

รหัสโครงการ SUT1-104-48-24-27



## รายงานการวิจัย

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวอนวิลเลบรันด์แฟกเตอร์ของคน: การศึกษาโดย  
ใช้โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและแมสสเปกโตรมิเตอร์  
(Conformational Change in Human von Willebrand Factor: Studies  
Using High Performance Liquid Chromatography and Mass  
Spectrometry)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ภกญ. ดร. นวรัตน์ จุฑะพงษ์

สาขาวิชา สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2553

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคลต่อไปนี้ที่มีส่วนช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ คือ 1) Professor Dr. John C. Kermode จาก Department of Pharmacology and Toxicology, University of Mississippi Medical Center ประเทศสหรัฐอเมริกาในการเป็นที่เลี้ยงให้คำปรึกษาตลอดโครงการวิจัย 2) รองศาสตราจารย์ ดอกเตอร์ชาญวิทย์ สีลาวัฒน์ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับการบริจาคเซลล์ COS-7 3) รองศาสตราจารย์ ดอกเตอร์วิภา สุจินต์ สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชา วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในการบริจาค pQE-60 vector และแบคทีเรีย M15 เพื่อใช้ในการผลิต recombinant von Willibrand factor A1 domain 4) ดร. พงษ์ฤทธิ์ ครอบปรัชญา สาขาวิชา ชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการ ออกแบบ primer และ 5) ดร. สุทธิรักษ์ รอยตระกูล นักวิจัยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่อง HPLC-MS และงานวิจัยนี้คงไม่สามารถทำสำเร็จได้หากปราศจากความช่วยเหลือในการทำการทดลองของคุณมัจฉา กามขุนทด ในฐานะผู้ช่วยวิจัย สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีสำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

บทคัดย่อภาษาไทย

Von Willebrand factor (VWF) เป็น glycoprotein ขนาดใหญ่ที่อยู่ในพลาสมา มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทำให้เลือดหยุดและการเกิดลิ่มเลือดอุดตัน โดยไปส่งเสริมให้เกล็ดเลือดเกาะกับชั้นของ endothelium ในบริเวณหลอดเลือดที่ได้รับความเสียหาย VWF แต่ละโมโนเมอร์ประกอบด้วย domain 4 แบบ (A ถึง D) จำนวน 13 domain มาเรียงต่อกัน A1 domain ของ VWF เป็นโครงสร้างที่มีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นปฏิกิริยาการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด ด้วยเหตุนี้ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของ A1 domain จึงเป็นการศึกษาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากทั้งในแง่ของความเข้าใจหน้าที่ของ domain นี้ใน vivo และในแง่ของการพัฒนาชนิดใหม่ ๆ ที่มีฤทธิ์ด้านการเกิดลิ่มเลือดอุดตัน การผลิต recombinant A1 domain ขึ้นจึงมีคุณค่าอย่างมากในการเป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้

ในการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการ clone ยีนของ VWF A1 domain จาก genomic DNA ของคน แทนการ clone ยีนจาก mRNA ซึ่งวิธีที่ค้นพบนี้มีข้อได้เปรียบ คือ สามารถนำไปใช้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของ A1 domain ในผู้ที่มี polymorphism ของ VWF gene ต่างกันได้ ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้พยายามผลิต recombinant A1 domain จากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อโปรตีนที่ผลิตขึ้นจะมีส่วนที่เป็น glycosylation เช่นเดียวกับโปรตีนในธรรมชาติของคน แต่ทว่าโปรตีนที่ผลิตได้จากการใช้เซลล์ COS-7 มีปัญหาด้านการละลายทำนองเดียวกับโปรตีนส่วนใหญ่ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้าง recombinant A1 domain ที่สามารถละลายน้ำได้จากแบคทีเรีย โดยการออกแบบให้มีการติด hexahistidine tag ทางด้าน C-terminal ของสายโปรตีนซึ่งเป็นอีกด้านหนึ่งของ A1 domain ซึ่งเกิดจากการสร้างพันธะ disulfide ระหว่าง Cys<sup>1272</sup> - Cys<sup>1458</sup> วิธีนี้มีความแตกต่างจากการศึกษาทุกการศึกษาที่เคยมีรายงานไปแล้วคือ สามารถสกัดแยก recombinant A1 domain โดยโปรตีนที่สร้างขึ้นยังอยู่ในสภาพเดิมตามธรรมชาติ ไม่มีการทำลายพันธะ non-covalent หรือพันธะ disulfide แต่อย่างใด จากการศึกษาด้านโครงสร้างโดยการใช้ recombinant A1 ที่สร้างขึ้นนี้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของ A1 domain เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากบ่มด้วย ristocetin โดยการใช้ SDS-PAGE และ HPLC-MS ในการวิเคราะห์ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นหลักฐานสำคัญเพิ่มเติมที่แสดงให้เห็นว่า ristocetin ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF A1 domain ระหว่างที่เกิดการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด

คำสำคัญ: วอนวิลลิเบรนต์แฟกเตอร์, เอวันโดเมน, รีคอมบิแนนท์, ริสโทซิน, โครงสร้าง

### Abstract

Von Willebrand factor (VWF) is a multimeric, plasma glycoprotein that plays an essential role in hemostasis and thrombosis. It promotes platelet adhesion to damaged vascular endothelium. The VWF monomer includes 13 domains, which are multiples of four domain types (A to D). The A1 domain in VWF domain contains multiple binding sites with critical roles in the initiation of platelet aggregation. The relationship of structure to function in the VWF A1 domain is a topic of intense interest, both from the perspective of understanding how the function of this domain is regulated *in vivo* and from the standpoint of developing novel antithrombotic agents. An isolated A1 domain expressed in recombinant form can serve as an invaluable tool for studying its structural and functional attributes.

In this study, the investigator has cloned A1 domain of human VWF from genomic DNA, rather than from mRNA. This approach has some advantages, which can facilitate subsequent studies of the structural and functional consequences of specific polymorphisms or mutations in the VWF gene. First, a recombinant A1 domain was generated from the mammalian cells so that the protein produced would have glycosylation parts as native protein from human. The protein expressed in COS-7 cells was encountered problems with solubility similar to those from many previous reports. However, a soluble form of the recombinant A1 domain of VWF was successfully generated from bacteria. This was accomplished through attachment of a C-terminal hexahistidine tag and judicious choice of the extent of flanking regions on either side of the critical Cys<sup>1272</sup> – Cys<sup>1458</sup> disulfide bond. This strategy permits extraction and purification of the recombinant A1 domain protein entirely under native conditions, thereby preserving its non-covalent and disulfide bonds. In the conformation study, the results showed that structure of the recombinant A1 domain was changed after incubation of ristocetin determined by SDS-PAGE and HPLC-MS. This data provides additional important evidence that conformational changes of the A1 domain occur during the induction of platelet aggregation by ristocetin.

**Keywords:** von Willebrand Factor, A1 Domain, Recombinant, Ristocetin, Conformation



## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ค
สารบัญ .....	ง
สารบัญภาพ .....	จ
สารบัญตาราง .....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	4
ขอบเขตของการวิจัย .....	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย .....	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย .....	5
บทที่ 3 ผลการวิจัย.....	10
บทที่ 4 อภิปรายผลการทดลอง.....	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	25
เอกสารอ้างอิง .....	26
ภาคผนวก .....	31
ประวัติผู้วิจัย .....	35

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 บทบาทของ platelet และ clotting factor ต่อการสร้าง thrombus .....	1
รูปที่ 1.2 แผนภาพแสดง โครงสร้างของ VWF .....	2
รูปที่ 3.1 การแสดงออกของ wild type recombinant VWF A1 domain gene โดยเซลล์ COS-7 ....	10
รูปที่ 3.2a Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์หาการจัดเรียงลำดับ nucleotide ของ Wild type A1 domain gene.....	12
รูปที่ 3.2b Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์หาการจัดเรียงลำดับ nucleotide ของ Cys/Ser mutant A1 domain gene .....	13
รูปที่ 3.3 การเปรียบเทียบความสามารถในการละลายใน PBS ระหว่าง wild type และ mutant VWF A1 domain protein.....	14
รูปที่ 3.4 การตรวจสอบการละลายของ mutant VWF A1 domain ใน 1% Triton X-100.....	15
รูปที่ 3.5 Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์หาการจัดเรียงลำดับ nucleotide ของ mutant A1 domain gene ใน pQE60 veWild type A1 domain gene.....	16
รูปที่ 3.6 การตรวจวิเคราะห์ recombinant A1 domain ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย โดยใช้ SDS-PAGE .....	18
รูปที่ 3.7 การตรวจวิเคราะห์ recombinant A1 domain ที่สกัดได้จากแบคทีเรียโดยใช้ HPLC-MS .....	18
รูปที่ 3.8 ผลของ ristocetin ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain .....	19
รูปที่ 3.9 ผลของ ristocetin ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain โดยวิธี HPLC-MS .....	20

สารบัญตาราง

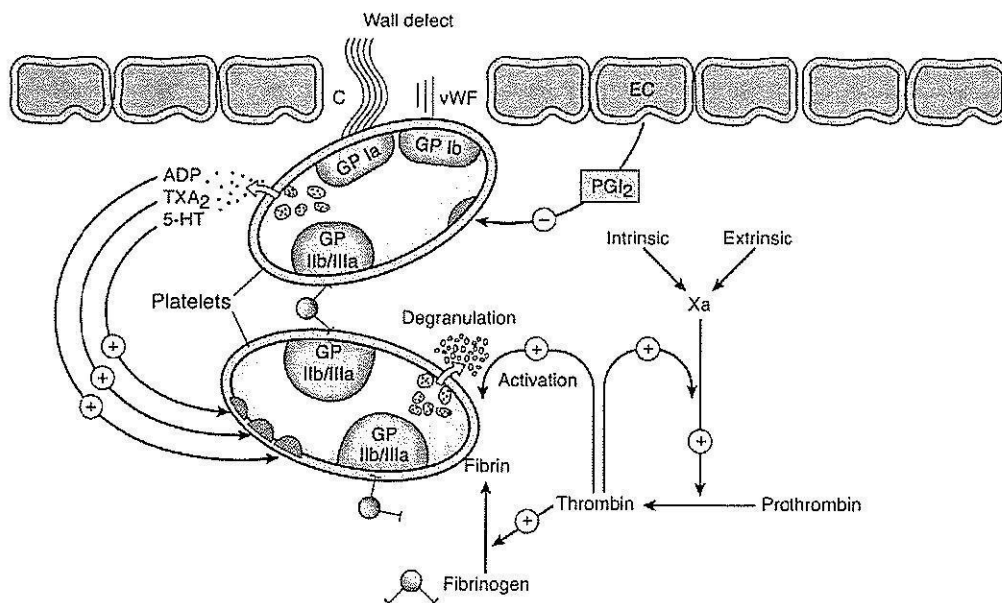
	หน้า
ตารางที่ 3.1 น้ำหนักโมเลกุลของ mutant recombinant A1 domain ที่สร้างจากเซลล์ COS-7 .....	11
ตารางที่ 3.2 น้ำหนักโมเลกุลของ mutant recombinant A1 domain ที่สร้างจากแบคทีเรีย .....	17

