

375

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2546

การศึกษาปฏิกิริยาเคมีแสงของอนุพันธ์ไพรีนสังเคราะห์ในการตัดโปรตีน

Photochemical studies of novel pyrenyl probe on specific cleavage of
proteins

อภิญญา ชัยวิสุทธิางกูร

C. V. Kumar

มะยูโซ๊ะ ญูโน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

547.7
อ253ก

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี ๒๕๔๖

การศึกษาปฏิกิริยาเคมีแสงของอนุพันธ์ไพรีนสังเคราะห์ในการตัดโปรตีน

**Photochemical studies of novel pyrenyl probe on specific cleavage of
proteins**

อภิญญา ชัยวิสุทธิทางกูร

C. V. Kumar

มะยูโซ๊ะ กูโน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนให้ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546 ขอขอบคุณ Professor Challa V. Kumar จาก Department of Chemistry, University of Connecticut, USA ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการทำวิจัย สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2547

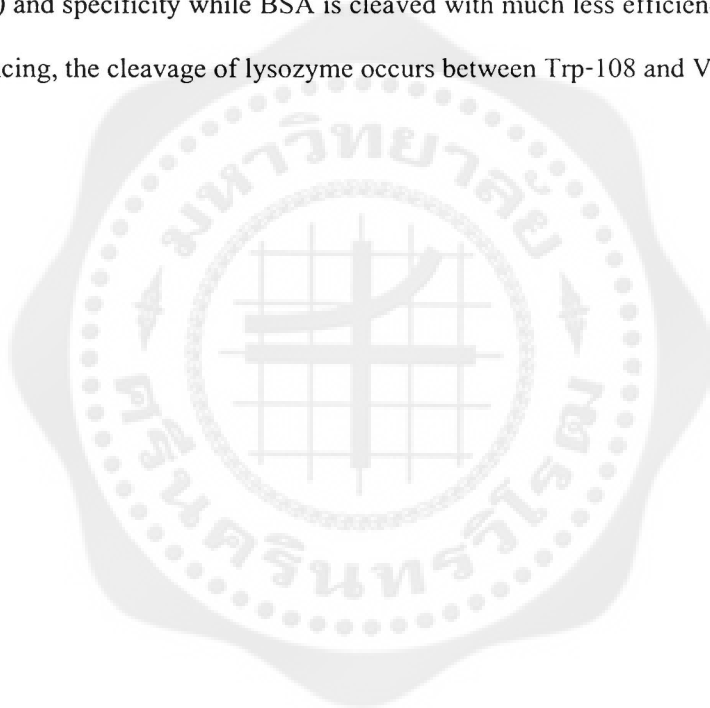


บทคัดย่อ

โมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่คือ L-phenylalanine-1(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-L-Phe) ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันสองหมู่คือ กรดอะมิโน และหมู่ไพรีน โดยมีส่วนปลายสุดเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) จากการศึกษาโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมของโมเลกุลนี้ เมื่อมีการจับกับโปรตีน เช่น bovine serum albumin (BSA) และ chicken egg-white lysozyme และเมื่อสารละลายผสมของโปรตีนและ PMA-L-Phe ถูกฉายแสงที่ 342 nm โดยมีตัวรับอิเล็กตรอน [Cobalt(III) hexammine chloride (CoHA)] อยู่ในสารละลายด้วย พบว่า โปรตีน lysozyme ถูกตัดมากกว่า BSA โดย lysozyme ถูกตัดร้อยละ 57 ในขณะที่ BSA ถูกตัดเพียงร้อยละ 5 โดยการตัดโปรตีนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าขาด PMA-L-Phe, CoHA หรือ แสง อย่างใดอย่างหนึ่ง และจากการหาลำดับกรดอะมิโน พบว่า lysozyme ถูกตัดระหว่าง Trp-108 และ Val-109

Abstract

A new probe, L-phenylalanine-1(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-L-Phe) carrying a free amino terminus binds to both bovine serum albumin (BSA) and chicken egg-white lysozyme with high binding affinity. Photocleavage of the proteins by PMA-L-Phe can be achieved when the mixture of the protein and PMA-L-Phe is irradiated at 342 nm in the presence of Co(III)hexammine (CoHA). No reaction can occur in the absence of light, PMA-L-Phe or CoHA. Lysozyme is cleaved by PMA-L-Phe with high efficiency (57% yield) and specificity while BSA is cleaved with much less efficiency (<5% yield). From the N-terminal sequencing, the cleavage of lysozyme occurs between Trp-108 and Val-109.



