บทคัดย่อภาษาไทย

von Willebrand factor (VWF) เป็น Glycoprotein ในพลาสมาที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการทำให้เลือดหยุดและการเกิดลิ่มเลือด โดยไปส่งเสริมให้เกล็ดเลือดเกาะกับ endothelium ในบริเวณเส้นเลือดที่ได้รับความเสียหาย VWF เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นไปเชื่อมต่อระหว่างกันด้วยพันธะ disulfide ทำให้โมเลกุลมีขนาดแตกต่างกัน โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 x 10^6 ดาลตัน โมโนเมอร์แต่ละโมโนเมอร์ซึ่งประกอบเป็น VWF นั้นประกอบด้วย domain 4 แบบ (A ถึง D) A1 doamin ของ VWF เป็นที่ตั้งของตำแหน่งจับของ GP Ib, heparin, ยาปฏิชีวนะ ristocetin และโปรตีนจากพิษงู botrocetin เชื่อกันว่า A1 domain เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญมากเนื่องจากพบว่ามี point mutation หลายจุดบนยีนของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือดซึ่งมีชื่อโรคว่า von Willebrand disease (VWD) แบบที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ A1 domain เป็นการศึกษาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยการใช้ X-ray crystallography นักวิจัยพบความแตกต่างของโครงสร้างของ recombinant A1 domain ในผู้ป่วยโรค VWD ชนิด 2 บี อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวไม่ได้พิสูจน์ว่า wild type A1 domain เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง วัตถุประสงค์หลักของการวิจัยชิ้นนี้เพื่อผลิต VWF A1 domain ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF ในการศึกษาระยะยาวขั้นต่อไป จากการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการโคลน VWF A1 domain ของคนจาก genomic DNA แทนการ clone จาก mRNA ซึ่งวิธีที่ค้นพบนี้จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของ A1 domain ในผู้ที่มี polymorphism ต่างกันใน VWF gene ได้ ผู้วิจัยได้ออกแบบให้ glycosylated protein ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ COS-7 มี hexahistidine tag เพื่อประโยชน์ในการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ ซึ่ง tag ดังกล่าวมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์จึงสามารถตัดออกไปได้ อันจะทำให้โปรตีนที่ผลิตขึ้นมีสภาพที่เหมือนกับโปรตีนที่สร้างขึ้นตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามทั้ง wild type และ mutant ที่เปลี่ยนจาก Cys เป็น Ser ทั้ง 3 ตำแหน่ง ของ A1 doamin ไม่ละลายในสารละลาย PBS และ 1% Triton X-100 ดังนั้นในการสกัดแยกให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไปควรใช้วิธี denaturing และ refolding method

Abstract

Von Willebrand factor (VWF) is a plasma glycoprotein that plays an important role in hemostasis and thrombosis. It promotes platelet adhesion to damaged vascular endothelium. VWF is a multimeric protein consisting of disulfide-bonded subunits, ranging from dimers to multimers extending up to 20 x 10^6 Daltons. The VWF monomer includes 13 domains, which are multiples of four domain types (A to D). The A1 domain in VWF contains multiple binding sites, including those for platelet glycoprotein Ib, heparin, and the artificial modulators ristocetin and botrocetin. The A1 domain contains multiple binding sites, including those for glycoprotein Ib, heparin, the antibiotic ristocetin and the snake venom protein botrocetin. This domain is thought to be a critical structural motif as several point mutations have been found within this domain in patients with type 2 von Willebrand disease (VWD). Conformational changes in the A1 domain of VWF are a topic of intense interest. Differences in the structure of this domain as a result of natural mutations in VWD have been examined by X-ray crystallography of recombinant A1 domain fragments. Such studies, however, do not prove that the wild type A1 domain can undergo a change in conformation. The goal of this study was to generate a suitable VWF A1 domain for studying the conformational change of VWF in the long term project. In the present study, the A1 domain of human VWF has been cloned from genomic DNA, rather than from mRNA. This approach facilitates subsequent studies of the structural and functional consequences of specific polymorphisms or mutations in the VWF gene. The investigator has designed a construct with a cleavable hexahistidine tag to express the recombinant protein which is for purification of the glycosylated protein after its expression in COS 7 cells. Cleavage of the tag will allow subsequent studies of conformational change to be performed with the protein in its native state. However, the expressed wild type and Cys/Ser (3-point mutations) A1 domain did not dissolve in PBS or 1% triton X-100. Using a denaturing and refolding method is recommended for the purification in the future project.