Abstract

Human genomic variations can directly cause human diseases or affect them at various stages including disease susceptibility, pathological pathway, disease progression and severity, respond to treatment and recovery. It has been known that same human disease usually occurs from diverse causes and pathological processes attributable to marked genetic heterogeneity in different populations and individuals. Recently, compelling evidence suggests that rare mutations with severe effect are responsible for a substantial portion of complex human disease, and genetic heterogeneity is important at multiple levels of disease causation. Based on this information, we propose that complex human diseases in Thais are caused by rare mutations with severe effect of the responsible genes that possess genetic heterogeneity. Thus, it is necessary to directly investigate into etiologies and pathogeneses of these diseases in Thai patients to understand their natures and to design appropriate interventions. The availabilities of sequence information of human genome and powerful molecular biology techniques make it possible to conduct this investigation into the diseases that cause health and economic burdens to Thais. Our group has long-term experiences in the study of genetics and molecular biology of diabetes, kidney diseases, and dengue virus infection in Thais. We therefore take this advantage to focus our research interest in the investigation of these diseases by applying advanced technologies in genetics, genomics, and molecular biology. The results of five projects studied are reported.

Project I: Genetics/Genomics and Molecular Biology of Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease characterized by hyperglycemia. If it is untreated, DM will result in complications including retinopathy, nephropathy, neuropathy, and cardiovascular disease. Type 2 diabetes (T2D) is the most common, accounting for 90% of all DM patients. The monogenic T2D is classified as maturity-onset diabetes of the young (MODY), characterized by young age at onset with autosomal dominant inheritance. Identification of genes causing MODY and that influencing individual susceptibility to T2D leads to a better understanding of pathophysiology of diabetes. Our research group has shown that the six reported MODY genes account for a small proportion of MODY (19%) and early-onset T2D patients (10%) in Thais. We are the first group who identified the mutations and single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *PAX4* caused MODY9 and T2D susceptibility, respectively. In the continuing studies, our group aimed to examine whether genetic variations of such strong candidate genes as *TCF7L2*, *CAPN10*, *AdipoQ*, and *PAX4* genes are associated with T2D in Thais or not. We found that these genes, especially *PAX4*, are associated with T2D in Thai patients. We studied into details of *AdipoQ* and *PAX4* variants identified in Thai patients and reported the abnormal structures and functions of mutant adiponectin and PAX4 proteins expressed in cultured cell lines. We also employed genomic approaches using DNA microarrays and exome sequencing to identify novel genes causing MODY and early-onset T2D in Thai families. We have discovered novel genes, which will be soon reported.

In addition, we also investigated the protective mechanism of sex hormones (estrogen and testosterone) against glucotoxicity on β-cells to understand the roles of these hormones in protection of DM and to search for an alternative strategy for prevention and treatment of DM, especially in elderly. We demonstrated that estrogen significantly decreases not only oxidative stress but also endoplasmic reticulum (ER) stress to protect against high glucose-induced pancreatic β-cell death. Similarly, testosterone can protect against male pancreatic β-cell apoptosis from glucotoxicity via reduction of both oxidative stress and ER stresses.

Project II: Genetics/Genomics and Molecular Biology of Kidney Stone Disease

Kidney stone disease (KSD) is an important public health problem in the Northeastern (NE) population of Thailand. Its prevalence is 5-10% with several thousands of new cases hospitalized for treatment each year. The etiology and pathogenesis of KSD in the NE Thai population are unknown but the disease in this population seems to be unique from what has been reported in other ethnic groups because it is not associated with the conditions of increased urinary stone promoters, such as hypercalciuria, hyperoxaluria, and hyperuricosuria. Our group has recently reported an initial evidence suggesting a genetic contribution to KSD in the NE Thai population because it was found to have familial aggregation with a high relative risk (λ_R = 3.18) among members of the affected families. To investigate into the role of genetic factor in pathogenesis of KSD in the NE Thai population, we have employed multiple genetic/genomic approaches, such as candidate-gene association study, genome-wide association study (GWAS), and genome-wide linkage analysis using DNA microarrays to identify disease-susceptibility and disease-causing genes. We firstly conducted a candidate gene association study and found the association between KSD in Northeastern Thai patients and *prothrombin* (*F2*) gene. After sequencing the entire coding regions of *F2*, we identified one exonic non-synonymous single nucleotide polymorphism (nsSNP; rs5896; c.494 C>T) in exon 6 resulting in a T165M substitution. Our results indicate that prothrombin variant (T165M) is associated with KSD risk in the NE Thai female patients. The genome-wide association study (GWAS) by using DNA microarrays was also conducted. A SNP rs759330, located at a predicted microRNA binding site at 3'UTR of *PAQR6* – a gene encoding progestin and adipoQ receptor family member VI, was found to be associated with KSD, suggesting that *PAQR6* is a modifying gene for KSD. We also selected a large family with KSD (UBRS082) to perform a genome-wide linkage and exome sequencing. KSD phenotype was inherited as autosomal dominant model in this family. Chromosomal regions with high logarithm of odd scores (LOD >2.80) were initially identified by genome-wide linkage and genetic variations in these regions were examined by exome sequencing. Two novel variations (p.N909K and p.K1809R) of *SCN10A* on chromosome 3, encoding Nav1.8α subunit of voltage-gated sodium channel, were co-segregated with KSD in this family without its presence in the normal control subjects. As these two variations were co-inherited in the same allele, they might have combined effects in causing KSD. An additional variation (p.V1149M) of *SCN10A* was identified in another affected family. Nav1.8α subunit mRNA and protein are expressed in human kidney tissues. All these findings provide evidences supporting that the mutations of *SCN10A* cause KSD in these families.

Project III: Molecular Mechanism of Human Kidney Anion Exchanger 1 Trafficking Associated with Distal Renal Tubular Acidosis

Human kidney anion exchanger 1 (kAE1) is a basolateral anion (Cl^-/HCO_3^-) exchanger of the acid-secreting type A intercalated cells in the distal nephron, involved in maintaining acid-base homeostasis in the human body. Several mutations in the *SLC4A1* gene encoding kAE1 result in autosomal dominant or autosomal recessive distal renal tubular acidosis (dRTA). This disease is characterized by an inability of the kidney to secrete H^+ into urine resulting in systemic metabolic acidosis often accompanied by several clinical manifestations including muscle weakness, growth retardation, metabolic bone disease, nephrocalcinosis, nephrolithiasis, chronic pyelonephritis, and renal failure. The *SLC4A1* mutations associated with dRTA usually do not cause defect in the anion exchange function of kAE1 but result in impaired trafficking or mistargeting of the mutant kAE1 proteins. However, it has yet been unknown how the protein trafficking fails or why mistargeting of kAE1 protein occurs. To understand the pathogenesis of

dRTA caused by *SLC4A1* mutations, it is necessary to investigate the trafficking and targeting process of kAE1 protein from its biosynthesis site to the cell surface in both normal and abnormal conditions.

Our group is interested in identifying the protein that interacts with kAE1 that plays a role in its basolateral trafficking. We identified kAE1-interacting proteins by using yeast two hybrid (Y2H) screening. The interaction between kAE1 and adaptor-related protein complex 1 mu1A (AP-1 mu1A), were identified. We have also discovered that kAE1 interacts with kinesin family member 3B (KIF3B) – a motor protein, in kidney cells, suggesting that KIF3B is involved in the trafficking of kAE1 to the plasma membrane of human kidney alpha-intercalated cells. However, it is not known how the intracellular sorting and trafficking of kAE1 from trans-Golgi network (TGN) to the basolateral membrane occur. We thus studied the role of basolateral-related sorting proteins, including mu1 subunit of adaptor protein (AP) complexes, clathrin, and protein kinase D, on kAE1 trafficking in polarized and non-polarized kidney cells. We found that AP-1 mu1A, AP-3 mu1, AP-4 mu1 and clathrin (but not AP-1 mu1B, PKD1 or PKD2) play crucial roles in intracellular sorting and trafficking of kAE1. We also demonstrated co-localization of kAE1 and basolateral-related sorting proteins in human kidney tissues by double immunofluorescence staining. These findings indicate that AP-1 mu1A, AP-3 mu1, AP-4 mu1, and clathrin are required for kAE1 sorting and trafficking from TGN to the basolateral membrane of acid-secreting alpha-intercalated cells.

Project IV: Molecular Pathogenesis of Dengue Virus Infected Liver Cells

Dengue virus (DENV) infection is one of the most important mosquito-borne viral diseases, affecting many million people worldwide. DENV particle contains a single positive-stranded RNA genome, encoding a single precursor polypeptide, which is cleaved by host and viral proteases into three structural proteins, including capsid (C), membrane (M), and envelope (E), and seven nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5). Clinical symptoms of DENV infection range from a predominantly febrile disease, dengue fever (DF), to dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS), which usually occurs in cases with subsequent infection with a different serotype of DENV. The patients with DHF generally present with hemorrhagic tendencies, plasma leakage, thrombocytopenia, and hemoconcentration. Liver cell injury is commonly observed in patients with DHF/DSS, as evident by elevation of aminotransferases, reactive hepatitis and fulminant hepatic failure. The cause of hepatocyte injury during DENV infection, which may lead to fulminant hepatic failure, remains unclear. In this project, we determined cell death responses and inflammatory cytokine production induced by DENV infection in cultured hepatic cells. And, the roles and mechanisms of DENV C and DENV NS5 proteins in cell death responses and induction of inflammatory cytokine were also investigated in the cultured hepatic cells. The results of these studies would provide insight into molecular pathogenesis of DENV infection causing liver cell injury and will facilitate the development of new therapeutic modalities for DENV infection.

We examined the expression of cell death genes during DENV-infection of HepG2 cells by using real-time PCR arrays. The expression changes were consistent with activation of apoptosis and autophagy, including the up-regulation of *RIPK2*, *HRK*, *TGF*-β, *PERK*, and *LC3B*. RIPK2 – receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 is a crucial mediator of multiple stress responses that leads to the activation of caspase, NF-κB and MAP kinases including JNK and p38. The inhibition of RIPK2 expression by SB203580 significantly reduced apoptosis and suppression of endogenous RIPK2 in DENV-infected HepG2 cells by small interfering RNA (siRNA) significantly decreased apoptosis, suggesting for the first time that RIPK2 plays a role in DENV-mediated apoptosis. From real-time PCR arrays, we also found the up-regulation of *cathepsin* gene expression in DENV-infected HepG2 cells.

Cathepsins – cysteine proteases inside the lysosome were previously reported to be up-regulated in patients with DHF. We showed for the first time that DENV induces lysosomal membrane permeabilization. The resulting cytosolic cathepsin B and S contributed to apoptosis via caspase-9 and caspase-3 activation, which was significantly reduced by cathepsin B or S inhibitors and cathepsin B-siRNA.

We have previously described the translocation of DENV C into nucleus and its interaction with death-domain-associate (DAXX) protein to induce apoptosis. Expression of CD137, which is a member of the tumor necrosis factor receptor family, increased significantly in HepG2 cells expressing DENV C. CD137 recruits TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) and activates apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1), resulting in activation of cJun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). p38 MAPK participates in both apoptosis-related signaling and pro-inflammatory cytokine production. The role of p38 MAPK in DENV-infected HepG2 cells was examined using siRNA, which showed that DENV infection activated p38 MAPK and induced apoptosis. Thus, DENV induces CD137 signaling to enhance apoptosis by increasing TNFα production via activation of p38 MAPK.

The *in vivo* role of ERK1/2, a member of the MAPK family, in a mouse model of DENV infection was also examined. Our results showed that DENV induces phosphorylation of ERK1/2 and increases apoptosis. Inhibition of phosphorylated ERK1/2 by the selective ERK1/2 inhibitor, FR180204, limits hepatocyte apoptosis and reduces DENV-induced liver injury. Clinical parameters, including leucopenia, thrombocytopenia, transaminases and histology, show improvements after FR180204 treatment. Caspase-3 was significantly decreased in FR180204 treated DENV-infected mice compared to the levels of untreated DENV-infected mice, suggesting the role of ERK1/2 signaling in immune-mediated liver injury during DENV infection.

DAXX was also identified to interact with DENV NS5 by yeast two-hybrid (Y2H) assay. The *in vivo* relevance of this interaction was suggested by co-immunoprecipitation and nuclear co-localization of these two proteins in HEK293 cells expressing DENV NS5. HEK293 cells expressing DENV NS5-K/A, which were mutated at the nuclear localization sequences (NLS), were created to assess its functional roles in nuclear translocation, DAXX interaction, and cytokine production. In the absence of NLS, DENV NS5 could neither translocate into the nucleus nor interact with DAXX to increase the DHF-associated cytokine, RANTES (CCL5) production. This demonstrates the interaction between DENV NS5 and DAXX and the role of the interaction on the modulation of RANTES production.

Increased levels of cytokines - the so-called 'cytokine storm', contribute to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). We therefore compared the expression of cytokine genes between mock-infected and DENV-infected HepG2 cells using a real-time PCR array and revealed several up-regulated chemokines and cytokines, including CXCL10 and TNF-α. In this study, we also used compound A (CpdA), a plant-derived phenyl aziridine precursor containing anti-inflammatory action and acting as a dissociated nonsteroidal glucocorticoid receptor modulator, as a candidate agent to modulate secretion of DENV-induced cytokines. CpdA is not a glucocorticoid but has an anti-inflammatory effect with no metabolic side effects as steroidal ligands. CpdA significantly reduced DENV-induced CXCL10 and TNF-α secretion and decreased leukocyte migration, indicating for the first time the therapeutic potential of CpdA in decreasing massive immune activation during DENV infection.

Project V: Production of Human Single Chain Antibody Variable Fragments and Peptide Inhibitors Specific to Dengue Virus Proteins

Nowadays, a licensed vaccine and anti-viral agent for DENV infection have not been available and only supportive treatment is given to the patients. We proposed that blocking or inhibiting functions of viral proteins could reduce disease severity and symptoms in the DENV-infected patients. In this project, we produced human single chain antibody variable fragments (HuScFv) specific to dengue virus proteins and test their binding and inhibiting activities to the corresponding antigens with an ultimate objective to produce therapeutic biomolecules for treatment of dengue virus infection.

HuScFv molecules were screened and selected from the human antibody phage display library by using purified recombinant DENV NS1 (rNS1), full-length envelope (rFL-E) and its domain III (rEDIII) proteins as target antigens for bio-panning. HuScFv from two phagemid transformed *E. coli* clones, i.e., clones 11 and 13, bound to the rNS1 as well as native NS1 in both secreted and intracellular forms. Culture fluids of the HuScFv11/HuScFv13 exposed DENV2 infected cells had significant reduction of the infectious viral particles, implying that the antibody fragments affected the virus morphogenesis or release. rEDIII-specific HuScFv15A exhibited neutralizing effect to DENV infection in Vero cells in a dose-dependent manner as determined by plaque formation and cell ELISA. Epitope mapping and molecular docking results concordantly revealed interaction of HuScFv15A to functional loop structure in EDIII of the DENV E protein. Although the functions of the epitopes and the molecular mechanism of the HuScFvs further investigations, these small antibodies have high potential for development as an effective anti-DENV biomolecules.

Furthermore, we used molecular docking to search for a safe anti-DENV drug. The short peptides targeting to the hydrophobic pocket on DENV E protein; a structural transition in the membrane fusion in DENV infection process, were identified. The information of predicted ligand-binding site of reported active compounds to DENV2 hydrophobic pocket was also used for peptide inhibitor selection. The di-peptide, EF, was the most effective on DENV2 infection inhibition *in vitro* with a half maximal inhibition concentration (IC50) of 96 μM. Treatment of DENV2 with EF at the concentration of 200 μM resulted in 83.47% and 84.15% reduction of viral genome and intracellular E protein, respectively. Among four DENV serotypes, DENV2 was the most effective for the inhibition. Our results provide the proof-of-concept for development of therapeutic peptide inhibitors against DENV infection by the computer-aided molecular design.

