

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A von Willebrand faktor
szerkezetének és működésének összefüggései

Udvardy Miklós László

Témavezető: Dr. Hársfalvi Jolán



Debreceni Egyetem
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Az értekezés címe:

A von Willebrand faktor szerkezetének és működésének összefüggései

Doktori iskola:

Laki Kálmán Doktori Iskola (Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia program)

Témavezető:

dr Hársfalvi Jolán, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnöke: Prof. Dr Balla József, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Blaskó György, az MTA doktora
Dr. Kolev Kraszimir, az MTA doktora

A bíráló bizottság:

elnöke: Prof. Dr Balla József, az MTA doktora

opponensek: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Bodó Imre, Ph.D.

tagok: Prof. Dr. Blaskó György, az MTA doktora
Dr. Kolev Kraszimir, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja és helye:

2009. november 2. 13:30 óra, az I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

Rövidítések listája

CDR	komplementaritást meghatározó régió (complementarity determining region)
DAB	diamino benzidin
ELISA	enzimkapcsolt immunszorbens teszt (enzyme-linked immunosorbent assay)
GP Ib	glikoprotein Ib (CD42b)
GP IIb/IIIa	glikoprotein IIb/IIIa (CD41/CD61, $\alpha_{IIb}\beta_3$)
GP VI	glikoprotein VI
HRP	tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)
moAb	monoklonális antitest
PVDF	polivinilidén fluorid
RD	reflektív denzitás
RF	relatív mobilitás (retenció faktor)
RIPA	risztocetin indukálta thrombocyta agglutináció
scFv	egyláncú variábilis fragmentum (single-chain Fv)
SOE-PCR	splicing by overlap extension by PCR - splicing átfedés kiegészítése által PCR-rel
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane, másnéven THAM
ULVWF	ultranagy, szokatlanul nagy (unusually large) VWF
V _H	nehéz lánc variábilis régió

V _L	könnyű lánc variábilis régió
VWB	von Willebrand betegség
VWF	von Willebrand Faktor

Bevezetés

A vér teszi lehetővé a szervek közötti hatékony anyag és sejt szállítást. Ennek érdekében a vért erek hálózata juttatja el a szövetekhez, amely hálózat gerincesekben zárt kell hogy legyen. Ha ez a követelmény nem teljesül, akkor az életfunkciók nem tarthatóak fenn, így létfontosságú, hogy hatékony lépések álljanak rendelkezésre a vérveszteség megfékezésére. Érsérülés esetén ehhez nyilvánvalóan szükség van az érfal helyreállítására, de ugyanezek a mechanizmusok felelnek az érfal endothel béléseinek periodikus megújításáért is. A sérülések lezárása mellett legalább ennyire fontos, hogy a vér máshol viszont folyékony maradjon. Az első cél elérését egymástól függő – sejtes és extracelluláris – lépések sorozata biztosítja. A sérülést követően az érfal összehúzódása és a thrombocyták szubendotheliális struktúrákhoz tapadása időlegesen elzárja a a sérülést. Ezzel egyidőben a koagulációs kaszkád is elindul, létrejön a hemosztatikus dugó amely később lebomlik miközben az érfal integritása helyreáll. A második cél megköveteli ezen összefonódó folyamatok térbeli és időbeli koordinációját, legfőképpen csak a megfelelő hatás aktiválhatja a rendszert. A sérült vérerek által kiszolgált szövetek érdekében a hemosztatikus dugó kiterjedését és élettartamát keretek közé kell szorítani. Azt az összetett rendszert, amely mindezen feladatokat ellátja hemosztázisnak nevezzük.

A thrombocyták adhéziója a sérült érfalhoz a hemosztázis egyik legkorábbi lépése. Az endothélium károsodása után azonnal thrombocyták gyűlnek a felszínre kerülő szubendotheliális struktúrákra. A vénákban vagy nagyobb artériákban, ahol az áramlási nyíróerők alacsonyabbak a thrombocyták GP VI és GP IIb/IIIa receptoraik segítségével közvetlenül kötődnek a szubendotheliális kollagénhez. Nagyobb fali nyíróerők esetén azonban, különösen arteriolákban és beszűkült ereken, ezek a receptorok önmagukban nem tudják biztosítani a thrombocyták adhézióját. Ezen megfigyelés alapján egy további mechanizmus feltételezhető, amely ilyen körülmények között lelassítja a mozgó thrombocytákat és ellenáll a nyíróerőknek amíg

a thrombocyták kialakítják stabil kötéseiket a sérült érfelülettel. Ezt a folyamatot valósidejű mikroszkópos rendszerek segítségével láthatóvá tették, és kimutatták, hogy a thrombocyták gördülnek a felszínre került szubendoteliumon mielőtt megállnak és demonstrálták, hogy ez a jelenség függ a von Willebrand faktor (VWF) és thrombocyta receptora (GP Ib) jelenlététől. Ennek a kölcsönhatásnak a jelentőségét igazolja, hogy a von Willebrand betegség (VWB) 3-as típusában (VWF teljes hiánya) és a Bernard-Soulier szindróma (GP Ib hiánya) jellegzetes tünetei (pl.: nyálkahártya vérzések) olyan ereket érintenek amelyekben az áramlási nyíróerők nagyok.

