หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์หาตำแหน่งที่จำเพาะบนโปรตีนแก็กด้วยแองไครินที่ออกแบบสำหรับการขัดขวางขั้นตอนการประกอบตัวของเชื้อไวรัสเอชไอวี-1
ผู้เขียน	นายวราชัย ประดิษฐ์วงศ์วาน
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร. สาวิตรี นะงอลา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โปรตีนแองไครินรีพีทที่ออกแบบ คือแองไครินที่ถูกดัดแปลงลำดับกรดอะมิโน ณ ตำแหน่งที่ถูกกำหนดบนแต่ละรีพีทซึ่งทำให้บริเวณผิวที่ใช้ในการจับ มีความสามารถเข้ากันกับลิแกนที่หลากหลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยทำการสร้างฟาจที่มีการแสดงออกของแองไครินไลบราลีส์ และคัดเลือกโคลนที่จับกับโปรตีนแมทริกซ์และแคบสิดของเชื้อเอชไอวี-1 โดย Ank^{GAG}1D4 ได้ถูกคัดเลือกมา มีความสามารถจับบริเวณ N-terminal ของโปรตีนแคปซิดของเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 (NTD^{CA}) และมีความสามารถในการต่อต้านไวรัสภายในเซลล์ ระยะหลังกระบวนการอินทิเกรชั่นของวงจรชีวิตไวรัส แต่การศึกษาเบื้องต้นยังไม่ทราบตำแหน่งที่จับแน่ชัดของ Ank^{GAG}1D4 การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์ตำแหน่งบนบริเวณ NTD^{CA} แองไคริน Ank^{GAG}1D4 ใช้จับ หรือที่เรียกว่า ankyrinotope mapping ด้วยวิธี competitive ELISA โดยใช้เปปไทด์ที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NTD^{CA} ซึ่งมีส่วนเหลื่อมล้ำ และต่อเนื่องกันเป็นตัวแข่งขันการจับ จากการทดลองพบว่าตำแหน่ง NTD^{CA} 2 บริเวณที่มีส่วนในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Ank^{GAG}1D4 ได้แก่บริเวณ helix ที่ 1 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 16-30 และ helix ที่ 7 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 126-145 นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังทำการตกผลึกโปรตีน Ank^{GAG}1D4 และกำหนดโครงสร้าง Ank^{GAG}1D4 มอนอเมอร์ ด้วยความละเอียด 2.2 อังสตอม และนำมาใช้สำหรับการทำนายโครงสร้างสามมิติด้วยวิธี molecular docking กับ homology model ของโปรตีนแคปซิดของเชื้อเอชไอวี-1 พบว่าโปรตีน Ank^{GAG}1D4 เกิดปฏิสัมพันธ์ได้กับบริเวณ helix ที่ 1 และ 7 ของ NTD^{CA} ซึ่งเป็นบริเวณที่สามารถเข้าคู่ได้กับโปรตีน Ank^{GAG}1D4 ในการเกิดโครงสร้างซับซ้อน และยังสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้าของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ankyrinotope mapping ข้อมูลการวิเคราะห์กรดอะมิโนสำคัญด้วยวิธี molecular docking แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนอนุรักษ์อาร์จินินตำแหน่งที่ 18 บน helix 1 ตำแหน่งที่ 132 และ 143 บน helix 7 มีบทบาทสำคัญในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับกรดอะมิโนไทโรซีนตำแหน่งที่ 56 ของโปรตีน Ank^{GAG}1D4 จากการศึกษาครั้งนี้มีนัยสำคัญอย่างยิ่งซึ่งแสดงให้เห็นถึงระดับความยืดหยุ่นภายในโมเลกุล NTD^{CA} นอกเหนือจากระหว่างโมเลกุล NTD^{CA} กับ CTD^{CA} และการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวของแองไครินสำหรับการต่อต้านเชื้อไวรัส และการหาตำแหน่งจำเพาะบนไวรัสเป้าหมายน่าจะช่วยการพัฒนาวิธีการใหม่ในการต่อต้านเชื้อไวรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Identification of Gag Determinants Specific with Ankyrin Designed for HIV-1 Assembly Interruption
Author	Mr. Warachai Praditwongwan
Degree	Master of Sciences (Medical Technology)
Advisory Committee	Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Advisor Dr. Sawitree Nangola Co-advisor

ABSTRACT

Designed ankyrin-repeat proteins (DARPins) are genetically modified ankyrins of which amino acid residues located at defined positions in each repeat motif to create a potentially binding surface adaptable to various ligands. We have recently generated a phage-displayed DARPins library, and screened with HIV-1 MA-CA polyprotein as viral target. The Ank^{GAG}1D4 (trimodular structure) was isolated and bound to the N-terminal domain (NTD^{CA}) of HIV-1 capsid protein (CA), and showed an intracellular antiviral activity at the post-integration phase of the viral life cycle. The present study aimed to identify the binding site(s) of Ank^{GAG}1D4 (called ankyrinotope mapping) on the NTD^{CA} by competitive ELISA, using a panel of overlapping pentadecapeptides covering the NTD^{CA} sequence as competitors. We found that two regions contributed to its interaction with Ank^{GAG}1D4, belonging to helices 1 (H1; residues 16-30) and 7 (H7; residues 126-145). Moreover, we have crystallized the Ank^{GAG}1D4 protein and determined the structure of the monomer at 2.2 Å resolution, and used it in a molecular docking with a homology model of HIV-1 CA. In agreement with ankyrinotope result, Ank^{GAG}1D4 interacted with helices 1 and 7 of NTD^{CA} which would be accessible to Ank^{GAG}1D4 in this binary complex. Data analysis of key amino acid residue by molecular docking showed the conserved arginine-18 in helix 1 and arginine-132 as well as arginine-143 in helix 7 of NTD^{CA}, played an important role in interaction with the tyrosine-56 of Ank^{GAG}1D4. This implies a significant degree of flexibility within the NTD^{CA} subdomain of HIV-1 CA protein, not only between NTD^{CA} and CTD^{CA}.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Characterization of ankyrins with antiretroviral activity and assignment of their ankyrinotopes on specific viral targets would help the development of novel antiretroviral strategies.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved