

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง Cyt2Aa และ Cry4Ba

การทดลองเพื่อค้นหาโปรตีน Cyt2Aa กลาย ไม่พบโปรตีน Cyt2Aa กลายที่ไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงแต่สามารถเสริมฤทธิ์กับโปรตีน Cry4Ba ได้ และไม่พบโปรตีน Cyt2Aa กลายที่ฆ่าลูกน้ำยุงได้แต่สูญเสียความสามารถในการเสริมฤทธิ์กับโปรตีน Cry4Ba ซึ่งอาจเป็นเพราะตำแหน่งกรดอะมิโนของ Cyt2Aa ที่เกิดการกลายไม่เกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์กัน เนื่องจากการศึกษาการจับกันของโปรตีนกลายกับไลโฟโซมแสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cyt2Aa กลายที่ไม่ฆ่าลูกน้ำยุงทั้งหมดไม่สามารถจับกับไลโฟโซมได้ แสดงว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่เกิดการกลายเกี่ยวข้องกับการจับกับเยื่อหุ้ม ซึ่งเป็นไปได้ว่าการเสริมฤทธิ์กันอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการจับกับเยื่อหุ้มของโปรตีน Cyt2Aa เช่น โปรตีน Cyt2Aa อาจต้องจับกับเยื่อหุ้มเซลล์หรือจับกันเองก่อนเพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจึงจะสามารถแสดงความสามารถในการเสริมฤทธิ์กับ Cry4Ba ได้ ดังนั้นหากพบโปรตีน Cyt2Aa กลายที่ไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงแต่ยังสามารถจับกับไลโฟโซมได้อาจเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจในการใช้ศึกษากลไกการเสริมฤทธิ์กัน

2. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วยเทคนิคชีวเคมี

การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษในช่วงที่โปรตีนอยู่ในสารละลายด้วยเทคนิคทางชีวเคมีได้ผลค่อนข้างชัดเจนว่าไม่มีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ เนื่องจากผลการทดลองทั้ง non-denaturing-PAGE และเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีให้ผลที่สอดคล้องกัน คือ ไม่พบว่าโปรตีนสารพิษทั้ง 2 ชนิด เกาะกลุ่มหรือรวมตัวกันในทางกลับกันการศึกษานี้แสดงอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษในช่วงที่โปรตีนอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิคทางชีวเคมีให้ผลที่ไม่ชัดเจน คือ เมื่อผสมโปรตีนสารพิษทั้ง 2 ชนิด เข้ากับไลโฟโซมทำให้สารตัวอย่างตกตะกอน ซึ่งเป็นตะกอนที่มีขนาดใหญ่และละลายได้ยาก ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์

ด้วยเทคนิค non-denaturing-PAGE SDS-PAGE และเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี ทั้งที่หากผสมโปรตีนสารพิษเพียงชนิดเดียวเข้ากับไลโปโซมยังสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางชีวเคมีที่กล่าวมา อย่างไรก็ตามปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้อาจชี้ให้เห็นว่าเมื่อโปรตีนสารพิษทั้ง 2 ชนิด อยู่ร่วมกันในสภาวะที่มีเยื่อหุ้มลิพิด จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากกับโปรตีนสารพิษ ทำให้โปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba รวมตัวกันเป็นกลุ่มโมเลกุล (complex) ที่มีขนาดใหญ่มาก หรือเกิดการเกาะกันอย่างแน่นหนา (aggregation) จนไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba และอันตรกิริยานี้อาจเกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์กันก็เป็นได้

3. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วยเทคนิค คลื่นผิวพลาสมอน

เนื่องจากการศึกษาโปรตีนสารพิษในช่วงที่อยู่บนเยื่อหุ้มประสบปัญหาการตกตะกอนของโปรตีน เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์การจับกันหรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างที่เกิดอันตรกิริยา จึงเป็นทางออกในการศึกษาโปรตีนในขั้นตอนนี้ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า Cry4Ba ที่อยู่ในสารละลายสามารถจับกับ โปรตีน Cyt2Aa บนพื้นผิวลิพิด แสดงว่ามีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba เมื่ออยู่บนเยื่อหุ้ม ซึ่งเชื่อว่าอันตรกิริยานี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการเสริมฤทธิ์กัน นอกจากนี้จากสัญญาณเอสพีอาร์ที่วัดได้ยังแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนของโปรตีนสารพิษ 2 ชนิด สัมพันธ์กับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น เมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของสัญญาณเอสพีอาร์เปรียบเทียบกับมวลโมเลกุลของ Cry4Ba และ Cyt2Aa จะเห็นว่าอัตราส่วนที่ทำให้เกิดการเกาะพื้นผิวลิพิดจนอิ่มตัว อยู่ที่ประมาณเป็น 1 ต่อ 1 หรืออาจกล่าวได้ว่าโปรตีน Cyt2Aa 1 โมเลกุล สามารถจับกับโปรตีน Cry4Ba ได้ไม่เกิน 1 โมเลกุล

ผลการทดลองฉีดโปรตีน Cry4Ba ไปยังพื้นผิวลิพิดแล้วตามด้วยโปรตีน Cyt2Aa พบว่าโปรตีน Cry4Ba จับพื้นผิวลิพิดได้น้อยมาก แต่สิ่งที่น่าแปลกคือโปรตีน Cyt2Aa ที่ฉีดตามไม่สามารถจับกับพื้นผิวลิพิดได้ซึ่งขัดแย้งกับข้อมูลอื่นๆ เป็นไปได้ว่าโปรตีน Cry4Ba ที่จับกับพื้นผิวได้น้อยมากขัดขวางการจับของโปรตีน Cyt2Aa หรือ ขณะที่โปรตีน Cry4Ba ผ่านพื้นผิวลิพิด โปรตีน Cry4Ba อาจไม่ได้จับกับพื้นผิวแต่ทำกิริยาทำให้คุณสมบัติของพื้นผิวลิพิดเปลี่ยนแปลงไปจึงวัดสัญญาณเอสพีอาร์ได้เล็กน้อย และทำให้โปรตีน Cyt2Aa ไม่สามารถจับกับพื้นผิวลิพิดนี้ได้

การใช้เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนในการศึกษากลไกการทำงานของโปรตีนสารพิษยังอยู่ในช่วงเริ่มต้น งานวิจัยนี้จึงยังมีข้อจำกัดในการตรวจวัดซึ่งไม่สามารถแยกสัญญาณที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ฉีดออกจากสัญญาณที่เกิดจากการจับกันของโปรตีนได้ ดังนั้นอันตรกิริยาที่วัดได้จากการศึกษานี้จึงเป็นค่าเชิงเปรียบเทียบของสัญญาณสุดท้ายว่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อเทียบกับตัวอ้างอิง จึงยังไม่สามารถบอกถึงระดับของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นได้ถึงระดับโมเลกุลหรือจลนศาสตร์ของการจับกันของโมเลกุล เช่นเดียวกับการศึกษาด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนทางด้านอื่นๆ ทำได้ จึงยังต้องพัฒนาและปรับปรุงเพื่อให้สามารถใช้ในการศึกษาโปรตีนสารพิษได้ดียิ่งขึ้นต่อไป

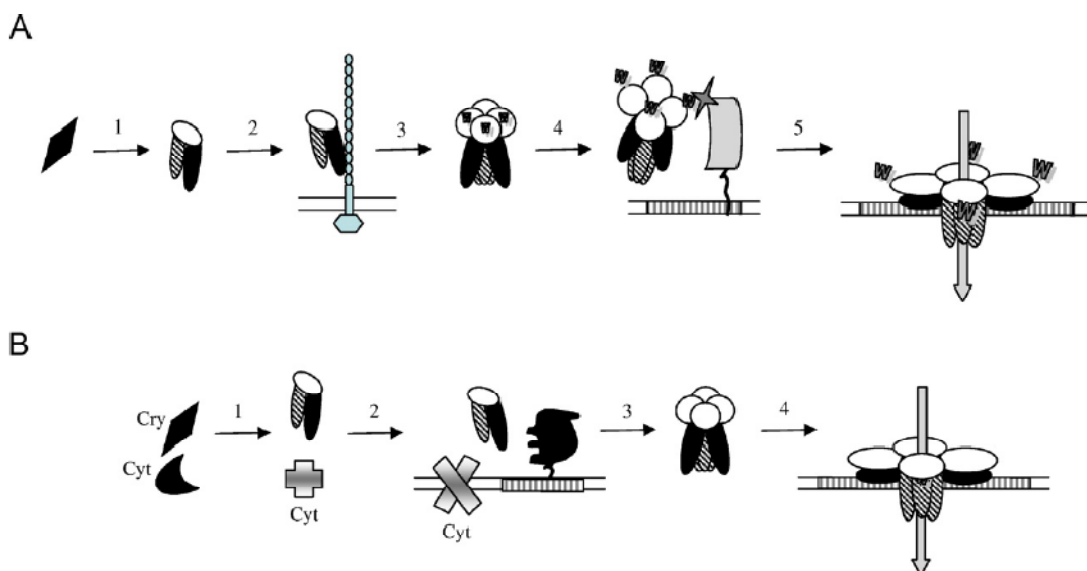
4. กลไกการเสริมฤทธิ์กันของโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน Cyt2Aa กับ Cry4Ba เกิดขึ้นหลังจากโปรตีน Cyt2Aa จับกับพื้นผิวลิพิดแล้ว อันตรกิริยานี้ชักพาให้โปรตีน Cry4Ba จับกับพื้นผิวลิพิด ทั้งที่โดยธรรมชาติโปรตีน Cry4Ba ไม่สามารถจับกับพื้นผิวลิพิดได้หากไม่มีตัวรับบนเยื่อหุ้มเซลล์ การที่โปรตีน Cyt2Aa ดึงดูดให้โปรตีน Cry4Ba จับกับพื้นผิวลิพิดนี้อาจเป็นสาเหตุของการเสริมฤทธิ์กันในการฆ่าลูกน้ำยุง โดยในธรรมชาติโปรตีน Cyt2Aa ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงระดับปานกลาง จึงต้องใช้ในปริมาณมากจึงจะสามารถทำให้ลูกน้ำยุงตายได้ แต่เมื่อมีโปรตีน Cry4Ba ร่วมด้วย โปรตีน Cyt2Aa ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์สามารถดึงดูดให้โปรตีน Cry4Ba ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงสูงกว่าโปรตีน Cyt2Aa ส่งผลให้โปรตีนสารพิษมีประสิทธิภาพสูงขึ้นหลายเท่าในการฆ่าลูกน้ำยุง กลไกในการเสริมฤทธิ์กันในระดับโมเลกุลที่เกิดขึ้นหลังจากโปรตีน Cry4Ba ถูกดึงดูดให้จับกับเยื่อหุ้มเซลล์แล้วยังต้องศึกษาเพิ่มเติมอีก กลไกที่เป็นไปได้ คือ โปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba อาจร่วมกันสร้างรูรั่ว (hybrid pore) ที่สร้างความเสียหายให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีกว่า หากโปรตีนทั้ง 2 ชนิดเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดรูรั่วจริง ข้อมูลจากงานวิจัยที่สนับสนุนแนวคิดนี้คือโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba เมื่อจับกับลิพิดแล้วเกิดเป็นโมเลกุลรวมขนาดใหญ่ ซึ่งอาจเป็นโครงสร้างร่วมที่ทำให้เกิดรูรั่วของโปรตีน 2 ชนิด แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ผ่านมาเสนอว่าโปรตีน Cry4Ba ใช้ส่วนที่เป็น α -helix ในการแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ในขณะที่โปรตีน Cyt2Aa ใช้ส่วนที่เป็น β -sheet ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบการร่วมกันสร้างรูรั่วโดยใช้โครงสร้างที่แตกต่างกัน อีกกลไกหนึ่งที่เป็นไปได้ คือ โปรตีน Cyt2Aa ทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวรับให้โปรตีน Cry4Ba เสนอโดย Pérez (2005) ซึ่งแสดงในภาพที่ 5.1B กล่าวคือโดยปกติหลังจากที่โปรตีน Cry4Ba ละลายจะต้องเข้าจับ

