (*Ruggeri et al. 1993*). Στην επικράτεια D2 εντοπίζεται η αλληλουχία RGD και η περιοχή πρόσδεσης του κολλαγόνου μεταξύ των καταλοίπων Arg⁶⁹⁸-Asp⁷⁰⁰, ενώ στις D' και D3 οι περιοχές δέσμευσης της ηπαρίνης (Cys¹⁵¹-Arg¹⁶¹) και του παράγοντα FVIII (Val⁷⁸-Asp⁹⁶) (*Sobel et al. 1991*). Οι περιοχές Cys²⁹⁵-Cys³⁴⁸, Cys⁶⁵²-Cys⁷⁰⁷, Cys⁷⁷⁶-Cys⁸²⁷ και Tyr¹¹⁴⁶-Val¹¹⁹⁶ που είναι πλούσιες σε κυστεΐνες ονομάζονται TIL1, TIL2, TIL3 και TIL4 (Trypsin Inhbitor Like Domains) και μετέχουν στο σχηματισμό των πολυμερών του vWF (*Zhang et al. 2007*).

4. Η βιοσύνθεση και η δομή των πολυμερών του vWF

Ο vWF συντίθεται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μεγακαρυοκύτταρα (Meyer et al. 1993, Ruggeri et al. 1993, Ruggeri et al. 1997, Ruggeri et al. 1999). Μετά τη σύνθεση *in vivo* στα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε εκκρίνεται άμεσα είτε αποθηκεύεται, ενώ μετά τη σύνθεση στα μεγακαρυοκύτταρα ακολουθεί μόνο το μονοπάτι της έκκρισης (Wagner et al. 1982). Μετά τη σύνθεσή του ο προ-προ-vWF κατευθύνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σχηματίζει ομοιοπολικά διμερή μέσω δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των καρβοξυτελικών περιοχών CK όπου συμβαίνουν και N γλυκοζυλιώσεις (Εικόνα 11) (Sadler et al. 1989, Wagner et al. 1990). Τα διμερή μεταφέρονται στο σύστημα Golgi, όπου μετά από επιπλέον μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πολυμερίζονται σε πολύ μεγάλα μόρια (μεγαλύτερα από 20,000 kDa) (Εικόνα 11). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω δισουλφιδικών δεσμών που συνδέουν τα αμινοτελικά άκρα του κάθε διμερούς στις επικράτειες D. Τα μεγαλύτερα πολυμερή που προκύπτουν (ULvWF) είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική βιολογική λειτουργία του vWF (Moake et al. 1982, Sporn et al. 1987, Tsai et al. 1989).



Εικόνα 11: Ο σχηματισμός των ULvWF (Denis et al. 2002).

Ο πολυμερισμός αυξάνει τον αριθμό των περιοχών δέσμευσης των προσδεμάτων ανά μόριο vWF και τα πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους παρουσιάζουν έξι φορές ισχυρότερη συγγένεια για τα αιμοπετάλια σε σχέση με τα διμερή (*Sugimoto et al. 1991, Sugimoto et al. 1993, Miyata et al. 1999, Lenting et al. 2003*). Το αιμοστατικό δυναμικό αυξάνεται σημαντικά με το μέγεθος του vWF (*Sadler et al. 1998, Arya et al. 2002*). Μετά τον πολυμερισμό γίνεται μεταφορά στο μετα-Golgi δίκτυο όπου το προπεπτίδιο vWF αποκόπτεται από ένζυμα (φουρίνη ή σχετικές πρωτεάσες) και το πολυμερές προϊόν εκκρίνεται άμεσα ή αποθηκεύεται στα αιμοπετάλια (*Ruggeri et al. 2007*).

Ο ώριμος vWF με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου εμφανίζεται είτε ως μια ινώδης δομή με διάμετρο 2-3 nm και μήκος μέχρι 1300 nm, κοντά στη διάμετρο των αιμοπεταλίων είτε ως ελικωμένο μόριο με διάμετρο 2-300 nm. Το ώριμο μόριο προκύπτει από ενδοκυτταρικές διαδικασίες που καταλήγουν στην αποθήκευση και έκκριση ενός ετερογενούς πληθυσμού πολυμερών γλυκοπρωτεϊνών που καλούνται συλλογικά vWF. Το προπεπτίδιο του vWF φαίνεται ότι απαιτείται για τη φυσιολογική δημιουργία των ULvWF, αλλά ο τρόπος με τον οποίο μετέχει στο σχηματισμό τους παραμένει ένα ενδιαφέρον ερώτημα. Παρόλο που το σύστημα Golgi δε διαθέτει πρωτεΐνες συνοδούς που μπορούν να μετέχουν στη δομική διαμόρφωση άλλων πρωτεϊνών και το περιβάλλον του είναι όξινο μη ευνοώντας τη δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών, σε περίπτωση μεταβολής των συνθηκών, δεν επιτυγχάνεται ο πολυμερισμός του vWF. Μια εκδοχή είναι πως το προπεπτίδιο μπορεί να λειτουργεί ως ενδογενής οξειδωαναγωγή ευαίσθητη στο pH και να καταλύει το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών για το σχηματισμό των ULvWF (*Purvis et al. 2004*).

5. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του vWF

Η γλυκοζυλίωση αποτελεί μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία πραγματοποιούνται ομοιοπολικές προσθήκες υδατανθράκων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα των πρωτεϊνών (Millar *et al.* 2006, Jenkins *et al.* 2006). Η παρουσία των υδατανθράκων συμβάλλει στη διαμόρφωση της δομής των πρωτεϊνών, στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους, στη βελτίωση της διαλυτότητάς τους και στο μηχανισμό απομάκρυνσής τους από την κυκλοφορία. Η N-γλυκοζυλίωση αναφέρεται στη σύνδεση υδατανθράκων στο άζωτο της πλευρικής αλυσίδας των καταλοίπων Asn στο μοτίβο Asn-X-Ser/Thr, όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός από την προλίνη. Η O-γλυκοζυλίωση αφορά τη σύνδεση υδατανθράκων στο οξυγόνο της πλευρικής αλυσίδας των καταλοίπων Ser ή Thr.

Ο ώριμος vWF διαθέτει 10 περιοχές O-γλυκοζυλίωσης στις θέσεις 485, 492, 493, 500, 705, 714, 723, 724, 916 και 1535 και 12 περιοχές N-γλυκοζυλίωσης στις θέσεις 94, 384, 468, 752, 811, 1460, 1527, 1594, 1637, 1783, 1822 και 2027 (Granilk *et al.* 1981). Υπάρχουν και τέσσερις περιοχές γλυκοζυλίωσης στην περιοχή του προπεπτιδίου στις θέσεις 99, 156, 211 και 666 (Federici *et al.* 1988). Η διαδικασία της N-γλυκοζυλίωσης αρχίζει κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των ULvWF κατά τη μεταφορά στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συνεχίζεται μέχρι το σύστημα Golgi, ενώ η O-γλυκοζυλίωση συμβαίνει στο σύστημα Golgi (Granilk *et al.* 1981, Kao *et al.* 1980).

Αναστέλλοντας τη διαδικασία της N-γλυκοζυλίωσης εμποδίζεται ο αρχικός διμερισμός του vWF, η μεταφορά του στο σύστημα Golgi και η παραγωγή των ULvWF (Lenting *et al.* 2007). Η διαδικασία της O-γλυκοζυλίωσης μετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων του vWF στο πλάσμα ασκώντας προστατευτική δράση. Η αναστολή της διαδικασίας της O-γλυκοζυλίωσης μπορεί να επηρεάσει τη διαμόρφωση της δομής της πρωτεΐνης προκαλώντας μείωση του χρόνου ημιζωής της (Stoddart *et al.* 1996, van Schooten *et al.* 2007).

Στο σύστημα Golgi γίνεται προσθήκη δύο καταλοίπων σιαλικών οξέων στα τελικά κατάλοιπα της γλυκοζυλίωσης που αποτρέπουν την πρόωρη αποικοδόμηση των ULvWF μέσω υποδοχέων που αναγνωρίζουν μη σιαλικά κατάλοιπα γαλακτόζης, όπως ο ηπατικός ασιαλογλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας. Στα εκκρινόμενα ULvWF παρατηρείται σούλφωση που συμβαίνει αργά στο στάδιο της βιοσύνθεσης, πριν από δύο πολύ σημαντικές διεργασίες, τον πολυμερισμό και την αποθήκευση των ULvWF. Κατά μέσο όρο παρατηρείται ένα μόριο θείου ανά υπομονάδα ώριμου vWF. Η

αναστολή της σουλφωσης δεν επηρεάζει το σχηματισμό, τη σταθερότητα και την αποθήκευση των ULvWF (*Josephine et al. 1990*).

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση του μορίου του vWF, επηρεάζοντας το μηχανισμό της πρωτεόλυσής του και την πρόσδεση στα αιμοπετάλια. Τα μόρια του vWF που δεν έχει πραγματοποιηθεί γλυκοζυλίωση έχει αποδειχθεί ότι προσδένονται στα αιμοπετάλια με μικρότερη συγγένεια και η προσκόλληση μέσω της ριστοσετίνης (ristocetin) είναι λιγότερο αποτελεσματική, πιθανόν λόγω της έλλειψης των απαραίτητων αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων σιαλικών οξέων των Ο-ολιγοσακχαριτών (*Cruz et al. 1993, McKinnon et al. 2008*). Η διαδικασία της N-γλυκοζυλίωσης της επικράτειας A2 ρυθμίζει την πρωτεόλυση της από την ADAMTS13, καθώς μετέχει στη μεταφορά του δεσμού που δρα η πρωτεάση από το εσωτερικό της κοιλότητας του μορίου στην εξωτερική επιφάνεια (*Cruz et al. 1993, Dong et al. 2003, McKinnon et al. 2008, McKinnon et al. 2010*).

6. Αποθήκευση, έκκριση και κυκλοφορία του vWF

Η ισορροπημένη συμμετοχή του vWF είναι απαραίτητη για το φυσιολογικό μηχανισμό της αιμόστασης υποδεικνύοντας την ύπαρξη ανταγωνισμού μεταξύ της βιοσύνθεσης των ULvWF και της αποικοδόμησής τους από τη μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13 (Dent et al. 1991, Auton et al. 2006). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα ένα μέρος των ULvWF εκκρίνεται και το υπόλοιπο αποθηκεύεται σε ειδικά οργανίδια που ονομάζονται σωμάτια Weibel-Palade (Bowie et al. 1986, Wagner et al. 1990, Haberichter et al. 2000). Αυτά τα οργανίδια είναι προσδεδεμένα σε μεμβράνες και αποτελούν σωληνώδεις δομές στις οποίες αποθηκεύονται τα ULvWF. Ο vWF συναντάται σε παρόμοιες σωληνώδεις δομές και στα α κοκκία των αιμοπεταλίων. Μόνο στα σωμάτια Weibel-Palade και στα α κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχεται λειτουργικός και ολοκληρωμένος vWF με τη μορφή των ULvWF, που συνήθως δε συναντάται στην κυκλοφορία. Το προπεπτίδιο του vWF φαίνεται να είναι απαραίτητο για τη στόχευση του vWF και αποθηκεύεται με τα ULvWF σε στοιχειομετρία ένα μόριο ανά ώριμη υπομονάδα (Sadler et al. 1991).

Τα περιεχόμενα των σωματίων Weibel-Palade και των α κοκκίων εκκρίνονται σε απόκριση σε μια ποικιλία φυσιολογικών ερεθισμάτων (Tsai et al. 1994). Ο vWF ακολουθεί ένα σταθερό και ένα ρυθμιζόμενο μονοπάτι έκκρισης (Dent et al. 1991). Το τελευταίο ακολουθείται κατά την έκκριση από τα σωμάτια Weibel-Palade και προκαλείται από διεγέρτες, όπως η δεσμοπρεσσίνη (desmopressin) (Dobrkovska et al. 1984, Menache et al. 1996). Δύο ώρες μετά την έκκριση στην κυκλοφορία, τα ULvWF διασπώνται από την πρωτεάση ADAMTS13 σε μικρότερα πολυμερή με ένα μεγάλο εύρος μεγεθών με χρόνο ημιζωής 12-20 h (Lenting et al. 2004).

7. Ο βιολογικός ρόλος του vWF

7.1. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων

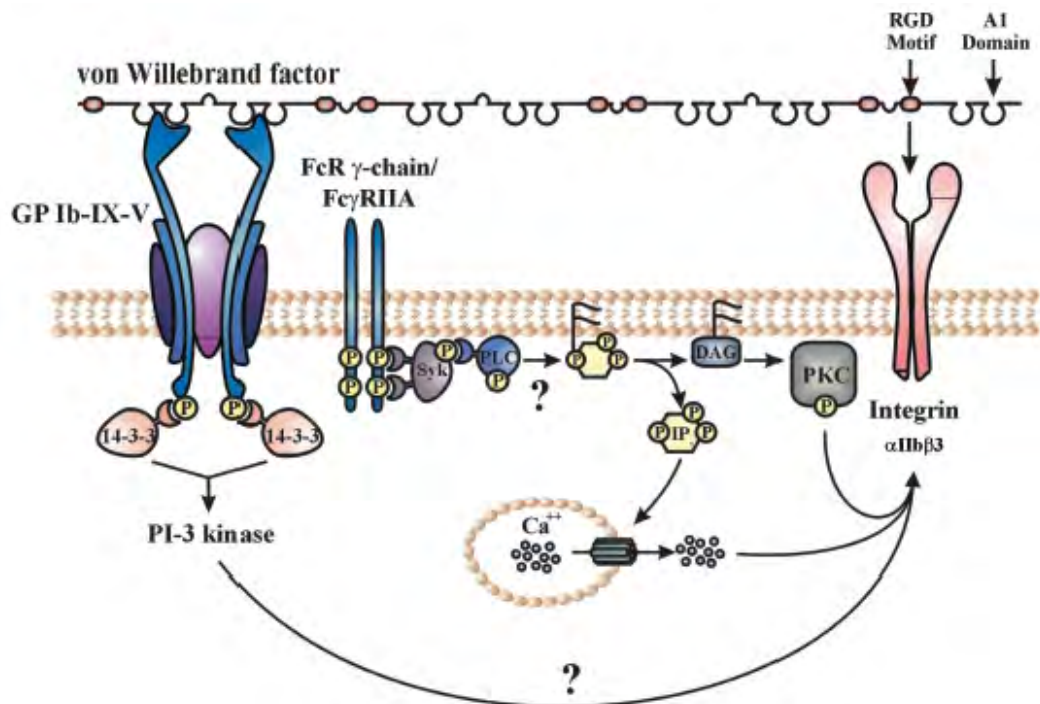
Η ροή του αίματος στο εσωτερικό των αγγείων παρομοιάζεται με μια σειρά στρωμάτων που κινούνται μέσα σε κύλινδρο με ταχύτητα που μειώνεται από το κέντρο προς την περιφέρεια. Το φαινόμενο της διαφορετικής ταχύτητας του πλάσματος στα διάφορα σημεία του εσωτερικού των αγγείων προκαλεί την ανάπτυξη της διατμητικής τάσης μεταξύ των παρακείμενων στρωμάτων του ρέοντος πλάσματος (*Kroll et al. 1996, Ruggeri et al. 1997*). Ο τοπικός ρυθμός πίεσης εκφράζεται σε cm/s ανά cm ή s^{-1} (*Mailhac et al. 1994*). Ως διατμητική τάση των ρευστών χαρακτηρίζεται η δύναμη ανά μονάδα επιφάνειας και αποτελεί την αιτία της κίνησης του αίματος. Η μεγαλύτερη διατμητική τάση πραγματοποιείται στα μικρά αρτηρίδια με διάμετρο 10-50 μm , όπου τα επίπεδα της έχει υπολογιστεί ότι ποικίλουν μεταξύ 500 και 5000 s^{-1} (*Siegel et al. 1994*). Ωστόσο η τάση είναι μεγαλύτερη σε αρτηρίες που παρουσιάζουν στένωση σε παθολογικές καταστάσεις (*Strony et al. 1993, Becky et al. 1998*).

Σε περιπτώσεις τραυματισμού προκαλείται στα σημεία της αγγειακής βλάβης αυξημένη διατμητική τάση (*Ruggeri et al. 2003, Blann et al. 2006*). Τα αιμοπετάλια αποκρίνονται ταχύτατα στις αλλαγές των ενδοθηλιακών κυττάρων και προσεγγίζουν την περιοχή της βλάβης (*Alevriadou et al. 1993, Mazzucato et al. 1998*). Η πλούσια σε κολλαγόνο στιβάδα της εξοκυττάριας περιοχής και το υποενδοθήλιο έχουν βασικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων (*Turitto et al. 1984, Moroi et al. 1997*). Στο εσωτερικό των αγγείων κυκλοφορεί άφθονος vWF και η αυξημένη διατμητική τάση προκαλεί μεταβολή στη διαμόρφωσή του που ενώ φυσιολογικά είναι σφαιρική, αποκτά μια ραβδοειδή δομή (*Girma et al. 1987, Siedlecki et al. 1996, Reiningger et al. 2006, Jackson et al. 2006*). Στα σημεία της αγγειακής βλάβης ο vWF συνδέεται μέσω της επικράτειας A3 με τον υπενδοθηλιακό ιστό (*Roth et al. 1986, Cruz et al. 1995, Cruz et al. 2005*). Η πρόσδεση πραγματοποιείται κυρίως μέσω του κολλαγόνου στον υποδοχέα GPIa-IIa (ιντεγκρίνη $\alpha 2\beta 1$) των αιμοπεταλίων (*Nieuwenhuis et al. 1985, Siedlecki et al. 1996, Watson et al. 1998, Andrews et al. 2004*).

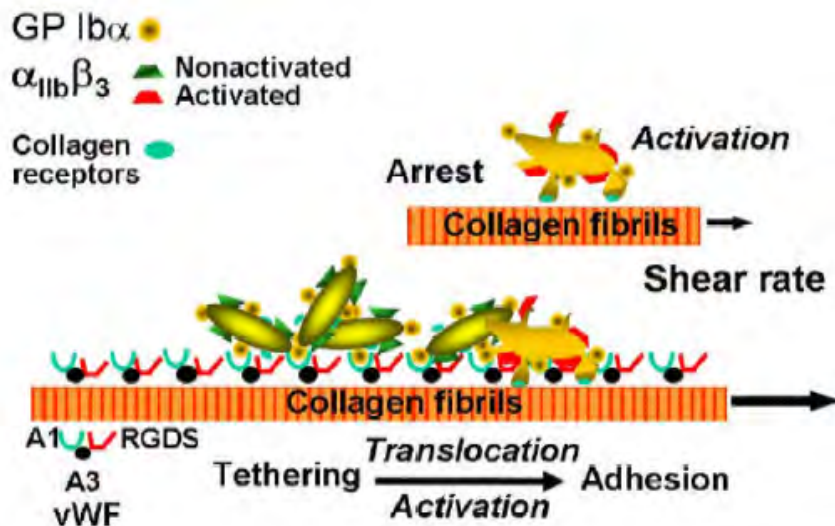
Ο vWF μέσω της επικράτειας A1 προσδέεται στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων περιορίζοντας σημαντικά την κινητικότητά τους και προάγοντας την έναρξη σχηματισμού του θρόμβου (*Sugimoto et al. 1999, Kulkarni et al. 2000, Tomokiyo et al. 2005, Moroi et al. 2007*). Η πολυμερής φύση του vWF επιτρέπει την

παρουσία επικρατειών A1 σε υψηλή πυκνότητα και το σχηματισμό πολλαπλών αναστρέψιμων δεσμών με τα αιμοπετάλια με υψηλό ρυθμό πρόσδεσης και αποσύνδεσης (Fujimura et al. 1986, Denis et al. 1993, Savage et al. 2002). Στον υποδοχέα GPIIbα εντοπίζεται ακόμη περιοχή δέσμευσης της θρομβίνης (Schrimpton et al. 2002). Παρόλο που η περιοχή A1 του vWF παρουσιάζει *in vitro* υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα GPIIbα των αιμοπεταλίων η σύνδεση δεν πραγματοποιείται αυθόρμητα, αλλά προάγεται μέσω εξωγενών διαμορφωτών, στους οποίους ανήκουν το αντιβιοτικό ριστοσετίνη (ristocetin) και οι πρωτεΐνες βοτροσετίνη (botrocetin) και βιτισετίνη (bitiscetin) (Miura et al. 1999). Η απαραίτητη συμμετοχή των εξωγενών διαμορφωτών μαρτυρά προαπαιτούμενες μεταβολές στη διαμόρφωση του μορίου του vWF, ώστε να εκτεθεί η επικράτεια A1 και να προσδεθεί στον υποδοχέα GPIIbα των αιμοπεταλίων (Matsushita et al. 1995).

Λόγω της υψηλής ταχύτητας της ροής του αίματος, η σύνδεση του vWF με τον υποδοχέα GPIIbα δεν είναι αρκετή για να επιτευχθεί η πλήρης ακινητοποίηση των αιμοπεταλίων που συνεχίζουν να κινούνται σε πιο αργό ρυθμό κατά τη ροή του αίματος υπό την εφαρμογή της διατημητικής τάσης. Τα αιμοπετάλια μεταφερόμενα στο σημείο της βλάβης ενεργοποιούνται από παράγοντες, όπως το ADP, η θρομβίνη, η θρομβοξάνη A, η σερετονίνη, η επινεφρίνη και το αραχιδονικό οξύ, μεταβάλουν το σχήμα τους και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους, εκκρίνοντας τοπικά αγωνιστές (π.χ. ADP, θρομβίνη, κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες). Η αλληλεπίδραση του vWF με τον υποδοχέα GPIIbα προκαλεί έναν καταρράκτη μετάδοσης μηνυμάτων στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω των G πρωτεϊνών. Η μετάδοση των μηνυμάτων πραγματοποιείται με την παραγωγή της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3), του ασβεστίου, της διακυλογλυκερόλης (DAC) και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός ακόμη υποδοχέα των αιμοπεταλίων, του GPIIb-IIIa ή α_{IIb}β₃ ιντεγκρίνης. Σε αυτόν τον υποδοχέα προσδένονται η επικράτεια C1 του vWF και το ινωδογόνο μέσω των περιοχών RGD και ολοκληρώνεται η ακινητοποίηση των αιμοπεταλίων (**Εικόνα 12**) (Savage et al. 1996, Berndt et al 2001). Ο ρυθμός αλληλεπίδρασης του vWF με τον υποδοχέα GPIIb-IIIa είναι σχετικά αργός και επάγει την ενίσχυση της αρχικής απόκρισης και τη σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην επιφάνεια του δικτύου του κολλαγόνου (**Εικόνα 13**) (De Marco et al. 1985, Savage et al. 1996).



Εικόνα 12: Μεταφορά μηνυμάτων που ξεκινούν από την πρόσδεση του vWF στον υποδοχέα GPIba των αιμοπεταλίων και προκαλούν την ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb-IIIa των αιμοπεταλίων (Berndt et al. 2001).

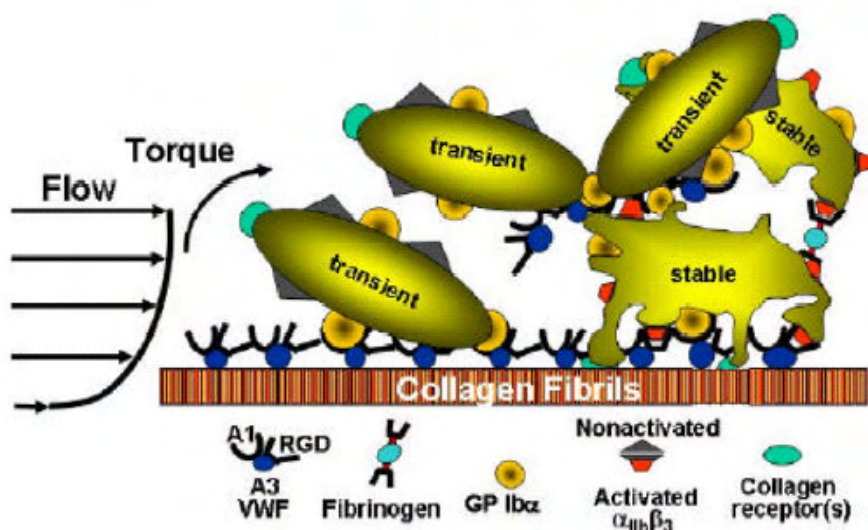


Εικόνα 13: Ο μηχανισμός της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων κατά τη ροή του αίματος. Κατά τον τραυματισμό, ιδιαίτερα σε αγγεία με υψηλή διατμητική τάση, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται παροδικά στον vWF του υποενδοθηλίου μέσω του υποδοχέα GPIIb. Η σύνδεση σταθεροποιείται και τα αιμοπετάλια ακινητοποιούνται μετά την αλληλεπίδραση του υποδοχέα GPIIb-IIIa ή αIIbβ₃ με τον vWF (Ruggeri et al. 2007).

Παρόλο που η ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb-IIIa είναι απαραίτητη για να πραγματοποιηθεί η προσκόλληση των αιμοπεταλίων, δεν επαρκεί για την αρχική σύνδεση τους στο τοίχωμα των αγγείων σε συνθήκες διατμητικής τάσης (*Weiss et al. 1978, Granilk et al. 1985*). Η πρόσδεση του vWF στον υποδοχέα GPIIb-IIIa μπορεί να επιτευχθεί μόνο μετά την πρόσδεση της επικράτειας A1 στον υποδοχέα GPIba (*Ruggeri et al. 2004*). Σε περιπτώσεις που δεν παρατηρούνται συνθήκες πολύ υψηλής διατμητικής τάσης, η προσκόλληση των αιμοπεταλίων είναι ανεξάρτητη από την πρόσδεση του vWF στον υποδοχέα GPIba και επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων των υποδοχέων του κολλαγόνου με τους υποδοχείς GPIa-IIa, GPVI και του ινωδογόνου με τον υποδοχέα GPIIb-IIIa (*Berndt et al. 2001*).

7.2. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Η πρώτη στιβάδα των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στο σημείο του τραυματισμού μπορεί να αποτελέσει το υπόστρωμα για τη συσσώρευση περισσότερων αιμοπεταλίων και την ανάπτυξη του θρόμβου. Το ινωδογόνο και ο vWF του πλάσματος προσδένονται μέσω του ενεργοποιημένου υποδοχέα GPIIb-IIIa στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων που έχουν προσκολληθεί και μετατρέπονται σε υπόστρωμα για την προσέλυση και συσσώρευση και άλλων αιμοπεταλίων που μεταφέρονται με την κυκλοφορία στην περιοχή της βλάβης (*Εικόνα 14*).



Εικόνα 14: Ο μηχανισμός της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Μετά την προσκόλλησή τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και προσδένεται σε αυτά το ινωδογόνο και ο vWF σχηματίζοντας το υπόστρωμα για τη συσσώρευση και άλλων αιμοπεταλίων και το σχηματισμό θρόμβου (*Ruggeri et al. 2007*).

Η δραστηριότητα αυτή πραγματοποιείται σε πολύ υψηλό βαθμό στα ULvWF (*Goto et al. 1997, Savage et al. 1998*). Όπως στη διαδικασία της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, για να επιτευχθεί η ανάπτυξη του θρόμβου και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι απαραίτητη η πρόσδεση της επικράτειας A1 του vWF στον υποδοχέα GPIIb. Για τη σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου απαιτείται η πρόσδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIb-IIIa που πραγματοποιείται μόνο μετά την αλληλεπίδραση της επικράτειας A1 με τον υποδοχέα GPIIb (*Ruggeri et al. 1999, Ruggeri et al. 2007*).

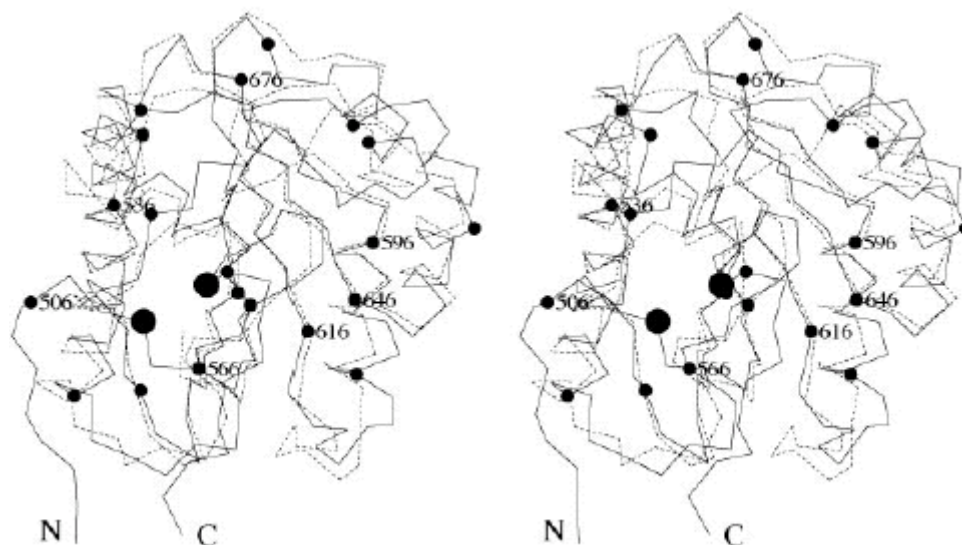
7.3. Ο σχηματισμός συμπλόκου του vWF με τον FVIII

Ο FVIII κυκλοφορεί στο πλάσμα στο μεγαλύτερο ποσοστό ως ανενεργός προ-συμπαράγοντας σχηματίζοντας ένα μη ομοιοπολικό σύμπλοκο με τον vWF. Κάθε μονομερές του vWF διαθέτει μια περιοχή πρόσδεσης για ένα μόριο FVIII. Η μοριακή συγκέντρωση του vWF στο πλάσμα (50 nmol subunit/L) υπερβαίνει 50 φορές τη μοριακή συγκέντρωση του FVIII και κάθε μεταβολή των επιπέδων του vWF σχετίζεται με αλλαγή της συγκέντρωσης του FVIII (*Lenting et al. 2007*).

Ο vWF προσδέεται με τον πρόσδεσης στον FVIII όταν είναι ανενεργός στην κυκλοφορία και τον μεταφέρει στην περιοχή της αγγειακής βλάβης, όπου είναι απαραίτητος για το μηχανισμό της πήξης του αίματος. Κατά το σχηματισμό του συμπλόκου ο FVIII προστατεύεται από πρωτεολυτική αποικοδόμηση και παρατείνεται ο χρόνος ημιζωής του στην κυκλοφορία από 2 σε 8-12 ώρες. Όταν ο FVIII δεν είναι προσδεμένος στον vWF, αποικοδομείται από πρωτεάσες, όπως η ενεργή πρωτεάση C, ο FXa και η πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τον υποδοχέα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LRPI) (*Lenting et al. 1999, Saenko et al. 1999*). Παράλληλα, το σύμπλοκο vWF-FVIII αναστέλλει την αλληλεπίδραση FVIII-FIXa παρεμποδίζοντας την πυροδότηση της πήξης μέσω του συμπλέγματος της ενδογενούς δεκάσης. Όταν ενεργοποιείται το σύστημα πήξης, η θρομβίνη διασπά το σύμπλοκο vWF-FVIII, ενεργοποιώντας τον FVIII (FVIIIa) και επιτρέποντας το σχηματισμό συμπλέγματος με τον FIXa (*Baglia et al. 2002*). Ο vWF με το σχηματισμό συμπλόκου με τον FVIII αποκτά τη δυνατότητα να παρεμβαίνει στις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες που εκτίθενται, όπως στα αιμοπετάλια (*Koppelman et al. 1994*).

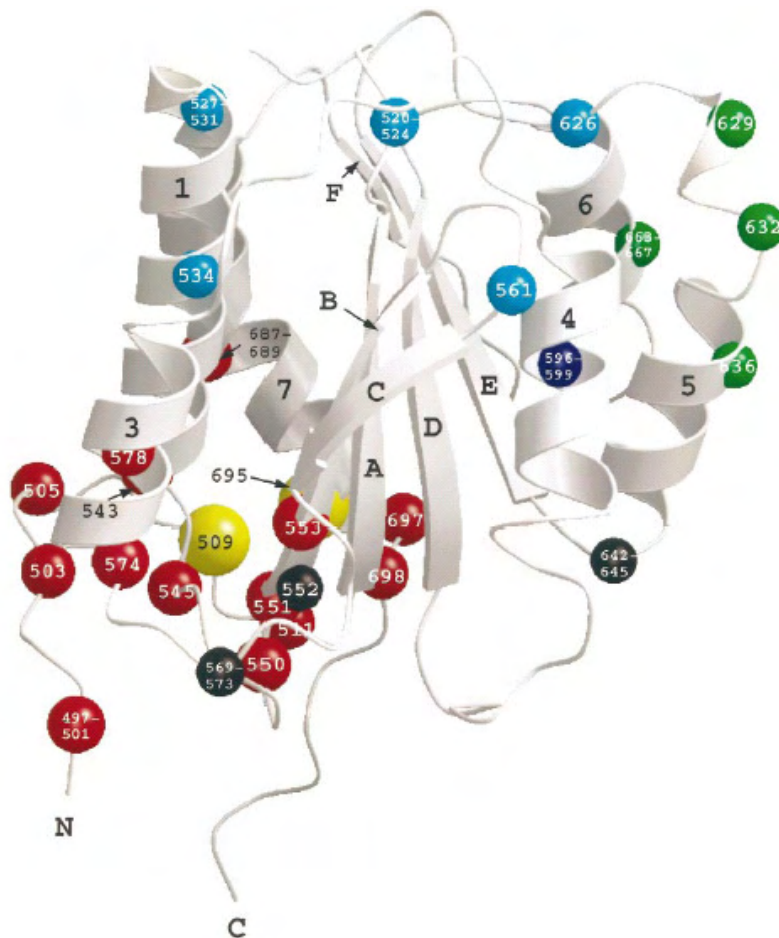
8. Η δομή της επικράτειας A1 του vWF

Η δομή της επικράτειας A1 του vWF έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X σε ευκρίνεια 2.3 Å (Emsley et al. 1997). Παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την επικράτεια A3 του vWF (Εικόνα 15) και την περιοχή I της ιντεγκρίνης και διαθέτει την τυπική αναδίπλωση που συναντάται στις πρωτεΐνες που διαθέτουν επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνες (Kobe et al. 2001).



Εικόνα 15: Στερεοδιαγράμματα σύγκρισης των δομών των επικρατειών A1 (συνεχόμενες γραμμές) και A3 (διακεκομμένες γραμμές) του vWF. Διακρίνονται κάθε δέκα κατάλοιπα ξεκινώντας από το 506 (μικροί κύκλοι) και τα κατάλοιπα των κυστεϊνών που σχηματίζουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς (μεγάλοι κύκλοι) (Emsley et al. 1997).

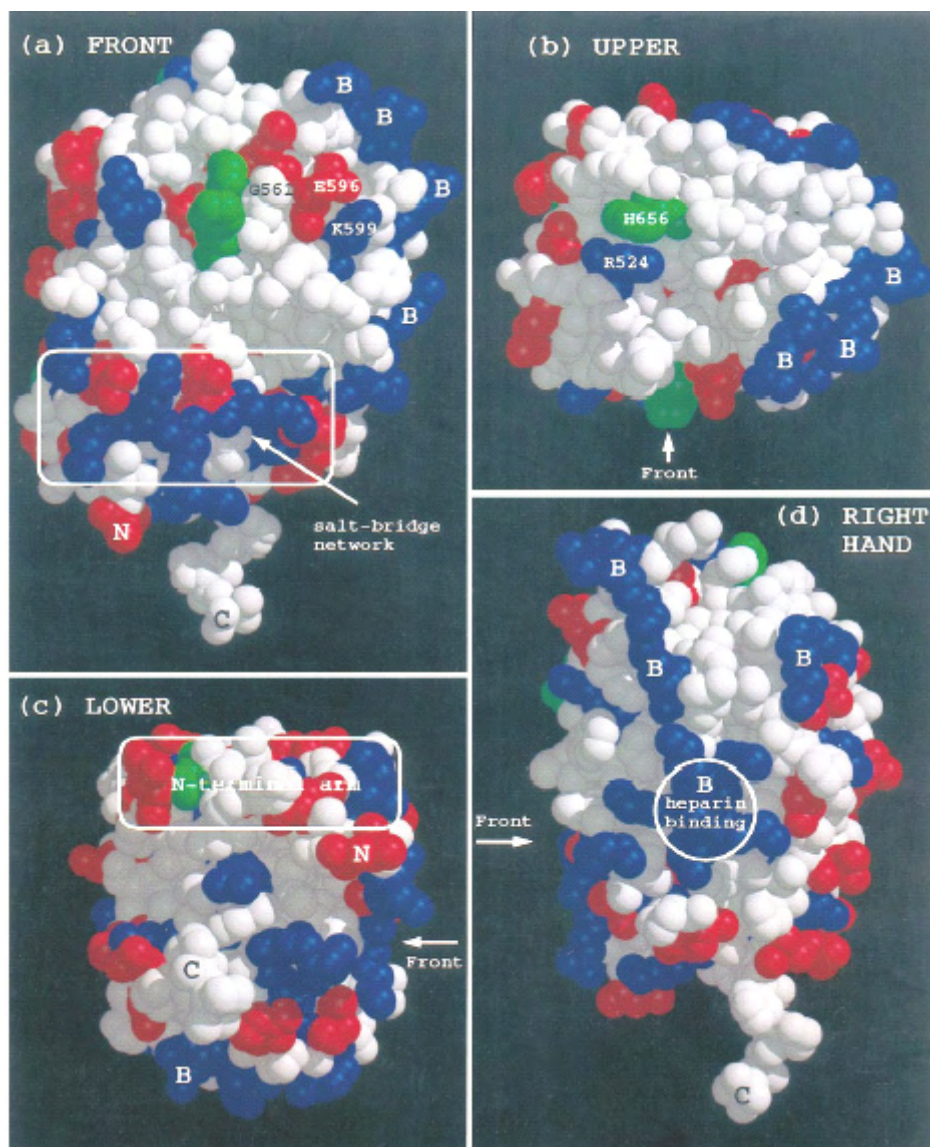
Η επικράτεια A1 έχει κατά προσέγγιση κυβοειδές σχήμα με διαστάσεις 40 X 30 X 40 Å, και αποτελείται από ένα κεντρικό υδρόφοβο παράλληλο β πτυχωτό φύλλο με 6 ελάσματα και 7 αμφιπαθείς α έλικες. Οι έλικες ονομάζονται 1-7 και τα ελάσματα A-F (Εικόνα 16). Αποτελείται από έξι κατά προσέγγιση επίπεδες επιφάνειες και στο κατώτερο τμήμα της εντοπίζονται φορτισμένα κατάλοιπα που σχηματίζουν δίκτυο ιοντικών γεφυρών, στο οποίο οφείλεται η σταθερότητά της (Emsley et al. 1998).



Εικόνα 16: Η κύρια αλυσίδα της επικράτειας A1 του vWF. Διακρίνονται τα κατάλοιπα Cys που εμπλέκονται στον δισουλφιδικό δεσμό (κίτρινο), οι περιοχές με μεταλλάξεις vWD τύπου 2B (κόκκινο), τα μεταλλάγματα όπου παρατηρείται μειωμένη πρόσδεση βοτροσετίνης (*botrocetin*) (πράσινο), οι μεταλλάξεις όπου υπάρχει μειωμένη πρόσδεση ριστοσετίνης (*ristocetin*), αλλά φυσιολογική πρόσδεση βοτροσετίνης (*botrocetin*) (γαλάζιο και μαύρο) και η μετάλλαξη όπου παρατηρείται μειωμένη πρόσδεση στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων, αλλά φυσιολογική πρόσδεση βοτροσετίνης (*botrocetin*) (μπλε) (Emsley et al. 1998).

Στη μπροστά επιφάνεια εντοπίζεται η μία άκρη του β πτυχωτού φύλλου και πλευρικές αλυσίδες από τις έλικες $\alpha 3$ και $\alpha 4$, το έλασμα βC και οι βρόχοι που τις συνδέουν (**Εικόνα 17**). Σε αυτήν την επιφάνεια βρίσκεται τμήμα του δικτύου των ιοντικών γεφυρών. Στην πάνω επιφάνεια διακρίνεται το καρβοξυτελικό άκρο του β πτυχωτού φύλλου και βρόχοι που συνδέουν το φύλλο με τις έλικες (**Εικόνα 17**). Σε αυτήν την επιφάνεια εντοπίζονται δύο θετικά φορτισμένα κατάλοιπα Arg⁵²⁴ και His⁶⁵⁶ στο κέντρο μιας πολικής, αλλά μη φορτισμένης επιφάνειας, με διάμετρο περίπου 20 Å που διαθέτει φορτισμένες ομάδες στην περιφέρεια. Στη χαμηλότερη επιφάνεια βρίσκονται τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα και οι βρόχοι που συνδέουν τις α

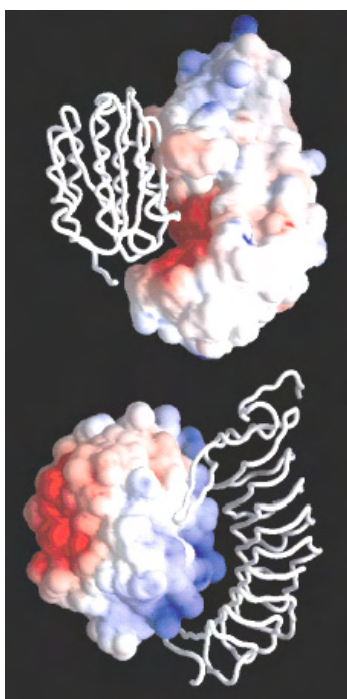
έλικες με το αμινοτελικό άκρο του β πτυχωτού φύλλου (Εικόνα 17). Στη δεξιά επιφάνεια που είναι ισχυρά βασική εντοπίζονται οι έλικες $\alpha 4$, $\alpha 5$ και $\alpha 6$ και στην αριστερή επιφάνεια που είναι ισχυρά όξινη περιέχονται οι έλικες $\alpha 1$, $\alpha 3$ και $\alpha 7$ (Εικόνα 17). Στην πίσω επιφάνεια διακρίνονται οι έλικες $\alpha 6$, $\alpha 7$ και το έλασμα βF (Emsley et al. 1998).



Εικόνα 17: Χωροπληρωτικό μοντέλο της μπροστά (a), άνω (b), κάτω (c) και δεξιά (d) πλευρά της επικράτειας A1 vWF. Όλα τα κατάλοιπα είναι χρωματισμένα γκριζα εκτός από τα κατάλοιπα που αντιστοιχούν σε Arg και Lys (μπλε), Asp και Glu (κόκκινα) και σε His (πράσινα). Διακρίνεται η προτεινόμενη περιοχή πρόσδεσης της μοττροσετίνης (B) και η πιθανή περιοχή πρόσδεσης της ηπαρίνης (κυκλωμένη) (Emsley et al. 1998).

8.1. Η αλληλεπίδραση της επικράτειας A1 του vWF και του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων

Η επικράτεια A1 του vWF και ο υποδοχέας GPIIb των αιμοπεταλίων παρουσιάζουν ηλεκτροστατική έλξη. Η επικράτεια A1 διαθέτει θετικά φορτισμένη επιφάνεια και μια μεγάλη περιοχή αρνητικά φορτισμένη. Πιθανώς αυτή η ασύμμετρη κατανομή φορτίου μετέχει στις αλληλεπιδράσεις μεγάλου εύρους (Sheinerman *et al.* 2000) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Ηλεκτροστατικά δυναμικά του συμπλόκου της επικράτειας A1 του vWF και του GPIIb υποδοχέα των αιμοπεταλίων. Συμβολίζεται το θετικό (μπλε) και το αρνητικό φορτίο (κόκκινο). Στο πάνω μέρος διακρίνεται το φορτίο του υποδοχέα GPIIb (η επικράτεια A1 συμβολίζεται με έλικα), ενώ στο κάτω μέρος διακρίνεται το φορτίο της επικράτειας A1 (ο υποδοχέας GPIIb συμβολίζεται με έλικα) (Huizinga *et al.* 2002).

Ο υποδοχέας GPIIb είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί το μεγαλύτερο συστατικό του συμπλέγματος των μεμβρανικών υποδοχέων GPIIb/IX/V των αιμοπεταλίων που αποτελείται από τις τέσσερις υπομονάδες, GPIIb, GPIIbβ, GPIIbX και GPIIbV. Η GPIIb έχει μέγεθος περίπου 135 kDa, αποτελείται από 610 αμινοξέα και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που διαθέτουν μοτίβο με περιοχές πλούσιες στο αμινοξύ λευκίνη (LRR) (Uff *et al.* 2002).

8.1.1. Υπολογιστική πρόβλεψη πρόσδεσης της A1 επικράτειας του vWF στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων

Με υπολογιστική πρόβλεψη πρόσδεσης της επικράτειας A1 του vWF σε ένα τμήμα του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων εντοπίστηκαν τα κατάλοιπα της διεπιφάνειας του συμπλόκου τους (**Εικόνα 19**). Επιλέχθηκε το πεπτίδιο του υποδοχέα μεταξύ των καταλοίπων 271-279 του αμινοτελικού του άκρου (GDTDLYDYY) που είχε αποδειχθεί με μεταλλαξιγένεση ότι αποτελεί τη θέση πρόσδεσης της επικράτειας A1 (Vasudevan et al. 2000).

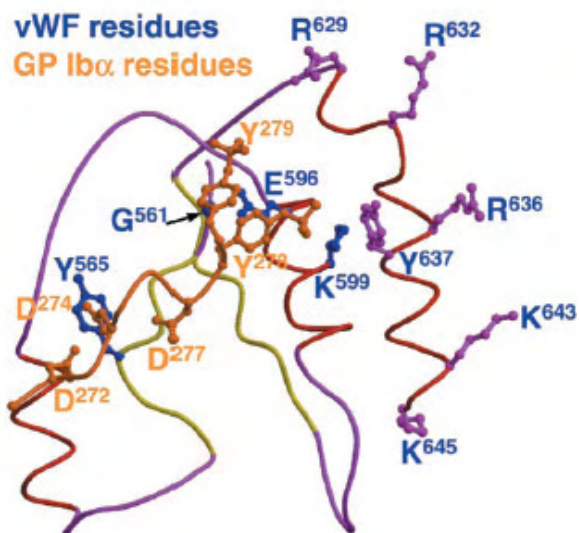


Εικόνα 19: Προσομοίωση της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου Gly²⁷¹-Asp-Asp-Thr-Asp-Lys-Tyr-Asp-Tyr-Tyr²⁷⁹ του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και της επικράτειας A1 του vWF. Διακρίνονται τα κατάλοιπα της αλληλουχίας του υποδοχέα GPIIb (πορτοκαλί), οι έλικες α3 (μπλε) και α4 (κόκκινο), οι υπόλοιπες α έλικες (μωβ), το β3 έλασμα (μπλε) και τα υπόλοιπα β ελάσματα (πράσινο) της επικράτειας A1 (Vasudevan et al. 2000).

Η μελέτη των αποστάσεων των καταλοίπων της διεπιφάνειας του συμπλόκου επέτρεψε να προσδιοριστεί η φύση των δεσμών που αναπτύσσονται (**Πίνακας 1**). Τα κατάλοιπα Asp⁵⁶⁰, His⁵⁶³, Tyr⁵⁶⁵, Arg⁶²⁹ και ιδιαίτερα τα Glu⁵⁹⁶ και Lys⁵⁹⁹ της επικράτειας A1 και τα κατάλοιπα Gly²⁷¹, Asp²⁷², Asp²⁷⁴, Asp²⁷⁷, Tyr²⁷⁸, Tyr²⁷⁹ και η θεϊκή ομάδα του καταλοίπου Tyr²⁷⁹ του υποδοχέα GPIIb παρατηρείται ότι είναι τα σημαντικότερα για τη σταθερότητα του συμπλόκου (**Εικόνα 20**) (Vasudevan et al. 2000).

Πίνακας 1: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξικών καταλοίπων της επικράτειας A1 του vWF και του πεπτιδίου του υποδοχέα GPIba των αιμοπεταλίων μετά από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Διακρίνονται οι αλληλεπιδράσεις van der Waals (VDW) και οι δεσμοί υδρογόνου (H) (Vasudevan et al. 2000).

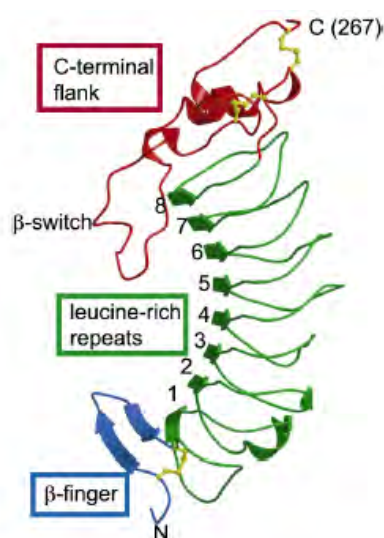
A1 domain	GP Iba	Type of interaction
Asp ⁵⁶⁰	Tyr(SO ₄) ²⁷⁹	VDW
Gly ⁵⁶¹	Tyr ²⁷⁸	VDW
Ser ⁵⁶²	Tyr ²⁷⁸	H bond
Ser ⁵⁶²	Asp ²⁷⁷	H bond
Ser ⁵⁶²	Tyr ²⁷⁸	VDW
His ⁵⁶³	Asp ²⁷⁷	VDW
Ala ⁵⁶⁴	Asp ²⁷⁷	VDW
Ala ⁵⁶⁴	Asp ²⁷⁷	H bond
Ala ⁵⁶⁴	Asp ²⁷⁴	H bond
Tyr ⁵⁶⁵	Asp ²⁷²	H bond
Tyr ⁵⁶⁵	Asp ²⁷⁴	VDW
Lys ⁵⁷²	Gly ²⁷¹	H bond
Ileu ⁵⁸⁰	Asp ²⁷²	VDW
Glu ⁵⁹⁶	Tyr(SO ₄) ²⁷⁸	H bond
Glu ⁵⁹⁶	Tyr ²⁷⁸	VDW
Glu ⁵⁹⁶	Tyr(SO ₄) ²⁷⁹	H bond
Lys ⁵⁹⁹	Tyr(SO ₄) ²⁷⁸	H bond
Lys ⁵⁹⁹	Tyr ²⁷⁹	H bond
Lys ⁵⁹⁹	Tyr ²⁷⁸	VDW
Tyr ⁶⁰⁰	Tyr ²⁷⁸	VDW
Tyr ⁶⁰⁰	Tyr ²⁷⁹	VDW
Tyr ⁶⁰⁰	Asp ²⁷⁷	VDW



Εικόνα 20: Τα κατάλοιπα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση της επικράτειας A1 του vWF με τον υποδοχέα GPIba των αιμοπεταλίων. Διακρίνεται η αλληλουχία του υποδοχέα GPIba (πορτοκαλί), η έλικα α4 (μωβ) και οι υπόλοιπες α έλικες (κόκκινο), το β3 έλασμα (μπλε) και τα υπόλοιπα β ελάσματα (πράσινο) και οι βρόχοι (μωβ) (Vasudevan et al. 2000).

8.1.2. Κρυσταλλογραφία ακτίνων X του συμπλόκου της επικράτειας A1 του vWF και του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων

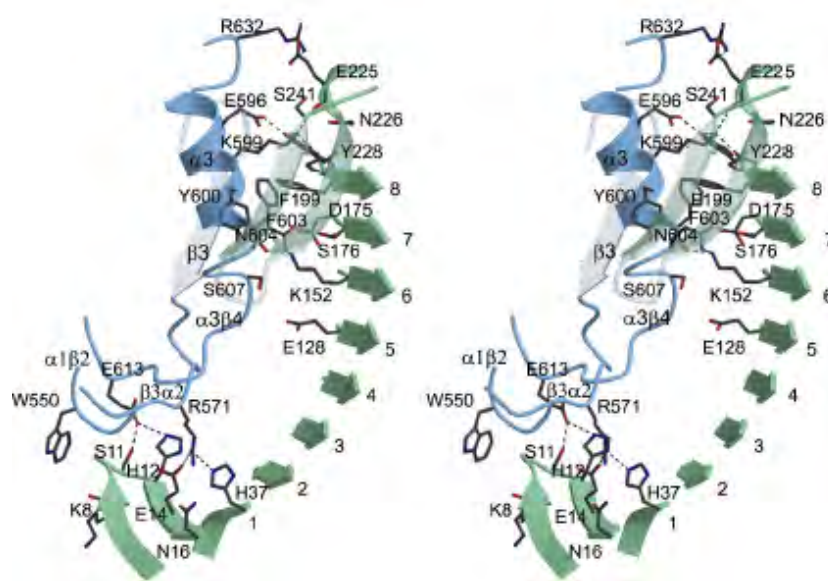
Η περιοχή του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων που αλληλεπιδρά με την επικράτεια A1 του vWF συνίσταται στο μοτίβο των πλούσιων σε λευκίνη επαναλήψεων (LRR), στα κατάλοιπα Cys²⁰⁹-Cys²⁴⁸ και Cys²¹¹-Cys²⁶⁴ (καρβοξυτελικό άκρο) που αναπτύσσουν δισουλφιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας το β διακόπτη (Val²²⁷-Ser²⁴¹) και στα κατάλοιπα Cys⁴-Cys¹⁷ της β φουρκέτας (αμινοτελικό άκρο) (**Εικόνα 21**) (Cauwenberghs et al. 2001, Huizinga et al. 2002, Uff et al. 2002).



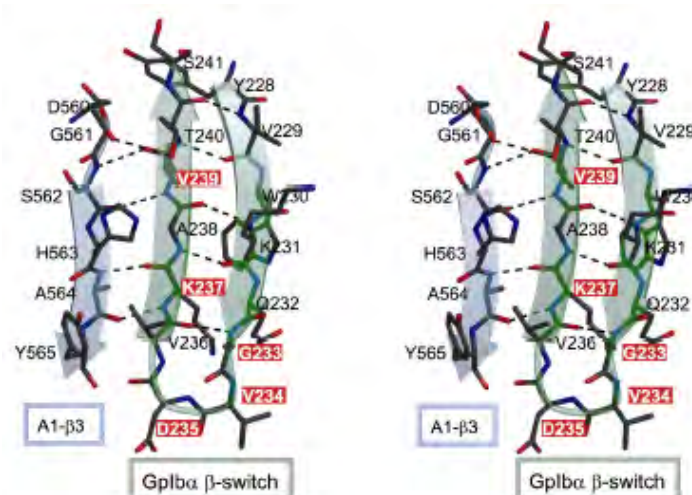
Εικόνα 21: Η δομή της περιοχής του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων που αλληλεπιδρά με την επικράτεια A1. Διακρίνεται η αμινοτελική περιοχή και η β φουρκέτα (μπλε), το μοτίβο των περιοχών πλούσιων σε λευκίνες (πράσινο), η καρβοξυτελική περιοχή και ο β διακόπτης (κόκκινο) και οι δισουλφιδικές γέφυρες (κίτρινο) (Huizinga et al. 2002).

Η δομή του συμπλόκου της επικράτειας A1 και του υποδοχέα GPIIb έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X σε ευκρίνεια 2.6 Å (**Εικόνα 22**) (Dumas et al. 2004). Κατά την αλληλεπίδραση η επικράτεια A1 υφίσταται αλλαγές στη διαμόρφωσή της γύρω από το κατάλοιπο Ser⁵¹⁰ (αμινοτελικό άκρο), γύρω από το Glu⁷⁰⁰ (στο καρβοξυτελικό άκρο) και μεταξύ των Arg⁵⁴³-Arg⁵⁵² (βρόχος α1β2). Ο GPIIb υποδοχέας υφίσταται αλλαγές στη β φουρκέτα, στο β διακόπτη και στα κατάλοιπα Asp²⁶⁴-Tyr²⁷⁹ (καρβοξυτελική περιοχή) (Dumas et al. 2004). Το σημαντικότερο σημείο επαφής εντοπίζεται μεταξύ του μοτίβου που είναι πλούσιο σε λευκίνες (κατάλοιπα 5-8) και του καρβοξυτελικού άκρου του υποδοχέα GPIIb και

της $\alpha 3$ έλικας, του βρόχου $\alpha 3\beta 4$ και του ελάσματος $\beta 3$ της επικράτειας A1. Ένα σημαντικό σημείο επαφής εντοπίζεται μεταξύ της β φουρκέτας και της πρώτης πλούσιας σε λευκίνη επανάληψης του υποδοχέα GPIba και των βρόχων $\alpha 1\beta 2$, $\beta 3\alpha 2$ και $\alpha 3\beta 4$ της επικράτειας A1 (**Εικόνα 22**). Κατά το σχηματισμό του συμπλόκου ο β διακόπτης του GPIba αλληλεπιδρά με το έλασμα $\beta 3$ της επικράτειας A1 (κατάλοιπα 562-566) σχηματίζοντας ένα συνεχές β έλασμα που μοιράζεται μεταξύ των δύο μορίων (**Εικόνα 23**) (Huizinga et al. 2002).



Εικόνα 22: Στερεοδιάγραμμα της δομής του συμπλόκου του υποδοχέα GPIba των αιμοπεταλίων (πράσινο) και της επικράτειας A1 (μπλε) (Huizinga et al. 2002).

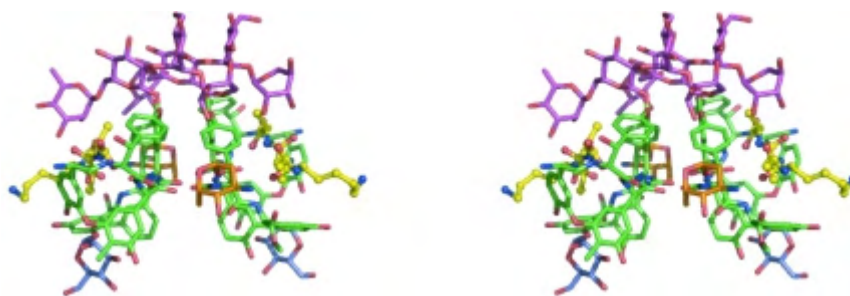


Εικόνα 23: Στερεοδιάγραμμα της αλληλεπίδρασης του β διακόπτη του υποδοχέα GPIba των αιμοπεταλίων με το έλασμα $\beta 3$ της επικράτειας A1. Διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου (διακεκομμένες γραμμές) (Huizinga et al. 2002).

8.2. Περιοχές της επικράτειας A1 του vWF με ιδιότητες δέσμησης προσδετών

Μετά από μελέτες μεταλλαξιγένεσης επιβεβαιώθηκε ότι τα κατάλοιπα Tyr⁵⁶⁵-Ala⁵⁸⁷ που εντοπίζονται στις έλικες $\alpha 2$ και $\alpha 3$ της επικράτειας A1 αποτελούν τη θέση πρόσδεσης της ηπαρίνης (Adachi et al. 2006). Τα κατάλοιπα Glu⁶²⁶-Val⁶⁴⁶ της επικράτειας A1 στην περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα GPIba σχετίζονται με την πρόσδεση εξωγενών σουλφατιδίων (Borthakur et al. 2003). Η θέση πρόσδεσης του κολλαγόνου εντοπίζεται μεταξύ των καταλοίπων Arg⁵⁴²-Met⁶²² της επικράτειας A1 (Romijn et al. 2003). Η πρόσδεση του κολλαγόνου επάγει την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα των αιμοπεταλίων (GPIba), ενώ η πρόσδεση της ηπαρίνης και των σουλφατιδίων την αναστέλλουν (Morales et al. 2006).

Ο μηχανισμός πρόσδεσης της ριστοσετίνης (ristocetin) παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (Read et al. 1989, Vicente et al. 1990). Πρόκειται για ένα αντιβιοτικό που συντίθεται από τον ακτινομύκητα *Nocardia lurida* και η δομή του έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X σε ευκρίνεια 1.0 Å σε σύμπλοκο με ένα πεπτίδιο (N-acetyl-Lys-d-Ala-d-Ala) (Εικόνα 24) (Nahoum et al. 2009). Η ριστοσετίνη (ristocetin) είναι ένα θετικά φορτισμένο γλυκοπεπτίδιο με τη μορφή ασύμμετρου διμερούς που αποτελείται από ένα διπεπτίδιο, όπου ενώνονται σάκχαρα (Alison et al. 1996).



Εικόνα 24: Στερεοδιάγραμμα της δομής του διμερούς της ριστοσετίνης (ristocetin) σε σύμπλοκο με ένα πεπτίδιο (N-acetyl-Lys-d-Ala-d-Ala) (κίτρινο). Διακρίνεται το διπεπτίδιο (πράσινο), τα σάκχαρα (πορτοκαλί) και η μαννόζη (μπλε) (Nahoum et al. 2009).

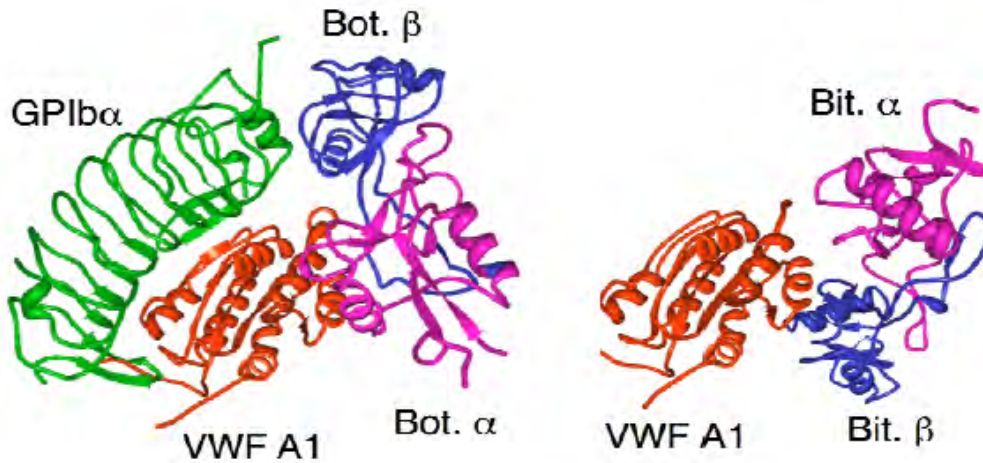
Διαθέτει δύο περιοχές πρόσδεσης που παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια για προσδέματα, επιτρέποντας την αλληλεπίδρασή τόσο με τον vWF όσο και με τα αιμοπετάλια μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ελεύθερων καρβοξυλομάδων τους

με τις φαινολικές της ομάδες (Scott *et al.* 1991). Προσδέεται στο πλούσιο σε προλίνες καρβοξυτελικό άκρο της επικράτειας A1 μεταξύ των καταλοίπων Glu⁷⁰⁰-Asp⁷⁰⁹ και στον υποδοχέα GPIIbα μεταξύ των καταλοίπων Tyr²⁵⁹-Lys²⁶² (Sugimoto *et al.* 1991, De Luca *et al.* 2000). Η πρόσδεσή της μειώνει το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας των αιμοπεταλίων και της περιοχής κοντά στον υποδοχέα GPIIbα επιτρέποντας την επαφή τους και βοηθά τον vWF να δημιουργεί γέφυρες μεταξύ των αιμοπεταλίων διευκολύνοντας τη συσσώρευσή τους (Scott *et al.* 1990).

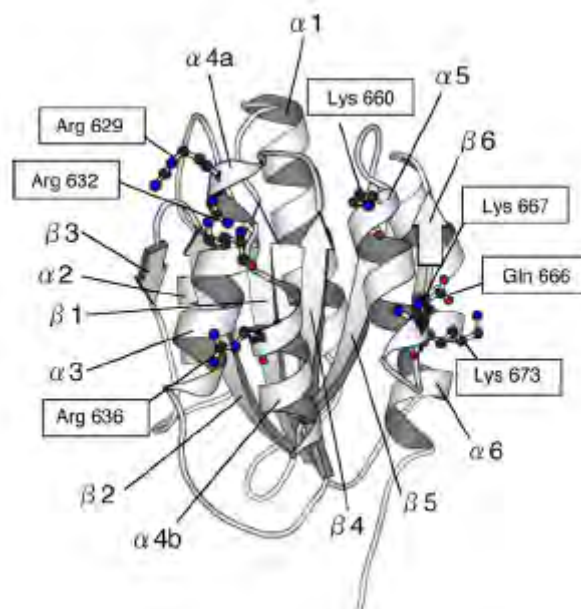
Οι πρωτεΐνες βοτροσετίνη (botrocetin) και βιτισετίνη (bitiscetin) περιέχονται στο δηλητήριο των όφεων *Bothrops jararaea* και *Viperidae B. arietans* αντίστοιχα και προσδέονται στην επικράτεια A1 του vWF (Nakayama *et al.* 2002). Η βοτροσετίνη (botrocetin) αποτελείται από α και β υπομονάδες 133 και 125 καταλοίπων και η βιτισετίνη (bitiscetin) από α και β υπομονάδες, 134 και 125 καταλοίπων (Obert *et al.* 2006). Οι υπομονάδες των πρωτεϊνών αποτελούνται από δύο α έλικες και από πέντε έως οχτώ β ελάσματα που σχηματίζουν μια σφαιρική περιοχή με ένα βρόχο. Ο κάθε βρόχος εκτείνεται και αναπτύσσονται μεταξύ τους υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις παράλληλα με δισουλφιδικούς δεσμούς στο εσωτερικό τους σχηματίζοντας μια αρνητικά φορτισμένη περιοχή (Matsui *et al.* 2005).

Τα σύμπλοκα της επικράτειας A1 με την βοτροσετίνη (botrocetin) και βιτισετίνη (bitiscetin) έχουν προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X σε ευκρίνεια 1.8 και 2.0 Å αντίστοιχα (Εικόνα 25) (Fukuda *et al.* 2002, Maita *et al.* 2003). Κατά τον πιο πιθανό μηχανισμό προσδέονται οι πρωτεΐνες στον vWF με την αρνητικά φορτισμένη περιοχή, χωρίς να προκαλούνται αλλαγές στη διαμόρφωση της θέσης πρόσδεσης της επικράτειας A1 στον υποδοχέα GPIIbα. Οι θετικά φορτισμένες περιοχές παρακείμενα των αρνητικών τοποθετούνται κοντά στην ανιοντική περιοχή του υποδοχέα, χωρίς να αλληλεπιδρούν με αυτόν, διευκολύνοντας την πρόσδεση του vWF (Εικόνα 25) (Pinto *et al.* 2006). Συγκεκριμένα τα κατάλοιπα Arg⁶³², Arg⁶³⁶, Gln⁶³⁹, Arg⁶⁶³, Lys⁶⁶⁷ Gln⁶⁶⁸ και Gln⁶⁶¹ της επικράτειας A1 αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα κατάλοιπα Glu⁹⁵(β), Glu¹⁰⁷(α), Lys⁴⁹(α), Asp⁸⁶(β), Asp⁸⁹(β), Tyr⁴⁵(α) και Tyr⁹¹(β) της βοτροσετίνης (botrocetin) και ένας αριθμός καταλοίπων Leu δημιουργεί υδρόφοβους δεσμούς (Matsushita *et al.* 2000, Furkuda *et al.* 2002). Τα κατάλοιπα Arg⁶³², Lys⁶⁶⁰, Glu⁶⁶⁶, Lys⁶⁷³, Gln⁶³⁹, Arg⁶⁶³, Gln⁶⁸⁶/Gln⁶⁸⁹, Glu⁶⁶⁶ και Lys⁶⁶⁷/Ala⁶⁶⁹ της επικράτειας A1 αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου με τα αντίστοιχα κατάλοιπα Tyr⁶⁴(α), Glu⁹⁶(α), Trp¹¹¹(β), Lys¹¹⁷(β)/Glu²²(β), His¹⁰⁶(α), Gln¹¹⁰(β), Lys²⁰(β) και Arg¹¹⁵(β) της βιτισετίνης (bitiscetin) (Matsui *et al.* 2002). Παράλληλα παρατηρούνται υδρόφοβες

αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλοίπων Pro⁶⁵⁵, Leu⁶⁵⁹, Ile⁶⁶², Val⁶⁷⁶ της επικράτειας A1 και Leu⁵⁸, Val⁶⁴, Leu⁶⁵, Phe¹⁰⁴, Ile¹⁰⁹ της βιτισετίνης (*bitiscetin*) (*Εικόνα 26*) (*Maita et al. 2003*).



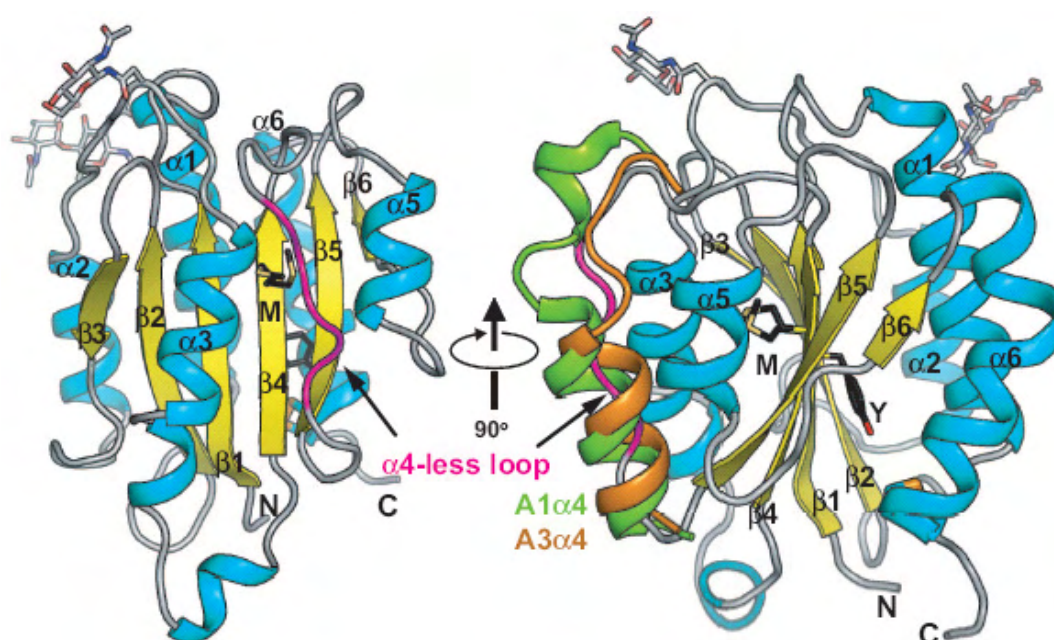
Εικόνα 25: Οι δομές των συμπλόκων της επικράτειας A1 με τον υποδοχέα GPIIbα και τη βοτροσετίνη (*botrosetin*) και της επικράτειας A1 με τη βιτισετίνη (*bitiscetin*). Διακρίνεται ο υποδοχέας GPIIbα (πράσινο), η επικράτεια A1 (κόκκινο), οι α (ροζ) και οι β (μπλε) υπομονάδες των πρωτεϊνών (*Matsui et al. 2009*).



Εικόνα 26: Η δομή της επικράτειας A1 του vWF και σημαντικά αμινοξέα για την πρόσδεση της βοτροσετίνης (*botrosetin*) (Arg⁶²⁹, Arg⁶³², Arg⁶³⁶ και Lys⁶⁶⁷) και της βιτισετίνης (*bitiscetin*) (Arg⁶³², Lys⁶⁶⁰, Gln⁶⁶⁶ και Lys⁶⁷³) (*Esnouf et al. 1999*).

9. Η δομή της επικράτειας A2 του vWF

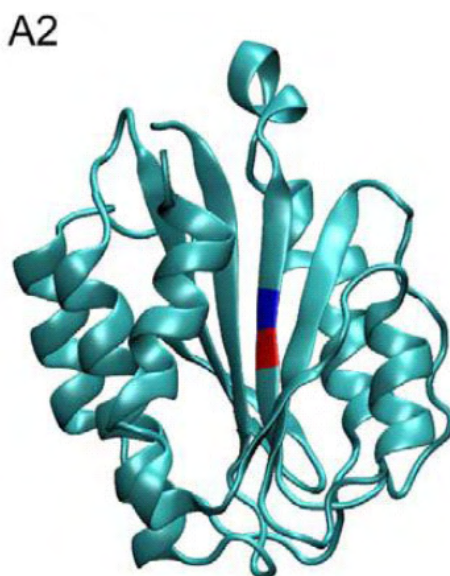
Η δομή της επικράτειας A2 του vWF έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X σε ευκρίνεια 1.9 Å (*Εικόνα 27*). Αποτελείται από έναν υδρόφοβο πυρήνα β πτυχωτού φύλλου με έξι β ελάσματα ($\beta 3, \beta 2, \beta 1, \beta 4, \beta 5, \beta 6$ με το $\beta 3$ αντιπαράλληλο) και έξι α έλικες. Η επικράτεια A2 ξεχωρίζει από τις άλλες επικράτειες A του vWF, καθώς δε διαθέτει την έλικα $\alpha 4$. Στη θέση της υπάρχει ένας μακρύς βρόχος που εκτείνεται από το καρβοξυτελικό άκρο του ελάσματος $\beta 4$ μέχρι το αμινοτελικό άκρο του ελάσματος $\beta 5$ και καλείται βρόχος $\alpha 4$. Οι α έλικες της επικράτειας A2, εκτός από το βρόχο $\alpha 4$, διαθέτουν ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιεί τη δομή της (*Zhang et al. 2009*).



Εικόνα 27: Η τριτοταγής δομή της επικράτειας A2 του vWF, όπου διακρίνεται ο βρόχος $\alpha 4$ (ροζ) και η θέση πρωτεόλυσης της ADAMTS13 στο βρόχο $\alpha 3\beta 4$. Στη δεξιά εικόνα παρουσιάζεται υπέρθεση των επικρατειών A1 και A3 (*Zhang et al. 2009*).

Η περιοχή πέψης της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS13 μεταξύ των καταλοίπων Tyr⁸⁴²-Met⁸⁴³ εντοπίζεται στο κέντρο του β πτυχωτού φύλλου, κοντά στο μέσο του κεντρικού ελάσματος $\beta 4$, στο εσωτερικό της κοιλότητας του βρόχου $\alpha 4$ και στην αντίθετη πλευρά παρατηρούνται δύο θέσεις γλυκοζυλίωσης. Το κατάλοιπο Met⁸⁴³ βρίσκεται ακριβώς κάτω από τον βρόχο $\alpha 4$ (*Εικόνα 28*). Για να αποκαλυφθεί η θέση της πρωτεόλυσης και να επιτραπεί η πρόσβαση της ADAMTS13, θα πρέπει να

αποδιαταχθεί η επικράτεια A2, τουλάχιστον μέχρι το έλασμα $\beta 4$, σε συνθήκες διατμητικής τάσης (Zhang et al. 2009, Baldauf et al. 2009).



Εικόνα 28: Η θέση πρωτεόλυσης της επικράτειας A2 από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13 μεταξύ των αμινοξέων Tyr⁸⁴² (μπλε) και Met⁸⁴³ (κόκκινο) (Zheng et al. 2009).

Η επικράτεια A2 παρουσιάζει δομικά χαρακτηριστικά που απουσιάζουν από τις άλλες επικράτειες A και επιτρέπουν την επιμήκυνσή της σε ένα ορισμένο εύρος τάσεων λειτουργώντας έτσι ως αισθητήρας τάσης. Η δύναμη της επιμήκυνσης των ULvWF σε συνθήκες διατμητικής τάσης μεταδίδεται στην επικράτεια A2 από τις γειτονικές A1 και A3 και η αποδιάταξη πραγματοποιείται από το καρβοξυτελικό άκρο μέχρι τη θηλιά $\alpha 3\beta 4$ μέσω των θέσεων γλυκοζυλίωσης αποκαλύπτοντας την περιοχή πρωτεόλυσης (Zhang et al. 2009). Η απουσία του σταθεροποιητικού δικτύου των δεσμών υδρογόνου από το βρόχο $\alpha 4$ μπορεί να συμβάλει στην ικανότητα του να μειώνει τη δύναμη που απαιτείται για την αποδιάταξή της A2 επικράτειας. Εναλλακτικά ο βρόχος $\alpha 4$ μπορεί να λειτουργεί καθυστερώντας την αναδίπλωση της A2 επικράτειας και παρέχοντας χρόνο για τη δράση της ADAMTS13.

Μια cis-Pro⁸⁸² που σχηματίζει πεπτιδικό δεσμό με τη γειτονική Trp⁸⁸¹ κατέχει ρυθμιστικό ρόλο διευκολύνοντας τη δράση της ADAMTS13 με τον ισομερισμό του δεσμού σε trans καθυστερώντας την αναδίπλωση της A2 επικράτειας (Furlan et al. 1996, Tsai et al. 1996, Tsai et al. 1994). Μεταξύ δύο γειτονικών καταλοίπων κυστεϊνών στις θέσεις Cys⁹⁰⁶ και Cys⁹⁰⁷ στο τέλος της έλικας $\alpha 6$ σχηματίζεται

δισουλφιδικός δεσμός που δρα ως φραγμός της αποδιάταξης της επικράτειας A2 λόγω της δύναμης. Αυτό το εύρημα είναι ασυνήθιστο και αποτελεί σημαντικό στοιχείο του υδρόφοβου χαρακτήρα της επικράτειας A2. Το κατάλοιπο Tyr⁸⁴², όπου δρα η ADAMTS13, αλληλεπιδρά με το δισουλφίδιο και παρέχει ένα άμεσο μονοπάτι μεταξύ του δισουλφιδίου και του β4 ελάσματος επιτρέποντας την αποδιάταξη της επικράτειας A2 και την έκθεση της περιοχής πέψης (Zhang *et al.* 2009).

Ακόμη, στο εσωτερικό της δομής της επικράτειας A2 εντοπίζεται ένας αριθμός μορίων ύδατος με κυριότερα ένα μόριο ύδατος στην πιο υδρόφοβη περιοχή του πυρήνα και τρία μόρια ύδατος στην υδρόφιλη περιοχή κοντά στο έλασμα β4. Το έλασμα β4 είναι τοποθετημένο μη συμπαγώς σε σχέση με τα άλλα ελάσματα και χαρακτηρίζεται από στροφομερή των πλευρικών αλυσιδών. Ακόμη, το έλασμα β4 είναι κατά ένα κατάλοιπο μικρότερο σε σχέση με τις άλλες επικράτειες A, διότι το κατάλοιπο Pro⁸³⁸ σχηματίζει ένα λιγότερο δεσμό υδρογόνου από τα αντίστοιχα κατάλοιπα Ser των περιοχών A1 και A3 (Zhang *et al.* 2009).

10. Η νόσος von Willebrand

Το 1926 ο Erik von Willebrand περιέγραψε πρώτος τα κλινικά και γενετικά χαρακτηριστικά μιας διαταραχής της αιμόστασης σε μια μεγάλη οικογένεια από την Φινλανδία, στα νησιά Aland στον Βοθνιακό κόλπο. Σε αντίθεση με την περίπτωση της αιμοφιλίας, αυτή η κληρονομική δυσλειτουργία παρουσιάζει αυτοσωμικό χαρακτήρα και το κύριο σύμπτωμα της είναι η αιμορραγία των βλενογόνων. Η πιο σημαντική εργαστηριακή ανωμαλία που παρατηρήθηκε ήταν ο παρατεταμένος μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης και χρόνος αιμορραγίας, αλλά ο αριθμός των αιμοπεταλίων και ο χρόνος προθρομβίνης ήταν φυσιολογικοί. Η πιο πιθανή αιτία της ασθένειας θεωρούνταν μια δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων και ο ίδιος χαρακτήρισε αρχικά την ασθένεια ως κληρονομική «ψευδοαιμοφιλία», ενώ κάποιοι συγγραφείς την ονόμασαν στη συνέχεια «αγγειακή αιμοφιλία» (*Sadler et al. 1991*). Στη δεκαετία του 1950 παρατηρήθηκε ότι ο παρατεταμένος χρόνος πήξης αυτών των ασθενών σχετιζόταν με μειωμένο FVIII και στη δεκαετία του 1970 ξεκαθαρίστηκε ότι ουσιαστικά υπεύθυνη ήταν η ανεπάρκεια ενός νέου παράγοντα που ονομάστηκε vWF. Εντυπωσιακά, η μείωση των επιπέδων του vWF προκαλούσε μείωση του FVIII, υποδεικνύοντας τη στενή σχέση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Στη δεκαετία του 1980 η κλωνοποίηση του γονιδίου του vWF έθεσε τις βάσεις για τον προσδιορισμό των μοριακών αιτιών της δυσλειτουργίας (*Giancarlo et al. 2003*).

Στη σημερινή εποχή η νόσος von Willebrand (vWD) αποτελεί την πιο συχνή κληρονομική διαταραχή της αιμόστασης με συχνότητα περίπου 1% παγκοσμίως και οφείλεται σε μεταλλάξεις σε διάφορες περιοχές του vWF. Χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ετερογένεια στην κλινική της έκφραση και στους ασθενείς μπορούν να εκδηλωθούν αιμορραγίες του δέρματος και των βλενογόνων, όπως επαναλαμβανόμενες ρινορραγίες, ουλορραγίες και δημιουργία μωλώπων. Στις γυναίκες το μόνο σύμπτωμα της νόσου ενδέχεται να είναι η μηνορραγία και είναι απαραίτητη η λήψη λεπτομερούς γυναικολογικού ιστορικού (*Williams Hematology*).

Η vWD ταξινομείται σε ποσοτική (τύπος 1 και τύπος 3) και σε ποιοτική ανεπάρκεια (τύπος 2). Η ποσοτική ανεπάρκεια διαχωρίζεται στη μερική (τύπος 1) και στην ολική ανεπάρκεια (τύπος 3). Η νόσος τύπου 1 παρουσιάζει αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονόμησης και αποτελεί την πιο συνηθισμένη (60-80%) και ήπια μορφή. Οι ασθενείς διαθέτουν μειωμένα επίπεδα vWF στο πλάσμα και μπορεί να εκδηλωθούν συμπτώματα της διαταραχής, όπως δυσμηνόρροια στις γυναίκες και

εμφάνιση μωλώπων, που δεν τους εμποδίζουν να ζουν φυσιολογικά. Προβλήματα μπορούν να προκύψουν μόνο σε περιπτώσεις αιμορραγιών σε μετεγχειρητικές καταστάσεις. Η νόσος τύπου 3 είναι η πιο σοβαρή και παρουσιάζει αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης. Οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν σοβαρή αιμορραγία στους βλεννογόνους, μη ανιχνεύσιμο vWF στο πλάσμα και χαμηλή συγκέντρωση FVIII που μπορεί να προκαλέσει περιστασιακές αιμαρθρώσεις, όπως στην περίπτωση της αιμοφιλίας (*Sadler et al. 1994*).

Η vWD λόγω ποιοτικής ανεπάρκειας συναντάται στο 20-30% των περιπτώσεων, των ασθενών, παρουσιάζει αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονόμησης και διαχωρίζεται σε τέσσερις τύπους, τους 2A, 2B, 2M και 2N. Σπάνια μπορεί ο τύπος 2 να παρουσιάσει υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης. Ωστόσο, ο φαινότυπος ποικίλλει στη σοβαρότητα και το είδος των αιμορραγιών στα μέλη τις ίδιας οικογένειας. Τα επίπεδα του vWF είναι φυσιολογικά, αλλά τα ULvWF παρουσιάζουν ανώμαλη δομή ή απουσιάζουν υπομονάδες (*Mayadas et al. 1992*).

Στην περίπτωση του τύπου 2A ο FVIII στο πλάσμα είναι φυσιολογικός, αλλά παρουσιάζεται μια ανωμαλία στη σύνθεση ή την πρωτεόλυση των ULvWF που έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία μόνο μικρών μονάδων πολυμερών στην κυκλοφορία (*Tsai et al. 2003*). Στον τύπο 2B, που έχει αναφερθεί και παραπάνω, παρατηρείται ενίσχυση της λειτουργίας του vWF. Η πρόσδεση του vWF στα αιμοπετάλια είναι αυξημένη και μπορεί να προκληθεί ήπια θρομβοπενία. Τα ULvWF αποικοδομούνται και δε συναντώνται στην κυκλοφορία, ενώ παράλληλα η πρόσδεση του FVIII επιτυγχάνεται φυσιολογικά. Στην περίπτωση του τύπου 2M παρατηρείται ανεπάρκεια του vWF που δεν οφείλεται στην απουσία των ULvWF, αλλά σε μειωμένη λειτουργία. Κάποιες περιπτώσεις της νόσου τύπου 2M μπορεί να καταταχθούν λανθασμένα στην vWD τύπου 1, αν δε μελετηθούν οι μεταλλάξεις. Στον τύπο 2N παρατηρείται μειωμένη συγγένεια του vWF με τον FVIII. Συναντάται μικρή συγκέντρωση του FVIII και για το λόγο αυτό είναι πιθανό οι ασθενείς να διαγνωσθούν λανθασμένα με αιμοφιλία τύπου A, αν δε μελετηθεί ο τύπος κληρονόμησης.

Ακόμη απαντάται και η νόσος του von Willebrand αιμοπεταλιακού τύπου που είναι γνωστή και ως ψευδο-vWD ή αιμοπεταλιακού τύπου ψευδο-vWD. Η διαταραχή κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και οφείλεται σε μεταλλάξεις του υποδοχέα των αιμοπεταλίων GPIba με τον οποίο προσδένεται ο vWF. Οι ασθενείς παρουσιάζουν κλινικές ομοιότητες με αυτούς του τύπου 2B και μπορεί να γίνει

λανθασμένη διάγνωση, αν δεν ερευνηθεί η πιθανότητα μεταλλάξεων στον υποδοχέα των αιμοπεταλίων (*Mazurier et al. 1992*).

Η νόσος του vWD μπορεί να προκληθεί και ως επίκτητη σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Σε αυτήν την περίπτωση η λειτουργία του vWF δεν παρεμποδίζεται, αλλά το σύμπλοκο του με τα αντισώματα απομακρύνεται ραγδαία από την κυκλοφορία. Μια μορφή vWD προκαλείται σε ασθενείς με στένωση αορτικής βαλβίδας που καταλήγει σε γαστρική αιμορραγία (σύνδρομο Heyde). Ακόμη, επίκτητη vWD έχει περιγραφεί στις περιπτώσεις όγκου Wilms, υποθυρεοειδισμού και μεσεγχυματικής δυσπλασίας (*Oxford Handbook of Clinical Haematology*).

11. Σχέσεις των λειτουργιών των επικρατειών A1 και A2 του vWF

Οι επικράτειες του μορίου του vWF παρουσιάζουν διαφορετικές λειτουργίες που μπορούν να ελέγχονται από τις γειτονικές τους περιοχές μέσω αλληλεπιδράσεων. Η πρόσβαση της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS13 στην περιοχή δράσης φαίνεται ότι ρυθμίζεται όχι μόνο από την επικράτεια A2, αλλά και από τη γειτονική A1 μέσω αλλοστερικών τροποποιήσεων (Nishio *et al.* 2004). Με τη χρήση αντισωμάτων αποδείχθηκε ότι η επικράτεια A1 μπορεί να αναστείλει το μηχανισμό πρωτεόλυσης της A2. Η αναστολή αυτή μπορεί να διακοπεί μετά από μεταβολές που υφίσταται η επικράτεια A1 στη διαμόρφωσή της, ώστε να εκτεθεί και να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα GPIIb (Dong *et al.* 2001, Dong *et al.* 2003, Nishio *et al.* 2004). Παρόμοιες ρυθμιστικές λειτουργίες έχουν προταθεί και για την επικράτεια A3 του vWF και τις περιοχές CUB της ADAMTS13 (Dong *et al.* 2003).

Παράλληλα, έρευνες παρουσίασαν εμμέσως τη συμμετοχή της επικράτειας A2 στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης της A1 με τον υποδοχέα GPIIb. Με μελέτες μεταλλαξιγένεσης αποδείχθηκε ότι η αποκοπή της επικράτειας A2 από το μόριο του vWF προάγει ελαφρώς την πρόσδεση της A1 στα αιμοπετάλια παρουσία της ριστοσετίνης (ristocetin) (Lankhof *et al.* 1997). Ενώ λοιπόν η επικράτεια A1 αναστέλλει την πρωτεόλυση της A2 από την ADAMTS13, παράλληλα η επικράτεια A2 εμποδίζει την πρόσδεση της A1 στα αιμοπετάλια και με αυτό τον τρόπο το μόριο του vWF αυτοελέγχει το μηχανισμό της αιμόστασης.

Πρόσφατες μελέτες πρότειναν και παρουσίασαν εμμέσως την αλληλεπίδραση των γειτονικών επικρατειών A1 και A2 σε διάλυμα με τη χρήση αντισωμάτων και απέδειξαν ότι μπορεί να αναστείλει την πρόσδεση στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων δρώντας ως αναστολέας του μηχανισμού της αιμόστασης (Lankhof *et al.* 1997, Martin *et al.* 2007). Κατά την ακινητοποίηση ή τη δράση της ριστοσετίνης (ristocetin), η επικράτεια A1 εκθέτει την περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα GPIIb και τη θέση αλληλεπίδρασης της A2. Θεωρήθηκε μάλιστα πιθανό οι περιοχές αλληλεπίδρασης της A2 επικράτειας και του υποδοχέα GPIIb στην A1 να αλληλεπικαλύπτονται σε κάποιο σημείο (Lenting *et al.* 2007).

Παράλληλα, μια έρευνα παρουσίασε με τη χρήση αντισωμάτων τη μεγαλύτερη συγγένεια της επικράτειας A1 από την A2 για το μόριο του vWF. Η παρατήρηση αποδόθηκε στην παρουσία πιθανής περιοχής αναγνώρισης της επικράτειας A1 στη γειτονική D'D3, της οποίας η δομή δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη με

κρυσταλλογραφία ακτινών X (*Ulrichs et al. 2006*). Μετά την αποκοπή της επικράτειας D'D3 από το μόριο του vWF ευνοήθηκε η αλληλεπίδραση με τα αιμοπετάλια και με τη χρήση αντισωμάτων επιβεβαιώθηκε η συγγένεια των επικρατειών D'D3 και A1 και υποστηρίχθηκε η πιθανή αλληλεπίδρασή τους. Με μελέτες μεταλλαξιγένεσης και με τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την επικράτεια D'D3 υποστηρίχθηκε η συμμετοχή της στην αναστολή πρόσδεσης της A1 στα αιμοπετάλια καλύπτοντας πιθανώς την περιοχή αλληλεπίδρασης με τον GPIIb υποδοχέα (*Ulrichs et al. 2006*).

Μοιάζει λοιπόν η περιοχή πρόσδεσης της επικράτειας A1 στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων να είναι προστατευμένη από το αμινοτελικό άκρο από την D'D3 που την καλύπτει κατά την κυκλοφορία στο πλάσμα σε φυσιολογικές συνθήκες και από το καρβοξυτελικό άκρο από την A2 που αναστέλλει την πρόσδεση στα αιμοπετάλια σε συνθήκες διατημητικής τάσης (*Lenting et al. 2007*).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι γειτονικές επικράτειες A1 και A2 του vWF παρουσιάζουν διαφορετικές λειτουργίες στο μηχανισμό της αιμόστασης, επάγοντας την πρόσδεση στα αιμοπετάλια και την έναρξη της πήξης του αίματος και την πρωτεόλυση του θρόμβου αντίστοιχα. Τελευταίες μελέτες προτείνουν το σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των επικρατειών A1 και A2 που μπορεί να αναστείλει την αλληλεπίδραση με τα αιμοπετάλια και το σχηματισμό θρόμβου. Ο κύριος σκοπός της διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετηθεί ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ των απομονωμένων επικρατειών A1 και A2 και να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά του συμπλόκου τους, χωρίς να συνυπολογίζεται η πιθανή συμμετοχή άλλων περιοχών του μορίου του vWF σε αυτή τη διαδικασία.

Για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των δύο επικρατειών, κλωνοποιήθηκαν τα γονίδια που τις κωδικοποιούν, υπερεκφράστηκαν και απομονώθηκαν οι αντίστοιχες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Οι επικράτειες A1 και A2 *in vivo* υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που είναι σημαντικές και απαραίτητες για τη λειτουργία τους. Ο στόχος της διδακτορικής διατριβής ήταν να χρησιμοποιηθεί βακτηριακό σύστημα, ώστε να μελετηθεί η δυνατότητα αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών απουσία των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Με Φασματοπλωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού αναλύθηκε η δευτεροταγής δομή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και του μίγματός τους και ακολούθησαν μελέτες Elisa, Θερμιδομετρίας Ισόθερμης Τιτλοδότησης και Φασματοσκοπίας Φθορισμού που επιβεβαίωσαν το σχηματισμό συμπλόκου και προσδιόρισαν τα χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης.

