

# Humán von Willebrand faktor klinikai mintákban és egymolekula szinten

Doktori tézisek

**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

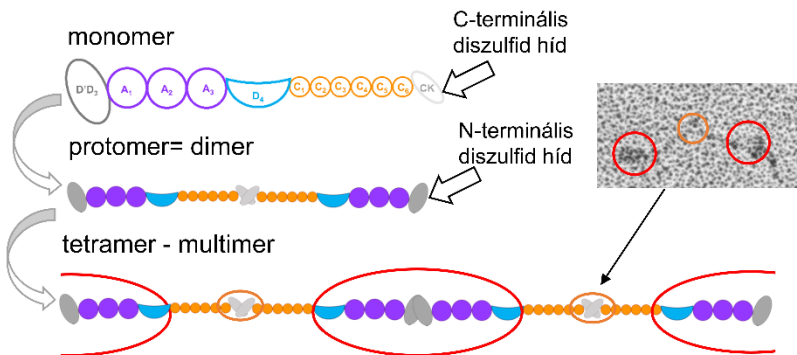
2023

## 1. Bevezetés

A pre-pro-VWF egy 22 aminosav hosszúságú szignál peptidből, a 741 aminosav hosszúságú propeptidből valamint a 2051 aminosavból felépülő érett VWF alegységből áll. 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. A VWF kifejezés az egytől kezdve az akár több mint 100 dimer egységből álló multimerek sokaságát jelenti (**1. ábra**).

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 kaszkád 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. 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 trombózis veszély áll fenn. A multimerok méretét a keringésben az ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, member 13) enzim szabályozza.



**1. ábra.** A VWF multimerizációja. A monomerek a C-terminális CK domének között létrejövő diszulfid hidak által dimerizálódnak. A dimerek az N-terminális D<sub>1</sub>D<sub>2</sub> domének közötti diszulfid hidakon keresztül multimerizálódnak. Az ábrán nincs feltüntetve a D<sub>1</sub>D<sub>2</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 és a multimer sematikus rajzán jelöltem azokat a doméneket, melyek a multimeren periodikusan megjelenő kis (narancssárga keret) és nagy (piros keret) csomókat alkotják.

A VWF multimerok első transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képein, már látható volt a molekula periódikus szerkezete, de ezt csak később hozták kapcsolatba a doménekkal (**1. ábra**). Ezekben a VWF mintát a felszínre permetezték, ennek során a multimerok megnyúlhattak. A képeken hajlékony fonálszerű szerkezet figyelhető meg, amelyen kisebb és nagyobb csomók helyezkednek el szabályos távolságokban. A multimerok egyik végén általában nagy csomó van, ebből arra következtettek, hogy ez felel meg a dimer N-terminális végének. Ahol ez hiányzik, az valószínűleg az

ADAMTS13 hasításának következménye. A kisebb csomót a C-terminális végekkel azonosították. A TEM képek alapján a protomer hossza 120 nm.

## 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 prosztatektómián átesett betegekben, műtét előtt és után, amikor a tumor jelenléte, majd a műtėti érkárosodás protrombotikus állapothoz vezethet, mennyire változik a VWF:Ag, a VWF:CB és multimer eloszlás valamint az ADAMTS13?

II. Egy-molekula szinten milyen axiális szerkezeti változások mutathatók ki a multimerek relaxált és nyújtott állapotában? 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**

#### ***A VWF tisztítása***

A humán plazma eredetű VWF multimereket terápiában használt koncentrátumból tisztítottuk HiTrap Heparin HP oszlopon, mivel affinitás alapján elválasztható az albumintól. Az eluálást NaCl gradienssel végeztük, így kis molekulásúlyú (LMW) és nagy molekulásúlyú (HMW) multimereket tartalmazó frakciókat nyertünk. A tisztítást SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel és Coomassie Blue fehérje festéssel ellenőriztük.

#### ***A VWF mennyiségének és funkciójának tesztelése***

A VWF mennyiségének és funkciójának tesztelésére ELISA módszereket alkalmaztunk. A mintákban a VWF antigén mennyiségét (VWF:Ag) és a VWF kollagén kötő aktivitását (VWF:CB) vizsgáltuk. A VWF mennyiségi meghatározásához poliklonális antitesttel, míg a minőségi jellemzéséhez kollagénnel fedtük a lemez felszínét, amelyhez a VWF kötődött a mintákból. A felszínhez kötött immunkomplexet enzimreakció segítségével mutattuk ki. A VWF kollagénnel történő kötődése érzékeny a HMW multimerek arányára a mintában, melyek a VWF funkciójához szükségesek a primer hemosztázisban.

