บทที่ 3

วิธีวิจัย

ส่วนที่หนึ่ง

1. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP และวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี FRET assay

นำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ pGEX-YHV3CLP 50 ไมโครกรัมมา transform เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ *E.coli* (rosetta with chaperone plasmid) คัดเลือกในอาหารแข็ง LA ที่มี 34 ไมโคกรัมต่อมิลลิลิตรของ chloramphanicol และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ ampicillin บ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือกแบบเหลวชนิด LB และกระตุ้นการแสดงออกรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP ด้วย 0.5 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาแยกบริสุทธิ์ด้วยโปรตีนด้วยคอลัมน์ชนิด GST sepharose ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย 15%SDS-PAGE

นำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยสับสเตรทสังเคราะห์และวัดด้วยวิธี FRET assayใช้ความเข้มข้นสับเสตรทเท่ากับ 40 uM ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 0.2 mM DTT 1 mM EDTA และ กลีเซอรอล 10% โดยวัดการดูดกลืนแสง(Emission) และ การสะท้อนแสง(Excitation) เท่ากับ 360 และ495 ตามลำดับ

2. การ screening RNA aptamer ด้วยวิธี SELEX

นำโปรตีน YHV protease ที่ purify ไว้ ประมาณ 1 mg/ml ผสมกับ RNA aptamer ในสารละลาย Tris-HCl pH 7.4 และ incubate ไว้ที่ 37 ^{o}C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการคัดเลือก RNA aptamer ที่จับจำเพาะกับ YHV protease ด้วยการกรอง และชะส่วนที่เป็น complex ของ YHV protease: RNA ด้วย Tris-HCl pH 7.4 และนำมาแยกเฉพาะ RNA โดยการสกัด RNA ซึ่ง RNA ที่แยกได้นั้น จะนำไปเพิ่มจำนวนด้วย PCR เพื่อเตรียมใช้เป็น RNA aptamer library อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งจะนำกลับมาผสมกับ purified YHV protease อีกครั้ง แต่ลดปริมาณโปรตีนลง 5 เท่า และทำเช่นนี้ไปประมาณ 6 รอบ โดยในแต่ละรอบนั้น จะลดปริมาณโปรตีนเป้าหมายลง เพื่อเพิ่มความจำเพาะให้มากยิ่งขึ้น

ซึ่งในขั้นตอนข้างต้น ถือได้ว่าเป็นการคัดเลือก RNA aptamer ที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้นั้น จะสามารถทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยการทำ DNA sequencing

3. การโคลน RNA aptamer เข้าสู่ TA cloning vector เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

RNA aptamer ที่คัดเลือกได้จากวิธีการข้างต้น จะถูกนำมาโคลนเข้าสู่ TA cloning vector เพื่อหาลำดับนิวคลีไทด์ ซึ่ง RNA aptamer จะถูกนำมา convert ให้เป็น cDNA ด้วย Reverse transcriptase (Invitrogen) แล้วจึงนำไป ligate เข้าสู่ pGEM-T easy vector (Promega) หลังจากนั้น นำ plasmid ที่ได้ไป transform เข้าสู่ *Escherichia coli* (DH5α) และคัดเลือกโคโลนีที่มียีนเป้าหมายอยู่ และนำไปส่ง DNA sequencing (Macrogen, Korea)

ส่วนที่สอง

1. การทำ multiple sequence alignment และการทำ homology modeling

การวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโน ด้วยวิธีการ homology modeling เพื่อการคำนวณหา molecular mechanism จากโปรแกรม discovery studio2.5 package โดยลำดับกรดอะมิโนของ YHV protease จากฐานข้อมูล NCBI มีความครอบคลุม 196 อะมิโน (Ser^{2828} to Asp^{3023}) ซึ่งถูกมาใช้เป็นแม่แบบในการเปรียบเทียบโครงสร้างกับโปรตีนที่ค้นหาจากฐานข้อมูล Protein Data Bank (PDB: http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do) พบว่ามีโปรตีเอส 8 ชนิด ซึ่งแบ่งได้เป็น โปรตีเอสจากกลุ่ม microorganism ได้แก่ tobacco etch virus, entry 1LVM; rhinovirus, entry 1CQQ; hepatitis A virus, entry 1HAV; *Staphylococcus aureus*, entry 1AGJ; *Achromobacter lyticus*, entry 1ARB และกลุ่ม high organism ได้แก่ bovine trypsin, entry 5PTP; human factor B, entry 1DLE; human heparin binding protein, entry 1A7S โดยโครงสร้างทั้งแปดชนิด ถูกนำมา 1) เปรียบเทียบความเหมือนกันของโครงสร้างระหว่าง c-alpha atoms ด้วยวิธี align and superimpose proteins โดยใช้โปรแกรม Clustal W 1.8 ซึ่งการเปรียบเทียบด้วยวิธีนี้ สามารถหาและติดตามลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันได้สูง 2) เปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างโปรตีเอสทั้งแปดชนิดกับ YHV protease ด้วยโปรแกรม geneDoc V 2.7 ซึ่งทำให้ได้รูปแบบของลักษณะโครงรูป YHV protease 3) เปรียบเทียบจาก Modeller9 v4 ภายใน build homology model การทำ insertion และ deletion ทำให้สามารถคาดเดา

โครงสร้าง YHV protease เพื่อทำนายการเกิด loop และพัฒนาโครงสร้างที่ดีที่สุดต่อการมีค่า DOPE (discrete optimized protein energy) สูงสุด จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย program minimization โดยยึดตามวิธีของ charmm22 force filed เพื่อลบความไม่น่าเชื่อถือของ atomic contact โดยให้ค่าพลังงานต่ำสุดของโครงสร้างทางเคมีที่ได้จากโปรแกรม Procheck v 3.5 ได้จากโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับ JCSG structure validatin sever

2. ขั้นตอนการเตรียม ligands

เมื่อได้โครงสร้างจำลองสามมิติของ YHV protease แล้ว จึงค้นหา ligands ที่สามารถแทรกเข้าไปใน active site ของ YHV protease และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้ ดังนั้น ชุดข้อมูลทั้งหมด 1,364 ตัวอย่าง ที่ได้จาก NCI diversity data set ซึ่งได้รับจาก Office of the Associated Director of the Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, more information is available at NCI/DTP Open Chemical Repository *{NCI/DTP #90680}* จะมีลักษณะโครงสร้าง ligands ถูกเติม hydrogen atom และเพื่อความถูกต้องของการเกิดพันธะและการหาตำแหน่งของ chiral center ด้วยโปรแกรม LigPrep 2.2 ด้วยการตั้งโปรแกรมอัตโนมัติ ทำให้ได้โครงสร้างทั้งหมด 1,523 โครงสร้าง และเก็บชุดข้อมูลในรูปแบบ SYBYL mol2 format ซึ่งมีการหมุนพันธะของ ligand เพื่อให้เกิดความยืดหยุ่นโดยใช้โปรแกรม python script และนำมาใช้ในการเป็นligand ในการทำ autodock ต่อไป

3. ขั้นตอนการทำ docking

โครงสร้างที่ได้จากการวิเคราะห์พลังงานต่ำสุดของ YHV protease ที่ได้จากการทำนายก่อนหน้านี้ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในโปรแกรม autodock tools version 1.5.2 เพื่อใช้ในการหาตำแหน่ง Kollman United Atom charges และหา solvent parameter ของโปรตีน YHV protease โดยใช้ การติดตั้งแบบ grid โดย grid boxes ที่ได้ สร้างบริเวณ catalytic residues กำหนด grid point เป็น 0.375 A° ภายในboxes ขนาด 60x60x60 โดยใช้โปรแกรม auto grid 4.0 เพื่อติดตามอะตอมชนิด : A (aromatic carbon), C, HD, N, NA (hydrogen-bond-accepting N), O, OA (hydrogen-bond-accepting O), S, SA (hydrogen-bond-accepting S), Cl, F, Br, I, P, and e (electrostatic).

การทำโปรแกรม protein ligand docking ได้วิเคราะห์ 50 รอบ โดยใช้ Lamarckian genetic algorithm search โดยจะหาจำนวน popular size ซึ่งตั้งไว้ที่ค่าเท่ากับ 150 ผลที่ได้มาจากค่าพลังงานที่จับกันได้ต่ำที่สุด ในเวลาเดียวกัน ผลที่ได้สามารถนำมาใช้ด้วย FRED program ส่วนของ anchor binding mode ระหว่าง ligand-proteins ถูกวิเคราะห์ด้วย SiMMap server ดังนั้น ผลของการวิเคราะห์ของแต่ละ ligand จะถูกคำนวณค่า *Estimated Free Energy of Binding* (AutoDock4 score) และกำหนดให้เรียงลำดับค่าที่คำนวณได้จากน้อยไปมาก โดยข้อมูลดังกล่าวสามารถคำนวณได้จากสมการด้านล่าง

Estimated Free Energy of Binding = *Final Intermolecular Energy + Final Total Internal Energy + Torsional Free Energy - Unbound System's Energy*

4. การวิเคราะห์ Molecular dynamics simulations

จากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จาก molecular docking ทำได้ได้โครงสร้างเชิงซ้อนของ ligand – YHV complex ทั้งนี้ โครงสร้างดังกล่าว ต้องถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี molecular dynamics (MD) simulation เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างดังกล่าวในสภาวะเสมือนจริง (อยู่ในสารละลาย) ทั้งนี้ จะใช้ AMBER99SB-ILDN force field (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010) ในการวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน YHV protease และลักษณะการแตกตัว (Ionization state) ของกรดอะมิโนเมื่ออยู่ในสารละลาย ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงได้เทียบเคียงสภาวะที่เหมาะสมของ Cysteine proteases (ซึ่ง YHV protease จัดอยู่ในกลุ่มดังกล่าว) โดยกำหนดให้ side chain ของ His30 นั้นถูก protonate ที่ตำแหน่ง δ- and ε-nitrogen atoms (HIP form) และกำหนดให้ side chain ของ Cys152 deprotonated (minus cysteine; CYM form)

นอกจากนี้ กรดอะมิโนที่อยู่ทางปลายด้าน N- และ C-terminal ของ YHV protease กำหนดให้ถูก capped ด้วยหมู่ acetyl (ACE) และหมู่ methyl amino (NME) ตามลำดับ

ในการวิเคราะห์ จะใช้โปรแกรม GROMACS เพื่อวิเคราะห์การเรียงตัวของ ligand แต่ละตัวที่อยู่ในโครงสร้างของ YHV-ligand complex ในที่นี้ จะกำหนดให้ complex แต่ละตัวอยู่ในกล่องสี่เหลี่ยมที่ล้อมรอบด้วยสารละลาย (rectangular box of TIP3P water) (Jorgensen *et al.*, 1983) ที่มี sodium ions อยู่ เพื่อ neutralize ประจุของทั้งระบบ ทั้งนี้ ในการวิเคราะห์ขั้นตอนนี้ จะกำหนดให้ complex อยู่ใน general AMBER force field (GAFF) parameters (Wang *et al.*, 1984) และคำนวณค่า atomic partial

charges ด้วยวิธี AM1-BCC method (Jakalian *et al.*, 2002) ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วย Antechamber module

5. การศึกษาการยับยั้งการทำงานของ YHV protease

ในการศึกษาการยับยั้งการทำงานของ YHV protease นั้นจะใช้วิธี fluogenic assay โดยนำ Fluorogenic peptide YHV substrate มาละลายใน 25 mM dimethyl sulfoxide (DMSO) และเจือจางใน YHV reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA และ 1 mM DTT) เพื่อเตรียมเป็น 100 μM YHV substrate

ในการเตรียม YHV inhibitor นั้นจะศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเลือก ligand ที่ทำนายว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ YHV protease ได้ดีที่สุด ซึ่ง ligand ดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จากจาก NCI (National Cancer Institute) จัดส่งมาใช้ในการวิเคราะห์ ligand เหล่านี้จะถูกนำมาละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 6.7 μM และเจือจางด้วย YHV reaction buffer จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 75 nM หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบทำปฏิกิริยาในYHV reaction buffer โดยใช้ 30 ใช้ 30 μl ของ YHV protease และ 30 μl ของ 75 nM ligand และทำให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที แล้วจึงเติม Fluorogenic peptide YHV substrate ลงไป และวัดการเปลี่ยนแปลงของ fluorescence ด้วย fluorescence microplate reader โดยตั้งค่าไว้ที่ excitation/emission at 340/485 nm เป็นระยะเวลา 5 min โดยอัตราเร็วของปฏิกิริยานั้นจะคำนวณจาก % activity ในที่นี้จะใช้ปฏิกิริยา negative control คือปฏิกิริยาที่มี YHV protease แต่ไม่มี ligands และปฏิกิริยา positive control คือปฏิกิริยาที่ไม่มี YHV protease