Παράλληλα ο στόχος της διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετηθεί η δομή του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2. Με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής προτάθηκαν τα τρία πιο πιθανά μοντέλα αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2, εντοπίστηκαν τα αμινοξέα που συμμετέχουν στη διεπιφάνειά τους και οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ τους και σχεδιάστηκαν μεταλλάξεις στα κατάλοιπα που είναι πιθανό να τα αποσταθεροποιούν.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Αντιδραστήρια

Acetic Acid (*Merck*, Germany)
Acrylamide (*Applichem*, Germany)
Agar (*Sigma-Aldrich*, Germany)
Agarose 4B (*Macherey-Nagel*, France)
AgNO₃ (*Fluka*, Germany)
Ampicillin (*Sigma-Aldrich*, Germany)
APS (*Sigma-Aldrich*, Germany)
ATP (*Fluka*, Germany)
BamHI (20,000 U/ml) (*New England Biolabs*, UK)
Bromophenol Blue (*Fluka*, Germany)
BSA (*New England Biolabs*, UK)
Calcium Chloride (*Merck*, Germany)
Chloramphenicol (*Sigma-Aldrich*, Germany)
4-Chloro-1-naphthol (*Sigma-Aldrich*, Germany)
Coomassie Brilliant Blue (*Fluka*, Germany)
DEPC (*Sigma-Aldrich*, Germany)
Dialysis Tubes (*Sigma-Aldrich*, Germany)
DMSO (*Sigma-Aldrich*, Germany)
DNA Ladder (*New England Biolabs*, UK)
dNTPs (*Stratagene*, Austria)
DTT (*Fluka*, UK)
EcoRI-HF (20,000 U/ml) (*New England Biolabs*, UK)
EDTA (*Panreac*, Spain)
EDTA Free Tablets (*Roche*, UK)
Ethidium Bromide (*Merck*, Germany)
Ethanol (*Merck*, Germany)
Extract II (*Macherey-Nagel*, France)
Formaldehyde (*Applichem*, Germany)
Glucose (*Sigma-Aldrich*, Germany)
Glutathione Beads (*GE Healthcare*, UK)
Glutathione Reduced (*Sigma-Aldrich*, Germany)
Glycerol (*Merck*, Germany)

Glycine (*Sigma-Aldrich*, Germany)
Goat Antimouse HRP (*Millipore*, UK)
Goat Antirabbit HRP (*Millipore*, UK)
HindIII (20,000 U/ml) (*New England Biolabs*, UK)
His–rabbit Polyclonal AntiPohistidine (*Novus Biologicals*, US)
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)
Magnesium Sulfates (*Panreac*, Spain)
Mouse Monoclonal Antihuman vWF A2 Antibody (*R&D Systems*, US)
NdeI (20,000 U/ml) (*New England Biolabs*, UK)
Ni-NTA beads (*Qiagen*, The Netherlands)
Ni Superflow beads (*GE Healthcare*, UK)
Nucleospin Plasmid (*Macherey-Nagel*, France)
Peg 20000 (*Sigma-Aldrich*, Germany)
Peg 40000 (*Sigma Aldrich*, Germany)
Phusion High Fidelity Polymerase (*Finnzymes*, Finland)
PMSF (*Merck*, Germany)
Potassium Chloride (*Merck*, Germany)
Primers (*VBC-Genomics*, Austria)
2-Propanol (*Merck*, Germany)
Protein Ladder (*New England Biolabs*, UK- *Invitrogen*-UK)
PVDF (*Biorad*, UK)
Sall-HF (20,000 U/ml) (*New England Biolabs*, UK)
SDS (*Sigma Aldrich*, Germany)
Sephadex G-50 (*GE Healthcare*, UK)
Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*, Austria)

Sodium Bicarbonate (*Merck, Germany*)
Sodium Chloride (*Merck, Germany*)
Sodium Hydrogen Phosphate (*Merck, Germany*)
Sodium Hydroxide (*Merck, Germany*)
Sodium Phosphate (*Merck, Germany*)
Sodium Thiosulfate (*Applichem, Germany*)
Strataclone (*Stratagene, Austria*)
Sulfuric acid (*Merck, Germany*)
Superscript Reverse Transcriptase (*Invitrogen, UK*)
T4 DNA Ligase (20,000 U) (*New England Biolabs, UK*)
Taq DNA Polymerase (*New England Biolabs, UK*)
TEMED (*Sigma Aldrich, Germany*)
Tri Reagent (*Sigma Aldrich, Germany*)
Tris Base (*Merck, Germany*)
Tween (*Merck, Germany*)
Tryptone (*Merck, Germany*)
Vivaspin 15 (*Santorius Stedim Biotech, Germany*)
X-gal (*Sigma Aldrich, Germany*)
XhoI (20,000 U/ml) (*New England Biolabs, UK*)
Xylene Cyanol (*Merck, Germany*)

2. Βακτηριακά στελέχη

Escherichia coli Solopack: recA1 endA1 gyrA96thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 (Tet^r)] (*Stratagene, Austria*).

Escherichia coli DH5a: F' endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM 15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17 (r_K- m_{K+}), λ- (προσφορά του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταθόπουλου Κωνσταντίνου).

Escherichia coli XL1: recA1 endA1 gyrA96thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 (Tet^r)] (*Stratagene, Austria*).

Escherichia coli BL21 (DE3): F-ompT gal dcm lon hsdS_B (rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) (προσφορά του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταθόπουλου Κωνσταντίνου).

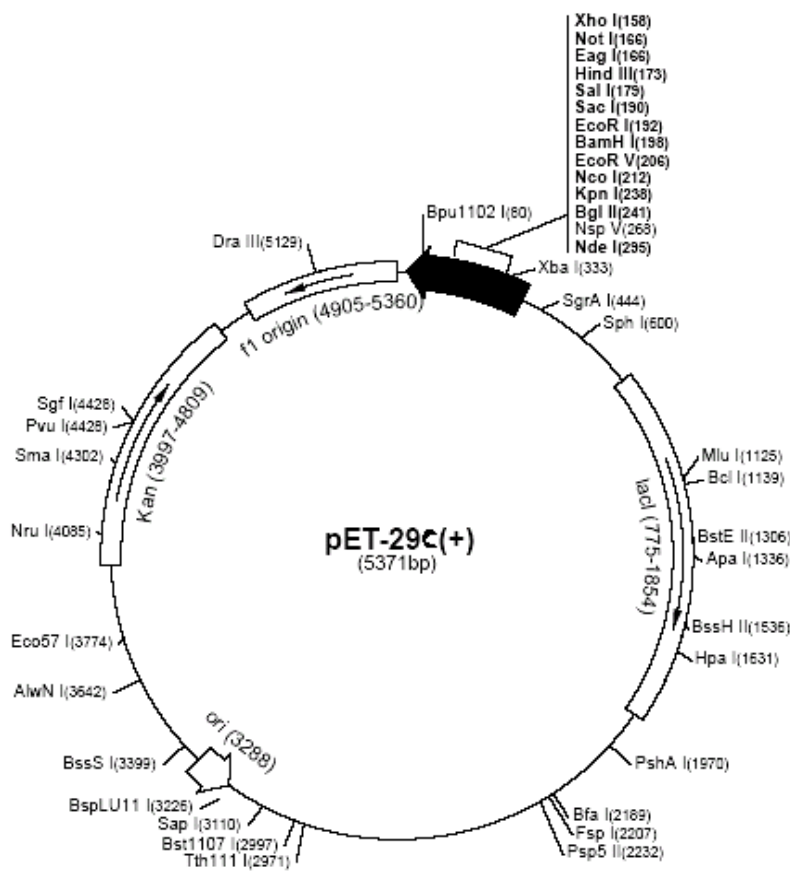
3. Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pET

Τα συστήματα έκφρασης έχουν σχεδιαστεί ώστε να πετυχαίνεται η παραγωγή των πρωτεϊνών σε κύτταρα έκφρασης. Οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pET φέρουν το γονίδιο *lacI* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του καταστολέα lac, τον T7 προαγωγέα που είναι εξειδικευμένος για την T7 πολυμεράση, το χειριστή lac που μπορεί να διακόψει τη διαδικασία της μεταγραφής, την θέση έναρξης f1 της αντιγραφής, τον πολυσυνδέτη όπου κλωνοποιείται το γονίδιο που μελετάται, το γονίδιο για ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό και τη θέση έναρξης της αντιγραφής *ColE1* (Blader *et al.* 1998). Ο προαγωγέας T7 είναι ικός και μεταγράφεται γρήγορα και ασταμάτητα όσο υπάρχει η T7 RNA πολυμεράση (Cambell *et al.* 2003). Το επιθυμητό γονίδιο δεν μπορεί να μεταγραφεί, εάν δεν υπάρχει η T7 πολυμεράση και καθώς τα προκαρυωτικά κύτταρα δεν παράγουν αυτόν τον τύπο RNA, θα πρέπει να προστεθεί (Unger *et al.* 1997). Συνήθως τα κύτταρα ξενιστές είναι βακτήρια που έχουν τροποποιηθεί γενετικά, ώστε να έχουν ενσωματώσει στο γένωμά τους το γονίδιο για την T7 πολυμεράση, τον lac χειριστή και τον lac προαγωγέα.

Όταν στο κύτταρο υπάρχει λακτόζη ή κάποιο ανάλογο της, ενεργοποιείται η μεταγραφή της T7 RNA πολυμεράσης και ελέγχεται μέσω του προαγωγέα και του ρυθμιστή lac. Τα γονίδια lac εκφράζουν ένζυμα που σχετίζονται με την αποικοδόμηση της λακτόζης και επομένως η παρουσία αυτής (ή αναλόγων της) μπορεί να προκαλέσει την έναρξη της μεταγραφής των lac γονιδίων. Το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή διαθέτει συνήθως έναν επαγωγίμο προαγωγέα που ενεργοποιείται από το IPTG (ισοπροπυλ-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη). Το IPTG είναι ένα ανάλογο της λακτόζης που προσδένεται στον lac καταστολέα και αποτρέπει την πρόσδεση του στο χειριστή lac. Όταν το IPTG προστίθεται στο κύτταρο, εκφράζεται η T7 πολυμεράση και αρχίζει να μεταγράφει γρήγορα το γονίδιο που μεταφράζεται στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

Ο φορέας έκφρασης pET-29c(+) (προσφορά της Καθηγήτριας κ. Χολή-Παπαδοπούλου Θεοδώρας) έχει μέγεθος 5371 bp, διαθέτει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και φέρει στο C-τελικό του άκρο τον επίτοπο εξαϊστιδίνης (His·Tag) που εξυπηρετεί την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου (Εικόνα 29). Ο φορέας έκφρασης pET-49b(+) (προσφορά του Ερευνητή Δρ. Νομικού Μιχαήλ) έχει μέγεθος 5926 bp, διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο

αντιβιοτικό καναμυκίνη και φέρει στο N-τελικό άκρο επίτοπο της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST·Tag) και επίτοπο εξαϊστιδίνης (His·Tag) καθώς και περιοχή πρωτεολυτικού κέντρου που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση 3C του ανθρώπινου ρινοϊού (HRV) (**Εικόνα 30**). Η παρουσία του επιτόπου GST (GST·Tag) προσφέρει τη δυνατότητα επιπλέον απομόνωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας αγχιστείας με γλουταθειόνη. Ο φορέας pET-M60 (*προσφορά του Ερευνητή Δρ. Νομικού Μιχαήλ*) έχει μέγεθος 7634 bp, διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και φέρει στο N-τελικό του άκρο επίτοπο NusA (NusA·Tag) και εξαϊστιδίνης (His·Tag) καθώς και περιοχή πρωτεολυτικού κέντρου που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση TEV (**Εικόνα 31**). Η παρουσία του επιτόπου της εξαϊστιδίνης εξυπηρετεί την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου. Η πρωτεΐνη NusA είναι συνοδός (chaperone) και συμβάλει στη σωστή αναδίπλωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών αποτρέποντας τη σύνθεση μη λειτουργικών δομών.



Εικόνα 29: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pET-29c(+).

4. Πρωτεάσες

Η ανασυνδυασμένη κυστεϊνική πρωτεάση 3C (HRV 3C) (προσφορά του *Ερευνητή Δρ. Νομικού Μιχαήλ*) κωδικοποιείται από τον ανθρώπινο ρινοϊό 14, έχει μοριακό βάρος 45 kDa και είναι εξειδικευμένη για την πρωτεόλυση της αλληλουχίας Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro. Παρουσιάζει δραστηριότητα σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών και η μέγιστη παρατηρείται σε ουδέτερο pH και σε θερμοκρασία 22 έως 37° C. Χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και της εξαϊστιδίνης από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που εκφράστηκαν στο φορέα pET-49b(+).

Η κυστεϊνική πρωτεάση TEV (Tobacco Etch Virus) (προσφορά του *Ερευνητή Δρ. Νομικού Μιχαήλ*) κωδικοποιείται από τον ιό που μολύνει τον καπνό, έχει μοριακό βάρος 25 kDa και πρωτεολύει την αλληλουχία Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓(Gly/Ser). Η μέγιστη δραστηριότητά της παρατηρείται στους 34° C και είναι ενεργή σε μεγάλο εύρος pH (4.0-9.0) και θερμοκρασιών. Χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση της πρωτεΐνης συνοδού και της εξαϊστιδίνης από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που εκφράστηκαν στο φορέα pET-M60.

5. Κατασκευή cDNA αλυσίδας από ενδοθηλιακά κύτταρα

Καθώς ο vWF παρουσιάζει υψηλό βαθμό έκφρασης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά HUVEC (προσφορά του *Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μόσιαλου Γεωργίου*) για την κατασκευή cDNA αλυσίδας, ώστε να ενισχυθούν τα γονίδια των επικρατειών A1 και A2 του vWF. Ακολούθησαν τα παρακάτω βήματα:

- Ανάπτυξη των κυττάρων.
- Απομόνωση RNA:
 1. Προσθήκη Tri Reagent (2 X ml του αριθμού των κυττάρων).
 2. Φυγοκέντρηση για 10 min στους 4° C στις 13,000 rpm και επιλογή υπερκείμενης στοιβάδας.
 3. Προσθήκη Chloroform (0.2 X διαλύματος λύσης) έντονη ανάδευση και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 4. Φυγοκέντρηση για 15 min στους 4° C στις 15,000 rpm και επιλογή της υδατικής φάσης (υπερκείμενη στοιβάδα).
- Κατακρήμνιση RNA:

1. Προσθήκη 2-Propanol (0.5 X διαλύματος λύσης) και έντονη ανάδευση.
2. Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 8 min στους 4° C στις 13,000 rpm.
3. Πλύση του ιζήματος με 75% Ethanol (1 X διαλύματος λύσης) και φυγοκέντρηση για 5 min στους 4° C στις 13,000 rpm.
4. Αναδιάλυση του ιζήματος με DEPC (0.2x διαλύματος λύσης).

Η σύνθεση της αλυσίδας cDNA πραγματοποιήθηκε όπως προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία (*Invitrogen*, UK) (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 2: Αντίδραση σύνθεσης cDNA αλυσίδας με τη μέθοδο PCR της αντίστροφης μεταγραφάσης.

mRNA	200 ng
Oligo dTs	0.5 µg
DNTPs	10 mM
RNase inhibitor	40 U
Διάλυμα σύνθεσης cDNA	5 X
DEPC	Εώς 10 µl. Επώαση για 5 min στους 37° C
Αντίστροφη μεταγραφάση	200 U. Επώαση για 1 h στους 42°. Απενεργοποίηση με επώαση για 10 min στους 70° C.

6. Κλωνοποίηση των γονιδίων που αντιστοιχούν στις επικράτειες A1 και A2 του vWF

6.1. Σχεδιασμός των εκκινήτων και ενίσχυση των γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στο δίκτυο ExPasy (*Expert Protein Analysis System*) <http://au.expasy.org/> και συγκεκριμένα στη διεύθυνση <http://www.uniprot.org/uniprot/P04275.html> εντοπίστηκαν καταχωρημένες οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων των επικρατειών A1 (531 bp) και A2 (543 bp) του vWF και σχεδιάστηκαν εκκινήτες για την κλωνοποίησή τους στους φορείς έκφρασης (**Πίνακας 3**). Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η cDNA αλυσίδα που κατασκευάστηκε από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Πίνακας 3: Εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2 του vWF στους φορείς έκφρασης.

Φορέας έκφρασης	Γονίδιο	Περιοριστικές Ενδονουκλεάσεις	Εκκινητές (5'-3')
pET-29c(+)	A1	<i>NdeI, XhoI</i>	GCGCATATGGACCTGGTCTTCCTGCTGGATG CGCCTCGAGGATCTCGTCCCTTTGCTGCTCC
pET-29c(+)	A2	<i>NdeI, XhoI</i>	GCGCATATGACCCTGGGGCCCAAGAGGAA CGCCTCGAGCTACAGCACCAGGTCAGGAGC
pET-49b(+)	A1	<i>BamHI, HindIII</i>	CTAGGATCCGGACCTGGTCTTCCTGCTGGAT ACAAAGCTTTCAGATCTCGTCCCTTTGCTGCTCC
pET-49b(+)	A2	<i>BamHI, HindIII</i>	CCAGGATCCCACCCTGGGGCCCAAGAGGAA CGCAAGCTTCTACTGCAGCACCAGGTCAGG
pET-M60	A1	<i>EcoRI, Sall</i>	ATGTGAATTCGGACCTGGTCTTCCTGCTGGAT GTAGGTCGACTCAGATCTCGTCCCTTTGCTGCTCC
pET-M60	A2	<i>EcoRI, Sall</i>	ATGTGAATTCGACCCTGGGGCCCAAGAGGAAC GTAGGTCGACTCACTGCAGCACCAGGTCAGGAGC

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση DNA πολυμεράσης υψηλής πιστότητας (*Phusion High-Fidelity*) σε συνθήκες που προτείνονται από την κατασκευάστρια εταιρεία (*Finnzymes*, Finland) (**Πίνακες 4, 5, 6 και 7**). Στο στάδιο της τελικής επιμήκυνσης έγινε προσθήκη Taq DNA πολυμεράσης (*New England Biolabs*, UK), ώστε να εισαχθούν προεξέχουσες αδερίνες στο 3' άκρο των προϊόντων. Μετά την αντίδραση ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5% και τα μόρια DNA ανακτήθηκαν με εκτομή (*Macherey-Nagel*, France).

Πίνακας 4: Αντίδραση PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF.

Εκμαγείο	50 ng
Phusion Buffer	5 X
DNTPs	10 μM
Νοηματικός εκκινητής γονιδίου A1 ή A2	0.5 μM
Αντινοηματικός εκκινητής γονιδίου A1 ή A2	0.5 μM
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0.02 U
Τελικός όγκος	20 μl

Πίνακας 5: Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF για την κλωνοποίηση στους φορείς έκφρασης pET-29c(+).

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχική αποδιάταξη	98 °C	30 sec	1
Αποδιάταξη	98 °C	5 sec	35
Υβριδοποίηση	58 °C	30 sec	35
Εκκινητών			
Επιμήκυνση	72 °C	15 sec	35
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	1

Πίνακας 6: Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-49b(+).

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχική αποδιάταξη	98°C	30 sec	1
Αποδιάταξη	98°C	5 sec	35
Υβριδοποίηση	65 °C	30 sec	35
Εκκινητών			
Επιμήκυνση	72 °C	15 sec	35
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	1

Πίνακας 7: Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF και την κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχική αποδιάταξη	98°C	30 sec	1
Αποδιάταξη	98°C	5 sec	35
Υβριδοποίηση	68 °C	30 sec	35
Εκκινητών			
Επιμήκυνση	72 °C	15 sec	35

TAE 50 X: 24.2% w/v Tris, 5.71% Glacial acetic acid, 1.86% w/v EDTA.

TBE 10 X: 10.8% Tris-Base, 5.5% w/v Boric acid, 0.02 M EDTA (pH 8.0).

Loading buffer 6 X (DNA): 0.09% Bromophenol Blue, 0.09% Xylene Cyanol, 60% Glycerol, 60 mM EDTA.

6.2. Κλωνοποίηση των γονιδίων σε πλασμιδιακούς φορείς

6.2.1. Κλωνοποίηση των γονιδίων στο φορέα pSC-A (TOPO-TA cloning)

Η κλωνοποίηση κάθε γονιδίου στο γραμμοποιημένο φορέα pSC-A που φέρει στα 3' άκρα δύο προεξέχουσες θυμίνες πραγματοποιήθηκε με τη δράση της DNA τοποϊσομεράσης που διασπά το φωσφοδιεστερικό σκελετό μιας έλικας DNA μετά την αλληλουχία 5'-CCCTT και σχηματίζει ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο DNA-ενζύμου που χρησιμοποιείται στην επανασύνδεση του DNA. Η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί και στο ετερόλογο τμήμα DNA και το ένζυμο ρεκομπινάση Cre καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ δύο αλληλουχιών αναγνώρισης *loxP*. Το μίγμα πλασμιδίων pSC-A περιέχει δύο άκρα DNA. Ένα άκρο διαθέτει τοποϊσομεράση I με τροποποιημένες επεκτάσεις θυμίνης και το άλλο αλληλουχία αναγνώρισης *loxP*. Οι επεκτάσεις 3'-αδενοσίνης των προϊόντων PCR υβριδίζονται με τις θυμίνες του φορέα.

Είναι μια ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική για την κλωνοποίηση γονιδίου από ένα φορέα σε κάποιον άλλο, όταν δεν είναι διαθέσιμες συμβατές περιοχές δράσης ενζύμων περιορισμού. Το ένθεμα ενσωματώνεται στο φορέα pSC-A με οποιαδήποτε κατεύθυνση και μπορεί να αποκοπεί με τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI*. Η κλωνοποίηση του προϊόντος PCR μπορεί να επιτευχθεί σε 5 min, όπως προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία (*Stratagene, Austria*) (**Πίνακας 8**). Στη συνέχεια μπορεί να επιβεβαιωθεί η επιθυμητή νουκλεοτιδική ακολουθία του ενθέματος με αλληλούχηση και να ακολουθήσει η κλωνοποίησή του σε φορέα έκφρασης.

Πίνακας 8: Αντίδραση ενοποίησης του προϊόντος PCR στο φορέα pSC-A.

Cloning Buffer	3 μl
Προϊόν PCR	2 μl
Vector Mix	1 μl
Σύνολο	6 μl

Ο έλεγχος κλωνοποίησης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με διαγνωστικές πέψεις των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (*New England Biolabs, UK*) (**Πίνακες 9, 10 και 11**). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια απομονώθηκαν όπως προτείνει η κατασκευάστρια εταιρεία (*Macherey-Nagel, France*) από μετασηματισμένα επιδεκτικά κύτταρα. Τα προϊόντα των πέψεων

ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5% και τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που έφεραν ενθέματα στα αναμενόμενα μεγέθη αλληλουχήθηκαν και επιβεβαιώθηκαν οι επιθυμητές νουκλεοτιδικές ακολουθίες των γονιδίων.

Πίνακας 9: Αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *XhoI*.

DNA	4 µg
Buffer 4	10 X
<i>NdeI</i>	2 U
<i>XhoI</i>	2 U
BSA	10 X
Τελικός όγκος	20 µl

Πίνακας 10: Αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *HindIII*.

DNA	4 µg
Buffer 2	10 X
<i>BamHI</i>	2 U
<i>HindIII</i>	2 U
BSA	10 X
Τελικός όγκος	20 µl

Πίνακας 11: Αντίδραση πέψης των τμημάτων DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF*.

DNA	4 µg
<i>EcoRI</i> Buffer	10 X
<i>EcoRI-HF</i>	2 U
<i>Sall-HF</i>	2 U
Τελικός όγκος	20 µl

Η κλωνοποίηση των γονιδίων στο φορέα έκφρασης pET-M60 ακολούθησε χωρίς να πραγματοποιηθεί αρχικά ενσωμάτωση στο φορέα pSC-A. Στα προϊόντα PCR και στο φορέα pET-M60 πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF* (**Πίνακας 11**) και ακολούθησε η αντίδραση ενοποίησης, όπως περιγράφεται παρακάτω (*Παράγραφος 6.2.2*).

6.2.2. Κλωνοποίηση των γονιδίων στους φορείς έκφρασης

Στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pSC-A που επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση ότι διέθεταν ενθέματα των επιθυμητών ακολουθιών των γονιδίων και στους φορείς έκφρασης πραγματοποιήθηκαν πέψεις με αντίστοιχες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων σε πηκτή αγαρόζης 1.5%, τα ενθέματα και οι φορείς ανακτήθηκαν με εκτομή και ακολούθησε η αντίδραση ενοποίησης T4 DNA λιγάσης (*New England Biolabs, UK*) (**Πίνακας 12**).

Πίνακας 12: Αντίδραση ενοποίησης ενθέματος στο φορέα έκφρασης.

Ένθεμα	600 ng
Φορέας έκφρασης	200 ng
Διάλυμα T4 DNA λιγάσης	10 X
T4 DNA λιγάση	20 U
ATP	1 mM
Τελικός όγκος	20 μl

Ο έλεγχος της κλωνοποίησης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε όπως παραπάνω (*Παράγραφος 6.2.1*).

6.3. Προετοιμασία και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Τα επιδεκτικά κύτταρα προετοιμάστηκαν με τα παρακάτω βήματα:

- Εμβολιασμός 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου με κύτταρα του επιθυμητού στελέχους, απουσία αντιβιοτικού. Ανάπτυξη στους 37° C για 12-16 h υπό ανάδευση στις 210 rpm.
- Εμβολιασμός 100 ml υγρού θρεπτικού μέσου (απουσία αντιβιοτικού) με 1 ml της καλλιέργειας. Ανάπτυξη στους 37° C υπό ανάδευση στις 210 rpm ($OD_{600\text{ nm}} 0.4$).
- Επώαση στον πάγο για 10 min και φυγοκέντρωση 10 min στους 4° C στις 4,000 rpm.
- Αναδιάλυση του ιζήματος με 60 ml διαλύματος $MgCl_2$ - $CaCl_2$ (80 mM $MgCl_2$ -20 mM $CaCl_2$). Φυγοκέντρωση για 10 min στους 4° C στις 4,000 rpm και αναδιάλυση του ιζήματος σε 4 ml $CaCl_2$ 0.1 M.

- Προσθήκη 140 µl DMSO, ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 15 min.
- Προσθήκη 140 µl DMSO, ήπια ανάδευση και φύλαξη (ανά 100 µl) σε -80° C.

Το γραμμοποιημένο τμήμα DNA που προέκυψε από την κλωνοποίηση στο φορέα pSC-A μετασχημάτισε επιλεκτικά κύτταρα *E.coli* Solopack που εκφράζουν τη ρεκομπινάση Cre. Ο ανασυνδυασμός μεταξύ των *loxP* περιοχών του φορέα μέσω της ρεκομπινάσης Cre μπορεί να κυκλοποιήσει το μόριο DNA που αναδιπλασιάζεται σε κύτταρα που αναπτύσσονται παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνης. Ο φορέας pSC-A, σε αντίθεση με τους φορείς pET-29c(+), pET-49B(+) και pET-M60, διαθέτει κασέτα *lacZ'* για την επιλογή μπλε-λευκών αποικιών και η εισαγωγή του ενθέματος διακόπτει την παραγωγή της λειτουργικής β-γαλακτοσιδάσης. Χρησιμοποιήθηκε X-gal που μεταβολίζεται από την β-γαλακτοσιδάση και παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν (5-βρωμο-4-χλωροϊνδόλη) που είναι μπλε και λειτουργεί σαν δείκτης. Οι λευκές αποικίες υποδηλώνουν την ύπαρξη του ενθέματος και την αδυναμία των κυττάρων να υδρολύσουν το δείκτη.

Για το μετασχηματισμό των επιλεκτικών κυττάρων ακολούθησαν τα βήματα:

- Προσθήκη 50 ng της αντίδρασης ενοποίησης σε 50 µl επιλεκτικών κυττάρων και επώαση για 20 min στον πάγο.
- Θερμικό σοκ για 45 sec στους 42° C και μεταφορά στον πάγο για 2 min.
- Προσθήκη 1 ml υγρού θρεπτικού μέσου SOC και επώαση για 1 h στους 37° C υπό ανάδευση στις 210 rpm.
- Επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα παρουσία αμπικιλίνης (100 µg/µl) και X-gal (30 µg/µl) και επώαση για 12-18 h στους 37° C. Στην περίπτωση των φορέων pET-29c(+), pET-49B(+) και pET-M60 τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (LB/άγαρ) παρουσία καναμυκίνης (50 µg/µl).

Στερεό θρεπτικό υλικό LB/ άγαρ: 1% Tryptone, 1% NaCl, 0.5% Yeast extract, 12 g/l Agar.

Υγρό θρεπτικό υλικό SOC: 0.5% Yeast extract, 2% Tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose.

Υγρό θρεπτικό υλικό LB: 1% Tryptone, 1% NaCl, 0.5% Yeast extract.

7. Θέση-Κατευθυνόμενη Σημειακή Μεταλλαξιγένεση

Συνήθως για να χαρακτηριστούν οι λειτουργίες και οι περιοχές δέσμωσης διαφόρων πεπτιδίων μεταλλάσσονται σημαντικά κατάλοιπα στο αμινοξύ αλανίνη, καθώς είναι το πιο συνηθισμένο που απαντάται στις πρωτεΐνες, είναι συμβατό με όλους τους τύπους δευτεροταγών δομών και η παρουσία του δεν προκαλεί σημαντικές δομικές αλλαγές (Wells *et al.* 1991). Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν μεταλλάξεις σημαντικών καταλοίπων της πρωτεΐνης A2 του vWF σε αλανίνες με θέση-κατευθυνόμενη σημειακή μεταλλαξιγένεση.

Ως εκμαγείο για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων A, B και Γ χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-49b(+) που διέθετε το ένθεμα του φυσιολογικού γονιδίου A2 του vWF (**Πίνακας 13**). Σχεδιάστηκαν ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που διέθεταν τις επιθυμητές μεταλλάξεις και επεκτάθηκαν από την PfuTurbo DNA πολυμεράση, παράγοντας μεταλλαγμένα πλασμίδια με κομμένα άκρα. Οι αντιδράσεις και τα προγράμματα PCR πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες που προτείνει η κατασκευάστρια εταιρεία (Stratagene, Austria) (**Πίνακες 14 και 15**).

Πίνακας 13: Εκκινητές για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων της επικράτειας A2 του vWF.

Μετάλλαγμα	Περιοριστικές ενδονουκλεάσες	Εκκινητές (5'-3')
A	<i>BamHI, HindIII</i>	CTACATGGTGACTGTGG GCG TACCCCTTCAGCGAGG CCTCGCTGAAGGGGTA CGCC CACAGTCACCATGTAG
B	<i>BamHI, HindIII</i>	CAACGTGCAGGAGCTGG GCG AGGATTGGCTGGCCC GGGCCAGCCAATCCT CGCC CAGCTCCTGCACGTTG
Γ	<i>BamHI, HindIII</i>	GATCGGACAAAATTGGT GCA GCCGACTTCAACAAGAG CTCTGTGTGAAGTCGGC TGC ACCAATTTTGTCCGATC

Πίνακας 14: Αντίδραση PCR για την εισαγωγή των μεταλλάξεων.

Πλασμιδιακό DNA	50 ng
Buffer	10 X
Νοσηματικός εκκινητής για την κάθε μετάλλαξη	125 ng
Αντινοσηματικός εκκινητής για την κάθε μετάλλαξη	125 ng
DNTPs	1 μl
Pfu Polymerase	2.5 U
Τελικός όγκος	50 μl

Πίνακας 15: Πρόγραμμα PCR για την εισαγωγή των μεταλλάξεων στο ένθεμα του γονιδίου *A2* του *vWF* του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pET-49b(+)*.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Επαναλήψεις
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	30 sec	1
Αποδιάταξη	95 °C	30 sec	12
Υβριδοποίηση	55 °C	1 min	12
Εκκινήτων			
Επιμήκυνση	68 °C	6.5 min	12

Στη συνέχεια με τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Dpn I* (στοχευόμενη ακολουθία: 5'-Gm6ATC-3' σε μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA) αποικοδομήθηκε το εκμαγείο. Ο κομμένος φορέας μετασημάτισε επιλεκτικά κύτταρα *E.coli* XL1-Blue που εκφράζουν τη ρεκομπινάση Cre και μπορούν να τον κυκλοποιήσουν. Ακολούθησε η αλληλούχηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και επιβεβαιώθηκε η εισαγωγή των επιθυμητών μεταλλάξεων.

8. Επεξεργασία των πρωτεϊνών

8.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και χρώση

Η πηκτή διαχωρισμού προετοιμάστηκε ανάλογα με τα μοριακά μεγέθη των πρωτεϊνών (*Πίνακας 16*).

Πίνακας 16: Διαλύματα για την προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμιδίου.

Πηκτή Διαχωρισμού	Μοριακό μέγεθος (kDa)	Διαλύματα (100 ml)
6%	60-200	30% Acrylamide: 20 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.9): 25 ml 10% SDS: 1 ml TEMED: 0.08 ml 10% APS: 1 ml
8%	40-140	30% Acrylamide: 26.7 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.9): 25 ml 10% SDS: 1 ml TEMED: 0.08 ml 10% APS: 1 ml
10%	20-80	30% Acrylamide: 33.3 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.9): 25 ml 10% SDS: 1 ml TEMED: 0.08 ml 10% APS: 1 ml
12%	15-70	30% Acrylamide: 40 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.9): 25 ml 10% SDS: 1 ml TEMED: 0.08 ml 10% APS: 1 ml
15%	10-50	30% Acrylamide: 50 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.9): 25 ml 10% SDS: 1 ml TEMED: 0.08 ml 10% APS: 1 ml
Πηκτή επιστοιβαξης (4%)	-	30% Acrylamide: 17 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8): 12.5 ml 10% SDS: 1 ml TEMED: 0.1 ml 10% APS: 1 ml

Η χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 και με τη μέθοδο του νιτρικού αργύρου. Κατά τη χρώση με τη χρήση νιτρικού αργύρου ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία:

- Επώαση της πηκτής για 20 min με το διάλυμα σταθεροποίησης.
- Πλύση 10 min με 50% Methanol και πολλές διαδοχικές πλύσεις με ddH₂O.
- Επώαση για 20-30 sec με το διάλυμα ευαισθητοποίησης και πλύση με ddH₂O.
- Επώαση για 20 min με το διάλυμα ευαισθησίας AgNO₃.
- Επώαση με το διάλυμα εμφάνισης μέχρι να γίνουν ορατές οι ζώνες.
- Επώαση με το διάλυμα διακοπής της χρώσης και πλύση με ddH₂O.

Διάλυμα Χρώσης Coomassie Brilliant Blue R-250: 0.2% Coomassie Blue, 10% Acetic acid, 50% Methanol.

Διάλυμα Αποχρωματισμού Coomassie Brilliant Blue R-250: 10% Acetic acid, 50% Methanol.

Διάλυμα Σταθεροποίησης: 50% Methanol, 5% Acetic acid.

Διάλυμα Ευαισθητοποίησης: 0.031% w/v Na₂S₂O₃.

Διάλυμα Ευαισθησίας AgNO₃: 0.1 % w/v AgNO₃.

Διάλυμα Εμφάνισης: 2 % w/v Na₂CO₃, 0.04% v/v Formaldehyde.

Διάλυμα Διακοπής χρώσης: 5 % v/v H₂SO₄.

Running buffer 10 X: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.92 M Glycine, 1% SDS.

Loading buffer 4 X: 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-Mercaptoethanol, 0.001% Bromophenol Blue.

8.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG, θερμοκρασίες και χρόνους επώασης και ακολούθησαν τα παρακάτω βήματα:

- Εμβολιασμός 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth παρουσία καναμυκίνης (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) με κύτταρα έκφρασης που έχουν μετασηματιστεί από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με τα επιθυμητά ενθέματα. Ανάπτυξη για 12-16 h στους 37° C υπό ανάδευση 210 rpm.
- Εμβολιασμός 450 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth παρουσία καναμυκίνης (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ανάπτυξη στους 37° C υπό ανάδευση 210 rpm ($\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 0.6).
- Διαχωρισμός της καλλιέργειας σε 8 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες (50 ml η καθεμία). Συλλογή 50 ml πριν την προσθήκη IPTG ως μάρτυρας. Προσθήκη IPTG σε τρεις κωνικές φιάλες σε συγκεντρώσεις 0.1 mM, 0.5 mM και 1 mM αντίστοιχα και επώαση για 5 h και 16 h στους 16° C υπό ανάδευση στις 180 rpm. Ομοίως, προσθήκη IPTG σε τρεις φιάλες και επώαση στους 37° C. Σε δύο φιάλες επώαση χωρίς την προσθήκη IPTG για 16 h στους 16° C και 37° C αντίστοιχα υπό ανάδευση στις 180 rpm.

Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 20 min στους 4° C στις 4,000 rpm και ακολούθησε ο χειρισμός τους με τα παρακάτω βήματα:

- Αναδιάλυση των ιζημάτων σε 2 ml διαλύματος λύσης και επώαση για 2 h στους 4° C.
- Λύση των κυττάρων με υπερήχους (2 min με παύσεις 10 sec ανά 10 sec) και φυγοκέντρωση για 20 min στους 4° C στις 14,000 rpm.
- Μεταφορά των υπερκειμένων σε νέους πλαστικούς σωλήνες.

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται συγχωνευμένες με τις εξαϊστιδίνες απομονώθηκαν με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας που διαθέτει ιόντα νικελίου καθλωμένα σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη) (*GE Healthcare*). Τα έξι κατάλοιπα ιστιδινών στη σειρά αλληλεπιδρούν με τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους που διαθέτουν με τα ιόντα νικελίου, οι πρωτεΐνες προσδένονται ισχυρά στα σφαιρίδια και

εκλύονται με την προσθήκη διαλύματος ιμιδαζολίου. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα λύσης: 150 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Imidazole, 10% Glycerol, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Triton, 0.14 mmole/Lt Lysozyme, 1 mM PMSF.

Διάλυμα εξισορρόπησης: 150 mM Tris HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Triton.

Διάλυμα πλύσης: 150 mM Tris HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Imidazole, 10% Glycerol, 10 mM 2-Mercaptoethanol.

Διάλυμα έκλουσης: 150 mM Tris HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 300 mM Imidazole, 10% Glycerol, 10 mM 2-Mercaptoethanol.

Διάλυμα διαπίδυσης: 150 mM Tris HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl.

Στις αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα λύσης: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 M Urea, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF.

Διάλυμα εξισορρόπησης: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 6 M Urea.

Διάλυμα πλύσης: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 6 M Urea, 5 mM Imidazole.

Διάλυμα έκλουσης: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 6 M Urea, 300 mM Imidazole.

Διάλυμα διαπίδυσης: 20 mM Tris HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl.

Όταν πραγματοποιήθηκε η επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60 χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα λύσης 50 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 8.0), 500 mM NaCl 20 mM Imidazole, 1 mM 2-Merchптоethanol, 0.14 mmole/Lt lysozyme, EDTA free protease inhibitors cocktail tablets, 1 mM PMSF.

Διάλυμα εξισορρόπησης: 50 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 8.0), 500 mM NaCl.

Διάλυμα πρώτης πλύσης: 50 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 8.0), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole.

Διάλυμα δεύτερης πλύσης: 50 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 8.0), 500 mM NaCl, 30 mM Imidazole.

Διάλυμα έκλουσης: 50 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 8.0), 500 mM NaCl, 250 mM Imidazole.

Διάλυμα διαπίδυσης: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT.

Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται συγχωνευμένες με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκε με στήλη χρωματογραφίας αγκιστείας που διαθέτει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη) (*GE Healthcare*). Η συγγένεια των σφαιριδίων της γλουταθειόνης με το τμήμα της τρανσφεράσης της S- γλουταθειόνης επιτρέπει την πρόσδεση της πρωτεΐνης στα σφαιρίδια και η έκλυση πραγματοποιείται με την προσθήκη διαλύματος ελεύθερης ανηγμένης γλουταθειόνης σε περίσσεια. Η ανηγμένη γλουταθειόνη δημιουργεί δισουλφιδικούς δεσμούς με την προσδεμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνη, αποδεσμεύοντας την πρωτεΐνη. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα λύσης: PBS (pH 7.4), 0.14 mmole/Lt Lysozyme, EDTA free protease inhibitors cocktail tablets, 1 mM PMSF.

Διάλυμα εξισορρόπησης: PBS (pH 7.4).

Διάλυμα πλύσης: PBS (pH 7.4).

Διάλυμα έκλυσης: PBS, 10 mM Glutathione reduced (pH 8.0).

Διάλυμα διαπίδυσης: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl.

8.2.1. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης τα μακρομόρια ενός διαλύματος διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Χρησιμοποιήθηκε το υλικό μέσο Sephadex G-50, που συντίθεται από τον πολυσακχαρίτη δεξτράνη και παρουσιάζει εύρος 1,500-30,000 Da σε στήλη διαμέτρου 10 mm και ύψους 30 cm (*GE Healthcare*). Οι οργανικές αλυσίδες του πολυσακχαρίτη συνδέονται και προσδίδουν μια τρισδιάστατη δομή με τη μορφή πόρων, όπου μπλέκονται οι ιονικές ομάδες των μακρομορίων μέσω συνδέσεων με τα μόρια της γλυκόζης. Τα μικρότερα μόρια εμπλέκονται σε περισσότερους πόρους και εκλούνται τελευταία από τη στήλη, ενώ τα μεγαλύτερα εκλούνται γρηγορότερα. Χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω διάλυμα:

Διάλυμα εξισορρόπησης και έκλυσης: 150 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl.

8.3. Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων

Η διαδικασία ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF είναι γνωστή ως Western blotting. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS (αρνητικά φορτισμένα) μετακινούνται κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προς την άνοδο και καθιλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Κατά τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης ακολούθησαν τα παρακάτω βήματα:

- Ενεργοποίηση της μεμβράνης PVDF με επώαση για 5 min σε Methanol.
- Τοποθέτηση της πηκτής σε επαφή με τη μεμβράνη και διαβίβαση ηλεκτρικού ρεύματος σταθερής έντασης (72 mA) για 1.5 h.

Οι πρωτεΐνες ανιχνεύτηκαν με τη χρήση αντισωμάτων με τα παρακάτω βήματα:

- Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα γάλακτος (5% w/v) σε PBS για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με His-rabbit Antibody (1:2000) σε διάλυμα γάλακτος (5% w/v) σε PBS για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση με διάλυμα PBS-Tween (0.5%) για 5 min.
- Επώαση με Antirabbit HRP Antibody (1:5000) σε διάλυμα γάλακτος (5% w/v) σε PBS για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση με διάλυμα PBS-Tween (0.5%) για 5 min.
- Χρώση με υπόστρωμα 4-chloro-1-naphthol (0.5 mg/ml σε Methanol) σε διάλυμα MetOH (20%) σε PBS με την προσθήκη H₂O₂ (30%). Διακοπή της αντίδρασης με πλύση με dH₂O.

Transfer buffer: 125 mM Tris-HCl (pH 8.58), 125 mM Borate (Boric acid), 0.2% SDS.

PBS: 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.3), 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄.

9. Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Με τη συζευγμένη με ένζυμο τεχνική ανοσοαπορρόφησης ή Elisa μελετήθηκε αρχικά η προσκόλληση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης A2 στα κελία και η ανίχνευσή της με αντισώματα. Σχεδιάστηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Επώαση αυξανόμενης συγκέντρωσης πρωτεΐνης A2 σε διάλυμα PBS στα κελία (πλάκες PVC) για 2 h στους 37° C.
- Πλύση με διάλυμα PBS-Tween (0.5%).
- Επώαση με διάλυμα αλβουμίνης (5% w/v) σε PBS για 1 h στους 37° C.
- Επώαση με Mouse vWF A2 Antibody (1 µg/ml) σε διάλυμα PBS για 2 h στους 37° C.
- Πλύση με διάλυμα PBS-Tween (0.5%).
- Επώαση με Antimouse HRP (1:5000) σε διάλυμα PBS για 1 h στους 37° C.
- Χρώση με διάλυμα φωσφορικών-κιτρικών με o-Phenilenediamine (OPD) (0.4 mg/ml) και H₂O₂ (0.02%) και διακοπή χρώσης με H₂SO₄ (1 N).
- Φωτομέτρηση στα 490 nm στα επόμενα 15 min.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών A1 και A2 σχεδιάστηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Επώαση πρωτεΐνης A1 σε αυξανόμενη ή σταθερή συγκέντρωση σε διάλυμα PBS σε διαδοχικά κελία για 2 h στους 37° C.
- Πλύση με διάλυμα PBS-Tween (0.5%).
- Επώαση με διάλυμα αλβουμίνης (5% w/v) σε PBS για 1 h στους 37° C.
- Πλύση με διάλυμα PBS-Tween (0.5%).
- Επώαση πρωτεΐνης A2 σε σταθερή ή αυξανόμενη συγκέντρωση αντίστοιχα σε διάλυμα PBS για 2 h στους 37° C.
- Πλύση με διάλυμα PBS-Tween (0.5%).
- Επώαση Mouse vWF A2 Antibody (0.1 µg/ml) σε διάλυμα PBS για 2 h στους 37° C.
- Πλύση με διάλυμα PBS-Tween (0.5%).
- Επώαση Goat Antimouse HRP (1:5000) σε διάλυμα PBS για 1 h στους 37° C.
- Πλύση με διάλυμα PBS-Tween (0.5%).
- Χρώση και φωτομέτρηση.

10. Δυναμική σκέδαση φωτός, DLS (Dynamic light scattering)

Για να ελεγχθεί η παρουσία πολυμερών στα διαλύματα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DLS, στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσοβιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Pasteur. Κατά την πρόσκρουση του φωτός σε μόρια σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις και μπορούν να υπολογιστούν οι διακυμάνσεις της σκεδαζόμενης έντασής του, να καταγραφούν οι χρονικές στιγμές που πραγματοποιούνται οι μέγιστες διακυμάνσεις και να υπολογιστούν οι φυσικοχημικές παράμετροι των βιολογικών μακρομορίων.

Ένα χρήσιμο μέγεθος που μελετάται είναι η γυροσκοπική ακτίνα (R_g) που χαρακτηρίζεται ως η απόσταση που συνδέει το κέντρο μάζας του μακρομορίου με το εξώτατο άκρο του και η υδροδυναμική ακτίνα (R_h). Θεωρώντας ότι κάθε μόριο διαλυμένης ουσίας περιτοιχίζεται από πολλά μόρια διαλύτη, παρατηρείται τελικά ο σχηματισμός φυσαλίδας που έχει πάντα σφαιρικό σχήμα και ακτίνα R_h . Η μέτρηση της χρονικής εξέλιξης της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας $I(t)$ με τη βοήθεια ψυφιακού συσχετιστή δημιουργεί τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της έντασης του σκεδαζόμενου από το αιώρημα φωτός:

$$g_2(\tau) = \langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle$$

Όπου τ είναι ο χρόνος καθυστέρησης μεταξύ των δύο σημάτων.

Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης $g_1(\tau)$ του ηλεκτρικού πεδίου του σκεδαζόμενου φωτός συνδέεται με την $g_2(\tau)$ και ορίζεται από τη σχέση:

$$g_2(\tau) = A + B \cdot [g_1(\tau)]^2$$

Οι σταθερές A και B εξαρτώνται από την οπτική διάταξη του συστήματος. Στην περίπτωση ύπαρξης πολυδιασποράς στα υπό εξέταση σωματίδια, η $g_1(\tau)$ υπολογίζεται από τη σχέση:

$$g_1(\tau) = \frac{1}{I(q)} \cdot \sum_{M=1}^{\infty} N(M) \cdot M^2 \cdot S(qR_g) \cdot P(aq) \cdot \exp(-\Gamma \cdot \tau)$$

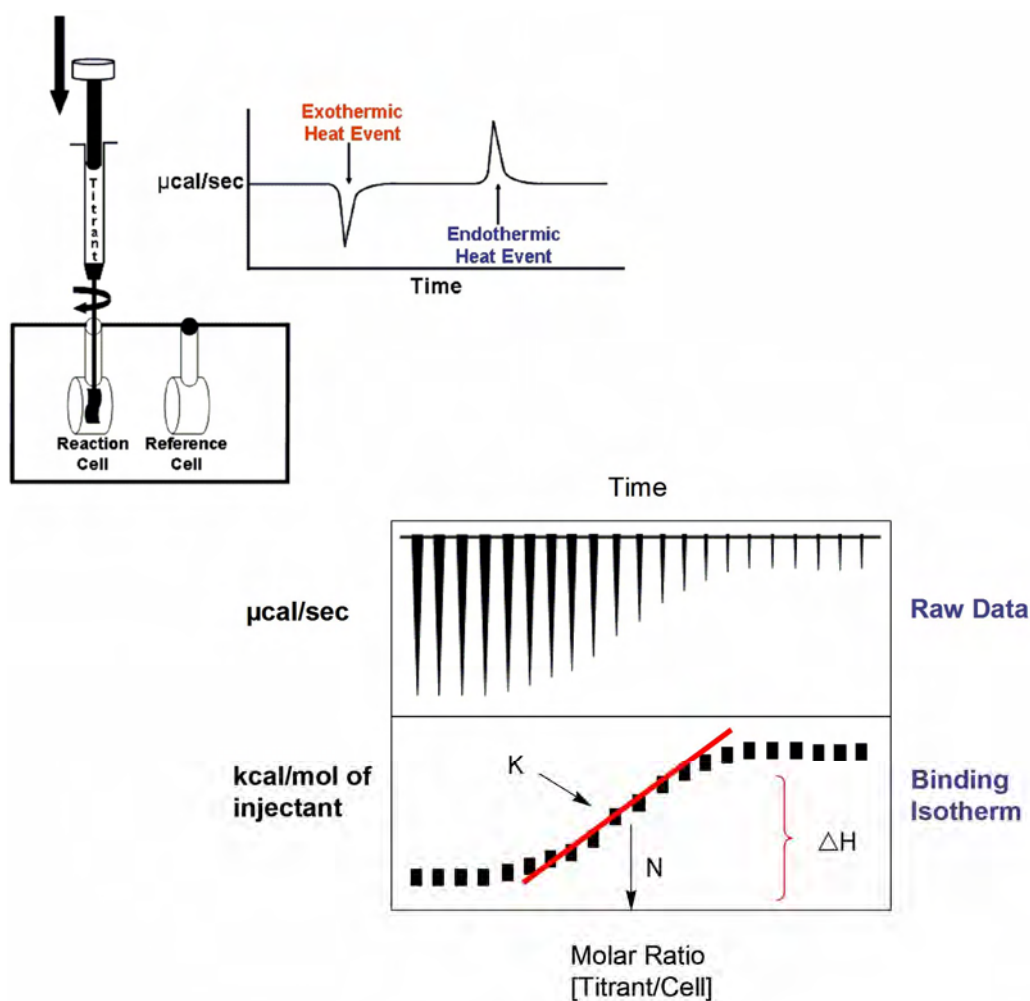
Όπου $\Gamma = q^2 \cdot D$ και D ορίζεται ο συντελεστής διάχυσης των σωματιδίων με υδροδυναμική ακτίνα R_h που δίνεται από την εξίσωση Einstein-Stokes (*Schatzkel 1991, Urban et al. 1998*).

$$D = k_B \cdot T / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h)$$

Όπου T η θερμοκρασία και η η το ιξώδες των σωματιδίων.

11. Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry-ITC)

Τα χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 προσδιορίστηκαν με θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής στο ίδρυμα ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Το ITC θερμιδόμετρο αποτελείται από δύο κελιά (δείγματος και αναφοράς). Στο κελί του δείγματος εισέρχεται το διάλυμα της πρωτεΐνης με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος (ή με τη μικρότερη συγκέντρωση) και στο κελί αναφοράς εγχύεται με σύριγγα το διάλυμα της άλλης πρωτεΐνης (**Εικόνα 32**) (Wiseman *et al.* 1989, Fisher *et al.* 1995, Gill *et al.* 1995, Indyk *et al.* 1998). Κατά τις εγχύσεις το διάλυμα της πρωτεΐνης βρίσκεται υπό συνεχή μηχανική ανάδευση (400 rpm/sec) και αποκαθίσταται η χημική ισορροπία.



Εικόνα 32: Βασική αρχή ITC πειράματος.

Στην αρχή της τιτλοδότησης τα περισσότερα μόρια της πρωτεΐνης στη σύριγγα δεσμεύονται στα μόρια της πρωτεΐνης στο κελί αναφοράς και καταγράφονται ισχυρά σήματα, αλλά καθώς εξελίσσεται η διαδικασία οι διαθέσιμες θέσεις δέσμευσης και το μέγεθος των κορυφών ελαττώνονται. Αν η αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου είναι ενδόθερμη ή εξώθερμη, εκλύεται ή απορροφάται αντίστοιχα θερμότητα και η συσκευή ρυθμίζει τη θερμοκρασία μέσω της ισχύος που παρέχεται ανάλογα με τον αριθμό των μορίων που αλληλεπιδρούν (Leavitt et al. 2001, Velazquez-Campoy et al 2004, Freire et al. 2009). Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται η αρχή διατήρησης της μάζας:

$$M_t^0 V_0 = M_t V_0 + \frac{M_t + M_t^0}{2} \Delta V$$

Όπου M_t^0 (moles/L) η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο κελί, V_0 ο ενεργός όγκος του κελίου, M_t η συγκέντρωση των μορίων στην i -στη έγχυση και ΔV ο ολικός όγκος που εγχύεται στο κελί του δείγματος.

Με την παραδοχή ότι τα μόρια που εγχέονται παραμένουν στον όγκο V_0 , η συγκέντρωση στο κελί του δείγματος στην i -στη έγχυση (X_t) υπολογίζεται:

$$X_t = X_t^0 \left(1 - \frac{\Delta V}{2V_0} \right)$$

Όπου X_t^0 είναι η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος της πρωτεΐνης στη σύριγγα.

Η σταθερά σύνδεσης της αλληλεπίδρασης K_b υπολογίζεται από τη σχέση:

$$K_b = \frac{\theta}{(1 - \theta)[X]}$$

Όπου θ συμβολίζεται το ποσοστό των αρχικών μορίων της πρωτεΐνης στο κελί του δείγματος που αλληλεπιδρούν με τα μόρια του διαλύματος της πρωτεΐνης που εγχέονται και $[X]$ η συγκέντρωση του διαλύματος στη σύριγγα που δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια της πρωτεΐνης του κελίου του δείγματος στον όγκο V_0 .

Η στοιχειομετρία της αντίδρασης N υπολογίζεται με την εξίσωση:

$$X_t = [X] + N\theta[M]_t$$

Από το συνδυασμό των παραπάνω προκύπτει:

$$\theta^2 - \theta \left[1 + \frac{X_t}{NM_t} + \frac{1}{M_t NK_b} \right] + \frac{X_t}{NM_t} = 0$$

Το ποσό της θερμότητας Q που εκλύεται ή απορροφάται υπολογίζεται:

$$Q = N\theta M_t \Delta H_b V_0$$

Όπου ΔH_b η ενθαλπία της αλληλεπίδρασης κανονικοποιημένη ανά mole διαλύματος πρωτεΐνης που προστίθεται.

Από τις παραπάνω εξισώσεις υπολογίζεται η εκλυόμενη θερμότητα:

$$Q = \frac{V_0 \Delta H_b [M]_t K_b [L]}{1 + K_b [L]} \left[1 + \frac{X_t}{NM_t} + \frac{1}{M_t N K_b} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{NM_t} + \frac{1}{M_t N K_b} \right)^2 - \frac{4X_t}{NM_t}} \right]$$

Η παράμετρος Q υπολογίζεται μετά το πέρας της i-στης έγχυσης και συμβολίζεται ως Q_i και η εξίσωση ισχύει μόνο για το διάλυμα που βρίσκεται στον όγκο V_0 .

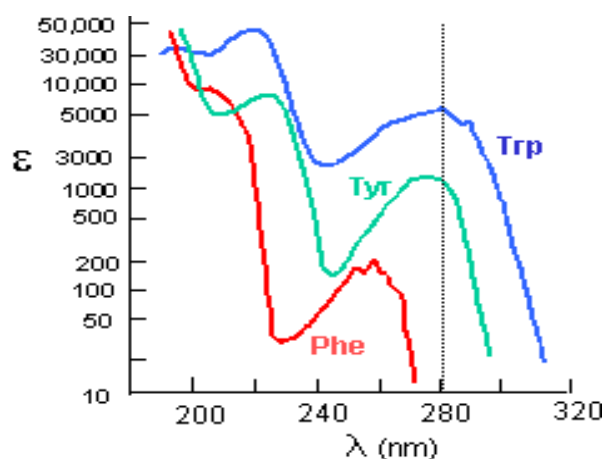
Το γεγονός ότι κάποιος όγκος στο κελί δείγματος στη i-1-στη έγχυση δε θα βρεθεί στον όγκο V_0 μετά την i-στη έγχυση, αλλά θα συμμετέχει στα θερμικά αποτελέσματα πριν περάσει εκτός του όγκου ελέγχου (V_0), απαιτεί διορθώσεις και προκύπτει η εξίσωση:

$$\Delta Q_i = Q_i + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q_i + Q_{i-1}}{2} \right] - Q_{i-1}$$

Όπου ΔQ_i είναι η θερμότητα που καταγράφεται κατά την i-στη έγχυση (*Jelesarov et al. 1999*).

12. 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 (**Εικόνα 33**) (Wetlaufer 1962). Οι φασματοσκοπικές τεχνικές πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής στο ίδρυμα ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».



Εικόνα 33: Διάγραμμα φασμάτων απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων φαινυλαλανίνης (Phe), τυροσίνης (Tyr) και θρυπτοφάνης (Trp) στην περιοχή του υπεριώδους σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (nm).

12.1. Φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism – CD)

Η φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού 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 (*Greenfield 2004, Greenfield 2006, Kelly et al. 2006*). Μετρώντας την επαγόμενη ελλειπτικότητα θ στην πόλωση που προκαλεί μια οπτικά ενεργός ουσία σε γραμμικά πολωμένο φως, σε συνάρτηση του μήκος κύματος λ μπορούν να διακριθούν τα διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά ενός μορίου σε διάλυμα (*Yang et al 1986, Kelly et al 1997, Johnson et al. 1999*).

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 διχρωισμός θ_λ της πρωτεΐνης σαν συνάρτηση του μήκους κύματος λ υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

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

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 φασμάτων 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 (*Bohm et al. 1992*) και υπολογίστηκε το ποσοστό των διαμορφωτικών χαρακτηριστικών των πεπτιδίων, στηριζόμενο σε πειραματικές τιμές πρωτεϊνών γνωστού ποσοστού έλικας.

12.2. 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 διάφορα χαρακτηριστικά φασμάτων φθορισμού (*Lakowicz et al. 1982*). 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 (*Chen et al. 1966, Burshtein 1968, Tourton et al. 1972, Schellman 1994, Knappskog et al. 1995*).

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).

13. Υπολογιστική προσέγγιση του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 του vWF

13.1. Υπολογιστική πρόβλεψη πρόσδεσης (docking) – Το πρόγραμμα HEX

Η διαδικασία της υπολογιστικής πρόβλεψης της πρόσδεσης μεταξύ βιολογικών μακρομορίων ή μακρομορίου και προσδέτη ονομάζεται «docking». Η μέθοδος χρησιμοποιείται πολύ συχνά στο σχεδιασμό φαρμάκων, καθώς είναι δυνατή η πρόβλεψη της βέλτιστης κατεύθυνσης ενός μορίου ως προς ένα άλλο (κατάσταση ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας) σε συνδυασμό με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Για την πρόβλεψη του τρόπου σύνδεσης των επικρατειών A1 και A2 του vWF χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα HEX που εφαρμόζει συσχετισμούς σφαιρικών πολικών μετασχηματισμών fourier και θεωρεί άκαμπτα μόρια (*Ritchie et al. 2000*). Οι κρυσταλλικές δομές των επικρατειών A1 (PDB:1AUQ) και A2 (PDB:3GXB) επικρατειών εισήχθησαν στο πρόγραμμα HEX και αξιοποιώντας βιβλιογραφικές δομικές και βιοχημικές πληροφορίες επιλέχθηκαν τα πιθανότερα μοντέλα αλληλεπίδρασης.

13.2. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics Simulations)

Η μοριακή δυναμική αφορά στις χρονοεξαρτώμενες μοριακές διαδικασίες. Τα βιολογικά μακρομόρια διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα χαρακτηριστικών κινήσεων, που εκτείνεται από τις ταχύτατες τοπικές διαταραχές των θέσεων των ατόμων έως τις αργές κινήσεις ολόκληρου του μορίου, όπως είναι οι αναδιπλώσεις. Πολλές από αυτές τις κινήσεις είναι σημαντικές για τις λειτουργίες των μακρομορίων. Η μέθοδος των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (ΜΔ) αποτελεί μια μορφή υπολογιστικών προσομοιώσεων, όπου τα άτομα των μορίων αφήνονται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους υπό την επίδραση γνωστών δυνάμεων της Φυσικής. Οι δυνάμεις αυτές κωδικοποιούνται σε συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας (force fields) εξαρτώμενης από τις θέσεις των ατόμων και από ειδικές για κάθε τύπο ατόμου παραμέτρους. Η υπολογιστική μέθοδος βασίζεται στην λύση κλασσικών εξισώσεων κίνησης για σύστημα πολλών σωματιδίων.

Οι προσομοιώσεις ΜΔ αποτελούν σήμερα ένα από τα χρησιμότερα θεωρητικά εργαλεία για την μελέτη των βιολογικών μορίων παρέχοντας λεπτομερείς πληροφορίες των διαταραχών και των μεταβολών της διαμόρφωσης πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιούνται ευρύτατα για τη μελέτη της δομής, της δυναμικής και της θερμοδυναμικής βιολογικών μορίων και των συμπλεγμάτων τους. Αφετηρία για την μελέτη με προσομοιώσεις ΜΔ αποτελούν τα αρχεία PDB των εξεταζόμενων μοριακών συστημάτων που περιέχουν (μεταξύ άλλων) τις συντεταγμένες των ατόμων, όπως έχουν προσδιορισθεί με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ ή NMR. Στο πλαίσιο της ανά χείρας εργασίας εφαρμόστηκαν οι προσομοιώσεις ΜΔ στις επικρατείες A1 και A2 του vWF με τους παρακάτω στόχους:

- Υπολογισμός των ενεργειών αλληλεπίδρασης μετά από ελαχιστοποίηση της ενέργειας στο κενό των 18 επιλεγμένων μοντέλων.
- Παραγωγή μοντέλων του συμπλόκου με πιο «φυσική» δομή της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης που επιτεύχθηκε με εξισορρόπηση και επακόλουθη ελαχιστοποίηση ενέργειας των επικρατέστερων μοντέλων.
- Παραγωγή εξισορροπημένων δομών των επικρατειών A1 και A2 ξεχωριστά.

Για τις προσομοιώσεις ΜΔ χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα “namd2” (Kalé *et al.* 1999) και το CHARMM27 force field για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Όλες οι εξισορροπήσεις εκτελέστηκαν με άμεση παρουσία νερού (TIP3), αντισταθμιστικών ιόντων και σε θερμοκρασία 300 K με θερμοστάτη Langevin. Πριν από την εφαρμογή των προσομοιώσεων ΜΔ προσδιορίστηκαν οι καταστάσεις πρωτονίωσης των τιτλοδοτίσιμων αμινοξέων της διεπιφάνειας με το πρόγραμμα H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>).

13.3. Χαρακτηρισμός της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF

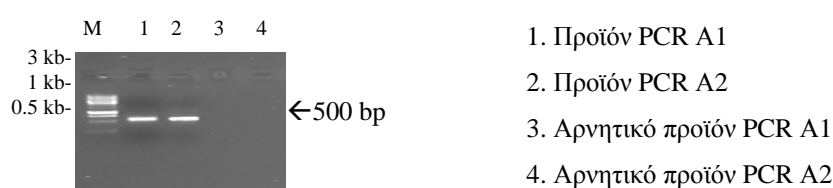
Οι διεπιφάνειες αλληλεπίδρασης μεταξύ των επικρατειών A1 και A2 του vWF χαρακτηρίστηκαν με την βοήθεια των web servers ProtorP (Reynolds *et al.* 2009) και FastContact (Champ *et al.* 2007). Προς τον σκοπό αυτό οι servers τροφοδοτήθηκαν με τις τελικές δομές των τριών επικρατέστερων μοντέλων, όπως προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την προηγούμενη ενότητα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)

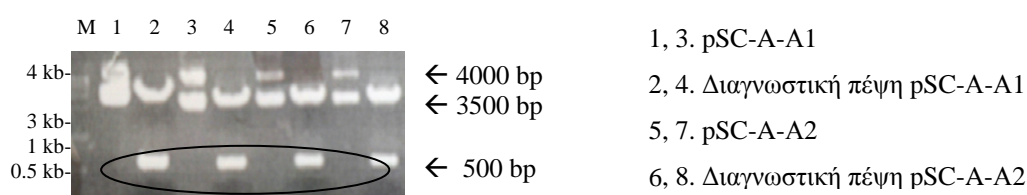
1.1. Ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2 του vWF στο φορέα pSC-A και στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)

Μετά την αντίδραση PCR όπου χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο η αλυσίδα cDNA που κατασκευάστηκε από ενδοθηλιακά κύτταρα, παρατηρήθηκε ενίσχυση DNA στα αναμενόμενα μοριακά μεγέθη 531 bp και 543 bp των γονιδίων A1 και A2 του vWF αντίστοιχα (Υλικά και μέθοδοι, 6.1) (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).

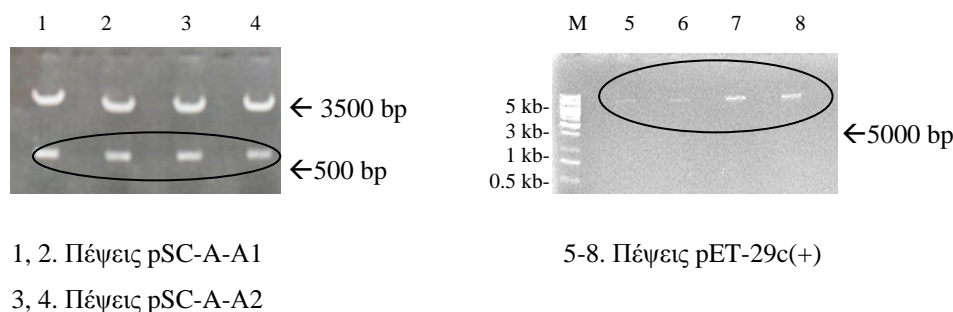
Τα PCR προϊόντα κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pSC-A και ακολούθησε ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* Solopack και η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων όπου πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *XhoI* (Υλικά και μέθοδοι, 6) (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψεων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pSC-A με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *XhoI*.

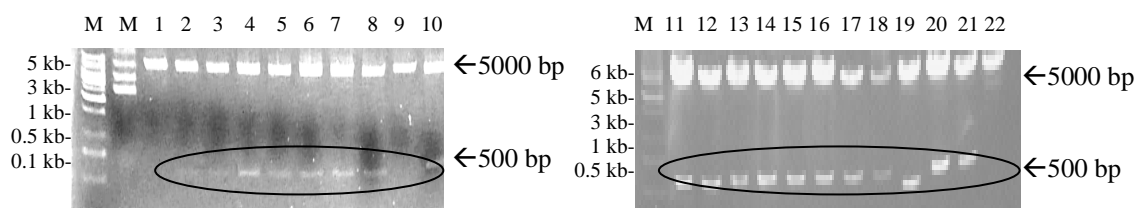
Μετά από αλληλούχηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που διέθεταν ενθέματα στα επιθυμητά μοριακά μεγέθη επιβεβαιώθηκαν οι επιθυμητές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων A1 και A2 του vWF. Ακολούθησαν πέψεις των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και του φορέα έκφρασης pET-29c(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *XhoI*. Τα προϊόντα των πέψεων

ηλεκτροφορήθηκαν και ανακτήθηκαν με εκτομή (**Εικόνα 36**). Ακολούθησε η κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2 ξεχωριστά στο φορέα έκφρασης pET-29c(+). (Υλικά και μέθοδοι, 6.2.2).



Εικόνα 36: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των πέψεων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pSC-A και του φορέα έκφρασης pET-29c(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *XhoI*.

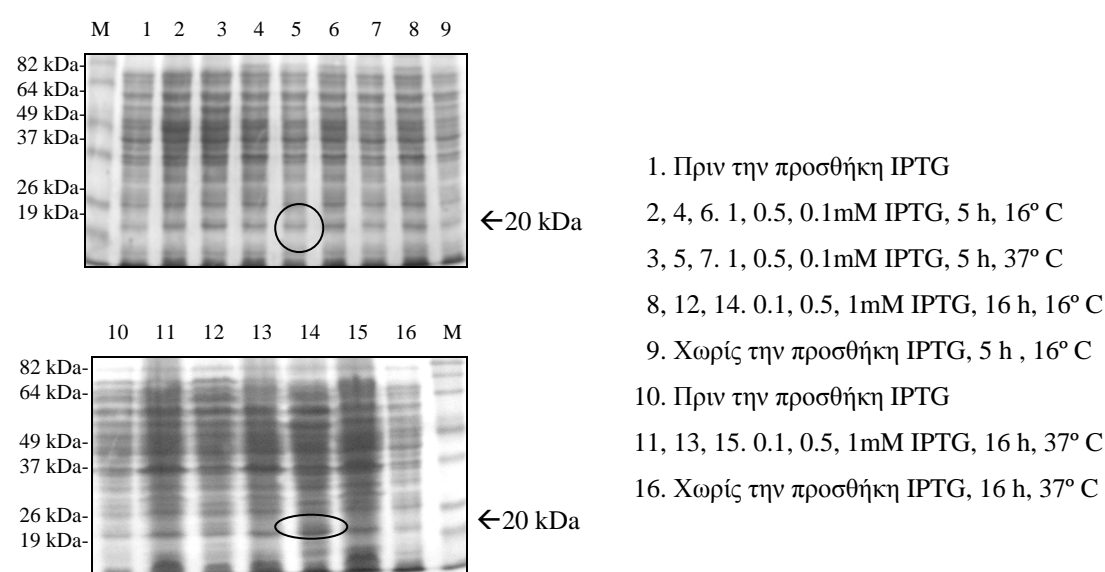
Μετά το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a απομονώθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *XhoI*, όπως παραπάνω. Στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που διέθεταν ενθέματα στα αναμενόμενα μοριακά μεγέθη (**Εικόνα 37**) πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση που επιβεβαίωσε τις νουκλεοτιδικές ακολουθίες των γονιδίων A1 και A2 του vWF. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που διέθεταν τα ενθέματα των γονιδίων μετασχημάτισαν επιδεκτικά κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21 (DE3).



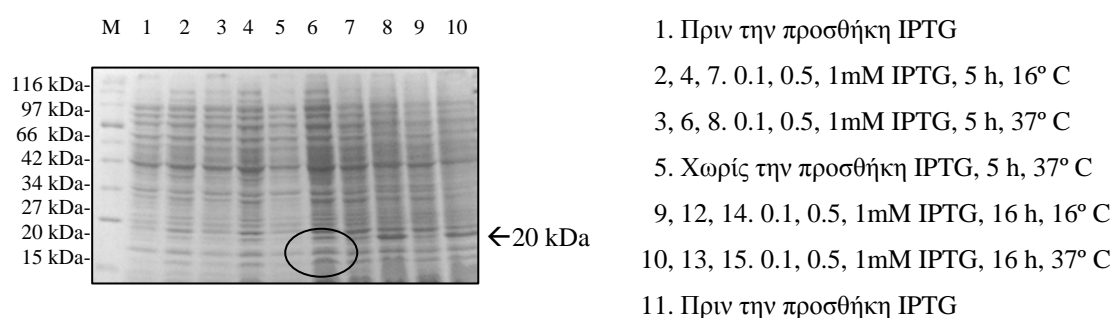
Εικόνα 37: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψεων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET-29c(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *XhoI* για τον εντοπισμό των ενθεμάτων των γονιδίων A1 και A2 του vWF.

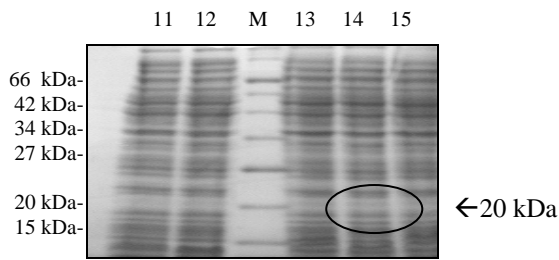
1.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)

Οι έλεγχοι υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη 0.1 mM, 0.5 mM και 1 mM IPTG και την επώαση για 5 h και 16 h σε θερμοκρασίες 16° C και 37° C υπό ανάδευση στις 180 rpm (Υλικά και μέθοδοι, 8.2). Οι πρωτεΐνες A1 και A2 εντοπίστηκαν στα αναμενόμενα μεγέθη των 20 kDa στα πρωτεϊνικά διαλύματα (υπερκείμενα) (Εικόνες 38 και 39) με την προσθήκη 1 mM IPTG και επώαση για 16 h στους 16° C υπό ανάδευση στις 180 rpm και στα λυμένα κύτταρα (ιζήματα) (Εικόνες 40 και 41).

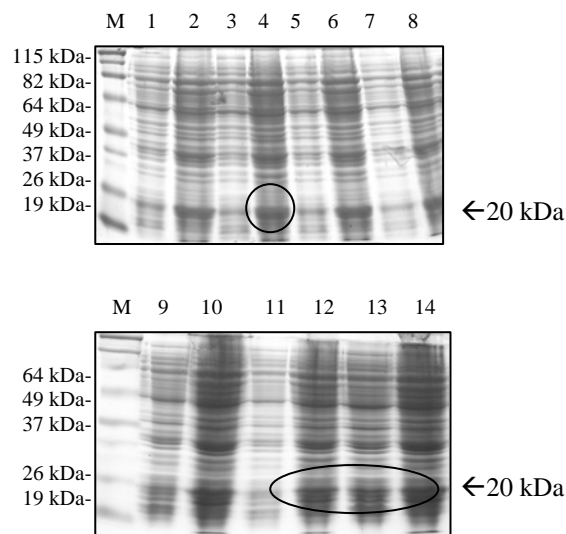


Εικόνα 38: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων των ελέγχων υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A1 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).



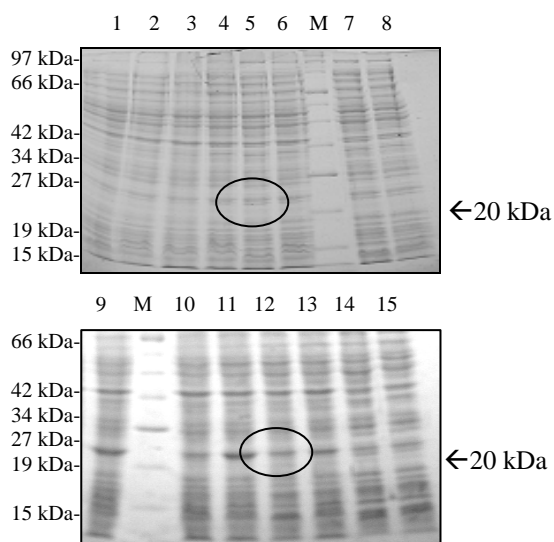


Εικόνα 39: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων των ελέγχων υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).



1. Πριν την προσθήκη IPTG
- 2, 4, 6. 0.1, 0.5, 1mM IPTG, 5 h, 37° C
- 3, 5, 7. 0.1, 0.5, 1mM IPTG, 5 h, 16° C
- 8, 10, 14. 0.1, 0.5, 1mM IPTG, 16 h, 37° C
- 9, 12, 13. 0.1, 0.5, 1mM IPTG, 16 h, 16° C
11. Χωρίς την προσθήκη IPTG, 5h, 37° C

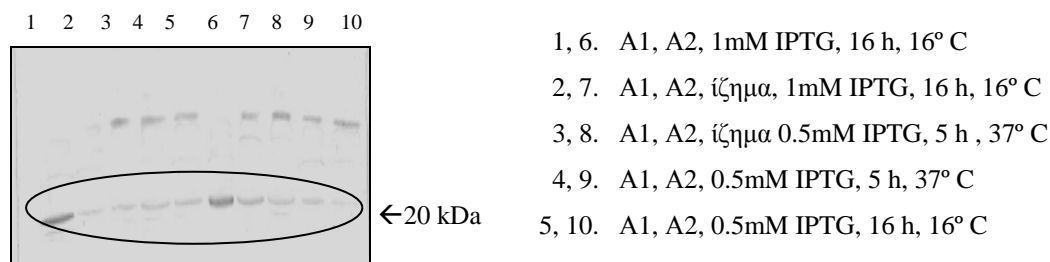
Εικόνα 40: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων του ελέγχου της πρωτεΐνης A1 του vWF στα ιζήματα μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).



1. Πριν την προσθήκη IPTG
2. Χωρίς την προσθήκη IPTG, 5 h, 37° C
- 3, 5, 7. 0.1, 0.5, 1mM IPTG, 5 h, 37° C
- 4, 6, 8. 0.1, 0.5, 1mM IPTG, 5 h, 16° C
- 9, 11, 13. 0.1, 0.5, 1mM IPTG, 16 h, 37° C
- 10, 12, 14. 0.1, 0.5, 1mM IPTG, 16 h, 16° C
15. Πριν την προσθήκη IPTG

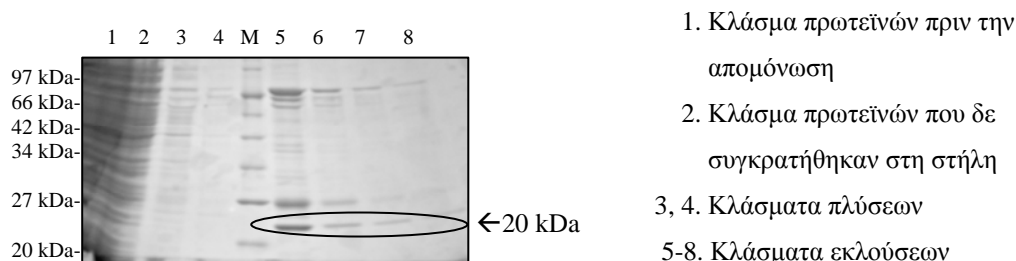
Εικόνα 41: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων του ελέγχου της πρωτεΐνης A2 του vWF στα ιζήματα μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).

Επιλέχθηκαν τα δείγματα που εντοπίστηκαν οι επιθυμητές πρωτεΐνες και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη και ανίχνευση με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαιστιδινών. Επιβεβαιώθηκε η παρουσία των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF, αλλά ανιχνεύτηκαν και άλλες λόγω της αναγνώρισης των καταλοίπων ιστιδινών από το αντίσωμα (**Εικόνα 42**).

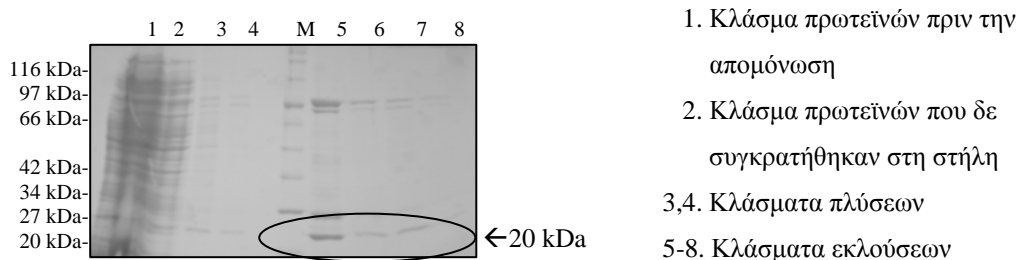


Εικόνα 42: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από ελέγχους υπερέκφρασης στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).

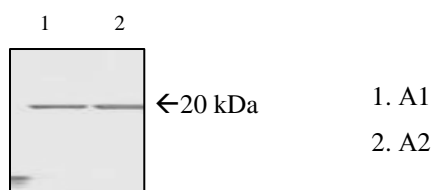
Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF απομονώθηκαν με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου (*Υλικά και μέθοδοι*, 8.2) μετά από επαγωγή με την προσθήκη 1 mM IPTG και επώαση για 16 h στους 16° C υπό ανάδευση στις 180 rpm. Οι πρωτεΐνες A1 και A2 εντοπίστηκαν στα αναμενόμενα μεγέθη των 20 kDa (**Εικόνες 43 και 44**) και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση των εκλουσμάτων σε μεμβράνη και ανίχνευση με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαιστιδινών που επιβεβαίωσε την παρουσία τους (**Εικόνα 45**). Μετά από συμπύκνωση των κλασμάτων των εκλουσμάτων σε τελικό όγκο 1 ml και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% εντοπίστηκαν και άλλες πρωτεΐνες εκτός από τις επιθυμητές (**Εικόνα 46**).



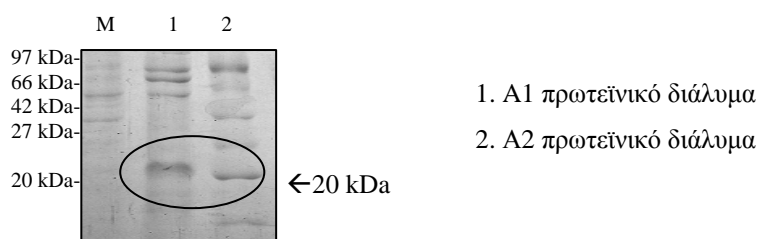
Εικόνα 43: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A1 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).



Εικόνα 44: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A2 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).



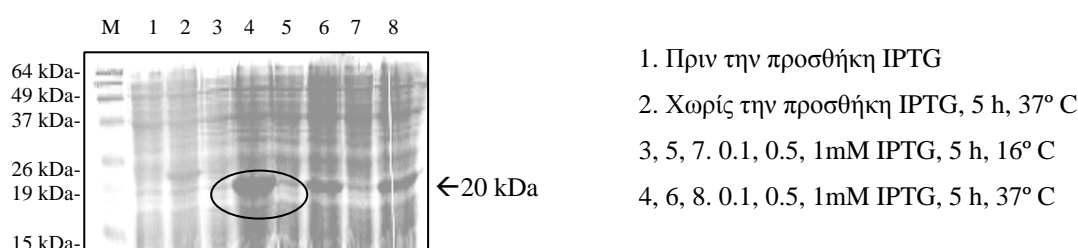
Εικόνα 45: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των απομονωμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).



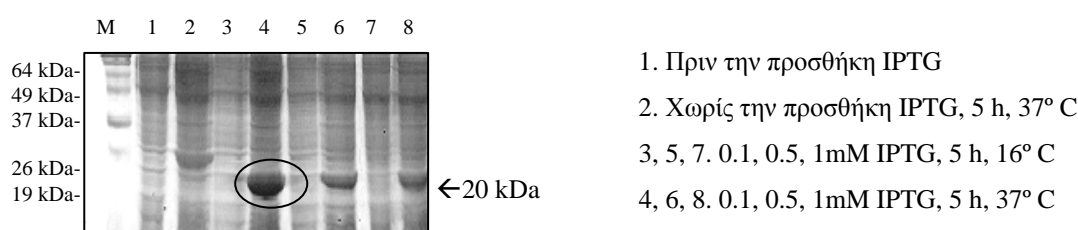
Εικόνα 46: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των συμπυκνωμένων κλασμάτων των απομονωμένων πρωτεϊνών διαλυμάτων A1 και A2 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).

1.3. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF σε αποδιατακτικές συνθήκες

Καθώς δεν παρατηρήθηκε σημαντική υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μελετήθηκε ο σχηματισμός σωμάτων εγκλεισμού που αποτελούν πυρηνικά ή κυτταροπλασματικά συσσωματώματα, που δημιουργούνται λόγω αδυναμίας της σωστής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Έτσι, ακολούθησαν έλεγχοι υπερέκφρασης και απομόνωσης των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με τη χρήση αποδιατακτικών μέσων και συγκεκριμένα διαλύματος ουρίας (6 M). Η επαγωγή πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 0.1 mM, 0.5 mM και 1 mM IPTG για 5 h στους 16° C και 37° C υπό ανάδευση στις 180 rpm (*Υλικά και μέθοδοι*, 8.2). Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 20 kDa μετά από επαγωγή στους 37° C και επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός των σωμάτων εγκλεισμού (*Εικόνες 47 και 48*).



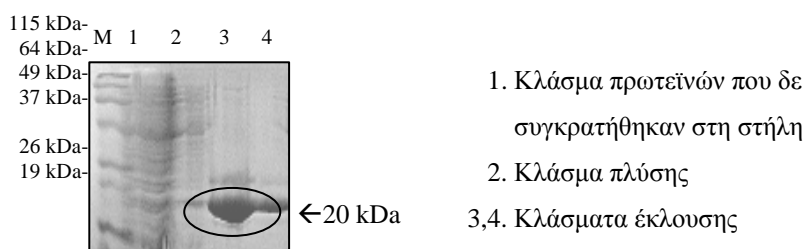
Εικόνα 47: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A1 του vWF παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).



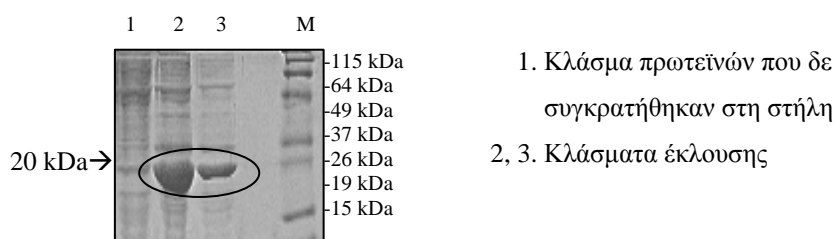
Εικόνα 48: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A2 του vWF παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).

Ακολούθησε η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου μετά από επαγωγή με την προσθήκη 0.1 mM IPTG για 5 h στους 37° C υπό ανάδευση στις 180 rpm (*Υλικά*

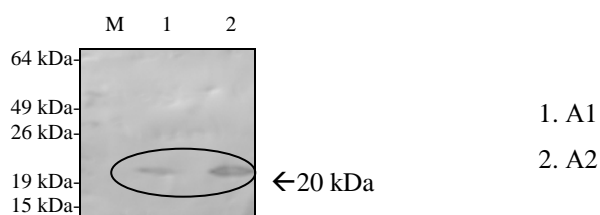
και μέθοδοι, 8.2). Οι πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 20 kDa (**Εικόνες 49 και 50**). Ακολούθησε η ανοσοαποτύπωση των εκλουσμάτων σε μεμβράνη και η ανίχνευση με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαΐστιδινών (**Εικόνα 51**). Οι πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF που απομονώθηκαν σε αποδιατακτικές συνθήκες δε χρησιμοποιήθηκαν στις παρακάτω μελέτες για τις οποίες απαιτούνται οι λειτουργικές μορφές τους.



Εικόνα 49: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A1 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).



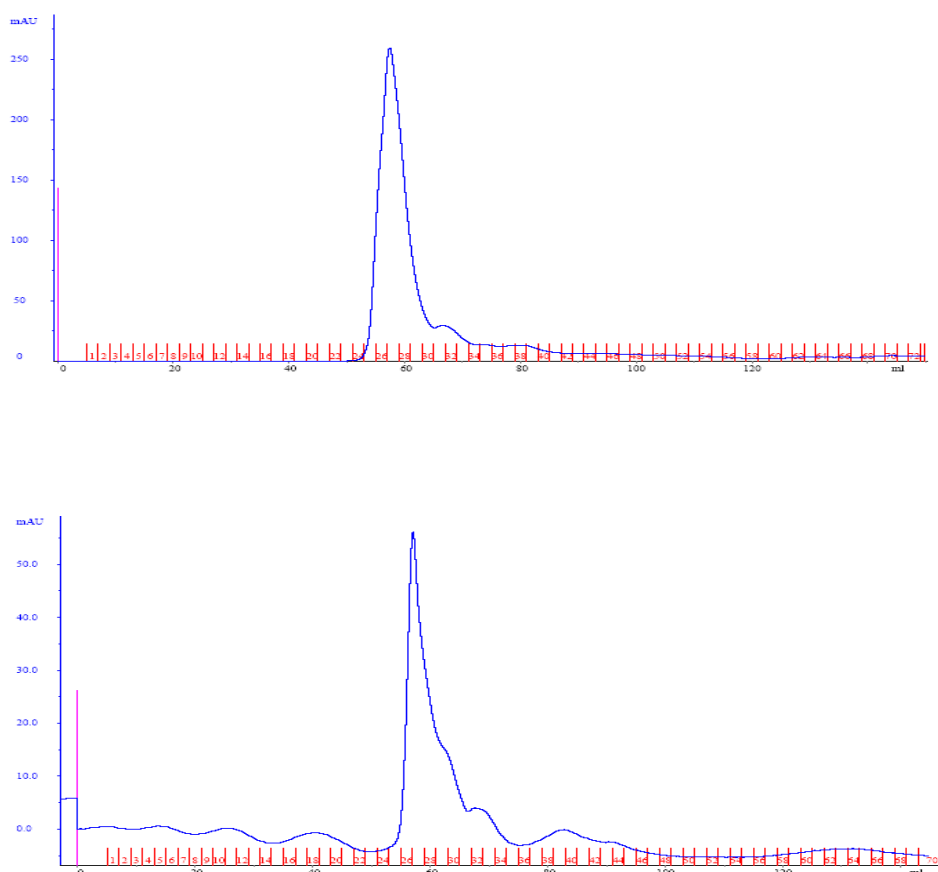
Εικόνα 50: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A2 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+).



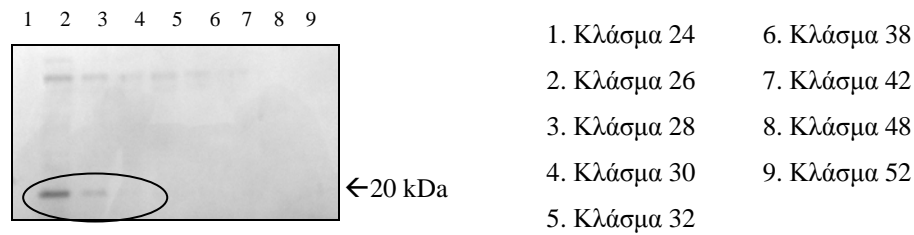
Εικόνα 51: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαΐστιδινών μετά από απομόνωση σε αποδιατακτικές συνθήκες.

1.4. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

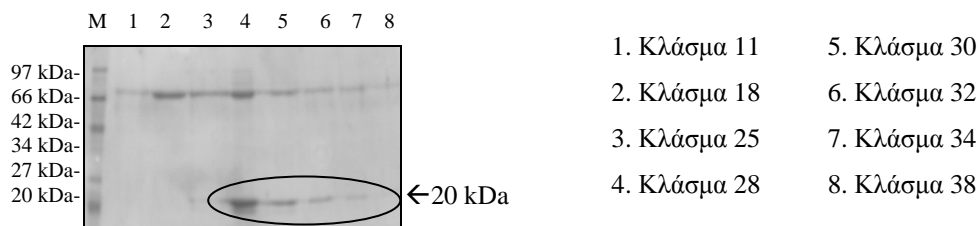
Ο μικρός βαθμός καθαρότητας των εκλουσμάτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF (Παράγραφος 1.2) οδήγησε στην προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου απομόνωσης με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Όλα τα κλάσματα των εκλούσεων φωτομετρήθηκαν και σχεδιάστηκαν οι γραφικές παραστάσεις σε συνάρτηση με τις απορροφήσεις (**Εικόνα 52**). Στα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στις κορυφές των διαγραμμάτων εντοπίστηκαν οι πρωτεΐνες A1 και A2 στο επιθυμητό μέγεθος των 20 kDa (**Εικόνες 53 και 54**). Σε αυτά τα κλάσματα ακολούθησε χρώση με νιτρικό άργυρο και παρατηρήθηκε η παρουσία και άλλων πρωτεϊνών (**Εικόνα 55**). Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη και ανίχνευση με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαιστιδινών που επιβεβαίωσε την παρουσία των επιθυμητών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 (**Εικόνα 56**).