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

A multimerek méreteloszlását SDS-agaróz gélelektroforézis és immunoblot segítségével vizsgáltuk. Azonban az SDS-agaróz elektroforézis során a multimereket nem redukáló pufferben futtatva azok molekulásúly

szerint egymástól külön választhatók, így a különböző méretű multimerok jelenléte és relatív mennyiségük vizsgálható.

### ***Atomierő-mikroszkópia (AFM)***

A legtöbb kísérlethez frissen hasított csillámpalát használtunk felszínként. A VWF-t kétféle módon rögzítettük a felszínen. Egyik esetben 10 µl, 2 µg/ml VWF oldatot csepegtettünk a felszínre, 1 perc után MilliQ vízzel lemostuk és megszáritottuk. Másik esetben a VWF-t molekuláris fésüléssel rögzítettük. Az erre a célra átalakított mikrocentrifuga sík rotorjába rögzítettük a fémkorongra ragasztott csillámot. 20 µl, 2 µg/ml VWF oldat felvitele után azonnal elindítottuk a centrifugálást (5685g, 10 s). A mintát kivéve azt lemostuk és megszáritottuk.

A képalkotáshoz Cypher S (Oxford Instruments Asylum Research) AFM-et AC üzemmódban használtuk. A pásztázás levegőben szilícium rugólapkával (OMCL-AC160TS-R3, Olympus) történt.

Néhány esetben a képalkotás után a mintákat 100 µl különböző koncentrációjú ditiotreitollal (DTT) (0,1 mM, 2 mM, 20 mM) kezeltük 10 percig. A DTT a multimerben lévő diszulfid kötésekkel redukálta. Ezt követően a mintákról mosás és szárítás után új képeket vettünk fel.

A nanomanipulációhoz a VWF-t molekuláris fésüléssel rögzítettük a felszínen. A nanomanipulációt levegőben, kontakt üzemmódban végeztük ugyanazzal a rugólapkával, amellyel a manipuláció előtt és után is a képeket készítettük. Nanomanipuláció során a rugólapka tujét a felszínhez nyomtuk, majd oldal irányba elmozdítottuk.

## **4. Eredmények**

### **4.1. A VWF vizsgálata klinikai mintákban**

A VWF emelkedett mennyisége sok kórképben igazolt. Két trombózis rizikóval rendelkező betegcsoportot vérplazma mintáiban

vizsgáltunk a következő VWF paramétereket: a VWF koncentrációt (VWF:Ag) és a funkcionális tesztek közül a kollagén kötő aktivitást (VWF:CB) mértük, és egyik esetben a multimerok eloszlását is 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, ezért mindkét csoportot kettéosztottuk, aszerint, hogy nullás vagy nem nullás a vércsoportjuk. A csoportokat Mann-Whitney és Spearman-féle rangkorrelációs teszttel hasonlítottuk össze. 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. A nem nullás vércsoport esetén a PAD és kontroll csoportban is szignifikánsan magasabb volt az OPG, a VWF:Ag és a VWF:CB. 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. A nem-nullás vércsoportú egyénekben (n = 149) a korreláció az OPG és VWF:CB között szignifikáns volt.

Prostata adenokarcinóma miatt radikális prosztatektómiát (RP) követően a betegek plazmájában a VWF: Ag és VWF:CB mellett a multimerok eloszlását is vizsgáltuk. A műtét előtti napon vett minta a beteg kezdeti állapotát jellemzi. A műtét után egy órával a műtét közvetlen hatását, hat nappal a műtét utáni periódust, az immobilizáció hatását, egy hónappal a megnövekedett trombózis rizikó végét és tíz hónappal a teljes felépülést jellemzik a minták. A műtét előtti napon emelkedett volt a VWF:Ag és VWF:CB is a kontroll csoporthoz képest, bár ez az eltérés csak a VWF:CB esetén volt szignifikáns. A műtét után már egy órával is szignifikánsan

magasabb volt a VWF:Ag és a VWF:CB a kezdeti állapothoz képest, amelyek egy hónap után csökkentek a kezdeti állapot szintjére, 10 hónap után pedig a kontroll csoport szintjére. A multimer eloszlást az elektroforézis képdenzitometriás görbéinek analízise alapján számszerűsítettük egy  $M_{MW25}$  paramétert bevezetésével. Elektroforézissel molekulásúlyuk szerint a legnagyobbtól a dimerig létraszerűen detektálhatók a multimerék és a görbe alatti terület felső 25% határához tartozó relatív mobilitás molekulásúlyban (MW) kifejezve, amely a HMW multimerék arányát jellemzi. A multimer analízis alapján a műtét előtt a betegek multimer eloszlása a kontrollokéhoz hasonló volt. A  $M_{MW25}$  értékek a VWF:Ag és a VWF:CB értékekhez hasonló módon változtak.

#### **4.2. A VWF relaxált szerkezetének vizsgálata AFM-mel**

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

Az LMW multimerék néhány csomóból állnak, melyeket vékony szakaszok kötnek össze. A HMW multimerекnél ez a szerkezet sokkal hosszabb, több csomóból áll, és véletlenszerű tekeresként (random coil) rögzül a felszínen. A multimereket alkotó dimerek nyitott és zárt állapotban is lehetnek, melyet több tényező befolyásol, pl. a kétértékű kationok jelenléte vagy a pH. Csillám felszínen a vizsgált multimerекnek ( $n = 625$ ) csak egy kis része, ~5% tartalmazott zárt állapotú dimereket. A multimerék rögzülését a felszín is jelentősen befolyásolja. Míg a negatív töltésű csillám felszínen a multimerék egy lazább, valamelyest szétterült formában rögzültek, addig pozitív töltésű PLL felszínen kompakt szerkezetet mutattak. Ez a kompakt



szerkezet kevésbé volt előnyös 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 ha a VWF oldat pH = 6,00 volt, mind csillám, mind PLL felszín esetén kompaktabb konformációban rögzültek a multimerek, mint pH = 7,4 oldatból.

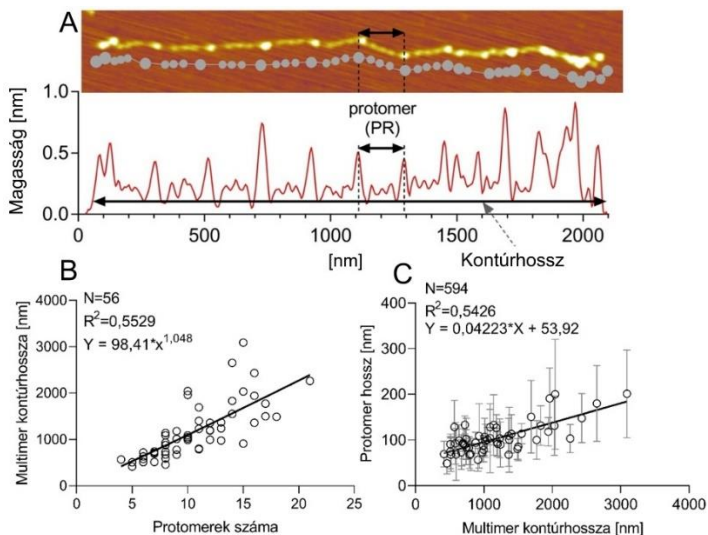
### **4.3. A VWF megnyújtott szerkezetének vizsgálata**

A VWF multimerek molekuláris fésüléssel megnyútlak és orientálódtak. A megnyújtott multimereken is megfigyelhető a gyöngysorszerű struktúra, csak a csomók eltávolodtak egymástól, azaz az összekötő szakaszok nyútlak meg. A multimereken tükör szimmetrikus ismétlődő egységek figyelhetők meg. Ezeket az egységeket a multimer különböző mértékben megnyútlak protomereiként (PR) azonosítottuk.

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

A protomer határai az adott szakaszon megtalálható legmagasabb csomók (nagy csomók), e csomók közötti távolság pedig a protomer távolságának felel meg (**2.A ábra.**). A multimer kontúrhossza hatványfüggvény szerint nő a felépítő protomerek számától függően (**2.B ábra.**). Ez arra enged következtetni, hogy a multimer kontúrhossza nem a protomerek elméleti hosszának összege, hanem a különböző mértékben megnyútlak egyedi protomerek megnyúlásának az összege befolyásolja a teljes

multimer hosszát. A teljes protomerhossz nem állandó, hanem a multimer hosszával növekszik (**2.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.

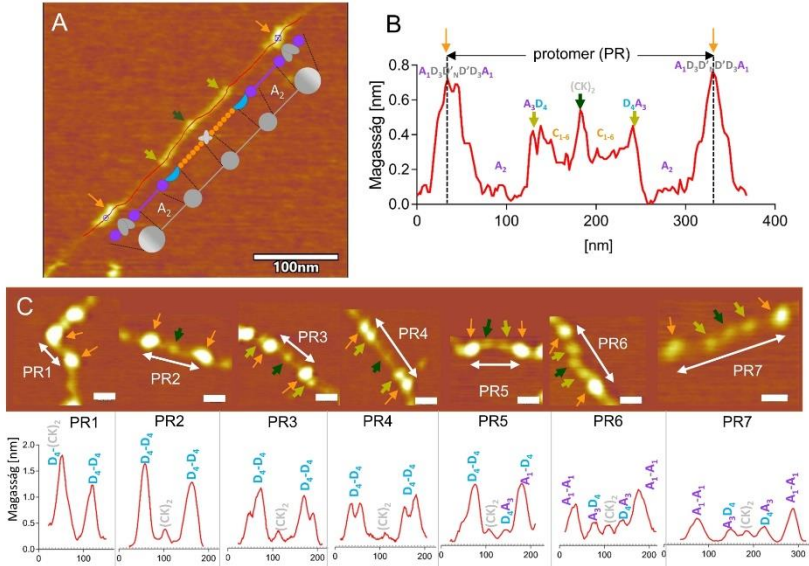


**2. ábra.** A protomerek hosszúságának elemzése a megnyújtott multimerekben. **(A)** Egy megnyújtott multimer AFM magasság képe és a gyöngysor szerkezet sematikus rajza szürkével. Alatta a multimer magasságprofilja, amin két nagy csomó közötti részt azonosítottuk a VWF protomereként (PR). **(B)** A multimerek kontúrhossza a multimert felépítő protomerek számának függvényében. **(C)** A magasságprofilon mért protomer hossz 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 típust különítettünk el és soroltunk osztályokba (PR1-PR7). A domének helyzetének meghatározását a leginkább megnyúlt tükörszimmetrikus szerkezeten mutatjuk be (**3.A-B ábra**), melyben a protomert határoló két nagy csomó között három kisebb csomó figyelhető meg. A középben elhelyezkedő kis csomó a (CK)<sub>2</sub> doménnek felel meg, ettől két oldalt szimmetrikusan a

másik két kis csomó az  $A_3D_4$  doménekkal azonosítható. A 7 protomer osztályra (konformerekre) egy-egy példát a **3.C ábrán** mutatunk be. A fő konformerek szimmetrikusak, de megfigyeltünk aszimmetrikus konformereket is. A különböző osztályokba sorolt protomereket részletesen elemeztük. A 3 típusú csomó (nagy,  $A_3D_4$ ,  $(CK)_2$ ) magassága a protomer hosszával csökkent, amit valószínűleg a csomókat alkotó domének részleges kitekérése okoz. A relaxált állapotban rögzült multimerek esetében főleg a kompaktabb PR1 és PR2 protomerek voltak megfigyelhetők (98,5% gyakoriság), amelyekben inkább a nagy csomók vannak jelen, míg a magasabb sorszámú konformerek (PR3-7), amikben a kis csomók is jól kivehetők gyakorlatilag nem jelentek meg. Ettől eltérően a molekuláris fésüléssel megnyújtott multimerekben a PR1 és PR2 gyakorisága jelentősen csökkent (43,5%) és a magasabb sorszámú protomerek is megjelentek. Hogy jobban tudjuk jellemezni a protomer megnyúlást megvizsgáltuk a  $C_{1-6}$  szakasz és az  $A_2$  domén hosszát. A  $C_{1-6}$  szakasz hosszának gyakorisága  $\sim 10$  nm-nél mutat egy maximumot, majd fokozatosan csökken. Az  $A_2$  domén hosszának gyakorisága 0 és 40 nm között közel állandó és ezután csökken.

Az eltérő protomer osztályok hossza független volt a multimeren belüli elhelyezkedésüktől és az eloszlásuk egyenetlen volt. A rövid (PR1) protomerek inkább a multimerek végein, míg a hosszabbak (PR6, PR7) inkább a multimerek közepén helyezkedtek el.

