



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของส่วน **Nonapeptide Repeats** ของ
***Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin** เมื่อจับกับแคลเซียม

โดยสราวุธ นุญกลาง

มีนาคม 2551

สัญญาเลขที่ MRG4880109

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของส่วน Nonapeptide Repeats ของ *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin เมื่อจับกับแคลเซียม

ดร.สรารุณ นกุลการ
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผลการวิจัยฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์และการสนับสนุนจากผู้ที่เกี่ยวข้องหลายฝ่าย ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ คือ ศ.ดร.ชนันท์ อังศุชนสมบัติ สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งให้ความอนุเคราะห์เป็นนักวิจัยพี่เลี้ยง และได้ให้คำแนะนำถึงประเด็นต่างๆ ในการศึกษาและชี้แนวทางในการแก้ปัญหา การค้นคว้าหาข้อมูลเพิ่มเติม อันเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์และสรุปผลการศึกษา

ขอขอบพระคุณผศ.ดร.บุษบา เผ่าทองจีน และผศ.ดร.สรวง รุ่งประกายพรรณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความช่วยเหลือต่างๆ ในการศึกษานี้ ตลอดจนให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษา

ขอขอบคุณ Pichaya Pojanapotha สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และนางสาวอมรรัตน์ เดชปาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความช่วยเหลือต่อการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งเป็นผู้สนับสนุนหลักที่ทำให้มีการวิจัยครั้งนี้

หากผลงานวิจัยนี้มีข้อผิดพลาดหรือบกพร่องประการใด ผู้วิจัยขออภัยไว้แต่เพียงฝ่ายเดียว แต่หากผลงานวิจัยนี้จะมีคุณค่าและประโยชน์อยู่บ้าง ผู้วิจัยใคร่ขออุทิศส่วนดีทั้งหมดแก่ท่านผู้ที่มีส่วนร่วมในการศึกษานี้ทุกท่าน

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4880109

ชื่อโครงการ: การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของส่วน Nonapeptide Repeats ของ *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin เมื่อจับกับแคลเซียม

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: สราวุธ นกุลการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

E-mail Address: nsarawut@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของส่วน 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 การศึกษาต่อไปในอนาคตในด้านโครงสร้างสามมิติ 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

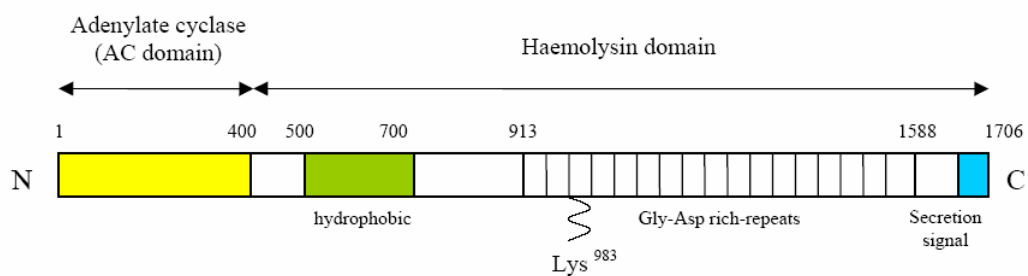
Project Period: 2 years

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

บทนำ

Bordetella pertussis เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคไอกรน (whooping cough) ซึ่งเป็นโรคทางระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันที่ร้ายแรงหากเกิดในเด็ก แม้ว่าจะมีการให้วัคซีนป้องกันแล้วในปัจจุบัน แต่ก็ยังพบการระบาดในหลายประเทศ ทำให้มีผู้เสียชีวิตแล้วประมาณ 285,000 รายในปี ค.ศ. 2001. Adenylate cyclase toxin (ACT หรือ CyaA) ซึ่งสร้างและหลั่งออกมาจากเชื้อ *B. pertussis* มีบทบาทสำคัญในช่วงแรกของการเกิด respiratory tract colonization (Paccani *et al.*, 2008) โดยโปรตีนนี้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งสิ้น 1706 ตัวและแสดงฤทธิ์ได้สองชนิดอย่างเป็นอิสระต่อกันจากการศึกษาในหลอดทดลอง คือ adenylate cyclase (AC) และ Pore forming (PF) หรือ haemolysin (Hly) (Guo *et al.*, 2005; Powthongchin and Angsuthanasombat, 2008) ส่วนของ catalytic AC domain จะอยู่ในช่วงกรดอะมิโน 400 แรกจากปลาย N-terminal ในขณะที่กรดอะมิโนที่เหลืออีก 1306 ตัวจะเป็นส่วนของ PF ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ hydrophobic region (residues 500–700) ซึ่งมีโครงสร้างของ five putative alpha helices (Powthongchin and Angsuthanasombat, 2009), ส่วนของ fatty-acylation site (Lys983), ส่วนของ calcium-binding Gly-Asp-rich repeat (RTX) region (residues 1,000–1,600) ซึ่งประกอบไปด้วย five blocks of the tandem repeats และส่วนปลาย C-terminal อีก 106 กรดอะมิโนซึ่งมี secretion signal (Vojtova *et al.*, 2005) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 องค์ประกอบของ Adenylate cyclase toxin

ส่วนของ PF จำเป็นต่อการนำส่งส่วนของ acylated catalytic domain เข้าไปสู่ภายในของเซลล์ หลังจากนั้นจะไปจับกับ calmodulin และสร้าง cAMP จาก ATP ภายในเซลล์ เรียกขบวนการนี้ว่า intoxication โปรตีนส่วน haemolytic จะมีโครงสร้างที่เป็นเอกลักษณ์ที่เรียกว่า RTX (Repeat in ToXin) ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 9 ตัวที่มีแบบแผนเฉพาะ (tandem repeated nonapeptides) คือ Gly-Gly-X-Gly-X-Asp-X-U-X (X=กรดอะมิโนใดๆ, U=กรดอะมิโนชนิด hydrophobic ขนาดใหญ่ เช่น Leu,

Ile เป็นต้น) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการจับกับแคลเซียม (Bauche *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารพิษที่พบในแบคทีเรีย ซึ่งมีตัวต้นแบบคือ *Escherichia coli* α -haemolysin

CyaA จะถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็น protoxin ก่อน แล้วเกิดขบวนการ palmitoylation ที่กรดอะมิโนไลซีนตำแหน่งที่ 983 โดยอาศัยการทำงานของ CyaC acyltransferase (Hackett *et al.*, 1994) ซึ่งช่วยให้โปรตีนเพิ่มการจับกับเซลล์เป้าหมายได้มากขึ้น (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003), ช่วยในการนำส่งส่วน AC เข้าสู่เซลล์ (Hewlett *et al.*, 2006) และจำเป็นต่อการเกิด haemolytic activity ของส่วน CyaA-PF (Powthongchin and Angsuthanasombat, 2008) มีรายงานว่าส่วน AC ของ CyaA สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ทดลอง CHO ที่มี CD11b+ และอาศัยการกระตุ้นจาก calmodulin ทำให้มีการสร้าง cAMP มากขึ้นจนก่อให้เกิดพยาธิสภาพ (Guermonprez *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2005) ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์แบบ apoptosis โปรตีนส่วนของ PF (CyaA-PF) ซึ่งประกอบไปด้วย alpha helices ที่มีแบบแผนเฉพาะจำนวน 5 ส่วน สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (Powthongchin and Angsuthanasombat, 2009) และสามารถทำให้เกิดรูรั่วชนิด cation-selective ในการทดสอบกับ unilamellar vesicles (Fiser *et al.*, 2009)

