



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความสัมพันธ์ของการแปรผันนิวคลีโอไทด์ของส่วน *gag-pol*

จากเชื้อ HIV-1 subtypes ในประเทศไทยกับการดื้อยา

โดย นายวิเชษฐ์ ลีลามานิตย์

24 กันยายน พ.ศ. 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความสัมพันธ์ของการแปรผันนิวคลีโอไทด์ของส่วน *gag-pol*

จากเชื้อ HIV-1 subtypes ในประเทศไทยกับการดื้อยา

นายวิเชษฐ์ลีลามานิตย์

ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนศรีอยุธยา แขวงทุ่งพญาไท กรุงเทพฯ 10400

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยต้องกราบขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนในการทำวิจัยนี้ ต้องกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สกล พันธ์ภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษาที่นอกจากให้คำปรึกษาที่ดีมาตลอด ยังให้กำลังใจและเป็นต้นแบบของความเป็นนักวิทยาศาสตร์ที่ผู้วิจัยจะจดจำไว้ตลอดไป ขอขอบคุณพันเอก นายแพทย์สรชัย นิตยพันธ์ และ Dr.Victoria R. Polonis ที่ให้คำปรึกษาและตัวอย่างที่ใช้ทำงานวิจัย ขอขอบใจนักศึกษาบัณฑิตศึกษาทุกท่านที่ร่วมทำวิจัยและเป็นเพื่อนที่ดี ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สุดท้ายงานวิจัยจะเกิดขึ้นไม่ได้หากผู้วิจัยไม่มีโอกาสได้รับความรู้ในฐานะนักศึกษาปริญญาเอกที่ University of Florida กับ Prof. Ben M. Dunn ที่ให้ทั้งความรู้ โอกาส และ ประสบการณ์ในชีวิต

วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์

25 กันยายน 2555

Abstract

Project Code: PDF/64/2540

Project Title: Genetic variability of *gag-pol* regions of HIV-1 subtypes found in Thailand relating to drug resistance

Investigator: Assistant Prof. Wichet Leelamanit

E-mail Address: pywlt@maidol.ac.th

Project Period: August, 1997-July, 2000

HIV-1, a causative agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), is genetically classified into different subtypes according to *env* and *gag* coding sequences. In Thailand, approximately 90% and less than 10% of HIV-infected population are infected with HIV-1 subtype E and subtype B, respectively. Although inhibitors of the HIV-1 protease are currently used for the treatment of AIDS, their therapeutic efficacy is limited due to the rapid emergence of drug resistant mutants. Therefore, it is very important to understand the *in vivo* sequence diversity and selection of the resistant strains in order to develop new anti-HIV drugs. Here, we analyzed the variability of the viral protease of HIV-1 subtype epidemically in Thailand. Briefly, the PCR technique was performed to amplify the protease-coding regions from the proviral DNA isolated from peripheral blood mononuclear cells obtained from the untreated subjects, and infected patients who individually had received only reverse transcriptase inhibitors or both reverse transcriptase and protease inhibitors (10 subject per group). After cloning the PCR products into *E. coli*, we randomly selected the clones and sequenced 100 protease-coding sequences from each group. The data indicated that the protease sequences of subtype E were unique and different from those of subtype B. Protease variants analyzed from a same subject were nearly homogeneous and different from patient to patient. The amino acid substitutions associated with drug resistance including M36I, V82A, and V82I were detected, although the frequency of drug-resistant mutations was low. Additionally, much variation appeared in the P6/PR cleavage site, while

sequences of the PR/RT site were absolutely conserved. Next, we plan to do the kinetic analysis of these protease variants.