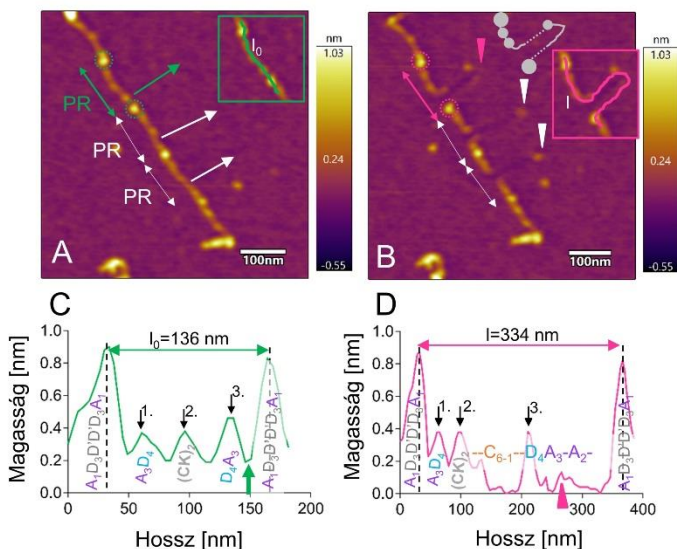


**3. ábra.** A konformációs állapotok hozzárendelése a VWF protomerekhez. (A) Egy nagymértékben megnyúlt VWF protomer AFM képe. Az AFM ábra alatt a protomer doménszerkezetét, alatta szürke csomós szerkezetét mutatják a sematikus rajzok. A narancssárga nyilak az N-terminális nagy csomóit jelölik, amelyek ebben az esetben az  $A_1D_3D'D'D_3A_1$  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 méréskála a PR1-PR6 esetén 40 nm, PR7 esetén 60 nm. A nyilak szinkódolása az (A) résszel megegyező.

### 4.3. A VWF megnyújtott szerkezetének vizsgálata

A molekuláris fésüléssel csillámra rögzített multimerek esetleges további nyújthatóságát nanomanipuláció alkalmazásával vizsgáltuk. A multimer különböző mértékben megnyúlt részeit az AFM tú a multimer axiális tengelyére merőleges irányú elmozdításával tovább nyújtottuk. A kiválasztott

szakaszokat hajtúszerűen sikerült úgy megnyújtani, hogy a multimer többi része nem mozdult el (4. ábra).



**4. ábra.** Molekuláris fészüléssel rögzített multimer nanomanipulációja. Egy multimer szakasz manipulációja (A) előtt és (B) után készült AFM kép, mely során 3 szakasz lett megnyújtva, szakadás nélkül. 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 magasságprofilot mutatja. A magasságprofilon jelölve vannak az adott résznek megfelelő domének. Az  $l_0$  a szakasz eredeti hosszát,  $l$  a manipuláció utáni hosszát jelenti.

Bizonyos esetekben addig nyújtottuk az adott szakaszt, hogy elszakadt. Aszerint, hogy a manipuláció során a szakasz elszakadt vagy sem két csoportra osztottuk a manipulált szakaszokat a további elemzésekhez. A megnyújtott szakaszban a csomókat fonálszerű szakaszok kötik össze, melyek magassága néhol az AFM függőleges irányú felbontásával összemérhető, így a megnyújtás során folytonosság hiány (hézag) látszik a kinyújtott

szakaszban, de nem a jellegzetes, szakadási szimmetria a hajtúkanyar végén. A képeken megmértük a szakaszok kezdeti átlagmagasságát, a kezdeti hosszt, a nyújtás utáni hosszt és a szakadás hosszát. A hossznövekmény a megnyújtott és a kezdeti hossz különbsége, szakadás esetén annak a hosszát levontuk. A megnyúlás mértéke a megnyújtott és a kezdeti hossz hányadosa. Az átlagmagasság csökkenése a megnyújtás utáni átlagmagasság és a kezdeti átlagmagasság különbségének abszolút értéke.

Összesen 11 (27,5%) esetben szakadtak el a meghúzott szakaszok, ebből négyszer az A- négyszer a C-doménekhez köthető helyen. Két esetben nem tudtuk pontosan megállapítani a szakadás helyét. 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. A hossznövekmény (217- vs. 72 nm) és a megnyúlás is jelentősen nagyobb volt azon szakaszok esetén, amelyek nem szakadtak el (2,79-szeres az 1,57-szereshez képest). A szakaszok eredeti átlagmagassága és az átlagmagasság csökkenése a két csoport esetében hasonló volt. A nanomanipuláció a szakaszok megnyúlása a magasság rovására történt, vagyis az eredeti szerkezetből húzódtak ki, vagy tekeredtek le az újonnan megjelenő részek.

## **5. 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 atomerő-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 egyénekben az oszteoprotegerin mennyisége és VWF kollagénkötő aktivitása közötti korreláció jelentős volt. Ezek a vércsoporthoz köthető különbségek magyarázhatják a betegség magasabb gyakoriságát a nem-nullás vércsoportúakban a nullás vércsoportúakhoz képest.
2. Radikális prosztatatektómia 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 alátámasztja 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 C1-6

domének nyúltak meg, majd az A2 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 fészüléssel rögzített multimerek kiválasztott részeit, melynek eredményeként az A és C doméneken kívül egyéb domének nyúlása, esetenként szakadása és kötőhelyek feltárulása is feltételezhető.



## 6. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. 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.
2. 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.
3. 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.

### A disszertációtól független közlemények

1. 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.
2. 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.