การที่ CyaA ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ แต่กลับสามารถทำหน้าที่เสมือนรูที่แทรกผ่านชั้นของเซลล์เมมเบรนในการนำส่งส่วนของ AC เข้าไปในเซลล์ได้นั้น แสดงว่า CyaA จะต้องสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในการที่จะนำส่วนที่ไม่ชอบน้ำแทรกผ่านชั้นของเซลล์เมมเบรน ซึ่งปรกติแล้วจะถูกซ่อนไว้ภายในของโครงสร้างเมื่อโปรตีนถูกสร้างขึ้นมาใหม่ๆ เคยมีรายงานว่า CyaA มีบริเวณที่สามารถจับกับแคลเซียมได้ประมาณ 30 ตำแหน่งซึ่งอยู่ในบริเวณของ RTX (Bauche *et al.*, 2006) การจับกับแคลเซียมยังจำเป็นสำหรับการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ด้วย (Guermonprez *et al.*, 2001) ตลอดจนการนำส่งส่วน AC เข้าสู่ภายในเซลล์ (Gentile *et al.*, 1988; Rose *et al.*, 1995) ซึ่งผลของแคลเซียมจะหายไป เมื่อมีการนำส่วนของ RTX repeats ออกไปจาก CyaA อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการศึกษาถึงกลไกการทำงานของ CyaA มากมาย แต่ก็ยังไม่สามารถอธิบายกลไกได้ว่า RTX toxins สามารถแทรกเข้าผ่านชั้นของเซลล์เมมเบรนได้อย่างไร ซึ่งในกรณีของ CyaA ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่า ส่วนของ AC สามารถแทรกผ่านเซลล์เมมเบรนเข้าสู่ภายในเซลล์ได้อย่างไร

จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA technology) และเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) นักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเทคโนโลยีการนำโปรตีนหรือพอลิเปปไทด์ที่สนใจมาแสดงออกบนผิวของอนุภาคฟาจ (phage) ที่เรียกว่าฟาจดิสเพลย์ (phage display) ขึ้น (Smith, 1985) เมื่อโปรตีนที่นำมาแสดงออกบนผิวของฟาจนั้นเป็นแอนติบอดี หรือชิ้นส่วนของ

แอนติบอดีที่จับแอนติเจน อาจจะเรียกเทคนิคนี้ว่า แอนติบอดีฟาจดิสเพลย์ (antibody-phage display) การนำชิ้นส่วนของแอนติบอดีที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจน อาจจะเป็น ScFv หรือ Fab มาแสดงออกที่ผิวของอนุภาคฟาจ ทำได้โดยการนำยีนของชิ้นส่วนของแอนติบอดีดังกล่าวไปเชื่อมต่อกับยีนที่เป็นรหัสของโปรตีนผิวฟาจ (phage surface protein) เมื่อเกิดการแสดงออกของจีโนมของฟาจดังกล่าว ก็จะได้ อนุภาคฟาจที่มีชิ้นส่วนของแอนติบอดีแสดงออกอยู่บนผิว ดังนั้นอนุภาคฟาจหนึ่งๆจึงทำหน้าที่เป็นพาหะที่แสดงออกแอนติบอดีชนิดหนึ่งที่ผิวอนุภาค พร้อมทั้งเก็บยีนของชิ้นส่วนแอนติบอดีดังกล่าวไว้ภายในอนุภาค เปรียบเสมือนเซลล์ลิ้มโฟซัยต์ที่มีแอนติบอดีแสดงออกอยู่ที่ผิว อนุภาคฟาจหนึ่งๆสามารถเพิ่มจำนวนได้มากมายภายในช่วงเวลาไม่กี่ชั่วโมง

จากหลักการดังกล่าวเมื่อนำยีนของแอนติบอดีหลากหลายชนิดจากมนุษย์ (human antibody gene pool) มาสร้างเป็นอนุภาคฟาจ เราจะได้คลังอนุภาคฟาจจำนวนมากที่มีแอนติบอดีมนุษย์แสดงออกอยู่ที่ผิว (antibody phage library) ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งสำหรับการคัดเลือกหาแอนติบอดีที่ต้องการ ซึ่งคลังแอนติบอดีที่ดีต้องมีขนาดใหญ่ มีความหลากหลายคือมีสมาชิก(แอนติบอดี)ในคลังมาก เทคนิคแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์นี้ทำให้กระบวนการวิจัยและพัฒนาโมโนโคลนัลแอนติบอดีเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง โดยสามารถคัดเลือกแอนติบอดีจากคลังได้ในระดับ 10^9 clones หรือมากกว่าภายในเวลา 1-2 สัปดาห์ ซึ่งรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เทคโนโลยีไฮบริโดมา

Naïve library ถูกสร้างขึ้นจากแหล่งแอนติบอดีที่ยังไม่ถูกกระตุ้น หรือ primary repertoire ดังนั้น หากกระบวนการสร้างคลังแอนติบอดีทำได้สมบูรณ์ เท่ากับว่าเราสามารถจำลองเอาแอนติบอดีที่มีทั้งหมดใน donor มาไว้ในคลัง และเราสามารถใช้อ้างอิงคลังแอนติบอดีดังกล่าวเพื่อคัดเลือกหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนใดๆก็ได้ (single-pot library หรือ universal library) เหมือนในธรรมชาติที่ร่างกายพร้อมที่จะสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนทุกชนิด เมื่อใช้การคัดเลือก naïve library ร่วมกับเทคนิคการทำ affinity maturation ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นการจำลองกระบวนการในธรรมชาติ ก็จะได้แอนติบอดีที่มีสัมฤทธิ์ภาพสูงต่อแอนติเจนเป้าหมาย ดังนั้น naïve library จึงมีข้อดีคือคลังแอนติบอดีที่สร้างขึ้นสามารถใช้สำหรับการคัดเลือกแอนติบอดีต่อแอนติเจนไม่จำกัดชนิด และสามารถเก็บรักษาไว้เพื่อใช้งานได้อย่างไม่มีกำหนดเวลา นอกจากนั้น naïve library ยังสามารถใช้ได้กับแอนติเจนที่ไม่สามารถทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เช่น human self-antigen และสารพิษต่างๆ (Sheets *et al.*, 1998)

ในการศึกษานี้ โปรตีนเฉพาะส่วน RTX ได้ถูกแสดงออกเพื่อใช้ในการศึกษาผลของแคลเซียมต่อโครงสร้างและการทำงานของ CyaA ซึ่งพบว่าสามารถละลายได้ดีซึ่งน่าจะแสดงถึงการมีโครงสร้างแบบธรรมชาติดั้งเดิม (native form) แอนติบอดีชนิด monoclonal scFv ที่สามารถจับแบบเฉพาะเจาะจงกับ

โปรตีนส่วน CyaA-RTX ของ *B. pertussis* ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนเมื่อมีการจับกับแคลเซียมต่อไป ซึ่งสามารถนำไปสู่การอธิบายโครงสร้างและการทำงานของ CyaA ได้ นอกจากนี้ แอนติบอดีที่ได้ยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อการรักษา หรือพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไปได้

พบว่าโปรตีนส่วน CyaA-RTX เกิด proteolytic ได้ ซึ่งโดยการทดสอบความไวต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส และการหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลาย เอ็น แสดงให้เห็นว่า โปรตีนส่วน CyaA-RTX ไวต่อการเกิด proteolytic degradation และพบว่าแคลเซียมช่วยเพิ่มความคงตัวได้โดยมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น

วิธีการทดลอง

1. Generation of nonimmune phage scFv antibody display libraries

1.1. การเตรียม RNA จาก peripheral blood lymphocyte

นำเลือดส่วน Buffy coat จากผู้บริจาคที่มีสุขภาพดีจำนวน 10 คนมาปั่นเพื่อแยกเม็ดเลือดขาว จากนั้นทำการสกัด RNA ด้วยชุดสกัดชนิดคอลัมน์ (QIAamp RNA Blood Mini Kit) โดยทำการสกัด RNA จากผู้บริจาคแต่ละรายแยกกัน วัดปริมาณ RNA ที่เตรียมได้จากผู้บริจาคแต่ละรายด้วยเทคนิคการวัดการดูดกลืนแสง เพื่อตรวจสอบคุณภาพ RNA และยืนยันด้วย 1% agarose gel อีกครั้งก่อนนำมารวมกันเป็น Pooled RNA

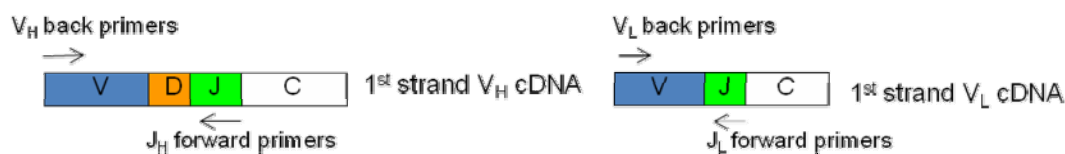
1.2. การเพิ่มจำนวนยีน V_H และ V_L โดย PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ของผู้บริจาคแต่ละรายด้วยวิธี reverse transcription (SuperScript™ First-strand Synthesis System) โดยใช้ primers ที่จำเพาะเจาะจงกับยีนส่วนคงที่ (constant region) ของ antibodies ส่วน Heavy chain และ Light chain แยกกัน ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การเพิ่มจำนวนยีน V_H และ V_L โดย PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะเจาะจงกับยีนส่วนคงที่

จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาใช้เป็น template สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน V_H และ V_L ด้วยเทคนิค PCR (Biometra, Lab Focus) โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีนของ V_H และ V_L ชนิดต่างๆที่พบในมนุษย์ ซึ่งลำดับเบสของ primers ที่จะใช้ นั้นสามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูลแอนติบอดีใน internet และรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการแบ่งกลุ่ม (class and subclass) ของแอนติบอดีมนุษย์ (Loiset *et al.*, 2005; Barbas *et al.*, 2001) ทำการเพิ่มจำนวนยีน V_H และ V_L คลาสต่างๆแยกกัน ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การเพิ่มจำนวนยีน V_H และ V_L ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีนของ V_H และ V_L

จากนั้นทำการแยกยีน V_H และ V_L คลาสต่างๆให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี 1.2% agarose electrophoresis แล้วแยกชิ้น DNA ออกจากเจล (HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit) แล้วทำการวัดปริมาณด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสง เตรียม V_H gene pool และ V_L gene pool โดยนำยีน V_H คลาสต่างๆ และ V_L คลาสต่างๆในปริมาณที่เท่ากันมาผสมกัน

1.3. การเชื่อม V_H กับ V_L ด้วย DNA linker โดยเทคนิค PCR เพื่อสร้าง ScFv genes

เชื่อมยีนของ V_H และ V_L เข้าด้วยกันด้วย DNA linker โดยเทคนิค overlapping extension PCR เพื่อสร้างยีนของ ScFv (V_H -linker- V_L) โดยใช้ชิ้นส่วน DNA ต่างๆ (V_H , V_L และ linker) ในอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลที่เท่ากัน (1:1:1) ให้ได้ scFv gene repertoires จำนวน 4 คือ $V_{H\mu}$ - V_K , $V_{H\mu}$ - V_λ , $V_{H\gamma}$ - V_K และ $V_{H\gamma}$ - V_λ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีนของ ScFv ด้วย primer ที่มีการออกแบบเพื่อเติม enzyme restriction site เข้าที่ปลายทั้งสองข้างของยีนสำหรับการโคลนนิ่งเข้าสู่พลาสมิดเว็คเตอร์ (pComb3X) ต่อไป

1.4. การโคลน ScFv repertoires เข้าสู่ phagemid vector

เชื่อมยีนของ V_H และ V_L เข้าด้วยกันด้วย DNA linker โดยเทคนิค overlapping extension PCR จากนั้นทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่พลาสมิดเว็คเตอร์โดย restriction / ligation แล้วทำการส่ง recombinant phagemid เข้าสู่ *E. coli* XL1Blue ด้วยเทคนิค electroporation

1.5. การสร้างคลังแอนติบอดีที่แสดงออกอยู่บนผิวฟาจ

ทำการเพิ่มจำนวน *E. coli* XL1Blue ที่รับเอา recombinant phagemid เข้าไปโดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และบ่มภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อเชื้อเจริญได้ขนาดจึงเติมฟาจผู้ช่วยลงไป ในขั้นตอนนี้ต้องอาศัยยาปฏิชีวนะในการควบคุมให้เฉพาะเชื้อที่มี recombinant phagemid พร้อมกับการถูก infect ด้วยฟาจผู้ช่วยเท่านั้นที่จะเจริญได้ในระบบ เมื่อบ่มเชื้อต่อไปเชื้อจะสร้างโปรตีนชนิดต่างๆของฟาจ รวมทั้ง recombinant antibody และเกิดการสร้างอนุภาคฟาจที่มีแอนติบอดีแสดงออกอยู่ที่ผิวจำนวนมากออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงทำการปั่นเก็บฟาจที่มีแอนติบอดีแสดงออกอยู่ที่ผิวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ฟาจ-แอนติบอดีที่รวบรวมได้ถือเป็นคลังแอนติบอดีที่พร้อมสำหรับการคัดเลือกหาแอนติบอดีที่ต้องการ หรือเพื่อเก็บรักษาไว้สำหรับการใช้งานในอนาคต

2. การเตรียมโปรตีนส่วน glycine/aspartate-rich nonapeptide repeats (CyaA-RTX subdomain)

2.1. การเตรียมดีเอ็นเอส่วน RTX subdomain

ทำการสร้างจุดตัดของ Nde I restriction enzyme ด้วยวิธี PCR-based mutagenesis (QuikChange Mutagenesis Kit) ในตำแหน่งก่อนหน้าส่วน RTX subdomain (amino acids 751-

1706) จาก pT-CyaA plasmid ที่มีส่วนของ Haemolysin domain ของ ACT ตัดด้วย Nde I แล้ว relegation เพื่อสร้าง pRTX ที่มีส่วนของ RTX subdomain ทำการยืนยันด้วยการหาลำดับเบส ก่อนที่จะย้าย pRTX จาก *E. coli* JM109 เข้าไปใน *E. coli* BL21(DE3) pLysS เพื่อใช้ในการ แสดงออกโปรตีน

2.2. การแสดงออกโปรตีน

ทำการแสดงออกโปรตีนโดยการบ่ม *E. coli* BL21(DE3)pLysS ที่มีพลาสมิด pCyaA-RTX ที่ 37°C จนกระทั่งมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ OD₆₀₀ ประมาณ 0.4-0.5 จึงเหนี่ยวนำการแสดงออก ด้วย IPTG แล้วบ่มเชื้อและเขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง บั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนกระจาย เซลล์ใน 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) ที่มี CaCl₂ 1 mM แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย French Pressure Cell แล้วปั่นแยกเอาส่วนตะกอน และ supernatant มาตรวจสอบการแสดงออกโดย SDS-PAGE

2.3. การทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น antigen

ส่วน Supernatant ที่มีโปรตีน CyaA-RTX subdomain ถูกตรวจสอบอีกครั้งด้วย SDS-PAGE และการวิเคราะห์ด้วย Western blot การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค anion-exchange FPLC system (5-ml HitrapQ HP และ 1-ml Mono Q, Amersham Biosciences) column โดยใช้ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) ที่มี CaCl₂ 1 mM เป็น Buffer A และใช้ Buffer A ที่มี 1 M NaCl ในการชะล้าง โปรตีนออกจาก column แบบ segmented gradient ทำการเก็บ Eluted fractions ในขนาด 1 มิลลิลิตร ทำการตรวจสอบหาโปรตีนเป้าหมายด้วยวิธี SDS-PAGE

Fraction ที่มีโปรตีน CyaA-RTX protein จากการผ่าน column ในแต่ละครั้งจะถูกนำมารวมกัน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ membrane spin column (Microcon YM-10, Millipore) ก่อนทำให้ บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายด้วยวิธี gel filtration (Superose 12 10/300 GL) โดยใช้ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) ที่มี CaCl₂ 1 mM เป็น Buffer ทำการเก็บ Eluted fractions ในขนาด 0.5 มิลลิลิตร ทำการ ตรวจสอบหาโปรตีนเป้าหมายด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting

3. การคัดเลือก phage antibodies ที่จำเพาะเจาะจงกับ RTX subdomain โดย biopanning และ phage ELISA

ทำการ immobilize โปรตีน RTX subdomain ที่ทำให้บริสุทธิ์บน immunotube จากนั้นทำการ บ่มคลังแอนติบอดี Human Single Fold scFv Libraries I + J ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก MRC HGMP Resource Centre กับ immobilized โปรตีน RTX subdomain เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง เอาฟาจ-แอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนออกไป ทำการ elute เอาฟาจ-แอนติบอดีที่จับกับแอนติเจน ออกมาด้วยสารละลายที่ทำลายแรงยึดเกาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี นำฟาจ-แอนติบอดีที่ได้ ไปทำการ infect เชื้อ *E. coli* พร้อมกับฟาจผู้ช่วย เพื่อเพิ่มจำนวนฟาจ-แอนติบอดี นำฟาจ-แอนติบอดีที่เตรียมได้ไปผ่านการคัดเลือกรอบต่อไป เมื่อทำการคัดเลือกรอบประมาณ 4-5 รอบ จะได้

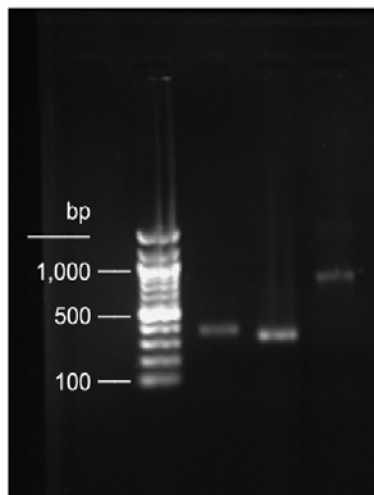
ฟาจ-แอนติบอดีที่มีสัมภักภาพสูงต่อโปรตีน RTX subdomain ทำการคัดกรองฟาจ-แอนติบอดีด้วยวิธี polyclonal phage ELISA

4. การทดสอบการย่อยโปรตีน RTX subdomain ด้วยเอนไซม์โปรติเอสและผลของแคลเซียม
เพื่อทดสอบผลของตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส cell lysates ที่ใช้ในการแสดงออกโปรตีน CyaA-RTX protein ถูกแบ่งและบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คู่กับสารต่างๆ ดังนี้ 0.5 mM/ 100 mM EDTA, 1, 10-phenanthroline, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 2 mM CaCl_2 หรือ 2 mM MgCl_2 ผลของแคลเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆจะถูกตรวจสอบโดยการบ่มโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วที่อุณหภูมิต่างๆ และตรวจสอบโดย SDS-PAGE
5. N-terminal amino acid sequencing
โปรตีนที่ถูกแยกโดย 10% SDS-PAGE จะถูกย้ายไปบน polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore) และย้อมโดย Coomassie-blue แถบของโปรตีนจะถูกตัดออกไปเพื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็น (ABI 491 automated protein sequencer, Proteome Factory, Germany)

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

การสร้าง nonimmune phage scFv antibody display libraries และคัดเลือก phage antibodies ที่จำเพาะเจาะจงกับ RTX subdomain

ยีนของ V_H และ V_L สามารถเพิ่มจำนวนได้จาก 1st stand cDNA ที่ได้มาจากการทำ reverse transcription ของ mRNA จากเลือดผู้ป่วยโรค 10 ราย โดยเกิดแถบ DNA ระหว่าง 300-400 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับ ขนาดของยีนที่เคยมีรายงานไว้ (Marks et al., 1991) (รูปที่ 4, lane 2 และ 3) จากการเชื่อมต่อกับ V_H gene กับ V_L gene เข้าด้วยกันโดยใช้ linker นั้น ได้ scFv ที่ขนาดประมาณ 700-800 bp ซึ่ง scFv เชื่อมต่อกันแล้ว จะเป็นแถบที่มีขนาด 700-800 bp (รูปที่ 4, lane 4) ทำการโคลนชิ้นส่วน scFv ที่ได้เข้าสู่พลาสมิดเว็คเตอร์โดย restriction / ligation แล้วทำการส่ง recombinant phagemid เข้าสู่ *E. coli* XL1Blue ด้วยเทคนิค electroporation และบ่มภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อเชื้อเจริญได้ขนาด จึงเติมฟาจผู้ช่วยลงไป ทำการปั่นเก็บฟาจที่มีแอนติบอดีแสดงออกอยู่ที่ผิวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ฟาจ-แอนติบอดีที่รวบรวมได้ถือเป็นคลังแอนติบอดีที่พร้อมสำหรับการคัดเลือกหาแอนติบอดีที่ต้องการ หรือเพื่อเก็บรักษาไว้สำหรับการใช้งานในอนาคต



