

บทที่ 4

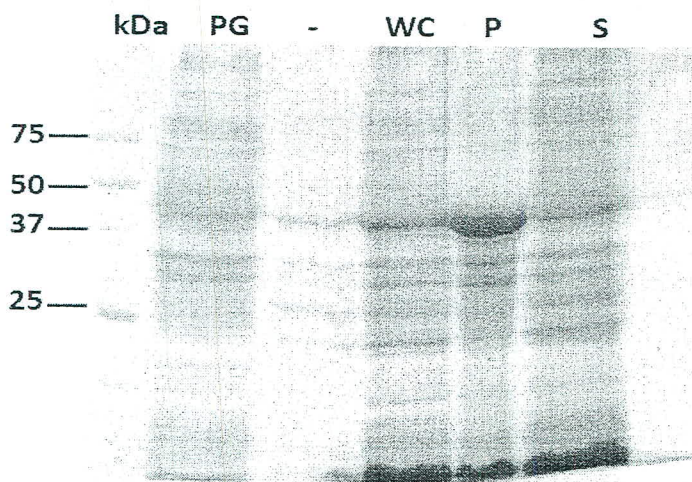
ผลการวิจัย

ส่วนที่ 1

1. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP และวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี FRET assay

1.1 การแสดงออกรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP ในระบบแบคทีเรีย

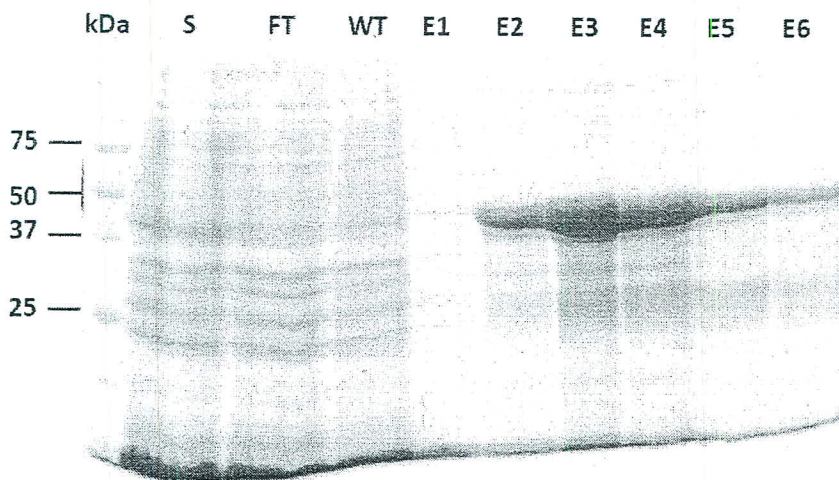
นำยีน YHV 3CLP ประมาณ 500 คู่เบสนำมาเชื่อมต่อเข้าไปในพลาสมิดชนิด pGEX4-1 expression vector เพื่อสร้าง pGEX-YHV3CLP หลังจากนั้นจึงทำการtransform เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ *E.coli* (DE3,rosetta with chaperone plasmid) และกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP ด้วย IPTG 0.5 mM ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า รีคอมบิแนนท์มีการแสดงออกมาทั้งในส่วนของตะกอนโปรตีนและสารละลายโปรตีนมีขนาดโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 1

การแสดงออกรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP ในแบคทีเรีย

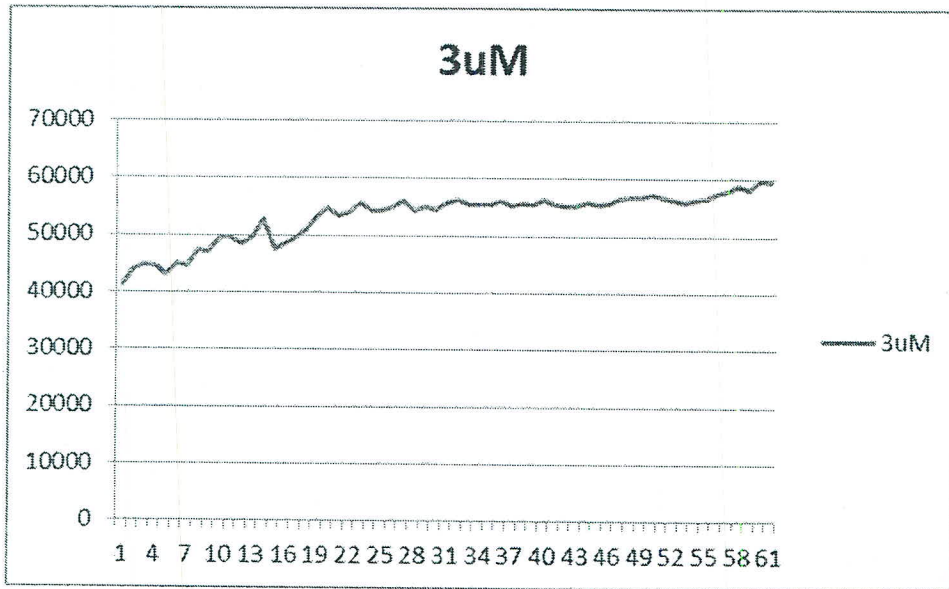
การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ YHV3CLP ด้วยคอลัมน์ชนิด GST-sepharose พบว่า สามารถทำการแยกบริสุทธิ์ได้บางส่วนและได้โปรตีนขนาดเท่ากับ 40 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 3 จึงนำโปรตีนไปใช้ในการทดลองเพื่อหาความจำเพาะต่อสับสเตรทด้วยเทคนิค FRET ต่อไป



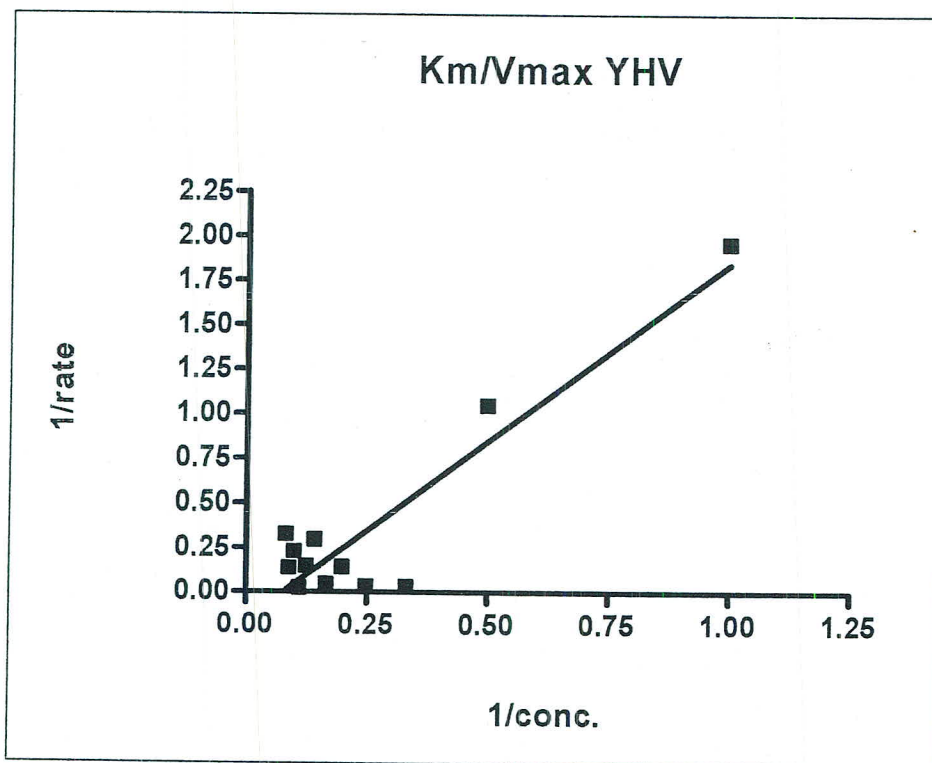
ภาพที่ 2 การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ YHV3CLP

1.2 การวัดกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP ด้วยเทคนิค FRET assay

โปรตีนรีคอมบิแนนท์ YHV 3CLP ที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนได้นำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่อการตัดสับสเตรท ซึ่งเป็นเปปไทด์สังเคราะห์ ชนิด LVTHE↓VNTGN โดยใช้ความเข้มข้นสับสเตรทตั้งแต่ 1-11 μM ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 0.2 mM DTT 1 mM EDTA และ กลีเซอรอล 10% โดยวัดการดูดกลืนแสง(Emission) และการสะท้อนแสง (Excitation) เท่ากับ 360 และ 495 ตามลำดับ ผลที่ได้พบว่า โปรตีนรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP สามารถตัดสับสเตรทสังเคราะห์ได้ในช่วงระยะเวลา 50 วินาทีแรกที่ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนเท่ากับ 100 ไมโครกรัม ดังภาพที่ 3 ซึ่งสามารถหาค่าจลนพลศาสตร์ของ YHV protease ได้คร่าวๆ ดังภาพที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่ผลิตได้มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แล้ว



ภาพที่ 3 การวัดกิจกรรมโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP โดยใช้ความเข้มข้นของ substrate 3 μ M



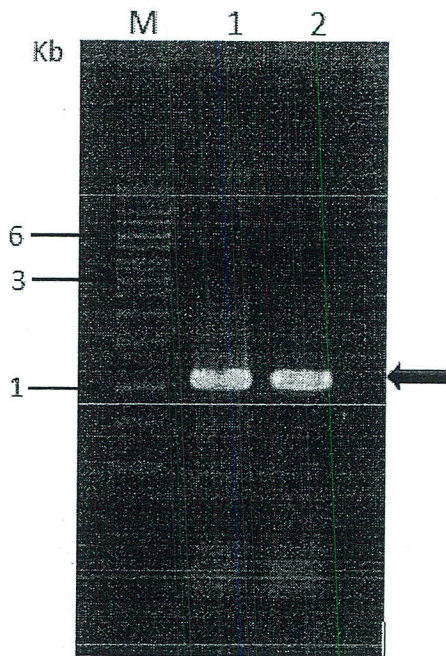
ภาพที่ 4 จลนพลศาสตร์ของ YHV3CLP

1.3 การสังเคราะห์และสร้างเวกเตอร์ YHV3CLP ที่เพิ่มความยาวด้าน N-terminal และ C-terminal

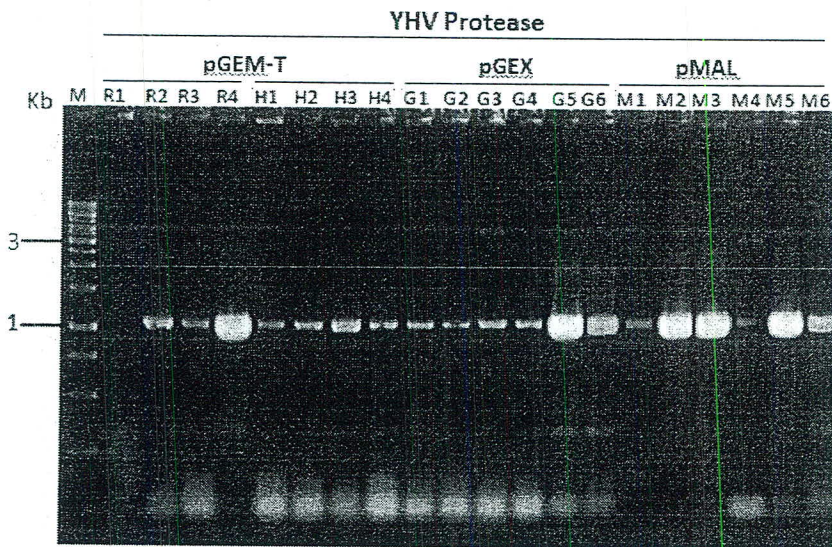
เนื่องจากเอนไซม์ YHV3CLP ที่ได้สร้างในขั้นตอนเบื้องต้นนั้น มี activity ของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ จึงทำให้ไม่สามารถติดตามการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ fluorescence-substrate ได้ ซึ่งคุณลักษณะของเอนไซม์ดังกล่าว ยังไม่เหมาะต่อการทำวิจัยต่อ เนื่องจากต้องใช้เอนไซม์ที่มี activity เหมาะสม มีการแสดงผลที่ชัดเจนจึงจะติดตามการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ดังนั้น จากงานวิจัยของ protease ใน Gill-associated virus (Ziebur *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นไวรัสที่ใกล้เคียงกับ YHV พบว่า การทำงานของ protease จากไวรัสชนิดนี้ จะมีชิ้นส่วนโปรตีนครอบคลุมบริเวณ protease domain ทั้งทางด้าน N-terminal และ C-terminal

ดังนั้น ยีน YHV3CLP_new ที่เพิ่มความยาวทางด้าน N-terminal และ C-terminal ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ ได้เพิ่มจำนวนจาก cDNA ของ YHV โดยใช้ specific primer (ภาพที่ 5) ต่อมา ซึ้นยีนดังกล่าวจึงทำบริสุทธิ์ และนำเข้าสู่ TA-cloning vector เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ

ยีน YHV3CLP_new นั้น ได้ถูกนำเข้าสู่ expression vector เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ในที่นี้ ได้ใช้ expression vector สามระบบ คือ pET, pGEX และ pMAL expression system ในขณะนี้ สามารถสร้าง expression vector ที่มี YHV3CLP_new อยู่ได้แล้วใน pGEX และ pMAL expression system (ภาพที่ 6) ดังนั้น งานวิจัยต่อไปคือ การ transform เวกเตอร์ที่มียีนเป้าหมายเข้าสู่ *E. coli* (BL21) เพื่อเหนี่ยวนำให้แสดงออกต่อไป



ภาพที่ 5 ยีน YHV3CLP_new ขนาดประมาณ 1,000 นิวคลีโอไทด์, M: 100 bp ladder,
 1: YHV3CLP_new จาก cDNA ของ YHV ที่สังเคราะห์ด้วย random hexamer
 2: YHV3CLP_new จาก cDNA ของ YHV ที่สังเคราะห์ด้วย oligodT



ภาพที่ 6 ยีน YHV3CLP_new ที่นำเข้าสู่ TA-cloning vector (pGEM-T) และ expression vectors คือ pGEX และ pMAL, M: 100 bp ladder,

2. การค้นหา RNA aptamer ที่จำเพาะต่อ YHV protease

เมื่อนำโปรตีน YHV protease ที่ผลิตได้ มาหา RNA aptamer ที่เหมาะสม พบว่า ในรอบที่ 6 ของการคัดเลือกด้วยวิธี SELEX นั้น พบชนิดของ RNA aptamer ที่ซ้ำกันทั้งหมด 3 คู่ ดังแสดงในภาพที่ 7 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กลไกการคัดเลือกนี้สามารถคัดเลือก RNA aptamer ที่มีความจำเพาะมากขึ้น ดังนั้น จะคัดเลือก ทั้ง 3 ชนิดนี้มาวิเคราะห์หาความจำเพาะในการจับต่อไป

```

GGCCAGGCAGCGAG-TAATTTATAACGGGTGGTTGATGGTAACTCATCTATTTT---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-TAAATACTCTTTTGTCTTTTGGCCAGTGTAGTTGTAAT---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-GTTCACGCTCCTTAGTGGCAACTGTGTGCIATTTATCGTGA---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-IGGTGCTCTGAGTCCATCAGTATATTTCTGTATAAGGGGACG-CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-TATGTATTAAACTGTCTCAGCATTGTGAAATATTTTGG---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-GGAATGTTTTGTACAGTTAGTGATTGGGTACTGATTGGT---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG

GGCCAGGCAGCGAG-TTGCCTEAGTTCCGATATGGTGGGTGTGCTGTGCTGAC---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-CTGAGAGGGATCCAGTTAGGGAG-----CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-CTGAGAGGGATCCAGTTAGGGAG-----CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-TGGGGGGCATTGCAAGCGGTATGTCTGTTAGGCTGACC---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-TGGGGGGCATTGCAAGCGGTATGTCTGTTAGGCTGACC---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-CCTGAATCGGCGTTACAAGACACGTCGACGAAATGTTGGT---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-GCAGCTATGTGGTATGTTATTGGGGTAGAAT-GTG CGGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG

GGCCAGGCAGCGAG-CCTTGTCTGCTTGTGTTGGTTGCGTGTAGGTTGGTTGAI---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-CGGGTAGTGTATGCTTACGTTAGAGTGGGTGCGGATGGCCTGGCTCCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-GGTTGGACCAACTACGGAAACAGTCTATGGGTCACAGG---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-GGAACCCGATAGTACGATGGGCTGCTATGTTGGGATCGGCGGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-AAAGTGGGCGCAAGGCTAGGTTGTGAGTGGGAGCAAGGAC---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-CGCATGAAGTCTGGAGATGGAAGCTGTATACGTAATTTCA---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-TTTGGCGGAAACGGTCTCTATTGGATGGGATATCGGGCGGGACCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-GTTTTTGTGGATAGGAAGTATTTATGTAAGTAGACTATG---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-G-CGATTCCTGTGGGAGTGTGCTCGTTTGGGCATTGTTGGGA---CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
GGCCAGGCAGCGAG-TCGTATTAATCACTAGTGAATTCGCGGGCCGCTGCAGGT CGACCA----TATGGGAGA
GGCCAGGCAGCGAG-TCGTATTAATCACTAGTGAATTCGCGGGCCGCTGCAGGT CGACCA----TATGGGAGA
GGCCAGGCAGCGAG-GCCGTGAGGACC-----CCGACCACACCGGTCGGAATCAGTAG
    
```

```

      T G G G A                C C G T G G G A
-----TGGGGGG--CATTGCAAGCGGTATGTCTGTTAGGCTGACC 40
-----TGGGGGG--CATTGCAAGCGGTATGTCTGTTAGGCTGACC 40
----CTGAGAGG--GAT-----CCAGTTAGG--GAG- 23
----CTGAGAGG--GAT-----CCAGTTAGG--GAG- 23
CGTAGTAGGGGGACCAGATGGAAACG-TAAACCCCGT--GG--GA-- 40
    
```

ภาพที่ 7

ลำดับนิวคลีโอไทด์ RNA aptamer ที่คัดเลือกได้

ส่วนที่สอง

1. การทำ multiple sequence alignment และการทำ homology modeling

การเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างโดยใช้ multiple template เพื่อติดตามหาค่าพลังงานต่ำสุด เพื่อทำนายโครงสร้าง YHV protease เนื่องจากการทำ multiple alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ YHV protease และโปรตีนเอสชนิดอื่นๆ เป็นเหมือนกุญแจสำคัญในการหา homology modeling และจะต้องระมัดระวังต่อการหาลักษณะโครงสร้างเป้าหมาย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ YHV protease ให้ได้ประสิทธิภาพและใช้โครงสร้างเพื่อทำนายจากโปรแกรมออนไลน์ ใน YHV protease การค้นหาโครงสร้างของโปรตีนที่คล้ายคลึงกับ YHV protease จากฐานข้อมูลไม่พบว่ามีเหมือนกันทั้งหมดหรือรูปแบบที่สมบูรณ์ และไม่ได้ค่า identities/similarities ที่น่าเชื่อถือต่อการเป็นลักษณะโครงสร้างของ YHV protease แท้จริงได้ จึงได้ทำนายโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนชนิดนี้ ว่าอาจจะมีบริเวณอนุรักษ์ที่สำคัญต่อการมีวนพับของโปรตีนเช่นเดียวกับโปรตีนเอสชนิดอื่นๆ และเพื่อการยอมรับถึงการพัฒนาวិธีการนี้ต่อการค้นหาโครงสร้างโปรตีนเป้าหมายด้วยการทำดั่งวิธีการข้างต้น รูปแบบเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษาเพื่อคัดเลือกบริเวณที่คล้ายคลึงกันมากที่สุด ใน 2 domain ของ antiparallel (alpha-barrel fold ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็น trypsin like protease) จากโครงสร้างนี้มีการแสดงตำแหน่งที่จำเพาะกับลำดับกรดอะมิโนของ YHV protease อยู่ในวงระหว่าง 14-20% ของตำแหน่งที่เปรียบเทียบ การคัดเลือก template จากทั้ง 3 cysteine protease คือ tobacco etch virus (pdb entry 1LVM) , rhinovirus (entry 1CQQ), hepatitis A virus (entry 1HAV) , และจาก non-viral protease ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ bovine trypsin (entry 5PTP), prctease domain of human factor B (entry 1DLE), epidermolytic toxin B from *Staphylococcus aureus* (entry 1AGJ), lysine-specific protease I from *Achromobacter lyticus* (entry 1ARB), และ trypsin-like folded human heparin binding protein (entry 1A7S)

หลังจากที่ได้ค่าพลังงานต่ำสุดของ homology model ผลจาก Ramachandran plot แสดงผลมากกว่า viral cysteine protease ซึ่ง atomic coordinated ของ catalytic triad residue คือ His³⁰, Asp(Glu)⁷⁰ และ Cys¹⁵² ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์มากที่สุดสำหรับ C-type cysteine protease (Yellow head A virus) บ่งชี้ให้เห็นถึงลักษณะโครงสร้าง YHV protease จากกระบวนการ docking ผลที่ได้พบว่า โครงสร้างของ ligands ทั้งหมด 1,523 โครงสร้างที่ได้จากฐานข้อมูล เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม docking

พบว่าสามารถเกิดการจับกันระหว่าง YHV protease ที่ทำนายที่บริเวณรอบๆ Cysteine residues C¹⁵² ดัง

ภาพที่ 8

	1	10	20	30	40	50	60
YHV_Protease							S
PDB_HVM	G	F	S	L	F	K	G
PDB_ICQQ		G	F	E			
PDB_IHAV		S	T	L			E
PDB_IARB		G	V	S		G	S
PDB_IAGI		E	V	S	A	E	E
PDB_SPTP					I	V	
PDB_IDLE						C	G
PDB_IA7S					I	V	

	70	80	90	100	110	120
YHV_Protease	Q	F	K	T	N	F
PDB_HVM	N	P	I	S	T	I
PDB_ICQQ	M	S	L	K	H	N
PDB_IHAV	G	L	V	R	K	N
PDB_IARB	R	D	I	I	R	A
PDB_IAGI	K	P	Y	N	T	I
PDB_SPTP	V	P	V	Q	S	L
PDB_IDLE	Q	P	W	A	K	I
PDB_IA7S	F	P	F	L	A	S

	130	140	150	160	170	180
YHV_Protease	V	G	E	R	G	D
PDB_HVM	Q	S	L			
PDB_ICQQ	D					
PDB_IHAV	N	R	G			
PDB_IARB	I	W	N	Y	Q	N
PDB_IAGI	R	P	S	I	N	D
PDB_SPTP	R	L	G	E	D	N
PDB_IDLE	S	V	G			
PDB_IA7S	V	L	G	A	Y	D

	190	200	210	220	230	240
YHV_Protease	C	T	D	N	L	T
PDB_HVM	G	R	D	M	I	I
PDB_ICQQ	K	L	E	I	T	V
PDB_IHAV	F	Q	D	V	V	K
PDB_IARB	A	T	S	D	F	T
PDB_IAGI	G	V	D	I	A	L
PDB_SPTP	N	T	L	N	D	I
PDB_IDLE	P	F	F	V	D	V
PDB_IA7S	Q	Q	N	L	N	D

	250	260	270	280	290	300
YHV_Protease	D	S	F	F	A	E
PDB_HVM	R	E	E	R	I	C
PDB_ICQQ	D	V	P	N	O	L
PDB_IHAV	L	N	K	L	A	T
PDB_IARB	V	P	G	A	I	B
PDB_IAGI	K	D	G	D	E	L
PDB_SPTP	S	A	G	T	Q	L
PDB_IDLE	A	Q	D	I	K	A
PDB_IA7S	E	A	G	T	R	C

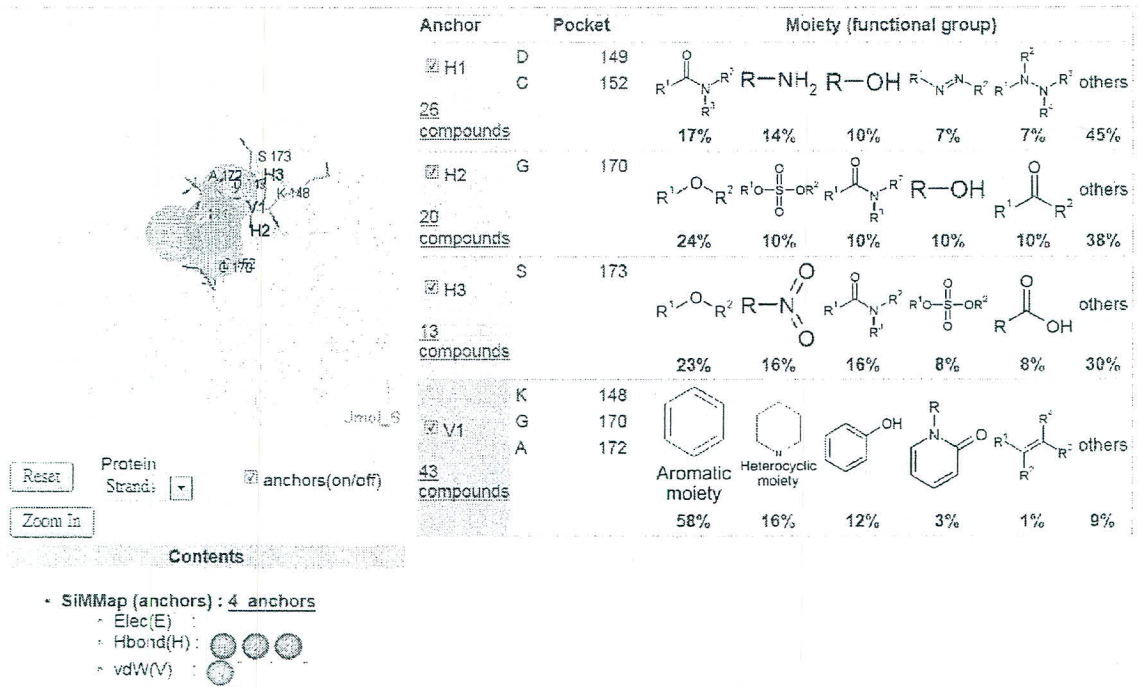
	310	320	330	340	350	360
YHV_Protease	V	G	S			
PDB_HVM	S	S	D			
PDB_ICQQ	Y	G	N	I	L	L
PDB_IHAV	F	E	E	A	T	V
PDB_IARB	G	A	G	T		
PDB_IAGI	S					
PDB_SPTP	G	O	I	T	S	
PDB_IDLE	S	E	V	V	T	
PDB_IA7S	R	P				

	370	380	390	400	410	420
YHV_Protease	G	A	H	V	G	I
PDB_HVM	V	G	I	H	S	A
PDB_ICQQ	L	G	I	H	V	G
PDB_IHAV	L	G	I	H	V	A
PDB_IARB	I	Q	L	H	G	G
PDB_IAGI	V	G	I	H	S	S
PDB_SPTP	Q	G	I	S	W	G
PDB_IDLE	V	G	I	S	W	G
PDB_IA7S	H	G	V	A	S	F

ภาพที่ 8

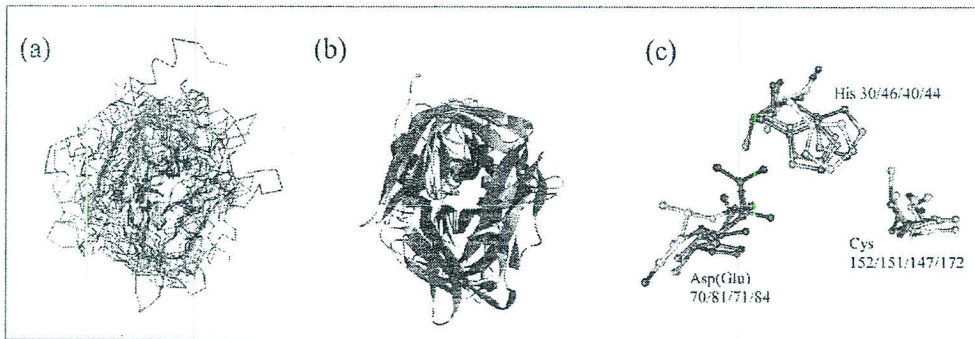
การวิเคราะห์บริเวณ catalytic cleavage pocket

การวิเคราะห์ตำแหน่ง pocket ของ YHV protease ใช้โปรแกรม POCASA web server ซึ่งมี 5 pocket ใน YHV protease ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 การวิเคราะห์บริเวณ catalytic cleavage pocket

โครงสร้างเปรียบเทียบของ YHV protease กับโปรตีนเอสทั้ง 8 ชนิด พบดังนี้ (1) ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิยึดตามการเปรียบเทียบได้อธิบายดังวิธีการข้างต้น โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการตอบสนองต่อการเป็นโครงสร้าง beta-strand และ alpha-helix แสดงดังสีเขียวและสีแดงตามลำดับ ซึ่งบริเวณ catalytic triad residues บ่งชี้ให้เห็นในบริเวณสีเหลืองพื้นผ้า (2) C alpha-wire แสดงโครงสร้างที่มีการเปรียบเทียบที่เหมือนกันทั้ง 8 template ซึ่งเป็นบริเวณแสดงดังสีเขียวและสีแดงตามลำดับ (3) จาก ribbon diagram มีเพียงบริเวณ catalytic triad และ His/Asp(Glu/Cys) แสดงในวงกลมและ stick model ตำแหน่ง C alpha atom ของ YHV protease 1LVM, 1CQQ และ 1HAV ถูกแสดงในสีเขียว สีส้ม ชมพู และเหลืองตามลำดับ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 โครงสร้าง (a) C_{α} -wire แสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างของ homology model ที่ใช้ต้นแบบ 8 ชนิด บริเวณที่มีโครงสร้างชนิด β -strand และ α helical นั้นแสดงไว้ด้วยสีเขียวและสีแดง (b) Ribbon diagram ของ YHV protease เมื่อเปรียบเทียบกับ viral cysteine proteases (entry 1LVM, 1CQQ and 1HAV) (c) แสดงตำแหน่ง catalytic triad His/Asp (Glu)/Cys ในรูปแบบ ball & stick model. ส่วนที่เป็น C_{α} atom ของ YHV protease, 1LVM, 1CQQ และ 1HAV นั้นแสดงไว้เป็นสีเขียว สีส้ม สีชมพูและสีเหลืองตามลำดับ

2. การทำ docking เทียบกับ ligand ใน NCI database

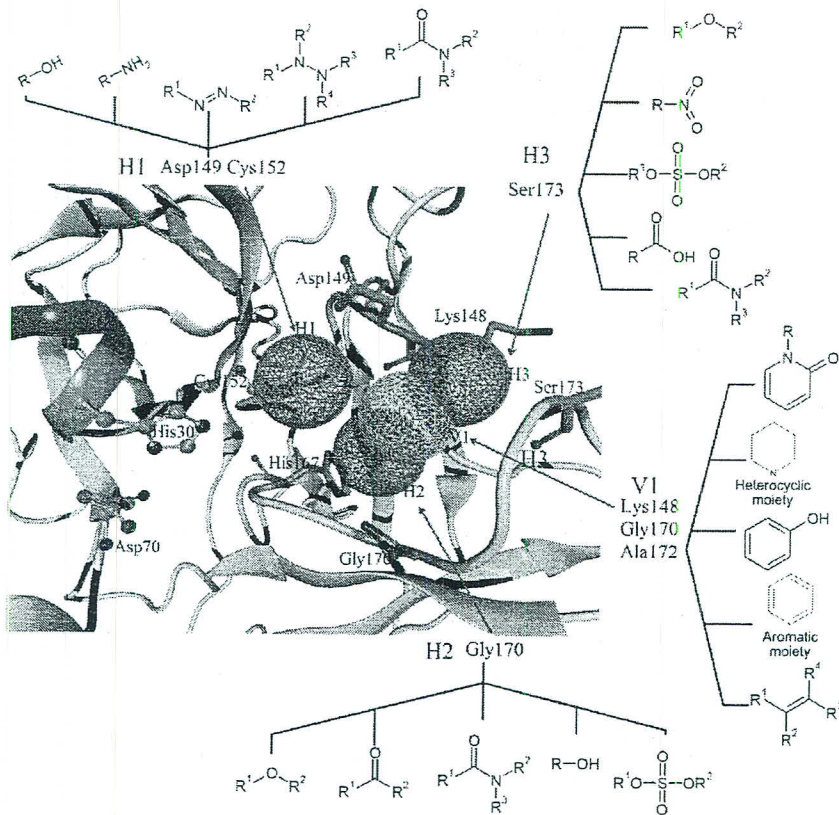
สารประกอบทั้งหมด 1,364 ชนิดที่มีอยู่ใน NCI diversity II database นั้นจะถูกนำมา dock ในโครงสร้างจำลองสามมิติของ YHV protease ที่ได้จำลองขึ้นไว้ โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FRED และ SiMMap server (<http://simmap.life.nctu.edu.tw/>) เพื่อคำนวณความน่าเชื่อถือของการเข้าจับกันระหว่าง ligand และ YHV protease ทั้งนี้ โปรแกรม SiMMap server นั้น จะใช้เพื่อจำแนกบริเวณที่เกิดพันธะระหว่าง ligand และตำแหน่ง side chain ของกรดอะมิโนที่อยู่รอบๆบริเวณ binding site (ภาพที่ 11)

ผลจากการวิเคราะห์เบื้องต้น พบสารประกอบทั้งหมด 43 ชนิด ที่สามารถสร้างพันธะกับ binding site ของ YHV protease ได้ ดังนั้นจึงแบ่งชนิดของสารประกอบดังกล่าวออกเป็น 3 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสารประกอบจำนวน 32 ชนิด ที่สามารถสร้างพันธะ hydrogen bond กับกรดอะมิโนที่บริเวณ catalytic cleft และ/หรือ pocket A ได้ นอกจากนี้ สารประกอบดังกล่าวสามารถเกิด cation- π และ π - π interactions กับกรดอะมิโนที่กล่าวมาข้างต้นได้ เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างแล้วพบว่า สารประกอบในกลุ่มนี้ มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย aromatic nucleus และมี peptide-bond-like structure ($\text{R}^1-\text{N}=\text{N}-\text{R}^2$) จึงทำให้โครงสร้างนั้นคล้ายคลึงกับ peptide bond

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสารประกอบเพียงสองชนิดเท่านั้น และสารทั้งสองสามารถสร้างพันธะ cation-p interaction ได้

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสารประกอบที่มีส่วน core structure ที่มีโครงสร้างหลากหลาย ซึ่งมีทั้งสิ้น 7 ชนิด ซึ่งทุกชนิดจะมีพันธะกับกรดอะมิโนที่บริเวณ catalytic cleft และ/หรือ pocket A ได้อย่างอ่อนๆ เช่น van der Waal เท่านั้น



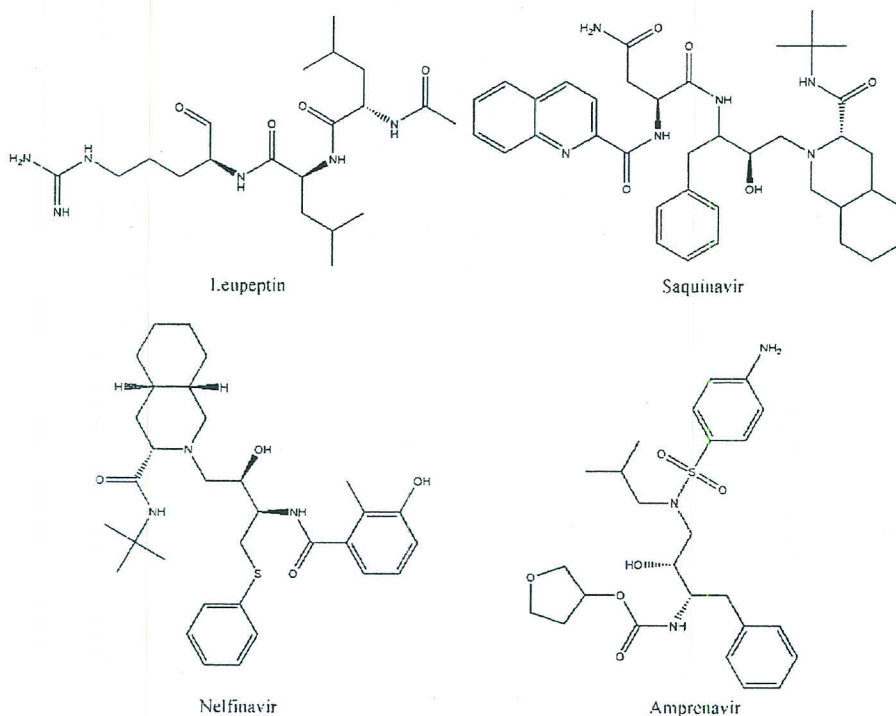
ภาพที่ 11 บริเวณ Catalytic triad ของบริเวณ active site ของ YHV protease แสดงด้วย pink balls และ sticks ตำแหน่งที่เกิด peptide binding site ทรงกลมสีเขียวและสีเทา แสดงบริเวณที่เกิด hydrogen-bond และ van der Waal

ตารางที่ 1 ค่า Docking score และ estimated inhibition constant ของสารประกอบที่อยู่ในกลุ่ม
ที่ 1 (คำนวณโดย AutoDock4)

NSC no.	AutoDock4 scores	Estimated Inhibition
	(Estimated Free Energy of Binding) kcal/mol	Constant, Ki [Temperature = 298.15 K]
122819	-8.26	883.02 nM
345647	-7.72	2.20 uM
319990	-7.53	3.00 uM
24951	-7.3	4.47 uM
91397	-7.3	4.49 uM
219894	-7.2	5.26 uM
91368	-7	7.38 uM
158413	-6.99	7.49 uM
5157	-6.92	8.49 uM
45384	-6.82	10.09 uM
50650	-6.76	11.14 uM
5069	-6.55	15.94 uM
91378	-6.54	16.20 uM
58052	-6.35	22.29 uM
67436	-6.35	22.16 uM
211490	-6.3	24.10 uM
45383	-6.14	31.50 uM
36525	-6.11	33.42 uM
132232	-6.1	33.65 uM
133073	-6.07	35.58 uM
83950	-6.05	36.45 uM
13051	-6.04	37.21 uM
201631	-5.89	48.01 uM
81750	-5.57	82.08 uM
29858	-5.36	118.28 uM
5856	-5.36	118.18 uM
73735	-5.29	131.71 uM
78676	-5.28	135.09 uM
47722	-4.9	256.05 uM
65537	-4.77	320.65 uM
19803	-4.59	431.37 uM
156563	-4.42	573.24 uM

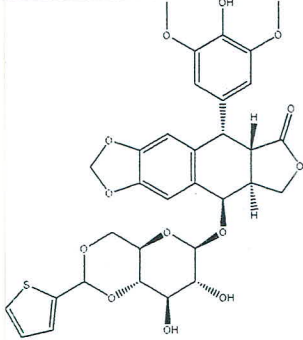
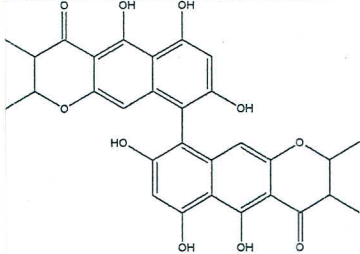
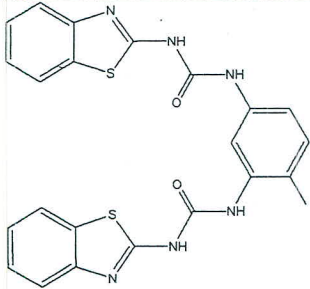
จากผลข้างต้น โครงสร้างของสารประกอบที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด จึงนำมาเปรียบเทียบกับ protease inhibitor ที่มีการใช้งานกันอยู่ในปัจจุบัน เช่น Leupeptins, Saquinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Indianavir, Amprenavir, Lopinavir, Chymostatins, Antipain, Elastinal, β -MAPI เป็นต้น ซึ่งพบสิ่งที่น่าสนใจคือ โครงสร้างที่วิเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้ มีความคล้ายคลึงกับ protease inhibitor ชนิดอื่นๆ เช่น ประกอบด้วย aromatic nucleus และมี peptide-bond-like structure (เปปไทด์) (ภาพที่ 12)

ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 สารประกอบที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด 32 ชนิดนั้น มีเพียง 11 ชนิดเท่านั้นที่สามารถสร้างพันธะและคงอยู่ใน บริเวณ catalytic cleft และ/หรือ pocket A ได้ด้วยพันธะ hydrogen bond ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ได้แก่ NSC. 122819, 132232, 19803, 29858, 319990, 345647, 47722, 50650, 5069, 5856, and 67436 (ตารางที่ 2)

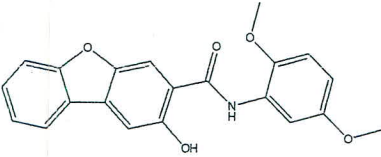
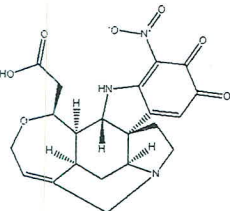
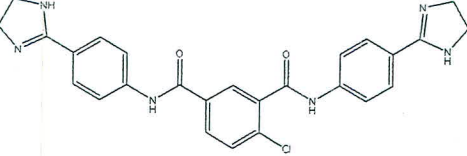
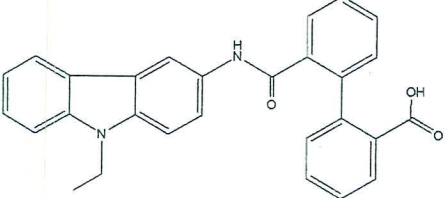


ภาพที่ 12 โครงสร้างของ protease inhibitor ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน โครงสร้างส่วนใหญ่จะประกอบด้วย aromatic nucleus และมี peptide-bond-like structure

ตารางที่ 2 สารประกอบ 11 ชนิดที่สามารถสร้างพันธะ hydrogen ได้กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณ catalytic cleft และ/หรือ pocket A

NSC no.	Two dimensional structure	PubChem CID	ChEMBL ID
122819		34698	1237078
345647		53277	162783
319990		330740	1578626

ตารางที่ 2 สารประกอบ 11 ชนิดที่สามารถสร้างพันธะ hydrogen ได้กับกรดอะมิโนที่อยู่ บริเวณ catalytic cleft และ/หรือ pocket A (ต่อ)

NSC no.	Two dimensional structure	PubChem CID	ChEMBL ID
50650		67239	1561747
5069		221125	-
67436		249307	1578626
132232		280492	1172912

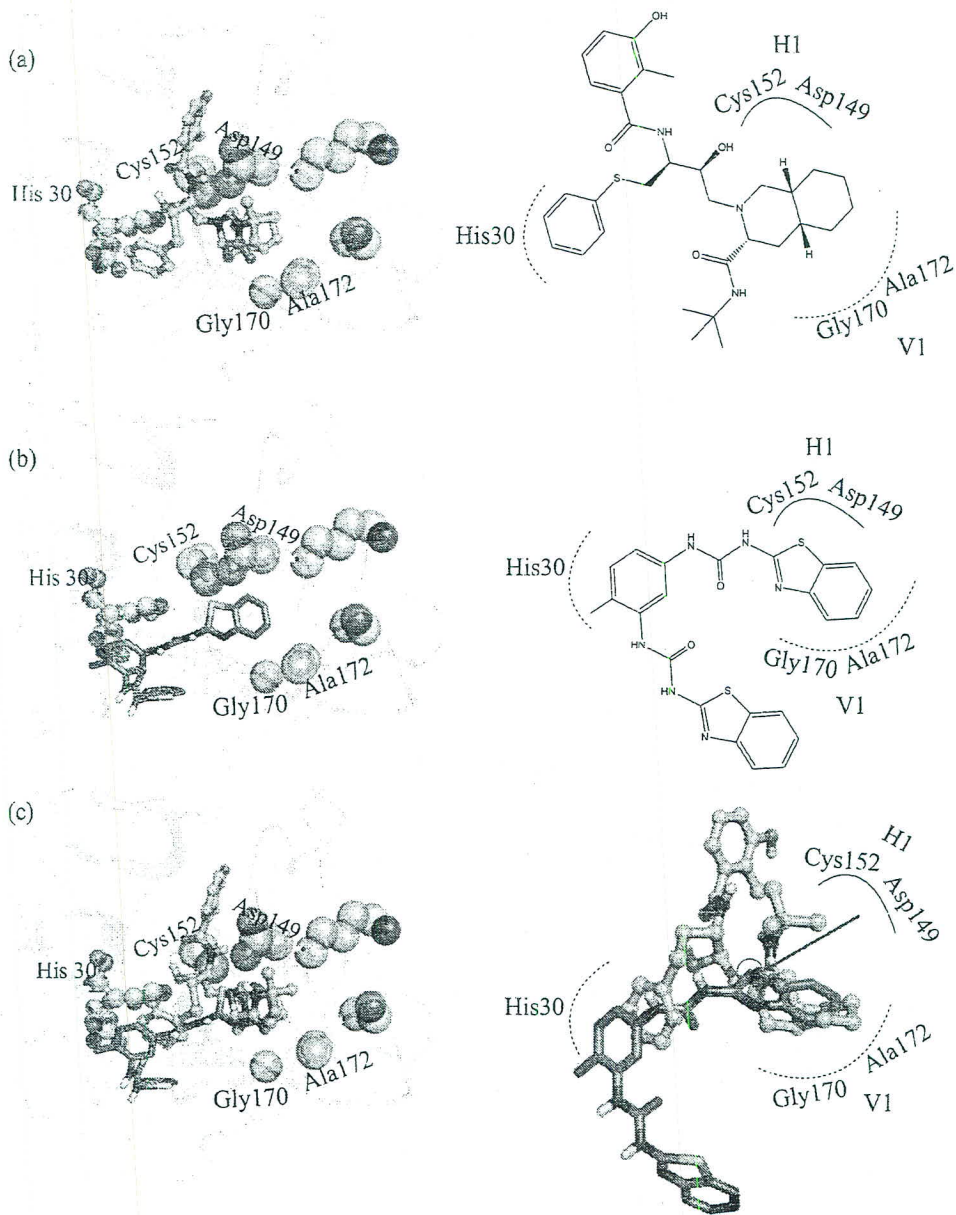
ตารางที่ 2 สารประกอบ 11 ชนิดที่สามารถสร้างพันธะ hydrogen ได้กับกรดอะมิโนที่อยู่ บริเวณ catalytic cleft และ/หรือ pocket A (ต่อ)

NSC no.	Two dimensional structure	PubChem	ChEMBL
		CID	ID
29858		232432	1326032
5856		3361436	1426572
47722		24674	1602553
19803		5281673	454576

ดังนั้น จึงได้ศึกษา mode of action ของสารประกอบ (ligand) ดังกล่าวในเชิงลึก โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่าง Nelfinavir ซึ่งเป็น protease inhibitor ที่ทราบการทำงานแล้ว และสารประกอบ NSC319990 ซึ่งเป็นสารที่ได้ทำนายให้ค่า docking score กับหมู่ carboximide ได้ป็นอันดับที่สาม โดยวิเคราะห์ hydrogen bond ทิศทางในการวางตัวของสารทั้งสองใน YHV protease ซึ่งผลจากขั้นตอนนี้ (Post-docking analysis) พบว่า โครงสร้างของ YHV protease และสารประกอบมีการเข้าจับกันจริง (ภาพที่ 13) ซึ่งพบว่า การเกิด interaction กันจริง ซึ่งจำแนกได้ดังนี้

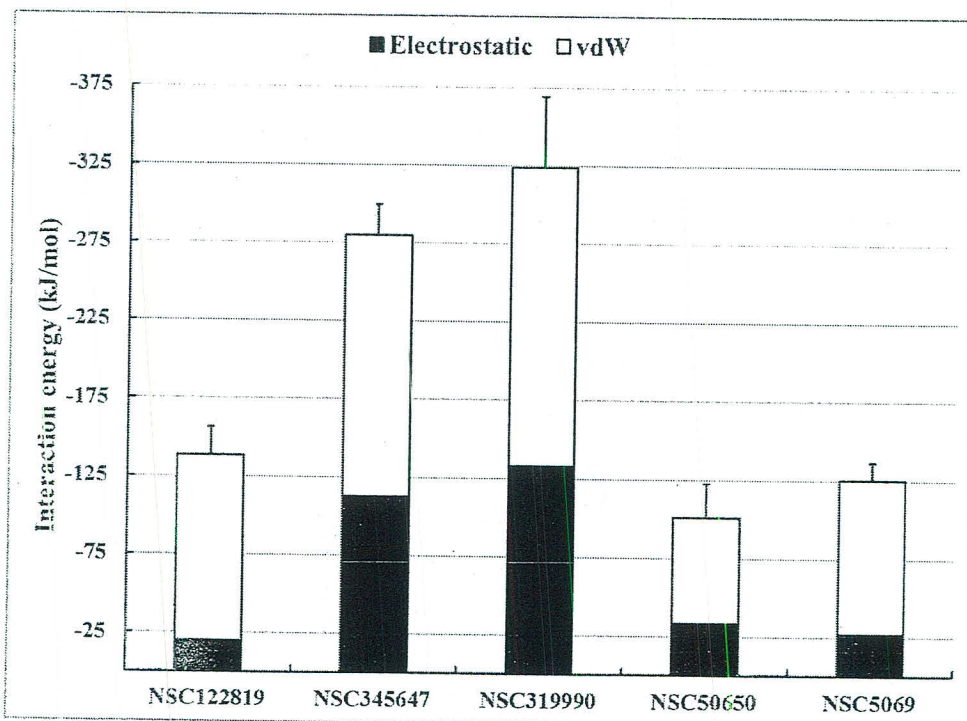
1. พบการเกิด interaction ชนิด π - π interaction ใน 6-membered aromatic ring และ His30 ที่เป็นส่วนหนึ่งของ catalytic triad
2. เกิด dipole-dipole electrostatic interaction ระหว่างสารประกอบและตำแหน่งกรดอะมิโน (binding residue) ใน Pocket A คือ Asp149 และ Cys152 โดยพบว่าเกิด negatively dipole และเกิด nucleophile ที่ตำแหน่ง N-atom ของ decahydroisoquinoline ของสาร Nelfinavir และ S-atom of benzo(d)thiazole ของ NSC319990 เพื่อสร้าง interaction กับ thiol group ของ Cys152 หรือหมู่ carboxylic group ของ Asp149
3. เกิด van der Waals interactions ระหว่าง Gly170 และ Ala172 ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า *V1 anchor*

จากข้อมูลข้างต้นสามประการ จึงอนุมานได้ว่า สารประกอบที่ทำนายว่าสามารถเข้าจับกับ YHV protease ในส่วน active site ได้นี้ น่าจะทำหน้าที่เสมือน protease inhibitors เช่นเดียวกับที่ Nelfinavir ได้ทำไว้ ทั้งนี้สารประกอบที่พบสามารถสร้าง hydrogen bond ที่แข็งแรงกับกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบใน active site (binding pocket)



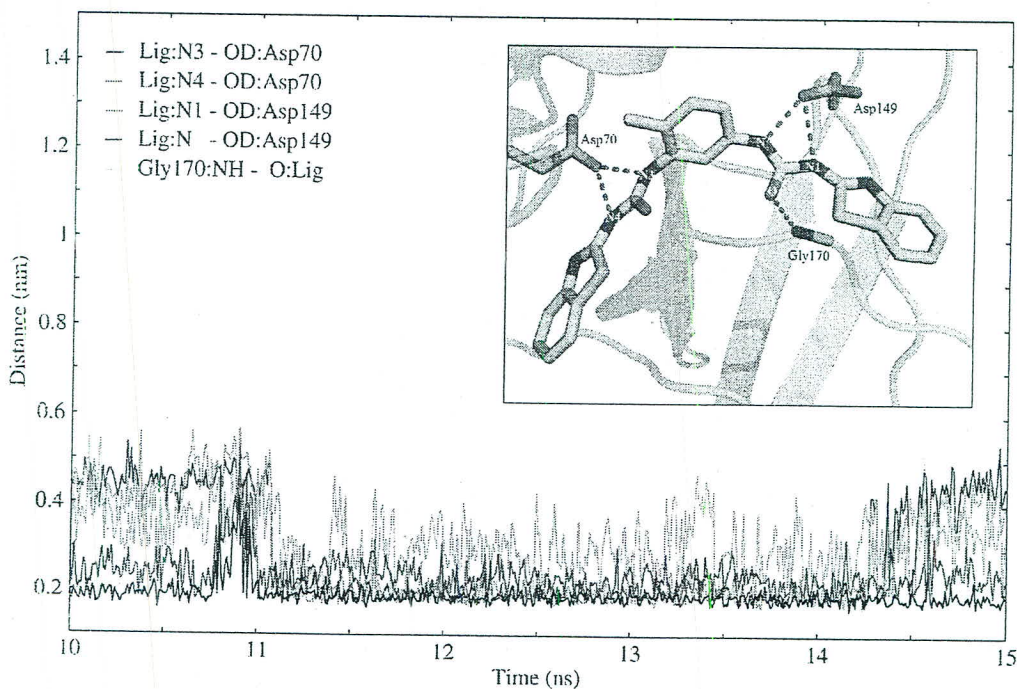
ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบการเกิดพันธะภายในระหว่าง a) protease inhibitor ที่ทราบหน้าที่แล้ว (Netfinavir) และ b) ทิศทางการเรียงตัวของ NSC319990 ใน binding site ของ YHC protease โดยแสดงในภาพ 2D แล 3D และ C) การเปรียบเทียบแบบ superimpose structures

ในการศึกษาความเสถียรของโครงสร้าง YHV protease-ligand complex นั้น จะวิเคราะห์จากการวิเคราะห์ด้วย MD simulation โดยใช้การศึกษาพลังงานของโครงสร้างระหว่าง YHV protease ที่มีสารประกอบที่มีค่าการคำนวณ docking energy ต่ำสุด 5 ชนิดคือ NSC122819, NSC345647, NSC319990, NSC50650, and NSC5069 เข้าจับ (ภาพที่ 14) และแสดงผลในรูปของค่าพลังงาน potential energy ของการเกิด interaction ระหว่างสารประกอบและเอนไซม์ หรือ electrostatic และ van der Waals (vdW) energies โดยกำหนดให้ศึกษาในช่วงระยะเวลา 5 ns ของการ simulation (ภาพที่ 15) ทั้งนี้ในการวิเคราะห์สารประกอบทุกชนิดพบว่าแรง van der Waals (vdW) นั้นเกิด interaction ได้ดีกว่า electrostatic interactions เสมอ นอกเหนือไปจากนี้ NSC345647 และ NSC319990 มีค่าพลังงานเด่นชัดที่สุด ซึ่งการวิเคราะห์นี้ให้ผลที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ docking



ภาพที่ 14 Potential energies ของการเกิด interaction ระหว่างเอนไซม์ YHV protease และสารประกอบที่เข้าจับได้ดีที่สุดทั้ง 5 ชนิด ค่า electrostatic และ van der Waals (vdW) energies แสดงไว้ด้วยสีดำและสีขาวตามลำดับ Error bars แสดงถึงค่า standard deviation จากผลรวมของการเกิด interaction

ในตารางที่ 3 แสดงถึงรายละเอียดของ interaction pair และ percentage of occupancy ได้วิเคราะห์ให้เห็นว่าสารประกอบที่สามารถสร้าง Hydrogen bond ได้ดีที่สุดนั่นคือ NSC345647 และ NSC319990 ซึ่งการวิเคราะห์นี้ให้ผลที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ docking เช่นเดียวกัน และเมื่อวิเคราะห์การเกิด interaction ของ NSC319990 เองนั้น พบว่า สารประกอบดังกล่าว สามารถสร้าง interaction แบบ hydrogen bond กับกรดอะมิโนที่อยู่ใน catalytic triad ของเอนไซม์ protease ได้ (ภาพที่ 15) จะเห็นได้ว่าการเกิด interaction พันธะที่เสถียรและมี bond occupancy สูงสุด (95.8% และ 69.5%) โดย interaction ดังกล่าวเกิดขึ้นระหว่างสารประกอบที่ตำแหน่ง N3 และ N4 และกรดอะมิโน Asp70 เอนไซม์ YHV protease นอกเหนือไปจากนี้ ตำแหน่ง Asp149 (ใน pocket A) ยังสามารถสร้างพันธะ hydrogen bond กับ N-atom ของสารประกอบได้เช่นเดียวกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้างต้นนี้สามารถสรุปได้ว่า NSC319990 นั้นสามารถเข้าจับกับ YHV protease สามารถนำไปใช้วิเคราะห์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในหลอดทดลองได้

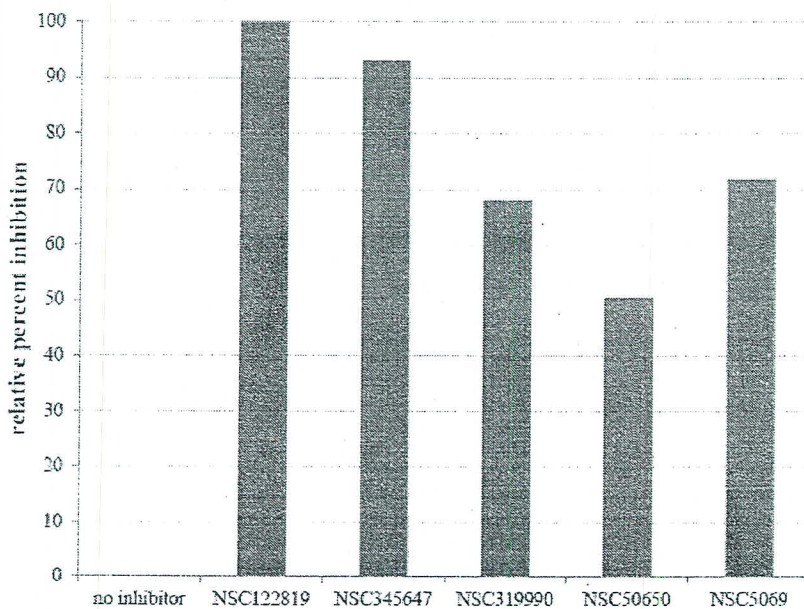


ภาพที่ 15 การเกิด interaction ระหว่างสารประกอบ NSC319990 และ YHV protease ส่วนของสารประกอบในภาพ แสดงในรูปของ Stick (C atom ใช้สีบานเย็น) บริเวณที่เกิดพันธะระหว่างสารประกอบและกรดอะมิโน (Asp70, Asp149 และ Gly170) ได้ระบุไว้ในภาพ พันธะ H-bond แสดงไว้ด้วยเส้นประสีชมพูเข้ม

ตารางที่ 3 List of hydrogen bonds of the YHV protease - hit compound interactions extracted during the last 5 ns from each complex simulation.

Complex	Residue atom		Ligand atom	% occupancy
NSC122819	Ala172:NH	-	O11:Lig	31.5
	Ala172:NH	-	O12:Lig	6.7
NSC345647	Lys29:Nz	-	O1:Lig	< 1
	Asn33:Od	-	O6:Lig	< 1
	Lys34:Nz	-	O4:Lig	2.4
	Asp149:Od	-	O4:Lig	43.3
	Ile168:CO	-	O5:Lig	3.0
	Gly170:NH	-	O8:Lig	42.3
	Gly170:CO	-	O8:Lig	< 1
NSC319990	His30:Nd	-	N3:Lig	< 1
	Ser67:Og	-	O1:Lig	3.7
	Asp70:Od	-	N3:Lig	95.8
	Asp70:Od	-	N4:Lig	69.5
	Asp149:NH	-	N2:Lig	3.2
	Asp149:Od	-	N1:Lig	63.4
	Asp149:Od	-	N:Lig	61.6
	Gly170:NH	-	O:Lig	19.4
	Gly170:NH	-	N1:Lig	1.8
	Gly170:NH	-	N2:Lig	< 1
NSC50650	Arg133:Ne	-	O1:Lig	21.3
	Arg133:Ne	-	N:Lig	< 1
	Arg133:Nh	-	O1:Lig	< 1
	Gly135:NH	-	O2:Lig	5.6
	Ser136:Og	-	O:Lig	< 1
NSC5069	Lys148:Nz	-	O3:Lig	< 1
	Asp149:NH	-	O2:Lig	< 1
	Asp149:NH	-	O3:Lig	76.7
	Asp149:NH	-	O4:Lig	5.5
	Gly170:NH	-	O2:Lig	3.4
	Ser173:NH	-	O5:Lig	2.1
	Ser173:NH	-	N2:Lig	< 1
	Ser173:Og	-	O:Lig	< 1
	Ser173:Og	-	O1:Lig	< 1
	Ser173:Og	-	O5:Lig	< 1

ในการวิเคราะห์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ YHV protease ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้สารประกอบที่คัดเลือกแล้วว่า ให้ผลการเข้าจับกับบริเวณ active site ของเอนไซม์ได้ดีที่สุดนั้น จำนวนทั้งสิ้น 5 ชนิด ซึ่งใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ดังกล่าวที่ผลิตในแบคทีเรีย (ขั้นตอนที่ 1) มาใช้วิเคราะห์ ทั้งนี้ สารประกอบนั้น ได้รับความอนุเคราะห์จาก NCI (National Cancer Institute, USA) ซึ่งผลการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ YHV protease เมื่อมีสารประกอบอยู่ด้วยจะถูกนำมาคำนวณเป็น relative inhibition (ภาพที่ 16) พบว่า สารประกอบ NSC122819 และ NSC345647 นั้น สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ YHV protease ในหลอดทดลองได้ดีที่สุดในขณะที่ NSC319990, NSC50650 และ NSC5069 ก็สามารถยับยั้งได้ประมาณ 50% ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า NSC122819 นั้นเป็นสารประกอบที่สามารถนำมาใช้งานเพื่อยับยั้งการทำงานของ YHV protease ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า คอมพิวเตอร์สามารถใช้ในการทำนายโครงสร้างของสารประกอบที่สามารถเข้าจับส่วน active site ของ YHV protease ได้ ซึ่งมีการทดสอบยืนยันการทำงานของสารประกอบดังกล่าวที่มีผลต่อ YHV protease ในหลอดทดลอง ดังนั้น จึงสามารถนำวิธีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันหรือยับยั้งโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์น้ำได้อีกวิธีหนึ่ง



ภาพที่ 16 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ YHV protease ด้วยสารประกอบที่คัดเลือกว่ามีคุณสมบัติในการเข้าจับส่วน active site ของโปรตีนดังกล่าวได้ดีที่สุด 5 ชนิด โดยวิธี fluoroscopic assay