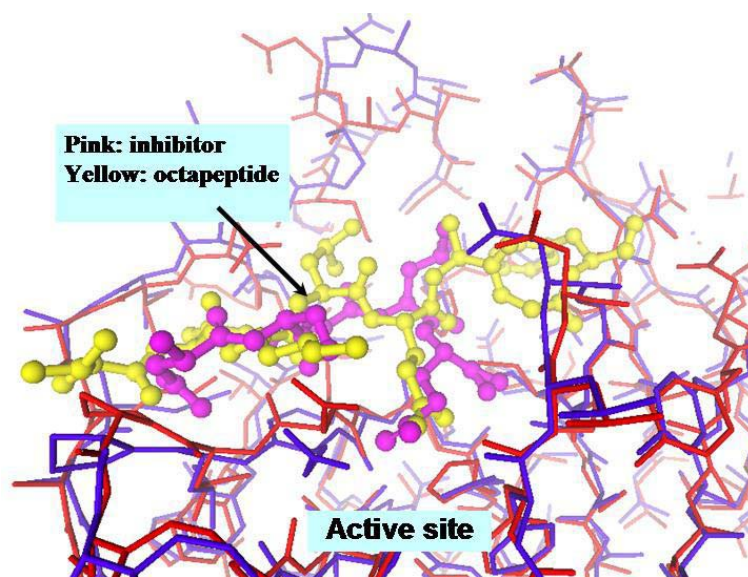


จากผลของการ docking พบว่า octapeptide สามารถเข้าไปยึดเหนี่ยวในบริเวณเร่งปฏิกิริยาได้อย่างพอดี และเพื่อเป็นการยืนยันว่าลักษณะการยึดเหนี่ยวจากการ docking นั้น อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องและน่าจะเป็นจริงมากที่สุด ในธรรมชาติ จึงได้มีการนำโครงสร้างของสารยับยั้งที่ได้ถูกดึงออกไปในตอนแรกกลับมาเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่ได้จากการ docking [10] ผลของการเปรียบเทียบแสดงดังรูปที่ 5 ซึ่งพบว่า C^α backbone ที่ตำแหน่ง P5Thr-P4Val-P3Lys-P2Leu-P1Gln ของ octapeptide อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับ C^α backbone ของสารยับยั้ง ตำแหน่งที่สำคัญมากเช่นตำแหน่งของ side chain ของ P1Gln ซึ่งหันเข้าไปใน pocket ของ S1 subsite และมีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือ ที่ Glu166 และ His163 เหมือนกันกับ P1Gln ของสารยับยั้งทุกประการ และสำหรับลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide ที่ได้จากการ docking นี้ได้ทำการคำนวณพันธะไฮโดรเจนที่สามารถจะเกิดขึ้นได้ระหว่างเอนไซม์กับ octapeptide ภายในระยะทางไม่เกิน 3 Å และมุมอย่างน้อย $\theta = 135^\circ$ ซึ่งพบว่ามีพันธะไฮโดรเจนที่น่าจะเกิดขึ้นได้ทั้งสิ้นจำนวน 13 พันธะ คือที่ S5(Thr190, Ala191)--P5Thr จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่ S4Gln189--P4, P1backbone จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่ S3Glu166--P3Lys จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่ S1(Ser144, His163, Glu166)--P1Gln จำนวน 3 ตำแหน่ง ที่ S2'Gly14--P2'backbone จำนวน 1 ตำแหน่ง และที่ปลาย C-terminal ของ octapeptide กับ Thr-cluster (residues 21, 24-26 และ 45) อีกจำนวน 3 ตำแหน่ง



รูปที่ 5 Superposition ระหว่างโครงสร้างเอนไซม์ที่ยึดเหนี่ยวกับสารยับยั้ง (crystal structure 1UK4) กับโครงสร้างเอนไซม์ที่ยึดเหนี่ยวกับ octapeptide แสดงให้เห็นว่าผลของการยึดเหนี่ยว octapeptide ที่ได้จากการ docking มีความถูกต้องแม่นยำเนื่องจากโครงสร้าง octapeptide อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับโครงสร้างของสารยับยั้งจาก crystal structure [10]

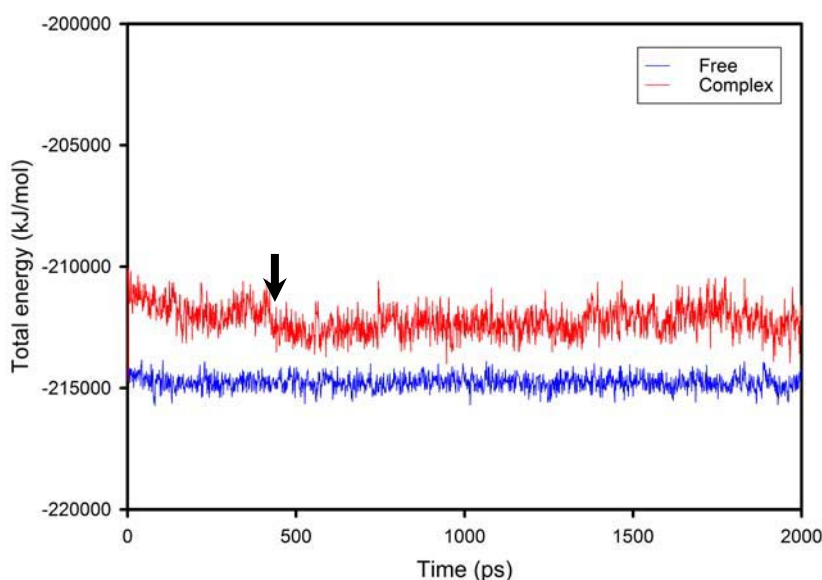
เมื่อวิเคราะห์จากลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide สามารถจำแนกบริเวณ subsite ของเอนไซม์ออกเป็นตำแหน่งต่างๆได้ 8 subsites (ตารางที่ 2) โดยการจำแนก subsite ยึดถือตำแหน่งที่ตั้ง side chain ของแต่ละ P ของ octapeptide โดย side chain ของ Px หันไปทางใดให้กำหนดบริเวณของเอนไซม์นั้นๆเป็น Sx pocket

ตารางที่ 2 กรดอะมิโนที่ล้อมรอบ octapeptide ในรัศมี 5 Å ซึ่งอยู่ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro โดยจำแนกออกเป็น subsite ต่างๆได้ 8 subsites

Subsite	ลำดับกรดอะมิโน
S5	Pro168, Thr190, Gln192
S4	Leu167, Gln189
S3	Ala46, Glu47, Glu166
S2	Met49, Met165
S1	Phe140, Ser144, His163, His172
S1'	Asn142, Gly143
S2'	Leu27
S3'	Thr21, Thr24-26, Thr45

3.3 Molecular dynamics simulation

วิเคราะห์ผลของ MD simulation โดยสังเกตระบบที่ทำการทดสอบว่าเข้าสู่สมดุลแล้วหรือยัง โดยพิจารณาจากค่าพลังงานหลายรูปแบบ เช่น potential energy, kinetic energy, Lennard-Jones energy เป็นต้น และ snapshot โครงสร้างในช่วงเวลาที่สมดุลมาวิเคราะห์ผล ซึ่งงานวิจัยนี้ได้้นำค่าพลังงานรวมของระบบ (total energy) ที่คิดจากผลรวมสมการของการคำนวณพลังงานในหลายๆเทอมที่ได้จากการคำนวณของโปรแกรมในขณะที่ทำการ simulation มาใช้ในการพิจารณาสถานะภาพสมดุลของระบบ ซึ่งลักษณะของค่าพลังงานรวมของระบบ SARS CoVMpro กับ octapeptide ในน้ำบริสุทธิ์ แสดงดังรูปที่ 6 ซึ่งพบว่าระบบได้เริ่มเข้าสู่สมดุลตั้งแต่เริ่มการ simulation ใน equilibrate state เนื่องจากในการทดลองนี้ทำการ simulation ใน initial state เป็นเวลานานพอสมควร (100 ps) จึงทำให้ระบบเข้าสู่สมดุลในช่วง equilibrate state ที่เร็วขึ้น



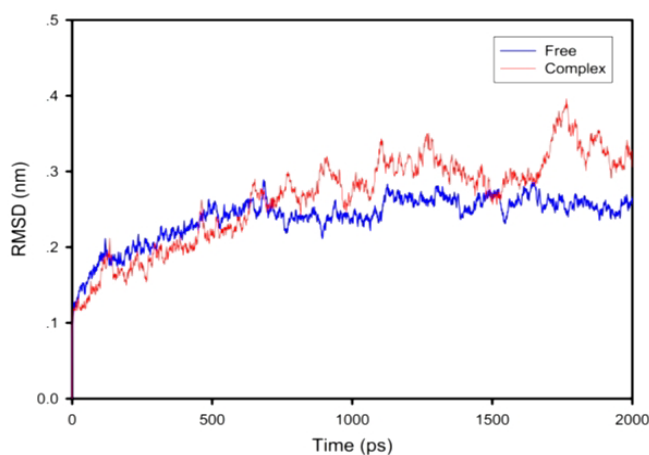
รูปที่ 6 Total energy profile ใน equilibrate state ที่ได้จากการคำนวณในระหว่างการ simulation อันตรกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro แบบ free form (เส้นสีน้ำเงิน) และแบบที่ยึดเหนี่ยวกับ octapeptide (เส้นสีแดง)

เมื่อทำการ simulation เอนไซม์ SARS CoVMpro แบบ freeform (โครงสร้างที่ได้หลังจาก minimization) ซึ่งไม่ได้จับอยู่กับซับสเตรทหรือ ligand ใดๆ เพื่อทำการเปรียบเทียบกับผลของเอนไซม์ที่ยึดเหนี่ยวอยู่กับซับสเตรท พบว่าทั้งสองระบบเข้าสู่สมดุลตั้งแต่เริ่มการ simulation ซึ่งสังเกตได้ว่าระบบ free form จะเสถียรตั้งแต่เริ่มต้นและค่าพลังงานจะต่ำกว่าระบบยึดเหนี่ยว สภาพเสถียรได้ดำเนินไปจนกระทั่งสิ้นสุดการ simulation ด้วยแนวโน้มแบบราบเรียบ ในอีกทางหนึ่งสังเกตได้ว่าระบบยึดเหนี่ยวมีค่าพลังงานสูงกว่าระบบ free form (การศึกษาสมดุลของระบบในทางเคมีเชิงฟิสิกส์เชื่อว่าในสภาพธรรมชาตินั้นค่าพลังงานต่ำกว่าจะมีแนวโน้มที่เสถียรมากกว่า) สภาพ

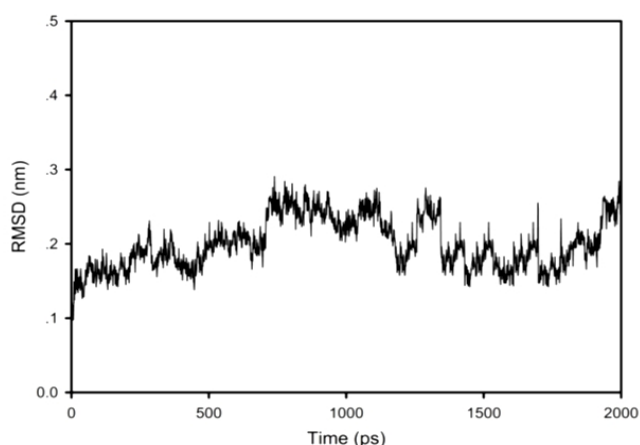
เสถียรของพลังงานเริ่มคงที่ที่เวลาประมาณ 500 ps (ลูกศรชี้) และเมื่อการ simulation กำลังดำเนินไป พลังงานมีการแปรปรวนเล็กน้อยตลอดเวลาจนกระทั่งสิ้นสุดการ simulation เสมือนว่ายังไม่ถึงจุดที่พลังงานจะเสถียรจริงๆ ปรากฏการณ์ที่แตกต่างกันของทั้งสองระบบเช่นนี้สามารถอธิบายได้ว่าในระบบยัดเหนี่ยวมีการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับโมเลกุลของ octapeptide อันตรกิริยาดังกล่าวในทางชีวเคมี ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน แรงกระทำ hydrophobic แรงกระทำ electrostatic และอิทธิพลของน้ำ ซึ่งเมื่อเกิดอันตรกิริยาเหล่านี้ขึ้นย่อมส่งผลต่อพลังงานของระบบ ดังนั้นค่าพลังงานของระบบยัดเหนี่ยวที่แปรปรวนนี้บ่งชี้ชัดเจนว่ามีการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ SARS CoVMpro กับ octapeptide ขึ้น

ในการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเอนไซม์และซับซ้อนที่เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนแต่ละหน่วย P ของ octapeptide กับกรดอะมิโนแต่ละหน่วย S ของเอนไซม์นั้น พิจารณาได้จากกราฟแสดงการผันแปรโครงสร้าง Root Mean Square Deviation (RMSD) และ Root Mean Square Fluctuations (RMSF) ที่แสดงดังรูปที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

(a)

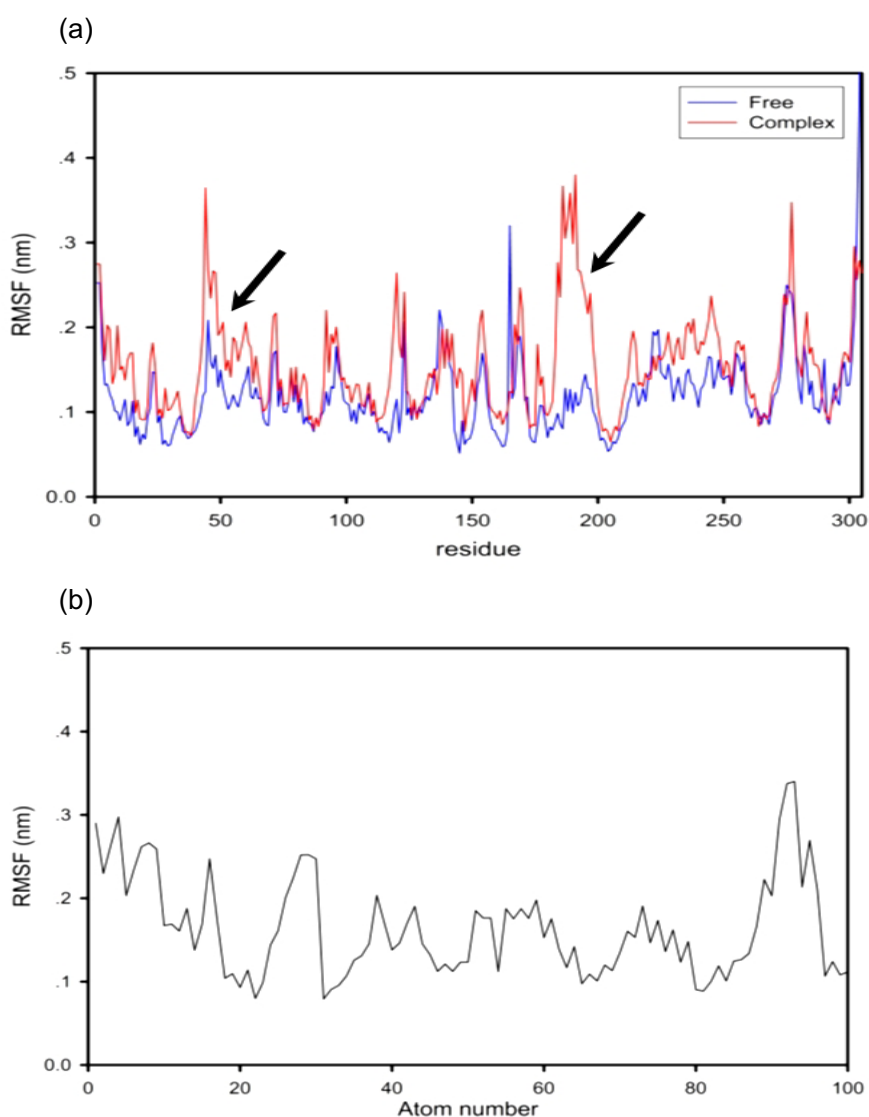


(b)



รูปที่ 7 RMSD profile ในขณะที่ simulation โมเลกุล (a) เอนไซม์ SARS CoVMpro แบบ free form (เส้นสีน้ำเงิน) และแบบที่ยัดเหนี่ยวอยู่กับ octapeptide (เส้นสีแดง) และ (b) octapeptide ใน equilibrate state ตั้งแต่ 0 จนถึง 2,000 ps

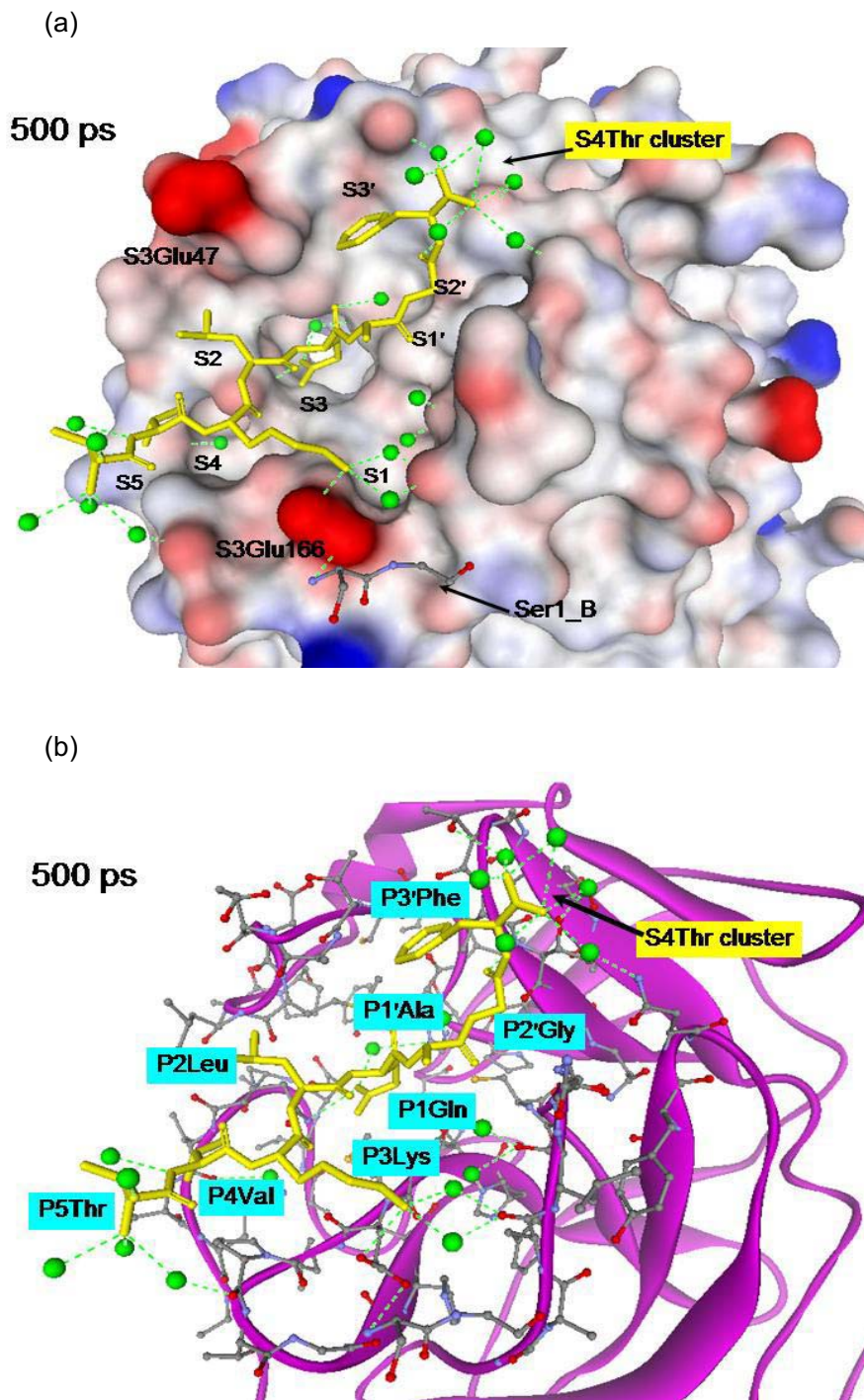
ผลของกราฟแสดงการผันแปรของโครงสร้างชี้ให้เห็นว่าโครงสร้างของเอนไซม์ SARS CoVMpro ทั้งแบบ free form และแบบยึดเหนี่ยวมีการผันแปรโครงสร้างอย่างมากในช่วงเวลา 500 ps แรก ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกัน หลังจากนั้นการผันแปรโครงสร้างของเอนไซม์แต่ละแบบมีความต่างกัน โดยเอนไซม์แบบยึดเหนี่ยวที่มีค่า RMSD สูงกว่าถูกบ่งชี้ว่ามีการผันแปรของโครงสร้างมากกว่าแบบ free form ขณะที่ RMSD ของเอนไซม์ free form ค่อนข้างคงที่ซึ่งสอดคล้องกับค่า total energy ส่วนค่า RMSD ของ octapeptide แสดงให้เห็นว่ามีการผันแปรของโครงสร้างอยู่ตลอดระยะเวลาของการ simulation และพบว่าเมื่อสิ้นสุดการ simulation ค่า RMSD ยังคงมีการแปรปรวนอยู่



รูปที่ 8 RMSF profile แสดงการผันแปรโครงสร้างของโมเลกุล (a) เอนไซม์ SARS CoVMpro แบบ free form (เส้นสีน้ำเงิน) และแบบที่ยึดเหนี่ยวอยู่กับ octapeptide (เส้นสีแดง) (b) อะตอม octapeptide ใน equilibrate state ที่เวลาตั้งแต่ 0 จนถึง 2,000 ps

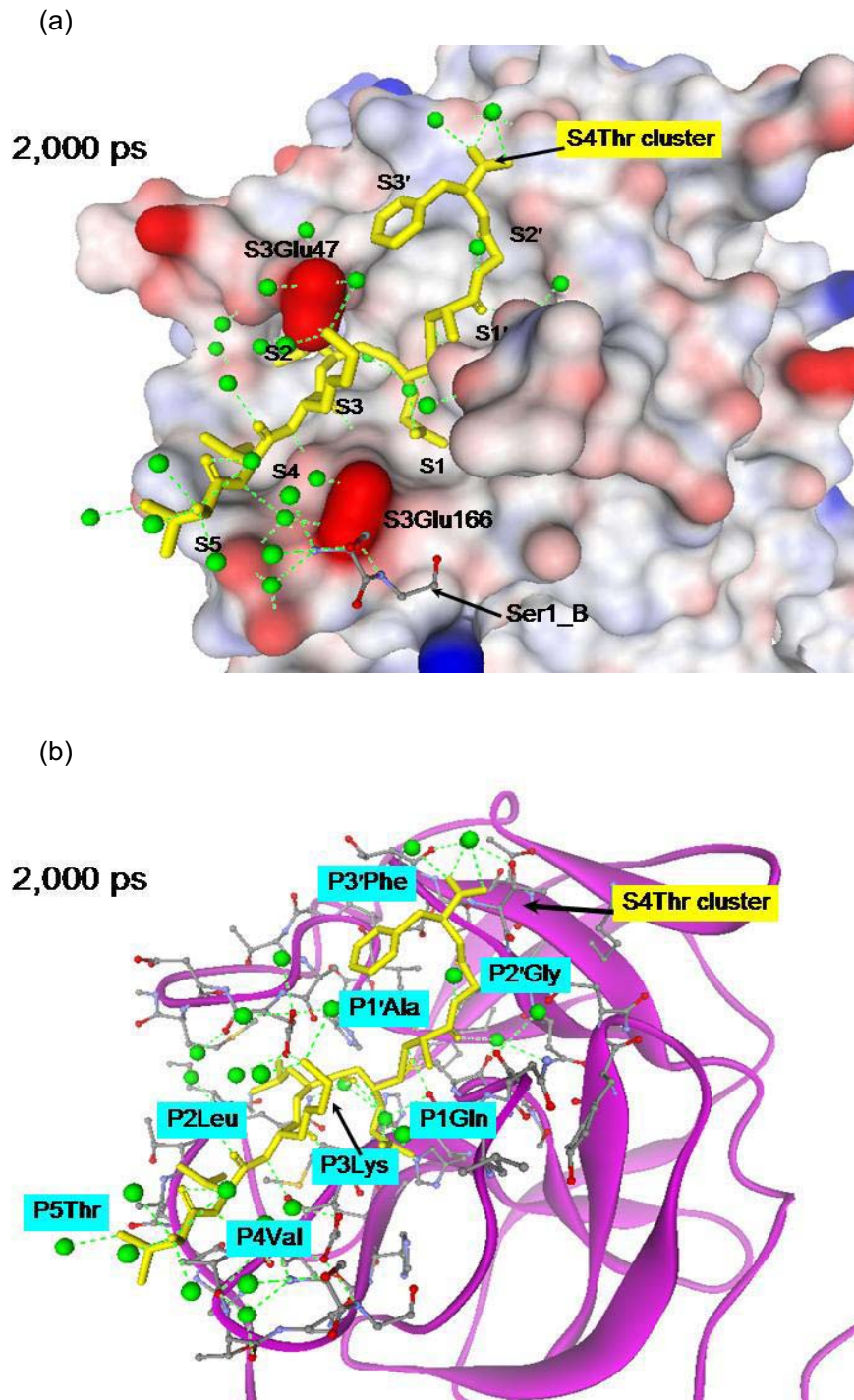
จากการศึกษาผลของ RMSF ซึ่งแสดงลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่มีการแปรผันของโครงสร้างในขณะที่ simulation (รูปที่ 8a) ทั้งแบบ free form และแบบยึดเหนี่ยว พบว่ากรดอะมิโนของเอนไซม์จำนวนหลายหน่วยในแบบยึดเหนี่ยวจะผันแปรมากกว่าแบบ free form โดยเฉพาะกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ลูกศรชี้พบว่าการผันแปรอย่างมาก ซึ่งในบริเวณดังกล่าวคือบริเวณ one turn α -helix (residue 41-60) และบริเวณ long loop (residue 187-192) ลักษณะเช่นนี้บ่งชี้ว่าในสองบริเวณนี้มีความยืดหยุ่นตลอดเวลาของการ simulation ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่าทั้งสองบริเวณนี้มีความยืดหยุ่นสูง [19] สำหรับค่า RMSF ของ octapeptide (รูปที่ 8b) แสดงให้เห็นว่าอะตอมที่ 10, 30 และ 90 เป็นอะตอมที่มีการผันแปรของโครงสร้างมากที่สุด ซึ่งตำแหน่งของอะตอมดังกล่าวคือกรดอะมิโน P5Thr, P3Lys, P2Leu และ P3'Phe ของ octapeptide ตามลำดับ

ขณะที่การ simulation เข้าสู่ช่วงเวลาที่ 500 ps ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ระบบเริ่มเสถียร จากผลของ snapshot (รูปที่ 9) บ่งชี้ว่าลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide ที่ตำแหน่ง P2Leu และ P3'Phe เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างที่ได้จากการ docking ซึ่งสอดคล้องกับค่าการผันแปรของ RMSF ในรูปที่ 8 โดยกรดอะมิโน P2Leu เดิมซึ่งปลาย side chain ไปหา Met49 ต่อมาที่เวลา 500 ps ซึ่งปลายไปที่ Met165 ส่วนกรดอะมิโน P3'Phe เดิมซึ่งปลาย side chain มุดเข้าไปใน pocket แต่ต่อมาที่เวลา 500 ps ซึ่งปลายออกมาสู่น้ำ อย่างไรก็ตามแม้ว่า P3'Phe จะซึ่งปลายออกมาสู่น้ำแต่โครงสร้างที่ปลาย C-terminal ของ octapeptide ยังคงถูกตรึงไว้อย่างแน่นด้วยการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Thr-cluster (residues 21, 24-26, 45) ในกรณีของเอนไซม์พบว่าโครงสร้างของบริเวณเร่งปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลงไปบ้างเช่นกัน โดยพบว่ากรดอะมิโนที่ S4 ได้แก่ Gln189 และที่ S2 ได้แก่ Met49 และ Met165 มีการหมุนของ side chain อยู่ตลอดเวลา โดยเฉพาะ Gln189 พบว่าโครงสร้าง backbone มีการกระเพื่อมของ long loop อยู่ตลอดเวลา ซึ่งสอดคล้องกับค่า RMSF ที่ได้รายงานไว้ข้างต้น

