

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5780079

ชื่อโครงการ : การออกแบบและสร้างแบคทีเรียอีโคไลน์สังเคราะห์เป็นเครื่องจักรทางชีวภาพเพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ดุจเดือน วราโห

หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address : dujduan.war@mail.kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์สามารถรักษาโรคได้หลากหลาย เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคติดเชื้อเอชไอวี ในปัจจุบัน โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ส่วนใหญ่มักทำการยับยั้งการทำงานของโปรตีนโดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ซึ่งส่งผลข้างเคียงอันเนื่องมาจากการจับกับโปรตีนอื่นของผู้ป่วยได้ โดยถูกเรียกว่า off-target effect อีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสสามารถทำได้โดยอาศัยความจำเพาะที่จุดตัดจำเพาะบนซับสเตรตแทนความจำเพาะที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้เสนอที่จะใช้กระบวนการทางชีววิทยาสังเคราะห์เพื่อสร้างแบคทีเรียอีโคไลน์สำหรับใช้เป็นเครื่องมือคัดเลือกลำดับทางชีวภาพสำหรับการติดเชื้อเอชไอวี-1 โดยอาศัยความสามารถของระบบขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย Twin arginine translocation pathway ในการขนส่งโปรตีนที่พับม้วนแล้วผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของแบคทีเรียอีโคไลน์และใช้ TEM-1 β -lactamase (Bla) เป็นตัวบ่งชี้ความสำเร็จของการขนส่งโปรตีน กระบวนการที่สร้างขึ้นใหม่นี้ใช้ชื่อว่า Protease inhibitor Recognition based On Tat Export after Cleavage Tampering (PROTECT) โดยมีองค์ประกอบสำคัญ 3 ประการ คือ ตัววัดผลการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส (ซึ่งประกอบขึ้นด้วย ตัวส่งสัญญาณที่จำเพาะเจาะจงกับระบบขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย Twin arginine translocation pathway; ssTorA, ซับสเตรตของไวรัส (p17dp24 และโปรตีนรายงานผล (Bla)), ตัวผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของไวรัสเอชไอวี-1 และตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส (ซึ่งคือ โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์; อินทราเซลล์ลูลาร์แอนติบอดีหรือ single-chain antibody fragment (scFv)) การทดลองทาง *in vivo* ได้ยืนยันว่ากระบวนการ PROTECT สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมเชิงบวกและลบซึ่งคือความสามารถในการจับจำเพาะและไม่จับจำเพาะของ scFvs กับซับสเตรตของเอชไอวี-1 ตามลำดับ โดยในการทดลองพบว่าโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ scFvp17 สามารถจับและปกป้องจุดตัดของซับสเตรตและทำให้ซับสเตรตถูกขนส่งโดยกระบวนการ Tat-pathway ไปยังเพอร์พลาสซึมได้ ทำให้แบคทีเรียดังกล่าว

สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะประเภท β -lactam นอกจากนี้ ยังได้นำเทคนิคดังกล่าวไปทำการคัดเลือก scFvp17 กลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปกป้องของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ ดังนั้น คณะผู้ทดลองจึงสร้างไลบรารีการกลายพันธุ์ของ scFvp17 (ตัวดั้งเดิม) และคัดแยกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่ถูกกลายพันธุ์ที่สามารถทนต่อแรงกดดันที่สูงขึ้นได้ซึ่งคือทนต่อความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลินที่สูงขึ้น เป็นที่น่าเสียดายว่าคณะผู้ทดลองไม่พบว่ามีตัวใดที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องจุดตัดได้ดีกว่าตัวดั้งเดิม ดังนั้น เพื่อปรับปรุงและศึกษาคุณลักษณะของเทคนิค PROTECT นี้ให้ดีขึ้น ในอนาคตควรมีการสร้างไลบรารีที่มีคุณภาพที่ดีมากกว่าที่สร้างได้ในปัจจุบันนี้แล้วนำมาทดสอบกับระบบ PROTECT นี้อีกครั้ง รวมถึงสามารถนำระบบนี้ไปใช้ทดสอบกับแอนติเจนต่างๆ นอกเหนือไปจาก p17 นี้ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ทำให้ได้กระบวนการใหม่สำหรับการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์เพื่อลดการติดเชื้อเอชไอวี-1 และยังสามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้งานได้อย่างหลากหลาย เช่น การเพิ่มประสิทธิภาพของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ในเชิงพาณิชย์และ/หรือใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ตัวใหม่

คำหลัก : ชีววิทยาสังเคราะห์; โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์; ระบบขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย ทวิน-อาร์จินีน
ทรานสโลเคชัน พาธเวย์; อินทราเซลล์ลาร์แอนติบอดี/ เอชไอวี-1

Abstract

Project Code : TRG5780079

Project Title : Teach an old dog a new trick: Design and construction of a synthetic *E. coli* protease inhibitor detecting biomachine

Investigator : Assistant Professor Doctor Dujduan Waraho
Biological Engineering Program,
King Mongkut's University of Technology Thonburi

E-mail Address : dujduan.war@mail.kmutt.ac.th

Project Period : 3 years

Protease inhibitors (PIs) are used to treat various types of symptoms or diseases, for example, cardiovascular disorder and HIV disease. Currently, most PIs block the protease's function by targeting the protease active site, which can cause side effects to patients due to cross-reactivity with host's protease homologues called off-target effect. Alternatively, proteolytic cleavage can be blocked by targeting the cleavage site on the substrate instead of the active site on the enzyme. We proposed to apply the synthetic biology approach to create a synthetic *E. coli*-based protease inhibitor detecting biomachine for HIV-1 infection therapy by utilizing the Twin-arginine translocation (Tat) pathway's ability to transport folded protein across the inner membrane of *E. coli* and antibiotic resistance of TEM-1 β -lactamase (Bla) as a reporter protein. This newly developed technique was termed Protease inhibitor Recognition based On Tat Export after Cleavage Tampering (PROTECT) and is comprised of 3 biological devices, which are protease activity detector (fusion of protein of the Tat signal sequence (ssTorA), viral substrate (p17dp24; and reporter protein (Bla)), protease generator (HIV protease) and protease blocking devices (PIs, intracellular antibody or single-chain antibody fragment (scFv)). The *in vivo* testing confirmed that PROTECT technique could distinguish between positive and negative controls which were the corresponding and non-corresponding scFvs against the HIV-1 substrate, respectively. It was found that scFvp17 could bind and protect the cleavage site of the viral substrate, and the fusion protein was transported to the periplasm, thus, allowing the bacterial cells to grow on an LB agar plate containing selective β -lactam ring antibiotic. The

technique was further tested by attempting to isolate randomly mutated scFvp17 variants for enhanced protection efficiency. Therefore, we constructed an error-proned library of scFvp17 and isolated scFv variants which were able to withstand higher selection pressure by using higher Carb concentrations. Unfortunately, we have not found any mutated scFv variants with higher ability to protect proteolytic cleavage than that of wild type scFvp17 yet. To further improve and characterize this PROTECT technique, in the future, a high quality library should be constructed and tested as well as applying this technique to various antigens besides p17. However, this work reports a new method for isolation of protease inhibitor to decrease HIV-1 infection and to apply in various applications such as optimization of the commercial protease inhibitors and/or selection of new ones.

Keywords : Twin-arginine translocation pathway; protease inhibitor; intracellular antibody; HIV-1; synthetic biology