

Conformational changes in human von Willebrand factor: studies with a recombinant A1 domain

Nuannoi Chudapongse

Suranaree University of Technology

2008

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 20×10^6 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. 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. Conformational changes in the A1 domain of VWF are a topic of intense interest. 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. Moreover, in contrast to the previous reports, the A1 domain expressed in this study did not form an inclusion body, so it was in a native condition throughout the purification process without disrupting noncovalent or disulfide bonds in the protein structure. The results showed that structure of the recombinant A1 domain have changed after incubation of ristocetin. This data provides additional important evidence that changes in the structural of the A1 domain occur during the induction of platelet aggregation by ristocetin.

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

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์ของคน : การศึกษาโดยใช้รีคอมบิแนนท์เอวันโดเมน

นวนน้อย จูทะพงษ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2551

Von Willebrand factor (VWF) เป็น glycoprotein ในพลาสมาที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทำให้เลือดหยุดและการเกิดลิ่มเลือด โดยไปส่งเสริมให้เกล็ดเลือดเกาะกับ endothelium ในบริเวณเส้นเลือดที่ได้รับความเสียหาย VWF เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นไป เชื่อมต่อระหว่างกันด้วยพันธะ disulfide ทำให้โมเลกุลมีขนาดแตกต่างกัน โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20×10^6 ดาลตัน โมโนเมอร์แต่ละโมโนเมอร์ซึ่งประกอบเป็น VWF นั้นประกอบด้วย domain 4 แบบ (A ถึง D) A1 domain ของ VWF เป็นตำแหน่งจับของทั้ง glycoprotein Ib, heparin, ยาปฏิชีวนะ ristocetin และโปรตีนจากพิษงู botrocetin เชื่อกันว่า A1 domain เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญมากเนื่องจากพบว่ามีการ point mutation หลายจุดบนยีนของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือดซึ่งมีชื่อโรคว่า von Willebrand disease แบบที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ A1 domain เป็นการศึกษาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ในวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการโคลน VWF A1 domain จาก genomic DNA ของคนแทนการ clone จาก mRNA ซึ่งวิธีที่ค้นพบนี้มีข้อได้เปรียบคือ สามารถนำไปใช้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของ A1 domain ในผู้ที่มี polymorphism ของ VWF gene ต่างกันได้ นอกจากนั้นสิ่งที่แตกต่างไปจากงานวิจัยที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ คือ recombinant A1 domain ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในการศึกษานี้ไม่เกิดเป็น inclusion body ดังนั้นโปรตีนที่สร้างขึ้นจึงอยู่ในสภาพเดิมโดยไม่มีการทำลายพันธะ noncovalent หรือพันธะ disulfide ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ ผลการทดลองจากการใช้ recombinant A1 ที่สร้างได้นี้ พบว่าโครงสร้างของ A1 domain เปลี่ยนแปลงไปหลังจากมีการเติม ristocetin ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นหลักฐานสำคัญเพิ่มเติมที่แสดงให้เห็นว่า ristocetin ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ VWF A1 domain ระหว่างที่มีการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด

Keywords: วอนวิลลิแบรนด์แฟกเตอร์, เอวันโดเมน, รีคอมบิแนนท์, ริสโทซิน, โครงสร้าง