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การเกาะตัวกันระหว่างเกล็ดเลือด (Platelet) มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกที่ทำให้เลือดหยุดขณะเกิดการฉีกขาดของหลอดเลือดในร่างกาย [1, 2] นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดลิ่มเลือดในภาวะหลอดเลือดแดงตีบ [3] การเกาะตัวกันของเกล็ดเลือดจะเริ่มต้นขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการจับกันระหว่าง von Willebrand factor (VWF) กับ receptor บนเยื่อหุ้มของเกล็ดเลือดที่เรียกว่า Glycoprotein Ib (GP Ib) ดังรูปที่ 1.1 อย่างไรก็ตามในภาวะปกติ VWF จะไม่ทำปฏิกิริยาจับกับ receptor บนเกล็ดเลือด แต่ปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อ VWF จับกับ collagen ในชั้น subendothelium ที่เปิดออกของหลอดเลือดที่มีการบาดเจ็บเสียก่อน [4] ด้วยเหตุนี้นักวิทยาศาสตร์จึงเชื่อว่า การจับตัวระหว่าง VWF กับ collagen น่าจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางอย่างของ VWF เพื่อให้ตำแหน่งจับของ VWF เปิดออกและเข้าจับกับ GP Ib ได้



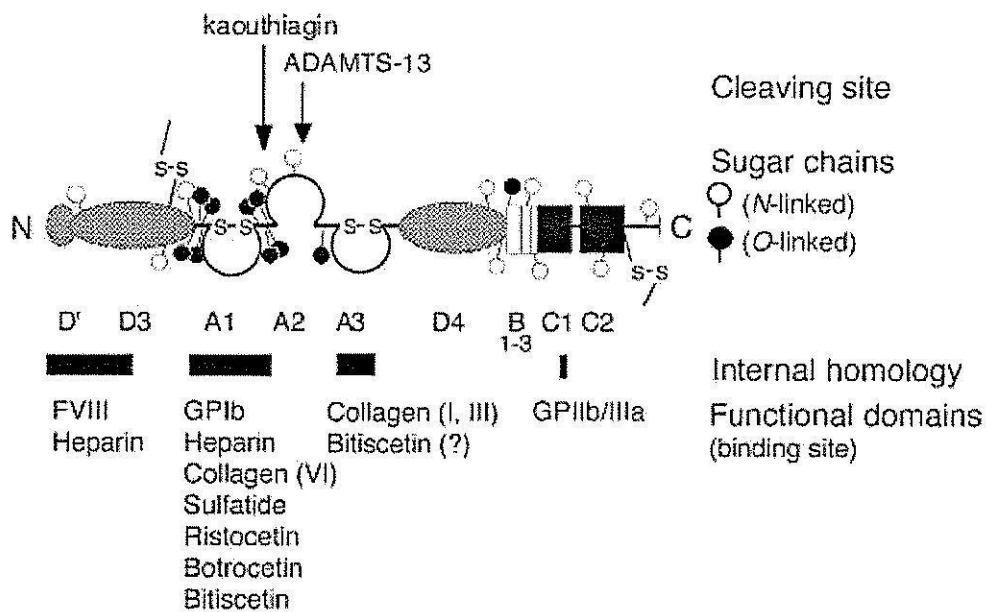
รูปที่ 1.1 บทบาทของ platelet และ clotting factor ต่อการสร้าง thrombus เมื่อผนังหลอดเลือดเกิดการบาดเจ็บ platelet receptor หลายชนิดที่อยู่บน membrane ของ platelet ได้แก่ glycoprotein Ia receptor (GP Ia) จับกับ collagen (C), GP Ib receptor จับกับ von Willibrand factor (VWF) และ GP IIb/IIIa จับกับ fibrinogen และ macromolecule อื่น ๆ prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) ซึ่งมีฤทธิ์เป็น antiplatelet จะถูกหลั่งออกมาจากชั้น endothelium ส่วน thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), adenosine diphosphate (ADP) และ serotonin (5-HT) จะถูกหลั่งออกมาจาก granule ของ platelet [5]

VWF เป็น Glycoprotein ที่มีขนาดใหญ่ประกอบด้วยหน่วยย่อยตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นไป เชื่อมต่อระหว่างกันด้วย disulfide bond ทำให้โมเลกุลมีขนาดแตกต่างกัน โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $20 \times 10^6$  dalton (D) [6, 7] monomer แต่ละ monomer ซึ่งประกอบเป็น VWF นั้นประกอบด้วย domain 4 แบบ คือ A, B, C และ D ดังนี้คือ D', D3, A1, A2, A3, D4, B1, B2, B3, C1, C2 ตามลำดับ (รูปที่ 1.2) A1 domain ซึ่งตรงกับกรดอะมิโน valine ที่ตำแหน่ง 1212 ( $V^{1212}$ ) ถึงกรดอะมิโน leucine ที่ตำแหน่ง 1491 ( $L^{1491}$ ) เป็นที่ตั้งของ binding site ของ GP Ib และ heparin [8, 9] นักวิจัยพบว่าในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือดซึ่งมีชื่อโรคว่า von Willebrand disease แบบ 2B (VWD type 2B) มีการกลายพันธุ์ (point mutation) ภายใน A1 domain [10, 11] ดังนั้น A1 domain น่าจะเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญมากต่อกลไกการทำงานของเกล็ดเลือดในขบวนการทำให้เลือดหยุด รวมทั้งกลไกการเกิดลิ่มเลือดอุดตันในผู้ป่วยเส้นเลือดตีบ

จากผลการทดลองแบบ *in vitro* พบว่า VWF สามารถถูกกระตุ้นให้จับกับเกล็ดเลือดได้ด้วยสารนอกร่างกายหลายประเภท เช่น ristocetin [12] หรือ botrocetin [13] เป็นต้น botrocetin เป็นโปรตีนในพิษงู ส่วน ristocetin เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียซึ่งเคยถูกนำมาทดลองใช้ในระดับคลินิกแต่ไม่ได้รับอนุญาตให้ออกจำหน่ายในตลาด เนื่องจากพบว่ากระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดเกาะตัวกันมากผิดปกติ จากรายงานการวิจัยโดยใช้ ultraviolet spectroscopy ของ Berndt และคณะ [14] พบว่า ristocetin สามารถจับกับ A1 domain ของ VWF ได้ที่ตำแหน่ง  $C^{1237}$ - $P^{1251}$  และ  $L^{1457}$ - $P^{1471}$  ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วว่า ristocetin มีกลไกที่ไปชักนำให้ VWF ทำปฏิกิริยาจับกับ GP Ib receptor แล้วเกิดการเกาะตัวกันได้เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในขณะที่เกล็ดเลือดเผชิญกับสภาวะแรงเสียดทานสูง (shear stress) ระหว่างการเคลื่อนที่ผ่านหลอดเลือดตีบ [15] ด้วยเหตุนี้ ristocetin จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษากลไกการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด ทั้งในการศึกษาแบบ *in vitro* และ *in vivo*

นักวิจัยหลายกลุ่มได้ทำการศึกษาโครงสร้างของ VWF ในผู้ป่วยโรค VWD แบบ 2B ด้วยวิธี X-ray crystallography โดยเปรียบเทียบโครงสร้างของ recombinant A1 domain พบว่ามีความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยและคนปกติ [16-18] อย่างไรก็ตาม การศึกษาดังกล่าวจัดเป็นเพียงหลักฐานทางอ้อมที่ชี้แนะว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF เท่านั้น แต่มีหลักฐานโดยตรงน้อยมากที่จะสามารถสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า “เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF หลังการถูกกระตุ้น เช่น จากแรงเสียดทาน หรือจากการจับกับ collagen หรือ ristocetin” การศึกษาที่เป็นหลักฐานโดยตรงเท่าที่พบมีเพียงการศึกษาของ Kang และคณะ [19, 20] โดยพบว่า ristocetin ไปเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการตัดย่อย VWF ของคนด้วยเอนไซม์ trypsin และ elastase อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวโดยการใช้ VWF ที่ร่างกายสร้างขึ้นตามธรรมชาติมีข้อจำกัดคือ VWF จากธรรมชาติมีขนาดใหญ่ (ประมาณ 250 kDa) ทำให้

มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัวหนึ่ง ๆ มากมายหลายตำแหน่ง ดังนั้นการศึกษาโดยใช้ recombinant A1 domain ของ VWF ซึ่งจะมีขนาดโมเลกุลไม่เกิน 50 kD น่าจะทำให้จำนวนตำแหน่งตัดน้อยลง และสามารถเจาะจงศึกษาเฉพาะโครงสร้างของ A1 domain ได้ นอกจากนี้หากใช้เอนไซม์ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงเพียงกรดอะมิโนตัวเดียวแทนการใช้ trypsin เช่น lysylendopeptidase ตัดเฉพาะที่ตำแหน่งกรดอะมิโน lysine หรือ arginylendopeptidase ตัดเฉพาะที่ตำแหน่งกรดอะมิโน arginine ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography และ mass spectrometry (HPLC-MS) ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวสามารถบอกข้อมูลเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละส่วนที่ถูกตัดออกได้แม่นยำ จะทำให้สามารถชี้ตำแหน่งของ VWF A1 domain ที่เอนไซม์แต่ละตัวเข้าตัดขณะที่มี ristocetin ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น ความเข้าใจอย่างลึกซึ้งในรายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF A1 domain จะช่วยเปิดทางไปสู่การพัฒนาใหม่ในการรักษาการเกิดลิ่มเลือดอุดตันได้เป็นอย่างดี เช่น การผลิต A1 domain antibody ที่เฉพาะเจาะจงกับตำแหน่งตัดที่สำคัญ เป็นต้น



รูปที่ 1.2 แผนภาพแสดงโครงสร้างของ VWF แต่ละ subunit ในโครงสร้างของ VWF ประกอบด้วย domain A-D ดังภาพ A1 domain ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ เป็นตำแหน่งจับของ GP Ib, heparin, collagen ristocetin และ botrocetin จะเห็นได้ว่ามีส่วนที่เป็น glycosylation (sugar chain) ในส่วนที่ไม่ใช่ loop [21]

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ คือ

1 หาวิธีที่เหมาะสมในการผลิต recombinant A1 domain ของ VWF เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของ VWF

2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain หลังการสัมผัสกับ ristocetin โดยการใช้ HPLC-MS และหาตำแหน่งตัด (cleavage site) ของ VWF fragment ด้วยเอนไซม์ chymotrypsin และ elastin ในสภาพที่มีและปราศจาก ristocetin

### ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF ของคนในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาพุ่งเป้าไปที่ A1 domain โดยเฉพาะ A1 domain จัดว่าเป็น domain ที่สำคัญที่สุดอันหนึ่งในบรรดาโครงสร้างทั้งหมดของ VWF เนื่องจากภายใน A1 domain เป็นที่ตำแหน่งที่ตั้งของ binding site ของ GP Ib ซึ่งปฏิกิริยาการจับระหว่าง VWF กับ GP Ib เป็นปฏิกิริยาเริ่มต้นในการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด

เนื่องจากการผลิต recombinant protein ชนิดนี้ใน mammalian cell ประสบปัญหาในการละลาย ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาผลิต recombinant A1 domain ใน bacteria แทน

### ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยค้นพบวิธีที่เหมาะสมในการผลิตและสกัด recombinant A1 domain ที่สามารถละลายน้ำได้ดี ไม่จับกันเป็น inclusion body วิธีที่ค้นพบนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการใช้ผลิตโปรตีนชนิดนี้เพื่อใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF ต่อไป และความเข้าใจในกลไกที่ชักนำให้การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain สามารถนำไปใช้เพื่อการพัฒนาชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดลิ่มเลือดอุดตัน

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### การทดลองและสารเคมี

#### 1. การผลิต wild type recombinant A1 domain protein ของ VWF ในเซลล์ COS-7

เซลล์ COS-7 ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับจาก ผศ. ดร. ชาญวิทย์ ติลาญวัฒน์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาเลี้ยงใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ร่วมกับ 4 mM glutamine (Gibco BRL), 5% fetal calf serum (Gibco BRL) และ penicillin (50 IU/ml)/streptomycin (50 µg/ml) (Gibco BRL) ที่ 37° C ในบรรยากาศที่มีความชื้นและ 5% CO<sub>2</sub>

#### 1.1. การเพิ่มปริมาณของยีนที่ควบคุมการสร้าง recombinant A1 domain protein จาก genomic DNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

Genomic DNA ที่ใช้ในการทดลองนี้สกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดที่ได้รับบริจาคจากอาสาสมัครในห้องปฏิบัติการของ Professor Dr. John C. Kermode forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ 5'-acggatCCACTGTGATGTTGTCAA-3' และ 5'-aatctaGACCAAGAAGC TGTGGTCA-3' ตามลำดับ primer ทั้งสองนี้ตรงกับ nucleotide ลำดับที่ 3985-4002 และ 5086-5068 ใน VWF coding sequence (nucleotide บริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็น restriction site สำหรับ BamH I และ Xba I ใน forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ซึ่งจะมีประโยชน์ในการทำ subcloning)

#### 1.2. การทำ transient expression ของ recombinant A1 domain โดยใช้เซลล์ COS-7

นำ plasmid จากการทำ transformation ซึ่งตรวจสอบแล้วว่ามียีนที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ BamH I และ Xba I แล้วนำไปทำ ligation เข้าใน pcDNA3.1/His vector หลังจากตรวจสอบแล้วจึงนำ vector ที่มี A1 domain gene ที่ถูกต้องไปทำ transfection ในเซลล์ COS-7 ด้วย DAEA-Dextran จากนั้นเก็บเซลล์ที่เลี้ยงไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง A1 domain โดยวิธี SDS-PAGE ด้วย anti-Xpress antibody (Invitrogen; 1:2500 dilution) และ polyclonal anti-VWF antibody coupled to horse radish peroxidase (Dago Denmark; 1:200 dilution) การตรวจสอบบน nitrocellulose membrane ทำโดยวิธี colorimetric detection (Opti-4CN Detection Kit, BioRad)



### 1.3 การผลิต Cys/Ser mutant recombinant A1 domain โดยวิธี site-directed mutagenesis

เริ่มต้นด้วยการผลิต Cys/Ser mutant recombinant A1 domain ที่ตำแหน่ง 1227 ก่อนโดยวิธีที่ใช้เป็นวิธีเดียวกับการผลิต wild type A1 domain gene ในข้อ 1.2 แต่ใช้ 5'-acggatCCACAGTGATGTTGTCAA-3' เป็น forward primer แทน หลังจากสกัดแยก plasmid ที่มี mutant gene แทรกอยู่ได้แล้วนำไปทำ site-directed mutagenesis ที่ตำแหน่ง 1234 แล้วต่อด้วยที่ ตำแหน่ง 1237 ตามลำดับ forward primer และ reverse primer สำหรับการทำให้ mutagenesis ที่ตำแหน่ง 1234 คือ GTTGTC AACCTCACCAGTGAAGCCTGCCAGG และ CCTGGCAGGCTTCACTGGTGAGGTTGACAAC ตามลำดับ ส่วน forward primer และ reverse primer สำหรับการทำให้ mutagenesis ที่ตำแหน่ง 1237 คือ CTCACCAGTGAAGCCAGCCAGAGCCGGGAG และ CTCCCGCTCCTGGCTGGCTTCACTGGTGAG ตามลำดับ (nucleotide ที่พิมพ์ด้วยตัวหนา คือ ตำแหน่งที่มีควมควบคุมการสร้าง amino acid เปลี่ยนจาก cysteine เป็น serine)

### 1.4 การทดสอบความสามารถในการละลายของ wild type recombinant A1 domain และ Cys/Ser mutant A1 domain

1.4.1 หลังจากทำ transient expression ของ recombinant A1 domain เป็นเวลา 2 วัน เซลล์ COS-7 จะถูกเก็บรวบรวมแล้วนำไปบดให้เซลล์แตกเป็นเนื้อเดียวกันใน phosphate buffer, pH 7.4 ด้วย Glass-Teflon homogenizer บนน้ำแข็ง นานครั้งละ 15 วินาที รวม 3 ครั้ง จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 7,500 x g แยก supernatant และ pellet ออกจากกัน นำไปตรวจสอบว่า wild type และ mutant recombinant A1 domain ที่เซลล์สร้างขึ้นอยู่ใน fraction ใด โดยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting ด้วย anti-VWF antibody

1.4.2 ในบางครั้งเซลล์อาจสร้าง recombinant protein ในรูปของ membrane bound protein ซึ่งทำให้ไม่ละลายน้ำ เพื่อตรวจสอบว่า A1 domain ที่เซลล์ COS-7 สร้างขึ้นในการทดลองนี้อยู่ในรูปของ membrane bound protein หรือไม่ ทำโดยการเติม Triton X-100 (ความเข้มข้นสุดท้าย 1%) ลงใน phosphate buffer ผสมให้เข้ากันก่อนนำไป centrifuge แล้วแยก supernatant ออกจาก pellet ก่อนนำไปตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ immunoblotting

## 2 การผลิต mutant recombinant A1 domain protein ของ VWF จากแบคทีเรีย

### 2.1 การสร้าง bacterial expression vector เพื่อใช้ในการสร้าง A1 domain

A1 domain จากแบคทีเรียผลิตขึ้นโดยการทำให้ PCR amplification จาก pcDNA/His ซึ่งมี A1 domain insert ด้วยการใส่ 5'-atcccatgGATGTTGTCAACCTC-3' เป็น forward primer และ 5'-gtcgaagatctCAAGAGCCCCGG-3' เป็น reverse primers (Restriction sites สำหรับ *Nco* I และ *Bgl* II คือ ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้) เมื่อได้ PCR product แล้วนำไปตัดด้วย *Nco* I และ *Bgl* II จากนั้นนำไปทำ ligation กับ pQE-60 vector (Qiagen) ซึ่งมี hexahistidine tag ที่ด้าน C-terminal A1 domain ที่ผลิตขึ้นนี้จะมีควมยาวที่สั้นกว่า A1 domain ที่ผลิตจากเซลล์ COS-7 โดยจะมียื่นที่ควบคุมการสร้าง amino acid residue ใน VWF จาก D<sup>1228</sup>—L<sup>1483</sup>

## 2.2 การสร้างและสกัด recombinant A1 domain จากแบคทีเรีย

การสร้าง A1 domain จากแบคทีเรียทำใน *E. coli* สายพันธุ์ M15 โดยวิธี antibiotic-selection โดย colony ที่สามารถต้านทานทั้ง ampicillin และ kanamycin จะถูกเลือกมาใช้ในการผลิต การแสดงออกของแบคทีเรียในการสร้าง recombinant A1 domain protein ถูกชักนำโดยการใช้ isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 mM การสกัด recombinant A1 domain protein ทำในสภาพที่โปรตีนอยู่ในสภาพ native ตลอดการทดลอง ดังต่อไปนี้

- 2.2.1 เลี้ยงเซลล์ ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมงแล้วเก็บเซลล์ โดย centrifuge ที่ 1000 x g
- 2.2.2 นำเซลล์มา resuspend ใน native purification buffer (500 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0)
- 2.2.3 บ่มเซลล์บนน้ำแข็งนาน 30 นาทีด้วย lysozyme (1 mg/ml)
- 2.2.4 นำเซลล์ไปทำให้เซลล์แตกโดยการทำให้ freeze-thaw cycles 2 รอบ แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกอย่างสมบูรณ์ด้วยการใช้ sonicator (6 pulses: 10 วินาที ที่ 200 W, พัก 10 วินาทีในแต่ละรอบ)
- 2.2.5 นำ lysate ไป centrifuged ที่ 10,000 g นาน 30 min ที่ 4 °C
- 2.2.6 นำ supernatant ไปสกัดด้วย ProBond Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) เก็บแยกส่วน fraction นำไปตรวจสอบด้วย western blot โดยใช้ anti-VWF antibody ว่า recombinant A1 domain อยู่ใน fraction ไດ
- 2.2.7 Fraction ที่ตรวจพบ recombinant A1 domain protein ยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอ เนื่องจากพบสารอื่นปนเปื้อนอยู่ ดังนั้นจึงต้องนำ fraction ดังกล่าวมาทำ dialysis เพื่อให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นก่อนนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Heparin-Sepharose column (GE Healthcare Bio-Sciences AB)

- 2.2.8 หลังจากล้าง Heparin–Sepharose column ด้วย binding buffer แล้วทำการ stepwise elution ด้วย binding buffer จำนวน 5 ml ซึ่งมีความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นตามลำดับดังต่อไปนี้คือ 0.1, 0.2, 0.4 and 2 M
- 2.2.9 หลังจากตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ Western blot พบว่า recombinant A1 domain protein จะหลุดออกจาก Heparin–Sepharose เมื่อใช้ binding buffer ที่มี 0.4 M NaCl โดยจะอยู่ใน elution ที่ 2 และ 3 (เก็บ elute ครั้งละ 1 ml)
- 2.2.10 นำ recombinant A1 domain ที่สกัดได้ไปตรวจสอบโครงสร้างว่าเป็น native structure หรือไม่ด้วยการเปรียบเทียบการ migration บน SDS-PAGE ภายใต้สภาพที่เป็น reducing และ non-reducing

### 3. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain protein

#### 3.1 การวิเคราะห์รูปแบบของ recombinant A1 domain protein บน SDS-PAGE ในสภาพที่มีและปราศจาก ristocetin

ดังที่ได้กล่าวไปแล้วว่า ristocetin เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการใช้ทดสอบหน้าที่ของ VWF ในการศึกษาแบบ *in vitro* ในการวิจัยนี้จึงศึกษาการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain โดยการเติม ristocetin (1 µg/ml) ลงในสารละลาย A1 domain (200 µg/ml) หลังการบ่มเป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปตรวจสอบด้วย reducing และ non reducing SDS-PAGE โดยทำการทดลองควบคู่ไปกับการใช้ vancomycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ ristocetin แต่ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นเกล็ดเลือดเพื่อเป็น negative control

#### 3.2 การวิเคราะห์รูปแบบของ recombinant A1 domain protein โดย HPLC-MS

นำ recombinant A1 domain ไปตรวจวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry โดย load purified A1 domain ความเข้มข้น 200 ng/ml ลงบน matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) target จากนั้นเติม matrix solution ที่ประกอบด้วย 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapic acid) ความเข้มข้น 10 mg/ml ใน acetonitrile:water:trifluoroacetic acid (50:50:0.1 โดยปริมาตร) ที่ให้แห้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วย Ultraflex III MALDI tandem time-of-flight (TOF/TOF) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) โดยใช้ positive linear mode ก่อนการ load ตัวอย่างเครื่องมือถูก calibrate ด้วยสารละลายมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย bovine insulin (5,734.5 Da), equine cytochrome c (12,362.0 Da) และ equine apomyoglobin (16,952.3 Da)