A VWF, amely a plazmában, thrombocytákban és az endothel sejtekben található, hídként köti össze a szubendotheliális kollagént és a thrombocytákat. A VWF-GP Ib kölcsönhatás rendelkezik néhány figyelemreméltó tulajdonsággal, amely különösen alkalmassá teszi feladatának ellátására. A VWF nagy, több azonos alegységből felépülő oligomer (akár 40 alegység – 20 MDa), mindegyik alegysége rendelkezik GP Ib és VWF kötőhelyekkel, így a kötőhelyek helyi sűrűsége magas. A GP Ib-VWF kölcsönhatás asszociációs és disszociációs sebessége magas valamint a ráható erők hatására kétfázisú, amely lehetővé teszi a thrombocyták görgését, kitapadását vagy leválását az áramlási erők hatására. Érdekes módon eltérően a szelektintektől és receptoraiktól, amelyek a fehérvérsejtek görgését közvetítik, mind a VWF mind receptora egyidőben jelen van a véráramban. Normál körülmények között azonban a natív GP Ib affinitása rendkívül alacsony a VWF iránt, csak kórosan magas nyíróerők jelenlétében vagy a VWF immobilizációja esetén lépnek kölcsönhatába.

Ez a megfigyelés egy áramlási sebességtől függő szabályozó mechanizmust feltételez. A jelenlegi elméletek a VWF különböző léptékű konformáció változására (amely a kötőhely affinitását vagy hozzáférhetőségét befolyásolja) és / vagy a multimer méret szabályozására (aviditás változtatása) fektetik a hangsúlyt:

- A nyíróerő hatására olyan konformáció változás jöhet létre a GP Ib α kötőhelyben vagy annak közelében, amely megnöveli affinitását GP Ib α iránt. Majdnem az összes leírt funkció nyerékes mutáció (VWB 2B altípus) miszszensz mutáció amely az A1 doménben található, abban

a doménben amely az egyetlen ismert GP Ib α kötőhelyet tartalmazza a VWF-ban. Ezekről a mutációkról feltételezik, hogy destabilizálják az A1 domén bázisát és ezáltal utánozzák a nyíróerők hatására kialakuló szerkezeti változásokat. Molekula modellezési módszerekkel azt is demonstrálták, hogy a VWF-GP Ib α kötésre ható erő hatására a GP Ib α és az A1 domén egymáshoz viszonyított helyzete olyan módon változik meg, amely új sóhíd és így erősebb kölcsönhatás kialakulásához vezet.

- A nyíróerő az előbbinél nagyobb léptékű konformáció változást is okozhat, amely nem érinti közvetlenül a GP Ib α kötőhelyet. Feltételezhető, hogy más domének is részt vesznek a VWF - GP Ib α kölcsönhatás szabályozásában, mivel önmagában az A1 domén spontán kötődik a GP Ib α -hoz. Ezzel összhangban az 1C1E7 elnevezésű antitestről leírták, hogy az VWF N-terminális részéhez (D'D3 régió) kapcsolódik, mégis 2 típusú VWB szerű változásokat idéz elő. Kiszögű neutronszerű tanulmányok is helyi, domén szintű átrendeződéseket valószínűsítene a nyíróerők hatására.
- Oldatban a VWF „feltekeredett” konformációban van, ami miatt a GP Ib kötőhelyek jelentős része nem hozzáférhető. Feltételezik, hogy a nyíróerők és / vagy az immobilizáció hatására a VWF „kitekerekedik” és ezáltal a kötőhelyek hozzáférhetővé válnak. Néhány tanulmány szerint ehhez az áramlásban a thrombocyta által kifejtett húzóerőre is szükség van.
- A VWF multimerek mérete ugyancsak befolyásolhatja a VWF - GP Ib kölcsönhatást. Általánosan elfogadott, hogy a nagyobb multimerek jelenlétében a thrombocyta adhézio hatékonyabb, amelyet a nagyobb multimerek több kötőhelyéből adódó nagyobb aviditásának tulajdonítanak. Jelenleg nem ismert milyen módon szabályozott a multimer eloszlás a szintézis során, illetve az sem, hogy létezik-e ilyen szabályozás. Mindenesetre az ADAMTS13 elnevezésű metalloproteáz specifikusan képes hasítani a kiválasztott, nyíróerőknek kitett ultra-nagy VWF (ULVWF) molekulákat. Ez alapján feltételezhető, hogy az

VWF multimer méretének csökkentésével az ADAMTS13 korlátozza a nagy nyíróerejű áramlás mellett bekövetkező thrombocyta adhéziót.

Intenzív kutató munka folyik jelenleg is ezen a területen, mivel az elégtelen szabályozás vérzéses és thrombotikus állapotokat is előidézhet, továbbá azért is, mivel potenciális célpontja a nagy nyíróerejű áramlást célzó (pl.: beszűkült artériák és sztentek) thrombocytagátló gyógyszereknek. A végleges válasz még várat magára, talán a jelenlegi elméletek egy kombinációja fogja megmagyarázni az eddig összegyűlt kísérletes adatokat.

Célkitűzés

Célunk az interdomén kölcsönhatások jelentőségének tanulmányozása a VWF GP Ib iránti affinitásának szabályozásában, és új módszerek kifejlesztése, amelyek további kutatásokat tesznek lehetővé ezen a területen.

- A D'D3 régió szerepének elemzése a VWF - GP Ib kölcsönhatás szabályozásában:
 - Az 1C1E7 elnevezésű monoklonális antitest (moAb) hatásmechanizmusának felderítése. Ez az antitest nem a GP Ib kötőhelyet tartalmazó doménben (A1), hanem a D'D3 régióban rendelkezik kötőhellyel, mégis elősegíti a VWF . GP Ib kölcsönhatást
 - A VWF különböző doménjeihez kötődő monoklonális antitestek közötti keresztgátlásos kísérletek
 - Rekombináns deléciós VWF mutánsokkal folytatott kísérletek
- Módszerfejlesztés:
 - A VWF multimer eloszlás elemzésére szolgáló módszerek tökéletesítése és kiterjesztése, ideértve az elektroforézis és adatelemzési technikákat is.
 - Egy olyan rendszer létrehozása, amelyben a thrombocytákat hasonló méretű, aktív GP Ib α -t hordozó részecskékkel helyettesítjük. Ezzel lehetővé válna a thrombocyták által kifejtett húzóerők tanulmányozása a VWF konformációjára.

Anyagok és Módszerek

Domének közötti kölcsönhatások

1C1E7 egyláncú variábilis fragmentum létrehozása és termeltetése

1C1E7 termelő hibridóma sejtekből teljes sejt RNS-t izoláltunk, amelyet oligo(dT)₂₀ primerek segítségével reverz transzkriptáltunk. A nehéz és a könnyű lánc variábilis régióit (V_H illetve V_L) az 1C1E7 N-terminális aminosav szekvenciája alapján tervezett degenerált szensz és a vázszekvenciára specifikus antiszensz primerek segítségével amplifikáltuk. Az egyláncú variábilis fragmentum (scFv) kódoló szekvenciáját ($V_H-(G_4S)_3-V_L$) SOE-PCR (splicing by overlap extension by PCR - splicing átfedés kiegészítése által PCR-rel) technikával hoztuk létre a V_H és V_L láncok megfelelő kiegészítése után. Az 1C1E7 scfv His-tag fúziós proteint *Escherichia coli* sejtekben termeltettük.

Thrombocyta agglutináció

Az 1C1E7 scFv agglutinációs kísérletekhez citráttal antikoagulált vérből preparáltunk thrombocyta dús plazmát. A thrombocyta dús plazmát 3 percig inkubáltuk 1C1E7 scFv-vel vagy IgG-vel majd az agglutinációt risztocetin hozzáadásával indítottuk el. A VWF deléciós mutánsokkal végzett kísérletekhez mosott thrombocytaakat használtunk. Ehhez 10 µg/ml végkoncentrációban $\Delta D'D3$ (nem tartalmazza $D'D3$ doméneket) $\pm D'D3$ vagy plus $D'D3$ ($D'D3$ doméneket tartalmazó kontroll) fragmentet adtunk és 3 perc inkubáció után az agglutinációt risztocetin hozzáadásával indítottuk el.

Keresztgátlási kísérletek

A kísérletekhez a 418 (kötőhely a D'D3 régióban) 701, 724 (kötőhely az A1 doménben) és 82D6A3 (kötőhely az A3 doménben) monoklonális antitesteket használtuk.

„Immobilizált” VWF: Mikrotiter lemezeket VWF-ral fedtünk majd a lyukakban egy biotinált és egy második nem biotinált antitestet inkubáltunk. A kikötődött biotinált antitest mennyiségét peroxidáz jelölt streptavidinnal detektáltuk.

„Natív” VWF: Mikrotiter lemezeket fedtünk a fenti antitestek egyikevel. Biotinált VWF-t egy második antitesttel preinkubáltuk majd ezt az oldatot a fedett lyukakba mértük. További 30 perc 37 °C-os inkubáció után a kikötődött biotinált VWF mennyiségét a fent leírt módon detektáltuk.

VWF multimer eloszlás

SDS agaróz gélelektroforézis és immunblot

A VWF oligomereket módosított Laemmli vagy Tris-borát diszkontinuus puffer rendszer segítségével választottuk szét. Először az alacsony felbontású (0,8%-os) agaróz szeparáló géleket (12,5 cm×10 cm×1,2 mm) öntöttük ki üveg lemezre, majd az első két és fél centiméteres sáv helyére tömörítő gél-t öntöttünk. A denaturált mintákat konstans áramerősség mellett 6 órán át (20 mA / 10 cm gél) vagy egész estén át (6 mA / 10 cm gél) 18°C-ra hűtött lapon futtatuk. A fehérjéket nedves elektro-blot technikával PVDF membránra juttattuk. A transzfer elősegítéséhez – Bowen és Bowley által közölt módon – a VWF oligomereket 1 mM β -mercaptoethanol segítségével részlegesen lebontottuk (merkaptolízis). A VWF immunfestéssel, HRP-vel jelölt anti-humán VWF antitest és DAB szubsztrát segítségével tettük láthatóvá.

Mennyiségi multimer analízis

A membránokat kalibrált denzitométerrel digitalizáltuk, az így kapott reflektív denzitás (RD) és relatív mobilitás (RF) adatokat saját fejlesztésű programunkkal dolgoztuk fel. Először ábrázoltuk a reflektív denzitást a relatív mobilitás függvényében, majd ezt a görbét simítottuk és a VWF csúcsokat azonosítottuk. A mennyiségi elemzést két módszerrel végeztük:

Az első módszer (M_{10}) esetében a nagy multimerek – amelyeket az ikozamernél (tizedik sáv) nagyobb oligomerekként definiáltunk – relatív mennyiségét számítottuk ki.