กับตัวรับ เกิดการรวมกลุ่มกัน แล้วจึงแทรกตัวเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย หากเซลล์ไม่มีตัวรับโปรตีน Cry4Ba จะไม่สามารถจับกับเซลล์ได้ ขั้นตอนการเข้าจับกับตัวรับจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการเริ่มทำงานของโปรตีน Cry4Ba แต่เมื่อมีโปรตีน Cyt2Aa อยู่ด้วย โปรตีน Cyt2Aa สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยตรง เมื่อจับกับเยื่อหุ้มเซลล์แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ดึงดูดโปรตีน Cry4Ba ให้รวมตัวกันและเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งเป็นการทำหน้าที่แทนตัวรับบนเยื่อหุ้มเซลล์ในภาพที่ 5.1A ทำให้โปรตีน Cry4Ba สามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์ได้ถึงแม้ว่าจะไม่ใช่เซลล์เป้าหมายก็ตามซึ่งเห็นได้จากการเสริมฤทธิ์กันในการฆ่ายุงรำคาญ และในกรณีของยุงลายซึ่งเป็นเป้าหมายของโปรตีน Cry4Ba อยู่แล้ว การมีโปรตีน Cyt2Aa ร่วมด้วยเป็นการเพิ่มตัวรับบนผิวเซลล์ให้มากขึ้น ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่าผลของการเสริมฤทธิ์กันในยุงลายสูงกว่าผลในยุงรำคาญ และผลจากเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอนแสดงให้เห็นว่าปริมาณของโปรตีน Cry4Ba ที่จับกับพื้นผิวลึปิดสัมพันธ์ปริมาณของโปรตีน Cyt2Aa ที่จับกับพื้นผิวอยู่ก่อน

ภาพที่ 5.1

กลไกการทำงานของโปรตีน Cry เปรียบเทียบกับกลไกเสริมฤทธิ์กันระหว่าง
โปรตีน Cyt กับ Cry



ที่มา: “Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control” by Bravo, Gill, & Soberón, 2007, *Toxicon*, 49(4), p. 430.

A) กลไกการเกิดรูรั่วในเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน Cry เริ่มจากผลึกโปรตีนละลายในสภาวะที่เป็นด่างและถูกตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส (1) โปรตีน Cry ที่มีโครงสร้างที่พร้อมแสดงความเป็นพิษเข้าจับกับตัวรับตัวแรกซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม cadherin (2) เอนไซม์โปรติเอสตัดปลาย N ในโดเมน I ของโปรตีนออก ทำให้เกิดการรวมตัวกัน (3) กลุ่มโปรตีน Cry ที่รวมตัวกันเข้าจับกับ APN ซึ่งเป็นตัวรับที่ 2 (4) และโปรตีน Cry ใช้โดเมน I แทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มทำให้เกิดรูรั่วขึ้น (5)

B) กลไกการเสริมฤทธิ์กันระหว่างโปรตีน Cyt กับ Cry เริ่มจากผลึกโปรตีนละลายในสภาวะที่เป็นด่างและถูกตัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส (1) โปรตีน Cyt ที่มีโครงสร้างที่พร้อมแสดงความเป็นพิษเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยตรง (2) โปรตีน Cry สามารถเข้าจับกับตัวรับหรือโปรตีน Cyt บนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสมือนเป็นตัวรับทำให้เกิดการรวมตัวกัน (3) กลุ่มโปรตีน Cry แทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มทำให้เกิดรูรั่วขึ้น (4)