

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2881.**

**CSÁNYI MÁRIA CSILLA**

**Celluláris és molekuláris biofizika**  
című program

Programvezető: Dr. Kellermayer Miklós, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Hársfalvi Jolán, tudományos tanácsadó

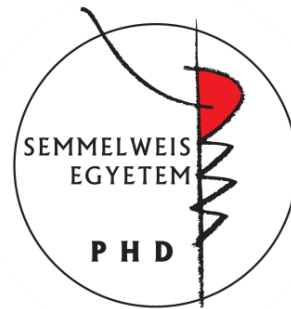
# Humán von Willebrand faktor klinikai mintákban és egymolekula szinten

Doktori értekezés

**Csányi Mária Csilla**

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hársfalvi Jolán, DSc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Bonyár Attila, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Wohner Nikolett, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Benyó Zoltán, DSc., egyetemi tanár, igazgató

Tagok: Dr. Hegyesi Hargita, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Sándor Noémi, Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest  
2023

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Irodalmi áttekintés.....	5
1.1 von Willebrand faktor (VWF) .....	5
1.1.1 A VWF szerepe a normál hemosztázisban.....	5
1.1.2 von Willebrand betegség (VWB).....	6
1.1.3 A VWF szerepe trombotikus folyamatokban.....	6
1.1.4 A VWF gén és monomer fehérje.....	7
1.1.5 Szintézis, tárolás és elimináció.....	10
1.2 Az atomerő-mikroszkópia működésének alapjai.....	12
1.2.1 A VWF szerkezete és funkciója közötti kapcsolat.....	13
2. Célkitűzések .....	17
3. Módszerek.....	18
3.1 Biológiai minták kezelése.....	18
3.2 A VWF multimerek elválasztása és tesztelése.....	18
3.2.1 A VWF tisztítása .....	18
3.2.2 ADAMTS13 mennyiség, VWF mennyiség és funkció mérése .....	19
3.2.3 A VWF tisztaságának vizsgálata.....	20
3.2.4 A multimerek méreteloszlásának vizsgálata .....	20
3.3 Atomerő-mikroszkópia (AFM).....	22
3.3.1 A VWF minta előkészítése.....	22
3.3.2 Molekuláris fésülés .....	22
3.3.3 Képkötés.....	23
3.3.4 Nanomanipuláció .....	24
3.3.5 Képanalízis.....	24
4. Eredmények.....	28

4.1 A VWF vizsgálata klinikai mintákban.....	28
4.2 Az egyedi molekula vizsgálatokhoz használt VWF minta jellemzői .....	32
4.3 A VWF relaxált szerkezetének vizsgálata AFM-mel .....	33
4.4 A VWF megnyújtott szerkezetének vizsgálata .....	36
4.5 A megnyújtott VWF vizsgálata nanomanipulációval .....	43
5. Megbeszélés .....	50
5.1 A VWF klinikai mintákban.....	50
5.2 A relaxált VWF szerkezete .....	51
5.3 A megnyújtott VWF szerkezete.....	52
5.4 A megnyújtott VWF változásai nanomanipuláció során .....	56
6. Következtetések.....	60
7. Összefoglalás .....	62
8. Summary.....	64
9. Irodalomjegyzék .....	65
10. Saját publikációk jegyzéke .....	73
10.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények .....	73
10.2 A disszertációtól független közlemények .....	73
11. Köszönetnyilvánítás .....	74

## Rövidítések jegyzéke

AB0	Az AB0 vércsoport rendszerben a vörösvértesteken jelen lévő antigének szerint 4 fenotípus különíthető el: A, B, AB és 0. Dolgozatomban a nem-0 csoportba az A, B és AB fenotípus tartozik.
ADAMTS13	<b>a</b> <b>d</b> isintegrin <b>and</b> <b>m</b> etalloprotease with <b>t</b> hrombos <b>p</b> ondin type 1 motif, member <b>13</b> , a VWF specifikus hasító enzime
AFM	atomic force microscopy (atomierő-mikroszkópia)
CBB	Comassie Brilliant Blue (nem specifikus fehérje festék)
DAB	3,3'-diaminobenzidine (diamino-benzidin)
DTT	1,4-dithiotreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	endoplasmic reticulum (endoplazmatikus retikulum)
FVIII	factor VIII (VIII-as véralvadási faktor)
GPIb	glikoprotein Ib (trombocita receptor)
HMW	high molecular weight (nagy molekulásúlyú)
IMW	intermediate molecular weight (közepes molekulásúlyú)
IQR	interquartile range (interkvartilis tartomány)
IU	international unit (nemzetközi egység, a VWF:Ag normál értéke 1 IU/ml)
LMW	low molecular weight (kis molekulásúlyú)
MW	molecular weight (molekulásúly)
OPD	o-phenylenediamine-dihydrochloride
OPG	osteoprotegerin (oszteoprotegerin)
PAD	peripheral arterial disease (perifériás artériás betegség)
PAGE	polyacrilamide gel electrophoresis (poliakrilamid gélelektroforézis)
PBS	phosphate buffered saline (foszfáttal pufferelt NaCl-oldat)
PBS-T	phosphate buffered saline – Tween (Tween-20-at tartalmazó foszfáttal pufferelt NaCl-oldat)
PLL	poly-L-lysine (poli-L-lizin)
PR	protomer
PVDF	polyvinylidene difluoride

RP	radical prostatectomy (radikális prosztatatektómia)
RPM	revolution per minute (percenkénti fordulatszám)
SDS	sodium dodecyl sulfate (nátrium lauril szulfát)
TEM	transmission electron microscopy (transzmissziós elektronmikroszkópia)
TTP	thrombotic thrombocytopenic purpura (trombotikus trombocitopéniás purpura)
VWB	von Willebrand betegség
VWF	von Willebrand factor (von Willebrand faktor)
VWF:Ag	von Willebrand factor antigen (VWF koncentráció antigén méréssel)
VWF:CB	von Willebrand factor collagen binding (VWF kollagén kötő aktivitás)
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

# 1. Irodalmi áttekintés

## 1.1 von Willebrand faktor (VWF)

A pre-pro-VWF egy 22 aminosav hosszúságú szignál peptidből (pre-), a 741 aminosav hosszúságú propeptidből valamint a 2051 aminosavból felépülő érett VWF alegységből áll (1). Az irodalomban az érett VWF-t nevezik monomernek. A szignál peptid lehasítása után a pro-VWF monomerek az endoplazmatikus retikulumban (ER) dimerizálódnak. Ez a VWF alapegysége a szervezetben, ami kémiai és szerkezeti szempontból a protomernek felel meg. Az endoplazmatikus retikulumból a pro-VWF dimerek a Golgi apparátusba kerülnek, ahol megtörténik a multimerizáció és utána a propeptid lehasítása. A VWF kifejezés az egytől kezdve az akár több mint 100 dimer egységből álló multimerek sokaságát jelenti.

### 1.1.1 A VWF szerepe a normál hemosztázisban

A VWF multimer glikoproteinek az endotél sejtekben és a megakariocitákban képződnek, a Weibel-Palade testecskékben és a trombociták  $\alpha$ -granulumaiban raktározódnak. Folyamatosan és stimulus hatására kerülnek a keringésbe. Fő szerepük a trombociták sérült érfalhoz való rögzülésének és a trombociták egymáshoz való aggregációjának a közvetítése nagy sebességgradiensű áramlás esetén (artériák és kapillárisok). A keringésben komplexet alkotva a VIII-as alvadási faktoral (FVIII), megvédi azt a degradációtól és biztosítja a FVIII elérhetőségét a koaguláció kaskád folyamatához, az aktiválódott trombociták felszínén. A plazmában különböző számú dimerből felépülő (0,5 - > 20 MDa) VWF multimerek keringenek. A normál hemosztázis fenntartásához szükséges a megfelelő mennyiségű és méretű (> 10 dimert tartalmazó) multimerek jelenléte a plazmában. A plazmában keringő VWF normál mennyisége 5 - 10 mg/l, ami 0,5 - 1,5 IU/ml VWF koncentrációnak (VWF:Ag) felel meg (2). Hiányukban vérzékenység alakulhat ki, a von Willebrand betegség, amely lehet öröklött vagy szerzett. Viszont, ha a VWF mennyisége, a nagyméretű multimerek száma vagy a multimerizáció mértéke fokozódik, akkor trombozisz veszély áll fenn. A multimerek méretét a keringésben az ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, member 13) enzim szabályozza.

### **1.1.2 von Willebrand betegség (VWB)**

A betegséget először Eric von Willebrand finn orvos írta le 1926-ban. Megfigyelései alapján felismerte, hogy a betegség mind tüneteiben mind öröklődésében eltér a hemofiliától. Magát a fehérjét csak később tudták kimutatni, de 1957-ben már felismerték, hogy egy, a hemofiliások plazmájában is jelenlévő fehérje korrigálja a vézést (3).

A VWB enyhe vagy súlyos nyálkahártya vérzékenységgel jár, pl. az erős menstruációs vérzés, kiterjedt véraláfutások, garat és orrvérzés valamint fogászati beavatkozásokhoz köthető vérzések gyakoriak (4). A VWB becsült előfordulása a populációban 1% alatti (5). A VWB-t a VWF mennyiségi vagy minőségi hiányossága szerint három típusba (1, 2, 3) és a 2-es típust négy altípusba (2A, 2B, 2N, 2M) soroljuk. A VWB autoszomális dominánsan öröklődik a 2N és a 3-as típus kivételével (4).

Hazánkban a Magyar Hemofília Egyesület foglalkozik a betegek érdekképviseletével, tájékoztató füzetet adtak ki részükre. Az egyesület honlapján szereplő adatok szerint Magyarországon körülbelül 1300 von Willebrand beteg él (6).

A von Willebrand betegségnek a különböző típusaiban eltérő a tünetek súlyossága. Több opció van a kezelésre a betegség típusától és a terápia indikációjától függően, adható dezmozpresszin, plazma eredetű és rekombináns VWF koncentrátumok és kiegészítő kezelésként antifibrinolitikus tranexámsav. Súlyos és gyakori vérzés esetén a betegeknél hosszú távú profilaxist javasolnak (4, 7).

Mivel a Ph.D. dolgozatom alapját képező munkáimnak nem volt része a VWB és annak laboratóriumi diagnosztikája, ezek részleteire nem térek ki.

### **1.1.3 A VWF szerepe trombotikus folyamatokban**

A VWF mennyiségét és minőségét a keringésben több tényező határozza meg: a genetikai variabilitás, az ADAMTS13, VWF specifikus hasítóenzim aktivitása, az AB0 vércsoport, a kor és az akut fázis reakciók. A különböző patológiás folyamatokban, sok esetben a kialakult trombózis a halál közvetlen oka, mely trombotikus folyamatokban a VWF is szerepet játszik (8). A gyulladáshoz kapcsolódó trombotikus folyamatokat kísérő trombotikus folyamatokat vizsgálva, egyre több bizonyíték utal arra, hogy a VWF nemcsak az artériás-, de a vénás trombotikusoknak is rizikó faktora (9).



Több klinikai tanulmány összefüggést mutatott ki az emelkedett VWF és az érrendszeri rendellenesség súlyossága között, de az ezek mögött álló folyamatok nem teljesen ismertek (10).

Sokféle folyamatban, pl. miokardiális infarktusban (11), agyi infarktusban (12), atheroszklerózisban (13, 14), hepatocelluláris karcinómában (15), akut májelégtelenségben (16), májcirrhosisban (17), tüdő (18) illetve hematopoetikus őssejt (19) transzplantációt követően és radikális prosztatatektómián átesett betegekben (20) sikerült kimutatni a VWF koncentráció emelkedését, bár ez nem minden esetben járt együtt nagyobb multimerek megjelenésével (16).

A trombotikus trombocitopénias purpura (TTP) egy trombotikus mikroangiopátia, amely a VWF hasítóenzimének, az ADAMTS13-nak a súlyos hiányával vagy aktivitásának csökkenésével jár. Ennek következtében ultranagy VWF multimerek jelennek meg a plazmában, ami trombusok kialakulásához vezethet. Az öröklött TTP (Upshaw-Schulman szindróma) ritka, az esetek nagyrészt szerzett TTP-ről van szó, amikor az ADAMTS13 aktivitásának csökkenése autoantitestek hatása miatt alakul ki. Bár a betegségről már 1924-ben publikáltak, a '60-as években az eseteket összefoglaló cikkben még > 90%-os mortalitásról írtak. Megfelelő terápiával a '90-es években sikerült a mortalitást 10-20%-ra csökkenteni (21).

Az endotél sérülése vagy működésének zavara során fehérjéket pl. VWF-t szekretál a keringésbe, így a mennyisége jelentősen megemelkedik. Emiatt a VWF jó biomarker jelölt a különböző endotél érintő folyamatokban. A Weibel-Palade testecskékben a VWF-ral együtt a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban szerepet játszó fehérjék pl. P-szelektin, oszteoprotegerin (OPG), is tárolódnak, és némelyek, mint az OPG szekréció után is komplexben marad a VWF-ral (22).

#### 1.1.4 A VWF gén és monomer fehérje

A 12-es kromoszómán található a 178 kilobázispár hosszúságú VWF gén összesen 52 exonból áll. A szignál peptid és a propeptid 17, az érett alegység a maradék 35 exonon van kódolva. Emellett a 22-es kromoszómán található még egy pszeudogén (23).

A fehérje 2813 aminosavból áll, melyből az első 22 aminosav a szignál peptid, a következő 741 aminosav hosszúságú rész a propeptid, amelyet a D1-D2 domének alkotnak (**1. táblázat**). Az érett fehérjét 2050 aminosav alkotja, melynek doménjei sorrendben: D'D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK (**1. ábra**) (24). Eredetileg

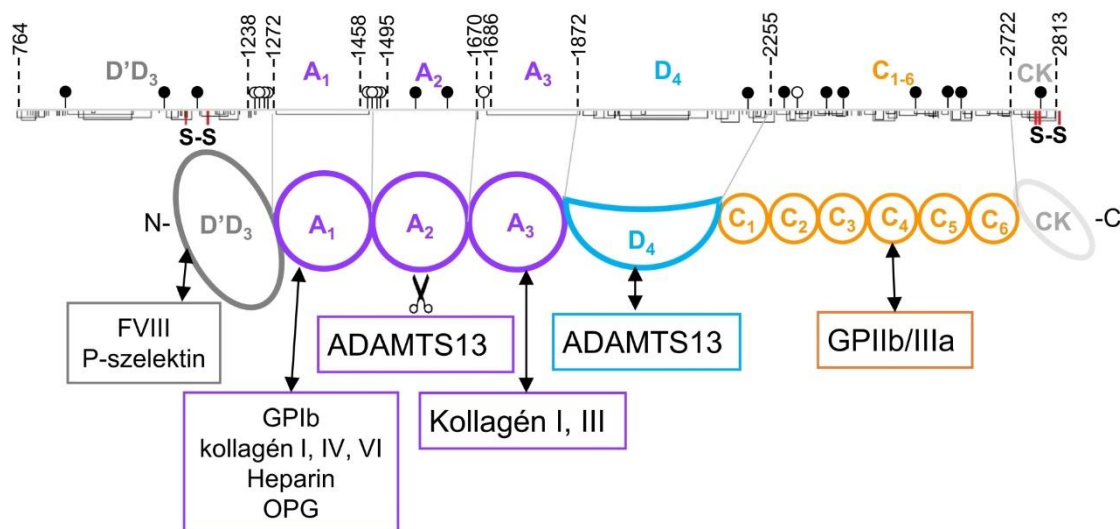
négy különböző típusú domént (A,B,C,D) írtak le, későbbi vizsgálatok során viszont azt találták, ahogy a B domének szerkezetileg a C doménekhez hasonlítanak. A **1. táblázatban** összefoglaltuk a VWF domének aminosav szekvenciájának számát és fizikai hosszukat. A D domének több modulból (VWD, C8, TIL, E, D4N) állnak, az viszont nem egyértelmű, hogy ezeknek van-e elkülönülő funkciójuk (23, 24). A VWF-ban nagy mennyiségben (8,3%) fordul elő cisztein, ami a szerkezetet stabilizáló diszulfid hidak alakítja ki (25). A VWF glikoprotein, az N- és O-glikozil csoportok a tömegének kb. 20%-át teszik ki. Az érett alegységen összesen 13 N- és 10 O- glikozilációs hely van, melyekre ~100 féle N- és 18 féle O-glikán struktúra kerülhet. Ezek nagyrésze szializált, az N- (13%) és O-glikánok (27%) AB0 vércsoport epitópokat tartalmaznak (26, 27).

**1.táblázat.** A VWF monomer domének aminosav-szekvencia száma és fizikai hosszuk. A domén határokat Rauch és munkatársai publikációjából vettük át (24, 28). Az elméleti letekeredett kontúrhossz kiszámításához egy aminosavmaradék hosszának 0,38 nm-t vettünk (29).

VWF domén	N-terminális aminosav határ	C-terminális aminosav határ	Aminosavban kifejezett hossza	Elméleti letekeredett kontúrhossz (nm)
Szignál peptid	1	22	22	8,36
D1	23	385	362	137,56
D2	386	763	377	143,26
D'	764	864	362	137,56
D3	865	1270	405	153,9
A1	1271	1479	208	79,04
A2	1480	1672	192	72,96
A3	1673	1872	199	75,62
D4	1873	2254	381	144,78
C1	2255	2333	78	29,64
C2	2334	2402	68	25,84
C3	2429	2496	67	25,46
C4	2497	2577	80	30,4

VWF domén	N-terminális aminosav határ	C-terminális aminosav határ	Aminosavban kifejezett hossza	Elméleti letekeredett kontúr hossz (nm)
<b>C5</b>	2578	2646	68	25,84
<b>C6</b>	2647	2722	75	28,5
<b>CK</b>	2723	2813	90	34,2

A VWF különböző doménjei jól meghatározott helyein tudnak eltérő partnerekhez kötődni (**1. ábra**). A keringésben D'D<sub>3</sub> doménhez kötődik a FVIII, amely kinyúlt vagy kollagénhez kötött VWF-hoz kevésbé kötődik (30). A vérlemezkék GPIb receptora a VWF A<sub>1</sub> doménjén keresztül tud kapcsolódni. A GPIb kötőhelye az A<sub>1</sub> doménon egy kriptikus kötőhely, mely nagy nyírófeszültség esetén válik hozzáférhetővé a megnyúlt multimer lánc mentén. A kötőhely alacsony affinitású állapota 21 pN felett nagy affinitású állapotra vált, a két konformációs állapot között 0,6-0,8 nm különbség van (31). Az A<sub>1</sub> domén fiziológias pH-n pozitívan töltött, a GPIb negatívan töltött felszínén kívül más negatív töltésű molekulákhoz is tud kapcsolódni, pl. heparinhoz vagy heparán szulfáthoz (32). Az A<sub>1</sub> doménhez kötődik az oszteoprotegerin (OPG) is, amellyel a tárolóhelyen komplexet képez a VWF (33). Stimulus hatására a VWF komplexben szekretálódik a keringésbe, így az OPG is jelzője lehet az endotél érintő folyamatoknak (34). Az OPG a tumor nekrosis faktor szuperfamília egy tagja, amely hatással van a csontvelő metabolizmusra, az endokrin funkciókra és az immunrendszerre (35). Az OPG plazma koncentrációja összefügg az ateroszklerózis súlyosságával (36), és az akut koronáriás események kimenetelével (35).



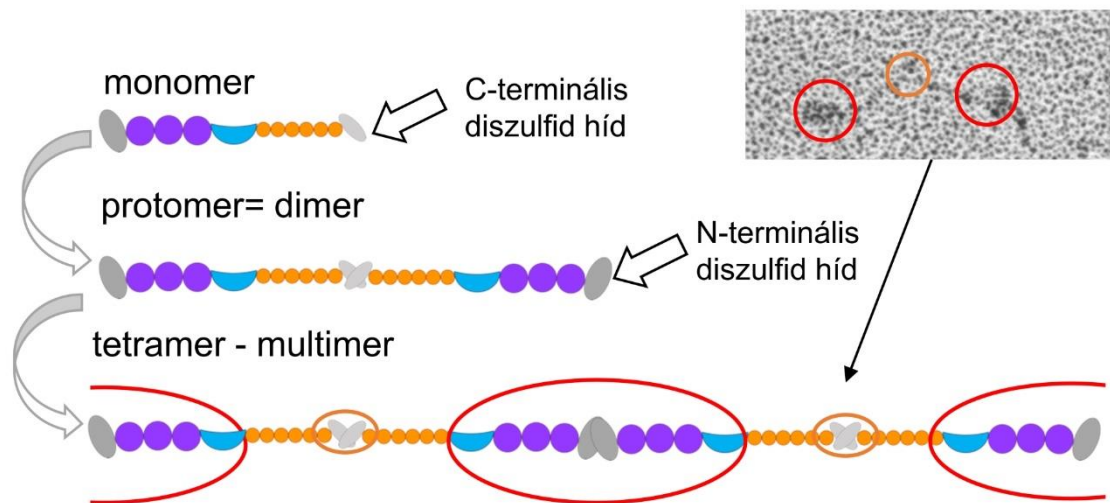
**1. ábra.** A VWF monomer doménszerkezete. A doméneket a szokásos D'D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK jelölés helyett alsó indexben jelöltük, mivel ez a későbbiekben könnyítette az eredményeink bemutatását. Az ábrán nincs feltüntetve a D'D3-hoz kapcsolódó propeptid (D<sub>1</sub>D<sub>2</sub> domének) melyet a multimerizáció után hasít le a furin. A doménszerkezet feletti vonalon a számok a domének és az azokat összekötő szakaszok határait jelölik. Az N- és O-glikozil csoportok a teli és üres karikákkal vannak jelölve a vonal mentén. A vonal alatti függőleges vonalak a ciszteineket jelölik, amelyek diszulfid hidak esetén össze vannak kötve egymással. A C-terminális végen a dimerizációban részt vevő 3 cisztein, illetve az N-terminális végen a multimerizációban részt vevő 2 cisztein pirossal van jelölve. A domének alatt a kötőpartnereiket jelöltük, illetve az ollóval jelölt helyen az ADAMTS13 hasítási helyet.

Az A<sub>2</sub> doménen van a VWF-t specifikusan hasító enzim, az ADAMTS13 hasító helye, mely Tyr1605-Met1606 között hasítja a VWF-t. Az ADAMTS13 a VWF D<sub>4</sub> doménjéhez tud kötődni, de csak nagy nyírási feszültség esetén történik olyan konformáció változás mind az A<sub>2</sub> doménben mind az ADAMTS13-ban, hogy a hasítás is megtörténik (30). Az A<sub>3</sub> doménen van a fő kötőhely a kollagén számára, mely segíti a VWF kitapadását a nagy sebességgradiensű helyeken. Az A<sub>3</sub> domén a kollagén pozitívan töltött felszínéhez tud kötődni (37).

### 1.1.5 Szintézis, tárolás és elimináció

A VWF az endotél sejtekben és a megakariocitákban szintetizálódik. Első lépésként a szignál peptid segítségével a naszcens fehérje-riboszóma komplex eljut az

endoplazmatikus retikulum (ER) membránjához, hogy a fehérje többi része már az ER lumenben szintetizálódjon. A fehérje feltekeredése már kotranszlációsan elkezdődik az N-glikozilációval együtt, melyet az oligoszahariltranszferáz végez. A VWF feltekeredésében a calnexin vagy a szolubilis calretikulin chaperon fehérjék vesznek részt. Miközben a protein diszulfid izomeráz A3 izoformája létrehozza a feltekeredéshez szükséges diszulfid hidakat. A dimerizáció az ER-ben pH = 7,4 környezetben a C-terminális CK domének között létrejövő három diszulfid híd kialakulásával történik, amit a protein diszulfid izomeráz A1 izoformája katalizál (38).



**2. ábra.** A VWF multimerizációja. A monomerek a C-terminális CK domének között létrejövő diszulfid hidak által dimerizálódnak. A dimerek az N-terminális D'D<sub>3</sub> domének közötti diszulfid hidakon keresztül multimerizálódnak. Az ábrán nincs feltüntetve a D'D<sub>3</sub>-hoz kapcsolódó propeptid (D<sub>1</sub>D<sub>2</sub> domének), melyet csak a multimerizáció után hasít le a furin. A transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képeken (39) és a multimer sematikus rajzán jelöltem azokat a doméneket, melyek a multimeren periodikusan megjelenő kis (narancssárga keret) és nagy (piros keret) csomókat alkotják.

Ezt követően a VWF dimerek átkerülnek a Golgi-apparátusba és végbemegy az N-glikozil csoportok módosítása valamint a felszíni hidroxil csoportok O-glikozilációja. A dimerek multimerizációja során a Golgiban - ahol a pH = 6,2 - két diszulfid híd jön létre az N-terminális D'D<sub>3</sub> domének között, melyet a VWF saját oxidoreduktáza katalizál (**2. ábra**). Végül a furin lehasítja a propeptidet (D<sub>1</sub>D<sub>2</sub> domének), amely majd a VWF multimerrel együtt szekretálódik a keringésbe (38).

A VWF multimerek a szekréciót megelőzően az endotélsejtek Weibel-Palade testecskéiben vagy a megakariocitákból képződő vérlemezkék  $\alpha$ -granulumaiban tárolódnak. A VWF az endotélből három módon szekretálódhat. Az egyik a bazális szekréció, mely során az ultranagy multimerektől a dimerig minden méretű VWF szekretálódik, mely 2/3 része a keringés, 1/3 része az extracelluláris mátrix felé szekretálódik. A multimerek egy kis része konstitutív módon, az extracelluláris mátrix felé szekretálódik. Ebben az esetben főleg alacsony molekulásúlyú (LMW) multimerek szekretálódnak. Ezen kívül az endotélből még lehetséges a stimulus hatására történő szekréció, mely során a keringésbe ultranagy multimerek kerülnek (25). Az szekréciót követően a VWF multimereket a plazmában a különböző enzimek, mint az ADAMTS13, plazmin, neutrofil elasztáz és trombin elhasítják (40, 41). A vérlemezkék  $\alpha$ -granulumaiban a teljes VWF mennyiség kb. 25%-a van tárolva, mely a vérlemezkék aktiválódásakor szekretálódik a keringésbe (25).

A VWF féléletideje a keringésben kb. 16 óra, de egyénenként elég eltérő lehet. A VWF féléletidejét az AB0 vércsoport nagyban befolyásolja. A nem-nullás vércsoport esetén a VWF féléletideje hosszabb, és valószínűleg emiatt magasabb a plazma VWF koncentráció a nem-nullás vércsoportú egyénekben. A különböző féléletidő valószínűleg összefügg azzal, hogy a VWF glikozil csoportjain jelen vannak az AB0 csoportoknak megfelelő epitópok. A VWF eliminációja a májban és lépben, a makrofágokon keresztül, receptor-mediált módon zajlik (25).

## **1.2 Az atomierő-mikroszkópia működésének alapjai**

Az atomierő-mikroszkópia (AFM) a pásztázó tűszondás mikroszkópiák egy típusa, mely során a képalkotás a minta és a tűszonda között kialakuló atomi és molekuláris kölcsönhatásokon alapul. Heinrich Rohrer és Gerd Binnig 1986-ban fizikai Nobel-díjat kaptak a pásztázó alagútmikroszkópia feltalálásáért (42). A pásztázó alagútmikroszkóp egy pásztázó tűszonda segítségével képes letapogatni az elektromosan vezetőképes minta felszínét. Binnig és munkatársai 1986-ban publikálták az AFM leírását, mely lehetővé teszi nem-vezetőképes anyagok pásztázását is (43).

Az AFM esetében a tű egy rugólapka végén helyezkedik el. A rugólapka elmozdulását a róla visszaverődő lézernyaláb segítségével megnövelve egy helyzetérzékelő fotodetektorral mérjük. Az AFM-nek változatos felhasználási lehetőségei vannak, két

gyakori alkalmazása a képalkotás és az erőmérés. Továbbiakban az AFM-nek a munkám során alkalmazott üzemmódjait fejtem ki részletesebben.

Az AFM képalkotó üzemmódjai közül biológiai minták esetén a tapogató vagy non-kontakt módot használjuk, mert kíméletes pásztázást biztosít. Ilyenkor a rugólapkát a sajátfrekvenciájához közeli frekvencián, a minta felett rezegtetjük a beállított amplitúdóval és így történik a pásztázás. A rugólapka rezgetése piezoelektromos kristályra kapcsolt váltóárammal van vezérelve. Amikor a tű közel kerül a mintához az atomi kölcsönhatások miatt a rugólapka sajátfrekvenciája eltolódik, így a rezgés amplitúdója csökken. Visszacsatoló rendszer érzékeli az amplitúdóváltozást, és olyan távolságban igyekszik tartani a rugólapkát a felszíntől, hogy a rezgés amplitúdója az eredetileg beállított értéken maradjon. A rugólapka folyamatosan változó X-Y-Z irányú helyzetéből a minta topográfiai képét alkotja meg a program.

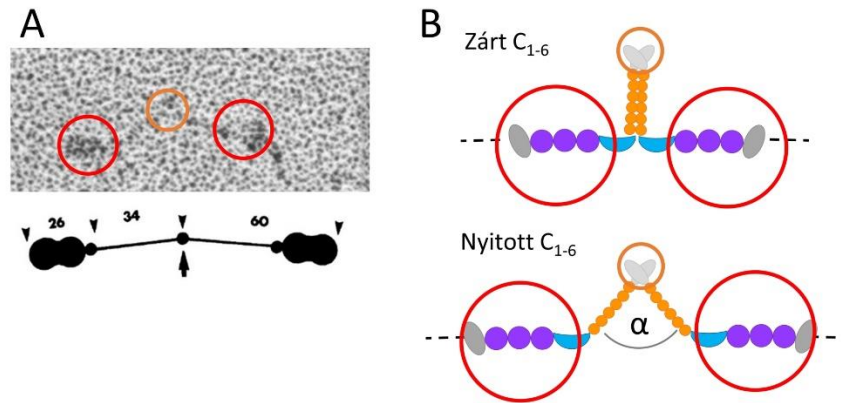
Az AFM rugólapka hegyes tüje kontakt módban alkalmas a minta nanoméretű manipulációjára. A felszínhez megfelelő erővel nyomott rugólapka elmozdítható, mely során érintkezve a mintával, elmozdítja, vagy elvágja azt. A nanomanipuláció előtt és után, nem kontakt módban készült képek elemzése szolgáltat eredményt. Ilyen technikával többen tártak fel korábban nem ismert szerkezeti részleteket, pl. DNS-en (44), fibrilláris fehérjéken (kollagén (45), fibrinen (46), intermedier filamentumon (47)), titin óriásfehérjén (48) és sejteken (49). Mivel a tűt sok esetben csak vágásra használták, ezért ezt a módszert nanodisszekciónak is nevezik. A nanodisszekciót különböző célból végzetek, volt, ahol a látható szerkezetet manipulálták, de más kísérletekben éppen a látható struktúrák eltávolítására és ezzel az alsóbb rétegek feltárására alkalmazták.

### 1.2.1 A VWF szerkezete és funkciója közötti kapcsolat

A multimer a keringésben véletlenszerűen feltekeredett láncként (random coil) kering, melyben a monomerek között csak gyenge kölcsönhatások vannak jelen (50, 51). Fényszóráson alapuló módszerekkel meghatározták a VWF hidrodinamikai sugarát, amely átlagosan ( $\pm$  SD)  $68,2 \pm 19,2$  nm volt a  $9,6 \pm 3,7$  MDa molekulasúlyú multimerek esetén, melyek kb. 20 dimer egységből állnak (52).

A VWF multimerek első transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képein, már látható volt a molekula periódikus szerkezete (53), de ezt csak később hozták kapcsolatba a doménnel (39). Ezekben a VWF mintát a felszínre permetezték, ennek során a multimerek megnyúlhattak. A képeken hajlékony fonálszerű szerkezet figyeltek meg,

amelyen kisebb és nagyobb csomók helyezkedtek el szabályos távolságokban. A multimerek végén általában nagy csomó volt, ebből arra következtek, hogy ez felel meg az N-terminális végnek. Ahol ez hiányzott, az valószínűleg az ADAMTS13 hasításának következménye. A kisebb csomót a C-terminális végekkel azonosították. A TEM képek alapján a protomer hossza 120 nm (39) (**3.A ábra**). Későbbi TEM és AFM vizsgálatok megerősítették ezeket a feltételezéseket (54-56).



**3. ábra.** A VWF protomer szerkezete transzmissziós TEM képek alapján. (A) Fowler és munkatársai 1985-ös publikációjában szereplő TEM képen egy protomerból álló multimer látható. Alatta sematikus rajz a szerkezetéről és a méretéről. A nagy csomó 26 nm, a pálcaszerű rész a C-domén kar (C<sub>1-6</sub> domének) 34 nm (39). (B) A protomerek két C-domén kar között kialakuló kölcsönhatás miatt zárt konformációt vesznek fel a Golgiban a szintézisük során, de a keringésben, fiziológiás pH-n főleg nyitott állapotban vannak. A C-domén karok által bezárt  $\alpha$  szög 0 - 180° között változhat.

AFM vizsgálatokban a VWF konformációját jelentősen befolyásolja, hogy milyen kölcsönhatás van a minta rögzítésére alkalmazott felszín és a multimer között. A negatív töltéssel rendelkező, hidrofil csillám felszínen a VWF multimerek enyhén szétterült konformációban tapadnak le. Ezt a kölcsönhatást valószínűleg jelentősen befolyásolja a VWF és a csillám felszín közötti vízréteg, mivel míg dehidrált állapotban stabilan a felszínen maradtak a multimerek, addig hidratált állapotban az AFM tú könnyen el tudta azokat mozdtítani (57, 58). Hidrofób oktadecil-triklór-szilán felszínen a VWF kompakt szerkezetben tapadt ki, amelyben a multimerláncok átlapolnak, valamint a nem átlapoló részeken a csomók és az azokat összekötő szakaszok magassága alacsonyabb volt, mint a csillám felszínen (59).



Siedlecki és munkatársai AFM-mel megfigyelték, hogy áramlási kamrában a VWF adott nyíróerő ( $31,5 \text{ dyn/cm}^2$ ) felett kinyúlik a csillám felszínén (58). Ezen multimerek axiális tengelye mentén csomókat figyeltek meg, amelyeket a doménszerkezetnek tulajdonítottak, de a protomereket nem azonosították. Seyfried és munkatársai plazma eredetű és rekombináns VWF-t vizsgáltak, relaxált állapotban a multimerek méreteloszlása alapján a rövidebb multimerek ( $< 300 \text{ nm}$ ) domináltak mindkét esetben. Áramlási kamrában is vizsgálva ezeket a multimereket, a nagy sebességgradiensnek ( $7345 \text{ s}^{-1}$ ) kitett multimerek egy része megnyúlt és hosszuk eltérte a  $2300\text{-}2800 \text{ nm}$ -t (60). Későbbiekben ez a munkacsoport további kísérleteket végzett áramlási kamrában megnyújtott multimereken. Ezeket összehasonlítva a nyújtás nélkül rögzített multimerekkel azt látták, hogy a relaxált szerkezetben a nagy csomók kb. a csomó átmérőjének távolságában helyezkednek el egymástól ( $\sim 20 \text{ nm}$ ), míg megnyújtott multimerekben kb.  $100 \text{ nm}$ -re vannak egymástól, ami a protomerek hosszának felel meg (61). Ez  $20\text{-}30 \text{ nm}$  eltérés a protomerek hosszában valószínűleg az eltérő mintaelőkészítés miatt nem volt látható a fentebb említett, korai TEM vizsgálatokban (1, 39).

Egyedi dimerek AFM vizsgálata alapján nyugalmi helyzetben a C-domén karok a protomerek 35%-ban zárt, 65%-ban nyitott állapotban vannak, ilyenkor  $0 - 180^\circ$  közötti szöget zárnak be a C-domén karok (**3.B ábra**). A zárt C-domén törzs kb.  $36 \pm 7 \text{ nm}$  hosszú pH = 7,4 esetén (54, 55). Ez a zárt konformáció a D<sub>4</sub> domének közötti erős intermolekuláris kölcsönhatások miatt alakul ki és ennek felszakításához  $50 - 120 \text{ pN}$  erő szükséges, amely  $\sim 80 \text{ nm}$ -rel járul hozzá a dimer hosszának növeléséhez. A kölcsönhatást jelentősen befolyásolja a pH és a kétértékű kationok jelenléte (55). Ha a C-domének nyitott állapotban vannak, az felel meg a kb.  $100 \text{ nm}$  dimer hosszának. Az A<sub>2</sub> domének letekeredése (unfolding) monomerenként körülbelül  $45 \text{ nm}$ -rel növeli meg a hosszat, melyhez  $11\text{-}21 \text{ pN}$  szükséges. Ezek alapján a protomer akár  $200 \text{ nm}$ -re megnyújtható (55, 62, 63).

Wang és munkatársai mikrofluidikai cellában áramlásban követték a fluoreszcensen jelzett VWF multimerek megnyúlását és relaxációját. Mivel konfokális mikroszkópiával nem nyerhető nagy-felbontású szerkezeti információ a multimer szerkezetről, így az adott molekula különböző sebességgradienseknél jelentkező megnyúlását vizsgálták és a legnagyobb sebességgradiensnél mért hosszára normalizálták a többi hosszt. Ezzel százalékosan tudták kifejezni, hogy mekkora volt a multimer megnyúlása. Azt figyelték

meg, hogy a nagyobb méretű molekulák ugyanakkora sebességgradiensnél jobban megnyúlnak, mint a kisebbek (64). Ez abból adódik, hogy a molekulára ható erő függ a molekula sugarától (65). Ezeket a megfigyeléseket Bergal és munkatársai is igazolták *in silico* kísérletekkel, mely során azt találták, hogy a multimerek viselkedését a monomerek között gyenge kölcsönhatást feltételező modellel lehet a leginkább jellemezni (50), amelyet már optikai csipesszel végzett kísérletek eredményiből is sejteni lehetett (62).

## 2. Célkitűzések

A kutatásunk során a VWF mennyiségi és minőségi változását, valamint szerkezetét vizsgáltuk klinikai és alapkutatás szintjén: (I) két olyan betegcsoportban, ahol a multimerek mennyiségi és minőségi többlete trombotikus állapotra utalhat, valamint (II) humán plazma eredetű VWF multimer szerkezetének erő hatására történő változásait egyedi multimer molekulákon.

A következő kérdések és célok vezették a munkafázisainkat.

I. Jelzője-e az esetleges pretrombotikus folyamatnak a plazma VWF multimerek mennyiségi és minőségi többlete érkárosodással járó állapotokban?

1. Perifériás artériás betegségben (PAD) (a) a VWF-ral együtt szekretálódó oszteoprotegerin (OPG), valamint a VWF koncentrációja (VWF:Ag) és kollagén kötő aktivitása (VWF:CB) összefügg-e a betegség súlyosságával, (b) a VWF 0 és nem-0 vércsoport függő koncentráció különbsége igaz-e a kollagén kötő aktivitására is, (c) és az OPG koncentráció mutat-e vércsoportfüggést?
2. Radikális prosztatatektómián átesett betegekben, műtét előtt és után, amikor a tumor jelenléte, majd a műtéti érkárosodás protrombotikus állapothoz vezethet, mennyire változik a VWF:Ag, a VWF:CB és multimer eloszlás valamint az ADAMTS13?

II. Egyedi multimerek vizsgálata nagy felbontású atomerő-mikroszkóppal alapkutatás szintjén. Munkafázisok:

1. Humán eredetű VWF mintából kis és nagy molekulásúlyú multimereket tartalmazó frakciók szeparálása és karakterizálása.
2. A relaxált és molekuláris fésüléssel megnyújtott VWF topográfiájának jellemzése és összehasonlítása.
3. A megnyújtott VWF további lokális nyújtása és szakítása nanomanipuláció alkalmazásával, és azok analízise, jellemzése szerkezeti elemek szintjén.

### 3. Módszerek

#### 3.1 Biológiai minták kezelése

A plazmát 3,2% trinátrium-citráttal antikoagulált teljes vérből (Vacutainer vérvételi cső, Beckton Dickinson) preparáltuk. A vért 3000 RPM-mel 10 percig centrifugáltuk, hogy trombocita-szegény plazmát kapjunk. A plazma mintákat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A perifériás artériás betegek esetében a kutatást a marosvásárhelyi Megyei Sürgősségi Kórház etikai bizottsága hagyta jóvá. A kontroll csoportot a romániai Nemzeti Egészségügyi Felmérésen részvevő egyénekből választottuk ki. A radikális prosztatektómián átesett betegcsoport esetében a kutatást a Debreceni Egyetem etikai bizottsága hagyta jóvá (DE OEC RKEB/IKEB 2884-2008).

A betegmintákból az endotél károsodásra utaló VWF és OPG mennyisége változása mellett a VWF funkcióját jellemző további három paramétert mértük RP esetén (VWF:Ag, VWF:CB,  $M_{MW25}$ , ADAMTS13) és a PAD betegek esetén pedig a VWF két paraméterét (VWF:Ag, VWF:CB) és az OPG vércsoport szerinti változásait kontroll csoportot is bevonva elemeztük.

#### 3.2 A VWF multimerek elválasztása és tesztelése

##### 3.2.1 A VWF tisztítása

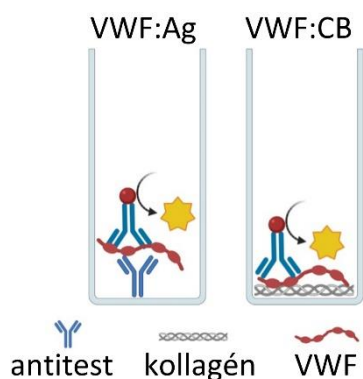
A humán plazma eredetű VWF multimereket terápiában használt koncentrátumból (Haemate P 1200 IU/500 IU, CSL Behring) tisztítottuk. A koncentrátum a VWF mellett nagy mennyiségű albumint is tartalmaz, amelytől el kellett választani. Az elválasztást HiTrap Heparin HP 1 ml (GE Healthcare) oszlopon végeztük, mivel a VWF  $A_1$  doménjével kötődik a heparinhoz (66), így affinitás alapján elválasztható az albumintól. Az oszlopra a VWF affinitás szerint kikötődött 10 mM HEPES pH = 7,35 pufferből. A kis és nagy molekulásúlyú (LMW, HMW) multimerek szeparálásához 0-500 mM NaCl gradienst használtunk az eluálás során. A HiTrap Heparin oszlop után egy Desalting 5ml (GE Healthcare) oszloppal távolítottuk el a nagy mennyiségű sót a VWF mellől. A tisztítást ÄKTApurifier FPLC rendszerrel (Amersham Biosciences) végeztük, az oszlop gyártójának ajánlása szerint 1 ml/perc térfogati áramerősséggel. Az elválasztás során 0,5 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. A frakciókat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A nagy molekulásúlyú

(HMW) multimereket tartalmazó frakciókat vizsgáltuk a későbbiekben, ezeket 20 µl-es alikvotokra osztottuk, az olvasztás-fagyasztás ciklusok fehérjekárosító hatásának elkerülése végett.

### 3.2.2 ADAMTS13 mennyiség, VWF mennyiség és funkció mérése

Az ADAMTS13 mennyiségének mérésére ADAMTS13 ELISA kittet használtunk (Technoclone GmbH, Austria).

A VWF mennyiségének és funkciójának tesztelésére ELISA módszereket alkalmaztunk, mely során a felszínhez kötött immunkomplexet enzimreakció segítségével mutattuk ki (**4. ábra**). A mintákban a VWF antigén mennyiségét (VWF:Ag) és a VWF kollagén kötő aktivitását (VWF:CB) vizsgáltuk. Mivel más VWF aktivitás tesztet nem végeztünk, ezért a továbbiakban aktivitás esetén a VWF:CB-t értem. A VWF mennyiségi meghatározásához poliklonális antitestet használtunk, míg a minőségi jellemzéséhez kollagént (67, 68). A VWF kollagénnel történő kötődése a HMW multimerek arányára utal a mintában, melyek a VWF funkciójához szükségesek a primer hemosztázisban.



**4. ábra.** ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) módszerek. A VWF:Ag méréshez poliklonális antitesttel, a VWF:CB méréshez kollagénnel fedtük a lemezt. Ehhez a hígított plazma mintából vagy a frakcióból kötődött a VWF, amit enzimmel jelzett antitest enzim-szubsztrát reakciójával detektáltunk.

A VWF:Ag és VWF:CB mennyiségeket % vagy IU/ml mennyiségben adja meg az irodalom leggyakrabban. A VWF:Ag µg/ml-ben is kifejezhető. Az WHO szerint definiálva 1 IU/ml vagy 100% megközelítőleg a normál populáció átlagértékének felel meg (69).

Első lépésként 96-lyukú nagy kötőképeségű mikrolemezt (Greiner) fedtünk egy éjszakán át 4 °C-on poliklonális anti-humán VWF 1:1000 hígítású antitesttel (A0082, DAKO) vagy 20 µg/ml P2 jelölésű kollagénnel. A fedéshez az oldatok 20 mM PBS (16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH:7.4) pufferben voltak hígítva. A

P2 kollagén placentából izolált, I-es és III-as típusú kollagén keveréke. Az 0,1% Tween-20-at tartalmazó PBS (PBS-T) pufferrel hígított frakciókat a fedett ELISA lemezbe mértük, amelyekből a VWF az antitesthez illetve a kollagénhez 1 órán keresztül 37 °C-on történő inkubálás során kötöttük hozzá. A kikötődött VWF-hoz tormaperoxidázzal jelzett poliklonális anti-humán VWF antitestet (1:2000 hígítás PBS-T-ben, P0226, DAKO) adtunk, mellyel 1 órán keresztül 37 °C-on végeztük az inkubálást. Az inkubálási lépések között a ki nem kötődött reagenseket PBS-T-vel történő mosással távolítottuk el. Az utolsó mosási lépést követően az antitesthez hozzáadtuk a tormaperoxidáz szubsztrát oldatot, ami 0,4 mg/ml OPD oldat (0,4 mg/ml OPD, 0,0257 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0243 mM citromsav, 0,012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH:5,0) volt. A frakcióban lévő VWF arányos a tormaperoxidáz enzimreakciója során elhasított OPD mennyiségével, amely színes terméket eredményezett. A reakció leállítása 20 perc után 2 M kénsavval történt. A sárga színű oldat abszorbanciájának mérése 490 nm-en Anthos Zenyth 200rt mikrolemes olvasóval (Biochrom) történt. A VWF:Ag és VWF:CB mennyiségeket standard sor alapján határoztuk meg (WHO International Standard NIBSC code: 09/182), illetve a normál és patológiás alacsony mennyiségek ellenőrzésére kontroll mintákat használtunk (Control Plasma N, Control Plasma P, Siemens Healthcare Diagnostics Products).

### **3.2.3 A VWF tisztaságának vizsgálata**

Az AFM vizsgálatokhoz fontos volt ismerni, hogy a minták milyen multimereloszlású VWF-t tartalmaznak, és hogy sikerült-e a VWF-t elválasztani az albumintól. Ez utóbbit SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőriztünk, melyhez a Mighty Small II SE250 (Hofer Scientific Instruments) rendszert használtuk, a gyártó leírása szerint készített pufferrendszerrel. 4% tömörítő és 7,5%-os szeparáló gélen történt a futtatás redukálószer jelenlétében. A gél kettévágtuk, az egyik felét Hofer Standard Comassie Brilliant Blue (CBB) leírása szerint festettük, mely nem specifikusan festi a fehérjéket. A gél másik felén immunoblottot végeztünk, amellyel specifikusan a VWF-t tettük láthatóvá.

### **3.2.4 A multimerek méreteloszlásának vizsgálata**

Nem redukáló SDS-agaróz elektroforézis során a multimerek molekulásúly szerint egymástól külön választhatók, specifikus festéssel detektálhatók, denzitometriával kvantifikálhatók, így a különböző méretű multimerek jelenléte és relatív mennyiségük

vizsgálható. Diagnosztikai szempontból a multimereket méretük vagyis az őket felépítő dimerek száma szerint csoportosítják kis- (LMW: 1-5 dimer), közepes- (IMW: 6-10), nagy- (HMW: 11-20 dimer) és ultra nagy molekulásúlyú (> 20 dimer) multimerekre (70). A multimerek méreteloszlását SDS-agaróz gélelektroforézis és immunoblot segítségével vizsgáltuk, korábban leírt módszer szerint (71).

Az elektroforézishez SeaKem HGT agarózt (High gelling temperature agarose for gel electrophoresis, Cat. No. 50040, Lonza) tartalmazó 0,8%-os tömörítő és 1%-os szeparáló gélt öntöttünk. A gélhez Lonza által javasolt Tris-borát puffereket használtunk, melyek a tank puffer (0,09 M Tris, 0,09 M bórsav, 0,1% SDS), a szeparáló gél puffer (0,5 M Tris, 0,16 M bórsav 1 M urea), és a tömörítő gél puffer (0,125 M Tris pH:8,0). A mintákat 1:1 arányban ureás minta pufferrel (8 M urea, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 2% SDS, 0,6% brómfenolkék, pH:8,0) hígítottuk meg és 20 percig 60 °C-on denaturáltuk. Lyukanként 10 µl mintát tudunk felvinni. A gélt horizontális kádban 20 mA/gél (2 mA/cm) –rel kb. 5 órán keresztül futtattuk, amíg a jelzőfesték elérte a gél végét. Az elektroforézis után a gélt 10 percen keresztül 1 mM β-merkaptóetanolt tartalmazó transzfer pufferrel kezeltük. Erre azért volt szükség, hogy a nagy multimereket redukáljuk, és így javítsuk a transzferüket a blottolás során. A blottolást Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD) készülékkel végeztük PVDF membránra (Immobilon-P, Cat.No: IPVH00010, Merck Millipore). A transzferhez a membránt a gyártó leírása szerint készítettük elő. A blottolás 1 órán keresztül 300 mA mellett történt. Ezután a membrán fehérjét nem kötött helyeit 3% kazeint tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk. PBS-T-vel történő mosás után a membránt tormaperoxidázzal jelzett poliklonális anti-humán VWF antitest 1:2000 arányban PBS-T-vel hígított oldatába (P0226, DAKO) helyeztük és egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. Másnap PBS-T-s mosás után a membránra szubsztrát (diamino-benzidin, DAB) oldatot (0,1 mg/ml DAB, 20 mM PBS-T, 0,006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) öntöttünk. A tormaperoxidáz reakciója során a DAB-ot hasítja és a hasítás helyén színes csapadék válik ki, melynek mennyisége arányos a membránhoz kötött antitest mennyiségével.

A különböző méretű multimerek sávjai eltérő sebességgel vándorolnak, a legkisebb méretű dimer a leggyorsabban, a nagy multimerek lassan. A relatív mobilitás (0-1, a jelzőfestéknek a szeparáló gél elejétől a futtatás végéig való vándorlási távolsága) függvényében ábrázolt denzitás görbén a multimer sávoknak megfelelő csúcsok

elkülönülnek IMW és LMW multimerek esetén. HMW multimerek esetén módszertől függően (elsősorban a szeparáló gél koncentrációja) változó, hogy mekkora molekulásúlyig különülnek el a sávok. A munkacsoportunk korábban kidolgozott egy módszert a multimerek eloszlásának jellemzésére a denzitometriás görbék alapján. A görbe integrálásánál nulla relatív mobilitástól számított 25%-ához tartozó relatív mobilitás értéknek megfelelő molekulásúly az  $M_{MW25}$  paraméter, mellyel a multimerek eloszlása számszerűen jellemezhető (71).

### 3.3 Atomierő-mikroszkópia (AFM)

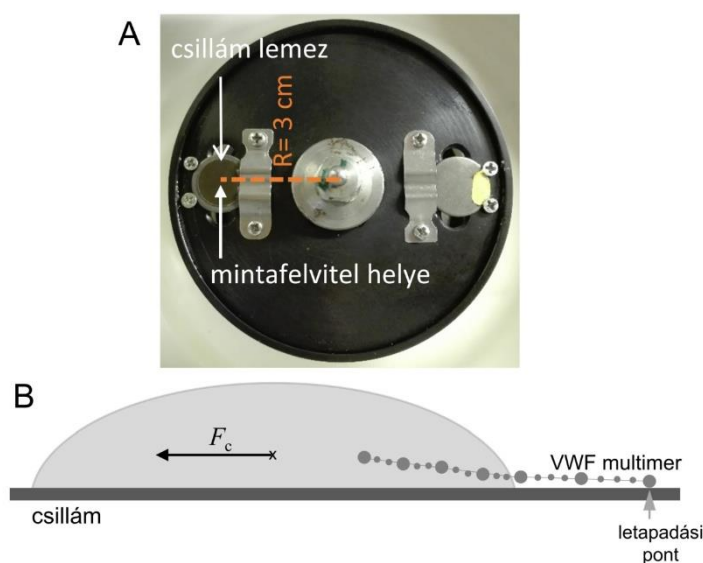
#### 3.3.1 A VWF minta előkészítése

A kísérlethez csillámpalát (Highest Grade V1 Mica,  $d = 12$  mm; TedPella) használtunk felszínként, amelyről a felső réteget ragasztó szalag segítségével frissen hasítottuk, hogy atomi simaságú felszínen dolgozzunk. A csillámpala felszíne negatívan töltött, hidrofil felszín. Bizonyos esetekben a csillámpalát pozitív töltéssel rendelkező poli-L-lizinnel (PLL) vontuk be. Ehhez  $100 \mu\text{l}$  0,01% PLL (mol wt 150,000-300,000; Sigma) oldatot inkubáltunk a felszínen 20 percig, majd MilliQ nagy tisztaságú vízzel (Merck Millipore) lemostuk és  $\text{N}_2$  gázzal megszáritottuk. A VWF-t kétféle módon rögzítettük a felszínen. Egyik esetben  $10 \mu\text{l}$  VWF oldatot ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  VWF:Ag PBS-ben) cseppentettünk a felszínre és 1 perc után vízzel lemostuk és megszáritottuk. Másik esetben a VWF molekuláris fészüléssel rögzítettük. Az AFM képalkotás előtt a mintákat exsikkátorban tartottuk. A mintaelőkészítés lépéseit  $23 \pm 2$  °C-on végeztük.

#### 3.3.2 Molekuláris fészülés

A molekuláris fészülés során a VWF-t erő hatásának kitéve kinyújtott állapotban tudtuk rögzíteni a felszínhez. A centrifugának erre a célra kialakított sík rotorjába rögzítettük a fémkorongra ragasztott csillámot. Ebben az elrendezésben a minta közepének távolsága a rotor tengelyétől  $r = 3$  cm.  $20 \mu\text{l}$  VWF oldat ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  VWF:Ag 1:1 arányú glicerin-PBS pufferben) felvitele után azonnal elindítottuk a gyorscentrifugálást (Biofuge Pico, Heraeus) (5. ábra). A mintafelvitelhez és a centrifuga bezárásához szükséges idő kb. 5 másodperc volt. A centrifuga 14 s alatt elérte a maximális 13000 RPM (5685g)-et, amelyen még 10 s-ig tartottuk. Ezt követően a centrifuga 10 s múlva állt meg. A mintát kivéve azt 1 percig mostuk spriccelő MilliQ vízzel és nitrogénnel szárítottuk.





**5. ábra.** VWF multimerek rögzítése csillám felszínre molekuláris fésüléssel. (A) Kísérleti elrendezés. (B) A molekuláris fésülés során a puffercsepp a centrifugális erő hatására elmozdul, és közben a VWF multimer rögzül a felszínen és megnyúlik.  $F_c$ -centrifugális erő.

A minta felcseppentésétől a centrifuga leállításáig különböző erők hatnak a multimerekre. A centrifugális erő a puffercseppre és a multimerre is hat. A közegellenállási erő a rögzült multimer hossz tengelye mentén hat, amikor a puffercsepp elmozdul rajta. A felületi feszültségből származó erő a meniszkusz visszahúzódása során hat. Ezeket az erőket ellensúlyozza a VWF és a felszín közötti adhéziós és súrlódási erő, valamint a VWF rugalmassága és intramolekuláris kölcsönhatásai.

### 3.3.3 Képképzés

A képképzéshez Cypher S (Oxford Instruments Asylum Research) AFM-et AC üzemmódban használtuk. A pásztázás levegőben szilícium rugólapkával (OMCL-AC160TS-R3, Olympus) történt. A rugólapka a tujének görbületes sugara  $r = 7$  nm, a rugólapka sajátfrekvenciája  $f_0 = 300$  kHz és a rugóállandója  $k = 26$  N/m. A pásztázás során a szabad amplitúdó 60-70%-ára állítottuk a célamplitúdót, a vonalmenti pásztázási frekvenciát pedig 0,7 Hz-re. A képek felbontása 512x512 pixel.

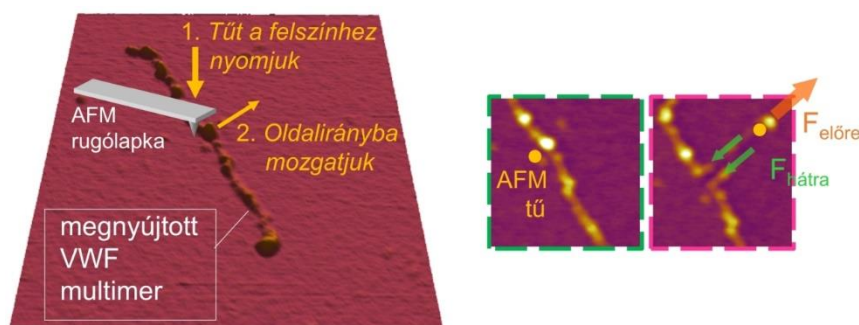
Néhány esetben a képképzés után a mintákat 100  $\mu$ l különböző koncentrációjú ditiotreitollal (DTT; 0,1 mM, 2 mM, 20 mM DTT PBS-ben oldva) kezeltük 10 percig. A

DTT a multimerben lévő diszulfid kötésekot redukálta. Ezt követően a mintákról mosás és szárítás után új képeket készítettünk.

Amikor a pásztázást pufferben végeztük (100  $\mu$ l PBS) BioLever mini (szilícium,  $r = 8$  nm,  $f_0 = 25$  kHz,  $k = 0,09$  N/m; BL-AC40TS-C2, Olympus) rugólapkát használtunk és szabad amplitúdó 60%-ra állítottuk a célamplitúdót.

### 3.3.4 Nanomanipuláció

A nanomanipulációhoz a VWF-t molekuláris fésüléssel rögzítettük a felszínen, viszont ebben az esetben a mintát nem tettük exszikkátorba, hanem standardizált idejű mosás és  $N_2$  szárítás után rögtön pásztáztuk és manipuláltuk. A manipulációt levegőben, kontakt módban végeztük OMCL-AC160TS-R3 rugólapkával, ugyanazzal, amellyel a manipuláció előtt és után is a képeket készítettük (6. ábra). Manipuláció során a rugólapka tuját a felszínhez nyomtuk (1) majd oldal irányba elmozdítottuk (2).



**6. ábra.** VWF multimer nanomanipulációja. Az AFM tű elmozdulása során az ellentétes irányba ható erők kiegyensúlyozzák egymást.

A kísérlethez kijelöltük a mozgás kezdeti pontját, irányát és távolságát, valamint a mozgás sebességét beállítottuk. A 10 nm/s, 100 nm/s és 1000 nm/s sebességek közül az eredmények alapján 100 nm/s-ot használtunk. A kísérletekben a tűt 150-600 nN erővel nyomtuk a felszínhez és a multimerre merőlegesen, az axiális tengelyétől maximum 300 nm távolságra húztuk meg.

### 3.3.5 Képanalízis

Az AFM szoftvere az Igor Pro 6.34 (WaveMetrics) alapú AR16 program, mellyel a képanalízis végeztük. A képeket a háttér simaságára és a színkontrasztra korrigáltuk. A molekulák magasságát a háttérhez képest mértük. A multimerek szélességét és a hézagok hosszát a tű és a minta konvolúciója alapján korrigáltuk (72). Az adatokat Excel 2016

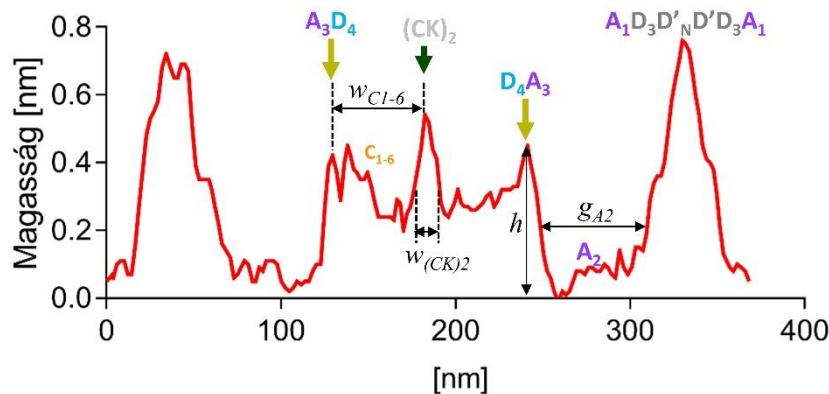
(Microsoft) és Prism 9 (GraphPad) programokkal dolgoztuk fel. A multimerek átlagos átmérőjét a pufferben készített képek alapján határoztuk meg. A topográfiai profilon mértük a multimerek magasságát (height,  $h$ ) és a magasság felénél a szélességet (width,  $w$ ). Mivel a multimer a kitapadás során ellapul a felszínen, így a keresztmetszete leginkább egy ellipszishez hasonlít. Ez alapján a VWF átmérője (diameter,  $d$ )

$$d = 2 \sqrt{\frac{A}{\pi}}, \quad (1)$$

ahol  $A$  az ellipszis területe, amely az ellipszis fél nagytengelyéből ( $a$ ) és fél kistengelyéből ( $b$ ) számolható, melyekre igaz, hogy  $a = h/2$  és  $b = w/2$ ,

$$A = ab\pi. \quad (2)$$

A  $C_{1-6}$  szakasz és az  $A_2$  vég-vég hossza a multimer hosszmenti topográfiai profilján mértük (7. ábra), mivel a megfigyeléseink alapján ezek a szerkezeti részek járultak hozzá a protomer megnyúlásához, amit az Eredmények fejezetben részleteztek.



**7. ábra.** A  $C_{1-6}$  szakasz és  $A_2$  hosszának mérése a topográfiai magasságprofilon. Egy PR7 (lásd Eredmények) protomerhez tartozó profilon mutatjuk be a mérést.  $w_{C1-6}$  - az  $A_3D_4$  és a  $(CK)_2$  csomóknak megfelelő csúcsok között lement távolság,  $w_{(CK)2}$  -  $(CK)_2$  csomó szélességéből,  $g_{A2}$  - a hézag mért hossza,  $h$  - az  $A_3$  csomó magassága

Az  $A_3D_4$  és a  $(CK)_2$  csomóknak megfelelő csúcsok között lement távolságból ( $w_{C1-6}$ ) és a  $(CK)_2$  csomó szélességéből (width,  $w_{(CK)2}$ ) meghatározható a  $C_{1-6}$  szakasz vég-vég hossza ( $w_{C1-6}$ ):

$$z_{C1-6} = w_{C1-6} - w_{(CK)2}. \quad (3)$$

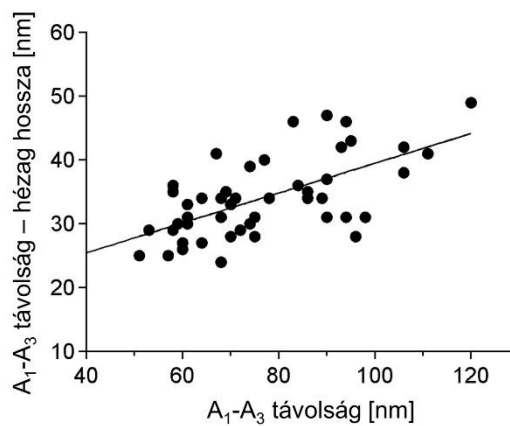
A letekeredett és megnyúlt  $A_2$  domén hosszát (*gap*,  $g$ ) az  $A_1$  és  $A_3$  domének közötti hézag hosszából ( $g_{A2}$ ) határoztuk meg, melyet a tű és a minta konvolúciója alapján korrigáltunk:

$$g = g_{A2} + 2\sqrt{2hr - h^2}, \quad (4)$$

ahol  $g_{A2}$  a hézag mért hossza,  $h$  az  $A_3$  csomó magassága,  $r$  a tű görbületi sugara. Ez a képlet csak nagy VWF megnyúlások esetén adta meg pontosan az  $A_2$  hosszát, amikor a hézag jól látható volt. Kevésbé megnyúlt multimerek esetén csak az  $A_1$  (N-terminális csomó) és  $A_3$  ( $A_3D_4$  csomó) csomók helyzete volt meghatározható. Ezekben az esetekben egy korrekciós faktort használtuk, hogy megkapjuk az  $A_2$  hosszát. A korrekciós faktor azon protomerek alapján határoztuk meg, ahol a  $g_{A2}$ -et meg tudtuk mérni.

$$\text{korrekciós faktor} = (A_1 - A_3 \text{ távolság}) - g, \quad (5)$$

ahol az  $A_1 - A_3$  távolságát az N-terminális csomó és az  $A_3D_4$  csomó csúcs-csúcs távolságának vettünk és  $g$  hézag hossza. A korrekciós faktor értéke nem volt állandó, az  $A_2$  megnyúlásával növekedett (**8. ábra**), ami arra enged következtetni, hogy az  $A_2$  melletti domének szerkezetében is voltak szerkezeti változások.



**8. ábra.** A korrekciós faktor ( $A_1$ - $A_3$  távolság- hézag hossza) változása az  $A_1$ - $A_3$  távolság függvényében.

Továbbiakban az  $A_2$  hossz kiszámításához a legkisebb  $A_1$ - $A_3$  távolsághoz tartozó korrekciós faktort (26 nm) használtuk, mivel feltételeztük, hogy az  $A_3D_4$  kis csomóban és az N-terminális nagy csomóban a nyújtás miatti szerkezeti változások ebben az esetben kevésbé jelentősek. A statisztikai számításokhoz nagyobb megnyúlások esetén az  $A_2$

hosszának a korrigált hézag hosszát ( $g$ ) vettük, míg kis megnyúlásoknál ( $A_1$ - $A_3$  csúcs-csúcs távolság  $< 50$  nm) úgy számítottuk az  $A_2$  hosszát, hogy az  $A_1$ - $A_3$  csúcs-csúcs távolságából levontuk a korrekciós faktor értékét (26 nm):

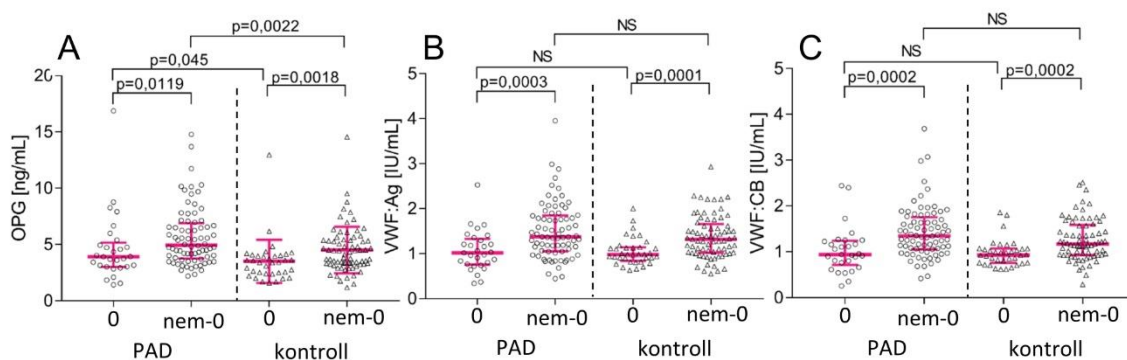
$$A_2 \text{ hossz} = (A_1 - A_3 \text{ távolság}) - 26 \text{ nm} \quad (6)$$

## 4. Eredmények

### 4.1 A VWF vizsgálata klinikai mintákban

A vérplazma VWF emelkedett koncentrációja sok kórképben igazolt. Klinikai kutató munkánk során két trombózis rizikóval rendelkező betegcsoport vizsgálatába kapcsolódtam be. A betegek plazma mintáiban a VWF koncentrációt (VWF:Ag) és a funkcionális tesztek közül a kollagén kötő aktivitást (VWF:CB) mértük, valamint egyik esetben az ADAMTS13 mennyiségét és a multimerek eloszlását is. Az eredményeket a betegségállapotot jellemző klinikai és rutin laboratóriumi paraméterekkel összevetve értékeltük.

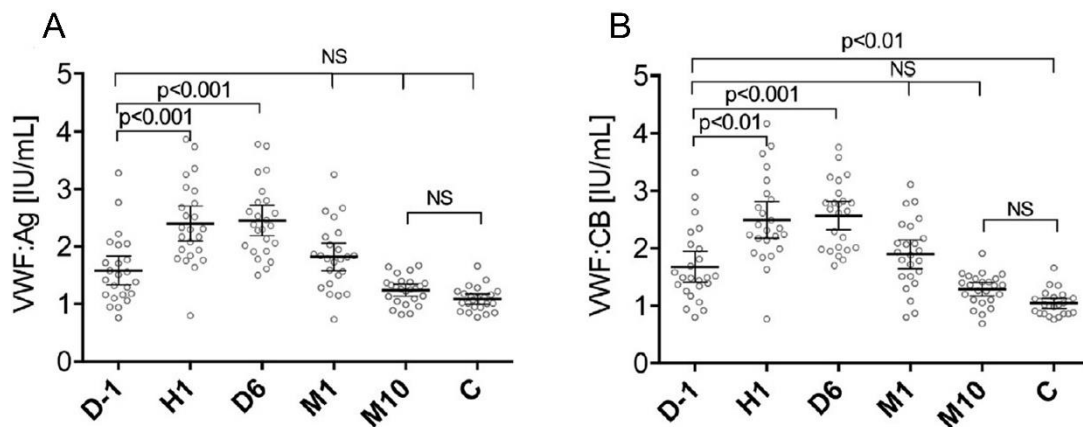
Perifériás artériás betegség (PAD) jellemzésére szolgáló adatok közül mértük az oszteoprotegerin (OPG) koncentrációt, ami a PAD súlyosságával hozható összefüggésbe, és ehhez köthetően vizsgáltuk a VWF:Ag-t és VWF:CB-t. PAD-ban az OPG, a VWF:Ag és VWF:CB AB0 vércsoporttól való függését is tanulmányoztuk (14). A PAD és a kontroll csoportot is kettéosztottuk, aszerint, hogy nullás vagy nem nullás a vércsoportjuk. A PAD csoport esetén 29 beteg nullás, 76 nem-nullás és a kontroll csoport esetén 36 személy nullás, 73 személy nem-nullás vércsoportú volt. A csoportokat Mann-Whitney és Spearman-féle rangkorrelációs teszttel hasonlítottuk össze.



**9. ábra.** Perifériás artériás betegek (PAD) és kontrollok AB0 vércsoport szerint 0 és nem-0 csoportok plazma mintáiban mért (A) Oszteoprotegerin (OPG) koncentráció, (B) VWF koncentráció (VWF:Ag), és (C) kollagén kötő aktivitás (VWF:CB). Az adatokon jelöltük a mediánt és az interkvartilis tartományt. A csoportok között összehasonlítás eredményét az adatpontok felett tüntettük fel. NS- nem szignifikáns.

Mind az OPG, a VWF:Ag koncentráció és a VWF:CB aktivitás magasabb volt a PAD betegcsoport esetén a kontrollokhoz képest, bár csak az OPG esetén volt szignifikáns a különbség. Az OPG pozitív korrelációt mutatott a VWF:Ag-nel és a VWF:CB-vel a beteg és a kontroll csoportban egyaránt. A nem nullás vércsoport esetén a PAD és kontroll csoportban is szignifikánsan magasabb volt az OPG, a VWF:Ag és a VWF:CB, mint a nullás vércsoportban (**9. ábra**). Megfigyeltük továbbá, hogy a vércsoport jelentősen befolyásolta a korrelációt az OPG és a VWF:CB között. A nullás vércsoportú egyénekben (n=65) nem volt korreláció az OPG és VWF:CB között ( $r = 0,017$ ,  $p = 0,891$ ). A nem-nullás vércsoportú egyénekben (n = 149) a korreláció az OPG és VWF:CB között szignifikáns volt ( $r = 0,28$ ,  $p < 0,001$ ).

Radikális prosztatatektómián (RP) átesett betegek plazmájában a VWF: Ag és VWF:CB mellett a multimerek eloszlását és az azt befolyásoló ADAMTS13 mennyiségét is vizsgáltuk (20). A 24 betegen prosztata adenokarcinóma miatt végeztek RP-t. A minták különböző időpontokban lettek levéve. A műtét előtti napon (D-1) levett minta a beteg kezdeti állapotát jellemzi. A műtét után egy órával (H1) a műtét közvetlen hatását, hat nappal (D6) a műtét utáni periódust, az immobilizáció hatását, egy hónappal (M1) a már csökkent arányú trombózis rizikót és tíz hónappal (M10) a teljes felépülést jellemzik a mintákban a VWF előbbi paraméterei. A kontroll csoport 24, kor és AB0 vércsoport szerint, valamint az egyéb kiválasztási szempontok szerint a betegcsoportnak megfelelő egészséges férfi.

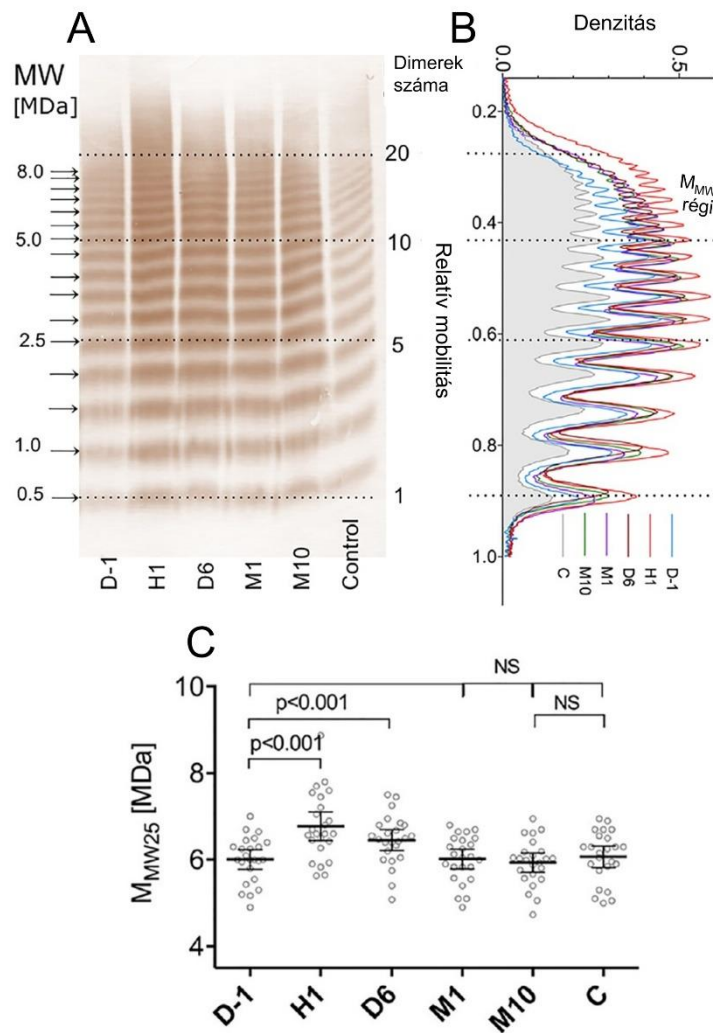


**10. ábra.** A VWF antigén (A, VWF:Ag) és kollagén kötő aktivitás (B, VWF:CB) változása radikális prosztatatektómia előtt és után. Az x tengelyen a mintavétel időpontja és a kontroll csoport (C) vannak jelölve. D-1: 1 nappal műtét előtt, H1: 1 órával, D6: 6 nappal, M1: 1 hónappal és M10: 10 hónappal a műtét után levett minta. Az ábrán az

*adatok átlaga és szórása van jelölve. A különböző időpontban vett minták és a kontrollok adatait Dunn teszttel hasonlítottuk össze. Felül az adatok közötti eltérés szignifikanciáját jelöltük. NS- nem szignifikáns*

A műtét előtti napon levett mintában is emelkedett volt a VWF:Ag és VWF:CB is a kontroll csoporthoz (C) képest, bár ez az eltérés csak a VWF:CB esetén volt szignifikáns. A műtét után már egy órával szignifikánsan magasabb volt a VWF:Ag és VWF:CB is a kezdeti állapothoz képest. Ez egy hónap után már lecsökkent a kezdeti állapot szintjére, 10 hónap után pedig a kontroll csoport szintjére (**10. ábra**). Az ADAMTS13 mennyiségének a VWF:Ag-re vonatkoztatott arányai a VWF:Ag-nel azonos statisztikai erősséggel, de indirekt módon változtak (20) (Ezek az eredmények nincsenek a dolgozatban bemutatva, mert nem vettem részt az ADAMTS13 mérésben). A multimer eloszlást az elektroforézis kép denzitometriás görbéinek analízise alapján számszerűsítettük. Ehhez az  $M_{MW25}$  paramétert használtuk, amely a görbe alatti terület felső 25%-nak a határához tartozó relatív mobilitás molekulaszúlyban (MW) kifejezve. A multimer analízis alapján a műtét előtt a betegek plazmáiból multimer eloszlása a kontrollokéhoz hasonló volt. A  $M_{MW25}$  érték, amely a HMW multimerek arányát jellemzi a mintában a VWF:Ag és VWF:CB értékekhez hasonló módon változott (**11. ábra**).

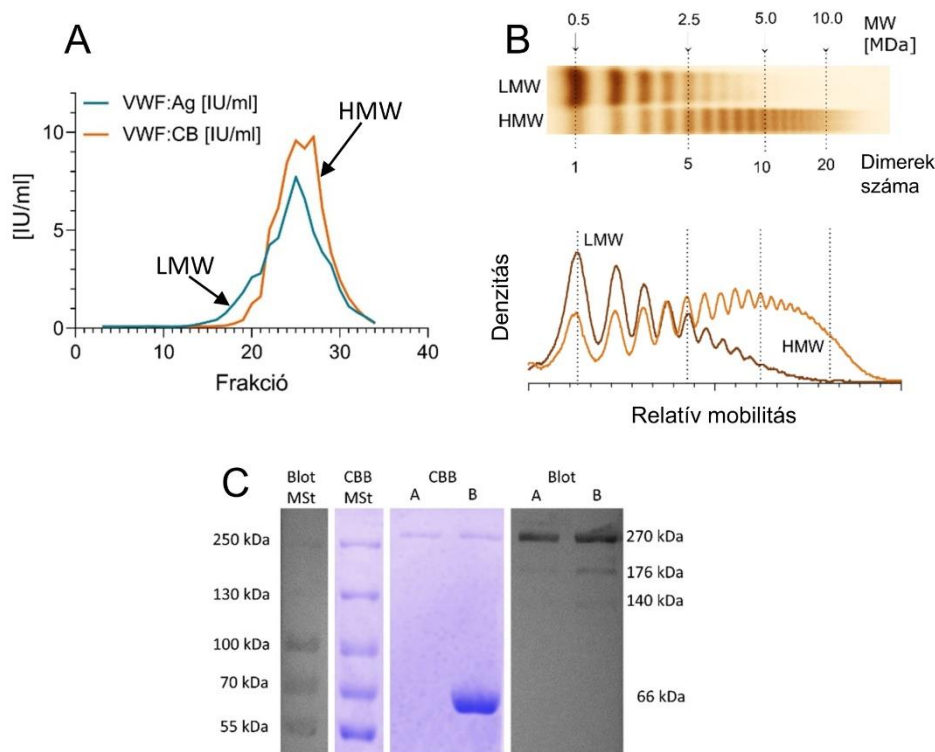




**11. ábra.** VWF multimer eloszlás változása radikális prosztatatektómia perioperatív periódusában. (A) Egy beteg különböző időpontokban levett mintái és egy kontroll minta VWF multimer eloszlása SDS-agaróz elektroforézis képen. A kép jobb oldalán az adott sávban található multimereket felépítő dimerek száma, baloldalon az ennek megfelelő molekulásúly (MW) van jelölve. (B) Az elektroforézis képhez tartozó denzitometriás görbék. A denzitometriás görbék alatti terület felső 25%-hoz tartozó relatív mobilitás molekulásúlyban kifejezett értékével ( $M_{MW25}$ ) jellemeztük a multimereloszlást, amelynek az értékei az ábrán jelzett régióban voltak. (C) A betegek különböző időpontban levett mintáinak és a kontrolloknak  $M_{MW25}$  értékei. Az átlagokat és a 95%-os konfidencia intervallumot jelöltük az ábrán, az adatok közötti különbség szignifikanciájával. NS- nem szignifikáns.

## 4.2 Az egyedi molekula vizsgálatokhoz használt VWF minta jellemzői

A VWF egyedi molekula vizsgálatához fontos volt, hogy tiszta VWF mintánk legyen és tartalmazzon nagy molekulásúlyú (HMW) multimereket, amelyek szükségesek a VWF hemosztázisban betöltött szerepének ellátásához.



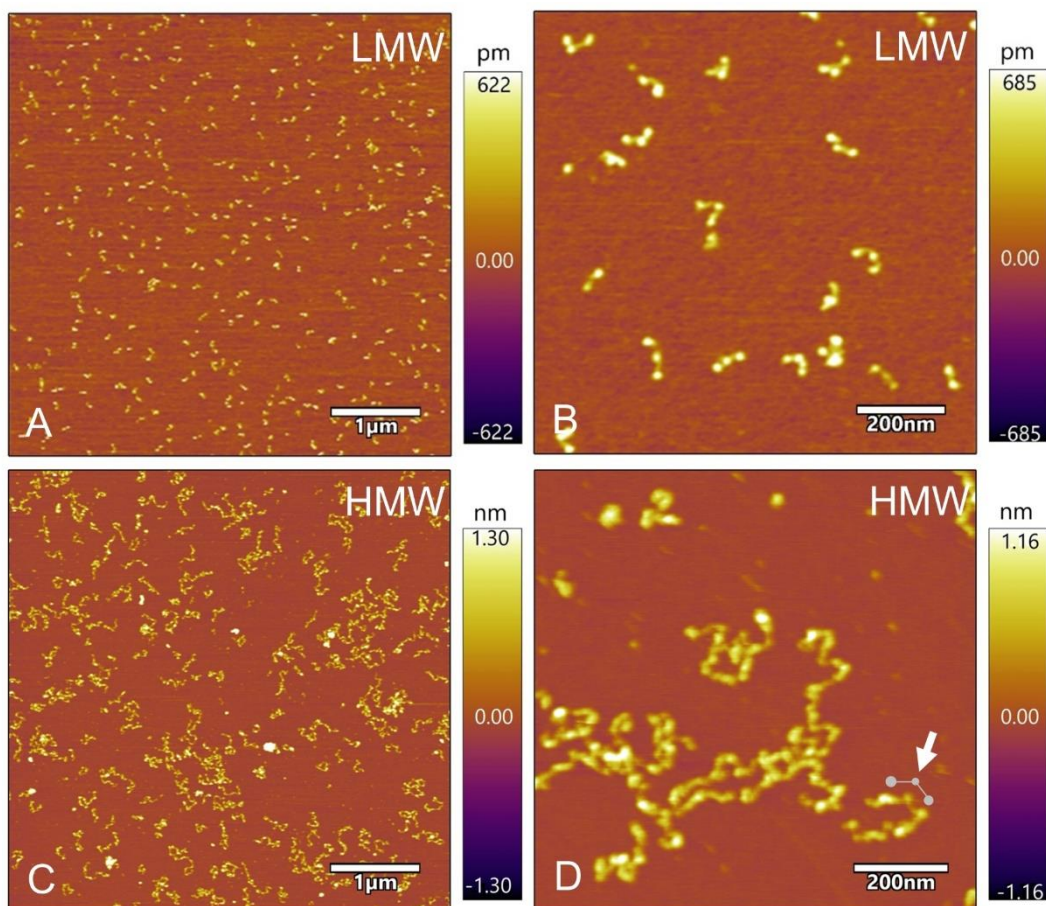
**12. ábra.** A tisztított VWF frakciók jellemzése. (A) A VWF:Ag és VWF:CB a frakciókban. (B) A multimer eloszlás vizsgálata SDS-agaróz elektroforézissel. A minta egy kis (LMW) és egy nagy (HMW) molekulásúlyú multimereket tartalmazó frakció. A gélkép felett a sávoknak megfelelő molekulásúly (MW), alatta a dimerek száma van feltüntetve. A gélkép alatt a minták denzitometriás görbéi láthatók. (C) A VWF minta tisztítás után (HMW frakció, A) és a kiindulási anyag (Haemate P, B) SDS-PAGE-en. A mintát vagy Coomassie (CBB) festéssel vagy immunoblottal tettük láthatóvá és molekulásúly standardhoz (MSt, bal oldal) hasonlítottuk. A fehérje komponenseknek megfelelő molekulásúly a jobb oldalon van feltüntetve. A VWF sávok: a monomer 270 kDa és ADAMTS13 hasítási termékek 176 és 140 kDa. Az albumin sáv: 66 kDa.

A tisztítás során gyűjtött frakcióknak VWF:Ag és VWF:CB módszerekkel meghatároztuk a mennyiségét és a kollagén kötő aktivitását (12.A ábra). A VWF:CB/VWF:Ag aránya normál plazmában egy körüli, ha ez az érték  $< 0,7$ , akkor az a

HMW multimerek hiányára utal (73). A 21-esnél kisebb sorszámú frakciókban  $VWF:CB/VWF:Ag < 1$ , vagyis LMW multimereket tartalmaznak ezek a frakciók, míg a nagyobb sorszámú frakciókban  $VWF:CB/VWF:Ag > 1$ , így a HMW multimerek ezekben vannak nagyobb arányban. A HMW multimerek jelenlétét SDS-agaróz elektroforézissel vizsgáltuk, melyen látható, hogy a HMW mintánkban jelen vannak a  $> 20$  dimerből álló multimerek (**12.B ábra**). A minta tisztaságát, amelyet SDS-PAGE-vel vizsgáltunk (**12.C ábra**). A Comassie (CBB) festéssel láthatóvá vált, hogy a frakcióban nincs jelen az albumin, amely az eredeti mintában nagy mennyiségben megtalálható. A VWF-nak megfelelő sáv tartalmát immunoblottal is ellenőriztük, amelyen láthatóvá vált a VWF monomernek megfelelő sáv 270 kDa-nál és a VWF ADAMTS13 hasítási termékeinek sávjai 176 és 140 kDa-nál.

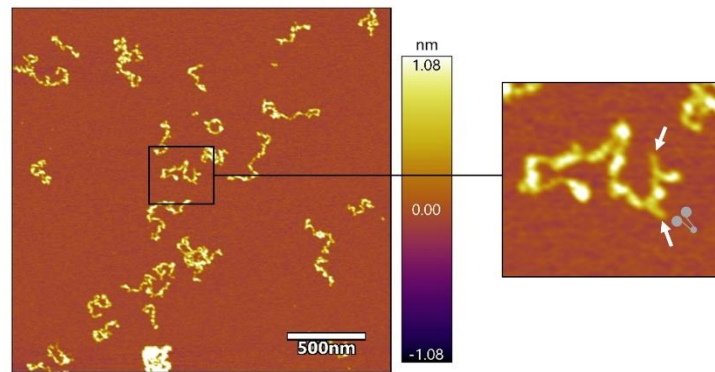
### **4.3 A VWF relaxált szerkezetének vizsgálata AFM-mel**

Az LMW és HMW multimereket tartalmazó frakciókból kitapadt multimerek AFM kép alapján is jelentősen eltértek. Az LMW multimereket tartalmazó frakciókban kis nagyításnál csak pontszerű struktúrák figyelhetők meg, a HMW multimerek esetén már kis nagyításnál is jól látható a felszínen a gyöngysorszerű struktúra, melynek hossza széles tartományban változik (**13. ábra**).



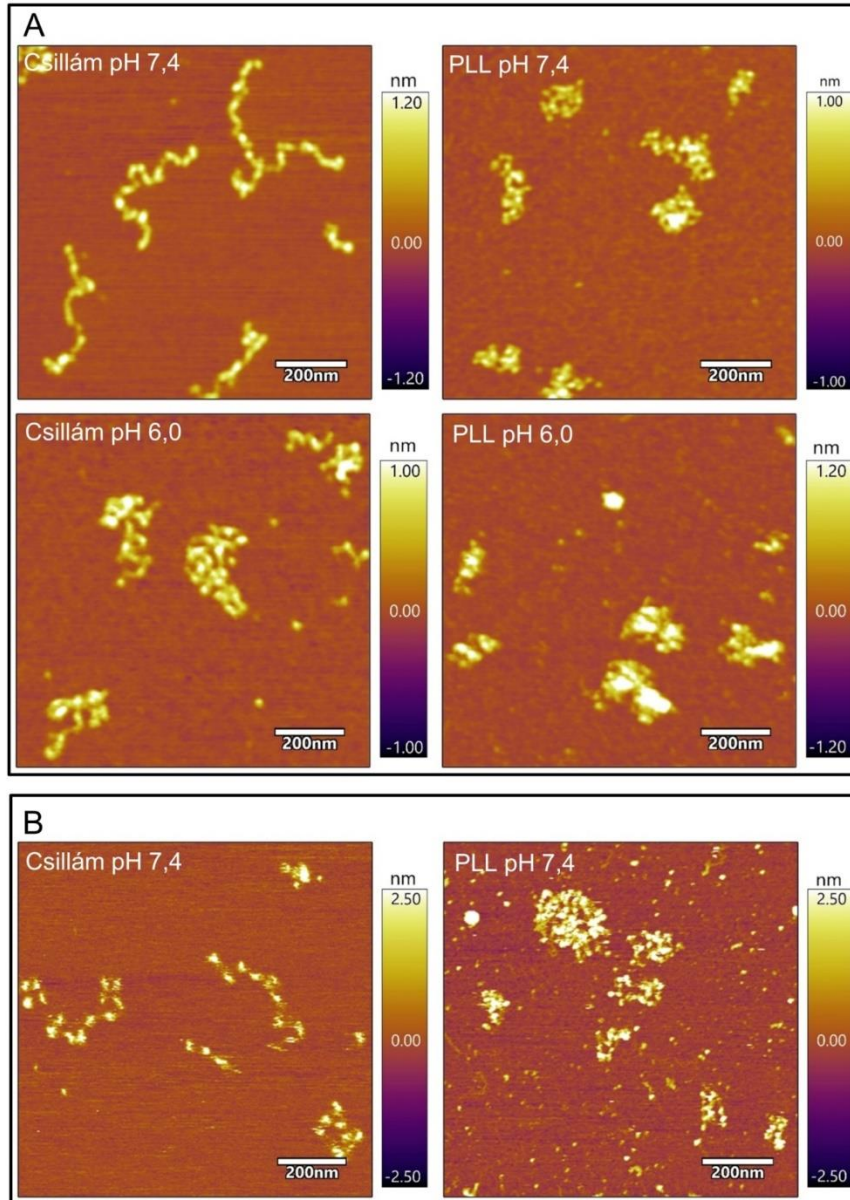
**13. ábra.** AFM magasságkép a VWF multimerek relaxált szerkezetéről. (A) Kis molekulásúlyú (LMW) multimereket tartalmazó frakció kisebb és (B) nagyobb nagyításnál. (C) Nagy molekulásúlyú (HMW) multimereket tartalmazó frakció kisebb és (D) nagyobb nagyításnál. A multimeren belül egy nyitott állapotú dimer szerkezetet fehér nyíllal jelöltük, mellette a dimer sematikus rajza látható (szürke körök és vonalak).

Az LMW multimerek néhány csomóból állnak, melyeket vékony szakaszok kötnek össze (13.B ábra). A HMW multimereknél ez a szerkezet sokkal hosszabb, több csomóból áll, és véletlenszerűen feltekeredett láncként (random coil) rögzül a felszínen (13.D ábra). A multimereket alkotó dimerek nyitott (13.D ábra) és zárt (14. ábra) állapotban is lehetnek, melyet több tényező befolyásol, pl. a kétértékű kationok jelenléte vagy a pH. Csillám felszínen a vizsgált multimereknek ( $n = 625$ ) csak egy kis része, ~5% tartalmazott zárt állapotú dimereket.



**14. ábra.** Zárt dimer szerkezetek a HMW multimereket tartalmazó mintában. A kisebb nagyításnál egy HMW multimereket tartalmazó frakció magasságképpen kiválasztottunk egy zárt dimer szerkezeteket tartalmazó multimert, mely nagyításán a zárt szerkezeteket fehér nyilakkal jelöltük, mellette a dimer sematikus rajza látható.

A multimerek rögzülését a felszín is jelentősen befolyásolja. Míg a negatív töltésű csillám felszínen a multimerek egy lazább, valamelyest szétterült formában rögzültek, addig pozitív töltésű PLL felszínen kompakt szerkezetet mutattak (**15. ábra**). Ez a kompakt szerkezet előnytelen a protomerek azonosítása szempontjából, így a csillámfelszínen rögzített multimereket analizáltuk részletesen. Irodalomból ismert, hogy a pH szintén befolyásolja a dimerek szerkezetét, alacsony pH-n inkább a zárt szerkezet jellemző. Megfigyeltük, hogy mind csillám, mind PLL felszín esetén kompaktabb konformációban rögzültek a multimerek, ha  $\text{pH} = 6,0$ , mint ha  $\text{pH} = 7,4$ .

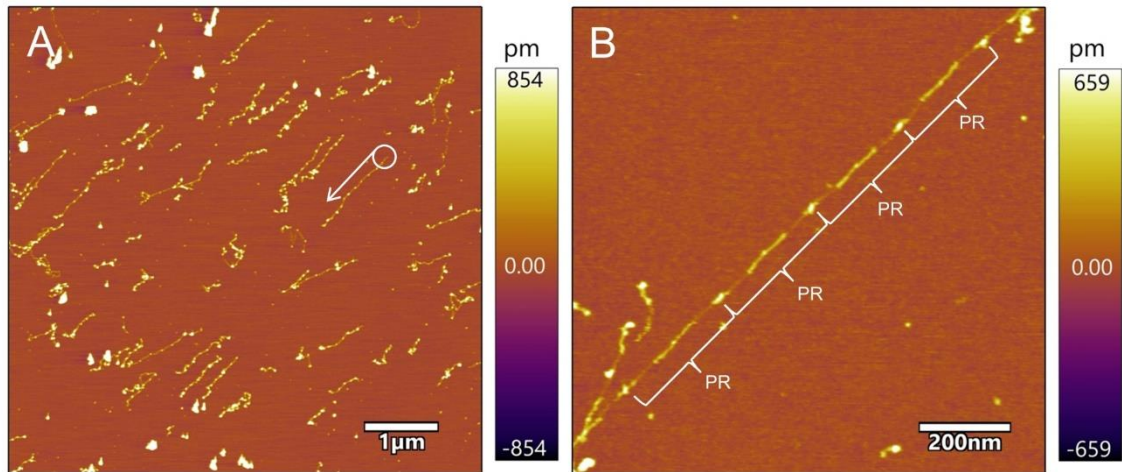


**15. ábra.** VWF multimerek szerkezete csillám és poli-L-lizin (PLL) felszíneken. Különböző pH-jú PBS-ből rögzített VWF multimerek (A) levegőben és (B) pufferben készített magasságképei.

#### 4.4 A VWF megnyújtott szerkezetének vizsgálata

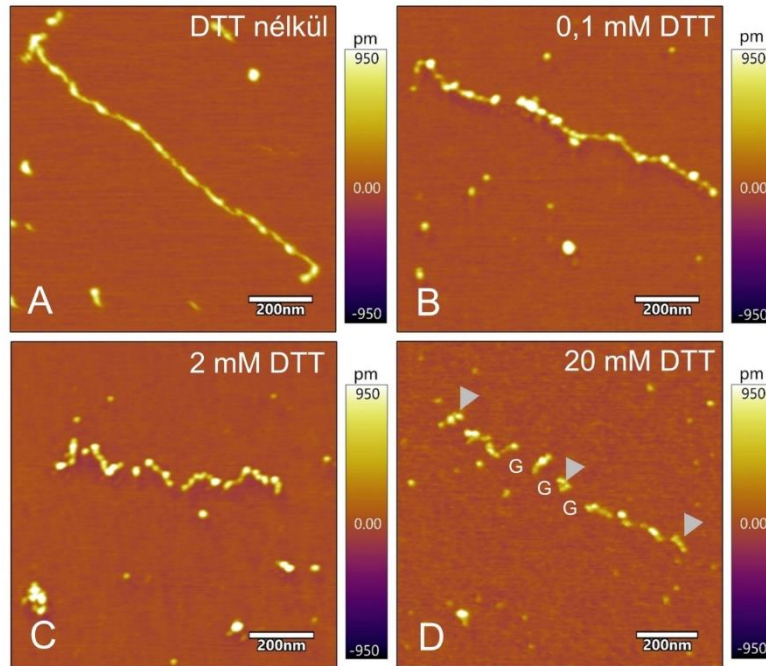
A VWF multimereket molekuláris fésüléssel nyújtottuk meg, mely után a multimerek megnyúltak és orientálódtak (16. ábra). A megnyújtott multimereken is megfigyelhető a gyöngysorszerű struktúra, de a csomók eltávolodtak egymástól, azaz az összekötő szakaszok nyúltak meg. A multimereken tükröszimmetrikus ismétlődő egységek

figyelhetők meg. Ezeket az egységeket a multimer különböző mértékben megnyúlt protomereiként (PR) azonosítottuk.



**16. ábra.** Molekuláris fésüléssel megnyújtott VWF multimerek. **(A)** A multimerek a centrifugális erő irányában orientálódnak. A fehér kör a multimer kitapadásának helyét jelöli a nyíl pedig a centrifugális erő irányát. **(B)** Nagyobb nagyításnál a multimereken ismétlődő egységek (protomerek, PR) azonosíthatók.

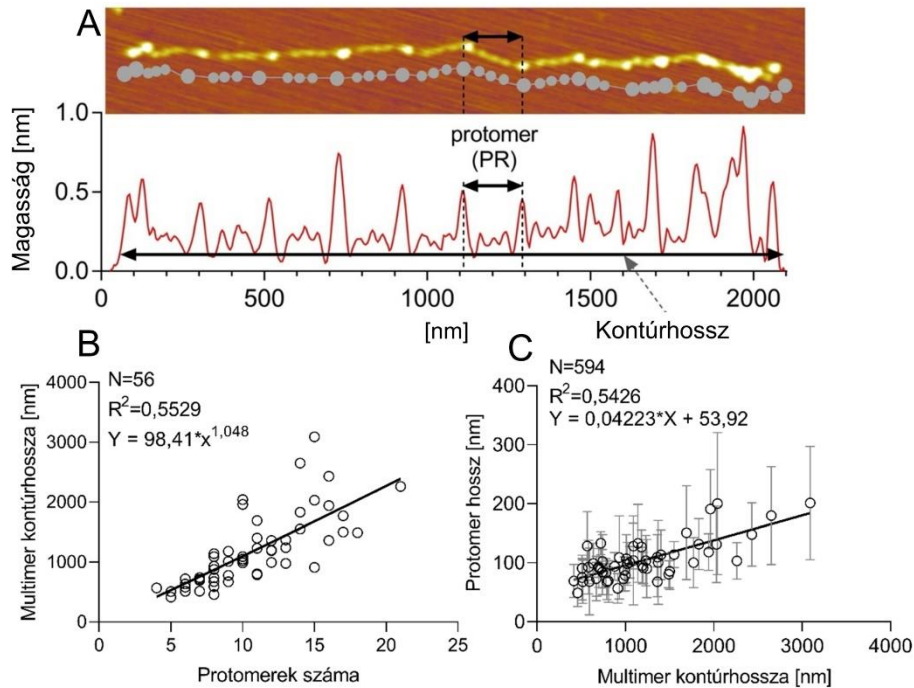
A protomerek diszulfid hidakkal vannak összekötve, ezért, hogy igazoljuk, hogy az egységek valóban a protomerek, redukálószerrel (DTT) kezeltük a megnyújtott multimereket. A növekvő DTT koncentrációval a multimerek egyre kisebb egységekre fragmentálódtak (**17. ábra**). Magas DTT koncentrációnál a fragmentumok között hézagok („G”-gap, **17.D ábra**) jelentek meg a fragmentumok relaxációja miatt. A fragmentumok a felszínen maradtak a kezelés után, ami utal a multimer több ponton történő letapadására.



**17. ábra.** Ditiotreitól (DTT) kezelés hatása a megnyújtott multimerekre. (A) Molekuláris fészüléssel rögzített multimer DTT kezelés előtt és (B) (C) (D) kezelés után. A mintát 10 percig (B) 0,1 mM, (C) 2 mM és (D) 20 mM DTT-vel kezeltük, majd lemostuk és megszáritottuk a képkalkotás előtt. A szürke nyilak az egyedi protomereket jelölik, a „G” (gap) a topográfiai hézagokat a fragmentumok között.

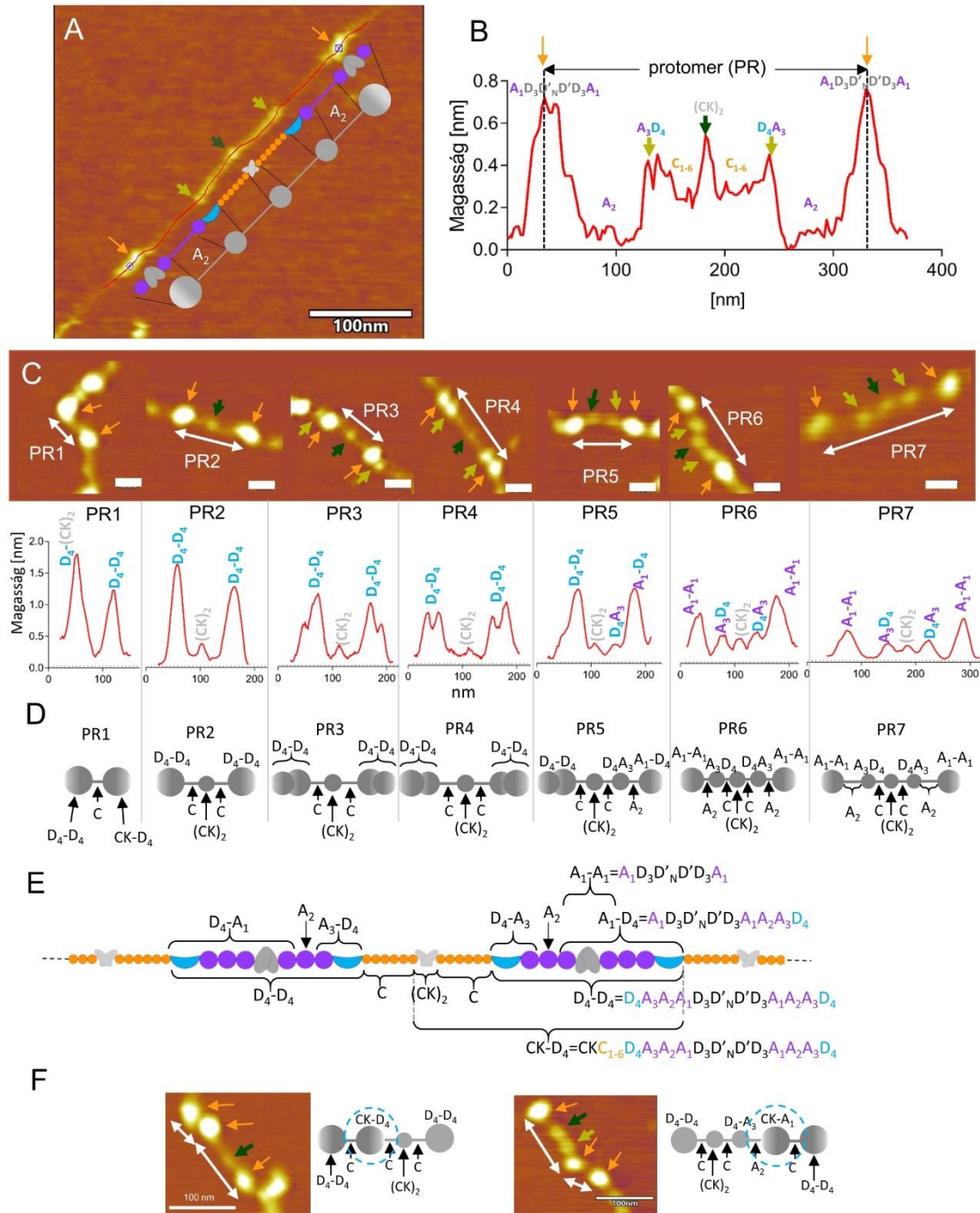
A protomer határai az adott szakaszon megtalálható legmagasabb csomók (nagy csomók), e csomók közötti távolság pedig a protomer hosszának felel meg (18.A ábra). A multimer kontúrhossza hatványfüggvény szerint nő a felépítő protomerek számától függően (18.B ábra). Ez arra enged következtetni, hogy a multimer kontúrhossza nem a protomerek elméleti hosszának összege, hanem az egyedi protomerek megnyúlása is befolyásolja a teljes multimer hosszát. A mért protomerhossz nem állandó, hanem a multimer hosszával növekszik (18.C ábra). Az adatok lineáris illesztése alapján a nyugalmi protomerhossz ~54 nm, és ez 4 nm-rel növekszik a multimer 100 nm-rel történő hosszabbodásával.





**18. ábra.** A protomerek hosszúságának elemzése a megnyújtott multimerekben. (A) Egy megnyújtott multimer AFM magasság képe és a gyöngysor szerkezet sematikus rajza szűrkével. Alatta a multimer magasságprofilja, amin két nagy csomó közötti részt azonosítottuk a VWF protomereként (PR). (B) A multimer kontúrhossza a multimer felépítő protomerek számának függvényében. (C) A magasságprofilon mért protomerhossz a multimer kontúrhosszának függvényében. Az ábrán az átlag és a szórás van feltüntetve.

Az AFM képek jó felbontása lehetőséget biztosított a domének valószínű azonosítására. Topográfiai konformációja szerint hét protomer konformert különítettünk el és soroltunk osztályokba (PR1-PR7). A domének helyzetének meghatározását a leginkább megnyúlt tükörszimmetrikus szerkezeten mutatjuk be, melyben a protomert határoló két nagy csomó között három kisebb csomó figyelhető meg (**19.A-B ábra**). A közepen elhelyezkedő kis csomó a (CK)<sub>2</sub> domének felel meg, ettől két oldalt szimmetrikusan a másik két kis csomó az A<sub>3</sub>D<sub>4</sub> doménekkal azonosítható. A 7 protomer konformert egy-egy példán a **19.C-D ábrán** mutatunk be. A domének pontos sorrendjét a csomókban a **2. táblázatban** mutatjuk be. A fő konformerek szimmetrikusak, de megfigyeltünk aszimmetrikus konformereket is (**19.F ábra**).



**19. ábra.** A konformációs állapotok hozzárendelése a VWF protomerekhez. **(A)** Egy nagymértékben megnyúlt VWF protomer AFM képe. Az AFM ábra alatt a protomer doménszerkezetét, alatta szürke csomós szerkezetét mutatják a sematikus rajzok. A narancssárga nyilak az N-terminális nagy csomóit jelölik, amelyek ebben az esetben az  $A_1D_3D'D_3A_1$  doméneknek felelnek meg. A sötétzöld nyíl a középső,  $(CK)_2$  kis csomót jelöli, míg a világoszöld nyilak az  $A_3D_4$  doméneket tartalmazó kis csomókra mutatnak. Az AFM képbe rajzolt vékony piros vonal mentén vettük fel a magasságprofil. **(B)** A

protomer magasságprofilja, melyen a függőleges szaggatott vonalak a nagy csomók közepét jelölik, ezek között lemértük a protomer hosszát. Az AFM képpel azonos szinkódolású nyilak a doméneknek megfelelő csúcsokat jelölik a magasságprofilon. (C) Példák a megnyúlásuk alapján hét csoportba osztott protomerekre. A csoportok növekvő megnyúlás szerint vannak rendezve. A méretskála a PR1-PR6 esetén 40 nm, PR7 esetén 60 nm. A nyilak szinkódolása az (A) résszel megegyező. (D) A protomer csoportok sematikus rajzai, ahol az egy csomót alkotó doméneket körök, az összekötő vékony szakaszokat vonalak jelölik. A protomerek domén jelöléseit az (E) részen mutatjuk be. (F) Példák aszimmetrikusan megnyúlt protomerekre.

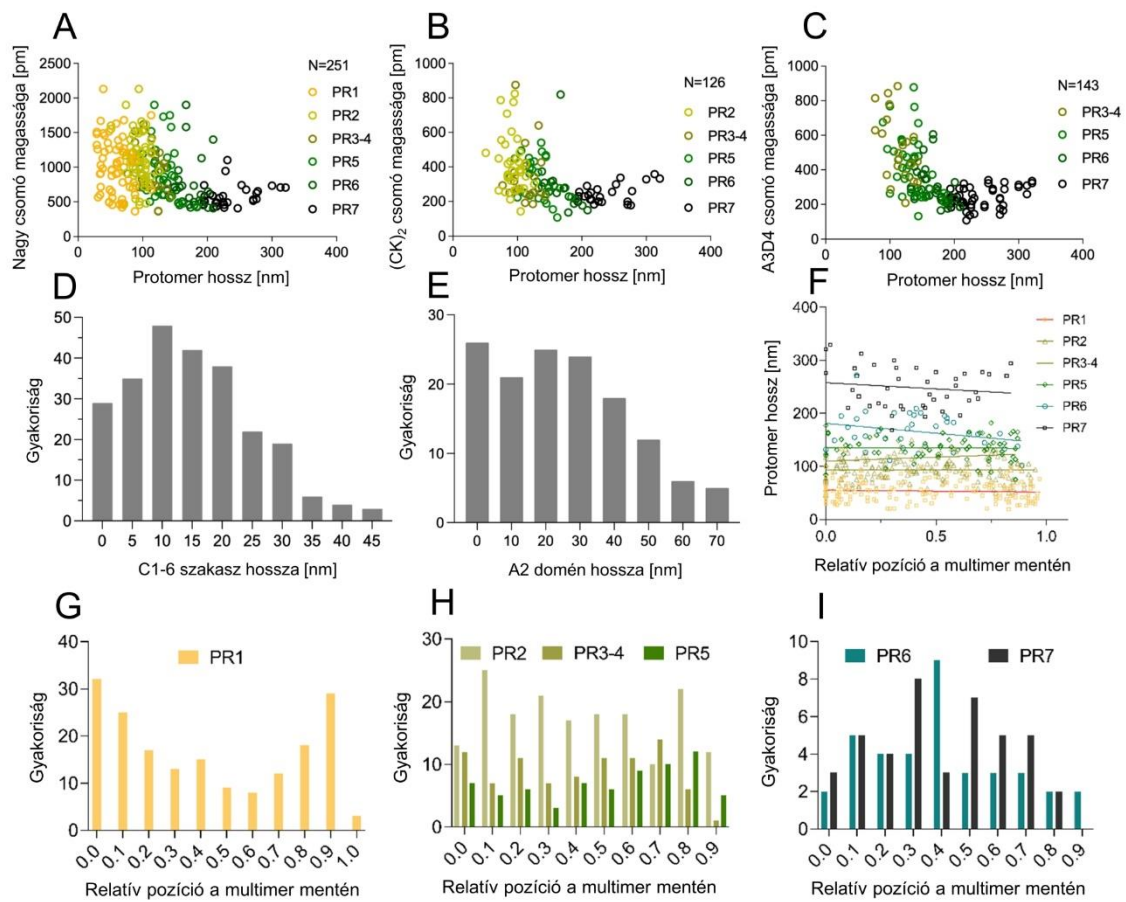
## 2. táblázat. A domének sorrendje a különböző protomer csoportokban.

PR1: --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--C <sub>1-6</sub> --((CK) <sub>2</sub> C <sub>1-6</sub> D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--
PR2: --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--C <sub>1-6</sub> --(CK) <sub>2</sub> --C <sub>1-6</sub> --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--
PR3: --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--C <sub>1-6</sub> --(CK) <sub>2</sub> --C <sub>1-6</sub> --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--
PR4: --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--C <sub>1-6</sub> --(CK) <sub>2</sub> --C <sub>1-6</sub> --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--
PR5: --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--C <sub>1-6</sub> --(CK) <sub>2</sub> --C <sub>1-6</sub> --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> )--A <sub>2</sub> --(A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )-- --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> )--A <sub>2</sub> --(A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--C <sub>1-6</sub> --(CK) <sub>2</sub> --C <sub>1-6</sub> --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--
PR6: --(A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> )--A <sub>2</sub> --(A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--C <sub>1-6</sub> --(CK) <sub>2</sub> --C <sub>1-6</sub> --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> )--A <sub>2</sub> --(A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> )--
PR7: --(A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> )--A <sub>2</sub> --(A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> )--C <sub>1-6</sub> --(CK) <sub>2</sub> --C <sub>1-6</sub> --(D <sub>4</sub> A <sub>3</sub> )--A <sub>2</sub> --(A <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D' <sub>N</sub> D'D <sub>3</sub> A <sub>1</sub> )--

Megjegyzés: A főkővér betűkkel jelölt domének tartoznak egy dimerhez, a kis zöld N betűk között, amivel az N-terminális végeket jelöltük. Az egy csomóhoz tartozó domének zárójelben vannak. A kötőjelek száma a domének között a megnyúlás mértékét jelzi. A PR5 esetén véletlenszerű, hogy melyik kis csomó felel meg a (CK)<sub>2</sub>-nek, így mindkét lehetőséget feltüntettük.

A különböző osztályokba sorolt protomereket részletesen elemeztük. A három típusú csomó (a középső kis csomó és az arra szimmetrikus két kicsi, valamint két nagy csomó) magassága a protomer hosszával csökkent (20.A-C ábra, 3. táblázat), amit valószínűleg

a csomókat alkotó domének részleges kitekeredése okoz. A relaxált állapotban rögzült multimerek esetében főleg a kompakt PR1 és PR2 protomerek voltak megfigyelhetők (98,5% gyakoriság), amelyekben a nagy csomók vannak jelen. Míg a hosszabb konformerek (PR3-PR7), amikben a kis csomók is jól kivehetők gyakorlatilag nem jelentek meg a relaxált állapotú multimerek AFM képein. Ettől eltérően, a molekuláris fésüléssel megnyújtott multimerekben a PR1 és PR2 gyakorisága jelentősen csökkent (43,5%) és a PR3-PR7 protomerek is megjelentek (**3. táblázat**).



**20. ábra.** A protomerek szerkezeti paramétereinek elemzése. (A) Az N-terminális nagy, (B) a (CK)<sub>2</sub> és (C) A<sub>3</sub>D<sub>4</sub> csomók topográfiai magassága a protomer hosszának függvényében. (D) A C<sub>1-6</sub> szakasz hosszának eloszlása. (E) Az A<sub>2</sub> domén hosszának eloszlása. (F) A különböző protomer konformerek hossza a multimer menti relatív pozíciójuk függvényében. (G) A legrövidebb (PR1), (H) a közepes méretű (PR2, PR3-4, PR5) és a (I) hosszú (PR6, PR7) protomerek eloszlása a multimer mentén.

Hogy jobban tudjuk jellemezni a protomer megnyúlást megvizsgáltuk a C<sub>1-6</sub> szakasz és az A<sub>2</sub> domén hosszát. A C<sub>1-6</sub> szakasz hosszának gyakorisága ~ 10 nm-nél mutat egy

maximumot, majd fokozatosan csökken (**20.D ábra**). Az  $A_2$  domén hosszának gyakorisága 0 és 40 nm között közel állandó és ezután csökken (**20.E ábra**).

Az eltérő protomer osztályok hossza független volt a multimeren belüli elhelyezkedésüktől (**20.F ábra**), viszont az eloszlásuk egyenetlen volt. A rövid (PR1) protomerek inkább a multimer végein, míg a hosszabbak (PR6, PR7) inkább a multimer közepén helyezkedtek el (**20.G-I ábra**).

**3. táblázat.** A protomerek különböző részeinek paraméterei.

	n <sup>a</sup>	Topográfiai magasság <sup>b</sup> [pm]			Hossz <sup>b</sup> [nm]		
		nagy (N-terminális) csomó	(CK) <sub>2</sub> csomó	A <sub>3</sub> D <sub>4</sub> csomó	protomer	C <sub>1-6</sub> CK domének	A <sub>2</sub> domén <sup>c</sup>
<b>Nyugalmi helyzetben rögzült VWF multimerék</b>							
<b>PR1</b>	95	1064±273	-	-	53±22	-	-
<b>PR2</b>	37	1074±237	592±110	-	68±15	-	-
<b>Molekuláris fésüléssel megnyújtott VWF multimerék</b>							
<b>PR1</b>	34	1020±405	-	-	57±20	-	-
<b>PR2</b>	36	1089±359	423±159	-	93±14	46±11	-
<b>PR3-4</b>	19	983±324	346±174	529±192	113±18	47±10	25±5
<b>PR5</b>	28	939±387	338±117	436±174	131±22	42±11	38±15
<b>PR6</b>	19	758±364	282±144	302±106	167±23	33±7	51±13
<b>PR7</b>	24	587±156	246±54	238±60	240±38	44±9	76±17

<sup>a</sup>n = az értékelt protomerek száma 14 VWF multimerben

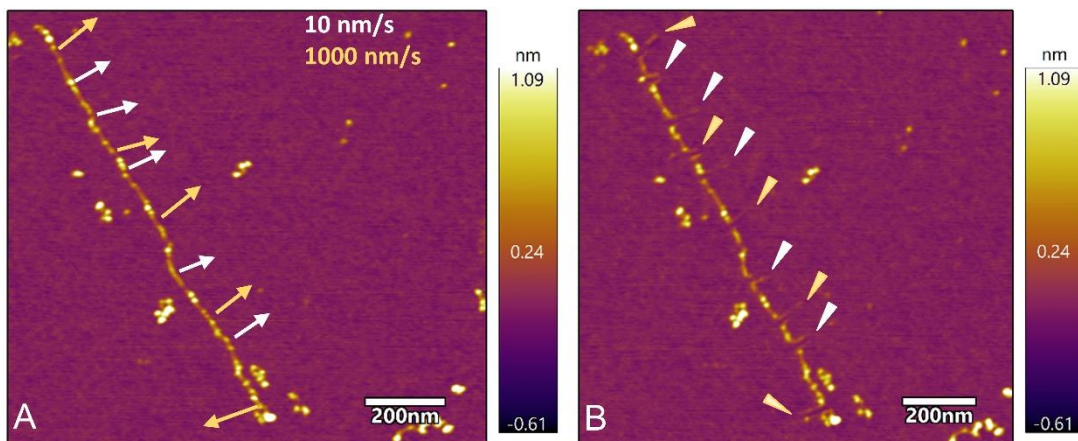
<sup>b</sup>átlag (±szórás)

<sup>c</sup>A<sub>1</sub>-A<sub>3</sub> csúcs-csúcs távolság, amely az A<sub>2</sub> megnyúlásával kapcsolatos

#### 4.5 A megnyújtott VWF vizsgálata nanomanipulációval

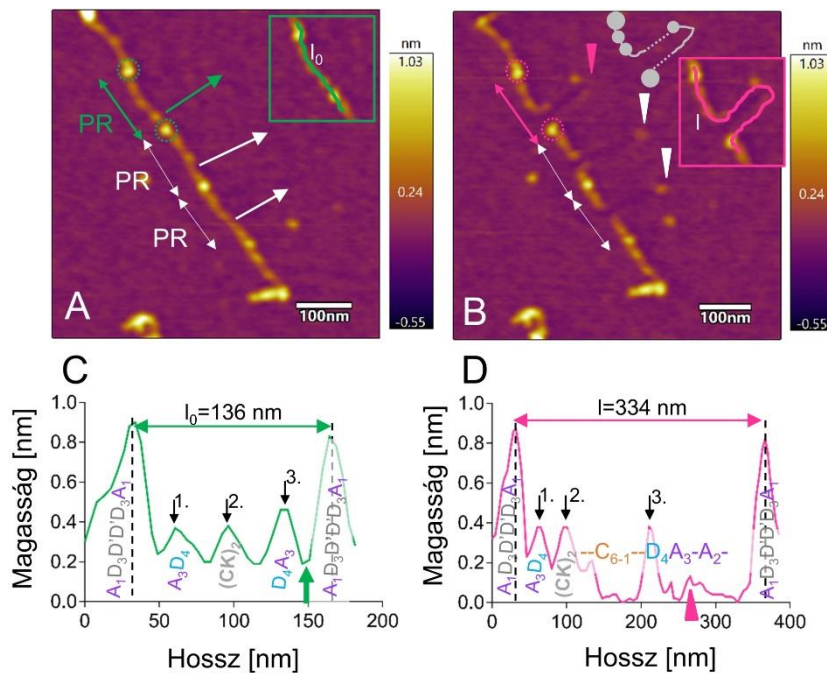
A molekuláris fésüléssel csillámra rögzített multimerék különböző mértékben megnyúlt részeit az AFM tű keresztirányú elmozdításával manipuláltuk. A tű elmozdításának kezdetétől a kiválasztott szakaszokat hajtűszerűen sikerült úgy megnyújtani, hogy a multimer többi része nem mozdult el.

Felmerült, hogy eltérő-e a megnyúlás, ha különböző sebességgel történik a manipuláció (10, 100, 1000 nm/s). A **21. ábra** 10 nm/s és 1000 nm/s sebességekkel manipulált a multimert mutat. Az ábra **A** részén a nyilak a meghúzás kezdeti pontját és irányát, a **B** részén a nyílhegyek a meghúzás végpontját mutatják. Fehér színnel a 10 nm/s-mal, sárga színnel az 1000 nm/s-mal történt meghúzást jelöltük, a végpontok és a kezdeti pontok közötti távolságokat értékeltük. Ezek között és a 100 nm/s-mal meghúzott szakaszok között nem találtunk eltérést a megnyúlásban.



**21. ábra.** VWF nanomanipulációja különböző meghúzási sebességekkel. (A) VWF multimer nanomanipuláció előtt és (B) utána. Az (A) ábrán a nyilak a meghúzás kezdeti pontját és irányát mutatják. A (B) ábrán a nyílhegyek a meghúzás végpontjára mutatnak. Fehér színnel a 10 nm/s-mal, sárga színnel az 1000 nm/s-mal történő meghúzást jelöltük.

Bizonyos esetekben addig nyújtottuk az adott szakaszt, hogy elszakadt a nyújtás végén. Aszerint, hogy a manipuláció során a szakasz elszakadt vagy sem, két csoportra osztottuk a manipulált szakaszokat a további elemzésekhez. A megnyújtott szakaszban a csomókat vékony fonálszerű szakaszok kötik össze. Ezeknek a fonalaknak a magassága néhol az AFM függőleges irányú felbontásának a tartományában van, így a megnyújtás során hézagok keletkeztek a kinyújtott szakaszban. Ezek azonban legtöbbször nem szimmetrikusak a meghúzás végére és nem látszanak szakadásra jellemző végek a fonál mentén, ezért a magasságprofil értékelésekor folytonos fonálnak tekintettünk.



**22. ábra.** Molekuláris fésüléssel rögzített multimer nanomanipulációja. Egy multimer szakasz manipulációja előtt (A) és után (B) készült AFM kép, mely során 3 szakasz lett megnyújtva szakadás nélkül. A multimerrel párhuzamos dupla végű fehér nyilak a protomereket (PR) jelölik. Az (A) ábrarészen a merőleges nyilak a manipuláció irányát mutatják, míg a (B) ábrarészen a nyílhegyek azokra a pontokra mutatnak, ameddig nyújtóerőt alkalmaztunk. Mellette a szürke rajz a megnyújtott szakasz sematikus szerkezetét ábrázolja. A zölddel és rózsaszínnel jelölt szakaszok magasságprofilja látható az AFM képek alatt, mely a manipuláció (C) előtti és a (D) manipuláció utáni magasságprofilt mutatja. A magasságprofilon jelölve vannak az adott résznek megfelelő domének. Az  $l_0$  a szakasz eredeti hosszát,  $l$  a manipuláció utáni hosszát jelenti.

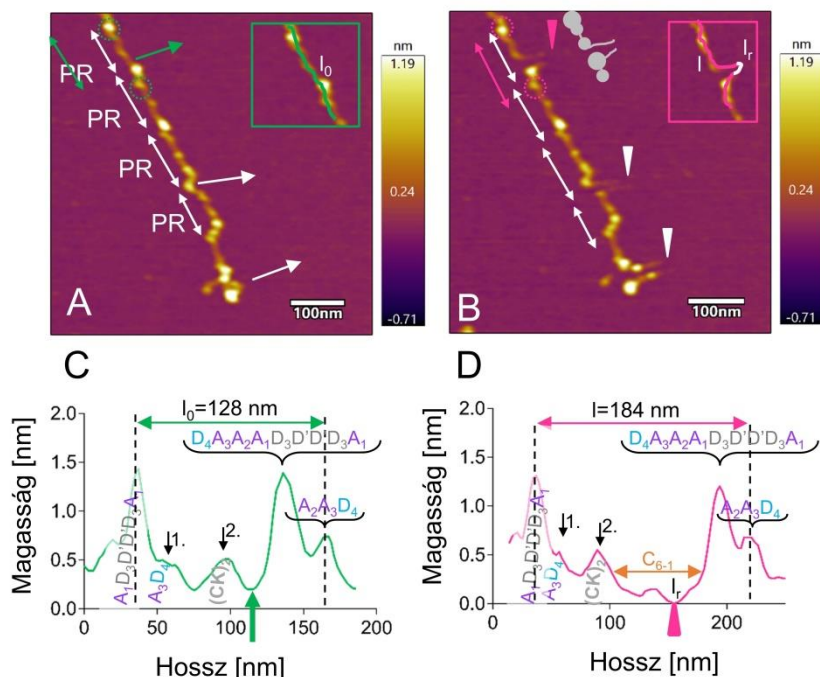
A magasságprofil képeken megmértük a szakaszok kezdeti átlagmagasságát ( $h_0$ ), a kezdeti hosszát ( $l_0$ ), a nyújtás utáni hosszát ( $l$ ) és a szakadás hosszát ( $l_r$ ). A hossznövekmény ( $\Delta l$ ) a megnyújtott és a kezdeti hossz különbsége ( $\Delta l = l - l_0$ , illetve  $\Delta l = (l - l_r) - l_0$ ), a megnyúlás (E, extension) a megnyújtott és a kezdeti hossz hányadosa ( $E = l/l_0$ , illetve  $E = (l - l_r)/l_0$ ). Az átlagmagasság csökkenése ( $-\Delta h$ ) a megnyújtás utáni átlagmagasság és a kezdeti átlagmagasság különbségének abszolút értéke ( $-\Delta h = |h - h_0|$ ).

A **22. ábrán** mutatott multimer rész három helyen volt manipulálva, két esetben egy  $A_3D_4$  csomónál, a harmadik esetben a középső  $(CK)_2$  csomónál. A manipuláció előtt (**22.A ábra**) és után (**22.B ábra**), zöld és rózsaszín nyíllal jelölt szakaszok

magasságprofilja az AFM képek alatt látható (**22.C,D ábra**). Ezeknél a manipuláció során az  $A_3D_4$  csomó eltávolodott a többitől, a csomókat fonálszerű szakaszok kötik össze, melyek hézagokként jelentek meg a nyújtott szakaszban. Ebben ez a szakasz a nyúlás előtt  $l_0 = 136$  nm hosszú volt, ami  $l = 334$  nm-re nyúlt meg, vagyis a hossznövekmény ( $\Delta l$ ) 198 nm, ami 2,5-szeres megnyúlást (E) jelent. A megnyúlt részen a csomókat összekötő fonalak hossza 55 nm illetve 127 nm, melyek feltehetőleg a  $C_{1-6}$  és az  $A_3A_2$  doméneknek felelnek meg. Ilyen vékony fonálszerű hézagok a megnyújtott szakaszok 97%-ban figyelhetők meg.

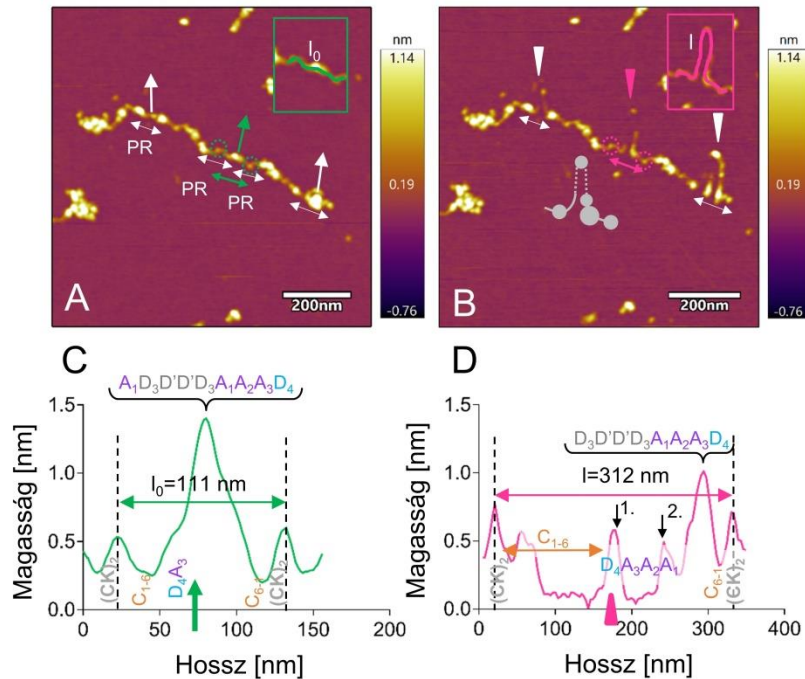
Az **23. ábrán** látható multimert szintén három helyen húztuk meg, viszont ebben az esetben mindegyik szakasz esetén látható a szakadás ( $l_f$ ) a meghúzás végén. A zöld nyíllal jelölt szakasz eredeti hossza ( $l_0$ ) 128 nm volt, amit 164 nm-re sikerült megnyújtani ( $l - l_f = 184$  nm – 21 nm). Ez 35 nm-es hossznövekményt és 1,3-szoros megnyúlást (E) jelent a csomókat összekötő szakaszon, amelyen belül a szakadás -feltehetően a  $C_{1-6}$  domének között- történt. Az összes közül 27,5%-ban (11 esetben) szakadtak el a meghúzott szakaszok, ebből négyszer az A-, négyszer a C-doménekhez köthető a szakadás helye. Két esetben nem tudtuk pontosan megállapítani, hogy melyik részen szakad el a szakasz. A megnyújtott szakaszokban megfigyelhető hézagok medián hossza 76 nm (IQR: 52-110 nm,  $n = 23$ ) az A-doméneknél és 96 nm (IQR: 64-121 nm,  $n = 22$ ) a C-doméneknél.





**23. ábra.** Molekuláris fésüléssel rögzített multimerok nanomanipulációja. Egy multimer szakasz manipuláció előtti (**A**) és utáni (**B**) képe, melyen látható, hogy három helyen történt a manipuláció, ami során a szakaszok megnyúltak és elszakadtak. A dupla végű fehér nyilak a protomereket (PR) jelölik. Az (**A**) ábrán a nyíl a manipuláció irányát mutatja, míg a (**B**) ábrán a nyílhegy arra a pontra mutat, ameddig a szakaszt megnyújtottuk. Mellette a szürke rajz a megnyújtott szakasz sematikus szerkezetét ábrázolja. A zölddel és rózsaszínnel jelölt szakaszok magasságprofilja látható az AFM képek alatt, mely a manipuláció (**C**) előtti és a (**D**) manipuláció utáni magasságprofilt mutatja. A magasságprofilon jelölve vannak az adott résznek megfelelő domének. Az  $l_0$  a szakasz eredeti hosszát,  $l$  a manipuláció utáni hosszát,  $l_r$  pedig a szakadás hosszát jelzi a magasságprofilokon.

A kompakt részek meghúzásakor sokszor új csomók is láthatóvá váltak. A **24.A,C** ábrán zöld nyíllal jelölt szakaszt, a két kis (CK)<sub>2</sub> csomó közötti N-terminális nagy csomónál meghúztuk. A nagy N-terminális csomó nanomanipulációja után két kis csomó jelent meg, amik fekete nyilakkal vannak jelölve a magasságprofilon (**24.B,D** ábra). A meghúzások során legtöbbször nem jelent meg új csomó, viszont néhány esetben egy, kettő és ritkábban három új csomó is láthatóvá vált. Ezek hisztogramját a **25.A** ábra mutatja. A manipuláció során megjelent két kis csomó az A<sub>3</sub>D<sub>4</sub> és A<sub>1</sub> doméneknek felelhet meg.



**24. ábra.** Megnyújtott multimer nanomanipulációja során új csomók válnak láthatóvá. (A) A molekuláris fészkeléssel megnyújtott VWF nanomanipuláció előtt és (B) után. A dupla végű fehér nyilak a protomereket (PR) jelölik. Az (A) ábrán a nyíl a manipuláció irányát mutatja, míg a (B) ábrán a nyílhegy arra a pontra mutat, ameddig a szakaszt megnyújtottuk. Mellette a szürke rajz a megnyújtott szakasz sematikus szerkezetét ábrázolja. A zölddel és rózsaszínnel jelölt szakaszok magasságprofilja látható az AFM képek alatt, mely a manipuláció (C) előtti és a (D) manipuláció utáni magasságprofilt mutatja.

A 40 meghúzott szakasz jellemző méreteit az **4. táblázatban** foglaltuk össze. A hossznövekmény ( $\Delta l$ ; 217 vs. 72 nm) és a megnyúlás (E; 2,79 vs. 1,57) is jelentősen nagyobb volt azon szakaszok esetén, amelyek nem szakadtak el. A szakaszok eredeti átlagmagassága ( $h_0$ ) és az átlagmagasság csökkenése ( $-\Delta h$ ) a két csoport esetében hasonló volt.

**4. táblázat.** A manipulált szakaszok hossz és magasság adatai.

	$\Delta l^a$ [nm]	$E^a$	$h_0^a$ [nm]	$-\Delta h^a$ [nm]
<b>nem szakadt VWF</b> <b>n=29</b>	<b>217<sup>b</sup></b> (182-283)	<b>2,79<sup>b</sup></b> (2,33-3,8)	0,54 (0,45-0,64)	0,28 (0,24-0,38)
<b>szakadt VWF</b> <b>n=11</b>	<b>72<sup>b</sup></b> (49-127)	<b>1,57<sup>b</sup></b> (1,27-1,88)	0,58 (0,43-0,62)	0,22 (0,20-0,28)

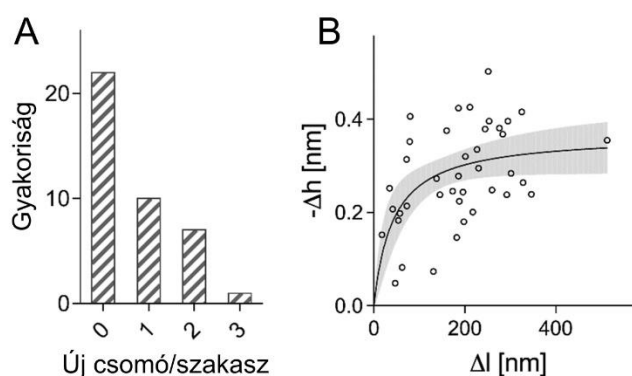
$n$  = manipulált szakaszok száma

<sup>a</sup> medián (interkvartilis tartomány)

<sup>b</sup> a vastagon szedett számok a csoportok között szignifikáns különbséget jelentik a  $\Delta l$  ( $p=0,0002$ ) és  $E$  ( $p=0,0001$ ) esetében

( $h_0$  – a szakasz eredeti átlagmagassága;  $-\Delta h$  – átlagmagasság csökkenése;  $\Delta l$  – a szakasz hossznövekménye manipuláció után,  $E$  – megnyúlás, a szakasz manipuláció utáni és előtti hosszának hányadosa)

A nanomanipuláció, függetlenül attól, hogy szakadás történt-e közben vagy sem, a szakaszok átlagmagasságának csökkenésével járt, vagyis a megnyúlás a magasság rovására történt, az eredeti -a molekuláris fésülés során a csillámpalához tapadt- szerkezetből húzódtak vagy tekeredtek ki az újonnan megjelenő részek (**25.B ábra**).



**25. ábra.** A manipulált szakaszokban megjelenő új csomók száma és a szakaszok magasságának és megnyúlásának összefüggése. (A) A manipuláció után a szakaszon megjelenő új csomók számának eloszlása. (B) A manipulált szakasz átlagmagasságának csökkenése ( $-\Delta h$ ) a megnyúlás ( $\Delta l$ ) függvényében,  $y=0,3669*x/(42,81+x)$ . Az illesztett görbe menti szürke terület a 95%-os konfidencia intervallumot jelöli.

## 5. Megbeszélés

### 5.1 A VWF klinikai mintákban

Az endotél sejtekben tárolódó és az onnan kiáramló oszteoprotegerin (OPG) komplexet alkot a VWF-ral (33). Már korábbi kutatásokból ismert, hogy a VWF és OPG koncentrációja összefügg az ateroszklerózis súlyosságával (36, 74). Az is ismert, hogy a VWF szintje összefügg a vércsoport antigének típusával (2, 25). Esetünkben a PAD betegek vénás vérében az OPG koncentráció a VWF:Ag és a VWF:CB is magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, de csak az OPG emelkedett szignifikánsan (**9. ábra**). Az OPG koncentrációval a VWF:Ag és a VWF:CB is jelentős pozitív korrelációt mutatott. A betegeket és a kontrollokat AB0 vércsoport alapján nullás és nem-nullás csoportra osztva az OPG és a VWF koncentráció, valamint a VWF kollagén kötő aktivitás jelentősen magasabb volt nem-nullás vércsoportú betegek és kontrollok esetén is, mint a nullás vércsoportúak esetén. A nem nullás csoportok OPG koncentrációja és VWF:CB aktivitása közötti korreláció is jelentős volt, nullás vércsoport esetén nem volt kimutatható korreláció a VWF és az OPG között. Az ateroszklerotikus plakkoknál az érkeresztmetszet leszűkül, az áramlás felgyorsul, így a VWF által közvetített trombózis kialakulásának kockázata ezért is megnő. Ismert, hogy ateroszklerózis esetén gyakoribb a perifériás artériás betegség (PAD) kialakulása a nem-nullás vércsoportú egyéneknél (75). Az OPG szint AB0 vércsoporttal való összefüggését nem vizsgálták előttünk.

Radikális prosztatektómia előtt a betegek plazmájában a VWF:CB értéke magasabb volt, mint a kontrollok plazmájában, a többi VWF paraméter (VWF:Ag,  $M_{MW25}$ ) változása nem volt jelentős. Közvetlenül a műtét után egy órával illetve még 6 nappal később a VWF paraméterek értékei jelentősen emelkedettek a műtét előtti állapothoz képest, és egy hónap múlva csökkentek a műtét előtti szintre (**10-11. ábra**). A paraméterek a kontrollok szintjére azonban csak a műtét után 10 hónap után csökkentek le, ami az endotél működésének hosszan tartó perturbációjára utal. Klinikai adatok alapján a trombózis rizikó a műtét után négy hétig áll fenn (76, 77), amit az endotél állapotára utaló VWF eredményeink alátámasztanak. Ha figyelembe vesszük a VWF féléletidejét a keringésben, akkor lehetséges, hogy közvetlenül a műtét utáni időszakban a VWF paraméterek értékeinek emelkedését nem csak az Weibel-Palade testecskékből történő nagyobb mennyiségű szekréció okozta, hanem a VWF intenzívebb szintézise is.

Emellett a műtéthez köthetően kialakuló gyulladáshoz vezető folyamatokban is megemelkedik a VWF szintje a keringésben (22). Az emelkedett VWF mennyiséggel és aktivitással azonban a multimerek méretét szabályozó ADAMTS13 enzim mennyisége nem tart egyensúlyt, a fokozottan trombogén, nagy multimerek mennyiségének a növekedése is a pretrombotikus állapotra utal.

## 5.2 A relaxált VWF szerkezete

A VWF a plazmában véletlenszerűen feltekeredett lánc (random coil) konformációban kering (50). Nagy sebességgradiens esetén az érsérülés helyén kitapad, majd kinyúlik. A relaxált állapotban - vagyis amikor nem tettük ki erőhatásnak a multimereket - rögzített multimerek feltehetően a normál keringésben lévő konformációjukhoz hasonló gyöngyszerű szerkezetben tapadnak ki a felszínre.

A VWF multimerek nyugalmi szerkezetét nagy felbontású AFM-mel vizsgáltuk, mely gyöngyszerű szerkezetet mutatott. A minta az SDS-agaróz elektroforézis képnek (**12. ábra**) megfelelően heterogén méretű multimereket tartalmazott. Az AFM képünk hasonló a korábban az irodalomban már közölt AFM képekhez (58, 60, 61) (**13. ábra**). Nagyobb nagyításon a multimerek részletesebb szerkezete is láthatóvá vált, a fonálszerű szerkezeten látható csomók vékony, többnyire egyenes szakaszokkal voltak összekötve. A multimerek alapegysége vagyis protomere a VWF dimer, melyet a tükörszimmetrikus szerkezete alapján lehet azonosítani. Fowler és munkatársainak sikerült először a VWF multimerek TEM képének analízisével feltárni ezt a szerkezetet, de a mintaelőkészítés során denaturálódott a VWF (39). Később többen bemutattak hasonló szerkezetet. Az irodalmi adatok alapján azonosítottuk a protomert a multimereken, aminek „nagy csomó-vékony szakasz-kis csomó-vékony szakasz- nagy csomó” (O-o-O) szerkezet felel meg. Ebben a szerkezetben a kis csomó felel meg az dimerizáció miatt átfedő C-terminális két CK doménjének, melyekre  $(CK)_2$  doménekként hivatkozunk. A  $(CK)_2$  domének mellett szimmetrikusan a C domének (6-6 C domén, melyekre  $C_{1-6}$  és  $C_{6-1}$  jelöléssel hivatkozunk) alkotják a vékony szakaszt. Ez a két szakasz a  $(CK)_2$  doménre zárt és nyitott állapotban lehet, a mi esetünkben az alacsony  $Ca^{2+}$  koncentráció miatt inkább a nyitott forma a jellemző. Emiatt a „vékony szakasz-kis csomó-vékony szakasz” (-o-) rész tulajdonképpen a  $C_{1-6}(CK)_2C_{6-1}$  doméneknek felel meg. A pH csökkenésével a C domének zárt állapota lesz jellemző, melyet a C domének közti gyenge kölcsönhatás tart össze a Golgiban, amely a multimerek megfelelő kis helyre történő „összecsomagolásának” a feltétele.

Fiziológiás pH-n megfigyelt D<sub>4</sub> domének közötti erős kölcsönhatáshoz, amely szintén a C domének zárt állapotát eredményezi Ca<sup>2+</sup> ionokra van szükség (78).

A különböző töltésű felszínekkel végzett kísérleteink azt mutatták, hogy a felszín kémiai tulajdonságai nagymértékben befolyásolják a felszínhez rögzült VWF konformációját. Ezt jelen munkánkban pozitív (PLL) és negatív (csillám) töltésű felszínek alkalmazásával mutattuk ki (**15. ábra**), míg mások korábban hidrofób és hidrofil felszínek között mutattak ki hasonló eltérést a VWF letapadásában (59).

A VWF átlagos keresztmetszeti átmérője  $4,4 \pm 1,1$  nm (N = 7), amelyet a multimerekről pufferben alkotott képek alapján határoztuk meg a (11) és (12) egyenletek szerint. Ez az érték jó egyezést mutat az irodalomban leírtakkal (39, 58).

Összességében, bár gyakran sikerült azonosítani a protomerek megfelelő szerkezetet a relaxált VWF-ban a csomók nagyon közel helyezkedtek el egymáshoz, gyakran átfedő, kompakt részeket alkotva, melyeken belül nem különíthetők el az egyes protomerek egymástól.

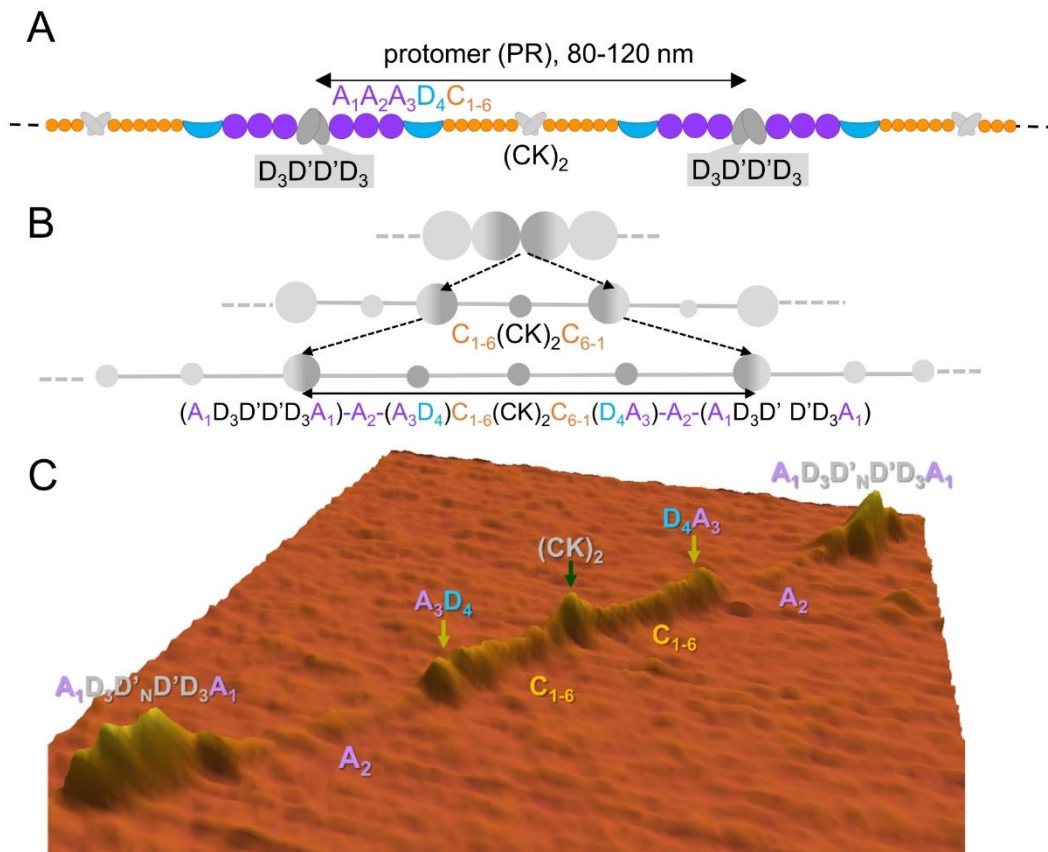
### 5.3 A megnyújtott VWF szerkezete

Annak érdekében, hogy a mechanikai erők hatását vizsgáljuk a VWF szerkezetére a multimereket molekuláris fésüléssel rögzítettük a csillám felszínen.

A molekuláris fésüléssel rögzített multimerek megnyúltak és egy irányba rendeződtek. A szerkezetükön az előbbieket szerinti periodikusan ismétlődő, szimmetrikus egységeket azonosítottunk (**16. ábra**). Ezek az egységek a multimer protomerjei, melyek szerkezetét részletesen elemeztük. A diszulfid hidakkal kötött alegységeknél különböző koncentrációjú DTT oldattal történő kezelés hatására hézagok jelentek meg és a fragmentumok megrövidültek (**17. ábra**). A VWF fragmentumok a megrövidülés után is a felszínhez rögzülve maradtak, vagyis ezeken a helyeken voltak a letapadási pontok. A csillámfelszín negatívan töltött, így a VWF pozitív töltésű részei tudnak letapadni. Ez valószínűleg az A<sub>1</sub> domén, mely a leginkább pozitív töltésű a VWF domének között. A VWF az A<sub>1</sub> doménen keresztül tud kötődni a sérülés helyén negatívan töltött molekulákhoz (79). A multimeren belül a protomerek megfeszített állapotban vannak a molekuláris fésülés után, a diszulfid hidak felszakítását követően a multimer fragmentálódik, így a protomerek kontrahálnak és a tárolt rugalmas energia felszabadul. A megnyújtott multimerek kontúr hossza 416 nm és 3090 nm között változott, amely jó egyezést mutat az irodalmi adatokkal (60). A multimer mentén megjelenő nagy csomókat

az N-terminális multimerizációs helyeiként azonosítottuk, a köztük lévő távolságot pedig a protomer hosszának feleltettük meg. A protomerek hossza 19 nm és 329 nm között változott, vagyis a korábban leírtaknál jóval hosszabb (39, 58, 61). A protomer hossza a multimer kontúrhosszával arányosan növekedett (**18. ábra**). Ez abból adódhat, hogy a közegellenállási erő arányos a multimer hosszával, vagyis hosszabb multimerre nagyobb erő hat.

Az AFM képeken megfigyeltük, hogy a nyújtott multimerekben a protomerek megnyúlása nem egyforma, előfordulnak jobban és kevésbé megnyúlt állapotban is. A protomereket megnyúlásuk szerint 7 típusú topográfiai osztályba soroltuk (PR1-től PR7-ig, és konformereknek is nevezzük ezeket), melyeknél a növekvő sorszám nagyobb megnyúlást jelent (**19. ábra**). A PR1 a legrövidebb és legkompaktabb állapotot jellemezi, amelyben a két nagy csomó egy vékony szakasszal van összekötve (O-O). Ebben az állapotban (CK)<sub>2</sub> kis csomó nem látszik különállóan, valószínűleg az egyik nagy csomóhoz túl közeli helyzete miatt. A PR2 egy kinyúltabb szerkezet, amely már mutatja a jellemző „nagy csomó-vékony szakasz- kis csomó-vékony szakasz-nagy csomó” szerkezetet, amelyben a C domének nyitott állapotban vannak (O-o-O). A PR3 és PR4 protomerekben a nagy csomók átrendeződése látszik, az azokat alkotó domének eltávolodnak valamelyest egymástól, valószínűleg az A<sub>2</sub> domén letekeredése miatt. Mivel az A<sub>2</sub> doménből kettő van egy protomeren belül, ezért a nagy csomók tagoldása szimmetrikusan is előfordul, így összesen négy féle kombinációban figyelhető meg ez a szerkezet (oO-o-Oo, Oo-o-oO). A négy közül a PR3 és PR4 a két tükörszimmetrikus szerkezetet mutatja be, habár ezek egymással analógok.



**26. ábra.** A VWF hierarchikus megnyúlása molekuláris fésülés során. (A) A VWF multimer szerkezeti alapegysége (protomere) a dimer, melyet a diszulfid hidakkal összekapcsolt  $D'D_3$  domének határolnak. Ezek a határok nagy csomókat alkotnak a multimer mentén, ami alapján EM és AFM képeken lemerített VWF protomerhossz 80-120 nm (39, 61). (B) Az AFM képeink alapján megfigyeltük, hogy a VWF relaxált szerkezetén főleg nagy csomók figyelhetők meg. Ez a szerkezet molekuláris fésülés során több lépésben megnyúlik és a kisebb csomók is láthatóvá válnak, melyek közül a középső a  $(CK)_2$ , és a további kettő az  $A_3D_4$  doméneknek felel meg. (C) Egy megnyújtott VWF multimerben található protomer 3D magasságképe, melyen a szerkezeti elemeknek megfelelő domének is jelölve vannak.

A PR5 esetében az egyik  $A_2$  domén letekeredik és megnyúlik, így egy kisebb csomó, amelyet az  $A_3D_4$  domének alkotnak, eltávolodik a nagy csomótól (O-o-o-Oo). Ránézésre a PR5 is lehet szimmetrikus szerkezetű, de ebben az esetben a  $(CK)_2$  csomó nem középen van, vagyis a protomert alkotó monomerek megnyúlása aszimmetrikus. A PR6-ban már megnyúltak annyira az  $A_2$  domének, hogy a két kis  $A_3D_4$  csomó elkülöníthető a nagy



csomóktól, de a PR7 esetében az  $A_2$  domének még inkább megnyúlnak (O-o-o-o-O). Megfigyeltünk aszimmetrikusan megnyúlt protomereket, melyekben a monomerek megnyúlása különböző, ami alátámasztja azt, hogy a multimer mechanikailag független egysége a monomer (62). A protomerek megnyúlásának alapján a megnyúlás folyamata feltehetően a következő sorrendben történt: először a C-terminális végen a  $C_{1-6}$  szakasz kiegyenesedett, ezt követte az  $A_2$  domén letekeredése, amely az N-terminális nagy csomóinak szegmentálódását eredményezte ( $D_4A_3$ ) és ( $A_1D_3D'D_3A_1$ ) valamint ( $A_3D_4$ ) csomókra, végül az  $A_2$  nagymértékű megnyúlása következett be. Ezek alapján feltételezzük, hogy a protomerek hosszának különböző mértékű növekedése a molekuláris feszülés során a  $C_{1-6}$  nyúlásának és a kitekeredett  $A_2$  nyúlásának következménye (**26. ábra**). Azt, hogy más domén kitekeredik-e a VWF megnyúlás során továbbra is kérdéses.

A növekvő protomer hosszúsággal a csomók magassága csökkent (**20.A-C ábra**) a  $C_{1-6}$  és  $A_2$  szerkezeti változásai miatt, ezen kívül más domének részleges letekeredése is előfordulhat. A  $C_{1-6}$  szakasz hossza nagyobb volt, mint a korábbi közlemények szerint várt  $\sim 30$  nm (39, 54) (**20.D ábra**), ami valamelyik C domén részleges letekeredésre vagy a doméneket összekötő szakasz megnyúlására utalhat. A PR7 típusban az  $A_2$  domének szinte teljesen kinyúlik, és majdnem eléri az elméleti  $\sim 73$  nm-es kontúrhosszt (**20.E ábra**). Abban az esetben, ha a megnyúlt  $A_2$  domént entrópikus láncnak tekintjük, a féregszerű lánc modell alapján (worm-like chain model) megbecsülhetjük az erőt, amelynek a multimer a molekuláris feszülés során ki volt téve:

$$F = \frac{k_B T}{L_P} \left[ \frac{z}{L_C} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L_C}\right)^2} - \frac{1}{4} \right], \quad (7)$$

ahol  $k_B$  a Boltzmann állandó,  $T$  az abszolút hőmérséklet,  $z$  az  $A_2$  mért hossza ( $\sim 55$  nm a maximális gyakoriság felénél),  $L_C$  az  $A_2$  elméleti kontúrhossza ( $\sim 73$  nm, **1. táblázat**),  $L_P$  a perzisztenciahossz (0,38 nm). Ez alapján a multimerre ható erő 45 pN, amely túllépi az  $A_2$  letekeredéséhez szükséges 11-21 pN-os küszöbértéket (55, 62, 63), de nagyságrendileg jó becslést ad.

A konformerek eloszlása a multimer mentén nem volt egyenletes. A kompakt konformerek (PR1) a multimer végein, a leginkább megnyúlt konformerek (PR6, PR7) pedig a multimer közepén fordultak elő gyakrabban (**20.G-I ábra**). A közepén történő

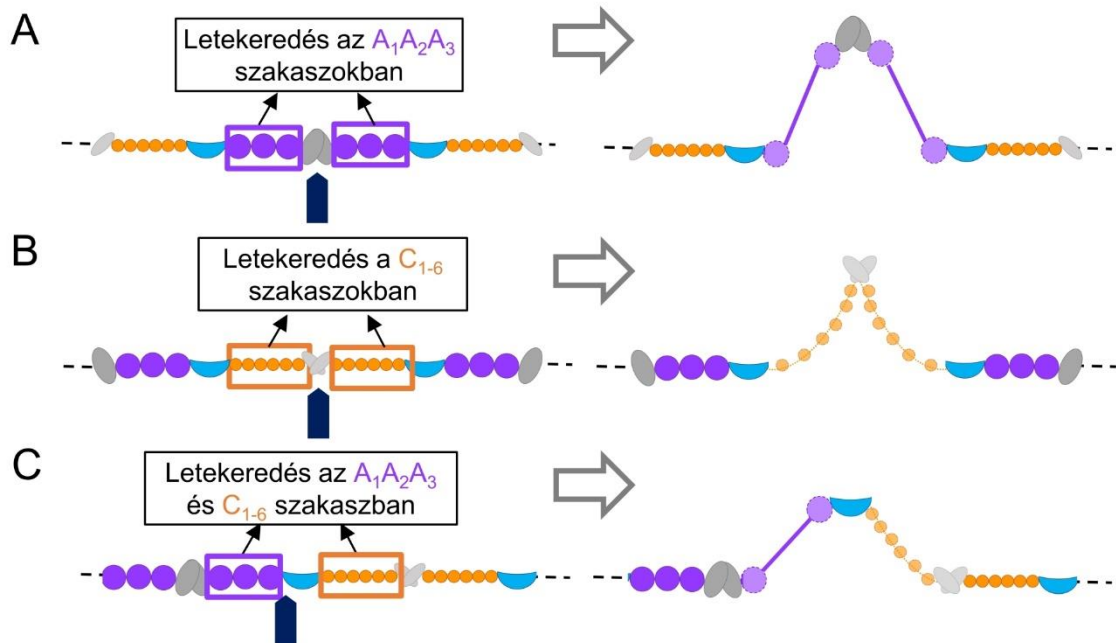
túlnyúlást, vagyis nyak képződést (necking) ami képlékeny anyagokra jellemző már más biomolekulákra is leírták. A VWF multimer ilyen jellegű megnyúlását már mások is felvetették durva szemcséjű (coarse-grain) modellt használó szimuláció alapján (80). Ezt a feltevést adataink igazolni látszanak. A protomerek egyenlőtlen megnyúlásának a multimeren belül jelenleg nem ismert a biológiai jelentősége. Feltételezhető, hogy a sérülés és a lokális trombocita dugó, a trombus növekedése vagy más miatt keletkező különböző mértékű érszűkület alakul ki, az áramlási erőviszonyok pedig gyorsan változnak. Ezekhez az erőváltozásokhoz a multimerek letapadt és szabadon lévő doménjai különböző módon alkalmazkodnak/reagálnak és tárják fel kriptikus kötőhelyeiket.

#### 5.4 A megnyújtott VWF változásai nanomanipuláció során

Nanomanipulációval sikerült tovább nyújtanunk a molekuláris fésüléssel a felszínre rögzített multimerek kiválasztott szakaszait. A nanomanipuláció során az adott szakasz hajtű alakban deformálódott, az itt található csomók elmozdultak, esetenként új csomók váltak ki a kompakt részekből. A megnyújtás közben vagy utána közvetlenül a megnyújtott szakasz a csillám felszínhez rögzült. A csillám felszín negatívan töltött, így a VWF doménjeink pozitív töltéssel rendelkező felszíneivel tud hozzákötődni. Az  $A_1$  doménról ismert, hogy a legpozitívabban töltött VWF domén fiziológias pH-n, és a trombociták GPIb receptora, illetve a heparin is az  $A_1$  pozitívan töltött felszínéhez tapad (81). A filamentális szerkezetű fehérjék megnyúlása akkor lehetséges, ha a nyújtó erő nagyobb, mint az ellene ható adhéziós és a molekulában ébredő rugalmas erő (47). Kísérleteinkben a multimerek manipulált szakaszon kívüli része egy esetben sem mozdult el a beavatkozás során, ami azt igazolja, hogy a csillámhoz tapadó multimer mentén több adhéziós pont is van.

Sok esetben a megnyújtás során a csomókat összekötő szakasz topográfiai hézagként jelent meg. Korábban a molekuláris fésüléssel megnyújtott PR7-es protomerekben is megfigyelhettünk hasonló jelenséget, és azonosítani tudtuk, hogy a hézagok az  $A_2$  domének kitekeredésének felelnek meg. A nanomanipuláció során nem csak az  $A_2$ , hanem sok esetben a  $C_{1-6}$  szakasz is érintett volt a megnyúlásban a nanomanipuláció pozíciójától függően (27. ábra). A 22. ábrán bemutatott multimer esetében a  $C_{1-6}$  doméneknek megfelelő szakasz hossza 55 nm, ami 1,2-szerese a korábban általunk mért, illetve az irodalomban leírt adatoknak (39, 54). A hézag arra enged következtetni, hogy

valamelyik C-domén vagy domének olyan jellegű konformáció változása történt a nyújtás során, amely miatt a magassága az AFM függőleges irányú felbontása alatt van.

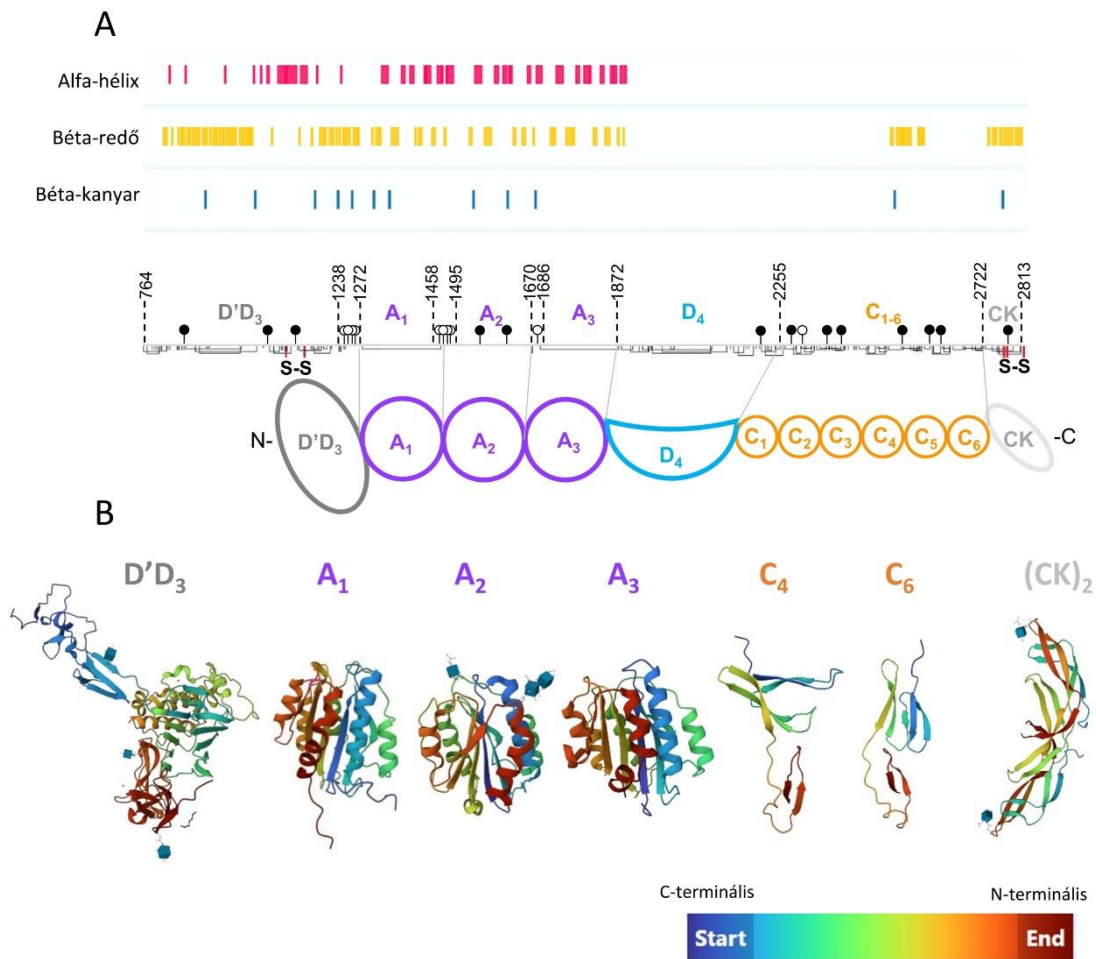


**27. ábra.** A VWF multimer különböző csomóknál történő manipulációja a szakasz elszakadása nélkül. (A) A VWF multimer egy N-terminális nagy csomónál volt meghúzva. A csomótól szimmetrikusan sok esetben csak az A<sub>2</sub>-domének nyúlnak meg, de az A<sub>1</sub> és A<sub>3</sub> nyúlása is lehetséges. (B) A VWF a (CK)<sub>2</sub> kis csomónál volt meghúzva, ekkor a C<sub>1-6</sub> domének nyúlnak meg. (C) A VWF az A<sub>3</sub>D<sub>4</sub> kis csomónál volt meghúzva, ami a C<sub>1-6</sub> és A<sub>2</sub> domének között helyezkedik el, így mindkét szerkezeti rész megnyúlik a manipuláció során. Az ábrákon a sötétkék nyíl jelöli a manipuláció helyét, a megnyúlás során érintett domének keretezettek. Az ábra jobb oldalán a manipuláció utáni állapot látható, az esetlegesen letekeredő doméneket az eredeti színükhöz képest halványabban jelöltem.

A C domének közül a C<sub>4</sub> illetve C<sub>6</sub> domének kristályszerkezete ismert (**28. ábra**) (82, 83). Ezek két, β-redő szerkezetű aldoménből állnak, melyeket egy flexibilis szakasz köt össze, amelyek elmozdulhatnak. Bár a C<sub>6</sub> esetében a két aldomén egymáshoz képest nem mozdul el olyan mértékben, mint a C<sub>4</sub> doménben. A másik hézag 127 nm, mely az A-doménekhez köthető. Az A<sub>2</sub> doménről ismert, hogy már alacsony erőnél képes letekeredni, mivel a szerkezetében a központi β-redő kevésbé stabil, és ezt α-hélixek veszik körül, melyeknek szinte nincs mechanikai ellenállásuk (**28. ábra**). Az A<sub>1</sub> és A<sub>3</sub> doménnel ellentétben az A<sub>2</sub> doménben a szerkezetet stabilizáló diszulfid híd sem található (84, 85). Az A<sub>2</sub> domén elméleti kontúrhossza ~73 nm (**1. táblázat**), amely viszont jóval

kevesebb, mint a mért 127 nm. Emiatt arra következtettünk, hogy egy szomszédos A-domén többi tagja is részlegesen letekeredhet, mely feltételezésünk szerint az A<sub>3</sub> lehet. Az A<sub>3</sub> doménben közvetlenül a diszulfid híd van az erő hatásának kitéve, míg az A<sub>1</sub> doménben a hidrogénkötés-hálózatnak fel kell szakadnia a diszulfid híd felszakadása előtt (81, 86).

A hézagok medián hossza az A-doméneknél 76 nm, ami alapján valószínűleg sokszor csak az A<sub>2</sub> domén nyílik ki, a C-domének esetén viszont 96 nm, ami azt jelenti, hogy ezen a szakaszon jelentős konformáció változás, esetleg letekeredés megy végbe.



**28. ábra.** A VWF másodlagos szerkezeti elemei a doménszerkezetre vetítve és az ismert 3D szerkezetek. (A) Az ismert alfa-hélix, béta-lemez és béta kanyar szerkezetek (87) a VWF monomerre vetítve. A doménszerkezet feletti vonalon a számok a domének és az azokat összekötő szakaszok határait jelölik. Az N- és O-glikozil csoportok a teli és üres karikákkal vannak jelölve a vonal mentén. A vonal alatti függőleges vonalak a ciszteineket jelölik, amelyek diszulfid hidak esetén egymással össze vannak kötve. A C-terminális

végen a dimerizációban résztvevő 3 cisztein, illetve az N-terminális végen a multimerizációban résztvevő 2 cisztein pirossal van jelölve. **(B)** VWF domének ismert 3D szerkezetei, melyek az N-terminálistól a C-terminális végig az ábrán feltüntetett jelölés szerint vannak színezve és amelyekben a glikán csoportok kék kockákkal vannak jelölve (88).

Amikor összehasonlítottuk a hossznövekményt ( $\Delta l$ ) és a megnyúlást (E) azokban a szakaszokban, amelyek elszakadtak, és amelyek nem, azt tapasztaltuk, hogy az elszakadt szakaszok rövidebbek (**4. táblázat**). Ez meglepőnek tűnhet, mivel a szakadás az adott szakasz túlnyújtásának a következménye. A szakadás után a megnyújtott szakaszban tárolt rugalmas energia felszabadul, így a szakasz még le nem tapadt vége relaxálódhat. Szintén előfordulhat, hogy a fehérje egy darabja az AFM tűre tapad, ami miatt a felszínen kevesebb fehérje rész látható.

A szakaszok megnyújtása az átlagmagasság csökkenésével jár, ami egy platóban végződő görbével írható le (**25.B ábra**). A görbén is látható a magasságmérés bizonytalansága.

A nanomanipulált szakaszok közül külön elemeztük azokat, amelyek a PR6 szerkezetnek megfelelőek ( $n = 9$ ), és a korábbi közleményünkben szereplő mérési adatainkkal vetettük össze. A PR6 konformereknek a manipuláció előtti hossza  $l_0 = 161 \text{ nm}$  ( $l_{0,\max} = 279 \text{ nm}$ ) összevethető azzal, amelyet korábban mértünk ( $l_{\text{PR6}} = 167 \text{ nm}$ ,  $l_{\text{PR6},\max} = 260 \text{ nm}$ , **3. táblázat**). Manipuláció után a teljes hosszuk átlagosan  $l = 345 \pm 69 \text{ nm}$  ( $l_{\max} = 459 \text{ nm}$ ), ami  $\Delta l = 178 \pm 90 \text{ nm}$  hossznövekményt és  $E = 2,23 \pm 0,78$  megnyúlást jelent. A manipuláció utáni szakasz teljes hossza hosszabb, mint amit PR7 szerkezetek esetén mértünk korábban ( $l_{\text{PR7}} = 240 \text{ nm}$ ,  $l_{\text{PR7},\max} = 329 \text{ nm}$ ). Ez alapján a multimereket lokálisan jobban meg tudtuk nyújtani, mint csak a molekuláris fésüléssel, ami a multimer nagy rugalmas potenciáljára utal. A nanomanipulációval igazoltuk, hogy lokális erőhatás olyan szerkezetváltozást idéz elő, amilyen több kötőhelyet biztosít a multimer letapadáshoz, feltehetően kriptikus kötőhelyeket tesz hozzáférhetővé (61).

## 6. Következtetések

Munkám során a VWF három diagnosztikai paraméterét (VWF:Ag, VWF:CB, multimereloszlás) vizsgáltam klinikai mintákban, továbbá nagy multimereket tartalmazó humán VWF mintában tanulmányoztam az egyedi multimerek globális illetve lokális nyújthatóságának topográfiáját atomierő-mikroszkópia (AFM) alkalmazásával. A legfontosabb eredmények és következtetések az alábbiak:

1. Perifériás artériás betegek esetében a vénás vérben mért oszteoprotegerin mennyisége szignifikánsan magasabb, míg a VWF mennyisége és kollagénkötő aktivitása nem tér el jelentősen a kontrolltól. Nullás vércsoportú betegek és a kontrollok esetén egyaránt, a VWF mennyisége és kollagénkötő aktivitása jelentősen magasabb volt a nem-nullás vércsoportúakhoz képest. Ez a vércsoport szerinti különbség jellemezte oszteoprotegerin mennyiségét is. A nem-nullás vércsoportú egyénekekben az oszteoprotegerin mennyisége és VWF kollagénkötő aktivitása közötti korreláció jelentős volt. Ezek a vércsoportokhoz köthető különbségek magyarázhatják a betegség magasabb gyakoriságát a nem-nullás vércsoportúakban a nullás vércsoportúakhoz képest.
2. Radikális prosztatektómia után a VWF mennyisége és kollagénkötő aktivitása, valamint a nagy multimerek aránya is jelentősen emelkedett a hatodik napig, egy hónap múlva éri el a műtét előtti és a tizedik hónapra a kontroll csoport szintjét, ami protrombotikus állapotra utal és magyarázza az egy hónapig tartó nagyobb posztoperatív trombózis veszélyt.
3. Véletlenszerűen feltekeredett (random coil) VWF multimereket sikeresen nyújtottuk meg molekuláris fésüléssel és nagy felbontású AFM képeket készítettünk a szerkezetükről. Egyedi-molekula szinten megmutattuk, hogy a multimerek protomerei különböző mértékben, de az eddig ismertnél átlagosan jobban megnyúlnak. Ez az új megfigyelésünk arra enged következtetni, hogy a multimer axiális nyúlása során a VWF kriptikus kötőhelyei nem egyformán tárulnak fel a VWF kötőpartnerei számára.
4. A multimerek mentén különböző mértékben megnyúlt protomer konformert azonosítottunk, melyeket 7 hierarchikus osztályba soroltunk (PR1-PR7). Feltételezzük, hogy molekuláris fésülés során először a C<sub>1-6</sub> domének nyúltak meg, majd az A<sub>2</sub> domének tárulnak fel és nyúlnak meg különböző mértékben.

5. A multimer mentén a rövidebb protomerek (PR1) a multimerek végén, míg a hosszabb protomerek (PR6, PR7) a multimerek közpén fordulnak elő gyakrabban, hasonlóan a viszkózus polimerek kémiájában ismert nyak képződés (necking) jelenségéhez.
6. Nanomanipulációval lokálisan tovább tudtuk nyújtani a molekuláris fésüléssel rögzített multimerek kiválasztott részeit, melynek eredményeként az A és C doméneken kívül egyéb domének nyúlása, esetenként szakadása és kötőhelyek feltárulása is feltételezhető.

## 7. Összefoglalás

A von Willebrand faktor (VWF) a vérben keringő multimer glikoprotein, mely kb. 100 nm hosszú, mechanoszenzor protomerekből épül fel. Alapvető szerepe a trombociták sérült érfalhoz való rögzülésének közvetítése, nagy sebességgradiens esetén. A nagy molekulású multimer jelenléte kritikus a VWF hemosztázisban betöltött funkciójának ellátásához, viszont túl nagy mennyiségben trombozisz rizikótényező. Különböző patológiás folyamatokban felmerül a lehetősége annak, hogy a VWF protrombotikus állapot markere vagy terápiás célpont legyen.

Munkánk során két különböző aspektusból vizsgáltuk a VWF-t, egyrészt klinikai mintákban mértük a VWF mennyiségi és minőségi többletét, mint protrombotikus állapotjelzőket, másrészt molekuláris fésüléssel nyújtott egyedi multimer szerkezetét elemeztük atomierő-mikroszkópiával (AFM) készített képeken, hogy újabb információt nyerjünk a VWF funkcióját is befolyásoló mechanikai hatások okozta szerkezeti változásáról.

A perifériás artériás betegek plazmájában az oszteprotegerin (OPG) mellett a VWF antigén mennyisége (VWF:Ag) és VWF kollagén kötő aktivitása (VWF:CB) is magasabb volt a kontrollokhöz képest. Nem-nullás vércsoportú betegekben a nullásokhoz képest nem csak a VWF, de az OPG mennyisége is emelkedett és köztük jó volt a korreláció is, ami a betegség nagyobb gyakoriságának magyarázatához is hozzájárul ebben a vércsoportban. Radikális prosztatektómia után a betegek plazmájában a VWF:Ag, VWF:CB és a nagy multimer aránya is emelkedett a műtét előtti állapothoz képest, mely a 6. napra már csökkent, de még 1 hónap elteltével sem normalizálódott, protrombotikus állapotot jelezve egyes esetekben.

Tisztított nagy multimer molekuláris fésülésével megnyújtott multimeret felépítő protomerek szerkezetének tanulmányoztuk AFM-mel. A protomerek a multimer mentén különböző mértékben nyúltak meg, amely szerint növekvő sorrendben 7 osztályba soroltuk őket. A protomerek megnyúlását a C<sub>1-6</sub> szakasz nyúlása valamint az A<sub>2</sub> domén feltárlása és nyúlása okozta. A multimer közepső része jobban megnyúlt, mint a végei, ami a multimer viszkózus tulajdonságát jelzi. Nanomanipuláció során a molekuláris fésüléssel rögzített multimeret, lokálisan tovább tudtuk nyújtani a kiválasztott szakaszra merőlegesen. Az eközben fellépő erők hatására az A és C doméneken kívül más domének kötőhelyei is hozzáférhetővé válhattak, igazolva a VWF helyi erőválasz



készségét, amely biztosíthatja a VWF kriptikus kötőhelyei hozzáférhetőségének szabályozását.

## 8. Summary

The von Willebrand factor (VWF) is a multimeric glycoprotein composed of 80- to 120-nm-long protomeric units and plays a fundamental role in mediating platelet function at high shear. In addition to its role in hemostasis, VWF is involved in many processes, which arises the possibility to use it as a biomarker or therapeutic target in various pathological processes.

In our work, on the one hand, we examined three laboratory parameters of VWF in clinical samples, and on the other hand, we stretched individual multimers by molecular combing and examined their structure using atomic force microscopy (AFM).

Osteoprotegerin (OPG) and VWF are stored in the Weibel-Palade bodies of the endothelial cells and released together into circulation. Both were elevated in the plasma of patients with peripheral artery disease compared to controls. We evidenced that OPG was higher in non-zero blood group patients and controls compared to zero groups, similarly to the VWF. The correlation between OPG and VWF activity was significant in non-zero group patients. These might explain the higher incidence of peripheral artery disease in non-zero group patients. Following radical prostatectomy, the level of VWF level and activity, the large multimers in the plasma of the patients increased compared to the preoperative state, decreased until the 6<sup>th</sup> day, but did not return to normal after 1 month but only 10 months, indicating the postoperative thrombotic risk.

We used a human VWF sample containing large multimers for single-molecule studies to examine the structure of the protomers in the multimers stretched by molecular combing. The elongation of protomers was uneven along the multimers, protomers extended through structural intermediates that could be grouped into 7 distinct topographical classes. Protomer extension progressed through uncoiling the C<sub>1-6</sub> domain segment and unfolding the A<sub>2</sub> domain with elastic extension. The last and most extended protomer conformations were localized at the ends and the middle of the multimer, respectively, revealing an apparent necking phenomenon characteristic of plastic-material behavior. Nanomanipulating the stretched multimers, we could locally extend selected sections, making domains other than A<sub>2</sub> and C accessible and confirming the local shear response potential of the VWF. The local shear response potential might ensure the tuned exposure of the cryptic binding places of the VWF.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Fretto LJ, Fowler WE, McCaslin DR, Erickson HP, McKee PA. (1986) Substructure of human von Willebrand factor. Proteolysis by V8 and characterization of two functional domains. *J Biol Chem*, 261: 15679-15689.
2. Casari C, Lenting PJ, Wohner N, Christophe OD, Denis CV. (2013) Clearance of von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1: 202-211.
3. Berntorp E. (2007) Erik von Willebrand. *Thromb Res*, 120 Suppl 1: S3-4.
4. Weyand AC, Flood VH. (2021) Von Willebrand Disease: Current Status of Diagnosis and Management. *Hematol Oncol Clin North Am*, 35: 1085-1101.
5. Lillicrap D. (2013) von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Blood*, 122: 3735-3740.
6. <https://www.mhe.hu/>. Magyar Hemofilia Egyesület.
7. Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R, Abdul-Kadir R, Arapshian A, Couper S, Grow JM, Kouides P, Laffan M, Lavin M, Leebeek FWG, O'Brien SH, Ozelo MC, Tosetto A, Weyand AC, James PD, Kalot MA, Husainat N, Mustafa RA. (2021) ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease. *Blood Adv*, 5: 301-325.
8. Shahidi M. (2017) Thrombosis and von Willebrand Factor. *Adv Exp Med Biol*, 906: 285-306.
9. Michels A, Lillicrap D, Yacob M. (2022) Role of von Willebrand factor in venous thromboembolic disease. *JVS Vasc Sci*, 3: 17-29.
10. Luo GP, Ni B, Yang X, Wu YZ. (2012) von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol*, 128: 158-169.
11. Rutten B, Maseri A, Cianflone D, Laricchia A, Cristell NA, Durante A, Spartera M, Ancona F, Limite L, Hu D, Li H, Uren NG, de Groot PG, Mannucci PM, Roest M. (2015) Plasma levels of active Von Willebrand factor are increased in patients with first ST-segment elevation myocardial infarction: a multicenter and multiethnic study. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 4: 64-74.
12. Qu L, Jiang M, Qiu W, Lu S, Zhao Y, Xia L, Ruan C, Zhao Y. (2016) Assessment of the Diagnostic Value of Plasma Levels, Activities, and Their Ratios of von Willebrand Factor and ADAMTS13 in Patients with Cerebral Infarction. *Clin Appl Thromb Hemost*, 22: 252-259.

13. Ding J, Chen Q, Zhuang X, Feng Z, Xu L, Chen F. (2014) Low paraoxonase 1 arylesterase activity and high von Willebrand factor levels are associated with severe coronary atherosclerosis in patients with non-diabetic stable coronary artery disease. *Med Sci Monit*, 20: 2421-2429.
14. Nagy EE, Varga-Fekete T, Puskas A, Kelemen P, Brassai Z, Szekeres-Csiki K, Gombos T, Csanyi MC, Harsfalvi J. (2016) High circulating osteoprotegerin levels are associated with non-zero blood groups. *BMC Cardiovasc Disord*, 16: 106.
15. Liu Y, Wang X, Li S, Hu H, Zhang D, Hu P, Yang Y, Ren H. (2014) The role of von Willebrand factor as a biomarker of tumor development in hepatitis B virus-associated human hepatocellular carcinoma: a quantitative proteomic based study. *J Proteomics*, 106: 99-112.
16. Hugenholtz GC, Adelmeijer J, Meijers JC, Porte RJ, Stravitz RT, Lisman T. (2013) An unbalance between von Willebrand factor and ADAMTS13 in acute liver failure: implications for hemostasis and clinical outcome. *Hepatology*, 58: 752-761.
17. Palyu E, Harsfalvi J, Tornai T, Papp M, Udvardy M, Szekeres-Csiki K, Pataki L, Vanhoorelbeke K, Feys HB, Deckmyn H, Tornai I. (2018) Major Changes of von Willebrand Factor Multimer Distribution in Cirrhotic Patients with Stable Disease or Acute Decompensation. *Thromb Haemost*, 118: 1397-1408.
18. Hugenholtz GC, Ruitenbeek K, Adelmeijer J, Pereboom IT, Meijers JC, van der Bij W, Porte RJ, Erasmus ME, Lisman T. (2015) Development of a Hyperactive Primary Hemostatic System During Off-Pump Lung Transplantation Resulting From an Unbalance Between von Willebrand Factor and Its Cleaving Protease ADAMTS13. *Am J Transplant*, 15: 1958-1966.
19. Radnay Z, Illes A, Udvardy M, Prohaszka Z, Sinkovits G, Csanyi MC, Kellermayer M, Kiss A, Harsfalvi J. (2022) Von Willebrand Factor and Platelet Levels before Conditioning Chemotherapy Indicate Bone Marrow Regeneration following Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplant Cell Ther*, 28: 830 e831-830 e837.
20. Harsfalvi J, Molnar Z, Csanyi MC, Domjan I, Flasko T, Kaposi A, Benyo M. (2020) Long-lasting prothrombotic state implied by changes of plasma von Willebrand factor parameters after radical prostatectomy for prostate malignancy. *Urol Oncol*, 38: 191-197.

21. Sukumar S, Lammle B, Cataland SR. (2021) Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *J Clin Med*, 10.
22. Kawecki C, Lenting PJ, Denis CV. (2017) von Willebrand factor and inflammation. *J Thromb Haemost*, 15: 1285-1294.
23. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. (1989) Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 264: 19514-19527.
24. Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. (2012) Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*, 120: 449-458.
25. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. (2015) von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*, 125: 2019-2028.
26. Canis K, McKinnon TA, Nowak A, Haslam SM, Panico M, Morris HR, Laffan MA, Dell A. (2012) Mapping the N-glycome of human von Willebrand factor. *Biochem J*, 447: 217-228.
27. Canis K, McKinnon TA, Nowak A, Panico M, Morris HR, Laffan M, Dell A. (2010) The plasma von Willebrand factor O-glycome comprises a surprising variety of structures including ABH antigens and disialosyl motifs. *J Thromb Haemost*, 8: 137-145.
28. Rauch A, Wohner N, Christophe OD, Denis CV, Susen S, Lenting PJ. (2013) On the versatility of von Willebrand factor. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 5: e2013046.
29. Erickson HP. (1994) Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 10114-10118.
30. Cao W, Cao W, Zhang W, Zheng XL, Zhang XF. (2020) Factor VIII binding affects the mechanical unraveling of the A2 domain of von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*, 18: 2169-2176.
31. Fu H, Jiang Y, Yang D, Scheiflinger F, Wong WP, Springer TA. (2017) Flow-induced elongation of von Willebrand factor precedes tension-dependent activation. *Nat Commun*, 8: 324.
32. Adachi T, Matsushita T, Dong Z, Katsumi A, Nakayama T, Kojima T, Saito H, Sadler JE, Naoe T. (2006) Identification of amino acid residues essential for heparin binding

- by the A1 domain of human von Willebrand factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 339: 1178-1183.
33. Shahbazi S, Lenting PJ, Fribourg C, Terraube V, Denis CV, Christophe OD. (2007) Characterization of the interaction between von Willebrand factor and osteoprotegerin. *J Thromb Haemost*, 5: 1956-1962.
  34. Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. (2018) The role of osteoprotegerin in the crosstalk between vessels and bone: Its potential utility as a marker of cardiometabolic diseases. *Pharmacol Ther*, 182: 115-132.
  35. Omland T, Ueland T, Jansson AM, Persson A, Karlsson T, Smith C, Herlitz J, Aukrust P, Hartford M, Caidahl K. (2008) Circulating osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 51: 627-633.
  36. Hosbond SE, Poulsen TS, Diederichsen AC, Nybo M, Rasmussen LM, Mickley H. (2012) Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis: a systematic update. *Scand Cardiovasc J*, 46: 203-211.
  37. Romijn RA, Bouma B, Wuyster W, Gros P, Kroon J, Sixma JJ, Huizinga EG. (2001) Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain. *J Biol Chem*, 276: 9985-9991.
  38. Brehm MA. (2017) Von Willebrand factor processing. *Hamostaseologie*, 37: 59-72.
  39. Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA. (1985) Substructure of human von Willebrand factor. *J Clin Invest*, 76: 1491-1500.
  40. De Ceunynck K, Rocha S, Feys HB, De Meyer SF, Uji-i H, Deckmyn H, Hofkens J, Vanhoorelbeke K. (2011) Local elongation of endothelial cell-anchored von Willebrand factor strings precedes ADAMTS13 protein-mediated proteolysis. *J Biol Chem*, 286: 36361-36367.
  41. Wohnner N, Kovacs A, Machovich R, Kolev K. (2012) Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathways. *Thromb Res*, 129: e41-46.
  42. The Nobel Prize in Physics 1986. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023. Sat. 4 Mar 2023. <<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1986/summary/>>
  43. Binnig G, Quate CF, Gerber C. (1986) Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56: 930-933.

44. Henderson E. (1992) Imaging and nanodissection of individual supercoiled plasmids by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res*, 20: 445-447.
45. Wen CK, Goh MC. (2006) Fibrous long spacing type collagen fibrils have a hierarchical internal structure. *Proteins*, 64: 227-233.
46. Guthold M, Liu W, Stephens B, Lord ST, Hantgan RR, Erie DA, Taylor RM, Jr., Superfine R. (2004) Visualization and mechanical manipulations of individual fibrin fibers suggest that fiber cross section has fractal dimension 1.3. *Biophys J*, 87: 4226-4236.
47. Kreplak L, Bar H, Leterrier JF, Herrmann H, Aebi U. (2005) Exploring the mechanical behavior of single intermediate filaments. *J Mol Biol*, 354: 569-577.
48. Sziklai D, Sallai J, Papp Z, Kellermayer D, Martonfalvi Z, Pires RH, Kellermayer MSZ. (2022) Nanosurgical Manipulation of Titin and Its M-Complex. *Nanomaterials (Basel)*, 12.
49. Fotiadis D, Scheuring S, Muller SA, Engel A, Muller DJ. (2002) Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron*, 33: 385-397.
50. Bergal HT, Jiang Y, Yang D, Springer TA, Wong WP. (2022) Conformation of von Willebrand factor in shear flow revealed with stroboscopic single-molecule imaging. *Blood*, 140: 2490-2499.
51. Parker ET, Lollar P. (2021) Conformation of the von Willebrand factor/factor VIII complex in quasi-static flow. *J Biol Chem*, 296: 100420.
52. Shankaran H, Alexandridis P, Neelamegham S. (2003) Aspects of hydrodynamic shear regulating shear-induced platelet activation and self-association of von Willebrand factor in suspension. *Blood*, 101: 2637-2645.
53. Ohmori K, Fretto LJ, Harrison RL, Switzer ME, Erickson HP, McKee PA. (1982) Electron microscopy of human factor VIII/Von Willebrand glycoprotein: effect of reducing reagents on structure and function. *J Cell Biol*, 95: 632-640.
54. Zhou YF, Eng ET, Nishida N, Lu C, Walz T, Springer TA. (2011) A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *EMBO J*, 30: 4098-4111.
55. Muller JP, Mielke S, Lof A, Obser T, Beer C, Bruetzel LK, Pippig DA, Vanderlinden W, Lipfert J, Schneppenheim R, Benoit M. (2016) Force sensing by the vascular protein von Willebrand factor is tuned by a strong intermonomer interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 1208-1213.

56. Lof A, Konig G, Schneppenheim S, Schneppenheim R, Benoit M, Budde U, Muller JP, Brehm MA. (2019) Advancing multimer analysis of von Willebrand factor by single-molecule AFM imaging. *PLoS One*, 14: e0210963.
57. Marchant RE, Lea AS, Andrade JD, Bockenstedt P. (1992) Interactions of Vonwillebrand-Factor on Mica Studies by Atomic Force Microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 148: 261-272.
58. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. (1996) Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*, 88: 2939-2950.
59. Raghavachari M, Tsai H, Kottke-Marchant K, Marchant RE. (2000) Surface dependent structures of von Willebrand factor observed by AFM under aqueous conditions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 19: 315-324.
60. Seyfried BK, Friedbacher G, Rottensteiner H, Schwarz HP, Ehrlich H, Allmaier G, Turecek PL. (2010) Comparison of plasma-derived and recombinant von Willebrand factor by atomic force microscopy. *Thromb Haemost*, 104: 523-530.
61. Bonazza K, Rottensteiner H, Schrenk G, Frank J, Allmaier G, Turecek PL, Scheiflinger F, Friedbacher G. (2015) Shear-Dependent Interactions of von Willebrand Factor with Factor VIII and Protease ADAMTS 13 Demonstrated at a Single Molecule Level by Atomic Force Microscopy. *Anal Chem*, 87: 10299-10305.
62. Ying J, Ling Y, Westfield LA, Sadler JE, Shao JY. (2010) Unfolding the A2 domain of von Willebrand factor with the optical trap. *Biophys J*, 98: 1685-1693.
63. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA. (2009) Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*, 324: 1330-1334.
64. Wang Y, Morabito M, Zhang XF, Webb E, 3rd, Oztekin A, Cheng X. (2019) Shear-Induced Extensional Response Behaviors of Tethered von Willebrand Factor. *Biophys J*, 116: 2092-2102.
65. Lof A, Muller JP, Brehm MA. (2018) A biophysical view on von Willebrand factor activation. *J Cell Physiol*, 233: 799-810.
66. Sixma JJ, Schiphorst ME, Verweij CL, Pannekoek H. (1991) Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin. *Eur J Biochem*, 196: 369-375.



67. Cejka J. (1982) Enzyme immunoassay for factor VIII-related antigen. *Clin Chem*, 28: 1356-1358.
68. Mendelboum Raviv S, Szekeres-Csiki K, Jenei A, Nagy J, Shenkman B, Savion N, Harsfalvi J. (2012) Coating conditions matter to collagen matrix formation regarding von Willebrand factor and platelet binding. *Thromb Res*, 129: e29-35.
69. Hubbard AR. (2006) von Willebrand factor standards for plasma and concentrate testing. *Semin Thromb Hemost*, 32: 522-528.
70. Stocksclaeder M, Schneppenheim R, Budde U. (2014) Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 25: 206-216.
71. Udvardy ML, Szekeres-Csiki K, Harsfalvi J. (2009) Novel evaluation method for densitometric curves of von Willebrand factor multimers and a new parameter (M(MW)) to describe the degree of multimersation. *Thromb Haemost*, 102: 412-417.
72. Martonfalvi Z, Kellermayer M. (2014) Individual globular domains and domain unfolding visualized in overstretched titin molecules with atomic force microscopy. *PLoS One*, 9: e85847.
73. Flood VH. (2014) Perils, problems, and progress in laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost*, 40: 41-48.
74. Sonneveld MA, Cheng JM, Oemrawsingh RM, de Maat MP, Kardys I, Garcia-Garcia HM, van Geuns RJ, Regar E, Serruys PW, Boersma E, Akkerhuis KM, Leebeek FW. (2015) Von Willebrand factor in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome. Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Thromb Haemost*, 113: 577-584.
75. Kingsbury KJ. (1971) Relation of ABO blood-groups to atherosclerosis. *Lancet*, 1: 199-203.
76. Benyo M, Harsfalvi J, Pfliegler G, Molnar Z, Muranyi M, Jozsa T, Flasko T. (2014) Present practice of thrombosis prophylaxis of radical prostatectomy in a European country: a Hungarian multicenter study. *Urol Int*, 92: 289-293.
77. Violette PD, Cartwright R, Briel M, Tikkinen KA, Guyatt GH. (2016) Guideline of guidelines: thromboprophylaxis for urological surgery. *BJU Int*, 118: 351-358.
78. Lof A, Walker PU, Sedlak SM, Gruber S, Obser T, Brehm MA, Benoit M, Lipfert J. (2019) Multiplexed protein force spectroscopy reveals equilibrium protein folding

- dynamics and the low-force response of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 18798-18807.
79. Kalagara T, Moutsis T, Yang Y, Pappelbaum KI, Farken A, Cladder-Micus L, Vidal YSS, John A, Bauer AT, Moerschbacher BM, Schneider SW, Gorzelanny C. (2018) The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium. *Blood Adv*, 2: 2347-2357.
  80. Morabito M, Dong C, Wei W, Cheng X, Zhang XF, Oztekin A, Webb E, III. (2018) Internal Tensile Force and A2 Domain Unfolding of von Willebrand Factor Multimers in Shear Flow. *Biophysical Journal*, 115: 1860-1871.
  81. Springer TA. (2014) von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood*, 124: 1412-1425.
  82. Chen PC, Kutzki F, Mojzisch A, Simon B, Xu ER, Aponte-Santamaria C, Horny K, Jeffries C, Schneppenheim R, Wilmanns M, Brehm MA, Grater F, Hennig J. (2022) Structure and dynamics of the von Willebrand Factor C6 domain. *J Struct Biol*, 214: 107923.
  83. Xu ER, von Bulow S, Chen PC, Lenting PJ, Kolsek K, Aponte-Santamaria C, Simon B, Foot J, Obser T, Schneppenheim R, Grater F, Denis CV, Wilmanns M, Hennig J. (2019) Structure and dynamics of the platelet integrin-binding C4 domain of von Willebrand factor. *Blood*, 133: 366-376.
  84. Zhang Q, Zhou YF, Zhang CZ, Zhang X, Lu C, Springer TA. (2009) Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 9226-9231.
  85. Languin-Cattoen O, Laborie E, Yurkova DO, Melchionna S, Derreumaux P, Belyaev AV, Sterpone F. (2021) Exposure of Von Willebrand Factor Cleavage Site in A1A2A3-Fragment under Extreme Hydrodynamic Shear. *Polymers (Basel)*, 13.
  86. Buehler MJ, Ackbarow T. (2007) Fracture mechanics of protein materials. *Materials Today*, 10: 46-58.
  87. UniProt P04275 VWF\_HUMAN <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P04275/entry>.
  88. Protein Data Bank <https://www.rcsb.org/>.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Nagy EE, Varga-Fekete T, Puskas A, Kelemen P, Brassai Z, Szekeres-Csiki K, Gombos T, Csanyi MC, Harsfalvi J. High circulating osteoprotegerin levels are associated with non-zero blood groups. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016 May 26;16(1):106. doi: 10.1186/s12872-016-0287-2. PMID: 27387019; PMCID: PMC4937555.

Harsfalvi J, Molnar Z, Csanyi MC, Domjan I, Flasko T, Kaposi A, Benyo M. Long-lasting prothrombotic state implied by changes of plasma von Willebrand factor parameters after radical prostatectomy for prostate malignancy. *Urol Oncol.* 2020 Apr;38(4):191-197. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.10.007. Epub 2019 Nov 9. PMID: 31711834.

Csányi MC, Salamon P, Feller T, Bozó T, Hársfalvi J, Kellermayer MSZ. Structural hierarchy of mechanical extensibility in human von Willebrand factor multimers. *Protein Sci.* 2023 Jan;32(1):e4535. doi: 10.1002/pro.4535. PMID: 36478480; PMCID: PMC9798247.

### 10.2 A disszertációtól független közlemények

Feller T, Hársfalvi J, Csányi C, Kiss B, Kellermayer M. Plasmin-driven fibrinolysis in a quasi-two-dimensional nanoscale fibrin matrix. *J Struct Biol.* 2018 Sep;203(3):273-280. doi: 10.1016/j.jsb.2018.05.010. Epub 2018 May 30. PMID: 29859328.

Radnay Z, Illés Á, Udvardy M, Prohászka Z, Sinkovits G, Csányi MC, Kellermayer M, Kiss A, Hársfalvi J. Von Willebrand Factor and Platelet Levels before Conditioning Chemotherapy Indicate Bone Marrow Regeneration following Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplant Cell Ther.* 2022 Dec;28(12):830.e1-830.e7. doi: 10.1016/j.jtct.2022.08.028. Epub 2022 Sep 2. PMID: 36058547.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Hársfalvi Jolánnak* tanácsaiért, segítségéért, ötleteiért és irányomba tanúsított türelméért.

Köszönöm az intézetvezetőknek, *Kellermayer Miklósnak*, aki biztosította számomra, hogy PhD munkámat a Biofizikai Intézetben végezhettem, amihez a legkorszerűbb műszerek álltak rendelkezésemre.

Köszönettel tartozom *Bozó Tamásnak* és *Feller Tímeának* az atomerő-mikroszkóp használatának tanításáért, valamint az eredmények, ötletek közös átgondolásáért.

Köszönöm *Salamon Pálnak* és *Sziklai Dominiknak* a segítséget a kísérletekben és az eredmények értékelésében.

Köszönöm *Komárné Drabbant Mónika* és *Szendefyné Lór Krisztina* segítségét a laboratóriumi munkában.

Köszönöm a *Biofizikai és Sugárbiológia Intézet* összes munkatársának a segítségét és támogatását.

Köszönöm *Pál Richárdnak*, és *családomnak* a folyamatos támogatást, amelyet tőlük az évek során kaptam.