

บทที่ 4

บทวิจารณ์

1. ผลของสารจับโลหะ (metal chelators) ต่อออกซิเดส แอคติวิตี

ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการจับกับโลหะทั้งทองแดงและตะกั่ว จำเป็นต้องเริ่มต้นศึกษากับอะโปรเชอูโรโพลลาสตินซึ่งไม่มีจำหน่าย โครงการนี้จึงจำเป็นต้องเตรียมอะโปรเชอูโรโพลลาสตินจากไฮโดรเชอูโรโพลลาสตินโดยใช้สารจับโลหะดึงทองแดงออกจากโมเลกุลของไฮโดรเชอูโรโพลลาสติน จากรายงานของรอสวันด์ (1996) และผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับออกซิเดส แอคติวิตีของเชอูโรโพลลาสตินพบว่าทองแดงมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับออกซิเดส แอคติวิตีของเชอูโรโพลลาสติน ดังนั้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างทองแดงกับออกซิเดส แอคติวิตี จึงได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงของออกซิเดส แอคติวิตีในการทดลองนี้ด้วย การทดลองนี้ได้เลือกใช้สารจับโลหะจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ penicillamine, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS), $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sodium diethyldithiocarbamate (DTC) โดยมีสูตรโครงสร้างที่จับกับโลหะ ดังแสดงในรูปที่ 5

1.1 ผลของสารจับโลหะต่อออกซิเดส แอคติวิตีของเชอูโรโพลลาสติน

ในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อเลือกสารจับโลหะที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ได้ติดตามผลการดึงทองแดงจากโมเลกุลของเชอูโรโพลลาสตินด้วยออกซิเดส แอคติวิตีเพียงอย่างเดียว พบว่า เมื่อใช้เชอูโรโพลลาสตินที่ความเข้มข้นคงที่ และแปรค่าความเข้มข้นของสารจับโลหะทุกตัว พบว่าสารจับโลหะทุกตัวสามารถลดออกซิเดส แอคติวิตีของเชอูโรโพลลาสตินแต่ด้วยปริมาณที่แตกต่างกัน

ผลงานวิจัยนี้แสดงว่า DMPS หรือ DTC เพียง 1 mg/ml หรือ (4.43 μM หรือ 4.76 μM) (รูปที่ 6ข และ 6ง) เพียงพอที่จะลดออกซิเดส แอคติวิตีของเชอูโรโพลลาสตินได้ทั้งหมด ในขณะที่ penicillamine ต้องใช้ความเข้มข้นถึง 3.5 mg/ml หรือ (24.6 μM) (รูปที่ 6ก) และ $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (รูปที่ 6ค) ไม่สามารถลด ออกซิเดส แอคติวิตีได้สมบูรณ์เลย ผลนี้วิเคราะห์ได้ว่าสารทั้งสี่สามารถดึงทองแดงที่เกี่ยวข้องกับออกซิเดส แอคติวิตีออกได้ แต่ไม่อาจจะระบุได้ว่าเป็นทองแดงใน domain โด หรือใน trinuclear center หรือใน labile site ของเชอูโรโพลลาสตินได้

ความแตกต่างของประสิทธิภาพในการทำงานของสารจับโลหะทั้งสี่อาจขึ้นกับ reactivity ของ active group ที่แตกต่างกัน DMPS และ DTC ใช้ sulfur ในการจับกับทองแดงทั้ง 2 แขน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเป็นรูป tetragonal ที่มีอัตราส่วนของ DMPS หรือ DTC ต่อทองแดง เป็น 2:1 (รูปที่ 5.3 และ 5.4) ส่วน penicillamine ใช้พันธะของ sulfur และ amine แต่จับกับทองแดงในอัตราส่วน 2:1 เช่นกัน (รูปที่ 5.2) ส่วน $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ จะใช้หมู่ amine และ carboxylic acid จับกับทองแดงเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเป็นรูป hexagonal (รูปที่ 5.1)

อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้เป็นการวิเคราะห์เบื้องต้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าสารจับโลหะทั้งสี่สามารถดึงทองแดงทั้งหมดออกจากโมเลกุลของเซอร์กูโลพลาสมินหรือไม่

