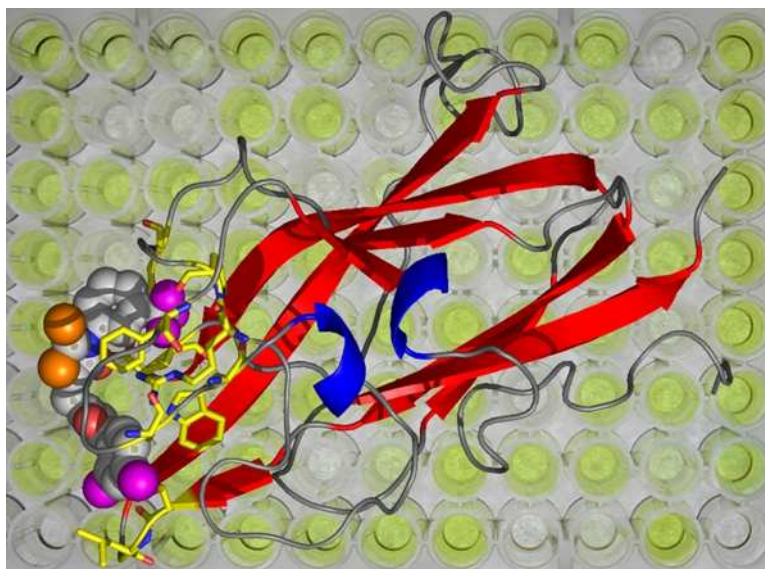




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΣΙΟΥΤΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

**« Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατείων A1 και A2 του
παράγοντα πήξης του αίματος von Willebrand μέσω
κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης »**



ΛΑΡΙΣΑ 2010

**« Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2
του παράγοντα πήξης του αίματος von Willebrand μέσω
κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης »**

Τριμελής Επιτροπή

- Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Κοντού Μαρία, Λέκτορας Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδόπουλος Γεώργιος, Λέκτορας Καθηγητής Βιοφυσικής του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

- **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

- **ABSTRACT**

- **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

1. Νόσος von Willebrand
2. Βιολογικά χαρακτηριστικά
3. Δομή του γονιδίου
4. Βιοσύνθεση και πολυμερική δομή
5. Αποθήκευση, έκκριση και κυκλοφορία
6. Μοριακή δομή
7. Σχέση δομής λειτουργίας
8. Δομή των περιοχών A1 και A2

- **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

- **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

I. ΚΥΤΤΑΡΑ, ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ENZYMA

1. Επιδεκτικά κύτταρα BL21
2. Το σύστημα PET
3. HRV 3C πρωτεάση

II. ΥΛΙΚΑ

1. Ρυθμιστικά διαλύματα
2. Θρεπτικά υλικά
3. Μάρτυρες
4. Αντισώματα

III. ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Καλλιέργειες
2. Καθαρισμός των πρωτεϊνών με στήλη GSH (Γλουταθειόνη)
3. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)
4. Ανοσοαποτύπωση (WESTERN BLOT)
5. Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford
6. Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση Σημείου

7. Ηλεκτρόφορηση πηκτώματος αγαρόζης
8. Απομόνωση πλασμιδίων (Mini – preps)
9. Φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχροϊσμού
10. Φασματοσκοπία φθορισμού

- **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

- Εισαγωγή
- Καθαρισμός των επικρατειών A1 και A2 του vWF και της πρωτεάσης 3C με στήλη GSH (Πέψη της GST ουράς από την πρωτεάση 3C)
- Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών A1 και A2 με την μέθοδο της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμού και της φασματοσκοπίας φθορισμού
- Παραγωγή των μοντέλων A, B και Γ της επικράτειας A2 μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης

- **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

- **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γεώργιο Παπαδόπουλο, Λέκτορα Βιοφυσικής, για την πολύτιμη συμβολή του στο σχεδιασμό των μοντέλων των μεταλλάξεων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω, στην υποψήφια διδάκτωρ Ζωή Καρούλια για την πολύτιμη βοήθεια καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων, για τις πολύτιμες συμβουλές αλλά και για την ηθική υποστήριξη και την υποψήφια διδάκτωρ Δήμητρα Κατσαρού για την συμμετοχή της στην πραγματοποίηση των μοριακών τεχνικών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους δουλεύουν στο εργαστήριο για τη βοήθεια και την καλή συνεργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο παράγοντας von Willebrand διαδραματίζει ένα καθοριστικό ρόλο στην αιμόσταση, καθώς είναι υπεύθυνος για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο του τραυματισμένου αγγείου και διατηρεί την ακεραιότητα του παράγοντα VIII της αιμόστασης, με τον οποίο συνδέεται, προστατεύοντάς τον από πρωτεολυτική καταστροφή στην κυκλοφορία. Η ελαττωμένη δράση του vWF, είτε λόγω ανεπαρκούς παραγωγής είτε λόγω παρουσίας δυσλειτουργικών μορφών του, προκαλεί αιμορραγική διάθεση. Αντίθετα, αυξημένη δράση του παράγοντα προκαλεί διαταραχή του καταβολισμού του αυξάνοντας τον κίνδυνο θρομβώσεων.

Το αρχικό προϊόν του γονιδίου του vWF, είναι μια πρωτεΐνη 2.813 αμινοξέων. Διαφορετικά τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αντιστοιχούν στους τέσσερις τύπους επαναλαμβανόμενων περιοχών (D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, A4, D4, B, C1, C2) του cDNA, και είναι υπεύθυνες για διαφορετικά χαρακτηριστικά δέσμησης του μορίου. Η A1-επικράτεια αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 497-716 του ώριμου vWF και το αμινοτελικό άκρο συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο της μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ Cys509 και Cys695. Η επικράτεια αυτή εμπλέκεται στη δέσμηση του vWF στον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα Ib των αιμοπεταλίων (GPIb). Η A2-επικράτεια του vWF αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 717-909 και διαθέτει μια φυσιολογική θέση πέψης μεταξύ Tyr842 και Met843 που αναγνωρίζεται από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13. Η δράση αυτή της ADAMTS-13 την καθιστά πολύ σημαντική για τη φυσιολογική ανακύκλωση του vWF και για την αποφυγή θρομβώσεων.

Μελέτες που έχουν γίνει δείχνουν ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ A1 και A2 περιοχών που εμποδίζει τη σύνδεση της A1 στα αιμοπετάλια, επομένως και την πήξη του αίματος. Με την εύρεση των κατάλληλων στοιχείων αλληλεπίδρασης των δύο επικρατειών θα είναι δυνατός ο σχεδιασμός κατάλληλων μορίων σύνδεσης στην A1-περιοχή που θα μπορούν να μιμούνται τον τρόπο σύνδεσης της A2-περιοχής εμποδίζοντας την πήξη του αίματος. Τα μόρια αυτά θα μπορούσαν επομένως να χρησιμοποιηθούν ως αντιθρομβωτικοί παράγοντες.

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 μέσω φασματοπωλοσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμού και φασματοσκοπίας φθορισμού, κλωνοποιήθηκαν τα γονίδια A1 και A2, υπερεκφράστηκαν οι αντίστοιχες πρωτεΐνες

και καθαρίστηκαν. Μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης της A2-επικράτειας δόθηκαν στοιχεία για τα αμινοξέα που μετέχουν στην αλληλεπίδραση.

ABSTRACT

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

The early product of the vWF gene is a protein of 2.813 amino – acids. Different proteins correspond to the four types of repeated domains (D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, A4, D4, B, C1, C2) of cDNA, and are responsible for different characteristics of molecular binding. The A1 – domain corresponds to the residues 497 – 716 of the mature vWF, and its N – end binds to the C – end through a disulfide bond between Cys509 and Cys695. This loop is involved in the binding of vWF on the glycoprotein receptor Ib of the platelets (GPIb). The A2 – domain of vWF corresponds to the residues 717 – 909 and contains a normal digestion site between Tyr842 and Met843 which is recognized by the metalloprotease ADMTS – 13 and is related to the normal feedback of vWF and prevention of blood coagulation.

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

In order to study the interaction of A1 and A2 – domains via circular dichroism and spectrometry of fluorescence, genes were cloned and proteins over – expressed and purified. Via directed mutagenesis of the A2-domain were given elements for the exact aminoacids that take part at the interaction.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Νόσος von Willebrand

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

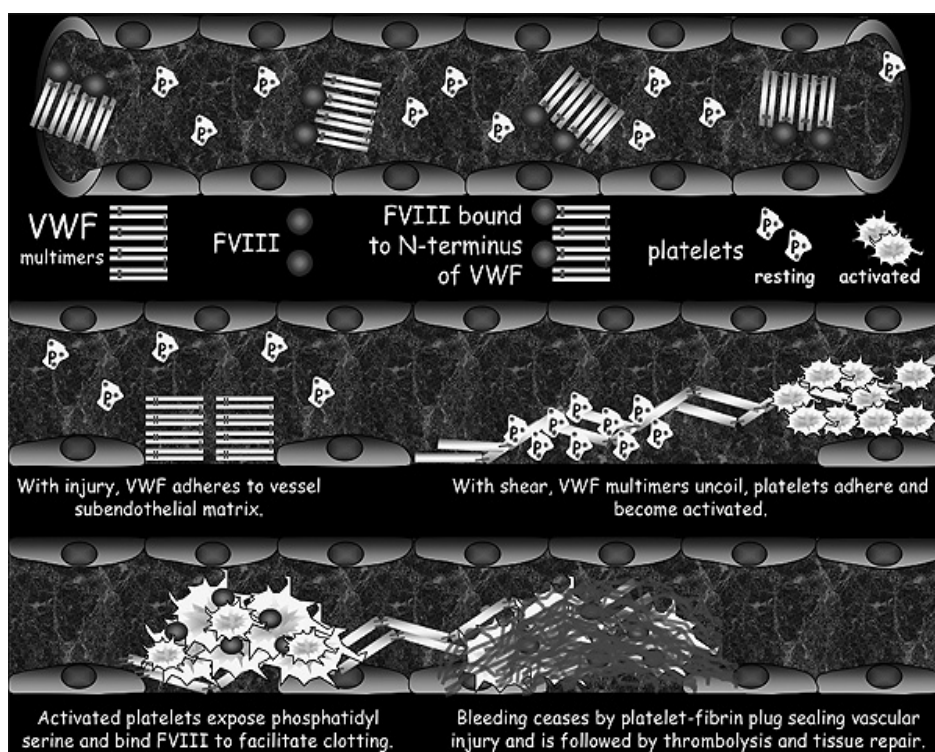
Η νόσος von Willebrand είναι η πιο συχνή κληρονομική διαταραχή της αιμόστασης με συχνότητα περίπου 1% παγκοσμίως [2]. Χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ετερογένεια στην κλινική της έκφραση. Η διάγνωσή της στηρίζεται σε τρεις παραμέτρους: το ατομικό ιστορικό αιμορραγιών δέρματος και βλεννογόνων, το οικογενειακό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

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

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

2. Βιολογικά χαρακτηριστικά

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



Εικ.1 vWF και φυσιολογική αιμόσταση

Σε σημεία αγγειακής βλάβης ο παράγοντας συνδέεται με το υπενδοθηλιακό ιστό κυρίως μέσω σύνδεσης του κολλαγόνου με τη A3 περιοχή. Στη συνέχεια λειτουργεί ως υπόστρωμα για την σύνδεση των αιμοπεταλίων μέσω του υποδοχέα τους GPIIb₃ στην A1 περιοχή του παράγοντα και έτσι προωθείται η έναρξη του σχηματισμού θρόμβου [3]. Ωστόσο, λόγω της υψηλής ταχύτητας ροής του αίματος, η σύνδεση αυτή

δεν είναι αρκετή για να ακινητοποιήσει πλήρως τα αιμοπετάλια. Η αρχική σύνδεση vWF - GPIIb₃ ενεργοποιεί τον υποδοχέα α_{IIb}β₃ της επιφάνειας των αιμοπεταλίων, ώστε να συνδεθεί με την C1 περιοχή του vWF ολοκληρώνοντας την ακινητοποίηση των αιμοπεταλίων [4,5]. Στη συνέχεια, ο σύνδεσμος του α_{IIb}β₃ με διάφορα άλλα μόρια συνδέσμων (vWF, ινωδογόνο κ.α.) οδηγεί στην συγκόλληση όλο και περισσότερων αιμοπεταλίων και την αύξηση του θρόμβου [5].

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

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

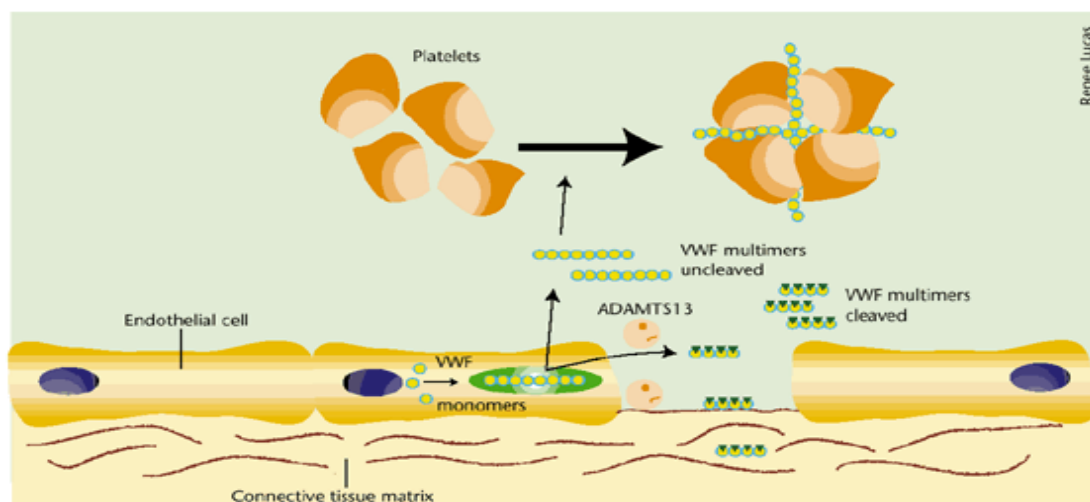
3. Δομή του γονιδίου

Ο vWF κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 [8,9]. Αποτελείται από 180 κιλοβάσεις και περιέχει 52 εξόνια [10]. Εκτός από τις A-περιοχές, το γονίδιο διαιρείται και σε άλλα τμήματα που κωδικοποιούν επαναλαμβανόμενες περιοχές που τείνουν να έχουν παρόμοιες αλληλουχίες συνόρων εξονίων – ιντρονίων. Στο χρωμόσωμα 22, υπάρχει μια περιοχή αντίγραφο της αλληλουχίας των εξονίων 23 έως 34 του γονιδίου του vWF [11,12]. Το ψευδογονίδιο αυτό αποτελείται από 21-29 κιλοβάσεις και κωδικοποιεί το 34% της αλληλουχίας του vWF περιέχοντας και τις A-περιοχές. Το γονίδιο του vWF και το ψευδογονίδιο έχουν απόκλιση μόνο 3,1%, κάτι που ίσως σημαίνει ότι το ψευδογονίδιο προέκυψε πρόσφατα, ίσως 20-30 εκατομμύρια χρόνια πριν [12]. Από τότε που οι A-περιοχές αναγνωρίστηκαν στον vWF [13], ομόλογες A-περιοχές έχουν βρεθεί σε πολλές άλλες πρωτεΐνες όπως την σερίνο-πρωτεάση συμπλήρωμα παράγοντα B και το συγγενές συμπλήρωμα C2, δυο ομάδες ιντεγκρινών, τρεις υποδοχείς προσκόλλησης λευκοκυττάρων (Mac-1, LFA-1, p150) και δύο υποδοχείς κολλαγόνου και όλες τις τρεις αλυσίδες του κολλαγόνου τύπου VI. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστά 12 γονίδια που μαζί κωδικοποιούν τουλάχιστον 29 A-περιοχές σαν αυτές του vWF, συχνά μαζί με μη συγγενικά δομικά μοτίβα. Οι υψηλά επαναλαμβανόμενες δομές από τις οποίες αποτελείται το γονίδιο του vWF, δείχνουν ότι ο vWF έχει μια πολύπλοκη εξελικτική ιστορία που συνδέεται από επαναλαμβανόμενα τμήματα που έχουν προκύψει από διαιρέσεις γονιδίων, διπλασιασμούς και ανακατατάξεις εξονίων.

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

4. Βιοσύνθεση και πολυμερική δομή

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



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

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

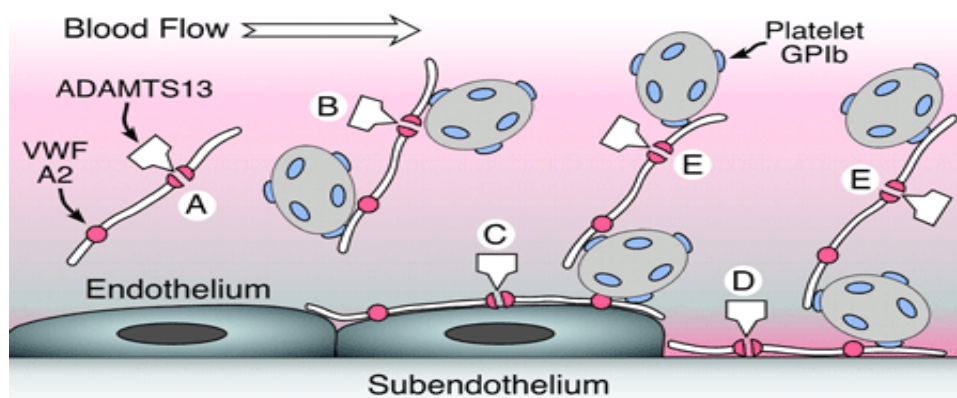
από τα πολυμερή, των οποίων οι ώριμες μορφές είναι πλέον έτοιμες προς έκκριση (Εικ. 2).

