KU LEUVEN

FACULTEIT WETENSCHAPPEN

Anti-C-terminale monoklonale antilichamen: de aanzet naar een verhoogde ADAMTS13 activiteit

Elien ROOSE

Promotor: Prof. dr. K. Vanhoorelbeke

Begeleider: *Louis Deforche*

Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van

Master of Science in de Biochemie & Biotechnologie

Academiejaar 2012-2013

© Copyright by KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wendt u tot de KU Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11 bus 2100, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

Dankwoord

Als eerste gaat mijn dank uit naar mijn promotor professor Karen Vanhoorelbeke en begeleider Louis Deforche die mij tijdens het verwezenlijken van deze masterproef begeleid hebben. Met raad en daad hebben ze me bijgestaan om stap voor stap de opbouw van deze masterproef mogelijk te maken.

Mijn dank gaat ook uit naar het laborantenteam Aline, Inge, Nele en Vicky. Vooral Inge verdient hier een bijzondere vermelding als dank voor het uitvoeren van de fusies. Maar ook de andere drie laborantes verdienen zeker een pluim. Geen enkele vraag is voor hen te veel en vaak is slechts een half woord nodig om een antwoord te krijgen.

Ook Katleen verdient een dank je wel voor het uitvoeren van de immunisaties en het afnemen van de bloedstalen bij de muisjes.

Hanne verdient zeker een plaatsje in dit dankwoord. Ze vergezelde me vaak tijdens de ritjes richting Leuven toen we tussendoor les hadden. Ze kon me steeds weer moed inpraten op momenten dat het even tegenzat of wanneer het even niet goed liep.

Mijn familie en vrienden mogen hier zeker niet vergeten worden. Ondanks hun geringe achtergrond over het onderwerp waren ze toch een steun en toeverlaat.

’s Morgens vertrok ik nooit met tegenzin naar het labo. De aanwezigheid van de andere doctoraatstudenten en personeelsleden van het tromboseteam maakten het immers zeer aangenaam om in het labo te werken. Vandaar dat ook zij een vermelding verdienen in dit dankwoord.

Inhoudsopgave

DANKWOORD ..... **I**

INHOUDSOPGAVE ..... **II**

DEEL I LITERATUURSTUDIE **1**

1. BLOED **2**

2. HEMOSTASE **5**

2.1 PRIMAIRE HEMOSTASE 5
2.2 SECUNDAIRE HEMOSTASE 7
2.3 FIBRINOLYSE 7

3. VON WILLEBRAND FACTOR **9**

3.1 BIOSYNTHESE 9
3.2 STRUCTUUR 11
3.3 REGULATIE VAN DE MULTIMEERGROOTTE 12

4. ADAMTS13 EN ZIJN WERKINGSMECHANISME **15**

4.1 DE WERKING VAN HET MDTCS KOPDOMEIN 16
4.2 DE MOGELIJKE ROL VAN HET C-TERMINALE STAARTDOMEIN 18

5. TROMBOTISCHE TROMBOCYTOPENISCHE PURPURA **21**

5.1 TYPES TTP 22
5.1.1 Congenitale TTP of Upshaw-Schulman syndroom *22*
5.1.2 Verworven of idiopatische TTP *23*
5.2 BEHANDELINGEN 23
5.3 TOEKOMST 24

6. DE ONTWIKKELING VAN MABS KAN DE ROL VAN DE STAART VAN ADAMTS13 HELPEN ONTRAFELEN **25**

7. DOELSTELLING **28**

DEEL II EXPERIMENTEEL ONDERZOEK **30**

1. MATERIAAL EN METHODEN **31**

1.1 PRODUCTIE EN OPZUIVERING VAN MADAMTS13 VOOR DE IMMUNISATIE VAN ADAMTS13$^{-/-}$ MUIZEN .. 31
1.1.1 De productie van mADAMTS13 ..... *31*
1.1.2 Opzuivering van mADAMTS13 ..... *33*
1.1.3 Dotblot van de geëlueerde fracties *34*
1.1.4 Concentratie- en zuiverheidsbepaling van het opgezuiverde mADAMTS13 ..... *35*
1.1.5 Immunisatie en serumscreening van ADAMTS13$^{-/-}$ muizen met mADAMTS13 ..... *36*

1.1.6 Fusie *38*
1.1.7 Screening op positieve klones na fusie *38*
1.2 ONTWIKKELING EN BEPALING FUNCTIONALITEIT VAN ANTI-HUMAAN ADAMTS13 MABS 39
1.2.1 Serumscreening na immunisatie met hADAMTS13 ..... *39*
1.2.2 Screening op positieve klones na de fusie *39*
1.2.3 Opgroeien van positieve hybridoma's voor de productie van anti-hADAMTS13 mAbs *39*
1.2.4 Opzuiveren van anti-hADAMTS13 mAbs via proteïne G Sepharose kolom *40*
1.2.5 SDS-PAGE van de opgezuiverde mAbs *41*
1.2.6 Epitoop mapping *42*
1.2.7 Functionaliteitstesten van de anti-hADAMTS13 mAbs *43*
A. Anti-hADAMTS13 mAbs als coating 43
B. Anti-hADAMTS13 gebiotinyleerde mAbs als detectie 43
C. BindingsELISA van hADAMTS13 aan rechtstreeks gecoat *purified* VWF 43
D. BindingsELISA van hADAMTS13 aan gevangen pVWF 44
E. FRETS-VWF73 44
1.3 KLONERING HSPACERC2 IN DE PSECTAG/FRT/V5-HIS TOPO® VECTOR 46
1.3.1 Amplificatie van het hSpacerC2 gen *46*
1.3.2 Ligatie en transformatie *47*
1.3.3 Miniprep *48*
1.3.4 Controle aanwezigheid en richting van het hSpacerC2 gen in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector *48*
1.3.5 Megaprep *49*
1.3.6 Sequentiebepaling *50*
1.3.7 HI van de hSpacerC2-TOPO vector in VWF$^{+/+}$ muizen *50*
1.3.8 Transfectie in Flp-In CHO cellen *51*
1.4 STATISTISCHE ANALYSES 53
2. RESULTATEN 54
2.1 OPTIMALISATIE VAN DE PRODUCTIE EN OPZUIVERING VAN MADAMTS13 VOOR DE IMMUNISATIE VAN ADAMTS13$^{-/-}$ MUIZEN 54
2.2 DE ONTWIKKELING VAN FUNCTIONELE ANTI-HADAMTS13 MABS 57
2.2.1 Ontwikkeling van anti-hADAMTS13 mAb producerende hybridoma's *57*
2.2.2 Opzuivering van de anti-hADAMTS13 mAbs *58*
2.2.3 Epitoop mapping van de ontwikkelde anti-hADAMTS13 mAbs *59*
2.2.4 Bepaling functionaliteit van de anti-hADAMTS13 mAbs *62*
A. Gebruik van de mAbs als coating Ab of detectie Ab 62
B. Invloed van de mAbs op de binding van ADAMTS13 aan VWF (onder statische condities) 63
C. Functionaliteit van de mAbs in FRETS-VWF73 66
2.3 DE CONSTRUCTIE VAN DE HSPACERC2 MUTANT VAN ADAMTS13 67

2.3.1 Kloneringsstrategie *68*
2.3.2 Expressie van het hSpacerC2 construct *71*

3. DISCUSSIE **74**

REFERENTIES **81**

DEEL III BIJLAGEN **93**

BIJLAGE 1: OVERZICHT VAN DE AANGEWENDE ELISA PROTOCOLS TIJDENS DE ONTWIKKELING VAN MABS TEGEN MADAMTS13 ..... **94**

BIJLAGE 2: OVERZICHT AANGEWENDE ELISA PROTOCOLS BIJ DE PRODUCTIE EN FUNCTIONALITEIT BEPALING VAN DE ONTWIKKELDE ANTI-HADAMTS13 MABS. **95**

BIJLAGE 3: OVERZICHT GEBRUIKTE ELISA PROTOCOLS TIJDENS DE HI EN TRANSFECTIE VAN DE HSPACERC2-TOPO VECTOR **97**

BIJLAGE 4: EPITOOPMAPPING VAN DE ONTWIKKELDE C-TERMINALE MABS **98**

BIJLAGE 5: RISICO ANALYSE **99**

Lijst met afkortingen

A2pr	*2,3-diaminopropion*
AA/BAA	Acrylamide/Bisacrylamide
Abs	Antilichamen
AD	*Aqua Destilata,* gedestilleerd water
ADAMTS13	*A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 motif, member 13*
APC	Antigen presenterende cel
AZ	Aminozuren
Bio	Gebiotinyleerd
BSA	*Bovine Serum Albumin*
CA	Californië
CFA	*Complete Freund's adjuvant*
CHO	*Chinese Hamster Ovary*
CO_2	Koolstofdioxide
CUB	*Complement component C1r/C1s, Urinary epidermal growth factor (Uegf), and Bone morphogenic protein-1*
Cys	Cysteïnerijk domein
DHFR	Dihydrofolaat reductase
Dis	Disintegrine-achtig domein
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medim*
DMSO	Dimethylsulfoxide
Dnp	Dinitrofenylgroep
EB	Elektroforesebuffer
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
ER	Endoplasmatisch Reticulum
ET-1	Endotheline-1
F	Coagulatiefactor
FBS	*Foetal Bovine Serum*
FKI	*Fetal Klone I*
FRET	*Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer*
GAM-HRP	Geit Anti-Muis *Horse Radish Peroxidase*
GAR-HRP	*Goat Anti-Rabbit Horse Radish Peroxidase*
GP	Glycoproteïne
hADAMTS13	humaan ADAMTS13
HBS	*Hepes Buffered Saline*
HEK T-Rex	*Human Embryonic Kidney with Tetracycline Regulated Expression*
HGPRT	Hypoxanthine guanine fosforibolsyl transferase
HI	Hydrodynamische injectie
HIV	Humaan Immunodeficiëntie virus
IFA	*Incomplete Freund's adjuvant*
Ig	Immunoglobuline
IL	Illinois
IMAC	*Immobilized Metal Affinity Chromatography*
ITS	Insuline-transferrine-selenium
KT	Kamertemperatuur

KV	Kolomvolumes
KY	Kentucky
LB	*Luria Broth*
L-Gln	L-Glutamine
MA	Massachusetts
mAbs	Monoklonale antilichamen
mADAMTS13	muis ADAMTS13
MASP	*mannose binding protein associated serine protease*
MBL	*mannose-binding lectin*
MO	Missouri
MP	metalloprotease domein
N	Stikstof
NHP	*Normal Human Plasma*
Nma	2-N-methylaminolbenzoylgroep
NMP	*Normal Murine Plasma*
NO	Stikstofoxide
NRSB	Niet reducerende staalbuffer
O_2	Zuurstof
OPD	o-fenyleendiamne
P/S	Penicilline/Streptomycine
PA	Pennsylvanië
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PEG	Polyethyleenglycol
PEx	*Plasma exchange*
PGI2	Prostaglandine 2
PSA	prostaat specifiek antigen
pVWF	*Purified plasma VWF*
RBC	Rode bloedcellen
RSB	Reducerende staalbuffer
SD	Standaarddeviatie
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfaat PolyAcrylamideGelElektroforese
Spacer	Spacer domein
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyleendiamine
TF	*Tissue factor*
TH	T helper cel
TK	Thymidine kinase
tPA	*tissue platelet activatorμ*
TSP1	Trombospondine type 1-achtig repeat
TSP-1	Trombospondine 1
TTP	Trombotische trombocytopenische purpura
Tw20	Tween 20
Tw80	Tween 80
UL-VWF	*Ultra-large* VWF
uPA	*urokinase platelet activator*
USS	Upshaw-Schulman syndroom

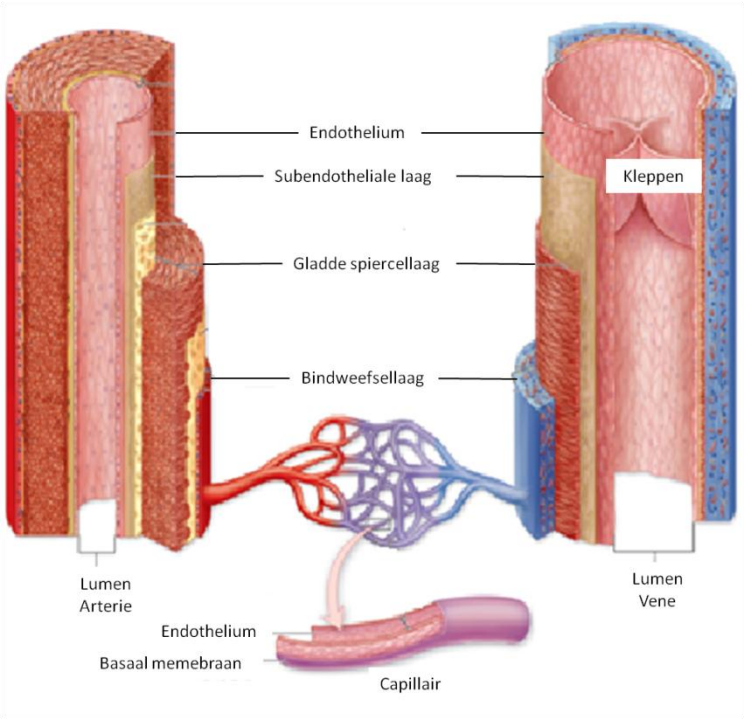
VWD	*von Willebrand disease*
VWF	von Willebrand factor
WBC	Witte bloedcellen
WI	Wisconsin

DEEL I
Literatuurstudie

1. Bloed

Bloed is het belangrijkste transportmedium van het lichaam en is samengesteld uit plasma (55%) en bloedcellen (45%). Het plasma levert nutriënten aan de organen en transporteert afvalstoffen naar de lever en nieren. Het bestaat uit water dat een hele reeks aan componenten bevat, zoals zuurstof (O_2), nutriënten (suiker, aminozuren (AZ), vitamines), afvalstoffen (stikstof (N), koolstofdioxide (CO_2)), hormonen, ionen, mineralen, albumines, globulines, fibrinogeen… Tot de bloedcellen behoren de rode bloedcellen (RBC) of erytrocyten, de witte bloedcellen (WBC) of leukocyten en de bloedplaatjes of trombocyten. Deze bloedcellen ontwikkelen zich in het beenmerg uit pluripotente stamcellen, een proces dat hematopoiese genoemd wordt (Raven *et al.*, 2008). De RBC (4 – 6.10^6 cellen/µl) transporteren O_2 naar de verschillende organen met behulp van hemoglobine (Hamasaki en Okubo, 1996), de WBC (4 – 11.10^3 cellen/µl) beschermen het lichaam tegen vreemde indringers (Raven *et al.*, 2008) en de bloedplaatjes (200 – 500.10^3 cellen/µl) ten slotte spelen een rol in de hemostase, trombosevorming, vasoconstrictie en het herstel van inflammatie (Harrison, 2005). Bloedplaatjes zijn anucleair en ontstaan door de afscheuring van megakaryocyten in het beenmerg (George, 2000; Patel *et al.*, 2005). Hun oppervlak is bedekt met receptoren die belangrijk zijn voor hun activiteit tijdens de primaire hemostase (Batty en Smith, 2010).

Het bloed wordt via een uitgebreid netwerk van venes, venules, arteriën, arteriolen en capillairen het hele lichaam rondgepompt met behulp van het hart (Raven *et al.*, 2008). De opbouw van dit netwerk bepaalt in belangrijke mate zijn functie. Van binnen naar buiten zijn de venes en arteriën opgebouwd uit een laag endotheelcellen die omgeven wordt door een basaal membraan, nl. het subendothelium (Figuur 1.1). Rond dit subendothelium ligt een laag gladde spiercellen waarin collageen en elastische vezels aanwezig zijn. Dit geheel wordt ten slotte nog omringd door een bindweefsellaag die bestaat uit collageen en fibroblasten en vooral een structurele rol vervult (Batty en Smith, 2010; Eyre *et al.*, 2010). Arteriën en arteriolen hebben een dikkere spiercellaag dan de venes en venules. Zo kunnen ze aan een veel grotere druk weerstaan, die veroorzaakt wordt doordat het bloed weg van het hart wordt gepompt. De venes en venules hebben kleppen, waardoor het bloed ondanks de lage druk terug naar het hart gebracht kan worden. De capillairen (of haarvaten), die de verbinding vormen tussen de arteriolen en de venules en ingebed liggen in de organen, zijn enkel opgebouwd uit een zeer dunne laag van endotheelcellen, waardoor diffusie gemakkelijk kan plaatsvinden. Bovendien zijn deze capillairen talrijker en hebben ze een veel kleinere diameter, waardoor het bloed trager stroomt en er een uitwisseling van een breed gamma aan stoffen kan optreden (Raven *et al.*, 2008).

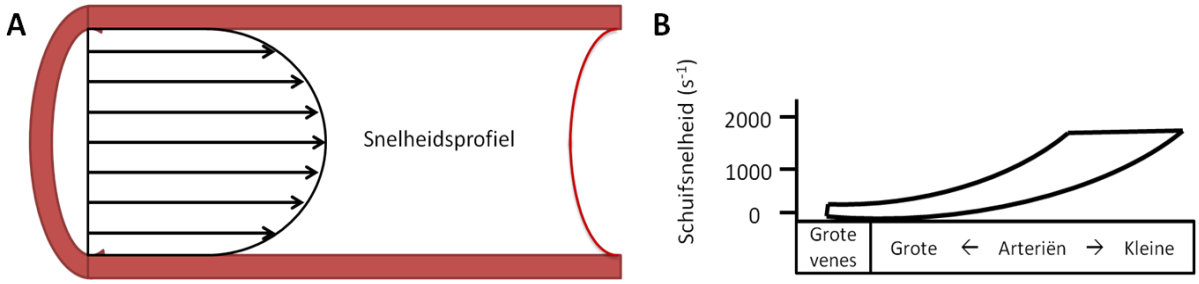


Figuur 1.1: De opbouw van een arterie, vene en capillair. De bloedvaten zijn opgebouwd uit verschillende lagen. Van binnen naar buiten: het endothelium, het subendothelium, een gladde spiercellaag en een bindweefsellaag. De arteriën moeten aan grote drukken weerstaan en bezitten daarom een dikke spiercellaag. De druk in de venes is daarentegen heel laag, waardoor kleppen nodig zijn om het bloed terug naar het hart te brengen. De capillairen zijn, in tegenstelling tot de arteriën en venes, enkel opgebouwd uit een dun endothelium zodat diffusie en uitwisseling van stoffen mogelijk gemaakt wordt (Raven *et al.*, 2008).

Onder normale omstandigheden is de bloedstroom laminair. Dit kan voorgesteld worden als minuscule laagjes bloed die boven elkaar glijden, waarbij een parabolisch snelheidsprofiel gecreëerd wordt (Figuur 1.2 A). De snelheid van de bloedstroom is hierbij het grootst ter hoogte van de centrale as en daalt gradueel tot 0 m/s ter hoogte van de bloedvatwand. De bloedstroom wordt voornamelijk beschreven met de parameter schuifsnelheid en minder frequent met de parameter schuifstress. Schuifsnelheid (s^{-1}) is een maat voor hoe snel de boven elkaar liggende vloeistoflagen ten opzichte van elkaar bewegen. De maximale schuifsnelheid wordt bereikt aan de bloedvatwand, terwijl deze rond de centrale as gelijk is aan 0 s^{-1}. De venes hebben de kleinste schuifsnelheden (< 100 s^{-1}), maar wanneer de diameter van het bloedvat daarentegen kleiner is, vergroten de schuifsnelheden. Deze kunnen oplopen tot 1000 s^{-1} in de arteriën en zelfs tot 1500 s^{-1} in de arteriolen (Figuur 1.2 B). De tweede parameter schuifstress (dynes/cm²) is de kracht per oppervlak die het bloed uitoefent op componenten of op de wand in de richting van de bloedstroom. De bloedstroom bepaalt de snelheid waarbij coagulatiefactoren, zoals bloedplaatjes en fibrinogeen, van en naar de bloedvatwand getransporteerd worden, waardoor het de trombusvorming in belangrijke mate reguleert (Hanson en Sakariassen, 1998).

De grote variëteit aan schuifsnelheden in de bloedsomloop verklaren ook de verscheidenheid aan adhesiemechanismen voor de recrutering van coagulatiefactoren naar de plaats van een beschadigd bloedvat. De grote schuifsnelheden in de kleine arteriën

verhinderen de vorming van een groot contactoppervlak, waardoor de adsorptie van de coagulatiefactoren aan de bloedvatwand bemoeilijkt wordt. Hierin komt echter de von Willebrand factor (VWF) tussen, waardoor bloedplaatjesadhesie wel mogelijk gemaakt wordt. VWF is een groot plasma glycoproteïne dat vooral actief is onder grote schuifsnelheden, waarvan de grootte-orde overeenkomt met deze die terug te vinden zijn in kleine arteriën (arteriolen) en capillairen. VWF medieert de bloedplaatjesadhesie bij beschadiging aan hun bloedvatwand (Schneider *et al.*, 2007). Het verloop van dit proces wordt uitgebreid in paragraaf 2 besproken.



Figuur 1.2: Het snelheidsprofiel en een overzicht van de schuifsnelheden in de bloedbaan. (A) De bloedstroom heeft een parabolisch snelheidsprofiel. Ter hoogte van de centrale as is de snelheid maximaal, maar deze daalt echter tot 0 m/s ter hoogte van de bloedvatwand (figuur gebaseerd op Slager *et al.*, 2005). (B) De schuifsnelheid geeft weer hoe snel de boven elkaar liggende vloeistoflagen ten opzichte van elkaar bewegen. Venes hebben ter hoogte van de bloedvatwand kleine schuifsnelheden (< 100 s^{-1}), terwijl de kleine diameter van de arteriën en arteriolen zorgt voor schuifsnelheden die kunnen oplopen tot respectievelijk 1000 s^{-1} en 1500s^{-1} (figuur gebaseerd op Hanson en Sakariassen, 1998).

2. Hemostase

Hemostase is het proces dat zorgt voor een snelle trombusvorming bij een wonde, zodat er zo weinig mogelijk bloedverlies optreedt. Een verkeerde regulatie van dit uniek proces kan echter leiden tot de vorming van een trombose (Denis en Lenting, 2012). In de hemostase spelen drie mechanismen een belangrijke rol, nl. de primaire hemostase (paragraaf 2.1), de secundaire hemostase of coagulatie (paragraaf 2.2) en de fibrinolyse (paragraaf 2.3).

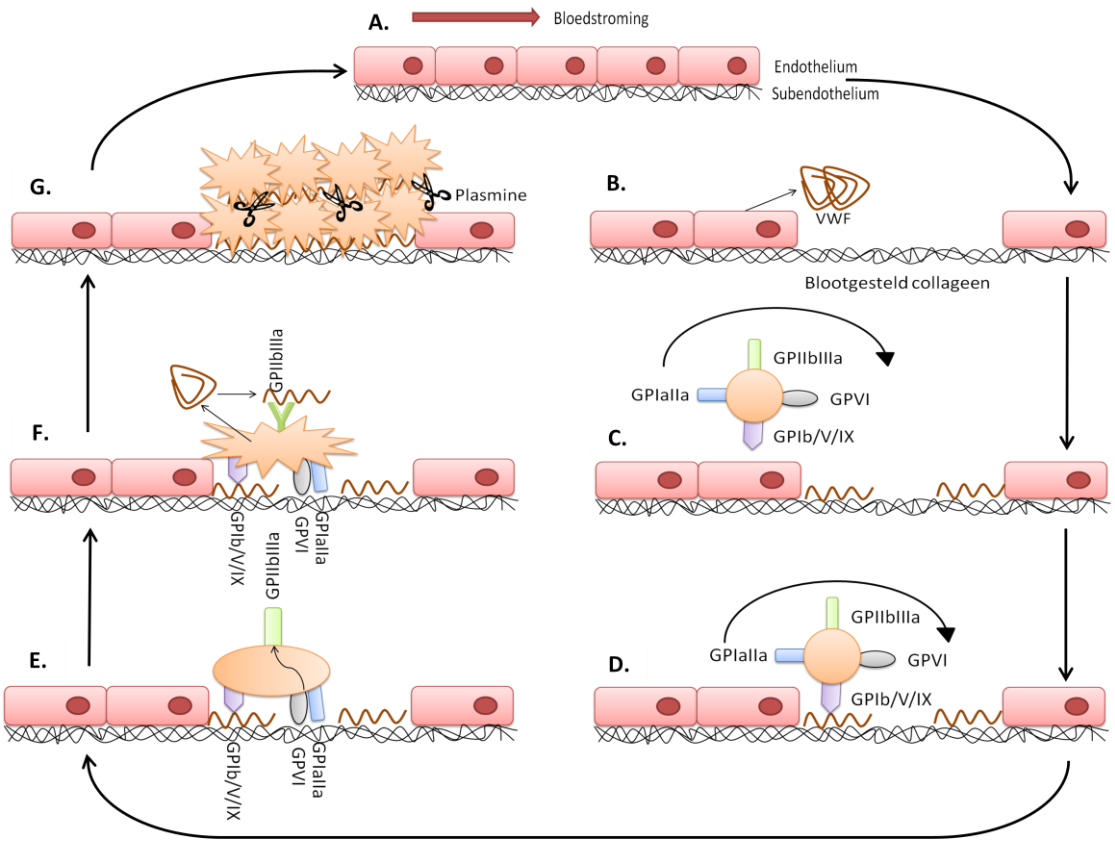
2.1 Primaire hemostase

De primaire hemostase is het initiële herstelmechanisme dat in werking treedt om het bloeden van een verwond bloedvat te beperken, waarbij het endothelium een belangrijke rol speelt (Figuur 2.1 A) (Weibel en Palade, 1964; Eyre *et al.*, 2010). Om de spontane initiatie van de primaire hemostase te vermijden, secreteren de endotheelcellen constant negatieve mediatoren (zoals prostaglandine I2 (PGI2) en stikstofoxide (NO)) in de bloedstroom, die de spontane aggregatie van bloedplaatjes inhiberen (Batty en Smith, 2010).

Het verlies van endotheelcellen door de beschadiging van een bloedvat zorgt voor de blootstelling van het subendotheliale collageen (Figuur 2.1 B). Hierdoor treedt er een *switch* op van NO en PGI2 secretie naar endotheline-1 (ET-1) secretie, waardoor er vasoconstrictie plaatsvindt. Tegelijkertijd worden de omliggende endotheelcellen gestimuleerd om NO en PGI2 te blijven produceren, zodat de coagulatie zich beperkt tot de plaats van beschadiging (Batty en Smith, 2010). De Weibel Palade *bodies*, die zich in het cytoplasma van arteriële endotheelcellen bevinden, zullen door de stimulatie van trombine, histamine en adrenaline VWF in het bloedvat vrijzetten (Figuur 2.1 B) (Weibel en Palade, 1964; Romani de Wit *et al.*, 2004; Weibel, 2012). VWF bindt aan het blootgestelde subendotheliale collageen en ontrolt onder invloed van de grote schuifkrachten van de bloedstroom (Figuur 2.1 C). Op deze wijze vormt het ontrolde VWF een afremmingsplatform voor de circulerende bloedplaatjes (Bergmeier *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006; Groot *et al.*, 2007; Metcalf *et al.*, 2008).

Het ontvouwen VWF vertoont een significante affiniteit voor het glycoproteïne (GP) Ib/IX/V-complex, een receptor op het oppervlak van de bloedplaatjes. Deze interactie wordt echter snel verbroken, waardoor een rolbeweging van de bloedplaatjes ontstaat (Figuur 2.1 C en D) (Sadler, 1998; Savage *et al.*, 1998). Deze rolbeweging faciliteert de binding van de bloed-plaatjes aan collageen via hun GPIa/IIa (integrine $\alpha_2\beta_1$) en GPVI collageenreceptoren (Figuur 2.1 E), wat leidt tot bloedplaatjesactivatie (Lisman *et al.*, 2005; Reininger, 2008; Pugh *et al.*, 2010). Door de activatie van de bloedplaatjes verandert hun discoïde vorm naar een sferische structuur die pseudopodia tentoonstelt en waarbij er ook degranulatie optreedt (Figuur 2.1 F) (Willoughby *et al.*, 2002; Batty en Smith, 2010). De finale aggregatie gebeurt

uiteindelijk via de GPIIb/IIIa (αIIbβ3) receptor (Leger *et al.*, 2006). Deze receptoren zijn in een lage affiniteitstoestand aanwezig op rustende bloedplaatjes, waarbij het extracellulaire domein zich in een gesloten conformatie bevindt. Door de bloedplaatjesactivatie wordt een intracellulaire signalisatiepathway geactiveerd waardoor de GPIIb/IIIa receptor een conformationele verandering ondergaat naar een hoge affiniteitstoestand (Figuur 2.1 F) (Schoolmeester *et al.*, 2004; Van de Walle *et al.*, 2005). De activatie van de bloedplaatjes zorgt ook voor de vrijzetting van onder andere VWF en fibrinogeen uit hun α-granules, die de aggregatie of *crosslinking* tussen de bloedplaatjes mogelijk maken, waardoor er zich een dense bloedplaatjesprop ontwikkelt (Figuur 2.1 G) (Koutts *et al.*, 1978; Vicic en Weiss, 1983; Corash *et al.*, 1984; Cramer *et al.*, 1990; Leger *et al.*, 2006).



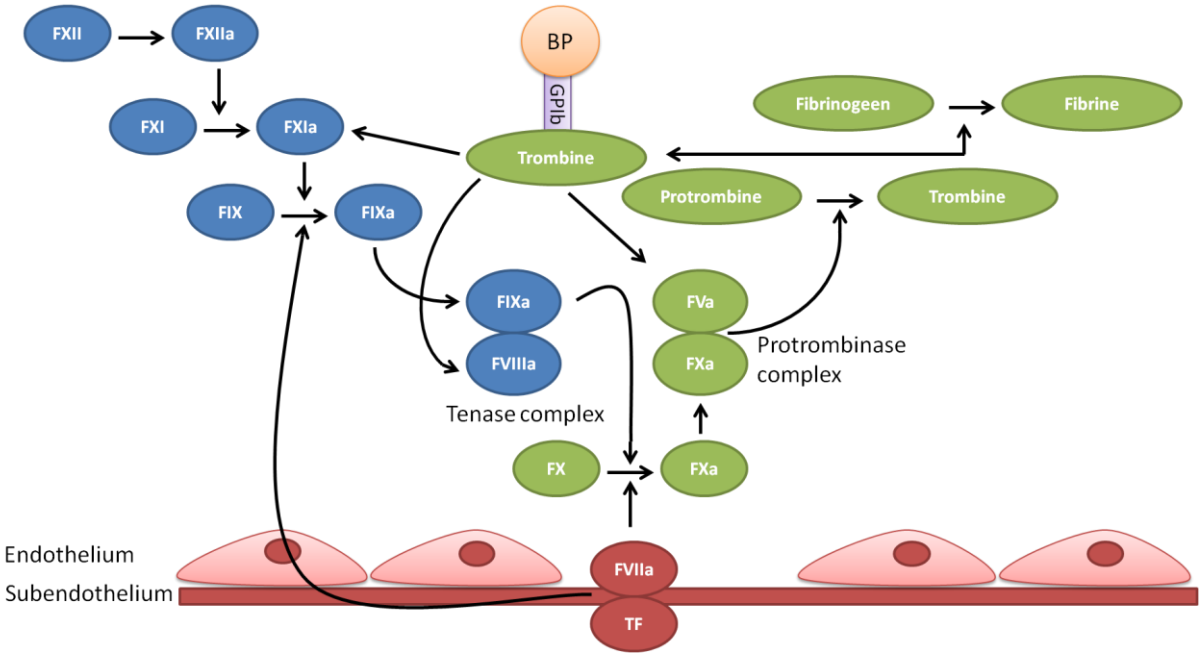
Figuur 2.1: Het verloop van de primaire hemostase ter hoogte van de arteriolen. (A) De intacte bloedstroom. (B) Door een beschadiging van het bloedvat wordt VWF vrijgezet uit de Weibel Palade *bodies* van de endotheel-cellen. (C) VWF bindt aan het blootgesteld collageen van het subendothelium en ontvouwt onder invloed van de bloedstroom, waardoor circulerende bloedplaatjes gerecruteerd worden. (D) De circulerende bloedplaatjes (niet actief) binden via het GPIb/V/IX-complex reversiebel aan VWF. (E) Deze reversiebele binding van de bloed-plaatjes zorgt voor een rolbeweging over het ontvouwen VWF dat dient als een soort afremmingsplatform. Deze rolbeweging faciliteert de stabiele binding van de bloedplaatjes aan collageen via de GPIa/IIa en GPVI receptoren. Deze interactie activeert de bloedplaatjes, waardoor ze pseudopodia vormen. Ook de GPIIb/IIIa receptor wordt geactiveerd en verandert van conformatie. (F) GPIIb/IIIa kan hierdoor binden met nieuw gesecreteerd VWF uit de α-granules van de bloedplaatjes. (G) Ten slotte aggregeren de bloedplaatjes met elkaar, waardoor een bloedplaatjesprop wordt gevormd. Deze wordt later tijdens de fibrinolyse geknipt door het protease plasmine, zodat de bloedplaatjesprop verdwijnt en het bloedvat zich terug in een onbeschadigde toestand bevindt.

2.2 Secundaire hemostase

De secundaire hemostase of coagulatie is de gestimuleerde klontervorming onder invloed van coagulatiefactoren die aanleiding geven tot trombine- en fibrinevorming (Weibel en Palade, 1964). Onder normale fysiologische omstandigheden is het niveau aan coagulatie-factoren in het bloed laag (de basale coagulatie) en bevindt het belangrijkste initiator proteïne van de coagulatiecascade, de *tissue factor* (TF), zich in de vasculaire ruimte, waardoor coagulatie onmogelijk is (Monroe en Hoffman, 2006). Schade aan de endotheel-cellen zorgt voor de blootstelling van TF en FVII (Figuur 2.2). TF vormt een complex met FVIIa ('a' stelt de activatie van de precursor voor), die op hun beurt de vorming van het FXa:FVa protrombinase complex activeert. Het protrombinase complex zorgt voor de conversie van protrombine naar trombine. De stijgende hoeveelheden trombine interageren met de GPIb receptor op het oppervlak van de bloedplaatjes, waardoor de coagulatie-factoren FV, FXI en FVIII geactiveerd worden. FIXa, geactiveerd door FXIa, vormt een tenase complex met het trombine geactiveerde FVIIIa. Vervolgens zorgt het tenase complex voor de omzetting van FX in FXa. Hierdoor wordt de coagulatiecascade enorm versterkt, aangezien er een grote conversie van protrombine naar trombine (= trombine *burst*) plaatsvindt. Trombine stimuleert uiteindelijk de omzetting van fibrinogeen naar fibrine dat het bloedplaatjesaggregaat, dat gevormd werd tijdens de primaire hemostase, verder stabiliseert (Weibel en Palade, 1964; Versteeg *et al.*, 2013).

2.3 Fibrinolyse

De fibrinolyse is het proces dat ervoor zorgt dat de propvorming beperkt blijft tot de plaats van beschadiging en de trombus verwijderd wordt na herstel van het beschadigde bloedvat. Het protease plasmine zorgt ervoor dat de fibrinedraden in de trombus worden opgeknipt, zodat de trombus destabiliseert en uiteindelijk verdwijnt, zodat het genezende bloedvat zijn vasculaire integriteit kan terugwinnen (Figuur 2.1 G) (Monagle en Massicotte, 2011). Plasmine wordt door de lever gesecreteerd in een inactieve vorm, nl. plasminogeen en wordt geactiveerd door tPA (*tissue platelet activator*) en uPA (*urokinase platelet activator*).



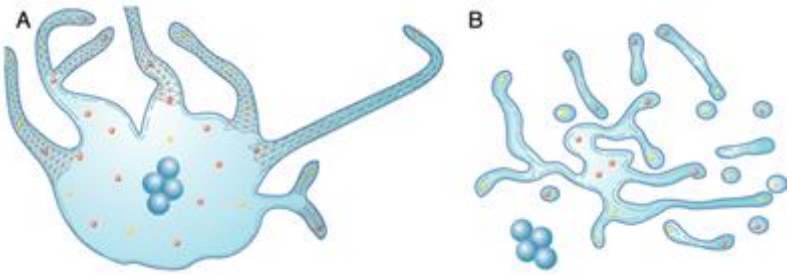
Figuur 2.2: De secundaire hemostase of coagulatie. Beschadiging aan het endothelium zorgt voor de blootstelling van TF en FVII die samen een complex vormen. Het TF:FVIIa complex zorgt voor de activatie van het FXa:FVa protrombinase complex. Het protrombinase complex zet protrombine om in trombine. Trombine bindt aan de GPIb receptoren van de bloedplaatjes (BP), wat leidt tot de activatie van FV, FXI en FVIII. FXIa activeert FIXa, die een tenase complex vormt met het trombine geactiveerde FVIIIa. Het tenase complex zorgt dan voor de activatie van FXa. De grote omzetting van protrombine in trombine zorgt voor een trombine *burst* en een versterking van de coagulatiecascade. Trombine zorgt uiteindelijk voor de vorming van fibrine uit fibrinogeen. Fibrine zal de bloedplaatjesprop die tijdens de primaire hemostase gevormd werd stabiliseren (figuur gebaseerd op Breitenstein *et al.*, 2010).

3. von Willebrand factor

VWF is een groot multimeer plasma glycoproteïne (500 tot > 20 000 kDa, 5-10 µg/ml in het bloed) dat enerzijds een cruciale rol speelt in de primaire hemostase door zijn interactie met het subendotheliale collageen en de bloedplaatjes. Anderzijds speelt VWF ook een belangrijke rol in de secundaire hemostase, doordat het een belangrijke drager is van FVIII. Naast zijn rol in zowel de primaire en de secundaire hemostase, zijn er ook aanwijzingen voor een rol van VWF in angiogenese, proliferatie van gladde spiercellen, tumorcelmetastase en het immuunsysteem (Luo *et al.*, 2012).

3.1 Biosynthese

De synthese van VWF vindt plaats in de endotheelcellen en megakaryocyten (Wagner *et al.*, 1982; Sporn *et al.*, 1985). Megakaryocyten ontwikkelen zich uit de hematopoietische stamcellen in het beenmerg en matureren onder invloed van diverse chemokines en cytokines, waardoor ze via een proces van endomitose meerkernig worden. Uit hun cytoplasma ontwikkelen deze meerkernige megakaryocyten dunne extenties en vormen proplaatjes (Figuur 3.1). Via de microtubuli worden de granules, waarin proteïnen zoals VWF en fibrinogeen worden opgeslagen, één voor één naar de proplaatjes gebracht. De maturatie van de megakaryocyten eindigt wanneer de plaatjes worden vrijgezet in de bloedstroom (Italiano, 2013).

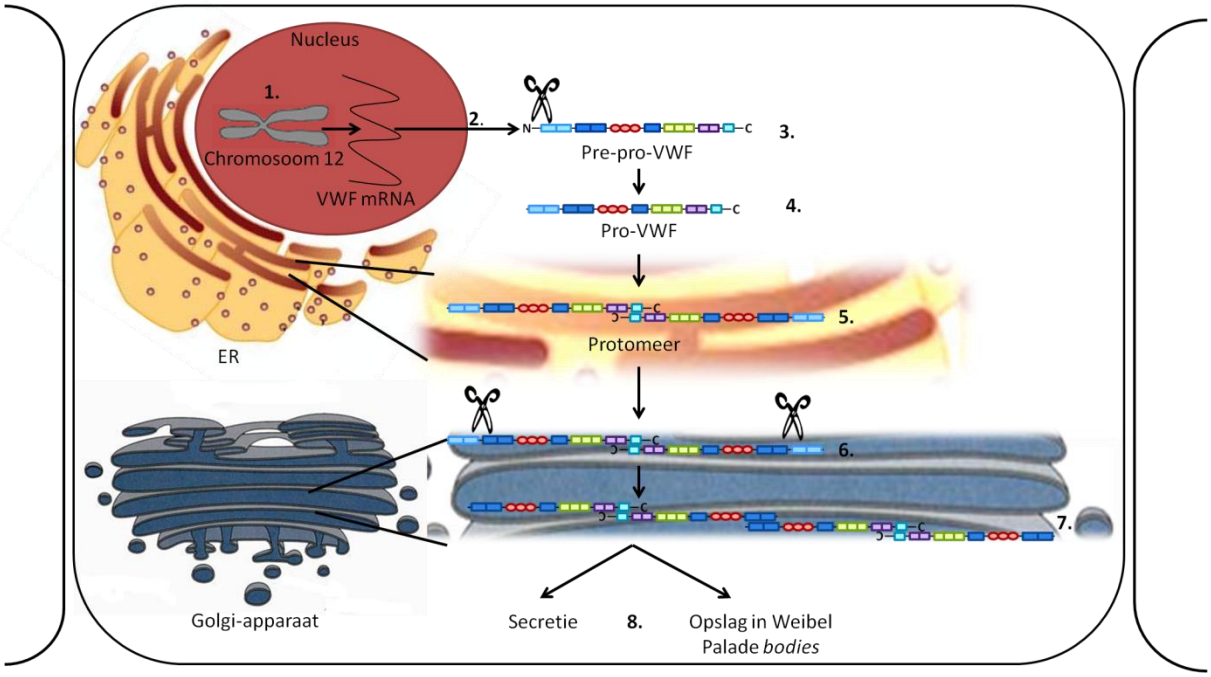


Figuur 3.1: Maturatie van een megakaryocyt. (A) Onder invloed van chemokines en cytokines worden de megakaryocyten meerkernig en vormt het cytoplasma dunne extenties. (B) De dunne cytoplasmatische extenties scheuren af en vormen proplaatjes, waarin granules aanwezig zijn die proteïnen zoals VWF en fibrinogeen bevatten.

Het syntheseproduct van VWF is een multimere vorm van VWF, die de naam *ultra-large* VWF (UL-VWF) draagt, waarin mogelijks tot 200 VWF monomeren aan elkaar gekoppeld kunnen zijn via disulfidebruggen (De Meyer *et al.*, 2009). Dit UL-VWF wordt opgeslagen in de Weibel Palade *bodies* en α-granules en wordt gesecreteerd als respons op een vasculaire wonde en bloedplaatjesactivatie (Pimanda *et al.*, 2004). VWF wordt ook constitutief door de endotheelcellen gesecreteerd, maar dit VWF bestaat enkel uit dimeren en kleine multimeren (Sporn *et al.*, 1986).

Het gen dat codeert voor VWF is op chromosoom 12 gelegen en bestaat uit 52 exonen (Figuur 3.2) (Reininger, 2008). Tijdens de translatie van het mRNA, dat codeert voor het pre-pro-VWF, wordt het proteïne getransloceerd naar het endoplasmatisch reticulum (ER) met behulp van het signaalpeptide. In het ER worden VWF dimeren gevormd door inter-moleculaire disulfidebrugvorming van de cysteïne residu's in het CK-domein (zie paragraaf 3.2 voor de structuur van VWF), waardoor een staart-staart interactie ontstaat (Wagner en Marder, 1984; Katsumi *et al.*, 2000). Deze dimeren, die ook wel protomeren genoemd worden, vormen de bouwstenen van de VWF multimeren. Na de dimerisatie van VWF in het ER, ondergaat VWF ook een extensieve glycosylatie die essentieel is voor de secretie van het proteïne. Op de protomeren worden de 12 N-gelinkte en 10 O-gelinkte koolwaterstof zijketens bevestigd. De N-gelinkte zijketens worden bovendien nog additioneel gemodificeerd door sulfatatie (McKinnon *et al.*, 2008; McKinnon *et al.*, 2010). Verdere multimerisatie van de dimeren gebeurt in het Golgi-apparaat. Het propeptide van VWF doet hierbij dienst als een disulfide isomerase en katalyseert de vorming van de disulfidebinding tussen de N-termini van de VWF dimeren, wat zorgt voor een hoofd-hoofd interactie (Wise *et al.*, 1988; Mayadas en Wagner, 1992). Furine verwijdert uiteindelijk het VWF propeptide, dat een belangrijke rol speelt in het transport van het mature UL-VWF naar de Weibel Palade *bodies* van de endotheelcellen of de α-granules van de bloedplaatjes voor stockage (Wagner *et al.*, 1991; Giblin *et al.*, 2008). In de zure Weibel Palade *bodies* worden de UL-VWF multimeren gecondenseerd door de vorming van helicale tubules om zo een efficiënte en ruimte-besparende stockage toe te laten. Via exocytose komt UL-VWF in het neutraal milieu van het bloed terecht, waardoor het zich ontvouwt tot strengen, zodat het efficiënt bloed-plaatjes kan capteren (Gerke, 2011).

De onmiddellijke proteolytische degradatie van VWF of defecten in de secretie en de vorming van VWF multimeren, levert lage concentraties aan VWF op, wat leidt tot de bloedingsziekte van von Willebrand (von Willebrand d*isease,* VWD) (Luo *et al.*, 2012).

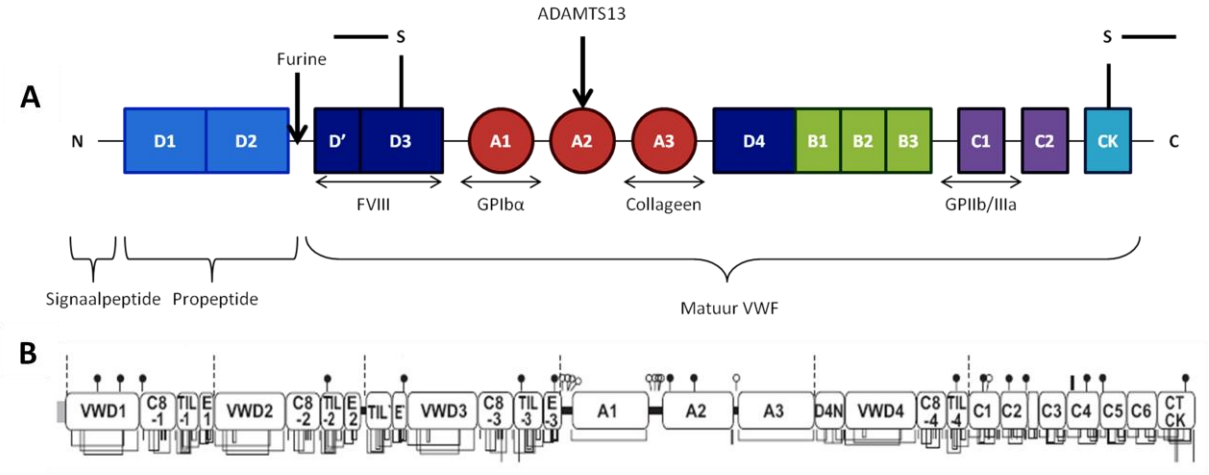


Figuur 3.2: De biosynthese van VWF in een endotheelcel. 1. Het gen dat codeert voor VWF is op chromosoom 12 gelegen, vanwaar het wordt afgeschreven tot mRNA. 2. Het VWF mRNA wordt naar het cytoplasma getransloceerd. 3. Daar wordt het vertaald in pre-pro-VWF. 4. Het signaalpeptide zorgt voor de translocatie van het pre-pro-VWF naar het ER. 5. In het ER worden staart-staart VWF dimeren (protomeren) gevormd via de CK-domeinen. 6. en 7. Verdere multimerisatie gebeurt in het Golgi-apparaat. De propeptides worden verwijderd en doen dienst als disulfide isomerase, waardoor hoofd-hoofd multimerisatie optreedt. 8. Bij het verlaten van het Golgi-apparaat wordt het multimeer VWF gesecreteerd of opgeslagen in de Weibel Palade *bodies* (figuur gebaseerd op Luo *et al.*, 2012).

3.2 Structuur

Het multimeer VWF is opgebouwd uit monomeren met een grootte van 250 kDa die aan elkaar gekoppeld zijn met disulfidebruggen. Elk monomeer is initieel opgebouwd uit drie fragmenten, nl. het signaalpeptide, het propeptide en het mature proteïne (Figuur 3.2). Het signaalpeptide bestaat uit 22 AZ en zorgt voor het transport van het pre-pro-VWF naar het ER (Luo *et al.*, 2012). De domeinen D1 en D2 vormen samen het VWF-propeptide dat opgebouwd is uit 741 AZ (Ginsburg *et al.*, 1985). Dit propeptide maakt het transport van VWF naar de Weibel Palade *bodies* mogelijk (Wagner *et al.*, 1991). Het mature VWF monomeer bestaat uit 2050 AZ die het monomeer onderverdelen in verschillende domeinen met elk hun eigen functie (Figuur 3.2) (Ginsburg *et al.*, 1985). Het D'-D3 domein bevat onder andere een bindingsplaats voor FVIII, waardoor deze beschermd wordt tegen vroegtijdige verwijdering uit de bloedstroom (Murrin en Murray, 2006; Lenting *et al.*, 2007). Daarnaast bevat het D'-D3 domein ook een bindingsplaats voor P-selectine. Hierdoor kan het nieuw vrijgezette VWF zich vasthechten aan geactiveerde endotheelcellen wat leidt tot de ontvouwing van het VWF (Dong *et al.*, 2002; Padilla *et al.*, 2004; Michaux *et al.*, 2006). Het A1 domein bevat een bindingsplaats voor de GPIbα receptor van de bloedplaatjes (Lankhof *et al.*, 1995) en in het A2 domein bevindt zich een knipplaats voor ADAMTS13 (***A D**isintegrin*

A**nd **M**etalloprotease with **T**hrombo**S**pondin type 1 motif, member **13) ter hoogte van de aminozuurresidu's Y^{1605} en M^{1606} (Dent *et al.*, 1990). De binding van VWF aan collageen gebeurt via het A3 domein (Ribba *et al.*, 2001; Riddell *et al.*, 2009; Flood *et al.*, 2010) en het C1 domein bevat een RGD-aminozuursequentie, waarmee het integrine GPIIb/IIIa kan interageren en kan zorgen voor een stabiele binding tussen de bloedplaatjes en het VWF (Reininger, 2008). Het CK domein van het VWF monomeer is homoloog met de cysteïne *knot* superfamilie. Proteïnen van deze familie hebben de neiging om hier te dimeriseren via disulfidebindingen (Sadler, 1998). Recent werd de klassieke voorstelling van de structuur van VWF via elektronenmicroscopie en volledige sequentieanalyse herzien (Figuur 3.3 B) (Zhou *et al.*, 2012).



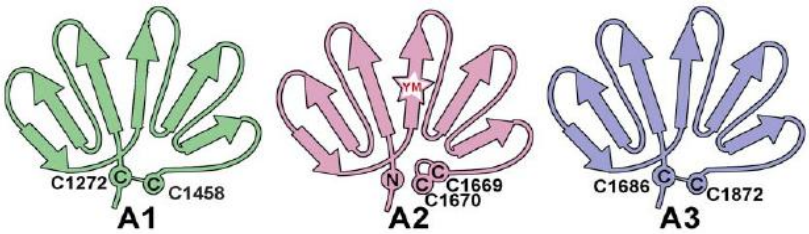
Figuur 3.3: De structuur van VWF. (A) De klassieke voorstelling van VWF. VWF is opgebouwd uit een signaalpeptide, een propeptide en het mature VWF. Het N-terminale signaalpeptide zorgt voor de translocatie van het pre-pro-VWF naar het ER. De domeinen D1 en D2 vormen samen het propeptide dat door furine afgesplitst wordt en het transport naar de Weibel Palade *bodies* mogelijk maakt. Via het D'-D3 domein kan FVIII aan VWF binden en beschermd worden tegen de vroegtijdige verwijdering uit de bloedstroom. Bloedplaatjes kunnen met hun GPIbα receptor binden aan het A1 domein van VWF. Ter hoogte van de aminozuurresidu's Y^{1605} en M^{1606} in het A2 domein bevindt zich de knipplaats voor ADAMTS13. VWF kan via zijn A3 domein binden aan het blootgestelde subendotheliale collageen. De stabiele binding van VWF aan de GPIIb/IIIa bloedplaatjes receptor gebeurt via het C1 domein, dat een RGD aminozuursequentie bevat. Via hun CK domein zal VWF staart-staart dimeren vormen. Daarnaast zijn ook nog de D4, B1, B2, B3 en C2 domeinen aanwezig (figuur gebaseerd op De Meyer *et al.*, 2009). (B) De recent herziene structuur van VWF (Zhou *et al.*, 2012).

3.3 Regulatie van de multimeergrootte

De biologische activiteit van VWF wordt gereguleerd door de grootte van de VWF multimeren. De grootste multimeren (UL-VWF) zijn het meest actief in het binden van bloedplaatjes en hun grootte wordt voornamelijk gecontroleerd door het protease ADAMTS13 (Furlan *et al.*, 1996; Tsai, 1996). VWF wordt onder drie verschillende condities geknipt door ADAMTS13. Ten eerste zullen de VWF strengen, die aan het oppervlak van de endotheelcellen van beschadigde venes voorkomen, intensieve knip ondergaan (Dong *et al.*, 2002). Ten tweede worden de UL-VWF clusters die in vrije circulatie voorkomen geknipt. Ten derde

ondergaan ook de ontvouwde VWF strengen ter hoogte van de trombus hetzelfde proces (Crawley *et al.*, 2011).

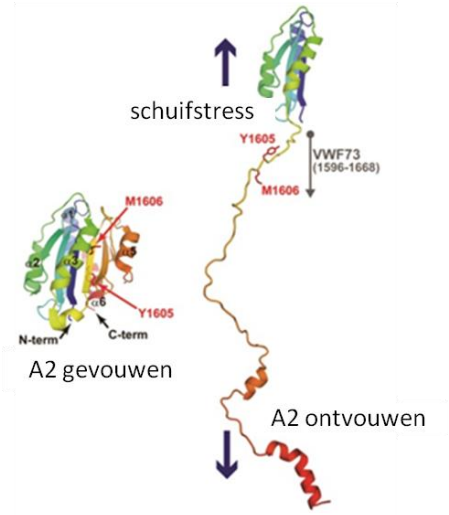
Onder normale fysiologische condities bevindt VWF zich in zijn globulaire, gevouwen conformatie, waardoor specifieke interactieplaatsen voor de bloedplaatjes en het VWF-knippend protease ADAMTS13 ontoegankelijk zijn. De toegankelijkheid en conformatie van de A1, A2 en A3 domeinen bepaalt in belangrijke mate de functie van VWF. De bindingsplaats voor collageen in het VWF A3 domein wordt constitutief blootgesteld aan het oppervlak van globulair VWF (Zhang *et al.*, 2009b), terwijl de ADAMTS13 knipplaats (Y^{1605} – M^{1606}) en de GPIbα bindingsplaats, respectievelijk gelegen in het A2 en A1 domein, verborgen liggen in de gevouwen structuur van VWF (Zanardelli *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009a; Zhang *et al.*, 2009b; Kim *et al.*, 2010). Plasma VWF zal via zijn A3 domein binden aan het collageen van de blootgestelde subendotheliale matrix (Dong *et al.*, 2003). De schuifkrachten van het bloed zorgen ervoor dat VWF zich ontrolt, waardoor de A1 en A2 domeinen tevoorschijn komen (Miura *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2010). UL-VWF dat door de Weibel Palade *bodies* van de endotheelcellen en de α-granules van de geactiveerde bloedplaatjes wordt vrijgezet, zal in de bloedsomloop terechtkomen. Door de hoge schuifkrachten van de bloedcirculatie zal zowel het vastgehechte als het vrij circulerende UL-VWF ontrafelen (Zhang *et al.*, 2009b; Kim *et al.*, 2010) en zullen de A2 domeinen ontvouwen, waardoor de splitsingssites vrij komen te liggen voor ADAMTS13 (Dent *et al.*, 1990).



Figuur 3.4: Structurele homologie tussen de A1, A2 en A3 domeinen van VWF. De A1, A2 en A3 domeinen van VWF hebben een sterk homologe structuur. Het A1 en het A3 domein wordt gekenmerkt door een disulfidebinding die de N- en C-termini van het domein met elkaar verbindt. Daarentegen worden de N- en C-termini van het A2 domein met elkaar verbonden via een vicinale disulfidebinding (Crawley *et al.*, 2011).

Structureel is het A2 domein sterk homoloog aan de A1 en A3 domeinen (Figuur 3.4). Deze laatste twee domeinen bevatten een disulfidebinding die de N- en C-termini van het domein met elkaar verbinden, waardoor ze in een gesloten conformatie voorkomen. In tegenstelling tot deze domeinen, bezit het A2 domein een vicinale disulfidebinding (C^{1669} – C^{1670}) die de N- en C-termini van het domein met elkaar verbindt (Figuur 3.4). Verder wordt het A2 domein ook gedestabiliseerd doordat een α-helix ingeruild werd voor een minder geordende loop (Crawley *et al.*, 2011). Beide factoren zorgden ervoor dat het A2 domein het enige domein in VWF is dat niet beschermd wordt voor ontvouwing. Bij een ontvouwing van het A2 domein zal deze langs de C-terminale zijde starten, aangezien dit gebied meer perifeer gelegen is en elke *unit* één voor één weggeduwd kan worden (Figuur 3.5). Het zijn dan ook de segmenten

die in het A2 domein C-terminaal van de knipplaats gelegen zijn, die herkend zullen worden door ADAMTS13. Daarom wordt gedacht dat ADAMTS13 mogelijks ook de intermediaire gevouwen toestand van het VWF A2 domein herkent en knipt. Van alle VWF A2 domeinen, die aanwezig zijn in een UL-VWF multimeer, zijn deze die zich in het midden van het multimeer bevinden gevoeliger aan ontvouwing en zullen dus sneller geknipt worden, aangezien de schuifkrachten van het bloed daar het hoogst zijn. Dit zorgt voor een mechanisme waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen welke multimeren geknipt moeten worden en welke niet. De kracht die nodig is om het A2 domein van VWF te ontvouwen en vervolgens te knippen is 11 pN (Zhang *et al.*, 2009a; Zhang *et al.*, 2009b). Dit valt binnen de grootte-orde van de krachten die gemeten worden in de arteriolen en capillairen, maar ook wanneer VWF gebonden is aan plaatjes, collageen of tijdens de secretie uit endotheelcellen (Dong *et al.*, 2002).



Figuur 3.5: De gevouwen en ontvouwen kristalstructuur van het VWF A2 domein. De knipplaats van VWF ligt begraven in de gevouwen structuur. Schuifstress zal er echter voor zorgen dat het A2 domein langs de C-terminale zijde ontvouwen wordt, waardoor de knipplaats vrij komt te liggen (Akiyama *et al.*, 2009).

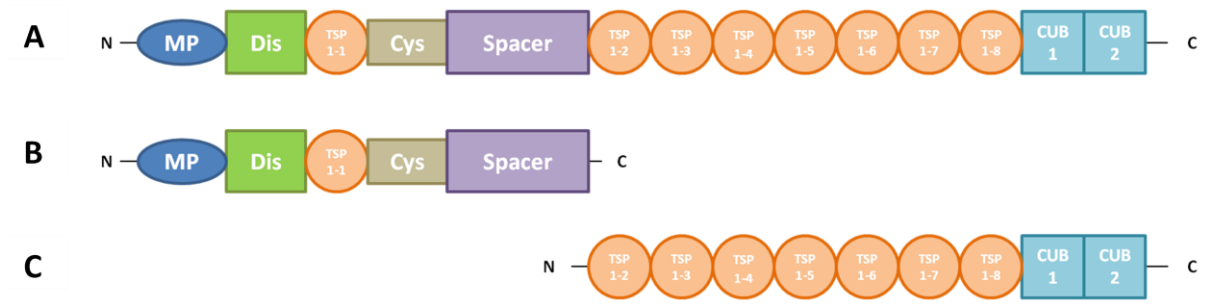
De multimeergrootte van VWF wordt dus voornamelijk bepaald door ADAMTS13. Toch zijn er ook nog een aantal andere proteïnen die een mineure rol spelen bij het knippen van VWF, zoals trombospondine-1 (TSP-1), leukocyt protease proteïnase 3, cathepsine G, elastase en granzyme B. Zo wordt VWF trager geknipt in aanwezigheid van TSP-1 dan in afwezigheid ervan. Vermoedelijk komt dit omdat ADAMTS13 en TSP-1 in competitie met elkaar treden voor binding aan het A2 en A3 domein van VWF (Pimanda *et al.*, 2004; De Ceunynck *et al.*, 2013). TSP-1 is dus mogelijks een negatief regulerende factor om ADAMTS13 te balanceren in het knippen van VWF (Coppo en Veyradier, 2012).

4. ADAMTS13 en zijn werkingsmechanisme

In 1996 werd het VWF knippend protease ADAMTS13 voor het eerst geïdentificeerd door de onderzoeksgroepen van Tsai en Furlan (Furlan *et al.*, 1996; Tsai, 1996). ADAMTS13 is een Zn^{2+}- en Ca^{2+}-afhankelijk plasma metalloprotease dat constitutief actief is (Crawley *et al.*, 2011). Het *ADAMTS13* gen is gelegen op chromosoom 9 en bestaat uit 29 exonen (1427 AZ) (Savage *et al.*, 1998; Ruggeri, 2007). ADAMTS13 wordt voornamelijk gesynthetiseerd in en gesecreteerd door de hepatische stellaatcellen van de lever (Uemura *et al.*, 2005), maar er zijn ook aanwijzingen dat ADAMTS13 ook door de vasculaire endotheelcellen gesynthetiseerd wordt (Turner *et al.*, 2006). Het enzym wordt gesecreteerd in de bloed-stroom, waar de concentratie tussen 0,5 en 1,0 µg/ml bloed bedraagt (Soejima *et al.*, 2006; Feys *et al.*, 2009).

ADAMTS13 controleert de trombusvorming door VWF te knippen. UL-VWF multimeren zijn enorm groot en hyperreactief in het binden van het plaatjesreceptor GPIb/IX/V-complex. Indien deze UL-VWF multimeren niet gesplitst worden in kleinere, minder actieve VWF multimeren, ontstaat er een protrombotische toestand, waarin bloedplaatjes spontaan aggregeren met elkaar via UL-VWF (Moake *et al.*, 1982; Sporn *et al.*, 1986). De kleinere, minder actieve VWF multimeren mogen tijdens de primaire hemostase echter niet verder opgeknipt worden door ADAMTS13, aangezien dan de activiteit van VWF verloren gaat. Daarom wordt ADAMTS13 tijdens de trombusvorming mogelijks geïnactiveerd door plasmine en trombine (Crawley *et al.*, 2005). Daarnaast kan ADAMTS13 ook *in vitro* geïnhibeerd worden door EDTA en hemoglobine (Furlan *et al.*, 1996; Tsai, 1996; Studt *et al.*, 2005).

ADAMTS13 behoort tot de ADAMTS familie. De leden van deze familie zijn allemaal hydrolasen en katalyseren de hydrolyse van hun substraat door gebruik te maken van metaalionen die door histidineresidu's gecoördineerd worden in de complexe secundaire structuur van het enzym. Alle ADAMTSen zijn opgebouwd uit een signaalpeptide, een propeptide, een metalloprotease katalytisch domein (MP), een disintegrine-achtig domein (Dis), een trombospondine type 1-achtig *repeat* (TSP1), een cysteïnerijk domein (Cys), een spacer domein en een variabel aantal C-terminale trombospondine type 1-achtige *repeats* (*range* van 0 tot 14) (Fujikawa *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 2001; Soejima *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001). ADAMTS13 ligt het verst verwijderd van zijn familieleden omwille van zijn substraatspecificiteit, zijn abnormaal kort propeptide en zijn twee unieke CUB domeinen aan zijn carboxyterminale (C-terminale) staart (Figuur 4.1 A) (Crawley *et al.*, 2011). ADAMTS13 is de enige in de ADAMTS familie die CUB domeinen '***C**omplement component C1r/C1s, **U**rinary epidermal growth factor* (Uegf)*, and **B**one morphogenic protein-1'* bevat. CUB domeinen uit andere proteïnen spelen een belangrijke rol bij proteïne-proteïne interacties, zoals de interactie tussen MASP (*mannose binding protein associated serine protease*) en MBL (*mannose-binding lectin*) (Tao *et al.*, 2005a; Teillet *et al.*, 2008).



Figuur 4.1: De structuur van ADAMTS13 met zijn staart en kop domein. (A) De structuur van ADAMTS13, bestaande uit een metalloproteasedomein (MP), een disintegrine-achtig domein (Dis), acht trombospondine type-1 *repeats* (TSP1), een cysteïne rijk domein (Cys), een spacer domein (Spacer) en twee CUB domeinen. (B) De MDTCS mutant van ADAMTS13. Deze N-terminale mutant mist de C-terminale TSP1 2-8 en CUB domeinen. (C) De C-terminale staart van ADAMTS13 die bestaat uit zeven TSP1 domeinen en twee CUB domeinen.

De proteolyse van VWF door ADAMTS13 gebeurt in verschillende stappen via een *induced-fit* mechanisme, waarbij een mechanische stimulus omgezet wordt in een enzymatische respons. ADAMTS13 bevat geen specifieke inhibitor, waardoor zijn activiteit vooral gecontroleerd wordt door de beschikbaarheid van de knipplaats van VWF en de ADAMTS13-VWF interactie. Er treden heel wat interacties op tussen VWF en ADAMTS13, waarbij de meeste enkel tot stand komen wanneer VWF onderworpen wordt aan de schuifkrachten van de bloedstroom. De interacties tussen het kopdomein van ADAMTS13 (Figuur 4.1 B) met VWF zijn goed gekend. De rol van de staart van ADAMTS13 (Figuur 4.1 C) blijft echter grotendeels een raadsel (Akiyama *et al.*, 2009; Crawley *et al.*, 2011).

4.1 De werking van het MDTCS kopdomein

Er is een cruciale rol weggelegd voor het spacer domein van ADAMTS13 in de herkenning van VWF (Soejima *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2003). De onderzoeksgroep van Voorberg identificeerde namelijk een belangrijke bindingsplaats in het spacer domein voor ontvouwen VWF. Hiervoor werden mutagenese studies uitgevoerd, waarbij in de sterk geconserveerde Y^{658} - Y^{665} regio enkelvoudige, dubbele en drievoudige alanine mutaties werden geconstrueerd. Hieruit bleek dat de binding tussen de drievoudige mutant $R^{660}A$, $Y^{661}A$ en $Y^{665}A$ (ADAMTS13-RYY) en de humane monoklonale antilichamen (mAbs) I-9 en II-1, beiden gericht tegen het spacer domein, volledig werd verbroken. De mAbs I-9 en II-1 werden geïsoleerd uit de B-cellen van patiënten met verworven trombotische trombocytopenische purpura (TTP: paragraaf 5.1.2). Het effect van de ADAMTS13-RYY mutant op de proteolyse van VWF werd nagegaan via verkorte en *full-length* substraten. De verkorte VWF mutanten van het A2 domein die hier gebruikt werden, waren VWF115 (AZ 1554 - 1668) en VWF106 (AZ 1554 - 1659), die 9 AZ korter is dan de VWF115 mutant. Wildtype ADAMTS13 knipte VWF115 even snel als VWF106, terwijl VWF115 in veel mindere mate geknipt werd dan VWF106 door de ADAMTS13-RYY mutant. Hieruit werd duidelijk dat de exosite in het VWF A2 domein, waar de AZ R^{660}, Y^{661} en Y^{665} van het spacer domein van ADAMTS13 binden,

bestaat uit de aminozuurresidu's E^{1660} tot R^{1668} (Figuur 4.2 C), aangezien de RYY mutatie de splitsing van VWF106 niet beïnvloedt. Daarnaast werd ook de proteolyse van *full-length* VWF onder denaturerende en *flow* condities nagegaan. De resultaten uit deze experimenten toonden aan dat *full-length* VWF trager geknipt werd door ADAMT13-RYY in vergelijking met wildtype ADAMTS13, wat bevestigt dat de AZ R^{660}, Y^{661} en Y^{665} belangrijk zijn in de herkenning en proteolyse van VWF, maar dat andere domeinen ook een rol spelen (Pos *et al.*, 2010; Crawley *et al.*, 2011).

Het cysteïnerijk domein bevat tien geconserveerde cysteïne residu's en kan opgedeeld worden in een C_A en C_B domein. Het C_A domein heeft ondanks zijn lage sequentiehomologie (17%) een sterke structurele gelijkheid met het disintegrine-achtig domein. Bovendien bevat het C_A domein een functionele exosite die interageert met het VWF A2 domein en een RGD-sequentie, die door proteïnes vaak gebruikt wordt om integrines te herkennen. Het C_B domein bestaat uit een georganiseerde lus die door twee disulfidebruggen gestabiliseerd wordt (Soejima *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2009; Crawley *et al.*, 2011).

Het eerste TSP1 (TSP1-1) domein is tussen het disintegrine-achtig en het cysteïnerijk domein gelegen. Officieus wordt dit vaak 'het centraal trombospondine domein' genoemd, omdat deze over alle ADAMTSen geconserveerd is (Schneppenheim *et al.*, 2004). TSP1-1 bevat een volledige WXXW-sequentie (gemodificeerd met C-mannosylatie) en een CSXS/TCG sequentie die waarschijnlijk een O-fucosylatie site is (Hofsteenge *et al.*, 2001). Deze laatste sequentie is belangrijk voor de interactie van TSP1-1 met CD36, wat aanwezig is op bloedplaatjes, endotheelcellen en monocyten. De belangrijke rol van dit TSP1-1 domein is hoogst waarschijnlijk het correct positioneren van het cysteïnerijk en spacer domein ten opzichte van de katalystische splitsingssite.

Het disintegrine-achtig domein krijgt een grotere affiniteit voor het VWF A2 domein door de interactie tussen het spacer domein en A2 domein (Figuur 4.2 D). De aanwezigheid van het disintegrine-achtig domein zorgt voor een snellere proteolyse en speelt dus een rol in de herkenning van het substraat en de efficiëntie van het enzym. In deze interactie zouden de AZ R^{349} en L^{350} uit het disintegrine-achtig domein mogelijks met het AZ D^{1614} in het A2 domein van VWF interageren. Hierdoor zou de katalytische site van ADAMTS13 beter georiënteerd worden ten opzichte van de knipplaats van VWF. Dat de AZ R^{349} en L^{350} hier een rol spelen werd aangetoond via mutagenesestudies, waarbij $R^{349}A$ en $L^{350}G$ ervoor zorgden dat VWF minder snel geknipt werd (de Groot *et al.*, 2009).

Bovenstaande interacties zorgen ervoor dat het metalloprotease domein goed georiënteerd wordt ten opzichte van de VWF knipplaats (Figuur 4.2 E) (Pruss *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2011). Het metalloprotease domein is het katalytisch domein van ADAMTS13. Deze katalytische activiteit is enkel mogelijk in de aanwezigheid van de divalente kationen Zn^{2+} en

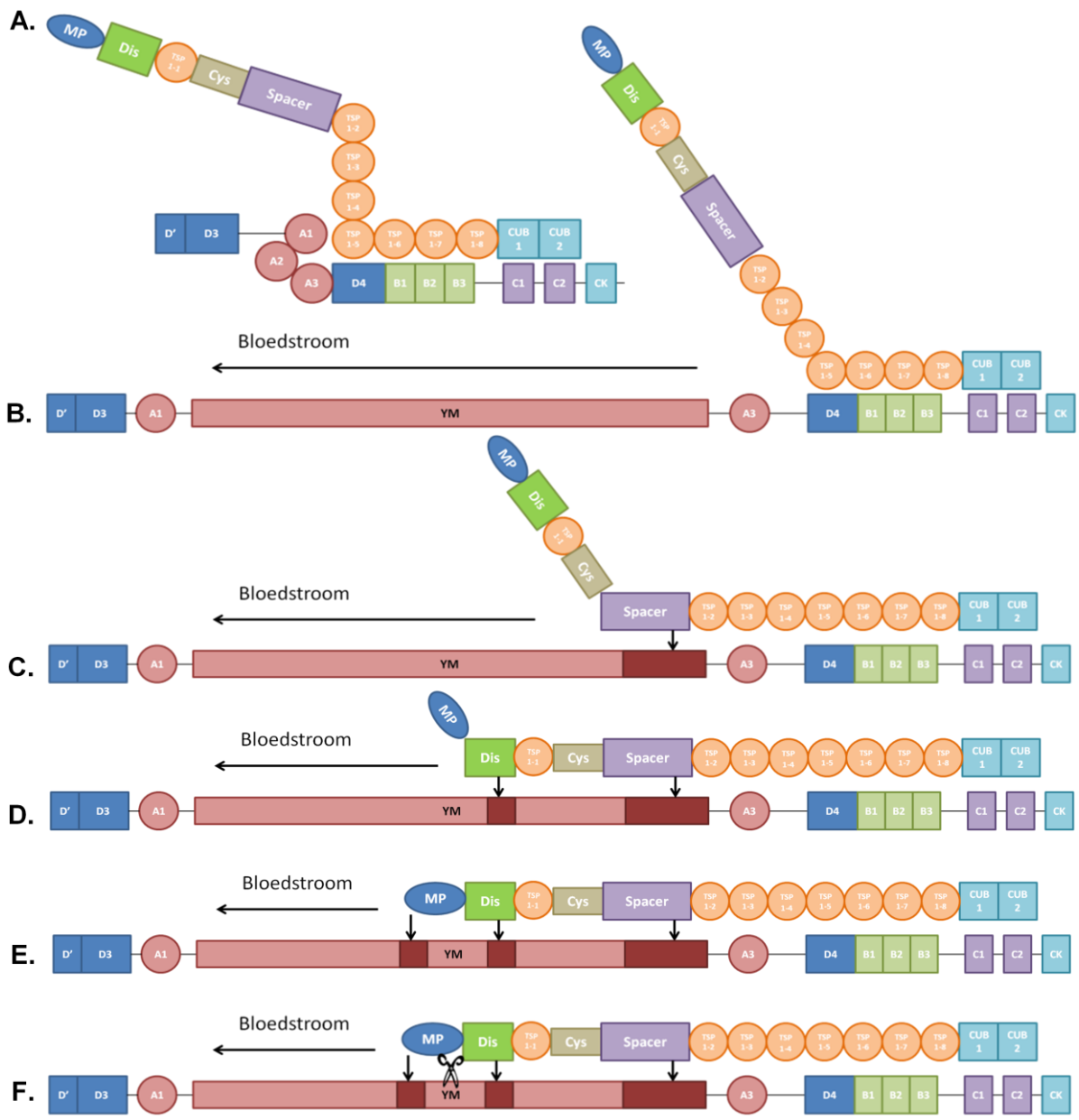
Ca^{2+} (Tsai, 1996). Zn^{2+} is van essentieel belang in het actief centrum. Zijn bindingsplaats bevat de sterk geconserveerde ^{224}**H**EXX**H**XXGXX**H**D^{235} herkenningssequentie waarin drie geconserveerde histidineresidu's aanwezig zijn om het Zn^{2+}-ion correct te positioneren. Dit ion stabiliseert een waterstofmolecule, dat belangrijk is voor de hydrolyse van de peptide-binding van VWF (Bode *et al.*, 1993). Ca^{2+} is daarentegen niet alleen belangrijk voor de activiteit van het enzym, maar zorgt ook voor het behoud van de structurele integriteit die nodig is voor een efficiënte proteolyse van VWF (Gardner *et al.*, 2009). De Y^{1605}-M^{1606} knip-plaats wordt in de actieve site gepositioneerd tussen de AZ L^{151}-V^{195} en D^{252}-P^{256} van het metalloprotease domein. Uiteindelijk wordt de Y^{1605} – M^{1606} binding geknipt en vermindert de affiniteit tussen het enzym en het substraat, zodat het protease gerecycleerd wordt (Figuur 4.2 F) (Crawley *et al.*, 2011). Het metalloprotease domein alleen is niet in staat om VWF te knippen. Dit werd experimenteel aangetoond door een verkorte vorm van VWF, nl. VWF73 (AZ 1596-1668), te gebruiken. Het toevoegen van een proximaal C-terminaal domein (disintegrine-achtig, TSP1-1 of spacer domein) herstelde de specificiteit. De proteolytische activiteit bleef echter laag wanneer het construct één of meer van deze proximaal C-terminale domeinen miste. Hieruit kon besloten worden dat elk proximaal C-terminaal domein een rol speelt in de herkenning en het knippen van VWF. Het MDTCS construct heeft een gelijkaardige proteolytische activiteit vergeleken met het *full-length* ADAMTS13. Toch mag hieruit niet geconcludeerd worden dat de distale C-terminale domeinen (TSP1 en CUB domeinen) *in vivo* geen rol zouden spelen (Ai *et al.*, 2005).

4.2 De mogelijke rol van het C-terminale staartdomein

Hoewel er over het staartdomein van ADAMTS13 (Figuur 4.1 C) dus nog weinig gekend is, spelen de verschillende domeinen vermoedelijk een rol in de herkenning van VWF, waardoor ze de splitsing van VWF beïnvloeden (Zhang *et al.*, 2007). Hoewel de MDTCS mutant, waarin de C-terminale staart gedeleteerd is (Figuur 4.1 B), de VWF-knippende activiteit grotendeels behoudt onder statische denaturerende en *flow* condities (Ai *et al.*, 2005; Crawley *et al.*, 2009), wijzen *in vitro* experimenten die de bloedstroom nabootsen er echter op dat de C-terminale domeinen belangrijk zijn voor een optimale proteolytische activiteit van ADAMTS13 (Zhang *et al.*, 2009b). Dit werd bevestigd doordat de deletie van de C-terminale TSP1-2 tot en met TSP1-8 en CUB domeinen resulteerde in een duidelijke daling van de splitsing van VWF door ADAMTS13 onder *flow* condities (Zhang *et al.*, 2007). Een C-terminale mutante vorm van muis ADAMTS13 (mADAMTS13), die de domeinen TSP1-2 tot en met CUB2 mist, geeft *in vivo* onder grote schuifkrachten (5000 s^{-1}) aanleiding tot grotere trombi dan in muizen die het volledige ADAMTS13 bevatten. Bijgevolg is er evidentie voor een rol van de staartdomeinen van ADAMTS13 in de regulatie van de trombusgrootte (Banno *et al.*, 2009). Op het eerste zicht lijken dit contradictorische resultaten te zijn,

aangezien enerzijds de deletiemutant (MDTCS) grotendeels zijn activiteit behoudt, maar anderzijds leidt de deletiemutant toch tot een grotere trombusvorming. Heel veel is echter afhankelijk van de structuur van VWF die verandert onder verschillende experimentele condities. Om de precieze rol van de staart van ADAMTS13 te achterhalen, is het dan ook noodzakelijk om hier verder onderzoek naar te doen.