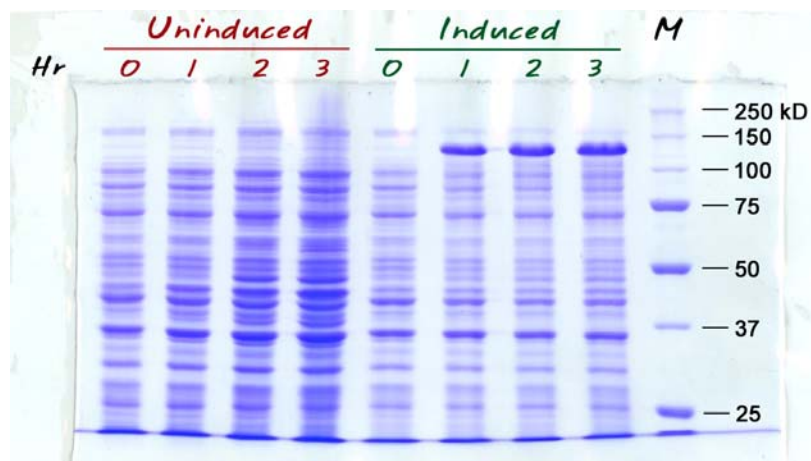
รูปที่ 4 Agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์ผลผลิตจากขบวนการ PCR ของ V_H , V_L และ scFv.

Lane 1 100-bp ladder marker; Lane 2 V_H ; Lane 3 V_L และ Lane 4 scFv

อย่างไรก็ตามคลังฟาจ-แอนติบอดีที่เตรียมได้ยังมีความหลากหลายไม่มากพอ โดยมีฟาจน้อยกว่า 10^9 ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการคัดเลือก phage antibodies ที่จำเพาะเจาะจงกับ RTX subdomain นั้น จึงใช้คลังแอนติบอดี Human Single Fold scFv Libraries I + J โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก MRC HGMP Resource Centre ซึ่งมีความหลากหลายมากกว่า โดยวิธี biopanning บน immunotube จำนวน 4-5 รอบ และคัดเลือกฟาจโดยวิธี phage ELISA ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 polyclonal phage ELISA ที่มีความสามารถจับกับโปรตีน RTX-subdomain



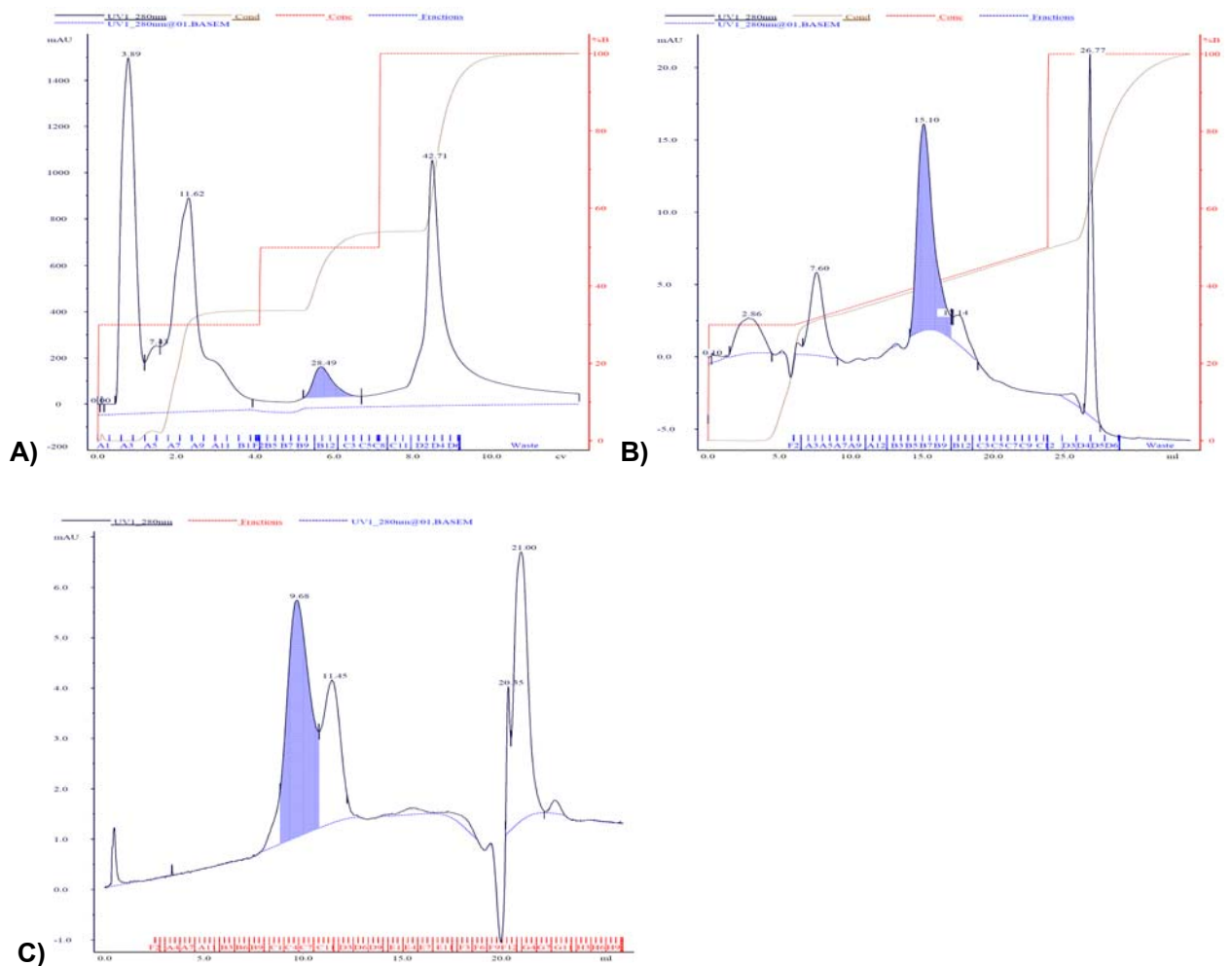
รูปที่ 6 แสดง cell lysate expression profile ของ RTX subdomain ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ที่ 0 ถึง 3 ชั่วโมง เมื่อไม่มีการเหนี่ยวนำ และมีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG (10% SDS-PAGE, 100 Volts, Coomassie staining)

การแสดงออกของโปรตีน RTX-subdomain และการทำให้บริสุทธิ์

ดีเอ็นเอสายผสม pCyaA-RTX ที่มีขนาด 2.8 กิโลเบสซึ่งมีรหัสสำหรับ RTX subdomain ของ CyaA (ลำดับกรดอะมิโนที่ 751-1706) ได้ถูกสร้างขึ้น เมื่อนำไปแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ผ่าน T7 promoter โดยการเหนี่ยวนำของ IPTG จะได้โปรตีน subdomain fragment ที่มีขนาดจากการคำนวณประมาณ 100 kDa (calculated molecular mass = 99,895.67 Da) ใน

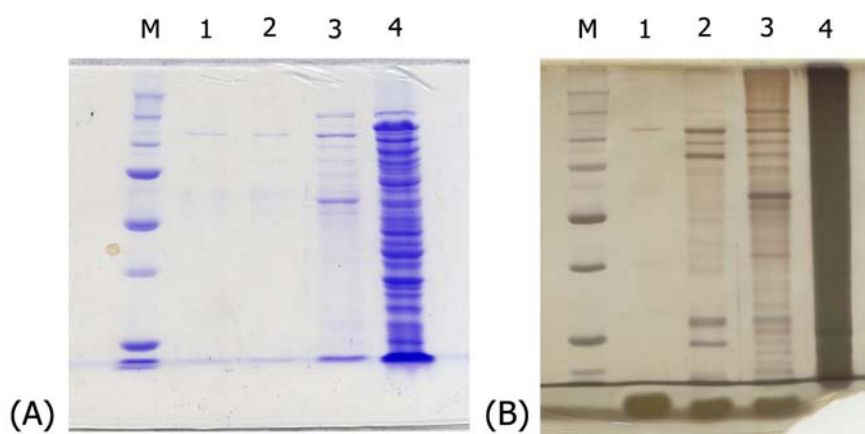
ปริมาณมาก และสามารถละลายได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 6 หากถอดรหัสจากยีนโดยเริ่มจาก ATG start codon โปรตีน RTX subdomain ที่ได้มีการดะมิโนตัวแรกคือ Ala751 ซึ่งตรงกับการหาลำดับกรดอะมิโนจากปลายเอ็น ในตารางที่ 1 คือ Ala-Asn-Ser-Asp-Gly- นอกจากนี้ โปรตีนที่แสดงออกได้ยังสามารถยืนยันโดยผลของ Western Blot ที่ทำปฏิกิริยากับ anti-RTX mAb 9D4 ด้วย

พบว่าโปรตีน CyaA-RTX ที่มีขนาด 100 KDa มีระดับของการแสดงออกที่สูงกว่าโปรตีน CyaA-PF (haemolysin domain) ซึ่งมีขนาด 126 KDa ซึ่งพบได้เช่นเดียวกันกับโปรตีน murine endogenous retroviral transmembrane envelope ซึ่งมีการเอาส่วน hydrophobic transmembrane domain ออกไป ทำให้มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมาก (Kim et al., 1999) นอกจากนี้ โปรตีน CyaA-RTX ยังคงสามารถแสดงออกได้ในรูปแบบที่ละลายได้ ซึ่งอาจจะอนุมานได้ว่ามีโครงสร้างใกล้เคียงกับรูปแบบดั้งเดิมในธรรมชาติ (a native-folded conformation) และเป็นไปได้ว่าโครงสร้างส่วน hydrophobic helices ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับโครงสร้าง RTX subdomain ของ CyaA



รูปที่ 7 FPLC Chromatogram ของการทำให้โปรตีน CyaA-RTX บริสุทธิ์ A) Hitrap HP, 5 mL B) Mono Q, 1 mL C) Superose GL

โปรตีน RTX subdomain ของ CyaA ที่อยู่ใน cell lysate ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี FPLC ในสารละลายที่มี 1 mM CaCl_2 โดยใช้เทคนิค Anion exchange chromatography โดยใช้ Hitrap Q และ Mono Q เพื่อเพิ่ม resolution ในการแยก และ gel filtration โดยใช้ Superose 12 10/300 GL ซึ่ง profile ในการแยกแสดงในรูปที่ 7 และ pooled fraction ที่มีโปรตีน CyaA-RTX จาก column ต่างๆ ได้ถูกวิเคราะห์โดย SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie blue และ Silver staining แสดงในรูปที่ 8



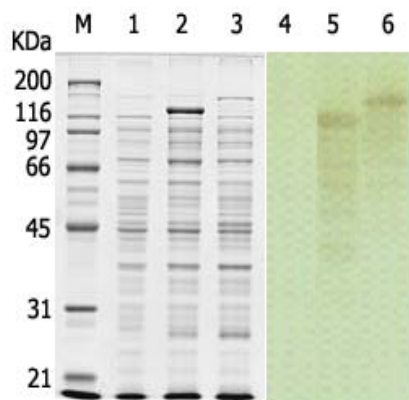
รูปที่ 8 10% SDS-PAGE แสดง pooled fraction ของ CyaA-RTX ที่ได้จาก FPLC โดย Hitrap Q HP (lane 3), Mono Q (lane 2), และ Superose 12 (lane 1) เทียบกับ cell lysate (lane 4) และ Precision unstained Bio-Rad Protein Marker (Lane M) ย้อมด้วย Coomassie blue staining (A) และ Silver staining (B)

การทดสอบการย่อยโปรตีน RTX subdomain ด้วยเอนไซม์โปรติเอสและผลของแคลเซียมต่อโครงสร้างของโปรตีน RTX subdomain

พบว่าโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณลดลงมาก และจากการย้อมด้วย Silver staining พบแถบของโปรตีนอื่นๆ เพิ่มขึ้นซึ่งเกิดขึ้นเช่นกันแม้ว่าจะถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นและแม้ว่าจะเก็บรักษาโปรตีนไว้ที่ 4 °C หรือ -20 °C ก็ตาม นอกจากนี้ cell lysate ที่แสดงออก CyaA-RTX ก็มีแถบโปรตีนที่ถูกย่อยสลายมากด้วย และมากกว่า cell lysate ที่แสดงออก 126-kDa CyaA-PF โดยการตรวจสอบด้วย Western blot analysis (รูปที่ 9) ยังพบว่า CyaA-RTX ถูกย่อยสลายจนเกือบหมดภายใน 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C

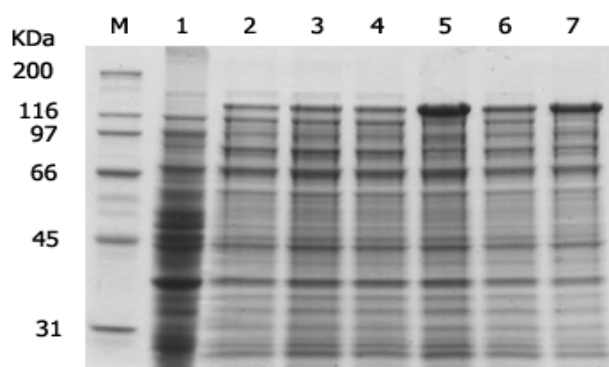
เพื่อแก้ปัญหการเสื่อมสลายของโปรตีน ตัวยับยั้งโปรติเอสชนิดต่างๆจึงถูกนำมาทดสอบ เช่น EDTA, 1, 10-phenanthroline, PMSF, pepstatin, leupeptin และ aprotinin โดยการเติมลงในสารละลายโปรตีน พบว่าการย่อยสลายลดลงเมื่อใช้สารต่อไปนี้อย่างใดอย่างหนึ่ง EDTA (a general metalloprotease inhibitor) 1, 10-phenanthroline (a specific zinc metalloprotease inhibitor) หรือ PMSF (a serine protease inhibitor) ในขณะที่โปรตีนยังแสดงการถูกย่อยสลายในตัวยับยั้งโปรติเอส

อื่นๆ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า serine proteases และ Zn metalloproteases แสดงบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย CyaA-RTX อย่างไรก็ตามการย่อยสลายโดยโปรติเอสเหล่านี้ ก็ไม่สามารถยับยั้งได้โดยสมบูรณ์เมื่อใช้ตัวยับยั้งโปรติเอส



รูปที่ 9 10% SDS-PAGE (Coomassie brilliant blue-staining) แสดงโปรตีนใน Crude extracts ของ *E. coli* cells ที่แสดงออก 100-kDa CyaA-RTX (lane 2) และ 126-kDa CyaA-PF (lane 3) เทียบกับ Crude extracts ของ *E. coli* cells ที่มี pET-17b vector (lane 1, negative control) และ Western blot ของ cell lysates ใน lane ที่ 4-6 ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันกับ lane ที่ 1-3 ตามลำดับ

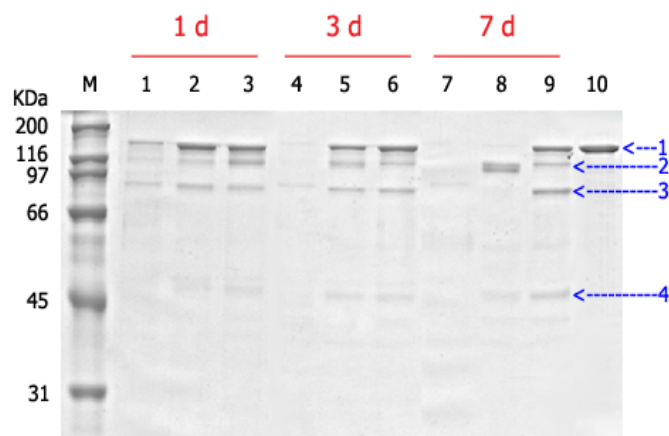
เนื่องจาก CyaA-RTX มีบริเวณที่มีรูปแบบเฉพาะในการจับกับแคลเซียมได้คือ Gly-Asp-rich repeats (Rose et al., 1995) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าการจับกับแคลเซียมจะช่วยให้เกิดโครงสร้างหรือรูปแบบการพับม้วนของโปรตีน CyaA-RTX subdomain ที่คงตัวได้ เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว จึงได้ทำการทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ CaCl_2 ต่างๆในสารละลายโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 10 พบว่า CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 2 mM สามารถลดการเกิด proteolytic degradation ของ CyaA-RTX ได้ แต่ไม่ปรากฏเหตุการณ์นี้เมื่อเปลี่ยนเป็น MgCl_2 แสดงว่าโครงสร้างสามมิติของโปรตีนมีความคงตัวมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากแคลเซียมไอออน นอกจากนี้ EDTA ในปริมาณที่มากเกินไป คือ ประมาณ 100 mM ยังมีประสิทธิภาพน้อยกว่าในการยับยั้งการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอส จึงเป็นไปได้ว่าการจับกับแคลเซียมของ CyaA-RTX มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอสมากกว่าการจับโลหะไอออนอื่นเป็นการยับยั้งที่การทำงานของเอนไซม์โปรติเอสเอง ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้โดยการศึกษาด้วย circular dichroism พบว่า บริเวณ RTX region (ลำดับกรดอะมิโนที่ 1006-1706) ของ CyaA แสดงโครงสร้างระดับทุติยภูมิมากขึ้นเมื่ออยู่ในสารละลายที่มี 2 mM CaCl_2 (Chenal et al., 2009) ทำให้เป็นไปได้ว่าการจับกับแคลเซียม สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างซึ่งจำเป็นต่อเสถียรภาพของโมเลกุลของ CyaA-RTX



รูปที่ 10 10% SDS-PAGE (Coomassie brilliant blue-staining) แสดง cell lysates ที่แสดงออก CyaA-RTX เมื่อบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C โดยไม่มีตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส (lane 2), เมื่อมี CaCl_2 ในความเข้มข้น 0.2 μM , 20 μM and 2 mM (lane 3, 4 and 5 ตามลำดับ), เมื่อมี MgCl_2 2 mM (lane 6) และ 100 mM EDTA (lane 7) เมื่อเทียบกับ *E. coli* cells ที่มี pET-17b vector (Lane 1) และ molecular mass standards (Lane M)

การทำให้ CyaA-RTX มีความบริสุทธิ์ในขั้นต่อมา จึงใช้สารละลาย 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , pH 8.0 buffer และสามารถใช้เทคนิค anion-exchange chromatography ในขั้นตอนเดียวได้ โดยให้ ความบริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 95 ดังแสดงในรูปที่ 11 (lane 10) ทั้งนี้ในการเตรียม cell lysate ต้องอาศัย 5 mM CaCl_2 ร่วมกับตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสด้วย เช่น PMSF และ 1, 10-phenanthroline เป็นต้น ในสภาวะดังกล่าวนี้ ทำให้สามารถได้ปริมาณโปรตีน CyaA-RTX ในปริมาณที่พอเพียงต่อการศึกษอื่นๆ ต่อไปได้

เพื่อศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของแคลเซียมต่อโครงสร้างของ CyaA-RTX โปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ได้ ถูกบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 1, 3 และ 7 วัน (รูปที่ 11) เห็นได้ชัดเจนว่าโปรตีน CyaA-RTX ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C มีความคงตัวมากขึ้นเมื่ออยู่ในสารละลายที่มี 5 mM CaCl_2 (รูปที่ 11, lane 10) ความคงตัวจะลดลงอย่างมากเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 7 วัน ในสารละลายที่มี CaCl_2 เข้มข้น 5 mM เมื่อเทียบกับ 2 mM (รูปที่ 11, lanes 8-9) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของแคลเซียมที่ต่างกัน ก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามรูปแบบการย่อยสลายที่ 5 mM และ 10 mM CaCl_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่าไม่แตกต่างกัน แสดงว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน CyaA-RTX โดยการเหนี่ยวนำโดยการจับกับแคลเซียมที่มีความเข้มข้นมากกว่า 5 mM อีกแล้ว นอกจากนี้ การที่มีตัวจับไอออนแคลเซียม (Ca^{2+} -chelating agent) เช่น EGTA เป็นต้น มีผลข้างเคียงต่อความคงตัวของโปรตีน CyaA-RTX แสดงว่าผลของการจับกับแคลเซียมต่อโครงสร้างโปรตีนนี้สามารถผันกลับได้



รูปที่ 11 10% SDS-PAGE (Coomassie brilliant blue-staining) แสดง CyaA-RTX protein ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค anion exchange ในสารละลายที่มี CaCl_2 5 mM โดยตัวอย่างโปรตีนทุกช่องยกเว้นใน lane ที่ 10 ได้ถูกบ่มที่ 37 °C เป็นเวลานาน 1, 3 และ 7 วัน ในสภาวะที่ไม่มี EGTA (lanes 3, 6 และ 9), ที่มี 10 mM EGTA (lanes 1, 4 และ 7) หรือ 3 mM EGTA (lanes 2, 5 และ 8)

