

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การยับยั้งการทำงานของ Epidermal Growth Factor
Receptor: ด้วยวิธีผสมผสานระหว่างการจำลองใน
คอมพิวเตอร์และการทดลองในห้องทดลอง

โดย เกียรติทวิ ชวงศ์โกมล

มิถุนายน พ.ศ. 2551

Abstract

The cancer is one of serious diseases that people life was killed in many countries. Abnormal activation of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase (EGFR-TK) have been shown to be involved more than 50% of cancer diseases. The inhibition of EGFR-TK activity by small molecules has proved effective for cancer therapy. Nevertheless, the EGFR-TK mutation in cancer's patients has been reported while on therapeutic process. In addition, more novel compounds are still necessary to improve the inhibited activity of this protein. The goal of this research was to develop both computational and experimental methods to find potential inhibitors of EGFR-TK further drug development. The computational method was to explore through virtual screening (VS) against two ligand databases. These databases are Chemiebase database which is collected 29,960 active compounds found in the Thai medical herb, and NCI diversity set of 1,990 compounds that passed *in vivo* cancer cell test. The VS based on molecular docking method is an *in silico* alternative to high-throughput screening that imposes a structure-based filter on a small chemical database. Furthermore, this technique is robust and inexpensive when compared to high-throughput screening. The crystal structure of EGFR-TK bound to erlotinib, (PDB code 1M17) was screened against a collection of compounds from Chemiebase database and NCI diversity set. We found 5 hits from Chemiebase database and 13 compounds from NCI diversity set. Both hit compounds are potential compound for further testing and development as a lead compound. Furthermore, in experimental part, we were able to clone the EGFR-TK as a GST-fusion protein in *E.coli*. and develop an activity assay method. Nevertheless the yield of expression protein was very low which was not enough for further NMR structural study.

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งเป็นโรคร้ายอันดับต้นๆที่คร่าชีวิตของประชากรในหลายประเทศ สาเหตุของโรคมะเร็งมากกว่า 50% ของชนิดมะเร็งที่พบในปัจจุบันเกิดจากการทำงานอย่างผิดปกติของโปรตีน Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase (EGFR-TK) การยับยั้งการทำงานของ EGFR-TK โดยสารเคมีโมเลกุลเล็กได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความสามารถในการรักษาโรคมะเร็งได้ อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของ EGFR-TK ในผู้ป่วยโรคมะเร็งในกระบวนการรักษาด้วยสารเคมีบำบัด จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องค้นหาสารเคมีที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการทำงานของ EGFR-TK ได้ เป้าหมายของงานวิจัยชิ้นนี้คือพัฒนาระเบียบวิธีการทดลองแบบบูรณาการโดยอาศัยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์และในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์เพื่อค้นหาสารยับยั้งการทำงานของ EGFR-TK ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งอาจจะสามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ในอนาคต ในวิธีการคำนวณทางคอมพิวเตอร์นั้นได้ใช้เทคนิคคัดสรรสารเสมือนเพื่อคัดสรรสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีนนี้จากฐานข้อมูลสารเคมีโมเลกุลเล็กสองแห่งคือ ฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรไทย (Chemiebase database) ซึ่งรวบรวมสารไว้มากถึง 29,960 ชนิด และฐานข้อมูล NCI diversity set ที่มีสารที่ผ่านการทดสอบยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแล้วถึง 1,990 ชนิด การคัดสรรสารเสมือนโดยอาศัยวิธี molecular docking เป็นการคัดเลือกสารโดยยึดหลักการวางตัวของโครงสร้างสารเคมีโมเลกุลเล็กในบริเวณเข้าจับของโปรตีนหรือเอนไซม์ วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก

รวดเร็วอีกทั้งยังประหยัดงบประมาณในการทำการวิจัยเมื่อเปรียบเทียบกับคัดเลือกลำดับในห้วงปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ในการทดลองนั้นได้เลือกใช้โครงสร้างสามมิติจากผลึกคริสตัลของโปรตีน EGFR-TK ที่จับอยู่กับยาค้านมะเร็งที่ชื่อว่า Erlotinib ชื่อทางการค้าว่า Tarceva® เป็นโปรตีนเป้าหมายสำหรับการคัดสรรสารเสมือนในคอมพิวเตอร์ จากผลการคัดสรรสารเสมือนพบสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการทำงานของ EGFR-TK จากฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรไทยอยู่ 5 โครงสร้างและจากฐานข้อมูล NCI diversity set อยู่ 13 โครงสร้างซึ่งสารเหล่านี้จะสามารถพัฒนาเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการพัฒนาได้อีกในอนาคต นอกจากนี้แล้วในส่วนของการทดลองทางห้องปฏิบัติการเราสามารถ แยกออกโปรตีน EGFR-TK ที่ต่ออยู่กับ GST-fusion โปรตีนในระบบของ *E.coli* ได้ และเรายังได้พัฒนาวิธีตรวจสอบการทำงานของโปรตีนได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามโปรตีนที่ผลิตได้จากระบบนี้มีปริมาณน้อยมากซึ่งไม่เพียงพอที่จะนำไปศึกษาโครงสร้างของโปรตีนโดยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ได้

Project Code : MRG4980061

Project Title : การยับยั้งการทำงานของ Epidermal Growth Factor Receptor: ด้วยวิธีผสมผสานระหว่างการจำลองในคอมพิวเตอร์และการทดลองในห้องทดลอง

Investigator : เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล ม.เกษตรศาสตร์

E-mail Address : fsciktc@ku.ac.th

Project Period : 1 กรกฎาคม 2549 ถึง 30 มิถุนายน 2551

Keywords : tyrosine kinase, EGFR, virtual screening, inhibitor, molecular docking

ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

Growth factor หลายชนิดมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง receptor ของ growth factor มีบทบาทสำคัญในการแสดงฤทธิ์ของ growth factor ด้วยซึ่ง receptor ของ growth factor มักจะเป็นเอนไซม์ประเภท tyrosine kinase ซึ่งมีบทบาทในการแบ่งตัวของเซลล์ receptor tyrosine kinase นี้พบได้ในเซลล์หลายชนิดทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง receptor ที่มีความสำคัญมีหลายชนิด แต่ receptor ที่ได้รับการศึกษามากที่สุดคือ epidermal growth factor receptor (EGFR) ซึ่ง EGFR นี้ได้ถูกค้นพบเกือบสามสิบปีมาแล้ว และเป็น receptor ตัวแรกที่ถูกเชื่อมโยงโดยตรงกับการเกิดมะเร็ง EGFRมีส่วนเกี่ยวข้องกับมากมายกับการควบคุมกิจกรรมของเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น การเกิด apoptosis, การแบ่งตัวของเซลล์, การจัดเรียงตัวของ cytoskeleton ในเซลล์, การพัฒนาของเซลล์ไปสู่เซลล์เป้าหมาย (differentiation), การแสดงออกของยีน, การตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน, และการทำงานของระบบประสาท ถ้าหาก growth factor หรือ EGFR มีจำนวนเพิ่มขึ้น หรือ อัตราการ turnover ของ receptor ลดลง จะส่งผลทำให้ growth factor ออกฤทธิ์กระตุ้นมากกว่าปกติ ทำให้เซลล์เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นผิดปกติซึ่งสามารถพัฒนากลายเป็นมะเร็ง ปัจจุบันพบว่ามีมะเร็งหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติในการทำงานของ EGFR นี้ อาทิเช่น มะเร็งที่ศีรษะและคอ, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งตับ, มะเร็งปอด, มะเร็งไต, มะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งรังไข่, และ มะเร็งเต้านม นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ EGFR ที่ผิดปกติในบริเวณ apical membrane ของ epithelial เซลล์ ยังทำให้เกิดโรค polycystic kidney disease

ดังนั้น EGFR จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญสำหรับการพัฒนา ยาเพื่อยับยั้งมะเร็ง ยาหลายกลุ่มที่มีเป้าหมายในการยับยั้ง EGFR ได้ถูกพัฒนาซึ่งประกอบด้วย anti-EGFR แอนติบอดี, antisense oligonucleotide, และ tyrosine kinase inhibitor ยาในกลุ่ม tyrosine kinase inhibitor เป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสำเร็จอย่างสูง เพราะยาในกลุ่มนี้มักจะ เป็น สารอินทรีย์ขนาดเล็ก ซึ่งง่ายต่อการสังเคราะห์ผลิตเป็นยา และ ง่ายต่อการส่งเข้าไปในเซลล์และยับยั้ง การทำงานของ EGFR ยาในกลุ่มนี้บางตัวได้อยู่ในขั้นการทดสอบในคน อาทิเช่น Irressa, ZD-1839, Tarceva (OSI-774), and Cetuximab. อย่างไรก็ตามพบว่ายาแต่ละตัวจะมีความเหมาะสมในการยับยั้งมะเร็งแบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาคัดสรรหาสารออกฤทธิ์เพิ่มเติมที่ยับยั้งการทำงานของ EGFR โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การหาสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรไทย เพื่อผลักดันให้เกิดการสกัดสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรไทยเชิงพาณิชย์ นอกจากนี้ยังควรมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบความสามารถในการจับกันได้ระหว่างสารออกฤทธิ์กับ EGFR ด้วย เทคนิค NMR spectroscopy ซึ่งจะทำให้สามารถศึกษาโครงสร้างการจับกันเพื่อหาหมู่ฟังก์ชันที่สามารถจับกันได้ในสถานะจลศาสตร์ (dynamic) และศึกษาค่าความสามารถในการจับกัน (affinity) ได้จริงในสารละลาย ซึ่งความรู้ที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการทดสอบสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้ ไปสู่การพัฒนาเป็นยาในการรักษามะเร็งต่อไป

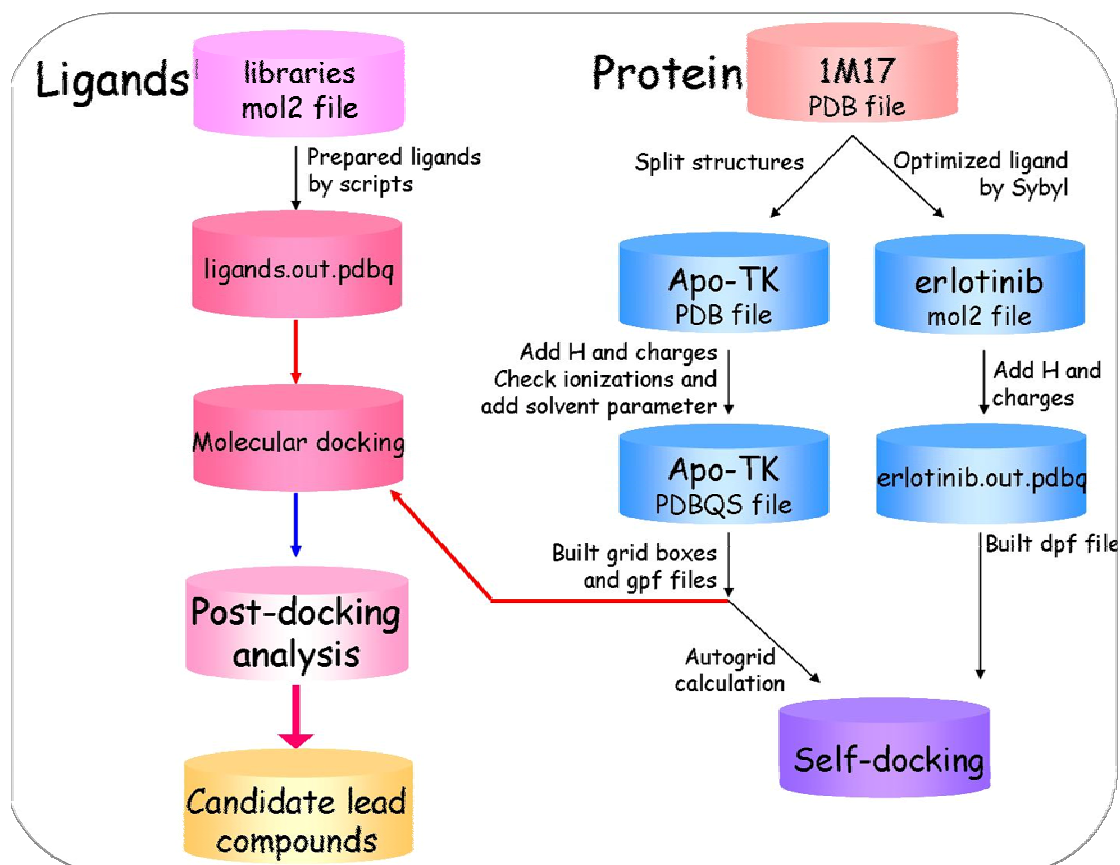
วัตถุประสงค์

1. ทำการคัดสรรเสมือนจริง ด้วยเทคนิค molecular docking simulation ระหว่าง โดเมนของ EGFR กับฐานข้อมูลสารออกฤทธิ์จากสมุนไพร (<http://chemiebase.ku.ac.th>) ซึ่งมีสารออกฤทธิ์อยู่ 29,960 ตัว
2. นำกลุ่มสารออกฤทธิ์ที่พบทดสอบความจำเพาะจงในการจับกับ tyrosine kinase จาก EGFR ด้วยการเปรียบเทียบการจับกันระหว่าง tyrosine kinase จาก EGFR และ tyrosine kinase จากโปรตีนตัวอื่น
3. ทำการแสดงออกของโปรตีนใน tyrosine kinase โดเมน ที่ติดฉลากด้วย ^{15}N และ/หรือ ^{13}C ในเซลล์แบคทีเรียหรือ เซลล์แมลง และทดสอบโปรตีนที่ได้ด้วย NMR spectroscopy

วิธีการทดลอง

1. วิธีการทำ Molecular docking

ในขั้นตอนการทำ molecular docking นั้นได้สรุปในแผนผังดังรูปที่ 1 โดยได้เริ่มจากการนำโปรตีนที่เราสนใจใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายซึ่งคือ EGFR-TK ที่จับอยู่กับ erlotinib (AQ4) ยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โครงสร้างนี้มีรหัส PDB คือ 1M17



รูปที่ 1 แผนผังการเตรียมโครงสร้างสามมิติเพื่อที่จะทำการคำนวณด้วยวิธี molecular docking

เมื่อได้โครงสร้างโปรตีนที่จะเป็นโปรตีนเป้าหมายแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ แยกโครงสร้างของยาที่จับอยู่ในโครงสร้างผลึกโปรตีนออก แล้วทำการ docked กลับเข้าไปใน binding pocket แล้วโครงสร้างที่ docked ได้จะต้องวางตัวใกล้เคียงโครงสร้างในผลึกโปรตีน (1M17) หรือ วางตัวทับกับโครงสร้างเดิมได้พอดี เรียกขั้นตอนนี้ว่า “Reproduced co-crystal” หลังจากนั้นจึงนำค่าพารามิเตอร์ที่ได้นั้นมาใช้ในการคัดสรรสารเสมือนโดยใช้คอมพิวเตอร์ (*in silico* screening or virtual screening)

โปรตีน EGFR-TK เตรียมโดยใช้โปรแกรม Sybyl 7.3 (Tripos Associates Inc., 1996) แยกโครงสร้างของ erlotinib ออกหลังจากนั้นจึงเติมไฮโดรเจนอะตอมแบบโพลาไรให้กับโมเลกุลโปรตีน EGFR-TK และประจุแบบ Kolman charge และ Solvent Parameter โดยใช้ script โปรแกรม pmol2q เพื่อให้พร้อมสำหรับกระบวนการ molecular docking โดยโปรแกรม AutoDock v.3.0.5 คือในรูปแบบ protein.pdbqs

ในขั้นทำ molecular docking ใช้โปรแกรม Autodock v3.0.5 ในการคำนวณหาการจัดเรียงตัวของสารโมเลกุลเล็กในบริเวณจับ (binding pocket) ของ EGFR-TK แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนสำคัญ คือ การเตรียมลิแกนด์ กระบวนการกำหนดบริเวณและชนิดของอะตอมในการคำนวณ หรือที่เรียกว่า AutoGrid และในขั้นสุดท้ายคือการคำนวณการจับกันของโปรตีนและลิแกนด์ หรือที่เรียกว่า AutoDock ในขั้นการกำหนดบริเวณหรือ AutoGrid นั้น Grid box จะถูกสร้างขึ้นรอบๆ catalytic cleft ของโปรตีน EGFR-TK (ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกันกับตัวยา erlotinib วางตัวอยู่ใน binding pocket ของโครงสร้างผลึกคริสตัล) และขนาดของกล่องคือ 70 จุดในแกน X และ 60 จุดทั้งในแกน Y และแกน Z ระยะห่างระหว่างจุดคือ 0.375 Å จำนวนรอบในการคำนวณ AutoDock คือ 50 ครั้งต่อ ligand 1 โมเลกุล

ฐานข้อมูลที่ใช้ในการคัดสรรเสมือนจริงนั้น ประกอบด้วยสองฐานข้อมูล ฐานข้อมูลแรกคือ ฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรไทยซึ่งรวบรวมไว้ใน Chemiebase Database (<http://chemiebase.ku.ac.th>) ซึ่งมีสาร อยู่ 29,960 โครงสร้าง และฐานข้อมูลที่สองคือ ฐานข้อมูล national cancer institute (NCI) diversity set ซึ่ง เป็นกลุ่มสารจากสถาบันมะเร็งของประเทศสหรัฐอเมริกา มีจำนวน 1,990 โครงสร้าง ligand เหล่านี้เป็นสารที่มีการทดสอบแล้วว่าสามารถยับยั้งมะเร็งในห้องปฏิบัติการได้ และได้ผ่านการ optimize เพื่อให้ใช้งานกับ molecular docking แล้ว จึงเป็นฐานข้อมูลที่น่าสนใจที่จะทำการทดสอบด้วย

รูปแบบของไฟล์ลิแกนด์ที่เหมาะสมสำหรับการนำมาคำนวณในขั้น molecular docking โดยใช้โปรแกรม AutoDock v.3.0.5 คือ ligand.pdbq ดังนั้นจากไฟล์ของลิแกนด์ที่ได้จากฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรไทยซึ่งอยู่ในรูป ligand.mol2 ในขณะที่ข้อมูลจากฐานข้อมูล NCI diversity set ซึ่งอยู่ในรูป ligand.pdb ดังนั้นลิแกนด์เหล่านี้จึงต้องผ่านขั้นตอนการเติมไฮโดรเจน(แบบทูกอะตอม)และเติมประจุแบบ Gasteiger โดยใช้โปรแกรม prepare_ligand.py ในการแปลงไฟล์ลิแกนด์ โดยไฟล์ลิแกนด์ทั้งหมดจะเตรียมบนเครื่อง cluster computer (computing node 8 nodes)ของหลักสูตรพันธุวิศวกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หลังจากนั้นจึงนำลิแกนด์ที่อยู่ในรูปแบบ ligand.pdbq แล้วมาผ่านการคัดสรรสารเสมือนจริงโดยอาศัยกระบวนการ molecular docking ผ่านการควบคุมโดย script ที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ และคำนวณโดยใช้แหล่งทรัพยากรคอมพิวเตอร์ในการคำนวณของ NECTEC (Large scale Simulation Research Laboratory (LSR), National Electronics and Computer Technology Center)ในเครื่อง Itanium cluster ซึ่งมี computing node 32 nodes การส่งงานขึ้นไปรันจะมีการทำงานเรียงตามลำดับก่อนหลังตามระบบ PBS client

2. Post-docking analysis (การวิเคราะห์ผลหลังจากขั้นทำ docking)

ในขั้นการวิเคราะห์ผล เริ่มแรกใช้หลักการ scoring function ของโปรแกรม AutoDock คือ ค่า final docked energy (kcal/mol) แต่เนื่องจากค่าที่ได้วิเคราะห์ผลและแปรผลได้ยากเนื่องจากค่าจาก final docking energy มีช่วงห่างของค่าค่อนข้างแคบ และจากคำแนะนำจาก ดร.จักร แสงมา (หน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีสารสนเทศ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัย) ใช้ scoring function ของโปรแกรม Fred (Fast Rigid Exhaustive Docking) จาก OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA. ซึ่งค่า Scoring function ของ Fred นั้นมีทั้งหมด 5 แบบ คือ ChemGauss2 ChemScore PLP (Piecewise Linear Potential Interaction) ScreenScore และ ShapeGauss ซึ่งแต่ละ score จะมีการ weight คำนวณให้กับคุณสมบัติทางเคมีของสารที่แตกต่างกัน

ในขั้นตอนก่อนที่จะใช้โปรแกรม Fred ทางผู้วิจัยได้เขียนโปรแกรมอย่างย่อ (script) ขึ้นเพื่อที่จะสะดวกในการเติมตัวเลขหลังโมเลกุลที่ได้จากการรัน AutoDock 50 โมเลกุล เพื่อที่จะเพิ่มความสะดวกที่จะแยกไฟล์ออกมา เนื่องจากว่าไฟล์ทั้ง 50 configuration มีชื่อที่หัวไฟล์เป็นชื่อเดียวกันถ้านำมาคำนวณโดยโปรแกรม Fred จะไม่สามารถแยกความแตกต่างของ configuration เปรียบเทียบกับผลที่ได้มาจากโปรแกรม AutoDock ได้ เพื่อที่จะหาว่าโครงสร้างการจัดเรียงตัวแบบไหนและที่ให้ค่า Scoring function ที่ดี ใกล้เคียงตัวควบคุม (erlotinib) ที่สุด โดยหลังจากเติมตัวเลขหลังโมเลกุลที่ได้จาก docking results แล้วการตรวจสอบโดย Fred program ทั้ง 5 scoring functions และใช้อีก script ซึ่งใช้ในการคัดเลือกหาโมเลกุลที่มีค่า scoring function ทั้ง 5 แบบ อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือจะเลือกโครงสร้างที่มีค่า Score มากกว่ายาต้านมะเร็ง erlotinib อยู่อย่างน้อย 4 ใน 5 Score หลังจากนั้นก็จะนำสารที่ผ่านการคัดเลือกจากกระบวนการทำการกรองอีกครั้งด้วยโปรแกรม FILTER (OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA.) ที่กำหนดให้เลือกสารที่มีคุณสมบัติผ่าน “Lipinski’s Rule of Five” ซึ่งมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้คือ มี hydrogen bond donor ไม่เกิน 5 อะตอม มี hydrogen bond acceptor ไม่เกิน 10 อะตอม น้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 500 g/mol และมีค่า partition coefficient log P น้อยกว่า 5 ซึ่งจะได้โครงสร้างและตำแหน่งการวางตัวของสารออกฤทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกตามเกณฑ์ที่กำหนดได้ จากฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรไทย ณ ปี พ.ศ. 2549 เริ่มต้นมีโครงสร้างสารจำนวน 30,000 โครงสร้าง และหลังจากผ่านการคัดเลือกในขั้นตอน Fred Scores โดยเลือกอย่างน้อย 4 ใน 5 Score เหลือ โครงสร้าง 126 โครงสร้าง และมีโครงสร้างที่ผ่าน โปรแกรม FILTER ตามหลัก Lipinski’s Rule of Five เพียง 5 โครงสร้าง

3. การโคลนยีนไทโรซีนไคเนส

3.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอด้านปลาย 5'

นำพลาสมิด pGex-4T-1 มาตัดด้วยเอนไซม์ Sma I และ Xho I บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel แล้วทำการ purify ด้วยวิธีตกตะกอนด้วย ethanol

3.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอด้านปลาย 3'

นำพลาสมิดที่มียีน tyrosine kinase ได้รับมาจาก มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ใช้ไพรเมอร์ EGFR TK_FOR (Sma I) เป็น forward primer โดยออกแบบให้มีลำดับเบสที่เป็นบริเวณตัดจำเพาะ (cutting site) ของเอนไซม์ Sma I และใช้ไพรเมอร์ EGFR TK_REVHIS (Xho I) เป็น reverse primer โดยออกแบบให้มีลำดับเบสที่เป็นบริเวณตัดจำเพาะ (cutting site) ของเอนไซม์ Xho I ตามด้วยลำดับเบสของฮิสทีดีน 6 ตัว

ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้คือ

EGFRTK_FOR (Sma I)

5' ATC CCG GGC TTC AAA AAG ATC AAA GTG 3'

EGFRTK_REVHIS (XhoI)

5' TAT CTC GAG TCA TGT GTG GTG GTG GTG GTG TCT TTC ATC CCC CTG AAT 3'

โดยใช้สภาวะดังนี้

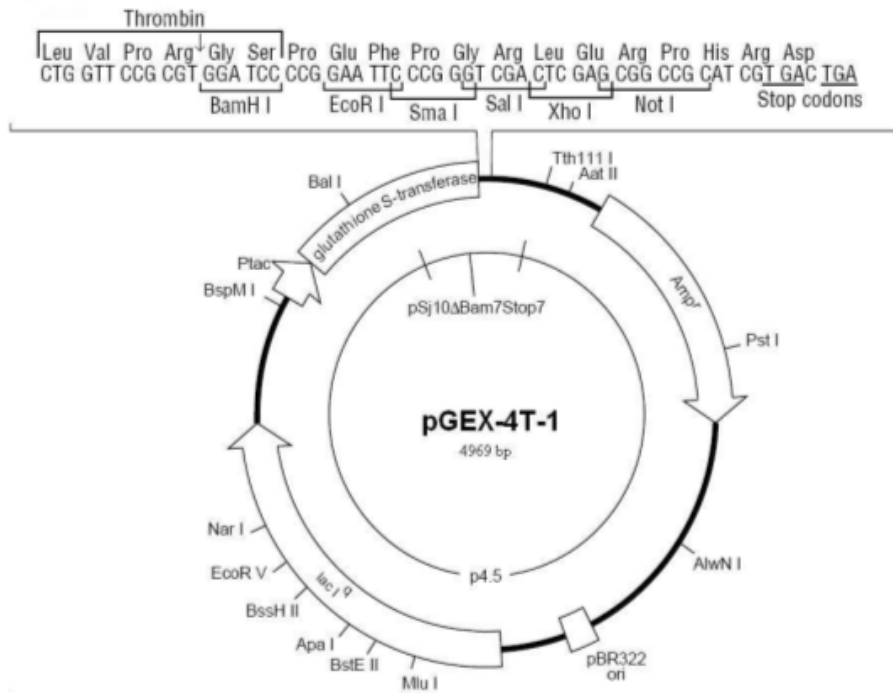
94 °C	4.30 นาที	1 รอบ
94 °C	30 วินาที	} 30 รอบ
55 °C	30 วินาที	
72 °C	1 นาที	
72 °C	10 นาที	1 รอบ
4 °C	∞	

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel แล้วทำการ purify ด้วยวิธีตกตะกอนด้วย ethanol จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGex-4T-1 ด้วยเอนไซม์ T4DNA ligase แล้วบ่มที่ 4 °C ข้ามคืน หลังจากนั้นทำการขนถ่ายพลาสมิด pGex-4T-1 ที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วเข้าสู่ competent E. coli(DH5α) ด้วยวิธี heat shock แล้วทำการคัดเลือกเชื้อที่มีโคโลนีขาวเลี้ยงใน LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin เข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 3 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก E. coli แล้วตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ Sma I และ Xho I บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel แล้วทำการ purify ด้วยวิธีตกตะกอนด้วย ethanol

3.3 การโคลนยีนไทโรซีน ไคเนส ที่มีฮิสทีดีนทางปลาย C-terminal เข้าสู่ E. coli

นำสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 1.1 และ 1.2 มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4DNA ligase แล้วบ่มที่ 4 °C ข้ามคืน เรียกพลาสมิดที่ได้นี้ว่า pGex-4T-GST-TK-His6 หลังจากนั้นทำการขนถ่ายพลาสมิด pGex-4T-GST-TK-His6 เข้าสู่ competent E. coli(DH5α) ด้วยวิธี heat shock แล้วทำการคัดเลือกเชื้อที่มีโคโลนีขาวเลี้ยงใน LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin เข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 3 ml บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก E. coli

pGEX-4T-1



รูปที่ 2 พลาสมิด pGex-4T-1 ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ *tac* และมีส่วนของ glutathione S-transferase ด้านปลาย N-terminal

4. การขนถ่ายยีนไทโรซีนไคเนสเข้าสู่ competent *E. coli* โดยวิธี heat shock

นำ competent cell *E. coli* มา 50 μ l และพลาสมิด pGex-4T-1 ที่มียีนไทโรซีนไคเนสมา 2 μ l ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที แช่ในน้ำแข็งโดยทันทีนาน 3 นาที แล้วเติม LB ปริมาตร 700 μ l บ่มพร้อมเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น spread เชื้อปริมาณ 250 μ l บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีสารปฏิชีวนะ 100 μ g/ml ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน

5. การแสดงออกของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสโดย *Escherichia Coli*

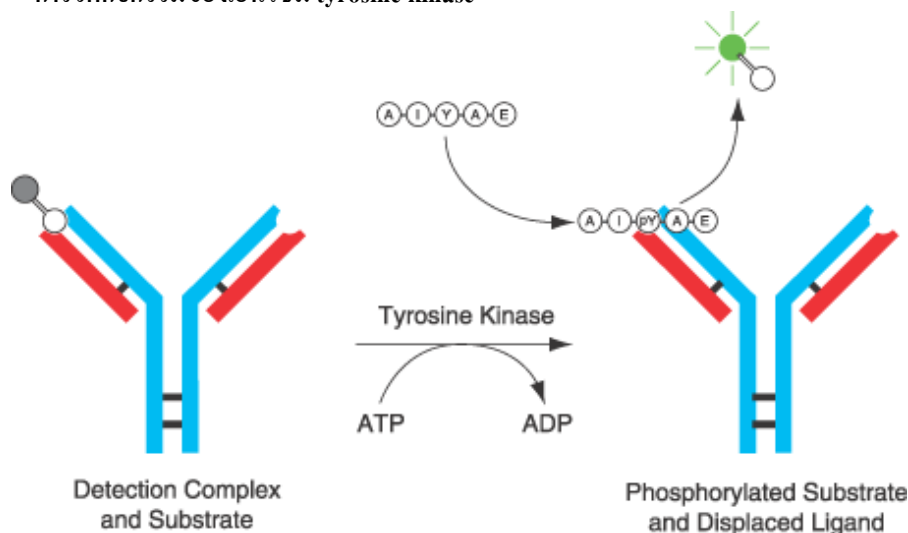
เมื่อได้โคลนของ *Escherichia Coli* ที่มียีน tyrosine kinase จากข้อ 1 นำมาเลี้ยงใน หลอดที่มี LB (1%NaCl , 1% Bacto-tryptone , 0.5% Yeast Extract) 3 ml ที่มี 100 μ g/ml ampicillin เลี้ยงที่ 37 °C เซลล์ที่ความเร็ว 180-200 rpm เป็นเวลา 1 คืน นำมา inoculate ใน LB 250 ml ที่มี 100 μ g/ml ampicillin เลี้ยงที่ 16 °C เซลล์ที่ความเร็ว 180-200 rpm จนได้ ให้ $OD_{600\text{ nm}} = 0.8-1.0$ แล้ว induce ด้วย 1 mM IPTG เลี้ยงที่ 16 °C เซลล์ที่ความเร็ว 180-200 rpm เป็นเวลา 24 ชม. นำมาปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเซลล์ที่ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์

6. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์

นำเซลล์ที่ได้นำมาผสมกับ buffer (50 mM Na/P₂ , 0.3 mM EDTA , 5 mM DTT , 60 μ M PMSF , pH 7.0) นำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสไปผ่าน glutathione column เพื่อแยกโปรตีนที่ต้องการซึ่งมี GST ติดอยู่ ซึ่งจะจับกับ glutathione ในคอลัมน์ สะกดล้นด้วย wash buffer (50 mM Tris-HCL , pH 8.0) จากนั้นชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย

Elution buffer (10 mM glutathione in 50 mM Tris-HCL , pH 8.0) เก็บ fraction ไว้ตรวจวัดกิจกรรม รวม fractions ที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน และนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

7. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ tyrosine kinase



รูปที่ 3 แสดงการทำงานของของ Antibody Beacon™ Tyrosine Kinase Assay Kit

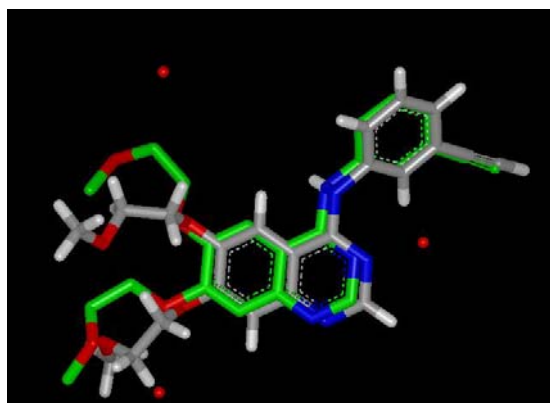
การวัดกิจกรรมของเอนไซม์สามารถทำได้โดยใช้ Antibody Beacon™ Tyrosine Kinase Assay Kit โดยประกอบด้วยองค์ประกอบสำคัญคือ Anti-phosphotyrosine antibody จะจับอยู่กับ Oregon Green 488 dye-labeled tracer ligand เมื่อเอนไซม์ Tyrosine kinase ทำงานจะใช้หมู่ฟอสเฟตจาก ATP มาเติมให้กับ Tyrosine kinase substrate - poly(Glu:Tyr) ตรงกรดอะมิโน Tyrosine ทำให้สามารถแย่งจับกับ Anti-phosphotyrosine antibody แทน Oregon Green 488 dye-labeled tracer ligand ได้ ซึ่ง Oregon Green 488 dye-labeled tracer ligand อิสระจะเรืองแสงที่ 517 nm ดังรูป 3

การทดลองเพื่อหาแอกติวิตีของไทโรซีนไคเนสโดยเตรียม phosphopeptide working solution โดยทำการเจือจาง Phosphotyrosine-containing peptide จาก 500 μ M เป็น 100 μ M ด้วย 1X KB + DTT จากนั้นทำ serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า ให้ 1X KB + DTT เป็น blank จากนั้นปีเปิดเอา 25 μ l แต่ละ dilution มาเติม 1X KB + DTT 24 μ l และ Anti-phosphotyrosine antibody กับ Oregon Green 488 dye-labeled tracer ligand อย่างละ 0.5 μ l ปริมาตรรวมเป็น 50 μ l จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 1X KB + DTT จนมีปริมาตร 200 μ l นำไปวัด Fluorescence ที่ Ex/Em = 492/517 nm

ผลงานวิจัย

1. ผลการศึกษา self-docking และการ optimized parameters

การทำ redocking กับ crystal structure นั้น เปรียบเสมือนการทำ positive control ในการทดลอง และปรับค่า parameter ต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับการ docking ด้วยโปรแกรม Autodock v3.0.5 โดยผลการทดลองในรูปแบบที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ด้วยระเบียบวิธีที่ทดลองสามารถทำการ redocking erlotinib เข้าไปใน docking site และได้โครงสร้างเหมือนที่พบใน crystal structure



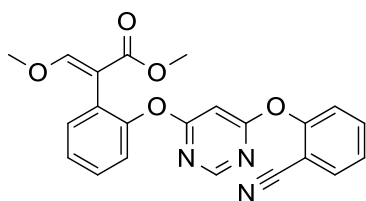
รูปที่ 1 โครงสร้างของ erlotinib (สีเขียวเป็นโครงสร้างใน crystal structure) โครงสร้างสีเทาเป็นโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณทางคอมพิวเตอร์โดยโปรแกรม AutoDock V.3.0.5 (Reproduced co-crystal)

2. ผลการคัดสรรเสมือนจริงจากฐานข้อมูล chemiebase

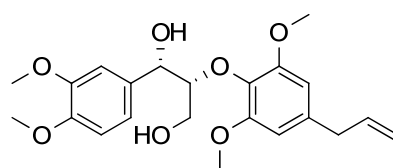
จากการทำการคัดสรรสารเสมือนจากฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรไทย (Chemiebase database) ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีสารสนเทศ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (<http://chemiebase.ku.ac.th>) จำนวน 29,960 โครงสร้าง ในขั้นตอนการวิเคราะห์ผลได้โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ที่สามารถจับโปรตีน ได้ดีกว่า erlotinib (ยารักษามะเร็งที่มีโครงสร้างจับกับ tyrosine kinase ของ EGFR; pdb code 1M17) อยู่ 126 โครงสร้าง สารออกฤทธิ์ทั้ง 126 โครงสร้างผ่านการคัดกรองด้วยอาศัยคุณสมบัติตาม “Lipinski’s Rule of Five” ด้วยโปรแกรม FILTER เหลือโครงสร้างสารออกฤทธิ์ที่ผ่านการคัดกรองจำนวน 5 โครงสร้าง ดังแสดงในตารางที่ 1 และ รูปที่ 5 สารออกฤทธิ์ทั้ง 5 สารนี้มีค่า score ที่สูงกว่าค่า score ของ erlotinib ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งที่จับกับ EGFR-TK ในโครงสร้างผลึกคริสตัลที่เลือกมาใช้เป็นต้นแบบในการคัดเลือกหาสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการทำงานของ EGFR-TK ได้ดีกว่ายาในท้องตลาด จากฐานข้อมูลโครงสร้างสามมิติสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรไทยดังแสดงในตารางที่ 2

ตาราง 1 ตารางแสดงชื่อของสารออกฤทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือก จากฐานข้อมูล Chemiebase database ทั้งใน
แบบ CAS no. และ IUPAC

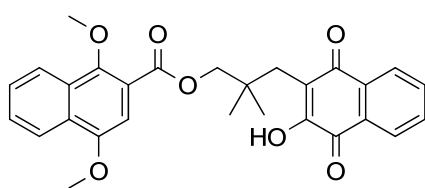
compound	CAS no.	IUPAC name
A	131860-33-8	methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate
B	154750-73-9	1,3-Propanediol, 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]-, (R*,S*)- (9CI)
C	220860-32-2	2-Naphthalenecarboxylic acid, 1,4-dimethoxy-, 3-(1,4-dihydro-3-hydroxy-1,4-dioxo-2-naphthalenyl)-2,2-dimethylpropyl ester
D	483-17-0	(1R)-1-[(2S,3R,11bS)-3-ethyl-9,10-dimethoxy-2,3,4,6,7,11b-hexahydro-1H-pyrido[2,1-a]isoquinolin-2-yl]methyl]-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-6-ol
E	93957-54-1	7-[3-(4-fluorophenyl)-1-(1-methylethyl)-1H-indol-2-yl]-3,5-dihydroxy-hept-6-enoic acid



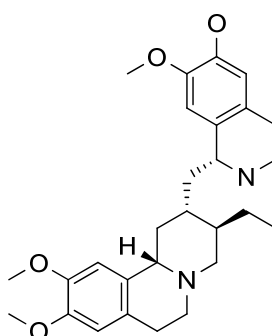
CAS no.131860-33-8
Compound (A)



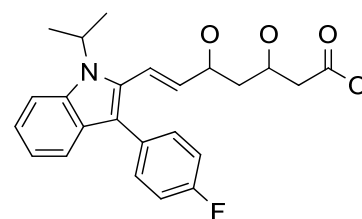
CAS no. 154750-73-9
Compound (B)



CAS no. 220860-32-2
Compound (C)



CAS no. 483-17-0
Compound (D)



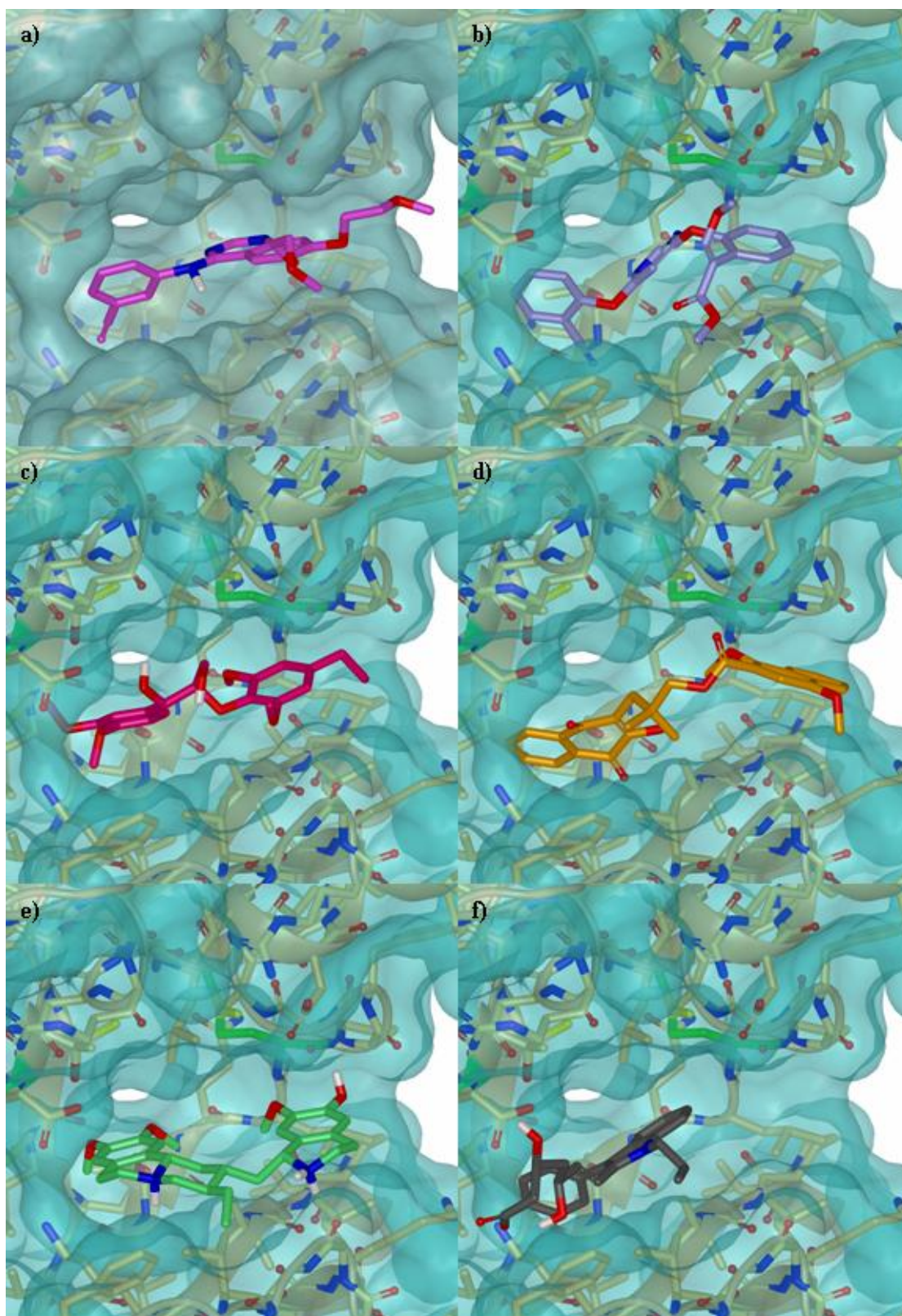
CAS no. 93957-54-1
Compound (E)

รูปที่ 2 โครงสร้างสารออกฤทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกการคัดสรรสารเสมือนที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ด้านการทำงานของ
EGFR-TK จากฐานข้อมูล Chemiebase database

ตาราง 2 ตารางแสดงค่า Score ทั้ง 5 ประเภทที่คำนวณจากโปรแกรม Fred ของสารออกฤทธิ์จากฐานข้อมูล Chemiebase ทั้ง 5 โครงสร้าง

compound	CAS no.	Fred Scoring Function				
		ChemGauss	ChemScore	PLP	ScreenScore	ShapeGauss
A	131860-33-8	-50.75	-	-54.79	-122.23	-521.24
B	154750-73-9	-52.79	-21.82	-53.94	-120.06	-
C	220860-32-2	-52.72	-	-53.51	-122.48	-551.47
D	483-17-0_52	-52.66	-25.88	-57.68	-142.08	-
E	93957-54-1	-50.64	-21.67	-59.26	-152.91	-

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางโครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ทั้ง 5 สารเปรียบเทียบกับยาค้านมะเร็ง erlotinib จับกับ EGFR-TK ในบริเวณ binding pocket (บริเวณเข้าจับของ ATP substrate) พบว่ามีเพียงโครงสร้าง Compound (E) เท่านั้นที่ไม่ได้เรียงตัวในช่องของ binding pocket เดียวกันกับ erlotinib ซึ่งคือ adenine pocket แต่ไปจับกลับไปในบริเวณ phosphate binding region ตามที่แสดงในรูปที่ 6 โครงสร้างของสารทั้งห้าชนิดนี้พบในพืชสมุนไพรต่างๆ ดังนี้แสดงในตารางที่ 3



รูปที่ 3 การเรียงตัวของยาต้านมะเร็ง (a) ในบริเวณ binding pocket ของ EGFR-TK เปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์ที่ทำการคัดสรรได้จากฐานข้อมูล ChEMBL (b) Compound (A) c) Compound (B) d) Compound (C) e) Compound (D) และ f) Compound (E)

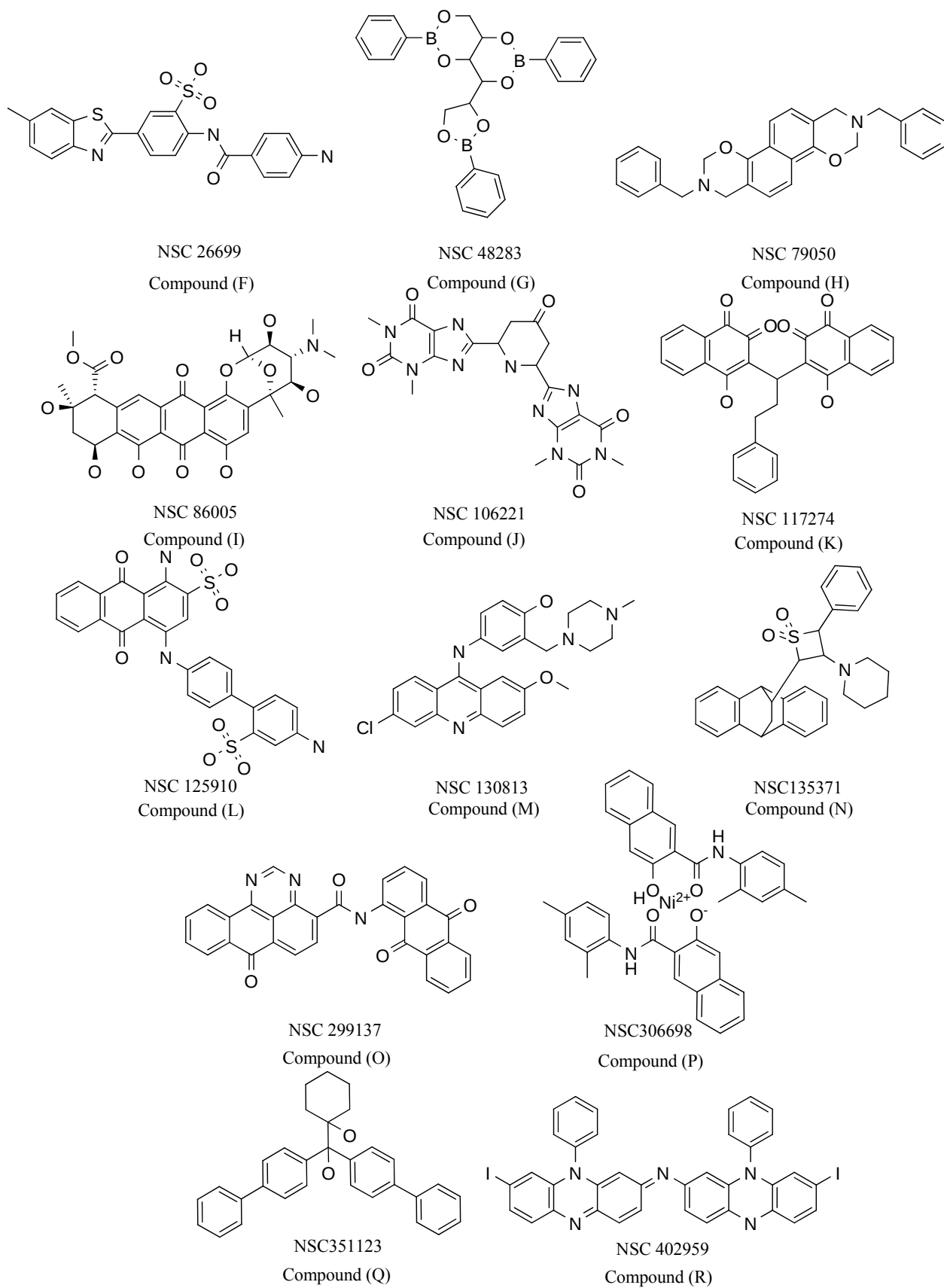
ตาราง 3 รายชื่อของพืชที่พบสารออกฤทธิ์ด้านการทำงานของ EGFR-TK ทั้งห้าชนิด

compound	รายชื่อพืช (ชื่อวิทยาศาสตร์ และ ชื่อพื้นบ้าน)
A	<i>Annona squamosa</i> L., มะนอแน่, หมักเขียว, Custard apple, sugar apple, Sweet sop, น้อยหน่า
	<i>Azadirachta indica</i> A.Juss, คิวินิน, สะเดา
	<i>Cinnamomum camphora</i> J.Presl, พรมเสี้ยน, อบเชยญวน, การบูร
	<i>Eugenia javanica</i> R.Br.
	<i>Saccharum officinarum</i> L., อ้อยแดง, อ้อยขม, อ่าโป, อ้อยดำ, Sugar cane, อ้อย
B	<i>Myristica fragrans</i> จันทน์เทศ, จันทน์บ้าน, Nutmeg tree
C	<i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.) Kurz, หญ้ามันไก่, ทองคันช้าง, ทองพันชั่ง
D	<i>Strychnos nux-vomica</i> A.w. Hill, กระเจี๊ว, แสงเบือ, กะกลิ้ง, โกงูกะกลิ้ง, แสงทม, ตูมกาแดง, แสงเบือ, แสงใจ
E	<i>Acacia catechu</i> Willd., สะแฉ, สีเสียดเหลือง, สีเสียดแก่น, ขี้เสียด, สีเสียดเหนือ, สีเสียด

3. การคัดสรรเสมือนจริงจากฐานข้อมูล NCI

นอกจากนี้ในขณะที่ทำการคัดสรรสารเสมือนจากฐานข้อมูล Chemicbase แล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำการคัดสรรสารเสมือนจากฐานข้อมูลอื่นโดยใช้ระเบียบวิธีเดียวกันคือ ฐานข้อมูล NCI diversity set 1990 ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งสารในฐานข้อมูลนี้ได้รวบรวมโดย National Cancer Institute ของกระทรวงสาธารณสุข สหรัฐอเมริกา สารในชุดนี้มีทั้งหมด 1,990 โครงสร้างซึ่งเป็นชุดที่ผ่านการคัดเลือกโดย Lipinski's Rule of Five มาแล้วจากชุดของสารที่มีมากถึง 140,000 โครงสร้าง หลังจากผ่านกระบวนการ molecular docking และวิเคราะห์ผลโดยใช้ Fred score แล้วพบว่ามีสารออกฤทธิ์ที่มีค่า Score มากกว่า erlotinib อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ดังกล่าวแล้วในข้างต้น อยู่จำนวน 13 โครงสร้าง (Compound (F)-(R)) ตามที่แสดงโครงสร้างสองมิติในรูปที่ 7 และชื่อ IUPAC ตามตารางที่ 4

จากการวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของสารที่คัดสรรได้ทั้ง 13 โครงสร้างพบว่ามีสารหลายตัวที่มี common structure คล้ายคลึงกับตัวยับยั้งที่ใช้ยับยั้งการออกฤทธิ์ของ EGFR-TK (รูปที่ 4) และเมื่อพิจารณาลักษณะการวางตัวของโครงสร้างสารออกฤทธิ์จาก NCI diversity set ในสามมิติพบว่า โครงสร้างส่วนใหญ่จะวางตัวอยู่ใน adenine binding pocket มีเพียง Compound (M) เท่านั้นที่จะวางตัวมาใกล้กับบริเวณ phosphate binding region และพบว่ามีโครงสร้างอีกกลุ่มคือ Compound (I), (P) และ (R) ที่จะวางตัวอยู่ทั้งใน adenine binding pocket และ sugar binding region (รูปที่ 8)



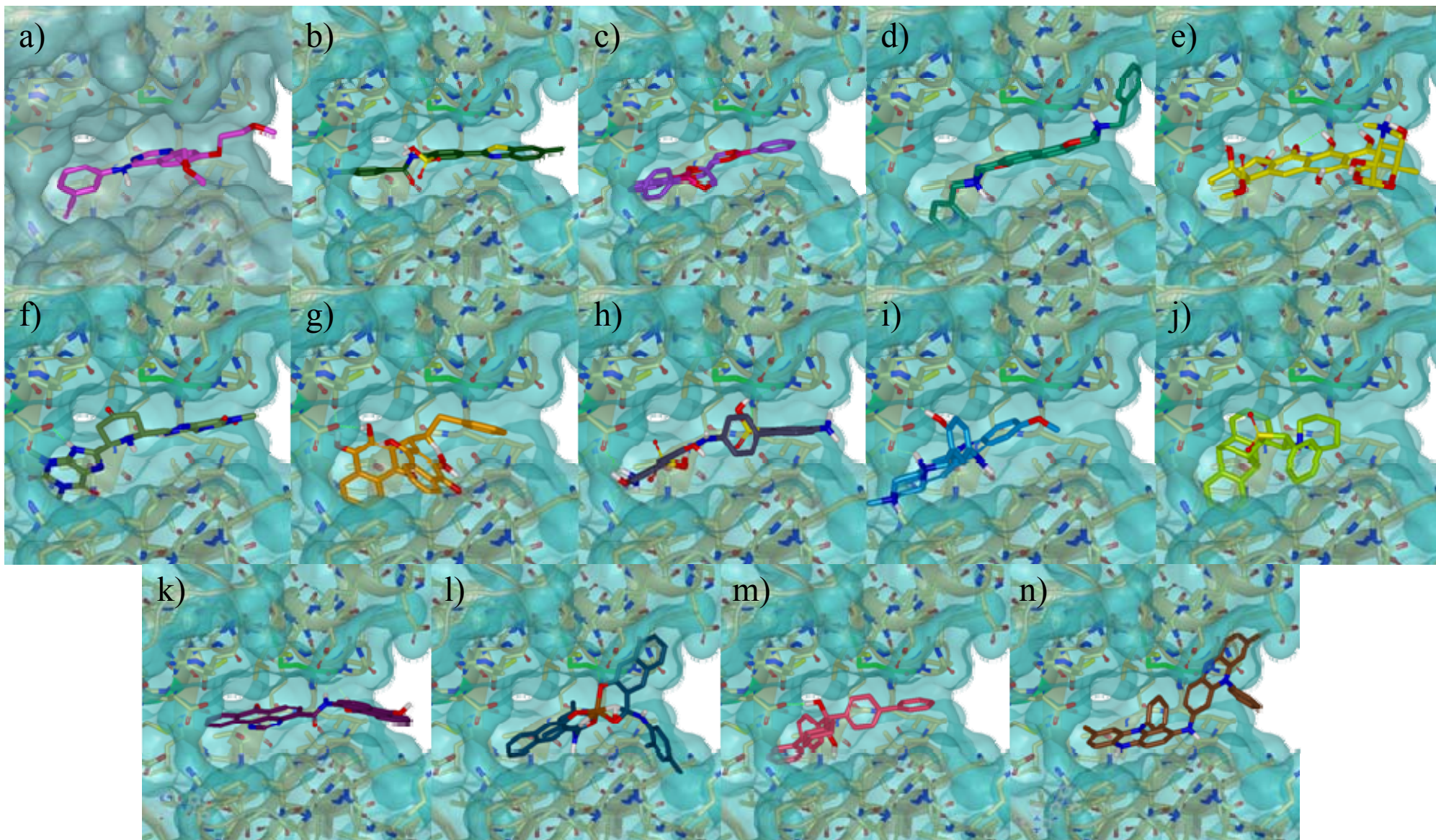
รูปที่ 4 โครงสร้างสารออกฤทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกการคัดสรรสารเสมือน 13 โครงสร้างที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ต้านการ
ทำงานของEGFR-TK จากฐานข้อมูล NCI diversity set 1990

ตาราง 4 ตารางแสดงชื่อของสารออกฤทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือก จากฐานข้อมูล NCI diversity set 1990
ทั้งแบบ NSC และ IUPAC name

compound	NSC	IUPAC name
F	26699	2-[(4-aminobenzoyl)amino]-5-(6-methyl-1,3-benzothiazol-2-yl)benzenesulfonic acid
G	48283	2,6-diphenyl-4-(2-phenyl-1,3,2-dioxaborolan-4-yl)tetrahydro-[1,3,2]dioxaborinino[5,4-d][1,3,2]dioxaborinine
H	79050	2,8-bis(phenylmethyl)-1,3,7,9-tetrahydro-[1,3]benzoxazino[8,7-h][1,3]benzoxazine
I	86005	2,6-Epoxy-2H-naphthaceno(1,2-b)oxocin-14-carboxylic acid, 4-(dimethylamino)-3,4,5,6,9,11,12,13,14,16-decahydro-3,5,8,10,11,13-hexahydroxy-6,13-dimethyl-9,16-dioxo-, methyl ester, (2-alpha,3-beta,4-alpha,5-beta,6-alpha,11-beta,13-alpha,14-alpha)-
J	106221	8-[6-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-7H-purin-8-yl)-4-oxopiperidin-2-yl]-1,3-dimethyl-7H-purine-2,6-dione
K	117274	4-hydroxy-3-[1-(1-hydroxy-3,4-dioxonaphthalen-2-yl)-3-phenylpropyl]naphthalene-1,2-dione
L	125910	1-amino-4-[[4-(4-amino-2-sulfophenyl)phenyl]amino]-9,10-dioxoanthracene-2-sulfonic acid
M	130813	4-[(6-chloro-2-methoxyacridin-9-yl)amino]-2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenol
N	135371	Piperidine, 1-[2-(9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-11-yl)-1,1-dioxido-4-phenyl-3-thietanyl]-
O	299137	7H-Benzo[e]perimidine-4-carboxamide, N-(9,10-dihydro-9,10-dioxo-1-anthracenyl)-7-oxo-
P	306698	3-[(2,4-dimethylphenyl)carbamoyl]naphthalen-2-olate; N-(2,4-dimethylphenyl)-3-hydroxynaphthalene-2-carboxamide; nickel(+2) cation
Q	351123	1-[hydroxy-bis(4-phenylphenyl)methyl]cyclohexan-1-ol
R	402959	8-iodo-N-(8-iodo-10-phenyl-5H-phenazin-2-yl)-10-phenylphenazin-2-imine

ตาราง 5 ตารางแสดงค่า Score ทั้ง 5 ประเภทที่คำนวณจากโปรแกรม Fred ของสารออกฤทธิ์จากฐานข้อมูล
NCI diversity set 1990 ทั้ง 13 โครงสร้าง

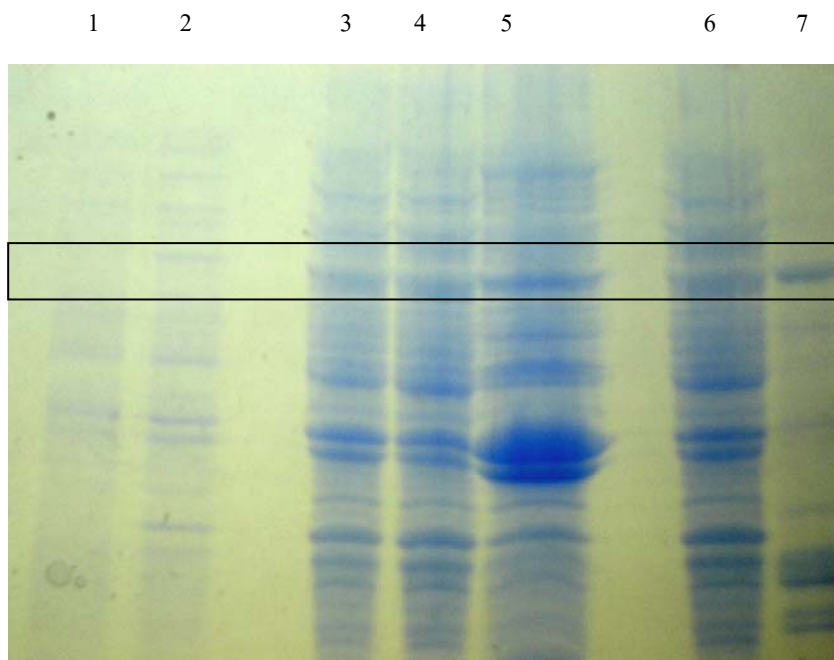
compound	NSC	Fred Scoring Function				
		ChemGauss	ChemScore	PLP	ScreenScore	ShapeGauss
F	26699	-52.50	-	-58.61	-121.97	-532.17
G	48283	-54.12	-22.04	-55.12	-145.09	-
H	79050	-53.48	-25.81	-67.79	-163.69	-
I	86005	-60.94	-34.57	-	-134.53	-573.21
J	106221	-51.69	-	-52.57	-133.08	-537.19
K	117274	-	-27.51	-52.84	-135.06	-575.13
L	125910	-56.01	-23.73	-51.52	-	-544.68
M	130813	-52.09	-23.82	-59.74	-148.71	-
N	135371	-	-21.91	-54.67	-129.10	-575.94
O	299137	-55.79	-32.95	-56.42	-139.14	-617.85
P	306698	-57.16	-24.49	-64.99	-150.49	-
Q	351123	-	-25.01	-59.52	-139.18	-505.25
R	402959	-	-28.33	-70.61	-166.30	-624.90



รูปที่ 5 การเรียงตัวของยาต้านมะเร็ง (a) ในบริเวณ binding pocket ของ EGFR-TK เปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์จากฐานข้อมูล NCI diversity set 1990 (b)-(n) การเรียงตัวของCompound (F) - Compound (R) ที่ระบุไว้โครงสร้างสองมิติไว้ในรูปที่ 7 และรายละเอียดชื่อ IUPAC ตามตารางที่ 4

4. การแสดงออกของเอนไซม์ไทโรซีน ไคเนส โดย *Eschericia Coli*

นำอาหารที่ได้จากการเลี้ยง *E. coli* ที่ผลิตเอนไซม์ GST-TK-his มาทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยนำเซลล์ที่ได้ทำให้แตก แล้วนำสารละลายที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ glutathione affinity chromatography ตามขั้นตอนดังที่อธิบายในวิธีการทดลอง ซึ่งนำแต่ละส่วนที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 การวิเคราะห์โปรตีนของเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี SDS-PAGE

Lane 1 = non-induce

Lane 2 = induce

Lane 3 = crude lysated cells

Lane 4 = supernatant of lysated cells

Lane 5 = pellet of lysated cells

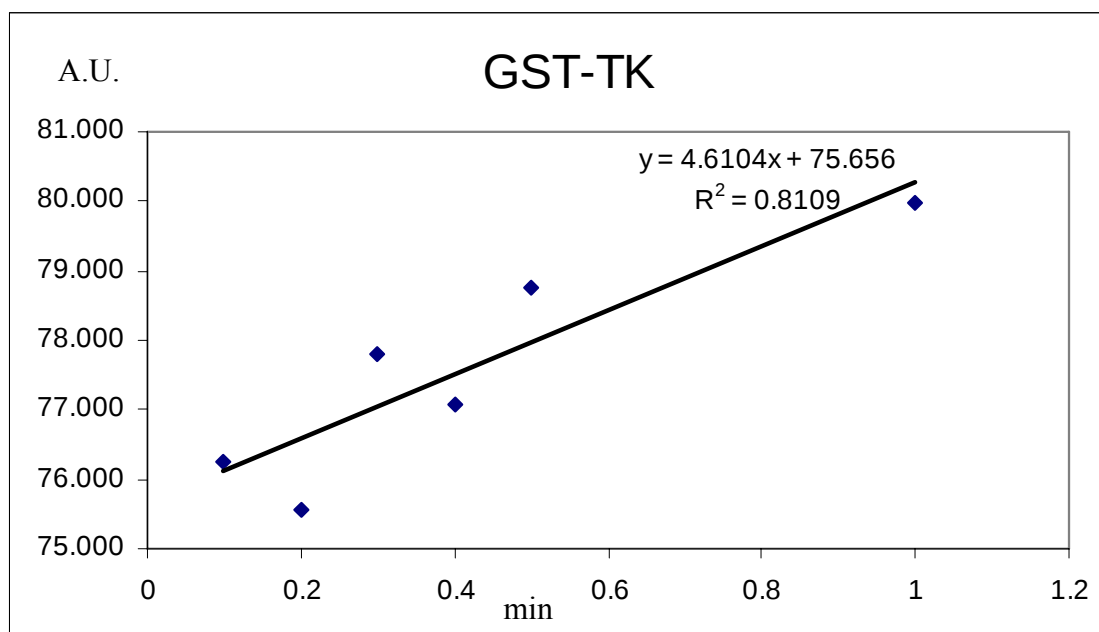
Lane 6 = flow-through from glutathione sepharose column

Lane 7 = elutant from glutathione sepharose column

จากผลการทดลองนั้นจะเห็นว่า GST-TK-his นั้นมีบางส่วนที่ไม่สามารถ ม้วนพับได้ถูกต้องและเกิดเป็น inclusion bodies พบใน pellet ของ lysated cells แต่อย่างไรก็ตามก็มี โปรตีนบางส่วนนั้นพบใน soluble fraction ซึ่งผู้วิจัยตัดสินใจที่จะนำเฉพาะส่วน soluble fraction มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยไม่ใช้ส่วน inclusion bodies โดยใช้ glutathione affinity chromatography พบว่าโปรตีน GST-TK-his พบใน elutant และมีความบริสุทธิ์บางส่วน ยังไม่ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ จากแค่ การทำบริสุทธิ์เพียงครั้งเดียว ดังนั้นโปรตีนนี้ควรจะผ่านการทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยสามารถใช้ทั้ง nickle affinity column เพื่อทำให้บริสุทธิ์ต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้นำโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนี้มาใช้ทดสอบแอกติวิตีก่อน เพื่อทดสอบดูว่าโปรตีนที่ได้อยู่ในรูป active form จริงหรือไม่ โดยเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดย Lowry method พบว่าได้โปรตีนทั้งหมดประมาณ 2 mg

5. แอคติวิตีของ tyrosine kinase ที่แสดงออกใน *E.coli*

โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนได้มาทดสอบแอคติวิตีโดยใช้ Antibody Beacon™ Tyrosine Kinase Assay Kit เพื่อเป็นการยืนยันว่าโปรตีนนั้นมีแอคติวิตี พบว่าไทโรซีนไคเนสมีแอคติวิตีจริง (ดังรูปที่10) แสดงว่ามีการมีวนพับเป็นโครงสร้างที่ถูกต้องและพร้อมจะใช้งานต่อไป จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนั้นมี GST-TK-his อยู่ เพราะเมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบกับ cell lysate ที่ไม่มีการ induce ให้ผลิต GST-TK-his พบว่าไม่มีแอคติวิตีของไทโรซีนไคเนสเลย แสดงว่าแอคติวิตีของไทโรซีนไคเนสที่ได้จากการทดลองนั้นเกิดจาก GST-TK-his



รูปที่ 10 แสดงกราฟแอคติวิตีของ GST-TK-his ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน จากกราฟ slope คือ ค่าความเร็วของปฏิกิริยา (V) = 4.610 A.U./min (A.U.= artificial unit)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะค้นหาสารออกฤทธิ์ใหม่ ๆ โดยใช้เทคนิคทางคอมพิวเตอร์ในการคัดสรรสาร และนำไปสู่การทดสอบความสามารถในการยับยั้งในห้องปฏิบัติการ โดยการโคลนและแสดงออกโปรตีน ไทโรซีนไคเนส และมีเป้าหมายที่จะนำไปสู่การทดสอบการจับกันจริงด้วยเทคนิค NMR spectroscopy แต่อย่างไรก็ตามด้วยเงื่อนไขจำกัดของงบประมาณ และเวลา ทำให้ไม่สามารถทำงานให้ครบทุกส่วนตามที่ตั้งไว้ในวัตถุประสงค์ได้ แต่งานวิจัยก็มีผลสัมฤทธิ์ในส่วนของการคัดสรรเสมือน ซึ่งเพียงพอที่จะตีพิมพ์ผลงานวิจัย 1-2 เรื่องจากส่วนนั้น

ผลการทดลองคัดสรรเสมือนจริงนั้นได้ทำการคัดสรรสารทั้งจากฐานข้อมูล ChEMBL และ ฐานข้อมูล NCI diversity set 1990 พบว่าโครงสร้างส่วนใหญ่มีลักษณะโครงสร้างหลักคล้ายคลึงกับตัวยับยั้งที่มีอยู่ในท้องตลาด เพื่อเป็นยารักษาโรคมะเร็งและตัวยับยั้งที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ แต่โครงสร้างที่คัดสรรได้ไม่เข้าซ้อนกับโครงสร้างของยาที่มีรายงานไว้อยู่แล้ว ดังแสดงในรูป 5 และ 7 อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า ข้อมูลที่จากฐานข้อมูลสมุนไพรไทย

นั่น สารส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่ไม่เหมาะกับการใช้เป็นยา เพราะไม่ผ่าน rule of five ซึ่งเป็นลักษณะต่างๆ ไปของสารที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นยา ถึงแม้ว่าการทำการคัดสรรนั้นจะได้สารหลายตัวที่แสดงค่า score การจับกัน สูงกว่า erotinib ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในปัจจุบันอย่างมาก จึงเป็นงานวิจัยต่อเนื่องที่น่าสนใจในการศึกษา ถึงหมู่ฟังก์ชัน และรูปแบบโครงสร้างของเฉพาะส่วนที่สำคัญต่อการจับกันระหว่างโปรตีนกับสารออกฤทธิ์กลุ่มนี้ต่อไป ซึ่งอาจนำมาสู่การศึกษาต่อเนื่องโดยการตัดโครงสร้างเฉพาะส่วนที่จับกัน และทำการทดสอบอีกครั้งว่ายังจะให้ค่า score สูงเช่นเดิมหรือไม่ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองคัดสรรเสมือนจริงนั้นมิงานเพียงพอซึ่งกำลังจัดทำโครงร่างเพื่อที่จะตีพิมพ์ต่อไป

ในส่วนผลการทดลองเพื่อโคลนนิ่งและแสดงออกโปรตีน GST-TK-his นั้นผู้วิจัยพบอุปสรรคมากมาย จนไม่สามารถทำให้เสร็จตามวัตถุประสงค์ได้ เนื่องจากมีปัญหาในการแสดงออกโปรตีนให้ได้โปรตีนที่มีแอกติวิตี้ เพราะเมื่อแสดงออกในสภาวะปกติ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และ induce ให้แสดงออกโปรตีนที่ 37 °C หรือ 25 °C ก็ไม่สามารถได้โปรตีนที่มีแอกติวิตี้ได้ โดยจะพบโปรตีนอยู่ในส่วนของ inclusion bodies (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แต่เมื่อทำการเลี้ยงที่ 16 °C และแสดงออกที่ 16 °C ถึงจะได้โปรตีนที่มีแอกติวิตี้ ถึงแม้จะได้ปริมาณน้อย (2 mg) ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ได้นี้ก็ยังเป็นแค่บริสุทธิ์บางส่วน เมื่อทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นก็จะมีโปรตีนไม่มากพอที่จะใช้ไปทำการศึกษาด้วย NMR เพราะการศึกษาด้วย NMR นั้นจะต้องทำการติดฉลากด้วย ¹³C และ ¹⁵N ซึ่งค่าใช้จ่ายจะประมาณ 10,000 บาทต่อลิตรของเบคทีเรีย เมื่อได้โปรตีนปริมาณน้อยจึงจำเป็นต้องเลี้ยงหลายลิตร ซึ่งทำให้ไม่คุ้มในการลงทุนติดฉลากโปรตีนเพื่อศึกษาด้วย NMR ต่อไป ดังนั้นด้วยข้อจำกัดดังกล่าวจึงทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถบรรลุตามวัตถุประสงค์ในข้อ 3 ได้ แต่ อย่างไรก็ตามโปรตีนที่แสดงออกมาได้นั้นสามารถนำมาใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งสารออกฤทธิ์ได้ต่อไปในอนาคต โดยผู้วิจัยได้พบวิธีเพื่อจะทำสอบแอกติวิตี้ และทดสอบการยับยั้ง โดยใช้ Antibody Beacon™ Tyrosine Kinase Assay Kit ซึ่งทำให้สามารถทำการทดสอบการยับยั้งของสารออกฤทธิ์ได้ต่อไป

นอกจากนี้การแสดงออกของโปรตีนใน inclusion bodies นั้น ผู้วิจัยมองเห็นว่าสามารถที่จะทำการ refold โปรตีนได้ ซึ่งถ้าสามารถทำได้สำเร็จนั้นจะทำให้ปริมาณโปรตีนที่มากกว่า และอาจคุ้มทุนในการติดฉลากเพื่อศึกษาต่อไป นอกจากนี้ การแสดงออกโปรตีนในระบบอื่นเช่น yeast และ insect cells นั้นก็เป็นหนทางที่น่าจะทดลองต่อไปในอนาคตเพื่อให้ได้โปรตีนมากเพียงพอที่จะศึกษาโครงสร้างต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. ระเบียบวิธีที่พัฒนาไว้สำหรับการคัดสรรเสมือนจริงนั้นสามารถนำไปใช้กับฐานข้อมูลอื่นเช่นฐานข้อมูล ZINC (<http://zinc.docking.org>) ซึ่งมีสารอยู่ถึง 2.7 ล้านตัว ซึ่งสามารถนำไปสู่การพบสารออกฤทธิ์ตัวใหม่ๆ ได้
2. สารที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง นั้นสามารถที่จะทำการสกัดสารซึ่งทำตามข้อมูลที่รวบรวมไว้ในฐานข้อมูล รวมทั้งอาจจะสังเคราะห์หรือสั่งซื้อสารเหล่านี้มาทดลองว่าสามารถยับยั้งกันได้จริงไหมในระดับ *in vitro* ซึ่งอาจนำไปสู่การทดลองใน *in vivo* และใน animal ต่อไป
3. การแสดงออกของโปรตีนนั้นควรทำการพัฒนาการแสดงออกใน E. coli เพื่อให้ได้โปรตีนมากพอ หรือเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้าน เช่นใช้ yeast หรือ insect cells เพื่อให้ได้โปรตีนมากพอเพื่อศึกษาโครงสร้างและการจับกันของโปรตีนไทโรซีนไคเนสต่อไป

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
กำลังอยู่ในระหว่างการจัดทำผลงานเพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ คาดว่าจะทราบผล
การส่งตีพิมพ์ไม่เกิน 31 ธันวาคม 2551
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - มีการนำระเบียบวิธีการวิจัยที่พัฒนาได้นี้ไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ ในการพัฒนางานวิจัยอื่นที่
ใกล้เคียง และพัฒนาการเรียนการสอน computational biochemistry ในระดับปริญญาโท และ เอก
 - การเรียนการสอน และงานวิจัยอื่นที่ใกล้เคียง
3. อื่นๆ
ผลงานที่เสนอในการประชุมระดับชาติ
 - 3.1 Sawaddeechaikul O. and **Choowongkamon K.** 2007. Virtual screening of EGFR kinase
inhibitors from the NCI diversity databases. The Proceeding of 45th, Kasetsart University Annual
Conference, January 30th – February 2nd 2007, 133-140.
ผลงานที่เสนอในการประชุมระดับนานาชาติ
 - 3.2 Orathai Sawatdichaikul and **Kiattawee Choowongkamon.** 2008. Molecular Simulation Studies of
the Significant Point Mutations of EGFR Kinase Domain on Their Inhibitors. The proceeding of the
12th Annual Symposium on Computational Science and Engineering, March 27th-29th 2008, Chemistry
Department, Faculty of Science, Ubon Rajathanee University, 218-223