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

5. Αποθήκευση, έκκριση και κυκλοφορία

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

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



Εικ.3 Απομόνωση vWF από την δράση της ADAMTS-13

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

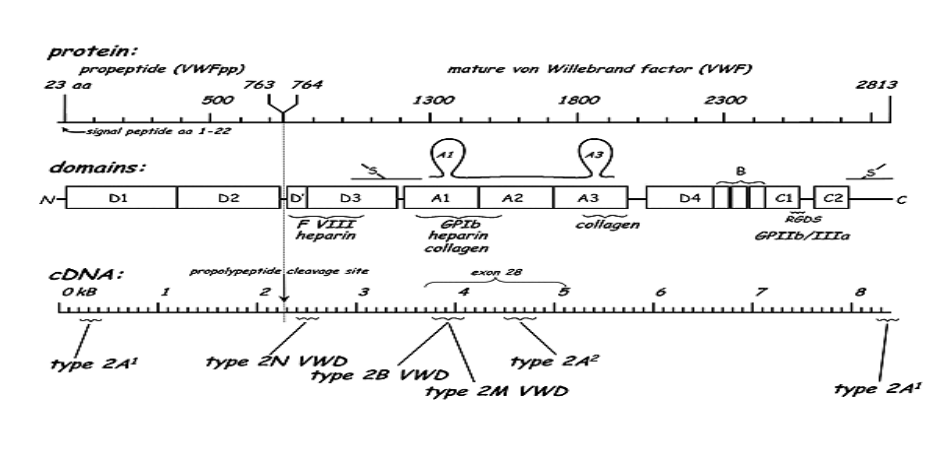
Στην κυκλοφορία τα πολυμερή έχουν χρόνο ημίσειας ζωής 12-20 ώρες [17] και απομακρύνονται με μηχανισμό ανεξάρτητο του μεγέθους τους. Στα ULvWF των αποθηκευτικών κοκκίων ανιχνεύονται μικρότερα πολυμερή τα οποία περιέχουν και κατακερματισμένες ώριμες μορφές του vWF [18]. Το μέγεθος των πολυμερών στην κυκλοφορία εξαρτάται από την πρωτεόλυση τους από την μεταλλοπρωτεάση

ADAMTS-13. Η ADAMTS-13 διασπά τον δεσμό ανάμεσα στην Tyr842 και την Met843 της A2-περιοχής [20,21]. Η διάσπαση αυτή δίνει δύο τμήματα, 176 KDaltons και 140 KDaltons, και είναι υπεύθυνη για τα δορυφορικά τμήματα που βρίσκονται στα άκρα του vWF σε πηκτώματα πολυμερών [22,23]. Στα αιμοπετάλια δεν εντοπίζονται αυτά τα προϊόντα αποικοδόμησης [23], γεγονός που συμφωνεί με την απομόνωση του vWF από την δράση της ADAMTS-13 (Εικ.3).

6. Μοριακή δομή

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

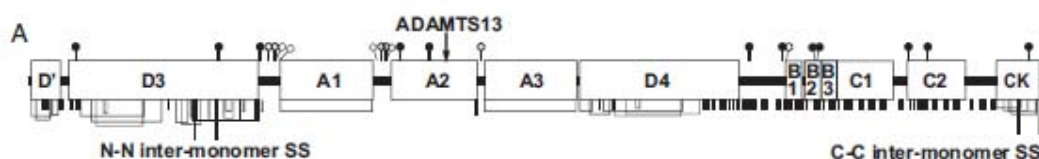
Σε μια αρίθμηση που ξεκινάει από το πρώτο αμινοξύ του πεπτιδίου-οδηγού, το 764 είναι το πρώτο αμινοξύ της ώριμης πρωτεΐνης. Διαφορετικές πρωτεΐνες αντιστοιχούν στους τέσσερις τύπους επαναλαμβανόμενων περιοχών (D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, A4, D4, B, C1, C2) του cDNA, και είναι υπεύθυνες για διαφορετικά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



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

7. Σχέση δομής – λειτουργίας

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



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

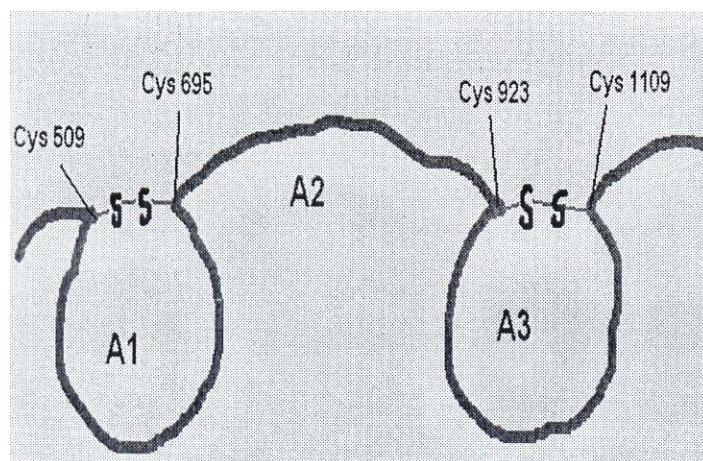
Οι D-περιοχές εμφανίζουν σημαντικές αλληλουχικές ομοιότητες μεταξύ τους, και η τοποθέτηση των περισσότερων καταλοίπων κυστεΐνης είναι συντηρημένη, γεγονός που υποδεικνύει ότι η τριτοταγής δομή των περιοχών αυτών ίσως είναι η ίδια. Τα κατάλοιπα Cys στην D3-περιοχή φαίνεται να συμμετέχουν σε έναν ενδομοριακό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

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

Οι επαναλαμβανόμενες A-επικράτειες είναι μοτίβα τριπλετών αποτελούμενα από τα κατάλοιπα 497-1111 του ώριμου vWF. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μοτίβα σαν τις A-περιοχές είναι παρόντα και σε άλλες πρωτεΐνες, όπως κάποιες ιντεγκρίνες (Mac-1, LFA-1, p150,95, VLA-2), ή σε συστατικά συμπλόκων όπως διαφόρων τύπων κολλαγόνου ή του παράγοντα Β. Μεταξύ των πρωτεϊνών που περιέχουν τουλάχιστον μια A-περιοχή, είναι η VLA-2 (Very Late Antigen, πολύ πρόσφατο αντιγόνο), η A-περιοχή της οποίας είναι μέρος ενός ετεροδιμερούς συμπλόκου (γνωστό στα

αιμοπετάλια ως GP Ia-ha) που αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο. Επιπροσθέτως, μερικά από τα πολλά αντίγραφα της Α-περιοχής στην α3(VI) αλυσίδα του κολλαγόνου τύπου VI μπορεί επίσης να συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με άλλα είδη κολλαγόνου. Σύμφωνα με αυτές τις ομοιότητες στο δέσιμο των προσδετών, οι Α-περιοχές σε διάφορες πρωτεΐνες σαφώς εμπλέκονται σε εξειδικευμένες αναγνωρίσεις [25].

Οι Α1, Α2 και Α3 περιοχές είναι το κλειδί για τις μακρομοριακές αλληλεπιδράσεις του vWF. Η Α1-περιοχή του vWF περιέχει έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys509-Cys695 που δημιουργεί μια θηλιά 185 καταλοίπων. Στην θηλιά αυτή περιέχονται θέσεις δέσμησης για διάφορα μακρομόρια, συμπεριλαμβανομένου και του υποδοχέα GPIb των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα οι περιοχές ανάμεσα στα κατάλοιπα 559-566 (β3 περιοχή) και στα κατάλοιπα 594-603 (α3 έλικα), φαίνεται να είναι αυτές που αλληλεπιδρούν με εξειδικευμένα κατάλοιπα του υποδοχέα GPIb. Σε διάλυμα, ο ανθρώπινος vWF δεν δεσμεύεται αυθόρμητα στον GPIb. Αυτή η αντίδραση, προωθείται φυσιολογικά από την δέσμευση του vWF στο υπενδοθηλιακό συνδετικό ιστό [30], ενώ *in vitro*, η δέσμευση του vWF με τον GPIb μπορεί να προαχθεί με το αντιβιοτικό ριστοσετίνη (ristocetin) [26]. Η συνάθροιση των αιμοπεταλίων που προωθείται από το αντιβιοτικό ριστοσετίνη αποτελεί και την βάση πολλών κλινικών δοκιμών της λειτουργίας του vWF [31]. Διακριτά τμήματα της Α1-περιοχής μεσολαβούν στην προωθούμενη από το αντιβιοτικό ριστοσετίνη δέσμευση του vWF με τον GPIb των αιμοπεταλίων [32]. Το δηλητήριο πολλών οχιών του γένους Bothrops, ειδικά οι Bothrops jararaea, περιέχει μια πρωτεΐνη που ονομάζεται “bothrocetin” που επίσης προωθεί την αλληλεπίδραση του vWF με τον GPIb [33]. Η “bothrocetin” δένεται άμεσα στην Α1-επικράτεια μέσα στην θηλιά που δημιουργείται από τις Cys509- Cys695 [34]. Αυτή η ίδια περιοχή περιέχει διακριτές θέσεις δέσμησης για την ηπαρίνη [26], τα σουλφίδια [35,36] και το κολλαγόνο [28]. Παρά τις κάποιες δομικές ομοιότητες, η ηπαρίνη και τα σουλφίδια δεν δεσμεύονται συναγωνιστικά στον vWF [35]. Μια δεύτερη θέση δέσμησης κολλαγόνου είναι τοποθετημένη στην Α3-περιοχή [26]. Η Α3-περιοχή περιέχει επίσης έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys923-Cys1109, που δημιουργεί μια θηλιά ίδιου μήκους με αυτής της Α1-περιοχής [37]. Η Α2-περιοχή του vWF είναι παρόμοια με τις Α1 και Α3 περιοχές σε πρωτοταγή δομή αλλά στερείται της διατηρημένης δισουλφιδικής θηλιάς (Εικ.6).



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

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

Οι C-περιοχές του vWF έχουν παρόμοια αλληλουχία με την θρομβοσπονδίνη και τα α-προκολλαγόνα τύπου I και III. Οι θέσεις δέσμευσης στον vWF του GPIIb-IIIa συμπλόκου των δραστικών αιμοπεταλίων έχει τοποθετηθεί στην αλληλουχία Arg-Gly-Asp-Ser(1747), δίπλα στο καρβοξυτελικό άκρο της C1-περιοχής [26]. Η αλληλουχία Arg-Gly-Asp υπολογίζεται ως το σήμα της θέσης αναγνώρισης ή υποδοχέας προσκόλλησης της υπεροικογένειας των ιντεγκρινών, μέλη της οποίας

μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με την θρομβοσπονδίνη και το κολλαγόνο και απαντώνται σε πρωτεΐνες που επίσης δεσμεύονται στο GPIIb-IIIa. Αρκετές άλλες ιντεγκρίνες εκτός του GPIIb-IIIa, περιλαμβάνουν και υποδοχείς που αναγνωρίζουν την αλληλουχία Arg-Gly-Asp μέσω προσδετών τους, όμως δεν δένονται στον vWF. Αυτή η αλληλεπίδραση ευθύνεται για την δραστικότητα προσκόλλησης κυττάρων των πρωτεϊνών αυτών [43].

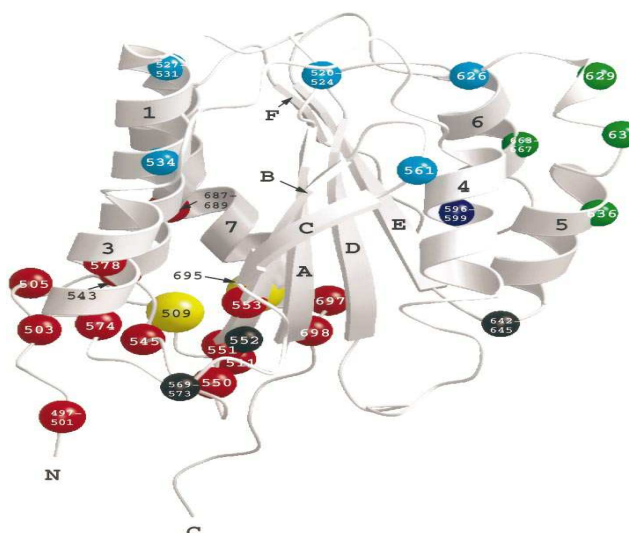
Η μόνη πληροφορία για τις λειτουργίες των B-περιοχών είναι ότι μια κατάλληλη διαμόρφωση της B2-περιοχής που εξαρτάται κάποια κρίσιμα κατάλοιπα Cys, ίσως είναι υπεύθυνη για την φυσιολογική πρωτεολυτική επεξεργασία των πολυμερών του vWF από την ADAMTS-13, δηλαδή την πέψη της Tyr1605-Met2606 στην A2-περιοχή.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

8. Δομή των περιοχών A1 και A2

Οι περιοχές A (A1,A2,A3) του vWF βρίσκεται σε διάφορες πρωτεΐνες του πλάσματος που συμμετέχουν σε διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες και θεωρείται προτύπη για μια υπεροικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τουλάχιστον 75 πρωτεΐνες που είναι ομόλογες στην αλληλουχία. Οι A1, A2 και A3 περιοχές είναι το κλειδί για τις μακρομοριακές αλληλεπιδράσεις του vWF.

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

Η δομή της A1 περιοχής απεικονίζεται στην Εικόνα 7. Η περιοχή A1 του vWF διαμορφώνει την κύρια περιοχή συνδέσης με την γλυκοπρωτεΐνη Ib των αιμοπεταλίων (GpIb), μια αλληλεπίδραση που είναι στενά ρυθμισμένη. Η κρυσταλλική δομή της A1 έχει επιλυθεί σε ευκρίνεια 2,3 Å [48]. Η πτυχωτή της επιφάνεια είναι όμοια με της A3 επικράτειας του vWF και της ιντεγκρίνης I και έχει μία κεντρική υδρόφοβη β-πτυχή που πλαισιώνεται από δύο έλικες. Οι έλικες ονομάζονται 1-7 και τα άκρα τους A-F. Το N- και το C- τελικό άκρο ενώνεται με ένα δισουλφιδικό δεσμό (Cys509-Cys695). Ο δισουλφιδικός δεσμός ενώνει 11 κατάλοιπα του N- τελικού άκρου με 10 κατάλοιπα του C- τελικού άκρου. Το γενικό σχήμα της δομής είναι κυβοειδής, με έξι σχεδόν επίπεδες επιφάνειες. Η πρόσθια επιφάνεια βρίσκεται στο ένα άκρο της β-πτυχής και περιέχει τις πλευρικές αλυσίδες των ελίκων 3 και 4, της C-πτυχωτής επιφάνειας και τις θηλίες που συνδέουν τις πλευρικές αλυσίδες. Η οπίσθια επιφάνεια βρίσκεται στο C- τελικό άκρο της β-πτυχωτής επιφάνειας και αποτελείται από τους βρόχους που συνδέουν την πτυχή με τις έλικες που την πλαισιώνουν [48].



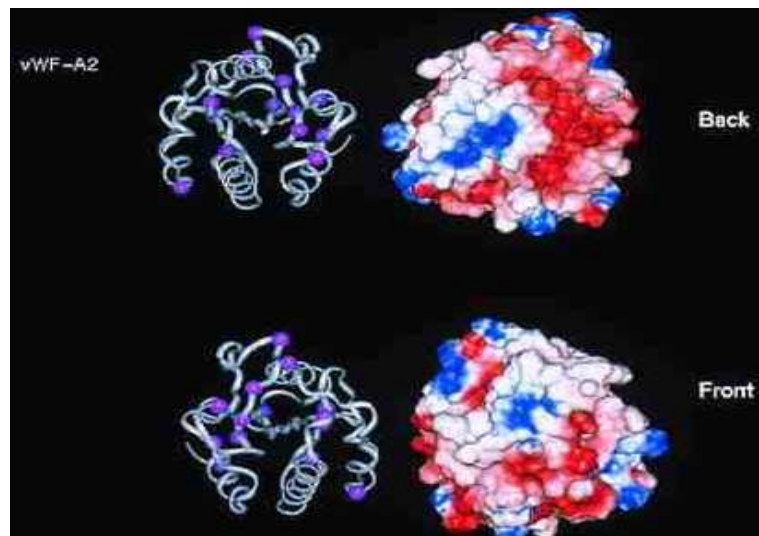
Εικ.7 Η δομή της A1 επικράτειας του vWF

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

Η δομή της A2 περιοχής φαίνεται στην Εικόνα 8. Η κρυσταλλική δομή (1,9 Å) της περιοχής A2 περιλαμβάνει ένα βρόγχο αντίθετα της α4 έλικας, και μία cis- προλίνη. Η κεντρική β4-πτυχή είναι φτωχά πακεταρισμένη. Η θέση κοπής από την ADAMTS-13 (Tyr842 και Met843) βρίσκεται στη β4-πτυχωτή επιφάνεια, και η τυροσίνη δομικά συνδέεται στο C- άκρο της α6 έλικας. Η α6 έλικα καταλήγει σε δύο κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία συνδέονται με ένα ασυνήθιστο δισουλφιδικό δεσμό ο οποίος μπαίνει σε ένα υδρόφοβο θύλακα. Αυτά τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα μπορούν να περιορίσουν την ισχύ της δομής έτσι ώστε να μπορεί να ξεδιπλώνει και να ξαναδιπλώνει. Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται από τη νόσο von Willebrand φαίνεται, με βάση τη δομή, ότι μειώνουν πιθανώς τη δυνατότητα της A2 επικρατείας να ξεδιπλώνει [49].

Η κύρια δομική διαφορά μεταξύ των A2 και A1 επικρατειών είναι ότι η πρώτη έχει μεγαλύτερη κατανομή θετικών και αρνητικών φορτίων στην επιφάνειά της από την επιφάνεια της τελευταίας, όπου κυριαρχεί το θετικό φορτίο. Η A2 περιοχή είναι η μοναδική από τις τρεις περιοχές του vWF που περιέχει δύο υποθετικές περιοχές γλυκοζυλίωσης, τις N752 και N811. Η διαμόρφωση της περιοχής A1 ρυθμίζει μέσω

αλλοστερικών μηχανισμών τη δυνατότητα πρόσβασης της περιοχής κοπής της ADAMTS-13 στη A2 περιοχή του vWF [50].