1.2 ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของเซอร์กูโลพลาสมิน

เมื่อนำไฮโดรเซอร์กูโลพลาสมินที่ทำปฏิกิริยากับสารจับโลหะแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับไฮโดรเซอร์กูโลพลาสมินในอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพที่ pH 8.8 (รูปที่ 7) ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจน จึงทดลองใช้ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งคาดว่าจะป็นระบบที่วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของประจุได้แม่นยำกว่าอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ ในไอโซอิเล็กทริกโฟกัสที่ pH 4-6 ซึ่งเป็นช่วงที่ครอบคลุมค่า pI ของเซอร์กูโลพลาสมินซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 4.4 โดยทำการวิเคราะห์และตรวจวัดออกซิเดสแอกติวิตีในเจลเพื่อหาตำแหน่งของเซอร์กูโลพลาสมินด้วย ดังรูปที่ 8 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนของเซอร์กูโลพลาสมินเมื่อบ่มกับสารจับโลหะชนิดใดชนิดหนึ่ง การที่อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพและไอโซอิเล็กทริกโฟกัสไม่สามารถตรวจวัดความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของเซอร์กูโลพลาสมินอันเนื่องมาจากสารจับโลหะได้ ทั้งนี้เนื่องจากทองแดงฝังตัวอยู่ใน domain ภายในโมเลกุลของเซอร์กูโลพลาสมิน อิเล็กโทรโฟรีซิสทั้ง 2 ชนิดข้างต้นตรวจประจุบนพื้นผิวโมเลกุล จึงไม่สามารถติดตามความแตกต่างนี้ได้ แนวคิดนี้สอดคล้องกับผล X-ray crystallography ของคณะ Zaitseva และ Lindley (Zaitseva *et al.*, 1996; Lindley *et al.*, 1997) ซึ่งกล่าวว่าทองแดงไม่ได้จับอยู่ที่ผิวหน้าของโมเลกุล แต่ยังคงฝังตัวอยู่ใน domain ทั้ง 6 ของเซอร์กูโลพลาสมิน เพื่อยืนยันข้อคิดเห็นข้างต้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยยูเรียพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งอาศัยคุณสมบัติที่ยูเรียไปทำลายพันธะไฮโดรเจนในโมเลกุลของเซอร์กูโลพลาสมิน ทำให้โมเลกุลของเซอร์กูโลพลาสมินเดิมที่มีรูปร่างเป็นก้อนกลม (globular shape) ให้กลายเป็นสายยาว (rod shape) โดยคาดว่าหากมีทองแดงในโมเลกุล ทองแดงจะสามารถทำให้เซอร์กูโลพลาสมินคงรูปไว้ได้บางส่วน โดยเฉพาะส่วนที่มีปฏิสัมพันธ์กับทองแดง แต่หากไม่มีทองแดงยูเรียจะคลายสายพอลิเพปไทด์ได้อย่างสมบูรณ์ การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจะช้ากว่าในสภาพแรก ผลการทดลองนี้ พบว่า 6 M ยูเรียสามารถทำให้เซอร์กูโลพลาสมินที่ทำปฏิกิริยากับสาร

จับโลหะจึงเข้าหาตัวบวกได้ช้ากว่าเซอร์คูโลพลาสตินที่ยังมีทองแดงจับอยู่ โดยทำการทดลองเทียบ กับอะโปทรานสเฟอร์รินและโฮโลทรานสเฟอร์รินซึ่งเป็น metalloprotein เหมือนกัน ผลการทดลอง นี้จึงเป็นการยืนยันว่ามีการดึงทองแดงออกจากโมเลกุลของเซอร์คูโลพลาสตินได้จริง

เพื่อจะติดตามปริมาณทองแดง จึงเลือกสารจับโลหะ 2 ชนิดในการวัดปริมาณทองแดงที่ เหลืออยู่ในโมเลกุล โดยใช้ graphite furnace atomic absorption พบว่าเมื่อแปรความเข้มข้น ของสารจับโลหะ DTC สามารถดึงทองแดงออกจากโมเลกุลได้ดีกว่า DMPS เล็กน้อย โดย DMPS เอาทองแดงออกได้ 30% และ DTC ดึงได้ 25% ของปริมาณทองแดงทั้งหมด แต่ถึงแม้การดึงเอา ทองแดงออกจะยังไม่สมบูรณ์แต่ออกซิเดส แอคติวิตีจะลดลงหมดแล้ว แต่ไม่อาจจะระบุว่าเป็น ทองแดงใน domain ใดหรือใน trinuclear center หรือใน labile site