Keywords: genomics; molecular biology; diabetes mellitus; kidney stone; distal renal tubular acidosis; dengue virus; pathogenesis; human single chain antibody variable fragments (HuScFv); peptide inhibitors

บทคัดย่อ

ความผันแปรของจีโนมมนุษย์ นอกจากจะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคในมนุษย์ได้โดยตรงแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อการเกิดโรคในขั้นตอนต่างๆ ตั้งแต่การทำให้เกิดความเสี่ยง การมีผลต่อกระบวนการทางพยาธิวิทยา การมีผลต่อการดำเนินของโรคและพัฒนาสู่ความรุนแรง ตลอดจนการตอบสนองต่อการรักษาและการหายจากความเจ็บป่วย ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแล้วว่า โรคชนิดเดียวกัน อาจจะมีสาเหตุและกระบวนการเกิดโรคที่แตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรและของบุคคล มีหลักฐานที่เชื่อถือได้ว่า การกลายพันธ์ของยีนชนิดที่รุนแรง แต่พบน้อย เป็นสาเหตุของโรคที่ซับซ้อนของมนุษย์ และความหลากหลายทางพันธุกรรม มีผลต่อการเกิดโรคในขั้นตอนต่างๆ ดังนั้นโดยอาศัยข้อมูลที่กล่าวมานี้เป็นฐาน คณะผู้วิจัย จึงตั้งสมมติฐานว่า โรคที่ซับซ้อนในคนไทยเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่รุนแรง แต่พบน้อย ซึ่งมีความหลากหลาย ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาสาเหตุและพยาธิกำเนิดของโรคในคนไทยโดยตรง เพื่อที่ให้เข้าใจธรรมชาติและการหาวิธีการรักษาที่เหมาะสม การมีข้อมูลจีโนมมนุษย์และเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ทรงพลังช่วยให้มีความเป็นไปได้ในการศึกษาโรค ซึ่งมีความสำคัญทางสาธารณสุขและมีผลกระทบทางเศรษฐกิจของคนไทย คณะผู้วิจัยมีประสบการณ์ที่ยาวนาน ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์และอณูชีววิทยาของโรคเบาหวาน โรคไต และโรคไข้เลือดออก ในคนไทย จึงอาศัยประโยชน์ในข้อนี้ ที่จะมุ่งความสนใจในการศึกษาโรคเหล่านี้ต่อไป โดยใช้เทคโนโลยีที่ก้าวหน้าทางด้านพันธุศาสตร์ จีโนมิกส์ และอณูชีววิทยา ผลการศึกษา ซึ่งแบ่งเป็น 5 โครงการ มีดังต่อไปนี้

โครงการที่ 1: อณูพันธุศาสตร์/จีโนมิกส์ และอณูชีววิทยาของโรคเบาหวาน

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังทางเมตาบอลิค ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง โรคนี้หากไม่มีการรักษา จะทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญ คือ จอตาเสื่อม ไตเสื่อม ระบบประสาทถูกทำลาย และเกิดความผิดปกติที่หลอดเลือดและหัวใจ โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุด มีสัดส่วนร้อยละ 90 ของโรคเบาหวานทั้งหมด โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งเกิดจากยีนเดี่ยว ในกลุ่มที่เรียกว่า โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในผู้ที่มีอายุน้อย (MODY) มีการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น การศึกษายีนซึ่งเป็นสาเหตุของ MODY และความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จะช่วยให้เข้าใจพยาธิสรีรวิทยาของโรคเบาหวานได้ดียิ่งขึ้น คณะผู้วิจัยได้เคยรายงานว่า ยีนซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนว่าเป็นสาเหตุของ MODY ในประชากรอื่น จำนวน 6 ยีน เป็นสาเหตุในสัดส่วนที่น้อยของ MODY (ร้อยละ 18) และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในผู้ป่วยที่มีอายุน้อย (ร้อยละ 10) ในคนไทย คณะผู้วิจัยเป็นกลุ่มแรกที่ค้นพบการกลายพันธุ์และความผันแปรของนิว-คลีโอไทด์ (SNP) ของยีน *PAX4* ว่าเป็นสาเหตุของ MODY9 และการเกิดความเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (ตามลำดับ) ในโครงการวิจัยต่อเนื่องนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนที่มีการรายงานอย่างชัดเจนว่าทำให้เกิดโรคเบาหวาน คือ ยีน *TCF7L2*, *CAPN10*, *AdipoQ* และ *PAX4* ว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานในคนไทยหรือไม่ คณะผู้วิจัยได้พบว่ายีนเหล่านี้ โดยเฉพาะยีน *PAX4* เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานในคนไทย คณะผู้วิจัยได้ศึกษาในรายละเอียดของ ความผันแปรของยีน *AdipoQ* และ *PAX4* ที่ค้นพบในคนไทย และได้รายงานความผิดปกติทางโครงสร้างและการทำหน้าที่ของของโปรตีน adiponectin และโปรตีน PAX4 ที่ผันแปรไป โดยการทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ใช้วิธีทางจีโนมิกส์ โดยวิธีดีเอ็นเอไมโครอะเรย์ (DNA microarrays) และวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็กโซม (exome sequencing) เพื่อค้นหายีนใหม่ที่ทำให้เกิด MODY และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในผู้ที่อายุน้อย ในครอบครัวผู้ป่วยไทย คณะผู้วิจัยได้ค้นพบยีนใหม่ ซึ่งกำลังจะตีพิมพ์เพื่อรายงานต่อไป

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลไกการป้องกันภาวะเป็นพิษจากน้ำตาลสูง ต่อเบต้า-เซลล์ของฮอร์โมนเพศ (เอสโตรเจนและเทสโทสเตอโรน) เพื่อให้เข้าใจบทบาทของฮอร์โมนเหล่านี้ ต่อการป้องการโรคเบาหวานและการค้นหาทางเลือกในการป้องกันและรักษาโรคเบาหวาน โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ คณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนสามารถลด ทั้งภาวะ oxidative stress และภาวะ endoplasmic reticulum (ER) stress ซึ่งจะป้องกันการตายของเบต้า-เซลล์ได้ ในทำนองเดียวกัน เทสโทสเตอโรนก็สามารถป้องกันการตายของเบต้า-เซลล์ของเพศชาย จากภาวะน้ำตาลสูงได้ โดยการลดทั้งภาวะ oxidative stress และ ER stress

โครงการที่ 2: อณูพันธุศาสตร์/จีโนมิกส์ และอณูชีววิทยาของโรคนิ่วไต

โรคนิ่วไตเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญในประชากรภาคอิสานของไทย มีอัตราความชุกร้อยละ 5-10 และมีผู้ป่วยใหม่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ปีละหลายพันคน สาเหตุและพยาธิกำเนิดของโรคนิ่วไตในประชากรภาคอิสานของไทย ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่น่าจะมีความแตกต่างจากโรคนิ่วไตที่เคยรายงานในประชากรอื่น เพราะไม่พบภาวะช่วยส่งเสริมการเกิดโรคนิ่ว เช่น ภาวะแคลเซียมสูงในปัสสาวะ ภาวะอ๊อกซาเลตสูงในปัสสาวะ และภาวะกรดยูลิคสูงในปัสสาวะ เป็นต้น คณะผู้วิจัยได้รายงานเมื่อเร็วๆ นี้ว่า มีหลักฐานแสดงถึงความเกี่ยวข้องของปัจจัยทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคนิ่วไตในประชากรภาคอิสานของไทย เพราะพบว่ามีผู้ป่วยหลายคนมาจากครอบครัวเดียวกัน และสมาชิกจากครอบครัวของผู้ป่วยจะมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมากกว่าประชากรทั่วไปประมาณ 3 เท่า เพื่อที่จะศึกษาบทบาทของปัจจัยทางพันธุกรรมต่อพยาธิกำเนิดของโรคนิ่วไตในประชากรภาคอิสานของไทย คณะผู้วิจัยได้ใช้วิธีทางพันธุศาสตร์และจีโนมิกส์หลายวิธี เช่น candidate-gene association study, genome-wide association study (GWAS), และ genome-wide linkage analysis โดยใช้ DNA microarrays เพื่อค้นหายีนที่ช่วยส่งเสริม และยีนที่เป็นสาเหตุของโรค ในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยได้พบความเกี่ยวข้องของยีน *prothrombin* (*F2*) กับการช่วยส่งเสริมเกิดโรคนิ่วไต จึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ทั้งยีน และพบว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 165 ของโปรตีนจาก threonine เป็น methionine (T165M) มีผลช่วยส่งเสริมการเกิดโรคนิ่วไตในผู้หญิงภาคอิสานของไทย โดยการศึกษาด้วยวิธี GWAS คณะผู้วิจัยพบว่า SNP rs759330 ซึ่งเป็นตำแหน่งจับของไมโครอาร์เอ็นเอ (micro RNA) บน 3' UTR ของยีน *PAQR6* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้างตัวรับของฮอร์โมนโปรเจสติน (progestin) และ adipoQ receptor family member VI มีความเกี่ยวข้องกับโรคนิ่วไต โดยมีผลเปลี่ยนแปลงต่อการเกิดโรค (modifying gene) คณะผู้วิจัยจึงคัดเลือกครอบครัวของผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่มีขนาดใหญ่ (UBRS082) ซึ่งมีการถ่ายทอดของโรคแบบลักษณะเด่น เพื่อทำการศึกษาโดยวิธี genome-wide linkage และ exome sequencing โดยในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยได้ใช้วิธี genome-wide linkage เพื่อวิเคราะห์หาบริเวณบนโครโมโซมที่น่าจะมียีนก่อโรค ก่อน โดยทำการคำนวณค่า logarithm of odd scores (LOD) ซึ่งได้ค่า LOD >2.80 ในบางบริเวณ ต่อมา จึงตรวจหาความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยวิธี exome sequencing ผลการศึกษาพบความผันแปรของยีน *SCN10A* บนโครโมโซมคู่ที่ 3 ทำให้มีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในโปรตีน Nav1.8α subunit of voltage-gated sodium channel สองตำแหน่ง คือ p.N909K and p.K1809R ซึ่งถ่ายทอดร่วมกันและถ่ายทอดร่วมกับโรคนิ่วไตในครอบครัวนี้ ซึ่งอาจจะแสดงถึงผลในการก่อโรคร่วมกัน จากการศึกษาเพิ่มเติม คณะผู้วิจัยได้พบความผันแปรของยีนเดียวกัน ทำให้มีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนอีกหนึ่งตำแหน่ง คือ p.V1149M ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตอีกครอบครัวหนึ่ง และเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในไตของมนุษย์ ก็พบว่ามีการแสดงออกของเอ็ม-อาร์เอ็นเอ (mRNA) และโปรตีนในเนื้อไตของมนุษย์ จากผลการศึกษาทั้งหมด จึงสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีน *SCN10A* ทำให้เกิดโรคนิ่วไตในครอบครัวที่ศึกษานี้

โครงการที่ 3: กลไกในระดับอณูของการเคลื่อนย้ายโปรตีนแอนไอออน เอ็กเช็นเจอร์-วัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคไตผิดปกติในการขับกรด

โปรตีนแอนไอออน เอ็กเช็นเจอร์-วันในไตมนุษย์ (kAE1) ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแอนไอออน (Cl^-/HCO_3^-) บริเวณด้านฐานของเยื่อหุ้มเซลล์ (basolateral membrane) ของเซลล์ขับกรด ซึ่งอยู่ในบริเวณดีส-ทอลแนบฟอน (distal nephron) ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมภาวะสมดุลย์กรด-ด่างของร่างกายมนุษย์ การกลายพันธุ์ในยีน *SLC4A1* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน kAE1 ทำให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรด (distal renal tubular acidosis หรือ dRTA) ซึ่งมีการถ่ายทอดได้ทั้งแบบลักษณะเด่นและแบบลักษณะด้อย โรคนี้เกิดจากไตไม่สามารถจะขับไฮโดรเจนไอออน (H^+) ออกทางปัสสาวะได้ ทำให้เกิดภาวะเป็นกรดในร่างกาย ซึ่งส่งผลให้เกิดอาการรุนแรงหลายอย่าง ได้แก่ กล้ามเนื้ออ่อนแรง เจริญเติบโตช้า กระดูกอ่อน เกิดนิ่วและการสะสมของแคลเซียมในไต กรวยไตอักเสบ และภาวะไตวาย การกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A1* ซึ่งทำให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรด มักจะไม่ได้ทำให้โปรตีน kAE1 สูญเสียหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนแอนไอออน แต่ทำให้โปรตีนผิดปกติในการเคลื่อนย้ายหรืออยู่ผิดตำแหน่ง แต่ยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัดว่า โปรตีน kAE1 ผิดปกติในการเคลื่อนย้ายหรืออยู่ผิดที่ได้อย่างไร ดังนั้น เพื่อที่จะเข้าใจพยาธิกำเนิดของโรคไตผิดปกติในการขับกรดจากการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A1* จึงจำเป็นจะต้องศึกษาให้เข้าใจกระบวน-การเคลื่อนย้ายของโปรตีน kAE1 จากแหล่งที่มีการสร้างไปสู่ผิวเซลล์ ทั้งในภาวะปกติและผิดปกติ

คณะผู้วิจัยมีความสนใจในการค้นหาโปรตีน ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน kAE1 และมีบทบาทในการเคลื่อนย้ายโปรตีน kAE1 ไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ในด้านฐานของเซลล์ (basolateral membrane) โดยใช้วิธี yeast two hybrid (Y2H) ทำให้ค้นพบว่าโปรตีน kAE1 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน adaptor-related protein complex 1 mu1A (AP-1 mu1A) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน kAE1 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน kinesin family member 3B (KIF3B) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งโปรตีน kAE1 ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ขับกรดในไต แต่เนื่องจากยังไม่เป็นที่ทราบว่าโปรตีน kAE1 ถูกแยกภายในเซลล์ (intracellular sorting) และเคลื่อนย้าย (trafficking) จาก trans-Golgi network (TGN) ไปสู่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านฐานของเซลล์ได้อย่างไร คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาบทบาทของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการแยกโปรตีน kAE1 จาก TGN ไปสู่เยื่อหุ้มเซลล์ และพบว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ AP-1 mu1A, AP-3 mu1, AP-4 mu1 และ clathrin (ส่วนโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้อง ได้แก่ AP-1 mu1B, PKD1 และ PKD2) และพบว่าโปรตีนเหล่านี้ถูกย้อมอยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับโปรตีน kAE1 ในชิ้นเนื้อจากไตของมนุษย์ ผลการศึกษานี้แสดงว่าโปรตีนดังกล่าว มีบทบาทในการแยกและเคลื่อนย้ายโปรตีน kAE1 จาก TGN ไปสู่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านฐานของเซลล์ขับกรดในไตมนุษย์

โครงการที่ 4: พยาธิกำเนิดระดับอณูของเซลล์ตับซึ่งติดเชื้อไวรัสเด็งกี

การติดเชื้อไวรัสเด็งกีเป็นปัญหาที่สำคัญของโรคที่เกิดจากไวรัสซึ่งมียุงเป็นพาหะ เพราะมีผู้ติดเชื้อจำนวนหลายล้านคนทั่วโลก อนุภาคไวรัสเด็งกีประกอบด้วยจีโนมซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอสายบวก ใช้ในการถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง 3 ชนิด ได้แก่ capsid (C), membrane (M), และ envelope (E) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างอีก 7 ชนิด ได้แก่ NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และ NS5 อาการของการติดเชื้อไวรัสเด็งกีมีตั้งแต่เป็นไข้ ไข้เลือดออก และกลุ่มอาการช็อกจากการติดเชื้อไวรัสนี้ ซึ่งอาการที่รุนแรง มักจะเกิดกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสซ้ำ แต่เป็นคนละซีโรทัยป์กับการติดเชื้อครั้งก่อน ผู้ป่วยที่เป็นไข้เลือดออกมักจะมีอาการเลือดออกง่าย มีการรั่วของสารน้ำออกนอกหลอดเลือด เกล็ดเลือดต่ำ และมีเลือดเข้มข้น ในผู้ป่วยที่มีอาการไข้เลือดออกและช็อกมักจะพบว่ามีการทำลายของเซลล์ตับ เนื่องจากพบว่ามีเอ็นไซม์ aminotransferases สูงขึ้น มีตับอักเสบ และมีภาวะตับล้มเหลวเฉียบพลัน สาเหตุของการทำลายเซลล์ตับในขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี ซึ่งอาจจะนำไปสู่ภาวะตับล้มเหลวเฉียบพลัน ยัง

ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในโครงการนี้ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการตอบสนองซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ และการสร้างสารซัยโตไคน์ ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบ ในเซลล์ตับที่นำมาเพาะเลี้ยงและทำให้ติดเชื้อไวรัสเด็งกี นอกจากนี้ยังศึกษาบทบาทและกลไกที่โปรตีน capsid และ NS5 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทั้งสองอย่างนี้ด้วย ผลการศึกษานี้จะทำให้เข้าใจพยาธิกำเนิดในระดับอณูของการติดเชื้อเด็งกี ซึ่งให้เกิดการทำลายของเซลล์ตับ และจะช่วยในการพัฒนารูปแบบการรักษาใหม่จากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ระหว่างการติดเชื้อไวรัสเด็งกี โดยใช้เซลล์ HepG2 และวิธี real-time PCR arrays ผลการศึกษาพบว่ามีการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโตซีส (apoptosis) และการเกิดออโตฟาจี (autophagy) ยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นได้แก่ *RIPK2*, *HRK*, *TGF*-β, *PERK* และ *LC3B* โปรตีน RIPK2 เป็นเอ็นไซม์ไคแนส (kinase) ที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนตัวรับ และมีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองหลายอย่าง ซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นเอ็นไซม์คาสเปส (caspase) โปรตีน NF-kB และเอ็นไซม์ MAP kinases ได้แก่ JNK และ p38 การยับยั้ง RIPK2 ด้วยสารยับยั้ง SB203580 ทำให้ลดการตายแบบอะพอพโตซีสของเซลล์ และการลด RIPK2 โดยใช้ siRNA ในเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี ทำให้ลดการตายแบบอะพอพโตซีสได้อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า RIPK2 มีบทบาทในการต่อการตายแบบอะพอพโตซีสของเซล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี นอกจากนี้การศึกษาด้วยวิธี real-time PCR arrays คณะผู้วิจัยยังพบว่ามีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *cathepsin* ในเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี cathepsins เป็น cysteine proteases ภายในไรโซโซม (lysosome) ซึ่งเคยมีรายงานว่ามีการเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยไข้เลือดออกจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี คณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า ไวรัสเด็งกีทำให้เยื่อหุ้มไรโซโซมสูญเสียคุณสมบัติ เมื่อ cathepsin B และ S ออกสู่ซัยโตพลาซึม จะทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโตซีส ผ่านทางการกระตุ้น caspase-9 และ caspase-3 ซึ่งสามารทำให้การตายแบบนี้ลดลงได้ โดยการใช้สารยับยั้งต่อ cathepsin B และ S และการใช้ cathepsin B-siRNA

คณะผู้วิจัยได้เคยรายงาน การเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของโปรตีนแค็บซีส (capsid protein) จากไวรัสเด็งกี และปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนแค็บซีสกับโปรตีน DAXX ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์แบบอะพอพโตซีส ในเซลล์ HepG2 ซึ่งทำให้มีการสร้างโปรตีนแค็บซีสของไวรัสเด็งกี จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีน CD137 ซึ่งเป็นสมาชิกของ tumor necrosis factor receptor family โปรตีน CD137 จะดึงโปรตีน TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) ให้เข้ามารวม และกระตุ้นโปรตีน apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) ส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้น cJun N-terminal kinase (JNK) และโปรตีน p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) โปรตีน p38 MAPK มีส่วนเกี่ยวข้องกับทั้งการตายแบบอะพอพโตซีส และการสร้างสารซัยโตไคน์ซึ่งกระตุ้นการอักเสบ บทบาทของโปรตีน p38 MAPK ในเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี ได้มีการศึกษาโดยใช้ siRNA ซึ่งผลแสดงว่าการติดเชื้อไวรัสเด็งกีทำให้มีการกระตุ้น p38 MAPK และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซีส จึงสรุปได้ว่าไวรัสเด็งกีทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซีส โดยมีการเหนียวนำสัญญาณผ่านทางโปรตีน CD137 ทำให้มีการผลิต TNF-α มากขึ้น โดยผ่านการกระตุ้นโปรตีน p38 MAPK

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาบทบาทของ ERK1/2 ซึ่งเป็นสมาชิกหนึ่งของ MAPK family ในสัตว์ทดลองโดยใช้หนูที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสเด็งกี ผลการทดลองพบว่าไวรัสเด็งกีเหนี่ยวนำการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของ ERK1/2 และทำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโตซีสเพิ่มขึ้น เมื่อทดลองใช้สารยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตบน ERK1/2 ที่จำเพาะ คือ FR180204 สามารถทำให้ลดการตายของเซลล์ตับแบบอะพอพโตซีสลงและลดการทำลายของตับจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้ นอกจากนี้การใช้ FR180204 ยังทำให้ค่าผลการตรวจซึ่งมีความสำคัญทางคลินิก ได้แก่ leucopenia, thrombocytopenia, transaminases และ histology เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น ในหนูที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีและให้ FR180204 ทำให้มีการ

ลดลงของ caspase-3 แสดงว่า ERK1/2 มีบทบาทในการสื่อสัญญาทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับในระหว่างที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี

คณะผู้วิจัยได้พบว่าโปรตีน DAXX จับกับโปรตีน NS5 ของไวรัสเด็งกี โดยการศึกษาด้วยวิธี yeast two-hybrid (Y2H) ซึ่งได้ทำการศึกษาเพื่อยืนยันผลในเซลล์ HEK293 ด้วยวิธี co-immunoprecipitation และ nuclear co-localization การจับกันระหว่างโปรตีน DAXX และโปรตีน NS5 ในนิวเคลียสทำให้มีการกระตุ้นการสร้างซัยโตไคน์ RANTES (CCL5) หากทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนของ NS5 บริเวณ nuclear localization sequence (NLS) จะทำให้เข้านิวเคลียสไม่ได้ ไม่มีการจับกับ DAXX และไม่กระตุ้นการสร้างสารซัยโตไคน์ RANTES ผลการทดลองนี้แสดงว่าการจับกันระหว่างโปรตีน NS5 ของเด็งกีและ DAXX มีบทบาทในการควบคุมการสร้างสารซัยโตไคน์ RANTES

