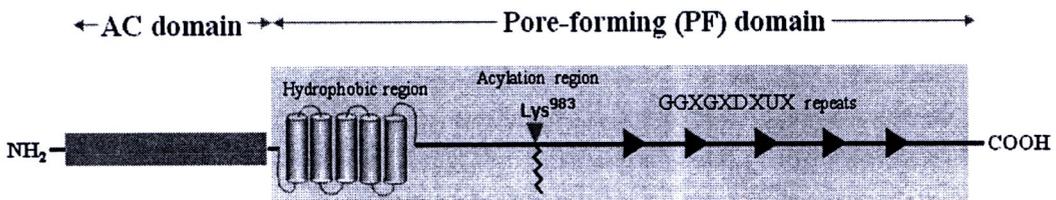


## บทนำ

Adenylate cyclase-haemolysin (CyaA) toxin เป็นหนึ่งในโปรตีนสารพิษที่หลังจากแบคทีเรียแกรมลบ *Bordetella pertussis* ซึ่งมีส่วนทำให้เชื้อมีความรุนแรงและก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคไอกรน (Whooping cough หรือ Pertussis) โครงสร้างของโปรตีนสารพิษ CyaA ประกอบด้วยสองส่วน โดยด้านปลาย N- เป็นส่วนของโปรตีน Adenylate cyclase (AC) ซึ่งเมื่อถูกนำผ่านเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์เป้าหมายแล้วจะทำให้เอนไซม์ adenylate cyclase ทำงานได้ เกิดการเปลี่ยน ATP ไปเป็น cAMP ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นมากอันเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการส่งต่อสัญญาณภายในเซลล์ (signaling pathway) แล้วทำให้เกิดเซลล์ตายแบบ apoptosis ต่อไป ส่วนด้านปลาย C- เป็นส่วนของโปรตีนที่คาดว่าทำให้เกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย (haemolytic domain หรือ pore-forming domain, PF) ซึ่งสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (Welch, 1991; Linhartova et al., 2010) ส่วนของ CyaA-PF domain นี้ยังประกอบด้วยบริเวณย่อย คือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic region) ส่วนที่มีกรดอะมิโน 9 ตัวเรียงตัวซ้ำกันมาก (nonapeptide repeats) และส่วนของ secretion signal peptide ที่อยู่ด้านปลายสุด (รูปที่ 1) โดยเมื่อตัดโปรตีน CyaA ส่วน AC ออกให้เหลือเฉพาะส่วนของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการทำให้เกิดรูรั่วนั้นในเซลล์ (truncated CyaA-PF) พบว่าโปรตีนส่วนนี้มีฤทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (Sakamoto et al., 1992; Powthongchin and Angsuthanasombat, 2008) ทั้งนี้โปรตีนสารพิษนี้ทั้งในแบบ full-length และ truncated จะต้องถูกเติมหมู่ palmitoyl ที่ตำแหน่ง Lys983 ก่อนจึงจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Hackett et al., 1994; Powthongchin and Angsuthanasombat, 2008)



รูปที่ 1 โครงสร้างของโปรตีนสารพิษ Adenylate cyclase-haemolysin (CyaA) จากเชื้อ *Bordetella pertussis*

เชื่อว่าการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษ CyaA จำเป็นต้องอาศัยการแทรกตัวของบริเวณที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนเข้าสู่ผนังเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย แต่ในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แท้จริงของโปรตีนสารพิษนี้ ดังนั้นเพื่อที่จะทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษ CyaA โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการแทรกตัวเข้าสู่ผิวเซลล์และ/หรือการทำให้เกิดรูรั่วนั้นในเซลล์ กลุ่มผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาเฉพาะส่วนที่มีฤทธิ์ในการทำให้เกิดรูรั่วนั้นในเซลล์ (pore-forming domain) ของโปรตีนนี้ ทั้งนี้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้โคลนยีน *cyaA*-PF ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนเฉพาะส่วน CyaA-PF และยีน *cyaC* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ acyltransferase ลงในพลาสมิดเดียวกันโดยใช้ pET-17b เป็น plasmid vector ซึ่งเอนไซม์ acyltransferase จะทำหน้าที่เติมหมู่ palmitoyl ให้แก่ CyaA-PF เพื่อให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ โดยในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มผู้วิจัยได้ใช้ crude extracts จาก *E. coli* ในการทดสอบฤทธิ์การทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แต่การใช้ crude extracts นั้นไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้าง หน้าที่ หรือใช้ในการตรวจเอกลักษณ์บางอย่างซึ่งจำเป็นต้องใช้โปรตีนเดี่ยวในรูปบริสุทธิ์ ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA เฉพาะส่วนของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการทำให้เกิดรูรั่วนั้นในเซลล์ (pore-forming domain) ของ CyaA หรือเรียกว่า CyaA-PF ที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Powthongchin and Angsuthanasombat, 2008) บริสุทธิ์ และนำโปรตีนบริสุทธิ์นั้นมาศึกษาผลต่อการรบกวนผนังลิโปโซมและการแตกของเม็ดเลือดแดง เพื่อเปรียบเทียบผลของการศึกษาโดยใช้เซลล์และการใช้ลิโปโซมเป็นแบบจำลองแทนผนังหุ้มเซลล์ โดยความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำให้โปรตีน CyaA-PF กลายพันธุ์