A második – általunk fejlesztett – módszer (M_{MW}) esetében a multimerizáltság fokát jellemeztük. Ezt a VWF fehérje méret szerint felső 25 százalékanak alsó határához tartozó molekulasúly segítségével adtuk meg. A molekulasúlyt a VWF csúcsok molekulasúlya és RF adatai alapján határoztuk meg. A 25 százalékos határt kevés nagy multimert tartalmazó, normál és ULVWF-t tartalmazó minták csoportjainak különböző M_{MW} mellett elvégzett összehasonlítása alapján választottuk.

Az általunk fejlesztett szoftver használatával az adatfeldolgozásnak egyik számítási mód esetén sem volt manuális lépése.

GP Ib α mikrogyöngyök

A 24B3 egy olyan monoklonális antitest amely képes a glycalicint plazmából funkcionálisan aktív konformációjában megkötni (a glycalicin a GP Ib α 135 kDa méretű, nagymértékben glikozilált, hidrofil proteolitikus fragmense). A 24B3-at a gyártó utasításait követve kovalensen 3 μ m átmérőjű karboxilát polisztirén mikrogyöngyökhöz kapcsoltuk. Glycalicin forrásként a vérellátó szolgálattól szerzett lejárt humán thrombocytaikat használtunk, a 24B3 fedett gyöngyöket egy estén át a mosott majd szonikált thrombocytaikat szűrletével inkubáltuk. Meghatároztuk a mikrogyöngyök felszínéhez kötött 24B3 és glycalicin molekulák számát. A gyöngyöket két órán át tisztított VWF-ral és botrocetinnel inkubáltuk, 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd a kötődött VWF-t nyúl anti-humán VWF

poliklonális antitesttel és ezt követően sertés anti-nyúl IgG-FITC jelöltük. A VWF mennyiségét flowcytométer segítségével detektáltuk.

Eredmények

Domének közötti kölcsönhatások

Thrombocyta agglutinációs kísérletek

Korábbi tanulmányok alapján feltételezhető, hogy a GP Ib α VWF-A1 kölcsönhatást más domének is befolyásolják. Az 1C1E7 monoklonális antitest a D'D3 régióhoz kötődik, de így is képes a elősegíteni a GP Ib α VWF-hoz való kötődését. Ez a D'D3 funkcionális szerepére utal, amelyet mi az alábbi rekombináns VWF deléciós mutánsokkal tanulmányoztunk: Δ D'D3 (hiányzik a D'D3 régió, de tartalmazza az A1 domén N-terminális szélső régióját), plusD'D3 (kontroll, amelyből hiányzik a D4-CK régió, viszont tartalmazza a D'D3 régiót és az A doméneket is) és D'D3 (csak a D'D3 doméneket tartalmazza). Alacsonyabb thrombocyta szám mellett a Δ D'D3 jelenlétében – a plusDD3-mal ellentétben – spontán thrombocyta agglutináció volt megfigyelhető. A mosott thrombocytákkal végzett risztocetin indukálta thrombocyta agglutináció (RIPA) risztocetin küszöbkonzentrációja alacsonyabb volt a Δ D'D3 esetében mint a plusD'D3 esetén, amely jelezte, hogy a D'D3 régió gátolja a VWF GP Ib α kölcsönhatást. Ezt megerősítette az is, hogy a D'D3 gátolta a risztocetin indukálta thrombocyta agglutinációt Δ D'D3 jelenlétében, míg plusD'D3 esetén nem volt ilyen hatása. Utóbbi eredmény azt demonstrálja, hogy a D'D3 régió deléciójának a hatása a Δ D'D3 mutáns esetén utólag hozzáadott D'D3-mal visszafordítható.

Keresztgátlási kísérletek

A D'D3 és az A1 domén harmadlagos szerkezetben megfigyelhető távolságát vizsgáltuk oldatban és felszínhez kötött VWF esetén is. Ehhez a 418 moAb (kötőhely a D'D3 régióban) kötődésének 701 és 724 moAb (kötőhely az A1 doménben) általi gátolhatóságát mértük. Negatív kontrollként a 82D6A3

moAb (kötőhely az A3 doménben) használtuk. Két különböző ELISA-szerű elrendezést állítottunk össze: az elsőben biotinált 418 (b-418) immobilizált VWF-hoz kötődésének, míg a másodikban biotinált VWF (b-VWF) immobilizált 418 antitesthez való kötődésének gátolhatóságát vizsgáltuk második jelületlen antitesttel. Immobilizált VWF esetén nem tudtunk gátlást kimutatni, kivéve a pozitív kontrollként használt jelületlen 418-at, annak ellenére, hogy mindegyik antitest képes volt a VWF-hoz kötődni. Ezzel ellentétben a 701 és a 724 moAb is gátolta a 418 moAb kötődését az oldatban lévő b-VWF-hoz, míg a 82D6A3-nak ez esetben sem volt hatása.

1C1E7 egyláncú variábilis fragmentum létrehozása és termeltetése

Az 1C1E7 scFv-t, amely egy His-taget is tartalmazott, *E. coli* törzsben termeltettük. Az 1C1E7 scFv az 1C1E7 IgG-hez hasonlóan fokozta a riztocetin indukálta thrombocytá agglutinációt, bizonyítva, hogy a megfelelő fragmentet állítottuk elő. Az 1C1E7 nehéz lánc komplementaritást meghatározó régiójában (CDR) 3 szekvenciája nagymértékű hasonlóságot mutatott a VWF-A1 domén szélső régiójával.