การเพิ่มขึ้นของสารซัยโตไคน์ จนเกิดภาวะ “พายุซัยโตไคน์ (cytokine storm)” ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออกและภาวะช็อกในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบ การแสดงออกของยีนซัยโตไคน์ในเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อและที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี และพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของซัยโตไคน์หลายชนิด เช่น *CXCL10* และ *TNF*-α คณะผู้วิจัยได้ทดลองใช้สารคอมเปาวด์-เอ (CpdA) ซึ่งมีธรรมชาติเป็นสาร phenyl aziridine precursor ที่สกัดมาจากพืชทะเลทราย และมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ โดยสามารถจับได้กับ glucocorticoid receptor แต่ไม่มีการกระตุ้นยีนที่จะก่อให้เกิดผลข้างเคียง (side effects) เหมือน glucocorticoid ผลการทดลองปรากฏว่า CpdA สามารถลดการหลั่งสารซัยโตไคน์ CXCL10 และ TNF-α และสามารถลดการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวได้ ซึ่งเป็นการแสดงครั้งแรกว่า CpdA สามารถใช้ลดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอย่างรุนแรงในภาวะที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้

โครงการที่ 5: การผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ และเปปไทด์ยับยั้งที่จำเพาะต่อโปรตีนของไวรัสเด็งกี

ในปัจจุบัน ยังไม่มีวัคซีนที่ได้รับการจดทะเบียนและยังไม่มียาต้านไวรัสเด็งกี การดูแลรักษาผู้ป่วยยังเป็นการดูแลรักษาแบบประคับประคอง คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่า การปิดกั้นหรือยับยั้งการทำงานของโปรตีนของไวรัส สามารถลดความรุนแรงและอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้ ในโครงการนี้ คณะผู้วิจัยได้ผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (HuScFv) ที่จำเพาะต่อโปรตีนของไวรัสเด็งกี และทดสอบการจับและยับยั้งการทำงานของโปรตีน โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตชีวโมเลกุล เพื่อใช้สำหรับรักษาการติดเชื้อไวรัสเด็งกี

คณะผู้วิจัยได้ผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวโดยการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของไวรัสเด็งกีชนิด rNS1, full-length envelope (rFL-E) และ domain III (rEDIII) เป็นแอนติเจนในการคัดเลือกแอนติบอดีสายเดี่ยวจาก Human antibody phage display library ซึ่งได้โคลนในแต่ละกลุ่มเป็นจำนวนมาก แต่ได้ทำการคัดเลือกจนเหลือโคลนที่จับได้ดีที่สุด สำหรับโปรตีน NS1 ได้จำนวน 2 โคลน (HuScFv11/HuScFv13) ซึ่งสามารถจับได้กับ rNS1 และ native NS1 และเมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี พบว่าสามารถลดจำนวนอนุภาคไวรัสลงได้ แสดงว่าแอนติบอดีสายเดี่ยวที่ใช้ทดลอง อาจจะมีผลต่อการสร้างรูปร่างของอนุภาคไวรัสหรือต่อการปลดปล่อยไวรัสออกจากเซลล์ สำหรับการคัดเลือกโดยใช้โปรตีน rEDIII ได้จำนวน 1 โคลน (HuScFv15A) ซึ่งสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเด็งกีของ Vero cells ในลักษณะผันแปรตามปริมาณของแอนติบอดี การศึกษา epitope mapping และ molecular docking ได้ผลว่ามีการจับของ HuScFv15A ต่อโครงสร้างที่ทำหน้าที่บริเวณ EDIII ของโปรตีน envelope ของไวรัสเด็งกี แม้จะยังจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป แอนติบอดีสายเดี่ยวเหล่านี้ มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อให้เป็นชีวโมเลกุลสำหรับใช้ต้านไวรัสเด็งกีต่อไปได้

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ใช้วิธี molecular docking เพื่อค้นหายาต้านไวรัสเด็งกีที่มีความปลอดภัย ซึ่งมุ่งในการหาเปปไทด์ (peptide) โดยได้คัดเลือกเปปไทด์ที่มีเป้าหมายในการจับที่ hydrophobic pocket บนโปรตีน envelope ของไวรัสเด็งกี มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง เมื่อมีการหลอมรวมระหว่างเยื่อหุ้มไวรัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี นอกจากนี้ยังใช้ข้อมูลการจับกันของสารซึ่งมีรายงานการเกี่ยวกับการจับกับบริเวณ hydrophobic pocket มาประกอบการพิจารณาออกแบบเปปไทด์ด้วย ผลการทดลองปรากฏว่า ได-เปปไทด์ ชนิด EF สามารถยับยั้งไวรัสเด็งกี ซีโรทัยป์สอง (DENV2) ได้มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีค่าครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นในการยับยั้ง (IC50) เท่ากับ 96 μM การใช้เปป-ไทด์ EF ที่ความเข้มข้น 200 μM ทำให้มีการลดลงของจีโนมและโปรตีนอี (E) ภายในเซลล์เท่ากับร้อยละ 83 และร้อยละ 84 ตามลำดับ ในบรรดาไวรัสเด็งกี 4 ซีโรทัยป์ ปรากฏว่าชนิดซีโรทัยป์ 2 ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด ผลการทดลองนี้เป็นการพิสูจน์ให้เห็นหลักการที่จะพัฒนาเปปไทด์ยับยั้งสำหรับเป็นยาต้านการติดเชื้อไวรัสเด็งกีโดยใช้คอมพิวเตอร์ในการช่วยออกแบบได้

คำสำคัญ: อณูพันธุศาสตร์; อณูชีววิทยา; โรคเบาหวาน; โรคนิ่วไต; โรคไตผิดปกติในการขับกรด; ไวรัสเด็งกี; พยาธิกำเนิด; แอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์; เปปไทด์ยับยั้ง