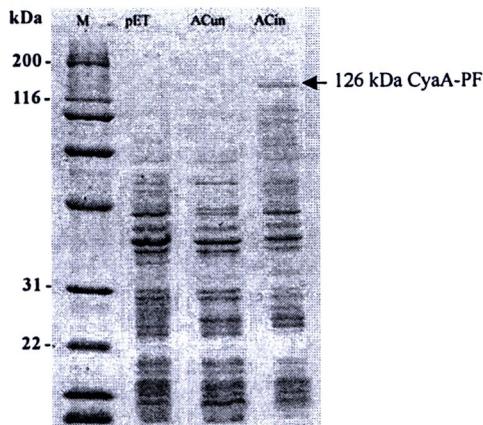


## ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

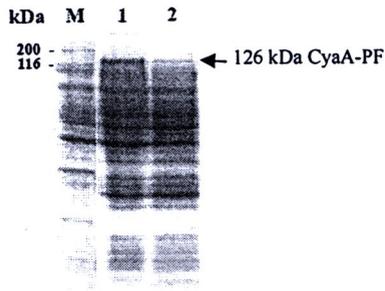
### ผลการแสดงออกของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF (*CyaA-PF expression profile*)

เนื่องจากโปรตีนสารพิษ adenylate cyclase-haemolysin (CyaA) ต้องการเติมหมู่ palmitoyl ที่ตำแหน่ง Lys983 เพื่อให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ และเมื่อตัดโปรตีน adenylate cyclase ส่วนต้นออกเหลือเพียงส่วน haemolytic หรือ pore-forming domain (CyaA-PF) พบว่าต้องมีการเติมหมู่ palmitoyl ที่ตำแหน่ง Lys983 เช่นเดียวกันเพื่อให้โปรตีนส่วนนี้สามารถออกฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแกะแตกได้ (Powthongchin and Angsuthanasombat, 2008)

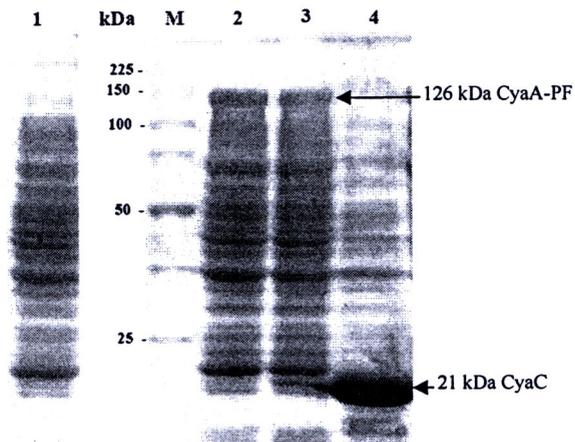
ในการศึกษานี้จึงมีการผลิตโปรตีน CyaA-PF ที่สามารถออกฤทธิ์ได้โดยใช้การแสดงออกของพลาสมิดลูกผสม pCyaAC-PF (ที่มียีน *cyaA*-PF ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนสารพิษ CyaA-PF และยีน *cyaC* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ acyltransferase อยู่ในพลาสมิดเดียวกัน) ในเซลล์ของ *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS และใช้การแสดงออกของพลาสมิดลูกผสมที่มีเพียงยีน *cyaA*-PF เพียงอย่างเดียวในเซลล์แบบเดียวกันเพื่อเป็นการควบคุม จากการศึกษาพบว่าโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ขนาด 126 kDa ถูกสร้างขึ้นในภาวะที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 0.1 mM IPTG เท่านั้น (รูปที่ 3) โดยพบส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วน supernatant พบเล็กน้อยในส่วนที่เป็น pellets (รูปที่ 4) และพบมีการสร้างโปรตีนสารพิษ CyaA-PF และโปรตีน acyltransferase ขนาด 21 kDa ในปริมาณมากใน *E. coli* lysate ที่ได้จากพลาสมิด pCyaAC-PF ในขณะที่พบเพียงโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ใน *E. coli* lysate ที่ได้จากพลาสมิด pCyaA-PF (รูปที่ 5)



รูปที่ 3 SDS-PAGE analysis ของ soluble crude lysate จาก *E. coli* BL21(DE3)pLysS ที่มีการผลิตโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ขนาด 126 Da ในสภาวะที่มีและไม่มี การเหนี่ยวนำด้วย IPTG, M คือ molecular mass standard, lane pET คือ lysate จาก *E. coli* ที่มี pET17b, Lane ACun และ ACin แสดง lysate จาก *E. coli* ที่มี pCyaAC-PF ซึ่งไม่ถูก และถูก induced ด้วย 0.1 mM IPTG ตามลำดับ



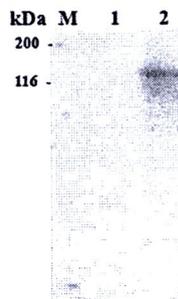
รูปที่ 4 SDS-PAGE analysis ของ crude lysate จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pCyaAC-PF โดย M คือ molecular mass standard, lane 1 คือ ส่วนของ soluble crude lysate, lane 2 คือ ส่วนของ pellets



รูปที่ 5 SDS-PAGE analysis ของ crude lysate จาก *E. coli* ที่มีพลาสมิด pCyaAC-PF โดย M คือ molecular mass standard, lane 1 คือ soluble crude lysate จาก *E. coli* ที่มี pET17b, lane 2 คือ soluble crude lysate จาก *E. coli* ที่มี pCyaA-PF, lane 3 คือ soluble crude lysate จาก *E. coli* ที่มี pCyaAC-PF, lane 4 คือ ส่วนของ pellets จาก *E. coli* ที่มี pCyaAC-PF

### Western blot analysis

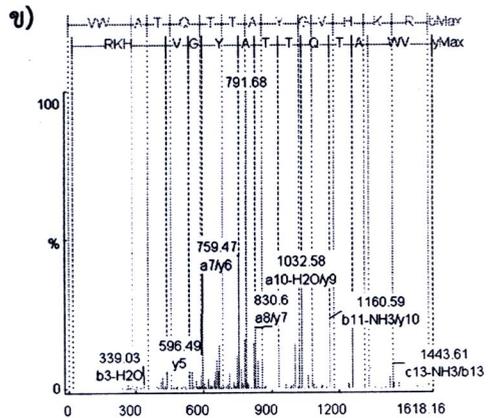
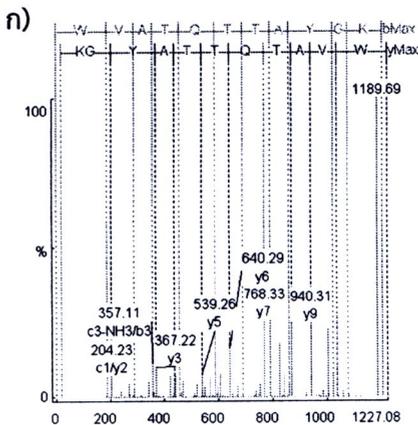
ในการตรวจสอบโดยวิธี Western blot analysis พบว่าโปรตีนสารพิษ CyaA-PF สามารถจับกับแอนติบอดี 9D4-anti-RTX monoclonal antibody ได้ (รูปที่ 6) โดยแอนติบอดีจับกับส่วน nonapeptide repeats ของโปรตีนสารพิษ CyaA แต่แม้ว่าในการผลิตโปรตีน CyaA-PF ในการศึกษาครั้งนี้จะมีการใช้สาร PMSF ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protease และมีการเติม 5 mM CaCl<sub>2</sub> ซึ่งพบว่าช่วยลดการทำลาย CyaA-PF ลงได้มาก (Pojanapotha et al., 2010) แล้วก็ตาม ยังพบแถบโปรตีนขนาดเล็กหลายแถบซึ่งสามารถจับกับแอนติบอดีได้เช่นกัน แสดงว่าโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ยังสามารถถูกทำลายได้จากเอนไซม์บางอย่างซึ่งอาจเป็น non-serine protease หรืออาจเกิดจากโปรตีนสารพิษ CyaA-PF อาจมีฤทธิ์ในการย่อยตัวเอง (autocatalysis) ได้



รูปที่ 6 Western blot analysis ของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF โดยใช้ 9D4 anti-RTX monoclonal antibody โดย M คือ molecular mass standard, lane 1 คือ soluble crude lysate จาก *E. coli* ที่มี pET17b, lane 2 คือ soluble crude lysate จาก *E. coli* ที่มี pCyaAC-PF

LC/MS/MS analysis

ดังที่กล่าวไว้แล้วว่าโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม pore-forming RTX cytotoxins ต้องมีการเติมหมู่ palmitoyl เข้าที่ตำแหน่ง Lys983 จึงจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ LC/MS/MS วิเคราะห์หาชิ้นส่วนเปปไทด์และลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ที่คาดว่าจะถูก palmitoylated โดยพบว่าโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่มีการสร้างจากพลาสมิด pCyaA-PF ที่ไม่มียีน *cyaC* จะพบเพียงชิ้นเปปไทด์ที่ m/z 1228.24 ซึ่งจากผล de novo sequencing mass (รูปที่ 7ก) ที่ปลายด้าน N- โปรแกรมนำมาว่าเป็นกรดอะมิโน tryptophan (W, น้ำหนักโมเลกุล 186.2132) แต่จากการคำนวณจะได้เป็นกรดอะมิโน glutamic acid (E, น้ำหนักโมเลกุล 129.1155) และกรดอะมิโน glycine (G, น้ำหนักโมเลกุล 57.0519) โดยน้ำหนักกรดอะมิโน glutamic acid และ glycine รวมกันเท่ากับ 186.1674 ดังนั้นจากการคำนวณค่า b และค่า y จะได้ลำดับกรดอะมิโนจริงของชิ้นเปปไทด์นี้ คือ E972GVATQTTAYGK983 ซึ่งจะเห็นว่าตำแหน่งที่ Lys983 นั้นไม่มีการเกิด acylation ส่วนโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่มีการสร้างจากพลาสมิด pCyaAC-PF ซึ่งมีการสร้างเอนไซม์ acyltransferase ร่วมด้วย พบชิ้นเปปไทด์ที่ m/z 1619.38 ที่ถูก palmitoylated ซึ่งจากผล de novo sequencing mass (รูปที่ 7ข) โดยจะเห็นว่าในสายเปปไทด์ที่ทำนาย TAYG...KR หลังลำดับกรดอะมิโน Gly จากโปรแกรมนำมาเป็นกรดอะมิโน valine (V, น้ำหนักโมเลกุล 99.1326) และกรดอะมิโน histidine (H, น้ำหนักโมเลกุล 137.1411) ซึ่งมีน้ำหนักรวมกันเท่ากับ 236.2737 ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักของหมู่ palmitoyl (~238) และจากการคำนวณพบว่าระหว่างกรดอะมิโน Lys983 และ Arg984 มีน้ำหนักเกินอยู่ประมาณ 238 ซึ่งสรุปได้ว่าที่ตำแหน่ง Lys983 นั้นมีหมู่ palmitoyl เกาะอยู่ นอกจากนี้จะเห็นว่าชิ้นเปปไทด์ที่ได้ถูกเอนไซม์ trypsin ตัดที่ Arg984 เนื่องจาก Lys983 ที่ถูก acylated ทำให้โมเลกุลใหญ่ขึ้นเอนไซม์จึงไม่สามารถตัดได้จึงไปตัดที่หลัง Arg984 แทน ดังนั้นลำดับจริงของชิ้นเปปไทด์นี้ คือ E972GVATQTTAYGK<sub>C16:0</sub>R984



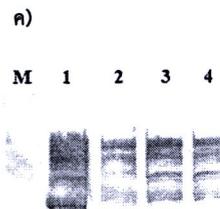
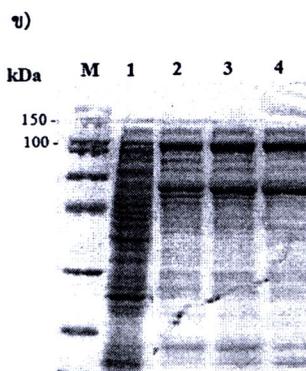
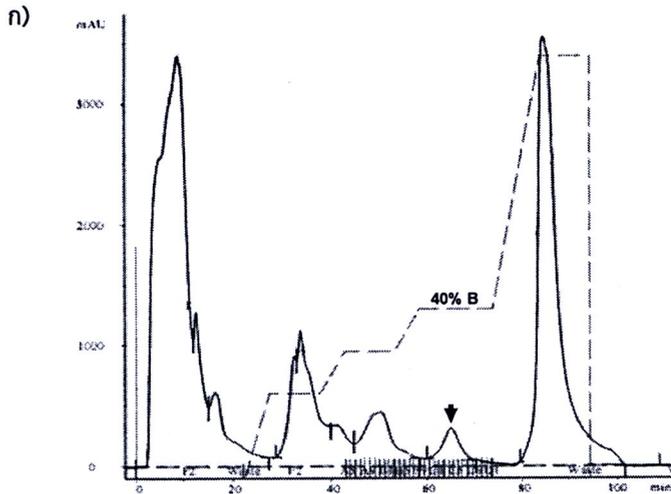
รูปที่ 7 LC/MS/MS spectra ของชิ้นเปปไทด์ที่มีตำแหน่ง acylation ที่ Lys983 ก) ชิ้นเปปไทด์ที่ได้จาก pCyaA-PF ข) ชิ้นเปปไทด์ที่ได้จาก pCyaAC-PF



### การทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์

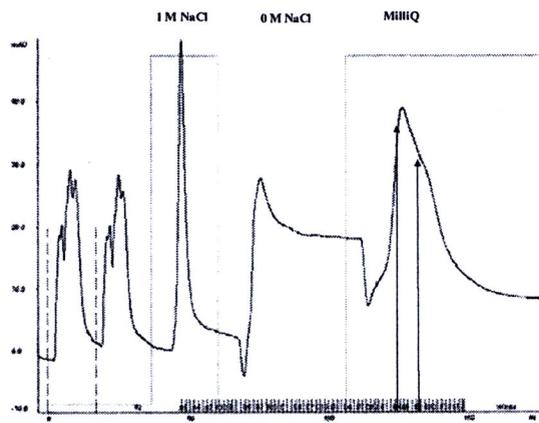
ในการทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์ขึ้นนั้นผู้วิจัยได้ทดลองทำหลายวิธีการ เช่น การตกตะกอนด้วย Ammonium sulphate ก่อนแต่พบว่าไม่สามารถแยกโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ให้บริสุทธิ์ได้ จึงได้เลือกใช้กระบวนการทาง chromatography 3 ขั้นตอน คือ Anion-exchange chromatography, Hydrophobic chromatography และ Size-exclusion chromatography ร่วมกันตามลำดับเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง ในขั้นแรกใช้ HiTrapQ column ซึ่งเป็น anion-exchange column พบว่าโปรตีนสารพิษ CyaA-PF (ค่า  $pI = 4.4$  จากการคำนวณ) ขนาด 126 kDa ส่วนใหญ่ถูก elute ออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ประมาณ 400 mM (รูปที่ 7ก) โดยพบว่าโปรตีนมีความบริสุทธิ์ขึ้นประมาณ 40% จากการเปรียบเทียบจาก SDS-PAGE และมีโปรตีนอื่นปนออกมาด้วยมากพอควร แต่จาก Western blot analysis ของ corresponding gel พบว่าแถบโปรตีนหลายแถบที่พบใน SDS-PAGE เป็นโปรตีนที่เกิดจากการสลายตัวของ CyaA-PF เองเนื่องจากยังสามารถจับกับ 9D4-antiRTX monoclonal antibody ได้ และเมื่อนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย HiTrap Phenyl HP column ซึ่งเป็น hydrophobic column โปรตีนสารพิษ CyaA-PF ถูก elute ออกมาที่ elution fractions ที่ 0 M NaCl (รูปที่ 8ก) และพบว่าโปรตีน CyaA-PF มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 80% แต่ยังคงมีแถบโปรตีนอื่นหรือเป็นแถบโปรตีน CyaA-PF ชิ้นเล็กๆที่ถูกละทิ้งอยู่ จึงทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ขึ้นอีกในขั้นตอนสุดท้ายโดยการแยกตามขนาดของโปรตีนโดยใช้ Superose 12 column ซึ่งเป็น size-exclusion column พบว่าโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ถูก elute ออกมาแบบเป็น peak เดียวแสดงว่าโปรตีนที่ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์และอยู่ในรูปของ monomer โดยถูก elute ออกมาที่ fractions 7-8.5 มล. โดย fraction แรกมีความบริสุทธิ์สูงสุดมากกว่า 90% (รูปที่ 9ก) แต่มี % yield เพียง 8% ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำมาก โดยพบว่ามีการสูญเสียโปรตีนไปมากระหว่างขั้นตอนของ hydrophobic chromatography และในขั้นตอนการทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นซึ่งโปรตีนจะติดค้างอยู่บนเมมเบรนค่อนข้างมากแม้ว่าจะเลือกใช้เมมเบรนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนต่ำแล้วก็ตาม ทั้งนี้ elution profile และการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนแสดงดังรูปที่ 7-9 ตามลำดับ