ถึงแม้สารจับโลหะทั้ง 4 ชนิดจะไม่สามารถใช้ในการเตรียมอะโปเซอร์คูโลพลาสตินขึ้นใช้ สำหรับการศึกษากลไกการขนส่งต่อไปได้ ความสัมพันธ์นี้มีประโยชน์ในการวิเคราะห์โครงสร้าง ของโมเลกุลของเซอร์คูโลพลาสตินต่อไป

2. การเติมทองแดงกลับสู่โมเลกุลของเซอร์คูโลพลาสติน (reconstitution)

จากผลการทดลองตามตารางที่ 8 พบว่าทองแดงสามารถกลับเข้าสู่โมเลกุลของเซอร์คูโลพลาสตินได้เต็มเท่าเดิม และมีค่าออกซิเดส แอคติวิตีกลับคืนมาประมาณ 80% ผลนี้สอดคล้อง กับงานของ Morell และคณะ (Morell et al., 1957)

จากงานวิจัยของผู้อื่น พบว่ามีวิธีการเตรียมอะโปเซอร์คูโลพลาสตินที่มีปริมาณต่ำมาก ๆ อยู่ 2 วิธีคือ

1. ในปี 1957 Morell และคณะใช้การรีดิวส์ $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$ ด้วย ascorbic acid และจับทองแดงที่เกิดขึ้นออกไปด้วยสารจับโลหะ วิธีนี้จะได้อะโปเซอร์คูโลพลาสตินที่มีปริมาณทองแดง เหลืออยู่ 2% ของปริมาณทั้งหมด

2. ในปี 1996 Musci และคณะเตรียมอะโปเซอร์คูโลพลาสตินที่มีปริมาณทองแดงเหลือ ต่ำกว่าวิธีแรก โดยใช้ ascorbic acid ร่วมกับไซยาไนด์ไอออนภายใต้สภาวะแอนแอโรบิก

งานวิจัยนี้ เลือกใช้วิธีที่ปรับปรุงจากวิธีแรกเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีอันตรายไซยาไนด์ เพียงแต่แยกผลิตภัณฑ์อะโปเซอร์คูโลพลาสตินโดยการไดอะลิซิสแทนการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ชนิดแลกเปลี่ยนไอออน โดยวิธีดังกล่าวจะได้อะโปเซอร์คูโลพลาสตินที่มีปริมาณทองแดงเหลืออยู่ 2% เพื่อใช้ศึกษากลไกการขนส่งทองแดงและการจับทองแดงและตะกั่วต่อไป

3. จลนพลศาสตร์ของการจับของทองแดงหรือตะกั่วกับอะโปเซอรูโลพลาสติน

จากอะโปเซอรูโลพลาสตินที่มีปริมาณทองแดงเหลือเพียง 2% นั้นได้นำไปศึกษาจลนพลศาสตร์ของการจับกับทองแดงและตะกั่ว (รูปที่ 11-24) วิเคราะห์หาค่าคงที่ของการแตกตัว (K_d) และจำนวนตำแหน่งบนเซอรูโลพลาสตินสูงสุดที่จับกับโลหะแต่ละชนิดได้ (n) จากกราฟ 3 ประเภทคือ

1. Metal-saturation curve
2. Double-reciprocal plot
3. Scatchard plot

ซึ่งมีรูปแบบสมการและลักษณะกราฟสัมพันธ์กันคือ

หากจลนพลศาสตร์ของการจับกับโลหะไม่ได้เป็นแบบอัลโลสเทอริกแต่เป็นแบบ simple kinetics

กราฟรูปแรกจะได้เป็นไฮเพอร์โบล่า ตามสมการ

$$v = \frac{nk[A]}{1 + k[A]}$$

เมื่อ v = ปริมาณโลหะที่จับกับเซอรูโลพลาสติน

n = จำนวนตำแหน่งของเซอรูโลพลาสตินสูงสุดที่จับกับโลหะ

$[A]$ = ปริมาณโลหะอิสระที่แปรในการทดลอง

และ k = ค่าคงที่ของการรวมตัว = $1/K_d$

เมื่อ K_d = ค่าคงที่ของการแตกตัว

เนื่องจากสมการนี้ได้กราฟรูปไฮเพอร์โบล่าซึ่งอ่านค่า K_d และ n ได้ไม่แม่นยำ สมการรูปแรกจึงถูกเปลี่ยนไปเป็นสมการเส้นตรงโดย double reciprocal plot