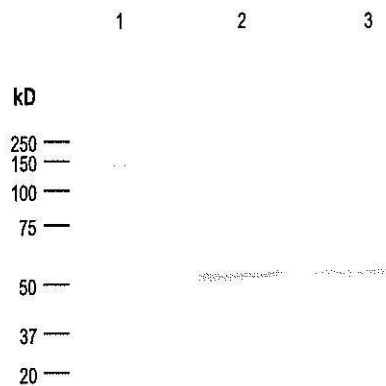
ตามวัตถุประสงค์เดิมที่ตั้งไว้ นั้น ผู้วิจัยต้องการทดสอบการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ (pattern) ของการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ chymotrypsin และ elastin ในสภาพที่มีและปราศจาก ristocetin โดยการใช้ HPLC-MS แต่เนื่องจากหลังการทดลองบ่ม recombinant A1 domain กับ ristocetin ปรากฏว่า recombinant A1 domain เกิดการ degradation ดังนั้นในการศึกษานี้จึงไม่สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain จากการตัดด้วยเอนไซม์ได้

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัย

##### 1. การสร้าง recombinant VWF A1 domain จากเซลล์ COS-7

รูปที่ 3.1 แสดงให้เห็นการแสดงออกของเซลล์ COS-7 ในการสร้าง recombinant VWF A1 domain ตรวจสอบได้โดยการใช้ anti-Xpress antibody ซึ่งจับกับ epitope เฉพาะของโปรตีนที่เซลล์สร้างขึ้น (lane 2) และ anti-VWF antibody ซึ่งจะจับกับ VWF ของคน (lane 3) และเมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุล (ตารางที่ 3.1) พบว่าได้ประมาณ 45.1 kD เมื่อรวมกับส่วนที่เป็น glycosylation (โปรตีนที่สร้างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีการเติม glucose ในโมเลกุลหลังกระบวนการ translation) จะใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่ปรากฏบน SDS-PAGE คือประมาณ 50 kD



รูปที่ 3.1 การแสดงออกของ wild type recombinant VWF A1 domain gene โดยเซลล์ COS-7 โปรตีนที่ได้จาก homogenate ของ transfected cell ถูกแยกโดย SDS-PAGE (7.5 %) จากนั้นจึงทำการตรวจด้วยวิธี Western blot โดย Lane ที่ 1= molecular weight marker; lane 2 = cell homogenate ตรวจด้วย anti-Xpress antibody; lane 3 = cell homogenate ตรวจด้วย anti-VWF antibody ตัวเลขทางซ้ายมือคือขนาดโมเลกุลของ standard หน่วย เป็น kD

Amino acid sequence of recombinant A1 domain from COS-7 cells				
<p>MGGSHHHHHHGMASMTGGQOMGRDLYDDDDKVPRIHSDVVN            LTCEACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRL            LDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRAV            EYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKY            TLFQIFSKIDRPEASRIALLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKK            KVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQRD            EIVSYLCDLAPEAPPPTLPPHMAQVTVGGPGLLGVSTLGPKRNSM            VLDVAFVLEGS DKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMDVGGQDSIHVT            VLQYSYMTVEYPPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLAL            RYLS DHSFLV</p>				
		Average Mass: 45072.6805		Sequence Length: 402
Symbols	Name	Mono Mass	Average Mass	Count
Ala A	Alanine	71.03711	71.07880	23
Arg R	Arginine	156.10111	156.1876	26
Asn N	Asparagine	114.04293	114.1039	8
Asp D	Aspartic Acid	115.02694	115.0886	25
Cys C	Cysteine	103.00919	103.1448	4
Glu E	Glutamic Acid	129.04259	129.1155	27
Gln Q	Glutamine	128.05858	128.1308	21
Gly G	Glycine	57.02146	57.0520	26
His H	Histidine	137.05891	137.1412	14
Ile I	Isoleucine	113.08406	113.1595	19
Leu L	Leucine	113.08406	113.1595	39
Lys K	Lysine	128.09496	128.1742	19
Met M	Methionine	131.04049	131.1986	13
Phe F	Phenylalanine	147.06841	147.1766	13
Pro P	Proline	97.05276	97.1167	23
Ser S	Serine	87.03203	87.0782	33
Thr T	Threonine	101.04768	101.1051	14
Trp W	Tryptophan	186.07931	186.2133	1
Tyr Y	Tyrosine	163.06333	163.1760	14
Val V	Valine	99.06841	99.1326	40

ตารางที่ 3.1 การคำนวณหาขนาดของ recombinant A1 domain ที่สร้างจากเซลล์ COS-7 สาย polypeptide ของ recombinant A1 domain ที่ผลิตได้ประกอบด้วย amino acid 398 ตัว ดังที่แสดงอยู่ในแถบ บนสุดของตาราง หลังจากคำนวณขนาดของ recombinant A1 domain โดย software จาก website <http://proteome.gs.washington.edu> พบว่า predicted molecular weight ของ recombinant A1 domain ควร มีขนาดประมาณ 44.5 kD โดยขนาดดังกล่าวยังไม่รวมน้ำหนักของส่วนที่เป็น glycosylation

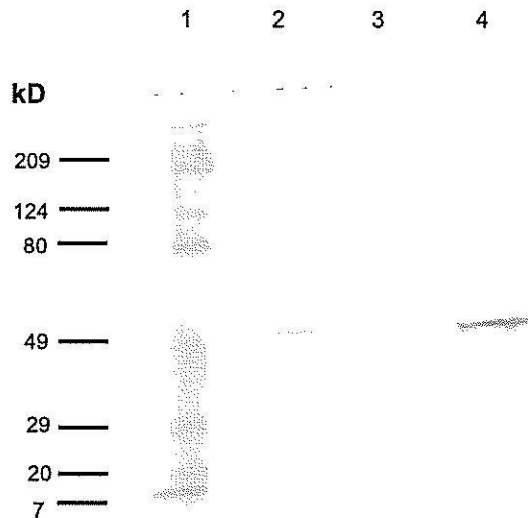




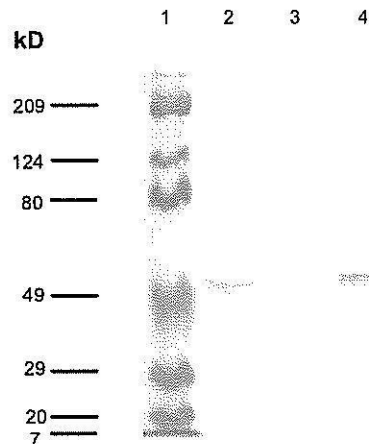


## 2. คุณสมบัติในการละลายน้ำของ recombinant A1 domains ที่สร้างจากเซลล์ COS-7

รูป 3.2a และ 3.2b เป็น chromatogram จากการตรวจสอบลำดับ nucleotide แสดงให้เห็นว่า mutant plasmid มี insert ที่เป็น A1 domain gene ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลง nucleotide 3 ตำแหน่ง อันจะทำให้เกิดการสร้าง serine แทน cysteine วัตถุประสงค์เพื่อลดโอกาสในการเกิดการสร้าง disulfide bond ระหว่างกรดอะมิโน 2 สาย ทำให้กรดอะมิโนในโครงสร้างของ A1 domain มี cysteine เพียงแค่ 2 ตัวเท่านั้น cysteine ที่เหลือ 2 ตัวนี้มีความจำเป็นในการสร้าง disulfide bond เพื่อการสร้างเป็น domain อย่างไรก็ตามหลังจากตรวจสอบการละลายน้ำพบว่า recombinant A1 ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ COS-7 ทั้ง wild type และ mutant ไม่สามารถละลายในน้ำได้ สังเกตได้จากผลการทดลองในรูปที่ 3.3 เมื่อใช้สารละลาย PBS ในการทำ homogenization และทำการ centrifugation จะไม่พบ recombinant A1 protein ในส่วนของ supernatant และเมื่อเติม 1% Triton-X ก็ยังไม่พบ recombinant A1 protein ในส่วนของ supernatant เช่นกัน (รูปที่ 3.4) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า recombinant A1 domain ที่สร้างจากเซลล์ COS-7 ในครั้งนี้ไม่สามารถละลายน้ำได้ และไม่ใช่มembrane bound protein



รูปที่ 3.3 การเปรียบเทียบความสามารถในการละลายใน PBS ระหว่าง wild type และ mutant VWF A1 domain protein Lane ที่ 1= molecular weight marker; lane 2 = pellet ของ wild type; lane 3 = supernatant ของ wild type; lane 4 = pellet ของ mutant; lane 5 = supernatant ของ mutant ตรวจสอบด้วย anti-VWF antibody ตัวเลขทางซ้ายมือคือขนาดโมเลกุลของ standard หน่วย เป็น kD



รูปที่ 3.4 การตรวจสอบการละลายของ mutant VWF A1 domain ใน 1% Triton X-100 Lane ที่ 1= molecular weight marker; lane 2 = cell homogenate; lane 3 = supernatant; lane 4 = pellet ตรวจสอบด้วย anti-VWF antibody ตัวเลขทางซ้ายมือคือขนาดโมเลกุลของ standard หน่วย เป็น kD

### 3. การสร้าง recombinant VWF A1 domain โดยแบคทีเรียและการสกัดแยก

การสร้าง recombinant VWF A1 domain จากแบคทีเรียในการวิจัยนี้ทำโดยใช้ pQE60 vector ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ลำดับของ nucleotide ใน A1 domain gene (ความยาว=788 base) แสดงอยู่ในรูปที่ 3.5 โปรตีนที่สร้างขึ้นมีควรวางขนาดประมาณ 29 kD การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลแสดงไว้ในตาราง 3.2 หลังจากทำการสกัดแยก recombinant VWF A1 domain และทำการตรวจสอบโครงสร้างของโปรตีนโดย SDS-PAGE และ western blot พบว่า โปรตีนที่สกัดได้มีโครงสร้างในสภาพ native เนื่องจาก recombinant A1 domain เคลื่อนที่ใน SDS-PAGE แบบ nonreducing ได้เร็วกว่าแบบ reducing หรืออีกนัยหนึ่งคือมีการเพิ่ม electrophoretic mobility ใน SDS-PAGE แบบ nonreducing เทียบกับแบบ reducing (รูปที่ 3.6)

จากการตรวจวิเคราะห์ recombinant A1 domain ด้วยวิธี HPLC-MS พบโปรตีนขนาด 28.890 kD และ 14.447 kD จำนวนมากที่สุด (รูปที่ 3.7)

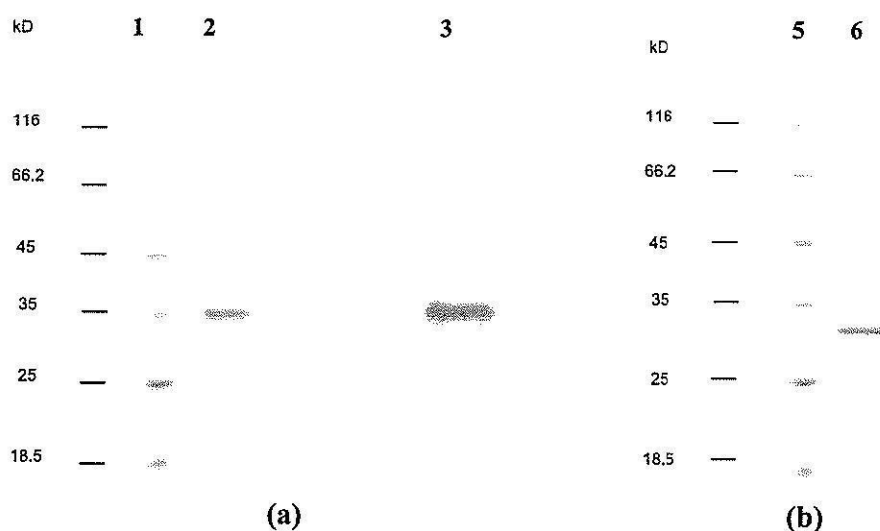
### 4. ผลของ ristocetin ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant VWF A1 domain

เมื่อทำการทดสอบโดยป้อน ristocetin กับสารละลายของ recombinant A1 domain พบว่า band ที่ตรวจพบใน SDS-PAGE เปลี่ยนจาก 1 band เป็นหลาย band (รูปที่ 3.8) ไม่ว่าจะป้อนใน SDS-PAGE แบบ reducing หรือ nonreducing ในขณะที่เดียวกันเมื่อป้อนกับ vancomycin ไม่มีก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว และเมื่อตรวจสอบผลของ ristocetin ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1

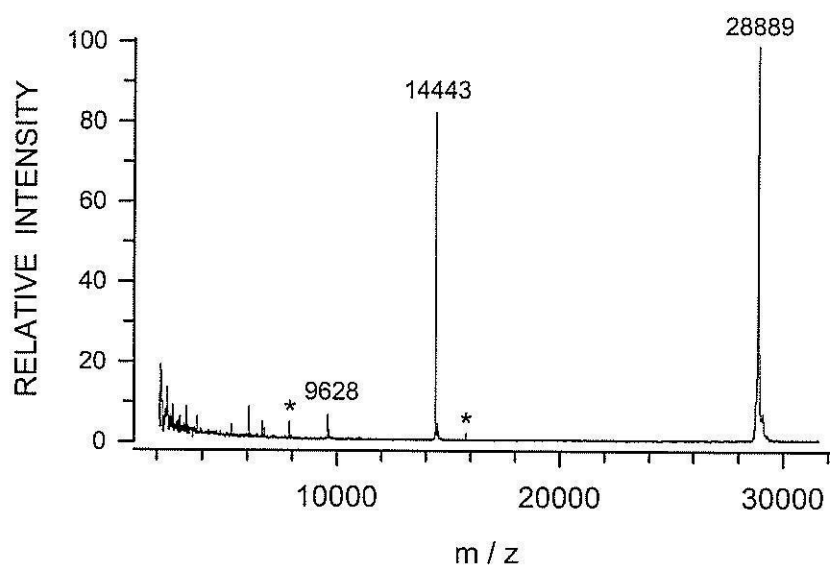


<b>Amino Acid Sequence</b>				
<p><i>MDVVNLTSEASQEPGGGLVVPPTDAPVSPPTLYVEDISEPPLHDFY            CSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMMERLRISQKWVRV            AVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPELRRIASQVKYAGSQVASTSEVL            KYTLFQIFSKIDRPEASRIALLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKK            KKVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQRD            EIVSYLCDLAPEAPPPTLPPHMAQVTVGPGLLR</i></p>				
<b>N-Terminal Group:</b> Hydrogen		<b>Mono Isotopic Mass:</b> 28959.29562		<b>Sequence Length:</b> 259
<b>C-Terminal Group:</b> Free Acid		<b>Average Mass:</b> 28977.5698		
Symbols	Name	Mono Mass	Average Mass	Count
Ala A	Alanine	71.03711	71.07880	18
Arg R	Arginine	156.10111	156.1876	17
Asn N	Asparagine	114.04293	114.1039	4
Asp D	Aspartic Acid	115.02694	115.0886	13
Cys C	Cysteine	103.00919	103.1448	2
Glu E	Glutamic Acid	129.04259	129.1155	19
Gln Q	Glutamine	128.05858	128.1308	13
Gly G	Glycine	57.02146	57.0520	11
His H	Histidine	137.05891	137.1412	5
Ile I	Isoleucine	113.08406	113.1595	13
Leu L	Leucine	113.08406	113.1595	29
Lys K	Lysine	128.09496	128.1742	14
Met M	Methionine	131.04049	131.1986	6
Phe F	Phenylalanine	147.06841	147.1766	8
Pro P	Proline	97.05276	97.1167	20
Ser S	Serine	87.03203	87.0782	23
Thr T	Threonine	101.04768	101.1051	8
Trp W	Tryptophan	186.07931	186.2133	1
Tyr Y	Tyrosine	163.06333	163.1760	8
Val V	Valine	99.06841	99.1326	27

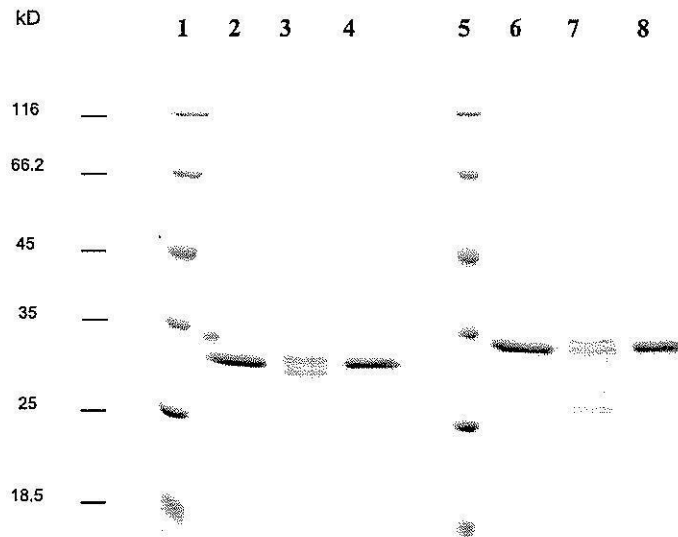
ตารางที่ 3.2 น้ำหนักโมเลกุลของ mutant recombinant A1 domain ที่สร้างจากแบคทีเรีย คำนวณโดยใช้ software จาก website <http://proteome.gs.washington.edu> สายของ polypeptide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 265 ตัว น้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้เท่ากับ 28.977 kD



รูปที่ 3.6 การตรวจวิเคราะห์ recombinant A1 domain ที่สกัดได้จากแบคทีเรียโดยใช้ SDS-PAGE โดยการใส่ gel 2 แบบ คือ แบบที่เป็น reducing (a) และแบบที่เป็น nonreducing (b) จากซ้ายของ (a), lane 1 = molecular weight marker; lane 2 = purified recombinant A1 protein (6  $\mu$ g) ย้อมสีด้วย Coomassie blue lane 3 = purified recombinant A1 protein (6  $\mu$ g) ตรวจสอบด้วย anti-VWF antibody จากซ้ายของ (b), lane 1 = molecular weight marker; lane 2 = purified recombinant A1 protein (6  $\mu$ g) ย้อมสีด้วย Coomassie blue

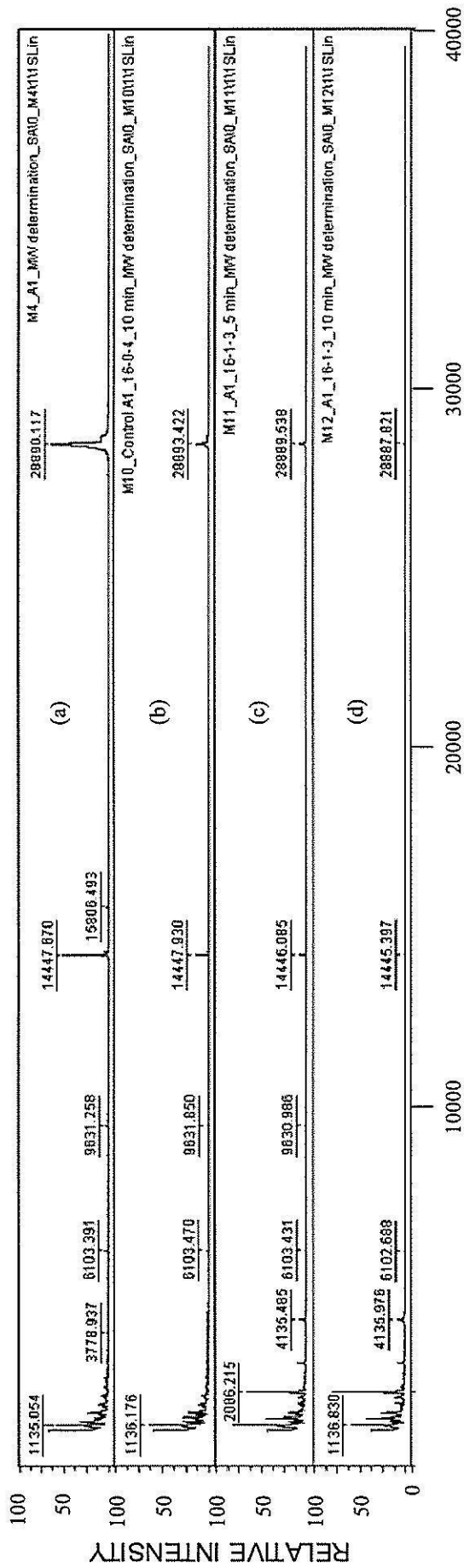


รูปที่ 3.7 การตรวจวิเคราะห์ recombinant A1 domain ที่สกัดได้จากแบคทีเรียโดยใช้ HPLC-MS เมื่อนำ recombinant A1 domain มาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-MS พบว่าโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุล 28.889 และ 14.443 kD ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น A1 domain ที่มีประจุ +1 และ +2 ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 ผลของ ristocetin ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain จากซ้าย lane 1 และ 5 = molecular weight marker; lane 2 และ 6 = purified recombinant A1 protein (6  $\mu$ g); lane 3 และ 7 = purified recombinant A1 protein + ristocetin; lane 4 และ 8 = purified recombinant A1 protein + vancomycin; lane 1-4 = non reducing SDS-PAGE ส่วน lane 5-8 = reducing SDS-PAGE ย้อมสีด้วย Coomassie blue

domain ด้วย HPLC-MS พบผลการทดลองที่สอดคล้องกัน (รูปที่ 3.9) คือหลังการป่มกับ ristocetin พบกรดอะมิโนสายสั้น ๆ (4.135 และ 2.086 kD) เกิดขึ้นขณะที่กรดอะมิโน ขนาด 28.890 kD และ 14.447 kD มี relative intensity ลดลง



รูปที่ 3.9 ผลของ ristocetin ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain โดยวิธี HPLC-MS chromatogram (a) แสดงมวลโมเลกุลของ recombinant A1 domain หลังจากรับกับ ristocetin เป็นเวลา 5 นาที (c) และ 10 นาที (d) พบว่าเกิดการอะมิโนใหม่ซึ่งมีขนาด โมเลกุล 4.135 และ 2.086 kD ขึ้น igr จะมิโนดังกล่าวไม่น่าจะเกิดจากการสลายตัวเอง สังเกตได้จาก chromatogram (b) ซึ่ง ได้จากตัวอย่างของ recombinant A1 domain ซึ่งรับโดยปราศจาก ristocetin นาน 10 นาที