สารบัญ

	หน้า
บทนำ	
การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ	3
วิธีการทดลอง	
การตัดโปรตีนด้วยแสง	8
การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	8
การ transfer เปปไทด์ที่ได้จากการตัดและการหาลำดับกรดอะมิโน	9
ผลการทดลอง	
การตัดโปรตีนด้วยแสงและการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	11
การ transfer เปปไทด์ที่ได้จากการตัดและการหาลำดับกรดอะมิโน	11
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	13
เอกสารอ้างอิง	16



บทนำ

การตัดโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายเล็กลงโดยทั่วไปเรานึกถึงเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งต่างกัน ในปัจจุบันมีการค้นพบสารเคมีที่ทำหน้าที่เหมือนเอนไซม์น้อยมาก จึงได้มีความพยายามในการสังเคราะห์โมเลกุลใหม่ที่มีความสามารถตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้ นอกจากการทำหน้าที่ย่อยโปรตีนให้เล็กลงเพื่อประโยชน์ในการหาลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequencing) แล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เป็น probe ในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนในบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ได้ด้วย นอกจากนี้ อาจใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยการจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ในการออกแบบยาชนิดใหม่ และยังใช้ในการศึกษาการหากลไกในการจับของโมเลกุลขนาดเล็กกับโปรตีน หรือเอนไซม์ได้อีกด้วย¹⁻⁹

โมเลกุลเหล่านี้เมื่อจับกับโปรตีนแล้วสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ 2 ทาง คือ ปฏิกิริยาทางความร้อน (thermal reaction) และปฏิกิริยาทางแสง (photoreaction) ในการออกแบบโมเลกุล อาจทำได้โดยการสร้างโมเลกุลที่มีความจดจำอย่างจำเพาะต่อ binding site ของโปรตีน⁵⁻⁹ หรืออาจนำโมเลกุลไปเชื่อมติดกับกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งของโปรตีน¹⁰⁻¹¹ ตัวอย่างในการใช้ปฏิกิริยาทางความร้อนนั้น ได้มีการใช้โมเลกุลที่มีความจดจำจำเพาะ (recognition element) มาต่อกับสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ (metal complex) ตัวอย่างเช่น การใช้ trifluoperazine (TFP) มาต่อกับ iron(II)ethylenediamine (Fe(EDTA)) ซึ่ง TFP สามารถนำสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวไปจับกับ calmodulin ได้ที่ตำแหน่งจำเพาะ จากนั้น calmodulin จะถูกตัดที่ตำแหน่งที่ TFP-Fe(EDTA) จับอยู่ ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดผ่านกลไกการออกซิเดชัน (oxidative mechanism) ของโลหะที่บริเวณนั้นของโปรตีน⁶ โดยเกิด hydroxyl radicals (OH•) ซึ่งเป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนและทำให้เกิดการแตกของพันธะเปปไทด์ จากการทดลองพบว่า calmodulin ถูกตัดได้ 6 เปปไทด์ย่อย แต่วิธีนี้มักได้ผลิตภัณฑ์ของเปปไทด์ที่ถูกตัดในปริมาณที่ต่ำ

การใช้แสงเป็นเสมือนสารเคมีตัวหนึ่งในปฏิกิริยามีประโยชน์คือ นอกจากจะสะดวกในการใช้และราคาไม่แพงแล้ว ปฏิกิริยาสามารถควบคุมได้ง่าย (sharp control) โดยการเปิดและปิดแสง และลดสารตั้งต้นตัวหนึ่งในการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้การเลือกความยาวคลื่นที่จำเพาะในการกระตุ้นโมเลกุลให้เกิดปฏิกิริยา จะช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ ตัวอย่างรายงานที่มีการใช้แสงในการตัดโปรตีนคือ การใช้ vanadate ในการหา binding site สำหรับฟอสเฟต (phosphate) ในโปรตีน¹²⁻¹⁵ (phosphate binding protein เช่น myosin light chain kinase) โดย vanadate มีประจุเหมือนฟอสเฟต จึงเกิดการแข่งที่จะจับกับโปรตีน หลังจากที่ vanadate ได้รับพลังงานจากแสง (ที่ 366 nm) พันธะเปปไทด์หลังหมู่ serine ในโปรตีนจะถูกตัด ถึงแม้ว่าการตัดจะจำเพาะที่ serine แต่พบว่ามีกรดอะมิโนตัวอื่นด้วย นอกจากนี้ vanadate จะอยู่ในรูปสมมูลของโอลิโกเมอร์ (oligomers) ทำให้ยากในการศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยา และเนื่องจาก vanadate มี absorption extinction coefficient ที่ต่ำ (ที่ >320 nm) จึงต้องใช้ความเข้มข้นสูงในการดูดกลืนแสงให้

เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี และการประยุกต์ใช้กับโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่จับกับฟอสเฟต เป็นไปได้อย่างจำกัด ดังนั้นการพัฒนาเพื่อหาโมเลกุลใหม่ที่สามารถจับกับโปรตีนได้ดีและสามารถ คัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงจึงได้รับความสนใจ

การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ

รายงานในระยะแรกได้มีการนำอนุพันธ์ของไพรีน คือ 4(1-pyrenyl)butyramine chloride (PBAC) มาศึกษาการจับกับโปรตีน เช่น BSA lactoglobulin และ calmodulin พบว่า PBAC จับกับโปรตีนด้วย binding constant ที่สูง¹⁶⁻¹⁷ โดยการจับของ PBAC จะเลือกจับตรงบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่อยู่ใกล้กับหมู่ที่มีประจุ (ionic) ในโปรตีน ซึ่งจะทำให้การเลือกจับมีความจำเพาะกว่าการจับตรงบริเวณหมู่ที่ไม่ชอบน้ำเพียงอย่างเดียว หรือการจับตรงบริเวณที่มีหมู่ ionic เพียงอย่างเดียว จากนั้นได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพรีน โมเลกุลใหม่ที่มีหมู่ที่จดจำอย่างจำเพาะ (recognition element) ซึ่งจะเป็นตัวที่พาโมเลกุลไปที่ตำแหน่งจำเพาะในโปรตีน โดยการเชื่อมปลายด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) ของ L-phenylalanine เข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของ 4-(pyrenyl)butyric acid เกิดเป็น N-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene)butyramide หรือเรียกย่อว่า Py-Phe (Chart 1)¹⁸

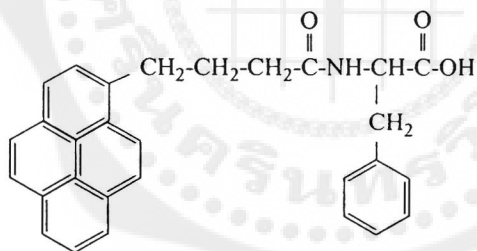


Chart 1 โครงสร้างของ N-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene)butyramide (Py-Phe)

การใช้ไพรีนมีข้อดีหลายประการ คือ 1) ไพรีนมี absorption extinction coefficient (>320 nm) ที่สูง ดังนั้นจึงสามารถใช้ความเข้มข้นน้อยในการรับแสงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา 2) ไพรีนที่สภาวะกระตุ้น (pyrene singlet excited state) จะมีช่วงเวลาวัย (~200 ns) ก่อนที่จะกลับสู่สภาวะพื้น (ground state) และมีพลังงานสูง (~70 kcal/mol) ทำให้มีโอกาสในการก่อให้เกิดปฏิกิริยาทางแสงได้มาก (ปกติโมเลกุลที่มีเวลานี้สั้นและพลังงานต่ำจะกลับสู่ ground state อย่างรวดเร็วโดยไม่เกิดปฏิกิริยาใด) 3) เนื่องจากไพรีนดูดกลืนแสงและคายพลังงานแสงด้วยความเข้มสูง เราสามารถใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปีในการติดตามปฏิกิริยาได้ และ 4) สามารถใช้เทคนิคทาง flash photolysis ในการหา intermediate ที่เกิดขึ้น เพื่อศึกษาถึงกลไกการตัดโปรตีนได้

จากการศึกษาทางสเปกโตรสโคปี พบว่า Py-Phe สามารถจับกับโปรตีนตัวอย่าง คือ BSA และ lysozyme ด้วยค่าคงที่ของการจับ (binding constant) สูงถึง $6.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ และ $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ตามลำดับ¹⁹ นอกจากนี้ พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ของ Py-Phe เมื่อจับกับ BSA ในบัฟเฟอร์ จะเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งไปที่ความยาวคลื่นสูงขึ้น (red shift) ถึง 4 nm (λ_{max} ที่ 343 nm เป็น 347 nm) ซึ่งการเกิด red shift ของ Py-Phe นี้ พบว่าสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อละลาย Py-Phe ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น benzene นอกจากนี้ยังพบว่าการคายแสง fluorescence ของ Py-Phe จะลดลงเมื่อ Py-Phe จับกับ BSA และมี peak ใหม่เกิดขึ้น²⁰ ($\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$) ซึ่งเป็น fluorescence ของ exciplex โดยเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไพรีนที่สถานะกระตุ้น กับ tryptophan ใน BSA การใช้ Hexamine cobalt(III) trichloride (CoHA) ในการยับยั้งการคายแสงของ Py-Phe (fluorescence quenching) เพื่อศึกษาความสามารถของ CoHA ในการเข้าถึง Py-Phe ขณะจับกับ BSA โดยเทียบกับความสามารถในการเข้าถึง Py-Phe อิสระในบัฟเฟอร์พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการคายแสงจะลดลงถึง 90 % แสดงให้เห็นว่า Py-Phe จะจับกับโปรตีนในลักษณะฝังหมู่ไพรีนตรงบริเวณที่เป็น hydrophobic ในโปรตีน ทำให้ CoHA ซึ่งอยู่ในบัฟเฟอร์ไม่สามารถเข้าถึงได้²⁰

เนื่องจากอะตอมคาร์บอนในตำแหน่งอัลฟา (α -carbon) ของกรดอะมิโนเป็นอะตอมคาร์บอนที่ไม่สมมาตร (asymmetric carbon atom) หรือเรียกว่า chiral carbon ดังนั้น หมู่ chiral carbon ของกรดอะมิโนสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้หมู่ไพรีนแสดงสัญญาณ CD ในช่วงความยาวคลื่นที่หมู่ไพรีนดูดกลืนแสงได้ (320-370 nm) และพบว่าขณะจับกับโปรตีน CD spectrum ของ Py-Phe มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งข้อมูลต่างๆ ทางสเปกโตรสโคปีได้บอกถึงการเปลี่ยนแปลงสภาวะรอบๆ หมู่ไพรีนจากบริเวณที่ชอบน้ำไปยังบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ นอกจากนี้ ยังพบว่า chirality ของ probe มีผลต่อการจับกับโปรตีน โดย L-isomer ของ Py-Phe (Py-L-Phe) จับกับ BSA ได้ดีกว่า D-isomer ของ Py-Phe (Py-D-Phe) ถึง 100 เท่า แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของหมู่ chiral บนกรดอะมิโนต่อการจดจำจำเพาะในการจับโปรตีน²¹⁻²²

จากการศึกษาการตัดโปรตีน พบว่า BSA ถูกตัดระหว่าง Leu 348 และ Arg 349 ในขณะที่ lysozyme ถูกตัดระหว่าง Val 108 และ Trp 109 เมื่อทำการฉายแสงที่ความยาวคลื่น 344 nm (λ_{max} ของ Py-Phe) ไปยังสารละลายผสมของโปรตีน Py-Phe และ CoHA ซึ่ง CoHA ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) จากไพรีนที่สถานะกระตุ้น (Py^*) โดยการตัดโปรตีนจะไม่เกิดขึ้นถ้าขาดสารตั้งต้นตัวใดตัวหนึ่งหรือขาดแสง¹⁸⁻¹⁹ การศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยาโดยเทคนิคทาง Flash photolysis พบว่าเกิดอนุมูลประจุบวกของไพรีน (pyrene cation radical; Py^+) เป็น intermediate หลังจาก CoHA รับอิเล็กตรอนจาก Py^* ซึ่ง Py^+ สามารถดึงอะตอมของไฮโดรเจน

(hydrogen atom abstraction) บนคาร์บอนตำแหน่งอัลฟาของกรดอะมิโนในโปรตีน ซึ่งก่อให้เกิดการสลาย (hydrolysis) ของพันธะเปปไทด์^{19,22}

การใช้กรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้น (di- และ tripeptide) ตัวอื่น เช่น glycine, L-tryptophan, L-tyrosine และ L-histidine ต่อเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของ 4(1-pyrene)butyric acid แทน L-phenylalanine²⁰ มีผลต่อการจับและตัดโปรตีน พบว่า BSA จะไม่ถูกตัดเมื่อใช้โมเลกุลที่มี Trp และ Tyr การศึกษาทาง flash photolysis แสดงถึงการยับยั้งการเกิด Py^+ จาก Py^* โดย Trp และ Tyr (intramolecular quenching) นอกจากนี้ความยาวของโมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีนมีผลต่อการตัดโปรตีนเช่นกัน เมื่อนำ glycine มาขึ้นระหว่าง 4(1-pyrene)butyric acid กับ L-phenylalanine (Py-Gly)_n-Phe; n=0, 1, 2) พบว่าความยาวของโมเลกุลไม่ช่วยให้การตัดโปรตีนดีขึ้น ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนลดลงเมื่อโมเลกุลมีความยาวเพิ่มขึ้น²³

จากการศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นการใช้อนุพันธ์ไพรีนที่มีปลายของโมเลกุลเป็นหมู่คาร์บอกซิล (COOH) เมื่อใช้เทคนิคทาง molecular modeling โดยใช้ x-ray crystal structure ของ lysozyme พบว่ามีหมู่ arginine อยู่ใกล้กับตำแหน่งที่ lysozyme ถูกตัด ทำให้ได้สมมติฐานว่า อาจเกิดการจับแบบ salt bridge ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ phenylalanine (บน Py-Phe) กับประจุบวกของ arginine (บน lysozyme) และพบว่า lysozyme ไม่ถูกตัดเมื่อใช้ C-methyl ester ของ Py-Phe แทน Py-Phe¹⁹ ทำให้ได้ข้อสรุปว่าขั้วที่ปลายโมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีนมีความสำคัญในการจับกับโปรตีน จึงเป็นที่มาของสมมติฐานใหม่ว่า การกลับขั้วที่ปลายของโมเลกุล Py-Phe จากขั้วลบเป็นขั้วบวก โดยให้ปลายของอนุพันธ์ไพรีนเป็นหมู่อะมิโนของ phenylalanine แทนหมู่คาร์บอกซิล ได้โมเลกุลใหม่ คือ PMA-L-Phe (Chart 2)

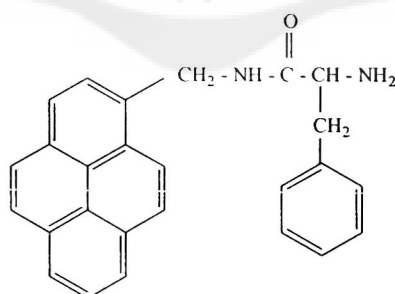


Chart 2 โครงสร้างของ L-phenylalanine-4(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-L-Phe).

พบว่า PMA-L-Phe สามารถจับกับ BSA และ lysozyme ด้วยค่าคงที่การจับ (binding constant) ที่สูงถึง $7.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ และ $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ตามลำดับ (รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทนอดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2545) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-Phe เมื่อจับกับ BSA จะเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น

ในขณะที่สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ PMA-Phe แทบจะไม่มีเปลี่ยนแปลงเมื่อจับกับ lysozyme ซึ่งการเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้นนี้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสภาวะรอบๆ หมู่ไพริน แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้น้อยกว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากที่มีการศึกษาโดยใช้ Py-Phe เป็น probe²⁰ (ซึ่ง Py-Phe มีหมู่คาร์บอกซิลอยู่ที่ปลายของโมเลกุล) จากนั้นจะได้ทำการศึกษาการตัดโปรตีน ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการตัดของโปรตีนที่จำเพาะในตำแหน่งอื่น โดยติดตามผลด้วยการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และการหาลำดับกรดอะมิโน โครงสร้างของโปรตีนบริเวณที่ถูกตัดจะถูกศึกษาโดยการสร้างโครงสร้างสามมิติของอนุพันธ์ไพริน และบริเวณ binding site ของโปรตีนที่สนใจโดยใช้ molecular modeling แล้วทำการปรับโครงสร้าง (optimize) ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัม จากนั้นจึงนำผลที่ได้มาพิจารณาถึงปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ไพรินกับโปรตีน เพื่อนำไปสู่การศึกษาโครงสร้างของโปรตีน และกลไกการจับกับโปรตีนต่อไป

วิธีการทดลอง



แผนการดำเนินการทดลองโดยรวมของการวิจัยนี้มีดังนี้

1. การตัดโปรตีนด้วยแสง
2. การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE
3. การ transfer เปปไทด์ที่ได้จากการตัดและการหาลำดับกรดอะมิโนเพื่อหาตำแหน่งของโปรตีนที่ถูกตัด

1. การตัดโปรตีนด้วยแสง

เตรียมสารละลายผสมของ probe (15 μ M) โปรตีน (15 μ M) และ CoHA (1 mM) ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 และสารละลายผสมที่ขาด probe หรือ CoHA ในสถานะเดียวกัน (controls) แล้วทำการฉายแสงด้วยเครื่อง monochromator (PTI model 1010; 120 W, ด้วยความอนุเคราะห์จาก Professor Challa V. Kumar, Department of Chemistry, University of Connecticut, USA) ที่ 342 nm ในช่วงที่หม้อไพร์นูดกลืนแสง โดยใช้ WG-345 filter ในการป้องกันแสงรบกวนจากความยาวคลื่นช่วงอื่น และจะเตรียมสารละลายผสมที่ไม่มีการฉายแสง (dark control) เพื่อเป็นการเปรียบเทียบ โดยการทดลองทั้งหมดทำในห้องมืด

2. การแยกเปปไทด์ผลิตผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

นำสารละลายทั้งหมดที่ผ่านการฉายแสงและสารละลายที่ใช้ในการเปรียบเทียบมาระเหยตัวทำละลายจนแห้ง ด้วยเครื่อง SpeedVac แล้วนำไปละลายใน loading buffer (24 μ l) ที่ประกอบด้วย SDS (7 % w/v), glycerol (4% w/v), Tris (50 mM, pH 6.8), mercaptoethanol (2 % v/v), และ Bromophenol blue (0.01 % w/v) จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยวิธี SDS-PAGE²⁴ โดยใช้ 12% polyacrylamide gel สำหรับ lysozyme และใช้ 8% polyacrylamide gel สำหรับ BSA ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 60 โวลต์ สำหรับ stacking gel และ 110 โวลต์ สำหรับ separating gel ภายหลังการแยก โปรตีนถูกนำไป stain ด้วย staining solution (0.2% (w/v) Coomassie blue R-250 ใน 25% isopropanol, 10% acetic acid) และทำการ destain โดยใช้ 10% Acetic acid

จากนั้นจึงทำการหาปริมาณของเปปไทด์ที่ได้จากการตัด (% yield) เทียบกับปริมาณโปรตีนเริ่มต้น โดยนำ gel ที่ได้มา scan แล้วตรวจวัดปริมาณของแต่ละ band โดยใช้โปรแกรม NIH image

3. การ transfer เปปไทด์ที่ได้จากการตัดและการหาลำดับกรดอะมิโน

การ transfer เปปไทด์ที่ได้จากการตัดทำโดยการ transfer เปปไทด์บน gel ไปยัง PVDF membrane โดยวิธี blotting โดยใช้ semi-dry system เริ่มต้นจากการนำ gel ที่ได้ผ่านกระแสไฟฟ้าเพื่อทำการแยกเปปไทด์แล้ว (โดยไม่ต้องย้อม gel) มาแช่ใน CAPS buffer, pH 10.5 เป็นเวลา 10-15 นาที นำ PVDF membrane ไปแช่ใน 100% methanol เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้วจึงนำไปแช่ใน CAPS buffer, pH 10.5 เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นจึงนำ gel และ PVDF membrane ประกบเข้าด้วยกันใน semi-dry system (BIORAD) และต่อกับ power supply โดยได้ทำการปรับกระแสไฟฟ้าและเวลาที่ใช้ในการ transfer เพื่อให้การ transfer เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งได้ทำการทดลองใช้เวลา 0.5-1.5 ชั่วโมง

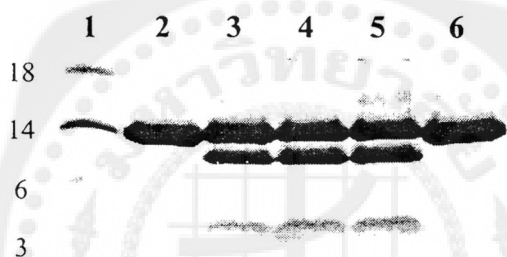
นำ PVDF membrane ที่ได้ทำการ transfer โปรตีนแล้วมา stain ใน Coomassie blue R-250 (0.1%) ที่ละลายใน methanol (45%) / acetic acid (10%) เป็นเวลาประมาณ 2 นาที (หรือจนเห็น band) แล้วจึงนำ PVDF membrane ไป destain โดยใช้ methanol (45%) / acetic acid (10%) ประมาณ 5 นาที แล้วจึงล้าง PVDF membrane ด้วยน้ำกลั่น ทำการตัด band ของเปปไทด์ที่ได้บน PVDF membrane เพื่อทำการหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป

ผลการทดลอง



1. การตัดโปรตีนด้วยแสงและการแยกเปปไทด์ผลิตผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

เมื่อทำการฉายแสงไปยังสารละลายผสมของ PMA-L-Phe (15 μ M) โปรตีน (BSA หรือ lysozyme) (15 μ M) และ CoHA (1 mM) โดยมีการ vary เวลาในการฉายแสง และหลังจากนำมาแยกโดยใช้เทคนิคทางอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) พบว่า lysozyme ถูกตัดโดยให้เปปไทด์ผลิตผล 2 bands ซึ่งมี molecular weight ประมาณ 11 และ 3 kDa (รูปที่ 1) ซึ่งการตัด lysozyme มีเปอร์เซ็นต์ของเปปไทด์ที่ได้จากการตัดสูงสุดถึง 57% เมื่อทำการฉายแสงนานเพียง 10 นาที (ในกรณีที่ใช้ Py-L-Phe มีเปอร์เซ็นต์ของเปปไทด์ที่ได้จากการตัด lysozyme สูงสุดเพียง 35%)¹⁹ ในขณะที่ BSA ถูกตัดเช่นกัน แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่ามาก (<5% yield, 60 นาที) การตัดโปรตีนจะไม่เกิดขึ้นถ้าขาดแสงหรือสารตัวใดตัวหนึ่ง



รูปที่ 1 SDS-PAGE แสดงการตัด lysozyme; Lane 1: M.W. markers; Lane 2-5: lysozyme (15 μ M) + PMA-L-Phe (15 μ M) + CoHA (1 mM) ฉายแสงเป็นเวลา 0, 5, 10 และ 20 นาที ตามลำดับ; Lane 6: lysozyme (15 μ M) + PMA-L-Phe (15 μ M) ฉายแสงเป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ความยาวคลื่น 342 nm ในการฉายแสงตลอดการทดลอง

2. การ transfer เปปไทด์ที่ได้จากการตัดและการหาลำดับกรดอะมิโน

การ transfer เปปไทด์ที่ได้จากการตัดทำโดยการ transfer เปปไทด์บน gel ไปยัง PVDF membrane โดยวิธี blotting โดยใช้ semi-dry system ได้มีการ vary เวลาและกระแสไฟฟ้า เพื่อให้การ transfer เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งจากการทดลองหลายๆ ครั้ง จึงได้ condition ที่เหมาะสมคือ การใช้กระแสไฟฟ้า 5 โวลต์ และเวลา 1.5 ชั่วโมง หลังจากนั้น จึงทำการตัด band ของเปปไทด์บน PVDF membrane เพื่อทำการหาลำดับกรดอะมิโน

จากการ N-terminal sequencing ของเปปไทด์ที่ได้จากการตัดทั้ง 2 เปปไทด์ คือ เปปไทด์ที่มี MW 11 kDa และเปปไทด์ที่มี MW 3 kDa พบว่า เปปไทด์ที่มี 11 kDa จะมี sequence ทางปลายด้าน N เป็น KVFGK ส่วนเปปไทด์ที่มี 3 kDa จะมี sequence ทางปลายด้าน N เป็น

VAWRN ดังนั้น เมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ lysozyme พบว่า lysozyme ถูกตัดตรงตำแหน่งระหว่าง Trp-108 และ Val-109 ดังแสดงใน Chart 3

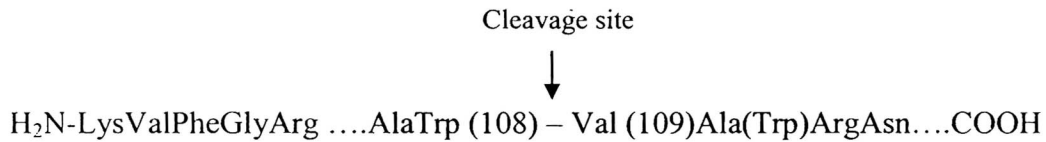


Chart 3 แสดง cleavage pattern ของ lysozyme โดยที่ (Trp) ตรงตำแหน่ง Trp-112 มีโครงสร้างที่ถูกเปลี่ยนแปลง (modified) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในระหว่างการศึกษาเคมีแสง (ด้วยความอนุเคราะห์จาก Professor Challa V. Kumar, Department of Chemistry, University of Connecticut, USA)

หมายเหตุ

ในการแยกโปรตีนได้มีการทดลองหลายวิธี คือ การใช้ HPLC การใช้ Column chromatography โดยใช้ Bio-Gel และ Sephadex ในการแยก แต่การแยกไม่ดีนัก และปริมาณสารที่แยกได้น้อยมากและไม่บริสุทธิ์ ในการ transfer โปรตีนก็มีปัญหาดูด้วยเช่นกัน เนื่องจาก band ของเปปไทด์ที่ได้จากการตัดมี M.W. น้อยคือ 3kDa ในการทดลองโดยวิธี blotting แรกๆ พบว่ามีการ diffuse ของ band และปริมาณที่ได้จากการ transfer มีน้อยมาก ซึ่งได้เคยส่งสารตัวอย่างไปหาลำดับกรดอะมิโนแล้ว แต่ไม่สามารถอ่านค่าออกมาได้ เนื่องจากปริมาณมีไม่เพียงพอ จึงได้มีการปรับ condition หลายอย่าง



สรุปและอภิปราย ผลการทดลอง

จากการศึกษาการตัดโปรตีนโดยใช้ PMA-L-Phe (มีหมู่ NH_2 อยู่ที่ปลายของโมเลกุล) เป็น probe โดยมีหมู่ไพรินเป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่รับแสง ($\lambda_{\text{max}} = 342 \text{ nm}$ ในช่วงความยาวคลื่น 300-400 nm) พบว่า lysozyme ถูกตัดด้วยประสิทธิภาพสูงสุดถึง 57% (ตารางที่ 1) เมื่อทำการฉายแสงที่ความยาวคลื่น 342 nm ไปยังสารละลายผสมของ PMA-L-Phe (15 μM) + lysozyme (15 μM) + CoHA (1 mM) โดยที่การตัดโปรตีนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าขาดสารตัวใดตัวหนึ่งหรือขาดแสง ในขณะเดียวกัน การตัด BSA โดยใช้ PMA-L-Phe จะมีประสิทธิภาพในการตัดน้อยมาก (<5%) ซึ่งเมื่อเทียบกับการใช้ Py-L-Phe เป็น probe (ซึ่ง Py-L-Phe มีหมู่ COOH อยู่ที่ปลายของโมเลกุล) พบว่าการตัด lysozyme และ BSA จะมีประสิทธิภาพในการตัดต่างกัน (35% และ 21% ตามลำดับ) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของหมู่ฟังก์ชันที่ปลายของโมเลกุลของ probe ในการจับและตัดโปรตีน ซึ่งเป็นการยืนยันการศึกษาทางสเปกโตรสโกปี²⁵⁻²⁶ ที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างที่เกิดขึ้นของสเปกตรัม (UV, FL และ CD) และค่าคงที่การจับ (binding constant) เมื่อใช้ PMA-L-Phe และ Py-L-Phe ในการศึกษาการจับกับโปรตีน

แต่อย่างไรก็ตาม การยืนยันที่จะบ่งบอกถึงความแตกต่างในการตัดโปรตีนได้ดีที่สุดคือการหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้จากการตัด จากการหาลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ที่ถูกตัดจากปลายด้าน N (N-terminal sequencing) พบว่าการตัด lysozyme เกิดขึ้นระหว่าง Trp-108 และ Val-109 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับที่ได้จากปฏิกิริยาของ Py-L-Phe แต่ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนจากปฏิกิริยาของ PMA-L-Phe จะสูงกว่าจากปฏิกิริยาของ Py-L-Phe มาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า การจับของ PMA-L-Phe บน lysozyme จะมี binding site อยู่ในบริเวณที่ CoHA จะสามารถเข้าถึงได้ดีกว่า (greater accessibility) จึงจำเป็นต้องศึกษากลไกของปฏิกิริยาต่อไปเพื่อให้เข้าใจถึงการจับและตัดโปรตีนของโมเลกุลเหล่านี้ โดยจะได้มีการทำ fluorescence quenching ของ PMA-L-Phe ในขณะที่จับกับ lysozyme โดยใช้ CoHA เป็น quencher และเนื่องจากการตัด BSA มีประสิทธิภาพต่ำ จึงไม่ได้ทำการแยกเปปไทด์ที่ได้ออกมาหาลำดับกรดอะมิโน

สิ่งที่จะต้องทำการศึกษาต่อไปคือ การศึกษาถึงโครงสร้างของโปรตีนบริเวณที่ถูกตัดโดยการสร้างโครงสร้างสามมิติของอนุพันธ์ของไพริน และบริเวณ binding site ของโปรตีนที่สนใจ โดยใช้ molecular modeling แล้วทำการปรับโครงสร้าง (optimize) ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัม โดยการศึกษาด้วยเทคนิคทาง Molecular modeling จะใช้ระเบียบวิธีการ Dock โมเลกุลที่สนใจเข้าไปในโครงสร้างสามมิติของโปรตีน โมเลกุลที่จะใช้ในการ Dock ในการวิจัยนี้เป็นอนุพันธ์ของไพรินที่สังเคราะห์ขึ้น ด้วยระเบียบวิธีดังกล่าวทำให้ทราบได้ว่าอนุพันธ์ของไพรินจะเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนใดบ้างบนโปรตีนในบริเวณ binding site ซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงลักษณะการจับที่ก่อให้เกิดการตัดของโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ แล้วนำผลที่ได้มาพิจารณาถึงปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ของไพรินกับโปรตีน โดยผลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการออกแบบอนุพันธ์ของไพรินที่หลากหลายและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากยิ่งขึ้น เพื่อนำไปสู่การศึกษา

โครงสร้างของโปรตีนหรือโมเลกุลชนิดอื่นต่อไป และเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการจับกับโปรตีนได้ดียิ่งขึ้น

ตารางที่ 1 แสดง % yield ของโปรตีนที่ได้จากการตัด

Probe	Protein	Time of irradiation (min)	%Yield
Py-L-Phe	BSA	20	21
	Lysozyme	10	35
PMA-L-Phe	BSA	20	<5
	Lysozyme	10	57



เอกสารอ้างอิง

1. Zhu, L., Qin, L., Parac, T. N., Kostic, N. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5218
2. Hegg, E. L., Burstyn, J. N. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *173*, 133
3. Rana, T. M., Meares, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2457
4. Ghaim, J. B., Greiner, D. P., Meares, C. F., Gennis, R. B. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11311
5. Ettner, N., Metzger, J. W., Lederer, T., Hulmes, J. D., Kisker, C., Hinrichs, W., Ellestad, G., Hillen, W. *Biochemistry* **1995**, *34*, 22
6. Schepartz, A., Cuenoud, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3247
7. Cuenoud, B., Tarasow, T. M., Schepartz, A. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 895
8. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Cho, A., Chaudhari, A. *Chem. Comm.* **2000**, 597
9. Buranaprapuk, A., Leach, S. P., Kumar, C. V., Bocarsly, J. *Biochemica et Biophysica Acta.* **1998**, *1387*, 309
10. Ermacora, M. R., Ledman, D. W., Hellinga, H. W., Hsu, G. W., Fox, R. O. *Biochemistry* **1994**, *33*, 13625
11. Maruta, S., Mitsuhashi, S., Yamada, M., Ikeke, M. *J. Biochem. (Tokyo)* **1998**, *128*, 557
12. Correia, J. J., Lipscomb, L. D., Dabrowiak, J. C., Isern, N., Zubieta, J. *Arch. Biochem. and Biophys.* **1994**, *309*, 94
13. Crans, D. C., Sudhakar, K., Zamborelli, T. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6812
14. Cremo, C. R., Loo, J. A., Edmonds, C. G., Hatlelid, K. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 491
15. Shrivastana, H. Y., Kanthimathi, M., Nair, B. U. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *265*, 311
16. Kumar, C. V., Tolosa, L. M. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 13914
17. Kumar, C. V., Tolosa, L. M. *FASEB J.* **1993**, *7*, A1131
18. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A.¹ *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2085
19. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Opiteck, G. J., Moyer, M. B., Jockusch, S., Turro, N. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10361
20. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4202
21. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Sze, H. C. *Chem. Comm.* **2001**, *3*, 297
22. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Sze, H. C., Jockusch, S., Turro, N. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002** *99*(9), 5810

¹ Buranaprapuk, A. เป็นนามสกุลเดิมของ ดร. อภิญา ชัยวิสุทธิฐานกูร

23. Buranaprapuk, A., Kumar, C. V. *Tetrahedron*. **2000**, 7019
24. Schagger, H.; von Jagow, G. *Anal. Biochem.* **1987**, 166, 368.
25. อภิญาชัยวิสุทธิทางกูร รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2545
26. Buranaprapuk, A., Kumar, C. V., Svasti, J., Chaivisuthangkura, P. *Biorg. Med. Lett.* **2004** (in preparation)

