

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัย (Project)
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2553

ส่วนที่ 1 สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)

1.1 รหัส ว-ท(ด)19.53 ชื่อโครงการ ศึกษาการจับตัวระหว่างเซลล์เจ้าบ้านกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินในสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อวัคซีนไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1

1.2 ลักษณะโครงการ ☒ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว

☐ เป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย (ระบุชื่อชุดโครงการวิจัย)

1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ นายจักร แสงมา

1.4 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ หน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีสารสนเทศ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

1.5 ประเภทโครงการ ☒ โครงการวิจัย 3 สาขา; ☐ เกษตรศาสตร์ ☒ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ☐ สังคมศาสตร์ฯ
☐ โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพ
☐ โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน
☐ โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย
☐ โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)
☐ โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขันฯ
☐ โครงการวิจัยพัฒนาร่วมภาครัฐและเอกชน

1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 1 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2553 ถึงปีงบประมาณ 2553

1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล หน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีสารสนเทศ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ 150,000 บาท ประกอบด้วย

ปีงบประมาณ 2553 ได้รับ 142,500 บาท ปีงบประมาณ ได้รับ บาท

ปีงบประมาณ ได้รับ บาท ปีงบประมาณ ได้รับ บาท

ปีงบประมาณ ได้รับ บาท ปีงบประมาณ ได้รับ บาท

1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากลไกการเข้าจับของไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์และดื้อต่อวัคซีนกับทั้งเซลล์เจ้าบ้านของมนุษย์และสัตว์ปีก

2. เพื่อสร้างแบบจำลองทางโครงสร้าง 3 มิติ ดูอันตรกิริยาของโปรตีนฮีแมกกลูตินินที่ส่งผลต่ออนุพันธ์ของน้ำตาลซึ่งเชื่อมกันเป็นสายโซ่บนผิวโปรตีน (glycoprotein)

3. เพื่อสร้างข้อมูลงานวิจัยขั้นพื้นฐาน (Basic Research) ในงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ของไทยให้ทัดเทียมนานาชาติในประเทศไทย

1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

- ปีที่ เดือนที่ ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
- 1-6 - ผลศึกษาการจับของโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับแอนติบอดีที่มีโครงสร้างทางเอ็กเรย์ด้วย MD
 - 7-12 - ผลศึกษาการจับของโปรตีนฮีแมกกลูตินินที่มีการกลายพันธุ์กับแอนติบอดีด้วย MD
 - ผลการศึกษาหาตำแหน่งการจับของแอนติบอดีบนโปรตีนฮีแมกกลูตินินด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

1.11 สรุปการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ (ตามแผน)	เป้าหมาย / ผลที่คาดหวัง (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)
1. ศึกษาการจับของโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับแอนติบอดีที่มีโครงสร้างทางเอ็กเรย์ด้วย MD	1. ผลการศึกษาการจับของ HA กับแอนติบอดีที่มีโครงสร้างทางเอ็กเรย์และผลการกลายพันธุ์ของ HA เพื่อทดสอบระเบียบวิธี MD	1. ผลการศึกษาการจับของ HA กับแอนติบอดี จากโครงสร้าง 3GBM ยืนยันความถูกต้องของระเบียบวิธีที่ใช้
2. ผลการศึกษาหาตำแหน่งการจับของแอนติบอดีบนโปรตีนฮีแมกกลูตินินด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์	2. ทราบเรซิดิวส์ที่มีผลต่อการจับของ HA กับแอนติบอดี 3. สามารถทำนายตำแหน่งการจับของแอนติบอดีบน HA	2. ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของ HA และเรซิดิวส์ที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ จากการทำ Alanine scanning 3. ผลการศึกษาหาตำแหน่งการจับของแอนติบอดี

1.12 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- ☐ บรรลุ.....
- ☒ บรรลุบางส่วน (ร้อยละ.....80.....) เหตุผล.....

ผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัยจากการศึกษากลไกการเข้าจับของไวรัสใช้หัดนกสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์และดื้อวัคซีนกับเซลล์เจ้าบ้านของมนุษย์และสัตว์ปีก เป็นการศึกษาการจับของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin; HA) กับแอนติบอดีโดยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน (Molecular dynamics simulation; MD) โดยช่วงต้นเป็นการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างทางเอ็กเรย์เพื่อทดสอบความถูกต้องของระเบียบวิธีที่ใช้ จากนั้นจึงศึกษาการกลายพันธุ์ของ HA ที่มีผลต่อการจับของแอนติบอดี โดยโครงสร้าง HA ที่กลายพันธุ์สร้างจากการทำ Homology modeling และทำ Alanine scanning เพื่อหาเรซิดิวส์ที่มีผลต่อการจับของแอนติบอดี และใช้โปรแกรมทำนายตำแหน่งการจับของแอนติบอดีบน HA

ผู้วิจัยจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนระเบียบวิธีเนื่องจาก ระหว่างการดำเนินงานวิจัยพบว่า โครงสร้างทางเอ็กเรย์ของ H5N1 กับแอนติบอดี มีเพียง 2 โครงสร้าง และการเข้าจับของแอนติบอดีจากทั้ง 2 โครงสร้างเป็นการ

จับบริเวณหาง (Stalk) ของ Chain B ซึ่งอยู่ห่างจากโพรงการจับกับเฮลด์เจ้าบ้านซึ่งจะอยู่ที่ส่วนหัว (Globular head domain) ใน Chain A อีกทั้งไม่พบข้อมูลทาง Sequence ของ H5N1 ที่ดี้อวัคซึนในคนในฐานข้อมูล ncbi การศึกษาใช้หวัดนกเพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของแอนติบอดีจึงเป็นการศึกษาจากโครงสร้างทางเอ็กเรย์ และทำ Alanine scanning บน HA เพื่อหาเรซิดิวส์ที่มีผลต่อการจับของแอนติบอดี และใช้โปรแกรมทำนายตำแหน่งการจับของแอนติบอดีบน HA

☐ ไม่บรรลุ เหตุผล.....

1.13 ผลผลิต/ สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs) (โปรดระบุรายละเอียด)

☒ องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน.....

ได้องค์ความรู้ในการศึกษาการจับของ HA กับแอนติบอดี ผลการกลายพันธุ์ของ HA และการหาตำแหน่งการจับของแอนติบอดี

☐ สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์.....

☐ ผลิตภัณฑ์.....

☐ สิ่งประดิษฐ์.....

☐ เทคโนโลยี/นวัตกรรม.....

☐ ฐานข้อมูล/ซอฟต์แวร์.....

☐ คู่มือ.....

☐ วิดีทัศน์.....

☒ การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิสิตปริญญาตรี.....คน ปริญญาโท.....คน ปริญญาเอก.....1.....คน

พัฒนานักวิจัยให้มีความรู้ด้านการศึกษา HA กับแอนติบอดี ได้เรียนรู้โปรแกรมใหม่ๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยในหน่วยวิจัยต่อไป

☐ สนับสนุนการศึกษาปัญหาพิเศษ.....เรื่อง (ระบุ).....วิทยานิพนธ์.....เรื่อง (ระบุ).....

☐ อื่นๆ (ระบุ).....

1.14 ผลลัพธ์/ผลสำเร็จที่ได้/หรือคาดว่าจะได้จากการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

(1) เป้าหมายการนำไปใช้ประโยชน์ (ระบุกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเชิงปริมาณ/คุณภาพ)

☐ ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนการสอน.....

☐ ด้านการเกษตร.....

☐ ด้านอุตสาหกรรม.....

☐ ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม.....

☐ ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย.....

☐ ด้านเศรษฐกิจ.....

☐ ด้านสังคม.....

- ☐ ด้านการทำนุบำรุงศิลป ศาสนา วัฒนธรรม.....
- ☐ ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย.....
- ☐ เสนอภาครัฐ เพื่อใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ
- ☒ นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป.....