VWF multimer eloszlás

A pufferek összehasonlítása

Normál mintákban a Tris-borát pufferekkel 18–22 különálló sávot tudtunk elkülöníteni. Laemmli pufferekkel kevesebb sávot detektáltunk és a futási front közelében általában egy torz sáv is megfigyelhető volt. A gélek feloldóképességét és a torz sáv tartalmát 2D elektroforézissel vizsgáltuk, amelyben egy mintát az első irányban Laemmli gélben választottunk szét, majd a második irányban Tris-borát gélben futtattunk. A nagy multimerek feloldása a Tris-borát gélben bizonyult jobbnak, és a Tris-borát gélben a Laemmli pufferekkel megfigyelhető torz sáv is több sávra vált szét.

Az M_{MW} számítás optimalizálása

Az optimalizálás eredményeképpen az M_{MW} -t a VWF fehérje méret szerint felső 25 százaléknak alsó határához tartozó molekulasúlyként definiáltuk. A 25%-os küszöböt az adatok egy részhalmazának (7 thrombocyta lizátum, 11 normál és 8 nagy multimer hiányos minta) különböző küszöbértékek (1-80%) melletti vizsgálata után állapítottuk meg. A módszer érzékenységét a fenti csoportok elválasztására t-statisztikával vizsgáltuk. Alacsonyabb küszöb mellett a thrombocyta lizátum és a normál csoport elkülönítése javult, míg a normál és a nagy multimer hiányos minták elkülönítése magasabb küszöb használata mellett volt jobb. A 25%-os küszöb egyforma távolságra helyezkedik el a legjobb normál vs. thrombocyta lizátum (10%) és a legjobb normál vs. VWF hiányos (40%) elkülönítés küszöbértékétől. Ennél a küszöbértéknél a csoportok között a különbség statisztikailag erősen szignifikáns (átlag $\pm$ SD 10.42 $\pm$ 0.78, 6.27 $\pm$ 0.68, 2.13 $\pm$ 1.12 MDa a thrombocyta lizátum, a normál és a nagy multimer hiányos minták esetén, $p < 0.01$)

Módszerjellemzők

A módszerek ismételhetősége (egy kontroll minta 20 különböző napon elvégzett mérésének variációs koefficiensével jellemezve) az M_{MW} és M_{10} esetében 7.8% illetve 15.9% volt. 35 egészséges egyént vizsgálva az M_{MW} és M_{10} esetén az átlag és a szórás 6.1 $\pm$ 0.72 illetve 33.5 $\pm$ 7.9 volt. A módszerek immunfestés erősségével kapcsolatos túrésát egy minta sorozathígításának (0,25 $\times$ – 2,5 $\times$ standard hígítás) kiértékelésével végeztük el. A különböző hígítások 0,061 és 0,319 közötti átlagos RD-t eredményeztek a gél VWF-t tartalmazó részén, ebben a tartományban az M_{MW} és M_{10} eredményeket ez nem befolyásolta.

Az M_{MW} és az M_{10} összefüggése

Meghatároztuk az M_{MW} és M_{10} thrombocyta lizátum, kontroll minták, ADAMTS13 által lebontott VWF és 2-es típusú von Willebrand betegek esetén. A thrombocytákban található VWF védett a plazma proteázokkal szemben és

ezért a szokásosnál nagyobb multimereket tartalmaz, míg a 2-es típusú VWB-ben jellemzően csökkent a nagy multimerek mennyisége. Normál minták és thrombocyta lizátum esetén jó összefüggést találtunk a multimerizáció mértéke és a nagy multimerek mennyisége között ($r^2=0.98$), ugyanakkor a regressziós egyenesek meredeksége különböző volt ($p<0.001$). A thrombocyta lizátumban található VWF jellemzően nagyobb multimereket tartalmazott, mint az azonos mennyiségű nagy multimert tartalmazó normál minta.

Az M_{MW} és a kollagén kötő aktivitás illetve a risztocetin kofaktor vizsgálat összefüggése

Normál és 2-es típusú VWB minták M_{MW} és a VWF funkcionális teszt (kollagén kötő aktivitás és risztocetin kofaktor vizsgálat) eredményeit hasonlítottuk össze. A funkcionális vizsgálatok és az antigén szint (aktivitás / antigén) hányadosok varianciájáért legalább részben a multimerizáció felelt ($r^2=0.42$ és 0.43 a VWF:RCo illetve VWF:CB esetén). Négy beteg esetén (16%) az M_{MW} normál a funkcionális tesztek kóros eredményt mutattak (lehetséges 2M altípus). Ugyanakkor VWF:CB esetén három (12%) illetve VWF:RCo esetén öt (20%) kettes típusú beteg aktivitás / antigén hányadosa normál volt kóros elektroforézis eredmény mellett. Ezek közül néhány minta antigén szintje alacsony volt (egy VWF:RCo és három VWF:CB esetében), ezekben az esetekben a funkcionális tesztek reprodukálhatósága jellemzően rosszabb. Továbbá öt normál minta (19%) VWF:RCo / VWF:Ag hányadosa kóros volt, míg ezen minták VWF:CB / VWF:Ag illetve M_{MW} eredményei normálisak voltak.

GP Ib α mikrogyöngyök

A 24B3 fedés követően a gyöngyök képessé váltak glyocalicin és azt követően anti-GP Ib α antitestek kötésére. A felszínhez kapcsolt 24B3 antitesteknek (~64 000) csak egy részéhez kötődött glyocalicin (~3 140). A kikötődött glyocalicin molekulák jelentősen alacsonyabb száma arra utalhat, hogy az

immobilizált 24B3 antitestek egy része nincs kötőképes konformációban. Botrocetin jelenlétében VWF-t adtunk glyocalicinnel előzetesen inkubált gyöngyökhöz, majd egy két lépéses jelölés után megmértük a gyöngyökhöz kötődött VWF mennyiségét. A VWF detektálható volt a gyöngyökön, ezzel demonstráltuk, hogy a 24B3 gyöngyökhöz kötött glyocalicin képes a VWF kötésére. A mérés specifitását a glyocalicin elhagyásával bizonyítottuk, amely a VWF jel megszűnéséhez vezetett.

Diszkusszió

A thrombocyták elsődleges feladatát egyszerűen összefoglalhatjuk: „A thrombocyták lyukakat tömnek be az erekben”. Kicsit részletesebben azt mondhatjuk, hogy a thrombocyták ezen folyamat első lépésében a keringés artériás oldalán azonosítják az erek borításának károsodását és a felszínre kerülő szubendotheliumhoz kötődnek. A kapillárisokban a thrombocyták átlagosan 0,5 mm/s sebességgel haladnak, figyelembe véve 2 μ m-es átmérőjüket, ez azt jelenti, hogy az érfal egy adott pontja felett hozzávetőleg 4 ms-ot töltenek. Nagyságrendileg hasonló időtartam állhat a thrombocyták rendelkezésére a sérült érszegmens felismerésére és az adhézióra. Ilyen áramlási körülmények között a megoldás egy transzlokációs lépés megjelenése a kezdeti kontaktus és a stabil adhézió között. Ebben a szakaszban a VWF mintegy hídként köti össze a gyorsan mozgó thrombocytákat és a mozdulatlan érfalat és így lehetővé teszi, hogy kölcsönhatásba léphessenek egymással. Érdekes módon azonban, a VWF és a thrombocyták egyidőben jelen vannak a keringésben, mégis kölcsönhatásuk csak olyan magas nyíróerejű áramlás mellett figyelhető meg, amely normálisan nem fordul elő. *In vitro*, a VWF és a GPIb kötődése modulátorokkal is előidézhető (pl.: risztocetin vagy botrocetin), de ilyen körülmények között a kölcsönhatás viszonylag mesterséges. Ennek ellenére kimutatták, hogy a risztocetin függő kölcsönhatás eléggé jól korrelál a fiziológiás áramlás függő állapottal. *In vivo* a kötést a VWF immobilizációja és az áramlási nyíróerők hatása idézi elő. Ez alapján feltételezhető, hogy a VWF GPIb iránti affinitását a VWF GPIb kötőhelyével kapcsolatos valamilyen konformációváltozása szabályozza, amely nyíróerő és immobilizáció hatására jön létre. A domének közötti kölcsönhatások lehetséges szerepét ebben a folyamatban az 1C1E7 elnevezésű moAb hatásmechanizmusának felderítésén keresztül tanulmányoztuk. Ez az anti-test a VWF N-terminális D'D3 doménjeiben kötődik, mégis képes a VWF GPIb iránti affinitását fokozni, annak ellenére hogy kötőhelye távol esik a GPIb kötőhelytől. Ez az 1C1E7 kötőhelyének modulátor hatására utal,

ezért ezen régió (D'D3) VWF GP Ib interakcióban betöltött funkcionális szerepének felderítését tűztük ki célul. A D'D3 régió deléciója GP Ib iránti magasabb affinitást eredményezett, amelyet a Δ D'D3 (dimer, hiányzik a D'D3 régió) plusD'D3-hoz (dimer, hiányzik a C-terminális régió, de a D'D3 domének épek) viszonyított alacsonyabb riztocetin küszöbértéke jelzett a RIPA tesztben. Ezen felül, alacsonyabb thrombocyta koncentrációknál Δ D'D3 jelenlétében – a plusD'D3-mal ellentétben – spontán thrombocyta agglutináció volt megfigyelhető. Együttesen ezek az adatok arra utalnak, hogy a D'D3 régió – leginkább az A1 domén takarásával – gátló szerepet tölthet be. Ezek az adatok megerősítik és kiegészítik azokat a korábbi tanulmányokat, amelyek leírják, hogy az A1 doménben található GP Ib kötőhelyet feltételezhetően az A1 domén N-terminális szélső régiói és a D'D3 domén C-terminális régiója takarja. Annak a feltevésnek a további bizonyításához, miszerint a D'D3 és A1 domének oldatban kölcsönhatásba lépnek, de immobilizálás / nyíróerők hatására kölcsönhatásuk megszűnik, az érintett doménekhez kötődő antitestek keresztgátlását vizsgáltuk, oldatban illetve immobilizáció után. Az anti-D'D3 418 moAb kötődését oldatban gátolta az anti-A1 701 és 724 moAb, azonban immobilizáció után ez a hatás megszűnt, amely bizonyítja, hogy a A1 és D'D3 domének távolsága megváltozik a VWF immobilizációja során. Végül, szembetűnő hasonlóságot fedeztünk fel az 1C1E7 nehézlánc CDR 3 és a VWF A1 domén N-terminális széli szekvenciája között. Ismert, hogy ez az N-terminális széli szekvencia fontos modulátora a GP Ib és az A1 kapcsolódásának, a régióban történő változtatások vagy deléciók fokozzák a VWF GP Ib iránti affinitását. Véleményünk szerint az A1 doménen belül ez az a régió, amely a D'D3 régióval kölcsönhatásba lép, és lehetséges, hogy az 1C1E7 antitest az A1 N-terminális szélső régiójával a D'D3 kötésért versenyezve leválasztja a D'D3 régiót az A1 doménről. Ezek az eredmények a VWF N-terminális régiójának GP Ib kötést gátló szerepét demonstrálják. Ezek alapján a megfigyelések alapján a következő hipotézis állítható fel: alapállapotban az A1 domén és a D'D3 régió szorosan kapcsolódik, feltételezhetően az A1 domén N-terminális szélső régióján keresztül. Ez a kölcsönhatás korlátozza az A1 domén hozzáférhetőségét. A VWF immobilizációja során ez a kapcsolat konformáció változás

hatására megszűnik, amely lehetővé teszi a thrombocyták kitapadását GP Ib receptoraikon keresztül.