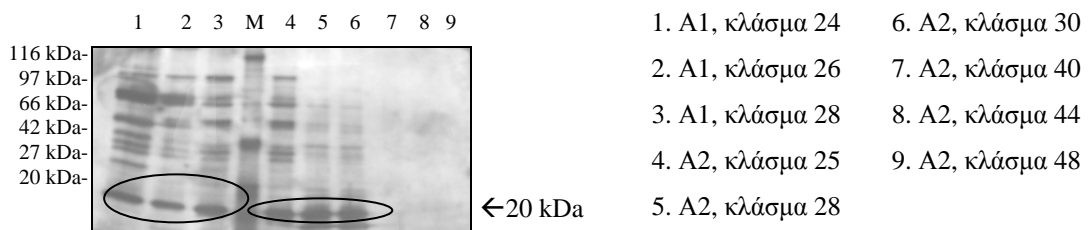
Εικόνα 52: Γραφικές παραστάσεις χρωματογραφίας μοριακής διήθησης των πρωτεϊνικών διαλυμάτων A1 και A2 του vWF.



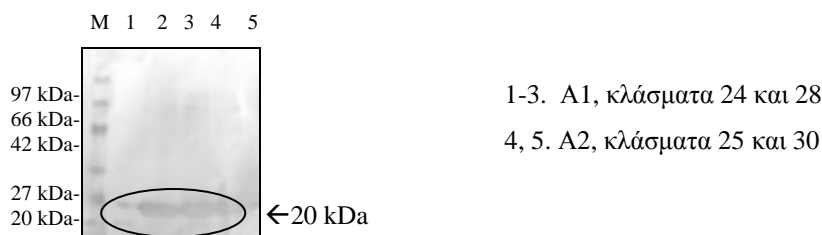
Εικόνα 53: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεϊνικού διαλύματος A1 του vWF που αντιστοιχούν στις κορυφές των απορροφήσεων του διαγράμματος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.



Εικόνα 54: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων του πρωτεϊνικού διαλύματος A2 του vWF που αντιστοιχούν στις κορυφές των απορροφήσεων του διαγράμματος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.



Εικόνα 55: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων των κλασμάτων μοριακής διήθησης που περιέχουν τις επιθυμητές πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF και χρώση με νιτρικό άργυρο.

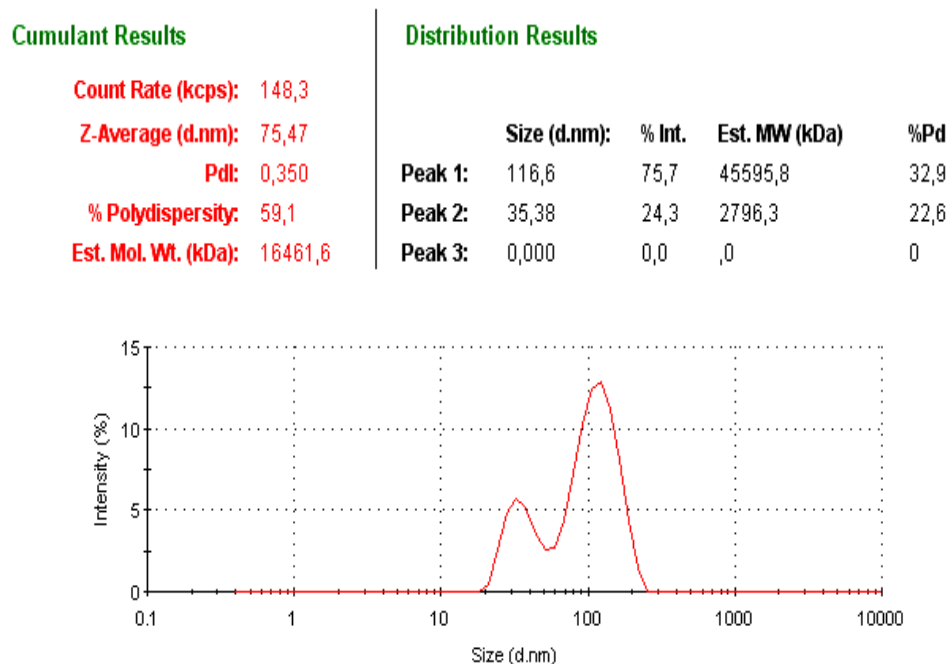


Εικόνα 56: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαισιτιδίων μετά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Καθώς δεν επιτεύχθηκε η απομόνωση των πρωτεϊνών μελετήθηκε η πιθανότητα σχηματισμού πολυμερών τους.

1.5. Δυναμική Σκέδαση Φωτός

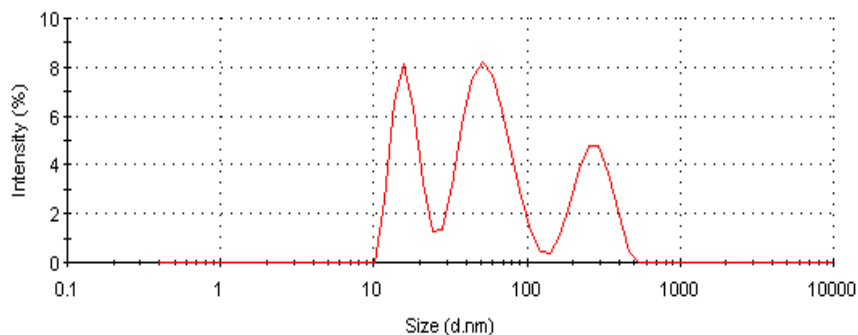
Με τη διανομή σκεδαζόμενου φωτός (ακτίνα Laser 605 nm) με σειρά έντασης προέκυψαν πληροφορίες μεγέθους του σωματιδίου (υδροδυναμική ακτίνα) και διασποράς (λόγος ημιεύρους προς το ύψος). Αποδόθηκαν κορυφές διασποράς κατά την ένταση και εκτιμήθηκαν τα μοριακά βάρη βάση εσωτερικού προτύπου του λογισμικού. Η εξαγωγή της διασποράς προέκυψε χωρίς προσεγγίσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της υδροδυναμικής ακτίνας (το ιξώδες του διαλύματος και ο δείκτης διάθλασης του φωτός θεωρήθηκαν αντίστοιχα διαλύματος PBS). Στο πρωτεϊνικό διάλυμα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF αποδόθηκαν δύο κορυφές και το λογισμικό αποτιμώντας τα αποτελέσματα τις απέδωσε σε πολυμερή μοριακών βαρών 45,596 kDa και 2,796 kDa (**Εικόνα 57**).



Εικόνα 57: Γραφική παράσταση της διασποράς του πρωτεϊνικού διαλύματος A1 του vWF κατά την ένταση. Στην τελευταία στήλη έχει υπολογιστεί η διασπορά. Στον άξονα y αντιστοιχεί το μέγεθος (nm) και στον άξονα x το ποσοστό % της έντασης. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 0.1 mg/ml.

Ακολούθησε διασπορά του δείγματος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF κατά την ένταση και προέκυψαν τρεις κορυφές που αποδόθηκαν σε πολυμερή μοριακών βαρών 8,404 kDa, 463 kDa και 335,658 kDa αντίστοιχα (**Εικόνα 58**).

Cumulant Results		Distribution Results				
Count Rate (kcps):	190,1	Size (d.nm):	% Int.	Est. MW (kDa)	%Pd	
Z-Average (d.nm):	43,24	Peak 1:	56,62	49,3	8404,1	36,7
Pdl:	0,576	Peak 2:	16,40	27,8	463,0	19,5
% Polydispersity:	75,9	Peak 3:	273,8	22,9	335658,1	25,3
Est. Mol. Wt. (kDa):	4471,8					



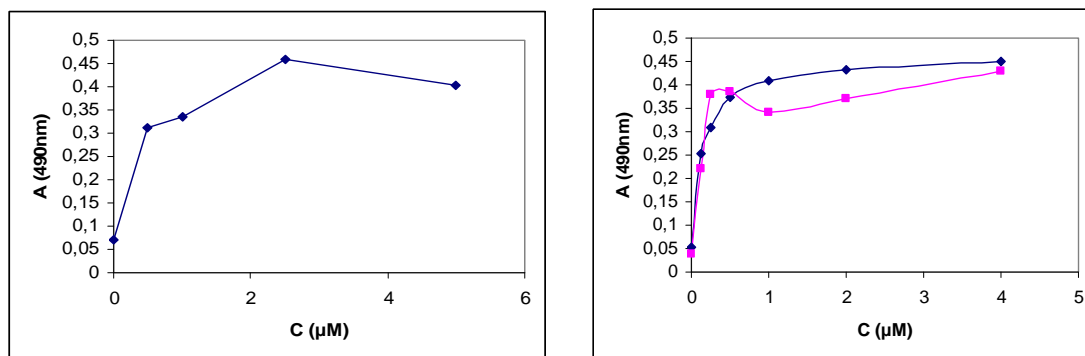
Εικόνα 58: Γραφική παράσταση της διασποράς του πρωτεϊνικού διαλύματος A2 του vWF κατά την ένταση. Στην τελευταία στήλη έχει υπολογιστεί η διασπορά. Στον άξονα y αντιστοιχεί το μέγεθος (nm) και στον άξονα x το ποσοστό % της έντασης. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 0.1 mg/ml.

1.6. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Elisa

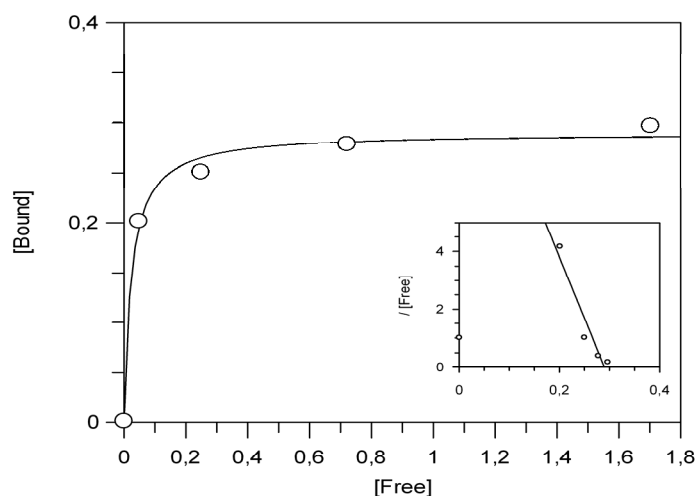
Παρά το μικρό βαθμό καθαρότητας των δειγμάτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF (Παράγραφος 1.2), επιβεβαιώθηκε η λειτουργικότητα και η αλληλεπίδρασή τους έμμεσα με την τεχνική της Elisa. Σχεδιάστηκε πρωτόκολλο και επιβεβαιώθηκε η προσκόλληση της πρωτεΐνης A2 στα κελία σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0.5 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M και 5 μ M) με αντίσωμα έναντι της επικράτειας A2. Η γραφική παράσταση των τιμών των απορροφήσεων σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης παρουσίασε αυξανόμενο σήμα που σταθεροποιήθηκε κατά τον κορεσμό της αντίδρασης (Εικόνα 59).

Αφού ποσοτικοποιήθηκε η προσκόλληση της πρωτεΐνης στα κελία και η αντίδρασή της σχεδιάστηκε πρωτόκολλο και μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2. Αυξανόμενη συγκέντρωση της πρωτεΐνης A1 (0.25 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M και 4 μ M) καθλώθηκε στα κελία και ακολούθησε η προσθήκη A2 σε σταθερή συγκέντρωση (1 μ M). Αντίστροφα καθλώθηκε στα κελία η πρωτεΐνη A1 σε σταθερή συγκέντρωση (0.25 μ M) και ακολούθησε η

προσθήκη A2 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0.25 μM , 0.5 μM , 1 μM , 2 μM και 4 μM). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με το αντίσωμα έναντι της επικράτειας A2. Η γραφική παράσταση των απορροφήσεων σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών παρουσίασε αυξανόμενο σήμα που σταθεροποιήθηκε κατά τον κορεσμό τους επιβεβαιώνοντας εμμέσως την αλληλεπίδραση των επικρατειών A1 και A2 με σταθερά αποσύνδεσης 23 μM (**Εικόνα 60**).



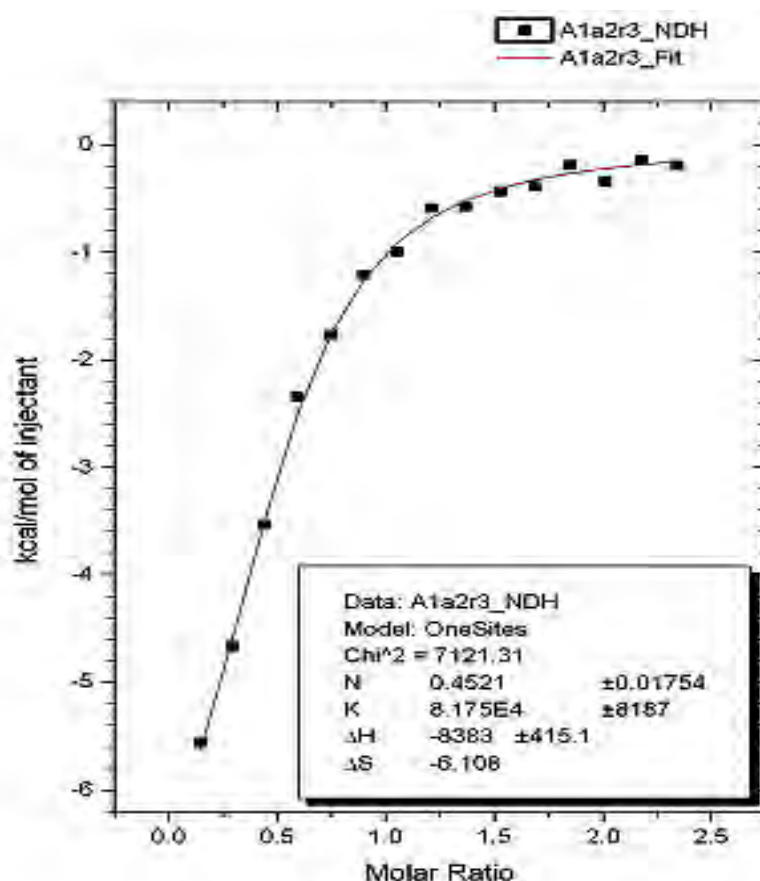
Εικόνα 59: Γραφική παράσταση της απορρόφησης (A) και των αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (0.5-5 μM) μετά από ανίχνευση με αντίσωμα έναντι της επικράτειας A2. Γραφική παράσταση της απορρόφησης (A) και της αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (0.25-4 μM) καθηλωμένης στα κελία με την προσθήκη σταθερής συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (1 μM) (μπλε καμπύλη, γραφική παράσταση της απορρόφησης (A) και της σταθερής συγκέντρωσης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (0.25 μM) καθηλωμένης στα κελία με την προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (0.25-4 μM) (ροζ καμπύλη). Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε ανίχνευση με αντίσωμα έναντι της A2 επικράτειας.



Εικόνα 60: Scatchard plot.

1.7. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (ITC)

Ακολούθησε η μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF (Παράγραφος 1.2) με θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC). Στο κελί του δείγματος εισήχθει η πρωτεΐνη A1 (0.1 mg/ml) και στη σύριγγα η A2 (1 mg/ml). Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών αποτέλεσε μια εξώθερμη αντίδραση ($\Delta H < 0$) και σχεδιάστηκε η γραφική παράσταση της ενθαλπίας σε συνάρτηση με τη μοριακή αναλογία των δύο πρωτεϊνών. Η καμπύλη που σχεδιάστηκε παρουσίασε αυξανόμενη μορφή μέχρι το κορεσμό της αντίδρασης επιβεβαιώνοντας το σχηματισμό του συμπλόκου με σταθερά αποσύνδεσης 12 μM . Με επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η στοιχειομετρία του συμπλόκου 0.4521, όπου δύο μόρια της πρωτεΐνης A1 αλληλεπίδρασαν με 1 μόριο της A2 (Εικόνα 61).



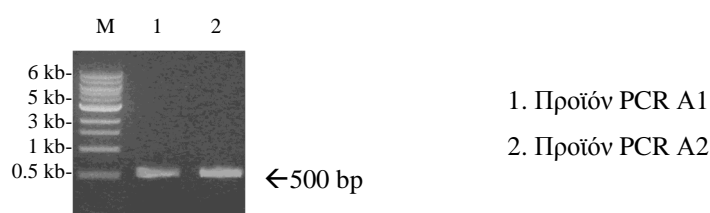
Εικόνα 61: Γραφική παράσταση της ενθαλπίας και της μοριακής αναλογίας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης.

Καθώς οι λειτουργίες των επικρατειών A1 και A2 *in vivo* εξαρτώνται από τις συνθήκες διατμητικής τάσης, είναι πιθανό η αλληλεπίδρασή τους να επηρεάστηκε από το στάδιο της ανάδευσης (400 rpm/min) που απαιτείται για να αποκατασταθεί η χημική ισορροπία στο διάλυμα του κελίου κατά τις εγχύσεις. Παράλληλα, ο μικρός βαθμός καθαρότητας των πρωτεϊνικών διαλυμάτων και το γεγονός ότι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες απομονώθηκαν συγχωνευμένες με τις εξαϊστιδίνες μπορεί να επηρέασαν τα αποτελέσματα της θερμοδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης. Καθώς είναι πιθανό να συνυπολογίστηκε η αλληλεπίδραση των εξαϊστιδινών και άλλων βακτηριακών πρωτεϊνών και να επηρεάστηκε ο σχηματισμός του συμπλόκου από το στάδιο της ανάδευσης, ακολούθησε η κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2 του vWF σε άλλο φορέα έκφρασης και η μελέτη της αλληλεπίδρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών A1 και A2 με φασματοσκοπία φθορισμού.

2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)

2.1. Ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF και κλωνοποίησή τους στο φορέα pSC-A και στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)

Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την αλυσίδα cDNA που κατασκευάστηκε από ενδοθηλιακά κύτταρα πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR και ενισχύθηκαν τα γονίδια A1 και A2 του vWF στα μοριακά μεγέθη 531 bp και 543 bp αντίστοιχα, όπως παραπάνω (Παράγραφος 1.1) (Εικόνα 62).



Εικόνα 62: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-49b(+).

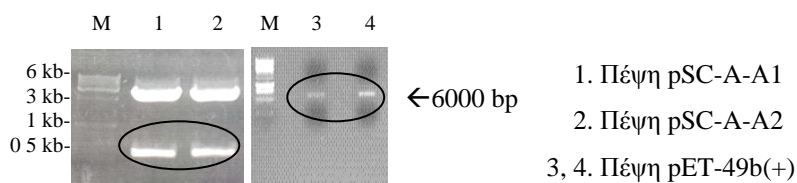
Ακολούθησε η κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2 ξεχωριστά στο φορέα pSC-A, ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* Solopack και η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, όπως παραπάνω (Παράγραφος 1.1). Πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Hind*III (Υλικά και μέθοδοι, 6.2.1) (Εικόνα 63).



Εικόνα 63: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψεων του ανασυνδυασμένου φορέα pSC-A με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Hind*III.

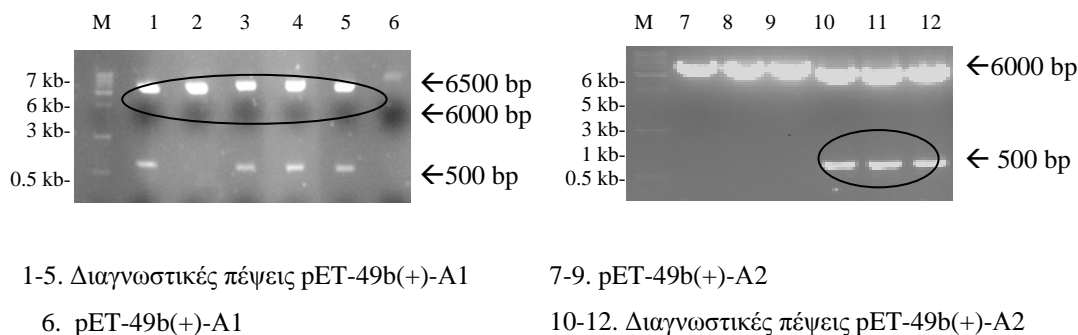
Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που διέθεταν ενθέματα στα επιθυμητά μοριακά μεγέθη αλληλουχίστηκαν και επιβεβαιώθηκαν οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες των γονιδίων A1 και A2 του vWF. Ακολούθησαν πέψεις του φορέα έκφρασης pET-

49b(+)
και των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που διέθεταν τα γονίδια A1 και A2 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Hind*III (Υλικά και μέθοδοι, 6.2.1) (Εικόνα 64).



Εικόνα 64: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των πέψεων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pSC-A και του φορέα pET-49b(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Hind*III.

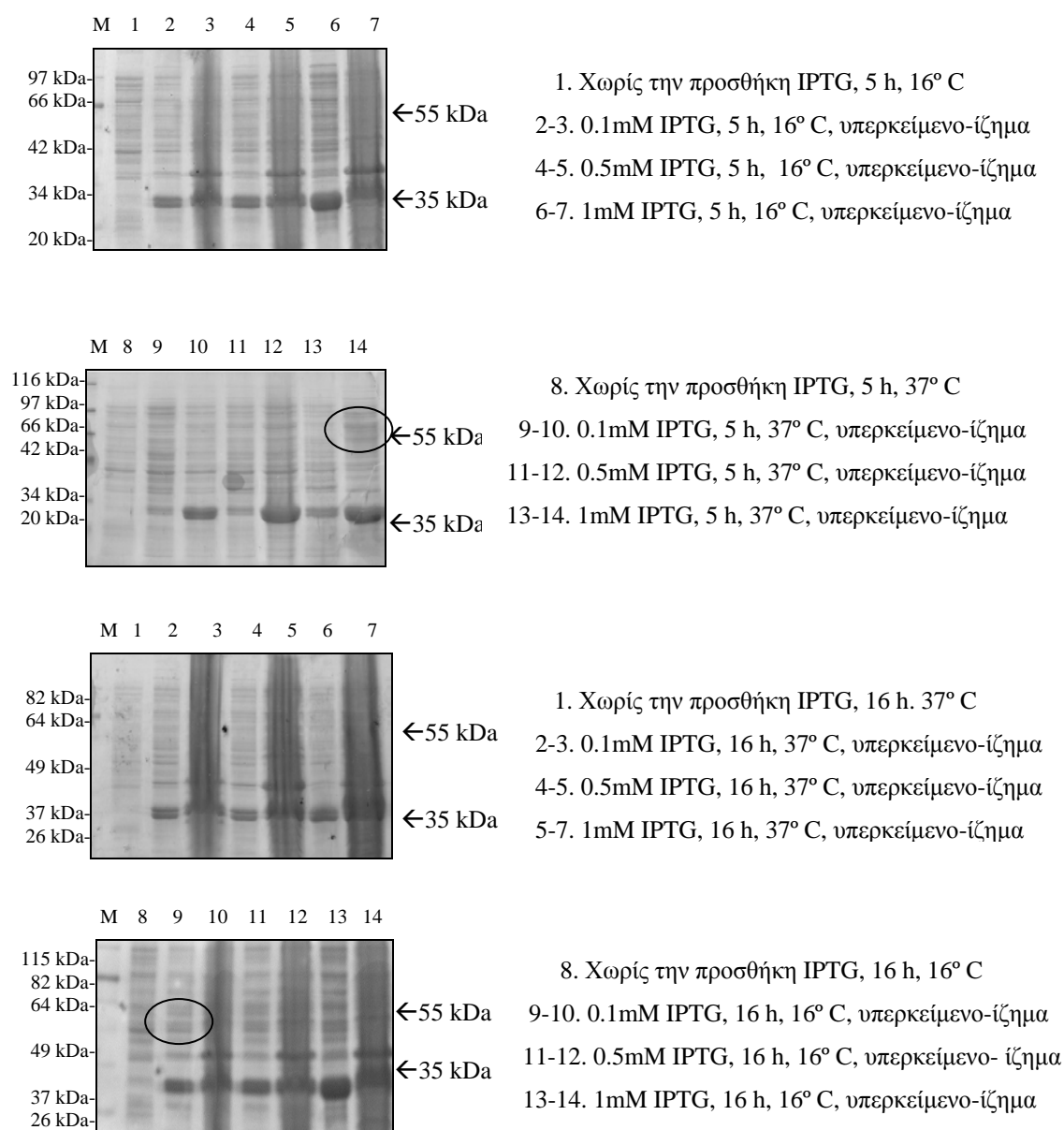
Τα προϊόντα των πέψεων ανακτήθηκαν από την πηκτή και πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις ενοποίησης των γονιδίων A1 και A2 ξεχωριστά στο φορέα έκφρασης pET-49b(+) (Υλικά και μέθοδοι, 6.2.2). Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a και απομονώθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια στα οποία πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Hind*III (Εικόνα 65), όπως παραπάνω. Επιβεβαιώθηκαν τα ενθέματα των γονιδίων A1 και A2 με αλληλούχηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και μετασχηματίστηκαν επιδεκτικά κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21 (DE3).



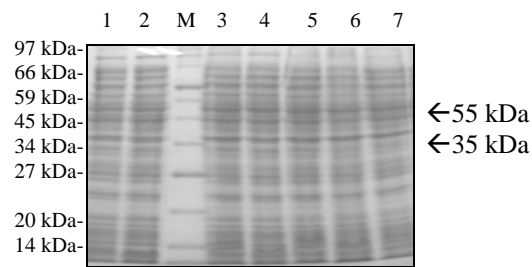
Εικόνα 65: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψεων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET-49b(+) για τον εντοπισμό ενθεμάτων των γονιδίων A1 και A2 του νWF με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Hind*III.

2.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)

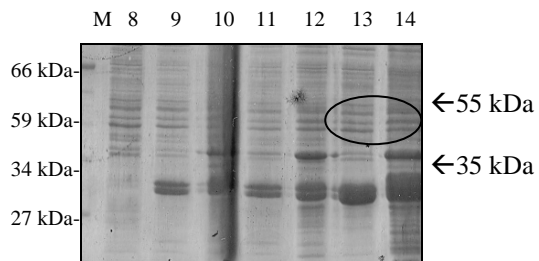
Ακολούθησαν έλεγχοι υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF σε συγκεντρώσεις IPTG 0.1 mM, 0.5 mM και 1 mM για 5 h και 16 h στους 16° C και 37° C υπό ανάδευση στις 180 rpm (*Υλικά και μέθοδοι*, 8.2). Οι επιθυμητές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στα αναμενόμενα μεγέθη των 55 kDa (*Εικόνες 66 και 67*).



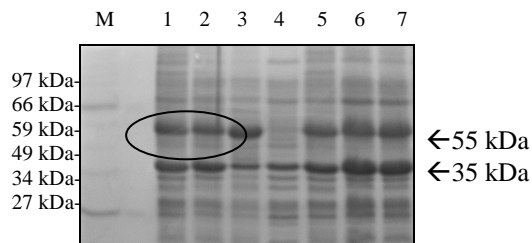
Εικόνα 66: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A1 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+).



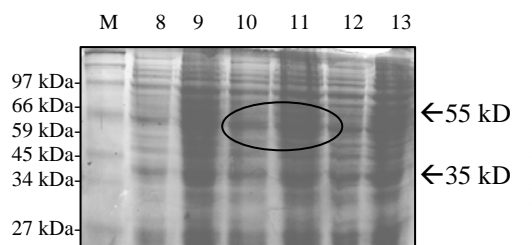
1. Χωρίς την προσθήκη IPTG, 5 h, 16° C
- 2-3. 0.1mM IPTG, 5 h, 16° C, υπερκείμενο- ίζημα
- 4-5. 0.5mM IPTG, 5 h, 16° C, υπερκείμενο- ίζημα
- 6-7. 1mM IPTG, 5 h, 16° C, υπερκείμενο- ίζημα



8. Χωρίς την προσθήκη IPTG, 5 h, 37° C
- 9-10. 0.1mM IPTG, 5 h, 37° C, υπερκείμενο- ίζημα
- 11-12. 0.5mM IPTG, 5 h, 37° C, υπερκείμενο- ίζημα
- 13-14. 1mM IPTG, 5 h, 37° C, υπερκείμενο- ίζημα



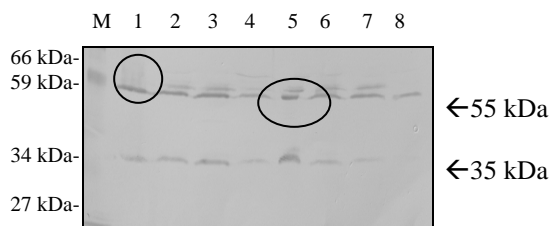
- 1-2. 0.1mM IPTG, 16 h, 16° C, υπερκείμενο- ίζημα
- 3-5. 0.5mM IPTG, 16 h, 16° C, υπερκείμενο- ίζημα
4. Χωρίς την προσθήκη IPTG, 16 h, 16° C
- 6-7. 1mM IPTG, 16 h, 16° C, υπερκείμενο- ίζημα



- 8-9. 0.1mM IPTG, 16 h, 37° C, υπερκείμενο- ίζημα
- 10-11. 0.5mM IPTG, 16 h, 37° C, υπερκείμενο- ίζημα
- 12-13. 1mM IPTG, 16 h, 37° C, υπερκείμενο- ίζημα

Εικόνα 67: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+).

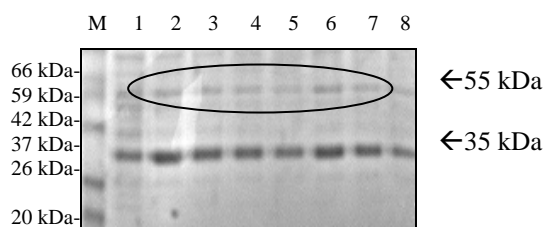
Στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε επαγωγή με 0.1 mM IPTG, για 16 h στους 16° C, και 1 mM IPTG για 5 h στους 37° C, υπό ανάδευση στις 180 rpm ακολούθησε ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη και ανίχνευση με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαϊστιδινών. Παράλληλα με τις επιθυμητές πρωτεΐνες ανιχνεύθηκε η τρανσφεράση της γλουταθειόνης συγχωνευμένη με τις εξαϊστιδίνες στο μέγεθος των 35 kDa (**Εικόνα 68**).



1. A1, 0.1mM IPTG, 16 h, 16° C
2. A1, 1mM IPTG, 5 h, 37° C
3. A1, 0.1mM IPTG, 16 h, 16° C, ζημα
4. A1, 1mM IPTG, 5 h, 37° C, ζημα
5. A2, 0.1mM IPTG, 16 h, 16° C
6. A2, 1mM IPTG, 5 h, 37° C
7. A2, 0.1mM IPTG, 16 h, 16° C, ζημα
8. A2, 1mM IPTG, 5 h, 37° C, ζημα

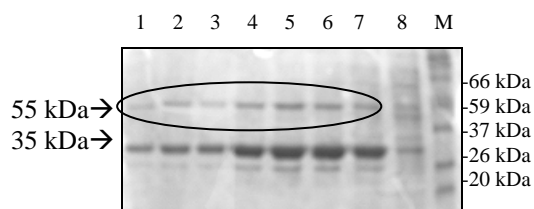
Εικόνα 68: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαισιτιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+).

Επιλέχθηκε η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με την προσθήκη 0.1 mM IPTG για 16 h στους 16° C υπό ανάδευση στις 180 rpm και ακολούθησε η απομόνωσή τους με στήλη χρωματογραφίας αχιστείας με γλουταθειόνη. Οι πρωτεΐνες A1 και A2 εντοπίστηκαν στα αναμενόμενα μεγέθη των 55 kDa (**Εικόνες 69 και 70**). Παράλληλα με την έκλυση των επιθυμητών πρωτεϊνών παρατηρήθηκε και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης συγχωνευμένη με τις εξαισιτιδίνες.



1. Κλάσμα πλύσεων
- 2-8. Κλάσματα εκλύσεων

Εικόνα 69: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A1 του vWF με χρωματογραφία αχιστείας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+).



- 1-7. Κλάσματα εκλύσεων
8. Κλάσμα πλύσεων

Εικόνα 70: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A2 του vWF με χρωματογραφία αχιστείας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+).

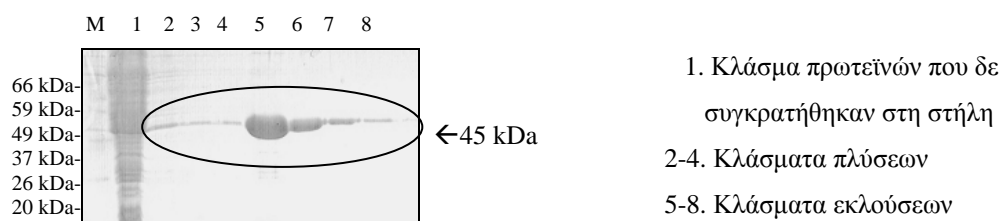
Με ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη και χρήση αντισώματος έναντι των εξαισιτιδινών ανιχνεύθηκαν οι ανασυνδυνασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης συγχωνευμένη με τις εξαισιτιδίνες (**Εικόνα 71**).



Εικόνα 71: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαισιτιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+).

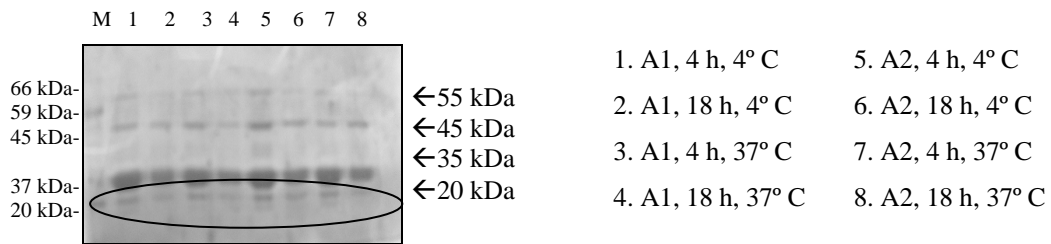
2.3. Απομόνωση της πρωτεάσης HRV 3C και αναζήτηση των βέλτιστων συνθηκών πρωτεόλυσης των ανασυνδυνασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF

Παρόμοια (*Παράγραφος 2.2*) απομονώθηκε η πρωτεάση HRV 3C και εντοπίστηκε στο αναμενόμενο μέγεθος των 45 kDa (**Εικόνα 72**).



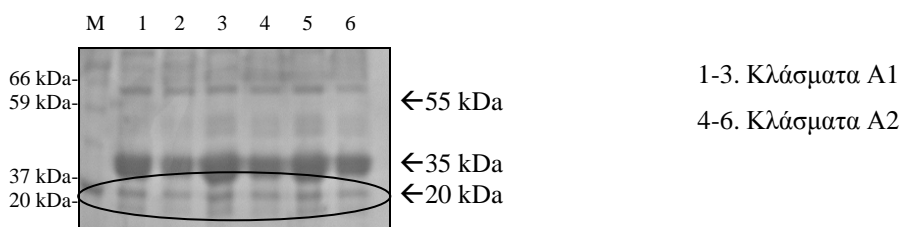
Εικόνα 72: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεάσης HRV 3C με χρωματογραφία αχιστείας.

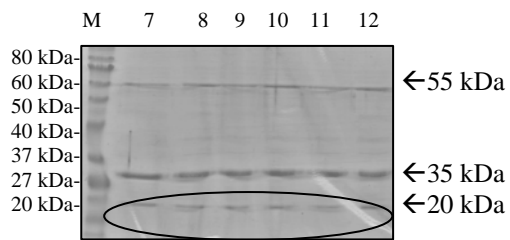
Ακολούθησε η πρωτεόλυση των ανασυνδυνασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 που απομονώθηκαν παραπάνω (*Παράγραφος 2.1*) από την πρωτεάση. Πραγματοποιήθηκε επώαση της πρωτεάσης με τις πρωτεΐνες σε αναλογία 1 mg/10 mg στους 4° C και 37° C για 4 h και 18 h. Μετά από 18 h στους 4° C παρατηρήθηκε η πρωτεόλυση της μεγαλύτερης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Οι επιθυμητές πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF διακρίθηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 20 kDa (**Εικόνα 73**).



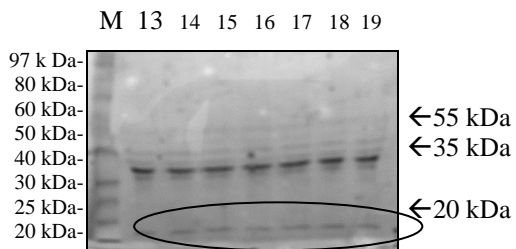
Εικόνα 73: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF από την πρωτεάση HRV 3C σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες.

Ακολούθησε η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 με στήλη χρωματογραφίας αγκιστείας με γλουταθειόνη. Οι πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF εντοπίστηκαν στο επιθυμητό μέγεθος των 20 kDa στα κλάσματα που δε δεσμεύτηκαν στις στήλες. Παράλληλα απομονώθηκε η τρανσφεράση της γλουταθειόνης συγχωνευμένη με τις εξαϊστιδίνες. Επαναλήφθηκε η απομόνωση των κλασμάτων με στήλη χρωματογραφίας αγκιστείας με γλουταθειόνη. Στα κλάσματα που δε δεσμευτήκαν στις στήλες ανιχνεύτηκαν οι επιθυμητές πρωτεΐνες A1 και A2 στο επιθυμητό μέγεθος των 20 kDa. Τα κλάσματα παρουσίασαν μεγαλύτερο βαθμό καθαρότητας αλλά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσής τους. Ακολούθησε πάλι απομόνωση των κλασμάτων με στήλη χρωματογραφία αγκιστείας με γλουταθειόνη, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη καθαρότητα των δειγμάτων. Μετά από την τρίτη απομόνωση μειώθηκε σημαντικά η συγκέντρωση των επιθυμητών πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF και μία ποσότητα της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης συγχωνευμένης με τις εξαϊστιδίνες παρέμεινε στα κλάσματα. (**Εικόνα 74**). Δε συνεχίστηκαν παραπέρα βήματα απομόνωσης των επιθυμητών πρωτεϊνών και χρησιμοποιήθηκαν τα κλάσματα που προέκυψαν από την τρίτη χρωματογραφία αγκιστείας για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών A1 και A2 με φασματοσκοπία φθορισμού.





7-9. Κλάσματα A1
10-12. Κλάσματα A2

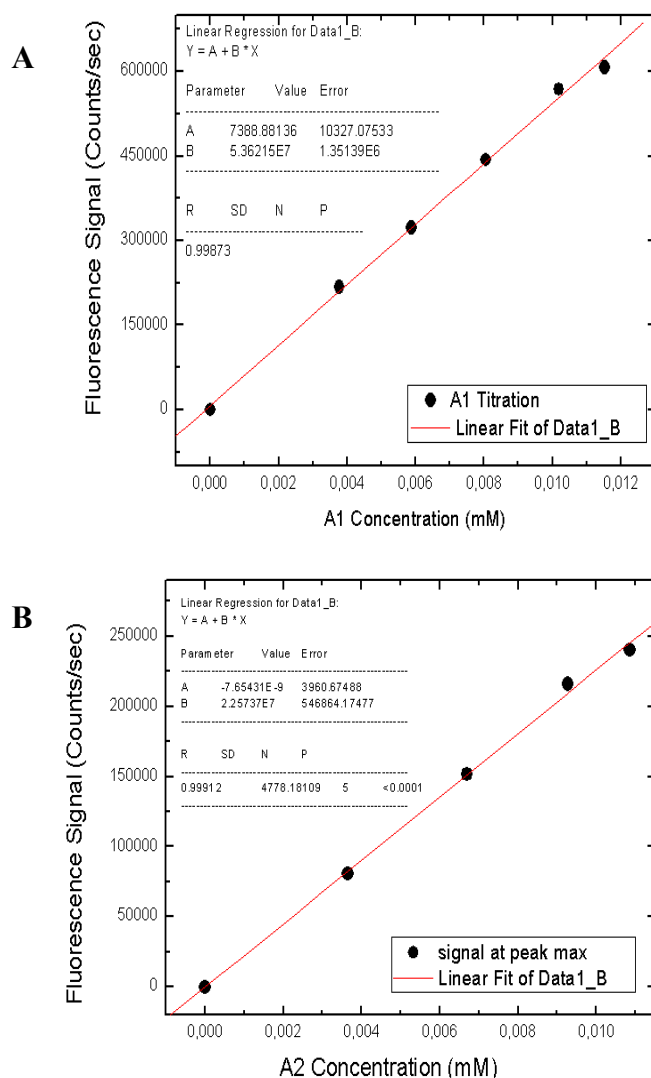


13-15. Κλάσματα A1
16-19. Κλάσματα A2

Εικόνα 74: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων των διαδοχικών απομονώσεων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με χρωματογραφία αχιστείας μετά την πρωτεόλυση.

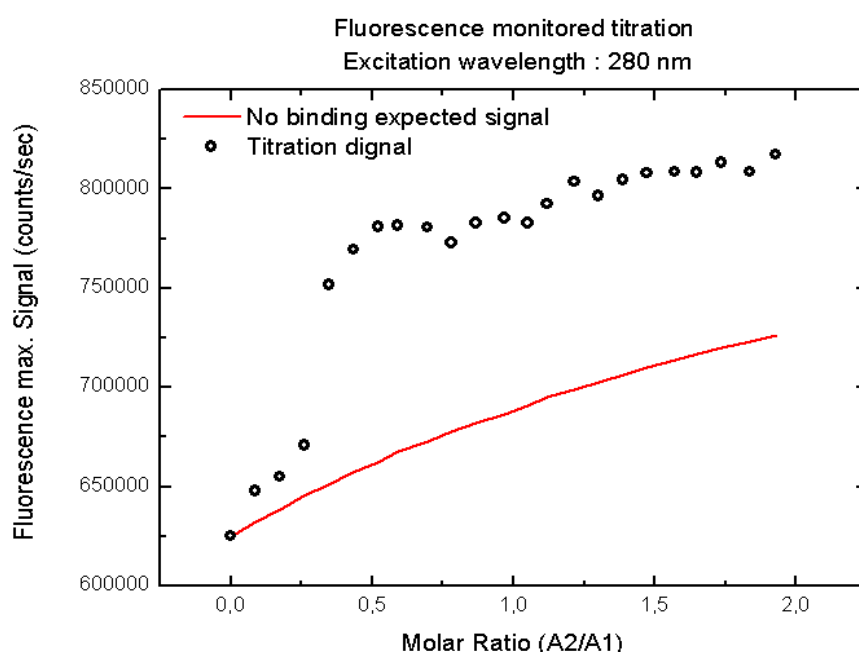
2.4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Φασματοσκοπία Φθορισμού

Αρχικά διεξήχθη λήψη φασμάτων φθορισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF (Παράγραφος 2.3) ξεχωριστά σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις έως 12 μM σε μήκος κύματος απορρόφησης 280nm, όπου παρουσιάζεται η εκλεκτή διέγερση των καταλοίπων θρυπτοφάνης που εκπέμπουν με κορυφή στα 340-350nm. Τα σήματα φθορισμού της πρωτεΐνης A1 κατέγραψαν μέγιστη τιμή 60,0000 χτύπους/sec και της πρωτεΐνης A2 κατέγραψε 250,000 χτύπους/sec και σχεδιάστηκαν οι γραφικές παραστάσεις σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις (**Εικόνα 75**).

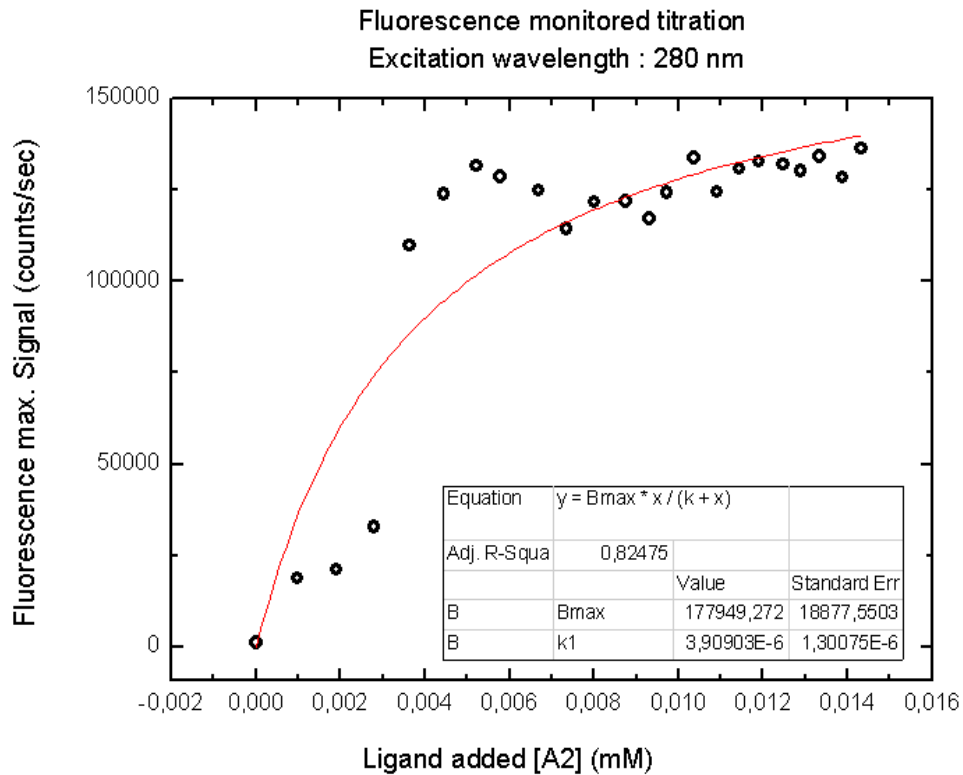


Εικόνα 75: Γραφικές παραστάσεις των σημάτων φθορισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (A) και A2 (B) του vWF ξεχωριστά σε συνάρτηση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (έως 12 μM) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών καταγράφοντας τη μεταβολή της έντασης του σήματος φθορισμού. Διατηρήθηκε σταθερή η συγκέντρωση της πρωτεΐνης A1 (6 μM) και ακολούθησε η προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης A2 (έως 15 μM) στην ίδια ακτινοβολία διέγερσης (280 nm). Εάν δεν υπήρχε αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών, η γραφική παράσταση της μοριακής αναλογίας τους σε συνάρτηση με τα σήματα φθορισμού, θα αποτελούσε συνάθροιση των παραπάνω ευθειών (**Εικόνα 76**). Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των σημάτων φθορισμού σε συνάρτηση με τη μοριακή αναλογία των δύο πρωτεϊνών σχεδιάστηκε μια καμπύλη που παρουσίασε αυξανόμενη μορφή και παρέμεινε σταθερή μετά τον κορεσμό της αντίδρασης επιβεβαιώνοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών A1 και A2. Η σταθερά αποσύνδεσης του συμπλόκου υπολογίστηκε 4 μM με μεγάλο ποσοστό θορύβου (**Εικόνα 77**).



Εικόνα 76: Συνάρτηση των φασμάτων φθορισμού και της μοριακής αναλογίας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm. Σημειώνονται τα σήματα φθορισμού (κουκίδες) και η ευθεία που θα προέκυπτε αν δεν υπήρχε αλληλεπίδραση.



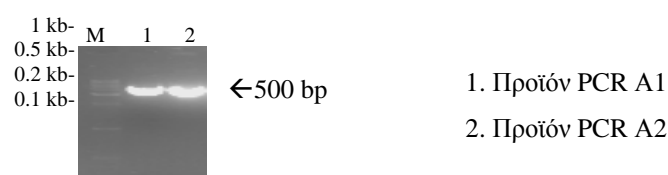
Εικόνα 77: Γραφική παράσταση των φασμάτων φθορισμού και της αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (έως 15 μ M) προστιθέμενης σε σταθερή συγκέντρωση της ανασυνδασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (1 μ M) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.

Το μεγάλο ποσοστό θορύβου οφειλόταν στη μικρή συγκέντρωση και καθαρότητα των ανασυνδασμένων πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη. Λόγω των προβλημάτων απομόνωσης των πρωτεϊνών, τα γονίδια A1 και A2 του vWF κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET-M60. Επιλέχθηκε αυτός ο φορέας, καθώς κωδικοποιεί τις ανασυνδασμένες πρωτεΐνες συγχωνευμένες με μια πρωτεΐνη συνοδό (chaperone), συμβάλλοντας στην παραγωγή μεγαλύτερων συγκεντρώσεών τους για τη μελέτη τους.

3. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60

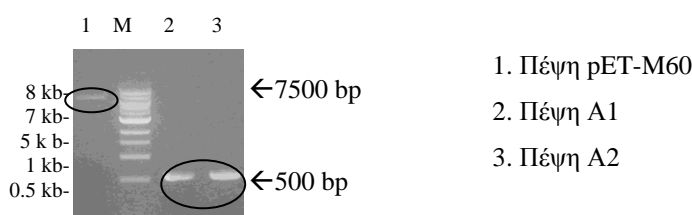
3.1. Ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF και κλωνοποίησή τους στο φορέα έκφρασης pET-M60

Τα γονίδια A1 και A2 του vWF ενισχύθηκαν με αντίδραση PCR στα αναμενόμενα μοριακά μεγέθη 531 bp και 543 bp αντίστοιχα χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο cDNA αλυσίδα που κατασκευάστηκε από ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως παραπάνω (Παράγραφος 1.1) (Εικόνα 78).



Εικόνα 78: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60.

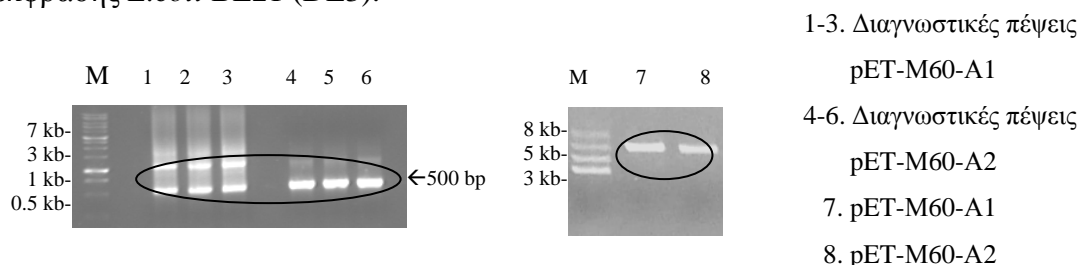
Ακολούθησαν οι πέψεις των γονιδίων A1 και A2 και του φορέα έκφρασης pET-M60 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF* (Υλικά και μέθοδοι, 6.2.1) (Εικόνα 79).



Εικόνα 79: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 12% των πέψεων των γονιδίων A1 και A2 του vWF και του φορέα έκφρασης pET-M60 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF*.

Ακολούθησε η ανάκτηση των προϊόντων των πέψεων από την πηκτή και η αντίδραση κλωνοποίησης των γονιδίων A1 και A2 ξεχωριστά στο φορέα έκφρασης pET-M60, όπως παραπάνω (Υλικά και μέθοδοι, 6.2.2). Μετασηματίστηκαν επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5a, απομονώθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και ακολούθησαν διαγνωστικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF* (Υλικά και μέθοδοι, 6.2.1) και τα ενθέματα εντοπίστηκαν στα

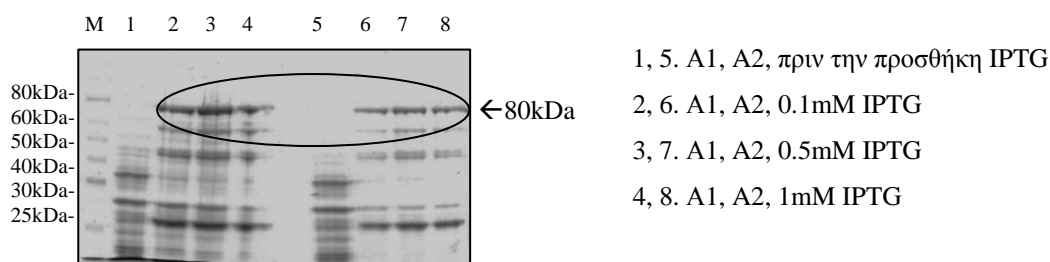
αναμενόμενα μοριακά μεγέθη των γονιδίων A1 και A2 (**Εικόνα 80**). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση ότι διέθεταν τα ενθέματα των γονιδίων A1 και A2 του vWF μετασημάτισαν επιδεικτικά κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21 (DE3).



Εικόνα 80: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% του ανασυνδυασμένου φορέα έκφρασης pET-M60 και των διαγνωστικών πέψεων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF*.

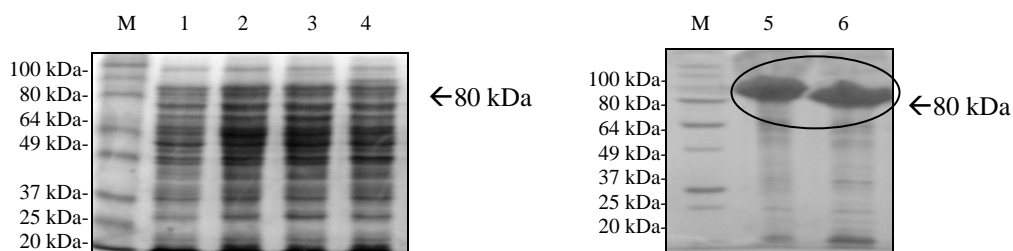
3.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60

Ακολούθησαν έλεγχοι υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με την προσθήκη IPTG σε συγκεντρώσεις 0.1 mM, 0.5 mM και 1mM για 16 h στους 16° C υπό ανάδευση στις 180 rpm (*Υλικά και μέθοδοι*, 8.2) και εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa (**Εικόνα 81**).



Εικόνα 81: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF σε κύτταρα έκφρασης μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.

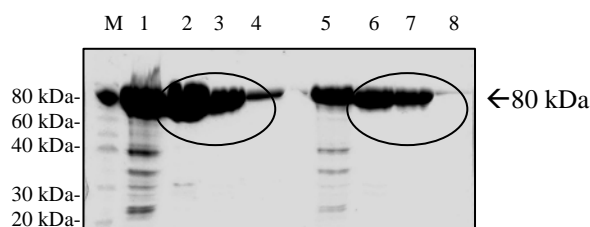
Επιλέχθηκε η επαγωγή με την προσθήκη 0.1 mM IPTG για 16 h στους 16° C υπό ανάδευση στις 180 rpm και ακολούθησε η λύση των κυττάρων (*Υλικά και μέθοδοι*, 8.2). Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa (**Εικόνα 82**).



- 1, 4. A1, A2, πριν την προσθήκη IPTG
 2, 5. A1, 0.1mM IPTG, 16 h, 16° C, υπερκείμενο, ίζημα
 3, 6. A2, 0.1mM IPTG, 16 h, 16° C, υπερκείμενο, ίζημα

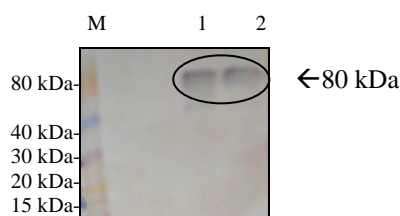
Εικόνα 82: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF στο φορέα έκφρασης pET-M60.

Ακολούθησε η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου (Υλικά και μέθοδοι, 8.2) και εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa (**Εικόνα 83**). Η παρουσία των επιθυμητών πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση των εκλουσμάτων σε μεμβράνη και ανίχνευση με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών (**Εικόνα 84**).



1. Σύνολο πρωτεϊνών πριν την απομόνωση A1
 2-4. Κλάσματα εκλούσεων A1
 5. Σύνολο πρωτεϊνών πριν την απομόνωση A2
 6-8. Κλάσματα εκλούσεων A2

Εικόνα 83: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60 με χρωματογραφία συγγένειας.

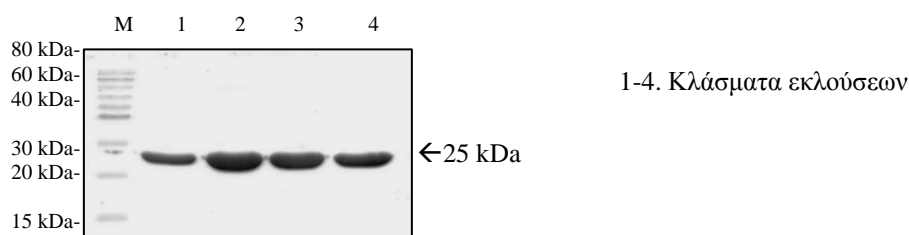


1. A1
 2. A2

Εικόνα 84: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.

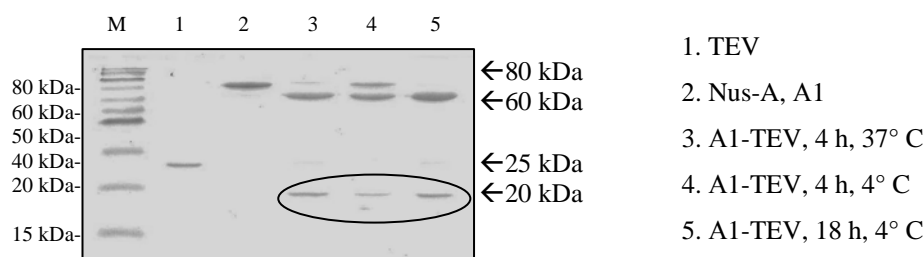
3.3. Απομόνωση της πρωτεάσης TEV και αναζήτηση των βέλτιστων συνθηκών πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF

Η πρωτεάση TEV απομονώθηκε με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου όπως παραπάνω (Παράγραφος 3.2) και εντοπίστηκε στο αναμενόμενο μέγεθος των 25 kDa (**Εικόνα 85**).



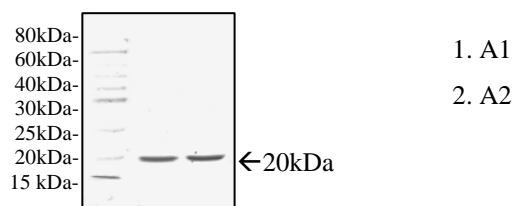
Εικόνα 85: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεάσης TEV με χρωματογραφία συγγένειας.

Ακολούθησε η πρωτεόλυση των εκλουσμάτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF. Πραγματοποιήθηκε επώαση της πρωτεάσης και των πρωτεϊνών σε αναλογία 1 mg/10 mg στους 4° C και 37° C για 4 h και 18 h και οι επιθυμητές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 20 kDa (**Εικόνα 86**).



Εικόνα 86: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων ελέγχου πρωτεόλυσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF από την πρωτεάση TEV σε διαφορετικούς χρόνους και θερμοκρασίες.

Επιλέχθηκαν οι συνθήκες επώασης για 18 h στους 4° C και ακολούθησε η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου (Υλικά και μέθοδοι, 8.2). Οι επιθυμητές πρωτεΐνες που δε δεσμεύτηκαν στη στήλη εντοπίστηκαν στα αναμενόμενα μεγέθη των 20 kDa (**Εικόνα 87**).

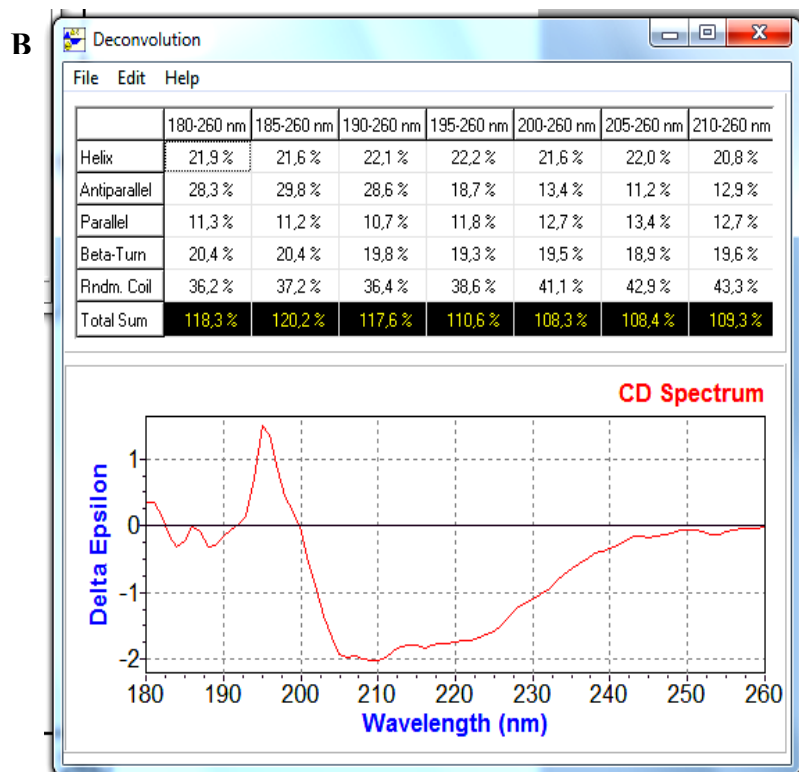
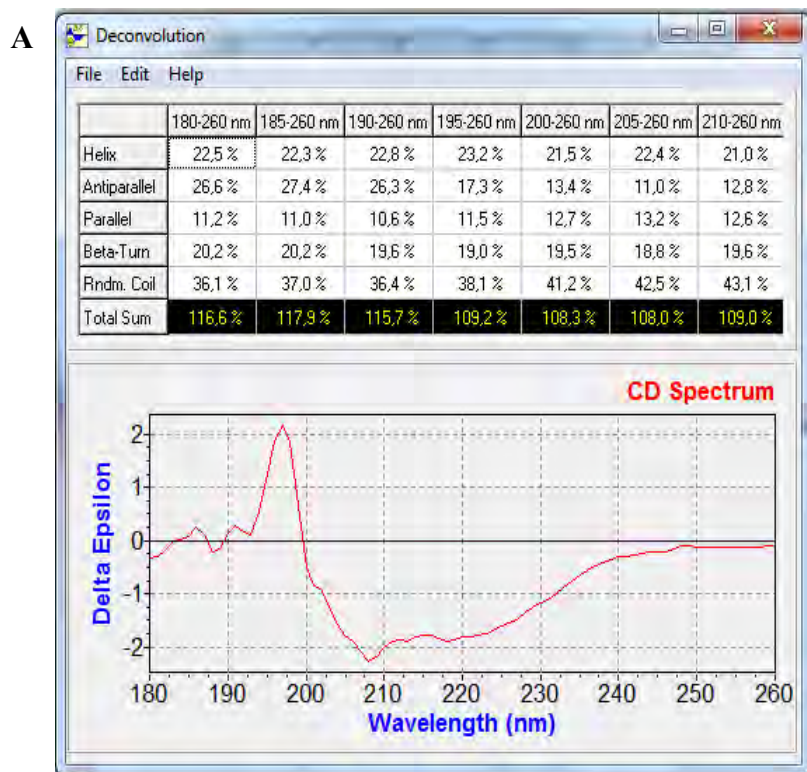


Εικόνα 87: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά την πρωτεόλυση.

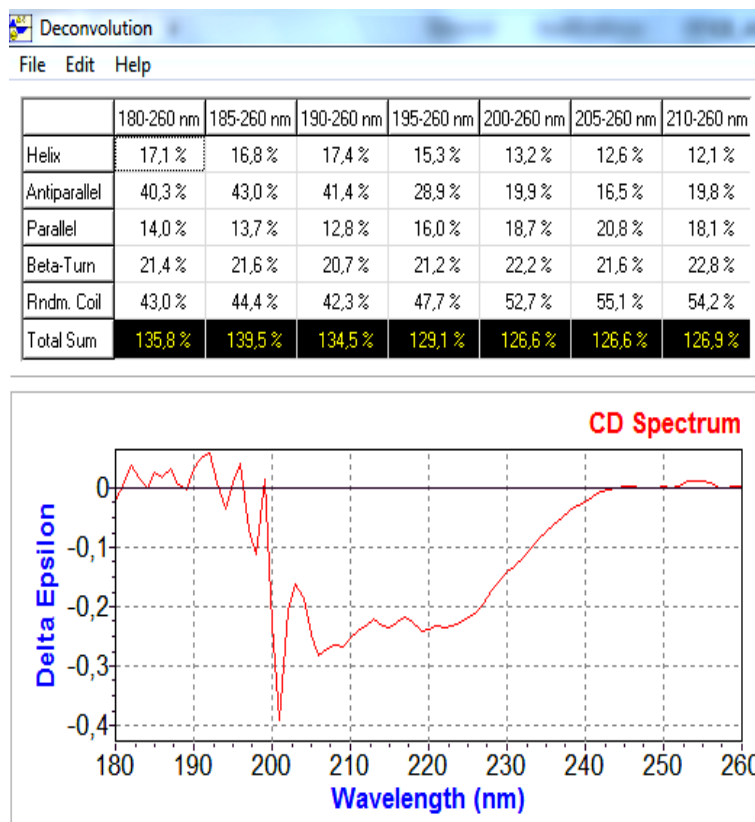
3.4. Μελέτη των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού (CD)

Ακολούθησαν οι αναλύσεις φασμάτων κυκλικού διχρωισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF ξεχωριστά (Παράγραφος 3.3), προκειμένου να διαπιστωθεί η σταθερότητα της δομής τους. Τα φάσματα CD ελήφθησαν στη περιοχή του άπω υπεριώδους σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 300 mM NaCl στους 5° C και η συγκέντρωση της κάθε πρωτεΐνης ήταν 0.15 mg/ml. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία (Helma) με μήκος διαδρομής 1 nm και οι υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του προγράμματος ανάλυσης CDNN (Bohm *et al.* 1992). Το ποσοστό της α έλικας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 που προέκυψε ήταν 21.5% και της A2 21.6% και το ποσοστό των β πτυχωτών επιφανειών και των δύο πρωτεϊνών 19.5% (συνολικά παράλληλα και αντιπαράλληλα) (**Εικόνα 88**).

Ακολούθησε η καταγραφή CD του μίγματος των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF, όπου διατηρήθηκαν ακριβώς οι ίδιες συνθήκες. Η προσαρμογή των δεδομένων έγινε θεωρώντας όλα τα μόρια στη μορφή του συμπλόκου και κανονικοποιώντας ως προς το ανάλογο μοριακό βάρος και τον αριθμό των αμινοξικών καταλοίπων. Το ποσοστό της α έλικας του μίγματος που προέκυψε ήταν 13.2% και το ποσοστό των β πτυχωτών επιφανειών 22.5% (συνολικά παράλληλα και αντιπαράλληλα). Στο διάγραμμα που σχεδιάστηκε μετά την από τη σύνθεση αυτών των στοιχείων παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή της δευτεροταγούς δομής (**Εικόνα 89**).

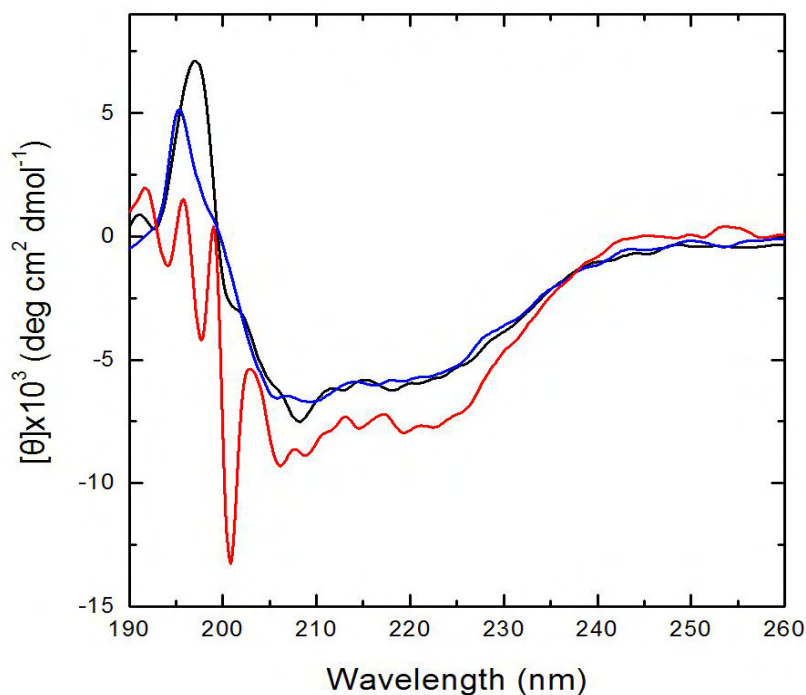


Εικόνα 88: Ανάλυση φασμάτων CD των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (0.15 mg/ml) (A) και A2 (0.15 mg/ml) (B) του νWF, όπου παρουσιάζεται το ποσοστό συμμετοχής κάθε στοιχείου της δευτεροταγούς δομής ανάλογα με το εύρος του φάσματος. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η καμπύλη που προέκυψε θεωρητικά από τη σύνθεση αυτών των στοιχείων.



Εικόνα 89: Ανάλυση φασμάτων CD του μίγματος των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF, όπου παρουσιάζεται το ποσοστό συμμετοχής κάθε στοιχείου της δευτεροταγούς δομής ανάλογα με το εύρος του φάσματος. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η καμπύλη που προέκυψε θεωρητικά από τη σύνθεση αυτών των στοιχείων.

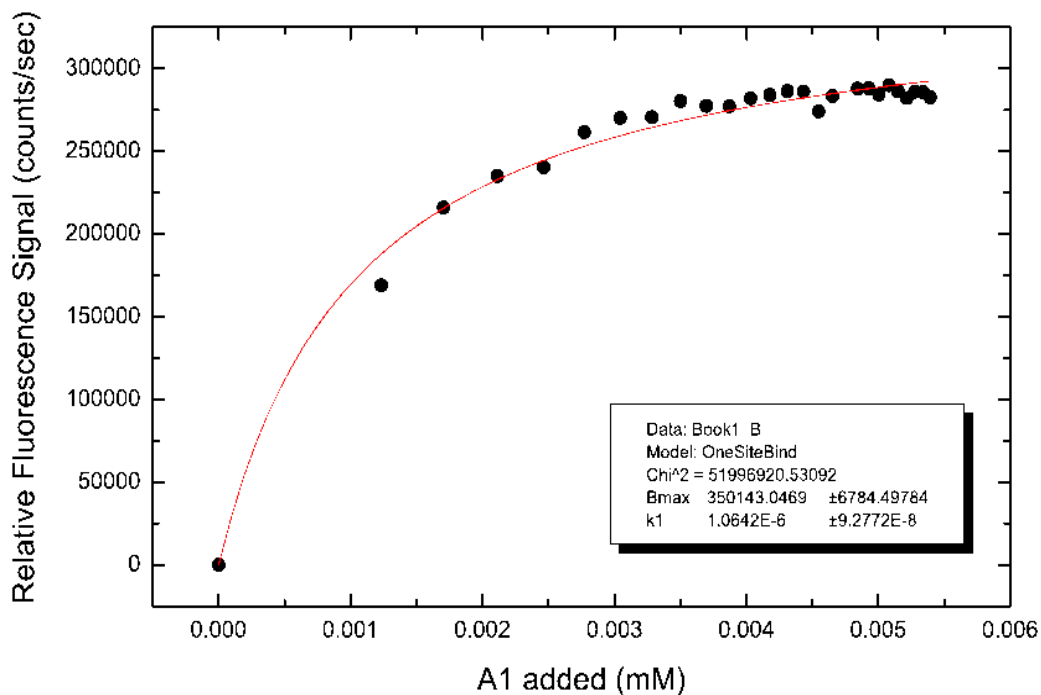
Η αλλαγή της δευτεροταγούς δομής κατά τη μελέτη του μίγματος ερμηνεύτηκε ως μεταβολή της δομικής διαμόρφωσης της μίας πρωτεΐνης ή και των δύο λόγω του σχηματισμού συμπλόκου (**Εικόνα 90**). Καθώς είναι γνωστή η χαρακτηριστική ικανότητα αποδιάταξης της επικράτειας A2 σε ορισμένο εύρος τάσεων, θεωρήθηκε πιθανότερο να ευθύνεται για αυτήν την αλλαγή της δευτεροταγούς δομής κάποια δομική μεταβολή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 κατά το σχηματισμό του συμπλόκου (Zhang *et al.* 2009).



Εικόνα 90: Φάσματα CD των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (μαύρο) και A2 (μπλε) του vWF και του συμπλόκου τους (κόκκινο) στην περιοχή του άπω υπεριώδους.

3.5. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με Φασματοσκοπία Φθορισμού

Ακολούθησε η μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF (Παράγραφος 3.3) σε συνάρτηση με τη μεταβολή της έντασης του σήματος φθορισμού. Το φάσμα φθορισμού ελήφθη στο μήκος κύματος 280 nm, όπου παρουσιάζεται η εκλεκτική διέγερση των καταλοίπων θρυπτοφάνης που εκπέμπουν με κορυφή στα 340-350 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης A2 παρέμενε σταθερή (2 μM) και ακολουθούσε η προσθήκη της A1 σε αυξανόμενη συγκέντρωση (έως 6 μM) σε διάλυμα 50 mM Tris (pH 7.5), 300 mM NaCl. Από το σήμα φθορισμού που καταγράφηκε σε συνάρτηση με την αυξανόμενη συγκέντρωση της πρωτεΐνης A1 σχεδιάστηκε μια καμπύλη όπως και παραπάνω (Παράγραφος 3.4). Η καμπύλη επιβεβαίωσε την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών και υπολογίστηκε η σταθερά αποσύνδεσης του συμπλόκου 1 μM (Εικόνα 91).



Εικόνα 91: Συνάρτηση φασμάτων φθορισμού και αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (6 μ M) προστιθέμενης σε σταθερή συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 (2 μ M) του vWF σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.

4. Υπολογιστική μελέτη του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 του vWF

4.1 Σχεδιασμός των πιθανών μοντέλων αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF

Οι μελέτες στη συνέχεια επικεντρώθηκαν στα ακριβή σημεία αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF καθώς και στη δομή του συμπλόκου τους με την εφαρμογή της πρόβλεψης πρόσδεσης «docking» σε συνδυασμό με προσομοιώσεις ΜΔ. Με τη χρήση του προγράμματος HEX προέκυψαν τα μοντέλα αλληλεπίδρασης και επιλέχθηκαν τα πιθανότερα με βάση δομικές και βιοχημικές πληροφορίες. Καθώς η επικράτεια A2 παρεμποδίζει την πρόσδεση της A1 στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και στη βοτροσετίνη (botrocetin) (Matsushita *et al.* 1993, Lenting *et al.* 2007), η διεπιφάνεια του συμπλόκου είναι λογικό να διαθέτει κοινά κατάλοιπα με αυτά τα μόρια. Με τη χρήση των επιλυμένων κρυσταλλικών δομών των συμπλόκων A1-GPIIb (PDB:1SQ0) και A1-βοτροσετίνη (botrocetin) (PDB:1U0N) επιλέχθηκαν

18 μοντέλα που ικανοποιούσαν την προσέγγιση. Ακόμη, θεωρήθηκε ότι θα πρέπει να υπάρχει ομοιότητα ακολουθίας της επικράτειας A2 με τον υποδοχέα GPIIb και τη βοτροσετίνη (botrocetin) στα κατάλοιπα που μετέχουν στη διεπιφάνεια των συμπλόκων A1-GPIIb και A1-botrocetin.

Εντοπίστηκαν τα τρία ενεργειακά ευνοϊκότερα μοντέλα συμπλόκου (με την αρνητικότερη ενέργεια αλληλεπίδρασης) που ονομάστηκαν Α, Β και Γ και ακολούθησε εξισορρόπηση για 2 ns και ελαχιστοποίηση ενέργειας με προσομοιώσεις ΜΔ. Τα Ca άτομα της επικράτειας A1 διατηρήθηκαν ακίνητα κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων του συμπλόκου, ώστε να είναι άμεσα συγκρίσιμες οι δομές των συμπλόκων μετά την εξισορρόπηση (*Εικόνα 92*).



Εικόνα 92: Τα τρία πιθανότερα μοντέλα αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 (λευκό) και A2. Διακρίνονται οι πιθανές διατάξεις της επικράτειας A2 του vWF, A (πορτοκαλί), B (μωβ) και Γ (γαλάζιο).

Η προσέγγιση δικαιολογείται, καθώς έχει διαπιστωθεί πειραματικά (Auton *et al.* 2007) και με προσομοιώσεις ΜΔ (Pentas 2010) η εξαιρετική ανθεκτικότητα της επικράτειας A1 έναντι της θερμοκρασίας και αποδιατακτικών παραγόντων όπως η ουρία. Από τη σύγκριση των δομών μετά από εξισορρόπηση και ελαχιστοποίηση ενέργειας προέκυψαν οι παρακάτω παρατηρήσεις:

- 1) Οι εξισορροπημένες δομές των επικρατειών A1 και A2 εμφανίζουν μικρές αναμενόμενες διαφορές σε σχέση με τις αντίστοιχες κρυσταλλικές (RMSD_A1=0.9841 Å, RMSD_A2=0.9271 Å).

2) Η εξισορροπημένη δομή της επικράτειας A2 στο σύμπλοκο παρουσιάζει δομικές διαφορές σε σχέση με την απομονωμένη μορφή που αντικατοπτρίζονται στο RMSD (A2_A=2.3117 Å, A2_B=2.1830 Å, A2_Γ=2.4848 Å) και στο ποσοστό δευτεροταγούς δομής (**Πίνακας 17**). Η δευτεροταγής δομή της επικράτειας A2 στα μοντέλα A, B και Γ εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με την κρυσταλλική, όπως παρατηρήθηκε και στα πειράματα CD (Παράγραφος 4.4). Ωστόσο η έκταση των πειραματικών δομικών αλλαγών της A2 δεν ήταν δυνατόν να αναπαραχθεί με τις προσομοιώσεις.

Πίνακας 17: Ποσοστά δευτεροταγούς δομής των κρυσταλλικών και εξισορροπημένων επικρατειών A1 και A2 του vWF σε μορφή συμπλόκου και μεμονωμένες.

Μοντέλο	Εξισορρόπηση-Ελαχιστοποίηση 300K	A-έλικα %	B-έλασμα %
A	A2-συμπλ.	32.8	20.1
B	A2-συμπλ.	31.0	20.1
Γ	A2-συμπλ.	32.2	21.3
	A2-κρυστ.	38.4	22.6
	A1-κρυστ.	37.2	21.3
	A2-μόνη	34.5	23.0
	A1-μόνη	37.2	22.7

4.2. Χαρακτηρισμός της διεπιφάνειας του συμπλόκου των μοντέλων A, B και Γ

Ακολούθησε ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός της διεπιφάνειας του συμπλόκου και προσδιορίστηκαν τα αμινοξέα που συμμετέχουν σε αυτήν (**Πίνακες 18 και 19**). Το μοντέλο A παρουσιάζει το μεγαλύτερο εμβαδόν διεπιφάνειας (752 Å²) καθώς και το μεγαλύτερο πλήθος καταλοίπων στην διεπιφάνεια (24) με το μικρότερο ποσοστό φορτισμένων καταλοίπων (30%). Το μοντέλο Γ παρουσιάζει το μεγαλύτερο αριθμό ιοντικών γεφυρών (40). Οι δεσμοί υδρογόνου δε διαφοροποιούνται μεταξύ των μοντέλων. Στη διεπιφάνεια του μοντέλου A εντοπίστηκε ο επίτοπος του αντισώματος VP-1 (Leu1591-Tyr1605) έναντι της επικράτειας A2 που παρεμποδίζει την πρόσδεση στον vWF. Στη διεπιφάνεια όλων των μοντέλων αλληλεπικαλύπτεται η περιοχή πρόσδεση της βοτροσετίνης (botrocetin) (Arg1395, Arg1399 και Gln1402) και της επικράτειας A2 στην A1.

Πίνακας 18: Οι παράμετροι της διεπιφάνειας των μοντέλων αλληλεπίδρασης A, B και Γ των επικρατειών A1 και A2 του vWF, όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ProtorP (Reynolds et al. 2009).

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 19: Τα κατάλοιπα που εντοπίζονται στη διεπιφάνεια των μοντέλων αλληλεπίδρασης A, B και Γ του vWF, όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ProtorP (Reynolds et al. 2009).

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				

Ακόμη, ταυτοποιήθηκαν ιεραρχημένα οι ιοντικές γέφυρες στην διεπιφάνεια του συμπλόκου των μοντέλων (**Πίνακας 20**). Στη διεπιφάνεια του μοντέλου A συμμετέχει με ιοντική γέφυρα το κατάλοιπο Ile1372 του οποίου η μετάλλαξη σε Ser σχετίζεται με vWD 2B. Σταθερότερο μοντέλο παρουσιάστηκε το A, με ελεύθερη ενέργεια σχηματισμού -2277.8 kcal/mol, χαμηλότερη από του B (-2255.8 kcal/mol) και του Γ (-2204.7 kcal/mol).

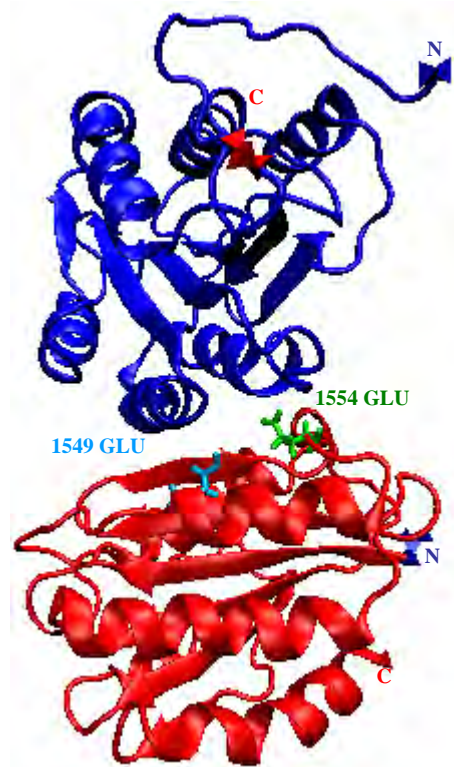
Πίνακας 20: Οι δέκα πιο σημαντικές ιοντικές γέφυρες που αναπτύσσονται στις διεπιφάνειες των μοντέλων A, B και Γ του vWF, όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα FastContact (Champ et al. 2007).

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

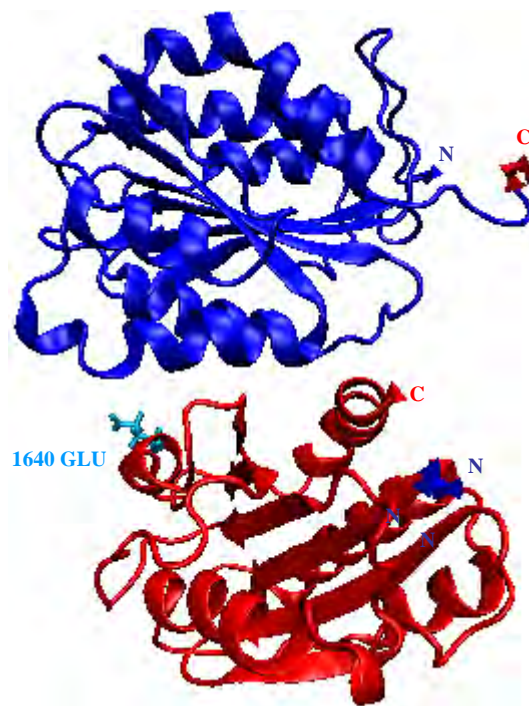
Τα κατάλοιπα Glu¹⁵⁴⁹ και Glu¹⁵⁵⁴ του μοντέλου A, Glu¹⁶⁴⁰ του μοντέλου B και Glu¹⁵¹¹, Glu¹⁵¹⁹, Glu¹⁵²² και Asp¹⁶⁶³ του μοντέλου Γ της επικράτειας A2 που συμμετέχουν στο σχηματισμό ιοντικών γεφυρών θεωρήθηκαν τα πιο αποφασιστικά για τη σταθερότητα του συμπλόκου καθώς εντοπίζονται στην κεντρική περιοχή της αλληλεπίδρασης (**Εικόνες 93, 94 και 95**). Προκειμένου να ερευνηθεί πιο μοντέλο από τα τρία είναι πιθανότερο να ισχύει, επιλέχθηκε η μετάλλαξη των καταλοίπων Glu¹⁵⁴⁹, Glu¹⁶⁴⁰ και Glu¹⁵¹¹ αντίστοιχα στα μοντέλα A, B και Γ σε αλανίνες, ώστε να μελετηθεί η μεταβολή της σταθερότητας του συμπλόκου (**Πίνακας 21**).

Πίνακας 21: Σχεδιασμός μεταλλάξεων του γονιδίου A2 του vWF στα μοντέλα A, B και Γ

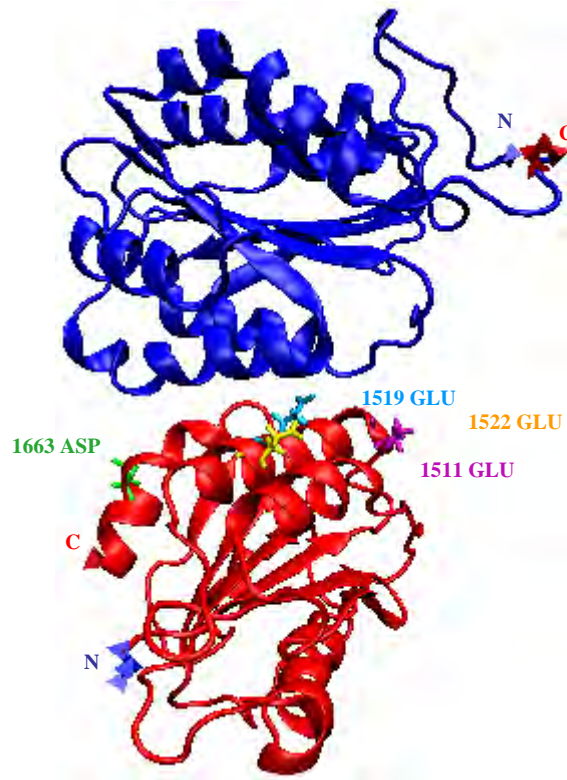
Μοντέλο	Σημειακή Μετάλλαξη	Μετάλλαξη καταλοίπου
A	GAG-GCG	Glu ¹⁵⁴⁹ → Ala ¹⁵⁴⁹
B	GAG-GCG	Glu ¹⁶⁴⁰ → Ala ¹⁶⁴⁰
Γ	GAG-GCA	Glu ¹⁵¹¹ → Ala ¹⁵¹¹



Εικόνα 93: Το μοντέλο A του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF, όπως σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα VMD. Διακρίνονται τα κατάλοιπα της διεπιφάνειας Glu¹⁵⁴⁹ (γαλάζιο) και Glu¹⁵⁵⁴ (πράσινο) και τα αμινοτελικά (μπλε) και καρβοξυτελικά άκρα (κόκκινο).



Εικόνα 94: Το μοντέλο B του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF, όπως σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα VMD. Διακρίνεται το κατάλοιπο της διεπιφάνειας Glu¹⁶⁴⁰ (γαλάζιο) και τα αμινοτελικά (μπλε) και καρβοξυτελικά άκρα (κόκκινο).



Εικόνα 95: Το μοντέλο Γ του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF, όπως σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα VMD. Διακρίνονται τα κατάλοιπα της διεπιφάνειας Glu¹⁵¹¹ (μωβ), Glu¹⁵¹⁹ (γαλάζιο) Glu¹⁵²² (κίτρινο) και Asp¹⁶⁶³ (πράσινο) και τα αμινοτελικά (μπλε) και καρβοξυτελικά άκρα (κόκκινο).

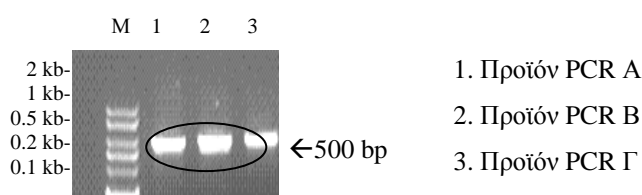
5. Παραγωγή και μελέτη των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών της επικράτειας A2 του vWF κατά τα μοντέλα αλληλεπίδρασης A, B και Γ

5.1. Εισαγωγή μεταλλάξεων στο γονίδιο A2 του vWF

Για την εισαγωγή μεταλλάξεων στην επικράτεια A2 κατά τα μοντέλα A, B και Γ σχεδιάστηκαν αντίστοιχοι εκκινητές για την περιοχή του γονιδίου A2 του vWF (Υλικά και μέθοδοι, 7). Τα μεταλλαγμένα γονίδια και οι πρωτεΐνες ονομάστηκαν αντίστοιχα με τα μοντέλα A, B και Γ. Μετά την πέψη των προϊόντων PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση *DpnI* και το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* XL1-Blue, απομονώθηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και ακολούθησε η αλληλούχησή τους που επιβεβαίωσε την εισαγωγή των επιθυμητών μεταλλάξεων.

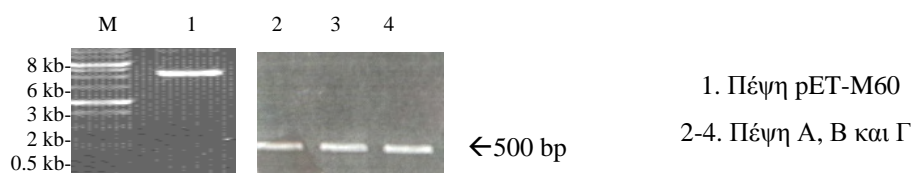
5.2. Κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ) του vWF στο φορέα έκφρασης pET-M60

Τα μεταλλαγμένα γονίδια A, B και Γ του vWF κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά στο φορέα έκφρασης pET-M60, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα ανασυνδυσμένα πλασμίδια pET-49b(+) που διέθεταν τα ενθέματα. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί για την ενίσχυση του γονιδίου A2 του vWF και την κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60 (Υλικά και μέθοδοι, 6.2.2) και τα μεταλλαγμένα γονίδια εντοπίστηκαν στα αναμενόμενα μοριακά μεγέθη 543 bp (Εικόνα 96).



Εικόνα 96: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ) του vWF για την κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60.

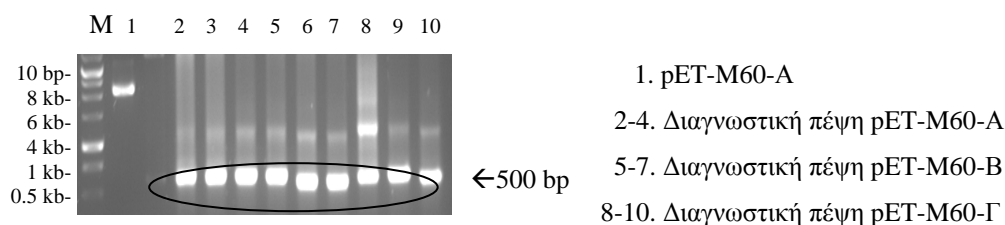
Ακολούθησαν πέψεις των προϊόντων PCR και του φορέα έκφρασης pET-M60 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF*, όπως παραπάνω (Παράγραφος 3.1) (Εικόνα 97).



Εικόνα 97: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των πέψεων του φορέα έκφρασης pET-M60 και των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ) του vWF με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF*.