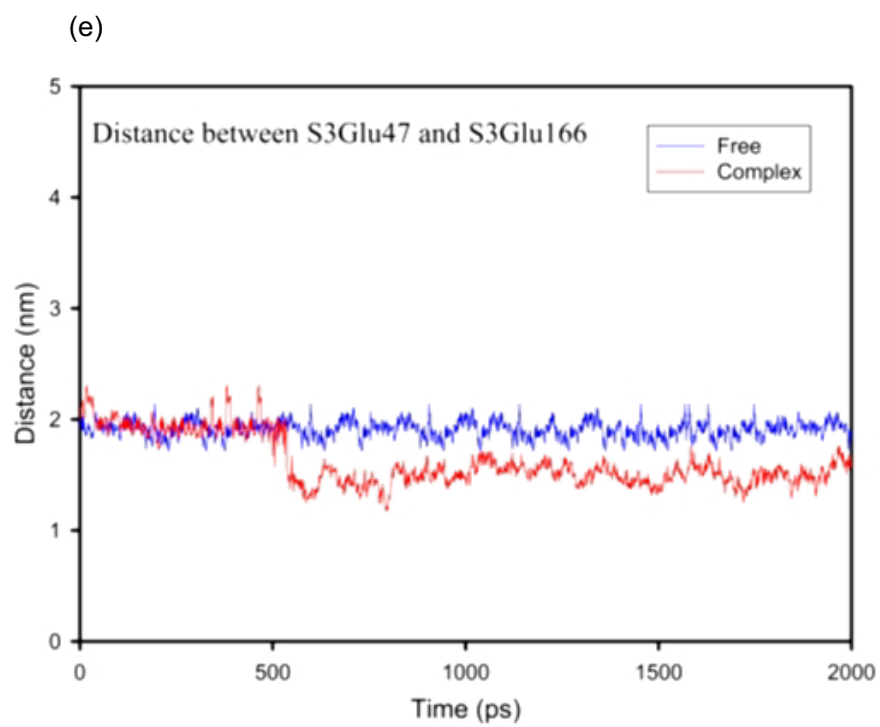
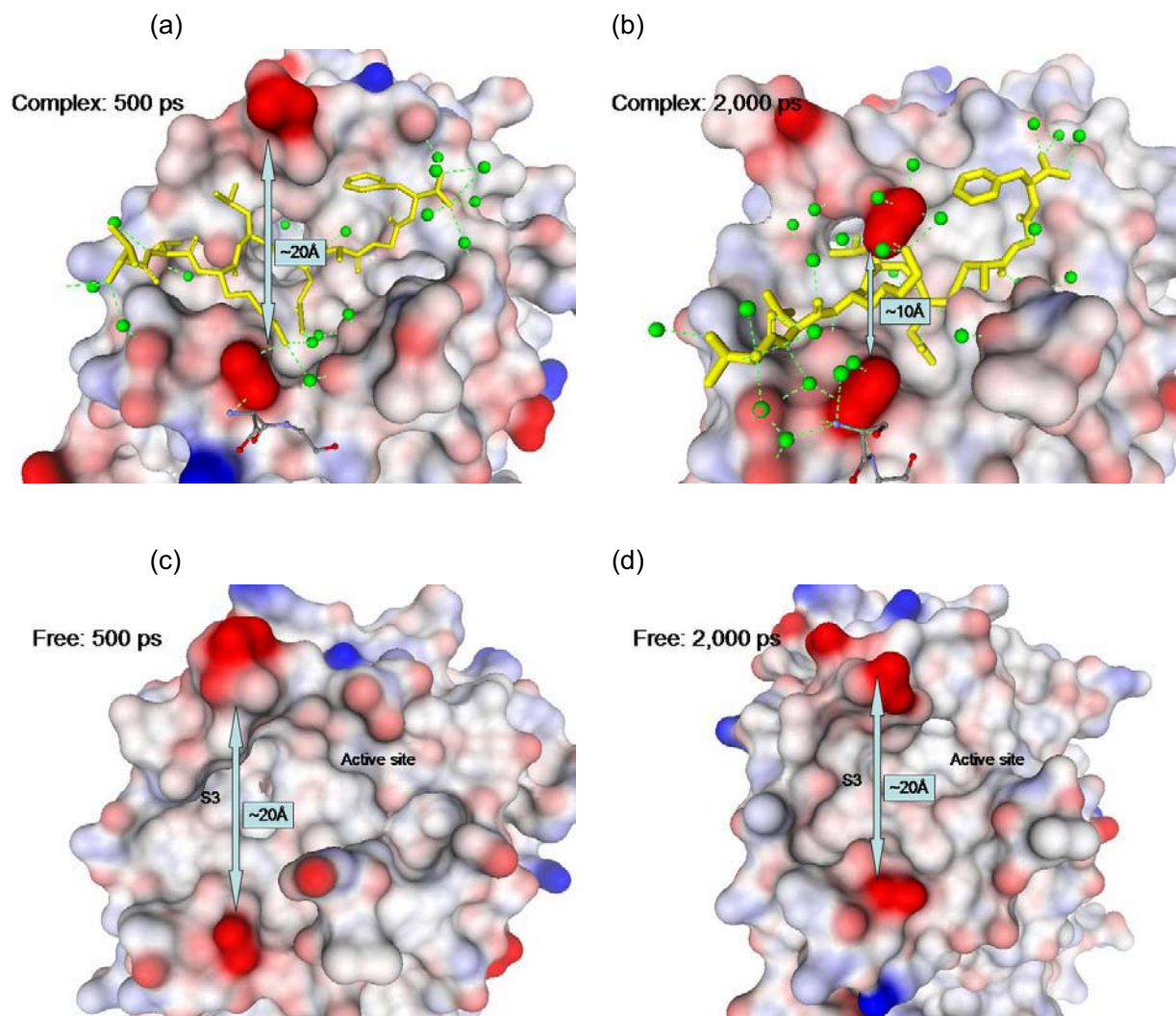


รูปที่ 9 ลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide (yellow stick) ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVpro ที่ equilibrate state ณ เวลา 500 ps โดย (a) แสดง electrostatic surface charge และ (b) แสดง ribbon model ของเอนไซม์เมื่อ surface สีน้ำเงินคือบริเวณประจุบวก สีแดงคือบริเวณประจุลบ และสีขาวคือบริเวณประจุกลาง และพบว่ามีน้ำ (green ball) จำนวนหนึ่งยึดเหนี่ยวอยู่รอบๆ octapeptide ในรัศมี 5 Å

หลังจากเวลา 500 ps จนกระทั่งสิ้นสุดการ simulation ที่เวลา 2,000 ps (รูปที่ 10) สังเกตได้ว่า octapeptide ได้เข้าไปยึดเหนี่ยวในบริเวณเร่งปฏิกิริยาแน่นยิ่งขึ้นกว่าที่เวลา 500 ps (รูปที่ 9) เมื่อพิจารณาที่ octapeptide ในช่วงเวลา 500 ps สดท้าย (1,500-2,000 ps) พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอย่างมากที่ P3Lys โดยมีค่า RMSF สูงที่สุด (ไม่ได้แสดงข้อมูล) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนี้เกิดจากการหมุน side chain ของ P3Lys จากเดิมที่เกิดพันธะไฮโดรเจน (รวมทั้ง electrostatic) อยู่กับ S3Glu166 ของเอนไซม์ ต่อมาได้หมุน side chain หันขึ้นไปหา S3Glu47 โดยสามารถตรวจพบ electrostatic interaction ระหว่าง S3Glu47--P3Lys ได้ด้วยระยะห่างเท่ากับ 2.25 Å ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ substrate specificity ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ [14-16] ไม่เคยกล่าวถึงความสำคัญของ S3Glu47 ที่มีต่อการยึดเหนี่ยว P3Lys แต่อย่างใด สำหรับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง S3Glu47 กับ P3Lys นี้พบว่าทำให้เกิดปรากฏของการเหนี่ยวนำที่พอดีในการยึดเหนี่ยว (induced fit model) โดยโครงสร้าง C^α-backbone ของสายโปรตีน one turn α -helix (residues 41-49) ได้เคลื่อนตำแหน่งจากเดิมเข้ามาใกล้กับสายโปรตีน long loop (residues 187-192) มากขึ้น (รูปที่ 11) โดยเมื่อทำการวัดระยะห่างระหว่างสายโปรตีนทั้งสองที่ตำแหน่ง C^α-backbone ของกรดอะมิโน Glu47 และ Glu166 พบว่า one turn α -helix ได้เคลื่อนตัวเข้ามาใกล้ long loop ตั้งแต่เวลา 500 ps เรื่อยมา โดยแต่เดิมจะอยู่ห่างกันประมาณ 20 Å และต่อมาได้เข้ามาใกล้กันจนอยู่ห่างกันประมาณ 10 Å ในขณะที่มีพันธะไฮโดรเจนระหว่าง P1Gln กับ S1 pocket ได้ช่วยตรึง octapeptide ไว้ไม่ให้เสียลักษณะการยึดเหนี่ยวที่ถูกต้อง นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับเอนไซม์แบบ free form ด้วย ซึ่งจากการวัดค่าระยะทางจากกราฟบ่งชี้ว่า ไม่มีการเคลื่อนตัวของ one turn α -helix เข้ามาใกล้ long loop เหมือนกับในเอนไซม์แบบยึดเหนี่ยวอย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับการศึกษา MD simulation ของเอนไซม์ SARS CoVMpro monomer A แบบ free form ที่ Liu และคณะ [19] เคย simulation เอาไว้ก่อนหน้านี้