Keywords: HIV, reverse transcriptase, viral protease, drug resistant, mutation, DNA sequence, subtype

บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่: PDF/64/2540

โครงการ: ความสัมพันธ์ของการแปรผันนิวคลีโอไทด์ของส่วน *gag-pol* จากเชื้อ HIV-1 subtypes ในประเทศไทยกับการดื้อยา

หัวหน้าโครงการ: นายวิเชษฐ์ ลีลามานิตย์

E-mail Address: pywlt@maidol.ac.th

เชื้อเอชไอวีที่ก่อให้เกิดโรคมุ้มนกพร่อง (เอดส์) สามารถแบ่งแยกเป็นหลายสายพันธุ์ตามลักษณะทางพันธุกรรมที่พบในส่วนที่กำหนดในส่วนยีนของ *gag* และ *env* ในประเทศไทยส่วนใหญ่พบสายพันธุ์ซบไต้ปีอีถึง 90% และพบสายพันธุ์ปีเพียง 10% ถึงแม้ในปัจจุบันยาด้านไวรัสในกลุ่มยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสถูกนำมาใช้เพื่อรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี แต่เนื่องจากเชื้อนี้คือต่อยาดังกล่าวอย่างรวดเร็ว การใช้ยาจึงไม่ได้มีประสิทธิภาพเต็มที่ ดังนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จำเป็นต้องรู้กลายพันธุ์ของเชื้อเอชไอวีที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย ดังนั้นเราจึงทำการศึกษาความหลากหลายของเอนไซม์โปรติเอส ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาาใหม่ การทดลองกระทำโดยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรติเอสจากไวรัสที่ฝังตัวอยู่ในส่วนของเม็ดเลือดขาวจากคนไข้สามกลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับยาเลย กลุ่มที่ได้รับยาด้านไวรัสประเภทรีเวิร์สทรานสคริปเตสอย่างเดียว และกลุ่มที่ได้รับทั้งยารีเวิร์สทรานสคริปเตสและโปรติเอสควบคู่กัน โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และการโคลนนิ่ง การทดลองพบว่าส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรติเอสของซบไต้ปีอีแตกต่างจากซบไต้ปีบีอย่างเห็นได้ชัด ในคนไข้คนเดียวกันจะมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันและแตกต่างจากคนไข้คนอื่นๆ สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ต่อยาด้านโปรติเอส ตัวอย่างเช่น M36I, V82A, และ V82I ได้ แม้ว่าจะพบในปริมาณที่เล็กน้อย นอกจากนี้ข้อมูลยังแสดงถึงความหลากหลายของส่วนของ P6/PR ในขณะที่ส่วนตัด PR/RT แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง การทดลองต่อไปจะทำการศึกษาคูสมบัติทางจลศาสตร์ของเอนไซม์โปรติเอส

คำสำคัญ: เอชไอวี, รีเวิร์สทรานสคริปเตส, โปรติเอส, การดื้อยา, การกลายพันธุ์ ลำดับดีเอ็นเอ, ซบไต้ปี

บทนำ

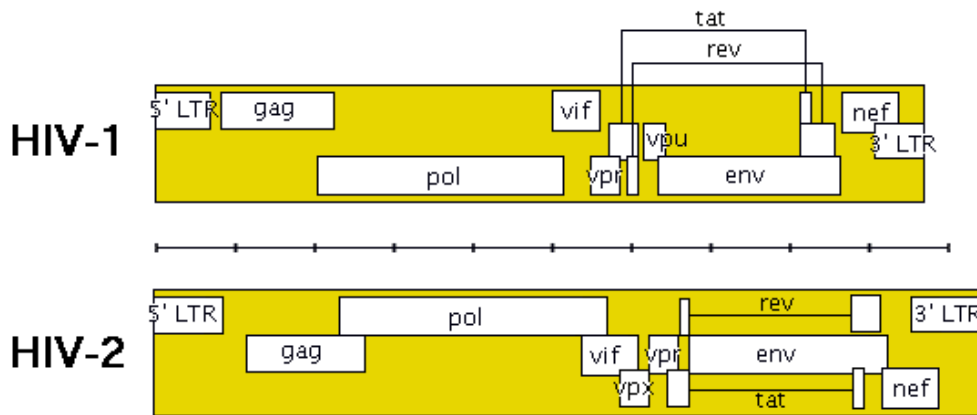
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

นับตั้งแต่การระบาดอย่างหนักของ เชื้อ Influenza virus ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 (ค.ศ 1918) ซึ่งฆ่าผู้คนทั่วโลกถึง 20 ล้านคนแล้วคงไม่มีโรคติดเชื้อชนิดใดที่จะฆ่าผู้คนและเป็นภัยร้ายแรงได้มากเท่าโรคมุคุ้มกันบกพร่อง (Acquired immunodeficiency syndrome) หรือที่เรารู้จักกันในนามย่อ ๆ ว่า เอชไอวี (AIDS)

นับตั้งแต่มีรายงานเกี่ยวกับคนไข้ติดเชื้อโรคเอดส์รายแรกในปี ค.ศ 1981 โรคติดเชื้อชนิดนี้ได้มีการแพร่ระบาดไปอย่างรวดเร็วทั่วโลก ในปี ค.ศ. 1993 องค์การอนามัยโลก (WHO, 1993) คาดการณ์ว่ามีประชากรโลกที่ติดเชื้อชนิดนี้อยู่ราว 14 ล้านคน และมีการประเมินว่าในปี ค.ศ 2000 จะมีประชากรทั่วโลกติดเชื้อนี้อาจมากถึง 110 ล้านคน โดยในจำนวนนี้จะเป็นคนไข้เด็กที่ติดเชื้ออยู่ถึง 10 ล้านคน (Man et al., 1992; WHO, 1993)

เป็นที่ยอมรับกันว่าเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคเอดส์คือเชื้อ HIV (Human Immunodeficiency Virus) (Barre-Sinoussi., 1983; Gallo et al., 1983; Levy et al., 1984) ในปีค.ศ 1986 กลุ่มของ Montagnier (Clavel et al., 1986) ได้พบเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคเอดส์เช่นกันแต่มีความรุนแรงน้อยกว่าและพบระบาดมากเฉพาะในทวีปแอฟริกา จึงเรียกไวรัสชนิดนี้ว่า HIV-2 และเรียกไวรัสตัวแรกที่ค้นพบที่มีความรุนแรงมากกว่าและระบาดทั่วโลกว่า HIV-1

HIV ทั้งสองประเภทจัดอยู่ในสมาชิกของ lentivirus subfamily of family retroviridae (Chiu et al., 1985; Gonda et al, 1985) HIV-1 และ HIV-2 นั้นมีลำดับของดีเอ็นเอเหมือนกันนั้นน้อยกว่า 55% HIV จีโนมเป็น RNA ที่มีความยาว 9.8 กิโลเบส และลำดับของนิวคลีโอไทด์ได้ถูกตรวจสอบอย่างครบถ้วน (Ratner et al., 1985) ลักษณะของ HIV จีโนมประกอบด้วยยีนหลัก ๆ 3 ยีนคือ gag, pol, และ env ยีน (รูปที่ 1) ซึ่งทั้งหมดจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส (Hahn, 1994; Conor and Ho, 1994; Green, 1995)



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางจีโนมของเชื้อ HIV-1 เปรียบเทียบกับของเชื้อ HIV-2

วงจรชีวิตของไวรัสนั้นสลับซับซ้อนขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัสและระบบภูมิคุ้มกันของคนไข้ (Levy, 1994; Pantaleo and Fauci, 1996) กล่าวโดยย่อ ๆ คือไวรัสจะบุกรุกเซลล์ของคนโดยการจับ gp 120 ของไวรัสจับที่ CD4 receptor ของเซลล์มนุษย์ หลังจากนั้น RNA ของไวรัสเข้าไปในเซลล์ มันจะจำลอง DNA จาก RNA แม่พิมพ์โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase ของมัน หลังจากนั้น DNA เส้นคู่ที่สร้างขึ้นใหม่จะสอดแทรกสู่โครโมโซมของคนโดยอาศัยเอนไซม์ไวรัสอีกตัวคือ integrase และจะอยู่ลักษณะนั้นเป็นเวลานานเป็นปี เมื่อไวรัสพร้อมที่จะก่อสร้างตัวใหม่มันจะสร้าง RNA ไวรัสและโปรตีนในลักษณะที่ยังไม่พร้อมจะทำงานที่เรียกว่า precursor polypeptide ทั้ง RNA ไวรัสและโปรตีนของไวรัสจะเคลื่อนไปยังบริเวณผนังเซลล์ มันจะใช้เอนไซม์อีกตัวชื่อ viral protease เพื่อทำการตัด precursor polypeptide ให้อยู่ในสภาพพร้อมที่ทำงาน หลังจากขั้นตอนนี้ไวรัสตัวใหม่ก็พร้อมที่จะบุกรุกเซลล์อื่นได้ จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ทั้งสามตัวคือ reverse transcriptase, integrase, และ protease มีความจำเป็นต่อวงจรชีวิตของไวรัส ถ้าขาดตัวหนึ่งตัวใด ไวรัสจะตายหรือหยุดการเจริญเติบโต ดังนั้นทั้งสามเอนไซม์จึงเป็นกลุ่มเป้าหมายที่สำคัญในการพัฒนายาต้านไวรัส HIV และเอนไซม์ทั้งสามตัวถูกกำหนดมาจากยีนของไวรัส ส่วนที่เรียกว่า pol ยีน(รูปที่ 1)

ปัญหาสำคัญของการหายาด้าน HIV ก็คือเชื้อ HIV กลายพันธุ์(mutation)ได้อย่างรวดเร็ว และก่อให้เกิดปัญหาคือต่อต้านไวรัส (Coffin, 1995; Wei et al., 1995) ในปัจจุบันนี้อาจกล่าวได้ว่ายังไม่มียาด้าน HIV ตัวใดที่มีประสิทธิภาพสูงจนเป็นที่น่าพอใจ ยาที่มีอยู่ในปัจจุบันและเป็นที่ยอมรับขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) (Pfeiffer, 1996) ไม่ว่าจะเป็นกลุ่ม anti-reverse transcriptase หรือแม้แต่กลุ่ม anti-protease ซึ่งเพิ่งนำมาจำหน่ายในท้องตลาดก็พบไวรัสที่คือต่อต้านหลังจากใช้ยาเหล่านี้ในคนไข้ไปไม่นาน (Condra et al., 1995; Gue et al., 1995; Wainberg et al., 1996) นอกจากนี้การผ่าเหล่าซึ่งทำให้เชื้อไวรัสต่อต้านไวรัสตัวหนึ่งตัวใด ก็อาจมีผลทำให้ต่อต้านไวรัสตัวอื่นๆในกลุ่มเดียวกัน (Condra et al., 1995 ; Lin et al., 1995;

Gulnik et al., 1995) เร็วๆนี้เรายังพบว่าผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับยาต้านไวรัสตัวหนึ่งตัวใดเลยก็มีเชื้อไวรัสที่ต่อต้านยาในกลุ่ม anti-protease (Leelamanit et al., 1995; Leelamanit, 1996) ปรากฏการณ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าโอกาสที่ผู้ป่วยจะมีไวรัสที่ต่อต้านยาต้านไวรัสใดๆนั้นสูง แม้ว่าผู้ป่วยนั้นจะไม่เคยได้รับยาด้านไวรัสมาก่อนเลย

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นนี้จึงเป็นที่น่าศึกษาเป็นอย่างยิ่งของเชื้อไวรัส HIV ในประเทศไทยซึ่งมี subtypes ต่างจากประเทศทางสหรัฐอเมริกาและยุโรป (Yu et al., 1995) ซึ่งในขณะนี้ก็มีข้อมูลอยู่น้อยมาก ความรู้จากการศึกษาของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HIV ที่พบในบ้านเราจะทำให้เราเข้าใจถึงการระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสในประเทศไทย วิธีการแพร่กระจายในกลุ่มคนไข้ (modes of transmission) อนุชีวิวิทยาของเชื้อไวรัส ตลอดจนถึงกลไกของการต่อต้านไวรัสของเชื้อ HIV ในบ้านเราได้เป็นอย่างดี

วิธีการทดลอง

ระเบียบวิธีการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 เก็บตัวอย่างเลือดของคนไข้ที่ติดเชื้อ HIV ในหมู่คนไทย (Collecting Blood Samples from HIV-1 Infected Thai Patients)

เป็นการเก็บตัวอย่างเลือดจากคนไข้ที่ติดเชื้อ HIV-1 ในประเทศไทยและบันทึกประวัติของผู้ป่วยอย่างละเอียด ขั้นตอนนี้มีความสำคัญมากเพราะประวัติของผู้ป่วยเช่น แม่-ลูก เพศชาย-หญิง การได้รับยาหรือไม่ได้รับยาต้านไวรัสมาก่อน ข้อมูลเหล่านี้จะมีผลต่อการแปลผลของข้อมูลที่ได้ ตัวอย่างเลือดคนไข้ที่คาดว่าจะทำการเก็บจากคนไข้ที่มารักษาตัวที่โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าฯ

ขั้นตอนที่ 2 แยกจีโนมของไวรัสจากเลือดคนไข้ (Isolation of HIV-1 Genome)

เป็นการแยกจีโนมของ HIV จากเลือดคนไข้โดยตรงโดยใช้ Ficoll hypaque centrifugation เพื่อเก็บเม็ดเลือด หลังจากย่อยสลายเซลล์ จีโนมจะถูกแยกโดยใช้การตกตะกอนด้วยเกลือและล้างอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ จีโนมจะถูกเก็บในลักษณะตะกอนใน absolute alcohol ที่ -70°C

ขั้นตอนที่ 3 แยกส่วน gag-pol ยีนของเชื้อ HIV (DNA Amplification of HIV Pol Genes)

เป็นการออกแบบ primers ที่จำเพาะต่อลำดับจีโนมที่ส่วนของ gag-pol ยีนโดยอาศัยเครื่องคอมพิวเตอร์แล้วทำการแยกส่วนของ gag-pol ยีนของเชื้อ HIV โดยใช้ PCR เทคนิค หลังจากนั้นจึงทำการวิเคราะห์แยกส่วนของจีโนมที่ขยายได้ โดยอาศัยเทคนิค low-melting agarose gel electrophoresis

ขั้นตอนที่ 4 clone ส่วน gag-pol ยีนเข้าสู่ *E. coli* (Cloning of HIV Gag-Pol Genes into *E. coli*) ทำการ clone ส่วนของ gag-pol ยีนที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 เข้าสู่ *E. coli* เข้าบ้าน โดยอาศัย pGEM-TA cloning vector และอาจใช้เครื่อง electroporation

ขั้นตอนที่ 5 หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของส่วน gag-pol ยีนของเชื้อ HIV (DNA Sequencing of HIV Gag-Pol Genes)

หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของส่วน gag-pol ยีนที่ทำการโคลนได้จากขั้นตอนที่ 4 โดยใช้เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดแบบอัตโนมัติ โดยจะใช้โคลนที่ได้จากคนไข้หลายๆประเภท มาเป็นตัวอย่างในการลำดับนิวคลีโอไทด์

ขั้นตอนที่ 6 เปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของส่วน gag-pol ขึ้นใน HIV-1 สายพันธุ์ต่างๆ (DNA and Amino Acid Sequence Comparisons of Gag-Pol Genes from Different HIV-1 Isolates)

ขั้นตอนนี้เป็นการแปรผล โดยการเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนในส่วน gag-pol ขึ้นในกลุ่มคนไทยและในส่วนของผลที่ทำการศึกษาจากต่างประเทศ และการใช้คอมพิวเตอร์เพื่อหาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ viral protease และ reverse transcriptase เพื่อดูกลไกการต่อต้านไวรัสของ HIV สายพันธุ์ที่พบในบ้านเรา

ผลการทดลอง

[illegible]

Nucleotide sequences of HIV-1 PR gene

1. พบความหลากหลายส่วนที่กำหนดคนเอนไซม์โปรตีนเอส ทั้งในลักษณะที่เป็นลำดับของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน
2. ความหลากหลายส่วนที่กำหนดเป็นเอนไซม์โปรตีนเอสแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดจากซัพไคต์อีกจากซัพไคต์บี
3. พบกรดอะมิโนแอซิดที่สัมพันธ์ต่อการด้อยด้านโปรตีนเอส เช่น G48M และ V82I เป็นต้น

HIVHXB2CG		GTAACCTTTAATTC		15	
1512-1	:	XXXX		XX	:
1512-2	:	XXXX		XX	:
1512-3	:	XXXX		XX	:
1512-4	:	XXXX		XX	:
1512-5	:	XXXX		XX	:
1512-6	:	XXXX		XX	:
1512-7	:	XXXX		XX	:
1512-8	:	XXXX		XX	:
1512-9	:	XXXX		XX	:
1512-10	:	XXXX		XX	:
1567-1	:	XXXX		XX	:
1567-2	:	XXXX		XX	:
1567-3	:	XXXX		XX	:
1567-4	:	XXXX		XX	:
1567-5	:	XXXX		XX	:
1567-6	:	XXXX		XX	:
1567-7	:	XXXX		XX	:
1567-8	:	XXXX		XX	:
1567-9	:	XXXX		XX	:
1567-10	:	XXXX		XX	:
1572-1	:	XXXX		XX	:
1572-2	:	XXXX		XX	:
1572-3	:	XXXX		XX	:
1572-4	:	XXXX		XX	:
1572-5	:	XXXX		XX	:
1572-6	:	XXXX		XX	:
1572-7	:	XXXX		XX	:
1572-8	:	XXXX		XX	:
1572-9	:	XXXX		XX	:
1572-10	:	XXXX		XX	:
1580-1	:	XXXX		XX	:
1580-2	:	XXXX		XX	:
1580-3	:	XXXX		XX	:
1580-4	:	XXXX		XX	:
1580-5	:	XXXX		XX	:
1580-6	:	XXXX		XX	:
1580-7	:	XXXX		XX	:
1580-8	:	XXXX		XX	:
1580-9	:	XXXX		XX	:
1580-10	:	XXXX		XX	:
1581-1	:	XXXX		XX	:
1581-2	:	XXXX		XX	:
1581-3	:	XXXX		XX	:
1581-4	:	XXXX		XX	:
1581-5	:	XXXX		XX	:
1581-6	:	XXXX		XX	:
1581-7	:	XXXX		XX	:
1581-8	:	XXXX		XX	:
1581-9	:	XXXX		XX	:
1581-10	:	XXXX		XX	:
1586-1	:	XXXX		XX	:
1586-2	:	XXXX		XX	:
1586-3	:	XXXX		XX	:
1586-4	:	XXXX		XX	:
1586-5	:	XXXX		XX	:
1586-6	:	XXXX		XX	:
1586-7	:	XXXX		XX	:
1586-8	:	XXXX		XX	:
1586-9	:	XXXX		XX	:
1586-10	:	XXXX		XX	:
1588-1	:	XXXX		XX	:
1588-2	:	XXXX		XX	:
1588-3	:	XXXX		XX	:
1588-4	:	XXXX		XX	:
1588-5	:	XXXX		XX	:
1588-6	:	XXXX		XX	:
1588-7	:	XXXX		XX	:
1588-8	:	XXXX		XX	:
1588-9	:	XXXX		XX	:
1588-10	:	XXXX		XX	:
1602-1	:	XXXX		XX	:
1602-2	:	XXXX		XX	:
1602-3	:	XXXX		XX	:
1602-4	:	XXXX		XX	:
1602-5	:	XXXX		XX	:
1602-6	:	XXXX		XX	:
1602-7	:	XXXX		XX	:
1602-8	:	XXXX		XX	:
1602-9	:	XXXX		XX	:
1602-10	:	XXXX		XX	:
1603-1	:	XXXX		XX	:
1603-2	:	XXXX		XX	:
1603-3	:	XXXX		XX	:
1603-4	:	XXXX		XX	:
1603-5	:	XXXX		XX	:
1603-6	:	XXXX		XX	:
1603-7	:	XXXX		XX	:
1603-8	:	XXXX		XX	:
1603-9	:	XXXX		XX	:
1603-10	:	XXXX		XX	:
1631-1	:	XXXX		XX	:
1631-2	:	XXXX		XX	:
1631-3	:	XXXX		XX	:
1631-4	:	XXXX		XX	:
1631-5	:	XXXX		XX	:
1631-6	:	XXXX		XX	:
1631-7	:	XXXX		XX	:
1631-8	:	XXXX		XX	:
1631-9	:	XXXX		XX	:
1631-10	:	XXXX		XX	:

Nucleotide sequences of the upstream of HIV PR coding regions

```

HIVHXB2CG : CCCATTAGCCCTATT : 15
15112-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
15112-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
15112-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
15112-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
15112-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
15112-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
15112-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
15112-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
15112-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
15112-10 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
1567-10 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
1572-10 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
1580-10 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
1581-10 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-10 : . . A . . . . T . . . . : 15
1586-11 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
1588-10 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
1602-10 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
1603-10 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-1 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-2 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-3 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-4 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-5 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-6 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-7 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-8 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-9 : . . A . . . . T . . . . : 15
1631-10 : . . A . . . . T . . . . : 15

```

Nucleotide sequences of the downstream of HIV PR coding regions

4. ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนรอยตัดของ p6/PR พบมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์
5. ในขณะที่ส่วนรอยตัดระหว่าง PR/RT พบว่าลำดับของนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

บทวิจารณ์

เอนไซม์ในส่วนของเชื้อเอชไอวีนั้นมีการเปลี่ยนแปลงมาก แม้ว่าคนยังไม่เคยรับยามาก่อนนั้นเป็นการบ่งชี้ว่าไวรัสชนิดนี้กลายพันธุ์ง่ายมาก และเมื่อคนไข้ได้รับยาต้านไวรัสชนิดยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส ก็จะพบการเพิ่มของกรดอะมิโนที่คือตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสมากขึ้น ปรากฏการณ์เช่นนี้แสดงให้เห็นชัดว่าไวรัสเอชไอวีพร้อมจะดื้อยาได้ในทุกขณะ

การเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงของส่วนของเอนไซม์โปรตีเอสในเชื้อเอชไอวีย่อมมีประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยเอดส์ การพัฒนายาใหม่ในอนาคตย่อมต้องอาศัยความรู้พื้นฐานทางกลไกทางอณูชีววิทยาตลอดจนคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์โปรตีเอส เพื่อสามารถพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพยับยั้งและลดการดื้อยาได้มากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

1. Barre-Sinoussi, F., J. -C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (1983). *Science* 220, 868-871.
2. Chiu, I. M., A. Yaniv, J. E. Dahlberg, A. Gazit, S. F. Skuntz, S. R. Tronick and S. A. Aaronson (1985). *Nature* 317, 366-368.
3. Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J. L. Champalimaud and L. Montagnier (1986). *Science* 233, 343-346.
4. Coffin, J. M. (1995). *Science* 267, 483-489.
5. Condra, J. H., W. A. Schleif, O. M. Blahy, L. J. Gabryelski, D. J. Graham, J. C. Quintero, A. Rhodes, H. L. Robbins, E. Roth, M. Shivaprakash, D. Titus, T. Yang, H. Teppler, K. E. Squires, P. J. Deutsch and E. A. Emini (1995). *Nature* 374, 569-571.
6. Connor R. I. and D. D. Ho (1994). In *Pediatric AIDS The Challenge of HIV Infection in Infants, Children, and Adolescents Second Edition* (ed. Pizzo, P. A. and C. M. Wilfert), Williams & Wilkins, Maryland, pp. 97-113.
7. Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch and M. Popovic (1983). *Science* 220, 865-867.
8. Gonda, M., F. Wong-Staal, R. C. Gallo, J. E. Clements, O. Narayan and R. V. Gilden (1985). *Science* 227, 173-177.
9. Greene, W. C. (1995). In *The Medical Management of AIDS fourth edition* (ed. Sande, M. A. and P. A. Volberding), W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 22-37.

10. Gu, Z., E. J. Arts, M. A. Parniak and M. A. Wainberg (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2760-2764. Gulnik, S. V., L. I. Suvorov, B. Liu, B. Yu, B. Anderson, H. Mitsuya and J. Erickson (1995). *Biochemistry* **34**, 9282-9287.
 11. Hahn, B. H. (1994). In *Textbook of AIDS Medicine* (ed. Broder, S., T. C. Merigan and D. Bolognesi), Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, pp. 21-43.
 12. Leelamanit, W., W. G. Farmerie, M. Goodenow, and B. M. Dunn (1995). Expression, Purification, and Enzymatic Analysis of Naturally-arising Variants of HIV-PR. *FASEB J.* Vol 9, 6, p. A1265, abstract number 54.
 13. Leelamanit, W. (1996). Kinetic Analysis and Inhibitor Susceptibility of Naturally Occurring HIV-1 Proteinase Variants. Ph.D. thesis, University of Florida, USA.
 14. Levy, J. A. (1994). In *HIV and the Pathogenesis of AIDS*, ASM Press, Washington, D.C., pp. 1-10, 35-57, 57-86.
 15. Lin, Y., X. lin, L. Hong, S. Foundling, R. L. Heinrikson, S. Thaisrivongs, W. Leelamanit, D. Raterman, M. Shah, B. M. Dunn and J. Tang (1995). *Biochemistry* **34**, 1143-1152.
 16. Mann, J. M., D. M. Tarantola and T. W. Netter (1992). In *AIDS in the World*, Harvard University Press, Boston.
 17. Pantaleo, G. and A.S. Fauci (1996). *Ann. Rev. Microbiol.* **50**, 825-854.
 18. Pfeiffer, N. (1996) *Genetic Engineering News* **16**, No 1.
 19. Ratner, L., W. Haseltine, R. Patarca, K. J. Livak, B. Starcich, S. F. Josephs, E. R. Doran, J. A. Rafalski, E. A. Whitehorn, K. Baumeister, L. Ivanoff, S. R. Petteway Jr, M. L. Pearson, J. A. Lauetenberger, T. S. Papas, J. Ghayeb, N. T. Chang, R. C. Gallo and F. Wong-Staal (1985). *Science* **313**, 277-284.
 20. Yu, X.-F., Z. Wang, C. Beyrer, D. D. Celentano, C. Khamboonrung, E. Allen and K. Nelson (1995). *J. of Virol.* Vol 69, 8, 4649-4655.
 21. Wainberg, M. A., W. C. Drosopoulos, H. Salomon, M. Hsu, G. Borkow, M. A. Parniak, Z. Gu., Q. Song., J. Manne, S. Islam, G. Castriota and V. R. Prasad (1996). *Science* **271**, 1282-1285.
 22. Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, M. S. Saag and G. M. Shaw (1995). *Nature* **373**, 117-122.
- World Health Organization. (1993). *WklyEpidemiol Rec.* **68** 9-11.

Output

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสาร AIDS Research And Human Retroviruses vol 20, Number 12, 2004
pp. 1368-1372
2. ฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนดการสร้างเอชไอวีโปรตีน ในฐานข้อมูล GenBank
3. ผลิตนักศึกษาบัณฑิตรับปริญญาโทจำนวน 2 คน และปริญญาเอกจำนวน 1คน ที่มีความรู้ความ
เชี่ยวชาญในเรื่องอนุชีววิทยาของเชื้อเอชไอวี