Az oldatban lévő VWF feltehetőleg feltekeredett konformációjú, ami miatt a GP Ib kötőhelyek jelentős hányada nem hozzáférhető. Feltételezhető, hogy ez a hatás nagymértékben függ a VWF multimer méretétől, ahogy a molekula aviditása is, mivel a nagyobb multimerek több kötőhelyet tartalmaznak. Ezzel összhangban szoros kapcsolat figyelhető meg a nagy multimerek jelenléte és a VWF hemosztatikus funkciója között. Az endothel sejtek által kiválasztott VWF mennyisége és feltehetően multimerizációja – csakúgy mint a VWF oligomereket bontó enzim (ADAMTS13) plazma koncentrációja – jelentős interindividuális változatosságot mutat és kóros körülmények között is változik. Ennek következtében várhatóan a VWF hemosztatikus aktivitását nagy mértékben meghatározó nagy VWF oligomerek mennyisége és nagysága is különbözik. A nagy multimerek mennyiségének kvantitatív mérésére jelenleg elfogadott módszer az ikozamernél (10-es sáv) nagyobb VWF fehérje relatív mennyiségének kiszámítása, bár más megközelítések is léteznek. Innen tekintve jelentős probléma az, hogy a Laemmli pufferekkel a kis VWF oligomerek elválasztása nem megfelelő és emiatt a VWF sávok nem azonosíthatóak megbízhatóan. Továbbá az is, hogy a hagyományos technikákkal a nagy oligomerek blottolása sem megbízható. Megoldásként több puffer rendszer kipróbálása után úgy találtuk, hogy a Tris-borát pufferek használata és a merkaptolízissal segített blottolás jobban megfelel a mennyiségi értékelés követelményeinek. A nagy multimerek méretének jellemzése több kérdést is felvet. A nagy multimerek méretének nyilvánvaló jellemzője a legnagyobb multimer mérete lehetne, ugyanakkor ennek a mennyisége olyan csekély, hogy denzitometriásan elkülöníthetetlen a VWF sávok fölötti háttértől. Továbbá ennek a multimernek a mérete nagyságrendileg 20 MDa körüli, amelyet a használt agaróz gélek nem oldanak fel, tehát, ha detektálása lehetséges is volna, molekulaméretét akkor sem tudnánk megállapítani. Ezek a nehézségek elkerülhetőek, ha nem csupán a legnagyobb oligomert, hanem a legnagyobb oligomerek egy részét célozzuk. Másrészt viszont, túl nagy hányad kijelölése csökkentheti a szelektivitást. Normál minták nagy multimer hiányos (2 típusú VWB)

és a szokásosnál nagyobb multimereket tartalmazó (thrombocyta lizátum) mintákhoz hasonlítása alapján úgy találtuk, hogy a felső 25% használata esetén a módszer szelektív és a háttér által okozott interferencia is elfogadható mértékű. (Az utóbbi probléma a 2 típusú VWB esetén jelentősebb, mivel a VWF sávok távolabb esnek a mintafelviteli helyektől.) A thrombocyta lizátum vizsgálata igazolta, hogy a szokásosnál nagyobb multimerek még akkor is kimutathatóak, ha a nagy multimerek aránya nem nagyobb a normál mintákban mérhetőnél. Az M_{MW} számítás további értékeléséhez az M_{MW} és a VWF GP Ib (VWF:RCo) illetve kollagén kötő (VWF:CB) aktivitásának összefüggését vizsgáltuk normál és 2-es típusú VWB mintákon. A két funkcionális teszt és az M_{MW} között mérsékelten erős ($r^2 \sim 0.4$) összefüggést találtunk, a VWF:CB nagyobb érzékenysége a nagy multimerek hiányára nem volt egyértelmű. Érdekes megemlíteni, hogy alacsony antigén koncentráció mellett a funkcionális tesztek rosszabb reprodukálhatósága normál aktivitás / antigén hányadost eredményezhet kóros elektroforézis eredmény mellett is. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a most vázolt új technikák pontosak és reprodukálhatóak és alapjául szolgálhatnak a későbbi VWF multimer eloszlás jelentőségét vizsgáló tanulmányoknak.

A jelenlegi hipotézisek szerint az áramlási nyíróerők és / vagy az immobilizáció hatására a VWF kitekerekedik és kötőhelyei hozzáférhetővé válnak. Ugyanakkor ezen feltevés kísérletes bizonyítása nehéz, feltehetően mivel a thrombocyták VWF-hoz kötődésére és az általuk kifejtett húzóerőre is szükség lehet a kitekerekedéshez. A thrombocyták a VWF-hoz vagy a szubendotheliumhoz kötődés során aktiválódnak, amely a fent vázolt hatás tanulmányozását megnehezíti. A probléma megoldásához a thrombocyták kiváltását terveztük hasonló méretű funkcionálisan aktív GP Ib α -t hordozó részecskékkel. Ehhez 3 μ m átmérőjű karboxilát polisztirol gyöngyökhöz a 24B3 elnevezésű monoklonális antitestet kovalensen kapcsoltunk, amely ismertén képes a rekombináns GP Ib α -t valamint a glycalicint (a GP Ib plazmában található extracelluláris proteolitikus fragmentje) aktív konformációjukban kikötni. Bemutattuk, hogy ezek a gyöngyök így képessé váltak a glycalicint thrombocyta lizátumból kikötni, és ez után botrocetin jelenlétében VWF-t kötni. Ez bizonyítja, hogy ezek a gyöngyök funkcionálisan

aktív GP Ib α -t hordoznak, és későbbiekben az áramlási kísérletek értékes eszközeivé válhatnak.

Új eredmények összefoglalása

- Kimutattuk, hogy a VWF D'D3 régiója gátolja a GP Ib α és VWF-A1 kölcsönhatását:
 - Keresztgátlós kísérletek a D'D3 régió és az A1 domén közeli konformációját jelezték oldatban, azonban immobilizáció után már nem
 - A risztocetin indukálta thrombocyta agglutinációs vizsgálatok a D'D3 régió gátló hatását mutatták ki
 - Szekvencia hasonlóságot találtunk az 1C1E7 nehéz lánc CDR3 és az A1 domén között, ami arra utal, hogy azonos helyre kötődhetnek a D'D3 régióban. Ez magyarázza hogyan fokozza az 1C1E7 a VWF affinitását GP Ib iránt: az 1C1E7 megszakítja az A1 domén és a D'D3 régió kapcsolatát és megszünteti az ebből a kölcsönhatásából adódó takarást.
- Új elektroforézis és kiértékelő technikákat dolgoztunk ki a VWF multimer eloszlás mennyiségi jellemzésére. Demonstráltuk, hogy ezek a módszerek pontosak és reprodukálhatóak:
 - Megvizsgáltuk módszerünk használhatóságát és érzékenységét a igen nagy multimereket és a nagy multimereket nem tartalmazó minták esetén.
 - A multimerizáció mértékét kvantitatív módon meghatározó módszerünk eredményeit összehasonlítottuk a funkcionális tesztek eredményeivel és statisztikai módszerekkel jól értékelhető összefüggést találtunk.
- Kifejlesztettünk egy módszert, amelynek segítségével lehetőség nyílik a thrombocyták által VWF-ra kifejtett húzóerők tanulmányozására.

Glycocalicint kötöttünk polisztirén mikrogöngyökhöz és kimutattuk, hogy ezek a göngyök képesek VWF kötésére.

Saját közlemények

Az értekezés elkészítéséhez felhasznált közlemények:

1. **Udvardy, M. L.**, Szekeres-Csiki, K., and Hársfalvi, J. (2009) Novel evaluation method for densitometric curves of von Willebrand Factor multimers and a new parameter (M_{MW}) to describe the degree of multimerisation. *Thromb Haemost* 102, 412–417.

Impakt faktor: 3.803 (2008)

2. Ulrichs, H.^{*}, **Udvardy, M. L.^{*}**, Lenting, P. J., Pareyn, I., Vandeputte, N., Vanhoorelbeke, K., and Deckmyn, H. (2006) Shielding of the A1 domain by the D'D3 domains of von Willebrand factor modulates its interaction with platelet glycoprotein Ib-IX-V. *J Biol Chem* 281, 4699–4707.

^{*}Both authors contributed equally to this work

Impakt faktor: 5.808

Az értekezés elkészítéséhez felhasznált közlemények összesített impakt faktora: 9.611

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények:

1. Szarvas, M., Oparaugo, P., **Udvardy, M. L.**, Toth J., Szanto T., Daroczi L., Vereb G., and Hársfalvi J. (2006) Differential platelet deposition onto collagen in cone-and-plate and parallel plate flow chambers. *Platelets* 17, 185-90.

Impakt faktor: 1.679

2. Toth, J., Kappelmayer, J., **Udvardy, M. L.**, Szanto, T., Szarvas, M., Rejto, L., Soltesz, P., Udvardy, M., and Hársfalvi, J. (2009) Increased

platelet glycoprotein Ib receptor number, enhanced platelet adhesion and severe cerebral ischaemia in a patient with polycythaemia vera. *Platelets* 20, 282–287.

Impakt faktor: 2.271 (2008)

3. Molvarec, A., Rigó, J., Bőze, T., Derzsy, Z., Cervenak, L., Makó, V., Gombos, T., **Udvardy, M. L.**, Hársfalvi, J., and Prohászka, Z. (2009) Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia. *Thromb Haemost* 101, 305–311.

Impakt faktor: 3.803 (2008)

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 7.753

Egyéb közlemények

1. Papp, M., Altorjay, I., Norman, G. L., Shums, Z., Palatka, K., Vitalis, Z., Foldi, I., Lakos, G., Tumpek, J., **Udvardy, M. L.**, Hársfalvi, J., Fischer, S., Lakatos, L., Kovacs, A., Bene, L., Molnar, T., Tulassay, Z., Miheller, P., Veres, G., Papp, J., Group, H. I. S. & Lakatos, P. L. (2007) Seroreactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, noninflammatory disease behavior and NOD2/CARD15 genotype, but not with risk for surgery in a Hungarian cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 13, 984-992.

Impakt faktor: 4,705