## บทที่ 4

### อภิปรายผลการทดลอง

โครงสร้างของ VWF A1 domain มีความสำคัญต่อหน้าที่ในการจับและกระตุ้นเกล็ดเลือด สังเกตได้ในผู้ป่วยโรค von Willebrand disease แบบที่ 2 ซึ่งมี mutation ของ A1 domain มีการศึกษาวิจัยพบตำแหน่งที่เกิด mutation อย่างน้อย 10 ตำแหน่งบน A1 domain gene ในผู้ป่วยโรคนี้ โดยพบทั้งที่เป็น single nucleotide, insert/deletion และ single amino acid polymorphism [22] ด้วยเหตุนี้ การศึกษาโครงสร้างของ VWF A1 domain จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก การ clone ยีนของ A1 domain ในการศึกษาวิจัยนี้แตกต่างจากการศึกษาที่ได้เคยรายงานไปแล้วคือใช้ genomic DNA ของคนเป็นต้นแบบแทนการใช้ mRNA การ clone ยีน A1 domain จาก genomic DNA นั้นจะมีข้อได้เปรียบคือ จะทำให้สามารถนำไปใช้สร้างและศึกษาหน้าที่ของ A1 domain จากประชากรที่มี mutation รวมทั้งประชากรที่มี polymorphism ของยีนดังกล่าวต่างกัน นอกจากนั้นอาจนำเทคนิคนี้ไปใช้ identify ผู้ป่วยที่เป็นโรค von Willebrand disease แบบ 2B และ 2M ได้เนื่องจากผู้ป่วยทั้งสองแบบจะมี point mutation ของ VWF A1 domain

VWF ที่ร่างกายสร้างขึ้นมาตามธรรมชาตินั้นจะมีโครงสร้างขนาดใหญ่และซับซ้อน เนื่องจากเป็น multimeric ทำให้ยากที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ นอกจากนั้นแต่ละ domain ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของ VWF นั้นจะมีหน้าที่ที่แตกต่างกันและเป็นอิสระต่อกัน [23, 24] การหาวิธีสร้าง domain ที่เป็นส่วนประกอบของ VWF แยกเป็นแต่ละ domain ได้จึงมีคุณค่าอย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของ VWF ดังกล่าว ดังนั้นจึงมีกลุ่มนักวิจัยหลายคณะพยายามที่จะสร้าง VWF A1 domain protein จาก mammalian cell [25-28], yeast [29], และ bacteria [30-38] ซึ่ง VWF A1 domain protein ที่เคยมีรายงานมาก่อนนี้ จะอยู่ในรูปของ inclusion body ดังนั้นจะต้องทำการ denature ด้วย urea หรือ guanidinium chloride และทำการ refold ให้กลับคืนสภาพเดิมก่อนนำไปทดสอบหน้าที่ของ โปรตีนที่ผลิตขึ้น อย่างไรก็ตามหลังจากทำการ refold แล้วไม่สามารถยืนยันได้แน่ชัดว่าการ refold นั้นจะได้โปรตีนที่เหมือนกับธรรมชาติกลับคืนมาก โดยสมบูรณ์ เนื่องจากยังมี cysteine ในโครงสร้างอีกทั้งหมด 7 ตัว ที่สามารถจะสร้างพันธะ disulfide ให้เกิดเป็น domain ที่แตกต่างไปได้

ในช่วงแรกของการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยวางแผนที่จะสร้าง VWF A1 domain protein จาก COS-7 cell ซึ่งเป็น mammalian cell เพื่อให้โปรตีนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ A1 domain จากธรรมชาติมากที่สุด หลังจากตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตขึ้นโดยการใช้ anti-Xpress และ anti-VWF antibody และขนาดของโปรตีนตรงตามที่คาดหมาย (รูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1) รวมทั้งได้ทำการตรวจสอบว่าไม่มี



ข้อผิดพลาดในยีนที่ทำการ clone (รูปที่ 3.2) ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการละลายของโปรตีนแต่พบว่าโปรตีนที่สร้างขึ้นเกิดเป็น inclusion body ไม่สามารถละลายน้ำได้ (รูปที่ 3.3) รวมทั้งไม่ใช่ membrane bound protein เนื่องจากไม่สามารถละลายได้ด้วย 1% Triton-X (รูปที่ 3.4) จากการนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้อง fluorescence โดยใช้ vector ที่มียีน green fluorescence protein พบว่าวิธีที่ใช้เซลล์ COS-7 สามารถ express โปรตีนได้ yield ประมาณ 25-30% ซึ่งค่อนข้างต่ำ การสกัดแยกให้บริสุทธิ์จึงทำได้ยาก ผู้วิจัยจึงได้ทดลองเปลี่ยนวิธีผลิตโปรตีนโดยการใช้แบคทีเรียแทน เนื่องจาก yield ที่ได้จากแบคทีเรียจะมีปริมาณสูงกว่าการผลิตจาก mammalian cell

ในการผลิตโปรตีนจากแบคทีเรีย หลังจากได้ทำการตรวจสอบแล้วว่าไม่มีข้อผิดพลาดในการทำ subcloning (รูปที่ 3.5) ผู้วิจัยได้ทำการผลิต recombinant VWF A1 domain protein จากการ transform bacteria M15 โดยใช้ pQE 60 vector พบว่าโปรตีนที่ผลิตขึ้นมีความแตกต่างจากโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากการศึกษาวิจัยอื่นในแง่ของการละลาย โปรตีนจากการศึกษานี้สามารถละลายน้ำได้ดีพร้อมให้ทำการสกัดแยกโดยไม่จำเป็นต้องทำการ unfold ก่อนการสกัดแยกด้วย cation exchange chromatography แล้วทำการ refold ให้กลับคืนโครงสร้างเดิมเหมือนกับการผลิตโปรตีนชนิดนี้ในการศึกษาวิจัยอื่น ๆ [30-38] อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใดที่ทำให้เกิดคุณสมบัติที่แตกต่างดังกล่าว แต่คาดว่าตำแหน่งของ histidine tag ของ recombinant protein อาจมีความสำคัญต่อการละลายเพราะตำแหน่งของ histidine tag ใน recombinant protein จากการศึกษานี้อยู่ทางด้าน C-terminal ขณะที่ในการศึกษาอื่น histidine tag จะอยู่ทางด้าน N-terminal ผู้วิจัยเชื่อว่าความยาวของ amino acid ที่เป็นส่วนประกอบในสายของ peptide ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายของโปรตีนที่สร้างขึ้น เนื่องจากโปรตีนที่สร้างขึ้นในงานวิจัยของนักวิจัยกลุ่มอื่น ๆ ไม่ว่าจะสั้นหรือยาวกว่าโปรตีนที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้แล้วแต่ไม่สามารถละลายน้ำได้ทั้งสิ้น

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปแล้วว่าพันธะ disulfide ที่ทำให้เกิดโครงสร้างเป็น loop ระหว่าง C509 (1272) และ C695 (1458) ใน VWF-A1 domain มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการจับกับ GpIb, heparin, collagen และ ristocetin ซึ่งในโครงสร้างของ VWF-A1 domain ในการศึกษานี้ยังมี cysteine อีก 3 ตัวที่อาจจะก่อให้เกิดการจับกับระหว่างสายของ polypeptide ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำ site direct mutagenesis ที่ตำแหน่ง 1227, 1234 และ 1237 เนื่องจากมีหลักฐานว่า cysteine อีก 3 ตัวก่อให้เกิดการเกาะกันของ recombinant proteins [33, 34, 38]

หลังจากสกัดแยกและตรวจสอบ recombinant A1 domain protein ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียด้วย antibody และเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณตามตารางที่ 3.2 (28.977 kD) และ standard marker บน SDS-PAGE (รูปที่ 3.6) พบว่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยละเอียดด้วยเครื่อง mass spectrometry (รูปที่ 3.7) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลลดลงจากที่คาดการณ์เล็กน้อย โดยโปรตีนที่ได้มีจำนวน amino acid น้อยลงกว่าที่คาดการณ์ประมาณ 7 หรือ 8

ตัว ผู้วิจัยคาดว่าอาจเป็นไปได้ที่จะมี post-translational processing ที่ N-terminal ซึ่งการตัดออกของ methionine ซึ่งอยู่ที่ปลายด้าน N-terminal จะพบได้เสมอในการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย [39] ในบางครั้งอาจพบการตัดออกของ amino acid เพิ่มต่อไปอีกทำให้สายสั้นลงอีกเล็กน้อยประมาณไม่เกิน 10 ตัว [40] ในกรณีนี้มีความเป็นไปได้ว่า amino acid ที่ถูกตัดออกไปนั้นทำหน้าที่เป็น signal protein ที่ช่วยในการทำให้โปรตีนละลายน้ำได้ เนื่องจากเคยมีรายงานว่าในแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *E. coli* มีการแสดงออกของ signal protein โดยโปรตีนดังกล่าวมีความยาวประมาณ 8 amino acid [41-42] อย่างไรก็ตามยังต้องมีการหาหลักฐานมาสนับสนุนสมมุติฐานดังกล่าวว่ามีความเป็นไปได้หรือไม่

หลังจากสกัดแยกพบว่าได้ปริมาณโปรตีนจำนวนประมาณ 2 mg/liter ของ bacterial culture และดังที่ได้กล่าวไปแล้วว่าโปรตีนที่ผลิตได้จากการวิจัยนี้สามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นระหว่างการสกัดแยก โปรตีนดังกล่าวจะคงอยู่ในสภาพที่เป็น native protein ตลอดกระบวนการสกัด สังเกตได้จากโปรตีนเคลื่อนที่ไปบน nonreducing SDS-PAGE ได้ระยะทางที่สั้นกว่าใน reducing SDS-PAGE และจากการศึกษาบน SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่สกัดแยกได้นั้นมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง mass spectrometry จะพบสารปนเปื้อนอยู่บ้างเล็กน้อย ซึ่งไม่น่าจะมีผลกระทบมากนักหากนำไปศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในขั้นต่อไป ตามแผนงานที่วางไว้เดิม ผู้วิจัยจะนำไปทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain protein ที่ผลิตได้ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถทำได้โดยทดสอบความสามารถของ proteolytic enzyme ชนิดต่าง ๆ ในการเข้าตัดก่อนและหลังการเติม ristocetin โดยใช้หลักการที่ว่า เมื่อ ristocetin จับกับ recombinant A1 domain และมีการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ A1 domain แล้ว proteolytic enzyme ที่เคยเข้าตัด recombinant A1 domain ได้จะไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้เช่นเดิม หลังการบ่มกับ ristocetin แต่ทว่าเมื่อทำการทดลองบ่ม recombinant A1 domain กับ ristocetin เป็นเวลา 5 นาทีพบว่า ristocetin ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain บน SDS-PAGE (รูปที่ 3.8) และโดยการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry (รูปที่ 3.9) โดยไม่จำเป็นต้องตัดด้วยเอนไซม์ใด ๆ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวน่าจะเกิดขึ้นจากฤทธิ์ของ ristocetin แบบเฉพาะเจาะจง ยืนยันได้จากผลของ vancomycin ซึ่งเป็น antibiotics ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ ristocetin แต่ไม่ทำให้เกิดการกระตุ้นเกล็ดเลือดให้เกาะตัวกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสามารถยืนยันได้ว่า การสลายตัวของ recombinant A1 domain ไม่ได้เกิดขึ้นเองจากการเสื่อมตามธรรมชาติเมื่อเวลาผ่านไป สังเกตได้จาก panel b ในรูปที่ 12 ที่ไม่เกิดสายของ amino acid ใหม่ขึ้นหลังจากบ่ม recombinant A1 domain นาน 10 นาทีโดยไม่ใส่ ristocetin การ degradation ของ VWF ซึ่งเกิดขึ้นหลังการสัมผัสกับ ristocetin โดยไม่จำเป็นต้องถูกย่อยด้วยเอนไซม์ใด ๆ เมื่อเปรียบเทียบการศึกษานี้กับงานวิจัยที่มีรายงานไปแล้ว โดย Kang และคณะ [43] พบว่าแม้ว่าผลการทดลองของนักวิจัยกลุ่มนี้จะสนับสนุนว่า ristocetin ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF ของคน เนื่องจากไปเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการตัด

purified human VWF ด้วยเอนไซม์ trypsin โดย ristocetin ไปทำให้ fragment ขนาด 130, 145, 181 และ 199 kD ลดลง ขณะเดียวกันก็ทำให้ fragment ขนาด 109 และ 160 kD เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยนี้มิได้ทำการทดลองเพื่อตัดผลของ ristocetin ต่อ purified human VWF ออกไป อาจเป็นไปได้ว่า protein fragment ที่เกิดใหม่บาง fragment อาจเป็นผลมาจากฤทธิ์ของ ristocetin ก็ได้ คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ควรออกแบบการทดลองโดยบ่ม ristocetin กับ purified human VWF โดยปราศจากเอนไซม์ใดๆ เช่นเดียวกับการศึกษานี้ ถ้าหลังจากบ่มแล้วไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ จึงจะเป็นที่แน่นอนว่าการตัดนั้นเกิดขึ้นจากผลของเอนไซม์เพียงอย่างเดียวจริง เพื่อให้ชัดเจนในประเด็นนี้ผู้วิจัยเสนอว่าควรจะต้องมีการศึกษาผลของ ristocetin ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ native human VWF ว่าเหมือนหรือต่างจาก recombinant A1 domain หรือไม่อย่างไร

การศึกษาวิจัยนี้ยังไม่ประสบผลสำเร็จในการเปรียบเทียบตำแหน่งตัด (cleavage site) ของ VWF fragment ด้วยเอนไซม์ chymotrypsin และ elastin ในสภาพที่มีและปราศจาก ristocetin ดังที่ตั้งวัตถุประสงค์ไว้เดิม แต่ผลจากการวิจัยนี้ก็สามารถใช้เป็นหลักฐานทางตรงอีกอันหนึ่งที่ช่วยสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF A1 domain ระหว่างการชักนำให้เกิดการเกาะตัวของเกล็ดเลือดในภาวะที่ถูกกระตุ้นได้ อย่างไรก็ตามสิ่งที่ควรจะต้องศึกษาวิจัยต่อไปคือการพิสูจน์ว่า recombinant VWF A1 domain ที่ผลิตขึ้นนี้สามารถทำหน้าที่จับกับ GP1b receptor บนเชื้อหุ้มของเกล็ดเลือดที่สกัดจากเลือดของคนเช่นเดียวกับ VWF ในธรรมชาติจริงหรือไม่ เพื่อจะได้เป็นหลักฐานยืนยันให้แน่ใจว่า ristocetin ที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant VWF A1 domain ในการศึกษาที่น่าจะสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF ในธรรมชาติได้เช่นเดียวกัน

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการผลิต recombinant VWF A1 domain ได้จากเซลล์ COS-7 ซึ่งเป็นเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้สำเร็จ การผลิตทำได้โดยการ clone gene จาก genomic DNA ของคน วิธีที่ผู้วิจัยใช้และ PCR ที่ออกแบบขึ้นจะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม VWD ชนิดที่ 2 และยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษา polymorphism ที่ต่างกันของคนได้ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาการกระจายของ polymorphism ของ A1 domain ในคนไทย อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง ๆ ที่ผู้วิจัยได้ทำ site direct mutagenesis เปลี่ยน cysteine ตรงตำแหน่งที่ไม่จำเป็นต่อการสร้าง A1 domain ทั้ง 3 ตัวไปเป็น serine เพื่อป้องกันการเกิดการเกาะตัวกันระหว่างสายของโปรตีนแล้ว โปรตีนที่ผลิตได้จากเซลล์ COS-7 กลับเกิดเป็น inclusion body ไม่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้เกิดอุปสรรคในการสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปศึกษาโครงสร้างในขั้นต่อไป

ผู้วิจัยได้เปลี่ยนวิธีผลิต recombinant VWF A1 domain โดยผลิตจากแบคทีเรียแทนการใช้เซลล์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้ไม่เกิด inclusion body ซึ่งคุณสมบัตินี้แตกต่างจากโปรตีนที่ผลิตได้จากงานวิจัยที่มีผู้รายงานไว้แล้ว ทำให้ไม่จำเป็นต้องทำการ denature โปรตีนด้วย reducing agent อันจะทำให้โปรตีนที่สร้างขึ้นอาจเกิดการ misfold ระหว่างขั้นตอนของการ refold ได้ ข้อดี recombinant VWF A1 domain ที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ คือ สามารถนำมาสกัดให้บริสุทธิ์ได้โดยโปรตีนคงสภาพธรรมชาติตลอดกระบวนการสกัด อย่างไรก็ตามโปรตีนที่สร้างได้จากแบคทีเรียจะมีข้อเสียเปรียบกว่าการสร้างจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากไม่มีส่วนที่เป็น glycosylation ดังนั้นหน้าที่ของโปรตีนที่สร้างขึ้นจะสามารถทำหน้าที่เช่นเดียวกับ natural A1 domain หรือไม่ จำเป็นต้องมีการทดลองเพื่อพิสูจน์ให้แน่ชัดต่อไป

หลังจากที่สกัดแยก recombinant VWF A1 domain ให้บริสุทธิ์แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ recombinant A1 domain โดยใช้ ristocetin ซึ่งเป็นสารที่ยอมรั้งกันอย่างกว้างขวางในการเป็น pharmacological tool ในการกระตุ้นเกล็ดเลือดให้เกาะตัวกัน พบว่า ristocetin ทำให้ recombinant A1 domain เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยทำให้เกิดการสลายตัวเป็น amino acid สายที่สั้นลง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของการตัด recombinant A1 domain ด้วยเอนไซม์ chymotrypsin และ elastin ในขณะที่มีและปราศจากสารกระตุ้นดังที่ตั้งวัตถุประสงค์ไว้เดิมได้ อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้อาจเป็นหลักฐานเพิ่มเติมที่ช่วยสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ A1 domain เมื่อมีการสัมผัสกับสารกระตุ้นการเกาะตัวของเกล็ดเลือด

## เอกสารอ้างอิง

1. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco L and Hellums JD. (1988). Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood*. 71:1366-1374.
2. Sugimoto M and Miyata S. (2002). Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. *Int. J. Hematol.* 75:19-24.
3. van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, Heijnen HFG, Connolly T M, de Groot PG and Sixma JJ. (1994). Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J. Clin. Invest.* 93:615-632.
4. Ruggeri ZM. (1999). Structure and function of von Willebrand factor. *Throm. Haemost.* 82: 576-584.
5. Zehnder JL. Drugs used in disorders of coagulation. In : Katzung BG, Masters SB and Trevor AJ, eds. *Basic & Clinical Pharmacology*. 11<sup>th</sup> edition, New York : McGraw-Hill, 2009; 587-603.
6. Hoyer LM and Shainoff JR. (1980). FactorVIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. *Blood* 55:1056-1059.
7. Ruggeri ZM and Zimmerman TS. (1981). The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. *Blood*. 57:1140-1143.
8. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, Roberts JR, Kostel P, Ruggeri ZM, and Zimmerman TS. (1987). A heparin-binding domain of human von Willebrand factor: characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. *J. Biol. Chem.* 262:1734-1739.
9. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, Russell SR, Roberts JR, Elder JH, Ruggeri ZM, and Zimmerman TS. (1986). von Willebrand factor: a reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 261:381-385.
10. Ginsburg D and Sadler JE. (1993). von Willebrand disease: a data base of point mutations, insertions and deletions. *Thromb. Haemost.* 69:177-184.

11. Sadler JE, Matsushita T, Dong Z, Tuley EA, and Westfield LA. (1995). Molecular mechanism and classification of von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 74:161-166.
12. Berndt MC, Du X, and Booth WJ. (1988). Ristocetin-dependent reconstitution of binding of von Willebrand factor to purified human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry.* 27:633-640.
13. Andrews RK, Booth WJ, Gorman JJ, Castaldi PA, and Berndt MC. (1989). Purification of botrocetin from Bothrops jararaca venom: analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry.* 28:8317-8326.
14. Berndt MC, Ward CM, Booth WJ, Castaldi PA, Mazurov AV, and Andrews RK (1992) Identification of aspartic acid 514 through glutamic acid 542 as a glycoprotein Ib-IX complex receptor recognition sequence in von Willebrand factor: mechanism of modulation of von Willebrand factor by ristocetin and botrocetin. *Biochemistry* 31:11144-11151.
15. De Marco L, Girolami A, Russell S, and Ruggeri ZM. (1985). Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and mediates platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* 75:1198-1203.
16. Dong J-F, Berndt MC, Schade A, McIntire LV, Andrews RK, and López JA. (2001). Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions. *Blood* 97:162-168.
17. Celikel R, Ruggeri ZM, and Varughese KI. (2000). von Willebrand factor conformation and adhesive function is modulated by an internalized water molecule. *Nature Struct. Biol.* 7:881-884.
18. Jenkins PV, Pasi KJ, and Perkins SJ. (1998). Molecular modeling of ligand and mutation sites of the type A domains of human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease. *Blood.* 91:2032-2044.
19. Kang M and Kermode JC. (2001). Correlation between changes in conformation and function of von Willebrand factor. *FASEB J.* 15:A592 (abstract).
20. Kang M and Kermode JC. (2002). Ristocetin promotes parallel changes in the susceptibility of von Willebrand factor to elastase digestion and in its binding to the platelet. *FASEB J.* 16:A204 (abstract).

21. Emsley J, Cruz MA, Handin RI, and Liddington R. (1998). Crystal structure of the von Willebrand factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 273:10396-10401.
22. Goodeve A and Peake I. (2001). A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 14: 235-240.
23. Burley SK, and Bonanno JB. Structuring the universe of proteins. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:243–62.
24. Ponting CP, and Russell RR. The natural history of protein domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:45–71.
25. Azuma H, Dent JA, Sugimoto M, Ruggeri ZM, and Ware J. Independent assembly and secretion of a dimeric adhesive domain of von Willebrand factor containing the glycoprotein Ib-binding site. *J Biol Chem* 1991;266:12342–7.
26. Cruz MA, Handin RI, and Wise RJ. The interaction of the von Willebrand factor-A1 domain with platelet glycoprotein Ib/IX: the role of glycosylation and disulfide bonding in a monomeric recombinant A1 domain protein. *J Biol Chem* 1993;268:21238–45.
27. Miyata S, Goto S, Federici AB, Ware J, and Ruggeri ZM. Conformational changes in the A1 domain of von Willebrand factor modulating the interaction with glycoprotein Iba. *J Biol Chem* 1996;271:9046–53.
28. Hulstein JJJ, de Groot PG, Silence K, Veyradier A, Fijnheer R, and Lenting PJ. A novel nanobody that detects the gain-of-function phenotype of von Willebrand factor in ADAMTS13 deficiency and von Willebrand disease type 2B. *Blood* 2005;106:3035–42.
29. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RAP, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, and Gros P. Structures of glycoprotein Iba and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science* 2002;297:1176–9.
30. Gralnick HR, Williams S, McKeown L, Kramer W, Krutzsch H, Gorecki M, Pinet A, and Garfinkel LI. A monomeric von Willebrand factor fragment, Leu-504—Ser-728, inhibits von Willebrand factor interaction with glycoprotein Ib—IX. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7880–4.
31. Cruz MA, Handin RI, and Wise RJ. The interaction of the von Willebrand factor-A1 domain with platelet glycoprotein Ib/IX: the role of glycosylation and disulfide bonding in a monomeric recombinant A1 domain protein. *J Biol Chem* 1993;268:21238–45.



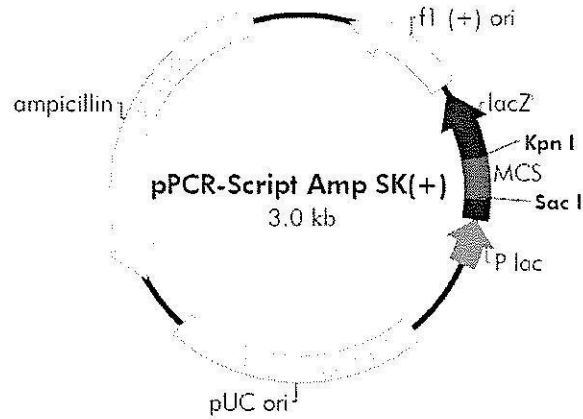
32. Miyata S, Goto S, Federici AB, Ware J, and Ruggeri ZM. Conformational changes in the A1 domain of von Willebrand factor modulating the interaction with glycoprotein Iba. *J Biol Chem* 1996;271:9046–53.
33. Piétu G, Meulien P, Cherel G, Diaz J, Baruch D, Courtney M, and Meyer D. Production in *Escherichia coli* of a biologically active subfragment of von Willebrand factor corresponding to the platelet glycoprotein Ib, collagen and heparin binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:1339–47.
34. Sugimoto M, Ricca G, Hrinda ME, Schreiber AB, Searfoss GH, Bottini E, and Ruggeri ZM. Functional modulation of the isolated glycoprotein Ib binding domain of von Willebrand factor expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1991;30:5202–9.
35. Sugimoto M, Dent J, McClintock R, Ware J, and Ruggeri ZM. Analysis of structure—function relationships in the platelet membrane glycoprotein Ib-binding domain of von Willebrand's factor by expression of deletion mutants. *J Biol Chem* 1993;268:12185–92.
36. Miura S, Li CQ, Cao Z, Wang H, Wardell MR, and Sadler JE. Interaction of von Willebrand factor domain A1 with platelet glycoprotein Iba-(1–289): slow intrinsic binding kinetics mediate rapid platelet adhesion. *J Biol Chem* 2000;275:7539–46.
37. Dumas JJ, Kumar R, McDonagh T, Sullivan F, Stahl ML, Somers WS, and Mosyak L. Crystal structure of the wild-type von Willebrand factor A1–glycoprotein Iba complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations. *J Biol Chem* 2004;279:23327–34.
38. Zhu H, Wang Y, Jiang M, Ji S, Bai X, and Ruan C. Generation and characterization of a recombinant single chain Fv antibody to von Willebrand factor A1 domain from phage display library. *Thromb Res* 2005;116:385–91.
39. Frottin F, Martinez A, Peynot P, Mitra S, Holz RC, Giglione C, and Meinnel T. The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:2336–49.
40. Giglione C, Boularot A, and Meinnel T. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1455–74.
41. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, and von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 1997;10:1–6.
42. Saleh MT, Fillon M, Brennan PJ, and Belisle JT. Identification of putative exported/secreted proteins in prokaryotic proteomes. *Gene* 2001;269:195–204.



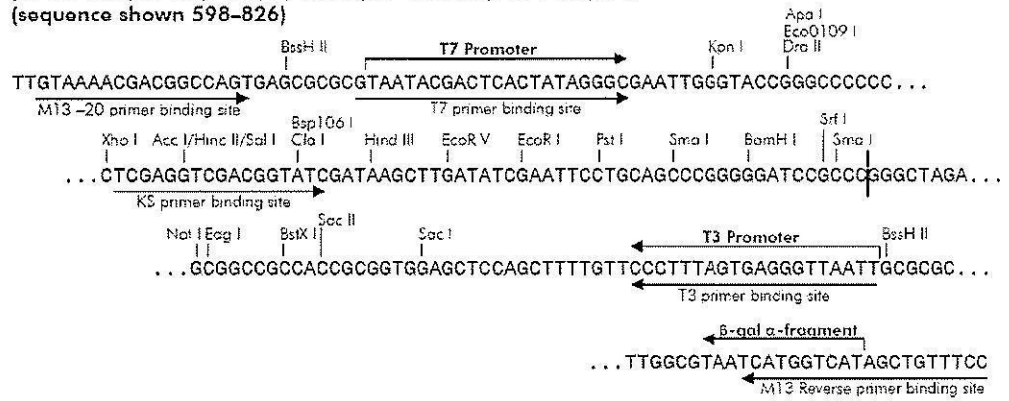
43. Kang M, Wilson L and Kernode JC. Evidence from limited proteolysis of a ristocetin-induced conformational change in human von Willebrand factor that promotes its binding to platelet glycoprotein Ib-IX-V. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:433–443.

ภาคผนวก

pPCR-Script Amp SK(+) Vector Map



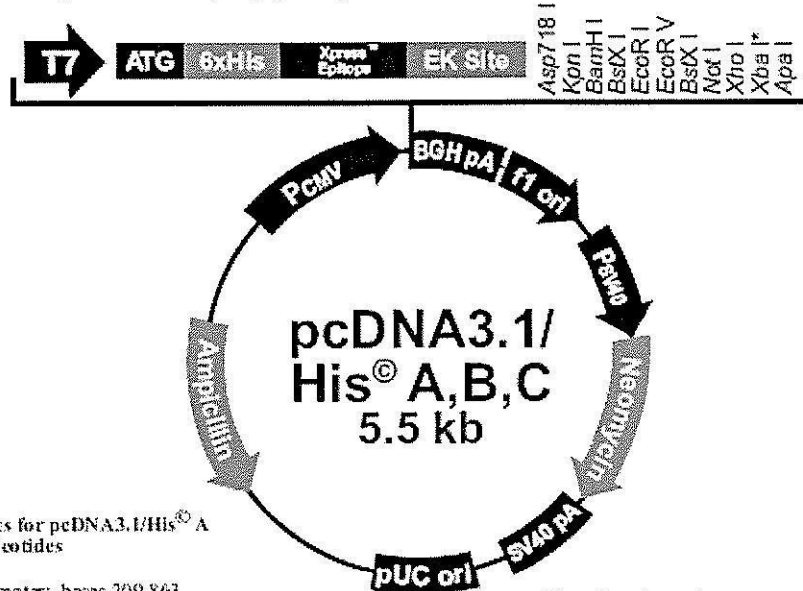
pPCR-Script Amp SK(+) Multiple Cloning Site Region  
(sequence shown 598-826)



## pcDNA3.1 His Vector Map

### Map of pcDNA3.1/His<sup>®</sup>

The figure below summarizes the features of the pcDNA3.1/His vectors. The sequences for pcDNA3.1/His A, B, and C are available for downloading from our Web site ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) or by contacting Technical Service (see page 10). Details of the multiple cloning sites are shown on page 2 for pcDNA3.1/His A, page 3 for pcDNA3.1/His B, and page 4 for pcDNA3.1/His C.



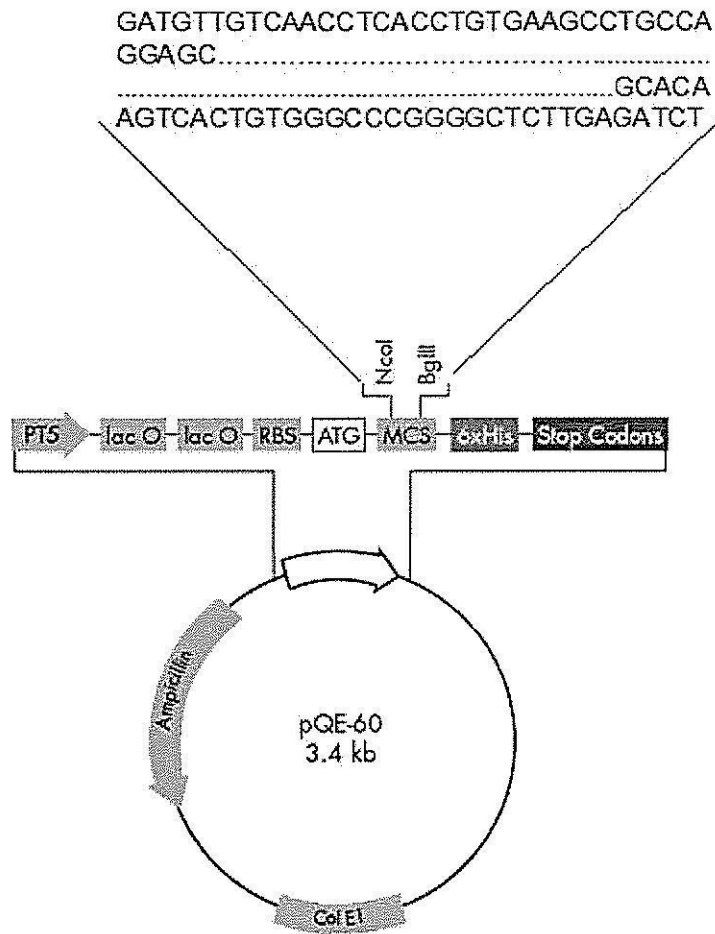
#### Comments for pcDNA3.1/His<sup>®</sup> A 5514 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863  
 T7 promoter/priming site: bases 863-882  
 ATG initiation codon: bases 920-922  
 Polyhistidine region: bases 932-949  
 Xpress<sup>™</sup> epitope: bases 989-1012  
 Enterokinase recognition site: bases 998-1012  
 Multiple cloning site: bases 1012-1085  
 BGH reverse priming site: bases 1105-1122  
 BGH polyadenylation signal: bases 1104-1318  
 fl ori: bases 1381-1794  
 SV40 early promoter and origin: bases 1859-2183  
 Neomycin resistance gene: bases 2219-3013  
 SV40 polyadenylation signal: bases 3029-3268  
 pUC origin: bases 3700-4373 (Complementary strand)  
 Ampicillin resistance gene: bases 4518-5379 (Complementary strand)

\*There is a stop codon following the Xba I site in version A.



**pQE-60 Vector Map**



**Multiple Cloning site of pQE-60 Vector**



## ประวัติผู้วิจัย

นวนน้อย จุฑะพงษ์ จบการศึกษาปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิตจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2528 ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยาจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2536 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาวิชา Pharmacology and Toxicology จาก University of Mississippi Medical Center ประเทศสหรัฐอเมริกาใน ปี พ.ศ. 2546 ปัจจุบันทำงานเป็นอาจารย์ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์