De onderzoeksgroep van Zanardelli ontdekte in 2009 een constitutief blootgesteld interactie-domein tussen de VWF D4-CK domeinen (aminozuurresidu's 1874-2813) en het C-terminale domein van ADAMTS13 (Figuur 4.2 A). Uit deze studie blijkt dat de TSP1-5 tot en met TSP1-8 en de CUB domeinen van ADAMTS13 noodzakelijk zijn voor een volledige herkenning van het VWF D4 domein. Bovendien kunnen de TSP1-2 tot en met TSP1-4 domeinen mogelijks ook een rol spelen. Deze interactie vindt niet alleen plaats in condities waar de bloedstroom gesimuleerd wordt, maar kan ook voorkomen onder statische condities, waarbij het A2 domein van VWF verborgen ligt in zijn structuur. Bovendien circuleert zo'n 3% van ADAMTS13 in complex met VWF, zonder dat het VWF geknipt wordt. Daarom wordt gedacht dat de binding van de staart aan ADAMTS13 de intitiële stap zou zijn van een multistap-interactie die uiteindelijk leidt tot de proteolyse van VWF (Feys *et al.*, 2009; Zanardelli *et al.*, 2009).



Figuur 4.2: Interacties die optreden tussen de verschillende domeinen van ADAMTS13 en VWF. (A) Volgens de hypothese van de onderzoeksgroep van Crawley (gebaseerd op de resultaten van de onderzoeksgroep van Zanardelli) zou de initiële interactie tussen ADAMTS13 en VWF bestaan uit een interactie tussen de TSP1-5 tot en met de CUB domeinen van ADAMTS13 met de D4-CK domeinen van VWF. Door de afwezigheid van schuifstress van de bloedstroom ligt het A2 domein nog verborgen in de globulaire structuur van VWF. (B) De schuifstress van de bloedstroom zorgt voor het vrijstellen van de A1, A2 en A3 domeinen van VWF, waarbij het A2 domein ook ontvouwt. (C) Het spacer domein van ADAMTS13 interageert met het C-terminale uiteinde van het A2 domein van VWF. (D) De interactie met het spacer domein initieert een reeks van opeenvolgende bindingen, nl. de correcte positionering van het disintegrine-achtig domein en (E) de binding van het katalytische metalloprotease domein aan het VWF A2 domein. (F) Het enzym en het substraat zijn uiteindelijk correct ten opzichte van elkaar gepositioneerd, zodat de proteolyse van VWF tussen de aminozuurresidu's Y^{1605} en M^{1606} plaatsvindt (figuur gebaseerd op Crawley *et al.*, 2011).

5. Trombotische Trombocytopenische Purpura

Milde tot matige deficiëntie van plasma ADAMTS13 wordt geassocieerd met een stijgend risico op arteriële trombotische aandoeningen, zoals een hartinfarct of een tekort van bloed-toevoer naar de hersenen (Bongers *et al.*, 2006). Ernstige deficiëntie van plasma ADAMTS13 resulteert echter in de levensbedreigende auto-immuunziekte TTP (Zheng en Sadler, 2008). TTP is een zeldzame aandoening met een jaarlijkse incidentie van vier patiënten per miljoen (Coppo en Veyradier, 2012). Vrouwen lopen dubbel zoveel risico als mannen, bovendien wordt de diagnose soms pas gesteld tussen een leeftijd van 30 en 40 jaar (Murrin en Murray, 2006). TTP kan voorkomen als een enkele, sporadische acute episode, maar vaak gaat het om een wederkerende chronische vorm (Mannucci en Franchini, 2012). Wanneer en of er een terugval van de ziekte plaatsvindt is echter heel moeilijk te voorspellen. Bijgevolg is het heel belangrijk om de patiënten op geregelde tijdstippen te monitoren, zodat patiënten met een hoger risico op een terugval van de ziekte geïdentificeerd kunnen worden (Sadler, 2008).

Door de sterk verminderde activiteit van ADAMTS13 kunnen de bloedplaatjes spontaan binden aan het ongeknipte UL-VWF (Dong *et al.*, 2002; Sadler, 2008). Deze trombi zorgen bijgevolg voor obstructies in de vasculatuur, waardoor de weefsels en organen onvoldoende doorbloed worden. Het zijn voornamelijk de arteriolen die op deze wijze afgesloten kunnen worden, maar er ontwikkelen zich ook trombi in de grotere bloedvaten die blijven groeien tot ze de schuifkracht van de bloedstroom niet meer kunnen houden. Uiteindelijk komt de groeiende trombus los en zal het de kleinere bloedvaten blokkeren (Reininger, 2008). TTP wordt onder andere gekenmerkt door hyaline (glas-achtige) trombi in de microcapillairen. Deze trombi bestaan hoofdzakelijk uit gecompacteerde bloedplaatjes in verschillende stadia van degranulatie (Kwaan, 1987).

TTP patiënten ontwikkelen een groot aantal kleine trombi (trombotisch), waardoor er een sterk tekort is aan bloedplaatjes in circulatie (< 20000/µl bloed: trombocytopenie) wat aanleiding geeft tot purpura. Purpura wordt gekenmerkt door kleine paarse stippen onder de huid (Figuur 5.1). Deze worden veroorzaakt door onderhuidse bloedingen die niet gestelpt kunnen worden door het tekort aan boedplaatjes in de circulatie. Dit komt omdat alle bloed-plaatjes aan UL-VWF geadhereerd zijn. Verder gaat TTP gepaard met ernstige nierfunctie-stoornissen en neurologische dysfunctie doordat de weefsels onvoldoende doorbloed worden (Murrin en Murray, 2006). Ook hemolytische anemie, ernstige geelzucht, koorts, vermoeidheid, gewrichtspijn, spierpijn, rugpijn, maagpijn, grieperig gevoel, misselijkheid, overgeven en diarree kunnen symptomen zijn van TTP (Galbusera *et al.*, 2006; Loirat *et al.*, 2006; Coppo en Veyradier, 2012).

Figuur 4.1: Klinisch beeld van purpura. Purpura ontstaat door onderhuidse bloedingen, die niet gestelpt kunnen worden, door een tekort aan vrij circulerende bloedplaatjes. Hierdoor komen paarse onderhuidse stippen te voorschijn.

TTP wordt vandaag nog steeds klinisch gediagnosticeerd. De parameters die hierbij gehanteerd worden zijn: een lage bloedplaatjestelling (< 50000/µl bloed), hemolytische anemie en een hematocrietwaarde lager dan 20%, een hemoglobinegehalte lager dan 10 g/dl en een verhoogde hoeveelheid aan bilirubine, lactaat dehydrogenase en schistocyten (gefragmenteerde RBC) in het bloed (http://ttpdatabase.org/en). Tot op heden is er nog geen specifieke diagnostische test voor TTP beschikbaar, wat het moeilijk maakt om TTP te identificeren. Mogelijke diagnostische tests zijn: het meten van de plasmawaarden van ADAMTS13, het onderzoeken of er anti-ADAMTS13 Abs in het bloed aanwezig zijn en het nagaan van de activiteit van ADAMTS13. Deze methodes staan echter nog niet voldoende op punt om als betrouwbare diagnostische test te gebruiken, aangezien de karakteristieke symptomen van TTP ook kunnen optreden zonder deficiëntie in ADAMTS13 activiteit.

5.1 Types TTP

ADAMTS13 deficiëntie kan enerzijds ontstaan door mutaties in het *ADAMTS13* gen (=congenitale TTP), maar kan anderzijds ook ontstaan door de ontwikkeling van autoAbs tegen het enzym (= verworven TTP) (Tao *et al.*, 2005a).

5.1.1 Congenitale TTP of Upshaw-Schulman syndroom

Het Upshaw-Schulman syndroom (USS) is de zeldzame congenitale TTP variant die plots tot uiting komt (Feys *et al.*, 2010). De ziekte profileert zich door een mutatie in het *ADAMTS13* gen (Levy *et al.*, 2001). Er zijn reeds meer dan 140 mutaties in het *ADAMTS13* gen beschreven (Kremer Hovinga en Lammle, 2012). Deze mutaties wijzen erop dat zowel de synthese, de secretie, als de activiteit van het protease beïnvloed kunnen worden (Manea en Karpman, 2009). Vaak komt congenitale TTP onmiddellijk na de geboorte of tijdens de kindertijd opzetten, maar soms gebeurt dit pas tijdens de adolescentie. Deze late ontwikkeling van TTP gaat vaak gepaard met de $R^{1060}W$ mutatie in het TSP1-7 domein (Camilleri *et al.*, 2008).

5.1.2 Verworven of idiopatische TTP

Verworven of idiopatische TTP is een auto-immuunziekte, waarbij het lichaam autoAbs aanmaakt tegen ADAMTS13 (Peyvandi *et al.*, 2008). Deze Abs kunnen ofwel de activiteit van ADAMTS13 inhiberen, of kunnen het verwijderen van het enzym uit het bloedplasma stimuleren. De Abs die gericht zijn tegen ADAMTS13 zijn voornamelijk van het type immunoglobuline G (IgG), maar ook IgM en IgA werden reeds teruggevonden in het plasma van TTP patiënten (Pos *et al.*, 2011).

Zowel genetische als omgevingsfactoren spelen een rol in de ontwikkeling van TTP. TTP wordt vaak voorafgegaan door een trigger, zoals een zwangerschap, beenmergtransplantatie, drugs of medicijnen en virale of bacteriële infecties. Tien tot dertig procent van alle TTP patiënten lijden echter ook aan een andere auto-immuunziekte, zoals bijvoorbeeld het Humaan Immunodeficiëntie Virus (HIV). De vormen van TTP die gepaard gaan met een additionele auto-immuunziekte worden ook wel secundaire TTP genoemd (Murrin en Murray, 2006; Pos *et al.*, 2011).

Epitoop *mapping* studies hebben aangetoond dat het cysteïnerijk en het spacer domein de belangrijkste bindingsplaatsen zijn voor anti-ADAMTS13 Abs. Alle patiënten bezitten immers Abs die gericht zijn tegen het spacer domein. Daarnaast werden er ook andere epitopen over het volledige enzym geïdentificeerd. Zo bezit ongeveer dertig tot vijftig procent van alle patiënten met verworven TTP Abs die gericht zijn tegen de C-terminale staart van ADAMTS13 (Pos *et al.*, 2010; Crawley *et al.*, 2011; Pos *et al.*, 2011). De meeste Abs tegen het spacer domein zijn gericht tegen het epitoop R^{660}, Y^{661} en Y^{665} op het buitenste oppervlak van het spacer domein. Door binding van de Abs op dit epitoop wordt er sterische hinder gecreëerd, waardoor de interactie met het A2 domein niet meer mogelijk is (Pos *et al.*, 2011).

In 64% van de plasmastalen van patiënten met verworven TTP worden naast Abs tegen het cysteïnerijk en het spacer domein ook Abs gevonden tegen de TSP1-2 tot en met de TSP1-8 en CUB domeinen. Deze kunnen ook een invloed hebben op de proteolytische activiteit van ADAMT13 (Klaus *et al.*, 2004; Pos *et al.*, 2011).

5.2 Behandelingen

Plasma infusie therapie wordt toegepast bij patiënten met congenitale TTP, waarbij donor ADAMTS13 wordt toegevoegd door de toediening van *fresh frozen* plasma (Feys *et al.*, 2010). Patiënten met verworven TTP worden echter behandeld met plasma-uitwisselingstherapie (*plasma exchange* (PEx)), waardoor de autoAbs uit het plasma van de patiënt verwijderd worden en er een herstel optreedt van de functionele ADAMTS13 niveaus en de bloedplaatjesconcentratie (Sadler, 2008; Pos *et al.*, 2011). Deze behandeling wordt dagelijks herhaald tot de ADAMTS13 activiteit in het bloed van de patiënt terug in orde is, de problemen met de organen zich oplossen en totdat de hoeveelheid aan bloedplaatjes in het

bloed terug genormaliseerd is (Coppo en Veyradier, 2012). Deze behandeling is echter voor een groot aantal patiënten niet optimaal, waardoor deze gecombineerd wordt met een immunosuppressieve therapie (Sadler, 2008; Coppo en Veyradier, 2012). In deze immuno-suppressietherapie wordt gebruik gemaakt van rituximab, een anti-CD20 mAb dat de eliminatie van de B-cellen promoot en zo de synthese van Abs onderdrukt (Taylor en Lindorfer, 2007). Over het algemeen wordt er reeds twee weken na de eerste toediening van rituximab herstel van het bloedplaatjesniveau vastgesteld. Na drie tot zes maanden wordt een gedeeltelijk tot volledig herstel van ADAMTS13 activiteit en een daling van de circulerende anti-ADAMTS13 Abs opgemerkt. Het gebruik van rituximab biedt momenteel echter nog geen soelaas op lange termijn (Coppo en Veyradier, 2012).

Er worden vaak additionele therapieën gebruikt, zoals steroïden en vincristine. Steroïden zorgen voor de downregulatie van verschillende cytokines, waardoor de ziekte beter gecontroleerd kan worden, aangezien in dit geval het immuunsysteem onderdrukt wordt. Vincristine kan de GP receptoren op het oppervlak van de bloedplaatjes wijzigen, waardoor hun activatie verhinderd wordt. In uitzonderlijke gevallen wordt er soms een splenectomie (verwijderen van de milt) uitgevoerd, zodat op die wijze ook de antilichaamproductie beperkt kan worden (Coppo en Veyradier, 2012).

5.3 Toekomst

Tegenwoordig is er groeiende interesse en gebeurt er volop onderzoek naar het gebruik van recombinant ADAMTS13 als therapie voor zowel congenitale als verworven TTP. Gentherapie zou een potentiële oplossing zijn om congenitale TTP niet tijdelijk, maar permanent te genezen. (Xiao *et al.*, 2011). Recombinant ADAMTS13 als substitutietherapie voor patiënten met congenitale TTP werd reeds *in vitro* aangetoond. Deze toepassing ligt echter iets gecompliceerder voor patiënten met verworven TTP, aangezien de autoAbs ook kunnen binden aan het recombinant ADAMTS13 en het enzym dus nog steeds kunnen inhiberen (Plaimauer *et al.*, 2011). Er wordt momenteel ook onderzoek gedaan naar de mogelijkheid om specifieke domeinen van ADAMTS13 met specifieke leden van de ADAMTS familie uit te wisselen. De meeste van deze domeinen vertonen over de verschillende leden van de ADAMTS familie een modulaire structuur, waardoor de structuur en integriteit van het enzym grotendeels behouden kan blijven. Op basis van deze redenering werden onlangs chimere protease constructen gevormd tussen ADAMTS13 en ADAMTS5. Na klonering werd de proteolytische efficiëntie van de constructen nagegaan op hun substraten, VWF voor ADAMTS13 en aggrecan voor ADAMTS5. Zo waren MD13/TCS5, MDT13/CS5 en MD5/TCS13 in staat om VWF te knippen, wat erop wijst dat het uitwisselen van specifieke domeinen tussen leden van de ADAMTS familie de activiteit van ADAMTS13 niet wijzigt. Bijgevolg kunnen deze constructen de mogelijkheid bieden om de proteolyse van VWF te herstellen in patiënten met verworven TTP (Gao *et al.*, 2012).

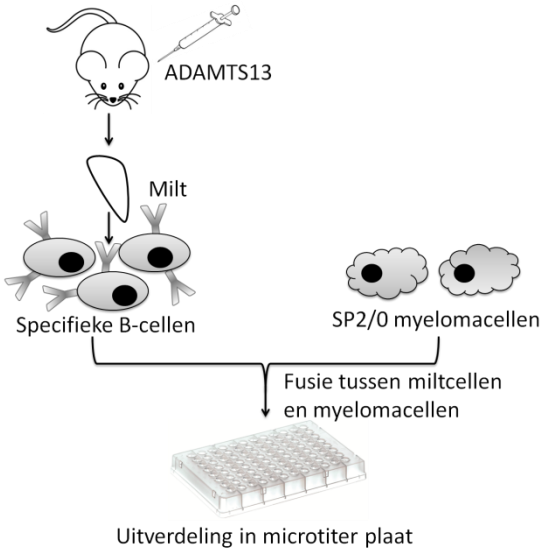
6. De ontwikkeling van mAbs kan de rol van de staart van ADAMTS13 helpen ontrafelen

De rol van het staartdomein van ADAMTS13 in TTP kan enerzijds onderzocht worden door het construeren van diverse mutanten van het staartdomein van ADAMTS13. Deze techniek heeft echter het nadeel dat hierdoor de structuur van ADAMTS13 kan gewijzigd worden, wat op zich al een invloed kan hebben op de functionaliteit van het enzym. Anderzijds kan de rol van het staartdomein ook bestudeerd worden door de ontwikkeling van mAbs tegen specifieke staartdomeinen van ADAMTS13. Op deze wijze wordt wel rekening gehouden met de structuur van het enzym. Het ontwikkelen en testen van mAbs zal dan ook het centraal thema zijn doorheen deze thesis. De mAbs kunnen ontwikkeld worden via de cel-fusietechniek van Köhler en Milstein (Köhler en Milstein, 1975), een belangrijke *tool* voor de ontwikkeling van specifieke mAbs tegen een vooraf bepaald antigen, in dit geval ADAMTS13. De geproduceerde Abs kunnen vervolgens in verschillende *assays* getest worden om na te gaan in welke mate ze de proteolytische activiteit van ADAMTS13 kunnen modificeren.

De techniek die gebruikt wordt voor de ontwikkeling van mAbs werd voor het eerst door Köhler en Milstein beschreven (Köhler en Milstein, 1975). In dit protocol worden muizen geïmmuniseerd met het antigen waartegen men Abs wil produceren. Hierbij is het belangrijk dat de muizen een volwassen immuunsysteem hebben. Vandaar dat muizen bij de eerste immunisatiestap minimaal zes weken oud moeten zijn. Ook de muizenstam die gebruikt wordt speelt een rol, want de fusie gebeurt met SP2/0 myelomacellen die oorspronkelijk afkomstig zijn van Balb/C muizen. Dit wil zeggen dat fusies met geïmmuniseerde Balb/C muizen beter lukken dan wanneer een andere muizenstam gebruikt wordt. Bovendien is het ook belangrijk dat het geïnjecteerde proteïne door de muis als vreemd wordt gezien, zodat een immuunrespons uitgelokt wordt. De muizen worden in totaal vier keer geïmmuniseerd. Voor de eerste immunisatie is de muis nog naïef voor het antigen, waardoor de eerste immunologische respons traag zal verlopen. De macrofagen en dendritische cellen zullen het antigen opnemen, verknippen en op hun celoppervlak tentoonstellen. Deze cellen worden de antigen presenterende cellen (APC) genoemd. Hieraan kunnen de specifieke T helper (T_H) cellen binden en zich prolifereren om de B-cel proliferatie te stimuleren. Ook B-cellen zullen dus via specifieke Abs op hun celoppervlak het antigen herkennen, dat vervolgens geïnternaliseerd en geprocessed zal worden. De B-cellen zullen het gefragmenteerde antigen ook op hun celoppervlak gaan presenteren, waaraan specifieke T_H-cellen zullen binden. Dit mechanisme zorgt uiteindelijk voor een exponentiële toename van de antilichaamtiters, doordat de geactiveerde B-cellen plasmacellen vormen die Abs secreteren. Hierbij worden er ook geheugen B-cellen gevormd die een belangrijke rol zullen spelen bij de volgende immunisaties. Een nieuwe injectie met antigen zal een veel snellere

immuunrespons uitlokken dankzij deze *memory* B-cellen. Er zullen nog hogere antilichaamtiters optreden, waarbij de Abs een hogere specificiteit en affiniteit zullen vertonen ten opzichte van het antigen. De eerste immunisatie gebeurt in combinatie met het '*complete Freund's adjuvant'* (CFA) en de tweede keer met het '*incomplete Freund's adjuvant'* (IFA). *Freund's adjuvant* is een olie-achtige oplossing die zorgt voor een trage en gelijkmatige vrijzetting van het antigen, waardoor het immuunsysteem langer gestimuleerd wordt. CFA bevat hitte geïnactiveerde mycobacteriën en wordt initieel gebruikt om een hypersensitieve immuunrespons uit te lokken. Deze mycobacteriën zijn afwezig in IFA, toch zal hier nog een sterke antilichaamproductie optreden, door de trage vrijzetting van het antigen (Billiau en Matthys, 2001). Net voor de fusie wordt de muis nog twee keer kort na elkaar geïmmuniseerd met het antigen (deze keer zonder *Freund's adjuvant*) om het immuunsysteem te boosten zodat een zo hoog mogelijke antilichaamtiter bereikt wordt (Harlow *et al.*, 1988). Na de reeks immunisaties wordt de muis geëuthanaseerd en wordt de milt eruit verwijderd. Aangezien een groot deel van de miltcellen B-cellen zijn die mogelijks Abs produceren tegen het antigen waarmee geïmmuniseerd werd (hier ADAMTS13) (Figuur 6.1), worden deze via de methode van Köhler en Milstein gefuseerd met SP2/0 myelomacellen tot een stabiele hybridomacellijn. Om de fusie van de B-cellen met de myelomacellen mogelijk te maken, wordt polyethyleen glycol (PEG) toegevoegd. Na de fusie is het heel belangrijk dat enkel de gefuseerde hybridomacellen verder kunnen groeien en niet de niet-gefuseerde miltcellen of myelomacellen. Daarom worden de cellen na de fusie in HAT-selectiemedium gekweekt. Dit selectiemedium bevat onder andere hypoxanthine, aminopterine en thymidine. Aminopterine zorgt ervoor dat de *de novo* synthese van nucleïnezuren niet kan plaatsvinden doordat het dihydrofolaat reductase (DHFR) inhibeert. De meeste cellen kunnen deze inhibitie echter omzeilen door gebruik te maken van de reddingspathway. In tegenstelling tot de B-cellen zijn de SP2/0 myelomacellen deficiënt in de enzymen waaruit de reddingspathway bestaat, namelijk hypoxanthine guanine fosforibosyl transferase (HGPRT) en thymidine kinase (TK), waardoor de niet-gefuseerde myelomacellen uiteindelijk zullen sterven. De miltcellen bezitten echter wel de nodige enzymen en zullen bij een geslaagde fusie dus de myelomacellen van HGPRT en TK voorzien, waardoor de hybridomacellen blijven leven. Niet-gefuseerde miltcellen hebben op zich een beperkte levensduur en zullen na verloop van tijd ook sterven. Dit wil dus zeggen dat enkel de gefuseerde hybridomacellen zullen overleven in het HAT-medium. Na de fusie worden de cellen uitverdeeld in microtiterplaten, zodat een klein aantal cellen per well aanwezig zijn. Twee weken na de fusie worden de cellen getest op hun antigenspecificiteit via een specifieke *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) en wordt nagegaan in welke wells Abs geproduceerd worden tegen het gewenste antigen. De hybridoma's in de positieve wells worden verder gesubkloneerd en uitverdund om de hybridomacellen die niet tegen het geïmmuniseerde antigen gericht zijn zoveel mogelijk te verwijderen. Op die manier wordt de

overgroei van de specifieke hybridomacellen door niet-specifieke hybridomacellen zoveel mogelijk verhinderd, zodat de specifieke hybridomacellen hun positiviteit niet zouden verliezen. Indien de klones na verschillende screenings positief blijven wordt dus een productielijn van mAbs bekomen, waarbij de mAbs na het opgroeien van de hybridomacellen opgezuiverd kunnen worden via een proteïne G kolom voor verdere karakterisatie.



Figuur 6.1: Procedure voor het maken van mAbs tegen een specifiek antigen, hier ADAMTS13. Na de immunisatieprocedure van een muis met een specifiek antigen bevat de milt van de muis specifieke B-cellen die Abs produceren tegen het geïnjecteerde antigen. Wanneer deze specifieke B-cellen gefuseerd worden met SP2/0 myelomacellen wordt hun levensduur verlengd, waardoor een oneindige bron aan mAbs tegen het gewenste antigen bekomen wordt. De cellen worden na de fusie uitverdeeld over microtiterplaten waarbij na twee weken via ELISA de hybridomacellijnen geïdentificeerd kunnen worden die specifieke Abs tegen het antigen produceren. Op die manier kan een productielijn opgestart worden van antigen-specifieke mAbs zodat deze mAbs in verschillende *assays* getest kunnen worden.

7. Doelstelling

Zoals reeds werd aangegeven doorheen de literatuurstudie is er al heel wat gekend over de interacties tussen het MDTCS kopdomein van ADAMTS13 en het VWF A2 domein. De interacties tussen het C-terminale staartdomein van ADAMTS13 en VWF blijven echter grotendeels een raadsel en steunen op tal van hypothesen. Zo zorgt de MDTCS mutant voor een gereduceerde proteolyse van VWF in vergelijking met *full-length* ADAMTS13 in een vortex *assay* (Zhang *et al.*, 2007), terwijl de MDTCS mutant in *flow* gebaseerde condities en *in vivo* eerder hyperactief is, waarbij de staart dus eerder een rol zou spelen als negatieve regulator van de ADAMTS13 activiteit (Tao *et al.*, 2005b; De Maeyer *et al.*, 2010). Bovendien zijn er ook aanwijzingen dat de C-terminale staart een belangrijke rol zou kunnen spelen bij de initiële binding van ADAMTS13 aan gevouwen VWF, terwijl deze *docking* onder gedenatureerde condities niet nodig zou zijn (Tao *et al.*, 2005a; Feys *et al.*, 2009; Zanardelli *et al.*, 2009; De Maeyer *et al.*, 2010). Het is dus noodzakelijk dat er verder onderzoek gedaan wordt naar de rol van de C-terminale staart van ADAMTS13 om meer duidelijkheid te scheppen in dit complex mechanisme. Het nadeel van alle hierboven beschreven experimenten is dat er vooral met deletiemutanten werd gewerkt, waarbij telkens (een deel van) de staart werd gedeleteerd. Er moet bij de interpretatie van deze resultaten dan ook rekening gehouden worden met de conformatie van de mutanten die mogelijks gewijzigd kan zijn ten opzichte van de conformatie van het wildtype ADAMTS13. Vandaar dat in deze masterthesis wordt getracht om meer inzicht te krijgen in de werking van ADAMTS13 en zijn C-terminale staart via de ontwikkeling van functionele mAbs tegen zowel het muis als het humaan ADAMTS13. Deze methode vormt een belangrijke onderzoeksstrategie, omdat de integriteit van ADAMTS13 behouden blijft.

In het eerste deel van dit project zal getracht worden om mAbs te ontwikkelen tegen muis ADAMTS13 (mADAMTS13). Hierbij zal er een optimalisatie moeten gebeuren om het expressieniveau van mADAMTS13 te verhogen, aangezien bij aanvang van deze master-thesis het expressieniveau van de mADAMTS13 HEK T-REx cellijn heel laag ligt. Via een subklonering zal geprobeerd worden om dit expressieniveau te verhogen. Indien het expressieniveau voldoende stijgt moet het ook nog in een voldoende mate opgezuiverd kunnen worden, zodat de immunisaties van ADAMTS13$^{-/-}$ muizen met het mADAMTS13 mogelijk zijn. Na de immunisaties is het de bedoeling om de miltcellen van de geïmmuniseerde muizen te fuseren met SP2/0 myelomacellen volgens het fusieprotocol van Köhler en Milstein om zo hybridomacellijnen te ontwikkelen die anti-mADAMTS13 mAbs produceren (Köhler en Milstein, 1975). De ontwikkelde anti-mADAMTS13 mAbs kunnen dan vervolgens *in vitro* en *in vivo* getest worden op hun functionaliteit.

In een tweede deel van het project worden mAbs tegen humaan ADAMTS13 (hADAMTS13) ontwikkeld. De ontwikkelde mAbs zullen hierbij na het opgroeien en opzuiveren voornamelijk via *in vitro assays* getest worden op hun functionaliteit, zodat de rol van de staart van ADAMTS13 verduidelijkt kan worden. Een *in vivo assay* is hierbij echter niet mogelijk, aangezien er hier gebruik gemaakt wordt van hADAMTS13 en geen mADAMTS13.

Het proberen te achterhalen van de rol van de C-terminale staart van ADAMTS13 kan mogelijks ook door het *full-length* ADAMTS13 in competitie te laten treden met een verkorte mutante vorm die bestaat uit het spacer domein en de C-terminale staart van ADAMTS13. Hiervoor moet er eerst een klonering uitgevoerd worden waarbij het fragment op een correcte manier in een vector wordt geligeerd. Deze vector kan dan getransfecteerd worden om zo tot een stabiele eukaryote cellijn te komen die het fragment tot expressie brengt, waarna het opgezuiverd en getest kan worden in toekomstige experimenten.

DEEL II
Experimenteel onderzoek

1. Materiaal en Methoden

1.1 Productie en opzuivering van mADAMTS13 voor de immunisatie van ADAMTS13$^{-/-}$ muizen

1.1.1 De productie van mADAMTS13

De immunisatie van ADAMTS13$^{-/-}$ muizen (C57BL/6J x 129Sv x CASA/Rk) voor de productie van mAbs tegen mADAMTS13 vereist een voldoende hoeveelheid aan antigen. Voor de productie van mADAMTS13 werd gebruik gemaakt van een reeds beschikbare H*uman Embryonic Kidney With Tetracycline Regulated Expression* (HEK T-REx: Invitrogen, Carlsbad, Californië (CA)) cellijn die reeds getransfecteerd was met een vector waarin het mADAMTS13 gen gekloneerd werd (mADAMTS13-pcDNA3.1) (De Maeyer, 2011). Dit celsysteem werkt via een tetracycline inductiesysteem, waardoor mADAMTS13 enkel tot expressie komt in aanwezigheid van tetracycline. De cellen werden op 37 °C uit een cryostock ontdooid en werden opgegroeid in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) selectiemedium (Invitrogen) dat met verschillende componenten werd aangereikt (Tabel 1.1).

Tabel 1.1: Media voor het opgroeien van HEK T-REx cellen.

Medium	Samenstelling
Selectiemedium	500 ml DMEM; 1% 2 mM L-Glutamine (L-Gln); 10% tetracycline vrij *Foetal Bovine Serum* (FBS); 1% Penicilline-Streptomycine (P/S); 250 µg/ml Zeocine; 5 µg/ml Blasticidine (Invitrogen)
Expressiemedium	293 *Freestyle* medium (Invitrogen); 10 µg/ml Tetracycline (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri (MO))

Om een betere expressie van mADAMTS13 door de HEK T-REx cellen te bekomen, werden deze cellen gesubkloneerd. Hierbij werden de cellen in een steriele 96-well plaat (Greiner Bio-One BVBA/SPRL, Wemmel, België) uitverdeeld aan 5 en 15 cellen per well. Het aantal cellen werd bepaald via een celtelling met behulp van een Bürkerkamer (Marienfield, Lauda-Köringshofen, Duitsland). De best producerende klones werden 2 à 3 weken later geïdentificeerd via een ELISA.

Om de best producerende mADAMTS13 klones te identificeren werden de 96-well platen gedurende de nacht gecoat met het Ab 20A10 (5 µg/ml), dat gericht is tegen het cysteïne/spacer domein van mADAMTS13 (De Maeyer, 2011). De volgende dag werden de 96-well platen 3 keer gewassen met *Phosphate Buffered Saline* (PBS: Tabel 1.2) 0,1% Tween 20 (Tw20: Acros Organics, Geel, België) en vervolgens geblokkeerd met een 3% melkoplossing (gloria: Nestlé, Vevey, Zwitserland) in PBS bij KT gedurende 2u. De platen werden opnieuw 3 keer gewassen met PBS Tw20 0,1%. Om contaminatie van de cellijnen te

vermijden werd onder de laminaire flow 90 µl van het medium waarin de cellen groeien in 10 µl 3% gloria overgebracht naar de geblokkeerde platen en 1,5u geïncubeerd bij 37 °C. *Normal Murine Plasma* (NMP) en mADAMTS13 expressiemedium (mWT) van voor de subklonering werden meegenomen als positieve controles. Na de incubatie met het medium werden de platen deze keer 6 maal gewassen met PBS Tw20 0,1%. De detectie van mADAMTS13 gebeurde door een polyklonaal konijn anti-mADAMTS13 Ab (De Maeyer, 2011) toe te voegen (5 µg/ml) en dit 1u te incuberen bij KT. Vervolgens werden de 96-well platen nogmaals 6 keer gewassen met PBS Tw20 0,1%. Het polyklonaal konijn anti-muis Ab werd opgepikt via *Goat-anti-Rabbit-HorseRadish Peroxidase* (GAR-HRP: Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK) in een 1/10000 verdunning in 0,3% gloria, waarmee het 1u bij KT geïncubeerd werd. De kleurontwikkeling van de platen gebeurde door het toevoegen van 160 µl ontwikkelingsbuffer aan elke well (Tabel 1.3). De kleurreactie werd gestopt door 50 µl 4 M H_2SO_4 toe te voegen aan elke well. De ELISA platen werden uitgelezen bij 490 nm met behulp van de Fluostar Optima ELISA*reader* (Isogen *Life Science*, Sint-Pieters-Leeuw, België). Voor meer details van dit experiment: zie Bijlage 1.

Tabel 1.2: Samenstelling PBS buffer

1x PBS (1 l)
8 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g Na_2HPO_4*$2H_2O$
0,2 g KH_2PO_4

Tabel 1.3: Samenstelling ontwikkelingsbuffer ELISA

Kleur ontwikkelingsbuffer	**Samenstelling**	**Verdeler**
10 ml citraatbuffer	0,05 M citraat	Acros Organics
10 ml fosfaatbuffer	0,1 M fosfaatbuffer	Acros Organics
8 µl H_2O_2	35%	Acros Organics
200 µl OPD	4,6 mM o-fenyleendiamine	Sigma Aldrich

De vijf best producerende klones werden opgepikt en overgezet naar een steriele 24-well plaat (Greiner Bio-One BVBA/SPRL). Eens de wells volgroeid waren, werden de cellen twee maal gewassen met PBS (Invitrogen), waarna ze los gemaakt werden door 200 µl trypsine-EDTA 0,5% (Invitrogen) toe te voegen en 5 min te incuberen bij 37 °C. Vervolgens werd 1 ml selectiemedium toegevoegd en werden de cellen samen met nog 5 ml extra selectiemedium overgebracht naar een 25 cm² cultuurfles. Bij een confluente cultuurfles werd het selectie-medium vervangen door expressiemedium (Invitrogen) (Tabel 1.1). Na enkele dagen werd het expressiemedium van de verschillende klones afgenomen.

De best producerende klone werd via een verdunningsreeks geïdentificeerd met behulp van de ELISA zoals hierboven beschreven, maar nu werd het expressiemedium in een 1/10 verhouding op de met 20A10 gecoate microtiterplaat gebracht en 1/2 uitverdund. Als positieve controle en ijk werden opnieuw NMP en mWT gebruikt. Het expressiemedium kon gedetecteerd worden door het toevoegen van het polyklonaal konijn anti-mADAMTS13 Ab. De kleurontwikkeling werd mogelijk gemaakt door de plaat eerst nog te incuberen met GAR-HRP (meer details: zie Bijlage 1).

De best producerende klone (mADAMTS13 F12) werd verder opgegroeid in een Cell Factories Nunc™ EasyFill™ multitray (VWR, Leuven, België) in 500 ml selectiemedium (Tabel 1.1). Om uiteindelijk grote hoeveelheden expressiemedium aan mADAMTS13 te produceren werd, eens de multitray volgroeid was, het selectiemedium verwijderd en vervangen door 500 ml expressiemedium (Tabel 1.1).

1.1.2 Opzuivering van mADAMTS13

Na het oogsten van het expressiemedium werd mADAMTS13 opgezuiverd via een nikkel-kolom. Deze opzuivering is een vorm van *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC), waarbij het tweewaardig metaalkation nikkel (Ni^{2+}) gebonden is aan een *Sepharose* drager. Muis ADAMTS13 kon via een nikkelkolom opgezuiverd worden, omdat aan het C-terminale uiteinde van mADAMTS13 een polyhistidine-tag gekloneerd was die gekenmerkt wordt door zijn hoge affiniteit voor nikkel. Het volledige opzuiveringsproces werd bij 4 °C uitgevoerd om de degradatie van mADAMTS13 zoveel mogelijk te beperken. Het expressie-medium (200 ml) werd voor de opzuivering gedurende de nacht gedialyseerd (4 °C) in laadbuffer zonder imidazol (10 l) (Tabel 1.4). De volgende dag werd de nikkelkolom eerst geëquilibreerd met laad- en wasbuffer, vooraleer het medium tijdens de nacht op de kolom werd gebracht. De kolom werd vervolgens gewassen met 10 kolomvolumes (KV) laad- en wasbuffer (Tabel 1.4). Met behulp van een fractiecollector werden, na het wassen van de kolom, zo'n 30 fracties van ongeveer 1 ml gecollecteerd in Sarstedt-buizen (Sarstedt, Essen, België) door elutiebuffer (Tabel 1.4) over de nikkelkolom te laten lopen. De overmaat aan imidazol in de elutiebuffer trad in competitie met mADAMTS13 voor een bindingsplaats aan Ni^{2+}, waardoor mADAMT13 geëlueerd kon worden. Na elutie werd opnieuw laad- en wasbuffer (5 KV) over de kolom gebracht. De nikkel werd vervolgens van de kolom gehaald door 5 KV strippingbuffer (Tabel 1.4) over de kolom te laten lopen. Wanneer alle nikkel verwijderd was, werden 5 KV laad- en wasbuffer en 5 KV gedestilleerd water (*aqua destilata*, AD) over de kolom gebracht. Voor het volgende gebruik, werd de kolom opnieuw geladen met nikkel door 0,5 KV herlaadbuffer (Tabel 1.4) op de kolom te brengen. Daarna werden opnieuw 5 KV AD en 5 KV laad- en wasbuffer over de kolom gebracht, waarna de kolom op

20% ethanol werd gebracht voor opslag. Omdat de laadcapaciteit van de kolom voldoende hoog was werd na verloop van tijd het laadvolume van het medium verhoogd naar 400 ml in plaats van 200 ml.

Tabel 1.4: Buffers voor de opzuivering van mADAMTS13 via nikkelkolom.

Buffer	Samenstelling
Laad- en wasbuffer	20 mM NaH_2PO_4; 30 mM imidazol; 500 mM NaCl
Elutiebuffer	20 mM NaH_2PO_4; 500 mM imidazol; 500 mM NaCl
Stripping buffer	20 mM NaH_2PO_4; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl
Herlaadbuffer	0,1 M $NiCl_26H_2O$

1.1.3 Dotblot van de geëlueerde fracties

Om na te gaan in welke geëlueerde fracties (paragraaf 1.1.2) het mADAMTS13 aanwezig was, dat opgezuiverd werd via nikkelkolom, werd een dotblot uitgevoerd. Hierbij werd 2 µl van elke fractie op een nitrocellulosemembraan (Hybond™-C Extra, GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin (WI)) gespot. Na 5 min drogen op KT werd het membraan geblokkeerd door het zacht te laten schudden in 50 ml 3% gloria (1u, KT). Het membraan werd vervolgens 6 keer 2 min gewassen met 0,05% PBS Tween 80 (Tw80: Acros Organics). Het mADAMTS13 beschikt naast een polyhistidine-tag, ook over een C-terminale V5-tag. Dit proteïne kon dus gedetecteerd worden door de incubatie met anti-V5-HRP (Invitrogen). Anti-V5-HRP werd bijgevolg in een 1/3000 verdunning (in een 0,3% gloria, PBS oplossing) aan het nitrocellulosemembraan toegevoegd (1u, KT). Daarna werd het membraan opnieuw 6 keer 2 min gewassen met PBS Tw80 0,05%. Vervolgens werd het membraan 5 min geïncubeerd met 2 ml detectieoplossing van de '*Supersignal© West Pico Chemiluminescent Substrate*' kit (Acros, Organics), waarbij 1 ml stabiele peroxide oplossing en 1 ml luminol werden samengevoegd. De blot werd gevisualiseerd met het *imaging* toestel Fujifilm LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japan). De fracties die het mADAMTS13 bevatten werden samengevoegd en opgeconcentreerd met behulp van een AMICON® Ultra Centrifugal filter Ultracel 100000 K (Millipore, Overijse, België), die enkele minuten aan 1730 g op 4 °C gecentrifugeerd werd (Sigma 3-16PK, Fisher Bioblock Scientific, Erembodegem, België) tot een volume van ongeveer 500 à 1000 µl bekomen werd. Na het opconcentreren werd het opgezuiverde mADAMTS13 gedurende de nacht op 4 °C gedialyseerd tegen *Hepes Buffered Saline (*HBS*)* buffer (Tabel 1.5)

Tabel 1.5: Samenstelling HBS buffer

1x HBS buffer
50 mM Hepes
50 mM $CaCl_2$
1 µM $ZnCl_2$
0,15 M NaCl

1.1.4 Concentratie- en zuiverheidsbepaling van het opgezuiverde mADAMTS13

Na de opzuivering werd de zuiverheid en concentratie van mADAMTS13 bepaald via Sodium Dodecyl Sulfaat PolyAcrylamide GelElektroforese (SDS-PAGE). Hierbij werd een 7,5% *running* gel met een 4% *stacking* gel (Tabel 1.6) gebruikt van 8 cm x 10 cm x 1 mm. N,N,N',N'-tetramethylethyleendiamine (TEMED: Biorad, Hercules, CA) zorgt voor de polymerisatiereactie tussen acrylamide (AA) en bisacrylamide (BAA), waardoor een soort raster wordt gevormd waartussen de proteïnen kunnen migreren onder invloed van de elektrische stroom. Van de stalen werd 20 µl op de gels geladen, waaraan 5 µl reducerende staalbuffer (RSB: Tabel 1.7) werd toegevoegd. *Purified* plasma VWF (pVWF) Haemate® (CSL Behring, King of Prussia, Pennsylvanië (PA)), werd meegenomen aan concentraties van 50, 125 en 250 µg/ml als ijk om de concentratie van mADAMTS13 te kunnen schatten. RSB bevat β-mercapto-ethanol (VWR) die zorgt voor het reduceren van de disulfidebruggen. SDS voorziet het proteïne van een lading die evenredig is met zijn lengte, waardoor proteïnen gescheiden kunnen worden op basis van hun grootte. Na het toevoegen van RSB aan de stalen werden deze vervolgens 5 min opgekookt en werden ze op de gel geladen samen met 5 µl ladder '*Prestained protein ladder broad range*' (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts (MA)), waarbij de tank gevuld werd met elektroforese buffer (EB: Tabel 1.8). De stalen migreerden door de *stacking* gel bij 20 mA. Eens de stalen zich in de *running* gel bevonden werd de stroom verhoogd tot 40 mA en werden de proteïnen gescheiden op basis van hun grootte. De proteïnen werden gekleurd door deze 1u te laten incuberen met Instant Blue (Westburg, Leusden, Nederland) en zacht te laten schudden. Tot slot werd de gel 1u nagespoeld met AD.

Tabel 1.6: Samenstelling van de SDS-PAGE gels

Gel	Samenstelling
7,5% *Running* gel	5 ml 0,75 M Tris-HCL pH 8,8 (Sigma Aldrich); 2,06 ml AD; 40 µl 25% SDS (Acros Organics); 2,44 ml 30% AA/BAA (Biorad, Hercules, CA); 0,5 ml 3% ammoniumpersulfaat (APS: Biorad); 5 µl TEMED
10% *Running* gel	5 ml 0,75 M Tris-HCl pH 8,8; 1,25 ml AD; 40 µl 25% SDS; 3,25 ml 30% AA/BAA; 0,5 ml APS; 5 µl TEMED
4% *Stacking* gel	2,5 ml 0,25 M Tris-HCl pH 6,8; 1,6 ml AD; 20 µl 25% SDS; 0,65 ml 30% AA/BAA; 250 µl APS; 2,5 µl TEMED

Tabel 1.7: Samenstelling RSB en NRSB voor het kleuren van proteïnen.

Staalbuffer	Samenstelling
NRSB	0,315 M Tris-HCl pH 6,8; 5% SDS; 50% glycerol; 0,1% bromofenol-blauw
RSB	0,315 M Tris-HCl pH 6,8; 5% SDS; 50% glycerol; 0,1% bromofenol-blauw; 5% β-mercapto-ethanol

Tabel 1.8: Samenstelling EB (pH 8,8 – 9)

1x EB (1 l)
3,03 g Tris
14,4 g glycine
1 g SDS

1.1.5 Immunisatie en serumscreening van ADAMTS13$^{-/-}$ muizen met mADAMTS13

Het opgezuiverde mADAMTS13 werd gebruikt om ADAMTS13$^{-/-}$ muizen mee te immuniseren. Hierbij werden de muizen vier keer volgens een vast protocol geïnjecteerd met 10 µg mADAMTS13 (Tabel 1.9).

Tabel 1.9: Immunisatieschema van ADAMTS13$^{-/-}$ muizen met mADAMTS13

Dag	Actie	Adjuvans (ratio antigen: ratio adjuvans)	Totaal volume	Toedieningswijze
1	1ste immunisatie	CFA (1:1)	200 – 250 µl	Subcutaan
14	2de immunisatie	IFA (1:1)	200 – 250 µl	Intraperitoneaal
21	Serumscreening 1			
56	3de immunisatie	\	200 – 250 µl	Intraperitoneaal
58	4de immunisatie	\	200 – 250 µl	Intraperitoneaal
59	Serumscreening 2			
60	Fusie			

Na de 2de en 4de immunisatie volgde een serumscreening om na te gaan of de titer de *cut-off* waarde van 10^{-5} bereikte. Vooraleer deze serumscreening uit te voeren, werd eerst de concentratie aan mADAMTS13 bepaald die nodig is voor een maximale *coating* van de ELISA. Hiervoor werd een 96-well plaat met mADAMTS13 (10 µg/ml) in een 1/2 uitverdunning gecoat, waarna het Ab polyklonaal konijn anti-mADAMTS13 (5 µg/ml) op de plaat werd gebracht. De toevoeging van GAR-HRP (1/10000) maakte het mogelijk om de mate van verzadiging met mADAMTS13 te visualiseren door het aanbrengen van ontwikkelingsbuffer (details: zie Bijlage 1).

Om de serumtiter te kunnen bepalen werd een 96-well plaat gecoat met mADAMTS13. De concentratie waarmee gecoat werd was afhankelijk van de opzuivering en werd telkens bepaald via ELISA (zie hierboven). Er werd een additionele 96-well plaat geblokkeerd met 3% gloria (2u, KT, 200 µl/well) om de verdunningen in te maken. Ondertussen werd via een retro-orbitale punctie 200 µl bloed afgenomen van de geïmmuniseerde muisjes en een controle muis (die niet geïmmuniseerd werd). Het bloed werd gedurende 1u op 37 °C geplaatst, waarna het 10 min gecentrifugeerd werd in een tafelcentrifuge 'Minispin Eppendorf' (VWR) aan 12100 g. Het serum werd afgenomen en overgebracht naar een nieuw epje. Om zoveel mogelijk bloedcellen uit het serum te verwijderen werd het serum nog eens 5 min gecentrifugeerd. Het serum werd nogmaals overgebracht naar een nieuw epje en werd op ijs geplaatst. In de niet-gecoate plaat werd in 200 µl een 1/10 verdunningsreeks gemaakt van de serumstalen. Hiervan werd 100 µl naar de gecoate plaat overgebracht. Vervolgens werd geit anti-muis-HRP (GAM-HRP: Jackson Immunoresearch) op de plaat gebracht om de door de muis geproduceerde Abs op te pikken (details: zie Bijlage 1). Na de kleurontwikkeling werd bepaald of de serumtiter de *cut-off* van 10^{-5} bereikte. De achtergrond werd bepaald op basis van de titer van de niet-geïmmuniseerde muis, waarbij de gemiddelde OD_{490nm} plus drie keer de standaarddeviatie (SD) als *baseline* gebruikt werd. De serumtiter

van de geïmmuniseerde muizen moest dus bij de 10^{-5} verdunning boven de *baseline* gelegen zijn.

1.1.6 Fusie

Wanneer een muis na de tweede serumscreening een titer boven de 10^{-5} had, werd overgegaan tot de fusie, waarbij de muis via een overdosis isofluraan (Nicholas Peramal limited, Mumbai, India) geëuthanaseerd werd. Daarna werd de milt uit de geïmmuniseerde muis verwijderd en via het protocol van Köhler en Milstein werden de miltcellen gefuseerd met SP2/0 myelomacellen (Köhler en Milstein, 1975). Doordat het hier om een gespecialiseerd protocol gaat, werd dit (enkel de fusie zelf) uitgevoerd door de laborante Pareyn I. Het principe van de fusie werd reeds besproken in de literatuurstudie (paragraaf 6, Literatuurstudie, Deel I).

1.1.7 Screening op positieve klones na fusie

De gefuseerde en uitverdeelde cellen werden twee weken na de fusie gescreend op hun antigen specificiteit voor mADAMTS13. Hiervoor werden twintig 96-well platen gecoat met mADAMTS13, waarbij de concentratie op voorhand bepaald werd aan de hand van een ELISA (zie eerder). Onder de laminaire *flow* werd 90 µl expressiemedium, waar mogelijks Abs gericht tegen mADAMTS13 in aanwezig zijn, naar de gecoate plaat overgebracht. De detectie gebeurde met het Ab GAM-HRP, om op die manier muis Abs, gericht tegen mADAMTS13, te kunnen oppikken. De ELISA platen konden vervolgens ontwikkeld en uitgelezen worden (details: zie Bijlage 1). De positieve klones werden geselecteerd en verder opgegroeid. De klones werden regelmatig via deze ELISA opnieuw gescreend om na te gaan of ze hun positiviteit niet verloren.

1.2 Ontwikkeling en bepaling functionaliteit van anti-humaan ADAMTS13 mAbs

1.2.1 Serumscreening na immunisatie met hADAMTS13

Bij aanvang van de masterproef was er reeds gestart met het immunisatieprotocol van Balb/C wildtype muizen met hADAMTS13. Alle verdere stappen werden in deze masterthesis uitgevoerd. Om te onderzoeken of de geïmmuniseerde muizen voldoende Abs produceerden tegen hADAMTS13, werd een serumscreening uitgevoerd. Deze verliep volledige analoog aan de serumscreening van de ADAMTS13$^{-/-}$ muizen die geïmmuniseerd werden met mADAMTS13 (paragraaf 1.1.5), uitgezonderd dat de 96-well plaat hier gecoat werd met het antigen hADAMTS13 dat verkregen werd van Baxter (Baxter, Deerfield, Illinois (IL)) in plaats van het zelf opgezuiverd mADAMTS13 (details: zie Bijlage 2). Na de kleurontwikkeling werd de plaat uitgelezen bij 490 nm, waarna de serumtiter bepaald werd om na te gaan of de muizen de titer van de *cut-off* van 10^{-5} haalde. Indien dit het geval was werd overgegaan op een fusie.

1.2.2 Screening op positieve klones na de fusie

Twee weken na de fusie werden de twintig 96-well cultuurplaten gescreend op de aanwezigheid van anti-hADAMTS13 Abs. In deze screening werd 90 µl van het supernatans van de cultuurplaten onder de laminaire *flow* overgezet naar ELISA platen die voordien gecoat werden met het hADAMTS13. Indien er tijdens de fusie hybridoma's gevormd werden die anti-hADAMTS13 mAbs produceren, dan zouden deze specifieke anti-hADAMTS13 mAbs in dit ELISA protocol binden aan hADAMTS13. De anti-hADAMTS13 mAbs werden gedetecteerd met GAM-HRP. Na de kleurontwikkeling konden de positieve hybridoma-cellijnen geïdentificeerd worden en werden deze verder opgegroeid. Deze geselecteerde hybridoma's werden geregeld opnieuw gescreend om na te gaan of deze hun productie van anti-hADAMTS13 mAbs niet verloren hadden.

1.2.3 Opgroeien van positieve hybridoma's voor de productie van anti-hADAMTS13 mAbs

De positieve hybridoma's werden opgegroeid in volledig DMEM medium (Tabel 1.10) en tegelijkertijd werden deze hybridoma's ook onderworpen aan een subklonering. Via een Bürkerkamertelling werden de cellen uitverdund aan één 1 cel per well, zodat een monoklonale hybridomacellijn bekomen kon worden. Het screenen op de positieve wells na de subklonering gebeurde volledig analoog aan de screening op positieve klones na de fusie (paragraaf 1.2.2). Tot 5 positieve wells per subklonering werden verder opgegroeid in volledig DMEM medium (Tabel 1.10). Hierbij werd de klone eerst overgebracht naar een 24-well plaat en vervolgens naar een 25 cm² cultuurfles door de cellen voorzichtig los te pipetteren. Eens de 25 cm² cultuurflessen volgroeid waren werden er celstocks van gemaakt.

De cellen werden voorzichtig losgeklopt en overgebracht naar een 15 ml falcon, die vervolgens gecentrifugeerd werd (5 min, 180 g, 37°C). De pellet werd geresuspendeerd in 1 ml van een gefiltersteriliseerde oplossing bestaande uit 90% *Hyclone Fetal Klone I* (FKI: Thermo Scientific, Erembodegem, België) en 10% dimethylsulfoxide (DMSO). De suspensie werd overgebracht naar een cryogeen epje (Fisher Bioblock Scientific), dat vervolgens naar een 'Mr Frosty' cryo-invriesapparaat (Fiers, Kuurne, België) werd overgebracht en op -80 °C werd geplaatst. De aanwezigheid van isopropanol in het cryo-apparaat zorgt voor een afkoeling van 1 °C per minuut. Later konden de celstocks overgebracht worden naar de vloeibare stikstof voor afkoeling tot -196 °C.

Aangezien de subklonering een tijdsconsumerend proces is en de mAbs ook op hun functionaliteit getest dienden te worden, werden de hybridoma's eveneens meteen in *celline* medium gekweekt (Tabel 1.10). Na enkele dagen incubatie (37 °C) werd het medium geoogst totdat in totaal 30 à 40 ml oogstmedium beschikbaar was voor de opzuivering van de mAbs. Om het celdebris uit het geoogste *celline* medium te verwijderen, werd het medium gedurende 12 min gecentrifugeerd bij 1730 g op 4 °C (Sigma 3-16PK, Fisher Bioblock Scientific).

Tabel 1.10: Overzicht van de groeimedia voor hybridomacellen en hun samenstelling

Medium	Samenstelling
Volledig DMEM medium	400 ml DMEM medium met Hepes (MP biomedicals, Brussel, België); 50 ml FKI, 15 ml NaH_2CO_3, 10 ml 2 mM L-Gln, 5 ml MEM *Non-Essential Amino Acid Solution*, 5 ml *Sodium pyruvate*, 0,2 ml 0,01% β-mercaptoethanol, 10 ml P/S en 10 ml HT-Supplement (Invitrogen)
***Celline* medium**	500 ml DMEM/F-12, 5 ml Penicilline/Streptomycine/Fungicide, 2,5 ml FBS, 5 ml *Insulin-Transferrin-Selenium* (ITS) (Invitrogen)

1.2.4 Opzuiveren van anti-hADAMTS13 mAbs via proteïne G Sepharose kolom

Het geoogste *celline* medium bevatte anti-hADAMTS13 mAbs die opgezuiverd werden met behulp van proteïne G *Sepharose* (Fisher Scientific Rockford, IL) affiniteitschromatografie. Proteïne G is een bacterieel proteïne afkomstig van *Streptococcus* en is covalent gebonden met *Sepharose.* Het proteïne bindt met de F_C regio van Ig's. De mAbs werden uit het oogstmedium opgezuiverd door dit medium eerst drie keer te verdunnen met kolombuffer (Tabel 1.11) en vervolgens te filteren met behulp van een bevochtigde Whatman™ filter. De proteïne G *Sepharose* kolom werd eerst geregenereerd met 100 ml kolombuffer vooraleer de mediumoplossing drie keer over de kolom werd gebracht. Na het laden werd de kolom gewassen met wasbuffer (Tabel 1.11) tot de OD_{280nm} lager was dan 0,1 (gemeten met de

'Biowave DNA' spectrofotometer (Biochrom, Cambridge, UK)). De mAbs konden vervolgens geëlueerd worden door het aanbrengen van een zure elutiebuffer op de kolom (Tabel 1.11). De zure pH maakte de elutie van de mAbs mogelijk doordat het de affiniteit tussen het proteïne G en de F_C regio van het Ig verbrak. Er werden twintig elutiefracties van ongeveer 1 ml opgevangen in Sarstedt-buizen, waarin op voorhand 50 µl neutralisatiebuffer (Tabel 1.11) werd gebracht om de zure pH onmiddellijk te neutraliseren. De OD_{280nm} van de verschillende fracties werd gemeten. De fracties waarin de mAbs aanwezig waren, werden gepoold en gedurende de nacht gedialyseerd tegen PBS (4 °C). De dag erop werd de concentratie aan mAbs bepaald via spectrofotometrische analyse bij 280 nm. De kolom werd uiteindelijk geregenereerd door achtereenvolgens kolombuffer en bewaarbuffer (Tabel 1.11) over de kolom te laten lopen.

Tabel 1.11: Samenstelling van de buffers voor de opzuivering van mAbs uit geoogst *celline* medium via proteïne G *Sepharose* kolom.

Buffer	Samenstelling
Kolombuffer	20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5
Wasbuffer	20 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; pH 7,5
Elutiebuffer	0,1 M glycine; pH 2,5
Neutralisatiebuffer	1 M Tris
Bewaarbuffer	20% ethanol in AD

1.2.5 SDS-PAGE van de opgezuiverde mAbs

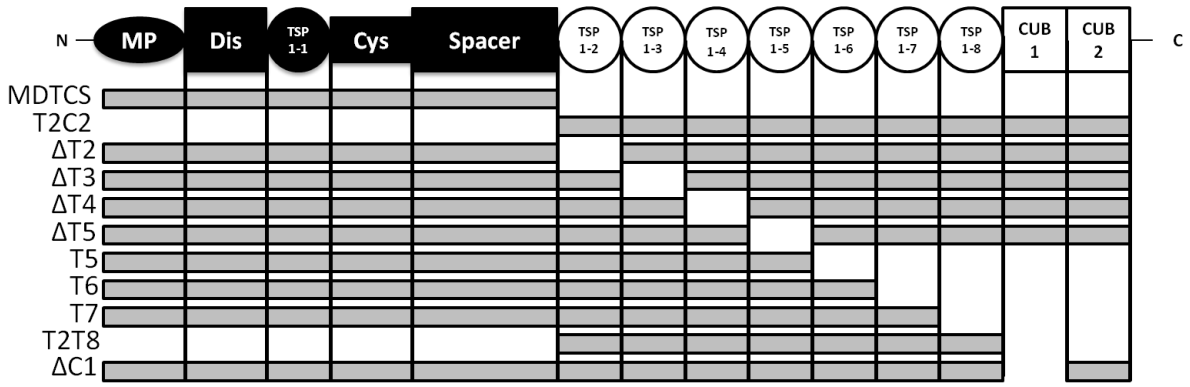
Na de opzuivering van de anti-hADAMTS13 mAbs, werd hun zuiverheid bepaald met behulp van SDS-PAGE en blauwkleuring. Dit gebeurde zowel onder reducerende als onder niet-reducerende condities. De mAbs werden hierbij verdund in PBS naar een concentratie van 2,5 µg/20 µl, waaraan 5 µl RSB of niet-reducerende staalbuffer (NRSB) werd toegevoegd (Tabel 1.7). Deze stalen werden gedurende 5 min opgekookt en werden vervolgens op de gel geladen. Voor de stalen die behandeld werden met RSB werd gebruikt gemaakt van een 4% *stacking* gel en een 10% *running* gel (Tabel 1.6), terwijl de stalen die behandeld werden met NRSB geladen werden op een gel bestaande uit een 4% *stacking* gel en 7,5% *running* gel (Tabel 1.6). Om de stalen door de *stacking* gel te laten migreren werd een stroom van 20 mA aangelegd. Daarna werd de stroom verhoogd tot 40 mA. De SDS-PAGE gels werden vervolgens gedurende 1u gekleurd met 20 ml Instant Blue. Voor ontwikkeling werden de gels nog 1u nagewassen met AD, waarna ze ingescand werden.

1.2.6 Epitoop mapping

Het is belangrijk om te bepalen tegen welk domein de ontwikkelde mAbs gericht zijn. Indien een mAb functioneel blijkt te zijn kan er op die manier een mogelijke link gelegd worden tussen het domein en zijn functionaliteit.

Om te bepalen tegen welk domein de mAbs gericht zijn werden eerst de kopmutant (MDTCS) en staartmutant (T2C2) van ADAMTS13, die beiden reeds ontwikkeld werden in het labo, gebruikt (Figuur 1.1). Zo kon een initiële indeling gemaakt worden tussen anti-MDTCS kopdomein mAbs en anti-staart mAbs. Hiervoor werden microtiterplaten gecoat met de ontwikkelde mAbs. Daarna werd ofwel de mutant MDTCS toegevoegd die daarna gedetecteerd kon worden met het gebiotinyleerd Ab 3H9-bio (gericht tegen het metalloprotease domein). Ofwel werd de T2C2 mutant toegevoegd die gedetecteerd kon worden door de Abs 17G2-bio en 19H4-bio. Na het toevoegen van streptavidine-POD kon overgegaan worden tot de kleurontwikkeling (meer details: zie Bijlage 2).

Via *in house* ontwikkelde staartmutanten werd het specifiek epitoop van de geïdentificeerde anti-staart mAbs bepaald. Hiervoor werden de anti-staart mAbs gecoat op 96-well platen. Daarna werden de verschillende mutanten T2C2, ΔT2, ΔT3, ΔT4, ΔT5, T5, T6, T7, T2T8 en ΔC1 (15 nM) op de platen gebracht en 1/2 uitverdund. De detectie gebeurde met het mAb 3H9-bio, waarna de platen vervolgens nog geïncubeerd werden met Streptavidine-POD en anti-V5-HRP voor tot de kleurontwikkeling werd overgegaan (meer details: zie Bijlage 2).



Figuur 1.1: Overzicht van de gebruikte mutanten voor het uitvoeren van de epitoop *mapping*. Door gebruik te maken van de MDTCS kopmutant en de T2C2 staartmutant kon een initiële indeling gemaakt worden tussen anti-MDTCS kopdomein mAbs en anti-staart mAbs. De staartmutanten ΔT2, ΔT3, ΔT4, ΔT5, T5, T6, T7, T2T8 en ΔC1, waarbij telkens een stuk van de staart gedeleteerd is, werden gebruikt om een specifieke epitoop *mapping* uit te voeren van de anti-staart mAbs.

1.2.7 Functionaliteitstesten van de anti-hADAMTS13 mAbs

De opgezuiverde mAbs werden in verschillende *assays* getest om hun invloed op de functionaliteit van hADAMTS13 te bepalen.

A. Anti-hADAMTS13 mAbs als coating

Om de relatieve coatingscapaciteit van de ontwikkelde mAbs te bepalen, werden de Abs in een 1/2 verdunningsreeks gecoat op 96-well platen, startende van 10 µg/ml. Als positieve controle en referentie werd het reeds ontwikkelde 5C11 mAb meegenomen, dat gericht is tegen de staart (het TSP1-2 domein) van hADAMTS13. De mAbs werden vervolgens geïncubeerd met hADAMTS13, waarna het gebonden hADAMTS13 gedetecteerd werd met 19H4-bio en 17G2-bio (gericht tegen het TSP1-8 domein en het CUB2 domein respectievelijk). Beide *in house* ontwikkelde gebiotinyleerde mAbs werden ten slotte geïncubeerd met streptavidine-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Duitsland) zodat kleurontwikkeling mogelijk was (details: zie Bijlage 2).

B. Anti-hADAMTS13 gebiotinyleerde mAbs als detectie

De mAbs kunnen enerzijds gebruikt worden als coating, maar anderzijds kunnen deze mAbs ook gebruikt worden om hADAMTS13 te detecteren. Om na te gaan of deze opgezuiverde anti-hADAMTS13 mAbs gebruikt kunnen worden als detectie Ab, werden deze eerst gebiotinyleerd. Hiervoor werd een 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin oplossing (Thermo Scientific) gemaakt. Per 2 mg Ab werd 80 µl van de 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin oplossing toegevoegd. Dit mengsel werd vervolgens gedurende 2u in het donker op ijs in een koude kamer op 4 °C geplaatst. De oplossingen werden daarna overgebracht in een dialyse-membraan en gedurende de nacht op 4 °C gedialyseerd tegen PBS.

De potentie van deze gebiotinyleerde mAbs als detectie Ab werd via ELISA bepaald. De 96-well platen werden gecoat met het mAb 5C11, waarna hADAMTS13 uit expressiemedium gevangen kon worden. Vervolgens werden de 96-well platen geïncubeerd met de verschillende gebiotinyleerde mAbs. Er werd gestart van een 10 µg/ml concentratie die 1/2 uitverdund werd. Het Ab 17G2-bio werd meegenomen als controle en referentie. Door het toevoegen van streptavidine-POD kon de detectie met de gebiotinyleerde mAbs gevisualiseerd worden (details: zie Bijlage 2).

C. BindingsELISA van hADAMTS13 aan rechtstreeks gecoat *purified* VWF

Doordat pVWF Haemate® rechtstreeks gecoat wordt, wordt pVWF ontvouwen (Majerus *et al.*, 2005). Wanneer vervolgens hADAMTS13 aan deze *assay* toegevoegd wordt, bindt het aan het ontvouwen pVWF. Deze interactie kan echter gemodificeerd worden door het toevoegen van anti-hADAMTS13 mAbs. Om te bestuderen of de geproduceerde mAbs in staat zijn om

deze interactie te modificeren, werden bindingsELISA's met rechtstreeks gecoat pVWF uitgevoerd.

Hierbij werden 96-well platen gecoat met pVWF. Er werd eveneens een niet-gecoate plaat gedurende de nacht geblokkeerd met 3% gloria in PBS (4 °C). De volgende dag werd de gecoate plaat gedurende 2u geblokkeerd met 3% gloria (KT). Op het ogenblik dat de gecoate plaat 1u geblokkeerd was, werden in de niet-gecoate platen de anti-hADAMTS13 mAbs verdund in 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7,8 in 0,3% melkoplossing tot een concentratie van 20 µg/ml (finaal 10 µg/ml) en werden 1/2 uitverdund. Vervolgens werd opgezuiverd recombinant hADAMTS13 toegevoegd (finaal 3 µg/ml). Deze 96-well plaat werd 30 min op 37 °C geplaatst, zodat de Abs de kans kregen om met hADAMTS13 te interageren. Na de incubatie van 30 minuten, werd 100 µl van elke well van de niet-gecoate plaat waarin de verdunningen aanwezig waren overgebracht naar de gecoate plaat (2u, KT). De detectie gebeurde met de Abs 5C11-bio, 17G2-bio en 19H4-bio. Om de kleurontwikkeling mogelijk te maken werden de platen eerst nog geïncubeerd met streptavidine-POD. Na 20 min kleurontwikkeling werd de kleurreactie stopgezet (meer details: zie Bijlage 2).

D. BindingsELISA van hADAMTS13 aan gevangen pVWF

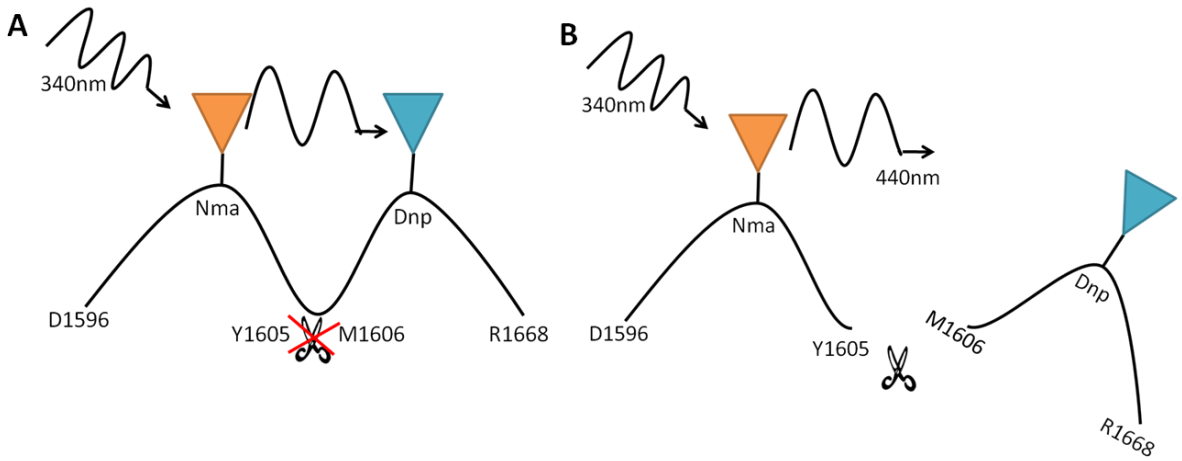
De bindingsELISA kan ook uitgevoerd worden door het hADAMTS13 dat geïncubeerd wordt met de mAbs te laten interageren met gevangen VWF. Op die manier kan achterhaald worden of er interacties plaatsvinden tussen hADAMTS13 en gevouwen VWF en in welke mate deze interactie door de aanwezigheid van de mAbs beïnvloed wordt.

Om pVWF te vangen werden microtiterplaten gecoat met het Ab 6D1 (gericht tegen het VWF A1 domein). Deze werden vervolgens geblokkeerd met 2% *Bovine Serum Albumin* (BSA: Sigma Aldrich) en 1% muisserum in PBS Tw20 0,1% (1u, 37°C). Ook niet gecoate platen werden op dezelfde manier geblokkeerd. De met 6D1 gecoate platen werden vervolgens geïncubeerd met pVWF (90 min, 37°C). Ondertussen werden de mAbs geïncubeerd met recombinant hADAMTS13. De verdunningen werden gemaakt in 20mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH 7,8 in 0,2% BSA en 1% muisserum. De mAbs werden toegevoegd aan een concentratie van 20 µg/ml (finaal 10 µg/ml) die 1/2 uitverdund werden. Vervolgens werd het recombinant hADAMTS13 eraan toegevoegd in een concentratie van 6 µg/ml (finaal 3 µg/ml). Dit werd gedurende 30 min gepreïncubeerd voor het naar de platen met gevangen pVWF werd overgebracht (2u, KT). Hierna volgde de detectie met 5C11-bio, 17G2-bio en 19H4-bio, waarna nog streptavidine-POD op de plaat werd aangebracht om de kleurontwikkeling mogelijk te maken (meer details: zie Bijlage 2).

E. FRETS-VWF73

De *Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) techniek werd aangewend om de invloed van de mAbs op de activiteit van ADAMTS13 in *Normal Human Plasma* (NHP) te

bestuderen. Hiervoor werd het fluorogeen substraat FRETS-VWF73 door de onderzoeks-groep van Kokame ontwikkeld (Kokame *et al.*, 2005). Dit FRETS-VWF73 bestaat uit de kortste regio van VWF dat als specifiek substraat voor hADAMTS13 kan dienen. Deze regio bestaat uit 73 AZ van D^{1596} tot R^{1668} in het A2 domein van VWF (Figuur 1.2). Het AZ Q^{1599} werd omgezet naar een 2,3-diaminopropionis residu (A2pr) en werd gemodificeerd met een 2-(N-methylamino)benzoylgroep (Nma). Het AZ N^{1610} werd eveneens omgezet tot een A2pr en gemodificeerd met een 2,4-dinitrofenylgroep (Dnp). De Nma groep wordt normaal geëxciteerd bij 340 nm, maar als het FRETS-VWF73 niet geknipt wordt door ADAMTS13, wordt de uitgezonden energie van Nma *gequenched* door Dnp. Als ADAMTS13 FRETS-VWF73 wel knipt bewegen de *quencher* en de fluorofoor van elkaar weg, waardoor de *quenching* niet kan optreden en de energie van Nma wordt uitgezonden bij 440 nm. Het is deze fluorescentie die tijdens de FRETS-VWF73 *assay* gemeten wordt.



Figuur 1.2: De werking van FRETS-VWF73. (A) Nma wordt geëxciteerd door licht bij 340 nm. Indien VWF nog niet geknipt werd door ADAMTS13 wordt de uitgezonden energie van de Nma groep *gequenched* door de Dnp groep en wordt geen fluorescentie gedetecteerd. (B) Als ADAMTS13 VWF knipt, wordt de uitgezonden energie van de Nma groep niet meer ge*quenched* door de Dnp groep en wordt fluorescentie bij 440 nm waargenomen.

Deze *assay* werd uitgevoerd uitgevoerd in een witte 96-well '*Luminescence Immuno Assay*' plaat (Greiner Bio-One BVBA/SPRL). Hiervoor werden de benodigde wells eerst gedurende 15 min bij KT geblokkeerd met 300 µl BSA (1 mg/ml) in 1x HBS (Tabel 1.5) buffer. Hierna werden de wells 3 keer gewassen met 300 µl 1x HBS buffer zodat het reactiemengsel met FRETS-VWF73 in de wells toegevoegd kon worden. Hiervoor werd 6 µl NHP, 20 µl 10x HBS buffer en 4 µl BSA (50 mg/ml) samengevoegd met het mAb naar keuze (aan 10 µg/ml). Als ijk werd in elk experiment ook 1 µl, 3 µl en 6 µl NHP, in afwezigheid van mAbs, meegenomen. Het volume werd vervolgens aangevuld met AD tot 196 µl, waarna als laatste 4 µl van het substraat FRETS-VWF73 (Peptides International Inc, Louisville, Kentucky (KY)) toegevoegd werd. Dit werd dan zo snel mogelijk in de ELISA*reader* geplaatst en uitgelezen met behulp van de software FLUOSTAR, waarbij 30 cycli doorlopen werden van 150 seconden (37 °C).

1.3 Klonering hSpacerC2 in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector

1.3.1 Amplificatie van het hSpacerC2 gen

Het DNA fragment dat codeert voor de hSpacerC2 mutant van ADAMTS13 werd via een *polymerase chain reaction* (PCR) uit de pcDNA4/TO vector dat het *hADAMTS13* gen bevat (hADAMTS13-pcDNA4/TO, aanwezig in het labo), geamplificeerd. Het hSpacerC2 fragment bestaat uit het spacer domein, de 7 C-terminale TSP1 *repeats* en de 2 CUB domeinen. De amplificatie (30 cycli: denaturatie 98 °C, 15 s; *annealing* 64 °C, 30 s; extentie 72 °C, 90 s) werd uitgevoerd met behulp van de zelf opgestelde primers Spacer-CUB2 FW (*forward* primer) en Spacer-CUB2 RV (*reverse* primer) (Tabel 1.14) (Isogen Life Science) en het *Phusion* DNA polymerase (New England Biolabs). De amplificatie werd vervolgens via agarose gelelektroforese beoordeeld. Het PCR fragment werd hierbij samen met 6x *loading dye* (Tabel 1.12) op een 1% ultrapure agarosegel (Invitrogen) met Gelgreen™ (Biotium, Hayward, CA) (1/10000) geladen in 0,5% TBE (Tabel 1.13) buffer. Het PCR fragment werd gevisualiseerd met de Safe Imager™ (Invitrogen) en kon vervolgens uit de gel gesneden worden. Het DNA werd uit de gel geëxtraheerd met behulp van de NucleoSpin® en PCR *Clean-up* kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Duitsland). In deze kit werd 200 µl NTE buffer per 100 mg uitgesneden agarosegel toegevoegd en in een warmwaterbad (50 °C, 10 min) geplaatst totdat de agarosegel volledig opgelost was. De oplossing werd overgebracht naar een *NucleoSpin Column* en werd gecentrifugeerd (30 s, 12100 g), zodat het DNA gebonden werd op het membraan. Al het overbodige materiaal werd weggewassen door twee keer 700 µl NT3 buffer op de kolom te brengen en te centrifugeren (30 s, 12100 g). Om te zorgen dat al de ethanol verwijderd werd (afkomstig van de NT3 buffer), werd een additionele minuut gecentrifugeerd (12100 g). Tot slot kon overgegaan worden tot de elutie van het DNA door 20 µl NE buffer op de kolom te brengen, dit 1 min te laten incuberen en uiteindelijk te centrifugeren (60 s, 12100 g).

Tabel 1.12: Samenstelling 6x *loading dye*

6x *loading dye*
40% sucrose
0,25% bromofenolblauw
MQ

Tabel 1.13: Samenstelling 10x TBE buffer

10x TBE (1l)
107,5 g Tris
55 g H_3BO_3
7,4 g Na_2 EDTA

1.3.2 Ligatie en transformatie

Het hSpacerC2 PCR fragment kon enkel in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector (Invitrogen) gekloneerd worden als het een 3' A-overhang bevatte. Aangezien dit niet het geval was bij het hSpacerC2 PCR fragment, werd dit eerst uitgevoerd door 25 µl van het opgezuiverde PCR product samen te voegen met 3,5 µl 10x reactiebuffer (Rxn), 1 µl 10 mM dNTP, 0,9 µl 50 mM $MgCl_2$, 4,1 µl MQ en 0,5 µl Platinum Taq polymerase (Invitrogen) (8 min, 70 °C). Na deze stap werden alle overbodige componenten weggewassen met behulp van de PCR *clean-up* kit. Hierbij werd het volume eerst aangepast tot 50 µl door het toevoegen van MilliQ (MQ). Hieraan werd 200 µl NTI buffer toegevoegd en dit geheel werd overgebracht naar een *NucleoSpinColumn*. Dit werd gecentrifugeerd (30 s, 12100 g), waarna de kolom gewassen werd met 700 µl NT3 buffer door centrifugatie (30 s, 12100 g). Alle ethanol werd verwijderd door een additionele minuut te centrifugeren (12100 g). Tot slot kon overgegaan worden tot de elutie van het DNA door 20 µl NE buffer op de kolom te brengen, dit 1 min te laten incuberen en uiteindelijk te centrifugeren (60 s, 12100 g). Voor het fragment in de vector werd geligeerd werd de concentratie van het PCR fragment (met 3' A-overhangen) eerst geschat op een 1% ultrapure agarosegel met Gelgreen™ (1/10000). Na schatting werd het PCR fragment (met 3' A-overhangen) in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector geligeerd met behulp van de bijhorende kit (Invitrogen). Hiervoor werd 0,5 µl van het hSpacerC2 PCR product samengevoegd met 1 µl zoutoplossing, 1 µl vectoroplossing en 2,5 µl MQ. Dit reactiemengsel werd gedurende 15 min op KT geplaatst en vervolgens op ijs. Daarna werd een transformatie naar *E. coli* TOP10 chemisch competente cellen (Invitrogen) uitgevoerd.

