

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

- **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Λεωνίδας Δημήτριος (Επιβλέπων Καθηγητής)**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Κοντού Μαρία**

Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Σταθόπουλος Κωνσταντίνος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

- **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Κοντού Μαρία**

Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Λεωνίδας Δημήτριος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Μπαλατσός Νικόλαος**

Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Νούνεσης Γεώργιος**

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

**Παπαδόπουλος Γεώργιος**

Λέκτορας Βιοφυσικής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Σταθόπουλος Κωνσταντίνος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

**Χολή-Παπαδοπούλου Θεοδώρα**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΖΩΗ ΚΑΡΟΥΛΙΑ

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

*Στους γονείς μου*

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

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: XXV

Συνολικός αριθμός σελίδων: 178

Αριθμός πινάκων: 21

Αριθμός εικόνων: 110

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 228

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

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

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

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

Με προσομοιώσεις μοριακών δυναμικών σχεδιάστηκαν τα τρία πιο πιθανά μοντέλα αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF και εντοπίστηκαν τα αμινοξέα της διεπιφάνειάς τους, οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ τους και τα κατάλοιπα της επικράτειας A2 που είναι πιο σημαντικά για τη σταθερότητά τους. Στην πρώτη διάταξη εντοπίστηκαν τα κατάλοιπα Glu<sup>1549</sup> και Glu<sup>1554</sup>, στη δεύτερη το Glu<sup>1640</sup> και στην τρίτη τα Glu<sup>1511</sup>, Glu<sup>1519</sup>, Glu<sup>1522</sup> και Asp<sup>1663</sup>. Μέσω της Θέση-Κατευθυνόμενης Σημειακής Μεταλλαξιγένεσης δημιουργήθηκε για την κάθε διάταξη μία μεταλλαγμένη πρωτεΐνη A2, όπου τα κατάλοιπα Glu<sup>1549</sup>, Glu<sup>1640</sup> και Glu<sup>1511</sup> αντίστοιχα μετατράπηκαν σε αλανίνες. Οι τρεις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες A2 υπερεκφράστηκαν, απομονώθηκαν και μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της κάθε μίας με τη φυσιολογική επικράτεια A1 με Φασματοσκοπία Φθορισμού.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

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

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

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

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

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	v
<b>Error! Bookmark not defined.</b>	
Πρόλογος.....	vi
Ευχαριστίες.....	<b>Er</b>
<b>ror! Bookmark not defined.</b>	
Κατάλογος πινάκων.....	<b>Error!</b>
<b>Bookmark not defined.</b>	
Κατάλογος εικόνων.....	<b>Error!</b>
<b>Bookmark not defined.</b>	
Συντομογραφίες.....	<b>Err</b>
<b>or! Bookmark not defined.iv</b>	
Εισαγωγή.....	1
1. Αιμόσταση.....	
.....	<b>Error! Bookmark</b>
<b>not defined.</b>	
2. Η μοριακή δομή του vWF.....	<b>Error! Bookmark not</b>
<b>defined.</b>	
3. Οι επικράτειες του vWF.....	5
3.1. Οι επικράτειες A του vWF.....	5
3.1.1. Η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13.....	8
3.2. Οι επικράτειες B του vWF.....	<b>Error! Bookmark not</b>
<b>defined.</b>	
3.3. Οι επικράτειες C του vWF.....	9
3.4. Οι επικράτειες D του vWF.....	<b>Error! Bookmark not</b>
<b>defined.0</b>	
4. Η βιοσύνθεση και η δομή των πολυμερών του vWF.....	<b>Error! Bookmark not defined.1</b>
5. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του vWF.....	13



6. Αποθήκευση, έκκριση και κυκλοφορία του vWF.....	<b>Error! Bookmark not defined.5</b>
7. Ο βιολογικός ρόλος του vWF.....	<b>Error! Bookmark not defined.6</b>
7.1. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων.....	<b>Error! Bookmark not defined.6</b>
7.2. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων.....	19
7.3. Ο σχηματισμός συμπλόκου του vWF με τον FVIII.....	<b>Error! Bookmark not defined.0</b>
8. Η δομή της επικράτειας A1 του vWF.....	<b>Error! Bookmark not defined.1</b>
8.1. Η αλληλεπίδραση της επικράτειας A1 του vWF και του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων.....	24
8.1.1. Υπολογιστική πρόβλεψη πρόσδεσης της A1 επικράτειας του vWF στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων.....	25
8.1.2. Κρυσταλλογραφία ακτινών X του συμπλόκου της επικράτειας A1 του vWF και του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων.....	27
8.2. Περιοχές της επικράτειας A1 του vWF με ιδιότητες δέσμησης προσδετών.....	29
9. Η δομή της επικράτειας A2 του vWF.....	<b>Error! Bookmark not defined.2</b>
10. Η νόσος von Willebrand.....	<b>Error! Bookmark not defined.5</b>
11. Σχέσεις των λειτουργιών των επικρατειών A1 και A2 του vWF.....	<b>Error! Bookmark not defined.8</b>
Σκοπός της διδακτορικής διατριβής.....	40
Υλικά και μέθοδοι.....	41
1. Αντιδραστήρια.....	42
2. Βακτηριακά στελέχη.....	44
3. Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pET.....	45
4. Πρωτεάσες.....	48
5. Κατασκευή cDNA αλυσίδας από ενδοθηλιακά κύτταρα.....	49

6. Κλωνοποίηση των γονιδίων που αντιστοιχούν στις επικράτειες A1 και A2 vWF.....	49
6.1. Σχεδιασμός των εκκινητών και ενίσχυση των γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	49
6.2. Κλωνοποίηση των γονιδίων σε πλασμιδιακούς φορείς.....	52
6.2.1. Κλωνοποίηση των γονιδίων στο φορέα pSC-A (TOPO-TA cloning).....	52
6.2.2. Κλωνοποίηση των γονιδίων στους φορείς έκφρασης.....	54
6.3. Προετοιμασία και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων.....	54
7. Θέση-Κατευθυνόμενη Σημειακή Μεταλλαξιγένεση.....	56
8. Επεξεργασία των πρωτεϊνών.....	58
8.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και χρώση.....	58
8.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	60
8.2.1. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	62
8.3. Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων.....	63
9. Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	64
10. Δυναμική σκέδαση φωτός, DLS (Dynamic light scattering).....	65
11. Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry-ITC).....	66
12. Φασματοσκοπικές τεχνικές.....	69
12.1. Φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism – CD).....	70
12.2. Φασματοσκοπία φθορισμού.....	72
13. Υπολογιστική προσέγγιση του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 του vWF.....	73
13.1. Υπολογιστική πρόβλεψη πρόσδεσης (docking) – Το πρόγραμμα HEX.....	73
13.2. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics Simulations).....	73
13.3. Χαρακτηρισμός της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF.....	74
Αποτελέσματα.....	75
1. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)......	76
1.1. Ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2 του vWF στο φορέα pSC-A και στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)......	76
1.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του	

νWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	78
1.3. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF σε αποδιατακτικές συνθήκες	82
1.4. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	84
1.5. Δυναμική Σκέδαση Φωτός	86
1.6. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF με Elisa	87
1.7. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF με Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (ITC)	89
2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του νWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	91
2.1. Ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του νWF και κλωνοποίησή τους στο φορέα pSC-A και στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	91
2.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)	93
2.3. Απομόνωση της πρωτεάσης HRV 3C και αναζήτηση των βέλτιστων συνθηκών πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF	96
2.4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF με Φασματοσκοπία Φθορισμού	99
3. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του νWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60	102
3.1. Ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του νWF και κλωνοποίησή τους στο φορέα έκφρασης pET-M60	102
3.2. Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60	103
3.3. Απομόνωση της πρωτεάσης TEV και αναζήτηση των βέλτιστων συνθηκών πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF	105
3.4. Μελέτη των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF με Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού (CD)	106
3.5. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του νWF με Φασματοσκοπία Φθορισμού	109
4. Υπολογιστική μελέτη του συμπλόκου των επικρατειών A1 και A2 του νWF	110
4.1. Σχεδιασμός των πιθανών μοντέλων αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 και A2 του νWF	110

4.2. Χαρακτηρισμός της διεπιφανείας αλληλεπίδρασης του συμπλόκου των μοντέλων A, B και Γ.....	112
5. Παραγωγή και μελέτη των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών της επικράτειας A2 του vWF κατά τα μοντέλα αλληλεπίδρασης A, B και Γ.....	116
5.1. Εισαγωγή μεταλλάξεων στο γονίδιο A2 του vWF.....	116
5.2. Κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ) του vWF στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	117
5.3. Υπερέκφραση και απομόνωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	118
5.4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της επικράτειας A2 του vWF A, B και Γ με την A1 φυσιολογικού τύπου με Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	121
Συζήτηση.....	125
Βιβλιογραφία.....	134
Abstract.....	152

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>1:</b> Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξικών καταλοίπων της επικράτειας A1 του vWF και του πεπτιδίου GPIIb των αιμοπεταλίων μετά από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Διακρίνονται οι αλληλεπιδράσεις van der Waals (VDW) και οι δεσμοί υδρογόνου (H) ( <i>Vasudevan et al. 2000</i> ).....	26
<b>2:</b> Αντίδραση σύνθεσης cDNA αλυσίδας με τη μέθοδο PCR της αντίστροφης μεταγραφάσης.....	49

3: Εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την κλωνοποίηση των γονιδίων A1 και A2 του vWF στους φορείς έκφρασης.....	50
4: Αντίδραση PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF.....	50
5: Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF για την κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-29c(+). .....	51
6: Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-49b(+). .....	51
7: Πρόγραμμα PCR για την ενίσχυση των γονιδίων A1 και A2 του vWF και την κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60. ....	51
8: Αντίδραση ενοποίησης του προϊόντος PCR στο φορέα pSC-A. ....	52
9: Αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>NdeI</i> και <i>XhoI</i> . ....	53
10: Αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>BamHI</i> και <i>HindIII</i> . ....	53
11: Αντίδραση πέψης των τμημάτων DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i> . ....	53
12: Αντίδραση ενοποίησης ενθέματος στο φορέα έκφρασης.....	54
13: Εκκινητές για την κατασκευή των μεταλλαγμάτων της επικράτειας A2 του vWF.....	56
14: Αντίδραση PCR για την εισαγωγή των μεταλλάξεων.....	56
15: Πρόγραμμα PCR για την εισαγωγή των μεταλλάξεων στο ένθεμα του γονιδίου A2 του vWF του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET-49b(+). ....	57
16: Διαλύματα για την προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμιδίου.....	58
17: Ποσοστά δευτεροταγούς δομής των κρυσταλλικών και εξισορροπημένων επικρατειών A1 και A2 του vWF σε μορφή συμπλόκου και μεμονωμένες.....	111

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

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

1: Ο μηχανισμός της πήξης του αίματος μέσω της διαδοχικής ενεργοποίησης των παραγόντων που συμμετέχουν στο ενδογενές και στο εξωγενές μονοπάτι ( <i>Hoffman et al. 2001</i> ). ....	2
2: Η μοριακή δομή του vWF ( <i>Said 2004</i> ). ....	4

<b>3:</b> Οι επικράτειες A, B, C και D του vWF και οι περιοχές δέσμευσης που διαθέτουν.....	5
<b>4:</b> Σύγκριση της πρωτοταγούς και της δευτεροταγούς δομής των επικρατειών A του vWF. Διακρίνονται τα β ελάσματα (ροζ) και οι α έλικες (γαλάζιες). Συμβολίζονται οι δεκάδες (τελείες), το σημείο πέψης της πρωτεάσης ADAMTS13 (μαύρο βέλος), οι περιοχές γλυκοζυλίωσης (αστερίσκοι), τα κατάλοιπα που σχετίζονται με μεταλλάξεις στις περιπτώσεις vWD (κίτρινο), τα κατάλοιπα που δεν παρουσιάζουν ομοιότητες (μικρά γράμματα) και τα κατάλοιπα που απουσιάζουν (παύλες) ( <i>Zhang et al. 2009</i> ).....	6
<b>5:</b> Οι επικράτειες A του vWF και οι περιοχές πρόσδεσης που διαθέτουν.....	7
<b>6:</b> Οι επικράτειες A1 και η A3 του vWF διαθέτουν από έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών τους άκρων και δημιουργούνται βρόχοι μεταξύ των καταλοίπων Cys <sup>509</sup> -Cys <sup>695</sup> και Cys <sup>923</sup> -Cys <sup>1109</sup> . Η A2 επικράτεια στερείται του δισουλφιδικού βρόχου .....	7
<b>7:</b> Η μοριακή δομή της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS13. Διακρίνεται η δομική περιοχή (MP), το τμήμα που μοιάζει με δυσιντεγκρίνη (Dis), οι οχτώ επαναλήψεις θρομβοσποντίνης τύπου 1 (TSP1), η πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή (Cys), η ενδιάμεση περιοχή (Sra) και οι δύο επικράτειες CUB ( <i>Zheng et al. 2001</i> ).....	8
<b>8:</b> Οι επικράτειες B του vWF.....	9
<b>9:</b> Οι επικράτειες C του vWF και η περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα GPIIb-IIIa των αιμοπεταλίων που διαθέτουν.....	9
<b>10:</b> Οι επικράτειες D του vWF και οι περιοχές πρόσδεσης που διαθέτουν.....	10
<b>11:</b> Ο σχηματισμός των ULvWF ( <i>Denis et al. 2002</i> ).....	11
<b>12:</b> Μεταφορά μηνυμάτων που ξεκινούν από την πρόσδεση του vWF στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και προκαλούν την ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb-IIIa των αιμοπεταλίων ( <i>Berndt et al. 2001</i> ).....	18
<b>13:</b> Ο μηχανισμός της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων κατά τη ροή του αίματος. Κατά τον τραυματισμό, ιδιαίτερα σε αγγεία με υψηλή διατμητική τάση, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται παροδικά στον vWF του υποενδοθηλίου μέσω του υποδοχέα GPIIb. Η σύνδεση σταθεροποιείται και τα αιμοπετάλια ακινητοποιούνται μετά την αλληλεπίδραση του υποδοχέα GPIIb-IIIa ή α <sub>IIb</sub> β <sub>3</sub> με τον vWF ( <i>Ruggeri et al. 2007</i> ).....	18
<b>14:</b> Ο μηχανισμός της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Μετά την προσκόλλησή τους τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και προσδένεται σε αυτά το ινωδογόνο και ο vWF	

σχηματίζοντας το υπόστρωμα για τη συσσώρευση και άλλων αιμοπεταλίων και το σχηματισμό θρόμβου ( <i>Ruggeri et al. 2007</i> ).....	19
<b>15:</b> Στερεοδιαγράμμα σύγκρισης των δομών των επικρατειών A1(συνεχόμενες γραμμές) και A3 (διακεκομμένες γραμμές) του vWF. Διακρίνονται κάθε δέκα κατάλοιπα ξεκινώντας από το 506 (μικροί κύκλοι) και τα κατάλοιπα των κυστεϊνών που σχηματίζουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς (μεγάλοι κύκλοι) ( <i>Emsley et al. 1997</i> ).....	21
<b>16:</b> Η κύρια αλυσίδα της επικράτειας A1 του vWF. Διακρίνονται τα κατάλοιπα Cys που εμπλέκονται στον δισουλφιδικό δεσμό (κίτρινο), οι περιοχές με μεταλλάξεις vWD τύπου 2B (κόκκινο), τα μεταλλάγματα όπου παρατηρείται μειωμένη πρόσδεση βοτροσετίνης (botrocetin) (πράσινο), οι μεταλλάξεις όπου υπάρχει μειωμένη πρόσδεση ριστοσετίνης (ristocetin), αλλά φυσιολογική πρόσδεση βοτροσετίνης (botrocetin) (γαλάζιο και μαύρο) και η μετάλλαξη όπου παρατηρείται μειωμένη πρόσδεση στον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων, αλλά φυσιολογική πρόσδεση βοτροσετίνης (botrocetin) (μπλε) ( <i>Emsley et al. 1998</i> ).....	22
<b>17:</b> Χωροπληρωτικό μοντέλο της μπροστά (a), άνω (b), κάτω (c) και δεξιά (d) πλευρά της επικράτειας A1 vWF. Όλα τα κατάλοιπα είναι χρωματισμένα γκριζα εκτός από τα κατάλοιπα που αντιστοιχούν σε Arg και Lys (μπλε), Asp και Glu (κόκκινα) και σε His (πράσινα). Διακρίνεται η προτεινόμενη περιοχή πρόσδεσης της μποτροσετίνης (B) και η πιθανή περιοχή πρόσδεσης της ηπαρίνης (κυκλωμένη) ( <i>Emsley et al. 1998</i> ).....	23
<b>18:</b> Ηλεκτροστατικά δυναμικά του συμπλόκου της επικράτειας A1 του vWF και του GPIIb υποδοχέα των αιμοπεταλίων. Συμβολίζεται το θετικό (μπλε) και το αρνητικό φορτίο (κόκκινο). Στο πάνω μέρος διακρίνεται το φορτίο του υποδοχέα GPIIb (η επικράτεια A1 συμβολίζεται με έλικα), ενώ στο κάτω μέρος διακρίνεται το φορτίο της επικράτειας A1 (ο υποδοχέας GPIIb συμβολίζεται με έλικα) ( <i>Huizinga et al. 2002</i> ).....	24
<b>19:</b> Προσομοίωση της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου Gly <sup>271</sup> -Asp-Asp-Thr-Asp-Lys-Tyr-Asp-Tyr-Tyr <sup>279</sup> του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων και της επικράτειας A1 του vWF. Διακρίνονται τα κατάλοιπα της αλληλουχίας του υποδοχέα GPIIb (πορτοκαλί), οι έλικες α3 (μπλε) και α4 (κόκκινο), οι υπόλοιπες α έλικες (μωβ), το β3 έλασμα (μπλε) και τα υπόλοιπα β ελάσματα (πράσινο) της επικράτειας A1 ( <i>Vasudevan et al. 2000</i> ).....	25

<b>20:</b> Τα κατάλοιπα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση της επικράτειας A1 του vWF με τον υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων. Διακρίνεται η αλληλουχία του υποδοχέα GPIIb (πορτοκαλί), η έλικα $\alpha 4$ (μωβ) και οι υπόλοιπες $\alpha$ έλικες (κόκκινο), το $\beta 3$ έλασμα (μπλε) και τα υπόλοιπα $\beta$ ελάσματα (πράσινο) και οι βρόχοι (μωβ) (Vasudevan et al. 2000).....	26
<b>21:</b> Η δομή της περιοχής του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων που αλληλεπιδρά με την επικράτεια A1. Διακρίνεται η αμινοτελική περιοχή και η $\beta$ φουρκέτα (μπλε), το μοτίβο των περιοχών πλούσιων σε λευκίνες (πράσινο), η καρβοξυτελική περιοχή και ο $\beta$ διακόπτης (κόκκινο) και οι δισουλφιδικές γέφυρες (κίτρινο) (Huizinga et al. 2002).....	27
<b>22:</b> Στερεοδιάγραμμα της δομής του συμπλόκου του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων (πράσινο) και της επικράτειας A1 (μπλε) (Huizinga et al. 2002).....	28
<b>23:</b> Στερεοδιάγραμμα της αλληλεπίδρασης του $\beta$ διακόπτη του υποδοχέα GPIIb των αιμοπεταλίων με το έλασμα $\beta 3$ της επικράτειας A1. Διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου (διακεκομμένες γραμμές) (Huizinga et al. 2002).....	28
<b>24:</b> Στερεοδιάγραμμα της δομής του διμερούς της ριστοσετίνης (ristocetin) σε σύμπλοκο με ένα πεπτίδιο (N-acetyl-Lys-d-Ala-d-Ala) (κίτρινο). Διακρίνεται το διπεπτίδιο (πράσινο), τα σάκχαρα (πορτοκαλί) και η μαννόζη (μπλε) (Nahoum et al. 2009).....	29
<b>25:</b> Οι δομές των συμπλόκων της επικράτειας A1 με τον υποδοχέα GPIIb και τη βοτροσετίνη (botrocetin) και της επικράτειας A1 με τη βιτισετίνη (bitiscetin). Διακρίνεται ο υποδοχέας GPIIb (πράσινο), η επικράτεια A1 (κόκκινο), οι $\alpha$ (ροζ) και $\beta$ (μπλε) υπομονάδες των πρωτεϊνών (Matsui et al. 2009).....	31
<b>26:</b> Η δομή της επικράτειας A1 του vWF και σημαντικά αμινοξέα για την πρόσδεση της βοτροσετίνης (botrocetin) (Arg <sup>629</sup> , Arg <sup>632</sup> , Arg <sup>636</sup> και Lys <sup>667</sup> ) και της βιτισετίνης (bitiscetin) (Arg <sup>632</sup> , Lys <sup>660</sup> , Gln <sup>666</sup> και Lys <sup>673</sup> ) (Esnouf et al. 1999).....	31
<b>27:</b> Η τριτοταγής δομή της επικράτειας A2 του vWF, όπου διακρίνεται ο βρόχος $\alpha 4$ (ροζ) και η θέση πρωτεόλυσης της ADAMTS13 στο βρόχο $\alpha 3\beta 4$ . Στη δεξιά εικόνα παρουσιάζεται υπέρθεση των επικρατειών A1 και A3 (Zhang et al. 2009).....	32
<b>28:</b> Η θέση πρωτεόλυσης της επικράτειας A2 από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13 μεταξύ των αμινοξέων Tyr <sup>842</sup> (μπλε) και Met <sup>843</sup> (κόκκινο) (Zheng et al. 2009).....	32
<b>29:</b> Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pET-29c(+)	46
<b>30:</b> Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pET-49b(+)	47



<b>31:</b> Πλασμιδιακός χάρτης του Φορέα έκφρασης pET-M60.....	47
<b>32:</b> Βασική αρχή ITC πειράματος.....	66
<b>33:</b> Διάγραμμα φασμάτων απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων φαινυλαλανίνης (Phe), τυροσίνης (Tyr) και θρυπτοφάνης (Trp) στην περιοχή του υπεριώδους σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (nm).....	69
<b>34:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)......	76
<b>35:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pSC-A με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>NdeI</i> και <i>XhoI</i> .....	76
<b>36:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pSC-A και του φορέα έκφρασης pET-29c(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>NdeI</i> και <i>XhoI</i> .....	77
<b>37:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET-29c(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>NdeI</i> και <i>XhoI</i> για τον εντοπισμό του ενθέματος των γονιδίων A1 και A2 του vWF..	77
<b>38:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων των ελέγχων υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A1 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)....	78
<b>39:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων των ελέγχων υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)....	78
<b>40:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων του ελέγχου της πρωτεΐνης A1 του vWF στα ιζήματα μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)......	79
<b>41:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων του ελέγχου της πρωτεΐνης A2 του vWF στα ιζήματα μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)......	79
<b>42:</b> Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από ελέγχους υπερέκφρασης στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)......	80
<b>43:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A1 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)......	81
<b>44:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A2 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)......	81

<b>45:</b> Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των απομονωμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	81
<b>46:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των συμπυκνωμένων κλασμάτων των απομονωμένων πρωτεϊνών διαλυμάτων A1 και A2 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	81
<b>47:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A1 του vWF παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	82
<b>48:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των δειγμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A2 του vWF παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	82
<b>49:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A1 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	83
<b>50:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A2 του vWF με χρωματογραφία συγγένειας παρουσία αποδιατακτικού μέσου μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-29c(+)	83
<b>51:</b> Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από απομόνωση σε αποδιατακτικές συνθήκες	83
<b>52:</b> Γραφικές παραστάσεις χρωματογραφίας μοριακής διήθησης των πρωτεϊνικών διαλυμάτων A1 και A2 του vWF	84
<b>53:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεϊνικού διαλύματος A1 του vWF που αντιστοιχούν στις κορυφές των απορροφήσεων του διαγράμματος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης	85
<b>54:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων του πρωτεϊνικού διαλύματος A2 του vWF που αντιστοιχούν στις κορυφές των απορροφήσεων του διαγράμματος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης	85
<b>55:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων των κλασμάτων μοριακής διήθησης που περιέχουν τις επιθυμητές πρωτεΐνες A1 και A2 του vWF και χρώση με νιτρικό άργυρο	85
<b>56:</b> Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης	85

- 57:** Γραφική παράσταση της διασποράς του πρωτεϊνικού διαλύματος A1 του vWF κατά την ένταση. Στην τελευταία στήλη έχει υπολογιστεί η διασπορά. Στον άξονα y αντιστοιχεί το μέγεθος (nm) και στον άξονα x το ποσοστό % της έντασης. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 0.1 mg/ml.....86
- 58:** Γραφική παράσταση της διασποράς του πρωτεϊνικού διαλύματος A2 του vWF κατά την ένταση. Στην τελευταία στήλη έχει υπολογιστεί η διασπορά. Στον άξονα y αντιστοιχεί το μέγεθος (nm) και στον άξονα x το ποσοστό % της έντασης. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος ήταν 0.1 mg/ml.....87
- 59:** Γραφική παράσταση της απορρόφησης (A) και των αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (0.5-5μM) μετά από ανίχνευση με αντίσωμα έναντι της επικράτειας A2 και Γραφική παράσταση της απορρόφησης (A) και της αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (0.25-4 μM) καθηλωμένης στα κελία με την προσθήκη σταθερής συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (1 μM) (μπλε καμπύλη), γραφική παράσταση της απορρόφησης (A) και της σταθερής συγκέντρωσης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (0.25 μM) καθηλωμένης στα κελία με την προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (0.25-4 μM) (ροζ καμπύλη). Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε ανίχνευση με αντίσωμα έναντι της A2 επικράτειας .....88
- 60:** Scatchard plot. ....88
- 61:** Γραφική παράσταση της ενθαλπίας και της μοριακής αναλογίας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από θερμοδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης.....89
- 62:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-49b(+). ....91
- 63:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψων του ανασυνδυασμένου φορέα pSC-A με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *HindIII*. ....91
- 64:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pSC-A και του φορέα pET-49b(+) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *HindIII*. ....92
- 65:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pET-49b(+) για τον εντοπισμό των ενθεμάτων των

γονιδίων A1 και A2 του vWF με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>BamHI</i> και <i>HindIII</i> .....	92
<b>66:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A1 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)......	93
<b>67:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης της πρωτεΐνης A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)......	94
<b>68:</b> Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)......	95
<b>69:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A1 του vWF με χρωματογραφία αγκιστείας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)......	95
<b>70:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεΐνης A2 του vWF με χρωματογραφία αγκιστείας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)......	95
<b>71:</b> Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-49b(+)......	96
<b>72:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεάσης HRV 3C με χρωματογραφία αγκιστείας.....	96
<b>73:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεόλυσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF από την πρωτεάση HRV 3C σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες.....	97
<b>74:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων των διαδοχικών απομονώσεων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με χρωματογραφία αγκιστείας μετά την πρωτεόλυση.....	98
<b>75:</b> Γραφικές παραστάσεις των σημάτων φθορισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (A) και A2 (B) του vWF ξεχωριστά σε συνάρτηση με αυξανόμενη συγκεντρώσεις (έως 12 $\mu$ M) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.....	99
<b>76:</b> Συνάρτηση των φασμάτων φθορισμού και της μοριακής αναλογίας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF. Σημειώνονται τα σήματα φθορισμού (κουκίδες) και η ευθεία που θα προέκυπτε αν δεν υπήρχε αλληλεπίδραση.....	100

<b>77:</b> Γραφική παράσταση των φασμάτων φθορισμού και της αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (έως 15 $\mu$ M) προστιθέμενης σε σταθερή συγκέντρωση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (1 $\mu$ M) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.....	101
<b>78:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των γονιδίων A1 και A2 του vWF για κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	102
<b>79:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 12% των πέψων των γονιδίων A1 και A2 του vWF και του φορέα έκφρασης pET-M60 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i> .....	102
<b>80:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% του ανασυνδυσμένου φορέα έκφρασης pET-M60 και των διαγνωστικών πέψων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i> .....	103
<b>81:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF σε κύτταρα έκφρασης μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	103
<b>82:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των κλασμάτων ελέγχου υπερέκφρασης πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	104
<b>83:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60 με χρωματογραφία συγγένειας.....	104
<b>84:</b> Ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	104
<b>85:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης της πρωτεάσης TEV με χρωματογραφία συγγένειας.....	105
<b>86:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων ελέγχου πρωτεόλυσης της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης A1 του vWF από την πρωτεάση TEV σε διαφορετικούς χρόνους και θερμοκρασίες.....	105
<b>87:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων απομόνωσης των ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF μετά την πρωτεόλυση.....	106
<b>88:</b> Ανάλυση φάσματος CD των ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών A1 (0.15 mg/ml) (A) και A2 (0.15 mg/ml) (B) του vWF, όπου παρουσιάζεται το ποσοστό συμμετοχής κάθε στοιχείου της δευτεροταγούς δομής ανάλογα με το εύρος του φάσματος. Στα	

διαγράμματα παρουσιάζεται η καμπύλη που προέκυψε θεωρητικά από τη σύνθεση αυτών των στοιχείων.....	107
<b>89:</b> Ανάλυση φάσματος CD του μίγματος των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 και A2 του vWF, όπου παρουσιάζεται το ποσοστό συμμετοχής κάθε στοιχείου της δευτεροταγούς δομής ανάλογα με το εύρος του φάσματος. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η καμπύλη που προέκυψε θεωρητικά από τη σύνθεση αυτών των στοιχείων.....	108
<b>90:</b> Φάσματα CD των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (μαύρο) και A2 (μπλε) του vWF και του συμπλόκου τους (κόκκινο) στην περιοχή του άπω υπεριώδους.....	109
<b>91:</b> Συνάρτηση φασμάτων φθορισμού και αυξανόμενης συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A1 του vWF (6 μM) προστιθέμενης σε σταθερή συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A2 του vWF (2 μM) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.....	110
<b>92:</b> Τα τρία πιθανότερα μοντέλα αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 (λευκό) και A2. Διακρίνονται οι πιθανές διατάξεις της επικράτειας A2 του vWF, A (πορτοκαλί), B (μωβ) και Γ (γαλάζιο).....	111
<b>93:</b> Το μοντέλο A του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF, όπως σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα <i>VMD</i> . Διακρίνονται τα κατάλοιπα της διεπιφάνειας Glu <sup>1549</sup> (γαλάζιο) και Glu <sup>1554</sup> (πράσινο) και τα αμινοτελικά (μπλε) και καρβοξυτελικά άκρα (κόκκινο).....	115
<b>94:</b> Το μοντέλο B του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF, όπως σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα <i>VMD</i> . Διακρίνεται το κατάλοιπο της διεπιφάνειας Glu <sup>1640</sup> (γαλάζιο) και τα αμινοτελικά (μπλε) και καρβοξυτελικά άκρα (κόκκινο).....	115
<b>95:</b> Το μοντέλο Γ του συμπλόκου των πρωτεϊνών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF, όπως σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα <i>VMD</i> . Διακρίνονται τα κατάλοιπα της διεπιφάνειας Glu <sup>1511</sup> (μωβ), Glu <sup>1519</sup> (γαλάζιο) Glu <sup>1522</sup> (κίτρινο) και Asp <sup>1663</sup> (πράσινο) και τα αμινοτελικά (μπλε) και καρβοξυτελικά άκρα (κόκκινο).....	116
<b>96:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των προϊόντων PCR των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ) του vWF για την κλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	117
<b>97:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των πέψων του φορέα έκφρασης pET-M60 και των μεταλλαγμένων γονιδίων A2 (A, B και Γ) του vWF με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i> .....	117

<b>98:</b> Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5% των διαγνωστικών πέψεων του ανασυνδυασμένου φορέα έκφρασης pET-M60 με τα μεταλλαγμένα ενθέματα του γονιδίου A2 (A, B και Γ) του vWF με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες <i>EcoRI-HF</i> και <i>Sall-HF</i> .....	118
<b>99:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων υπερέκφρασης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	118
<b>100:</b> Ανοσοποτύπωση και ανίχνευση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	119
<b>101:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των εκλουσμάτων των απομονωμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A, B και Γ του vWF με χρωματογραφία συγγένειας μετά από επαγωγή στο φορέα έκφρασης pET-M60.....	119
<b>102:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% και ανοσοαποτύπωση και ανίχνευση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF με αντίσωμα έναντι των εξαιστιδινών.....	120
<b>103:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων πρωτεόλυσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B και Γ) του vWF από την πρωτεάση TEV.....	120
<b>104:</b> Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των κλασμάτων των απομονωμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών A2 (A, B Γ) του vWF μετά την πρωτεόλυση.....	120
<b>105:</b> Φάσματα φθορισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών A1 (μαύρο), A2 (ροζ), A (κόκκινο), B (μπλε) και Γ (πράσινο) του vWF ξεχωριστά σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις στην περιοχή εκπομπής 315-450 nm. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 280 nm.....	121
<b>106:</b> Φάσματα φθορισμού μέσου μήκους κύματος εκπομπής προς τη μοριακή αναλογία των μιγμάτων των πρωτεϊνών A1/(A1+A2), A1/(A1+A), A1/(A1+B) και A1/(A1+Γ) (μαύρες κουκκίδες) σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm. Διακρίνονται οι τιμές που θα προέκυπταν αν δεν υπήρχε αλληλεπίδραση (κόκκινες κουκκίδες).....	122
<b>107:</b> Φάσματα φθορισμού μέσου μήκους κύματος εκπομπής ως προς τη μοριακή αναλογία των πρωτεϊνών μιγμάτων των πρωτεϊνών A1/(A1+A2), A1/(A1+A), A1/(A1+B) και A1/(A1+Γ) μετά την αφαίρεση των θεωρητικών τιμών σε ακτινοβολία διέγερσης 280 nm.....	123
<b>108:</b> Η δομή του συμπλόκου του υποδοχέα GPIIbα των αιμοπεταλίων και της επικράτειας A1 του vWF και η σύγκρισή του με την ελεύθερη επικράτεια A1 (μη	

προσδεδεμένη στον υποδοχέα). Α) Η δομή του συμπλόκου, όπου διακρίνεται ο υποδοχέας GPIIb των αιμοπεταλίων (πράσινο), η επικράτεια A1 (κίτρινο) και τα κατάλοιπα κυστεϊνών (κίτρινες σφαίρες). Β) Υπέρθωση του συμπλόκου και ελεύθερη επικράτεια A1 (άσπρο). Διακρίνονται οι περιοχές της επικράτειας A1 που διαφέρουν (κόκκινο) (*Dumas et .2004*).....126

**109:** Η δομή της επικράτειας A2 του vWF. Διακρίνονται οι α έλικες, τα β ελάσματα και με β οι βρόχοι α4 και α3β4 (*Zhang et al. 2009*).....127

**110:** Υπολογιστική προσέγγιση του συμπλόκου αλληλεπίδρασης των επικρατειών A1 (μπλε) και A2 (κόκκινο) του vWF κατά τα τρία πιθανότερα μοντέλα Α, Β και Γ, όπως σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα VMD. Διακρίνονται οι διαφορετικές διατάξεις της επικράτειας A2 (κόκκινο).....132

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADAMTS	Μεταλλοπρωτεάση και δυσιντεγκρίνη με μοτίβο θρομβοσποντίνης 1
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
CD	Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού
CUB	Πρωτεΐνες C1r/C1s, Uegf και Bmp1
DAC	Διακυλογλυκερόλη
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός
dsDNA	Υπερελικωμένο δίκλωνο DNA
ELISA	Συζευγμένη με ένζυμο τεχνική ανοσοαπορρόφησης



Expasy	Ειδικό σύστημα ανάλυσης πρωτεϊνών
FI	Ινωδογόνο
FII	Προθρομβίνη
FIII	Ιστικός παράγοντας
FIV	Ασβέστιο
FV	Προαξελλερίνη
FVI	Αξελλερίνη
FVII	Προκομβερτίνη
FVIII	Αντιαιμοφιλικός παράγοντας A
FIX	Παράγοντας Christmas ή αντιαιμοφιλικός παράγοντας B
FX	Παράγοντας Stuart-Prower
FXI	Πρόδρομος θρομβοπλαστίνη πλάσματος
FXII	Παράγοντας Hageman
FXIII	Σταθεροποιητικός παράγοντας ινικής
GPIba	Υποδοχέας γλυκοπρωτεΐνης Iba
GPIa-IIa	Υποδοχέας ιντεγκρίνης α2β1
GPIIb-IIIa	Υποδοχέας ιντεγκρίνης αIIbβ3
GSH	Ανηγμένη γλουταθειόνη
HRV (3C)	Ανθρώπινος ρινοϊός 3C
HRP	Ραφανιδική υπεροξειδάση
ITC	Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης
IP3	Τριφωσφορική ινοσιτόλη
IPTG	Ισοπροπυλ-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη
LRPI	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LRR	Μοτίβο με περιοχές πλούσιες σε λευκίνη
MMBK	Κινησιγόνο υψηλού μοριακού βάρους
OPD	Ο-φαινυλαινεδιαμίνη
PMSF	Φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο
PVDF	Πολύ-βινυλο-δι-φθορίδιο
PKC	Πρωτεϊνική κινάση C
RGD	Μοτίβο των αμινοξέων Arg-Gly-Asp
RMSD	Ρίζα μέσης τετραφωνικής απόκλισης

RPM	Κύκλοι ανά λεπτό
TEV	Ιός του καπνού
TIL	Επικράτειες που μιμούνται τους αναστολείς θρυψίνης
TSP1	Θρομβοσπονδίνη τύπου 1
TTP	Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα
ULvWF	Πολυμερή vWF μεγάλου μοριακού βάρους
VDW	Αλληλεπιδράσεις van der Waals
vWF	Παράγοντας von Willebrand
vWD	Νόσος von Willebrand