Εικ.8 Η δομή της A2 επικράτειας του vWF



ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της Εργασίας

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

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν να καθαριστούν οι A1 και A2 επικράτειες του παράγοντα πήξης του αίματος vWF αφού πρώτα κλωνοποιήθηκαν και υπερεκφραστήκαν, ώστε να μελετηθεί η αλληλεπίδρασή τους. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 έγινε με τις μεθόδους της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμού και της φασματοσκοπίας φθορισμού. Οι τεχνικές αυτές έδειξαν ότι είναι εφικτή η μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης της περιοχής A2. Πολλά μοντέλα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης έχουν βρεθεί και έχουν ερευνηθεί αλλά έχουμε καταλήξει σε τρία πιο πιθανά μοντέλα αλληλεπίδρασης αποκλείοντας πολλά αμινοξέα της A1 περιοχής που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΚΥΤΤΑΡΑ, ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ENZYMA

1. Επιδεκτικά Κύτταρα BL21

Το είδος των κυττάρων *Escherichia coli* BL21 χρησιμοποιείται συνήθως ως αποδέκτης για πρωτεϊνική έκφραση και καθαρισμό. Όταν απαιτούνται μεγάλες ποσότητες των πλήρως πρωτεϊνών δευτεροταγής δομής, το είδος των κυττάρων *Escherichia coli* BL21 αυξάνεται συχνά με ελάχιστα μέσα ανάπτυξης. Τα BL21 κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πρωτεϊνικούς φορείς έκφρασης που είναι υπό έλεγχο της T7 λυσοζύμης, όπως οι φορείς PET. Αυτό το είδος των κυττάρων περιέχει το T7 γονίδιο βακτηριοφάγων 1, που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση υπό έλεγχο του γονιδίου-υποκινητή *lacUV5*. Η T7 λυσοζύμη χαμηλώνει το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στόχων υπό έλεγχο του T7 γονιδίου-υποκινητή αλλά δεν παρεμποδίζει το επίπεδο έκφρασης που επιτυγχάνεται μετά από την χρήση του IPTG.

Η παρασκευή των BL21 επιδεκτικών κυττάρων βασίζεται στο πρωτόκολλο CaCl_2 Competent Cells και η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Πρώτη μέρα: Καλλιέργεια κυττάρων σε 3ml LB θρεπτικό υλικό (από αποικίες κυττάρων που έχουν μεγαλώσει σε τρυβλίο με LB άγαρ θρεπτικό υλικό) και επώαση στους 37° C στις 210rpm για 16 ώρες

2) Δεύτερη μέρα:

- Καλλιέργεια κυττάρων σε 100ml LB θρεπτικό υλικό (1 ml από την καλλιέργεια των 3ml) και επώαση στους 37° C στις 210rpm έως ότου η $\text{O.D.}_{595\text{nm}}$ φτάσει 0,4
- Μόλις γίνει η $\text{O.D.}_{595\text{nm}}$ 0,4 γίνεται μεταφορά των κυττάρων σε αποστειρωμένους σωλήνες των 50ml και τοποθέτηση αυτών για 10 λεπτά στον πάγο
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στους 4° C στις 4000rpm για 10 λεπτά
- Απόρριψη υπερκείμενου και τοποθέτηση των σωλήνων κατακόρυφα για 1 λεπτό ώστε να φύγει η περίσσεια του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 30ml παγωμένου διαλύματος $\text{MgCl}_2\text{-CaCl}_2$ (αναλογία 80% MgCl_2 και 20% CaCl_2) σε κάθε σωλήνα

- Φυγοκέντρωση των κυττάρων στους 4° C στις 4000rpm για 10 λεπτά
- Τοποθέτηση των σωλήνων κατακόρυφα για 1 λεπτό ώστε να φύγει η περίσσεια του υπερκείμενου
- Προσθήκη 2ml CaCl₂ (συγκέντρωσης 0,1M) σε κάθε σωλήνα
- Προσθήκη 70μl DMSO και ανάδευση ελαφρώς για 15 λεπτά στον πάγο
- Προσθήκη 70μl DMSO και ανάδευση ελαφρώς και γρήγορη διανομή των κυττάρων σε σωλήνες των 200μl
- Αποθήκευση στους -80° C

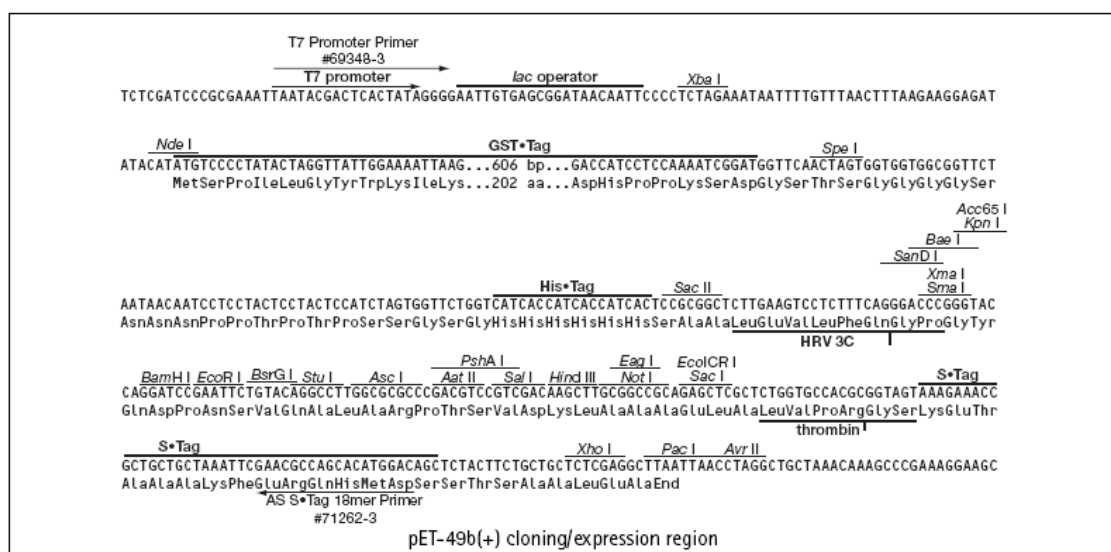
Η μέθοδος αυτή παραγωγής επιδεκτικών κυττάρων ενδείκνυται για όλα τα είδη επιδεκτικών κυττάρων, όπως τα Rosseta, τα XL1-Blue, DH5a κα.

2. Το σύστημα pET

Το pET σύστημα είναι το πιο ισχυρό μέχρι στιγμής σύστημα για την κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε *E.coli*. Τα γονίδια στόχοι κλωνοποιούνται στα pET πλασμίδια κάτω από τον έλεγχο ισχυρών T7 σημάτων μεταγραφής και μετάφρασης. Η έκφραση επάγεται παρέχοντας μια πηγή T7 RNA πολυμεράσης στα κύτταρα – ξενιστές. Η T7 RNA πολυμεράση είναι τόσο επιλεκτική και ενεργή ώστε, όταν γίνεται πλήρης επαγωγή της, όλες σχεδόν οι πηγές του κυττάρου μεταστρέφονται προς τη στόχευση της γονιδιακής έκφρασης. Το επιθυμητό προϊόν μπορεί να αποτελεί παραπάνω από το 50% των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών λίγες ώρες μετά την επαγωγή. Ένα ακόμα πλεονέκτημα του συστήματος αυτού είναι η ικανότητά του να διατηρεί τα γονίδια στόχους μεταγραφικά σιωπηλά στο μη επαγόμενο στάδιο. Η έκφραση των γονιδίων - στόχων μπορεί να ξεκινήσει με τη μεταφορά του πλασμιδίου σε ξενιστή που περιέχει ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης. Στην περίπτωση αυτή, η έκφραση επάγεται με την προσθήκη IPTG στη βακτηριακή καλλιέργεια. Ο φορέας που χρησιμοποιείται είναι ο pET49b.

pET-49b(+)

Ο φορέας αυτός έχει σχεδιαστεί για την κλωνοποίηση και υψηλού επιπέδου έκφραση πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με την GST αλληλουχία η οποία μπορεί να κοπεί με την πρωτεάση 3C. Η GST ουρά χρησιμοποιείται ως συνέχεια πρωτεϊνών



32

3. HRV 3C Πρωτεάση

Ο ανασυνδυαζόμενος τύπος της 3C πρωτεάσης από τον ανθρώπινο ρινοϊό (HRV 3C) είναι μια ανασυνδυαζόμενη πρωτεάση ειδική για κάποια αμινοξέα. Η HRV 3C είναι μια ιδιαίτερα ανασυνδυαζόμενη πρωτεΐνη 6XHis, η οποία αναγνωρίζει την ίδια περιοχή κοπής με το πρωταρχικό ένζυμο: LeuGluValLeuPheGln↓GlyPro. Το μικρό μέγεθος 22-kDa της πρωτεάσης (22-kDa), η βέλτιστη δραστηριότητα στους 4° C, η υψηλή ιδιομορφία, και η His ούρα κάνουν την HRV 3C πρωτεάση μια ιδανική επιλογή για τη γρήγορη κοπή των ουρών. Η HRV 3C πρωτεάση χρησιμοποιείται για φορείς τύπου pET και μπορεί να κόψει αλληλουχίες τύπου GST-Tag.

II. ΥΛΙΚΑ

1. Ρυθμιστικά διαλύματα

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris base	242g
Οξικό Οξύ	57.1ml
EDTA 0.5M pH 8	100ml
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι 1lt

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Trizma base	54g
Βορικό οξύ	27.5g
EDTA 0.5M pH 8	20ml
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι 1lt

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris HCl	25mM
Γλυκίνη	0,2M
SDS	35mM
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι 1lt

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris base pH 8.3	3.03g
Γλυκίνη	14.4g
Μεθανόλη	200ml
Απιονισμένο H ₂ O	Μέχρι 1lt

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Bromophenol Blue	0.09%
Xylene Cyanol	0.09%
Γλυκερόλη	60%
EDTA	60mM

- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (2x) σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

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

- Χρωστική κυανού Coomasie χρώσης πηκτώματος ακρυλαμιδίου

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Χρωστική κυανού coomasie	0,25%
Οξικό οξύ	10%
Μεθανόλη	45%

- Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτώματος ακρυλαμιδίου

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Οξικό οξύ	10%
Μεθανόλη	45%

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (10X) pH 7,4

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
NaCl	1,37M
KCl	26,8mM
Na ₂ HPO ₄	81mM
KH ₂ PO ₄	14,7mM

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris – NaCl pH 7,4

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris	50mM
NaCl	300mM

2. Θρεπτικά υλικά

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) pH 7.2

Αντιδραστήριο	Τυπική αναλογία (g/l)
NaCl	10
Tryptone	10
Yeast extract	5

Για τελικό όγκο θρεπτικού μέσου 1lt χρησιμοποιούνται:

LB Broth 25g και απιονισμένο H₂O

- Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar) pH 7.2

Αντιδραστήριο	Τυπική αναλογία (g/l)
NaCl	10
Tryptone	10
Yeast extract	5
Άγαρ	15

Για τελικό όγκο στερεού θρεπτικού μέσου 1lt χρησιμοποιούνται:

LB agar 40g και απιονισμένο H₂O

3. Μάρτυρες

- Μάρτυρας για ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης

Ladder PCR 2-log DNA Ladder (0,1-10kb)

- Μάρτυρες για ηλεκτροφόρηση πηκτώματος ακρυλαμιδίου

1) Protein marker, Broad Range (2-212kDa)

2) Color Plus Pre-stained Protein Ladder, Broad Range (10-230kDa)

3) Bench Mark Pre-stained Protein Ladder (6-180 kDa)

4. Αντισώματα

	Αντισώματα	Εταιρεία	Συγκέντρωση - Αραίωση
1	His – rabbit polyclonal antiPohistidine	Novus biologicals	1:2000 – 1:10.000
2	Mouse monoclonal antihuman von Willebrand Factor A2 antibody	R & D Systems	0,5 – 1 µg / ml
3	Mouse antiHis tag-HRP Monoclonal antibody	AbB serotec	1:20 – 1:10.000
4	Goat antirabbit HRP	Millipore	1:5000 – 1:100.000
5	Goat antimouse HRP	Millipore	1:5000 – 1:100.000

III. ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Καλλιέργειες

Οι καλλιέργειες χωρίζονται σε:

- **Καλλιέργεια κυττάρων σε στερεό υπόστρωμα**

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα μεταφέρονται σε τρυβλίο που έχει στρωθεί με στερεό θρεπτικό μέσο LB-agar. Το στερεό αυτό θρεπτικό μέσο, σχηματίζεται αφού διαλυθούν 4g του σε 100ml απιονισμένο H₂O. Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να αναδευτεί και να αποστειρωθεί. Σε 20ml από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται 20μl του αντιβιοτικού καναμυκίνη (επιλέγεται γιατί ο φορέας pET49(+) είναι ανθεκτικός σε αυτό). Η ποσότητα αυτή στρώνεται στο τρυβλίο και αφού πήξει, προστίθενται τα μετασχηματισμένα κύτταρα. Το τρυβλίο επωάζεται για περίπου 16 ώρες στους 37 °C. Στο τρυβλίο μετά το πέρας των απαραίτητων ωρών έχουν αναπτυχθεί μπλε και άσπρες αποικίες. Μονό οι άσπρες αποτελούνται από μετασχηματισμένα κύτταρα.

- **Καλλιέργεια κυττάρων σε υγρό υπόστρωμα**

Αφού επιλεγεί μια άσπρη αποικία από το τρυβλίο, μεταφέρεται σε περίπου 5ml υγρού θρεπτικού μέσου LB. Το θρεπτικό αυτό μέσο δημιουργείται αφού διαλυθούν 25g LB σε 1lt H₂O και το προκύπτον διάλυμα αναδευτεί καλά και αποστειρωθεί. Και σε αυτήν την διαδικασία προστίθεται το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Το θρεπτικό μέσο με την λευκή αποικία που έχει μεταφερθεί σε αυτό επωάζεται για περίπου 3-4 ώρες στους 37 °C και μόλις η O.D._{595nm} φθάσει 0,6 προστίθεται IPTG (0,1mM). Το IPTG είναι ουσία που προωθεί στην υπερέκφραση της επικείμενης πρωτεΐνης επιδρώντας στον προαγώγα του φορέα. Η επώαση συνεχίζεται και μετά την προσθήκη IPTG στους 16 °C για περίπου 16 ώρες. Μέσω της διαδικασίας αυτής καλλιεργούνται μόνο κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με τον ανασυνδιασμένο φορέα.

2. Καθαρισμός των πρωτεϊνών με στήλη GSH (Σεφαρόση)

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη 4B Σεφαρόση σχεδιάστηκε για το καθαρισμό με ένα βήμα των γλουταθειόνη-S-τρανσφερασών, των γλουταθειό-εξαρτώμενων πρωτεϊνών και των ανασυνδυασμένων παραγώγων της γλουταθειό-S-τρανσφεράσης, που περιλαμβάνουν την GST αλληλουχία.. Οι πρωτεΐνες με GST μπορούν να καθαριστούν άμεσα από βακτηριακές λύσεις χρησιμοποιώντας την γλουταθειόνη 4B Σεφαρόση. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με έκλουση κάτω από ήπιες συνθήκες μη μετουσίωσης που συντηρούν την πρωτεϊνική δομή και λειτουργία. Η κοπή της επιθυμητής πρωτεΐνης από την GST επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μια συγκεκριμένη πρωτεάση (συγκεκριμένα την 3C), η οποία αναγνωρίζει τις θέσεις περιορισμού.

Πρωτόκολλο

Η μέθοδος καθαρισμού οποιασδήποτε πρωτεΐνης (A1, A2, 3C) με χρωματογραφία συγγένειας έχει τα εξής βήματα:

- Σε θρεπτικό υλικό 1000ml γίνεται προσθήκη 10ml των βακτηριακών κυττάρων BL21 που περιέχουν το πλασμίδιο pET49(+) που περιλαμβάνει την επικείμενη πρωτεΐνη.
- Επώαση της καλλιέργειας των κυττάρων για περίπου 3-4 ώρες στους 37 °C, στις 210rpm έως ότου η O.D._{595nm} είναι 0,6 προστίθεται IPTG (0,1mM). Το IPTG είναι ουσία που προωθεί την υπερέκφραση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει επιδρώντας στον προαγωγέα του φορέα.
- Επώαση της καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων στους 16 °C, στις 150-180rpm για περίπου 16 ώρες
- Διανομή των κυττάρων σε σωλήνες των 50ml και φυγοκέντρωση της καλλιέργειας στους 4°C, στις 4000rpm για 10 λεπτά (συλλογή ιζήματος και απόρριψη υπερκείμενου)

- Τοποθέτηση των κυττάρων στον πάγο και προσθήκη 2-3 κόκκους λυσοζύμης (10mg/l), αναστολείς πρωτεασών (PMSF συγκέντρωσης 100mM) και buffer εξισορρόπησης PBS (1X) .
- Αναδιάλυση των κυττάρων τα οποία βρίσκονται μέσα στον πάγο
- Τοποθέτηση των κύτταρων στον πάγο για 1 ώρα και διάσπαση αυτών με υπέρηχους έως ότου να διαφανοποιηθεί το μίγμα
- Διανομή των κυττάρων σε σωλήνες των 1,5ml και φυγοκέντρωση στους 4°C, στις 14500rpm για 20 λεπτά (συλλογή υπερκείμενου που περιέχει την πρωτεΐνη και απόρριψη ιζήματος που περιέχει τα συστατικά των κυττάρων)
- Προσθήκη του υπερκείμενου στην στήλη GSH την οποία πρώτα έχουμε εξισορροπήσει με buffer εξισορρόπησης PBS (1X) ώστε να βρίσκεται στο ίδιο διάλυμα με τα κύτταρα
- Επώαση της στήλης στους 4°C και ταυτόχρονη ανάδευση για 2 ώρες προκειμένου για να δεθεί η πρωτεΐνη στη στήλη
- Σε σύριγγα που έχει επενδυθεί με υαλοβάμβακα στη βάση της (λειτουργεί ως στεγανό της στήλης) γίνεται προσθήκη της στήλης και περνούν οι πρωτεΐνες που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη (flow through)
- Πλύση της στήλης με PBS (1X) για να απορριφθούν τυχόν πρωτεΐνες μικρής συγγένειας που έχουν προσδεθεί στη στήλη. Γίνονται πλύσεις 10 όγκων στήλης
- Έκλουση της στήλης με γλουταθειόνη (10mM και ρύθμιση του pH στο 7-8). Η γλουταθειόνη του διαλύματος ανταγωνίζεται την GST ουρά των πρωτεϊνών που έχουν κατακρατηθεί στην στήλη για τα σφαιρίδια αυτής και έτσι προκαλεί την έκλουσή τους. Γίνεται συλλογή των εκλούσεων σε σωλήνες των 1,5ml
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου του flow through, των πλύσεων και των εκλούσεων. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται για να διαπιστωθεί αν η πρωτεΐνη βρίσκεται στις εκλούσεις και απέχει από τις πλύσεις και το flow through.
- Συλλογή των εκλούσεων που περιέχουν την πρωτεΐνη σε μεμβράνη (Visking dialysis tubing 20/32) (έχει πρώτα βραστεί σε κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3) με σκοπό την απομάκρυνση της γλουταθειόνης από τους πόρους της μεμβράνης η οποία βρίσκεται σε buffer διαπίδυσης (Tris NaCl pH 7,4). Το στάδιο αυτό συμβαίνει στους 4°C κατά την νύχτα και με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση του buffer διαπίδυσης που περιέχει την μεμβράνη.