|                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ |               |
| ห้องสมุดงานวิจัย                |               |
| วันที่.....                     | - 7 S.P. 2555 |
| เลขทะเบียน.....                 | 190908        |
| เลขเรียกหนังสือ.....            |               |

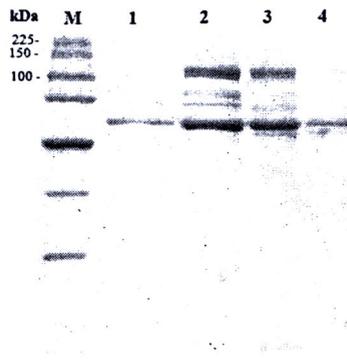


รูปที่ 7 การทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์โดยใช้ Anion-exchange chromatography ก) Elution profile โดย elute ด้วยบัฟเฟอร์ B ที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0-1 M แบบ step-wise gradients ข) แผ่น SDS-PAGE ที่มีโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก ก) โดย M = molecular mass standard, lane 1 = soluble *E. coli* crude lysate ที่มี CyaA-PF (จาก pCyaAC-PF), lane 2-4 = elution fractions ช่วงที่มีความเข้มข้นของ NaCl ประมาณ 400 mM ค) Western blot analysis ของ ข) โดยใช้ 9D4 anti-RTX monoclonal antibody

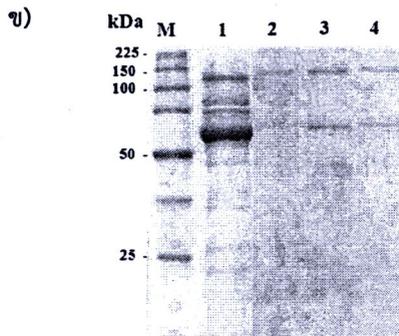
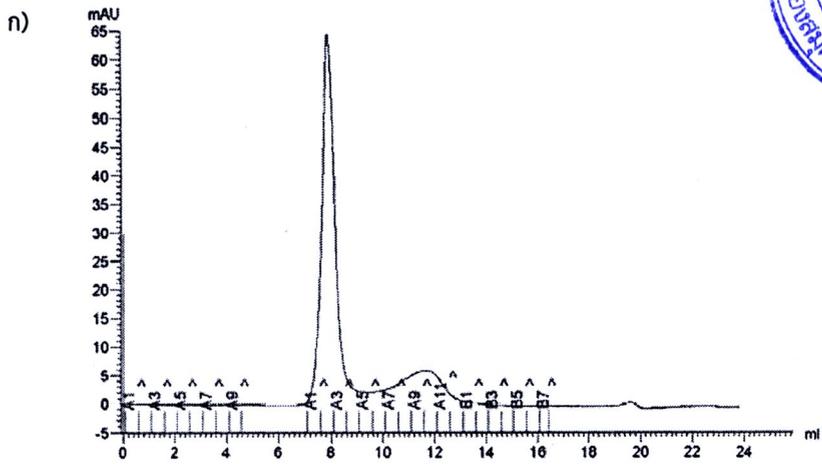
ก)



ข)



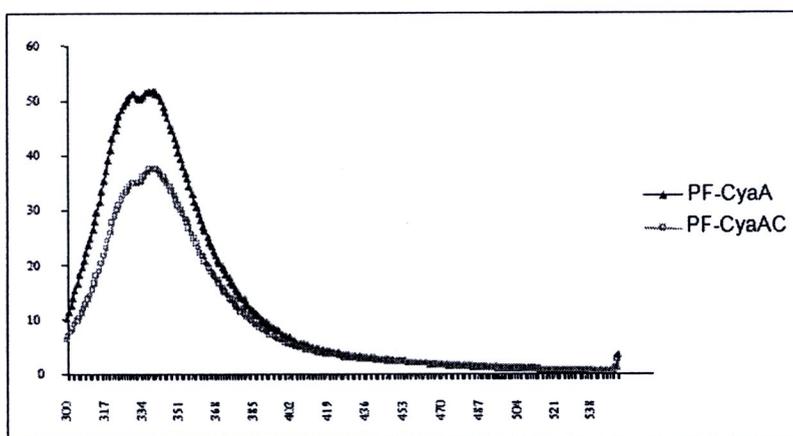
รูปที่ 8 การทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์เพียงบางส่วนที่ได้จาก Anion-exchange chromatography ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดย Hydrophobic chromatography ก) Elution profile โดยการใช้บัฟเฟอร์ B ที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl 4-0 M ข) แผ่น SDS-PAGE ที่มีโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นจาก ก) โดย M = molecular mass standard, lane 1-4 = elution fractions ช่วงที่มีความเข้มข้นของ NaCl เป็น 0 M



รูปที่ 9 การทำให้โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์เพียงบางส่วนที่ได้จาก Hydrophobic chromatography ให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการแยกตามขนาดใช้ Size-exclusion chromatography ก) Elution profile ของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF โดยใช้อัตราการไหลของบัฟเฟอร์ A 1 มล./นาที, 1 CV ข) แผ่น SDS-PAGE ที่มีโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นจาก ก) โดย M = molecular mass standard, lane 1 = โปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์เพียงบางส่วนที่ได้จาก Hydrophobic chromatography และถูกทำให้เข้มข้นขึ้นก่อนฉีดเข้า Superose12 column, lane 2-4 = elution fractions ช่วง peak, A1-A3, ตามลำดับ

## การวัด Intrinsic fluorescence measurement

โปรตีน CyaA-PF บริสุทธิ์ที่ได้จาก pCyaA-PF และ pCyaAC-PF นั้นได้นำมาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพอย่างหนึ่ง คือ การวัดค่า intrinsic fluorescence measurement โดยผลแสดงดังรูปที่ 10 พบว่าค่า maximum fluorescence emission ที่ 346 nm ต่างกันระหว่างโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่ไม่ถูกเติมหมู่ palmitoyl (non-acylated CyaA-PF) กับโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ที่ถูกเติมหมู่ palmitoyl (acylated CyaA-PF) แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติมหมู่ palmitoyl ให้กับโปรตีนสารพิษ CyaA-PF ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของโปรตีนไปจากเดิม



รูปที่ 10 การวัด Intrinsic fluorescence measurement ของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF บริสุทธิ์

## Haemolytic activity assay

เมื่อนำโปรตีนสารพิษ acylatedCyaA-PF ในรูปของ crude lysate และรูปที่บริสุทธิ์ ปริมาณ  $\sim 10 \mu\text{g}$  มา incubate กับเม็ดเลือดแดงแกะความเข้มข้น  $5 \times 10^8$  เซลล์/มล. โดยการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแกะแตกของโปรตีนบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากโปรตีนมีการสลายตัวระหว่างการเก็บ

| โปรตีนสารพิษ acylatedCyaA-PF | % Haemolysis $\pm$ SEM |
|------------------------------|------------------------|
| Crude lysate                 | 54.7 $\pm$ 5.3         |
| บริสุทธิ์                    | 59.7 $\pm$ 8.4         |