

วิธน์ สุวรรณทัต : ความผันแปรในส่วนกลางของยีนเอปิคอลเมมเบรนแอนติเจนที่ 1 จากผู้ป่วยในจังหวัดตากที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม. (VARIATION IN THE CENTRAL PART OF THE APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 GENE FROM *PLASMODIUM FALCIPARUM*-INFECTED PATIENTS IN TAK PROVINCE) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์ หน้า. ISBN 937-03-1086-9

เอปิคอลเมมเบรนแอนติเจนที่ 1 (AMA-1) ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* เป็นโปรตีนที่พบมากบริเวณ apical complex ของระยะ merozoite โปรตีนชนิดนี้ถูกเคลื่อนย้ายมายังผิวของ merozoite ตั้งแต่ระยะที่ schizont กำลังมีการเจริญเติบโตจนเป็นระยะ merozoite ข้อมูลเกี่ยวกับ AMA-1 ที่ผ่านมาทั้งที่ได้จากการศึกษาในหลอดทดลอง และในสิ่งมีชีวิต ชี้ให้เห็นว่า AMA-1 เป็นเป้าหมายหนึ่งในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย จากการวิเคราะห์โครงสร้าง พบว่าประกอบด้วยส่วนย่อย 5 ส่วนได้แก่ เปปไทด์สัญญาณ (signal- peptide), โดเมนที่ 1, 2, 3 และ ส่วนท้ายที่อยู่ในไซโตพลาสซึมซึ่งมีส่วนที่แทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane cytoplasmic tail) ถึงแม้ว่าจะไม่พบกรดอะมิโนเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุด ๆ ใน AMA-1 แต่ก็ยังพบการแทนที่ในบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์มากในสายพันธุต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่เป็น T-cell epitope ใน โดเมนที่ 1 เพื่อเป็นการศึกษาอย่างละเอียดเกี่ยวกับความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AMA-1 ในส่วน T-cell epitope จากผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในประเทศไทยที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ จึงทำการศึกษากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจำนวน 100 ราย จากจังหวัดตาก บริเวณของ AMA-1 ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีความยาวทั้งสิ้น 435 คู่เบส จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณดังกล่าวโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ 19 รูปแบบ ในจำนวนนี้มี 16 รูปแบบที่ไม่เคยพบจากการศึกษาใดมาก่อน นอกจากนั้นยังพบตำแหน่งที่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 25 ตำแหน่ง ในจำนวนนี้มี 10 ตำแหน่ง ที่ถูกแทนที่โดยนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้ง 25 ตำแหน่งนี้ ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปทั้งสิ้น ทั้งนี้ codon ที่มีการแทนที่ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 80 ) เป็นการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติการมีขั้ว และประจุที่แตกต่างไปจากกรดอะมิโนชนิดเดิม ดังนั้นรูปแบบของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณต่าง ๆ ที่เป็น T-cell epitope ที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้จึงมีตั้งแต่ 2 ถึง 9 รูปแบบ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนรูปแบบของบริเวณที่เป็น T-cell epitope ที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับ AMA-1 ในภูมิภาคอื่น ๆ พบว่ามี T-cell epitope 3 บริเวณ ที่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนไม่มาก ในขณะที่ T-cell epitope อีก 2 บริเวณมีจำนวนรูปแบบที่แตกต่างกันเพิ่มขึ้นเป็น 13 ถึง 23 รูปแบบ ด้วยเหตุนี้ความรู้เกี่ยวกับความผันแปรของลำดับกรดอะมิโนของ AMA-1 ที่ปรากฏในประชากรของเชื้อ *P. falciparum* ในธรรมชาติ จึงเป็นพื้นฐานสำคัญในการออกแบบวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่อาศัย AMA-1 เป็นองค์ประกอบ

KEY WORD: *PLASMODIUM FALCIPARUM* / APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1

VIT SUVANNADHAT: VARIATION IN THE CENTRAL PART OF THE APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 GENE FROM *PLASMODIUM FALCIPARUM*-INFECTED PATIENTS IN TAK PROVINCE.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES MD, Ph.D. 88 pp.

ISBN 937-03-1086-9

Apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum* is a merozoite protein localized to the apical complex and transported to the merozoite surface during schizont maturation. Several lines of evidences from *in vitro* and *in vivo* studies have suggested that AMA-1 is a promising candidate for a malaria vaccine. Although sequence analysis has revealed that AMA-1 lacks apparent repeats, nucleotide substitutions have been frequently identified among isolates. Importantly, clusters of nucleotide substitutions are found in domain I where a number of T-cell epitopes have been mapped. To gain insights into natural variation in these T-cell-epitope-encoding regions among Thai isolates, 100 *P. falciparum*-infected patients in Tak province were recruited in this study. The AMA-1 gene fragment, spanning 435 base pairs, from each isolate was amplified by the polymerase chain reaction, followed by direct sequencing. Results revealed that 19 distinct alleles were detected in this population, 16 of which were newly identified in this analysis. In total, 25 substituted nucleotides occurred, 10 of which were transitional changes. It is of note that all of these substitutions resulted in amino acid altering. Furthermore, the majority of substituted codon (80%) created radical amino acid replacements in terms of polarity and acid-base property. Consequently, the T-cell epitopes mapped in this region exhibited sequence variation ranging from 2 to 9 sequence types. Comparison with the AMA-1 sequences from diverse geographic origins has shown that a limited sequence variation occurred in 3 epitopes while 2 epitopes displayed extensive sequence polymorphism, containing 13 and 23 sequence types. Therefore, a rational design of an AMA-1-based vaccine should take into account the variation among natural *P. falciparum* populations.