จะเห็นว่า เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนในสารละลาย โปรตีนจะถูกย่อยสลายเป็นแถบของโปรตีนมากกว่าที่จะเกิดเป็นรอยยาวๆ แบบในตัวอย่างที่ไม่มีแคลเซียม แถบของโปรตีนแต่ละอันดังแสดงในรูปที่ 11 เป็นลูกศร 1-4 ได้ถูกตัดออกมาเพื่อทำการหาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายเอ็น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 N-terminal amino acid sequence ของ protease-resistant fragments

Fragment	N-terminal amino acid sequence	Cleavage site
1	Ala-Asn-Ser-Asp-Gly	
2	Arg-Val-Gly-Gln-Leu-Val	A ⁹⁹⁵ -R ⁹⁹⁶
3	Ala-Asn-Ser-Asp-Gly-Leu	
4	Arg-Gly-Gly-Leu-Gly-Leu	L ¹¹⁷² -R ¹¹⁷³

เมื่อเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์ Trypsin ของโปรตีนเฉพาะส่วน CyaA ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1006 - 1706 (Bauche et al., 2006) พบว่า trypsin-resistant fragments จะเกิดขึ้นเมื่อมีแคลเซียมเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม จุดตัดที่พบนั้นต่างกัน จึงเป็นไปได้ว่าจุดตัดในการศึกษานี้ไม่เกี่ยวข้องกับ trypsin-like serine proteases และจากทดลองนี้ แสดงว่าโปรตีน CyaA-RTX มี autolysis activity

เหมือนกับที่มีรายงานใน *Photorhabdus* PrtA (Bowen et al., 2003) ซึ่งเป็น RTX alkaline Zn metalloprotease ถูกสร้างและหลั่งออกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Photorhabdus* spp. ซึ่งอาศัยใน nematodes แบบพึ่งพาอาศัย protease-resistant patterns ของ PrtA เห็นได้อย่างชัดเจนเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีแคลเซียม และจะเกิดเป็น smear bands เมื่อปฏิกิริยากับ EDTA (Bowen et al., 2003) โปรตีนกลุ่ม RTX family เป็นโปรตีนกลุ่มขนาดใหญ่ ซึ่งรวมถึง alkaline Zn metalloproteases, cytolysins, lipases, antifreeze proteins เป็นต้น แม้ว่าจะมีความหลากหลายในหน้าที่การทำงาน กรดอะมิโนใน CyaA-RTX กลับมีความเหมือนกันกับกลุ่ม alkaline Zn metalloprotease group นอกจากนั้นการย่อยสลายยังสามารถถูกยับยั้งด้วย EDTA และ 1, 10-phenanthroline ได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีน CyaA-RTX สามารถแสดงบทบาทเป็น Zn metalloprotease ได้ซึ่งแนวคิดนี้ยังคงต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ซึ่งอาจอาศัยโครงสร้างสามมิติของโปรตีน หรือการศึกษาด้วยฟาจ-แอนติบอดี เพื่อทำให้เข้าใจโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน CyaA จากเชื้อ *B. Pertussis* มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Barbas III, CF., Burton, DR., Scott, JK. and Silverman GJ., (2001) Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Bauche, C., Chenal, A., Knapp, O., Bodenreider, C., Benz, R., Chaffotte, A. and Ladant, D. (2006) Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* **281**, 16914-16926.
- Bowen, D.J., Rocheleau, T.A., Grutzmacher, C.K., Meslet, L., Valens, M., Marble, D., Dowling, A., Constant, R. and Blight, M.A. (2003) Genetic and biochemical characterization of PrtA, an RTX-like metalloprotease from *Photorhabdus*. *Microbiology*. **149**, 1581-1591.
- Fiser, R. and Konopasek, I. (2009) Different modes of membrane permeabilization by two RTX toxins: HlyA from *Escherichia coli* and CyaA from *Bordetella pertussis*. *BBA-Biomembranes*. Article in press.
- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Castagnoli, P.R., Guiso, N., Ladant, D. and Leclerc, C. (2001) The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the $\alpha M\beta 2$ integrin (CD11b/CD18). *J.Exp.Med.* **193**, 1035-1044.
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.S., Gibbs, C.S., Mrksich, M. and Tang, W.J. (2005) Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenyl cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J.* **24**, 3190-3201.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., and Leclerc, C. (2003) Interaction of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and Identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 38514–38521
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hewlett, E.L. (1994) Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*, *Science*. **266**, 433-435.
- Hewlett, E. L., Donato, G.M. and Gray, M.C. (2006) Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol.* **59**, 447-459.
- Kim, K.S., Kim, K.H., Choi, S.E., Yoon, J.W. and Kang, Y. (1999) Soluble expression in *Escherichia coli* of murine endogenous retroviral transmembrane envelope protein having immunosuppressive activity. *Prot Express Purif*, **16**, 19-26.
- Marks, JD., Hoogenboom, HR., Bonnert, TP., et al. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **222**, 581-597.

- Loset, GA., Lbersli, I., Kavlie, A., et al. (2005) Construction, evaluation and refinement of a large human antibody phage library based on the IgD and IgM variable gene repertoire. *J Immunol Methods* **299**, 47-62.
- Paccani, S.R., Molin, F.D., Benagiano, M., Ladant, D., D'Elis, M.M., Montecucco, C. and Baldari, C.T. (2008) Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **76**, 2822-2832.
- Powthongchin, B. and Angsuthanasombat, C. (2008) High level of soluble expression in *Escherichia coli* and characterisation of the CyaA pore-forming fragment from a *Bordetella pertussis* Thai clinical isolate. *Arch Microbiol.* **189**, 169-174.
- Powthongchin, P. and Angsuthanasombat, C. (2009) Effects on haemolytic activity of single proline substitutions in the *Bordetella pertussis* CyaA pore-forming fragment. *Arch Microbiol.* **191**, 1-9.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. and Ladant, D. (1995) Interaction of Calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem.* **270**, 26370-26376.
- Sheets, MD., Amersdorfer, P., Finnern, RA., et al. (1998) Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: The production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6157-6162.
- Smith, GP. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**:1315-1317.
- Vojtova, J., Kamanova, J. and Sebo, P. (2005) *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol.* **9**, 1–7

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานบางส่วนคาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ Manuscript “Bordetella pertussis CyaA-RTX Subdomain Requires Calcium Ions for Its Structural Stability” โดย Pichaya Pojanapotha, Sarawut Nukoolkarn, and Chanan Angsuthanasombat
2. โอกาสในการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - คลังแอนติบอดีที่สร้างขึ้นสามารถใช้สำหรับการคัดเลือกแอนติบอดีต่อแอนติเจนอื่นๆ ซึ่งอาจนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้
 - แอนติบอดีต่อ CyaA-RTX ที่ได้ อาจนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อการรักษา หรือพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไปได้
3. มีสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ และพัฒนาความร่วมมือระหว่างสถาบันในการวิจัยเกี่ยวกับโปรตีน CyaA และ CyaC