รูปที่ 10 ลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide (yellow stick) ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่ equilibrate state ณ เวลา 2,000 ps โดย (a) แสดง electrostatic surface charge และ (b) แสดง ribbon model ของเอนไซม์ เมื่อ surface สีน้ำเงินคือบริเวณประจุบวก สีแดงคือบริเวณประจุลบ และสีขาวคือบริเวณประจุกลาง และพบว่ามีน้ำ (green ball) จำนวนหนึ่งยึดเหนี่ยวอยู่รอบๆ octapeptide ในรัศมี 5 Å



รูปที่ 11 ลักษณะของ octapeptide ที่เหนี่ยวนำและทำให้เกิด induced fit model ของเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา S3 subsite โดยพบลักษณะนี้ตั้งแต่เวลา 500 ps (a) ขึ้นไปจนกระทั่งสิ้นสุดการ simulation ที่ 2,000 ps (b) ทั้งนี้ไม่พบลักษณะการ induced fit กับเอนไซม์แบบ free form ตลอดระยะเวลาในการ simulation (c) และ (d) และสำหรับลักษณะการเกิด induced fit model นี้เกิดจากสายโปรตีน one turn α -helix ได้เคลื่อนตัวเข้ามาใกล้กับสายโปรตีน long loop เนื่องจากอิทธิพลของการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้าระหว่าง S3Glu47 กับ P3Lys ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยค่าระยะทางระหว่าง Glu47 กับ Glu166 (e)

4. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะการยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์ SARS CoVMpro กับซับสเตรท octapeptide ด้วยวิธีการ molecular docking ร่วมกับวิธีการศึกษาพลวัตเชิงโมเลกุลสามารถนำมาอธิบายเพื่อสนับสนุนผลการทดลองในห้องปฏิบัติการให้มีความเข้าใจเพิ่มขึ้นว่า subsite ของเอนไซม์ที่เป็น critical subsite สำหรับการยึดเหนี่ยวซับสเตรทคือ S3, S1 และ S4' โดยซับสเตรทจำเพาะอย่าง Thr-Val-Lys-Leu-Gln-Ala-Gly-Phe สามารถยึดเหนี่ยวกับเอนไซม์ได้ดีเนื่องจากอิทธิพลของ P3Lys ที่เกิดอันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้ากับ S3Glu47 มากกว่าที่จะเกิดกับ Glu166 อย่างที่เข้าใจกัน นอกจากนี้อันตรกิริยาระหว่าง S1 pocket กับ P1Gln รวมทั้งอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นที่ปลาย C-terminal ของ octapeptide กับ S4Thr-cluster ด้วยพันธะไฮโดรเจนจำนวนหลายพันธะนั้นน่าจะมีนัยสำคัญอย่างมากที่ช่วยส่งเสริมให้ octapeptide ที่มีลำดับ Thr-Val-Lys-Leu-Gln-Ala-Gly-Phe สามารถยึดเหนี่ยวกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro ได้อย่างจำเพาะ

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้โครงการวิจัยเคมีทางยาของฝ่ายวิชาการที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ MAEKA Cluster เพื่อใช้ในการคำนวณ Molecular docking

6. เอกสารอ้างอิง

1. Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G. M., Ahuja, A., Yung, M. Y., Leung, C. B., To, K. F., Lui, S. F., Szeto, C. C., Chung, S., and Sung, J. J., 2003, "A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong," *New England Journal of Medicine*, Vol. 348, pp. 1986-1994.
2. Poutanen, S. M., Low, D. E., Henry, B., Finkelstein, S., Rose, D., Green, K., Tellier, R., Draker, R., Adachi, D., Ayers, M., Chan, A. K., Skowronski, D. M., Salit, I., Simor, A. E., Slutsky, A. S., Doyle, P. W., Krajden, M., Petric, M., Brunham, R. C., and McGeer, A. J., 2003, "Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome in Canada," *New England Journal of Medicine*, Vol. 338, pp. 1995-2005.
3. Holmes, K. V., 2003, "SARS-Associated Coronavirus," *New England Journal of Medicine*, Vol. 348, pp. 1948-1951.
4. Leng, Q., and Bentwich, Z., 2003, "A Novel Coronavirus and SARS," *New England Journal of Medicine*, Vol. 349, pp. 709.
5. Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M. H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A. D., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., and Bellini, W. J., 2003, "Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome," *Science*, Vol. 300, pp. 1394-1399.
6. Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S., Khattra, J., Asano, J. K., Barber, S. A., Chan, S. Y., Cloutier, A., Coughlin, S. M., Freeman, D., Girn, N., Griffith, O. L., Leach, S. R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S. B., Pandoh, P. K., Petrescu, A. S., Robertson, A. G., Schein, J. E., Siddiqui, A., Smailus, D. E., Stott, J. M., Yang, G. S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T. F., Bowness, D., Czub, M., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S., Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G. A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R. C., Krajden, M., Petric, M., Skowronski, D. M., Upton, C., and Roper, R. L., 2003, "The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus," *Science*, Vol. 300, pp.1399-1404.
7. Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E., and Ziebuhr, J., 2003,

"Mechanisms and Enzymes Involved in SARS Coronavirus Genome Expression," *Journal of General Virology*, Vol. 84, pp. 2305-2315.

8. Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J. R., and Hilgenfeld, R., 2003, "Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs," *Science*, Vol. 300, pp.1763-1767.

9. Xiong, B., Gui, C. S., Xu, X. Y., Luo, C., Chen, J., Luo, H. B., Chen, L. L., Li, G. W., Sun, T., Yu, C. Y., Yue, L. D., Duan, W. H., Shen, J. K., Qin, L., Shi, T. L., Li, Y. X., Chen, K. X., Luo, X. M., Shen, X., Shen, J. H., and Jiang, H. L., 2003, "A 3D Model of SARS_CoV 3CL Proteinase and Its Inhibitors Design by Virtual Screening," *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 24, pp. 497-504.

10. Yang, H., Yang, M., Ding, Y., Liu, Y., Lou, Z., Zhou, Z., Sun, L., Mo, L., Ye, S., Pang, H., Gao, G. F., Anand, K., Bartlam, M., Hilgenfeld, R., and Rao, Z., 2003, "The Crystal Structures of Severe Acute Respiratory Syndrome Virus Main Protease and Its Complex with an Inhibitor," *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, Vol. 100, pp. 13190-13195.

11. Chen, S., Chen, L., Tan, J., Chen, J., Du, L., Sun, T., Shen, J., Chen, K., Jiang, H., and Shen, X., 2005, "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3C-Like Proteinase N Terminus is Indispensable for Proteolytic Activity but Not for Enzyme Dimerization; Biochemical and Thermodynamic Investigation in Conjunction with Molecular Dynamics Simulations," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, pp.164-173.

12. Toney, J. H., Navas-Martin, S., Weiss, S. R., and Koeller, A., 2004, "Sabadinine: a Potential Non-Peptide Anti-Severe Acute-Respiratory-Ryndrome Agent Identified Using Structure-Aided Design," *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 47, pp. 1079-1080.

13. Chou, K. C., Wei, D. Q., and Zhong, W. Z., 2003, "Binding Mechanism of Coronavirus Main Proteinase with Ligands and Its Implication to Drug Design Against SARS," *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol. 308, pp.148-151.

14. Anand, K., Palm, G. J., Mesters, J. R., Siddell, S. G., Ziebuhr, J., and Hilgenfeld, R., 2002, "Structure of Coronavirus Main Proteinase Reveals Combination of a Chymotrypsin Fold with an Extra Alpha-Helical Domain," *EMBO Journal*, Vol. 21, pp. 3213-3224.

15. Chen, L., Gui, C., Luo, X., Yang, Q., Gunther, S., Scandella, E., Drosten, C., Bai, D., He, X., Ludewig, B., Chen, J., Luo, H., Yang, Y., Yang, Y., Zou, J., Thiel, V., Chen, K., Shen, J., Shen, X., and Jiang, H., 2005, "Cinanserin is an Inhibitor of the 3C-Like

Proteinase of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Strongly Reduces Virus Replication in Vitro,” *Journal of Virology*, Vol. 79, pp. 7095-7103.

16. Fan, K., Ma, L., Han, X., Liang, H., Wei, P., Liu, Y., and Lai, L., 2005, “The Substrate Specificity of SARS Coronavirus 3C-Like Proteinase,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 329, pp. 934-940.

17. Bacha, U., Barrila, J., Velazquez-Campoy, A., Leavitt, S. A., and Freire, E., 2004, “Identification of Novel Inhibitors of the SARS Coronavirus Main Protease 3CLpro,” *Biochemistry*, Vol. 43, pp. 4906-4912.

18. Gasteiger, J., and Marsili, M., 1980, “Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity—a Rapid Access to Atomic Charges,” *Tetrahedron*, Vol. 36, pp. 3219-3228.

19. Liu, H. L., Lin, J. H., Ho, Y., Hsieh, W. C., Chen, C. W., and Su, Y. C., 2004, “Molecular Dynamics Simulations of Various Coronavirus Main Proteinases,” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Vol. 22, pp. 65-77.

7. Output ที่ได้จากงานวิจัย

7.1 Oral presentation

Surapong Pinitglang, Khanok Ratanakhanokchai, Khin Lay Kyu, Pornthep Sompornpisut and Kongsakda Phakthanakanok "Characterization of S₃ subsite of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Proteinase (SARS CoV M^{pro}) Based on Molecular Docking Method", **32nd Congress on Science and Technology of Thailand**, 10-12 October 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

Surapong Pinitglang, Khanok Ratanakhanokchai, Khin Lay Kyu, Pornthep Sompornpisut and Kongsakda Phakthanakanok "Investigation of Molecular Interaction between SARS Cysteine Proteinase Active Site and Octapeptide using Molecular Dynamics Simulation", **33rd Congress on Science and Technology of Thailand**, 18-20 October 2007, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand.

7.2 Poster presentation

Surapong Pinitglang, Khanok Ratanakhanokchai, Khin Lay Kyu, Pornthep Sompornpisut and Kongsakda Phakthanakanok, "Molecular Modeling of Active Site of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Cysteine Proteinase Based Drug Design", **1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand**, 24-25 October 2006, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand.

Surapong Pinitglang, Khanok Ratanakhanokchai, Khin Lay Kyu, Pornthep Sompornpisut and Kongsakda Phakthanakanok, "*In-Silico* Analysis of SARS Cysteine Proteinase Interaction with Octapeptide Substrate: Implication for Structure and Active Site Binding Mechanism", **2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand**, 20-21 September 2007, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand.

7.3 Proceedings

Surapong Pinitglang, Khanok Ratanakhanokchai, Khin Lay Kyu, Pornthep Sompornpisut and Kongsakda Phakthanakanok, "Insight into the Active Site of SARS Coronavirus Main Cysteine Proteinase: Molecular Dynamics Study of Monomer A", **1st**

Biochemistry and Molecular Biology (BMB) Conference: Biochemistry and Molecular Biology for the Integration of Life, 26-27 April 2007, pp. 103-113., Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. **(Invited speaker)**

7.4 Publication

Phakthanakanok K, Rattanakhanokchai K, Kyu K L, Sompornpisut P, Pinitglang S. *Computational Investigation on Binding Mechanism of SARS Cysteine Proteinase Studies: Structural Model Approach of Active Site Interactions with Octapeptide by Docking and Molecular Dynamics Simulation. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. **(in submission)***.