บทที่ 5

สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

การแสดงออกรีคอมบีแนนท์ YHV 3CLP ในระบบแบคทีเรียมีการแสดงออกของ GST fusion YHV3CLP ขนาดโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน และแยกบริสุทธิ์ด้วย GST-sepharose เป็นการแยกบริสุทธิ์เพียงบางส่วน เพื่อนำมาใช้ทดสอบ YHV protease activity ในหลอดทดลอง เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ YHV3CLP ด้วย FRET assay พบว่ามีกิจกรรมต่อสับเสตรทสังเคราะห์สามารถวิเคราะห์หาจนลศาสตร์ของเอนไซม์เบื้องต้นได้ จึงใช้โปรตีนดังกล่าวในการ screen หา aptamer จากการวิเคราะห์ Aptamer ที่ได้ สามารถพบ aptamer ที่ซ้ำกันได้ 3 ชนิดจากการ screening จำนวน 6 รอบ ซึ่ง aptamer ที่พบนั้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกันคือ TYYGYGGSA ~ CCHGT ~ GG ~ GA ดังนั้นจึงคาดว่าจะสามารถนำ aptamer ดังกล่าวไปวิเคราะห์หา affinity ในการจับกับ YHV protease ต่อไป

เนื่องจากเป้าหมายในงานวิจัย มุ่งเน้นไปในการหาสารยับยั้งการทำงานของ YHV protease ดังนั้น ผศ.ดร.เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล จึงได้เสนอให้ค้นหาสารประกอบที่สามารถยับยั้งการทำงานของ YHV protease โดยการทำนายจากโครงสร้างสามมิติของ YHV protease จากการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของโปรตีน YHV3CLP จากไวรัสหัวเหลืองด้วยโปรแกรมทางด้าน ชีวสารสนเทศพบว่า เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติของโปรตีน YHV3CLP จากไวรัสหัวเหลืองกับ Protease ที่มีอยู่ใน Protein Data Bank (PDB) พบว่า โครงสร้างสามมิติของโปรตีนชนิดนี้มีความใกล้เคียงกันกับโครงผลึกโปรตีเอส 8 ชนิด คือ 3 cysteine protease; tobacco etch virus (pdb entry 1LVM), rhinovirus (entry 1CQQ), hepatitis A virus (entry 1HAV), และ non-viral protease 5 ชนิด ได้แก่ bovine trypsin (entry 5PTP), protease domain ของ human factor B (entry 1DLE), epidermolytic toxin B จาก *Staphylococcus aureus* (entry 1AGJ), lysine-specific protease I จาก *Achromobacter lyticus* (entry 1ARB), และ trypsin-like folded human heparin binding protein (entry 1A7S) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนต่อการม้วนพับของโปรตีน YHV3CLP พบว่า มีการแสดงโครงสร้างเป็น viral cysteine protease ซึ่ง atomic coordinated ของ catalytic triad residue คือ His^{30}, $Asp(Glu)^{70}$ และ Cys^{152} ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์มากที่สุดสำหรับ C-type cysteine protease ดังนั้นจึงได้นำโครงผลึกที่ทำนาย

ได้เพื่อเป็นตัวแทนของโครงสร้างสามมิติต่อการมาวิเคราะห์คุณสมบัติการจับกันกับสารประกอบจาก NCI เพื่อค้นหาความสามารถของการจับกันด้วยโปรแกรม docking

ผลจากการการวิเคราะห์ ด้วยโปรแกรม docking พบสารประกอบจำนวน 11 ชนิดที่สามารถสร้างพันธะ hydrogen ได้กับกรดอะมิโนที่อยู่ บริเวณ catalytic cleft และ/หรือ pocket A ได้ ซึ่งพันธะดังกล่าวมีความแข็งแรง จึงคาดว่าจะทำให้สารประกอบคงอยู่ในบริเวณ catalytic cleft และ/หรือ pocket A ได้นานขึ้น ซึ่งหมายถึงว่า สามารถยับยั้งการทำงานของ YHV protease ได้ดีขึ้น เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารที่ค้นหาได้ เปรียบเทียบกับโครงสร้างของ protease inhibitor ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน พบว่ามีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ประกอบด้วยส่วน aromatic nucleus และมี peptide-bond-like structure (ภาพที่) จึงทำให้โครงสร้างนั้นคล้ายคลึงกับ peptide bond ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเอาสารประกอบดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งการทำงานของ YHV protease พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protease ได้จริงในหลอดทดลอง ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงเป็นแนวทางวิจัยและแนวปฏิบัติในการป้องกันโรคในสัตว์น้ำต่อไป