Μετά από εκτομή των προϊόντων των πέψεων από την πηκτή πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ενοποίησης κάθε μεταλλαγμένου γονιδίου ξεχωριστά στο φορέα έκφρασης pET-M60, όπως παραπάνω (Παράγραφος 3.1). Μετασηματίστηκαν επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5a και απομονώθηκαν ανασυνδυασμένα πλασμίδια στα οποία πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF* (Υλικά και μέθοδοι, 6.2.1) και εντοπίστηκαν ενθέματα στα

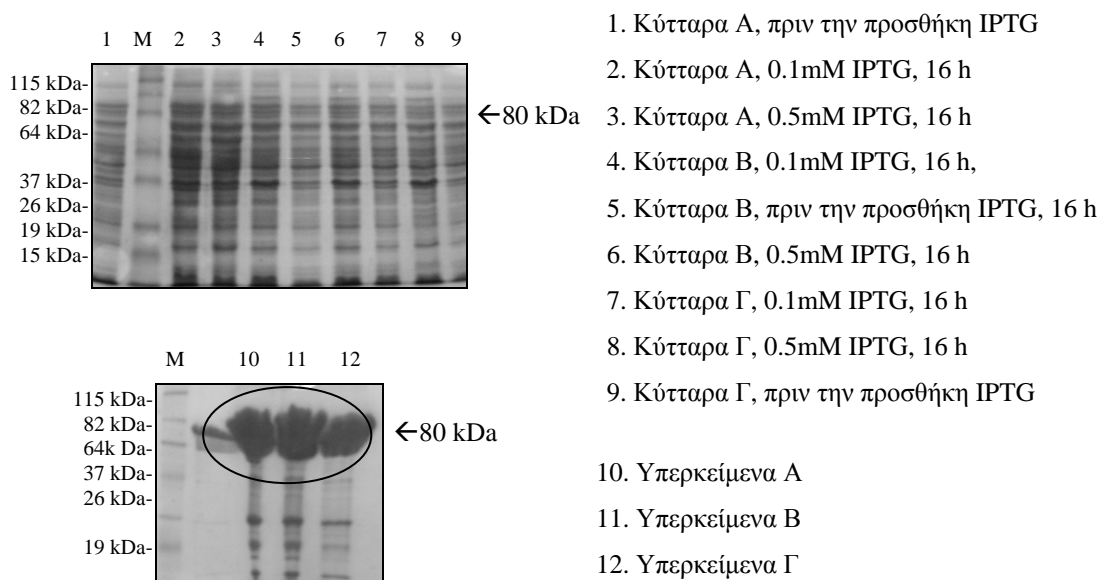
επιθυμητά μοριακά μεγέθη (**Εικόνα 98**). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση ότι διέθεταν τα ενθέματα των μεταλλαγμένων γονιδίων A, B και Γ του vWF μετασημάτισαν επιδεκτικά κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21 (DE3).



Εικόνα 98: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψεων του ανασυνδυασμένου φορέα έκφρασης pET-M60 με τα μεταλλαγμένα ενθέματα του γονιδίου A2 (A, B και Γ) του vWF με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI-HF* και *Sall-HF*.

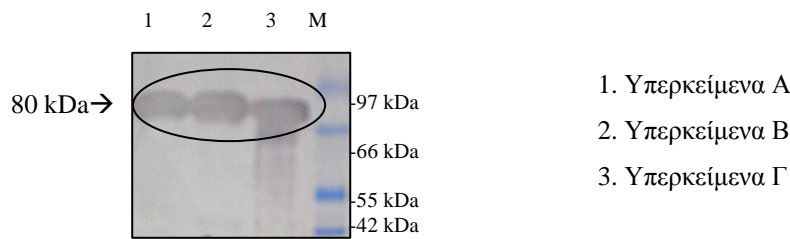
5.3. Υπερέκφραση και απομόνωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60

Η υπερέκφραση και απομόνωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A, B και Γ του vWF πραγματοποιήθηκε όπως παραπάνω (*Παράγραφος 3.2*). Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa (**Εικόνα 99**).



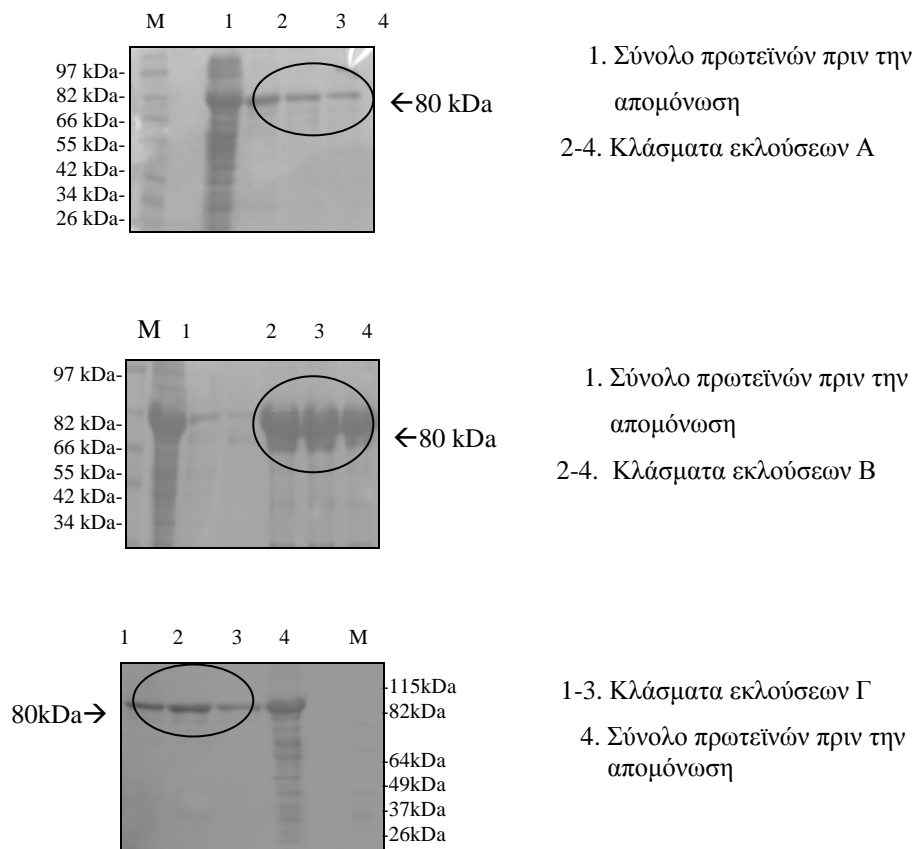
Εικόνα 99: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων υπερέκφρασης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF στο φορέα έκφρασης pET-M60.

Η παρουσία των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη και ανίχνευση με αντίσωμα έναντι των εξαισιτιδινών (**Εικόνα 100**).



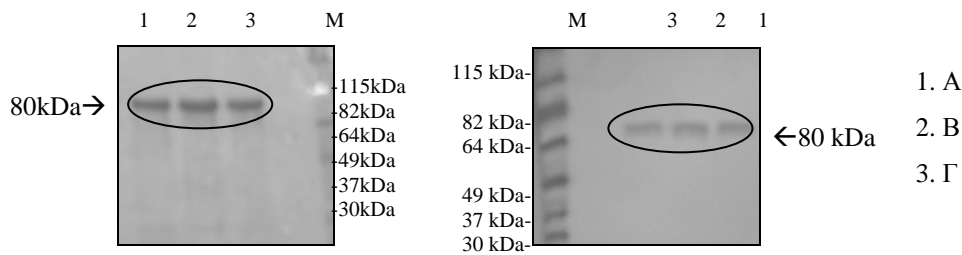
Εικόνα 100: Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (Α, Β και Γ) του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαισιτιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.

Ακολούθησε απομόνωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Α, Β και Γ της επικράτειας A2 του vWF με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου (*Παράγραφος 3.2*) και εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 80 kDa (**Εικόνα 101**).



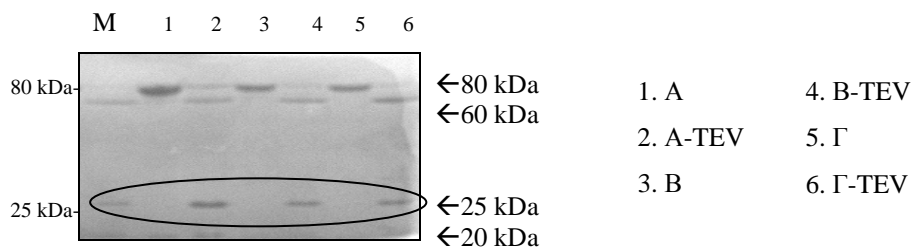
Εικόνα 101: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των εκλουσμάτων των απομονωμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Α, Β και Γ με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.

Επιβεβαιώθηκε η παρουσία των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη και ανίχνευση με αντίσωμα έναντι των εξαισιτιδινών (**Εικόνα 102**).



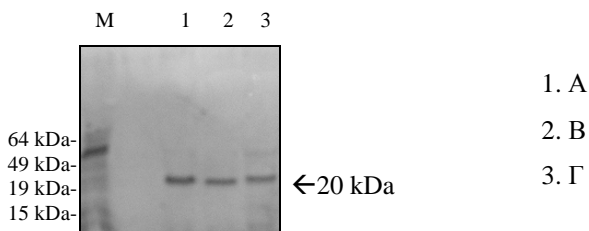
Εικόνα 102: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% και ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαισιτιδινών.

Ακολούθησε η πρωτεόλυση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών από την πρωτεάση TEV όπως παραπάνω (**Παράγραφος 3.3**) και οι επιθυμητές πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 20 kDa (**Εικόνα 103**).



Εικόνα 103: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεόλυσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF από την πρωτεάση TEV.

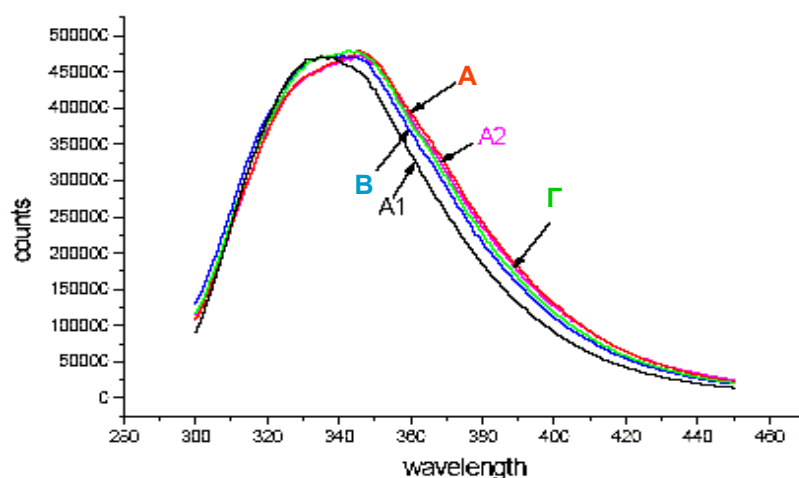
Οι πρωτεΐνες A, B και Γ απομονώθηκαν με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας με ιόντα νικελίου όπως παραπάνω (**Παράγραφος 3.3**). Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες A, B και Γ δε συγκρατήθηκαν στις στήλες και εντοπίστηκαν στο αναμενόμενο μέγεθος των 20 kDa (**Εικόνα 104**).



Εικόνα 104: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων των απομονωμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF μετά την πρωτεόλυση.

5.4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της επικράτειας A2 του vWF A, B και Γ με την A1 φυσιολογικού τύπου με Φασματοσκοπία Φθορισμού

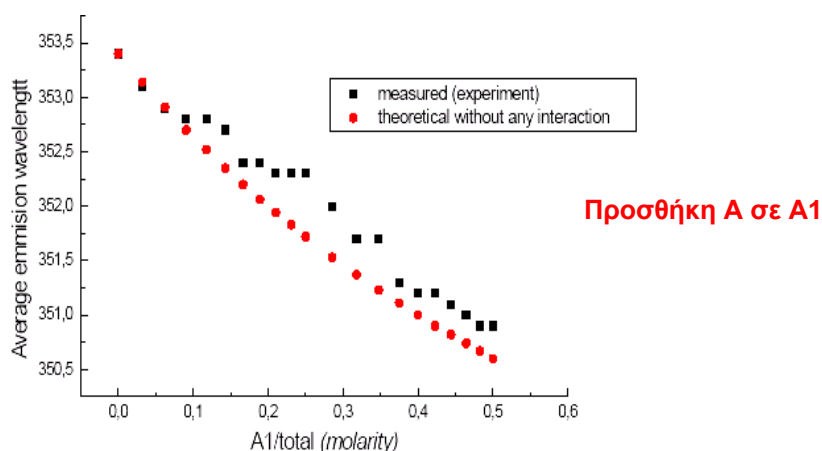
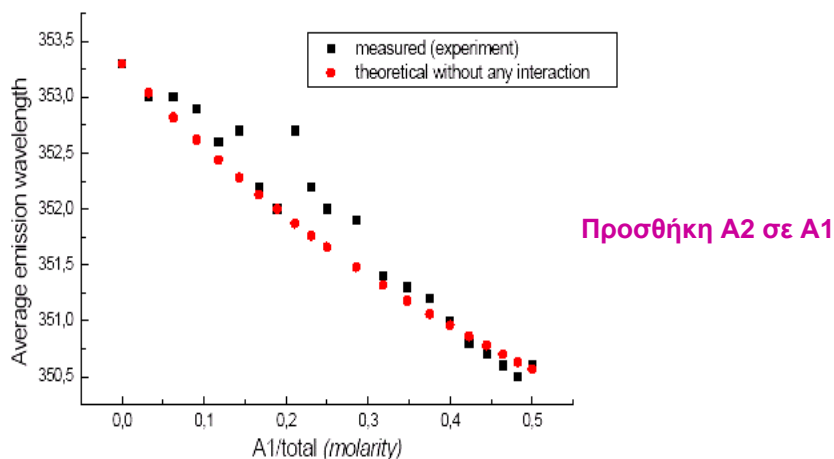
Συλλέχθηκαν φάσματα των πρωτεϊνών φυσιολογικού τύπου και των μεταλλαγμένων ξεχωριστά σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0.1-1 mg/ml) στην περιοχή 315-450 nm και σχεδιάστηκε η γραφική παράσταση, όπου όλες οι πρωτεΐνες παρουσίασαν μέγιστο σήμα εκπομπής στην περιοχή 340-350 nm (**Εικόνα 105**).

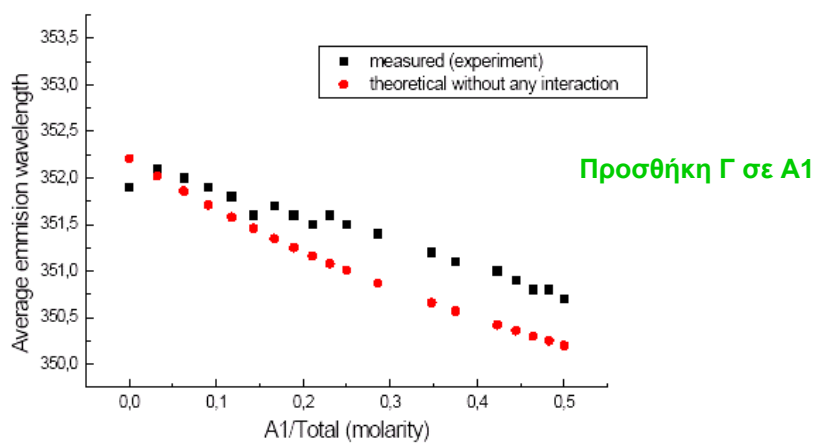
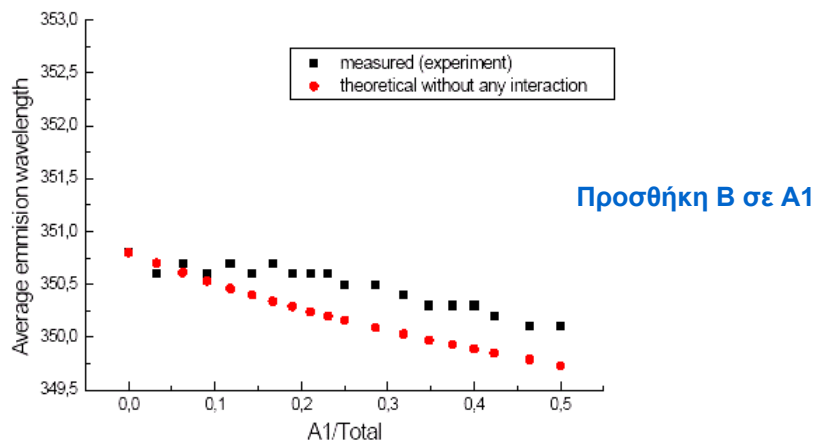


Εικόνα 105: Φάσματα φθορισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (μαύρο), A2 (ροζ), A (κόκκινο), B (μπλε) και Γ (πράσινο) του vWF ξεχωριστά σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις στην περιοχή εκπομπής 315-450 nm. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 280 nm.

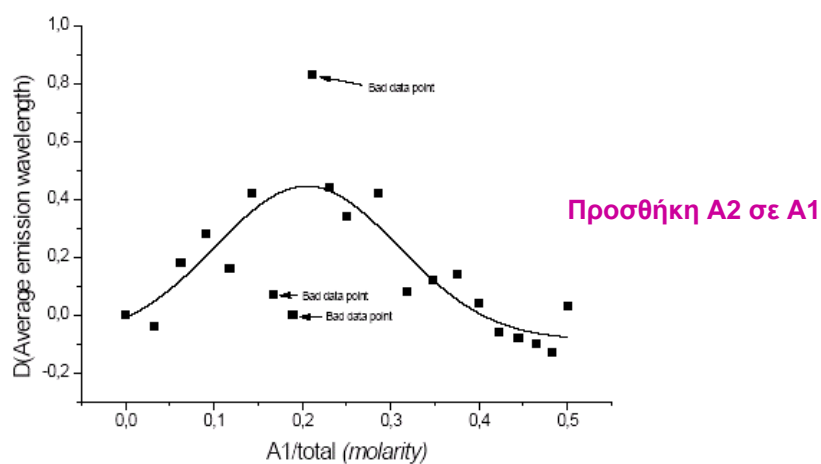
Ακολούθησε η συλλογή φασμάτων φθορισμού των μιγμάτων της κάθε μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με την ανασυνδυασμένη A1 φυσιολογικού τύπου σε συνάρτηση με τη μετατόπιση του μήκους κύματος σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm. Στην κυβελίδα προστέθηκε σταθερή συγκέντρωση της πρωτεΐνης A1 και ακολούθησε η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων των A2, 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 με συντελεστή βάρους ως προς τις μοριακές αναλογίες των πρωτεϊνών παρουσία και απουσία των θεωρητικών τιμών (**Εικόνες 106 και 107**). Σε κάθε περίπτωση καταγράφηκε μετατόπιση του μέσου μήκους κύματος εκπομπής και αλληλεπίδραση των μεταλλαγμάτων με την πρωτεΐνη A1 φυσιολογικού τύπου. Εάν δεν υπήρχε

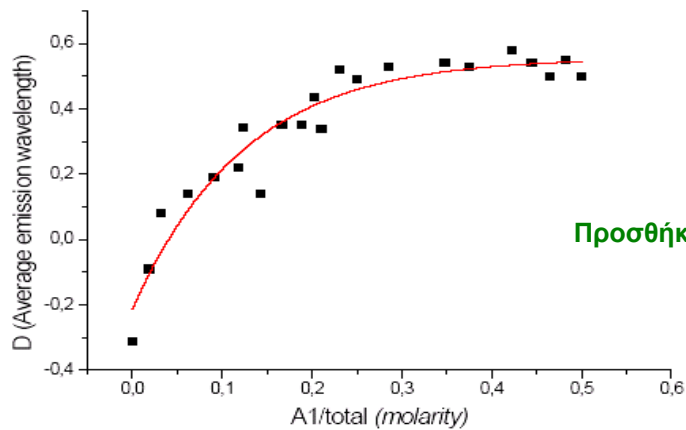
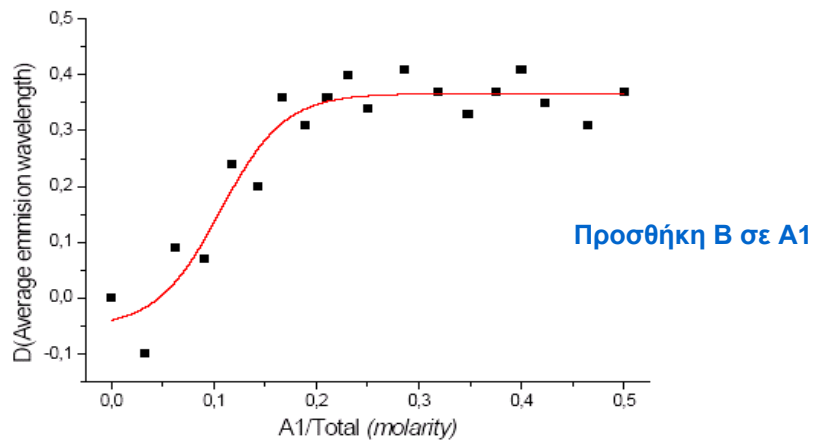
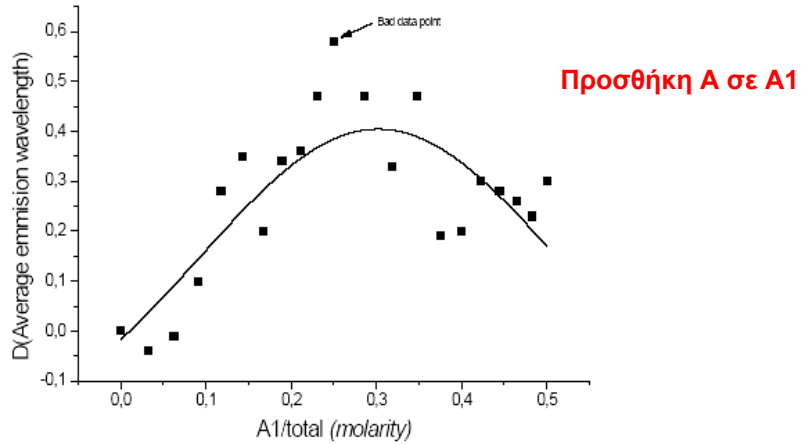
αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών, θα προέκυπταν ευθείες γραμμές της μετατόπισης του μήκους κύματος σε συνάρτηση με τη μοριακή τους αναλογία. Η καμπύλη που προέκυψε από τη μελέτη των μοντέλου Α μοιάζει περισσότερο με αυτήν των πρωτεϊνών φυσιολογικού τύπου και αφορά πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις. Οι καμπύλες των μοντέλων Β και Γ μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους και η αλληλεπίδραση στις περιπτώσεις αυτές φαίνεται να μην είναι τόσο πολύπλοκη.





Εικόνα 106: Φάσματα φθορισμού μέσου μήκους κύματος εκπομπής προς τη μοριακή αναλογία των μιγμάτων των πρωτεϊνών $A1/(A1+A2)$, $A1/(A1+A)$, $A1/(A1+B)$ και $A1/(A1+Γ)$ (μαύρες κουκκίδες) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm. Διακρίνονται οι τιμές που θα προέκυπταν αν δεν υπήρχε αλληλεπίδραση (κόκκινες κουκκίδες).



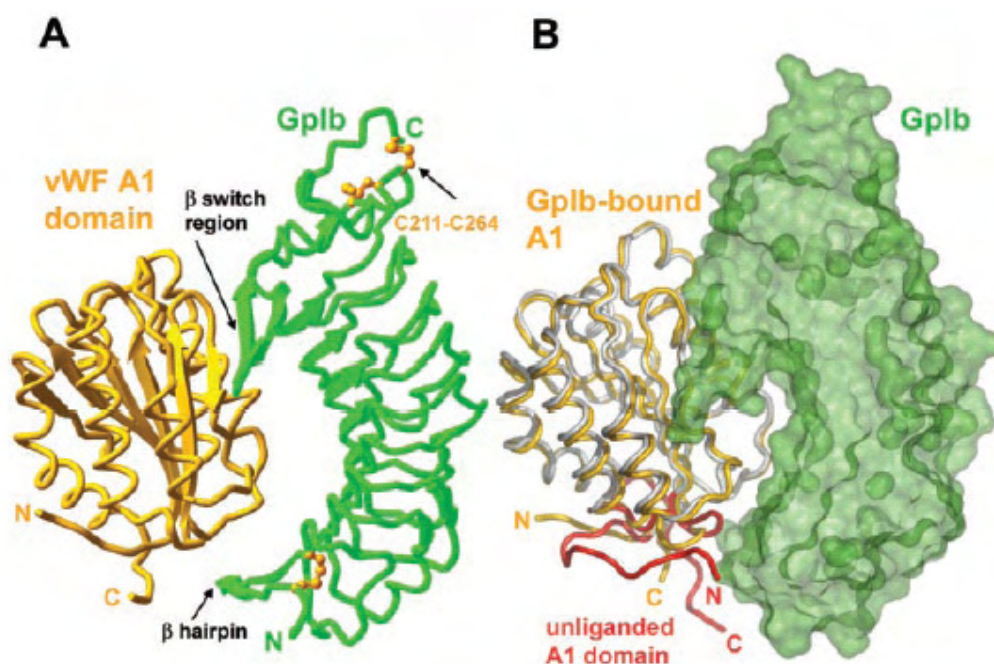


Εικόνα 107: Φάσματα φθορισμού μέσου μήκους κύματος εκπομπής ως προς τη μοριακή αναλογία των πρωτεϊνών μιγμάτων των πρωτεϊνών $A1/(A1+A2)$, $A1/(A1+A)$, $A1/(A1+B)$ και $A1/(A1+\Gamma)$ μετά την αφαίρεση των θεωρητικών τιμών σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πλήθος των μορίων και των κυττάρων που μετέχουν στο μηχανισμό της αιμόστασης περιορίζουν την προσέγγιση των περίπλοκων γεγονότων που συμβαίνουν στις περιοχές της αγγειακής βλάβης (Ruggeri 1997). Το ενδιαφέρον για τον vWF αυξήθηκε σημαντικά τις τελευταίες δύο δεκαετίες όπου έπαψε να θεωρείται απλά ένας βιοδείκτης καρδιαγγειακών παθήσεων. Με το συνδυασμό της βιοτεχνολογίας, των κρυσταλλογραφικών μελετών και των εργαλείων της βιοπληροφορικής προσδιορίστηκε ο ρόλος του vWF στις πολύπλοκες διαδικασίες του σχηματισμού θρόμβου σε περιπτώσεις τραυματισμού, σε μικρά αγγεία και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η αθηροσκλήρωση (de Wit et al. 2001, Ruggeri 2007). Με προσομοιώσεις βασισμένες σε κρυσταλλογραφικές μελέτες ερευνήθηκαν οι γενετικοί πολυμορφισμοί, η vWD και μια πλειάδα μεταλλάξεων που εμπλέκονται στην πρόκληση θρομβωτικής ή αιμορραγικής διάθεσης (Jenkins et al. 1998).

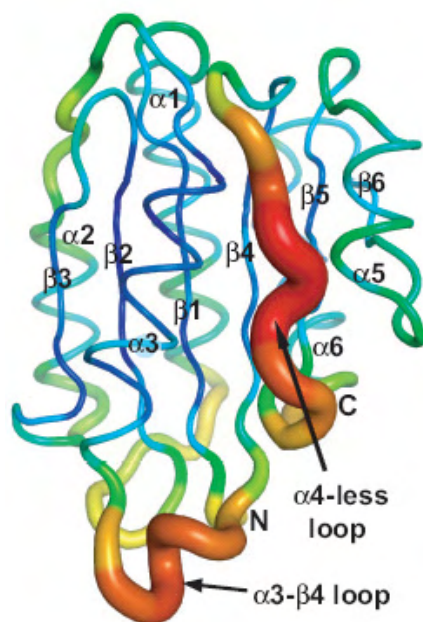
Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην επικράτεια A1 του vWF, καθώς παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της πρόσδεσής της στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων. Με τη μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης και με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής μελετήθηκε το σύμπλοκο της επικράτειας A1 και του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και προσδιορίστηκε η δομή του με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Εικόνα 108) (Emsley et al. 1998, Vasudevan et al. 2000, Dumas et al. 2004).



Εικόνα 108: Η δομή του συμπλόκου του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και της επικράτειας A1 του vWF και η σύγκρισή του με την ελεύθερη επικράτεια A1 (μη προσδεμένη στον υποδοχέα). Α) Η δομή

του συμπλόκου, όπου διακρίνεται ο υποδοχέας GPIIb των αιμοπεταλίων (πράσινο), η επικράτεια A1 (κίτρινο) και τα κατάλοιπα κυστεϊνών (κίτρινες σφαίρες). B) Υπέρθωση του συμπλόκου και ελεύθερη επικράτεια A1 (άσπρο). Διακρίνονται οι περιοχές της επικράτειας A1 που διαφέρουν (κόκκινο) (Dumas et al. 2004).

Πολύ πρόσφατα προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X η δομή της επικράτειας A2 του vWF και ο μηχανισμός πρωτεολυτικής δράσης της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS13 (**Εικόνα 109**) (Zhang et al. 2009, Zhou et al. 2009).



Εικόνα 109: Η δομή της επικράτειας A2 του vWF. Διακρίνονται οι α έλικες, τα β ελάσματα και με βέλη οι βρόχοι α4 και α3β4 (Zhang et al. 2009).

Η ικανότητα της επικράτειας A1 να αναστέλλει την πρωτεόλυση της A2 και αυτής να παρεμποδίζει την πρόσδεση της A1 στα αιμοπετάλια προσανατόλισε τις έρευνες στη μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης των δύο επικρατειών του vWF (Lankhof et al. 1997, Nishio et al. 2004). Με τη χρήση αντισωμάτων παρατηρήθηκε η αλληλεπίδραση της απομονωμένης επικράτειας A2 με το μόριο του vWF, όταν βρίσκεται στην ενεργή του διαμόρφωση, την οποία αποκτά κατά την πρόσδεση στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων (Lenting et al. 2007, Martin et al. 2007). Παρόλο που δεν αποδείχθηκε η άμεση επαφή των δύο γειτονικών επικρατειών A1 και A2 του vWF, παρουσιάστηκε η ειδική αλληλεπίδρασή τους που αναστέλλει την πρόσδεση της A1 στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων παρεμποδίζοντας το σχηματισμό θρόμβου (Martin et al. 2007).

Μια πρόκληση για τις μελλοντικές μελέτες θα ήταν η κατανόηση του ακριβούς μηχανισμού αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF, ώστε να σχεδιαστούν διαλυτοί αντιθρομβωτικοί παράγοντες που θα στοχεύουν αποκλειστικά στο αρχικό βήμα του μηχανισμού της αιμόστασης, στο στάδιο της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων (Majerus et al. 2005, Gilbert et al. 2007). Οι αντιθρομβωτικοί αυτοί παράγοντες θα έχουν τη δυνατότητα να δρουν μιμούμενοι το μηχανισμό δράσης της επικράτειας A2 αναστέλλοντας τη διαδικασία της θρομβογένεσης σε παθολογικές καταστάσεις.

Η διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στην προσπάθεια προσδιορισμού του μηχανισμού αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF. Η δομική και λειτουργική έρευνα του συμπλόκου των δύο απομονωμένων επικρατειών θα μπορούσε να συμβάλει στον προσδιορισμό του ακριβούς μηχανισμού σχηματισμού του, χωρίς να συνυπολογίζεται η πιθανή συμμετοχή άλλων επικρατειών του μορίου του vWF. Στην παρούσα μελέτη τα ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν τις A1 και A2 επικράτειες εκφράστηκαν σε βακτηριακό σύστημα, ώστε να είναι δυνατή η γρήγορη και εύκολη παραγωγή τους. Παράλληλα, επιλέχθηκε να μελετηθεί ο σχηματισμός συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 απουσία των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που πραγματοποιούνται στα ανθρώπινα κύτταρα.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις επικράτειες A1 και A2 του vWF ενισχύθηκαν από ενδοθηλιακά κύτταρα, όπου εκφράζονται σε υψηλό βαθμό και κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά στο φορέα έκφρασης pET-29c(+) που εκφράζει τις εξαίσιτιδίνες συγχωνευμένες στο καρβοξυτελικό άκρο των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ακολούθησαν έλεγχοι επαγωγής των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε ποικίλες συνθήκες και επιλέχθηκε η επώαση με την προσθήκη 1 mM IPTG για 16 h στους 16° C υπό ανάδευση στις 180 rpm. Παρατηρήθηκε μικρός βαθμός διαλυτότητας και υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, αλλά η παρουσία τους επιβεβαιώθηκε με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαίσιτιδινών. Ακολούθησε η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας και τα εκλούσματα ανιχνεύτηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαίσιτιδινών. Καθώς παρουσιάστηκε μικρός βαθμός καθαρότητας των εκλουσμάτων, έγινε προσπάθεια ενίσχυσης του με την προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου απομόνωσης με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Μετά το δεύτερο αυτό στάδιο καθαρισμού, δεν επιτεύχθηκε ο αναμενόμενος διαχωρισμός των πρωτεϊνών λόγω του σχηματισμού πολυμερών, όπως αποδείχθηκε με τη μέθοδο της μοριακής σκέδασης φωτός.

Προβλήματα διαλυτότητας, υπερέκφρασης και σχηματισμού πολυμερών των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF λόγω της απουσίας των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και του σχηματισμού σωμάτων εγκλεισμού παρουσιάστηκαν και σε άλλες μελέτες στο παρελθόν και αντιμετωπίστηκαν με επαγωγή σε ευκαρυωτικά κύτταρα και με τη χρήση αποδιατακτικών μέσων (Cruz *et al.* 1993). Έτσι, και στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι υπερέκφρασης και απομόνωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες και συγκεκριμένα σε διάλυμα ουρίας υψηλής συγκέντρωσης μετά την προσθήκη 0.1mM IPTG με επώαση για 5 h στους 37° C υπό ανάδευση στις 180 rpm. Επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός των σωμάτων εγκλεισμού, καθώς παρατηρήθηκε σημαντική υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που ανιχνεύτηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαιστιδινών. Καθώς ο στόχος της εργασίας ήταν να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF στις λειτουργικές τους μορφές εγκαταλείφτηκε η υπερέκφραση και απομόνωσή τους παρουσία αποδιατακτικών μέσων.

Ο σχηματισμός συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μελετήθηκε αρχικά έμμεσα με την τεχνική της Elisa. Σχεδιάστηκε πρωτόκολλο και αποδείχθηκε εμμέσως η αλληλεπίδρασή τους με τη χρήση αντισώματος έναντι της επικράτειας A2. Ακολούθησε προσπάθεια προσδιορισμού των θερμοδυναμικών παραμέτρων του συμπλόκου των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με θερμοδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης. Επιβεβαιώθηκε ότι δύο μόρια της πρωτεΐνης A1 και ένα μόριο της A2 συμμετείχαν στο σχηματισμό συμπλόκου με σταθερά αποσύνδεσης 12 μ M. Η μικρή διαλυτότητα και καθαρότητα των εκλουσμάτων, η αδύνατη απομάκρυνση των εξαιστιδινών από τα καρβοξυτελικά άκρα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και το στάδιο της ανάδευσης σε 400 rpm/min κατά τη θερμοδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης δεν είναι απίθανο να επηρέασαν την μελετώμενη αλληλεπίδραση και έτσι επιλέχθηκε η αλλαγή του φορέα έκφρασης και της μεθόδου μελέτης του συμπλόκου των δύο επικρατειών.

Τα γονίδια των επικρατειών A1 και A2 του vWF κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά στο φορέα έκφρασης pET-49b(+) που εκφράζει την τρανσφεράση της γλουταθειόνης και τις εξαιστιδίνες συγχωνευμένες με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στο αμινοτελικό άκρο, συμβάλλοντας στην αύξηση της διαλυτότητάς τους και διαθέτει περιοχή πρωτεολυτικού κέντρου που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση HRV (3C). Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μελετήθηκε σε διάφορες συνθήκες και

επιλέχθηκε η προσθήκη 0.1 mM IPTG και η επώαση 16 h στους 16° C υπό ανάδευση στις 180 rpm, όπου παρατηρήθηκε ο μεγαλύτερος βαθμός υπερέκφρασης. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία αγκιστείας και οι επιθυμητές πρωτεΐνες παρουσίασαν υψηλό βαθμό καθαρότητας και ανιχνεύθηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαϊστιδινών. Παρόμοια απομονώθηκε η πρωτεάση HRV(3C) και ακολούθησε η βελτιστοποίηση των συνθηκών πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε αναλογία 1/10 μετά από επώαση για 18 h στους 4° C. Οι επιθυμητές πρωτεΐνες A1 και A2 απομονώθηκαν μετά την πρωτεόλυση με χρωματογραφία αγκιστείας, αλλά μετά το δεύτερο στάδιο καθαρισμού παρατηρήθηκαν σημαντικές απώλειες και συλλέχθηκαν τελικά σε αρκετά μικρές συγκεντρώσεις.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF διεξήχθη με την καταγραφή φασμάτων φθορισμού στο μήκος κύματος της επιλεκτικής διέγερσης των καταλοίπων θρυποφάνης. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της μεταβολής της έντασης του σήματος φθορισμού σε συνάρτηση με την προσθήκη πρωτεΐνης A2 σε διάλυμα σταθερής συγκέντρωσης της A1 υπολογίστηκε η σταθερά αποσύνδεσης του συμπλόκου 4 μM. Λόγω της μικρής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάστηκε μεγάλο ποσοστό θορύβου. Έτσι, επιλέχθηκε και πάλι η αλλαγή του φορέα έκφρασης, ώστε να επιτευχθεί η παραγωγή μεγαλύτερων συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών που απαιτούνται για τις βιοφυσικές μελέτες.

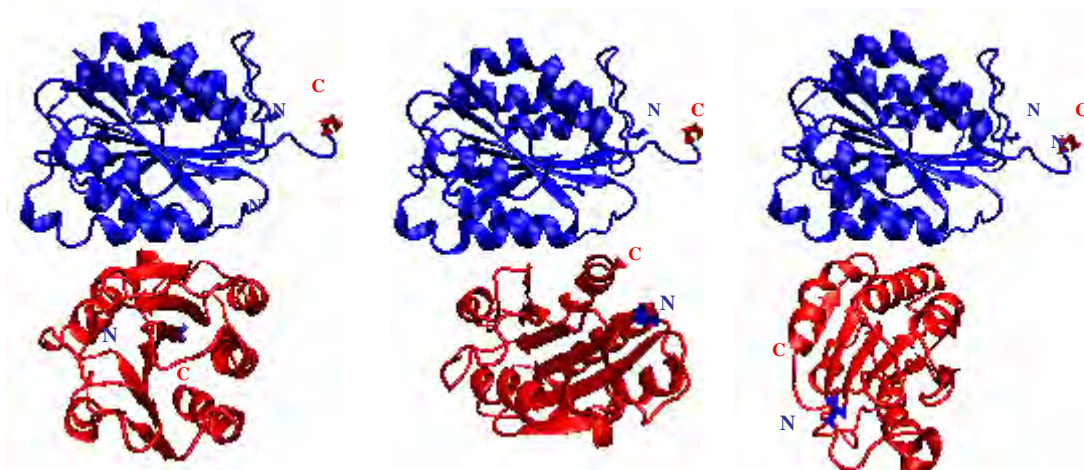
Επιλέχθηκε ο φορέας pET-M60 που εκφράζει τις εξαϊστιδίνες και μια πρωτεΐνη συνοδό (chaperone) συγχωνευμένη με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στο αμινοτελικό άκρο, συμβάλλοντας στη σωστή αναδίπλωσή τους σε λειτουργικές μορφές, στην ενίσχυση της διαλυτότητάς τους και στην αποφυγή σχηματισμού σωμάτων εγκλεισμού και διαθέτει περιοχή πρωτεολυτικού κέντρου που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση TEV. Τα γονίδια των επικρατειών A1 και A2 του vWF κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά στο φορέα έκφρασης και μετά από ελέγχους επιλέχθηκε η επαγωγή με την προσθήκη 0.1 mM IPTG με επώαση για 16 h στους 16° C υπό ανάδευση στις 180 rpm. Ο βαθμός της υπερέκφρασης ενισχύθηκε εντυπωσιακά και ακολούθησε η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας και η ανίχνευσή τους με αντίσωμα έναντι των εξαϊστιδινών. Παρόμοια απομονώθηκε η πρωτεάση TEV, βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 με επώαση σε αναλογία 1/10 για 18 h στους

4 °C και ακολούθησε η απομόνωση των επιθυμητών πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας.

Ο μεγάλος βαθμός καθαρότητας και η υψηλή συγκέντρωση των εκλουσμάτων των πρωτεϊνών επέτρεψε τη διεξαγωγή φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ξεχωριστά και του συμπλόκου τους στην περιοχή του άπω υπεριώδους. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF παρουσίασαν εντυπωσιακά παρόμοια ποσοστά δευτεροταγούς δομής και σταθερότητα στη διαμόρφωσή τους. Το ποσοστό της α έλικας της πρωτεΐνης A1 υπολογίστηκε 21.5% και της A2 21.6%, ενώ το ποσοστό των β πτυχωτών επιφανειών και των δύο πρωτεϊνών υπολογίστηκε 19.5%. Στο φάσμα που προέκυψε από το μίγμα των δύο πρωτεϊνών παρατηρήθηκε σημαντική πτώση στο ποσοστό της α έλικας. Η δομική αυτή μεταβολή πιθανότατα οφειλόταν στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των επικρατειών A1 και A2. Ακολούθησε πάλι ποσοτική καταγραφή της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με φασματοσκοπία φθορισμού στο μήκος κύματος που διέγερσης των καταλοίπων θρυπτοφάνης. Από τη μεταβολή της έντασης των σημάτων φθορισμού σε συνάρτηση με την προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης της πρωτεΐνης A1 σε διάλυμα σταθερής συγκέντρωσης της A2 υπολογίστηκε η σταθερά αποσύνδεσης του συμπλόκου 1 μ M με πολύ μικρό ποσοστό θορύβου.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιτεύχθηκε η υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων επικρατειών A1 και A2 του vWF σε βακτηριακό σύστημα και ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών απομόνωσής τους απουσία των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που υφίστανται *in vivo*. Παράλληλα, αποδείχθηκε η δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 απουσία άλλων επικρατειών του μορίου του vWF και χωρίς να έχουν πραγματοποιηθεί οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Η μελέτη στη συνέχεια επικεντρώθηκε στη δομή του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 του vWF χρησιμοποιώντας ως βασικό εργαλείο τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Με μια σειρά βιοχημικών και ενεργειακών προσεγγίσεων προτάθηκαν τα τρία πιθανότερα μοντέλα αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 που ονομάστηκαν Α, Β και Γ (*Εικόνα 110*).



Εικόνα 110: Υπολογιστική προσέγγιση του συμπλόκου αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF κατά τα τρία πιθανότερα μοντέλα A, B και Γ, όπως σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα VMD. Διακρίνονται οι διαφορετικές διατάξεις της επικράτειας A2 (κόκκινο).

Προσδιορίστηκαν οι παράμετροι της διεπιφάνειας του συμπλόκου των μοντέλων, εντοπίστηκαν τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στο σχηματισμό του και οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ τους και ταυτοποιήθηκαν ιεραρχημένα οι ιοντικές γέφυρες. Στο μοντέλο A εντοπίστηκαν ιοντικές γέφυρες μεταξύ των καταλοίπων Lys¹³⁶²-Asp¹⁵⁸⁷, Lys¹³⁷¹-Asp¹⁵⁶⁰, Lys¹³⁷¹-Glu¹⁵⁵⁴, Ile¹³⁷²-Glu¹⁵⁵⁴, Arg¹³⁹⁵-Asp¹⁵⁸⁷, Lys¹⁴⁰⁶-Arg¹⁵⁶⁹, Lys¹⁴⁰⁶-Tyr¹⁵⁷⁰, Lys¹⁴⁰⁶-Glu¹⁵⁴⁹, Lys¹⁴⁰⁷-Glu¹⁵⁵⁴ και Lys¹⁴⁰⁷-Glu¹⁵⁴⁹ των επικρατειών A1 και A2 αντίστοιχα. Στο μοντέλο B εντοπίστηκαν ιοντικές γέφυρες μεταξύ των καταλοίπων Lys¹³⁷¹-Glu¹⁶⁶⁰, Lys¹³⁷¹-Asp¹⁶⁶³, Arg¹³⁹⁵-Gln¹⁶³⁷, Arg¹³⁹⁵-Glu¹⁶⁴⁰, Arg¹³⁹⁹-Glu¹⁶⁴⁰, Lys¹⁴⁰⁶-Cys¹⁶⁶⁹, Lys¹⁴⁰⁶-Gln¹⁶²⁴, Lys¹⁴⁰⁶-Arg¹⁶⁶⁸, Lys¹⁴⁰⁷-Glu¹⁶⁶⁰ και Lys¹⁴⁰⁷-Asp¹⁶⁶³ των επικρατειών A1 και A2 αντίστοιχα. Στο μοντέλο Γ εντοπίστηκαν ιοντικές γέφυρες μεταξύ των καταλοίπων Glu¹³⁵⁹-Arg¹⁶⁵⁹, Lys¹³⁶²-Glu¹⁶⁵⁵, Phe¹³⁶⁶-Arg¹⁵¹⁶, Gln¹³⁶⁷-Arg¹⁵¹⁶, Lys¹³⁷¹-Glu¹⁵¹¹, Arg¹³⁹⁵-Asp¹⁶⁶³, Arg¹³⁹⁹-Pro¹⁶⁵⁸, Arg¹³⁹⁹-Glu¹⁵²³, Lys¹⁴⁰⁶-Glu¹⁵²² και Lys¹⁴⁰⁷-Glu¹⁵¹⁹ των επικρατειών A1 και A2 αντίστοιχα. Το μοντέλο A θεωρήθηκε το σταθερότερο ενεργειακά, γεγονός στο οποίο συνάδει ο εντοπισμός του επιτόπου του αντισώματος VP-1 που αναστέλλει την πρόσδεση στον vWF και του καταλοίπου Ile1372 που σχετίζεται με την vWD 2B στη διεπιφάνειά του. Καθώς στη διεπιφάνεια όλων των μοντέλων παρατηρήθηκε αλληλεπικάλυψη της περιοχής πρόσδεσης της βοτροσετίνης (botrocetin) και της επικράτειας A2, θεωρήθηκε πιθανό η πρώτη να δρα αναστέλλοντας το σχηματισμό

του συμπλόκου A1-A2, παρεμποδίζοντας την ανασταλτική δράση της επικράτειας A2 στην πρόσδεση A1-GPIba και προάγοντας την αλληλεπίδραση A1-GPIba.

Τα κατάλοιπα Glu¹⁵⁴⁹, Glu¹⁶⁴⁰ και Glu¹⁵¹¹ της επικράτειας A2 των μοντέλων A, B και Γ αντίστοιχα που σχηματίζουν ιοντικές γέφυρες και εντοπίζονται στην κεντρική περιοχή αλληλεπίδρασης θεωρήθηκε ότι είναι σημαντικά για τη σταθερότητα του συμπλόκου. Τα κατάλοιπα αυτά μεταλλάχθηκαν σε αλανίνες με τη μέθοδο της Θέση-Κατευθυνόμενης Σημειακής Μεταλλαξιγένεσης, ώστε να μελετηθεί η διατάραξη της αλληλεπίδρασης και να προσδιοριστεί το πιθανότερο από τα μοντέλα. Τα μεταλλαγμένα γονίδια του vWF κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά στο φορέα έκφρασης pET-M60 και οι αντίστοιχες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες A, B και Γ υπερεκφράστηκαν και απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Τα μεταλλάγματα ανιχνεύθηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι των εξαϊστιδινών, πρωτεολύθηκαν με επώαση με την πρωτεάση TEV και οι επιθυμητές πρωτεΐνες απομονώθηκαν 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 των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και της A1 φυσιολογικού τύπου. Οι μεταλλάξεις των καταλοίπων Glu¹⁵⁴⁹, Glu¹⁶⁴⁰ και Glu¹⁵¹¹ της επικράτειας A2 των μοντέλων A, B και Γ αντίστοιχα φαίνεται ότι δεν επηρέασαν το σχηματισμό του συμπλόκου. Καθώς είναι δύσκολη η κρυστάλλωση του συμπλόκου των επικρατειών A1-A2 λόγω προβλημάτων υπερέκφρασης και απομόνωσής τους, η επιλογή και μετάλλαξη περισσότερων καταλοίπων μεταξύ αυτών που έχουν προταθεί ότι μετέχουν στη διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης των επικρατειών είναι πιθανό να αποσταθεροποιήσει το σύμπλοκο των προτεινόμενων μοντέλων και να προσδιοριστεί το πιθανότερο από αυτά.

Ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών της διεπιφάνειας του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 του vWF και η πρόταση των σημαντικών καταλοίπων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του μπορεί να αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο για το σχεδιασμό αντιθρομβωτικών φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά μιμούμενα τον μηχανισμό πρόσδεσης της επικράτειας A2 στην A1 θα στοχεύουν εξειδικευμένα στην αναστολή του κυρίου βήματος της αιμόστασης, της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alevriadou, BR., Moake, JL., Turner, NA., Ruggeri, ZM., Folie, BJ., Phillips, MD., Schreiber, AB., Hrinda, ME. and McIntire, LV. (1993). Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood*. 81: 1263-76.

Andrews, RK. and Berndt, MC. Platelet physiology and thrombosis. (2004). *Thromb Res*. 114: 447-53.

Andrews, RK., Gorman, JJ., Booth, WJ., Corino, GL., Castaldi, PA. and Berndt, MC. (1989). Cross-linking of a monomeric 39/34-kd dispaase fragment of von Willebrand factor (Leu-480/Val-481-Gly-718) to the N-terminal region of the α -chain of membrane glycoprotein Ib on intact platelets with bis (sulfosuccinimidyl) suberate. *Biochemistry*. 28: 8326-36.

Arya, M., Anvari, B., Romo, GM., Cruz, MA., Dong, JF., McIntire, LV., Moake, JL. and Lopez, JA. (2002). Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood*. 99: 3971-7.

Auton, M., Cruz, MA. and Moake, J. (2007). Conformational stability and domain unfolding of the von Willebrand factor A domains. *J Mol Biol*. 366: 986-1000.

Bauldauf, C., Schneppenheim, R., Stacklies, W., Obser, T., Pieconka, A., Schneppenheim, S., Budde, U., Zhou, J., Gräter F. (2009). *Journal of Thromb and Haemost*. 7: 2096-2105.

Shear-induced unfolding activates von Willebrand factor A2 domain for proteolysis
Blaber, M. (1998). Lecture 25 of Molecular Biology and Biotechnology Course: Prokaryotic Expression Vectors.

Blann, AD. (2006). Plasma von Willebrand factor, thrombosis and the endothelium: the first 30 years. *Thromb Haemost*. 95: 49-55.

Bogdanov, VY., Balasubramanian, V., Hathcock, J., Vele, O., Lieb, M. and Nemerson, Y. (2003). Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nature medicine*. 9: 458-62.

Bohm., G., Muhr, R., Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 5. 191-5.

Bonthron, DT., Handin, RI., Kaufman, RJ., Wasley, LC., Orr, EC., Mitscock, LM., Ewenstein, B., Loscalzo, J., Ginsburg, D. and Orkin, SH. (1986). Structure of pre-pro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nature*. 324: 270-3.

Bonthron, DT., Orr, EC., Mitscock, LM., Ginsburg, D., Handin, RI. and Orkin, SH.(1986). Nucleotide sequence of pre-pro-von Willebrand factor cDNA. *Nucleic Acids Res*. 14: 7125-7.

Borthakur, G., Cruz, MA., Dong, JF., Mcintire, L., Li, F., López, JA. and Thiagarajan P. (2003). Sulphatides inhibit platelet adhesion to von Willebrand factor in flowing blood. *J Thromb Haemost.* 1: 1288-95.

Bowie, EJ., Solberg Jr, LA., Fass, DN., Johnson, CM., Knutson, GJa. and Stewart, ML. (1986). Transplantation of normal bone marrow into a pig with severe von Willebrand's disease. *J Clin Invest.* 78: 26-30.

Briedé, JJ., Tans, G., Willems, GM., Hemker, HC. and Lindhout, T. (2001). Regulation of platelet factor Va-dependent thrombin generation by activated protein C at the surface of collagen-adherent platelets. *The Journal of Biological Chemistry.* 276; 7164-8.

Brown, SA., Eldridge, A., Collins, PW. and Bowen, DJ. (2003). Increased clearance of von Willebrand factor antigen post-DDAVP in type 1 von Willebrand disease: is it a potential pathogenic process? *J Thromb Haemost.* 1: 1714-7.

Burshtein, EA, (1968). Quenching of protein Fluorescence II. Tyrosine residues in Ribonuclease. *Biofizika.* 13: 718-20.

Burshtein, EA. (1968). Quenching of protein Fluorescence I. Principles of the method. Solutions of tryptophane, tyrosine and denaturated proteins. *Biofizika.* 13: 433-42.

Cal, S., Obaya, AJ., Liaumazares, M., Garabaya, C., Quesada, V. and Lopez Otin, C. (2002). Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene.* 283 :49-62.

Campbell, M. (2003). Class Lecture.

Casonatol, A., De Marco, L., Gallinarol, L., Sztukowskal, M., Mazzuccato, M., Battiston, M., Pagnanl, A., Ruggeri, ZM. (2007). Altered von Willebrand factor subunit proteolysis and multimer processing associated with the Cys2362Phe mutation in the B2 domain. *Thromb Haemost.* 97: 527-33.

Cauwenberghs, N., Vanhoorelbeke, K., Vauterin, S., Westra, DF., Romo, G., Huizinga, EG., Lopez, JA., Berndt, MC., Harsfalvi, J. and Deckmyn, H. (2001). Epitope mapping of inhibitory antibodies against glycoprotein IbaIpha reveals interaction between the leukine-rich N-terminal and C-terminal flanking domains of glycoprotein IbaIpha. *Blood.* 98: 652-60.

Champ, PC., Camacho, JC. (2007). FastContact: a free energy coring tool for protein-protein complex structures. *Nucleic Acids Research.* 35. <http://structure.pitt.edu/servers/fastcontact/>

Christophe, O., Obert, B., Meyer, D. and Girma, J. (1991). The bonding domain of von Willebrand factor to sulfatides is distinct from those interacting with glycoprotein Ib, heparin and collagen and residues between amino acid residues Leu 512 and Lys 673. *Blood.* 78: 2310-7.

Chen, RF. and Cohen, PF. (1966). Quenching of tyrosine fluorescence in proteins by phosphate. *Arch Biochem Biophys.* 114: 514-22.

Colige, A., Sieron, AL., Li, SW., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilux, W., Krakov, D., Cohn, DH., Reardon, W., Byers, PH., Lapiere, CM., Prockop, DJ. and Nusgens, BV. (1999). Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am J Hum Genet.* 65: 308-17.

Coller, BS., Folts, JD., Scudder, LE. and Smith, SR. (1986). Antithrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in an experimental animal model. *Blood.* 68: 783-6.

Colombatti, A. and Bonaldo, P. (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 defence mechanisms. *Blood.* 77: 2305-15.

Cruz, MA., Diacovo, TG., Emsley, J., Liddington, R. and Handin, RI. (2000). Mapping the glycoprotein Ib-binding site in the von Willebrand factor A1 domain. *J Biol Chem.* 275: 19098-105.

Cruz, MA., Handin, RI. and Wise, RJ. (1993). The interaction of the von Willebrand factor A1 domain with platelet glycoprotein Ib/IX. *J Biol Chem.* 268 (28):21238-45.

Cruz, MA., Whitelock, J. and Dong, JF. (2003). Evaluation of ADAMTS-13 activity in plasma using recombinant von Willebrand factor A2 domain polypeptide as substrate. *Thromb Haemost.* 90: 1204-9.

Cruz, MA., Yuan, H., Lee, JR., Wise, RJ. and Handin RI. (1995). Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF at domain polypeptides. *J. Biol. Chem.* 270: 10822-7.

Davie, EW. and Ratnoff, OD. (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science.* 145: 1310-2.

De Cristofaro R., Peyvandi F., Palla R., Lavoretano S., Lombardi R., Merati G., Romitelli F., Di Stasio E. and Mannucci PM. (2005). Role of chloride ions in modulation of the interaction between von Willebrand factor and ADAMTS-13. *J Biol Chem.* 280: 2395-302.

Denis, CV. (2002). Molecular and cellular Biology of von Willebrand factor. *Int. J. Haematol.* 75: 3-8.

Denis, CV., Baruch, D., Kielty, CM., Ajzenberg, N., Christophe, O. and Meyer, D. (1993). Localization of von Willebrand factor binding domains to endothelial extracellular matrix and to type VI collagen. *Arterioscl Thromb.* 13: 398-406.

De Marco, L., Girolami, A., Russell, S. and Ruggeri ZM. (1985). Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to glycoprotein IIb/IIIa complex and mediates platelet aggregation. *J Clin Invest.* 75: 1198-203.

De Marco, L., Girolami, A., Zimmermann, TS. and Ruggeri, ZM. (1985). Interaction of purified IIB von Willebrand factor with the platelet membrane glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and initiates aggregation. *PNAS.* 82: 7424-8.

Dent, JA., Berkowitz, R., Ware, J., Kasper, CK. and Ruggeri, ZM. (1990). Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *PNAS.* 87: 6306-10.

Dent, JA., Galbusera, M. and Ruggeri, ZM. (1991). Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest.* 88: 774-82.

de Wit, TR. and van Mourik, JA. (2001). Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 14, 241-55.

Di Nisio, M., Middeldorp, S. and Büller, HR. (2005). Direct thrombin inhibitors. *N Engl J Med.* 10: 1028-40.

Dobrkovska, A., Krzenski, U. and Chediak, JR. (1998). Pharmacokinetics efficacy and safety of human-P in von Willebrand disease. *Haemophilia.* 4: 33-9.

Dong, JF., Berndt MC., Schade A., McIntire LV., Andrews RK and Lopez JA. (2001). Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions. *Blood.* 97: 162-168.

Dong, JF., Moake, JL., Bernardo, A., Fujikawa, K., Ball, C., Nolasco, L., Lopez, JA. and Cruz, MA. (2003). ADAMTS13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 278: 29633-9.

Dong, JF., Moake, JL., Nolasco, L., Bernardo, A., Arceneaux, W., Schrimpton, CN., Schade, AJ., McIntire, LV., Fujikawa, K. and Lopez, JA. (2002). ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood.* 100: 4033-9.

D'Souza, SE., Ginsberg, MH. and Plow, EF. (1991). Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): A cell adhesion motif. *Trends Biol Sci.* 16: 246-50.

Dumas, JJ., Kumar, R., McDonagh, T., Sullivan, F., Stahl, ML., Somers, W. and Mosyak, L. (2004). Crystal structure of the wild type von Willebrand factor A1-glycoprotein Iba complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations. *J Biol Chem.* 279: 23327-34.

- Emsley, J., Cruz, M., Handin, R. and Liddington, R. (1998). Crystal structure of the von Willebrand factor A1 domain and the implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 17: 10396-401.
- Federici, AB., De Romeuf, De Groot, PG., Samor, B., Lombardi, R., D'Alessio, P., Mazurier, C., Mannucci, PM. and Sixma, JJ. (1985). Adhesive properties of the carbohydrate-modified von Willebrand factor. *Blood.* 71(4): 947-52.
- Fernandes, RJ., Hirahata, S., Engle, JM., Colige, DH., Eyre, DR. and Apte, SS. (2001). Procollagen II amino-propeptide processing by ADAMTS-3: insights on dermatosparaxis. *J Biol Chem.* 276: 31502-9.
- Fisher, HF. and Singh, N. (2009). Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol.* 259: 194-221.
- Freire, E., Schon, A. and Velazquez-Campoy, A. (2009). Isothermal titration calorimetry: general formalism using binding polynomials. *Methods Enzymol.* 455: 127-55.
- Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B. and Chung D. (2001). Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood.* 98: 1662-6.
- Fujimura, Y., Titani, K., Holland, LZ., Roberts, JR., Kostel, P., Ruggeri, ZM. and Zimmerman, TS. (1987). A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a cryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Ly-728. *J Biol Chem.* 262:1734-9.
- Fujimura, Y., Titani, K., Holland, LZ., Russell, SR., Roberts, JR., Elderm JH., Ruggeri, ZM. and Zimmerman, TS. (1986). von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48 kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 261: 381-5.
- Fujimura, Y., Usami, Y., Titani, K., Niinomi, K., Nishio, K., Takase, T., Yoshioka, A. and Fukui, H. (1991). Studies on anti-von Willebrand factor (vWF) monoclonal antibody NMC-4, which inhibits both ristocetin- and botrocetin- induced vWF binding to platelet glycoprotein Ib. *Blood.* 77: 113-20.
- Fukuda, K., Doggett, TA., Bankston, LA., Cruz, MA., Diacovo, TG., Liddington, RC. (2002). The von Willebrand factor mutant (1546V) A1 domain. *Structure.* 10: 943-50.
- Furie, B. and Furie, BC. (2005). Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest.* 115: 3355-62.
- Furlan, M. and Lammle, B. (1999). von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 82: 592-600.
- Furlan, M., Robles, R. and Lämmle, B. (1996). Partial purification of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood.* 86: 4223.

Gerritsen, HE., Robles, R., Lammle, B. and Furlan, M. (2001). Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*. 98: 1654-61.

George, H., Bruckner, R., Nagase, H., Itah, Y., Ellis, DM., Ross, H., Wisswall, BH., Murphy, K., Hillman, MC., Hollis, GF. and Arner, EC. (1999). Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science*. 284: 1664-6.

Giesen, PLA., Rauch, U., Bohrmann, B., Kling, D., Roque, M., Fallon, JT., Badimon, JJ., Hember, J., Riederer, MA. and Nemerson, Y. (1999). Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *PNAS*. 96: 2311-5.

Gilbert, JC., DeFeo-Fraulini T., Hutabarat RM., Horvath CJ., Merlino PG., Marsh NH., Healy JM., BouFakhreddine S., Holohan TV. and Schaub RG. (2007). First-in-human evaluation of anti-von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation*. 116: 2678-2686.

Gill, DS., Roush, DJ., Shick, KA. and Willson, RC. (1995). Microcalorimetric characterization of the anion-exchange absorption of recombinant cytochrome b5 and its surface-charge mutants. *J Chromatogr A*. 715: 81-93.

Gill, JC., Endres-Brooks, J., Bauer, PJ. and Marks, WJ. (1987). Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood*. 69: 1691-5.

Girma, JP., Meyer, D., Verweij, CL., Pannekoek, H. and Sixma, JJ. (1987). Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood*. 70: 605-11.

Granilk, HR., Williams, SB. and Coller, BS. (1985). The interaction of the von Willebrand Factor-A1 Domain with Platelet Glycoprotein IB/IX. *J Clin Invest*. 76: 19-25.

Granilk, HR., Williams, SB. and Morisato, DK. (1981). Effect of multimers structure of the factor VIII/von Willebrand factor protein on binding to platelets. *Blood*. 58: 387-97.

Greenfield, NJ. (2004). Circular dichroism analysis for protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*. 261: 55-78.

Greenfield, NJ. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*. 1: 2876-90.

Haberichter, SL., Balistreri, M., Christopherson, P., Morateck, P., Gavazova, S., Bellissimo, DB., Manco-Johnson, MJ., Gill, JC. and Montgomery, RR. (2006). Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood*. 108: 3344-51.

Haberichter SL, Fahs SA and Montgomery, RR. (2000). von Willebrand factor storage and multimerization: 2 independent intracellular processes. *Blood*. 96: 1808-15.

Hoffman, M. (2003). Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 16: 17-20.

Hoffman, M. and Monroe, DM. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 85: 958-65.

Hoffman, M., Monroe, DM. and Roberts, HR. (1994). Human monocytes support factor X activation by factor VIIa, independent of tissue factor: implications for the therapeutic mechanism of high-dose factor VIIa in hemophilia. *Blood*. 83: 38-42.

Hoffman, M., Monroe, DM. and Roubey, RAS. (2001). Links between the immune and coagulation systems: how do "Antiphospholipid antibodies" cause thrombosis? *Immunologic Research*. 22: 2-3.

Huizinga, EG., Tsuji, S., Romijn, RAP., Schiphorst, ME., de Groot, PG., Sixma, JJ. and Gros, P. (2002). Structures of glycoprotein Iba and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*. 297: 1176-9.

Hurskainen, TL., Hirohata, S., Sheldin, MF. and Apte, SS. (1999). ADAM-TS5, ADAM-TS6 and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem*. 274: 25555-63.

Indyk, L. and Fisher, HF. (1998). Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol*. 295: 350-64.

Jackson, SP., Mangin, P. and Yuan, Y. (2006). «Pulling strings»: shear, platelets and microparticles. *Blood*. 107: 3418-9.

Jelesarov, I. and Bosshard, HR. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Rec*. 12: 1-18.

Jenkins, PV. and O'Donnell, JS. (2006). ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? *Transfusion*. 46: 1836-44.

Jenkins, PV., Pasi, JK. and Perkins, SJ. (1998). Molecular Modelling of ligand and mutation sites of the type A domains of Human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease. *Blood*. 91: 2032-44.

Johnson, WC. (1999). Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins*. 35: 307-12.

Kalé, L., Skeel, R., Bhandarkar, M., Brunner, R., Gursoy, A., Krawetz, N., Phillips, J., Shinozaki, A., Varadarajan, K. & Schulten, K. (1999). NAMD2: greater scalability for parallel molecular dynamics. *J. Comput. Phys*. **151**: 283-312.

Kao, KJ., Pizzo, SV. and McKee, PA. (1980). Factor VIII/Von Willebrand protein. Modification of its carbohydrate causes reduced binding to platelets. *J Biol Chem.* 255: 10134-9.

Kelly, SM. and Price, NC. (2006). Circular dichroism to study protein interactions. *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 20. Unit 20.

Kiharsky, AL. and Fogelson, AL. (2001). Surface-mediated control of blood coagulation: the role of binding site densities and platelet deposition. *Biophysical Journal.* 80: 1050-74.

Kjalke, M., Ezban, M., Monroe, DM., Hoffman, M., Roberts, HR. and Hedner, U. (2001). Highdose factor VIIa increases initial thrombin generation and mediates faster platelet activation on thrombocytopenia-like conditions in a cell-based model system. *British Journal of Haematology.* 114: 114-20.

Knappskog, PM. and Haavik, J. (1995). Tryptophan fluorescence of human phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 34: 11790-9.

Kobe, B. and Kajava, AV. (2001). The leukine-rich as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 11: 725-32.

Kokame, K., Matsumoto, M., Fujimura, Y. and Miyata, T. (2004). VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS13. *Blood.* 103: 607-12.

Kokame, K., Matsumoto, M., Soejima, K., Yagi, H., Ishizashi, H., Funato, M., Tamai, H., Konno, M., Kamide, K., Kawano, Y., Miyata, T. and Fujimura, Y. (2002). Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *PNAS.* 99: 11902-7.

Kroll, MH., Hellums, JD., McIntire, LV., Schafer, AI. and Moake, JL. (1996). Platelets and shear stress. *Blood.* 88: 1525-41.

Kulkarni, S., Dopheide, SM., Yap, CL., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P. and Heel, KA., Street, A, Harper, IS., Lanza, F. and Jackson, SP. (2000). A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest.* 105: 783-91.

Kuno, K. and Matsushita, K. (1998). Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *J Biol Chem.* 273: 13912-7.

Lakowicz, JR. and Balter, A. (1982). Differential-wavelength deconvolution of time resolved fluorescence intensities. A new method for the analysis of excited-state processes. *Biophys Chem.* 16: 223-40.

Lakowicz, JR. and Balter, A. (1982). Theory of phase-modulation fluorescence spectroscopy for excited-state processes. *Biophys Chem.* 16: 99-115.

Lakowicz, JR. and Balter, A. (1982). Analysis of excited-state processes by phase-modulation fluorescence spectroscopy. *Biophys Chem.* 16: 117-32.

Lankhof, H., Damas, C., Schiphorst, ME., Ijsseldijk, MJ., Bracke, M., Furlan, M., Tsai, HM., De Groot, PG., Sixma, JJ. and Vink, T. (1997). von Willebrand factor without the A2 domain is resistant to proteolysis. *Thromb Haemost.* 77: 1008-13.

Lankhof, H., van Hoeij, M., Schiphorst, ME., Bracke, M., Wu, YP., Ijsseldijk, MJ., Vink, T., De Groot, PG. and Sixma, JJ. (1996). A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemos.* 75: 980-8.

Lankhof, H., Wu, YP., Vink, T., Schiphorst, ME., Zerwes, HG., de Groot, PG. and Sixma, JJ. (1995). Role of the glycoprotein Ib-binding A1 repeat and the RGD sequence in platelet adhesion to human recombinant von Willebrand factor. *Blood.* 86: 1035-42.

Leavitt, S. and Freire, E. (2011). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol.* 11: 560-6.

Lenting, PJ. and Denis, CV. (2007). Von Willebrand factor A1 domain: stuck in the middle. *J Thromb Haemost.* 5: 1361-2.

Lenting, PJ., Neels, JG., van den Berg, BM., Clijsters, PP., Meijerman, DW., Pannekoek, H., van Mourik, JA., Mertens, K. and van Zonneveld, AJ. (1999). The light chain of factor VIII comprises a binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 274: 23734-9.

Lenting, PJ., Van Shooten, CJM. and Denis CV. (2007). Clearance mechanism of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost.* 5: 1353-60.

Lenting, PJ., Westein, E., Terraube, V., Ribba, AS., Huizinga, EG., Meyer, DG., de Groot, PG. and Denis CV. (2004). An experimental model to study the in vivo survival of von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 279: 12102-9.

Levy, GG., Nichols, WC., Lian, EC., Foreud, T., McClintick, JN., McGee, BM., Yang, AY., Siemieniak, DR., Stark, KR., Gruppe, R., Sorode, R., Shurin, SB., Chandraschkaram, V., Stabler, SP., Sabin, H., Bouhaesira, EE., Upshaw, JD. Jr, Ginsburg, D. and Tsai, HM. (2001). Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature.* 413: 488-94.

Lichtman MAL, Beutler, E., Kaushansky, K., Kipps, TJ., Seligsohn, U. and Prchal, J. (2008). Williams Hematology, 7th Edition. McGraw-Hill Medical, Chapters 112 (p. 1806) and 118 (p. 1937).

MacFarlane, RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. (1964). *Nature.* 202: 498-9.

Mailhac, A., Badimon, JJ., Fallon, JT., Fwernandez-Ortiz, A., Meyer, B., Chesebro, JH., Fuster, V. and Badimon, L. (1994). Effect of the eccentric severe stenosis on fibrin(ogen) deposition on severely damaged vessel wall in arterial thrombosis: Relative contribution of fibrin(ogen) and platelets. *Circulation.* 90: 988-96.

Majerust, EM., Anderson, PJ. and Sadler, JE. (2005). Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 280: 21773-8.

Marti, T., Rösselet, SJ., Titani, K. and Walsh, KA. (1987). Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry.* 26: 8099-8109.

Martin, C., Morales, LD. and Cruz, MA. Purified A2 domain of von Willebrand factor binds to the active conformation of von Willebrand factor and blocks their interaction with the platelet glycoprotein Iba. (2007). *J Thromb Haemost.* 5: 1363-6.

Matsui, T., Hamako, J. and Titani, K. (2010). Structure and function of snake venom proteins affecting platelet plug formation. *Toxins.* 2: 10-23.

Matsushita, T. and Sadler, E. (1995). Identification of amino acid residues essential for von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 270: 13406-14.

Mazzucato, M., Spessotto, P., Masottu, A., De Appollonia, L., Cozzi, MR., Yoshioka, A., Perris, R., Colombatti, A. and De Marco, L. (1999). Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow. *J Biol Chem.* 274: 3033-41.

McKinnon, TAJ., Chion, ACK., Millington, AJ., Lane, DA. and Laffan, MA. (2008). N-linked glycosylation of vWF modulates its interaction with ADAMTS13. *Blood.* 6: 3042-50.

McKinnon, TAJ., Goode, EC., Birdsey, GM., Nowak, AA., Chan, AC., Lane, DA. and Laffan, MA. (2010). Specific N-linked glycosylation sites modulate synthesis and secretion of von Willebrand factor. *Blood.* 116: 640-8.

Menache, D., Aronson, DL., Darr, F., Montgomery, RR., Gill, JC., Kessler, CM., Lusher, JM., Phatak, PD., Shapiro, AD., Thompspon, AR. and White, GC. (1996). Pharmacokinetics of von Willebrand factor and factor VIIC in patients with severe von Willebrand factor (type 3 VWD): estimation of the rate of factor VIIC synthesis. *Br J Haematol.* 94: 740-5.

Mendolicchio, GL. and Ruggeri, ZM. (2005). New perspectives of von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol.* 42: 5-14.

Meyer, D. and Girma, J-P. (1993). von Willebrand factor: Structure and function. *Thromb Haemost.* 70: 99-104.

Millar, CM. and Brown, SA. (2006). Oligosaccharide structures of von Willebrand factor and their potential role in von Willebrand disease. *Blood Rev.* 20: 83-92.

Miura, S., Li, CQ., Cao, Z., Wang, H., Wardell, MR. and Sadler, JE. (2000). Interaction of von Willebrand factor domain A1 with platelet glycoprotein Iba-(1-289). *J Biol Chem.* 275: 7539-46.

Miyata, S. and Ruggeri, ZM. (1999). Distinct structural attributes regulating von Willebrand factor A1 domain interaction with platelet glycoprotein Iba under flow. *J Biol Chem.* 274: 6586-93.

Moake, JL. (2002). Mechanisms of disease: Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med.* 347: 589-600.

Moake, JL., Rudy, CK., Troll, JH., Weinstein, MJ., Colannino, NM., Azocar, J., Seder, RH., Hong, SL. and Deykin, D. (1982). Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 307: 1432-5.

Mohri, H., Fujimura, Y., Shima, M., Yoshioka, A., Houghten, RA., Ruggeri, ZM. and Zimmerman, TS. (1988). Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 263: 17901-4.

Mohri, H., Yoshioka, A., Zimmerman, TS. and Ruggeri, ZM. (1989). Isolation of the von Willebrand factor domain interacting with platelet glycoprotein Ib, heparin and collagen and characterization of its three distinct functional sites. *J Biol Chem.* 264: 17361-7.

Molales, LD., Martin, C. and Cruz MA. (2006). The interaction of von Willebrand factor-A1 domain with collagen : mutation G1324S (type 2M von Willebrand disease) impairs the conformational in A1 domain induced by collagen. *J Thromb Haemost.* 4: 417-25.

Monroe, DM., Hoffman, M. and Roberts, HR. (2002). Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22; 1381-9.

Moroi, M. and Jung, SM. (2007). A mechanism to safeguard platelet adhesion under high shear flow: von Willebrand factor-glycoprotein Ib and integrin $\alpha 2\beta 1$ -collagen interactions make complementary, collagen-typ-specific contributions to adhesion, *J Thromb Haemost.* 5: 797-803.

Moroi, M., Jung, SM., Nomura, S., Sekiguchi, S., Ordinas, A. and Diaz-Ricart, M. (1997). Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein IB interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions. *Blood.* 90: 4413-24.

Nakayama, T., Matsushita, T., Dong, Z., Sadler, JE., Jorieux, S., Mazurier, C., Meyer, D., Kojima, T. and Saito, H. (2002). Identification of the regulatory elements of the human von Willebrand factor for binding to platelet GPIba. Importance of structural integrity of the regions flanked by the CYS1272-CYS1458 disulfide bond. *J Biol Chem.* 277: 22063-72.

Nieuwenhuis, HK., Akkerman, JW., Houdijk, WP. and Sixma, JJ. (1985). Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature.* 318: 470-2.

- Nishio, K., Anderson, PJ., Zheng, XL. and Sadler, JE. (2004). Binding of platelet glycoprotein Iba1 α to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *PNAS*. 101: 10578-83.
- Nossent, AY., Marion, V., Van Tilburg, NH., Rosendaal, FR., Bertina, RM., van Mourik, JA. and Eikenboom, HC. (2006). Von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 4: 2556-62.
- O'Donnell, J., Mille-Baker, B. and Laffan, M. (2000). Human umbilical vein endothelial cells differ from other endothelial cells in failing to express ABO blood group antigens. *J. Vasc. Res.* 37: 540-7.
- Oliver, JA., Monroe, DM., Roberts, HR. and Hoffman, M. (1999). Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 170-7.
- Orstavik, KH. (1990). Genetics of plasma concentration of von Willebrand factor. *Folia Haematol.* 117: 527-31.
- Pentas, S. (2010). *PHD Thesis*. Faculty of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki.
- Perkins, SJ., Smith, KF., Williams, SC., Haris, PI., Chapman, D. and Sim, RB. (1994). The secondary structure of the von Willebrand factor type A domain in factor B of human complement by Fourier-transform infrared spectroscopy. Its occurrence in collagen type-VI, type-VII, type-XII and type-XIV, the integrins and other proteins by averaged structure predictions. *J Mol Biol.* 238: 104-19.
- Philips, DR., Charo, IF. and Scarborough, RM. (1991). GPIIb/IIIa: the responsive integrin. *Cell.* 65: 359-62.
- Provan, D., Singer, CRJ., Baglin, T. and Dokal, I. (2009). Oxford Handbook of Clinical Haematology, 3rd Edition, *Oxford Handbooks Series*. Chapter 10.
- Read, MS., Smith, SV., Lamb, MA. and Brinkhous, KM. (1989). Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex of botrocetin and von Willebrand factor. *Blood.* 74: 1031-5.
- Reininger, AJ., Heijnen, HF., Schumann, H., Specht, HM., Schramm, W. and Ruggeri, ZM. (2006). Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood.* 107: 3537-45.
- Reynolds, C., Damerell, D., Jones, S. (2009). Protorp: a protein-protein interaction analysis server. *Bioinformatics application note.* 25: 413-4. (<http://www.bioinformatics.sussex.ac.uk/protorp/index.html>)

- Ritchie, DW. (1998). Parametric Protein Shape Recognition, PhD Thesis, University of Aberdeen.
- Roth, GJ., Titani, K., Hoyer, LW. and Hickey, MJ. (1986). Localization of binding sites within human von Willebrand factor for monomeric type III collagen. *Biochemistry*. 25: 8357-61.
- Ruggeri, ZM. (1997). von Willebrand factor. *J Clin Invest*. 99: 559-64.
- Ruggeri, ZM. (1997). Perspective series: cell adhesion in vascular biology. *J Clin Invest*. 99: 559-64.
- Ruggeri, ZM. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 8: 1227-34.
- Ruggeri, ZM. (2003). Von Willebrand factor, platelets, and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost*. 1: 1335-42.
- Ruggeri, ZM. (2004). Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall. *Hämostaseologie*. 24: 1-11.
- Ruggeri, ZM. (2005). Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb. Hematol*. 42: 5-14.
- Ruggeri, ZM. (2007). The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res*. 5: 120.
- Ruggeri, ZM., Dent, JA. and Saldivar, E. (1999). Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing. *Blood*. 94: 172-8.
- Ruggeri, ZM and Mendolicchio, GL. (2007). Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res*. 100: 1673-85.
- Ruggeri, ZM. and Ware, J. (1993). von Willebrand factor. *FASEB J*. 7: 308-16.
- Sadler, JE. (1991). von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 266: 22777-80.
- Sadler, JE. (1994). A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 71: 520-5.
- Sadler, JE. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*. 67: 395-424.
- Sadler, JE. (2003). von Willebrand disease type 1: A diagnosis in search of a disease. *Blood*. 101: 2089-93.
- Sadler, JE. (2005). von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemos*. 3: 1702-9.

- Saenko, EL., Yakhyaev, AV., Mikhailenko, I., Strickland, DK. and Sarafanov, AG. (1999). Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem.* 274: 37685-92.
- Sakariassen, KS., Bolhuis, PA. and Sixma, JJ. (1979). Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor to the subendothelium. *Nature.* 279: 636-8.
- Salemink, I., Franssen, J., Willems, GM., Hemker, HC. and Lindhout, T. (1999). Inhibition of tissue factor-factor VIIa-catalyzed factor X activation by factor Xa-Tissue factor pathway inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry.* 274: 28225-32.
- Samor, B., Michalski, JC., Mazurier, C., Goudemand, M., De Waard, P, Vliegthart, JF., Strecker, G. and Montreuil, J. (1989). Primary structure of the major O-glycosidically linked carbohydrate unit of human von Willebrand factor. *Glycoconj J.* 6: 263-70.
- Sandy, JD., Westling, J., Kenagy, RD., Irela-Arispe, ML., Verscharen, C., Rodriguez-Mazaneque, JC., Zimmermann, DR., Lemire, JM., Fischer, JW., Wight, TN. and Clowes, AW. (2001). Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 276:13372-8.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F. and Ruggeri, ZM. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* 94: 657-66.
- Savage, B., Saldivar, E. and Ruggeri, ZM. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 84: 289-97.
- Savage, B., Sixma, JJ. and Ruggeri, ZM. (2002). Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow. *PNAS.* 99: 425-430.
- Schatzkel, K. (1991). Suppression of multiple-scattering by photon cross-correlation techniques. *J. Mod. Opt.* 38: 1849.
- Schellman, JA. (1997). The thermodynamics of solvent exchange. *Biopolymers.* 34: 1015-26.
- Shapiro, SS. (2003). Treating thrombosis in the 21st century. *N Engl J Med.* 349: 1762-4.
- Sheinerman, FB., Norel, R. and Honig, B. (2000). Electrostatic aspects of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 10: 153-9.
- Shelton-Inloes, BB., Titani, K. and Sadler, JE. (1986). cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domain and five possible protein sequence polymorphisms. *Biochemistry.* 25: 3164-71.

Siedlecki, CA., Lestini, BJ., Kottke-Marchant, KK., Eppell, SJ., Wilson, DL. and Marchant, RE. (1996). Shear Dependent Changes in the Three Dimensional Structure of Human von Willebrand Factor. *Blood*. 88: 1239-50.

Siegel, JM., Markou, CP., Ku, DN. and Hanson, SR. (1994). A scaling law for wall shear rate through an arterial stenosis. *J Biomech Eng*. 116: 446-51.

Soejima, K., Matsumata, M., Kokane, K., Yagi, H., Ishizachi, H., Maeda, H., Nozaki, C., Miyata, T., Gujimura, Y. and Nakagaki, T. (2003). ADAMTS13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood*. 102: 3232-7.

Soejima, K., Mimuca, N., Hirashima, M., Maeda, H., Hamamele, T., Nakagaki, T. and Nozaki, C. (2001). A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem*. 130: 475-80.

Souto, JC., Almasy, L., Soria, JM., Buil, A., Stone, W., Lathrop, M., Blangero, J. and Fontcuberta, J. (2003). Genome-wide linkage analysis of von Willebrand factor plasma levels: results from the GAIT project. *Thromb Haemost*. 89: 468-74.

Sporn, LA., Marder, VJ. and Wagner, DD. (1987). Von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively. *Blood*. 69: 1531-4.

Springer, TA. (2006). Complement and the multifaceted functions of VWA and integrin I domains. *Structure*. 14: 1611-6.

Stoddart, JH. Jr, Andersen, J. and Lynch, DC. (1996). Clearance of normal and type 2A von Willebrand factor in the rat. *Blood*. 88: 1692-9.

Strony, J., Beaudoin, A., Brands, D. and Adelman, B. (1993). Analysis of shear stress and hemodynamic factors in a model of coronary artery stenosis and thrombosis. *Am J Physiol*. 265: 1787-96.

Sugimoto, M., Dent, J., McClintock, R., Wake, J. and Ruggeri, ZM. (1993). Analysis of structure-function relationships in the GP Ib-binding domain of von Willebrand factor by expression of deletion mutants. *J Biol Chem*. 268: 12185-92.

Sugimoto, M., Mohri, H., McClintock, RA. and Ruggeri, ZM. (1991). Identification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with botrocetin. *J Biol Chem*. 266: 12342-7.

Sugimoto, M., Tsuji, S., Kuwahara, M., Matsui, H., Miyata, S., Fujimura, Y. and Yoshioka, A. (1999). Shear-dependent functions of the interaction between soluble von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib in mural thrombus formation on a collagen surface. *Int J Hematol*. 69: 48-53.

Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, LH., Wade, RD. and Ashida, K. (1986). Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry*. 25: 3171-84.

Tomokiyo, K., Kamikubo, Y., Hanada, T., Araki, T., Nakatomi, Y., Ogata, Y., Jung, SM., Nakagaki, T. and Moroi, M. (2005). Von Willebrand factor accelerates platelet adhesion and thrombus formation on a collagen surface in platelet-reduced blood under flow conditions. *Blood*. 195: 1078-84.

Tortorella, MD., Burn, TC., Prattta, MA., Abbaszade, L., Hollis, JM., Liu, R., Rosenfeld, SA., Copeland, RA., Decicco, CP., Wynn, R., Rockwell, A., Yang, F., Duke, JL., Solomon, K., Tortorella, M., Pratta, M., Liu, RQ., Abbaszade, I., Ross, H., Burn, T. and Arner, E. (2000). The thrombospondin motif of aggregatase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem*. 275: 25791-7.

Tournon, J., Kuntz, E. and el-Bayoumi, MA. (1972). Fluorescence quenching in phenylalanine and model compounds. *Photochem Photobiol*. 16: 425-33.

Tsai, HM. (1996). Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*. 87; 4235-44.

Tsai HM. (2003). Shear stress and von Willebrand factor in health and disease. *Semin Thromb Haemos*. 29: 479-88.

Tsai, HM. and Lian, EC. (1998). Antibodies in von Willebrand factor cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 339: 1585-94.

Tsai, HM., Nagel, RL., Hatcher, VB. and Sussman, II. (1989). Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor. *Blood*. 73: 2074-6.

Tsai, HM., Sussman, II. and Nagel, RL. (1994). Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood*. 83:2171-9.

Turitto, VT., Weiss, HL. and Baumgartner, HR. (1984). Platelet interactions with rabbit subendothelium in von Willebrand's disease: altered thrombus formation distinct from defective platelet adhesion. *J Clin Invest*. 74: 1730-41.

Uff, S., Clemetson, JM., Harrison, T., Clemetson, KJ. and Emsley, J. (2002). Crystal structure of the platelet glycoprotein Iba N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation. *J Biol Chem*. 38: 35657-63.

Unger, TF. (1997). Show Me The Money: Prokaryotic Expression Vectors and Purification Systems. *The Scientist*. 17: 20-3.

Ulrichs, H., Udvardy, M., Lenting, PJ., Pareyn, I., Vandeputte, N., Vanhoorelbeke, K. and Deckmyn, H. (2006). Shielding of the A1 domain by the D'D3 domains of von Willebrand factor modulates its interaction with platelet glycoprotein Ib-IX-V. *J Biol Chem*. 281: 4699-707.

Urban, C., Schurtenberger, P. (1998). Characterization of turbid colloidal suspensions using light scattering techniques combined with cross-correlation methods. *J. Colloid Interface Sci.* 207:150-8.

van Schooten, CJ., Denis, CV., Listman, T., Eikenboom, JC., Leebeek, FW., Goudemand, J., Fressinaud, E., van den Berg, HM., de Groot, PG. and Lenting, PJ. (2006). Variations in glycosylation of von Willebrand factor with O-linked sialylated T-antigen are associated with its plasma levels. *Blood.* 109:2430-7.

Velazquez-Campoy, A., Ohtaka, H., Nezami, A., Muzammil, S. and Freire, E. (2004). Isothermal titration calorimetry. *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 17. Unit 17-18.

Vermynen, J., Donati, MB., De Gaetano, G. and Verstraete, M. (1973). Aggregation of human platelets by bovine or human factor VIII: role of carbohydrate side chains. *Nature.* 244: 167-8.

Verweij, CL., Diergaatrd, PJ., Hart, M. and Pannekoek, H. (1986). Full length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit. *EMBO J.* 5: 1839-47.

Vicente, V., Houghten, RA. and Ruggeri, ZM. (1990). Identification of a site in the alpha chain of platelet glycoprotein Ib that participates in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem.* 265: 274-80.

Vischer, UM. and Wagner, DD. (1994). Von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies. *Blood.* 83: 3536-44.

Wagner, DD. (1990). Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol.* 6: 217-46.

Wagner, DD., Olmsted, JB. and Marder, VJ. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 95: 355-60.

Wannamethee, SG., Lowe, GD., Whincuo, PH., Rumley, A., Walker, M. and Lennon, L. (2002). Physical activity and hemostatic and inflammatory variables in elderly men. *Circulation.* 105: 1785-90.

Watson, SP. and Gibbons, J. (1998) Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol. Today.* 19: 260-4.

Weiss, HL., Turitto, VT. and Baumgartner, HR. (1978). Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood, I: shear rate dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Med.* 92: 750-64.

Wells, JA (1991). Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces. *Methods Enzymol.* 202: 390-411.

- Wetlaufer, DB. (1962). Ultraviolet spectra of proteins and aminoacids. *Adv Protein Chem.* 17: 304-90.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, JF. and Lin, LN. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem.* 179: 131-7.
- Wright, IS. (1962). The nomenclature of blood clotting factors. *Can Med Assoc J.* 86: 373-4.
- Yang, JT., Wu, CS. and Martinez, HM. (1999). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 130: 208-69.
- Yarnell, JW., Sweetnam, PM., Rumley, A. and Lowe, GD. (2001). Lifestyle factors and coagulation activation markers: the Caerphilly study. *Blood Coagul Fibrinolysi.* 12: 721-8.
- Zhang, Q., Zhou, YF., Zhang, CZ., Zhang, X., Lu, C. and Springer, TA. (2009). Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *PNAS.* 106: 9226-31.
- Zhang, W., Motto, D. and Ginsburg, D. (2004). ADAMTS13 binds VWF via its C-terminal CUB2 domain. *Blood.* 104: 39a.
- Zhao, Y., Dong, N., Shen, F., Xie, L., He, Y., Liu, F. and Ruan, C. (2007). Two novel monoclonal antibodies to VWFA3 inhibit VWF-collagen and VWF-platelet interactions. *J Thromb Haemost.* 5: 1963-70.
- Zheng, X. (2009). A team player: the disintegrin domain of ADAMTS13. *Blood.* 113: 5373-4.
- Zheng, X., Chung, D., Takayama, TK., Majerus, EM., Sadler, JE. and Fujikawa, K. (2001). Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem.* 276: 41059-63.
- Zheng, X., Nishio, K., Majerus, EM. and Sadler JE. (2003). Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. 2003. *J Biol Chem.* 278: 30136-41.

ABSTRACT

Haemostasis is an absolutely essential body defense system for normal life that impedes the disturbance of blood flow and the loss of blood and provides the repair of injured vasculature and tissue. Thrombus generation occurs when a vessel is damaged or inflamed. The complex process of thrombus generation is mediated by platelets, endothelial cells and coagulation factors. At the same time, the fibrinolysis system and physiological inhibitors are activated to inhibit the mechanism of clot generation. These two opposing phenomena contribute to a self-control mechanism of clot growth and thus, the process of thrombus creation is brief.

Von Willebrand factor (vWF) is a big multimeric glycoprotein responsible for stopping bleeding in case of vascular damage. vWF contains several functional domains that are arranged in the order D', D3, A1, A2, A3, D4, B1, B2, B3, C1, C2 and CK. The A1 domain contains a binding site for the platelet receptor GPIb α . GPIb α is essential for platelet adhesion to exposed tissues, where a discontinuity in the vascular endothelium is directing platelet aggregation and thrombus formation. The A2 domain contains a cleavage site specific for ADAMTS13 metalloprotease. This proteolysis is the predominant physiological for normal feedback of vWF and prevention of blood coagulation. The A1 domain binds to platelet receptor GPIb α inhibiting the cleavage of A2, while A2 prevents the formation of the A1-GPIb α complex. Recent data suggested an interaction between A1 and A2 domains, which inhibits the binding to the receptor GPIb α and platelet thrombus growth underscoring the antithrombotic potential. The study of the A1-A2 interaction could help to clarify the mechanism of complex formation and its role in haemostasis reactions.

The human genes encoding A1 and A2 domains were cloned and expressed to a bacterial system and the recombinant A1 and A2 proteins were overexpressed and purified in the absence of post-translational modifications occurring *in vivo*. The secondary structure of each protein and their mixture were analyzed by Circular Dichroism (CD) and the analysis indicated conformational changes. The binding of the two proteins was investigated indirectly by home made ELISA using an antibody against the A2 domain and the thermodynamic characteristics of the complex were studied by Isothermal Calorimetry (ITC). The interaction of A1 and A2 domains was also studied by Fluorescence Spectroscopy obtaining spectra at the wavelength of maximum absorption of tryptophan.

Molecular Dynamic Simulations were used to search for models of the A1-A2 complex and three probable model structures were identified. The critical residues of A2 domain participating to A1-A2 interaction were also located. Some of these residues at the first model were Glu¹⁵⁴⁹ and Glu¹⁵⁵⁴, at the second model was Glu¹⁶⁴⁰ and at the third model were Glu¹⁵¹¹, Glu¹⁵¹⁹, Glu¹⁵²² και Asp¹⁶⁶³. By Site-Directed Mutagenesis A2 mutant proteins were generated for each model, where the residues Glu¹⁵⁴⁹, Glu¹⁶⁴⁰ and Glu¹⁵¹¹ were converted to alanines. The three A2 mutant proteins were expressed, purified and their binding to the wild type A1 domain was studied by Fluorescence Spectroscopy. This study of the A1-A2 complex characteristics may provide evidence for the establishment of the A2 domain as the lead compound for the design of new and potent antithrombotic factors against the vWF-GPIIb/IIIa axis.