องค์ความรู้ในการศึกษาการจับของ HA กับแอนติบอดี ผลการกลายพันธุ์ของ HA และการหาตำแหน่งการจับของแอนติบอดีจากงานวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปศึกษาวิจัยต่อเพื่อประโยชน์ในการผลิตวัคซีนให้หัดนกต่อไป

- ☐ ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน/การสร้างเครือข่าย.....
- ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

(2) สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ / ถ่ายทอด **ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ** (ระบุรายละเอียดอยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์/ตีพิมพ์แล้วในรูปแบบเอกสารอ้างอิงและแนบสำเนาเป็น

ภาคผนวกของรายงาน)

- ☐ ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ต่างประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ในประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอทางวิทยุ/โทรทัศน์/Website..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอทางนิทรรศการ..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ บทความ/เอกสารสิ่งพิมพ์/วีดิทัศน์..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ ถ่ายทอด/ฝึกอบรมแก่เกษตรกร/ผู้สนใจ..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชน/อุตสาหกรรม/ผู้ประกอบการ (ประโยชน์เชิงพาณิชย์)..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ (ระบุ).....
- ☐ มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง (ระบุ).....
- ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

1.15 การยื่นจด ☐ สิทธิบัตร ☐ อนุสิทธิบัตร ☐ ลิขสิทธิ์

☐ มีศักยภาพที่จะยื่นจด (ระบุ)..... ☐ ยื่นจดแล้ว เมื่อ.....

1.16 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ (ระบุว่าก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร)

- ☐ ด้านความมั่นคง อาทิ การเมืองการปกครอง กฎหมาย การต่างประเทศ โครงสร้างพื้นฐาน และบริการโทรคมนาคม ฯลฯ (ระบุ).....
- ☐ ด้านการเศรษฐกิจ อาทิ การพาณิชย์กรรม การเกษตรกรรม การอุตสาหกรรม การท่องเที่ยว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พลังงาน ฯลฯ (ระบุ).....
- ☐ ด้านคุณภาพชีวิตและสังคม ศักยภาพของคนและการศึกษา การแพทย์และสาธารณสุข หลักประกันความมั่นคง สวัสดิการสังคม วัฒนธรรม จริยธรรมและค่านิยม ฯลฯ (ระบุ).....

- ☐ ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การบริการจัดการการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ การป้องกันการทำลาย ลดการสูญเสีย การฟื้นฟูทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ฯลฯ
- ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

1.17 ผลการดำเนินงานวิจัยสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ ในด้าน

- ☐ ยุทธศาสตร์การจัดความยากจน
- ☐ ยุทธศาสตร์การพัฒนาคมนและสังคมที่มีคุณภาพ
- ☐ ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุล และแข่งขันได้
- ☐ ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- ☐ ยุทธศาสตร์การต่างประเทศและเศรษฐกิจระหว่างประเทศ
- ☐ ยุทธศาสตร์การพัฒนากฎหมายและส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี
- ☐ ยุทธศาสตร์การส่งเสริมประชาธิปไตยและกระบวนการประชาสังคม
- ☐ ยุทธศาสตร์การรักษาความมั่นคงของรัฐ
- ☐ ยุทธศาสตร์การรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลก
- ☐ อื่นๆ โปรดระบุ.....

1.18 ปัญหา อุปสรรค ในการดำเนินงานวิจัยและแนวทางแก้ไข.....

1.19 งานที่จะทำต่อไป/คำชี้แจงเพิ่มเติม.....

ศึกษาการกลายพันธุ์ของ HA ที่ตำแหน่งการจับพัฒนาปรับปรุงระเบียบวิธีการหาตำแหน่งการจับของแอนติบอดี

1.20 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project)” ตามหัวข้อ ในส่วนที่ 2 (หน้าถัดไป) มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....



หัวหน้าโครงการ

(..... นายจักร แสงมา.....)

5 / พ.ย. / 2556วัน/เดือน/ปี ที่รายงาน

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2553

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)19.53

(ชื่อโครงการภาษาไทย ศึกษาการจับตัวของเซลล์เจ้าบ้านกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินในสายพันธุ์ที่มีการ
ดื้อต่อวัคซีนใช้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1..)

(ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ Study of Binding Patterns of Cell Receptors and Hemagglutinin (HA)
in Vaccine-Resistant Strains H5N1..)

(ชื่อผู้วิจัยภาษาไทย นายจักร แสงมา⁽¹⁾ น.ส.นิภา จงกล⁽¹⁾)

(ชื่อผู้วิจัยภาษาอังกฤษ Chak Sangma⁽¹⁾ Nipa Jongkon⁽¹⁾)

บทคัดย่อ

ใช้หวัดนกสายพันธุ์ย่อย H5N1 เป็นเชื้อที่สามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วในสัตว์ปีก อีกทั้งยังสามารถติดต่อสู่คนและทำให้เสียชีวิตได้ สร้างความเสียหายทั้งด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุข การใช้วัคซีนเป็นทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการป้องกันและยับยั้งการแพร่เชื้อ ทั้งนี้พบว่า การกลายพันธุ์บางตำแหน่งของโปรตีนฮีแมกกลูตินินทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนลดลง โครงการวิจัยนี้จึงทำการศึกษารูปแบบการจับของแอนติบอดีกับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน H5N1 เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาและปรับปรุงวัคซีน โดยใช้โครงสร้าง 3GBM ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ได้รับความสนใจในการผลิตยาจากแอนติบอดีในปัจจุบัน ด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์เชิงโมเลกุล เพื่อหาเหตุผลที่สำคัญต่อการจับโดยการทำ Alanine scanning จากการศึกษาค้นคว้า D42 ใน HA2 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานในการจับของโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับแอนติบอดีมากที่สุด จึงคาดว่าน่าจะมีผลต่อการจับกับแอนติบอดีหากมีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดสอบโปรแกรมทำนายตำแหน่งการจับของแอนติบอดีบนโปรตีนฮีแมกกลูตินิน โดยอาศัยข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับแอนติบอดีต่อไป

คำสำคัญ: ใช้หวัดนก โปรตีนฮีแมกกลูตินิน วัคซีน แอนติบอดี

ABSTRACT

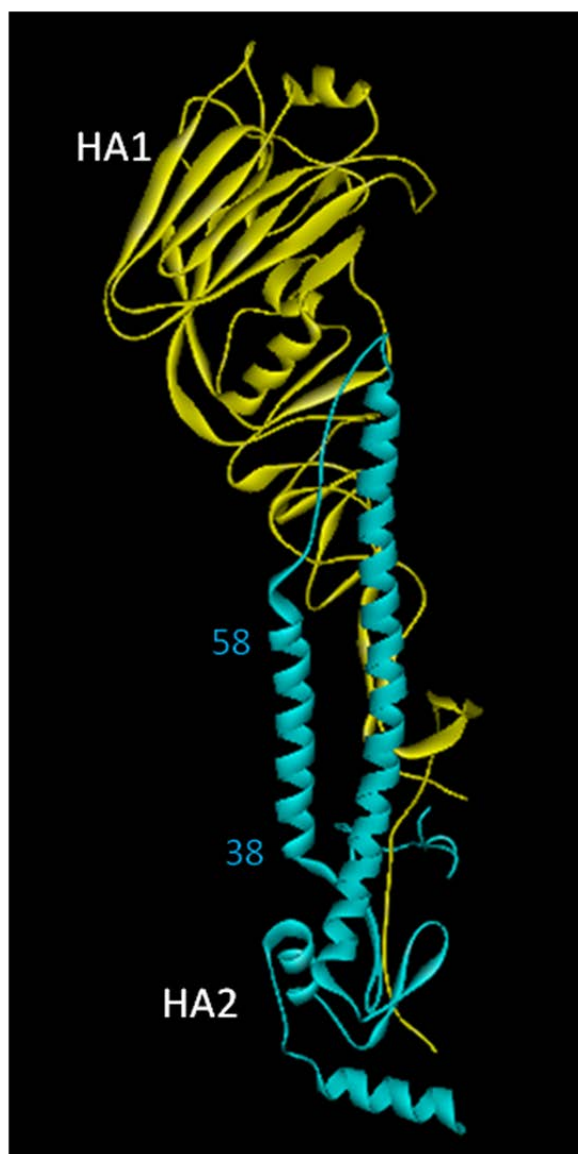
The most effective way to prevent influenza A H5N1 from the outbreak is to use vaccine. The strain from the early years of the outbreak has been used to produce vaccine and still in the trial period. The problem is while researchers try to produce vaccine based on those strains, the virus keeps on mutating. To know whether the antibody produced by human body after vaccine stimulated is working against mutated virus is therefore important. We investigated on the affinity of antibody against H5N1 to know if there is any loss in the activity after points mutation occurred on virus hemagglutinin by using molecular modeling approach. We found that although some mutations could cause the negative effect but till now none of such mutations have been observed.

Key words: Influenza A virus, Hemagglutinin, H5N1, Vaccine, Antibody

บทนำ

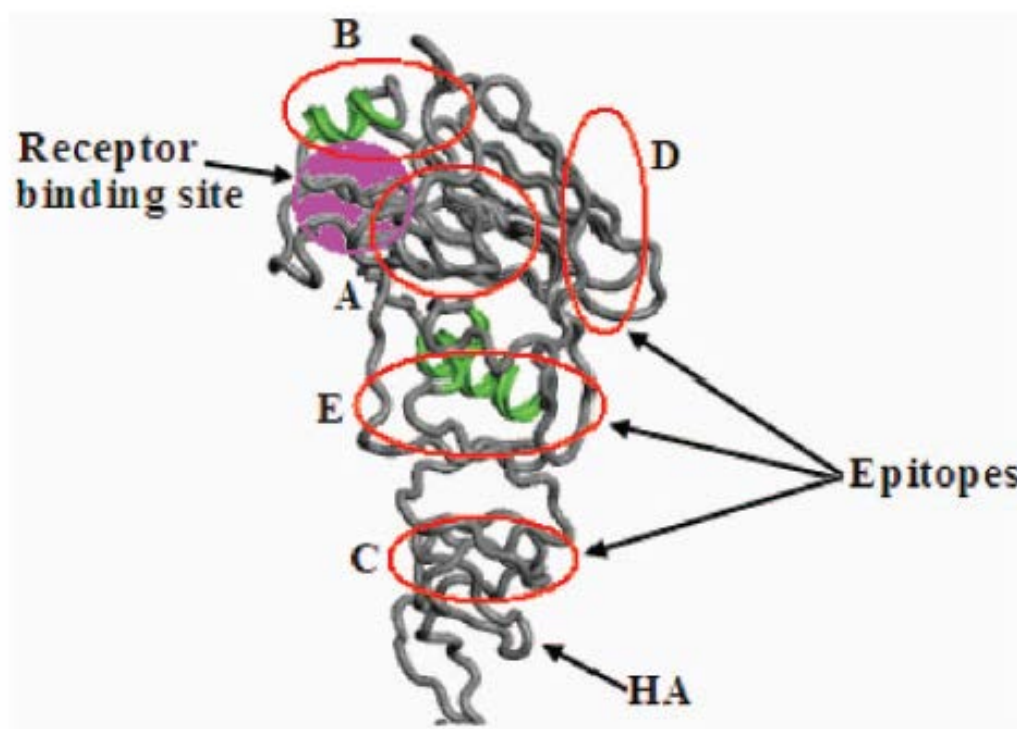
ไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ย่อย H5N1 (Influenza A virus H5N1) ถือเป็นโรคหนึ่งที่เป็นปัญหาสำคัญของหลายๆ ประเทศในโลกรวมถึงประเทศไทย เนื่องจากสามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วในสัตว์ปีก สร้างความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ รวมถึงอุตสาหกรรมสัตว์ปีกที่เกี่ยวข้อง อีกทั้งยังเป็นโรคที่สามารถติดต่อมายังคนและทำให้เสียชีวิตได้ หลายๆ ประเทศมีการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อและยับยั้งการแพร่ระบาดในสัตว์ปีก แต่พบว่าการกลายพันธุ์ของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin; HA) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผิวของไวรัสสามารถส่งผลให้ความสามารถของวัคซีนลดลงได้ โครงสร้างของ HA ประกอบด้วย HA1 และ HA2 ดังรูป

1



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้าง HA ซึ่งประกอบด้วย HA1 (สีเหลือง) และ HA2 (สีฟ้า) และแสดงเรซิดิวส์ 38 ถึง 58 ที่ค่อนข้าง Conserve ใน HA2 (โครงสร้าง 3GBM [1])

HA เป็นส่วนหลักของไวรัสใช้หัดนกที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน หรือ แอนติบอดี (Antibody) ซึ่งแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจะจำเพาะกับชนิดของไวรัสและเข้าจับบริเวณที่เรียกว่าอีพิโทป (Epitope) โดยปกติแล้วใน HA1 จะมีอีพิโทปหลักๆ 5 บริเวณ ดังรูป 2



รูปที่ 2 แสดง Receptor binding site และอีพิโทปของ HA (PDB code: 1HGF) [2]

แต่เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบอีพิโทปที่ HA2 บริเวณเรซิเดวส์ 38-58 (รูป 1) ซึ่งเป็นบริเวณที่ค่อนข้างคงที่ (Conserved) ไม่มีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนมากเหมือนใน HA1 [1]

นอกจากนี้ยังพบว่า แอนติบอดีที่จับบริเวณนี้สามารถจับกับ HA ได้หลายชนิด หรือที่เรียกว่า Broadly neutralizing antibody ด้วย ทำให้มีความพยายามในการสร้างแอนติบอดีที่จับบริเวณนี้เพื่อใช้เป็นยารักษาไข้หวัดในอนาคต และเนื่องจากเป็นโครงสร้างที่มีโครงสร้างทางเอ็กเรย์ใน Protein DataBank (PDB) [3] ผู้วิจัยจึงสนใจนำมาศึกษาต่อด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน (Molecular dynamics simulation; MD) [4] เพื่อศึกษาลักษณะการจับ การกลายพันธุ์ และหาเรซิเดวส์ที่สำคัญในการจับเพื่อประโยชน์ในการศึกษาและปรับปรุงโครงสร้างแอนติบอดีต่อไป

เพื่อความเข้าใจในโครงสร้างและการจับของ HA กับแอนติบอดี ผู้วิจัยจะทำการศึกษา HA ที่มีโครงสร้างทางเอ็กโซเรย์ โดยเลือก 3GBM (PDB code) ซึ่งเป็นระบบ H5 ที่จับกับแอนติบอดี CR6261 และเป็นโครงสร้างที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยในต่างประเทศในการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาจากแอนติบอดีในอนาคต [5] โดยจะทำการศึกษาเพื่อหาเรซิดิวที่สำคัญในการจับของ HA ต่อแอนติบอดี โดยการทำ Alanine scanning [6] นั่นคือ เปลี่ยนเรซิดิวที่เกี่ยวข้องต่อการจับของ HA เป็น Alanine (ALA) หลังจากนั้นทำ Homology modeling เพื่อสร้างโครงสร้างสามมิติแล้วคำนวณค่าพลังงานในการจับหลังการรันด้วย MD เป็นเวลา 5000 ps หากค่าพลังงานมีการเปลี่ยนแปลงไปมาก นั้นหมายถึง เรซิดิวนั้นมีมีความสำคัญต่อการจับมาก

นอกจากนี้ผู้วิจัยจะทำการทดสอบเพื่อหาโปรแกรมทำนายอิพิโทปของ HA เพื่อพัฒนาเครื่องมือการศึกษาวิจัยแอนติบอดี โดยทดสอบกับโครงสร้างทางเอ็กโซเรย์ของแอนติบอดีที่จับกับ HA1 ซึ่งปัจจุบันมีเฉพาะโครงสร้าง X31(H3) ที่จับกับแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในส่วน HA1 ในการศึกษานี้ผู้วิจัยเลือกโครงสร้างมาจำนวน 4 โครงสร้าง มี PDB code ดังนี้ 1EO8 [7] 1QFU [8] 2VIR [9] 1KEN [10]

ผลและวิจารณ์

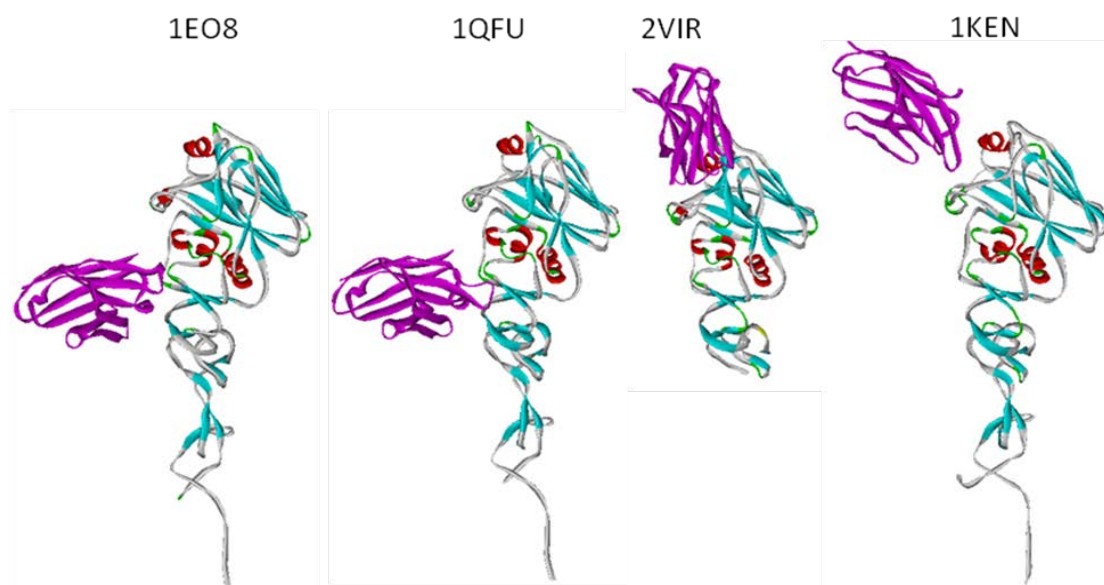
ผลการทำ Alanine scanning ที่ HA2 ของโครงสร้าง 3GBM

โครงสร้าง	ค่าพลังงานในการจับของ HA กับแอนติบอดี (kcal)
3GBM Wide type	-14.53
D42A	-11.35
D46A	-13.55
T49A	-12.84
N53A	-12.35

จากค่าพลังงานที่คำนวณได้แสดงให้เห็นว่ากรณี Wide type ค่าพลังงานมีค่าลบมากที่สุดแสดงถึงความสามารถในการจับกับแอนติบอดีดีที่สุด และเรซิดิว D42 มีความสำคัญต่อการจับมาก ดังจะเห็นจากค่าพลังงานที่เปลี่ยนไปมากที่สุดเมื่อเทียบกับ Wide type ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาแอนติบอดีต่อไป

ผลการทดสอบโปรแกรมทำนายอิพิโทป

ผู้วิจัยใช้โครงสร้าง 1EO8 1QFU 2VIR 1KEN ซึ่งเป็นโครงสร้างทางเอ็กโซเรย์ของ X31 (H3) จาก PDB ที่จับกับแอนติบอดี มาใช้ทดสอบโปรแกรม โครงสร้างแสดงบริเวณการจับของแอนติบอดี ดังรูป 4



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างทางเอ็กเรย์ของ X31 ที่จับกับแอนติบอดีบริเวณต่างๆ ใน HA1

จากการทดสอบหลายๆ โปรแกรมทั้งที่ให้บริการบนอินเทอร์เน็ต และโปรแกรมที่สามารถดาวน์โหลดมาติดตั้งในคอมพิวเตอร์ เช่น ZDOCK [11] HEX [12] และ GRAMM [13] ผู้วิจัยพบว่าไม่มีโปรแกรมใดที่สามารถให้ผลทำนาย epitope ได้แม่นยำ >70% จำเป็นต้องอาศัยการพิจารณาจากผู้ใช้

การทำนายอิพิโทปของแอนติบอดีจำเป็นต้องอาศัยระเบียบวิธีและการพิจารณาากกว่านี้ ซึ่งผู้วิจัยจะพยายามเพื่อสร้างระเบียบวิธีที่สามารถทำนายอิพิโทปของแอนติบอดี ในการวิจัยต่อไป

สรุปและเสนอแนะ

เนื่องจากผู้วิจัยไม่พบการตีพิมพ์ขึ้นใช้หวัดนกในคน ไม่พบข้อมูลการกลายพันธุ์ของ HA ที่ทำให้ติดคนได้ดีขึ้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง นอกจากนี้โครงสร้างทางเอ็กเรย์ของ H5N1 กับแอนติบอดี มีเพียง 2 โครงสร้าง โดยการเข้าจับของแอนติบอดีจากทั้ง 2 โครงสร้างเป็นการจับบริเวณหาง (Stalk) ของ HA2 ซึ่งอยู่ห่างจากโพรงการจับกับเซลล์เจ้าบ้านซึ่งจะอยู่ที่ส่วนหัว (Globular head domain) ใน HA1 ทำให้ผู้วิจัยเปลี่ยนระเบียบวิธีการวิจัยเป็นการศึกษาการจับของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin; HA) กับแอนติบอดีโดยระเบียบวิธี MD ซึ่งพบว่าสามารถทำนายผลได้ถูกต้อง โดยนำมาใช้ทำนายการกลายพันธุ์บริเวณการจับกับแอนติบอดี เพื่อหาเรซิดิวส์ที่สำคัญในการจับ โดยการทำ Alanine scanning พบว่า D42 ใน HA2 ให้ค่าพลังงานที่เปลี่ยนไปมากที่สุดเมื่อเทียบกับ Wide type จึงคาดว่าเรซิดิวส์ตำแหน่งนี้จะมีผลต่อการจับกับแอนติบอดี หาก HA เกิดการกลายพันธุ์

ส่วนการทำนายตำแหน่งการจับของแอนติบอดีบน HA ด้วยโปรแกรมต่างๆ พบว่ายังให้ผลไม่ดีนัก จำเป็นต้องอาศัยการพัฒนาระเบียบวิธีทำนายที่มากขึ้น ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาระบบของแอนติบอดีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger M-A, Friesen RHE, Jongeneelen M, Throsby M, Goudsmit J, Wilson IA. Antibody Recognition of a Highly Conserved Influenza Virus Epitope (2009). *Science*, 324: 246-251.
2. Ndifon W, Wingreen NS and Levin SA. Differential neutralization efficiency of hemagglutinin epitopes, antibody interference, and the design of influenza vaccines (2009). *PANS*, 106: 8701-8706.
3. www.pdb.org
4. Case DA, Darden TA, Cheatham III TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Merz KM, Pearlman DA, Crowley M, Walker RC, Zhang W, Wang B, Hayik S, Roitberg A, Seabra G, Wong KF, Paesani F, Wu X, Brozell S, Tsui V, Gohlke H, Yang L, Tan C, Mongan J, Hornak V, Cui G, Beroza P, Mathews DH, Schafmeister C, Ross WS, Kollman PA: *AMBER 9*. University of California, San Francisco; 2006.
5. <http://www.ebionews.com/news-center/enterprise-a-industry/34-business-development/5787-crucell-sees-government-interest-in-novel-flu-drug.html>
6. Weiss GA, Watanabe CK, Zhong A, Goddard A, and Sidhu SS. Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 97: 8950-8954.
7. Fleury D, Daniels RS, Skehel JJ, Knossow M and Bizebard T. Structure Evidence for Recognition of a Single Epitope by Two Distinct Antibodies (2000), *PROTEINS: Structure, Function & Genetics*, 40: 572-578.
8. Fleury D, Barrère B, Bizebard T, Daniels RS, Skehel JJ and Knossow M. A complex of influenza hemagglutinin with a neutralizing antibody that binds outside the virus receptor binding site (1999). *Nature America Inc*, 6: 530-534.
9. Fleury D, Wharton SA, Skehel JJ, Knossow M, Bizebard T. Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization (1998), *Nat.Struct.Biol.* 5: 119-123.
10. Wharton SA, Skehel JJ, Knossow M. An antibody that prevents the hemagglutinin low pH fusogenic transition (2002) *VIROLOGY* 294: 70-74.
11. <http://zdock.bu.edu/software.php>
12. Ritchie DW. Recent progress and future directions in protein-protein docking (2008). *Curr. Prot. Pep. Sci.* 9: 1-15.
13. Katchalski-Katzir, E., Shariv, I., Eisenstein, M., Friesem, A.A., Aflalo, C., Vakser, I.A. Molecular surface recognition: Determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2195-2199.

(ภาษาอังกฤษ) *Department of Chemistry, Faculty of Science*

หมายเหตุ : ให้ส่งรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับร่าง) จำนวน 3 ชุด ก่อน โดยสถาบันวิจัยและพัฒนาจะส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิ ประเมิน / วิจารณ์ หากไม่มีการแก้ไข จะแจ้งให้ส่งเพิ่ม แต่หากมีความเห็นข้อเสนอแนะจากผู้ทรงคุณวุฒิให้ปรับแก้ไข จะแจ้งให้ดำเนินการแก้ไข และให้ส่งรายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง) จำนวน 12 ชุด พร้อม Diskette ต่อไป