Voor de transformatie werden de chemisch competente *E. coli* cellen eerst gedurende 10 min ontdooid op ijs, waarna 2 µl van het ligatiemengsel toegevoegd werd. Deze cellen werden onmiddellijk terug op ijs geplaatst voor 30 min, waarna de cellen onderworpen werden aan een *heatshock* (30 s op 42 °C) zodat de chemisch competente cellen de vector opnamen. Na 2 min op ijs werd 250 µl '*Super Optimal broth with Catabolite repression*' medium (SOC: Invitrogen) aan de cellen toegevoegd en werden ze gedurende 1u geschud bij 37 °C (250 rpm). De vector bevat naast het *hSpacerC2* gen ook een ampicilline-resistentiegen, wat de getransformeerde *E. coli* cellen resistent maakt voor ampicilline. Na de incubatie werden de cellen bijgevolg uitgeplaat op Luria Agar (Sigma Aldrich) platen die ampicilline bevatten (50 µg/ml). Na de incubatie (gedurende de nacht, 37 °C) werden enkele kolonies van de agarplaten opgepikt en geënt in 3 ml Luria *Broth* medium (LB: Invitrogen) met ampicilline (ampicilline). De bacteriën werden gedurende de nacht al schuddend opgegroeid (250 rpm, 37 °C), zodat de dag erop een grote hoeveelheid aan vector bekomen kon worden via miniprep (paragraaf 1.3.3).

1.3.3 Miniprep

Het vector DNA werd met behulp van de Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen Benelux BV, Venlo, Nederland) uit de bacteriën geëxtraheerd. De bacteriën die gedurende de nacht geïncubeerd werden (paragraaf 1.3.2), werden geoogst door centrifugatie bij 3076 g (10 min, 21 °C). De gevormde pellet werd geresuspendeerd in 250 µl P1 buffer en overgebracht naar een epje. Om de bacteriën te lyseren werd vervolgens 250 µl P2 buffer toegevoegd, waarmee ze 5 min geïncubeerd werden op KT. Om de lysisreactie te stoppen werd 350 µl N3 buffer toegevoegd. Het celdebris werd vervolgens neergeslagen door centrifugatie (12100 g, 5 min). Het supernatans dat het vector DNA bevat, werd overgebracht naar een Qiaprep Spin Column en gecentrifugeerd (12100 g, 60 s), waardoor het vector DNA gebonden werd aan de kolom. Het overtollige materiaal werd vervolgens weggewassen door 500 µl PB en 750 µl PE wasbuffer over de kolom te laten lopen (12100 g, 60 s), waarbij respectievelijk de endonucleasen en hoge zout condities verwijderd werden. Om alle ethanol van de wasbuffer te verwijderen werd nog een additionele minuut gecentrifugeerd (12100 g). Het DNA kon uiteindelijk geëlueerd worden door 50 µl EB op de kolom te brengen, dit 3 min te laten inwerken en 1 min te centrifugeren bij 12100 g. Tot slot werd de concentratie van het opgezuiverde vector DNA via een 1/35 verdunning bepaald bij 260 nm met behulp van een spectrofotometer.

1.3.4 Controle aanwezigheid en richting van het hSpacerC2 gen in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector

Na de klonering en opzuivering van het vector DNA uit verschillende (getransformeerde) kolonies, werd onderzocht bij welke kolonies het hSpacerC2 fragment aanwezig was. Hiervoor werd de PCR reactie gebruikt die oorspronkelijk uitgevoerd werd om het hSpacerC2 fragment uit de hADAMTS13-pcDNA4/TO vector te amplificeren (paragraaf 1.3.1). De aanwezigheid van het *hSpacerC2* gen werd na PCR bevestigd met behulp van agarose gelelektroforese (1% ultrapure agarosegel met Gelgreen™ (1/10000)).

Naast de aanwezigheid van het *hSpacerC2* gen, moest vervolgens ook bepaald worden in welke richting het *hSpacerC2* gen geligeerd werd in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector. Dit valt te verklaren doordat de vector langs beide zijden een 5’ T-overhang heeft en het hSpacerC2 fragment aan beide zijden een 3’ A-overhang heeft. Daardoor is het mogelijk dat het fragment in twee richtingen in de vector geligeerd werd. Om dit te verduidelijken werd na de miniprep opnieuw een PCR uitgevoerd met het *Phusion* DNA polymerase (30 cycli: denaturatie 98 °C, 15 s; *annealing* 55 °C, 30 s; extentie 72 °C, 30 s), maar met andere primers, nl. de primers C1-C2 FOR en BGH REV, die respectievelijk zullen aanhechten ter hoogte van het CUB1 domein en de BGH *reverse priming site* (Tabel 1.14) die reeds beschikbaar waren in het labo. De vectoren waarin (na controle op een 1,5% ultrapure agarosegel met Gelgreen™ (1/10000)), het fragment in de correcte richting zat, werden

samen met de BGH-REV primer (Tabel 1.14) opgestuurd voor sequentiebepaling. Zo kon de overgang van het *hSpacerC2* gen met de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector (hSpacerC2-TOPO vector) gecontroleerd worden (GATC Biotech, Konstanz, Duitsland).

1.3.5 Megaprep

Het vector DNA van één kolonie waarvan de overgang van het *hSpacerC2* gen met de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector correct was, werd uitgekozen om een megaprep op uit te voeren. Op deze wijze werd een grote hoeveelheid van deze vector bekomen die nodig is voor de hydrodynamische injectie (HI) van C57BL/6J $VWF^{+/+}$ muizen (paragraaf 1.3.7) en de transfectie van Flp-In *Chinese Hamster Ovaria* (CHO) cellen (paragraaf 1.3.8). Hiervoor werd een nieuwe transformatie uitgevoerd met het vector DNA (paragraaf 1.3.2). Van deze transformatie werd opnieuw een kolonie geënt die al schuddend in LB medium met ampicilline (50 µg/ml) opgegroeid werd (37 °C, 8u, 250 rpm). Hiervan werd 500 µl overgebracht naar 500 ml LB medium met ampicilline (50 µg/ml) die gedurende de nacht al schuddend werden opgegroeid bij 37 °C. De extractie van het vector DNA gebeurde met behulp van de *EndoFree® Plasmid Mega and Giga kit* (Qiagen). De cultuur die gedurende de nacht werd geïncubeerde werd overgebracht naar Sorvaltubes en werd gedurende 15 min gecentrifugeerd bij 6000 g (4 °C) met de Sorvall RC6+ centrifuge (Fisher Scientific). De pellets werden geresuspendeerd in 50 ml P1 buffer, waarna ze gelyseerd werden door het toevoegen van 50 ml P2 buffer. De lysisreactie werd na 5 min stopgezet door 50 ml P3 buffer toe te voegen en de tubes een aantal keer te inverteren. Het lysaat werd vervolgens op een QIAfilter *Cartridge* overgebracht, die op een geautoclaveerde Duranfles bevestigd werd en 10 min geïncubeerd werd bij KT. Daarna werd de vloeistof door de filter gezogen met behulp van een vacuümpomp (Fisher Scientific). Het lysaat werd vervolgens nog eens nagespoeld met 50 ml FWB2. Aan de doorloop werd 12,5 ml ER buffer toegevoegd om te verhinderen dat de endotoxines die tijdens de lysisreactie vrijkwamen aan de hars van de QIAGEN-tip 2500 zouden binden. Na een goede menging werd alles 30 min op ijs geïncubeerd. Ondertussen werd een QIAGEN-tip 2500 geëquilibreerd met 35 ml QBT buffer. Vervolgens werd het gefilterde lysaat op de kolom gebracht. De QIAGEN-tip 2500 werd nog nagespoeld met 200 ml QC buffer en het DNA werd geëlueerd met 35 ml QN buffer en verdeeld over twee 50 ml falcontubes. Per falcon werd nog 12,25 ml isopropanol toegevoegd, waarna de oplossing 1u gecentrifugeerd werd op 3893 g (4 °C). Het supernatans werd vervolgens verwijderd en er werd 3,5 ml endotoxine vrij 70% ethanol toegevoegd per falcon. Opnieuw werd de oplossing gedurende 1u gecentrifugeerd op 3893 g (4 °C). Met behulp van een pipet werd de ethanol verwijderd en de resterende hoeveelheid ethanol werd verdampt door de pellet gedurende 1u op KT te plaatsen. Tot slot werd nog 0,5 ml TE (Tris EDTA) buffer toegevoegd, waardoor de pellet kon oplossen door deze gedurende de nacht op een schudder te plaatsen. De volgende dag werd de concentratie van het opgezuiverde DNA

bepaald door de absorbantie bij 260 nm te meten van een 1/100 verdunning van het DNA in MQ.

1.3.6 Sequentiebepaling

De geëlueerde vector van de megaprep werd samen met negen primers (T7 promotor, He4R, He1F, 6548F, 6506R, He2F, He3R, 6753F, BGH REV) opgestuurd voor een volledige sequentiebepaling van het *hSpacerC2* gen (Tabel 1.14) (GATC Biotech). Hierdoor kon de volledige sequentie gecontroleerd worden op eventuele mutaties.

Tabel 1.14: Overzicht van de gebruikte primers tijdens de klonering van het *hSpacerC2* gen in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector.

Primer naam	Sequentie 5'➔ 3'	*Forward/ Reverse*	Tm (°C)	GC (%)	Domein
Spacer-CUB2 FW	AGCCCACGGAAGGGCTCTTTCACAG	*Forward*	68	60	Spacer domein
Spacer-CUB RV	GGTTCCTTCCTTTCCCTTCCAGGAC	*Reverse*	66	56	CUB2
C1-C2 FOR	TGTGGCAAGCAGCACCTTGAGCCA	*Forward*	57	63	CUB1
BGH-REV	TAGAAGGCACAGTCGAGGC	*Reverse*	70	57	BGH *priming site*
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	*Forward*	47	40	T7 promotor
He4R	GGGGGCAATGTCTTCAGGAGG	*Reverse*	75	61	TSP1-3
He1F	AAACCTGCAACCCCCAGCCCT	*Forward*	75	61	TSP1-4
6548F	AGGAAGAGCTGTGTGGCCTG	*Forward*	72	60	TSP1-5
6506R	CAGGGCTCCAGCTGCAGGC	*Reverse*	79	75	TSP1-6
He2F	TGTTTCCTGTGGGGATGGCAT	*Forward*	71	52	TSP1-8
He3R	CATGTCAATGGTTCCTGTTGG	*Reverse*	69	47	TSP1-8-CUB1
6753F	GACATGTTGCTGCTTTGGGGC	*Forward*	73	57	CUB1

1.3.7 HI van de hSpacerC2-TOPO vector in VWF$^{+/+}$ muizen

De snelste methode om na te gaan of het hSpacerC2 construct, afkomstig van de hSpacerC2-TOPO vector, tot expressie komt, is door deze vector hydrodynamisch te

injecteren. De aanwezigheid van het hSpacerC2 construct op verschillende tijdstippen na injectie kan uiteindelijk nagegaan worden met behulp van ELISA.

Er werden zes C57BL/6J $VWF^{+/+}$ muizen hydrodynamisch geïnjecteerd met de hSpacerC2-TOPO vector om te controleren of het hSpacerC2 construct al dan niet tot expressie kwam. Hiervoor werd 50 µg vector in fysiologisch water (0,9% NaCl in *ultrapure* water: Acros Organics) per muis geïnjecteerd. Bloed werd 1, 4 en 7 dagen na de HI afgenomen (200 µl) op 40 µl 3,8% citraat (Acros Organics). Het plasma werd geïsoleerd door het bloed 6 min te centrifugeren bij 4300 g. Het plasma werd overgebracht naar een nieuw epje en werd opnieuw gecentrifugeerd (3 min, 4300 g). Het plasma werd vervolgens in een nieuw epje gebracht en ingevroren op -20 °C.

De plasmastalen werden getest in ELISA op de aanwezigheid van de hSpacerC2 mutant van ADAMTS13. Hierbij werd een 96-well plaat gecoat met het Ab 5C11 (gericht tegen TSP1-2) of met het Ab anti-V5 (gericht tegen V5-tag, aanwezig door de vector). De plasmastalen werden aangebracht in een 1/10 verdunning die 1,5 over 2,5 werden uitverdund. Als negatieve controle werd NMP van niet-geïnjecteerde $VWF^{+/+}$ muizen meegenomen en als positieve controle NHP (15 V%) of recombinant hADAMTS13 (3 µg/ml). De detectie van het hSpacerC2 of ADAMTS13 gebeurde door het toevoegen van de mAbs 19H4-bio en 17G2-bio. Door het toevoegen van streptavidine-POD kon de expressie gevisualiseerd worden (details: zie Bijlage 3).

1.3.8 Transfectie in Flp-In CHO cellen

De hSpacerC2-TOPO vector werd ook getransfecteerd in Flp-In CHO cellen die de pFRT/*lac*Zeo vector (Invitrogen) bevatten. Op deze wijze kan een stabiele Flp-In CHO cellijn ontwikkeld worden die constant de hSpacerC2 mutant van ADAMTS13 tot expressie brengt.

Voor deze transfectie werden Flp-in CHO cellen uit de vloeibare stikstof gehaald en ontdooid op 37 °C. Deze cellen werden overgebracht naar een 75 cm² cultuurfles, waaraan HAMF12 nutriënt mix groeimedium (Tabel 1.15) werd toegevoegd. De cellen werden vervolgens 2u in de incubator geplaatst op 37 °C, waarna het medium ververst werd. De dag erop werd het medium vervangen door groeimedium met zeocine (100 µg/ml) om de cellen te selecteren die de pFRT/*lac*Zeo vector bevatten. De dag voor de transfectie werden de cellen gewassen met PBS en losgemaakt door ze 5 min bij KT te incuberen met trypsine. Hieraan werd groeimedium toegevoegd om de trypsinisatiereactie te stoppen. Het medium werd vervolgens overgebracht naar een 15 ml falcon en gecentrifugeerd (180 g, 37 °C, 5 min). Het supernatans werd verwijderd en de pellet werd geresuspendeerd in 10 ml groeimedium met zeocine. Via een Bürkerkamertelling werden 1.10^6 cellen overgebracht naar een 25 cm² cultuurfles, die op 37 °C werd geplaatst. De volgende dag werd in een 24-well plaat het reactiemengsel voor de transfectie gemaakt. Hierbij werd 1 µg van de hSpacerC2-TOPO

vector en 9 µg van de pOG44 vector (Invitrogen) samengevoegd met 12 µl fugene (Roche Diagnostics). Het volume werd met optimem (Invitrogen) aangevuld tot 300 µl en werd gedurende 15 min op KT geplaatst. Ondertussen werden de Flp-In CHO cellen gewassen met warme optimem (37 °C) en werd er 3 ml verse optimem op de cellen aangebracht. Na de incubatie werd het reactiemengsel toegevoegd aan de cellen, waarna ze op 37 °C werden geplaatst. Om te kunnen controleren of de transfectie gelukt was, werd enerzijds een positieve controle vector pSecTag/FRT/V5-His/PSA (Invitrogen), die het prostaat specifieke antigen (PSA) tot expressie brengt, en anderzijds een negatieve controle, waarbij enkel fugene werd toegevoegd, meegenomen. Fugene bestaat uit positief geladen lipiden, die elektrostatisch interageren met het negatief geladen vector DNA. Wanneer fugene bij de cellen wordt gevoegd, treedt lipofectie op. Dit betekent dat de lipiden, waarin het vector DNA mogelijks aanwezig is, fuseren met het plasma membraan van de cel of ze dringen de cel binnen via endocytose. Op die manier kan het vector DNA de cel binnengebracht worden (Jacobsen *et al.*, 2004). De pOG44 vector brengt het Flp recombinase tot expressie, wat zorgt voor homologe recombinatie tussen de hSpacerC2-TOPO vector en de pFRT/*lac*Zeo vector, waardoor het *hSpacerC2* gen, samen met een hygromycineresistentie gen geïntegreerd kan worden in de Flp-In CHO gastheer cellijn.

De volgende dag werd het medium ververst naar groeimedium zonder zeocine. Na 24u werden de cellen gesplitst om de selectie zo goed mogelijk te laten doorgaan. Hierbij werd het medium afgenomen en werden de celllen gewassen met PBS, waarna ze werden losgemaakt met behulp van trypsine. De reactie werd gestopt door groeimedium toe te voegen. De cellen werden opnieuw gecentrifugeerd, geresuspendeerd met 4 ml selectie-medium met hygromycine (700 µg/ml: Tabel 1.15) en uitgesplitst tot een confluentie van minder dan 25%. De cellen werden terug op 37 °C geplaatst, waarbij het medium om de 3 à 4 dagen ververst werd tot de getransfecteerde cellen volgroeid waren. Eens de cellen volgroeid waren werd het medium vervangen door serumvrij expressiemedium (Tabel 1.15). Na enkele dagen incubatie werd het medium afgenomen en getest in ELISA. Hiervoor werd een microtiterplaat gecoat met het mAb 5C11, waarna vervolgens het expressiemedium op de plaat werd aangebracht. De detectie gebeurde met de mAbs 17G2-bio en 19H4-bio. Voor tot de kleurontwikkeling kon worden overgegaan werd eerst nog Streptavidine-POD toegevoegd (meer details: zie Bijlage 3).

Tabel 1.15: Gebruikte media voor het opgroeien van Flp-In CHO cellen.

Medium	Samenstelling
Groeimedium zonder Zeocine	500 ml HamF12 Nut mix (Invitrogen); 50 ml FBS; 5 ml 2 mM L-Gln; 5 ml P/S
Groeimedium met Zeocine	500 ml HamF12 Nut mix; 50 ml FBS; 5 ml 2 mM L-Gln; 5 ml P/S; 100 µg/ml Zeocine
Selectiemedium	500 ml HamF12 Nut mix; 50 ml FBS; 5 ml 2 mM L-Gln; 5 ml P/S; 700 µg/ml Hygromycine (Invitrogen)
Expressiemedium	500 ml Freestyle CHO (Invitrogen)

1.4 Statistische analyses

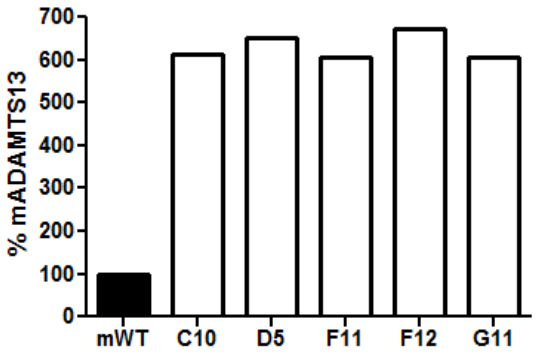
De statistische verwerking van alle data gebeurde aan de hand van het software programma Graphpad Prism 5.

2. Resultaten

2.1 Optimalisatie van de productie en opzuivering van mADAMTS13 voor de immunisatie van ADAMTS13$^{-/-}$ muizen

In het onderzoek naar de rol van de staart van ADAMTS13 is het niet alleen belangrijk om deze rol via *in vitro* experimenten (paragraaf 2.2) te bestuderen, maar ook via *in vivo* experimenten. Daar alle anti-hADAMTS13 Abs ontwikkeld in onze groep niet kruisreageren met mADAMTS13 (niet gepubliceerde resultaten), is het van groot belang om functionele anti-mADAMTS13 mAbs te ontwikkelen. In het labo werd voorheen nog maar één (niet functioneel) anti-mADAMTS13 mAb ontwikkeld, nl. 20A10 (gericht tegen het cysteïne/spacer domein) (De Maeyer, 2011), wat in groot contrast is met de drieëndertig anti-hADAMTS13 mAbs die reeds ontwikkeld werden (Feys, 2006; Feys *et al.*, 2009; Feys *et al.*, 2010). Één van de redenen hiervoor is de heel lage expressie van *full-length* mADAMTS13 door de HEK T-REx cellijn, waarin de vector met mADAMTS13 eerder getransfecteerd werd. Door deze lage expressie levels ligt het rendement van de opzuivering van mADAMTS13 heel laag en wordt een vrij onzuiver staal bekomen.

Dit probleem werd tijdens deze masterthesis echter opgelost door de HEK T-REx cellen, die mADAMTS13 tot expressie brengen, te subkloneren in een 96-well cultuurplaat aan 15 en 5 cellen per well. De productiecapaciteit van mADAMTS13 door de individuele HEK T-REx cellen is heel divers. Via de subklonering was het echter mogelijk om enkel die cellen te selecteren die mADAMTS13 in hogere mate tot expressie brengen. Om eerst na te gaan in welke wells er na de subklonering nog steeds productie aan mADAMTS13 was, werd er een specifieke ELISA uitgevoerd (paragraaf 1.1.1). Zowel de subklonering aan 5 cellen per well als deze aan 15 cellen per well vertoonden een positief resultaat. Er werd gekozen om de 5 wells met de hoogste OD_{490nm} van de 5 cellen per well uitverdunning verder op te groeien, omdat deze cellijnen meer monoklonaal zijn. Na het opgroeien van deze 5 subklones werd via een verdunningsreeks duidelijk dat de 5 subklones 6 keer meer mADAMTS13 tot expressie brachten dan de originele klone. Er werd met de subklone F12 verder gewerkt en van de andere subklones (C10, D5, F11 en G11) werden celstocks gemaakt (Figuur 2.1). Dit betekent een grote stap voorwaarts in de ontwikkeling van de anti-mADAMTS13 mAbs.

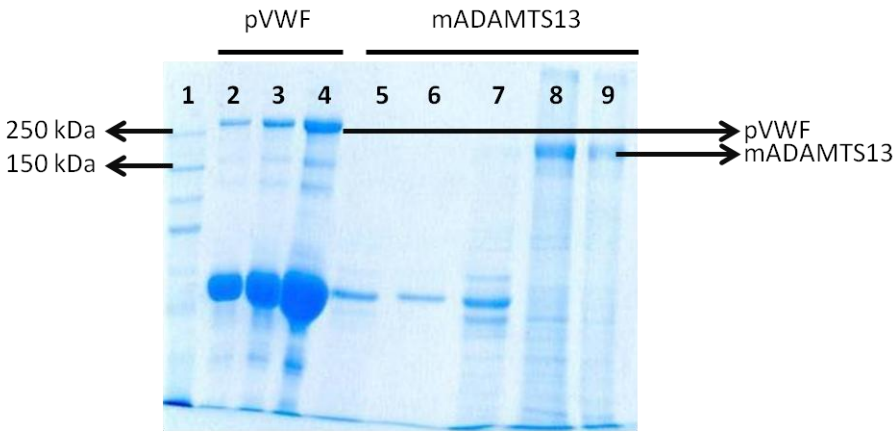


Figuur 2.1: Identificatie van de best producerende mADAMTS13 subklone via ELISA. C10, D5, F11, F12 en G11 zijn de 5 subklones die na de subklonering van de mADAMTS13 HEK T-REx cellijn verder werden opgegroeid. mWT is het expressiemedium van mADAMTS13 van voor de subklonering en werd gelijkgesteld aan 100%. Uit deze grafiek blijkt dat het expressieniveau gestegen is tot meer dan 600%.

Aangezien er grote hoeveelheden aan mADAMTS13 nodig zijn voor de immunisatie van ADAMTS13$^{-/-}$ muizen (per immunisatie is er 10 µg aan antigen nodig per muis), en voor de daarop volgende screening *assays*, werd de HEK T-REx F12 subklone verder opgegroeid in een Cell Factories Nunc™ EasyFill™ multitray (2520 cm²) in plaats van in 75 cm² cultuur-flessen, wat op zich ook al de productie-efficiëntie verhoogde. Wanneer deze multitray volgroeid was, werd het groeimedium vervangen door serumvrij oogstmedium met tetracycline (10 µg/ml), waardoor het mADAMTS13 tot expressie kwam. Het medium werd na 5 dagen geoogst en mADAMTS13 werd eruit opgezuiverd via een nikkelkolom (paragraaf 1.1.2, resultaat niet getoond). Met behulp van een dot blot werd ten slotte bepaald in welke fracties het mADAMTS13 aanwezig was, waardoor de fracties samengevoegd konden worden om deze op te concentreren (paragraaf 1.1.3, resultaat niet getoond).

De zuiverheid en de concentratie van de opgezuiverde mADAMTS13 stalen werd bepaald via SDS-PAGE en blauwkleuring (paragraaf 1.1.4). De slotjes waarin de gepoolde, opgeconcentreerde facties werden geladen (Figuur 2.2, lanen 8 en 9) vertonen een duidelijk bandje dat iets hoger gelegen is dan 150 kDa, wat overeenkomt met de moleculaire massa van mADAMTS13 (ongeveer 155 kDa). Naast dit bandje, dat het opgezuiverde mADAMTS13 voorstelt, zijn er ook heel weinig nevenbandjes te zien, wat wijst op een efficiënte opzuivering. Dit wordt bevestigd door de slotjes waarin een fractie van het startmedium (Figuur 2.2, laan 5), de doorloop (Figuur 2.2, laan 6) en de wasoplossing (Figuur 2.2, laan 7) geladen werden. In het startmedium is het mADAMTS13 niet zichtbaar. Dit komt omdat mADAMTS13 nog veel te laag geconcentreerd is, door het grote volume waarin het tot expressie kwam. Er is echter wel een sterke contaminant op te merken, maar deze werd grotendeels verwijderd tijdens de wasstap, waardoor het opgezuiverde mADAMTS13 voldoende zuiver was voor de immunisaties van ADAMTS13$^{-/-}$ muizen.

Vooraleer hiermee gestart werd, werd eerst nog de concentratie aan mADAMTS13 bepaald. Aangezien de concentratie aan ADAMTS13 in het bloed van muizen ongekend is en bijgevolg de concentratie aan opgezuiverd mADAMTS13 niet te kwantificeren valt via ELISA, werd de concentratie aan opgezuiverd mADAMTS13 geschat via SDS-PAGE en blauw-kleuring (paragraaf 1.1.4). Hierbij werd pVWF, met een moleculaire massa van 255 kDa en een gekende concentratie, als ijk gebruikt (Figuur 2.2, lanen 2, 3 en 4). Zo werd de concentratie aan opgezuiverd mADAMTS13 in Figuur 2.2 geschat op 150 µg/ml.

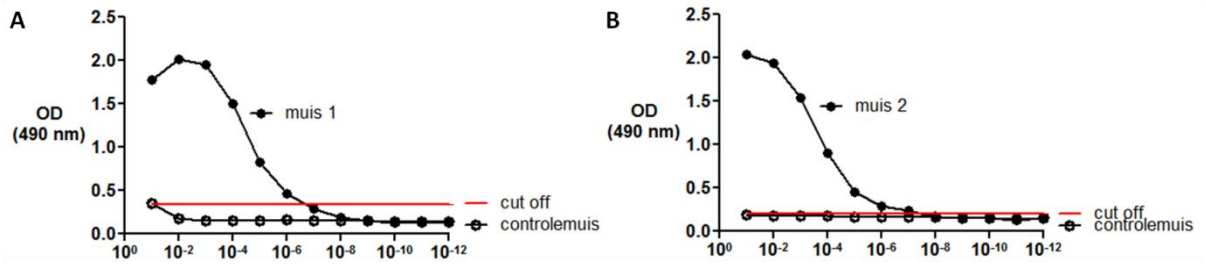


Figuur 2.2: Concentratie en zuiverheidsbepaling van mADAMTS13 na opzuivering via nikkelkolom met behulp van SDS-PAGE en blauwkleuring. Laan 1: 10 – 250 kDa proteïneladder (*Prestained Protein Ladder, Broad Range* (New England, Biolabs®Inc.)). Laan 2: pVWF (50 µg/ml). Laan 3: pVWF (125 µg/ml). Laan 4: pVWF (250 µg/ml). Laan 5: het startmedium voor het op de nikkelkolom werd geladen. Laan 6: de doorloop van het staal. Laan 7: de wasstap, waar te zien is dat heel wat contaminanten werden weggewassen. Laan 8: 20 µl opgezuiverd mADAMTS13 van de gepoolde fracties. Laan 9: 10 µl opgezuiverd mADAMTS13 van de gepoolde fracties. Het mADAMTS13 in laan 8 en 9 is voldoende zuiver om te gebruiken voor de immunisaties. Op basis van de ijk in laan 2, 3 en 4 werd de concentratie van het opgezuiverd mADAMTS13 geschat op 150 µg/ml.

Zodra de concentratie aan opgezuiverd mADAMTS13 gekend was, werd overgegaan tot de immunisatie van drie vrouwelijke ADAMTS13$^{-/-}$ muizen (paragraaf 1.1.5). Na 21 dagen werd de immuunrespons voor een eerste maal gecontroleerd en bleek de serumtiter (10^{-6}) hoger dan de *cut-off* (10^{-5}) te liggen. Het immuunsysteem van de muizen werd dus voldoende gestimuleerd om Abs tegen mADAMTS13 te ontwikkelen. Bijgevolg kon er dan ook verdergegaan worden met het immunisatieprotocol. Na de derde en vierde immunisatie (respectievelijk 4 en 2 dagen voor de fusie) hadden muis 1 en muis 2 nog steeds een serumtiter die boven 10^{-5} lag (Figuur 2.3), waardoor de fusie kon worden uitgevoerd (paragraaf 1.1.6).

Twee weken na de fusie werden de twintig microtiterplaten, waarin de 'met SP2/0 myelomacellen gefuseerde B-cellen' uitverdeeld waren, gescreend op positieve klones (paragraaf 1.1.7). Tussen de fusie en het screenen van de platen was er echter een algemene besmetting opgetreden, waardoor de meerderheid van de hybridomacellijnen verloren zijn gegaan. Toch werd er initieel nog één positieve klone gedetecteerd, nl. 6F4.

Een herscreening een aantal dagen later toonde echter aan dat deze klone zijn positiviteit verloren had en waarschijnlijk overgroeid is geweest door een andere hybridomacellijn die aspecifieke mAbs tot expressie bracht. De immunisatie had dus geen positieve klones opgeleverd. Ondertussen zijn reeds nieuwe immunisaties gestart met mADAMTS13, maar aangezien het immunisatieprotocol op zich al zestig dagen in beslag neemt werden hier nog geen nieuwe resultaten verkregen.



Figuur 2.3: Het resultaat van de serumscreening na de vierde immunisatie van twee ADAMTS13$^{-/-}$ muizen met mADAMTS13. (A) Serumscreening van muis 1. (B) Serumscreening van muis 2. De grafieken geven aan dat zowel de serumtiter van de geïmmuniseerde muis 1 als de serumtiter van de geïmmuniseerde muis 2 boven de *cut-off* waarde van 10^{-5} gelegen zijn, waardoor beide fusies uitgevoerd konden worden.

2.2 De ontwikkeling van functionele anti-hADAMTS13 mAbs

2.2.1 Ontwikkeling van anti-hADAMTS13 mAb producerende hybridoma's

Twee wildtype Balb/C muizen werden bij aanvang van deze masterthesis geïmmuniseerd met recombinant hADAMTS13 (verkregen van Baxter). Deze muizen vertoonden bij de eerste en tweede serumscreening een serumtiter boven de *cut-off* van 10^{-5} (resultaten niet weergegeven), waardoor er één fusie per muis werd uitgevoerd (paragraaf 1.2.1). Twee weken na de fusies werden de microtiterplaten gescreend, waarbij er initieel 36 positieve klones geïdentificeerd werden (paragraaf 1.2.2, resultaten niet getoond). Na het opkweken en het subkloneren van deze positieve klones gingen er een aantal cellijnen verloren en werden uiteindelijk 16 hybridomacellijnen bekomen die anti-hADAMTS13 mAbs tot expressie brengen. Een overzicht van deze hybridomacellijnen en hun respectievelijke mAbs waarmee werd verder gewerkt, is terug te vinden in Tabel 2.1.

Tabel 2.1: Overzicht van de positieve hybridomacellijnen en hun respectievelijke anti-hADAMTS13 mAbs die ze tot expressie brengen. Deze cellijnen werden bekomen door de fusie van de miltcellen van wildtype Balb/C muizen die geïmmuniseerd werden met hADAMTS13 (Baxter), met Sp2/0 myelomacellen.

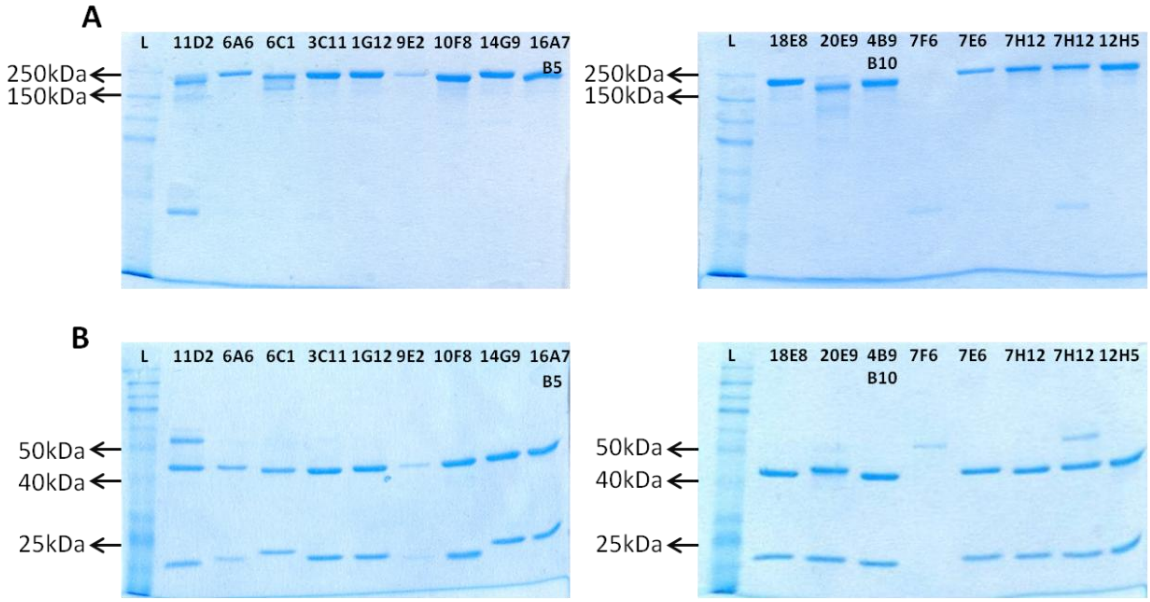
	mAb	Subklones		mAb	Subklones
1.	1G12	\	9.	10F8	C6, E7, E8, E10, E11
2.	3C11	\	10.	11D2	\
3.	4B9 B10	\	11.	12H5	\
4.	6A6	\	12.	14G9	B1, B4, D6, D8, E4
5.	6C1	\	13.	16A7 B5	\
6.	7E6	\	14.	18E8	B4, D4, F2, F5, G6
7.	7H12	\	15.	20E9	B8, C5, D9, F4
8.	9E2	\	16.	7F6	C4, F3

Deze 16 hybridomacellijnen werden vervolgens voor opzuivering verder opgegroeid in celline medium met een laag serumgehalte tot ongeveer 30 à 40 ml medium bekomen werd (paragraaf 1.2.3). Dit is het minimaal vereiste volume voor de opzuivering van de mAbs via een proteïne G *Sepharose* kolom (paragraaf 1.2.4). Ondertussen werd ook telkens een subklonering uitgevoerd. Als de screening van deze subklonering een positief resultaat opleverde werden tot 5 subklones verder opgegroeid om er daarna celstocks van te maken (Tabel 2.1).

2.2.2 Opzuivering van de anti-hADAMTS13 mAbs

Voordat de functionaliteit van de opgezuiverde anti-hADAMTS13 mAbs bestudeerd werd, werd hun zuiverheid bepaald via SDS-PAGE en blauwkleuring (paragraaf 1.2.5). De niet gesubkloneerde mAbs (uitgezonderd 4B9 B10 en 16A7 B5) werden hierbij onderworpen aan zowel niet-reducerende als reducerende condities. Onder niet-reducerende condities (Figuur 2.4 A) is er voor bijna elk mAb (behalve voor het mAb 7F6) een duidelijk bandje te zien rond de 150 kDa, wat overeenkomt met het moleculaire gewicht van een IgG Ab. Ook onder reducerende condities (Figuur 2.4 B) komen de moleculaire gewichten overeen met deze van de lichte en zware ketens van een IgG Ab, nl. 25 kDa voor de lichte keten en 50 kDa voor de zware keten. De meeste opgezuiverde mAbs zien er zuiver uit, maar bij de mAbs 11D2 en 7H12 (Figuur 2.4) is een extra bandje te zien met een grootte van 50 à 60 kDa, wat wijst op een lichte contaminatie tijdens de opzuivering. Er werd beslist om ondanks de lichte contaminatie deze mAbs toch mee te nemen in de functionele testen. Indien een functioneel effect van de mAbs zou waargenomen worden, moet nagegaan worden of dit functioneel effect al dan niet te wijten is aan de contaminatie. Daarnaast bleek dat het mAb 7F6 verloren is gegaan tijdens de opzuivering via proteïne G *Sepharose* kolom, aangezien er geen bandjes te zien zijn op de correcte hoogtes (Figuur 2.4). Dit mAb werd bijgevolg niet meer meegenomen in de functionele testen. Na verdere analyses bleek dat de mAbs 11D2, 14G9

en 6C1 toch niet specifiek tegen hADAMTS13 gericht zijn, waardoor beslist werd om de (negatieve) resultaten van deze mAbs in de functionele testen niet weer te geven.

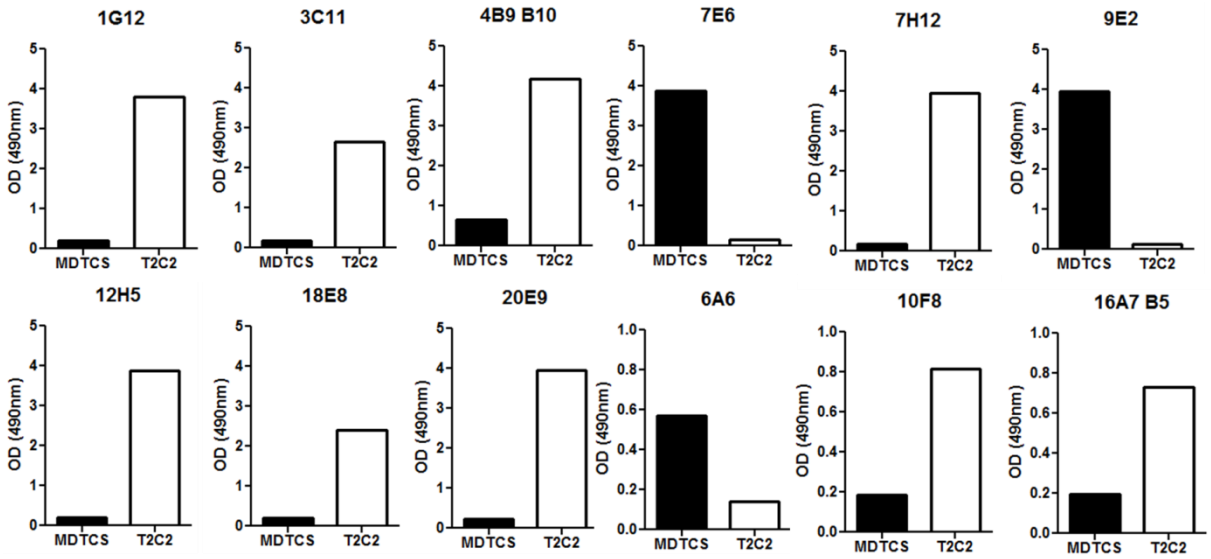


Figuur 2.4: SDS-PAGE van de opgezuiverde mAbs via een proteïne G *Sepharose* kolom in niet-reducerende (A) en reducerende condities (B). L: de 10 – 250 kDa proteïneladder (*Prestained Protein Ladder, Broad Range* (New England, Biolabs®Inc.)). De bandjes van de mAbs lagen zowel in de niet-reducerende condities (A) als in de reducerende condities (B) op de verwachte hoogte. Een niet-gereduceerd IgG mAb heeft een moleculaire massa van ongeveer 150 kDa. Na het verbreken van de disulfidebruggen met behulp van β-mercapto-ethanol uit de reducerende buffer, wordt een IgG mAb opgedeeld in twee zware ketens (elk 50 kDa) en twee lichte ketens (elk 25 kDa). Na de opzuivering zagen de mAbs er voldoende zuiver uit. Enkel de mAbs 11D2 en 7H12 vertoonden een lichte contaminatie. Het mAb 7F6 bleek na opzuivering niet meer aanwezig te zijn en werd daarom niet verder meegenomen in de volgende experimenten.

2.2.3 Epitoop mapping van de ontwikkelde anti-hADAMTS13 mAbs

Via epitoop *mapping* (paragraaf 1.2.6) kan bepaald worden tegen welk domein van ADAMTS13 de opgezuiverde mAbs gericht zijn. Op deze wijze kan de functionaliteit van de mAbs gekoppeld worden aan de domeinen van ADAMTS13 waartegen ze gericht zijn en kan de rol van de staart van ADAMTS13 in sterke mate verduidelijkt worden. Eerst werd met behulp van de kopmutant (MDTCS) en staartmutant (T2C2) bepaald of de mAbs gericht zijn tegen het kopdomein of staartdomein van ADAMTS13 (Figuur 2.5). Uit de resultaten bleek dat 9 van de 12 mAbs gericht zijn tegen de C-terminale staart van hADAMTS13, nl. de mAbs 1G12, 3C11, 4B9 B10, 7H12, 12H5, 18E8, 20E9, 10F8 en 16A7 B5. De mAbs 7E6, 9E2 en 6A6 bleken tegen het kopdomein van ADAMTS13 gericht te zijn. Bij het mAb 4B9 B10 was er bovendien ook een laag signaal (OD_{490nm} = 0,654) te detecteren wanneer de kopmutant MDTCS werd toegevoegd. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat de OD_{490nm} voor de mAbs 6A6, 10F8 en 16A7 B5 een stuk lager ligt dan de OD_{490nm} voor de andere mAbs. Zoals later

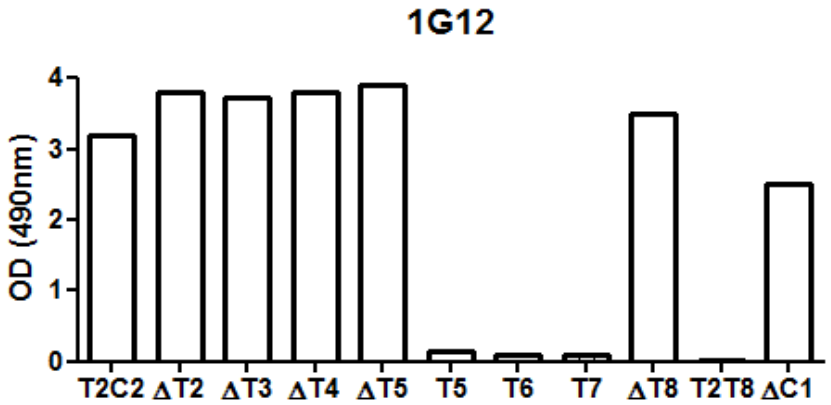
zal blijken is de lagere OD_{490nm} te wijten aan de slechte coatingscapaciteit van deze mAbs (Figuur 2.8, paragraaf 2.2.4 A).



Figuur 2.5: Initiële epitoop *mapping* van de ontwikkelde mAbs. De mAbs 7E6, 9E2 en 6A6 blijken tegen het MDTCS kopdomein van ADAMTS13 gericht te zijn, daarentegen zijn de mAbs 1G12, 3C11, 4B9 B10, 7H12, 12H5, 18E8, 20E9, 10F8 en 16A7 B5 tegen de C-terminale staart van ADAMTS13 gericht. Het mAb 4B9 B10 lijkt ook een lichte affiniteit te hebben voor het MDTCS kopdomein.

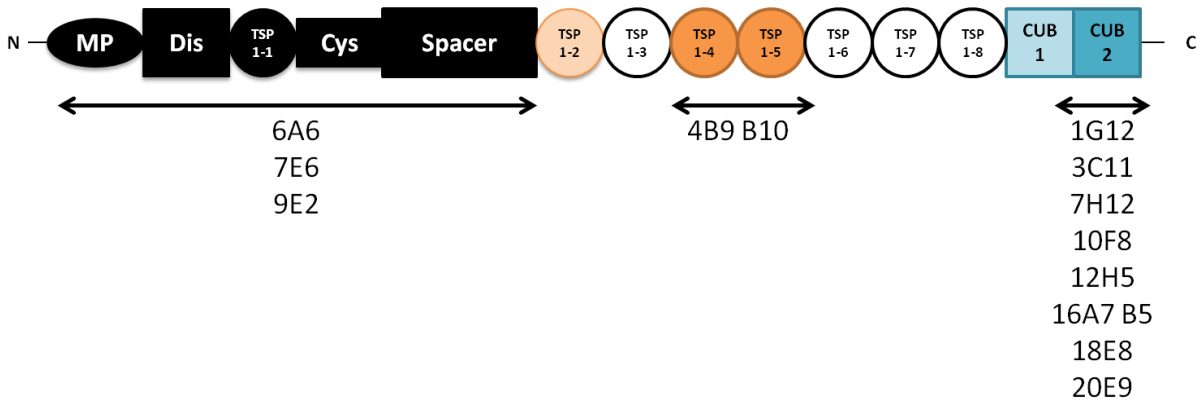
Er werd een gerichtere epitoop *mapping* uitgevoerd door gebruik te maken van een combinatie van staartmutanten, waarbij steeds een deel van de staart gedeleteerd is (paragraaf 1.2.6 A, Figuur 1.1), kan het specifieke bindingsdomein van de mAbs van ADAMTS13 achterhaald worden. Een voorbeeld van hoe het epitoop afgeleid kan worden uit deze experimenten is terug te vinden in Figuur 2.6. De deletiemutanten ΔT2, ΔT3, ΔT4, ΔT5 en ΔT8, waarbij respectievelijk het TSP1-2, TSP1-3, TSP1-4, TSP1-5 en TSP1-8 domein gedeleteerd is, geven allen een positief signaal, wat betekent dat het mAb 1G12 niet aan één van deze domeinen bindt. Verder vertonen de mutanten die domeinen bezitten tot en met TSP1-5 (T5), TSP1-6 (T6), TSP1-7 (T7) en de staartmutant T2T8 (zonder CUB domeinen) geen signaal, waardoor de bindingsplaats van het mAb 1G12 achter deze domeinen gelegen moet zijn. Enkel de twee CUB domeinen volgen nog na het TSP1-8 domein. Bovendien geeft ook de deletiemutant ΔC1, waarbij CUB1 niet aanwezig is een signaal, waardoor besloten kan worden dat het mAb 1G12 aan CUB2 bindt. Een overzicht van de epitoop bepalingen van de andere mAbs is terug te vinden in Bijlage 4. De specifieke epitoop *mapping* kon echter enkel uitgevoerd worden voor de mAbs die tegen het staartdomein van ADAMTS13 gericht zijn, aangezien enkel mutanten van de staart van ADAMTS13 voorhanden zijn in dit labo. Voor de mAbs die tegen het MDTCS kopdomein gericht zijn, kon daardoor geen specifieke epitoop *mapping* uitgevoerd worden. De specifieke domeinbepaling van deze mAbs kan in de toekomst wel bepaald worden door een samenwerking met Prof. Soejima

(*Nara Medical University,* Japan) en Prof. Fujimura (*The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto,* Japan), die wel over de kopmutanten beschikken.



Figuur 2.6: Bepaling van het specifieke epitoop van het mAb 1G12 met behulp van verschillende staartdeletiemutanten. Het signaal van de T2C2 mutant geeft aan dat het mAb 1G12 gericht is tegen het staart-domein van ADAMTS13. De deletiemutanten ΔT2, ΔT3, ΔT4, ΔT5 en ΔT8 geven allen een positief signaal, wat betekent dat het mAb 1G12 niet aan de domeinen TSP1-2, TSP1-3 TSP1-4, TSP1-5 en TSP1-8 bindt. De mutanten T5, T6, T7 en T2T8 geven echter geen signaal, waardoor het domein waaraan het mAb 1G12 bindt in deze mutanten dus niet aanwezig is. De enige domeinen die ADAMTS13 na het TSP1-8 domein nog bevat zijn de twee CUB domeinen. Ook de deletiemutant ΔC1 geeft een positief signaal. Uit al deze resultaten kan dus afgeleid worden dat het mAb 1G12 tegen het CUB2 domein van ADAMTS13 gericht is.

Uit de resultaten van de specifieke epitoop *mapping* van de mAbs die tegen de C-terminale staart van ADAMTS13 gericht zijn, blijkt dat de mAbs 1G12, 3C11, 7H12, 10F8, 12H5, 16A7 B5, 18E8 en 20E9 allen tegen het CUB2 domein van ADAMTS13 gericht zijn (Figuur 2.7), terwijl het mAb 4B9 B10 bindt aan de TSP1-4 en TSP1-5 domeinen (Figuur 2.7).



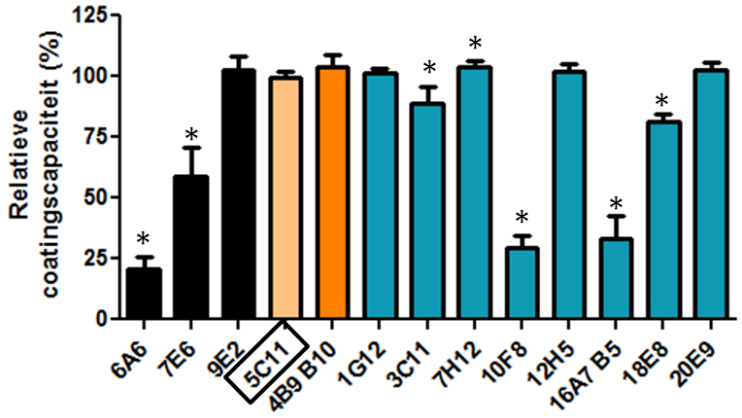
Figuur 2.7: Resultaat van de epitoop *mapping* van de ontwikkelde mAbs. Negen van de twaalf ontwikkelde mAbs zijn gericht tegen de C-terminale staart (T2C2) van hADAMTS13, waarbij het mAb 4B9 B10 bindt aan de TSP1-4 en TSP1-5 *repeats*, terwijl de mAbs 1G12, 3C11, 7H12, 10F8, 12H5, 16A7 B5, 18E8 en 20E9 gericht zijn tegen het CUB2 domein. De overige drie mAbs, nl. 6A6, 7E6 en 9E2 zijn daarentegen gericht tegen het MDTCS kopdomein van hADAMTS13. De kleuren van deze figuur worden aangehouden bij de volgende figuren, zodat snel de link gelegd kan worden tussen het domein en de mogelijke functionaliteit.

2.2.4 Bepaling functionaliteit van de anti-hADAMTS13 mAbs

A. Gebruik van de mAbs als coating Ab of detectie Ab

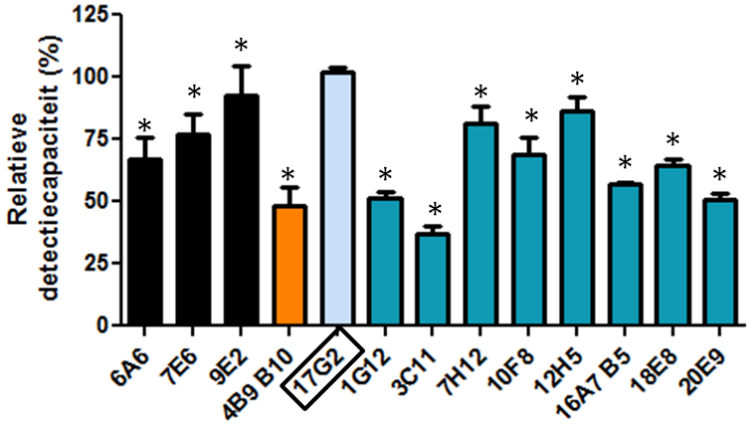
Het bepalen van de capaciteit van een mAb om ADAMTS13 te vangen (als coating Ab in een ELISA) of te detecteren (als detectie Ab in een ELISA) zal informatie geven over de affiniteit van het mAb voor hADAMTS13.

De capaciteit van de mAbs als coating Ab om hADAMTS13 te vangen, werd getest ten opzichte van het mAb 5C11 (gericht tegen het TSP1-2 domein), dat in onze groep als een standaard coating Ab gebruikt wordt. Hierbij werd de OD_{490nm} met 5C11 als coating (bij een concentratie van 10 µg/ml) gelijkgesteld aan 100% coatingscapaciteit (paragraaf 1.2.6 A). De waarden van de andere mAbs als coating werden dan ten opzichte van deze waarde ook omgezet in percentages, waardoor de relatieve coatingscapaciteiten van de opgezuiverde mAbs ten opzichte van 5C11 bepaald konden worden (Figuur 2.8). De mAbs 1G12 (gemiddelde coatingscapaciteit (%) ± SD: 102 ± 1), 4B9 B10 (104 ± 3), 9E2 (103 ± 3), 12H5 (102 ± 2) en 20E9 (103 ± 2) hebben een gelijkaardige coatingscapaciteit als de referentie 5C11 (100 ± 1). Ondanks dat het mAb 3C11 (90 ± 4) een significant lagere coatingscapaciteit dan 5C11 vertoont, bezit het mAb 3C11 toch nog een relatief goede coatingscapaciteit. De mAbs 6A6 (21 ± 3), 7E6 (59 ± 7), 10F8 (30 ± 3), 16A7 B5 (33 ± 5) en 18E8 (81 ± 2) vertonen daarentegen een coatingscapaciteit die lager ligt dan deze van 5C11. Het mAb 7H12 (104 ± 2) zou een betere coatingscapaciteit dan 5C11 hebben, aangezien de coatingscapaciteit van 7H12 significant verschillend en boven de coatingscapaciteit van 5C11 ligt (Figuur 2.8). Het verschil is echter zo gering dat het gebruik van het mAb 7H12 in vergelijking met het mAb 5C11 weinig of geen verschil zal maken bij het uitvoeren van ELISA's, tenzij het van belang is tegen welk domein het coating mAb bindt.



Figuur 2.8: Relatieve coatingscapaciteit van de ontwikkelde mAbs ten opzichte van 5C11 (n=3). De mAbs 9E2, 4B9 B10, 1G12, 12H5 en 20E9 hebben een gelijkaardige bindingscapaciteit als 5C11 en zijn dus geschikt als coating Ab. De mAbs 3C11, 6A6, 7E6, 10F8, 16A7 B5 en 18E8 hebben een coatingscapaciteit die significant lager ligt dan deze van 5C11. Het mAb 7H12 daarentegen heeft een nog iets hogere coatingscapaciteit dan 5C11 en is dus zeker geschikt als coating Ab (gepaarde t-test, *two-tailed*, $p < 0,05$ (*)).

Naast de capaciteit van de mAbs om deze te gebruiken als coating Ab, is het ook belangrijk om hun capaciteit als detectie Ab te bepalen. Dit was echter enkel mogelijk indien deze mAbs eerst gebiotinyleerd werden (paragraaf 1.2.6 B). De relatieve detectiecapaciteit werd via ELISA bepaald (paragraaf 1.2.6 B) en werd berekend op basis van de detectiecapaciteit van 17G2-bio (gericht tegen het CUB1 domein), die als referentie gebruikt werd (Figuur 2.9). Geen enkel van de ontwikkelde mAbs lijkt de detectiecapaciteit van 17G2 te kunnen evenaren. Toch bereiken 10 van de 12 ontwikkelde mAbs, nl. 1G12 (gemiddelde detectie-capaciteit (%) ± SD: 51 ± 2), 6A6 (70 ± 5), 7E6 (77 ± 4), 7H12 (81 ± 4), 10F8 (69 ± 4), 12H5 (86 ± 3), 16A7 B5 (57 ± 1), 18E8 (64 ± 2) en 20E9 (51 ± 1), een relatieve detectiecapaciteit van minimaal 50%. Slechts twee mAbs, nl. 3C11 (37 ± 2) en 4B9 B10 (48 ± 5) vertonen een relatieve detectiecapaciteit die lager ligt dan 50%. Deze lage detectiecapaciteit van 4B9 B10 kan eventueel te wijten zijn aan de experimentele set-up. Hierbij werd het Ab 5C11 als coating gebruikt, dat tegen het TSP1-2 domein gericht is en dus dicht in de buurt ligt van het epitoop waar 4B9 B10 aan bindt, nl. de TSP1-4 en TSP1-5 domeinen.



Figuur 2.9: Relatieve detectiecapaciteit van de gebiotinyleerde mAbs ten opzichte van 17G2-bio (n=3). Geen enkel van de ontwikkelde mAbs kan de detectiecapaciteit van 17G2 evenaren. Tien van de twaalf mAbs hebben wel een relatieve detectiecapaciteit die boven de 50% gelegen is. De mAbs 3C11 en 4B9 B10 halen de grens van 50% niet (ongepaarde t-test, *two-tailed*, $p < 0,05$ (*)).

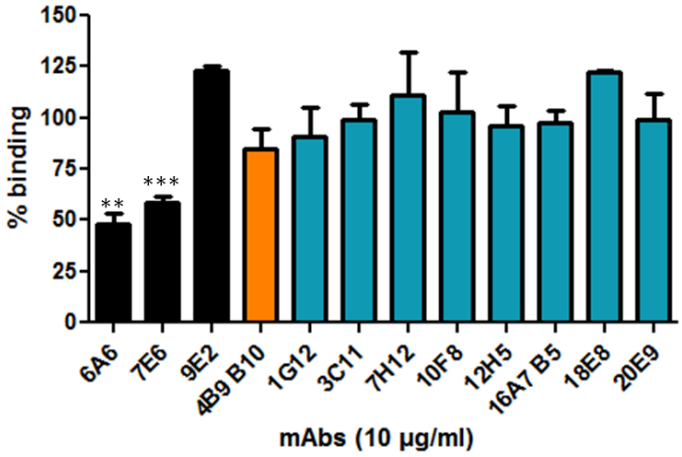
Alle mAbs bezitten dus als coating of detectie Ab een relatief goede affiniteit voor ADAMTS13, waardoor deze in volgende experimenten gebruikt kunnen worden. Hierbij moet er wel rekening gehouden worden dat sommige mAbs beter zijn als coating Ab en andere beter zijn als detectie Ab.

B. Invloed van de mAbs op de binding van ADAMTS13 aan VWF (onder statische condities)

Één van de hypothesen luidt dat de C-terminale staart van ADAMTS13 belangrijk zou zijn voor het faciliteren van de binding van ADAMTS13 aan VWF, zodat VWF geknipt kan

worden (paragraaf 4, Literatuurstudie, Deel I). Om dit te bestuderen werd met behulp van een *in house* ontwikkelde ELISA (paragraaf 1.2.6 C en D) de invloed van de ontwikkelde mAbs op de binding van ADAMTS13 aan VWF onder statische condities bestudeerd. Door vervolgens het bindingsgedrag van ADAMTS13 aan VWF, in aanwezigheid van een specifiek mAb, te linken met het domein van ADAMTS13 waaraan het specifiek mAb bindt, kan de functie van de staart van ADAMTS13 stap voor stap verduidelijkt worden. De invloed van de mAbs op de binding van ADAMTS13 werd enerzijds bestudeerd met ontvouwen VWF, maar werd anderzijds ook bestudeerd in aanwezigheid van gevouwen, globulair VWF, aangezien beide vormen van VWF verschillen in de beschikbaarheid van bindingsplaatsen voor ADAMTS13.

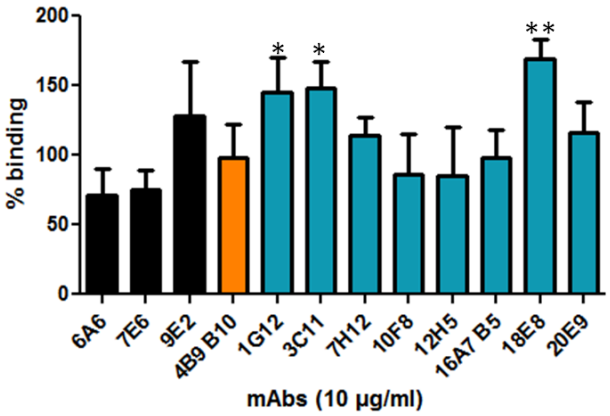
De binding van ADAMTS13 aan ontvouwen VWF werd enkel beïnvloed door de anti-MDTCS mAbs 6A6 en 7E6 (Figuur 2.10). Ontvouwen VWF komt *in vivo* voor wanneer UL-VWF ontrolt door de aanwezige schuifspanning in het bloed. Deze mAbs bleken immers de binding van ADAMTS13 aan ontvouwen VWF te inhiberen, waarbij respectievelijk slechts 48% en 59% van het ADAMTS13 aan het ontvouwen VWF bond (Figuur 2.10).



Figuur 2.10: De invloed van de respectievelijke mAbs op de binding van ADAMTS13 aan ontvouwen VWF (6A6, 7E6: n=3; 4B9 B10, 1G12, 3C11, 7H12, 10F8, 12H5, 16A7 B5, 18E8 en 20E9: n=2). Wegens de tijdsbestedende techniek en het vele materiaal die nodig is voor de uitvoering van het experiment, werden enkel de mAbs die na twee herhalingen op het eerste zicht significant leken een derde keer herhaald, nl. 6A6 en 7E6. De mAbs 6A6 en 7E6 vertonen inderdaad een statistisch significant verschil met de binding van ADAMTS13 aan ontvouwen VWF in afwezigheid van de mAbs (ongepaarde t-test, *two-tailed*). In aanwezigheid van het mAb 6A6 (10 µg/ml) vertoont ADAMTS13 een significant lagere binding aan VWF ($p = 0,0002$ (**)), slechts 48% van het ADAMTS13 bindt aan het ontvouwen VWF in vergelijking met de conditie waarbij er geen mAb aanwezig is. Het mAb 7E6 zorgt ook voor een lager bindingspercentage van ADAMTS13 aan ontvouwen VWF ($p < 0,0001$ (***)). Hierbij bindt slechts 59% van het ADAMTS13.

Globulair, gevouwen VWF werd bekomen door het opgezuiverde pVWF te vangen met het *in house* ontwikkeld mAb 6D1, dat gericht is tegen het A1 domein van VWF (paragraaf 1.2.7 D). *In vivo* blijkt immers ongeveer 3% van het plasma ADAMTS13 gecomplexeerd te zijn met endogeen gevouwen VWF in de bloedcirculatie (Feys *et al.*, 2009). In afwezigheid van een

mAb wordt de binding van ADAMTS13 aan VWF gezien als 100%. Op basis hiervan kon dan gekeken worden of de binding gemodificeerd werd door de toevoeging van een mAb (10 µg/ml). Onder deze condities bleken de drie anti-staart ADAMTS13 mAbs 1G12, 3C11 en 18E8 de binding van ADAMTS13 aan globulair VWF te stimuleren voor respectievelijk 145%, 148% en 169% (Figuur 2.11). Deze data wijzen er bovendien op dat de mAbs die gericht zijn tegen de staart van ADAMTS13 de binding aan globulair VWF niet inhiberen, maar stimuleren, wat wijst op een potentiële inhiberende rol van de staart van ADAMTS13 in zijn binding aan globulair VWF.

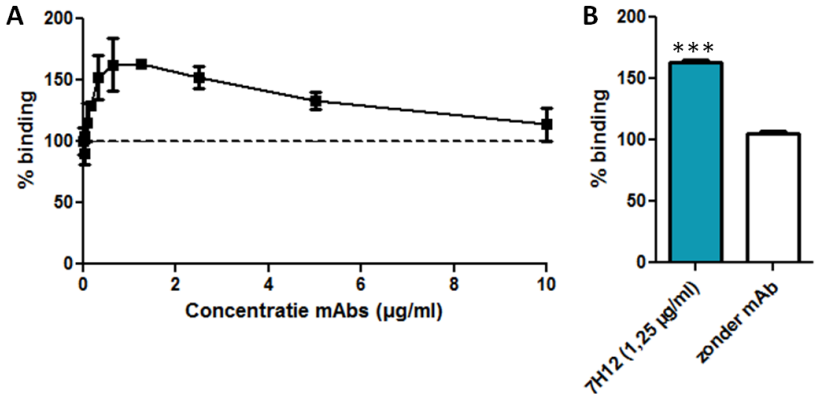


Figuur 2.11: De invloed van de respectievelijke mAbs aan een concentratie van 10 µg/ml op de binding van ADAMTS13 aan globulair, gevouwen VWF (n=3). Enkel de mAbs 1G12, 3C11 en 18E8 vertonen een statistisch significant verschil met de binding van ADAMTS13 aan globulair VWF in afwezigheid van de mAbs. Deze drie anti-staart ADAMTS13 mAbs stimuleren de binding van ADAMT13 aan globulair VWF met respectievelijk 145%, 148% en 169% (ongepaarde t-test, 2-*tailed*, $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**)).

Na het uitvoeren van de bindingsELISA's met gevouwen VWF konden bindingscurves opgesteld worden. Hierbij werd opgemerkt dat het mAb 7H12 de binding van ADAMTS13 aan gevouwen VWF niet modificeerde wanneer het mAb werd toegevoegd aan een concentratie van 10 µg/ml (Figuur 2.12). Daarentegen is er wel een duidelijke stijging van de binding van ADAMTS13 aan gevouwen VWF te zien wanneer het mAb 7H12 slechts in een concentratie van 1 à 2 µg/ml werd toegevoegd (Figuur 2.12). Dit toont aan dat er ook een concentratie-afhankelijk effect van het mAb kan zijn op de interactie tussen ADAMTS13 en gevouwen VWF. De lichte contaminatie die optrad tijdens de opzuivering van 7H12 kan een mogelijke reden zijn van deze enigszins abnormale bindingscurve (Figuur 2.4). De contaminatie kan mogelijks een invloed hebben op de bindingscapaciteit van ADAMTS13 aan gevouwen VWF. Dit moet echter verder bestudeerd worden vooraleer hier uitsluitsel over gegeven kan worden.

De binding van ADAMTS13 aan ontvouwen VWF kan dus gereduceerd worden door de aanwezigheid van de anti-MDTCS mAbs 6A6 en 7E6. Daarentegen zorgen de anti-staart

mAbs 1G12, 3C11 en 18E8 voor een verhoogde binding van ADAMTS13 aan gevouwen VWF.



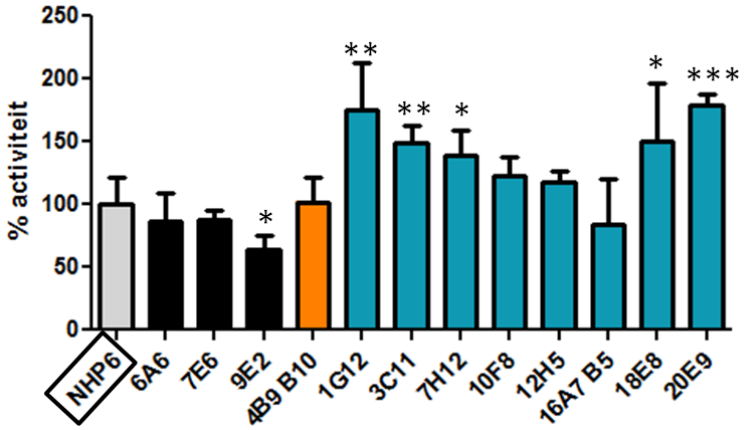
Figuur 2.12: Concentratieafhankelijk effect van het mAb 7H12 op de binding van ADAMTS13 aan gevouwen VWF (n=3). (A) De bindingscurve van ADAMTS13 aan gevouwen VWF in de aanwezigheid van het mAb 7H12 vertoont een duidelijke concentratieafhankelijkheid. Er wordt geen verhoogde binding van ADAMTS13 aan gevouwen VWF waargenomen indien het mAb 7H12 aan een concentratie van 10 µg/ml wordt toegevoegd. Er wordt echter wel een verhoogde interactie tussen ADAMTS13 en gevouwen VWF waargenomen wanneer het mAb 7H12 slechts in een concentratie van 1 à 2 µg/ml wordt toegevoegd. Het mAb 7H12 zorgt dus voor een concentratie-afhankelijk effect op de interactie tussen ADAMTS13 en VWF. (B) ADAMTS13 bindt beter aan gevouwen VWF wanneer het mAb 7H12 in een concentratie van 1,25 µg/ml aanwezig is (ongepaarde t-test, *two-tailed*, $p < 0,0001$ (***)).

C. Functionaliteit van de mAbs in FRETS-VWF73

De invloed van de mAbs op de activiteit van ADAMTS13 kan bestudeerd worden via de FRETS-VWF73 *assay*. FRETS-VWF73 is een verkorte vorm van *full-length* VWF en omvat hoofdzakelijk de splitsingssite van het A2 domein (Figuur 3.5, paragraaf 3.3, Deel I: Literatuurstudie). Deze verkorte vorm van VWF bevat bovendien aan de ene kant van de splitsingssite een *quencher* die het fluorescent signaal van de fluorofoor aan de andere kant van de splitsingssite opneemt. Wanneer FRETS-VWF73 dus geknipt wordt door ADAMTS13, komen de *quencher* en de fluorofoor te ver van elkaar te liggen, waardoor fluorescent licht uitgezonden wordt (paragraaf 1.2.7 E).

In deze *assay* werd nagegaan of de mAbs (aan 10 µg/ml) in staat zijn om de activiteit van ADAMTS13 in NHP te modificeren. Op basis van de fluorescentie die werd uitgelezen, kon per mAb een rechte opgesteld worden, waaruit de richtingscoëfficiënt berekend werd. De richtingscoëfficiënt van de fluorescentiecurve van NHP werd gebruikt als referentie en werd gelijkgesteld aan 100% activiteit van ADAMTS13. Op basis van deze referentie werd de activiteit van ADAMTS13 in NHP (gemiddelde activiteit (in %) ± SD: 100 ± 7) in aanwezigheid van de verschillende mAbs berekend (Figuur 2.13). Hieruit blijkt dat de mAbs 1G12 (175 ± 22), 3C11 (149 ± 8), 7H12 (139 ± 12), 18E8 (150 ± 27) en 20E9 (179 ± 5), die tegen de C-

terminale staart van ADAMTS13 gericht zijn, de activiteit van ADAMTS13 in sterke mate verhogen. Daarentegen blijkt het mAb 9E2 (64 ± 6), dat tegen het MDTCS domein van ADAMTS13 gericht is, de activiteit van ADAMTS13 voor 36% te inhiberen.



Figuur 2.13: Invloed van de anti-hADAMTS13 mAbs op de activiteit van ADAMTS13 in de FRETS-VWF73 *assay* (n=3). Op basis van de richtingscoëfficiënt van de NHP ijkcurve werd de activiteit van ADAMTS13 berekend in aanwezigheid van de respectievelijke mAbs. De mAbs 1G12, 3C11, 7H12, 18E8 en 20E9 zorgen voor een significant verhoogde activiteit van ADAMTS13, terwijl het mAb 9E2 een inhiberende werking op de activiteit van ADAMTS13 blijkt te hebben (ongepaarde t-test, *two-tailed*, $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**), $p = 0,0001$ (***)).

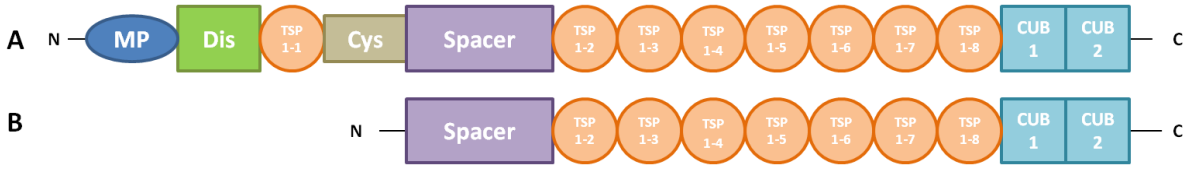
Het mAb 9E2, gericht tegen het kopdomein van ADAMTS13, zorgt dus voor een lagere ADAMTS13 activiteit. De mAbs 1G12, 3C11, 7H12, 18E8 en 20E9, gericht tegen het staart-domein van ADAMTS13, zorgen daarentegen voor een gestimuleerde ADAMTS13 activiteit.

2.3 De constructie van de hSpacerC2 mutant van ADAMTS13

De rol van de staart van ADAMTS13 en zijn functie kan enerzijds bestudeerd worden met behulp van mAbs (paragraaf 2.2), aangezien op deze wijze rekening gehouden wordt met de conformatie van ADAMTS13. Anderzijds kan de functie van de staart van ADAMTS13 ook bestudeerd worden door gebruik te maken van diverse mutanten van ADAMTS13 (waarvan een deel wordt weergegeven in figuur 1.1, paragraaf 1.2.6). Hierbij kan de functionaliteit van de mutant vergeleken worden met deze van het wildtype ADAMTS13. Het gebruik van mutanten heeft echter als nadeel de structurele integriteit van het enzym kan verstoord worden, waardoor de bekomen resultaten moeilijker interpreteerbaar zijn. Toch kan deze techniek extra informatie verlenen, wat van heel groot belang is binnen dit onderzoeks-domein.

In deze context werd een mutant van hADAMTS13 gekloneerd die bestaat uit het spacer domein, de zeven TSP1 domeinen en de twee CUB domeinen, genaamd hSpacerC2 (Figuur 2.14 B). Mutanten die heel het staartdomein of delen van het staartdomein van ADAMTS13

omvatten werden reeds gekloneerd (Figuur 1.1, paragraaf 1.2.6), maar tot op de dag van vandaag werd nog geen mutant ontwikkeld die niet alleen bestaat uit het staartdomein, maar ook een belangrijk domein van de kop van ADAMTS13 bevat, nl. het spacer domein. Zoals reeds vermeld, speelt het spacer domein van ADAMTS13 een cruciale rol in de herkenning van het A2 domein van VWF (paragraaf 4, Literatuurstudie, Deel I). De constructie van de hSpacerC2 mutant zou op deze wijze belangrijk inzicht kunnen geven in de coöperativiteit tussen het spacer domein en de staart van ADAMTS13 in de binding aan VWF.

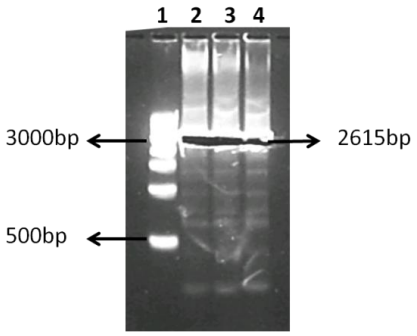


Figuur 2.14: Het *full-length* ADAMTS13 en de hSpacerC2 mutant van ADAMTS13. (A) *Full-length* ADAMTS13 bestaat uit een metalloprotease domein, een disintegrine achtig domein, 8 TSP1 *repeats*, een cysteïne domein, een spacer domein en twee CUB domeinen. (B) De hSpacerC2 mutant bestaat uit het spacer domein, de 7 C-terminale TSP1 domeinen en de 2 CUB domeinen van ADAMTS13.

2.3.1 Kloneringsstrategie

Opdat het hSpacerC2 DNA fragment de promotor van *full-length* hADAMTS13 niet kan gebruiken (aangezien het DNA fragment dat codeert voor de M, D, TSP1-1 en C nog tussen de promoter en het hSpacerC2 fragment gelegen is), werd geopteerd om dit fragment in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector te kloneren, omdat deze vector zelf een promoter bevat.

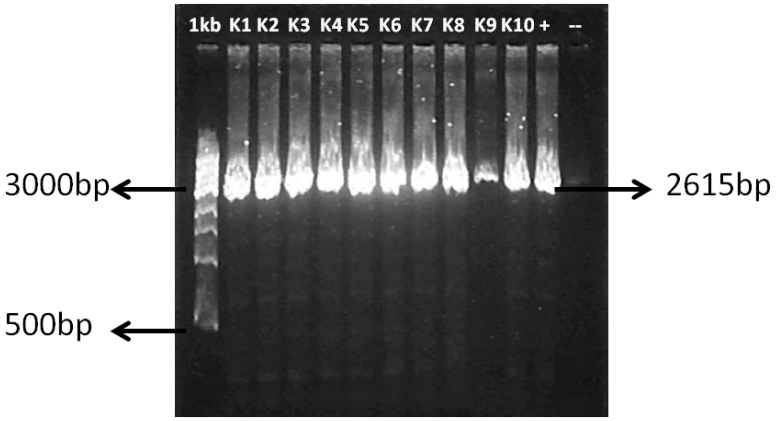
Na de constructie van de specifieke primers, werd het hSpacerC2 DNA fragment via PCR geamplificeerd uit de pcDNA4/TO-hADAMTS13 vector, waarin hADAMTS13 reeds gekloneerd was (paragraaf 1.3.1). Om na te gaan of de amplificatiereactie correct verlopen was, werd het PCR staal op een 1% agarosegel geladen (Figuur 2.15). Op de 1% agarose-gel was een intens bandje te zien van ongeveer 3000 bp. Het hSpacerC2 DNA fragment is 2615 bp groot en komt dus overeen met het bandje dat op ongeveer 3000 bp hoogte ligt.



Figuur 2.15: Visualisatie van hSpacerC2 DNA fragment op een 1% agarosegel na PCR amplificatie uit de pcDNA4/TO-hADAMTS13 vector. Laan 1: 1kb DNA ladder 'New England Biololabs'. Laan 2-4: Het PCR amplificatieproduct dat uit de gel geknipt werd. Het hSpacerC2 fragment is 2615 bp groot en werd op de verwachte hoogte op de agarosegel teruggevonden, waarna het uitgeknipt werd voor verdere kloneringsstappen.

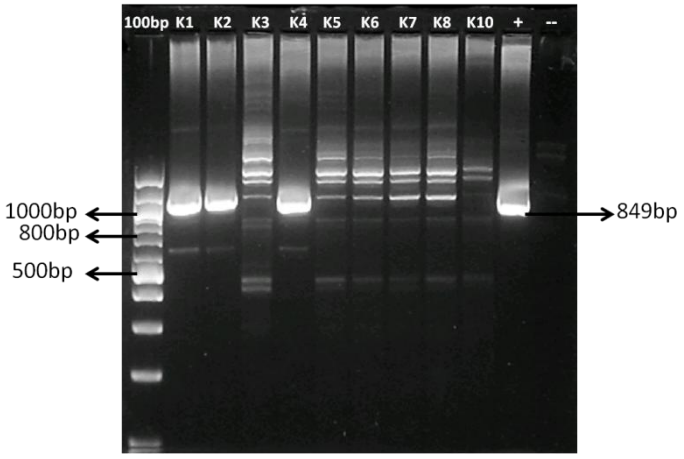
Het geamplificeerde DNA fragment werd uit de 1% agarosegel gesneden en opgezuiverd om vervolgens een 3' A-overhang aan het geamplificeerde DNA fragment toe te voegen zodat het in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector geligeerd kon worden (paragraaf 1.3.2). Om het volume aan DNA te bepalen dat aan het ligatiemengsel toegevoegd moest worden, werd het fragment na een PCR *clean-up* opnieuw op een 1% agarosegel geladen om een concentratieschatting uit te voeren. De concentratieschatting gebeurde aan de hand van de 1 kb 'New England Biolabs' DNA ladder. De verschillende bandjes die op de ladder te zien zijn hebben een verschillende intensiteit, die gecorreleerd is met hun massa. De intensiteit van het bandje dat overeenkomt met het hSpacerC2 DNA fragment lag echter hoger dan door de ladder gedetecteerd kon worden (resultaten niet weergegeven), waardoor beslist werd om slechts 0,5 µl van het PCR product aan het ligatiemengsel toe te voegen.

Na de ligatie van het hSpacerC2 DNA fragment in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector, werd deze vector vervolgens getransformeerd in TOP10 *E. coli* bacteriecellen (paragraaf 1.3.2). Na het opgroeien van de kolonies werden 10 kolonies geselecteerd en geënt in vloeibaar LB medium, zodat het vector DNA met behulp van een miniprep per geselecteerde kolonie geïsoleerd kon worden (paragraaf 1.3.3). De aanwezigheid van het hSpacerC2 DNA fragment in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector werd nagegaan door per kolonie een insert-insert PCR uit te voeren op het geïsoleerde vector DNA en de geamplificeerde stalen terug te laden op een 1% agarosegel (Figuur 2.16). Op basis van de 1% agarosegel kan besloten worden dat alle kolonies het hSpacerC2 DNA fragment bevatten, wat dus wil zeggen dat hSpacerC2 succesvol gekloneerd werd in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector. De intensiteit van het bandje van kolonie 9 is echter veel lichter dan deze van alle andere kolonies, waardoor het DNA van deze kolonie uit de verdere analyses werd weggelaten.



Figuur 2.16: Bepaling van de aanwezigheid van het hSpacerC2 fragment in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector. Dit werd nagegaan door de geamplificeerde stalen op een 1% agarosegel te laden. 1kb: 1kb DNA ladder 'New England Biolabs '. K1: kolonie 1 tot en met K10: kolonie 10. + : positieve controle pcDNA4/TO-hADAMTS13. - : negatieve controle met MQ in plaats van het vector DNA. In alle kolonies bleek het fragment aanwezig te zijn.

Het hSpacerC2 DNA fragment kon echter in twee richtingen in de vector geligeerd zijn. Het hSpacerC2 fragment heeft immers aan beide zijden van het fragment een 3' A-overhang en de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector heeft langs beide zijden een 3' T-overhang, waardoor het fragment in twee richtingen in de vector geligeerd kon worden. Om de kolonies te selecteren waarbij het hSpacerC2 DNA fragment in de correcte richting geligeerd werd in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector, werd een vector-insert PCR uitgevoerd op het vector DNA (paragraaf 1.3.4). Hiervoor werden primers gekozen die de overhang tussen het C-terminale gedeelte van ADAMTS13 (CUB1 en CUB2) en de BGH *reverse priming site* van de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector via PCR reactie amplificeren (indien het insert weliswaar in de correcte richting in de vector aanwezig is). Via een 1,5% agarosegel werd bepaald of er amplificatieproduct te zien was (Figuur 2.17). Indien er geen bandje op de juiste hoogte te zien is, betekent dit dat het fragment fout in de vector geligeerd werd. Het fragment tussen het CUB1 domein en de BGH *reverse priming site* bestaat in totaal uit 849 bp. Enkel de kolonies 1, 2 en 4 vertonen een bandje ter hoogte van deze grootte en bevatten dus het hSpacerC2 DNA fragment in de gewenste richting in de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector. Deze drie kolonies werden vervolgens opgestuurd voor sequentiebepaling om de sequentieovergang tussen het hSpacerC2 fragment en de pSecTag/FRT/V5-His TOPO® vector na te gaan. Deze sequenties werden geanalyseerd en er werd besloten om met kolonie 1 verder te werken. Op deze kolonie werd dan ook een megaprep uitgevoerd om een grote hoeveelheid vector DNA te bekomen voor de volledige sequentiebepaling, voor HI en voor transfectie van eukaryote cellen (paragraaf 1.3.5).



Figuur 2.17: Identificatie van de kolonies waarin het hSpacerC2 DNA fragment in de correcte richting aanwezig is in de pSec/Tag/FRT/V5-His TOPO® vector. De vector-insert PCR amplificatieproducten werden gevisualiseerd door ze op een 1,5% agarosegel te laden. 100 bp: 100 bp DNA ladder 'New England Biolabs'. K1: kolonie 1, … , K8: kolonie 8. K10: kolonie 10. + : positieve controle pSec/Tag/FRT/V5-His TOPO® vector-hT2C2 (reeds in labo aanwezig). - : negatieve controle, amplificatie met MQ in plaats van vector DNA . Het fragment van het CUB1 domein tot aan de BGH r*everse priming site* bestaat uit 849 bp. Bij de kolonies 1, 2 en 4 werd een bandje op de correcte hoogte gevisualiseerd.

Na de megaprep werd de gekloneerde hSpacerC2-TOPO vector voor een volledige sequentiebepaling opgestuurd en werd de volledige sequentie gecontroleerd op eventuele mutaties (paragraaf 1.3.6). Tijdens de controle werd opgemerkt dat er een puntmutatie opgetreden was in het spacer domein ter hoogte van het basepaar 108 (Figuur 2.18). Wanneer het leesraam echter gevolgd wordt, betekent dit dat het ACA codon gemuteerd werd naar een ACG codon. Beide codons coderen voor hetzelfde AZ (threonine), wat wil zeggen dat deze puntmutaties geen verdere problemen zou mogen opleveren. Bijgevolg werd er beslist om, ondanks deze ene puntmutatie, verder te werken met dit construct.

```
AATATGTCACATTTCTG
AATATGTCACGTTTCTG
**********.******
```

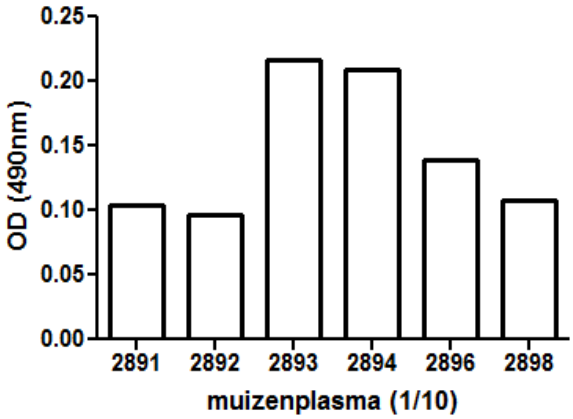
Figuur 2.18: Aanwezigheid van puntmutatie in de hSpacerC2-TOPO vector. Het basepaar 108 in het spacer domein werd van een A naar een G gemuteerd. Volgens het leesraam werd het ACA codon gemuteerd naar een ACG codon. Beide codons coderen voor hetzelfde AZ (threonine), waardoor deze puntmutatie geen verdere problemen zou mogen vormen.

2.3.2 Expressie van het hSpacerC2 construct

Het is reeds geweten dat bepaalde mutanten van ADAMTS13 moeilijk of niet tot expressie komen. Dit risico bestaat dus ook voor dit construct, waardoor het al dan niet tot expressie komen eerst gecontroleerd moest worden vooraleer het tijdsconsumerende transfectie-protocol in gang werd gezet. Een snelle techniek om te bepalen of een construct al dan niet tot expressie wordt gebracht, is de HI van de hSpacerC2-TOPO vector in muizen (paragraaf

1.3.7). Door de HI, wordt de vector door de levercellen van de muis opgenomen en wordt de mutant al dan niet tot expressie gebracht. Indien de mutant tot expressie gebracht wordt, wordt deze vrijgezet in de bloedbaan van de muis en kan dit na bloedname met behulp van ELISA gedetecteerd worden (paragraaf 1.3.7).

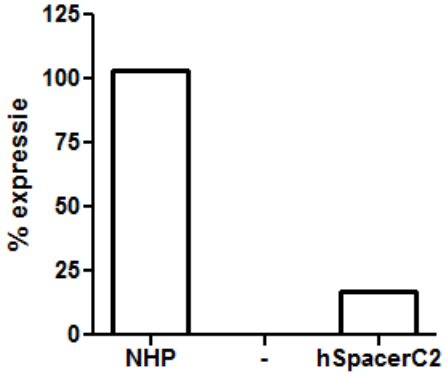
Zes VWF$^{+/+}$ muizen werden hydrodynamisch geïnjecteerd (muizen 2891, 2892, 2893, 2894, 2896 en 2898) met 10 µg van de hSpacerC2-TOPO vector. Het bloed van de muizen werd één, vier en zeven dagen na injectie afgenomen op citraat, waardoor het plasma geïsoleerd kon worden en vervolgens getest kon worden in ELISA (paragraaf 1.3.7). Initieel werd getracht om de hSpacerC2 mutant te detecteren met 5C11 (gericht tegen het TSP1-2 domein) als coating, maar dit leverde echter een negatief resultaat op. De hSpacerC2 mutant bevat aan zijn C-terminale uiteinde ook een V5-tag, waardoor in tweede instantie nagegaan werd of de mutant gedetecteerd kon worden met een anti-V5 mAb als coating. Dit was inderdaad het geval voor de muizen 2893 en 2894, hoewel het signaal weliswaar relatief laag was (Figuur 2.19). Het signaal was echter volledig verdwenen op vier en zeven dagen na de injectie (resultaten niet weergegeven). Hoewel het signaal laag is, wil dit toch zeggen dat de hSpacerC2 mutant tot expressie komt, waardoor beslist werd om het transfectieprotocol in gang te zetten.



Figuur 2.19: Screening op de aanwezigheid van de hSpacerC2 mutant in het plasma van zes VWF$^{+/+}$ muizen (2891, 2892, 2893, 2894, 2896 en 2898), één dag na HI. Twee van de zes geïnjecteerde muizen (2893 en 2894) hebben bij een 1/10 plasmaverdunning een OD_{490nm} die hoger ligt dan 0,2. Het lijkt er dus op dat deze twee muizen de hSpacerC2 mutant in lage niveaus tot expressie brachten.

Flp-In CHO cellen werden getransfecteerd met de hSpacerC2-TOPO vector (paragraaf 1.3.8). Nadat de getransfecteerde cellen volgroeid waren, werd er serumvrij expressie-medium op de cellen gebracht. De aanwezigheid van de hSpacerC2 mutant in het expressie-medium werd nagegaan via ELISA (paragraaf 1.3.8), waaruit bleek dat de hSpacerC2 mutant duidelijk tot expressie wordt gebracht door de getransfecteerde Flp-In CHO cellen (Figuur 2.20). Berekeningen gaven aan dat er zo'n 17% expressie was van het hSpacerC2

construct ten opzichte van de NHP ijk, in tegenstelling tot de negatieve controle, waarbij er geen signaal werd opgepikt.



Figuur 2.20: Screening op de aanwezigheid van de hSpacerC2 mutant in het expressiemedium van de getransfecteerde Flp-In CHO cellen. De hSpacerC2 mutant komt duidelijk tot expressie door de getransfecteerde Flp-In CHO cellen. In vergelijking met de NHP ijk is er zo'n 17% expressie van de hSpacerC2 mutant. Bij de negatieve controle (-) werd er geen signaal gedetecteerd.

3. Discussie

Het hemostatisch actief metalloprotease ADAMTS13 speelt een belangrijke rol in de regulatie van de multimeergrootte van VWF. ADAMTS13 bevat geen specifieke inhibitor en zijn activiteit wordt voornamelijk gecontroleerd door de beschikbaarheid van de knipplaats van VWF. De proteolyse van VWF door ADAMTS13 gebeurt in verschillende stappen, maar het exacte werkingsmechanisme is nog niet volledig opgehelderd. Deficiëntie van ADAMTS13, door mutaties of door de ontwikkeling van autoAbs, leidt tot de levens-bedreigende ziekte TTP. Het ontrafelen van het werkingsmechanisme van ADAMTS13 kan dan ook helpen om TTP beter te begrijpen, aangezien er heel wat variabiliteit is tussen verschillende patiënten. In het afgelopen decennium werd reeds intensief onderzoek gedaan naar de rol van het MDTCS kopdomein in de proteolyse van VWF, aangezien dit kopdomein over de katalytische site beschikt. Over dit kopdomein is geweten dat het een cruciale rol speelt in de herkenning en positionering van ADAMTS13 ten opzichte van de knipplaats in VWF. Hierbij toonde de onderzoeksgroep van Voorberg aan dat de AZ R^{660}, Y^{661} en Y^{665} van het spacer domein cruciaal zijn voor de interactie met het VWF A2 domein (Pos *et al.*, 2010). Vooral onder statisch denaturerende condities werd aangetoond dat de MDTCS mutant even actief is als het wildtype ADAMTS13 en op zich voldoende zou zijn om VWF te knippen (Zheng *et al.*, 2003).

Over de rol van de C-terminale TSP1 *repeats* en CUB domeinen van ADAMTS13 bestaat er echter nogal veel controverse. De resultaten van *in vitro* studies vertonen weinig consistentie wat betreft het relatief belang van de C-terminale TSP1 en CUB domeinen in de substraat-herkenning en de activiteit van ADAMTS13. Er zijn aanwijzingen dat de staart een rol zou spelen bij de initiële binding van ADAMTS13 aan gevouwen VWF (Tao *et al.*, 2005a; Zhang *et al.*, 2007; Feys *et al.*, 2009; Zanardelli *et al.*, 2009; De Maeyer *et al.*, 2010). Terwijl op basis van *flow* en *in vivo* gebaseerde resultaten de staart eerder wordt gezien als negatieve regulator van de ADAMTS13 activiteit (Tao *et al.*, 2005b; De Maeyer *et al.*, 2010). Tot op de dag van vandaag zijn heel wat experimenten rond de rol van de C-terminale staart van ADAMTS13 gebaseerd op het gebruik van mutante getrunceerde vormen van ADAMTS13, waarin specifieke domeinen verwijderd werden (Majerus *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Feys *et al.*, 2009; De Maeyer *et al.*, 2010). Het probleem hierbij is dat de oorspronkelijke structuur van het enzym volledig gewijzigd kan zijn. Tijdens deze masterthesis werd getracht om meer inzicht te krijgen in de rol van de C-terminale staart van ADAMTS13 via de ontwikkeling van zowel anti-muis als anti-humaan ADAMTS13 mAbs. Op die manier kunnen tijdens de verschillende *in vitro assays* de verschillende domeinen van ADAMTS13 getarget worden, terwijl de fysiologische structuur van ADAMTS13 zoveel mogelijk behouden blijft.

De eerste stap in het onderzoek naar de *in vivo* rol van de staart van ADAMTS13

Voor de ontwikkeling van anti-mADAMTS13 mAbs, was het noodzakelijk om eerst voldoende mADAMTS13 te produceren, zodat de ADAMTS13$^{-/-}$ muizen hiermee geïmmuniseerd konden worden. De succesvolle subklonering leverde een HEK T-REx subklone op die 6 keer meer mADAMTS13 tot expressie brengt (Figuur 2.1). Via opzuiveringen met behulp van een nikkelkolom werd voldoende zuiver materiaal bekomen (Figuur 2.2), waardoor tot de immunisaties en screenings kon worden overgegaan. Hoewel de Ab titers aan anti-mADAMTS13 Abs in de geïmmuniseerde muizen voldoende waren (Figuur 2.3), leverden de fusies geen positieve klones op onder andere vanwege een algemene besmetting van de 96-well cultuurplaten. Ondanks de besmetting werden de wells waarin nog geen besmetting te zien was en wel uitgroei was, gescreend, maar deze bleken ook negatief te zijn. Dat de fusie bij mADAMTS13 moeilijker verloopt dan bij hADAMTS13 valt deels te verklaren door het feit dat de gebruikte SP2/0 myelomacellen afkomstig zijn van Balb/C muizen, de muizenstam die gebruikt wordt voor de immunisaties met hADAMTS13. De immunisaties met mADAMTS13 werden echter uitgevoerd met C57BL/6J x 129Sv x CASA/Rk muizen, waardoor de genetische achtergrond van de miltcellen van deze muizen minder compatibel was met deze van de SP2/0 myelomacellen. Om de rol van mADAMTS13 in de muis verder te kunnen bestuderen en zo ook een *in vivo* proefdiermodel te kunnen ontwikkelen van verworven TTP, is het dus naar de toekomst toe van groot belang dat er opnieuw immunisaties worden uitgevoerd.

Het ontrafelen van de rol van de staart van ADAMTS13 via diverse *in vitro* studies

De immunisaties van wildtype Balb/C muizen met hADAMTS13 waren meer succesvol. Hierbij werden twaalf mAbs ontwikkeld tegen hADAMTS13, waarvan er drie gericht zijn tegen het MDTCS kopdomein (6A6, 7E6 en 9E2) en negen tegen de C-terminale staart van ADAMTS13 (1G12, 3C11, 4B9 B10, 7H12, 10F8, 12H5, 16A7 B5, 18E8 en 20E9). Hoewel de meeste anti-staart mAbs tegen het CUB2 gericht zijn, werd er ook een mAb ontwikkeld dat gericht is tegen de TSP1-4 en TSP1-5 domeinen (4B9 B10, Figuur 2.7).

a. Anti-MDTCS kopdomein mAbs

De mAbs 6A6 en 7E6, die gericht zijn tegen het MDTCS kopdomein van ADAMTS13, reduceren in een statische *assay* de binding van ADAMTS13 aan ontvouwen VWF voor respectievelijk 52% en 41% (Figuur 2.10). In de FRETS-VWF73 *assay,* waar de invloed van de mAbs op de activiteit van ADAMTS13 (terug onder statische condities) kan worden nagegaan, werd echter geen verandering in de activiteit van ADAMTS13 waargenomen in aanwezigheid van de mAbs 6A6 en 7E6 (Figuur 2.13). Bij de interpretatie van de resultaten

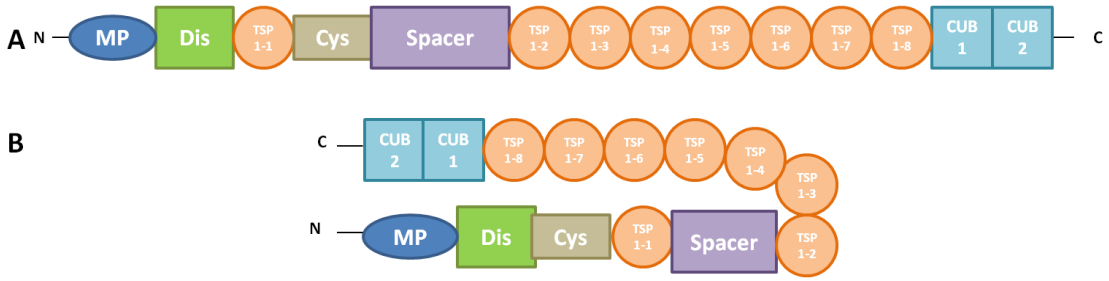
van de FRETS-VWF73 *assay* is het echter wel belangrijk dat er rekening wordt gehouden met het feit dat er enkel een klein deel van het A2 domein van VWF (VWF73) wordt toegevoegd en niet het volledige (*full-length*) VWF. De FRETS-VWF73 *assay* is onder specifieke condities een goede, betrouwbare en snelle *assay* om de functionaliteit van ADAMTS13 te bestuderen, maar representeert in mindere mate de reële fysiologische toestand in de bloedstroom. Er kan mogelijks een conformatieverschil zijn tussen het VWF73 substraat en hetzelfde domein in *full-length* VWF. Dit zou kunnen verklaren waarom de mAbs 6A6 en 7E6 zorgen voor een gereduceerde binding van ADAMTS13 aan ontvouwen VWF en niet voor een gereduceerde activiteit van ADAMTS13 op het VWF73 substraat. De gereduceerde binding van ADAMTS13 werd echter niet waargenomen op het gevouwen, globulair VWF, wat doet vermoeden dat de regio's waarop deze twee mAbs binden in het MDTCS domein niet belangrijk zijn voor de initiële herkenning van gevouwen VWF, maar wel wanneer VWF reeds ontrold is. Verdere epitoop *mapping* studies zullen uitwijzen tegen welk domein van de kop deze mAbs precies gericht zijn.

Ook het mAb 9E2 is tegen het MDTCS kopdomein van ADAMTS13 gericht. In de FRETS-VWF73 *assay* zorgde dit mAb, in tegenstelling tot de mAbs 6A6 en 7E6, weldegelijk voor een reductie van 36% in de katalytische activiteit van ADAMTS13 (Figuur 2.13). Dit resultaat ligt in dezelfde lijn als deze van onze onderzoeksgroep (Feys, 2006) en die van de onderzoeks-groep van Igari (2012), die ook aantoonde dat mAbs gericht tegen de kop van ADAMTS13 een inhibitorisch werking kunnen hebben op de katalytische activiteit van ADAMTS13 in de FRETS-VWF73 *assay* (Feys, 2006, Igari *et al.*, 2012). De inhibitorische rol van 9E2 en de mAbs van onze onderzoeksgroep en die van Igari (2012), valt te verklaren doordat het kop-domein van ADAMTS13 het katalytisch actief centrum en verschillende exosites bevat. De gedeeltelijke inhibitie van de activiteit van ADAMTS13 zou bijgevolg kunnen verklaard worden doordat het mAb aan één van de exosites in het MDTCS domein van ADAMTS13 bindt en daardoor de positionering van MDTCS op het A2 domein gedeeltelijk verstoort, waardoor de katalytische activiteit van ADAMTS13 daalt.

b. Anti-staart ADAMTS13 mAbs

De anti-staart ADAMTS13 mAbs vertonen een volledig tegengestelde invloed op de activiteit van ADAMTS13 ten opzichte van de anti-kop ADAMTS13 mAbs. Zo zorgen 5 van de 9 anti-staart ADAMTS13 mAbs (1G12, 3C11, 7H12, 18E8, 20E9), gericht tegen het CUB2 domein (Figuur 2.7), in de FRETS-VWF73 *assay* voor een significant hogere activiteit van ADAMTS13 dan in afwezigheid van deze mAbs (Figuur 2.13). Het is de eerste keer binnen dit onderzoeksdomein dat een gestimuleerde activiteit van *full-length* ADAMTS13 aangetoond werd. Ook met behulp van deletiemutanten van ADAMTS13 kon de activiteit van

ADAMTS13 niet gestimuleerd worden (De Maeyer *et al.*, 2010), wat duidt op het belang van de conformatie van ADAMTS13 in zijn functie. Ook de resultaten van bij de onderzoeksgroep van Igari (2012), heeft enkel anti-C-terminale staart mAbs ontwikkeld die een een zwak inhibitorische werking hadden in de FRETS-VWF73 *assay* (Igari *et al.*, 2012). Hun Abs binden aan de TSP1 domeinen, terwijl de onze ter hoogte van het CUB2 domein van ADAMTS13 binden, wat vermoedelijk het verschil in het modulerend effect van de Abs verklaart. De resultaten bekomen met onze activerende mAbs zijn in lijn met de hypothese waarbij de C-terminale staart van ADAMTS13 de katalytisch actieve site zou afschermen en als een negatieve regulator van de ADAMTS13 activiteit zou dienen (Tao *et al.*, 2005b; De Maeyer *et al.*, 2010). Dit impliceert dat er een evenwicht is tussen een inactieve gesloten conformatie en een actieve open conformatie van ADAMTS13 (Figuur 3.1). De aanwezigheid van de C-terminale mAbs zou een conformationele verandering richting de open vorm kunnen veroorzaken waardoor de katalytische plaats van ADAMTS13 vrij komt te liggen en zo zorgt voor een snellere proteolyse van VWF73. De mAbs zouden ook kunnen helpen om inzicht te krijgen in de structuur van *full-length* ADAMTS13. Zo zou een activerend mAb de open conformaties kunnen vastzetten, zodat het misschien mogelijk wordt om een kristal-structuur van ADAMTS13 te bepalen. Anderzijds kunnen competitie ELISA's, waarbij gebruik gemaakt wordt van de ontwikkelde mAbs inzicht kunnen geven of bijvoorbeeld de CUB domeinen in hun 3-dimensionele structuur in de buurt liggen van het spacer domein.

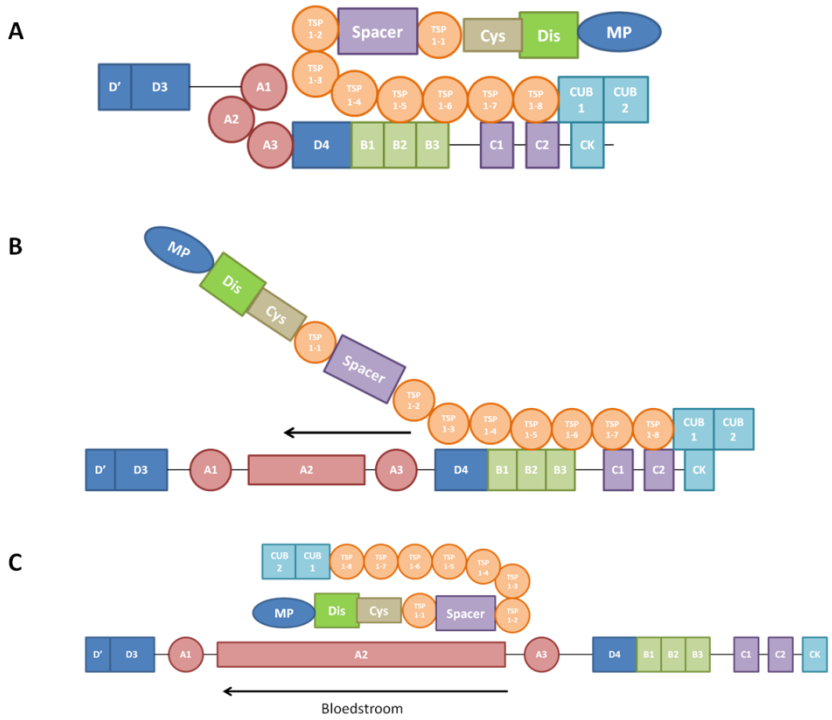


Figuur 3.1: Voorstelling van de hypothese waarbij ADAMTS13 een evenwicht zou vormen tussen een open en een gesloten conformatie. (A) De open conformatie van ADAMTS13 zou leiden tot de proteolyse van VWF indien de knipplaatsen voor ADAMTS13 beschikbaar zijn. (B) In de gesloten conformatie zou de C-terminale staart van ADAMTS13 het katalytisch domein kunnen afschermen, waardoor de staart de rol krijgt van negatieve regulator voor de ADAMTS13 activiteit.

Grotendeels dezelfde anti-staart ADAMTS13 mAbs (1G12, 3C11 en 18E8) stimuleren niet alleen de activiteit van ADAMTS13, maar zorgen bovendien ook voor een verhoogde binding van ADAMTS13 aan gevouwen, globulair VWF (Figuur 2.11), maar niet aan ontvouwen VWF (Figuur 2.10). Hieruit rijst het vermoeden dat de staart naast zijn mogelijke rol als negatieve regulator van de ADAMTS13 activiteit en zijn rol bij de initiële binding aan gevouwen VWF (Zanardelli *et al.*, 2009), ook een rol zou spelen bij het helpen vrijzetten van de spacer bindingsplaats in het VWF A2 domein (Zanardelli *et al.*, 2006). Deze veronderstelling kan bijgestaan worden door de bevindingen dat binding van *full-length* ADAMTS13 aan

gevouwen VWF partieel geïnhibeerd kan worden door een anti-spacer Ab (niet gepuliceerde resultaten uit onze groep), terwijl de MDTCS variant op zich niet blijkt te binden aan gevouwen VWF. Dat deze hogere binding niet wordt gezien bij ontvouwen VWF is waarschijnlijk te verklaren door de rechtstreekse toegankelijkheid van het VWF A2 domein voor het MDTCS kopdomein van ADAMTS13.

De hypothese die uit onze resultaten tot stand komt richt zich vooral op het feit dat de staart van ADAMTS13 waarschijnlijk belangrijk is als een negatieve regulator van de katalytische activiteit van ADAMTS13 door het partieel afschermen van de katalytische site (Figuur 3.1 B). Dit volgt vooral uit de resultaten van de FRETS-VWF73 *assay*, waarbij de aanwezigheid van de C-terminale mAbs ADAMTS13 richting een gestimuleerde activiteit duwen. Bovendien speelt de C-terminale staart van ADAMTS13 hoogstwaarschijnlijk ook een belangrijke rol bij het herkennen van natief, gevouwen VWF, waarbij de A2 bindingsplaatsen voor het MDTCS kopdomein verborgen liggen in zijn structuur (Figuur 3.2 A). Binden van de C-terminale staart zou dan eveneens bijdragen tot het vrijzetten van de spacer bindings-plaats in het A2 domein (Figuur 3.2 B). Wanneer schuifstress zorgt voor de blootstelling van de A2 bindingsplaatsen vervalt de rol van de C-terminale staart in het herkennen van VWF mogelijks, aangezien de gestimuleerde binding van ADAMTS13 in aanwezigheid van de C-terminale mAbs niet te zien is bij ontvouwen VWF (Figuur 3.2 C).



Figuur 3.2: Hypothese voor het binden van ADAMTS13 aan VWF. (A) De C-terminale staart van ADAMTS13 speelt mogelijks een rol bij de initiële binding van ADAMTS13 aan gevouwen VWF, waarbij de knipplaats in het A2 domein van VWF verborgen ligt in zijn structuur. (B) Het binden van de C-terminale staart van ADAMTS13 aan gevouwen VWF zou misschien kunnen zorgen voor het vrijzetten van de A2 knipplaats door het induceren van een conformatieverandering. (C) De rol van de staart van ADAMTS13 vervalt mogelijks indien VWF reeds ontrold is door de bloedstroom, aangezien de knipplaats in het A2 domein van VWF dan rechtstreeks toegankelijk is voor het MDTCS kopdomein van ADAMTS13.

Dit model staat echter op heel wat veronderstellingen. Het is dan ook ten sterkste aangewezen om nog verder onderzoek te doen met de ontwikkelde mAbs. Aangezien deze mAbs tot nu toe enkel onder statische condities getest werden is het zeker ook belangrijk dat deze nog getest worden in experimenten zoals *flow* kamers en vortex *assay.* In de *flow* kamer *assay* zal vooral de invloed op de activiteit van ADAMTS13 bekeken kunnen worden. De aanwezigheid van de anti-CUB2 mAbs zouden de activiteit van ADAMTS13 moeten verhogen, terwijl de anti-MDTCS mAbs de activiteit van ADAMTS13 gedeeltelijk zouden moeten inhiberen. De conformatieverandering geïnduceerd door het binden van de staart, waarbij de A2 domeinen vrijgezet worden, kan hier niet bestudeerd worden, aangezien de bloedstroom hier gesimuleerd wordt, waarbij het VWF reeds ontrold werd en de A2 domeinen onmiddellijk toegankelijk zijn voor het MDTCS kopdomein. Deze inductie van conformatieverandering kan eerder in de vortex *assay* bestudeerd worden, waarbij de aanwezigheid van de anti-CUB2 mAbs tot een verhoogde proteolyse van VWF zou moeten leiden wanneer geen of lage *shear* gebruikt wordt, terwijl de aanwezigheid van de anti-MDTCS mAbs de activiteit van ADAMTS13 zouden moeten verlagen.

De ontwikkeling van de hSpacerC2 mutant

Via een mutant die bestaat uit het spacer domein en de C-terminale staart van ADAMTS13 kan mogelijks de coöperativiteit tussen beide domeinen achterhaald worden. Hiervoor was het belangrijk dat dit fragment eerst gekloneerd werd, wat ook succesvol gelukt is. Vervolgens werd de expressie van dit fragment nagegaan door C57BL/6J $VWF^{+/+}$ muizen hydrodynamisch te injecteren met het hSpacerC2 construct. In het plasma werd slechts een lage expressie van het hSpacerC2 fragment vastgesteld (Figuur 2.19). De lage expressie kan het gevolg zijn van de aanwezigheid van een CMV promotor in plaats van een lever-specifieke promotor. De lage expressie kan evengoed te wijten zijn aan de mutant die mogelijks een gewijzigde conformatie heeft, waardoor deze minder goed gesecreteerd wordt. Aangezien het construct tot expressie kwam in de muizen, werd een transfectie uitgevoerd op Flp-In CHO cellen. Ook hier kon expressie van het construct aangetoond worden (Figuur 2.20). Naar de toekomst toe is het hier belangrijk dat een subklonering wordt uitgevoerd om een goed producerende hSpacerC2 klone te bekomen. Deze mutant kan dan na opzuivering gebruikt worden in tal van experimenten om de coöperativiteit tussen het spacer domein en de C-terminale staart van ADAMTS13 te achterhalen. Zo kan het hSpacerC2 bijvoorbeeld gebruikt worden bij het uitvoeren van *flow* kamer experimenten, waarbij eerst de mutant en daarna het wildtype hADAMTS13 over de gevormde UL-VWF strengen wordt gebracht en waarbij de invloed op de proteolyse van VWF bekeken wordt.

Ter conclusie werden tijdens deze masterthesis mAbs ontwikkeld die voornamelijk gericht zijn tegen het CUB2 domein van de staart van ADAMTS13. Deze mAbs zorgen voor een verhoogde binding van ADAMTS13 aan gevouwen VWF en een gestimuleerde ADAMTS13 activiteit. Hieruit volgt de veronderstelling dat de C-terminale staart van ADAMTS13 dienst doet als negatieve regulator van de ADAMTS13 activiteit en bovendien conformatie-veranderingen moet induceren die het vrijzetten van het A2 domein in het gevouwen VWF moet faciliteren. De rol van deze inductie van conformatieveranderingen vervalt echter wanneer de VWF knipplaatsen rechtstreeks toegankelijk zijn in ontvouwen VWF. Daarnaast werden ook enkele anti-MDTCS mAbs ontwikkeld die een gereduceerde binding van ADAMTS13 aan ontvouwen VWF teweeg brengen en bovendien zorgen voor een lagere ADAMTS13 activiteit. Dit geeft aan dat het MDTCS kopdomein belangrijk is voor de correcte binding aan ontvouwen VWF, die uiteindelijk tot de proteolyse van VWF moet leiden. Tenslotte werd ook nog een hSpacerC2 mutant van ADAMTS13 gekloneerd, die een duidelijker beeld kan scheppen over de coöperativiteit tussen het belangrijke spacer domein en het staartdomein van ADAMTS13.

Referenties

Ai, J., Smith, P., Wang, S., Zhang, P., and Zheng, X. L. (2005). The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J Biol Chem* **280**, 29428-34.

Akiyama, M., Takeda, S., Kokame, K., Takagi, J., and Miyata, T. (2009). Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19274-9.

Banno, F., Chauhan, A. K., Kokame, K., Yang, J., Miyata, S., Wagner, D. D., and Miyata, T. (2009). The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood* **113**, 5323-9.

Batty, P., and Smith, J. G. (2010). Haemostasis. *Surgery (Oxford)* **28**, 530-535.

Bergmeier, W., Piffath, C. L., Goerge, T., Cifuni, S. M., Ruggeri, Z. M., Ware, J., and Wagner, D. D. (2006). The role of platelet adhesion receptor GPIbalpha far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16900-5.

Billiau, A., and Matthys, P. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* **70**, 849-60.

Bode, W., Gomis-Ruth, F. X., and Stockler, W. (1993). Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* **331**, 134-40.

Bongers, T. N., de Maat, M. P., van Goor, M. L., Bhagwanbali, V., van Vliet, H. H., Gomez Garcia, E. B., Dippel, D. W., and Leebeek, F. W. (2006). High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. *Stroke* **37**, 2672-7.

Breitenstein, A., Tanner, F. C., and Luscher, T. F. (2010). Tissue factor and cardiovascular disease: quo vadis? *Circ J* **74**, 3-12.

Camilleri, R. S., Cohen, H., Mackie, I. J., Scully, M., Starke, R. D., Crawley, J. T., Lane, D. A., and Machin, S. J. (2008). Prevalence of the ADAMTS-13 missense mutation R1060W in late onset adult thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* **6**, 331-8.

Coppo, P., and Veyradier, A. (2012). Current management and therapeutical perspectives in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Presse Med* **41**, e163-76.

Corash, L., Costa, J. L., Shafer, B., Donlon, J. A., and Murphy, D. (1984). Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. III. Density-dependent differences in subcellular constituents. *Blood* **64**, 185-93.

Cramer, E. M., Harrison, P., Savidge, G. F., Wilbourn, B., Debili, N., Vainchenker, W., and Breton-Gorius, J. (1990). Uncoordinated expression of alpha-granule proteins in human megakaryocytes. *Prog Clin Biol Res* **356**, 131-42.

Crawley, J. T., de Groot, R., and Luken, B. M. (2009). Circulating ADAMTS-13-von Willebrand factor complexes: an enzyme on demand. *J Thromb Haemost* **7**, 2085-7.

Crawley, J. T., de Groot, R., Xiang, Y., Luken, B. M., and Lane, D. A. (2011). Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* **118**, 3212-21.

Crawley, J. T., Lam, J. K., Rance, J. B., Mollica, L. R., O'Donnell, J. S., and Lane, D. A. (2005). Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood* **105**, 1085-93.

De Ceunynck, K., De Meyer, S. F., and Vanhoorelbeke, K. (2013). Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle. *Blood* **121**, 270-7.

de Groot, R., Bardhan, A., Ramroop, N., Lane, D. A., and Crawley, J. T. (2009). Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function. *Blood* **113**, 5609-16.

De Maeyer, B. (2011). VWF processing by ADAMTS13 : unravelling its mode of action. dissertation, Leuven : K.U.Leuven. Faculteit Wetenschappen, 2011, Leuven.

De Maeyer, B., De Meyer, S. F., Feys, H. B., Pareyn, I., Vandeputte, N., Deckmyn, H., and Vanhoorelbeke, K. (2010). The distal carboxyterminal domains of murine ADAMTS13 influence proteolysis of platelet-decorated VWF strings in vivo. *J Thromb Haemost* **8**, 2305-12.

De Meyer, S. F., Deckmyn, H., and Vanhoorelbeke, K. (2009). von Willebrand factor to the rescue. *Blood* **113**, 5049-57.

Denis, C. V., and Lenting, P. J. (2012). von Willebrand factor: at the crossroads of bleeding and thrombosis. *Int J Hematol* **95**, 353-61.

Dent, J. A., Berkowitz, S. D., Ware, J., Kasper, C. K., and Ruggeri, Z. M. (1990). Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6306-10.

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

Dong, J. F., Moake, J. L., Nolasco, L., Bernardo, A., Arceneaux, W., Shrimpton, C. N., Schade, A. J., McIntire, L. V., Fujikawa, K., and Lopez, J. A. (2002). ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* **100**, 4033-9.

Eyre, L., Gamlin, F., Eyre, L., and Gamlin, F. (2010). Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* **11**, 244-246.

Feys, H. (2006). Insights into thrombotic thrombocytopenic purpura by monoclonal antibody-based analysis of the Von Willebrand factor cleaving protease, ADAMTS-13. dissertation, Kortrijk : K.U.Leuven. Faculteit Wetenschappen, 2006, Kortrijk.

Feys, H. B., Anderson, P. J., Vanhoorelbeke, K., Majerus, E. M., and Sadler, J. E. (2009). Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* **7**, 2088-95.

Feys, H. B., Roodt, J., Vandeputte, N., Pareyn, I., Lamprecht, S., van Rensburg, W. J., Anderson, P. J., Budde, U., Louw, V. J., Badenhorst, P. N., Deckmyn, H., and Vanhoorelbeke, K. (2010). Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (Papio ursinus). *Blood* **116**, 2005-10.

Flood, V. H., Lederman, C. A., Wren, J. S., Christopherson, P. A., Friedman, K. D., Hoffmann, R. G., and Montgomery, R. R. (2010). Absent collagen binding in a VWF A3 domain mutant: utility of the VWF:CB in diagnosis of VWD. *J Thromb Haemost* **8**, 1431-3.

Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B., and Chung, D. (2001). Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* **98**, 1662-6.

Furlan, M., Robles, R., and Lammle, B. (1996). Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* **87**, 4223-34.

Galbusera, M., Noris, M., and Remuzzi, G. (2006). Thrombotic thrombocytopenic purpura--then and now. *Semin Thromb Hemost* **32**, 81-9.

Gao, W., Zhu, J., Westfield, L. A., Tuley, E. A., Anderson, P. J., and Sadler, J. E. (2012). Rearranging exosites in noncatalytic domains can redirect the substrate specificity of ADAMTS proteases. *J Biol Chem* **287**, 26944-52.

Gardner, M. D., Chion, C. K., de Groot, R., Shah, A., Crawley, J. T., and Lane, D. A. (2009). A functional calcium-binding site in the metalloprotease domain of ADAMTS13. *Blood* **113**, 1149-57.

George, J. N. (2000). Platelets. *Lancet* **355**, 1531-9.

Gerke, V. (2011). Von Willebrand factor folds into a bouquet. *EMBO J* **30**, 3880-1.

Giblin, J. P., Hewlett, L. J., and Hannah, M. J. (2008). Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood* **112**, 957-64.

Ginsburg, D., Handin, R. I., Bonthron, D. T., Donlon, T. A., Bruns, G. A., Latt, S. A., and Orkin, S. H. (1985). Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* **228**, 1401-6.

Groot, E., de Groot, P. G., Fijnheer, R., and Lenting, P. J. (2007). The presence of active von Willebrand factor under various pathological conditions. *Curr Opin Hematol* **14**, 284-9.

Hamasaki, N., and Okubo, K. (1996). Band 3 protein: physiology, function and structure. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **42**, 1025-39.

Hanson, S. R., and Sakariassen, K. S. (1998). Blood flow and antithrombotic drug effects. *Am Heart J* **135**, S132-45.

Harlow, E., Lane, D., Harlow, E., and Lane, D. (1988). "Antibodies : a laboratory manual," Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor laboratory, 1988, Cold Spring Harbor.

Hofsteenge, J., Huwiler, K. G., Macek, B., Hess, D., Lawler, J., Mosher, D. F., and Peter-Katalinic, J. (2001). C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem* **276**, 6485-98.

Igari, A., Nakagawa, T., Moriki, T., Yamaguchi, Y., Matsumoto, M., Fujimura, Y., Soejima, K., and Murata, M. (2012). Identification of epitopes on ADAMTS13 recognized by a panel of monoclonal antibodies with functional or non-functional effects on catalytic activity. *Thromb Res* **130**, e79-83.

Italiano, J. E., Jr. (2013). Unraveling mechanisms that control platelet production. *Semin Thromb Hemost* **39**, 15-24.

Jacobsen, L. B., Calvin, S. A., Colvin, K. E., and Wright, M. (2004). FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* **33**, 104-12.

Katsumi, A., Tuley, E. A., Bodo, I., and Sadler, J. E. (2000). Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* **275**, 25585-94.

Kim, J., Zhang, C. Z., Zhang, X., and Springer, T. A. (2010). A mechanically stabilized receptor-ligand flex-bond important in the vasculature. *Nature* **466**, 992-5.

Klaus, C., Plaimauer, B., Studt, J. D., Dorner, F., Lammle, B., Mannucci, P. M., and Scheiflinger, F. (2004). Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **103**, 4514-9.

Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-7.

Kokame, K., Nobe, Y., Kokubo, Y., Okayama, A., and Miyata, T. (2005). FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* **129**, 93-100.

Koutts, J., Walsh, P. N., Plow, E. F., Fenton, J. W., 2nd, Bouma, B. N., and Zimmerman, T. S. (1978). Active release of human platelet factor VIII-related antigen by adenosine diphosphate, collagen, and thrombin. *J Clin Invest* **62**, 1255-63.

Kremer Hovinga, J. A., and Lammle, B. (2012). Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2012**, 610-6.

Kumar, R. A., Moake, J. L., Nolasco, L., Bergeron, A. L., Sun, C., Dong, J. F., and McIntire, L. V. (2006). Enhanced platelet adhesion and aggregation by endothelial cell-derived unusually large multimers of von Willebrand factor. *Biorheology* **43**, 681-91.

Kwaan, H. C. (1987). Clinicopathologic features of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* **24**, 71-81.

Lankhof, H., Wu, Y. P., Vink, T., Schiphorst, M. E., Zerwes, H. G., de Groot, P. G., and Sixma, J. J. (1995). Role of the glycoprotein Ib-binding A1 repeat and the RGD sequence in platelet adhesion to human recombinant von Willebrand factor. *Blood* **86**, 1035-42.

Leger, A. J., Covic, L., and Kuliopulos, A. (2006). Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation* **114**, 1070-7.

Lenting, P. J., CJ, V. A. N. S., and Denis, C. V. (2007). Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost* **5**, 1353-60.

Levy, G. G., Nichols, W. C., Lian, E. C., Foroud, T., McClintick, J. N., McGee, B. M., Yang, A. Y., Siemieniak, D. R., Stark, K. R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S. B., Chandrasekaran, V., Stabler, S. P., Sabio, H., Bouhassira, E. E., Upshaw, J. D., Jr., Ginsburg, D., and Tsai, H. M. (2001). Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* **413**, 488-94.

Lisman, T., Weeterings, C., and de Groot, P. G. (2005). Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrin(ogen). *Front Biosci* **10**, 2504-17.

Loirat, C., Veyradier, A., Girma, J. P., Ribba, A. S., and Meyer, D. (2006). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) deficiency in children. *Semin Thromb Hemost* **32**, 90-7.

Luo, G. P., Ni, B., Yang, X., and Wu, Y. Z. (2012). von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol* **128**, 158-69.

Majerus, E. M., Anderson, P. J., and Sadler, J. E. (2005). Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J Biol Chem* **280**, 21773-8.

Manea, M., and Karpman, D. (2009). Molecular basis of ADAMTS13 dysfunction in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Nephrol* **24**, 447-58.

Mannucci, P. M., and Franchini, M. (2012). Advantages and limits of ADAMTS13 testing in the prognostic assessment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Presse Med* **41**, e157-62.

Mayadas, T. N., and Wagner, D. D. (1992). Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3531-5.

McKinnon, T. A., Chion, A. C., Millington, A. J., Lane, D. A., and Laffan, M. A. (2008). N-linked glycosylation of VWF modulates its interaction with ADAMTS13. *Blood* **111**, 3042-9.

McKinnon, T. A., Goode, E. C., Birdsey, G. M., Nowak, A. A., Chan, A. C., Lane, D. A., and Laffan, M. A. (2010). Specific N-linked glycosylation sites modulate synthesis and secretion of von Willebrand factor. *Blood* **116**, 640-8.

Metcalf, D. J., Nightingale, T. D., Zenner, H. L., Lui-Roberts, W. W., and Cutler, D. F. (2008). Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J Cell Sci* **121**, 19-27.

Michaux, G., Pullen, T. J., Haberichter, S. L., and Cutler, D. F. (2006). P-selectin binds to the D'-D3 domains of von Willebrand factor in Weibel-Palade bodies. *Blood* **107**, 3922-4.

Miura, S., Li, C. Q., Cao, Z., Wang, H., Wardell, M. R., and Sadler, J. E. (2000). Interaction of von Willebrand factor domain A1 with platelet glycoprotein Ibalpha-(1-289). Slow intrinsic binding kinetics mediate rapid platelet adhesion. *J Biol Chem* **275**, 7539-46.

Moake, J. L., Rudy, C. K., Troll, J. H., Weinstein, M. J., Colannino, N. M., Azocar, J., Seder, R. H., Hong, S. L., and Deykin, D. (1982). Unusually large plasma factor VIII:von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* **307**, 1432-5.

Monagle, P., and Massicotte, P. (2011). Developmental haemostasis: secondary haemostasis. *Semin Fetal Neonatal Med* **16**, 294-300.

Monroe, D. M., and Hoffman, M. (2006). What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 41-8.

Murrin, R. J., and Murray, J. A. (2006). Thrombotic thrombocytopenic purpura: aetiology, pathophysiology and treatment. *Blood Rev* **20**, 51-60.

Padilla, A., Moake, J. L., Bernardo, A., Ball, C., Wang, Y., Arya, M., Nolasco, L., Turner, N., Berndt, M. C., Anvari, B., Lopez, J. A., and Dong, J. F. (2004). P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood* **103**, 2150-6.

Patel, S. R., Hartwig, J. H., and Italiano, J. E., Jr. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* **115**, 3348-54.

Peyvandi, F., Lavoretano, S., Palla, R., Feys, H. B., Vanhoorelbeke, K., Battaglioli, T., Valsecchi, C., Canciani, M. T., Fabris, F., Zver, S., Reti, M., Mikovic, D., Karimi, M., Giuffrida, G., Laurenti, L., and Mannucci, P. M. (2008). ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission. *Haematologica* **93**, 232-9.

Pimanda, J. E., Ganderton, T., Maekawa, A., Yap, C. L., Lawler, J., Kershaw, G., Chesterman, C. N., and Hogg, P. J. (2004). Role of thrombospondin-1 in control of von Willebrand factor multimer size in mice. *J Biol Chem* **279**, 21439-48.

Plaimauer, B., Kremer Hovinga, J. A., Juno, C., Wolfsegger, M. J., Skalicky, S., Schmidt, M., Grillberger, L., Hasslacher, M., Knobl, P., Ehrlich, H., and Scheiflinger, F. (2011). Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies. *J Thromb Haemost* **9**, 936-44.

Pos, W., Crawley, J. T., Fijnheer, R., Voorberg, J., Lane, D. A., and Luken, B. M. (2010). An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood* **115**, 1640-9.

Pos, W., Luken, B. M., Sorvillo, N., Kremer Hovinga, J. A., and Voorberg, J. (2011). Humoral immune response to ADAMTS13 in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* **9**, 1285-91.

Pruss, C. M., Notley, C. R., Hegadorn, C. A., O'Brien, L. A., and Lillicrap, D. (2008). ADAMTS13 cleavage efficiency is altered by mutagenic and, to a lesser extent, polymorphic sequence changes in the A1 and A2 domains of von Willebrand factor. *Br J Haematol* **143**, 552-8.

Pugh, N., Simpson, A. M., Smethurst, P. A., de Groot, P. G., Raynal, N., and Farndale, R. W. (2010). Synergism between platelet collagen receptors defined using receptor-specific collagen-mimetic peptide substrata in flowing blood. *Blood* **115**, 5069-79.

Raven, P., Johnson, G., Losos, J., and Singer, S. (2008). "Biology," eighth, international edition/Ed. Boston : McGraw-Hill, 2008, Boston.

Reininger, A. J. (2008). Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia* **14 Suppl 5**, 11-26.

Ribba, A. S., Loisel, I., Lavergne, J. M., Juhan-Vague, I., Obert, B., Cherel, G., Meyer, D., and Girma, J. P. (2001). Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb Haemost* **86**, 848-54.

Riddell, A. F., Gomez, K., Millar, C. M., Mellars, G., Gill, S., Brown, S. A., Sutherland, M., Laffan, M. A., and McKinnon, T. A. (2009). Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood* **114**, 3489-96.

Romani de Wit, T., Rondaij, M., van Mourik, J., Romani de Wit, T., Rondaij, M., and van Mourik, J. (2004). Weibel-Palade-lichaampjes : unieke secretieorganellen in endotheelcellen.

Ruggeri, Z. M. (2007). Von Willebrand factor: looking back and looking forward. *Thromb Haemost* **98**, 55-62.

Sadler, J. E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* **67**, 395-424.

Sadler, J. E. (2008). Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **112**, 11-8.

Savage, B., Almus-Jacobs, F., and Ruggeri, Z. M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* **94**, 657-66.

Schneider, S. W., Nuschele, S., Wixforth, A., Gorzelanny, C., Alexander-Katz, A., Netz, R. R., and Schneider, M. F. (2007). Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7899-903.

Schneppenheim, R., Budde, U., Hassenpflug, W., and Obser, T. (2004). Severe ADAMTS-13 deficiency in childhood. *Semin Hematol* **41**, 83-9.

Schoolmeester, A., Vanhoorelbeke, K., Katsutani, S., Depraetere, H., Feys, H. B., Heemskerk, J. M., Hoylaerts, M. F., and Deckmyn, H. (2004). Monoclonal antibody IAC-1 is specific for activated alpha2beta1 and binds to amino acids 199 to 201 of the integrin alpha2 I-domain. *Blood* **104**, 390-6.

Slager, C. J., Wentzel, J. J., Gijsen, F. J., Schuurbiers, J. C., van der Wal, A. C., van der Steen, A. F., and Serruys, P. W. (2005). The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **2**, 401-7.

Soejima, K., Matsumoto, M., Kokame, K., Yagi, H., Ishizashi, H., Maeda, H., Nozaki, C., Miyata, T., Fujimura, Y., and Nakagaki, T. (2003). ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* **102**, 3232-7.

Soejima, K., Mimura, N., Hirashima, M., Maeda, H., Hamamoto, T., Nakagaki, T., and Nozaki, C. (2001). A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem* **130**, 475-80.

Soejima, K., Nakamura, H., Hirashima, M., Morikawa, W., Nozaki, C., and Nakagaki, T. (2006). Analysis on the molecular species and concentration of circulating ADAMTS13 in Blood. *J Biochem* **139**, 147-54.

Sporn, L. A., Chavin, S. I., Marder, V. J., and Wagner, D. D. (1985). Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest* **76**, 1102-6.

Sporn, L. A., Marder, V. J., and Wagner, D. D. (1986). Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* **46**, 185-90.

Studt, J. D., Kremer Hovinga, J. A., Antoine, G., Hermann, M., Rieger, M., Scheiflinger, F., and Lammle, B. (2005). Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood* **105**, 542-4.

Tao, Z., Peng, Y., Nolasco, L., Cal, S., Lopez-Otin, C., Li, R., Moake, J. L., Lopez, J. A., and Dong, J. F. (2005a). Recombinant CUB-1 domain polypeptide inhibits the cleavage of ULVWF strings by ADAMTS13 under flow conditions. *Blood* **106**, 4139-45.

Tao, Z., Wang, Y., Choi, H., Bernardo, A., Nishio, K., Sadler, J. E., Lopez, J. A., and Dong, J. F. (2005b). Cleavage of ultralarge multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS-13 under flow. *Blood* **106**, 141-3.

Taylor, R. P., and Lindorfer, M. A. (2007). Drug insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease--the immune complex decoy hypothesis. *Nat Clin Pract Rheumatol* **3**, 86-95.

Teillet, F., Gaboriaud, C., Lacroix, M., Martin, L., Arlaud, G. J., and Thielens, N. M. (2008). Crystal structure of the CUB1-EGF-CUB2 domain of human MASP-1/3 and identification of its interaction sites with mannan-binding lectin and ficolins. *J Biol Chem* **283**, 25715-24.

Tsai, H. M. (1996). Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* **87**, 4235-44.

Turner, N., Nolasco, L., Tao, Z., Dong, J. F., and Moake, J. (2006). Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* **4**, 1396-404.

Uemura, M., Tatsumi, K., Matsumoto, M., Fujimoto, M., Matsuyama, T., Ishikawa, M., Iwamoto, T. A., Mori, T., Wanaka, A., Fukui, H., and Fujimura, Y. (2005). Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* **106**, 922-4.

Van de Walle, G. R., Vanhoorelbeke, K., Majer, Z., Illyes, E., Baert, J., Pareyn, I., and Deckmyn, H. (2005). Two functional active conformations of the integrin {alpha}2{beta}1, depending on activation condition and cell type. *J Biol Chem* **280**, 36873-82.

Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W., Levi, M., and Reitsma, P. H. (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* **93**, 327-58.

Vicic, W. J., and Weiss, H. J. (1983). Evidence that platelet alpha-granules are a major determinant of platelet density: studies in storage pool deficiency. *Thromb Haemost* **50**, 878-80.

Wagner, D. D., and Marder, V. J. (1984). Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *J Cell Biol* **99**, 2123-30.

Wagner, D. D., Olmsted, J. B., and Marder, V. J. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* **95**, 355-60.

Wagner, D. D., Saffaripour, S., Bonfanti, R., Sadler, J. E., Cramer, E. M., Chapman, B., and Mayadas, T. N. (1991). Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propolypeptide. *Cell* **64**, 403-13.

Weibel, E. R. (2012). Fifty years of Weibel-Palade bodies: the discovery and early history of an enigmatic organelle of endothelial cells. *J Thromb Haemost* **10**, 979-84.

Weibel, E. R., and Palade, G. E. (1964). New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol* **23**, 101-12.

Willoughby, S., Holmes, A., and Loscalzo, J. (2002). Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs* **1**, 273-88.

Wise, R. J., Pittman, D. D., Handin, R. I., Kaufman, R. J., and Orkin, S. H. (1988). The propeptide of von Willebrand factor independently mediates the assembly of von Willebrand multimers. *Cell* **52**, 229-36.

Xiang, Y., de Groot, R., Crawley, J. T., and Lane, D. A. (2011). Mechanism of von Willebrand factor scissile bond cleavage by a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11602-7.

Xiao, J., Jin, S. Y., Xue, J., Sorvillo, N., Voorberg, J., and Zheng, X. L. (2011). Essential domains of a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats-13 metalloprotease required for modulation of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 2261-9.

Zanardelli, S., Chion, A. C., Groot, E., Lenting, P. J., McKinnon, T. A., Laffan, M. A., Tseng, M., and Lane, D. A. (2009). A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood* **114**, 2819-28.

Zanardelli, S., Crawley, J. T., Chion, C. K., Lam, J. K., Preston, R. J., and Lane, D. A. (2006). ADAMTS13 substrate recognition of von Willebrand factor A2 domain. *J Biol Chem* **281**, 1555-63.

Zhang, P., Pan, W., Rux, A. H., Sachais, B. S., and Zheng, X. L. (2007). The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood* **110**, 1887-94.

Zhang, Q., Zhou, Y. F., Zhang, C. Z., Zhang, X., Lu, C., and Springer, T. A. (2009a). Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9226-31.

Zhang, X., Halvorsen, K., Zhang, C. Z., Wong, W. P., and Springer, T. A. (2009b). Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science* **324**, 1330-4.

Zheng, X., Chung, D., Takayama, T. K., Majerus, E. M., Sadler, J. E., and Fujikawa, K. (2001). Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* **276**, 41059-63.

Zheng, X., Nishio, K., Majerus, E. M., and Sadler, J. E. (2003). Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J Biol Chem* **278**, 30136-41.

Zheng, X. L., and Sadler, J. E. (2008). Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Pathol* **3**, 249-77.

Zhou, Y. F., Eng, E. T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., and Springer, T. A. (2012). Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* **120**, 449-58.

Samenvatting

De von Willebrand Factor (VWF) is een multimeer plasma glycoproteïne dat een cruciale rol speelt tijdens de hemostase. Bij een beschadiging aan een bloedvat zal het natief, gevouwen VWF binden aan het blootgesteld collageen en een uitgestrekte conformatie aannemen onder invloed van de schuifstress van de bloedstroom. Via de binding van bloedplaatjes op het ontvouwen VWF wordt de bloeding zo snel mogelijk gestopt. Het metalloprotease ADAMTS13, dat zorgt voor de proteolyse van *ultra-large* VWF, kan spontane trombi vorming, veroorzaakt door het vrij circulerend VWF, voorkomen. Deficiëntie van ADAMTS13 geeft bijgevolg aanleiding tot de levensbedreigende ziekte trombotische trombocytopensiche purpura (TTP). De werking van ADAMTS13 en zijn interactie met VWF is nog niet volledig duidelijk. ADAMTS13 bestaat uit heel wat domeinen, maar kan hoofdzakelijk ingedeeld worden in een N-terminaal kopdomein en een C-terminale staart. Over het N-terminaal kop-domein is al heel wat gekend, in tegenstelling tot de C-terminale staart.

Tijdens deze masterthesis werd dan ook geprobeerd om nieuwe inzichten te verwerven in de rol van de C-terminale staart van ADAMTS13 via de ontwikkeling van monoklonale antilichamen (mAbs) tegen zowel muis als humaan ADAMTS13. De mAbs werden verkregen door muizen te immuniseren met ADAMTS13. Om tot de immunisaties met muis ADAMTS13 (mADAMTS13) te kunnen overgaan, werd eerst de productie en opzuivering van mADAMTS13 geoptimaliseerd. Via een subklonering steeg het expressieniveau van mADAMTS13 met ongeveer 600%. Een opzuivering via nikkelkolom leverde daarna voldoende zuiver mADAMTS13 op om tot de immunisaties te kunnen overgaan. De antilichaam producerende B-cellen van de milt werden gefuseerd met SP2/0 myelomacellen, waardoor mAb producerende hybridomacellijnen bekomen werden. Helaas kon er geen enkele mAb producerende hybridomacellijn tegen mADAMTS13 ontwikkeld worden.

Er werden mAb producerende hybridomacellijnen ontwikkeld tegen humaan ADAMTS13 die daarna verder werden opgegroeid en opgezuiverd. Een epitoop *mapping* gaf aan dat de meeste van de ontwikkelde mAbs tegen de C-terminale staart van ADAMTS13 gericht zijn. Via functionele *in vitro* testen werd nagegaan of de ontwikkelde mAbs een invloed uitoefenen op de binding of de activiteit van ADAMTS13. Hieruit bleek dat de C-terminale staart mAbs de binding aan gevouwen VWF en de activiteit van ADAMTS13 stimuleren. Dit geeft aanleiding tot het vermoeden dat de C-terminale staart mogelijks dienst doet als negatieve regulator van de ADAMTS13 activiteit en ook een rol speelt bij de initiële binding aan gevouwen VWF.

Ten slotte kon via een klonering en transfectie een mutante vorm van ADAMTS13 tot expressie gebracht worden. Deze mutant zal in de toekomst gebruikt kunnen worden om de rol van de C-terminale staart van ADAMTS13 verder te ontrafelen.

Summary

The von Willebrand Factor (VWF) is a multimeric glycoprotein that plays a crucial role during hemostasis. Due to the influence of the shear stress of the bloodstream, native folded VWF will unfold and have the ability to bind to the exposed collagen of a damaged blood vessel. The bleeding will be stopped as soon as possible because the blood platelets will bind to the unfolded VWF. The metalloprotease ADAMTS13, that proteolyses ultra-large VWF, can prevent spontaneous thrombi formation caused by free circulating VWF. Therefore ADAMTS13 deficiency gives rise to the life threatening disease thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). The working mechanism of ADAMTS13 and its interaction with VWF is not yet entirely elucidated. ADAMTS13 constitutes a lot of domains but can predominantly be divided in a N-terminal head domain and a C-terminal tail. A lot is known about the N-terminal head domain in contrast to the C-terminal tail.

During this masterthesis we tried to gain new insights in the role of the C-terminal tail of ADAMTS13 by developing monoclonal antibodies (mAbs) against both murine and human ADAMTS13. The mAbs could be obtained through the immunization of mice with ADAMTS13. An optimization of the production and purification of mice ADAMTS13 (mADAMTS13) was needed before immunizations could be carried out. A subcloning raised the expression level of mADAMTS13 with approximately 600%. We could proceed to the immunizations of mice because a nickel column purification delivered satisfactory pure mADAMTS13. The antibody producing B-cells of the spleen were fused with SP2/0 myelomacells, that gives mAb producing hybridomacellines. Unfortunately no mAb producing hybrimacelline against mADAMTS13 could be obtained.

The mAb producing hybridomacellines against human ADAMTS13 that were developed, were grown and purified. An epitope mapping showed that most of the developed mAbs are directed against the C-teminal tail of ADAMTS13. *In vitro* functional tests allowed us to investigate the influence of the mAbs on the binding or activity of ADAMTS13. This showed that a few of the C-terminal tail mAbs provide a greater binding of ADAMTS13 to folded VWF and a stimulated ADAMTS13 activity. This gives rise to the presumption that the C-terminal tail serves as a negative regulator of ADAMTS13 and plays a role in the initial binding to folded VWF.

Finally, a cloning and transfection leaded to the successful expression of an ADAMTS13 mutant. In the future this mutant can be used to further unravel the role of the C-terminal tail of ADAMTS13.

DEEL III
Bijlagen

Bijlage 1: Overzicht van de aangewende ELISA protocols tijdens de ontwikkeling van mAbs tegen mADAMTS13

	Subklonering mADAMTS13	**Concentratiebepaling coating mADAMTS13**	**Serumscreening na immunisatie mADAMTS13**	**Screening op positieve mAbs tegen mADAMTS13 na fusie**
Coating (in PBS, gedurende de nacht, 4 °C, 100 µl/well)	Ab 20A10 (5 µg/ml)	mADAMTS13 (10 µg/ml)	mADAMTS13	mADAMTS13
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	3	3	3	3
Blokkering (200 µl/well)	3% gloria, 2u, KT	3% gloria, 2u, KT	3% gloria, 2u, KT	3% gloria, 2u, KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	3	3	3	3
Incubatie (100 µl/well)	Expressiemedium (9/10) in 0,3% gloria, 90 min, 37 °C		Serum (1/10) in 0,3% gloria, 1u, 37 °C	Supernatans (9/10) in 0,3% gloria, 1u, 37 °C
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6		6	6
Detectie (100 µl/well)	Polyklonaal konijn anti-mADAMTS13 (5 µg/ml), 1u, KT in 0,3% gloria	Polyklonaal konijn anti-mADAMTS13 (5 µg/ml), 1u, KT in 0,3% gloria		
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6		
Mogelijkheid tot kleurontwikkeling (100 µl/well)	GAR-HRP (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT	GAR-HRP (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT	GAM-HRP (1/10000), 1u, KT	GAM-HRP (1/10000), 1u, KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6	6	6
Kleurontwikkeling (160 µl/well)	Kleurontwikkeling sbuffer	Kleurontwikkelingbuffer	Kleurontwikkelingsbuffer	Kleurontwikkelingsbuffer
Stoppen kleurreactie 4 M H_2SO_4 (50 µl/well)	H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4
Paragraaf	1.1.1	1.1.5	1.1.5	1.1.7

Bijlage 2: Overzicht aangewende ELISA protocols bij de productie en functionaliteit bepaling van de ontwikkelde anti-hADAMTS13 mAbs.

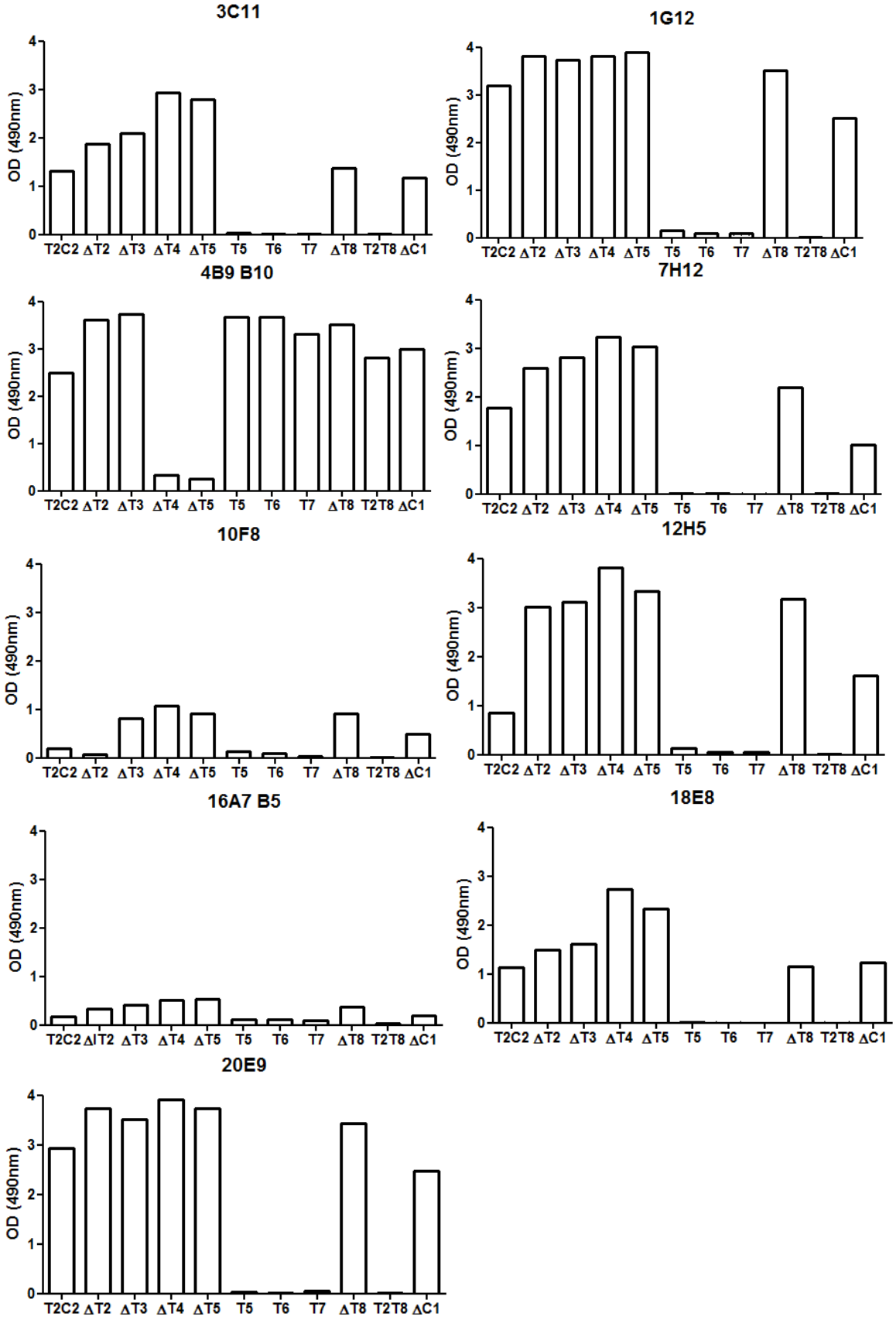
	Serumscreening na immunisatie hADAMTS13	**Screening op positieve mAbs tegen hADAMTS13 na fusie**	**Epitoop *mapping* 1**	**Epitoop *mapping 2***
Coating (in PBS, gedurende de nacht, 4 °C, 100 µl/well)	hADAMTS13 (Baxter) (1 µg/ml)	hADAMTS13 (Baxter) (1 µg/ml)	mAbs (6 µg/ml)	mAbs (6 µg/ml)
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	3	3	3	3
Blokkering (200 µl/well)	3% gloria, 2u, KT	3% gloria, 2u, KT	3% gloria, 2u, KT	3% gloria, 2u, KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	3	3	3	3
Incubatie (100 µl/well)	Serum (1/10) in 0,3% gloria, 1u, 37 °C	Supernatans (9/10) in 0,3% gloria, 1u, 37 °C	MDTCS (1) of T2C2 (2) (15 nM) in 0,3% gloria, 1u, 37 °C	ΔT2, ΔT3, ΔT4, ΔT5, T5, T6, T7, T2T8 en ΔC1 (15 nM) in 0,3% gloria, 1u, 37 °C
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6	6	6
Detectie (100 µl/well)			3H9-bio (1) of 17G2-bio, 19H4-bio (2) (1,5 µg/ml) in 0,3% gloria, 1u, KT	3H9-bio (1,5 µg/ml) in 0,3% gloria, 1u, KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%			6	6
Mogelijkheid tot kleurontwikkeling (100 µl/well)	GAM-HRP (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT	GAM-HRP (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT	Streptavidine-POD (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT	Streptavidine-POD (1/10000) + anti-V5-HRP (1/3000) in 0,3% gloria, 1u, KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6	6	6
Kleurontwikkeling (160 µl/well)	Kleurontwikkeling sbuffer	Kleurontwikkelingbuffer	Kleurontwikkelingsbuffer	Kleurontwikkeling sbuffer
Stoppen kleurreactie 4 M H_2SO_4 (50 µl/well)	H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4
Paragraaf	1.2.1	1.2.2	1.2.6	1.2.6

	mAbs als coating	mAbs als detectie	BindingsELISA met rechtstreeks gecoat pVWF	BindingsELISA met gevangen pVWF
Coating (in PBS, ON, 4 °C, 100 µl/well)	mAbs (10 µg/ml)	5C11 (5 µg/ml)	pVWF (10 µg/ml)	6D1 (5 µg/ml)
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	3	3	3	3
Blokkering (200 µl/well)	3% gloria, 2u, KT	3% gloria, 2u, KT	3% gloria, 2u, KT	2% BSA, 1% muisserum in PBS Tw20 0,1%, 1u, 37 °C
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	3	3	3	3
Incubatie (100 µl/well)	Expressiemedium hADAMTS13 (9/10) in 0,3% gloria, 1u, 37 °C	Expressiemedium hADAMTS13 (9/10) in 0,3% gloria, 1u, 37 °C	mAbs (10 µg/ml) + hADAMTS13 (3 µg/ml) in 20mM Tris-HCl, EDTA 0,3% gloria, 30min 37°C preincubatie, 2u KT	pVWF (50 µg/ml) in 0,2% BSA en 1% muisserum in PBS, 90 min, 37 °C + mAbs (10 µg/ml) + hADAMTS13 (3 µg/ml) in 20mM Tris-HCl, EDTA 0,2% BSA en 1% muisserum, 30min 37°C preincubatie, 2u KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6	3	3
Detectie (100 µl/well)	17G2-bio, 19H4-bio (1,5 µg/ml) in 0,3% gloria, 1u, KT	mAbs-bio (10 µg/ml), 1u, KT	5C11-bio, 17G2-bio, 19H4-bio (1,5 µg/ml) in 0,3% gloria	5C11-bio, 17G2-bio, 19H4-bio (1,5 µg/ml) in 0,3% gloria
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6	3	3
Mogelijkheid tot kleurontwikkeling (100 µl/well)	Streptavidine-POD (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT	Streptavidine-POD (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT	Streptavidine-POD (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT	Streptavidine-POD (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6	3	3
Kleurontwikkeling (160 µl/well)	Kleurontwikkeling sbuffer	Kleurontwikkelingbuffer	Kleurontwikkelingsbuffer	Kleurontwikkelingsbuffer
Stoppen kleurreactie 4 M H_2SO_4 (50 µl/well)	H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4	H_2SO_4
Paragraaf	1.2.7 A	1.2.7 B	1.2.7 C	1.2.7 D

Bijlage 3: Overzicht gebruikte ELISA protocols tijdens de HI en transfectie van de hSpacerC2-TOPO vector

	Controle aanwezigheid hSpacerC2 na HI	**Controle op de aanwezigheid hSpacerC2 in expressiemedium na transfectie**
Coating (in PBS, gedurende de nacht, 4 °C, 100 µl/well)	5C11 of anti-V5 (5µg/ml)	5C11
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	3	3
Blokkering (200 µl/well)	3% gloria, 2u, KT	3% gloria, 2u, KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	3	3
Incubatie (100 µl/well)	Plasma (1/10) in 0,3% gloria, 90 min, 37 °C	Expressiemedium (9/10) in 0,3% gloria, 90 min, 37 °C
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6
Detectie (100 µl/well)	17G2-bio, 19H4-bio (1,5 µg/ml) in 0,3% gloria, 1u, KT	17G2-bio, 19H4-bio (1,5 µg/ml) in 0,3% gloria, 1u, KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6
Mogelijkheid tot kleurontwikkeling (100 µl/well)	Streptavidine-POD (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT	Streptavidine-POD (1/10000) in 0,3% gloria, 1u, KT
Aantal keer wassen met PBS Tw20 0,1%	6	6
Kleurontwikkeling (160 µl/well)	Kleurontwikkelingsbuffer	Kleurontwikkelingsbuffer
Stoppen kleurreactie 4 M H_2SO_4 (50 µl/well)	H_2SO_4	H_2SO_4
Paragraaf	1.3.7	1.3.8

Bijlage 4: Epitoopmapping van de ontwikkelde C-terminale mAbs



Bijlage 5: Risico analyse

Het Laboratorium voor Trombose Onderzoek (Latron) aan de KU Leuven kulak is een laboratorium met inperkingsniveau L1. Tijdens het uitvoeren van experimenten werd steeds een labojas gedragen en werd er met zorg omgesprongen met de producten om zoveel mogelijk spatten en aerosols te voorkomen. Indien er met stoffen gewerkt werd die huid-irritatie kunnen veroorzaken of die mogelijks carcinogeen zijn, werden additioneel handschoenen aangetrokken. Dit was het geval voor stoffen zoals SDS (E1), OPD (E4), H_2O_2 (E4) en H_2SO_4 (E4). Er werd ook voor gezorgd dat deze in de correcte en daarvoor voorziene afvalvaten werden afgevoerd.

Voor het maken van zowel de SDS-PAGE als de DNA agarose gels werd steeds een labojas en handschoenen gedragen om de huid tegen schadelijke stoffen zoals acrylamide (E4), APS (E3), TEMED (E3) en Gelgreen (E3) te beschermen. Het opkoken van de agarosegel met Gelgreen gebeurde telkens onder een trekkast als bescherming tegen de giftige dampen. Restanten van de gelen werden in de voorziene gele afvalcontainers afgevoerd.

Het uitvoeren van een transormatie gebeurde in de buurt van een bunzenbrander. Het werk-oppervlak werd eerst ontsmet met ethanol (E3). Aangezien dit een lichtontvlambare stof is, werd erop toegezien dat alle ethanol verdampt was voor de vlam werd aangezet. De gebruikte TOP 10 *E. coli* chemisch competente cellen waren niet-pathogeen, waardoor geen extra voorzorgsmaatregelen moesten genomen worden bij het werken met deze stam.

Tijdens deze masterthesis werd ook met muizen gewerkt. Deze zijn gehuisvest in een A1 animalium. Er werd steeds een labojas en handschoenen gedragen bij het behandelen van de proefdieren ter bescherming van bijt- en krabwonden. Ook de blootstelling aan het beddingmateriaal en urine werd geminimaliseerd om de ontwikkeling van allergieën te vermijden. De dieren in het animalium werden op geregelde tijdstippen gescreend op pathogenen. De bloedafnames en immunisaties gebeurden op een door de ethische commissie goedgekeurde manier en werden steeds uitgevoerd door een opgeleide proefdiermedewerker. De gebruikte naalden en glascapillairen werden afgevoerd in een daarvoor voorziene afvalcontainer. Na het uitvoeren van de handelingen werden de handen grondig gewassen. Na het voltooien van de experimenten werd een overdosis isofluraan (E3) aan de dieren toegediend, waarna de dierlijke restanten in een vriezer werden opgeslagen tot een gespecialiseerd ophaalbedrijf (Rendac) de dieren verwijderde.

Het werken met eukaryote cellijnen gebeurde steeds in een afzonderlijk lokaal onder een laminaire flow. Ook hier werd steeds met handschoenen gewerkt, aangezien soms met schadelijke stoffen als trypaanblauw (E4) werd gewerkt. Dit lokaal werd overnacht gesteriliseerd met behulp van UV-licht. Dit UV-licht brandde nooit indien personen aanwezig waren in het lokaal om oog- en huidschade te vermijden.

CHEMIE KULAK
E. Sabbelaan 53
8500 KORTRIJK, BELGIË
tel. + 32 56 24 60 61
fax + 32 56 24 69 97
karen.vanhoorelbeke@kuleuven-kulak.be
www.kuleuven-kulak.be