Σημείωση: Σε περίπτωση που η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα εκλούσματα είναι χαμηλή γίνεται συμπύκνωση της πρωτεΐνης πριν την διαπίδυση. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της PEG (PolyEtylene Glucol M.B. 20.000) ή σε φίλτρα Vivaspin 15 (M.B. 10000)

Πέψη με την πρωτεάση 3C των επικείμενων πρωτεϊνών

Σε περίπτωση που καθαριστούν οι υπό μελέτη πρωτεΐνες με το άνω πρωτόκολλο γίνεται πέψη της GST ουράς τους «δένοντας» αυτές στην στήλη GSH και προσθέτοντας την πρωτεάση 3C σε αυτήν. Η πρωτεάση 3C που επιλέχτηκε είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη δεσμευμένη και αυτή με μια GST ουρά.

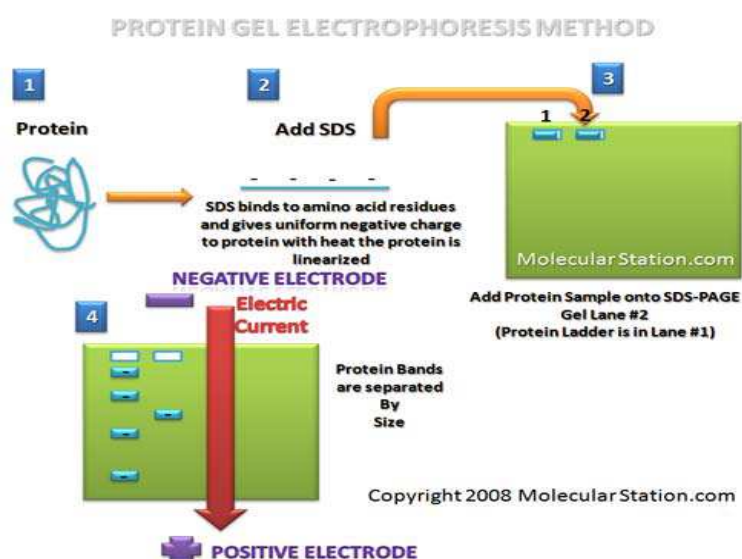
Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Αφού η στήλη εξισορροπηθεί με το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεάση (Tris-NaCl pH 7,4), προστίθεται η πρωτεάση και οι εκλούσεις που προέκυψαν από την προηγούμενη διαδικασία και περιέχουν μόνο τις υπό μελέτη πρωτεΐνες και αφήνεται για 2 περίπου ώρες στους 4 °C υπό ήπια ανάδευση. Στις 2 αυτές ώρες, δρα η πρωτεάση και κόβει την GST ουρά που είναι συνδεδεμένη στην πρωτεΐνη και επίσης αλληλεπιδρούν οι πρωτεΐνες που περιέχουν GST με τα σφαιρίδια της στήλης. Έτσι στην στήλη θα συγκρατηθούν, η 3C και η ποσότητα της πρωτεΐνης που δεν κόπηκε καθώς και οι GST-ουρές.
- Το ξέπλυμα της στήλης γίνεται με το ίδιο διάλυμα (Tris-NaCl pH 7,4), οι πλύσεις που προκύπτουν περιέχουν όποια πρωτεΐνη δεν έχει GST ουρά, δηλαδή την υπό μελέτη πρωτεΐνη από την οποία όμως έχει κοπεί η ουρά.
- Γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου για να διαπιστωθεί αν πράγματι υπάρχει η κομμένη πρωτεΐνη

3. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται και σχηματίζονται αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου, στις οποίες ενσωματώνονται κατά διαστήματα μόρια N-N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (bis). Τα μόρια bis μπορούν να ενσωματώνονται σε δύο διαφορετικές αλυσίδες και έτσι, δημιουργείται ένα πλέγμα. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται με το TEMED (τετρμεθυλοδιαμίνη) για τη δράση του οποίου είναι απαραίτητη η παρουσία υπερθειικών ιόντων. Οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι το ιοντικό απορρυπαντικό θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) και η μερκαπτεθανόλη (mercaptoethanol). Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με σταθερή αναλογία βάρους (1,4gr SDS/ gr πρωτεΐνης) προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο, ανάλογο του μεγέθους τους. Η χρήση της μερκαπτεθανόλης (mercaptoethanol) έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αλλά και αυτών που συνδέουν διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες πολυμερών πρωτεϊνών. Η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 100°C για 1 με 2 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό, τα πολυπεπτίδια τα οποία αναλύονται σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση αποκτούν αρνητικό φορτίο και η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

Πρωτόκολλο πήκτωματος ακρυλαμιδίου (Εικ. 10)



Εικ. 10 Ηλεκτροφόρηση πήκτωματος ακρυλαμιδίου

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου 12%. Αυτή, αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) και την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel).

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Στήσιμο της συσκευής.
- Κατασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Απιονισμένο H ₂ O	
Ακρυλαμίδιο	30%
Tris - HCl (pH 8,8)	1,5mM
SDS 10%	10%
APS 10%	10%
TEMED	

Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού 12%

- Πήξη του πηκτώματος, αφού τοποθετηθεί ένα στρώμα ισοπροπανόλης στην κορυφή.
- Κατασκευή του πηκτώματος επιστοίβαξης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Απιονισμένο H ₂ O	
Ακρυλαμίδιο	30%
Tris - HCl (pH 6,8)	1mM
SDS	10%
APS	10%
TEMED	

Σύσταση πηκτώματος επιστοίβαξης 4%

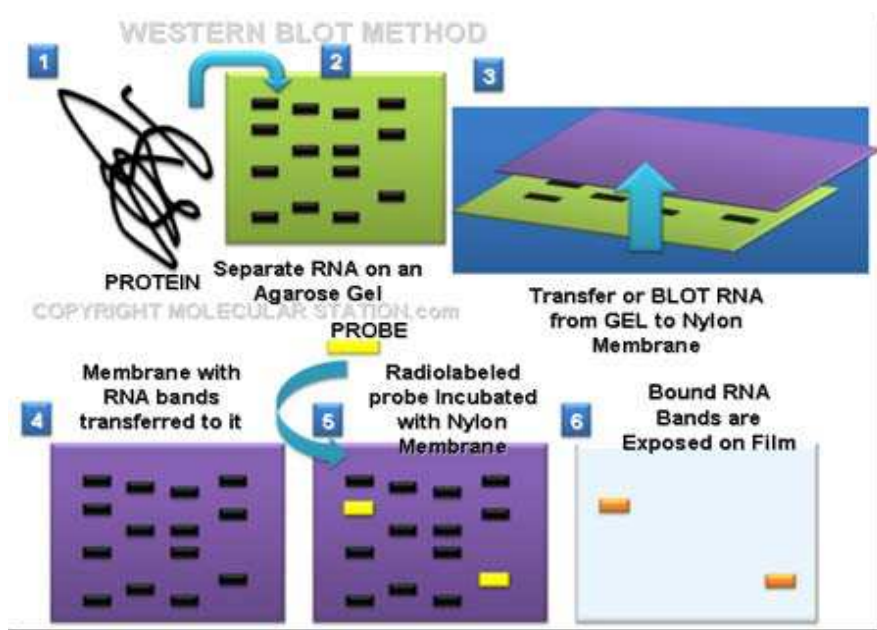
- Ετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων με προσθήκη loading buffer και θέρμανση στους 100°C για 1-2 λεπτά.
- Φόρτωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στα φρεάτια του πηκτώματος επιστοίβαξης.

- Ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό την παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης με 90mA για περίπου 1 ώρα.
- Βάψιμο του πηκτώματος με διάλυμα coomassie για 15 λεπτά.
- Εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με το διάλυμα αποχρωματισμού

4. Ανοσοαποτύπωση (WESTERN BLOT)

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

Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης (Εικ. 11)



Εικ. 11 Ανοσοαποτύπωση

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Μια μεμβράνη PVDF, ίδιων διαστάσεων με το πήκτωμα ακρυλαμιδίου, ενεργοποιείται καθώς εμβαπτίζεται για 5 λεπτά σε μεθανόλη και στην συνέχεια εξισορροπείται στο διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζεται και το πήκτωμα καθώς και 6 χαρτιά τύπου Whatmann 3MM και 2 σφουγγαράκια.

- Ακολουθεί η διάταξη της μεταφοράς που αποτελείται κατά σειρά από: 1 σφουγγαράκι, 3 υγρά χαρτιά τύπου Whatmann, το πήκτωμα υακρυλαμιδίου, την μεμβράνη, 3 υγρά χαρτιά τύπου Whatmann και άλλο 1 σφουγγαράκι. Η διάταξη αυτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, με τέτοιον τρόπο ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται προς την πλευρά της ανόδου. Η μεταφορά γίνεται στα 150V για 1,5 ώρα.
- Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη επώάζεται σε διάλυμα μη ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών (2.5g σκόνη άπαχου γάλακτος σε 50ml PBS(1X) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (blocking).
- Η μεμβράνη ξεπλένεται δύο φορές με PBS και έπειτα επώάζεται με το πρωτεύον αντίσωμα (Anti-GST Goat) που έχει διαλυθεί σε διάλυμα μη ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών, το οποίο αναγνωρίζει την υπό μελέτη καθηλωμένη πρωτεΐνη, για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με το PBS και έπειτα γίνεται επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (Anti-Goat), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα, αναγνωρίζει και δεσμεύει τις ανοσοσφαιρίνες IgG του πρώτου αντισώματος και είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση από αγριοράπανο (HRP) που σαν υπόστρωμα έχει την χλωροναφθόλη.
- Η μεμβράνη ξεπλένεται με PBS δυο φορές
- Προκειμένου να γίνει η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών που είναι δεσμευμένες με το πρωτεύον αντίσωμα, η μεμβράνη επώάζεται σε διάλυμα εμφάνισης το οποίο περιέχει χλωροναφθόλη διαλυμένη σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 0.5g/ml και στο οποίο προστίθεται H_2O_2 30%. Η χλωροναφθόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση HRP παρουσία H_2O_2 , δίνοντας ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα στις περιοχές που είναι δεσμευμένο το δεύτερο αντίσωμα.
- Για να τερματιστεί η αντίδραση, η μεμβράνη ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό.

5. Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Με τη μέθοδο Bradford προσδιορίζεται η συγκέντρωση πρωτεϊνικών δειγμάτων. Η δέσμευση της χρωστικής coomassie brilliant blue στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών αποτελεί τη βάση της μεθόδου αυτής. Η δέσμευση αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 470nm στα 595nm. Το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για μία ώρα περίπου και έχει υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων. Με τη βοήθεια διαλυμάτων αλβουμίνης ορού (BSA) γνωστών συγκεντρώσεων, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη από την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε πρωτεΐνη.

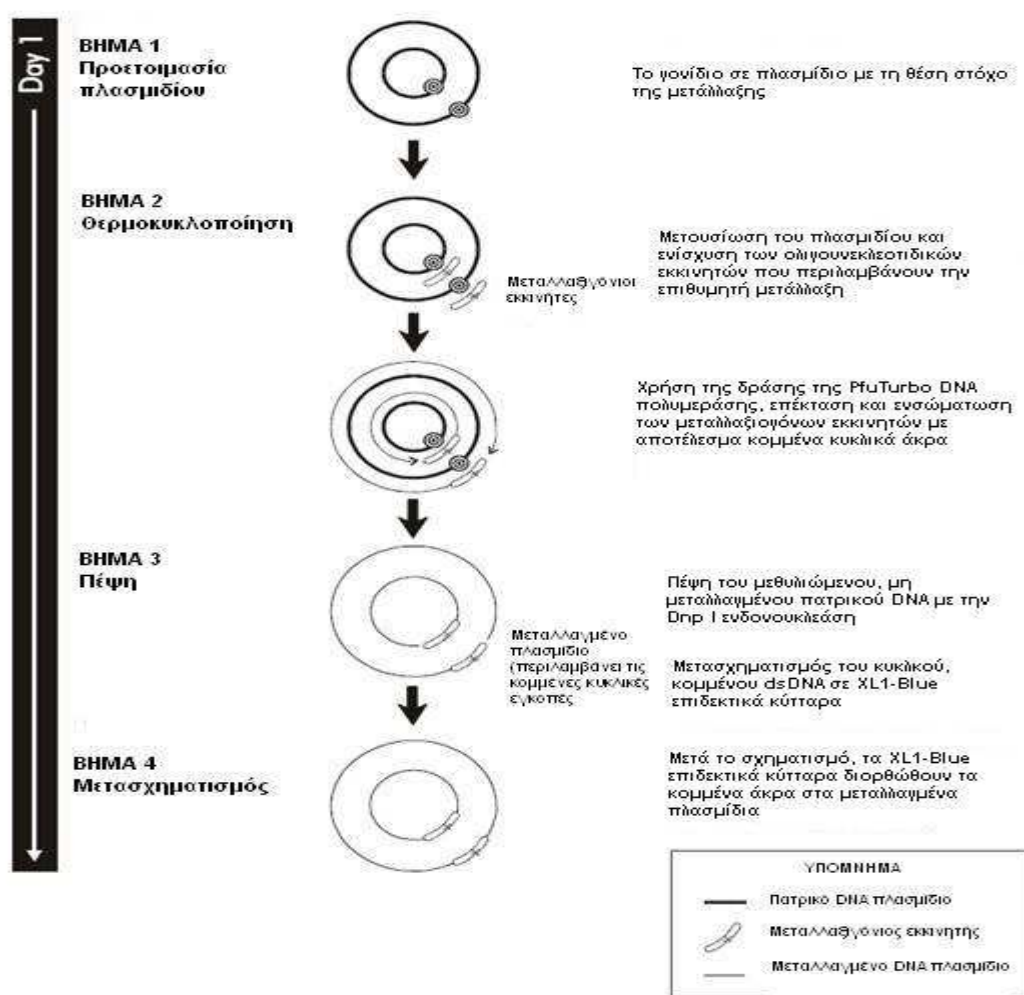
6. Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση Σημείου

Εισαγωγή

Στο εργαστήριο η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση σημείου είναι μια ανεκτίμητη τεχνική για την μελέτη σχέσεων δομής – λειτουργίας των πρωτεϊνών και έκφρασης γονιδίων, και τις τροποποιήσεις φορέων. Διάφορες προσεγγίσεις για αυτήν την τεχνική έχουν δημοσιευτεί, αλλά αυτές οι μέθοδοι απαιτούν γενικά μονόκλωνο DNA (ssDNA) για υπόστρωμα και αποτελεί ευαίσθητη εργασία και δύσκολη τεχνική. Το QuikChange Site-directed Mutagenesis kit μας επιτρέπει συγκεκριμένη μετάλλαξη σημείου ουσιαστικά σε οποιοδήποτε δίκλωνο πλασμίδιο, εξαλείφοντας κατά συνέπεια την ανάγκη για υποκλωνοποίηση σε φορείς M13 βακτηριοφάγους και για διάσωση του ssDNA. Επιπλέον, το σύστημα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης σημείου δεν απαιτεί κανένα εξειδικευμένο φορέα, μοναδικές θέσεις περιορισμού, ή πολλαπλούς μετασχηματισμούς. Αυτή η γρήγορη διαδικασία τεσσάρων βημάτων δημιουργεί μεταλλάξεις με μεγαλύτερη αποδοτικότητα από 80%. Το πρωτόκολλο είναι απλό και χρησιμοποιεί είτε πλασμιδιακό DNA ή καθαρισμένο DNA με χλωριούχο κάσσιο.

Το QuikChange Site-directed Mutagenesis kit χρησιμοποιείται για να γίνουν σημειακές μεταλλάξεις, αποκοπή αμινοξέων, και αποκοπή ή εισαγωγή ενός ή πολλών αμινοξέων. Η μέθοδος της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης σημείου πραγματοποιείται με τη χρήση της PfuTurbo DNA πολυμεράσης. Η PfuTurbo DNA πολυμεράση αντιγράφει και τους δύο πλασμιδιακούς κλώνους με υψηλή ακρίβεια και χωρίς την μετατόπιση των μεταλλαγμένων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων. Η βασική διαδικασία χρησιμοποιεί ένα φορέα υπερελικώμενου δίκλωνου DNA (dsDNA) με το ένθεμα που μας ενδιαφέρει και δύο συντεθειμένους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινήτες που περιλαμβάνουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινήτες, καθένας συμπληρωματικός στα αντίθετα άκρα του φορέα, επεκτείνονται κατά της διάρκειας της PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) από την PfuTurbo DNA πολυμεράση. Η ενσωμάτωση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων παράγει ένα μεταλλαγμένο πλασμίδιο που περιέχει κομμένα άκρα. Μετά από την PCR, το προϊόν κόβεται με Dpn I. Η Dpn I ενδονουκλεάση (στοχευόμενη ακολουθία: 5'-Gm6ATC-3') είναι συγκεκριμένη για μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA και χρησιμοποιείται για να καταστρέψει το

πατρικό DNA και να παραμείνει το DNA που περιέχει τη σχεδιασμένη μετάλλαξη. Το DNA που απομονώνεται από σχεδόν όλα τα γένη *E.coli* αποτελεί δεξαμενή που μεθυλιώνεται και επομένως είναι ευαίσθητο σε πέψη με Dpn I. Ο κομμένος DNA φορέας που περιέχει τις επιθυμητές μεταλλάξεις μετασχηματίζεται έπειτα στα XL1-Blue επιδεκτικά κύτταρα. Η μικρή ποσότητα του αρχικού DNA υποστρώματος που απαιτείται για να εκτελεστεί αυτή η μέθοδος, η υψηλή ακρίβεια της PfuTurbo DNA πολυμεράσης, και ο χαμηλός αριθμός των θερμικών κύκλων συμβάλουν στην υψηλή αποδοτικότητα της μετάλλαξης και τη μειωμένη δυνατότητα παραγωγής τυχαίων μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (Εικ. 12).



Εικ. 12 Διαδικασία κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης σημείου

Σχεδιασμός μεταλλαξιγόνων εκκινητών

Οδηγίες σχεδιασμού εκκινητών

Οι μεταλλαξιγόνοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για να χρησιμοποιηθούν σε αυτό το πρωτόκολλο πρέπει να σχεδιαστούν χωριστά σύμφωνα με την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι ακόλουθες μελέτες που πρέπει να γίνουν για το σχεδιασμό των μεταλλαξιγόνων εκκινητών είναι:

- ♦ Και οι δύο μεταλλαξιγόνοι εκκινητές πρέπει να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη και να ενισχύσουν την ίδια ακολουθία στα αντίθετα άκρα του πλασμιδίου.
- ♦ Οι εκκινητές πρέπει να είναι μήκους μεταξύ 25 και 45 βάσεων, με μια θερμοκρασία τήξης (TM) $\geq 78^{\circ}\text{C}$. Εκκινητές μακρύτεροι από 45 βάσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν, αλλά η χρήση των μακρύτερων εκκινητών αυξάνει την πιθανότητα του δευτεροβάθμιου σχηματισμού δομών, ο οποίος μπορεί να έχει επιπτώσεις στην αποδοτικότητα της αντίδρασης μεταλλαξίγνεσης. Ο ακόλουθος τύπος χρησιμοποιείται συνήθως για τον υπολογισμό της TM των εκκινητών:

$$TM = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

Για τον υπολογισμό του TM:

- Το N είναι το μήκος εκκινητών στις βάσεις
- Οι τιμές για %GC και %mismatch είναι ακέραιοι αριθμοί

Για τον υπολογισμό του TM για τον σχεδιασμό των εκκινήτων που προορίζονται για να εισαγάγουν παρεμβολές ή διαγραφές, χρησιμοποιούν αυτήν την τροποποιημένη έκδοση του ανωτέρω τύπου:

$$TM = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N,$$

όπου το N δεν περιλαμβάνει τις βάσεις που παρεμβάλλονται ή διαγράφονται.

- ♦ Η επιθυμητή μετάλλαξη (διαγραφή ή παρεμβολή) πρέπει να εντοπίζεται στη μέση του εκκινητή με ~10-15 βάσεις της σωστής ακολουθίας σε κάθε πλευρά.
- ♦ Οι εκκινητές πρέπει βέλτιστα να έχουν ένα ελάχιστο περιεχόμενο GC του 40% και πρέπει να καταλήγουν σε μια ή περισσότερες βάσεις G ή C.

Πρόσθετες μελέτες εκκινητών

- ♦ Το πρωτόκολλο μεταλλαξίγνεσης χρησιμοποιεί 125ng κάθε ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή. Για να μετατραπούν τα νανογραμμάρια σε picomoles του ολίγο, χρησιμοποιείται η ακόλουθη εξίσωση:

$$X \text{ pmoles of oligo} = \frac{\text{ng of oligo}}{330 \times \# \text{ of bases in oligo}} \times 1000$$

Παραδείγματος χάριν, για 125 ng ενός 25μερές:

$$\frac{125 \text{ ng of oligo}}{330 \times 25 \text{ bases}} \times 1000 = 15 \text{ pmole}$$

Πρωτόκολλο PCR

Αντίδραση σύνθεσης μεταλλαγμένων στελεχών (θερμική κυκλοποίηση)

1. Σύνθεση δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων που περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη.
2. Προετοιμασία της αντίδρασης δειγμάτων όπως υποδεικνύεται κατωτέρω:

5 μl 10× buffer αντίδρασης
 x μl (50 ng) του dsDNA
 x μl (125 ng) του ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή #1
 x μl (125 ng) του ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή #2
 1 μl του μίγματος των dNTPs
 ddH₂O σε έναν τελικό όγκο 50 μl

Και μετά προσθήκη

1 μl της PfuTurbo DNA πολυμεράσης (2.5 U/μl)

3. Κύκλος κάθε αντίδρασης που χρησιμοποιεί τις παραμέτρους ανακύκλωσης που περιγράφονται στον πίνακα I.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

Παράμετροι της μεθόδου QuikChange Site-directed Mutagenesis

Τμήμα	Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	1	95° C	30 seconds
2	12-18	95° C	30 seconds
		55° C	1 minute
		68° C	1 minute / kb μήκους πλασμιδίου

4. Ρύθμιση του κύκλου 2 σύμφωνα με τον τύπο της επιθυμητής μετάλλαξης (δείτε τον ακόλουθο πίνακα):

Τύπος της επιθυμητής μετάλλαξης	Αριθμός κύκλων
Μεταλλάξεις σημείου	12
Μονές αλλαγές αμινοξέων	16
Πολλαπλές διαγραφές ή παρεμβολές αμινοξέων	18

5. Μετά από την PCR, η αντίδραση τοποθετείται στον πάγο για 2 λεπτά για να κρυώσει στους $\leq 37^{\circ}\text{C}$.

Πέψη με Dpn I των προϊόντων ενίσχυσης

1. Προσθήκη 1 μl του Dpn I ένζυμο περιορισμού (10 U/ μl) άμεσα σε κάθε αντίδραση ενίσχυσης κάτω από την επικάλυψη λαδιού
2. Ανάμιξη ήπια κάθε μίγματος αντίδρασης πιπετάροντας το διάλυμα πάνω-κάτω αρκετές φορές. Επώση αμέσως κάθε αντίδρασης σε 37°C για 1 ώρα για να καταστραφεί το πατρικό (δηλ. το μη μεταλλαγμένο) υπερελικώμενο dsDNA.

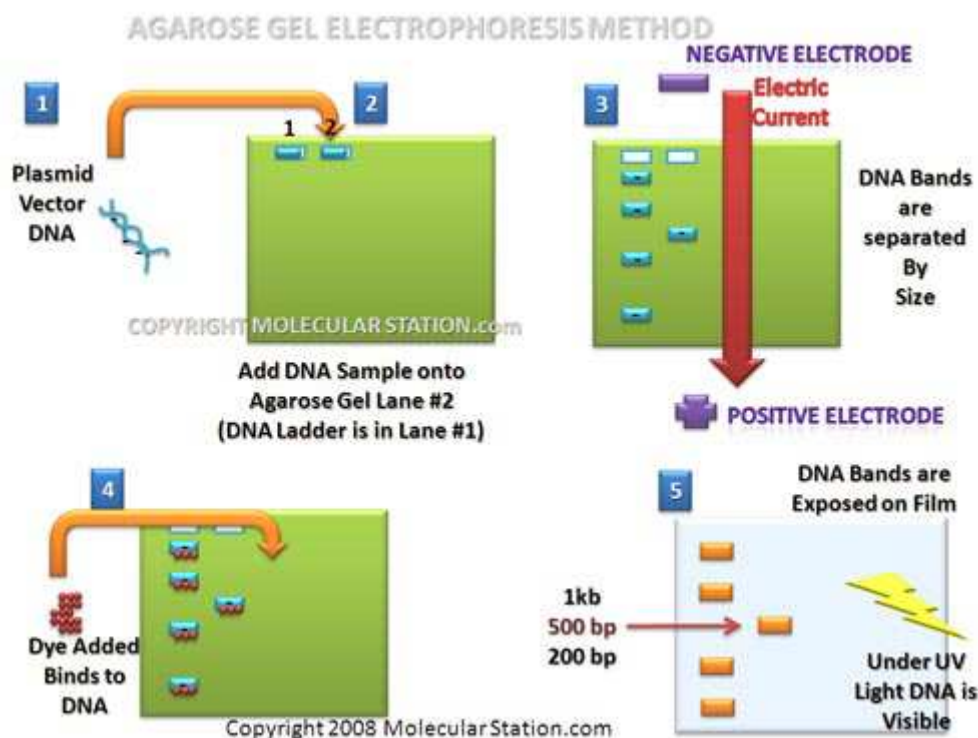
Μετασχηματισμός των XL1-Blue επιδεικτικών κυττάρων

1. Ήπια ξεπαγώνονται τα XL1-Blue επιδεικτικά κύτταρα στον πάγο.
2. Μεταφορά 1 μ l του DNA που πέπηκε με Dpn I από κάθε αντίδραση δειγμάτων στα XL1-Blue επιδεικτικά κύτταρα. Ανάδευση των αντιδράσεων μετασχηματισμού ήπια για να αναμιχθούν και να επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
3. Θέρμανση των αντιδράσεων μετασχηματισμού για 45 δευτερόλεπτα στους 42°C και τοποθέτηση αυτών έπειτα στον πάγο για 2 λεπτά.
4. Προσθήκη 0.5ml του θρεπτικού NZY+ προθερμασμένο στους 42°C και επώαση των αντιδράσεων μετασχηματισμού στους 37°C για 1 ώρα με ανάδευση στις 225-250 περιστροφές / λεπτό.
5. Επίστρωση κάθε αντίδρασης μετασχηματισμού, στα τρυβλία με άγαρ που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για τον πλασμιδιακό φορέα, στην περίπτωση μας καναμυκίνη.
6. Επώαση των τρυβλίων μετασχηματισμού στους 37°C για > 16 ώρες.

Αναμενόμενα αποτελέσματα για τους μετασχηματισμούς δειγμάτων

Ο αναμενόμενος αριθμός αποικιών είναι μεταξύ 10 και 1000 αποικιών, ανάλογα της σύνθεσης των βάσεων και το μήκος του προτύπου DNA που χρησιμοποιείται. Το ένθεμα που μας ενδιαφέρει πρέπει να ελεγχτεί ώστε οι επιλεγμένοι κλώνοι να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη.

7. Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης (Εικ. 13)



Εικ. 13 Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης

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

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

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

8. Απομόνωση πλασμιδίων (Mini – preps)

Από τα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί και έχουν μετασχηματιστεί από τον ανασυνδυασμένο φορέα σε αυτό το στάδιο πρέπει να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας το kit “Nucleospin Plasmid”.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1) Καλλιέργεια και συλλογή βακτηριακών κυττάρων

- Γίνονται 5ml καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB
- Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα, στις 11.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να μείνουν τα κύτταρα με την μορφή ιζήματος στο πυθμένα του σωληναρίου, ενώ το υπερκείμενο που αποτελεί το θρεπτικό μέσο στο οποίο είχαν αναπτυχθεί τα κύτταρα, αποχύνεται.

2) Λύση των κυττάρων

- Προσθήκη 250μl του αντιδραστηρίου A1 (διατηρείται στους 4° C) και το μίγμα ανακινείται έντονα (Vortex) μέχρι το ίζημα να διαλυθεί πλήρως (γίνεται λύση των κυττάρων)
- Προσθήκη 250μl του αντιδραστηρίου A2 και ήπια ανάδευση
- Επώαση του μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 300μl του αντιδραστηρίου A3 και ανάδευση των σωλήνων 6-8 φορές

3) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 11.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου

4) Δέσμευση DNA στις στήλες (Bind)

- Μεταφορά του υπερκείμενου σε στήλες καθαρισμού των 2ml
- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να συγκρατηθεί το DNA σ' αυτή.

5) Πλύσεις

- Προσθήκη 600μl του αντιδραστηρίου A4 (έχει προστεθεί πρώτα αιθανόλη)
- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να φύγουν τα υπολείμματα των υπολοίπων συστατικών των κυττάρων ή και η περίσσεια των αντιδραστηρίων.
- Απόρριψη υπερκείμενου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου

6) Έκλουση

- Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρούς σωλήνες των 1,5ml

- Προσθήκη 20μl του αντιδραστηρίου AE για να γίνει έκλυση του DNA
 - Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου
 - Προσθήκη 10μl του αντιδραστηρίου AE
 - Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- 7) Το πλασμιδιακό DNA φυλλάσσεται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Πέψεις του πλασμιδιακού φορέα

Για τον έλεγχο της απομόνωσης του σωστού πλασμιδίου μπορεί να γίνει πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII (New England Biolabs, NEB) και μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αгарόζης του προϊόντος μπορεί να φανεί αν προκύπτουν οι σωστές ζώνες.

Επομένως βάσει του πίνακα της NEB, ο συνδυασμός των δύο ενζύμων επιβάλλει τη χρήση του αντιδραστηρίου 4. Τα ένζυμα περιορισμού BamHI και HindIII πρέπει να είναι 5.000 units ή 20.000 units/ml. (1 Unit = το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για να κοπεί 1μg λ DNA στους 37° C για 1 ώρα)

Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Δείγματα πλασμιδιακού DNA στάλθηκαν στην εταιρεία Αντισέλ για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η επιβεβαίωση των αλληλουχιών έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

9. Φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχροϊσμού (Circular Dichroism – CD)

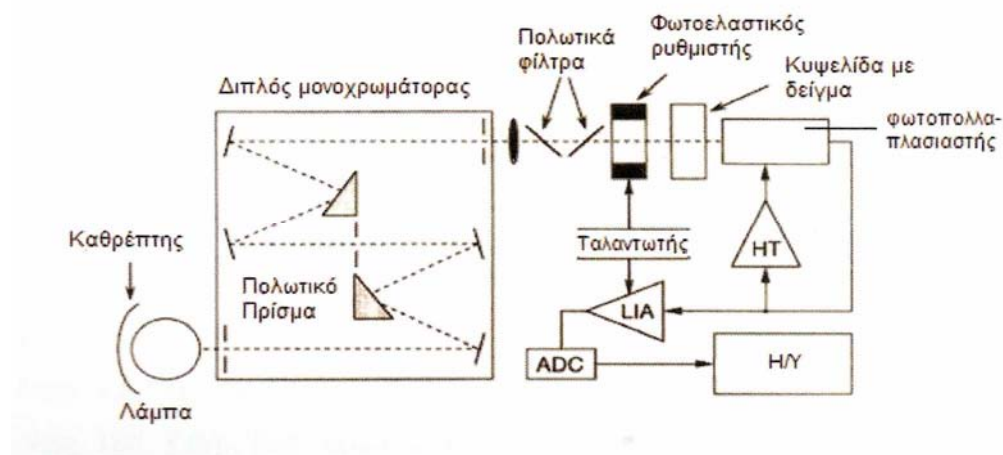
Με την τεχνική της φασματοπολωσιμετρίας του κυκλικού διχροϊσμού μετράμε την επαγόμενη ελλειπτικότητα στην πόλωση γραμμικά πολωμένου φωτός όταν αυτό διέρχεται από μια οπτικά ενεργό ουσία. Ως οπτικά ενεργές ουσίες χαρακτηρίζονται οι ουσίες που παρουσιάζουν τις εξής τέσσερις χαρακτηριστικές ιδιότητες αλληλεπίδρασης με το φως: (1) ισχύ οπτικής στρέψης (optical **rotatory power**), στρέφουν δηλαδή το επίπεδο πόλωσης γραμμικά πολωμένου φωτός που διέρχεται μέσω αυτών, (2) κυκλική διπλοθλαστικότητα (**circular birefringence**), παρουσιάζουν δηλαδή διαφορετικό δείκτη διάθλασης για αριστερόστροφα και δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένο φως, (3) κυκλικό διχροϊσμό (**circular dichroism**), την αλλαγή δηλαδή της πόλωσης από γραμμική σε ελλειπτική όταν γραμμικά πολωμένο φως διέρχεται μέσω αυτών και (4) παρουσιάζουν διαφορετικό συντελεστή απορρόφησης για δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως.

Η στρέψη του επιπέδου πόλωσης γραμμικά πολωμένου φωτός είναι συνέπεια της κυκλικής διπλοθλαστικότητας και ο κυκλικός διχροϊσμός είναι συνέπεια της διαφοράς των συντελεστών απορρόφησης για αντίθετης φοράς κυκλικά πολωμένο φως. Οι τέσσερις παραπάνω ιδιότητες ανάγονται σε δύο, με τις (1) και (2) να αφορούν στη διάθλαση και τις (3) και (4) να αφορούν στην απορρόφηση κυκλικά πολωμένου φωτός.

Σχεδόν όλα τα βιολογικά μόρια είναι οπτικά ενεργά μόρια. Επειδή τα επιμέρους δομικά συστατικά των βιομορίων (πρωτεΐνες, DNA κ.λπ.) απορροφούν ακτινοβολία σε διαφορετικές περιοχές μήκους κύματος, η φασματοσκοπία CD δίνει τη δυνατότητα, ανάλογα με την περιοχή μήκους κύματος, να διακρίνουμε διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά ενός μορίου σε διάλυμα. Το σήμα CD σε αυτές τις περιοχές μήκους κύματος είναι μη μηδενικό μόνο όταν το άμεσο περιβάλλον των οπτικά ενεργών μορίων είναι μη συμμετρικό, γιατί μόνο τότε το ηλεκτρονιακό νέφος των απεντοπισμένων π ηλεκτρονίων των αρωματικών δακτυλίων συστρέφεται και μία «ελικοειδή» διάταξη.

Η σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης κυκλικού διχροϊσμού παρουσιάζεται στην Εικόνα 14. Η πειραματική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι το φασματοπολωσίμετρο JASCO-715 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) με

λειτουργικό εύρος μήκους κύματος στην περιοχή του ορατού (VIS) και του υπεριώδους (UV).



Εικ. 14 Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης κυκλικού διχροϊσμού

Η φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχροϊσμού είναι μια τεχνική που μπορεί να αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμη στα ακόλουθα πεδία μελέτης:

- Στο να διαπιστώσει κανείς αν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην αναδιπλωμένη της μορφή, να προσδιορίσει την δευτεροταγή δομή της και να την κατατάξει στην κατάλληλη δομική οικογένεια.
- Στην σύγκριση των δομών πρωτεϊνών που προέκυψαν από διαφορετικές πηγές, ή δομών της ίδιας πρωτεΐνης κάτω από διαφορετικές συνθήκες διαλύτη ή θερμοκρασίας ή ακόμα και μεταβολές στη δομή που προκαλούνται από μεταλλάξεις.
- Στη μελέτη του κατά πόσο αλληλεπιδράσεις τύπου πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταβάλλουν την δομή των αλληλεπιδρώντων μορίων.

Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχροϊσμού στην περιοχή του άπω υπεριώδους (190 - 250 nm). Στην περιοχή αυτή η χρωμοφόρος ομάδα είναι ο πεπτιδικός δεσμός και εμφανίζει μη μηδενικό σήμα όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην αναδιπλωμένη δομή (ύπαρξη κανονικότητας). Η δομές α-έλικας, β-φύλλου και τυχαίου σπειράματος αποδίδουν ένα χαρακτηριστικό σε σχήμα και ένταση φάσμα κυκλικού διχροϊσμού. Όπως και οι υπόλοιπες φασματοσκοπικές τεχνικές, τα σήματα του κυκλικού διχροϊσμού απεικονίζουν τον μέσο όρο ολόκληρου του πρωτεϊνικού πληθυσμού. Για τον λόγο αυτό, ενώ μπορεί κανείς να υπολογίσει ότι π.χ. το 50% των αμινοξικών κατάλοιπων μιας πρωτεΐνης συμμετέχουν στον σχηματισμό κάποιας α- έλικας, δεν μπορεί να προσδιορίσει ποια ακριβώς είναι τα κατάλοιπα αυτά.

Στα πειράματα CD που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία διαφανής στο εύρος 190 - 350 nm με οπτική διαδρομή 1 cm για μετρήσεις στη περιοχή του εγγύς υπεριώδους και 1 mm για μετρήσεις στη περιοχή του μακρινού υπεριώδους. Η χρήση θερμοστάτη Peltier με υδάτινο λουτρό επιτρέπει τη λήψη φάσματος CD σε επιλέξιμη σταθερή θερμοκρασία καθώς και την καταγραφή της μεταβολής της ελλειπτικότητας, σε επιλεγμένο, σταθερό μήκος κύματος, συναρτήσει της θερμοκρασίας για σταθερό ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας του δείγματος. Ένα πείραμα κυκλικού διχροϊσμού απαιτεί περίπου 200 μ L πρωτεϊνικού διαλύματος σε συγκεντρώσεις από 50 μ g/ml έως και 1 mg/ml, ανάλογα με την πρωτεΐνη, με διαλύτη οποιοδήποτε ρυθμιστικό διάλυμα που δεν εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στη περιοχή αυτή (υψηλές συγκεντρώσεις DTT, ιστιδίνης ή ιμιδαζόλης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη περιοχή του μακρινού υπεριώδους).

Το πρωτεϊνικό φάσμα κυκλικού διχροϊσμού στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους (250-350 nm) εμφανίζει ευαισθησία σε συγκεκριμένα στοιχεία τριτοταγούς δομής. Σε αυτά τα μήκη κύματος τα χρωμοφόρα είναι τα αρωματικά αμινοξέα και οι δισουλφιδικοί δεσμοί της πρωτεΐνης τα σήματα των οποίων είναι ευαίσθητα στην όλη διευθέτηση του μορίου στο χώρο. Στην περιοχή 250-270 nm απορροφά κυρίως η φαινυλαλανίνη, στη περιοχή 270-290 nm απορροφά κυρίως η τυροσίνη και τέλος στη περιοχή 250-270 nm απορροφά η θρυπτοφάνη. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί δίνουν ασθενή σήματα σε όλη την περιοχή του εγγύς υπεριώδους. Αν η πρωτεΐνη διατηρεί στοιχεία δευτεροταγούς δομής αλλά δεν υπάρχει σαφώς καθορισμένη τριτοταγής δομή (π.χ. αναδιπλωμένη πρωτεΐνη σε μη λειτουργική διαμόρφωση), τότε τα σήματα στη περιοχή αυτή θα κινούνται σε μηδενικές τιμές. Αν όμως υπάρχουν σημαντικά σήματα στο εγγύς υπεριώδες τότε μπορούμε να υποθέσουμε με ασφάλεια ότι η πρωτεΐνη που μελετάμε αναδιπλώθηκε σε μία αυστηρά καθορισμένη δομή. Το φάσμα κυκλικού διχροϊσμού στο εγγύς υπεριώδες είναι ευαίσθητο και σε μεταβολές στη δομή που οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων ή σε μεταβολή των συνθηκών του διαλύτη. Η ένταση των σημάτων στη περιοχή αυτή είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή του μακρινού υπεριώδους και για τη λήψη των φασμάτων αυτών απαιτούνται περίπου 600 μ L διαλύματος πρωτεΐνης με συγκέντρωση στην περιοχή των 0.3 - 2 mg/mL, ανάλογα πάντα με το πρωτεϊνικό μόριο.

10. Φασματοσκοπία φθορισμού

Το φαινόμενο της εκπομπής ακτινοβολίας από κάποιο υλικό καλείται φωταύγεια. Η εκπομπή φωτός σαν αποτέλεσμα της διέγερσης Του υλικού από την απορρόφηση ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος καλείται φθορισμός (**fluorescence**).

Όταν ένα μόριο διεγερθεί από την απορρόφηση ακτινοβολίας μπορεί να ακολουθήσει διάφορους μηχανισμούς για την αποδιέγερσή του (Εικ. 15). Οι διάφοροι αυτοί τρόποι αποδιέγερσης είναι ανταγωνιστικοί ως προς την εκπομπή ακτινοβολίας όταν ο απαιτούμενος γι' αυτές χρόνος πραγματοποίησης είναι συγκρίσιμος με το μέσο χρόνο που το μόριο βρίσκεται στη διεγερμένη κατάσταση.



Εικ. 15 Αποδιέγερση μορίου

Το φαινόμενο αυτό είναι και αυτό που εκμεταλλευόμαστε για να μελετήσουμε την αποδίπλωση των πρωτεϊνών. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στη περιοχή του εγγύς υπεριώδους απορροφούν τα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και μάλιστα σε διακριτά μήκη κύματος. Εκτός από τις διαφορές που εμφανίζουν στα φάσματα απορρόφησης, τα τρία αυτά αμινοξέα εμφανίζουν μεγάλες διαφορές και κατά το φθορισμό.

Η θρυπτοφάνη εμφανίζει ισχυρότερο φθορισμό και μεγαλύτερη κβαντική απόδοση από τα άλλα δύο αρωματικά αμινοξέα. Η ένταση, η κβαντική απόδοση και το μήκος κύματος του μέγιστου της κορυφής εκπομπής βρίσκονται σε άμεση σχέση με το διαλύτη. Όσο λιγότερο πολικό είναι το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη, τόσο πιο ισχυρή είναι η ένταση του φθορισμού χαμηλότερο το μήκος κύματος του μέγιστου εκπομπής (**blue shift**). Κατάλοιπα θρυπτοφάνης που είναι θαμμένα στο υδρόφοβο εσωτερικό των πρωτεϊνών μπορούν να διαφέρουν κατά 10-20 nm στο μήκος κύματος του μέγιστου του φάσματος εν συγκρίσει με αυτά που βρίσκονται στο εξωτερικό της πρωτεΐνης σε επαφή με το (συνήθως πολικό) διαλύτη. Η αποδιέγερση των καταλοίπων θρυπτοφάνης είναι πιθανό να μην πραγματοποιηθεί με εκπομπή

ακτινοβολίας αλλά με μηχανισμό μεταφοράς ενέργειας αν σε μικρή ακτίνα υπάρχουν κατάλοιπα με πρωτονιωμένες καρβοξυλομάδες, όπως το ασπαρτικό οξύ και το γλουταμικό οξύ).

Η τυροσίνη, όπως και η θρυπτοφάνη εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στα 280 nm και όταν διεγερθεί από ακτινοβολία αυτού του μήκους κύματος εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό φάσμα εκπομπής. Η εκπομπή αυτή είναι ασθενέστερη από αυτή της θρυπτοφάνης, παρόλα αυτά σε απόλυτα μεγέθη συνεισφέρει σημαντικά στο πρωτεϊνικό φάσμα φθορισμού μιας και συνήθως βρίσκεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στις πρωτεΐνες. Η Παρουσία σε μικρή ακτίνα καταλοίπων θρυπτοφάνης μπορεί να οδηγήσει σε αποδιέγερση με μηχανισμό μεταφοράς ενέργειας. Επιπλέον η τυροσίνη μπορεί να μεταπέσει σε μια διεγερμένη κατάσταση ιοντισμού όπου χάνει το πρωτόνιο του αρωματικού υδροξυλίου. Ο μηχανισμός αυτός είναι ένας επιπλέον μηχανισμός αποδιέγερσης χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας που εμφανίζεται στις τυροσίνες.

Η φαινυλαλανίνη με ένα μόνο βενζολικό δακτύλιο και μια μεθυλομάδα εμφανίζει πολύ ασθενή φθορισμό. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της διεγείρουσας ακτινοβολίας και η κβαντική απόδοση της αποδιέγερσης είναι πολύ χαμηλότερες από αυτές των άλλων αρωματικών καταλοίπων. Στη πράξη ο φθορισμός των καταλοίπων φαινυλαλανίνης παρατηρείται μόνο απουσία καταλοίπων τυροσίνης και θρυπτοφάνης. Η απλή δομή της φαινυλαλανίνης αποδεικνύει την ισχυρή εξάρτηση του φθορισμού από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος του αρωματικού καταλοίπου. Η προσθήκη στη φαινυλαλανίνη μιας υδροξυλομάδας όπως στη τυροσίνη οδηγεί σε αύξηση της έντασης φθορισμού κατά 20 φορές. Αν στη συνέχεια προστεθεί και ένας ινδολικός δακτύλιος, όπως στη θρυπτοφάνη, η μεταβολή στην ένταση φθορισμού φθάνει τις 200 φορές αυτή της φαινυλαλανίνης.

Εξαιτίας των σημαντικών αυτών διαφορών στους συντελεστές κβαντικής απόδοσης και από το γεγονός ότι κατά όταν κάποια αρωματικά κατάλοιπα βρίσκονται αρκετά κοντά στο χώρο λαμβάνουν χώρα φαινόμενα μεταφοράς ενέργειας από φαινυλαλανίνη σε τυροσίνη και από τυροσίνη σε θρυπτοφάνη, το φάσμα εκπομπής μιας πρωτεΐνης συνήθως θυμίζει αυτό της θρυπτοφάνης.

Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι σήμερα μία από τις πιο διαδεδομένες φασματοσκοπικές τεχνικές στα πεδία της βιοχημείας και της βιομοριακής φυσικής. Αν και δεν μπορεί να προσφέρει λεπτομερείς δομικές πληροφορίες, η τεχνική αυτή έχει καθιερωθεί εξαιτίας της εξαιρετικής της ευαισθησίας σε μεταβολές στη διαμόρφωση και τα δυναμικά χαρακτηριστικά των μελετώμενων βιομορίων.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πριν γίνει ο καθαρισμός και η μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του παράγοντα πήξης von Willebrand, που είναι και ο σκοπός αυτής της εργασίας, προηγήθηκε στο εργαστήριο κλωνοποίηση και μελέτη της υπερέκφρασης των επικείμενων πρωτεϊνών.

Αφού απομονώθηκαν τα γονίδια A1 και A2, ενισχύθηκαν και κλωνοποιήθηκαν, ελήφθησαν οι αλληλουχίες τους και είναι οι εξής:

A1 γονίδιο

```
ga cctggtcttc ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagttg aagtgtgaa ggcctttgtg
gtggacatgatggagcggctgcgcatctcc cagaagtggg tccgctggc cgtgggtggag taccacgacg
gctccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc gtcagagctg cggcgcattg ccagccaggt
gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac cagcgaggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc
aagatcgacc gccctgaagc ctcccgcac gccctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt
cccggaaactt tgtccgctac gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccgg tgggcattgg
gccccatgcc aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc
cttcgtgtg agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatc
```

A2 γονίδιο

```
accatggggc ccaagaggaa ctccatggtt ctggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt
gaagccgact tcaacaagag caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca
gcatccacgt caggtgtctg cagtactct acatggtgac cgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc
caaaggggac atctctcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg
gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg ggagcaggtg cccaacctgg
tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc
cattggagtg ggccctaatt ccaacgtgca ggagctggag aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc
atccaggact ttgagacgct ccccagagag gctcctgacc tgggtgtgcag
```

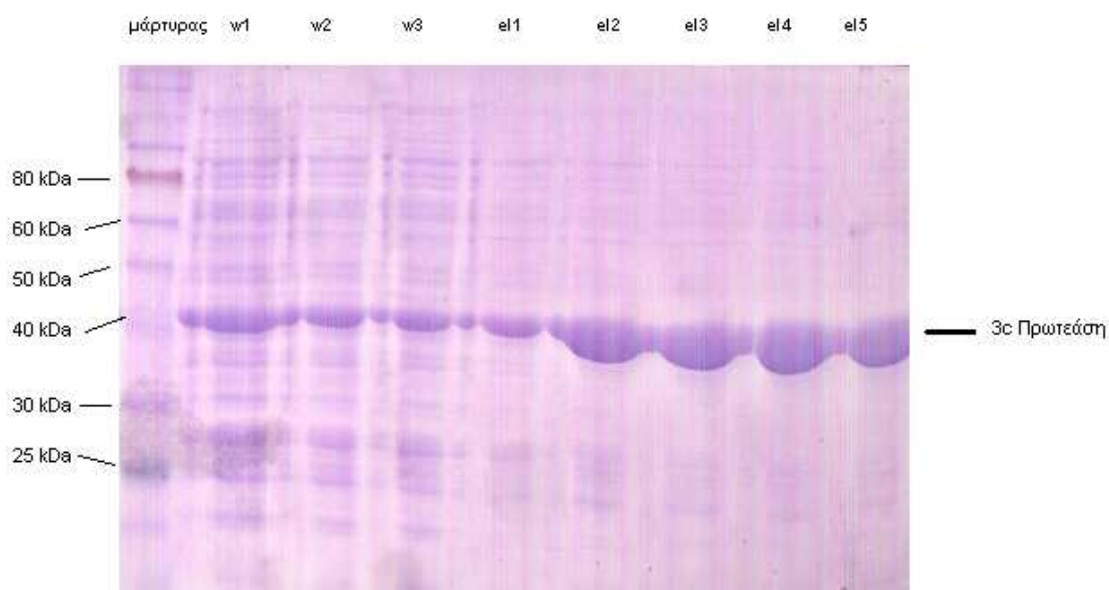
Έπειτα ακολούθησε η μελέτη της υπερέκφρασης των επικρατειών A1 και A2 και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καλύτερη έκφραση των πρωτεϊνών επιτεύχθει σε συνθήκες επώασης των καλλιιεργειών στους 16° C για 16 ώρες με συγκέντρωση IPTG 0.1mM.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΩΝ A1 ΚΑΙ A2 ΤΟΥ vWF ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΑΣΗΣ 3C ΣΕ ΣΤΗΛΗ GSH

Η μέθοδος που επιλέχτηκε προκειμένου να γίνει ο καθαρισμός των πρωτεϊνών ήταν σε στήλη GSH (βλέπε πειραματικό μέρος, μέθοδος 2) διότι περιέχουν πέραν της ουράς των 6 ιστιδινών και μια GST ουρά. Το μίγμα που περιλάμβανε τις υπό μελέτη πρωτεΐνες πέρασε από τρεις στήλες (A1, A2 και 3C), οι οποίες τις συγκράτησαν και απέβαλλαν με τις πλύσεις τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Μετά τις εκλούσεις με γλουταθειόνη στα τρία προϊόντα που ελήφθησαν υπήρχαν αντίστοιχα A1, A2 και 3C συνδεδεμένες με την GST ούρα.

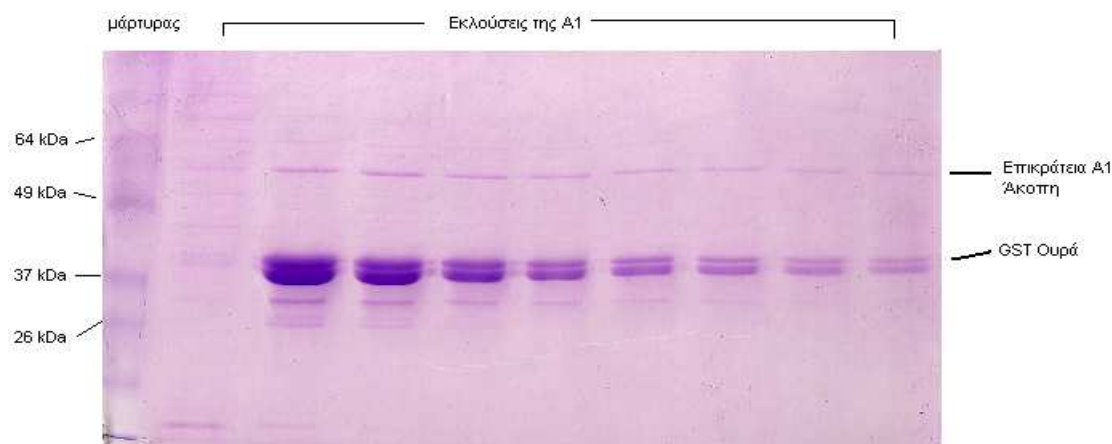
Ακολούθησε έλεγχος των προϊόντων που προέκυψαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου 12% και τα αποτελέσματα ήταν τα αναμενόμενα.

Ο καθαρισμός της 3C πρωτεάσης ήταν επιτυχής και το αποτέλεσμα αυτής φαίνεται στην εικόνα 16.



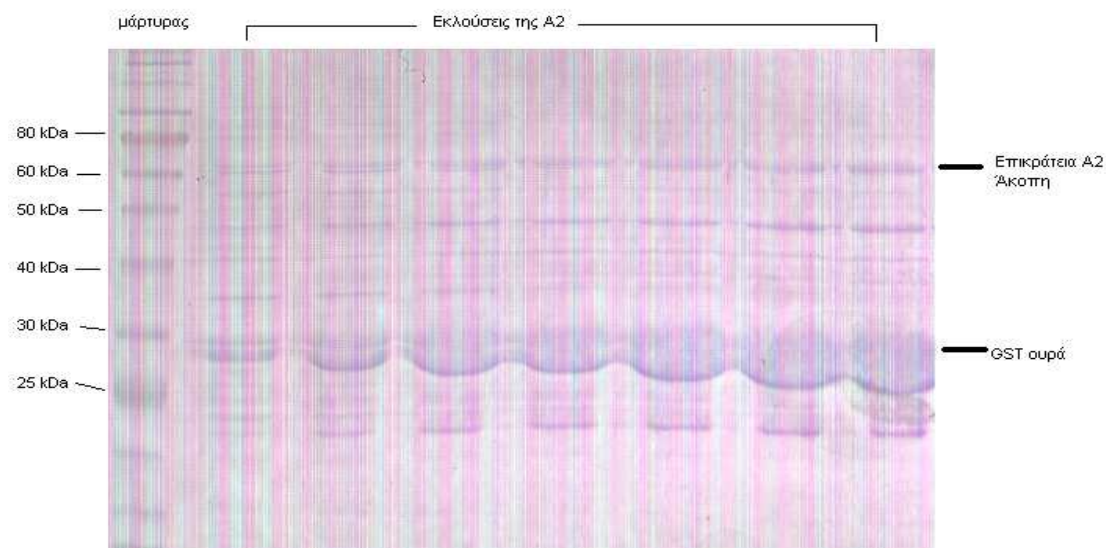
Εικ. 16 Καθαρισμός της 3C πρωτεάση
Πρώτη διαδρομή: Μάρτυρας,
Δεύτερη – Τέταρτη διαδρομή: Πλύσεις της στήλης
Πέμπτη – Ένατη διαδρομή: Εκλούσματα της στήλης

Τα αποτελέσματα του καθαρισμού της περιοχής ήταν ακριβώς αυτά που περιμέναμε και διακρίνονται στην εικόνα 17.



Εικ. 17 Καθαρισμός της επικράτειας Α1 (άκοπη)
Πρώτη διαδρομή: Μάρτυρας
Δεύτερη – Ένατη διαδρομή: Εκλούσματα στήλης

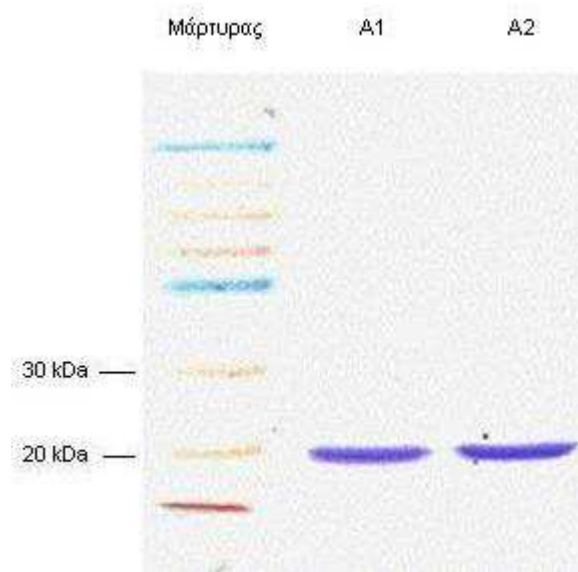
Τέλος, τα αποτελέσματα του καθαρισμού της επικράτειας Α2 ήταν τα αναμενόμενα και παρατίθενται στην εικόνα 18.



Εικ. 18 Καθαρισμός της επικράτειας Α2 (άκοπη)
Πρώτη διαδρομή: Μάρτυρας
Δεύτερη – Έβδομη διαδρομή: Εκλούσματα της στήλης

Πένψη της GST ουράς από την πρωτεάση 3C

Μετά τον καθαρισμό των πρωτεϊνών A1 και A2 ακολούθησε η κοπή της GST ουράς από τις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Για να πραγματοποιηθεί αυτό επιλέχτηκε η πρωτεάση 3C. Μετά από δοκιμές φάνηκε ότι η πρωτεάση είναι λειτουργική σε αναλογία 1:20 (πρωτεάση : πρωτεΐνη). Επιλέχτηκε ένα πρωτόκολλο (βλέπε πειραματικό μέρος, μέθοδος 2) μέσω του οποίου έγιναν εφικτά τόσο η πέψη της GST ουράς όσο και η απομόνωση της κομμένης πλέον πρωτεΐνης από τα υπόλοιπα κλάσματα (GST ουρά, πρωτεάση 3C, άκοπη πρωτεΐνη). Εφόσον όλα τα προαναφερθέντα κλάσματα πέραν της κομμένης πρωτεΐνης περιέχουν GST θα παραμείνουν στην στήλη και τελικά μόνο η κομμένη πρωτεΐνη θα περάσει από αυτή. Από την ηλεκτροφόρηση του flow through σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12% φάνηκε ότι πραγματικά απομονωνόταν η κομμένη πρωτεΐνη (Εικ.18).



Εικ. 18 Πένψη της GST ούρας από τις επικράτειες A1 και A2

Πρώτη διαδρομή: Μάρτυρας
Δεύτερη διαδρομή: Επικράτεια A1
Τρίτη διαδρομή: Επικράτεια A2

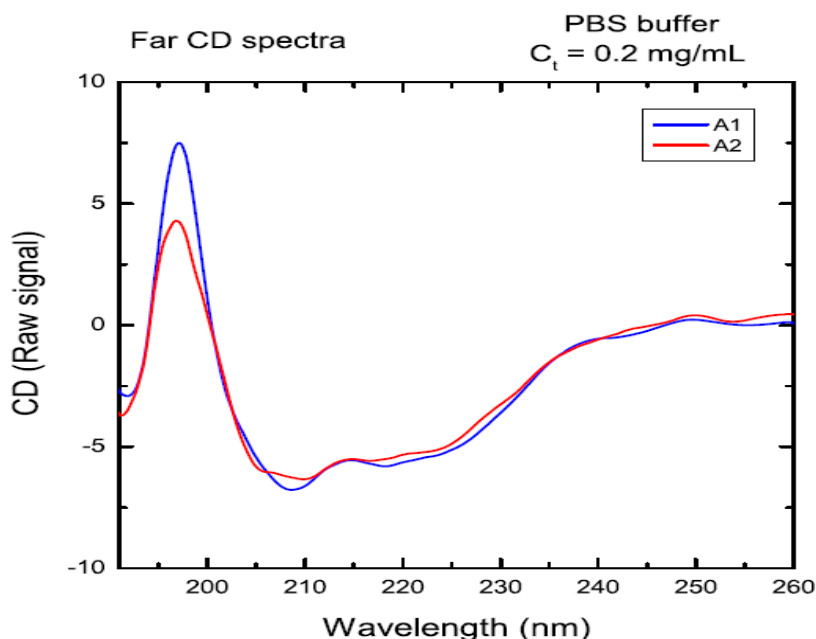
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΩΝ A1 ΚΑΙ A2 ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ von WILLEBRAND

A) ΦΑΣΜΑΤΟΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΟΙΣΜΟΥ

Αμέσως μετά το καθαρισμό των επικρατειών A1 και A2, πραγματοποιήθηκαν λήψεις φασμάτων κυκλικού διχροϊσμού στην περιοχή του άπω υπεριώδους προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι πρωτεΐνες βρίσκονται στις λειτουργικές τους διαμορφώσεις.

Τα φάσματα CD των πρωτεϊνών A1 και A2 ελήφθησαν στη περιοχή του άπω υπεριώδους στους 5° C σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1x) με pH 7,4. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση και για τις δύο πρωτεΐνες ήταν 0,2mg/ml. Για την λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία (προϊόν της εταιρείας Helma), με μήκος διαδρομής 1nm.

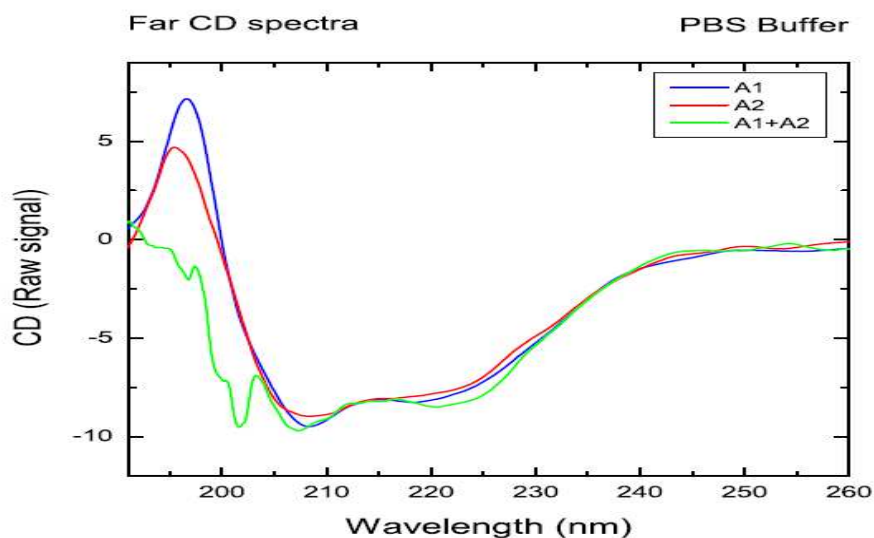
Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες A1 και A2 εμφανίζουν σταθερότητα στη διαμόρφωση τους και είναι λειτουργικές. Η καμπύλη της A1 (χρώμα μπλε) είναι ελαφρώς πιο πάνω από αυτή της A2 (κόκκινο χρώμα) (Εικ. 19).



Εικ. 19 Φάσματα CD των πρωτεϊνών A1 και A2

Επίσης, πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος κυκλικού διχροϊσμού για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών A1 και A2 ακριβώς με τις ίδιες συνθήκες που

προαναφέρθηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όντως υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των A1 και A2 και δημιουργείται σύμπλοκο μεταξύ των δύο έτσι ώστε να είναι λειτουργικό για να μην πραγματοποιηθεί η δέσμευση του υποδοχέα GPIb των αιμοπεταλίων και να γίνει η πήξη του αίματος. Η καμπύλη της αλληλεπίδρασης (πράσινο χρώμα) δεν συμπίπτει με τις καμπύλες των πρωτεϊνών που σημαίνει ότι η δευτεροταγής δομή του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 αλλάζει κατά την αλληλεπίδραση τους (Εικ. 20).



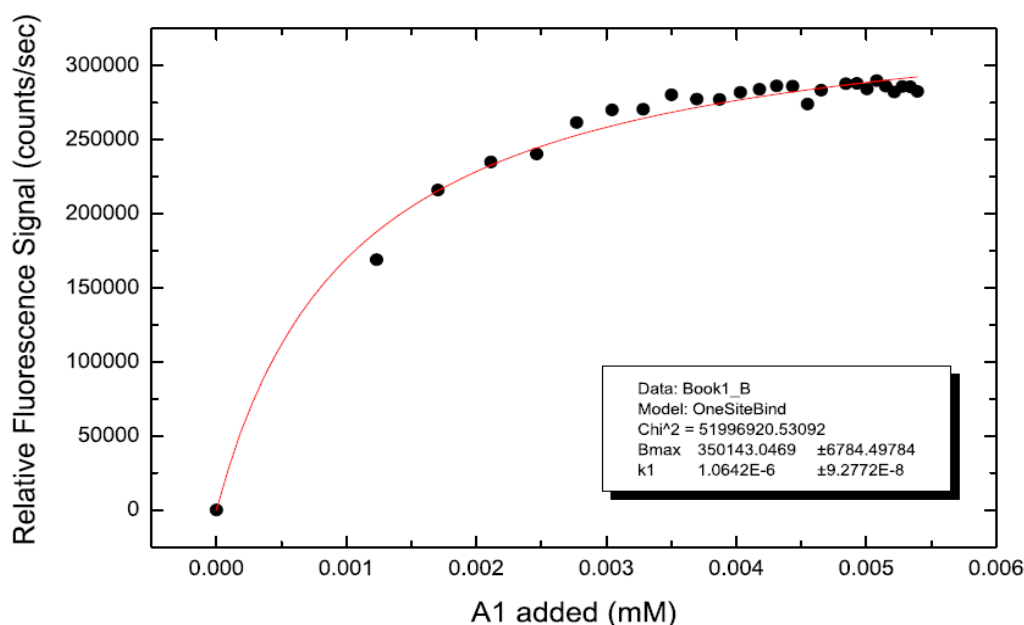
Εικ. 20 Φάσματα CD των πρωτεϊνών A1,A2 και του συμπλόκου τους

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της δευτεροταγούς δομής της A1, της A2 και του συμπλόκου τους έδειξαν ότι είναι φυσιολογικό το ποσοστό πάνω από 100% κάτι που συμβαίνει σε όλες σχεδόν τις πρωτεΐνες. Καλύτερη προσαρμογή έχουμε για τη περιοχή 200-260nm. Η αλλαγή στα ποσοστά άρα και στη δομική διαμόρφωση μπορεί να είναι αλληλεπίδραση των A1 και A2. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρουμε τα ποσοστά.

	A1	A2	A1 – A2
180 – 260 nm	116,6 %	118,6 %	135,8 %
185 – 260 nm	117,9 %	120,2 %	139,5 %
190 – 260 nm	115,7 %	117,6 %	134,5 %
195 – 260 nm	109,2 %	110,6 %	129,1 %
200 – 260 nm	108,3 %	108,3 %	126,6 %
205 – 260 nm	108,0 %	108,4 %	126,6 %
210 – 260 nm	109,0 %	109,3 %	126,9 %

Β) ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών A1 και A2 μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού. Το φάσμα φθορισμού λήφθηκε σε μήκος κύματος διέγερσης στα 290 nm (εκλεκτική διέγερση καταλοίπων θρυπτοφάνης) και με αυξανόμενη πρωτεϊνική συγκέντρωση της A1 έως 6 μM . Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης A1 στο πρωτεϊνικό διάλυμα αυξάνεται και το σήμα φθορισμού λόγω της έντονης αλληλεπίδρασης των δομών της A1 και της A2. Άρα, η καμπύλη που σχηματίστηκε επιβεβαιώνει την αλληλεπίδραση των δύο μορίων (Εικ. 23).

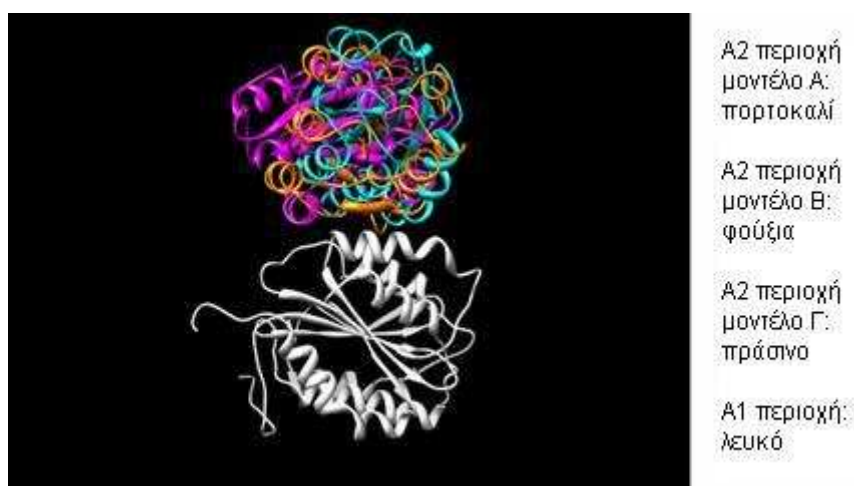


Εικ. 21 Καμπύλη φασματοσκοπίας φθορισμού για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2

Με βάση την καμπύλη αυτή προσδιορίστηκαν η κινητική σταθερά k_1 της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2, η οποία είναι $k_1 = 1,0642^E -6 (\pm 9,2772E - 8)$.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ Α, Β, Γ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ Α2 ΜΕΣΩ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ

Αφού διαπιστώθηκε η αλληλεπίδραση των επικρατειών Α1 και Α2 αποφασίσαμε να ερευνήσουμε τον τρόπο αλληλεπίδρασης των δύο περιοχών μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης σημείου. Έτσι, ο κύριος Γεώργιος Παπαδόπουλος, Λέκτορας Βιοφύσικης, με βάση προσομοιώσεις μοριακών δυναμικών, σχεδίασε τρία πιθανά μοντέλα αλληλεπίδρασης των επικρατειών Α1 και Α2 που τα ονόμασε Α και Β και Γ. Τα μοντέλα φαίνονται στην εικόνα 22. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη της εικόνας καθώς και για την επεξεργασία των δεδομένων της δομής ήταν το chimera.



Εικ. 22 Δομή της μεταλλαγμένης περιοχής Α2

Προκείμενου να δούμε ποιο από αυτά τα μοντέλα ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, σχεδιάστηκαν σημειακές μεταλλάξεις σε αμινοξέα, που με βάση τις μοριακές προσομοιώσεις είναι κρίσιμα για την αλληλεπίδραση. Οι αλλαγές που έγιναν στα αμινοξέα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της επικράτειας Α2 παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της επικράτειας A2			
	Μοντέλο Α	Μοντέλο Β	Μοντέλο Γ
Πρώτη μεταλλαγή	Από Γλυκίνη (GAG) σε Αλανίνη (GCG) Είναι το 63 ^ο αμινοξύ	Από Γλυκίνη (GAG) σε Αλανίνη (GCG) Είναι το 68 ^ο αμινοξύ	Από Γλυκίνη (GAG) σε Αλανίνη (GCG) Είναι το 25 ^ο αμινοξύ
Δεύτερη μεταλλαγή	Από Γλυκίνη (GAG) σε Αλανίνη (GCG) Είναι το 154 ^ο αμινοξύ	Από Αλανίνη (GCG) σε Αργινίνη (CGC) Είναι το 161 ^ο αμινοξύ	

Δημιουργία των μοντέλων Α, Β και Γ της πρωτεΐνης A2

Ακολουθώντας την τεχνική της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης σημείου δημιουργήθηκαν τα μοντέλα που σχεδιάστηκαν. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας ήταν να γίνουν οι μεταλλάξεις στα κατάλληλα σημεία του γονιδίου A2 μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινήτες, βάσει του πρωτοκόλλου, που προκαλούσαν τις μεταλλάξεις σημείου στο γονίδιο A2 που βρίσκεται μέσα στον κατάλληλο φορέα. Τα ζεύγη των εκκινήτων είναι τα εξής:

Μοντέλο Α

- A first forward

5' – CTA CAT GGT GAC TGT GGC GTA CCC CTT CAG CGA GG – 3'

- A first reversed

5' – CCT CGC TGA AGG GGT ACG CCA CAG TCA CCA TGT AG – 3'

- A both forward

5' – GGC GTA CCC CTT CAG CGC GGC ACA GTC CAA AGG GG – 3'

- A both reversed

5' – CCC CTT TGG ACT GTG CCG CGC TGA AGG GGT ACG CC – 3'

Μοντέλο Β

- B first forward

5' – CAA CGT GCA GGA GCT GGC GAG GAT TGG CTG GCC C – 3'

- B first reversed

5' – GGG CCA GCC AAT CCT CGC CAG CTC CTG CAC GTT G – 3'

- B medium forward

5' – GAT TGG CTG GCC CAA TGG CCC TAT CCT CAT CCA GG – 3'

- B medium reversed

5' – CCT GGA TGA GGA TAG GGC CAT TGG GCC AGC CAA TC – 3'

- B both forward

5' – GAT TGG CTG GCC CAA TCG CCC TAT CCT CAT CCA GG – 3'

- B both reversed

5' – CCT GGA TGA GGA TAG GGC GAT TGG GCC AGC CAA TC – 3'

Μοντέλο Γ

- Γ first forward

5' – GAT CGG ACA AAA TTG GTG CAG CCG ACT TCA ACA AGA G – 3'

- Γ first reversed

5' – CTC TTG TTG AAG TCG GCT GCA CCA ATT TTG TCC GAT C – 3'

- Γ second forward

5' – CTT CCA CCA GAG CAA GGC GTT CAT GGA GGA GGT G – 3'

- Γ second reversed

5' – CAC CTC CTC CAT GAA CGC CTT GCT CTT GTT GAA G – 3'

- Γ third forward

5' – GCA AGG CGT TCA TGG CTG AGG TGA TTC AGC G – 3'

- Γ third reversed

5' – CGC TGA ATC ACC TCC GCC ATG ACC GCC TTG C – 3'

- Γ fourth forward

5' – CGA GAG GCT CCT GCC CTG GTG CTG CAG – 3'

- Γ fourth reversed

5' – CTG CAG CAC CAG GGC AGG AGC CTC TCG – 3'

Η προετοιμασία των δειγμάτων και οι συνθήκες της PCR αντίδρασης επιλέχθηκαν βάσει της τεχνικής της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης σημείου (βλέπε πειραματικό μέρος, μέθοδος 6).

Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης πέπτηκαν από την Dpn I ενδονουκλεάση ώστε να καταστραφεί το πατρικό γονίδιο A2 και να παραμείνει το σημείο που έγινε η μετάλλαξη.

Τα προϊόντα της πέψης μετασχηματίστηκαν στα XL1-Blue XL1-Blue επιδεκτικά κύτταρα και έγινε επίστρωση κάθε αντίδρασης μετασχηματισμού, στα τρυβλία με άγαρ που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για τον πλασμιδιακό φορέα, στην περίπτωση μας καναμυκίνη. Σ' αυτό το σημείο θα ήταν σκόπιμο να προστεθεί ότι ύστερα από μελέτες και δοκιμές που έγιναν στο εργαστήριο ο μετασχηματισμός αυτών των προϊόντων μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε είδος επιδεκτικών κυττάρων.

Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα με την τεχνική Mini – prep (βλέπε πειραματικό μέρος, μέθοδος 8) και πέψη του φορέα. Τα προϊόντα στάλθηκαν για αλληλούχιση και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι έγιναν οι σημειακές μεταλλάξεις μόνο στα μοντέλα A και B. Οι αλληλουχίες του μεταλλαγμένου γονιδίου A2 βάσει των μοντέλων A και B είναι οι εξής:

Γονίδιο A2 (άγριος τύπος)

```
accatggggc ccaagaggaa ctccatgggt ctggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt
gaagccgact tcaacaagag caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca
gcatccacgt cacggtgctg cagtactcct acatggtgac cgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc
caaaggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg
gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc aggggtgaccg ggagcaggtg cccaacctgg
tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc
cattggagtg ggccctaattg ccaacgtgca ggagctggag aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc
atccaggact ttgagacgct ccccgagag gctcctgacc tgggtctgcag
```

Πρώτη μετάλλαξη

Μοντέλο A

```
accatggggc ccaagaggaa ctccatgggt ctggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt
gaagccgact tcaacaagag caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca
gcatccacgt cacggtgctg cagtactcct acatggtgac cgtggcgtac cccttcagcg aggcacagtc
caaaggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg
gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc aggggtgaccg ggagcaggtg cccaacctgg
tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc
```

cattggagtg ggcctaagt ccaacgtgca ggagctggag aggattggct ggccaatgc ccctatcctc
atccaggact ttgagacgct cccccgagag gctcctgacc tgggtgctgcag

Μοντέλο B

accatggggc ccaagaggaa ctccatggtt ctggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt
gaagccgact tcaacaagag caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca
gcatccacgt cacggtgctg cagtactcct acatggtgac cgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc
caaagggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg
gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc aggggtgaccg ggagcaggtg cccaacctgg
tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc
cattggagtg ggcctaagt ccaacgtgca ggagctg**gcg** aggattggct ggccaatgc ccctatcctc
atccaggact ttgagacgct cccccgagag gctcctgacc tgggtgctgcag

Δεύτερη μετάλλαξη

μοντέλο A

accatggggc ccaagaggaa ctccatggtt ctggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt
gaagccgact tcaacaagag caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca
gcatccacgt cacggtgctg cagtactcct acatggtgac cgtg**gcg**tac cccttcagc**g cg**gcacagtc
caaagggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg
gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc aggggtgaccg ggagcaggtg cccaacctgg
tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc
cattggagtg ggcctaagt ccaacgtgca ggagctggag aggattggct ggccaatgc ccctatcctc
atccaggact ttgagacgct cccccgagag gctcctgacc tgggtgctgcag

Μοντέλο B

accatggggc ccaagaggaa ctccatggtt ctggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt
gaagccgact tcaacaagag caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca
gcatccacgt cacggtgctg cagtactcct acatggtgac cgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc
caaagggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg
gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc aggggtgaccg ggagcaggtg cccaacctgg
tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc
cattggagtg ggcctaagt ccaacgtgca ggagctg**gcg** aggattggct ggccaat**cg cg**ccctatcctc
atccaggact ttgagacgct cccccgagag gctcctgacc tgggtgctgcag

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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

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

Η σύνθεση του vWF γίνεται αποκλειστικά στα μεγακαρυοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 2.813 αμινοξέων. Η A1 περιοχή αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 497-716, ενώ η A2 περιοχή στα κατάλοιπα 717-909. Για τον λόγο αυτό, αφού απομονώθηκε RNA από ενδοθηλιακά κύτταρα και συντέθηκε το αντίστοιχο cDNA σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι primers, ώστε με την μέθοδο της PCR να ενισχυθούν οι περιοχές A1 και A2. Τα ενισχυμένα αυτά προϊόντα κλωνοποιήθηκαν και έγινε απευθείας μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων. Τελικά οι κωδικές περιοχές των A1 και A2 επικρατειών κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pet49b, μετά από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BamHI και HindIII προκειμένου να παραχθούν ανασυνδυασμένες A1

και A2 περιοχές που θα φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μια ουρά His και μια GST ουρά. Οι ουρές αυτές είναι χρήσιμες για τον μετέπειτα καθαρισμό των πρωτεϊνών αυτών με στήλες γλουταθειόνης. Με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς που μετά από αλληλούχισή επιβεβαιώθηκε ότι περιείχαν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες, μετασχηματίστηκαν κύτταρα BL21 ώστε αυτές να εκφραστούν. Ακολούθησαν διάφορες δοκιμασίες υπερέκφρασης των πρωτεϊνών αυτών, που περιλάμβαναν διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG και διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους επώασης, ώστε να καθοριστούν οι συνθήκες που επιτρέπουν την καλύτερη έκφρασή τους. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως μεγαλύτερη έκφραση πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση IPTG 0,1mM και overnight επώαση στους 16 °C.

Καθώς στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών είχαν εισαχθεί ουρές His και GST ακολούθησαν καθαρισμοί των παραγόμενων πρωτεϊνών με στήλες γλουταθειόνης. Η στήλη γλουταθειόνης έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα στον καθαρισμό των πρωτεϊνών. Επόμενο βήμα στην πειραματική διαδικασία ήταν να αποκοπεί η GST-ουρά που είχε προστεθεί στις A1 και A2 πρωτεΐνες. Αυτό έγινε χρησιμοποιώντας την πρωτεάση 3C που περιείχε επίσης GST-ουρά. Η πέψη των A1 και A2 πρωτεϊνών από την 3C έγινε πάνω σε στήλη γλουταθειόνης. Έτσι επιτεύχθηκε τόσο η πέψη των GST ουρών όσο και η απομόνωση των κομμένων πλέον πρωτεϊνών, αφού η στήλη συγκράτησε όσες πρωτεΐνες περιείχαν GST-ουρές, δηλαδή την 3C, τις άκοπες A1 και A2 καθώς και τις ουρές GST, ενώ άφησε να περάσουν οι κομμένες A1 και A2. Οι απομονωμένες κομμένες πρωτεΐνες αφού πρώτα στάλθηκαν για ένα πείραμα με φασματοσκοπικές μεθόδους, της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμού και της φασματοσκοπίας φθορισμού ώστε να μελετηθεί η αλληλεπίδρασή τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι A1 και A2 πρωτεΐνες που καθαρίσαμε είναι λειτουργικές και δημιουργούν σύμπλοκο.

Με βάση την μελέτη της αλληλεπίδρασης σχεδιάσαμε μοντέλα μεταλλαξιγένεσης της επικράτειας A2 και τα ονομάσαμε A και B προκειμένου να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση των περιοχών A1 και A2 ύστερα από στοχευμένη μεταλλαξιγένεση. Έγιναν οι πρώτες και οι δεύτερες μεταλλάξεις σημείου και στα δύο μοντέλα A και B και ήταν επιτυχείς. Η διαδικασία παραγωγής των μεταλλάξεων για το Γ μοντέλο συνεχίζεται για να γίνει η μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

12. Mancuso D.J., Tuley EA., Westfeld LA., Lester-Mancuso TL., Le Beau MM., Sorace JM. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991, 30:253-69
13. Charles A. Wittaker, Richard O. Hynes. Distribution and Evolution of von Willebrand/Integrin A domains: Widely Dispersed Domains with Roles in Cell Adhesion and Elsewhere. *Molecular Biology of the Cell* 2002, 264:19514-19527
14. Ruggeri ZM. Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001, 14:257-79
15. Wagner DD. Cell Biology of von Willebrand factor. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1990, 6:217-46
16. Mayadas TN., Wagner DD. Von Willebrand factor biosynthesis and processing. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1991, 614:156-66
17. Dobrkovska A., Krzensk U., Chediak JR. Pharmacokinetics efficacy and safety of Humate-P in von Willebrand disease. *Haemophilia* 1998, 4 Suppl 3:33-9
18. Zimmerman TS., Dent JA., Ruggeri ZM., Nannini LH. Subunit composition of plasma von Willebrand factor: cleavage in present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers. *J. Clin Invest* 1986, 77:947-51
19. Xie L., Chesteman CN., Hogg PJ. Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1. *J. Exp. Med.* 2001, 193:1341-9
20. Tsai HM., Sussman II., Nagel RL. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* 1994, 83:2171-9
21. Dent JA., Galbusera M., Ruggeri ZM. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J. Clin Invest* 1991, 88:774-82
22. Furlan M., Robles R., Afolter D., Meyer D., Baillod P., Lammle B. Triplet structure of von Willebrand factor precludes proteolytic degradation of high molecular weight multimers. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1993, 90:7503-7
23. Kokame K., Matsumoto M., Fujimura Y., Miyata T. VW73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood* 2004, 103:607-12
24. Goodeve A., Eikenbood JC., Ginsburg D., Hilbert L., Mazurier C., Peake IR. A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms.

On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 2001, 85:929-31

25. Zaverio M. Ruggeri, Jerry Ware. Von Willebrand Factor. *FASEBJ* 1993, 7:308-316

26. J. Evan Sadler. Minireview: von Willebrand Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1991, Vol. 866, No 34, Issue of December 5, pp 22777-22780

27. Verweij C.L., Hart M., Pannekoek H. *EMBO J.* 1987, 6:2885-2890

28. Wise R.J., Pittman D.D., Handin R.J., Orkin S.H. *Cell* 1988, 52:229-236

29. Mayadas T.N., Wagner D.D. *J. Biol. Chem.* 1989, 264:13497-13503

30. Weiss H.J., *Ann N.Y. Acad. Sci* 1991, 614:125-137

31. Sadler J.E., in the *Metabolic Basis of Inherited Disease* 1989, (Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D.) 6th Ed, pp 2171-2188 McGraw-Hill book Co, N.Y.

32. Mohri H., Fujimura Y., Shima M., Yoshioka A., Houghten R.A., Ruggeri Z.M., Zimmerman T.S. *J. Biol. Chem.* 1988, 263:17901-17904

33. Fujimura Y., Holland I.Z., Rurperi Z.M., Zimmerman T.S. *Blood* 1987, 70:985-988

34. Andrews K., Gorman J.J., Booth W.J., Corino G.L., Castaldi P.A., Berndt M.C. *Biochemistry* 1989, 28:8326-8336

35. Roberts D.D., Williams S.B., Gralnick H.R., Ginsburg V. *J. Biol. Chem.* 1986, 261:3306-3309

36. Christophe O., Obert B., Meyer D., Girma J.P. *Thromb. Haemostasis* 1991, 65:797

37. Marti T., Roesslelet S., Titani K., Walsh K.A. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* 1987, 26:8099-8109

38. Nishio K., Anderson P.J., Zheng X.L., Sadler J.E. Binding of platelet glycoprotein Iba to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS-13. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2004, 101:10578-83

39. Dong J.F., Moake J.L., Bernardo A., Fujikawa K., Ball C., Nolasco L., Lopez J.A., Cruz M.A. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J. Biol. Chem* 2003, 278:29633-9

40. Majerus E.M., Anderson P.J., Sadler J.E. Characterization of the binding interaction between ADAMTS-13 and vWF. *Blood* 2004, 104:150a

41. Zhang W., Motto D., Ginsburg D. ADAMTS-13 binds vWF via its C-terminal CUB2 domain. *Blood* 2004, 104:39a

42. Alessandra Casonatol, Luigi De Marco, Lisa Gallinarol. Maryta Sztukowski, Mario Mazzuccato, Monica Battiston, Antonio Pagnal, Zaverio M. Ruggeri. Altered von Willebrand factor subunit proteolysis and multimer processing with the Cys2362Phe mutation in the B2 domain. 2007
43. D' Souza S.E., Ginsberg M.H., Plow E.F. Trends Biochem 1991, 16:246-250
44. Sugimoto M., Mohri H., McClintock R.A., Ruggeri ZM. Identification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with botrocetin. J. Biol. Chem 1991, 266:18172
45. P. Vincent Jenkins, K. John Pasi, Stephen J. Perkins. Molecular Modeling of Ligand and Mutatio Sites of the Type A Domains of Human von Willebrand Factor and Their Relevance to von Willebrand's Disease. Blood Vol 91 No 6 (March 15) 1998, pp 2032-2044
46. Furlan M., Robles R., Lamie B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. Blood 1996, 87:4223-34
47. Dent JA., Berkowitz SD., Ware J., Kasper CK., Ruggeri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand Factor. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1990, 87:6306
48. Crystal Structure of the von Willebrand Factor A1 Domain and Implications for the Binding of Platelet Glycoprotein Ib, Jonas Emsley, Miguel Cruz, Robert Handin and Robert Liddington (1998).
49. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor, Qing Zhang, Yan-Feng Zhou¹, Cheng-Zhong Zhang, Xiaohui Zhang, Chafen Lu, and Timothy A. Springer (April 3, 2009)
50. De Cristofaro, R., Peyvandi, F., Palla, R., Lavoretano, S., Lombardi, R., Merati, G., Di Stasio, E., and Mannucci, P. M. (2005) J. Biol. Chem. 280, 23295–23302.