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk[A]}$$

กราฟที่ได้จะให้ค่า K_d และ n ที่แม่นยำขึ้น

หากผลการทดลองให้รูปกราฟแบบ metal-saturation curve เป็นไฮเพอร์โบล่าและรูปกราฟใน double reciprocal plot เป็นเส้นตรง แสดงว่าการจับของทองแดงกับเฮอริโกลฟลาสมีนเป็นแบบ non-cooperative binding

ในการวิเคราะห์ค่า K_d และ n ของ การจับระหว่างโลหะกับโปรตีนนิยมใช้ Scatchard plot ซึ่งมีสมการรูป

$$V = n - K_d \frac{V}{[A]}$$

ในงานวิจัยนี้พบว่า จลนพลศาสตร์ของการจับทองแดงเข้ากับอะโปเฮอริโกลฟลาสมีนเป็นแบบ non-cooperativity เพราะ metal-saturation curve เป็นแบบไฮเพอร์โบล่า (รูปที่ 12) และ double reciprocal plot ให้สมการเส้นตรง (รูปที่ 13) ค่า K_d และ n จากการวิเคราะห์ทั้ง 3 แบบได้ค่าใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 9 แต่ Scatchard plot ไม่สามารถให้ค่าจลนพลศาสตร์ที่แม่นยำได้เพียงแต่แสดงให้เห็นว่าเฮอริโกลฟลาสมีนอาจมีตำแหน่งที่จับกับทองแดงได้ด้วยคุณสมบัติการจับที่ต่างกันมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง ผลนี้สอดคล้องกับงานของ Lindley และคณะ ในปี 1997 ที่แสดงว่า เฮอริโกลฟลาสมีนมีตำแหน่งที่จับกับทองแดงได้ถึงสี่ชนิด คือ ชนิดที่ 1, 2, 3 (ตารางที่ 2) และ labile site

ค่าคงที่จลนพลศาสตร์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Mckee และ Frieden (Mckee and Frieden, 1971) ซึ่งใช้วิธีไดแอลลิซิสในการเติมโลหะเข้าในโมเลกุลของอะโปเฮอริโกลฟลาสมีน พบว่าค่า K_d ในการเติมทองแดงกลับเข้าโมเลกุลของอะโปเฮอริโกลฟลาสมีนเท่ากับ 5 μM และจำนวนทองแดงที่เข้าจับกับอะโปเฮอริโกลฟลาสมีนเท่ากับ 9 อะตอมต่อโมเลกุล และในงานวิจัยของ Lindley และคณะ (Lindley *et al.*, 1997) ใช้วิธี EPR และ X-ray Fluorescence พบว่าจำนวนทองแดงที่เข้าจับกับอะโปเฮอริโกลฟลาสมีนเท่ากับ 7 อะตอมต่อโมเลกุล แต่ไม่ได้วิเคราะห์ค่า K_d และงานวิจัยของ Ehrenwald และ Fox (Ehrenwald and Fox, 1994) พบว่าจำนวนทองแดงที่เข้าจับกับอะโปเฮอริโกลฟลาสมีนเท่ากับ 6.6 อะตอมต่อโมเลกุล

ผลจากงานวิจัยนี้พบว่าการจับระหว่างตะกั่วกับอะโปเฮอริโกลฟลาสมีนมีรูปร่างของ metal-saturation curve เป็นแบบ Sigmoidal ไม่ใช่ไฮเพอร์โบล่า (รูปที่ 16) กราฟในรูป double reciprocal plot และ Scatchard plot ไม่สามารถเขียนเป็นเส้นตรงได้ (รูปที่ 17 และรูปที่ 18) แสดงว่าการจับระหว่างตะกั่วกับอะโปเฮอริโกลฟลาสมีนควรเป็นแบบ cooperativity และเป็น positive cooperativity ด้วย ลักษณะเช่นนี้ทำให้ไม่สามารถหาค่า K_d และค่า n ด้วยสมการรูป

Scatchard ซึ่งใช้อธิบายได้เฉพาะ non-cooperativity เท่านั้น การวิเคราะห์ค่าคงที่จลนพลศาสตร์ของตะกั่วต่อเฮมูโกลบินจึงต้องทำด้วยสมการของ Hill ซึ่งมีรูปสมการเป็น

$$\log \frac{V}{(n - V)} = \log k_n + n_H \log [A]$$

เมื่อ n_H คือ maximum Hill coefficient

และ k_n คือ ค่าคงที่ของการแตกตัว

อาจวิเคราะห์การจับของตะกั่วต่ออะโปเฮมูโกลบินได้ว่า n_H หรือ maximum Hill coefficient มีค่า 3.42 ซึ่งมากกว่า 1 แสดงว่าการจับเป็นแบบ positive cooperativity และค่า dissociation constant เป็น 3.45 μM และค่า n หรือปริมาณตำแหน่งจับกับตะกั่วสูงสุดคือ 4.60 อะตอมต่อโมเลกุลตามลำดับ

การวิเคราะห์ผลต่อไปนี้จะจำแนกเป็น 2 ประเด็นหลักตามลำดับคือ

การจับของตะกั่วต่ออะโปเฮมูโกลบินเป็นแบบ cooperativity และค่าคงที่จลนพลศาสตร์ dissociation constant และ n

3.1 การจับของตะกั่วกับอะโปเฮมูโกลบินและไฮโดรเฮมูโกลบิน

ผลการวิเคราะห์การจับของตะกั่วต่ออะโปเฮมูโกลบิน ได้ว่า n_H หรือ maximum Hill coefficient มีค่า 3.42 ซึ่งมีค่ามากกว่า 1 แสดงว่าการจับเป็นแบบ positive cooperativity

ในระดับโมเลกุลได้มีผู้เสนอโมเดลเพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงของ allosteric protein ไว้ 2 โมเดล

1. Concerted symmetry model (หรือ Two-state model หรือ All or none model หรือ MWC model) โดย Monod, Wyman, และ Changeux ซึ่งมีคำอธิบายดังนี้

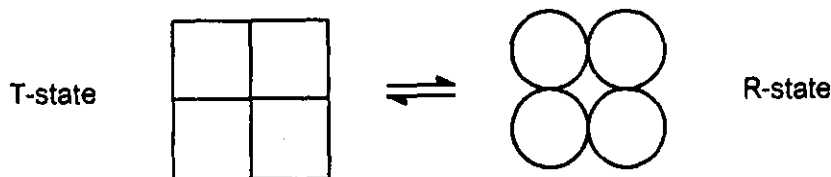
1.1 อัลโลสเตอริกโปรตีน (allosteric protein) จะเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) คือประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วยย่อย

1.2 แต่ละหน่วยย่อย จะมี allosteric site อยู่แยกกันต่างหาก

1.3 ลักษณะของโครงรูปแต่ละหน่วยย่อยจะสัมพันธ์กันโดยการเชื่อมต่อกับหน่วยย่อยอื่นๆ

1.4 โปรตีนที่ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อยนี้จะมีโครงรูปอยู่ 2 แบบที่แตกต่างกัน แบบหนึ่งเรียกว่า T-conformational state (หรือ Tight-state) ซึ่งมีความชอบต่อลิแกนด์ต่ำหรือแทบจะไม่มีเลย อีกแบบหนึ่งเรียกว่า R-conformational state (หรือ Relax state) ซึ่งมีความชอบต่อลิแกนด์สูง ในขณะที่ไม่มีลิแกนด์อยู่โปรตีนจะอยู่ทั้ง 2 รูปในสภาพที่สมดุลกัน ถ้าโปรตีนนั้น

ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยโดยใช้รูปสี่เหลี่ยมแทน T-state และรูปวงกลมแทน R-state จะเขียนได้ดังนี้



โดย L คือค่าคงที่ที่สมดุลสำหรับการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของโปรตีนที่มีหลายหน่วยย่อย ในขณะที่ไม่มีลิแกนด์อยู่ด้วยซึ่งมีค่าเท่ากับ $[T_0]/[R_0]$ ในแบบจำลองนี้ถือว่าในขณะนี้ถือว่าในขณะไม่มีลิแกนด์โปรตีนส่วนใหญ่ในรูป T_0 state นั่นคือ L มีค่าสูง

1.5 ทุกๆหน่วยย่อยของโปรตีนดังกล่าวจะต้องมีโครงรูปเหมือนกัน เช่นในกรณีของโปรตีนที่ประกอบด้วยสี่หน่วยย่อย หน่วยย่อยทั้งสี่จะต้องอยู่ในสภาพ T state หรือ R state ทั้งหมดโดยไม่สามารถมีลูกผสมของ T และ R อยู่เลย ดังนั้นจึงเรียกแบบจำลองนี้ว่าเป็น concerted model คือถ้าหน่วยย่อยใดในสี่หน่วยย่อยนี้เปลี่ยนโครงรูปไปก็จะทำให้สามหน่วยย่อยที่เหลือเปลี่ยนโครงรูปตามไปพร้อมๆกัน

จากแบบจำลองนี้จะเกิด positive homotropic cooperativity ได้ ต่อเมื่อในขณะที่ไม่มีลิแกนด์ โปรตีนจะอยู่ในรูป T_0 state มากกว่าจะอยู่ในรูป R_0 state (นั่นคือ $L_0 = T_0/R_0$ จะต้องมีค่าสูง) และลิแกนด์จะจับกับโปรตีนที่อยู่ในรูป R_0 state เท่านั้น ดังนั้นเมื่อเริ่มเติมลิแกนด์จำนวนน้อยๆ ลงไป ลิแกนด์จะเข้าจับกับ R_0 state เท่านั้น ทำให้ R_0 กลายเป็น R , มีผลทำให้ความเข้มข้นของ R_0 ลดลง ดังนั้น T_0 จะต้องเปลี่ยนมาอยู่ในรูป R_0 เพื่อทำให้ค่า L ของระบบคงที่ การเพิ่ม $[R_0]$ จะเท่ากับเป็นการเพิ่มบริเวณจับกับลิแกนด์ได้อย่างดี ทำให้เมื่อเพิ่มลิแกนด์ขึ้นไปอีกก็จะมีปริมาณของบริเวณจับของลิแกนด์มากขึ้น ทำให้ลิแกนด์จับกับโปรตีนได้อย่างรวดเร็วมาก ผลก็จะทำให้ได้กราฟฟรูปร่างตัวเอส และถ้าเพิ่มลิแกนต์ให้มากขึ้นไปอีกจนกระทั่งบริเวณจับทุกบริเวณมีลิแกนด์จับอยู่หมดแล้ว (คือเกิดการอิ่มตัว) ก็จะทำให้จำนวนของลิแกนต์ที่เข้าจับกับโปรตีนไม่เพิ่มอีกต่อไปไม่ว่าจะเพิ่มลิแกนต์ให้สูงขึ้นไปอีกเท่าใดก็ตาม

2. Sequential model แบบจำลองนี้สอดคล้องกับสมมติฐาน "การเหนี่ยวนำให้เหมาะสม" (Induced fit hypothesis) ที่ว่าการเข้าจับของลิแกนด์กับโปรตีนจะเหนี่ยวนำให้โครงรูปของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปซึ่งมีผลทำให้ความชอบของบริเวณที่ว่างอยู่เปลี่ยนไปโดยอาจจะดีขึ้นหรือเลวลง

โดยการเปลี่ยนโครงรูปนี้จะเกิดขึ้นที่หน่วยย่อย ในกรณีที่เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสี่หน่วยย่อย จะเกิด positive homotropic cooperativity เกิดขึ้นได้โดยการเข้าจับลิแกนด์แรกกับบริเวณใด บริเวณหนึ่งในสี่บริเวณที่ว่างอยู่ด้วยการจับที่มีค่าคงที่ของการแตกตัว (dissociation constant) เท่ากับ K_d การเข้าจับของลิแกนด์ตัวแรกกับบริเวณจับบริเวณแรกนี้ จะทำให้โครงรูปของหน่วยย่อยแรกเปลี่ยนแปลงไปและจะส่งผลไปยังหน่วยย่อยข้างเคียงสามหน่วยย่อยที่เหลือทำให้สามารถจับกับลิแกนด์ได้แตกต่างไปจากเดิม โดยทำให้ค่าคงที่ของการแตกตัวของสามบริเวณที่ว่างอยู่ต่ำลงตามลำดับ

