บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4880109
ชื่อโครงการ: การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงร่างของส่วน Nonapeptide Repeats ของ *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin เมื่อจับกับแคลเซียม
ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: สราวุธ นุกูลการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
E-mail Address: nsarawut@yahoo.com
ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงร่างของส่วน RTX ของ *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin เมื่อจับกับแคลเซียม โดยได้เตรียมคลังของ Naive scFv phage antibody เพื่อนำไปใช้คัดเลือกหา antibodies ที่สามารถจับกับ RTX subdomain ในอนาคตต่อไป โปรตีนขนาด 100 KDa ของ CyaA-RTX ซึ่งมีบริเวณที่จับกับแคลเซียมอยู่ได้ถูกแสดงออกใน *E. coli* ได้รูปแบบที่ละลายน้ำได้ และพบว่าไวต่อการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอสได้ การใช้แคลเซียมในปริมาณระดับมิลลิโมลาร์ สามารถช่วยยับยั้งการถูกทำลายได้ดีกว่าการใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนี้ผลของแคลเซียมยังแปรผันตามความเข้มข้น แสดงให้เห็นถึงบทบาทของแคลเซียมต่อความคงตัวของโครงสร้างของโปรตีน จากแบบแผนของแถบโปรตีนที่ถูกย่อยสลายได้ เป็นไปได้ว่าโปรตีน RTX subdomain นี้อาจมีความสามารถในการย่อยสลายตัวเอง ซึ่งยังคงต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมว่าจะเป็นลักษณะของ Zn metalloprotease หรือไม่ การศึกษาต่อไปในอนาคตในด้านโครงสร้างสามามิติ หรือการใช้ฟาจ-แอนติบอดีในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง น่าจะให้ข้อมูลเชิงลึกมากขึ้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน CyaA หรือ ACT ได้

คำหลัก : Adenylate cyclase toxin, Bordetella pertussis, RTX, Proteolytic degradation, Phage antibody

Abstract

Project Code: MRG4880109

Project Title: Studies on Calcium-dependent Conformational Change of the Nonapeptide Repeats Domain of the *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin

Investigator: Sarawut N. Nukoolkarn, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

E-mail Address: nsarawut@yahoo.com

Project Period: 2 years

This project aims to study the structural change of the RTX domain of the *B. pertussis* Adenylate Cyclase Toxin upon calcium binding. Naïve Single chain variable fragment (scFv) phage antibodies were generated. These antibodies will be a valuable tool to study the detailed calcium-dependent conformational change of the ACT. A 100-kDa RTX (Repeat-in-ToXin) fragment (CyaA-RTX) containing a number of putative calcium-binding repeats was expressed as a soluble form in a protease-deficient *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS, was found to be highly sensitive to proteolytic degradation. The addition of calcium ions in a millimolar range into the CyaA-RTX preparation could significantly prevent the degradation when compared to certain protease inhibitors. Moreover, levels of proteolytic degradation were dependent on calcium concentrations, implying an important role for calcium-binding sites in the RTX subdomain for structural stability. Patterns of protease-resistant fragments of the purified RTX protein suggest the possibility that the 100-kDa RTX subdomain contains an autocleavage activity. At this stage, it remains a challenge for experimental approaches to prove whether the CyaA-RTX protein is a Zn metalloprotease. X-ray crystallography of the protein or epitope mapping by phage display technology would pave the way to an understanding of the detailed mechanisms of CyaA in terms of structure-function relationship.

Keywords : Adenylate cyclase toxin, Bordetella pertussis, RTX, Proteolytic degradation, Phage antibody