ในกรณีของเฮมโกลบิน การจับกับตะกั่วมีลักษณะเป็น positive cooperativity มีค่า n_H สูงถึง 3.42 เมื่อทดสอบกับอะโปเฮมโกลบิน และมีค่า 1.72 เมื่อทดสอบกับไฮโดรเฮมโกลบิน แสดงว่า ตะกั่วโมเลกุลแรกจะเหนี่ยวนำให้การจับขั้นตอนต่อไปเกิดได้ง่ายขึ้น ลักษณะทางโครงสร้างของเฮมโกลบินแม้จะต่างจาก allosteric protein ทั่วไป คือไม่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อย แต่ก็มีลักษณะของ domain ที่สามารถแสดงปฏิสัมพันธ์ต่อกันจนเกิดลักษณะ cooperativity ขึ้นได้ โดยอธิบายการเข้าจับของตะกั่วกับอะโปเฮมโกลบินและไฮโดรเฮมโกลบินด้วย 2 โมเดล คือ

1. อธิบายการเข้าจับของตะกั่วกับอะโปเฮมโกลบินและไฮโดรเฮมโกลบินด้วย Concerted symmetry model คาดว่าเฮมโกลบินเดิมอยู่ในรูปที่ไม่ชอบจับกับตะกั่ว T_0 มากกว่า R_0 เมื่อมีตะกั่วอะตอมแรกสามารถเข้าจับเฮมโกลบินซึ่งจะอยู่ในรูป R_0 ที่ site ใด site หนึ่ง ใน domain 2, 4, 6 หรือใน trinuclear center บริเวณ domain 1 และ 6 หรือ labile site ได้แล้ว มีผลทำให้เฮมโกลบิน T_0 เปลี่ยนเป็น R_0 มากขึ้น เมื่อเริ่มเติมตะกั่วจำนวนน้อยๆ ลงไป ตะกั่วจะเข้าจับเฮมโกลบินรูป R_0 state เท่านั้น ทำให้ R_0 กลายเป็น R_1 มีผลทำให้ความเข้มข้นของ R_0 ลดลง ดังนั้น T_0 เปลี่ยนเป็น R_0 มากขึ้นเพื่อทำให้ค่า L ของระบบคงที่ การเพิ่ม R_0 จะเท่ากับเพิ่มบริเวณจับกับตะกั่ว เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตะกั่วขึ้นไปอีก ก็จะทำให้ตะกั่วจับกับเฮมโกลบินอย่างรวดเร็วมาก จนกระทั่ง site ทุก site ที่ตะกั่วสามารถเข้าจับได้เต็มหมด (คือเกิดการอิ่มตัว) ก็จะทำให้ตะกั่วที่เหลือไม่สามารถเข้าจับได้เพิ่มขึ้นอีก ไม่ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของตะกั่วเท่าใดก็ตาม ดังนั้นกราฟ Saturation curve ระหว่างอะโปเฮมโกลบินหรือไฮโดรเฮมโกลบินกับตะกั่ว จึงเปลี่ยนรูปจากไฮเพอร์โบลาเป็นแบบ sigmoidal

2. อธิบายการเข้าจับของตะกั่วกับอะโปเฮมโกลบินและไฮโดรเฮมโกลบินด้วย Sequential model คาดว่าตะกั่วอะตอมแรกจะเข้าจับเฮมโกลบินที่ site ใด site หนึ่ง ใน domain 2, 4, 6 หรือใน trinuclear center หรือ labile site แล้ว จะเหนี่ยวนำให้ site ของเฮม-

โลหลาสมินที่ตะกั่วตัวแรกจับมีโครงสร้างเปลี่ยนไปส่งผลให้ site ที่รับตะกั่วอีก 3 อะตอมที่เหลือดีขึ้น โดยเกิดขึ้นที่ละ site ทำให้ค่าคงที่ของการแตกตัวของตะกั่วกับ 3 site ที่เหลือต่ำลงตามลำดับ

3.2 ค่าคงที่จลนพลศาสตร์ (K_d และ n)

เมื่อเปรียบเทียบค่า n ในตารางที่ 9 จะพบว่าปริมาณทองแดงที่จับกับอะโปเฟอร์ริโธโลหลาสมินมีค่า 7.25 อะตอมต่อโมเลกุล ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Lindley และคณะ (Lindley *et al.*, 1997) ซึ่งพบว่าปริมาณทองแดงที่จับกับอะโปเฟอร์ริโธโลหลาสมินมีค่า 7 อะตอมต่อโมเลกุล และ Ehrenwald และ Fox (Ehrenwald and Fox, 1994) ซึ่งพบว่าปริมาณทองแดงที่จับกับอะโปเฟอร์ริโธโลหลาสมินมีค่า 6.6 อะตอมต่อโมเลกุล ถึงแม้ Zaitseva และคณะ (Zaitseva *et al.*, 1996) จะสามารถสร้างโมเดลอธิบายการจับกับทองแดง 6 อะตอมไว้ได้ด้วย แต่ผลจาก X-ray crystallography ของ Lindley และคณะ (Lindley *et al.*, 1997) พบว่าเฟอร์ริโธโลหลาสมินยังมี 2 labile site ใกล้กับ domain 4 และ domain 6 นอกเหนือจาก prosthetic site ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุลบได้แก่ His₉₄₀, Glu₉₃₅ และ Asp₁₀₂₅ ใน domain 6 และ Asp₂₇₂ จาก domain 2 และอีก site อยู่ใกล้กับ domain 4 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุลบได้แก่ His₆₀₂, Glu₅₉₇ และ Asp₆₉₄ ใน domain 4

อย่างไรก็ตามในจำนวนตำแหน่งที่จับกับทองแดงได้ 7.25 อะตอมนี้ พบว่าจับกับตะกั่วได้เต็มที่เพียง 4.6 อะตอมเท่านั้นไม่ว่าจะเป็นอะโปเฟอร์ริโธโลหลาสมินหรือไฮโดรเฟอร์ริโธโลหลาสมินก็ตาม คาดว่าตะกั่วเข้าไปใกล้ที่ทองแดงได้แต่ไม่หมดทุก site ถึงแม้จะไล่ที่ทองแดงออกก่อนด้วย ascorbic acid และ DTC แล้วก็ตาม (ในผลการทดลองของอะโปเฟอร์ริโธโลหลาสมิน) ขนาดของตะกั่วที่ใหญ่กว่าทองแดงอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ป้องกันไม่ให้ตะกั่วเข้าสู่ metal-binding sites ในเฟอร์ริโธโลหลาสมิน

หากเปรียบเทียบค่าการแตกตัวระหว่างทองแดงกับตะกั่วพบว่าใกล้เคียงกันมาก (3.20 μM และ 3.45 μM ตามลำดับ) ซึ่งหมายความว่าตะกั่วไม่จำเป็นต้องไล่ที่ทองแดงในไฮโดรเฟอร์ริโธโลหลาสมินออกได้ แต่ลักษณะ cooperativity ทำให้ตะกั่วกลับสามารถไล่ทองแดงออกได้ โดยมีค่า K_d 0.54 μM และ 2.80 μM จะเห็นได้ว่าค่าแรกต่ำกว่า K_d ของทองแดงมาก และเป็นปัจจัยสำคัญที่ผลักดันให้ตะกั่วสามารถไล่ที่ทองแดงออกไปได้นั่นเอง

เมื่อทำการทดลองกับไฮโดรเฟอร์ริโธโลหลาสมิน ค่า K_{app} สูงขึ้นจาก 3.45 μM เป็น 6.95 μM ซึ่งแสดงว่า หากยังมีทองแดงอยู่ในโมเลกุลของเฟอร์ริโธโลหลาสมิน เราจำเป็นต้องใช้ตะกั่วความเข้มข้นมากขึ้นจึงจะไล่ที่ทองแดงได้ ลักษณะ cooperativity ซึ่งมีค่า K_d ต่ำมากที่สุดที่ 0.54 μM ก็ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ผลักดันให้ตะกั่วเข้าแทนที่ทองแดงในโมเลกุลของเฟอร์ริโธโลหลาสมินได้

ตารางที่ 10 ค่าคงที่จลนพลศาสตร์ของโลหะต่อเซอรูโลพลาสมิน

ระหว่าง	ค่าคงที่จลนพลศาสตร์						
	Apparent binding*		Strong binding		Weak binding		n_H
	K_d	n	K_d	n	K_d	n	
1. ทองแดงกับอะโปเซอรูโลพลาสมิน	3.20 μM	7.25	-	-	-	-	-
2. ตะกั่วกับอะโปเซอรูโลพลาสมิน	$K_{app} = 3.45 \mu\text{M}$	4.6	1.10 μM	2.54	2.67 μM	2.84	3.42
3. ตะกั่วกับไฮโดเซอรูโลพลาสมิน	$K_{app} = 6.95 \mu\text{M}$	4.6	0.54 μM	1.49	2.80 μM	1.79	1.72

* จาก metal-saturating curve

ค่าอื่นๆ มาจาก Hill plot

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย