

การกลายพันธุ์บนคอมพิวเตอร์และการพยากรณ์โครงสร้างพันธุกลาย
ของโดเมนอาร์ของโคลิซินเอ็น



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

In silico mutations and mutant structure prediction of
Colicin N's R domain

Kanokpol Aphicho
Panuwat Lerdvorasap



A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Doctor of Pharmacy Program in Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University

2017

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการปริญญาโท	การกลายพันธุ์บนคอมพิวเตอร์และการพยากรณ์ โครงสร้างพันธุกรรมของโดเมนอาร์ของโคลิซินเอ็น
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นายกนกพล อภิโช นายภาณุวัฒน์ เลิศวรทรัพย์
สาขาวิชา/ภาควิชา	การค้นพบและพัฒนาายา / ชีวเคมีและจุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท	อ. ภก. ดร.ณัฐพล พรพุทธพงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อ. ดร.วันชพร อรุณมณี

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพ็ชร สกุลบำรุงศิลป์)

..... ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนาายา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุญานี พงษ์ธนานิกร)

..... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท
(อาจารย์ เภสัชกร ดร.ณัฐพล พรพุทธพงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.วันชพร อรุณมณี)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำนำ

ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบโพลีซินพันธุ์กลายที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปศึกษาผลของอันตรกิริยาทางไฟฟ้าต่อฤทธิ์ของมันในการทดลองระดับสูงขึ้นไป โดยการนำเอาชีวสารสนเทศศาสตร์เชิงโครงสร้างและการวิศวกรรมโปรตีนมาประยุกต์ใช้

งานวิจัยฉบับนี้เป็นตัวอย่างของการนำความก้าวหน้าทางวิทยาการชีวสารสนเทศศาสตร์มาปรับใช้ ช่วยเพิ่มโอกาสของความสำเร็จ ลดต้นทุนทั้งด้านค่าใช้จ่าย และเวลา ในการทดลองวิจัยทางห้องปฏิบัติการ และยังเป็นตัวอย่างหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าเครื่องมือทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์มีใช้สำหรับผู้เชี่ยวชาญเท่านั้น หากแต่สามารถเข้าถึงได้ง่าย แม้ว่าจะเป็นผู้เริ่มต้นก็ตาม

ผู้วิจัยจึงขอเชิญชวน และสนับสนุนให้นำเอาวิทยาการทางคอมพิวเตอร์มาช่วยในการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเช่นนี้อ่างแพร่หลายมากขึ้น อันจะยังประโยชน์แก่การพัฒนา และการศึกษาวิจัยทางด้านเภสัชศาสตร์อย่างยิ่ง คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ต้องการศึกษาวิจัยในลักษณะดังกล่าวสืบไป

คณะผู้จัดทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

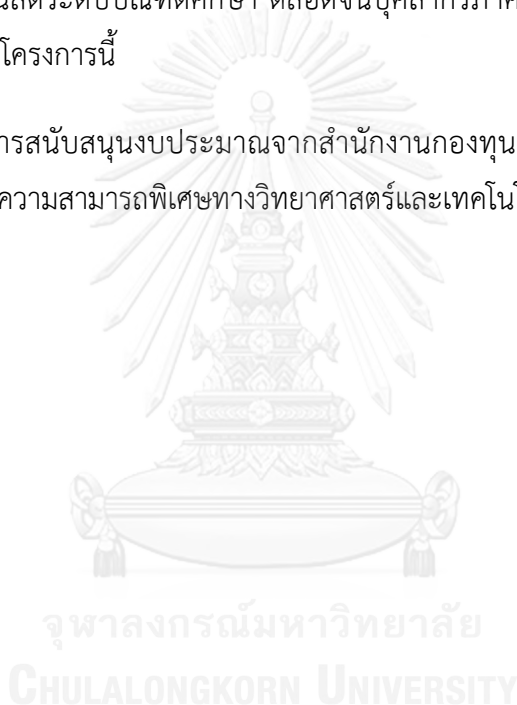
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทฉบับนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ เกษีซกร ดร.ณัฐพล พรพุทธพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.วันชัยพร อรุณมณี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. เอกชัย พรหมเพชร หัวหน้ากลุ่มขับเคลื่อนการวิจัยด้านวัคซีน และโปรตีนเพื่อการรักษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Professor Jeremy H. Lakey Newcastle University สหราชอาณาจักร ที่กรุณาให้คำปรึกษานำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงการนี้ให้สมบูรณ์ถูกต้อง ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ตลอดจนบุคลากรภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำโครงการนี้

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โครงการลำดับที่ 3.9

ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ : การกลายพันธุ์บนคอมพิวเตอร์และการพยากรณ์โครงสร้างพันธุกลาย
ของโดเมนอาร์ของโคลิซินเอ็น

หัวหน้าโครงการ : นายกนกพล อภิโช 5636502733

ผู้ร่วมโครงการ : นายภาณุวัฒน์ เลิศวรทรัพย์ 5636561733

อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.ภก.ดร.ณัฐพล พรพุทธพงศ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร.วันชพร อรุณมณี

สาขา/ภาควิชา : การค้นพบและพัฒนาายา/ ชีวเคมีและจุลชีววิทยา

โคลิซินเอ็น (colN) เป็นแบคทีเรียโอซินชนิดโคลิซิน โดยเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่ง *Escherichia coli* ผลิตขึ้นในสภาวะแข่งขัน โดยกลไกความเป็นพิษของโคลิซินแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของโคลิซินนั้น ๆ กลไกดังกล่าว ได้แก่ DNase tRNase และการก่อรู โดย colN นับเป็นหนึ่งในชนิดที่ก่อรูบนผนังเซลล์ มีการศึกษารายงานถึงคุณสมบัติต่อต้านมะเร็งของโคลิซินชนิดก่อรูบางชนิด เช่น โคลิซินเอ และ โคลิซินอี 1 ขณะที่คุณสมบัติดังกล่าวใน colN ยังไม่ได้ ได้รับความรู้จากที่กล่าวมาข้างต้น การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมของ colN จึงเป็นที่น่าสนใจ จากความรู้ที่ว่าประจุบนพื้นผิวของเซลล์มะเร็งนั้นมีความเป็นลบ ผู้วิจัยจึงสนใจในการวิศวกรรมพันธุกลายของ colN ที่มีประจุเป็นบวกมากขึ้น เพื่อศึกษาวิเคราะห์และปรับปรุงฤทธิ์ของ colN ต่อเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์บางรูปแบบอาจทำลายโครงสร้างและการทำหน้าที่ของโปรตีนได้ ในการศึกษาบนคอมพิวเตอร์นี้ จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินและเสนอแนะการกลายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดความไม่คงตัว มีความเหมาะสมต่อการศึกษาฤทธิ์ชีวภาพต่อไป ขั้นแรก จะหาตำแหน่งของตำแหน่งของกรดอะมิโนประจุลบที่มีความเข้ากันได้สูงที่สุดและเป็นตำแหน่งของโครงสร้างที่เกิดไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับโครงสร้างหลักหรือโซ่ข้าง โดยใช้เครื่องมือ Rosetta Supercharge จึงพบแอสปาร์เตตที่ ตำแหน่ง 150 และ 154 บนโดเมนอาร์ต่อมาในขั้นตอนที่สองจะเป็นการวิเคราะห์โปรตีนพันธุกลายประจุบวกที่ ตำแหน่งทั้งสองถูกแทนที่ด้วยไลซีน และ/หรือargi โดยใช้เครื่องมือทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุกลายหลายชนิด และทำการจำลองแบบโครงสร้างด้วยวิธีจำลองโครงสร้างจากโปรตีนต้นแบบ โดยโครงสร้างที่ถูกจำลองขึ้นจะนำมา วิเคราะห์ด้วยเครื่องมือประเมินโครงสร้างชนิดต่าง ๆ ต่อมาจึงทำการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลเพื่อยืนยันความคงตัวของโครงสร้างโปรตีน โดยสรุปสุดท้ายผู้วิจัยเสนอแนะ colN พันธุกลายที่ตำแหน่ง D150RD154R สำหรับใช้ในการ ทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาทางคอมพิวเตอร์ จึงต้องทำการ ทดลองในห้องปฏิบัติการร่วมด้วย ได้แก่ การใช้ circular dichroism spectroscopy เพื่อยืนยันโครงสร้างโปรตีนพันธุ กลาย และควรมีการศึกษาเพื่อทำการกลายพันธุ์อย่างเข้มข้นขึ้นเพื่อให้ได้โปรตีนพันธุกลายที่มีความเป็นบวกมากขึ้น

คณะเภสัชศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Abstract

Senior project title : *In silico* mutations and mutant structure prediction of Colicin N's R domain

Students' name : Mr. Kanokpol Apicho 5636502733

: Mr. Panuwat Lerdvorasap 5636561733

Advisor : Natapol Pornputtpong Ph.D.

Co-advisor : Wanatchaporn Arunmanee Ph.D.

Field/Department : Drug Discovery and Development/ Biochemistry and Microbiology

Colicin N (colN) is a bacteriocin of colicin type, an antimicrobial protein produced by *Escherichia coli* in competitive condition. The cytotoxic mechanism of colicins depends on its type including DNase, tRNase and pore-forming activity. ColN is among the pore-forming types. There are studies reported anticancer activity of some pore-forming toxins e.g. colicin A and colicin E1. While such activities of colN were unexplored. As stated above, the study of mammalian cell cytotoxicity of colN was inspired. Knowing that surface charge of cancer cell in certain types is negative, we were motivated to engineer more positive colN mutant to investigate an improvement of its activity against cancerous cell type with negative charge. Unfortunately, some mutation can diminish protein structure and function. This *in silico* study therefore aim to evaluate and suggest non-destabilizing mutation appropriate for undergoing further bioactivity study. First, the negative residues with highest accessibility and involve neither backbone nor sidechain hydrogen bonding stabilization were located using Rosetta Supercharge. Aspartate residues D150 and D154 in domain R were determined accordingly. In the second step, positive mutants in which both residues substituted with either lysine or arginine were analyzed by using several mutant protein stability prediction tools and homology modelling. Modelled structures from latter were analyzed using various structure evaluation tools. Finally, molecular dynamics simulation was performed to confirm the structure stability. In conclusion, we suggested the D150R, D154R colN mutant for further cytotoxicity experiments. Due to nature of computational study, complementary laboratory experiments i.e. circular dichroism spectroscopy to confirm mutant protein structures and study to explore more intensive mutation yielding more positive variants should be conducted.

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Student's signature

Chulalongkorn University

Advisor's signature

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

**The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.**

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ฉ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 โคลิซิน.....	3
2.2 โคลิซินเอ็น	4
2.3 โครงสร้างของโคลิซินเอ็น.....	4
2.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคลิซินก่อรู.....	7
2.6 ความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งของแบคทีเรียโอสลินกับความเป็นลบทางไฟฟ้าของเซลล์มะเร็ง.....	8
2.7 การวิศวกรรมประจุพื้นผิวของโปรตีน และเครื่องมือ SUPERCHARGE	10
2.8 การใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธู์กลาย	11
2.8.1 การจำลองโครงสร้างโปรตีน.....	12
2.8.1.1 การจำลองแบบโครงสร้างจากโปรตีนต้นแบบ.....	12
2.8.1.2 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล	13

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9 เครื่องมือทำนายความคงตัวของพันธู์กลาย.....	13
2.9.1 CUPSAT	13
2.9.2 SDM2.....	14
2.9.3 MAESTRO	14
2.10 เครื่องมือจำลองโครงสร้างโปรตีน.....	15
2.10.1 MODELLER.....	15
2.10.2 NAMD.....	15
2.11 เครื่องมือประเมินคุณภาพโครงสร้างโปรตีน	15
2.11.1 RAMPAGE	15
2.11.2 QMEAN	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	19
3.1 ระบบปฏิบัติการ ซอฟต์แวร์และฮาร์ดแวร์ที่ใช้.....	20
3.2 การออกแบบโปรตีนพันธู์กลาย.....	21
3.2.1 การค้นหาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เหมาะสมโดยใช้เครื่องมือ Supercharge	21
3.3 การคัดเลือกโปรตีนพันธู์กลาย.....	23
3.3.1 การจำลองโครงสร้างโปรตีนด้วยวิธี Homology modelling โดยใช้เครื่องมือ MODELLER.....	23
3.3.2 การประเมินคุณภาพโครงสร้าง โดยใช้เครื่องมือ RAMPAGE	28
3.3.3 การประเมินคุณภาพโครงสร้าง โดยใช้เครื่องมือ QMEAN	29
3.3.5 การทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธู์กลาย โดยใช้เครื่องมือ CUPSAT	31
3.3.4 การทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธู์กลาย โดยใช้เครื่องมือ SDM2	33
3.3.6 การทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธู์กลาย โดยใช้เครื่องมือ MAESTRO.....	34
3.4 การยืนยันโครงสร้างโปรตีนพันธู์กลายด้วยการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยใช้เครื่องมือ NAMD	38
3.4.1 การเตรียมไฟล์ที่จำเป็นสำหรับการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล	39
การกำหนดสภาพโปรโตเนชันของโปรตีน โดยใช้เครื่องมือ ProteinPrepare.....	39
การเตรียมไฟล์โครงสร้าง ตัวแปรสนามพลัง และไฟล์กำหนดค่า โดยใช้เครื่องมือ QwikMD	40
3.3.2 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยใช้เครื่องมือ NAMD.....	44
3.3.3 การวิเคราะห์ผลจากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยใช้เครื่องมือ VMD	45

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	48
4.1 การออกแบบโปรตีนพันธุ้กลาย	48
4.1.1 ผลการวิเคราะห์ การเปิดสั้มีลของมีว ด้วย Supercharge	48
4.1.2 ผลการวิเคราะห์การเกิดพันธะไฮโดรเจน ด้วย Supercharge.....	50
4.1.3 สรุปผลการออกแบบโปรตีนพันธุ้กลาย.....	50
4.2 ผลการคัดเลือกโปรตีนพันธุ้กลาย	51
4.2.1 ผลการทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุ้กลายโดยการจำลองโครงสร้าง	51
ผลการจำลองโครงสร้างด้วย MODELLER.....	51
ผลการประเมินโครงสร้างจำลองด้วย RAMPAGE.....	52
ผลการประเมินโครงสร้างจำลองด้วย QMEAN.....	54
4.2.1 ผลการทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุ้กลายโดยการใช้เครื่องมือทำนาย.....	56
ผลการทำนายความคงตัวด้วย CUPSAT.....	56
ผลการทำนายความคงตัวด้วย SDM2.....	59
ผลการทำนายความคงตัวด้วย MAESTRO.....	60
4.2.3 สรุปผลการคัดเลือกโปรตีนพันธุ้กลาย	61
4.3 ผลการยืนยันโครงสร้างโปรตีนพันธุ้กลาย	61
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	64
รายการอ้างอิง	66

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 โมเลกุลชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายและกลไกความเป็นพิษของโคลิซินแต่ละชนิด	5
ตารางที่ 2 การจำแนกโครงสร้างตามระบบ CATH ของโคลิซินเอ็น โดเมนอาร์ และพี.....	6
ตารางที่ 3 แบบคเทอรีโอซินที่มีรายงานว่ามียุทธิต่อเซลล์ไลน์มะเร็ง (cancer cell line) ชนิดต่าง ๆ	7
ตารางที่ 4 ค่า AvNAPSA value ของกรดอะมิโนประจุลบ ในช่วงโดเมนอาร์และพีของโคลิซินเอ็นจากโปรแกรม Rosetta	48
ตารางที่ 5 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโคลิซินเอ็นที่ลำดับกรดอะมิโน 150 และ 154 หลังจาก การกลายพันธุ์เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ในการทดลองแบบใช้ความร้อน จากโปรแกรม CUPSAT	57
ตารางที่ 6 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโคลิซินเอ็นที่ลำดับกรดอะมิโน 150 และ 154 หลังจาก การกลายพันธุ์เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ในการทดลองแบบใช้สารทำให้เสียสภาพ จากโปรแกรม CUPSAT.....	58
ตารางที่ 7 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ และ Confident estimation ของโปรตีนโคลิซินเอ็นที่กลายพันธุ์ตำแหน่ง D150RD154R, D150RD154K, D150KD154R และ D150KD154K จากโปรแกรม MAESTRO.....	60

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญรูปรภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างของโคลิซินเอ็นจากเทคนิคเอกซเรย์ คริสตัลโลกราฟีและแผนผังโดเมน.....	6
รูปที่ 2 แผนภาพฟอสโฟลิปิดองค์ประกอบและสภาพความเป็นกรดเบสของเซลล์มะเร็งเทียบกับเซลล์ปกติ.....	9
รูปที่ 3 สภาพความเป็นลบของเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ด้วย Nanoprobe.....	9
รูปที่ 4 ข้อมูลชุดคำสั่งโปรแกรม Rosetta.....	22
รูปที่ 5 ข้อมูล resfile_output_Rsc ที่แสดงตำแหน่งที่เกิด Hbond และข้อมูลแสดงค่า AvNAPSA value ที่นำมาใช้ในการแปลผลของโปรแกรม Rosetta.....	23
รูปที่ 6 ข้อมูลเบื้องต้นเป็นไฟล์นามสกุล .py และ .seg ของโปรแกรม MODELLER.....	24
รูปที่ 7 หน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม command prompt.....	25
รูปที่ 8 สัญลักษณ์ของการเปิดใช้งานโปรแกรม MODELLER.....	25
รูปที่ 9 ไฟล์ที่จำเป็นและการสั่งงานโปรแกรม MODELLER คำสั่งใช้งานเครื่องมือ โดยที่ชื่อไฟล์ต้องตรงกับในโพลเดอร์ปฏิบัติการด้วย	26
รูปที่ 10 ผลลัพธ์จากโปรแกรม MODELLER.....	27
รูปที่ 11 หน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม RAMPAGE.....	28
รูปที่ 12 ผลลัพธ์จากโปรแกรม RAMPAGE.....	29
รูปที่ 13 การเลือกไฟล์โครงสร้างพันธู์กลายนามสกุล .pdb ที่ต้องการคำนวณ และเลือก QMEAN method จากหน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ QMEAN	30
รูปที่ 14 ผลลัพธ์จากโปรแกรม QMEAN	31
รูปที่ 15 หน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ CUPSAT	31
รูปที่ 16 หน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ CUPSAT หลังจากระบุชื่อโปรตีนที่ต้องการคำนวณ พร้อมตั้งค่าการทดลองที่สนใจ.....	32
รูปที่ 17 CUPSAT ประมวลผลเสร็จและปรากฏข้อมูลต่าง ๆ ขึ้นมา.....	32
รูปที่ 18 หน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ SDM2.....	33
รูปที่ 19 ผลลัพธ์จาก SDM2.....	34
รูปที่ 20 หน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม MAESTRO.....	35
รูปที่ 21 การตั้งค่าระบุโครงสร้างที่ต้องการในโปรแกรม MAESTRO.....	36
รูปที่ 22 การเลือกรูปแบบการทำงานที่ต้องการในโปรแกรม MAESTRO	36
รูปที่ 23 การกำหนดการกลายพันธู์ที่ต้องการทำนายในโปรแกรม MAESTRO.....	37
รูปที่ 24 ผลลัพธ์จากโปรแกรม MAESTRO.....	38

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 25 หน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม ProteinPrepare.....	39
รูปที่ 26 การปรับเลือกค่าที่ใช้ด้วยโปรแกรม ProteinPrepare	40
รูปที่ 27 การเตรียมไฟล์เดอริบรจไฟล์ pdb ที่ใช้ในโปรแกรม VMD	40
รูปที่ 28 หน้าต่าง VMD Main และการเข้าสู่โปรแกรม QwikMD	41
รูปที่ 29 หน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม QwikMD.....	41
รูปที่ 30 หน้าต่าง Structural Manipulation/Check ของโปรแกรม QwikMD.....	42
รูปที่ 31 โปรโตคอลตั้งต้นของ Easy Run ในโปรแกรม QwikMD.....	42
รูปที่ 32 โพลเดอร์ไฟล์ที่ถูกเตรียมขึ้นจากโปรแกรม QwikMD.....	43
รูปที่ 33 การสั่งงานเริ่มต้นโปรแกรม NAMD	44
รูปที่ 34 ผลลัพธ์จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลด้วยโปรแกรม NAMD	45
รูปที่ 35 หน้าจอ VMD main หลังจากโหลดไฟล์ผลลัพธ์จากการจำลองพลวัต เชิงโมเลกุลในโปรแกรม VMD	46
รูปที่ 36 หน้าจอเริ่มต้นของ Timeline ในโปรแกรม VMD.....	46
รูปที่ 37 ผลลัพธ์จากการระบุโครงสร้างทุติยภูมิจาก Timeline ในโปรแกรม VMD	47
รูปที่ 38 ค่า AvNAPSA เรียงจากต่ำไปสูงของลำดับกรดอะมิโนประจุลบ ในช่วงโดเมนอาร์จากโปรแกรม Rosetta.....	50
รูปที่ 39 แผนภาพกล่องแสดง ฟังก์ชันจุดประสงค์ ของโปรตีนพันธุกลายแต่ละโมเดล	51
รูปที่ 40 แผนภูมิคอลัมน์ซ้อนแสดงร้อยละของกรดอะมิโนที่ตกอยู่ในบริเวณ Favoured region, Allowed region และ Outlier region ของโคลิซินเอ็นพันธุกลาย D150R,D154R ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง.....	52
รูปที่ 41 แผนภูมิคอลัมน์ซ้อนแสดงร้อยละของกรดอะมิโนที่ตกอยู่ในบริเวณ Favoured region, Allowed region และ Outlier region ของโคลิซินเอ็นพันธุกลายD150R,D154K ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง	53
รูปที่ 42 แผนภูมิคอลัมน์ซ้อนแสดงร้อยละของกรดอะมิโนที่ตกอยู่ในบริเวณ Favoured region, Allowed region และ Outlier region ของโคลิซินเอ็นพันธุกลาย D150K,D154R ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง.....	53
รูปที่ 43 แผนภูมิคอลัมน์ซ้อนแสดงร้อยละของกรดอะมิโนที่ตกอยู่ในบริเวณ Favoured region, Allowed region และ Outlier region ของโคลิซินเอ็นพันธุกลาย D150K,D154K ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง.....	53
รูปที่ 44 แผนภาพกระจายค่า QMEAN score values ของโคลิซินเอ็นพันธุกลาย ตำแหน่ง D150R,D154R ทั้งหมดสิบตัวอย่าง จากโปรแกรม QMEAN	54
รูปที่ 45 แผนภาพกระจายค่า QMEAN score values ของโคลิซินเอ็นพันธุกลาย ตำแหน่ง D150R,D154K ทั้งหมดสิบตัวอย่าง จากโปรแกรม QMEAN	54

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 46 แผนภาพกระจายค่า QMEAN score values ของโคลิซินเอ็นพินธุ์กลาย ตำแหน่ง D150K,D154R ทั้งหมดสิบตัวอย่าง จากโปรแกรม QMEAN	55
รูปที่ 47 แผนภาพกระจายค่า QMEAN score values ของโคลิซินเอ็นพินธุ์กลาย ตำแหน่ง D150K,D154K ทั้งหมดสิบตัวอย่าง จากโปรแกรม QMEAN	55
รูปที่ 48 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโคลิซินเอ็นพินธุ์ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 150 และ 154 จากแอสปาร์เตตเป็น อาร์จินีน และ ไลซีน จากโปรแกรม CUPSAT	59
รูปที่ 49 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโคลิซินเอ็นพินธุ์ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 150 และ 154 จากแอสปาร์เตตเป็น อาร์จินีน และ ไลซีน จากโปรแกรม SDM2	59
รูปที่ 50 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโปรตีนโคลิซินเอ็นพินธุ์ตำแหน่ง D150RD154R, D150RD154K, D150KD154R และ D150KD154K จากโปรแกรม MAESTRO	61
รูปที่ 51 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนพินธุ์กลายตำแหน่ง D150RD154R ตลอดช่วงกรอบเวลาที่ทำกรจำลองที่คำนวณจากโปรแกรม NAMD	62
รูปที่ 52 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนโคลิซินเอ็นพินธุ์ต้นแบบเทียบกับพินธุ์กลายตำแหน่ง D150RD154R ตลอดช่วงกรอบเวลาที่ทำกรจำลอง ในช่วง โดเมนอาร์ ที่คำนวณจากโปรแกรม NAMD	63

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งเกิดจากความผิดปกติของสารพันธุกรรมในเซลล์ร่างกายจนเกิดการเจริญเติบโตของเซลล์อย่างผิดปกติและการรุกราน กระจายไปยังบริเวณต่าง ๆ ของร่างกายก่อให้เกิดความเสียหายต่ออวัยวะอื่น ๆ ข้อมูลในปี พ.ศ. 2558 จากองค์การอนามัยโลก ระบุว่า มะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับสองของประชากรโลก แต่ละปีมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งถึง 8.8 ล้านราย คิดเป็นร้อยละ 17 ของสาเหตุการเสียชีวิตจากทั่วโลก (1) การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันสามารถทำการรักษาได้โดยการศัลยกรรม รังสีรักษา เคมีบำบัด และการรักษาโดยใช้ฮอร์โมนในโรคมะเร็งบางชนิด แม้ว่าจะมีการพัฒนาขึ้นของกระบวนการรักษามะเร็งอย่างก้าวกระโดด แต่การรักษาด้วยวิธีดังกล่าวยังคงสามารถทำให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรงได้หรือกดภูมิคุ้มกันให้ต่ำลงและทำให้เกิดผลเสียในระยะยาวต่อสุขภาพ (2) ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่เพื่อให้ความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้นโดยอาศัยสารภูมิต้านทาน (antibody) ที่จำเพาะกับเซลล์มะเร็งเชื่อมต่อเข้ากับสารออกฤทธิ์ไม่ว่าจะเป็นยาโมเลกุลเล็ก เรดิโอนิวคลีโอไทด์ (radionucleotide) หรือโปรตีนพิษ (protein toxin) (2) ถึงแม้จะมีความจำเพาะมากขึ้นแต่ก็ยังเป็นยาที่มีการออกฤทธิ์เช่นเดิม จึงยังคงมีผลข้างเคียงดังเดิม การค้นหาสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์แบบใหม่ต่อเซลล์มะเร็งยังคงมีความจำเป็นอยู่

แบคทีริโอซิน (bacteriocin) เป็นโปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในสภาวะเครียด มีฤทธิ์ต้านเชื้ออื่น โดยที่ที่น่าสนใจคือ มีรายงานว่าแบคทีริโอซินหลายชนิด มีฤทธิ์ต่อต้านและจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ ส่วนหนึ่งเนื่องจากคุณสมบัติร่วมกันของผนังเซลล์แบคทีเรีย และเยื่อหุ้มเซลล์ของมะเร็งมีความเป็นลบทางไฟฟ้าเช่นเดียวกัน ทำให้แบคทีริโอซินที่โดยส่วนใหญ่จะมีประจุบวกอยู่ จึงสามารถเกิดอันตรกิริยากับเซลล์ทั้งสอง และเกิดการสะสมและส่งเสริมฤทธิ์ได้ (3)

โคลิซินเอ็น เป็นแบคทีริโอซิน ที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิซินก่อรู (pore-forming colicin) โดยบริเวณโดเมนอาร์ของโคลิซินเอ็น เป็นส่วนที่มีประจุบวกที่สำคัญต่อการจับกับผิวเซลล์ โคลิซินก่อรูหลายชนิดมีรายงานพบว่ามีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง ขณะที่โคลิซินเอ็น (colicin N) ยังไม่ได้รับการศึกษา จึงเป็นที่น่าสนใจว่า จะมีฤทธิ์บางประการต่อเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกัน (2,3)

จึงนำมาสู่ปัญหาที่ผู้วิจัยสนใจ คือ การทดสอบฤทธิ์และศึกษากลไกของโคลิซินเอ็น (colicin N) ในการจับกับเซลล์มะเร็ง โดยทำการกลายพันธุ์เฉพาะที่ (site-directed mutagenesis) ในส่วน โดเมนอาร์ เพื่อให้ได้โปรตีนพันธุ์กลายที่มีความเป็นประจุบวกมากขึ้น เพื่อนำไปตรวจสอบผลของประจุทางไฟฟ้าต่อ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ฤทธิ์ของโคลิซินเอ็นต่อไป อย่างไรก็ตาม ในการทำการกลายพันธุ์ จำเป็นต้องทราบตำแหน่งที่เหมาะสม ที่เมื่อแทนที่กรดอะมิโนด้วยกรดอะมิโนที่ต้องการแล้ว ไม่ทำให้โครงสร้างเกิดความเสียหาย และต้องเป็นตำแหน่งที่มี การเปิดสัมผัสของผิว (surface exposure) ที่ดีอีกด้วย

ในงานวิจัยฉบับนี้ผู้วิจัยทำการออกแบบโคลิซินเอ็นพันธุ์กลายที่มีพื้นผิวประจุบวกมากขึ้น โดยการจำลองโครงสร้างและศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปของโปรตีนพันธุ์กลายโดยอาศัยชีวสารสนเทศศาสตร์ เพื่อเสนอโคลิซินเอ็นพันธุ์กลายที่มีความเหมาะสม สำหรับนำไปศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อทำออกแบบ คัดเลือกและเสนอโคลิซินพันธุ์กลายที่มีประจุบวกมากขึ้น ที่เหมาะสมสำหรับนำไปทดลองในระดับหลอดทดลองต่อไป โดยใช้กระบวนการทางชีวสารสนเทศศาสตร์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยโดยการประยุกต์ใช้ชีวสารสนเทศศาสตร์ในการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนโคลิซินเอ็น ค้นหาบริเวณที่เหมาะสมแล้วทำการกลายพันธุ์ จากนั้นจึงทำการจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีนพันธุ์กลายจากโปรตีนต้นแบบ และการทดสอบความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนด้วยเครื่องมือวิเคราะห์จากคอมพิวเตอร์ โดยไม่ครอบคลุมการทำงานทดลองทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยัน

1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

วิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนโคลิซินเอ็นเพื่อหาบริเวณเหมาะสมต่อการทำการกลายพันธุ์ คัดเลือกกรดอะมิโนที่เหมาะสม ด้วยเครื่องมือพยากรณ์ความคงตัวของโปรตีนพันธุ์กลาย รวมถึงการจำลองโครงสร้างสามมิติด้วยวิธีจำลองโครงสร้างจากโปรตีนต้นแบบ (homology modeling) ยืนยันโครงสร้างด้วยการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamic simulation)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบโคลิซินเอ็นพันธุ์กลายที่มีประจุบวกมากขึ้น ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปศึกษาผลของประจุบวกต่อคุณสมบัติต่าง ๆ และฤทธิ์ทางชีวภาพของโคลิซินเอ็นต่อไป

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โคลิซิน

โคลิซิน เป็นทอกซินต้านแบคทีเรีย (antibacterial toxin) ชนิดหนึ่ง ถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1925 พบได้ในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) โคลิซินเป็นแบคทีริโอซินชนิดที่เข้ารหัสอยู่ในพลาสมิด (plasmid-encoded bacteriocin) โดยเมื่อ *E. coli* อยู่ในสภาวะเครียดหรือสภาวะแข่งขันจะเกิดการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนโคลิซินและหลั่งออกมาสู่สภาพแวดล้อม ยับยั้ง *E. coli* หรือแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ไวต่อโคลิซินชนิดนั้น ๆ (4,5)

ในการออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียนั้น ขั้นแรกโคลิซินจะต้องจับเข้าจับกับตัวรับบนเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรีย จากนั้นจึงเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกเข้าไป แล้วจึงไปแสดงฤทธิ์ที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นใน หรือภายในเซลล์ขึ้นกับชนิดของโคลิซินนั้น ๆ โดยโคลิซินมีขนาดตั้งแต่ 40 ไปจนถึง 60 กิโลดาลตัน (4)

โคลิซินแต่ละชนิดล้วนมีลักษณะพื้นฐานร่วมกัน คือจะประกอบด้วย 3 โดเมน แต่ละโดเมนจะมีหน้าที่แตกต่างกันสอดคล้องกับกลไกเชิงโมเลกุลของโคลิซิน ได้แก่ (1) โดเมนอาร์ (R-domain) หรือโดเมนจับตัวรับ (receptor-binding domain) เป็นโดเมนส่วนที่อยู่บริเวณกลางสาย ทำหน้าที่จับกับตัวรับที่เยื่อหุ้มชั้นนอกอย่างแน่นหนา (high affinity) ทำให้การเกิดสะสมของโคลิซินในเยื่อหุ้มชั้นนอก ตัวรับเหล่านี้โดยมากจะมีรูปร่างเป็นทรงถังปิตา หรือ ปิตาบาเรล (β -barrel) ซึ่งโดยปกติตัวรับเหล่านี้จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งสารอาหาร วิตามิน ไอออนหรือแร่ธาตุต่าง ๆ ยกเว้นโคลิซินเอ็นที่มีตัวรับเป็นไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharides, LPS) ขั้นตอนต่อมาจะเกี่ยวข้องกับ (2) โดเมนที (T-domain) หรือโดเมนเคลื่อนย้าย (translocation domain) อยู่บริเวณด้านปลายไนโตรเจน (N-terminal) อาจแบ่งที่โดเมนออกเป็น 2 ส่วน คือ โดเมนเคลื่อนย้ายที่มีโครงสร้าง (structured translocation domain; STD) และอีกส่วนหนึ่งคือโดเมนไม่มีระเบียบตามธรรมชาติ (intrinsically disorder domain; IDD) หรือมักเรียกว่าโดเมนเคลื่อนย้ายที่ไม่เกิดโครงสร้างตามธรรมชาติ (intrinsically unstructured translocation domain; IUTD) อันเป็นส่วนสำคัญในการเคลื่อนย้ายของโดเมนที่เป็นพิษต่อเซลล์ของโคลิซินผ่านเข้าไปยัง periplasmic space โดยหลังจากที่จับกับตัวรับโดยอาศัยโดเมนอาร์ที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น โดเมนที่จะจับกับโปรตีนบนเยื่อหุ้มชั้นนอกตัวที่สองที่อยู่บริเวณข้างเคียง ซึ่งอาจเป็นตัวรับชนิดเดิมก็ได้ขึ้นกับชนิดของโคลิซิน แล้วการเกิดเคลื่อนย้ายของโคลิซินข้ามเยื่อหุ้มชั้นนอก โดยอาศัยกลไกเคลื่อนย้ายที่แตกต่างกัน ในกรณีของโคลิซินกลุ่ม A (group A colicin) จะเกิดผ่านระบบเคลื่อนย้ายที่ขึ้นกับ TolA (TolA-dependent translocation systems) ในขณะที่โคลิซินกลุ่ม B (group B colicin) จะเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกไปโดยอาศัยระบบเคลื่อนย้ายที่ขึ้นกับ TonB (TonB-dependent translocation systems) หลังจากนั้น

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โดเมนสุดท้าย คือ โดเมนซี (C-domain) หรือ โดเมนเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic domain) อยู่บริเวณด้านปลาย C (C-terminal) โดเมนนี้เป็นส่วนที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยหากเป็นชนิดที่ก่อรู โดเมนซีของโคลิซินหลาย ๆ หน่วยจะไปรวมตัวกันเป็นรูบนเยื่อหุ้มชั้นใน หากเป็นชนิดนิวคลีเอส ก็จะเข้าไปย่อยสลายอาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) หรือทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) ภายในเซลล์ ในกรณีที่โดเมนซีเป็นชนิดที่ทำให้เกิดรู อาจเรียกได้อีกอย่างว่า โดเมนพี (P-domain) หรือ โดเมนก่อรู (pore-forming domain) ก็ได้ (6-9) โมเลกุลชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายของโคลิซินและกลไกความเป็นพิษของโคลิซินแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 1

2.2 โคลิซินเอ็น

โคลิเอ็นจัดอยู่ในโคลิซินกลุ่มเอ เป็นโคลิซินก่อรูที่มีขนาดเล็กที่สุดที่พบในปัจจุบัน (10) มีความยาว 387 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 41,743 ดาลตัน (11) โคลิซินเอ็นมีคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ต่างจากโคลิซินอื่น ๆ หลายประการ เช่น โดเมนจับตัวรับของโคลิซินเอ็น จับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งต่างจากชนิดอื่น ๆ ที่จะจับกับโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก นอกจากนี้ โดเมนของโคลิซินเอ็นยังมีขนาดเล็กกว่าโคลิซินชนิดอื่น ๆ โดยที่ทั้งที่โดเมนเป็นส่วนที่ไม่มีโครงสร้างโดยธรรมชาติทั้งหมด ด้วยลักษณะที่กล่าวมาข้างต้นยังทำให้กลไกการเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ของโคลิซินเอ็นมีลักษณะเฉพาะต่างจากโคลิซินอื่น ๆ มาก ยังทำให้โคลิซินเอ็นมีคุณสมบัติทางชีวภาพบางประการที่แตกต่างไปจากโคลิซินชนิดอื่นอีกด้วย ดังจะกล่าวต่อไป

2.3 โครงสร้างของโคลิซินเอ็น

โครงสร้างของโคลิซินเอ็น ได้จากเทคนิคเอกซเรย์ คริสตัลโลกราฟี (X-ray crystallography) และแผนผังแสดงตำแหน่งของแต่ละโดเมนแสดงในรูปที่ 1 โดเมนที่ซึ่งไม่มีโครงสร้าง (unstructured T-domain) ไม่ปรากฏในโครงสร้างผลึก มีความยาว 90 อะมิโน เริ่มจากปลายเอ็น (N-terminal) M1 ถึง A91 บริเวณโดเมนที่นี้จะมีตำแหน่งสำหรับจับ ToIA (TABs) (12) ต่อมาในส่วนโดเมนอาร์ เริ่มตั้งแต่ R184 ถึง R387 มีความยาว 93 อะมิโน จะมีกรดอะมิโนประจุบวกกระจุกตัวอยู่จำนวนมาก และเป็นส่วนที่เผยออก (expose) อย่างมาก โดยเป็นตำแหน่งที่จับกับ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วยแผ่นบีตาชีต 6 แผ่น หุ้มรอบเกลียวแอลฟาความยาวประมาณ 20 อะมิโนที่ต่อมาจากโดเมน P โดเมนอาร์มีลักษณะเด่นประการหนึ่งคือ จะมีร่อง (cleft) ขนาดใหญ่ซึ่งเกิดจากแผ่นบีตาบิด (twisted beta sheet) อยู่ 2 ร่อง โดยร่องหนึ่งเป็นร่องที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic cleft) เกิดจากกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นอะโรมาติก ร่องนี้ถูกเติมเต็มด้วยเกลียวแอลฟา (alpha-helix) ที่ถูกแผ่นบีตา (beta sheet) พันหุ้มอยู่ ขณะที่อีกร่องหนึ่งว่างเปล่าและเปิดเผยให้สัมผัสกับตัวทำละลายอย่างเต็มที่ โดยบริเวณนี้จะประกอบด้วยกระจุกของกรดอะมิโนประจุบวก 2 กระจุกอยู่ด้านบนและล่างของร่อง ขณะที่บริเวณตรงกลางของร่องจะมีกรดอะมิโนประจุลบอยู่ โดเมนอาร์อาศัยประจุบวกบริเวณนี้เองการในจับกับ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ บนเยื่อหุ้มชั้นนอกของ *E. coli* (13) ต่อมาในส่วนโดเมนพี เริ่มตั้งแต่ R184 ไปสิ้นสุดที่ปลายซี (C-terminal) R387 โดเมนพีมีทอ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

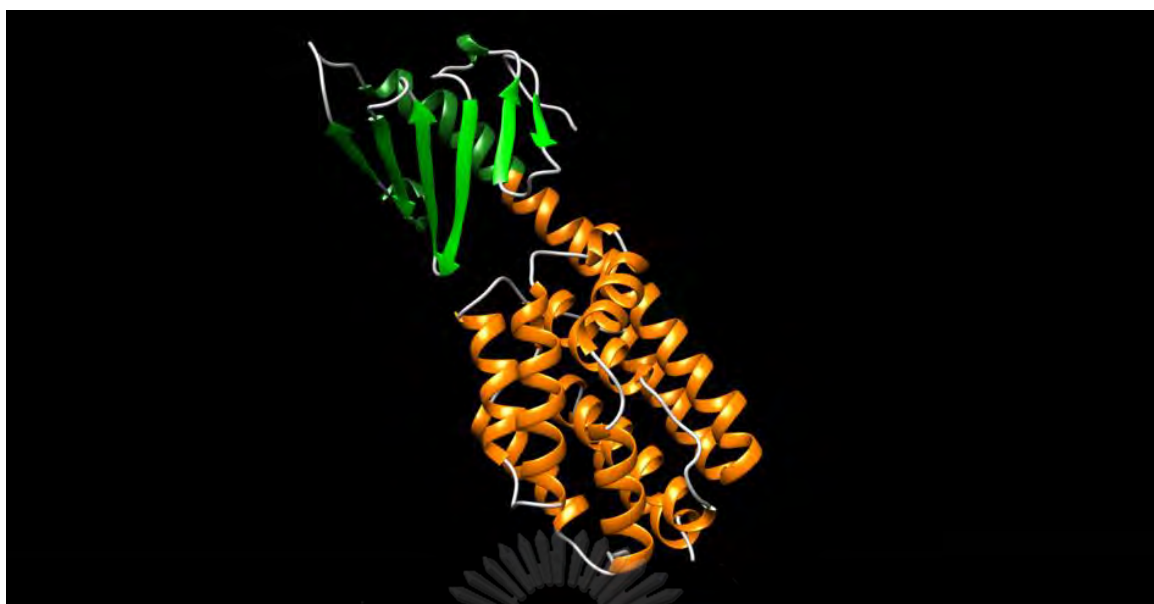
พอลิคล้ายโกลบิน (globin-like) ที่ประกอบด้วยมัดของเกลียวแอลฟา 10 แห่งเรียงตัวกันซ้อนเป็นสามชั้น โดยมีแกนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic core) อยู่ด้านใน (7) อนึ่งการนิยามตำแหน่งของโดเมนต่าง ๆ ว่าเริ่มต้นและสิ้นสุดที่ใด อาจมีความหลากหลายแตกต่างกันได้ เช่น อาจกำหนดให้โดเมนอาร์สิ้นสุดที่ตำแหน่ง F183 (12) หรือตำแหน่ง F184 (13) การจำแนกโครงสร้างของโคลิซินเอ็นโดเมนอาร์และพีตามระบบ CATH แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 โมเลกุลชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายและกลไกความเป็นพิษของโคลิซินแต่ละชนิด (9)

Colicin	Outer membrane receptor	Translocator	Mechanism of translocation	Cytotoxicity
<i>Group A</i>				
A	BtuB	OmpF	Tol A,B,Q,R	Pore-forming
E2, E7, E8, E9	BtuB	Omp F	Tol A,B,Q,R	DNase
E3, E4, E6	BtuB	OmpF	Tol A,B,Q,R	rRNase
E5	BtuB	OmpF	Tol A,B,Q,R	tRNase
E1	BtuB	TolC	Tol A,R	Pore-forming
N	LPS	OmpF	Tol A,Q,R	Pore-forming
K	Tsx	OmpF	Tol A,B,Q,R	Pore-forming
S4	OmpW	Omp F	Tol A,B,Q,R	Pore-forming
U	Omp A	Omp F, LPS	Tol A,B,Q,R	Pore-forming
28b	Omp A	Omp F, LPS	Tol A,B,Q,R	Pore-forming
Cloacin DF13	IutA	Unknown	Tol A,Q,R	RNase
<i>Group B</i>				
5, 10	Tsx	TolC	TonB, Exb B,D	Pore-forming
Ia, Ib	Cir	Cir	TonB, Exb B,D	Pore-forming
B	FepA	Unknown	TonB, Exb B,D	Pore-forming
D	Fep A	Unknown	TonB, Exb B,D	tRNase
M	Fhu A	Unknown	TonB, Exb B,D	Peptidoglycan synthesis inhibitor

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 1 โครงสร้างของโคลิซินเอ็นจากเทคนิคเอกซเรย์ คริสตัลโลกราฟีและแผนผังโดเมน

(บน) โครงสร้างของโคลิซินเอ็นจากเทคนิคเทคนิคเอกซเรย์ คริสตัลโลกราฟี บันทึกอยู่ใน PDB (1A87)

(ล่าง) แผนผังโครงสร้างของโคลิซินเอ็นโดเมนต่าง ๆ ตัดแปลงจาก (13)

ตารางที่ 2 การจำแนกโครงสร้างตามระบบ CATH ของโคลิซินเอ็น โดเมนอาร์ และพี (14)

	Receptor-binding domain		Pore-forming domain	
Level	CATH Code	Description	CATH Code	Description
C	3	Alpha Beta	1	Mainly Alpha
A	3.30	2-Layer Sandwich	1.10	Orthogonal Bundle
A	3.30.1120	Arylsulfatase, C-terminal domain	1.10.490	Globin-like
H	3.30.1120.60	Colicin	1.10.490.30	Colicin

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ลำดับกรดอะมิโนของโคลิซินเอ็น (11)

โดเมนที่ MGSNGADNAHNNAFGGGKNP GIGNTSGAGSNGSASSNRGNSNGWSWSNKPHKNDGFHS
DGSYHITFHGDNNSKPKPGGNSGNGRGNNGDGA

โดเมนอาร์ SAKVGEITITPDNSKPGRYISSNPEYSLLAKLIDAESIKGTEVYTFHTRKGQYVKVTVPDSNIDK
MRVDYVNWKGPKYNNKLVKRFVSQFLLF

โดเมนพี RKEEKEKNEKEALLKASELVSGMGDKLGEYLGVKYKNVAKEVANDIKNFHGRNIRSYNEAMA
SLNKVLANPKMKVNSDKDAIVNAWKQVNAKDMANKIGNLGKAFKVADLAIKVEKIREKSIE
GYNTGNWGPLLLLEVESWIIGGVVAGVAISLFGAVLSFLPISGLAVTALGVIGIMTISYLSSFIDA
NRVSNINNISSVIR

2.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคลิซินก่อรู

แบคทีเรียโอซินหลาย ๆ ชนิด มีรายงานว่ามียูทรีต่อเซลล์มะเร็ง (แสดงใน ตารางที่ 3) โดยในกลุ่มโคลิซินก่อรูได้แก่โคลิซินเอ (Colicin A) และโคลิซินอี 1 (Colicin E1) ต่างก็พบว่ามียูทรีต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยยังได้มีการศึกษาในเซลล์มะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ของ p53 เทียบกับเซลล์ไลน์ไฟโบบลาสต์มนุษย์มาตรฐาน (human standard fibroblast cell line) พบว่าโคลิซินอี 1 และโคลิซินเอ ต่างก็มียูทรีต่อเซลล์มะเร็งอย่างเฉพาะเจาะจงอีกด้วย (2) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีปรากฏการณ์การศึกษาที่ทดลองกับโคลิซินเอ็น

ตารางที่ 3 แบคทีเรียโอซินที่มีรายงานว่ามียูทรีต่อเซลล์มะเร็ง (cancer cell line) ชนิดต่าง ๆ (3)

Bacteriocin	Cancer cell lines
Colicin E3	P388, HeLa, HS913T
Colicin A	HS913T, SKUT-1, BT474, ZR75, SKBR3, MRC5
Colicin E1	MCF7, HS913T
Microcin E492	Hela, Jurkat, RJ2.25
Pediocin PA-1	A-549, DLD-1
Pediocin K2a2-3	HT2a, HeLa
Pediocin CP2	HeLa, MCF7, Sp2/0-Ag 14, HepG2
Pyocin S2	HepG2, Im9 HeLa, AS-II, mKS-A TU-7
Nisin	MCF7, HepG2
Bovicin HC5	MCF7, HepG2
Smegmatocin	HeLa AS-II, HGC-27 mKS-A TU-7
Plantaricin A	Jurkat, GH ₄ , Reh, Jurkat, PC12, N2A, GH ₄

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.6 ความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งของแบคทีเรียโอซินกับความเป็นลบทางไฟฟ้าของเซลล์มะเร็ง

แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่เป็นที่แน่ชัดถึงกลไกที่ทำให้แบคทีเรียโอซินชนิดต่าง ๆ มีความจำเพาะในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามที่ความเฉพาะเจาะจงของแบคทีเรียโอซินต่อเซลล์มะเร็งอาจอธิบายได้ด้วยคุณสมบัติความเป็นลบทางไฟฟ้าที่ผิวเซลล์มะเร็งซึ่งสอดคล้องกับความเป็นลบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรีย ที่เอื้อให้แบคทีเรียโอซินซึ่งโดยมากเป็นมีความเป็นลบทางไฟฟ้าอยู่สูงสามารถแสดงฤทธิ์ได้ดี (3)

โดยทั่วไป เยื่อหุ้มฟอสโฟลิปิดสองชั้น (phospholipid bilayer) ของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ปกติ จะมีความสมมาตรซึ่งเกิดจากการกระจายของฟอสโฟลิปิดชนิดต่าง ๆ กันที่บริเวณผิวด้านในเซลล์และด้านนอกเซลล์ โดยบริเวณผิวด้านนอกเซลล์จะประกอบด้วยเป็นฟอสโฟลิปิดที่มีโคลีนเป็นองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นทั้งประจุบวกและลบ (zwitterionic) และมีความเป็นกลางทางไฟฟ้า เช่น สฟิงโกไมอีลิน (sphingomyeline) และฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine) ในขณะที่ในเซลล์มะเร็งจะมีการสูญเสียความสมมาตรไป โดยเป็นที่ทราบกันว่าผิวด้านนอกของเซลล์มะเร็งมีความเป็นลบเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากมีการกระจายของฟอสฟาติดีลเซอรีน (phosphatidylserine) โอลิโกแซคคาไรด์เท็ตราไมวซิน (O-glycosylated mucin) ซิอาเลทเท็ตแกงกลิโอไซด์ (sialylated ganglioside) และ เฮปารินซัลเฟต (heparin sulfate) อยู่ที่ผิวเซลล์ (3) นอกจากนี้ยังเชื่อว่า “ปรากฏการณ์วอร์เบิร์ก (Warburg effect)” ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เซลล์มะเร็งมีการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส และเพิ่มเกิดการหลั่งแลคเตท (lactate) ในปริมาณสูงกว่าเซลล์ปกติถึงกว่า 30 เท่า โดยแลคเตทไอออนจะไปสะสมที่บริเวณผิวเซลล์ทำให้เกิดสภาพลบที่เยื่อหุ้มเซลล์ก็มีส่วนสำคัญเช่นเดียวกัน (15,16) ขณะเดียวกันสภาพความเป็นกรดบริเวณภายนอกเซลล์มะเร็ง ยังทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนของสารโมเลกุลเล็ก รวมถึงโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีคุณสมบัติเป็นกรดที่อยู่ในบริเวณโดยรอบ อยู่ในรูปประจุบวกอีกด้วย (17) ความแตกต่างระหว่างสภาพ pH ภายนอกเซลล์ และองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งแสดงในรูปที่ 2

สภาพความเป็นลบของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ด้วยอนุภาคนาโนแสดงในรูปที่ 3 โดยจะเห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิ ซึ่งเป็นเซลล์ร่างกายปกติที่แยกจากผู้ป่วย จะแสดงความเป็นกลางทางไฟฟ้า ยกเว้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่มีนิวเคลียสหลายรูปร่าง (polymorphonuclear leukocyte, PMN) ที่แสดงความเป็นบวก (16)

นอกจากผลของประจุไฟฟ้าแล้วยังมีปัจจัยทางสรีรวิทยาโมเลกุลของเซลล์มะเร็งอื่น ๆ ที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความจำเพาะของแบคทีเรียโอซินต่อเซลล์มะเร็งอีก อันได้แก่ ความอ่อนไหวของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane fluidity) ของมะเร็งที่ทำให้เกิดความไม่คงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane

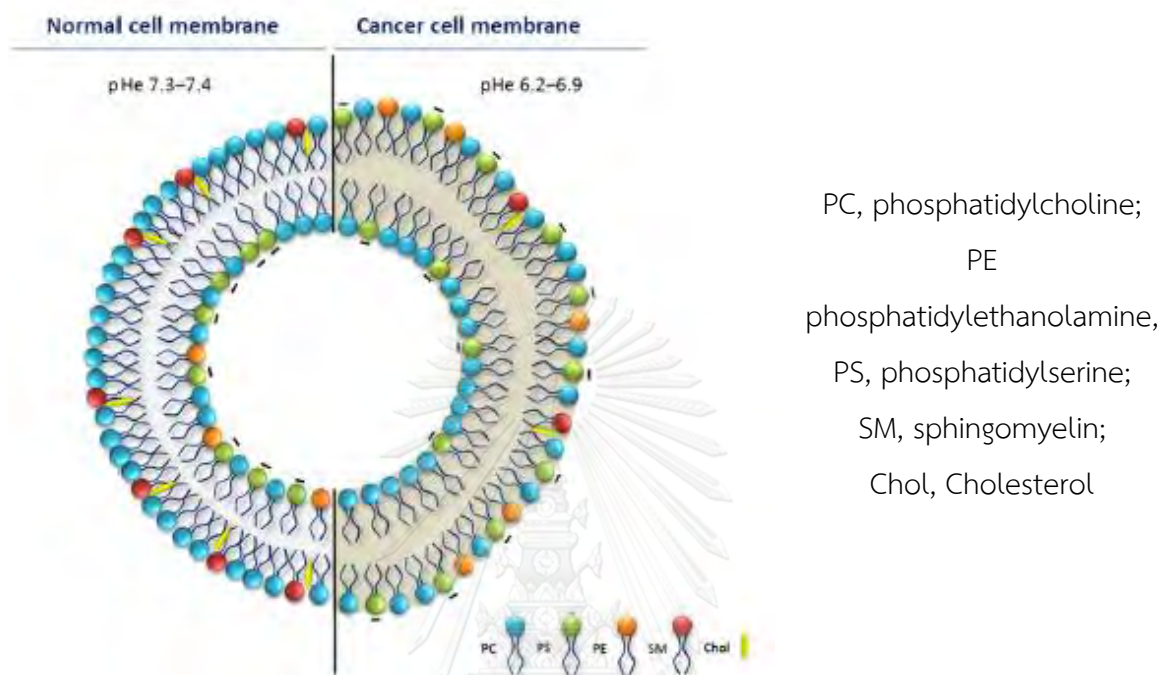
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

destabilization) ได้ง่ายกว่าเซลล์ปกติ และปริมาณของไมโครวิลไล (microvilli) ที่เซลล์มะเร็งมักจะมีอยู่มากกว่าเซลล์ปกติ เพิ่มพื้นที่ผิวในกับดูดซับพวกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีกว่าเซลล์ทั่วไป (3)



รูปที่ 2 แผนภาพฟอสโฟลิปิดองค์ประกอบและสภาพความเป็นกรดเบสของเซลล์มะเร็งเทียบกับเซลล์ปกติ (17)



รูปที่ 3 สภาพความเป็นลบของเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ด้วย Nanoprobe (16)

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.7 การวิศวกรรมประจุพื้นผิวของโปรตีน และเครื่องมือ Supercharge

การเพิ่มประจุของกระบวนการวิศวกรรมประจุพื้นผิวถูกเสนอขึ้นในพ.ศ. 2550 โดย Liu และคณะ (18) โดยเรียกกระบวนการดังกล่าวว่า Supercharging กลุ่มวิจัยของ Liu ประสบความสำเร็จในการเพิ่มประจุพื้นผิวของโปรตีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สีเขียว (Green Fluorescent Protein, GFP) จากเดิมมีประจุ -7 ไปเป็นประจุ +36 +48 และ -30 โดยไม่กระทบถึงการเรืองแสงของ GFP อย่างมีนัยสำคัญ

หลักการสำคัญของการวิศวกรรมประจุพื้นผิว คือ บริเวณผิวของโปรตีนจะมีความคงทนต่อการแทนที่กรดอะมิโนมากกว่าบริเวณอื่น Liu และคณะได้พัฒนาค่า AvNAPSA (average number of neighboring atoms within 10Å° per side-chain atom) ขึ้นเพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งที่มีความเปิดเผยสัมผัส (exposure) ที่เหมาะสม โดยมีหลักการในการแทนที่กรดอะมิโน คือ ในการปรับให้มีประจุบวกมากขึ้น จะแทนที่กรดอะมิโนมีขั้วที่ไม่ใช่ประจุบวก ได้แก่ แอสปาร์เตท (aspartate) กลูตาเมต (glutamate) แอสพาราจีน (asparagine) และกลูตามีน (glutamine) ด้วยไลซีน (lysine) และในการปรับให้มีประจุลบ จะทำการแทนที่กรดอะมิโนมีขั้วที่ไม่เป็นประจุลบ ได้แก่ อาร์จินีน (arginine) ไลซีน (lysine) และกลูตามีน (glutamine) ด้วยกลูตาเมต และแทนที่ แอสพาราจีนด้วยแอสปาร์เตท โดยจะเริ่มแทนที่ที่กรดอะมิโนที่มีค่า AvNAPSA ต่ำที่สุดก่อน (19)

ต่อมา Kuhlman และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 ได้พัฒนาหลักการใหม่ขึ้น (20) โดยกรดอะมิโนที่จะถูกแทนที่จะไม่จำกัดแต่เพียงกรดอะมิโนขั้วสูงเท่านั้น แต่ยังคงพิจารณาการเปิดเผยสัมผัสของพื้นผิวเป็นปัจจัยสำคัญร่วมกับปัจจัยอื่น ๆ ด้วย เช่น การเกิดพันธะไฮโดรเจนของโซ่ข้าง (side chain) โดย Kuhlman ได้สร้างแอปพลิเคชัน ชื่อ Supercharge บรรจุอยู่ในชุดซอฟต์แวร์จำลองและออกแบบโปรตีน Rosetta โดยแอปพลิเคชันดังกล่าวจะทำงานร่วมกับ Rosetta (21) ในการคัดเลือกตำแหน่งกรดอะมิโน ทำการแทนที่ และคำนวณพลังงานที่เปลี่ยนแปลงไปโดยอัตโนมัติ โดยมีสามารถเลือกรูปแบบการวิศวกรรมประจุได้ทั้งแบบดั้งเดิมของ Liu ใช้ชื่อว่า AvNAPSA mode และแบบที่พัฒนาขึ้นใหม่ ในชื่อ Rosetta mode

อย่างไรก็ดีในปฏิญญาฉบับนี้ จะใช้ Supercharge เพื่อคำนวณและวิเคราะห์คุณสมบัติของกรดอะมิโนต่าง ๆ เท่านั้น โดยมีหลักการเลือก และกลายพันธุ์ที่กำหนดขึ้นเอง ซึ่งจะบรรยายต่อไปในบทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปฏิญญาฉบับนี้ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปฏิญญาฉบับนี้ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.8 การใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุกลาย

เครื่องมือทางคอมพิวเตอร์นั้น จะทำงานภายใต้อัลกอริทึม (algorithm) หรือ ชุดกฎเกณฑ์ โดยเครื่องมือทำนายความคงตัวของพันธุกลายที่ถูกพัฒนาขึ้นจะใช้อัลกอริทึมที่สนใจคุณลักษณะของโปรตีนที่แตกต่างกันไป โดยคุณลักษณะที่อาจนำมาใช้ได้แก่

1. คุณลักษณะด้านโครงสร้าง การแพ็คตัว การพับม้วนของโปรตีน มุมองศาต่าง ๆ ของโครงสร้างแกน อันตรกิริยาเชิงไฟฟ้าสถิตย์
2. คุณลักษณะด้านลำดับกรดอะมิโน วิธีการนี้จะอิงกับลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) และตำแหน่งของกรดอะมิโน
3. คุณลักษณะด้านพลังงาน ตัวอย่างเช่น พลังงานที่ใช้ในการคลี่ม้วน (unfolding) ของโปรตีน โดยอาจคิดจากผลรวมของพลังงานต่าง ๆ อาทิ แรงแวนเดอร์วาล (Van der Waals interaction) พลังงานการละลาย (solvation energy) เป็นต้น
4. คุณลักษณะด้านโมเลกุล เช่น พื้นที่ที่ตัวทำละลายเข้าถึงได้ (solvent accessible surface area) พื้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic area) พื้นที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เป็นต้น

เครื่องมือบางอย่างอาจใช้หลาย ๆ คุณสมบัติร่วมกันเข้ามาทำนายผลของการกลายพันธุ์ต่อความคงตัว โดยปัจจุบันยังได้มีการพัฒนาเครื่องมือที่อาศัยการเรียนรู้ของเครื่อง (machine learning) ขึ้น โดยให้คอมพิวเตอร์เรียนรู้คุณลักษณะต่าง ๆ ที่สนใจ เพื่อนำมาทำนายผลการกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม เครื่องมือเหล่านี้มีข้อจำกัดอันเนื่องด้วย เครื่องมือเหล่านี้จะทำนายได้ดีภายใต้ชุดข้อมูลที่ใช้ในการพัฒนาโมเดลในการพยากรณ์ (predictive model) เท่านั้น จึงจำเป็นต้องใช้หลาย ๆ เครื่องมือร่วมกัน เพื่อป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้จากอคติของต่อละเครื่องมือ (22)

อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ผลที่น่าเชื่อถือมากขึ้น อาจนำการจำลองโครงสร้างโปรตีน เช่นการจำลองโครงสร้างโปรตีนจากโปรตีนต้นแบบ (23) หรือการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลมาใช้ ซึ่งนอกจากจะให้ข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่าแล้ว ยังให้ข้อมูลอื่น ๆ นอกเหนือจากข้อมูลความคงตัวอีกด้วย เช่น กระบวนการพับม้วน อันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยังแสดงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยจากการกลายพันธุ์ได้อีกด้วย (22)

โดยสรุปการวิเคราะห์การกลายพันธุ์โดยใช้เครื่องมือทำนาย จะช่วยให้แนวทางในการออกแบบโปรตีนพันธุกลาย และการจำลองโครงสร้างจะเป็นเครื่องมือที่ช่วยแสดงให้เห็นพฤติกรรมเชิงโมเลกุล และยืนยันความคงตัวของพันธุกลายได้

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.8.1 การจำลองโครงสร้างโปรตีน

คุณสมบัติและการทำงานของโปรตีนนั้นขึ้นกับลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติของโปรตีน การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนสามารถทำได้โดยอาศัยการทดลองในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม การทดลองวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนนั้นกินระยะเวลานาน และมีต้นทุนที่สูง (24) อีกทั้งโครงสร้างที่ได้จากการทดลองแต่ละประเภทจะมีข้อจำกัดบางประการ เช่น โครงสร้างที่ได้จากเทคนิคเอกซเรย์ คริสตัลโลกราฟี ทำให้ได้โครงสร้างเฉพาะที่ปรากฏแบบหยุดนิ่งในสภาวะผลึกเท่านั้น ไม่อาจสะท้อนพฤติกรรมของโปรตีนที่เป็นพลวัตได้ การจำลองโครงสร้างโปรตีนจึงมีบทบาท ในกรณีที่ยังไม่มีโครงสร้างสามมิติที่ได้จากการทดลองของลำดับอะมิโนนั้น ๆ ปรากฏ เพื่อนำโครงสร้างที่จำลองขึ้นมาศึกษา ทำความเข้าใจเกี่ยวกับคุณสมบัติของมัน หรือในการกรณีของการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลที่จะช่วยแสดงให้เห็นพฤติกรรมของโมเลกุลในสภาวะจำลองที่คล้ายคลึงกับสภาวะจริงได้

การจำลองหรือทำนายโครงสร้างสามมิติ อาจแบ่งเป็นได้ 2 แนวทางหลัก ได้แก่ การจำลองแบบโครงสร้างโดยอาศัยโครงสร้างต้นแบบ และ การจำลองแบบโครงสร้างจากเริ่มต้น (Ab initio) (25)

การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเป็นอัลกอริทึมที่นำเอาหลักการทางฟิสิกส์มาคำนวณการเคลื่อนที่อะตอมต่าง ๆ ในโมเลกุล ซึ่งมีการนำมาประยุกต์ใช้กับการจำลองโครงสร้าง ไม่ว่าจะเป็นการจำลองแบบโครงสร้างจากเริ่มต้น การปรับปรุงโครงสร้าง (optimization) ฯลฯ การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลมีประโยชน์อย่างยิ่งในการแสดงพลวัตของโปรตีนในสารละลาย (26)

ในการศึกษานี้จะมุ่งเน้นการที่จำลองแบบโครงสร้างจากโปรตีนต้นแบบ และการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลซึ่งจะกล่าวถึงเป็นลำดับต่อไป

2.8.1.1 การจำลองแบบโครงสร้างจากโปรตีนต้นแบบ

การจำลองแบบโครงสร้างจากโปรตีนต้นแบบ (Homology Modelling) หรือการจำลองแบบเชิงเปรียบเทียบ (comparative modelling) จะอาศัยข้อมูลเชิงโครงสร้างของโปรตีนต้นแบบมีความคล้ายคลึงกัน มาใช้จำลองโปรตีนเป้าหมาย โดยมีกระบวนการทำงาน 4 ขั้นตอนหลัก ๆ (24,27) ได้แก่

1. การกำหนดตัวต้นแบบให้กับโปรตีนเป้าหมาย (fold assignment) โดยควรเลือกโปรตีนต้นแบบที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสกับโปรตีนเป้าหมายไม่น้อยเกินไป
2. การเทียบแนบระหว่างโปรตีนเป้าหมายและต้นแบบ (target-template alignment) ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมายไปที่โครงสร้างของโปรตีนต้นแบบในส่วนที่มีลำดับกรดอะมิโนตรงกัน

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3. การสร้างแบบจำลอง (model building) จำลองโครงสร้างของโปรตีนเป้าหมายขึ้นจากตัวต้นแบบ โดยยึดจากโครงสร้างหลัก (backbone) และจำลองโครงสร้างของส่วนที่ไม่มีโครงสร้างและส่วนของโซ่ข้าง
4. ประเมินแบบจำลองที่สร้างขึ้น (model evaluation)

2.8.1.2 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics) เป็นวิธีการศึกษาความคงตัวของสารชีวโมเลกุลจากการทำนายด้วยคอมพิวเตอร์ด้วยหลักการด้านกลศาสตร์เชิงโมเลกุล (molecular mechanics) โดยอะตอมหรือโมเลกุลจะเกิดอันตรกิริยาต่อกันในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ด้วยคุณสมบัติทางกายภาพที่กำหนดเพื่อให้ทราบถึงการเคลื่อนไหวแบบพลวัตของของระบบหรืออนุภาค การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลนำมาใช้ทำนายพฤติกรรมของโปรตีน การทำนายโครงสร้างพลวัตเชิงโมเลกุลนี้ยังใช้ในการวิเคราะห์หาโครงสร้างของโปรตีนจากการทดลองนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) หรือ เอกซเรย์ คริสตัลโลกราฟี จากที่กล่าวมาอาจบอกได้ว่าการทำนายพลวัตเชิงโมเลกุลนี้เป็นรอยต่อระหว่างการทดลองในห้องปฏิบัติการและทฤษฎี ที่ซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อช่วยเพิ่มโอกาสสำเร็จของการทดลองในห้องปฏิบัติการได้ อีกทั้งยังเป็นการแสดงถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างเชิงโมเลกุล หน้าที่ของมัน และการเคลื่อนที่ของโมเลกุลอีกด้วย ในปัจจุบันการทำนายโครงสร้างพลวัตเชิงโมเลกุลถูกนำไปใช้ในวงกว้างในเชิงวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เพื่อศึกษาถึงกระบวนการเชิงพลวัตซับซ้อนที่เกิดขึ้นในระบบทางชีวภาพ ดังเช่นการพับม้วนของโปรตีน ความคงตัวของโปรตีน การจำแนกโมเลกุล การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง การออกแบบตัวยา การแสดงรายละเอียดของโครงสร้างสามมิติ ปฏิกริยาของเอนไซม์ และการเคลื่อนที่ของไอออนผ่านตัวขนส่งในระบบชีวภาพ (28)

2.9 เครื่องมือทำนายความคงตัวของพันธู์กลาย

2.9.1 CUPSAT

CUPSAT หรือ Cologne University Protein Stability Analysis Tool เป็นเครื่องมือวิเคราะห์และทำนายเสถียรภาพของโปรตีนจากการทำการกลายพันธู์เฉพาะที่ โดยนำศักยภาพของโครงสร้างแวดล้อมของอะตอมจำเพาะ (structural environment specific atom potentials) และศักยภาพของมุมบิดเกลียวภายใน (torsion angle potentials) มาทำนายผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ของการคลี่ม้วน (unfolding free energy) ระหว่างพันธู์ป่า (wild type) และพันธู์กลาย (mutant) ในการใช้เครื่องมือชนิดนี้ต้องการโครงสร้างของโปรตีนต้นแบบในรูปแบบ PDB และตำแหน่งที่ต้องการกลายพันธู์ โดยข้อมูลที่ได้รับจากเครื่องมือนี้ประกอบด้วยตำแหน่งที่ทำการกลายพันธู์ (mutation site) ข้อมูลที่ครอบคลุมเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงความคงตัวของโปรตีนสำหรับการแทนที่กรดอะมิโนอย่างเจาะจงที่เป็นไปได้ทั้งหมด และ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

คุณสมบัติเชิงโครงสร้างของโปรตีนต้นแบบ ซึ่งประกอบด้วยสามคุณสมบัติคือความสามารถในการเข้าถึงได้ของสารละลายของแบบจำลอง โครงสร้างเชิงทุติยภูมิ และมุมบิดเกลียวภายใน นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ความสามารถของกรดอะมิโนพันธุกลายเพื่อทำการปรับค่ามุมบิดเกลียวภายในอีกด้วย (29)

2.9.2 SDM2

SDM2 หรือ Site directed mutator (30) เป็นเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นจากเครื่องมือ SDM โดยใช้พยากรณ์ผลของการกลายพันธุ์ต่อความคงตัวของโปรตีน

เครื่องมือ SDM นี้มีการหลักการทำงานโดยอาศัยความรู้เป็นฐาน (knowledge-based approach) โดยใช้ตารางการแทนที่ของกรดอะมิโนในแต่ละสภาพแวดล้อม (environmental-specific amino acid substitution tables, ESST) ซึ่งได้มาจากการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลธนาคารข้อมูลโปรตีน (Protein Data Bank) มาคำนวณคะแนนความคงตัวที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างโปรตีนพันธุป่าและโปรตีนพันธุกลาย

โดยในเครื่องมือ SDM2 มีการปรับปรุงแก้ไขตารางการแทนที่ของกรดอะมิโนในแต่ละสภาพแวดล้อม ให้มีความทันสมัย ตามฐานข้อมูลธนาคารโครงสร้างโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และยังมีการเพิ่มเติมตัวแปรเชิงโครงสร้าง ได้แก่ residue packing density ในตารางอีกด้วย

เครื่องมือ SDM2 ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ ยังให้ความสอดคล้องในการทำนายการกลายพันธุ์ย้อนกลับได้ค่อนข้างดีกว่าเครื่องมืออื่น ๆ โดยเฉพาะเครื่องมือที่ใช้หลักการเรียนรู้ของเครื่อง (machine learning approach) ซึ่งมักจะมีปัญหา overfitting ทำให้ทำนายได้ไม่ถี่นัก

2.9.3 MAESTRO

MAESTRO หรือ multi-agent prediction system, based on statistical scoring functions เป็นเครื่องมือที่สามารถคำนวณเสถียรภาพของโปรตีนพันธุกลายหลายตำแหน่งพร้อมกันได้โดยคำนวณจากพลังงานเสรีของการคลี่คลายตัวของโปรตีน โดยเครื่องมือ MAESTRO นี้มีการคำนวณโดยใช้เทคนิคการเรียนรู้ของเครื่อง ร่วมด้วย ซึ่งเครื่องมือนี้จะให้ผลลัพธ์เป็นค่าการทำนายความต่างของพลังงานอิสระของกิบส์ ร่วมกับค่าความเชื่อมั่นในการทำนาย จากการคำนวณนี้ทำให้ทราบว่าค่าพลังงานอิสระของกิบส์ ในเครื่องมือ MAESTRO ยังมีค่าน้อย ยิ่งแสดงถึงความคงตัวของโครงสร้างได้ อีกทั้งมีระบบที่ใช้กับโครงสร้างจตุรภูมิได้ (quaternary structure) ทำให้โครงสร้างต้นแบบที่ใช้มีความใกล้เคียงโครงสร้างที่ออกฤทธิ์ได้จริงมากขึ้นด้วย โดยเครื่องมือนี้สามารถใช้ในการคัดกรองโครงสร้างโปรตีนพันธุกลายได้อย่างดีเนื่องจากสามารถคำนวณได้อย่างรวดเร็วและพร้อมกันได้ที่ละมาก (31)

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.10 เครื่องมือจำลองโครงสร้างโปรตีน

2.10.1 MODELLER

เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการจำลองโครงสร้างโปรตีนจากโปรตีนต้นแบบ โดย MODELLER จะรับค่าป้อนเข้าเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย และลำดับกรดอะมิโนพร้อมทั้งโครงสร้างของโปรตีนต้นแบบ จากนั้นจะทำการคำนวณแบบจำลองขึ้นโดยจะคิดรวมอะตอมทุกชนิดยกเว้นอะตอมไฮโดรเจน โดยโปรแกรมจะพยายามสร้างแบบจำลองให้ได้เป็นไปตามฟังก์ชันบังคับตัวหนึ่งเรียกว่า spatial restraints ซึ่งคิดจากทั้งระยะทาง มุม ระนาบมุมสองหน้าหรือคู่ระนาบ ที่ได้จากโปรตีนต้นแบบ ความยาวพันธะและมุมพันธะซึ่งได้จากสนามแรงกลศาสตร์เชิงโมเลกุล (molecular mechanics force field) CHARMM-22 ความเหมาะสมของมุมสองหน้า (dihedral angle) และระยะห่างระหว่างอะตอมในทางสถิติ รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่ผู้ใช้สามารถเพิ่มเติมได้ เช่น ข้อมูลจากการทดลอง NMR (32)

เมื่อเสร็จสิ้นการทำงาน จะได้ไฟล์โครงสร้างของโปรตีนที่จำลองขึ้น พร้อมทั้งรายงานค่าฟังก์ชันจุดประสงค์ (objection function) หากมีค่าน้อยจะบ่งบอกว่าจะมีความสอดคล้องกับ spatial restraint ดี

2.10.2 NAMD

NAMD หรือ Nanoscale Molecular Dynamics เป็นโปรแกรมแบบขนาน สำหรับจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยออกแบบขึ้นเพื่อใช้กับงานจำลองประสิทธิภาพสูงในระบบชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ โดย NAMD สามารถใช้กับตัวประมวลผลตั้งแต่ระดับไม่ถึง 10 core ไปจนถึงระดับ 100 หรือกว่า 500000 นอกจากนี้ยังสามารถทำงานบนคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคลได้อีกด้วย โดย NAMD จะทำงานร่วมกับ VMD (33) ซึ่งเป็นโปรแกรมประมวลผลกราฟิก ในการเตรียมไฟล์ที่จำเป็น และการวิเคราะห์ผลการจำลอง (34)

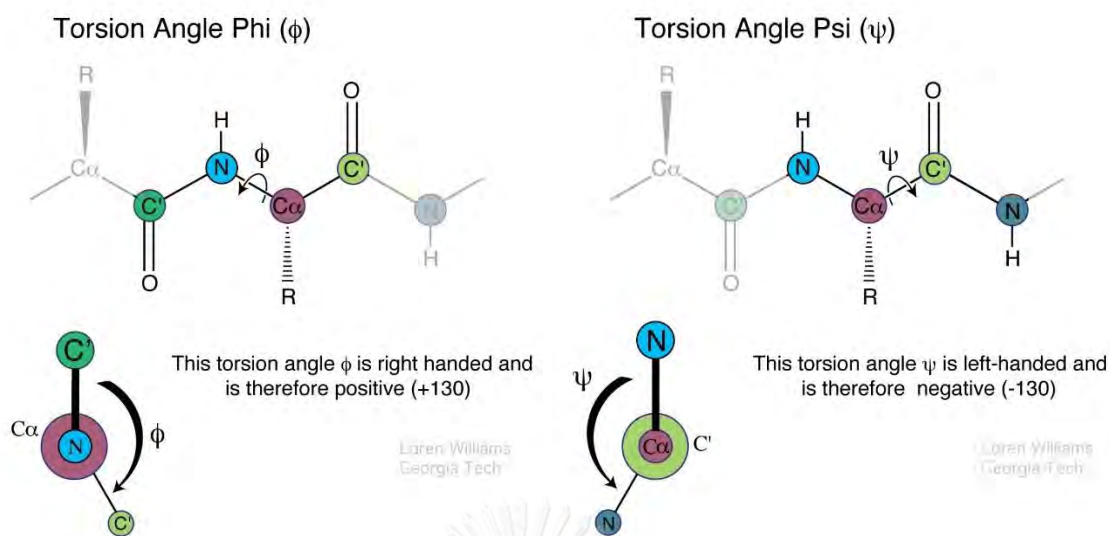
2.11 เครื่องมือประเมินคุณภาพโครงสร้างโปรตีน

2.11.1 RAMPAGE

เครื่องมือในการสร้างแผนภาพรามจันทรัน (Ramachandran plot) (35) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการแสดงมุมบิดเกลียวภายใน (Torsion angle) ของสายโครงสร้างหลัก (Backbone) ที่กระทำมุมกันระหว่างระนาบมุมสองหน้าคือมุมพาย ϕ (Phi) และมุมฟไซ ψ (Psi) ของกรดอะมิโนในโครงสร้างโปรตีน โดยเรียกมุมเหล่านี้ว่ามุมบิดเกลียวภายใน โดยค่านิยามของมุม ϕ (Phi) และมุม ψ (Psi) แสดงดัง รูปที่ 4

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 4 โครงสร้างระนาบมุมสองหน้า แสดงด้วยมุม ϕ (Phi) และมุม ψ (Psi) (36)

โดยมุม ϕ (Phi) แสดงถึงมุมการหมุนของพันธะสายโซ่โครงสร้างหลัก N-C α ระหว่างระนาบพันธะสี่จุดคือ C-C α กับ N-C และมุม ψ (Psi) แสดงถึงมุมการหมุนของพันธะสายโซ่โครงสร้างหลัก C-C α ระหว่างระนาบพันธะสี่จุดคือ N-C α กับ C-N

จากการคำนวณด้วยค่ามุมรามจันทรินทำให้สามารถแสดงถึงการกระจายของมุมบิดเกลียวภายในของโครงสร้างโปรตีนได้ โดยแสดงออกเป็นแผนภาพรามจันทรินซึ่งแสดงถึงปริมาณของกรดอะมิโนที่มีมุมพันธะในบริเวณที่เหมาะสม (Favoured และ Allowed region) และบริเวณที่ไม่เหมาะสม (Outlier region) ออกมาในหน่วยจำนวนและเปอร์เซ็นต์ของบริเวณต่าง ๆ พร้อมแจ้งรายละเอียดของบริเวณที่กำหนดด้วย (เฉพาะ Allowed และ Outlier region) โดยบริเวณที่ไม่เหมาะสมเกิดจากปัจจัยด้านผลกระทบของความเกะกะ (Steric hindrance) หรือการปะทะกันระหว่างอะตอม (Collision between atom) ทำให้สามารถนำแผนภาพรามจันทรินมาใช้ในการตัดสินใจถึงคุณภาพและความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนสามมิติได้ กล่าวคือยังมีจำนวนกรดอะมิโนในบริเวณที่เหมาะสมมากยิ่งแสดงถึงคุณภาพและความเสถียรที่ดีของโครงสร้างโปรตีน

นอกจากนี้มุมบิดเกลียวภายในยังแสดงถึงปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งด้วยคือ การม้วนพับของโครงสร้างโปรตีน แสดงถึงการใช้แผนภาพรามจันทรินในการทำนายการม้วนพับของโครงสร้างโปรตีนได้ ซึ่งหากมุมบิดเกลียวภายในคือมุม ϕ และมุม ψ มีการเคลื่อนไหวได้เหมาะสม ย่อมทำให้สายโซ่โครงสร้างหลักสามารถม้วนพับได้อย่างเหมาะสมเช่นกัน นอกจากนี้จากกล่าวได้ว่าการหมุนของสายโซ่โปรตีนอาจมาจากการหมุนของระนาบระหว่างพันธะกันก็เป็นได้

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

จากแผนภาพรามจันตรันแสดงถึงข้อมูลได้ดังนี้ ในแกนแนวตั้งแสดงถึงค่ามุม ψ และแกนแนวนอนแสดงถึงมุม ϕ โดยจุดต่าง ๆ ที่ปรากฏในแผนภาพแสดงถึงมุมของกรดอะมิโน โดยค่าองศาของมุมเริ่มตั้งแต่ -180 จนถึง $+180$ องศาทั้งสองแกน ซึ่งภายในแผนภาพจะทำการแยกให้เห็นถึงบริเวณที่เหมาะสมของมุมที่ควรปรากฏในโครงสร้างระดับทุติยภูมิในเกลียวอัลฟา (Alpha-helix) และแผ่นปัด้า (Beta-pleated sheet) ซึ่งบริเวณที่มีปริมาณจุดหนาแน่นที่สุดแสดงถึงบริเวณที่เหมาะสม แต่การคำนวณนี้ก็ยังมีข้อจำกัดคือ แผนภาพที่แสดงบริเวณที่เหมาะสมสามารถใช้ได้แค่เฉพาะกรดอะมิโนทั่วไปเท่านั้น โดยไม่นับรวมถึงกรดอะมิโนสองชนิดคือไกลซีน (Glycine) และโพรลีน (Proline) เหตุเพราะแผนภาพแสดงถึงการกระจายของมุมบิดเกลียวภายในของโครงสร้างโปรตีน แต่กรดอะมิโนไกลซีน และโพรลีน มีการกระจายของมุมบิดเกลียวภายในที่แตกต่างจากกรดอะมิโนชนิดอื่น ทำให้ต้องจัดทำแผนภาพเฉพาะของกรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้เพิ่มเติมด้วย เนื่องจากไกลซีนไม่มีโครงสร้างแขนงข้างทำให้มีการเคลื่อนไหวได้มาก เป็นเหตุให้สามารถมีมุมบิดเกลียวภายในที่มากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่นได้ จึงเป็นเหตุผลสำหรับการพบไกลซีน ในบริเวณห่วงวน (Loop regions) มากนั่นเอง สุดท้ายคือกรดอะมิโนโพรลีน ที่มีโครงสร้างแขนงข้างที่มีวงไพโรลิดีน (Pyrrolidine ring) ทำให้มีความเกะกะสูงกว่า จึงมีมุมบิดเกลียวภายในที่น้อยกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่นนั่นเอง

2.11.2 QMEAN

QMEAN เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของโครงสร้างโดยอ้างอิงจากปัจจัยด้านกายภาพและเคมีจากหลายด้านร่วมกัน (37) ในการทำนายโครงสร้างของโปรตีน มักดำเนินการโดยการทำนายแบบจำลองในปริมาณมาก แล้วสุดท้ายจึงเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดออกมาในตอนท้าย ดังนั้นฟังก์ชันการให้คะแนนสำหรับการระบุแบบจำลองที่ดีที่สุดจากแบบจำลองทั้งหมดจึงถือว่าเป็นวิธีการทำนายโครงสร้างโปรตีนที่สำคัญและถือเป็นปัจจัยหลักเลยก็ว่าได้ โดย QMEAN หรือ Qualitative Model Energy ANalysis เป็นเครื่องมือที่มีฟังก์ชันในการให้คะแนนแบบหลายส่วนประกอบกัน (Composite scoring function) ซึ่งช่วยอธิบายถึงรูปร่างทางเรขาคณิต (Geometrical aspects) ที่สำคัญของโครงสร้างโปรตีน โดยให้ข้อมูลออกมา สองส่วนคือในระดับโดยรวม (Global structure) และบริเวณเฉพาะที่ (Local residue) ซึ่งเป็นการประเมินคุณภาพบนพื้นฐานของแบบจำลองแบบเดียว

โดยเครื่องมือ QMEAN มีการแบ่งข้อมูลในระดับโดยรวมออกเป็นอีกสองแบบคือค่า QMEAN4 และ QMEAN6 โดยแบบแรกคือค่า QMEAN4 เป็นค่าการรวมกันเชิงเส้นของข้อมูลทางสถิติสี่แบบประกอบด้วยข้อมูลแรกคือค่ารูปทรงเฉพาะที่ (Local geometry) ซึ่งคำนวณจากค่าศักย์ของมุมบิดเกลียวภายใน (Torsion angle potential) ที่กรดอะมิโนมากกว่าสามหน่วยติดต่อกัน ข้อมูลอย่างที่สองคือค่าศักย์ในการละลาย เพื่อใช้ในการทำนายบริเวณที่เข้าถึงได้ยาก และข้อมูลอย่างสุดท้ายคือค่าศักย์ของอันตรกิริยาที่ขึ้นกับระยะทาง ซึ่งใช้ในการประเมินอันตรกิริยาจากระยะไกล ประกอบด้วยสองค่าคือ ค่าระดับของ **บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บริเวณที่ใช้คำนวณ โดยขึ้นอยู่กับอะตอมที่บีตาคาร์บอน ($C\beta$ atom) เท่านั้น และค่าศักย์ของอะตอมโดยรวม ซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดเพิ่มเติมของแบบจำลองได้

ข้อมูลในระดับโดยรวมแบบที่สองคือค่า QMEAN6 เป็นค่าการรวมกันเชิงเส้นของข้อมูลทางสถิติหกแบบประกอบด้วย ข้อมูลเดิมจาก QMEAN4 เพิ่มเติมอีกสองข้อมูลคือ เงื่อนไขของการทำนายจากลำดับและโครงสร้างทุติยภูมิที่คำนวณได้ร่วมกับความสามารถในการเข้าถึงได้ของสารละลายของแบบจำลอง ซึ่งข้อมูลทั้งสองนี้ช่วยในการทำนายการม้วนพับที่ถูกต้องของแบบจำลองได้

ในการศึกษาทั่วไปพบว่าค่า QMEAN4 และ QMEAN6 มักใช้ในการเปรียบเทียบและจัดอันดับแบบจำลองทางเลือกที่มีเป้าหมายเดียวกัน โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างแบบจำลองสามารถช่วยให้เกิดความเข้าใจในความแตกต่างของคุณภาพของแบบจำลองได้ ซึ่งทำให้ทราบถึงค่าพลังงานเทียมของข้อมูลเชิงสถิติทั้งสี่แบบ นอกจากนี้ QMEAN6 ยังแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของข้อตกลงระหว่างคุณสมบัติที่ทำนายกับที่วัดได้จากลำดับและแบบจำลองตามลำดับ พบว่าค่าที่ได้จากการทำนายนั้นจะแสดงออกมาในรูปของค่าคะแนนมาตรฐาน (QMEAN Z-score) ทั้งในแต่ละหัวข้อของข้อมูลรวมถึงค่า QMEAN โดยรวมเองด้วย

โดยค่าคะแนนมาตรฐานแสดงถึงค่าประมาณของระดับความเหมือน (degree of nativeness) ของคุณสมบัติของโครงสร้างที่สังเกตได้จากแบบจำลองในระดับโดยรวม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถนำค่าคะแนนมาตรฐานของแบบจำลองนี้ไปเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่ทำการทดลองจริงในขนาดเท่ากันได้ ซึ่งค่าคะแนนมาตรฐานนี้ยังมีค่าใกล้ศูนย์มากจะแสดงถึงความเสถียรของโครงสร้างแบบจำลองรวมถึงโครงสร้างที่ทำการทดลองจริงในขนาดเท่ากันได้ หากค่าคะแนนมีค่าเป็นบวกจะแสดงถึงคุณสมบัติของแบบจำลองสูงกว่าโครงสร้างที่ทำการทดลองจริง หากคะแนนมีค่าเป็นลบแสดงถึงคุณสมบัติของแบบจำลองต่ำกว่าโครงสร้างที่ทำการทดลองจริง หากมีค่าคะแนนน้อยกว่าหรือเท่ากับ -4.0 แสดงถึงแบบจำลองที่คุณภาพต่ำ (19)

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการศึกษา แบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ การออกแบบโปรตีนพันธุกลาย การคัดเลือกโปรตีนพันธุกลาย และการยืนยันโครงสร้างโปรตีนพันธุกลาย โดยจะทำการกลายพันธุ์บริเวณโดเมนอาร์ซึ่งเป็นบริเวณที่มีประจุบวกอยู่มาก และมี การเปิดสัมผัสของผิว สูง ให้มีประจุบวกมากขึ้น

ในการออกแบบโปรตีนพันธุกลายจะเลือกกรดอะมิโนประจุลบในโดเมนอาร์ที่มี การเปิดสัมผัสของผิว สูงที่สุด และหลีกเลี่ยงกรดอะมิโนที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมใกล้เคียง โดยจะนำเครื่องมือ Supercharge มาวิเคราะห์หาตำแหน่งกรดอะมิโนประจุลบ และคำนวณค่า AvNAPSA ของกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวเพื่อหากรดอะมิโนที่มี การเปิดสัมผัสของผิว สูงที่สุด และวิเคราะห์หาตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมข้างเคียง

เมื่อได้ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เหมาะสมแล้ว ต่อไปจะพิจารณาว่าจะแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่งนั้นด้วยกรดอะมิโนประจุบวก ไลซีน หรือ อาร์จินีน โดยจะทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุกลายที่ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนทั้งสองในแบบต่าง ๆ โดยใช้ทั้งวิธีจำลองโครงสร้างโปรตีนขึ้นเอง และการใช้เครื่องมือสำเร็จรูปในการทำนายความคงตัว ในการจำลองโครงสร้างจะใช้วิธีจำลองโครงสร้างจากโปรตีนต้นแบบโดยใช้เครื่องมือ MODELLER จำลองโครงสร้างของพันธุกลายแต่ละแบบขึ้นหลาย ๆ โครงสร้าง และนำไปวิเคราะห์คุณภาพของโครงสร้างที่จำลองขึ้นด้วย RAMPAGE และ QMEAN สำหรับเครื่องมือทำนายความคงตัวของพันธุกลายที่นำมาใช้ ได้แก่ SDM2 MAESTRO และ CUPSAT จากนั้นจะพิจารณาผลการวิเคราะห์จากทั้งการจำลองโครงสร้าง และเครื่องมือทำนายความคงตัว และเลือกพันธุกลายที่มีความเหมาะสมที่สุด 1 แบบ เพื่อนำไปเข้าสู่การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลในขั้นต่อไป

เมื่อเลือกตำแหน่งและกรดอะมิโนที่จะทำการกลายพันธุ์แล้ว จะนำไปจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลโดยใช้ NAMD จากนั้นนำไปวิเคราะห์ติดตามโครงสร้างทุติยภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปโดยใช้ Timeline โดยในการเตรียมไฟล์ที่จำเป็น และการกำหนดระเบียบวิธีทดลองของ NAMD จะใช้ QwikMD ในการเตรียม

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.1 ระบบปฏิบัติการ ซอฟต์แวร์และฮาร์ดแวร์ที่ใช้

Desktop usage	
Operating system	Windows 10 64-bit
System specification	<i>Acer Aspire VX5-591G</i> Processor: Intel® Core™ i7-7700HQ CPU @ 2.80GHz 2.80 GHz Installed memory (RAM): 16.0 GB (15.9 GB usable) System type: 64-bit Operating system, x64-based processor Graphics device 1: Intel® HD Graphics 630 Graphics device 2: NVIDIA GeForce GTX 1050 Ti
โปรแกรมสนับสนุน	การใช้งานจาก desktop
<i>Anaconda 3-4.2.0</i>	<i>Python</i> distribution used to install <i>MODELLER</i>
<i>Atom</i>	Text editors
<i>Chimera 1.11.2</i>	Visualization and analysis molecular structures
<i>Bitvise SSH 7.39.0.0</i>	To access <i>SSH</i> server
โปรแกรมที่ใช้ในการทดลอง	สถานที่ติดตั้งก่อนใช้งาน / URL web-base
<i>MODELLER 9.18</i>	Desktop
<i>RAMPAGE</i>	http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php
<i>QMEAN</i>	https://swissmodel.expasy.org/qmean/
<i>CUPSAT</i>	http://cupsat.tu-bs.de/
<i>SDM2</i>	http://marid.bioc.cam.ac.uk/sdm2
<i>MAESTRO</i>	https://biwww.che.sbg.ac.at/maestro/web/
<i>ProteinPrepare</i>	http://www.playmolecule.org/proteinPrepare/
<i>VMD 1.9.3 w/ plugin</i>	Desktop
<i>QwikMD</i>	

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

CU Server	
Operating system	Linux
Specification	Processor: 31 CPU cores: 8 Model name: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2620 v4 @ 2.10GHz
โปรแกรมที่ใช้ในการทดลอง	สถานที่ติดตั้งก่อนใช้งาน / URL web-base
Rosetta w/ plugin supercharge	Server
NAMD 2.12	Server

3.2 การออกแบบโปรตีนพันธุกรรม

3.2.1 การค้นหาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เหมาะสมโดยใช้เครื่องมือ Supercharge

ต่อไปเป็นการใช้เครื่องมือ Supercharge เพื่อคำนวณหาตำแหน่งของกรดอะมิโนประจุลบในโปรตีนที่มีการเปิดเผยออก โดยจะพิจารณาจากค่า AvNAPSA และค้นหาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีพันธะไฮโดรเจน

แบ่งออกเป็นสองขั้นตอนคือขั้นเตรียมข้อมูลและขั้นใช้งานเครื่องมือ Supercharge ในขั้นเตรียมข้อมูลให้เริ่มต้น (input) โดยเตรียมไฟล์โครงสร้างโปรตีนต้นแบบเป็นไฟล์นามสกุล .pdb และชุดพารามิเตอร์ของคำสั่ง Supercharge ใน Rosetta แสดงดังรูปที่ 4 แล้วทำการเก็บไฟล์ไว้ใน server

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

```

colnRosetta
1  #-database <path>
2  -s Test/1a87.pdb
3  -use_input_sc
4  -jd2:no_output
5  -ignore_unrecognized_res
6
7  -AvNAPSA_negative false
8  -AvNAPSA_positive false
9  -compare_residue_energies_all false
10 -compare_residue_energies_mut true
11 -dont_mutate_correct_charge true
12 -dont_mutate_glyprocys true
13 -dont_mutate_hbonded_sidechains true
14 -include_arg true
15 -include_asp false
16 -include_glu false
17 -include_lys true
18 -pre_packminpack false
19 -refweight_arg -0.98
20 -refweight_lys 0.65
21 -surface_atom_cutoff 100000000
22 -target_net_charge_active false
23
24 -out:path TestOutput/Rosetta
25

```

รูปที่ 4 ข้อมูลชุดคำสั่งโปรแกรม Rosetta

ในการใช้งานเครื่องมือให้เริ่มต้นโดยเข้าไปในโปรแกรม Bitvise SSH Client จากนั้นทำการ login เข้าสู่ server จากนั้นให้เข้า folder ที่ผู้ใช้เก็บข้อมูล แล้วจึงใช้คำสั่งในการเริ่มการทำงานของ Rosetta ด้วยคำสั่งดังนี้

“supercharge.default.linuxgccrelease@Test/ colnRosetta > colnRosetta.log”

หลังจากคำนวณเสร็จจะได้ผลข้อมูล (output) ออกมา สองที่ดังนี้คือ log file ที่แสดงการคำนวณ ซึ่งข้อมูลจะอยู่ใน folder ที่ผู้ใช้อยู่ในขณะสั่งทำงาน AvNAPSA และข้อมูลอีกส่วนคือ ไฟล์โครงสร้างโปรตีนพันธะกลายนามสกุล .pdb กับ resfile_output_Rsc ที่ถูกเก็บตามผู้ใช้ระบุในชุดคำสั่งของ Rosetta โดยข้อมูลที่ใช้เข้ามาประเมินจะเป็นข้อมูลในไฟล์ resfile_output_Rsc ซึ่งแสดงตำแหน่งที่เกิด Hbond แสดงดังรูปที่ 5

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

```

resfile_output_Rsc
1 NATAA
start
91 A PTKAA SRK
92 A PIKAA ARK
93 A NATAA #same charge
94 A PIKAA VRK
96 A NATRO #has sc hbond energy= -0.613179
97 A PIKAA IRK
98 A PIKAA TRK
99 A PTKAA TRK
100 A PTKAA TRK
102 A PIKAA DRK
103 A PIKAA NRK
104 A PIKAA SRK
105 A NATAA #same charge
108 A NATAA #same charge
109 A NATRO #has sc hbond energy= -0.78884
110 A PIKAA IRK
111 A NATRO #has sc hbond energy= -1.21303
112 A NATRO #has sc hbond energy= -1.2824
113 A NATRO #has sc hbond energy= -0.671835
115 A NATRO #has sc hbond energy= -0.671835
116 A PIKAA YRK
117 A NATRO #has sc hbond energy= -1.21303
118 A PIKAA LRK
119 A PIKAA LRK
120 A PIKAA ARK
121 A NATAA #same charge
122 A PIKAA LRK
123 A PIKAA IRK
124 A NATRO #has sc hbond energy= -1.37
125 A PIKAA ARK

colnRosetta.log
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 41 126
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 42 178
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 43 140
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 44 214
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 45 157
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 46 218
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 47 138
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 48 172
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 49 87
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 50 34
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 52 135
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 53 133
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 54 206
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 55 120
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 56 204
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 57 150
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 58 178
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 59 126
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 60 79
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 61 141
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 62 79
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 63 131
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 64 59
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 65 77
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 66 166
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 67 77
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 68 157
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 69 104
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 70 155
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 71 188
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 72 80
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 73 148
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 74 48
apps.public.design.supercharge: AVNAPSA score for residue 76 69

```

รูปที่ 5 ข้อมูล resfile_output_Rsc ที่แสดงตำแหน่งที่เกิด Hbond และข้อมูลแสดงค่า AvNAPSA value ที่นำมาใช้ในการแปลผลของโปรแกรม Rosetta

ตำแหน่งที่เกิด Hbond (ซ้าย) และข้อมูลแสดงค่า AvNAPSA value (ขวา)

3.3 การคัดเลือกโปรตีนพันธุกลาย

3.3.1 การจำลองโครงสร้างโปรตีนด้วยวิธี Homology modelling โดยใช้เครื่องมือ MODELLER

ต่อไปเป็นการใช้โปรแกรม MODELLER เพื่อทำนายโครงสร้างพันธุกลายสามมิติโดยใช้โครงสร้างต้นแบบและพื้นฐานความรู้ทางวิวัฒนาการร่วม และแสดงค่า ฟังก์ชันจุดประสงค์ ซึ่งสามารถใช้ในการจัดอันดับความเสถียรของโครงสร้างได้ โดยหากมีค่า ฟังก์ชันจุดประสงค์ ต่ำที่สุดจะถือว่ามีความเสถียรที่สุด เพียงแต่ค่า ฟังก์ชันจุดประสงค์ สามารถเปรียบเทียบได้แค่ในกลุ่มโครงสร้างที่มาจากลำดับกรดอะมิโนเดียวกันเท่านั้น ไม่สามารถนำค่านี้ไปเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างของโปรตีนต่างชนิดได้

แบ่งออกเป็นสองขั้นตอนคือขั้นเตรียมข้อมูลและขั้นใช้งานเครื่องมือ MODELLER

ในขั้นเตรียมข้อมูลเบื้องต้นคือไฟล์นามสกุล .py และ .seg โดยมีข้อมูลในแต่ละไฟล์แสดงดังรูปที่ 6

```

1A87-RP_D150RD154K-N.py
1 # A sample script for fully automated comparative modeling
2 from modeller import *
3 from modeller.automodel import * # Load the automodel class
4
5 log.verbose()
6 env = environ()
7
8 # directories for input atom files
9 env.io.atom_files_directory = ['.', '../atom_files']
10
11 a = automodel(env,
12             # file with template codes and target sequence
13             alnfile = '1A87-RP_D150RD154K-N.seg',
14             # PDB codes of the templates
15             knows = ('1A87'),
16             # code of the target
17             sequence = '1A87-RP_D150RD154K-N')
18 a.auto_align() # get an automatic alignment
19 a.starting_model = 1 # index of the first model
20 a.ending_model = 10 # index of the last model
21 a.make() # do comparative modeling

```

```

1A87-RP_D150RD154K-N.seg
1 C;
2
3 >P1;1A87
4 structureX:1A87:FIRST:@:LAST:@::-1.00:-1.00
5 *
6
7 >P1;1A87-RP_D150RD154K-N
8 sequence:1A87-RP_D150RD154K-N:FIRST:@:LAST:@::-1.00:-1.00
9 SAKVGEITITPDNSKPGRYISSNPEYSLAKLIDAESIKGTEVYTFHTRKGQVVKVTVPRSNIK
10

```

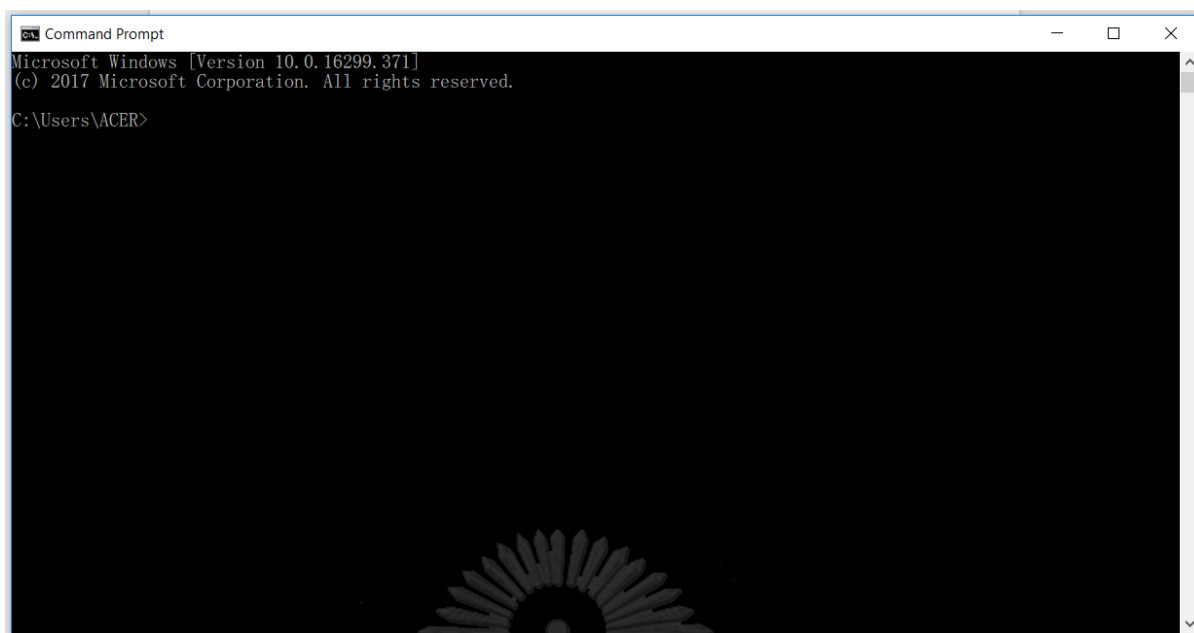
รูปที่ 6 ข้อมูลเบื้องต้นเป็นไฟล์นามสกุล .py และ .seg ของโปรแกรม MODELLER

ในขั้นใช้งานเครื่องมือให้เริ่มโดย เปิดโปรแกรม command prompt ขึ้นมา ซึ่งสามารถค้นหาโปรแกรมได้จากแถบวินโดวส์ โดยใช้คำสั่ง “command prompt” จากนั้นจะพบกับหน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม พร้อมข้อความที่แสดงถึงตำแหน่งที่อยู่ในปัจจุบัน แสดงดังรูปที่ 7

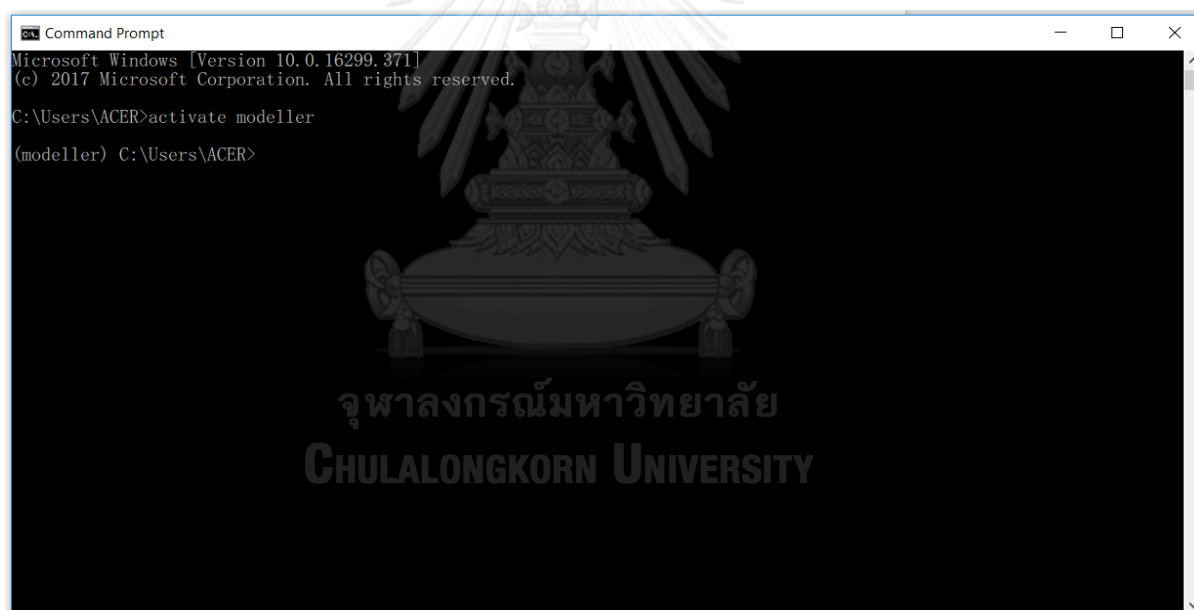
ต่อไปให้ทำการเปิดใช้งานเครื่องมือ MODELLER โดยการพิมพ์คำสั่ง “activate modeller” แล้วกดปุ่ม enter เพื่อยืนยันคำสั่ง หลังจากยืนยันคำสั่งแล้ว ที่หน้าต่างโปรแกรมจะปรากฏสัญลักษณ์“(modeller)” ขึ้นมาด้านหน้าข้อความที่อยู่ แสดงดังรูปที่ 8

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 7 หน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม command prompt

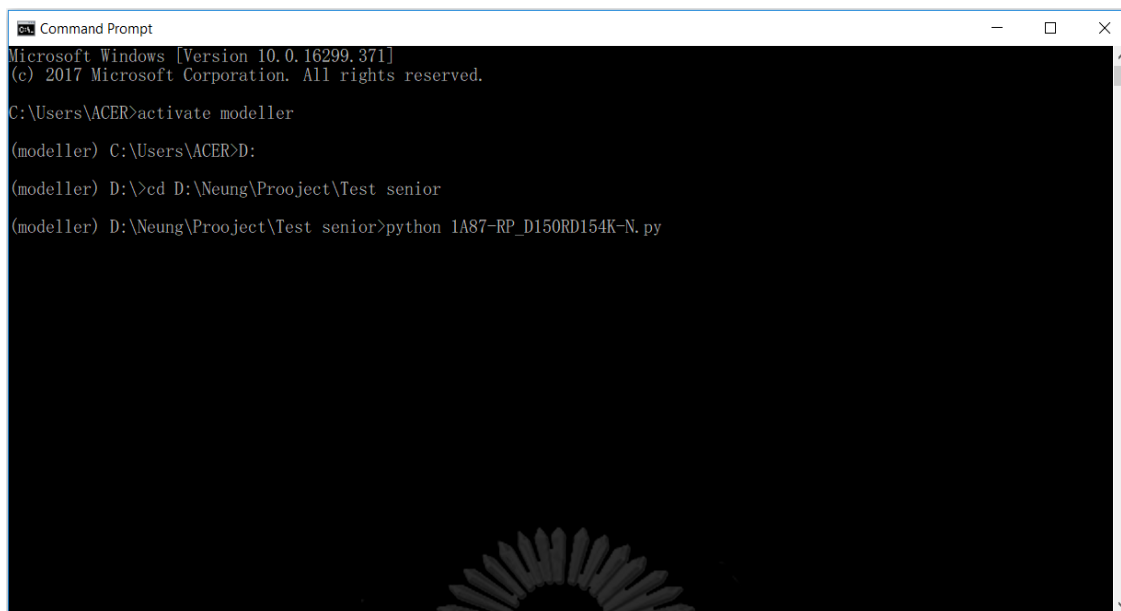


รูปที่ 8 สัญลักษณ์ของการเปิดใช้งานโปรแกรม MODELLER

จากนั้นจึงทำการย้ายตำแหน่งที่อยู่ให้ไปที่ตำแหน่งโฟลเดอร์ปฏิบัติการ แล้วจึงสั่งใช้งานเครื่องมือ โดยการพิมพ์คำสั่ง “python ชื่อไฟล์คำสั่งปฏิบัติการ.py” โดยต้องพิมพ์ให้เหมือนกับชื่อไฟล์ของจริงด้วย (ที่เป็นนามสกุลไฟล์ .py) ตัวอย่างเช่น “python 1A87-RP_D150RD154K-N.py” แล้วยืนยันคำสั่ง แสดง ดังรูปที่ 9

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



```

Command Prompt
Microsoft Windows [Version 10.0.16299.371]
(c) 2017 Microsoft Corporation. All rights reserved.

C:\Users\ACER>activate modeller
(modeller) C:\Users\ACER>D:
(modeller) D:\>cd D:\Neung\Prooject\Test senior
(modeller) D:\Neung\Prooject\Test senior>python IA87-RP_D150RD154K-N.py

```

รูปที่ 9 ไฟล์ที่จำเป็นและการสั่งงานโปรแกรม MODELLER
คำสั่งใช้งานเครื่องมือ โดยที่ชื่อไฟล์ต้องตรงกับในไฟล์เตอร์ปฏิบัติการด้วย

หลังจากนั้นเครื่องมือ MODELLER จะเริ่มทำงานและคำนวณโครงสร้างสามมิติออกมาแล้วทำการลดระดับพลังงานหรือค่า ฟังก์ชันจุดประสงค์ ลง สุดท้ายเมื่อเครื่องมือประมวลผลเสร็จก็จะให้ข้อมูลออกมาเป็นค่า ฟังก์ชันจุดประสงค์ แสดงดัง และปรากฏไฟล์โครงสร้างนามสกุล .pdb ที่ไฟล์เตอร์ปฏิบัติการ

ผู้ใช้ได้ใช้งานเครื่องมือ MODELLER ให้ทำงานทั้งหมดสี่ครั้งดังนี้คือลำดับโปรตีนพันธุ้กลายที่ตำแหน่ง D150RD154R D150RD154K D150KD154R และ D150KD154K โดยได้ข้อมูลไฟล์นามสกุล .pdb ทั้งหมดสี่สิบชุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Command Prompt output:

```

report_____ > Distribution of short non-bonded contacts:

DISTANCE1:  0.00 2.10 2.20 2.30 2.40 2.50 2.60 2.70 2.80 2.90 3.00 3.10 3.20 3.30 3.40
DISTANCE2:  2.10 2.20 2.30 2.40 2.50 2.60 2.70 2.80 2.90 3.00 3.10 3.20 3.30 3.40 3.50
FREQUENCY:   0    0    0    0    0   11   31  124  208  188  214  349  368  359  369

<< end of ENERGY.
openf_224 > Open                1A87-RP_D150RD154K-N.B99990010.pdb
wrpdb_568 > Residues, atoms, selected atoms:      297    2315    2315

>> Summary of successfully produced models:
Filename                                     molpdf
-----
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990001.pdb         1258.48914
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990002.pdb         1161.31592
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990003.pdb         1203.56372
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990004.pdb         1191.91003
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990005.pdb         1248.27112
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990006.pdb         1181.00427
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990007.pdb         1155.72339
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990008.pdb         1414.49597
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990009.pdb         1416.37634
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990010.pdb         1152.02979

(modeller) D:\Neung\Prooject\Test senior>

```

File Explorer view:

Name	Date modified	Type	Size
1a87.pdb	6/4/2560 13:21	Protein Data Bank ...	232 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990001.pdb	19/4/2561 03:11	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990002.pdb	19/4/2561 03:12	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990003.pdb	19/4/2561 03:12	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990004.pdb	19/4/2561 03:12	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990005.pdb	19/4/2561 03:12	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990006.pdb	19/4/2561 03:12	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990007.pdb	19/4/2561 03:13	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990008.pdb	19/4/2561 03:13	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990009.pdb	19/4/2561 03:13	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.B99990010.pdb	19/4/2561 03:13	Protein Data Bank ...	179 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.D00000001	19/4/2561 03:11	D00000001 File	18 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.D00000002	19/4/2561 03:12	D00000002 File	19 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.D00000003	19/4/2561 03:12	D00000003 File	19 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.D00000004	19/4/2561 03:12	D00000004 File	19 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.D00000005	19/4/2561 03:12	D00000005 File	18 KB
1A87-RP_D150RD154K-N.D00000006	19/4/2561 03:12	D00000006 File	19 KB

รูปที่ 10 ผลลัพธ์จากโปรแกรม MOLELLER

(บน) MOLELLER ประมวลผลเสร็จแล้วให้ข้อมูลออกมาในเป็นค่า ฟังก์ชันจุดประสงค์

(ล่าง) ปรากฏไฟล์โครงสร้างนามสกุล .pdb ที่ไฟล์เดอร์ปฏิบัติการ

บทความและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

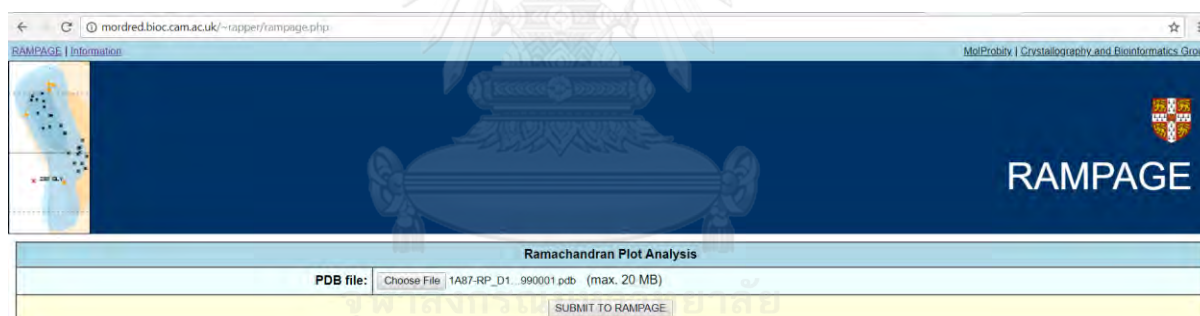
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.3.2 การประเมินคุณภาพโครงสร้าง โดยใช้เครื่องมือ RAMPAGE

ต่อไปเป็นการใช้โปรแกรม RAMPAGE เพื่อประเมินคุณภาพของโครงสร้างโดยแสดงค่า %favoured region %allowed region และ %outlier region พร้อมกับแผนภาพรามจันทร์

ในการใช้งานเครื่องมือให้เริ่มต้นโดยเข้าไปในเว็บไซต์ <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php> จากนั้นจึงเลือกไฟล์โครงสร้างพันธู์กลายเป็นนามสกุล .pdb ที่จะให้เครื่องมือ RAMPAGE ทำการประมวลผล โดยกดที่คำสั่ง “Choose file” โดยเครื่องมือสามารถประมวลผลได้ที่ละโครงสร้างเท่านั้น แสดงดังรูปที่ 11 จากนั้นกดคำสั่ง “SUBMIT TO RAMPAGE” เพื่อเริ่มการทำงานของเครื่องมือ RAMPAGE หลังจากที่ได้ประมวลผลเสร็จจะปรากฏข้อมูลต่าง ๆ ขึ้นมาเช่น ชื่อไฟล์โครงสร้างพันธู์ กลายที่ทำการคำนวณ แผนภาพรามจันทร์และผลการประเมินตำแหน่ง (Evaluation of residues) แสดงดังรูปที่ 12

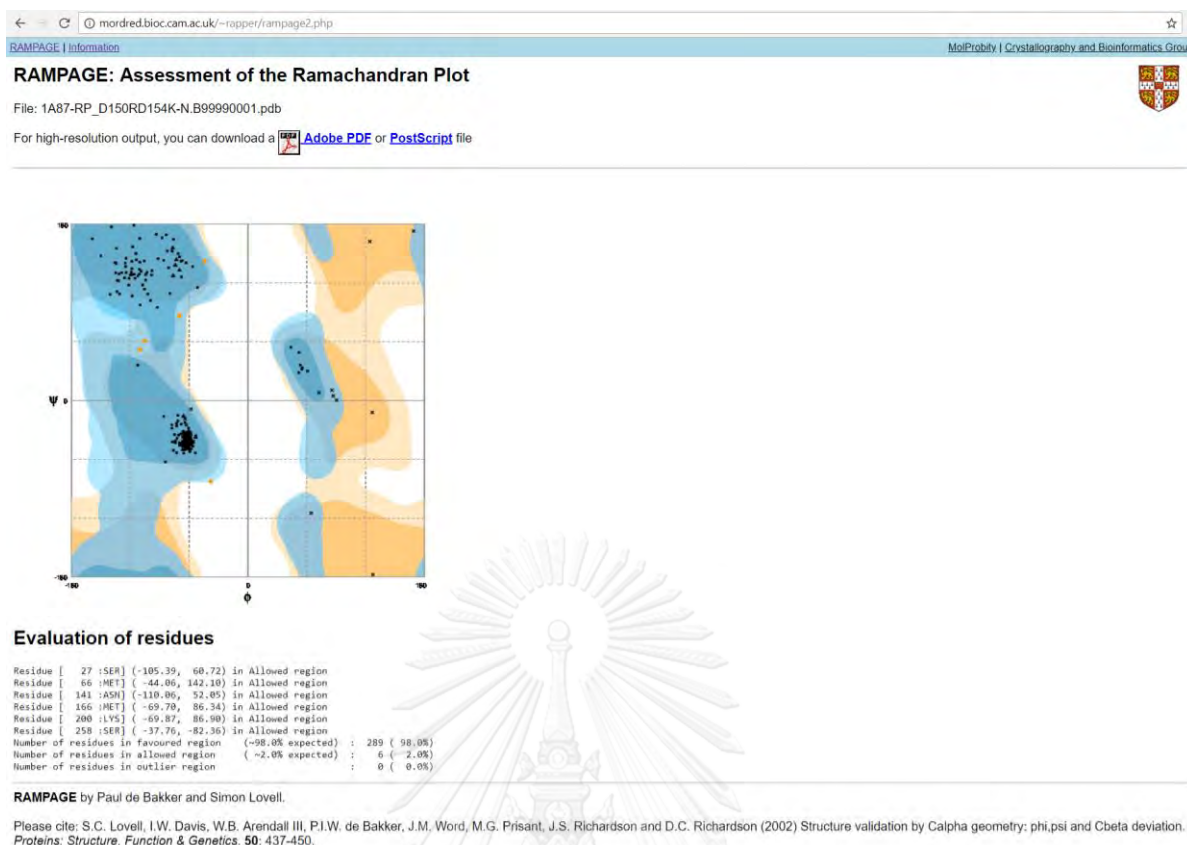
ผู้ใช้ได้ใช้งานเครื่องมือ RAMPAGE ให้ทำงานทั้งหมดสี่สิบครั้งจากไฟล์นามสกุล .pdb ที่ได้จากการใช้งานเครื่องมือ MODELLER ทั้งสี่แบบคือ D150RD154R D150RD154K D150KD154R และ D150KD154K โดยได้ข้อมูลแผนภาพรามจันทร์ ทั้งหมดสี่สิบชุด



รูปที่ 11 หน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม RAMPAGE

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 12 ผลลัพธ์จากโปรแกรม RAMPAGE

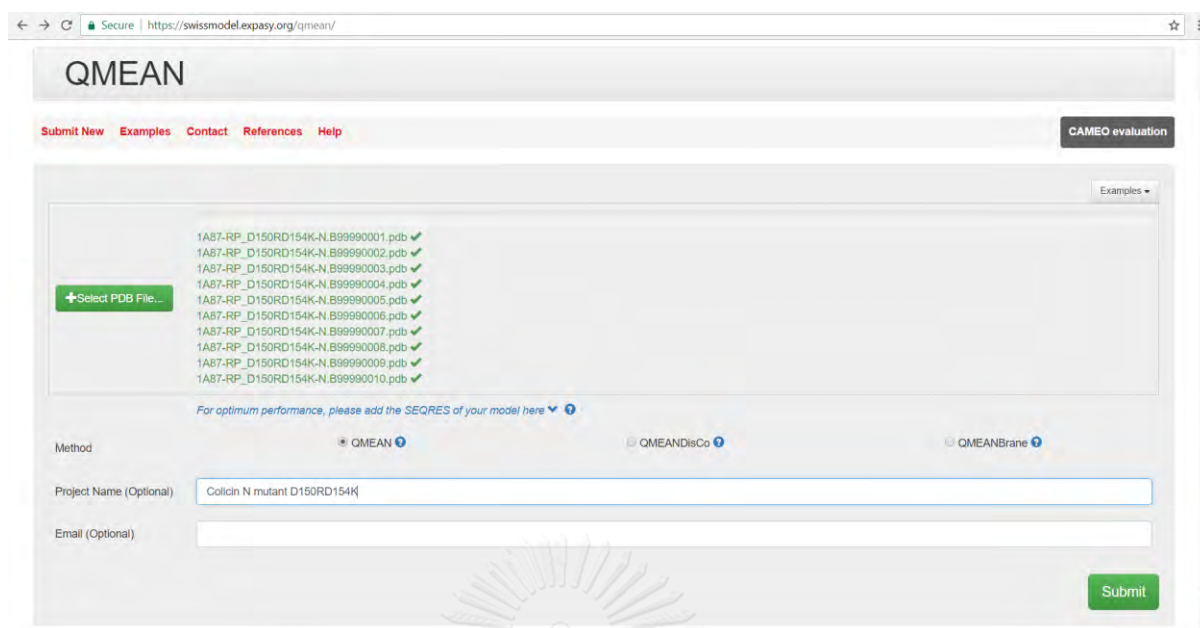
3.3.3 การประเมินคุณภาพโครงสร้าง โดยใช้เครื่องมือ QMEAN

ต่อไปเป็นการใช้โปรแกรม QMEAN เพื่อประเมินคุณภาพของโครงสร้างโดยแสดงค่า QMEAN Z-score ซึ่งเป็นค่าคะแนนโดยรวมที่ประเมินจากสมบัติทางกายภาพและเคมี (Physicochemical properties)

ในการใช้งานเครื่องมือให้เริ่มต้นโดยเข้าไปในเว็บไซต์ <https://swissmodel.expasy.org/qmean/> จากนั้นจึงเลือกไฟล์โครงสร้างพันธุกรรมนามสกุล .pdb ที่จะให้เครื่องมือ RAMPAGE ทำการประมวลผล โดยกดที่คำสั่ง “Select PDB File” โดยเครื่องมือสามารถประมวลผลโครงสร้างได้หลายโครงสร้างพร้อมกัน แล้วเลือก QMEAN method แสดงในรูปแบบที่ 13 นอกจากนี้ยังสามารถกำหนดชื่อของชุดข้อมูลที่ประมวลผลพร้อมระบุ email เพื่อให้ข้อมูลที่ประมวลเสร็จแล้วส่งเข้าไปที่ email ได้ จากนั้นกดคำสั่ง “SUBMIT” เพื่อเริ่มการทำงานของเครื่องมือ QMEAN

บทความและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



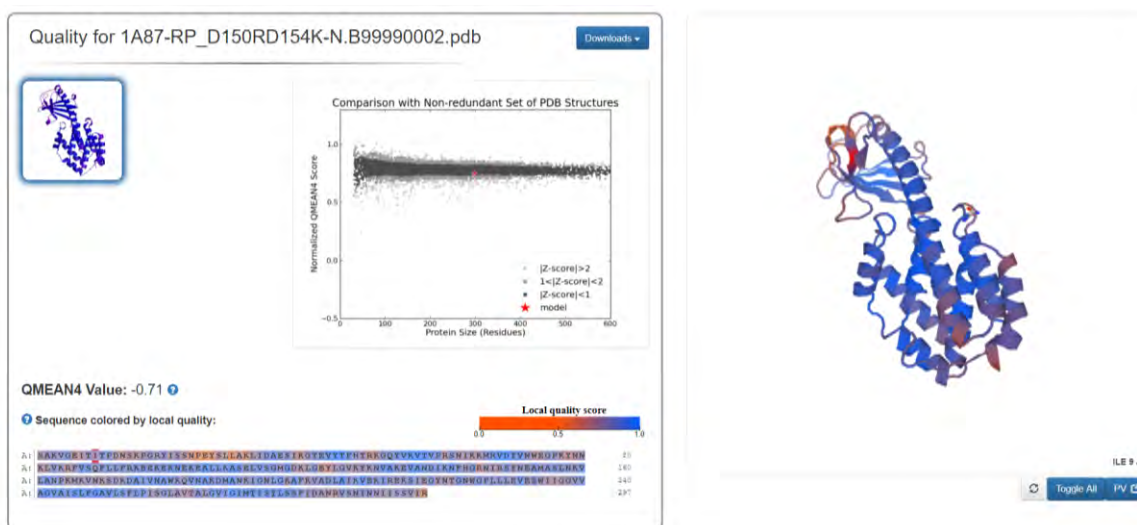
รูปที่ 13 การเลือกไฟล์โครงสร้างพันธุกลายนามสกุล .pdb ที่ต้องการคำนวณ และเลือก QMEAN method จากหน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ QMEAN

หลังจากที่ประมวลผลเสร็จจะปรากฏข้อมูลต่าง ๆ ขึ้นมาเช่น ชื่อไฟล์โครงสร้างพันธุกลายที่ทำ การคำนวณ แผนภาพเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างกับค่าคะแนน QMEAN และผลคะแนนมาตรฐานโดยรวม ของโครงสร้างพร้อมกับแสดงคุณภาพของลำดับกรดอะมิโน หากกดเลือกที่ตำแหน่งกรดอะมิโน จะสามารถ แสดงถึงรูปร่างผ่านแบบจำลองด้านขวามือได้ แสดงในรูปที่ 14 สุดท้ายสามารถบันทึกข้อมูลทั้งหมดได้โดย กดคำสั่ง “Project Archive” ที่อยู่บริเวณชื่อของชุดข้อมูลด้านบนสุด

ผู้ใช้ได้ใช้งานเครื่องมือ RAMPAGE ให้ทำงานทั้งหมดสี่สัปดาห์จากไฟล์นามสกุล .pdb ที่ได้จากการ ใช้งานเครื่องมือ MODELLER ทั้งสี่แบบคือ D150RD154R, D150RD154K, D150KD154R และ D150KD154K โดยได้ข้อมูล QMEAN Z-score ทั้งหมดสี่สัปดาห์

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

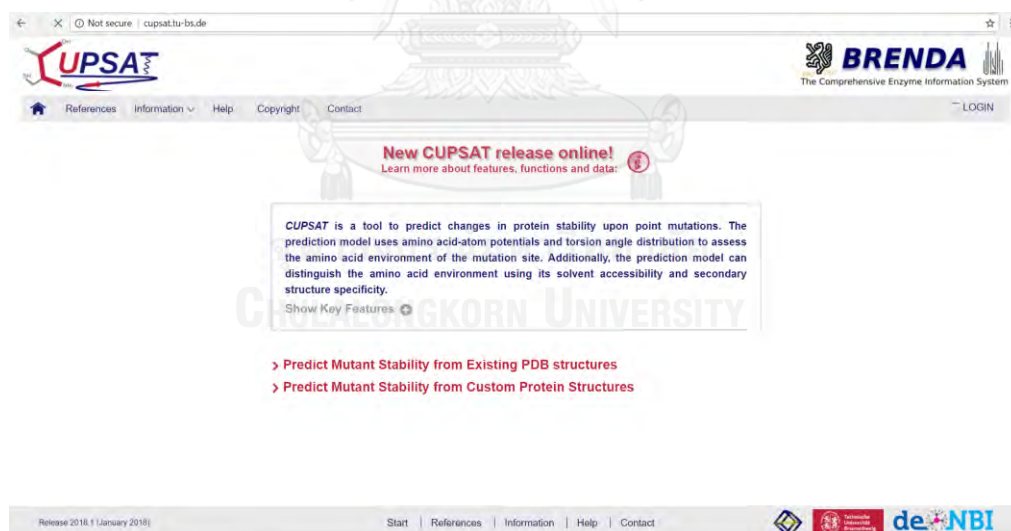
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 14 ผลลัพธ์จากโปรแกรม QMEAN

3.3.5 การทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุ์กลาย โดยใช้เครื่องมือ CUPSAT

ในการใช้งานเครื่องมือให้เริ่มต้นโดยเข้าไปในเว็บไซต์ <http://cupsat.tu-bs.de/> โดยจะแบ่งระบบการคำนวณออกเป็นสองส่วน โดยขึ้นกับโปรตีนต้นแบบคือใช้ข้อมูลโปรตีนจากฐานข้อมูลออนไลน์ (protein data bank) หรือใช้ข้อมูลจากไฟล์นามสกุล .pdb ของผู้ใช้งาน (custom structures) แสดงดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 หน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ CUPSAT

ในการทดลองนี้ผู้ใช้เลือกการคำนวณโดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลออนไลน์ จากนั้นจึงระบุชื่อโปรตีนที่ต้องการลงในช่อง “PDB ID” โดยสามารถตรวจสอบข้อมูลได้โดยกดปุ่ม “View Structure from PDB” ต่อไปจึงทำการตั้งค่าการทดลองที่สนใจคือวิธีทำให้โครงสร้างเสถียรภาพ (experimental method) และตำแหน่งในการทำนายความคงตัวหลังจากกลายพันธุ์ (stability prediction) จากนั้นเพื่อเริ่มการทำงานของเครื่องมือ CUPSAT โดยกดที่คำสั่ง “Predict Stability” แสดงดังรูปที่ 16

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รูปที่ 16 หน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ CUPSAT หลังจากระบุชื่อโปรตีนที่ต้องการคำนวณ พร้อมตั้งค่าการทดลองที่สนใจ

หลังจากที่ประมวลผลเสร็จจะปรากฏข้อมูลต่าง ๆ ขึ้นมาเช่น ชื่อไฟล์โครงสร้างโปรตีนที่ทำ การคำนวณ วิธีทำให้โครงสร้างเสถียรภาพ และผลข้อมูลสองชนิดคือการทำนายคุณสมบัติของโครงสร้าง และ การทำนายความเสถียรของโครงสร้าง แสดงดังรูปที่ 17 สุดท้ายสามารถบันทึกข้อมูลทั้งหมดได้โดยกด คำสั่ง “Download file” ที่อยู่บริเวณผลข้อมูลทั้งสองชนิดนั่นเอง

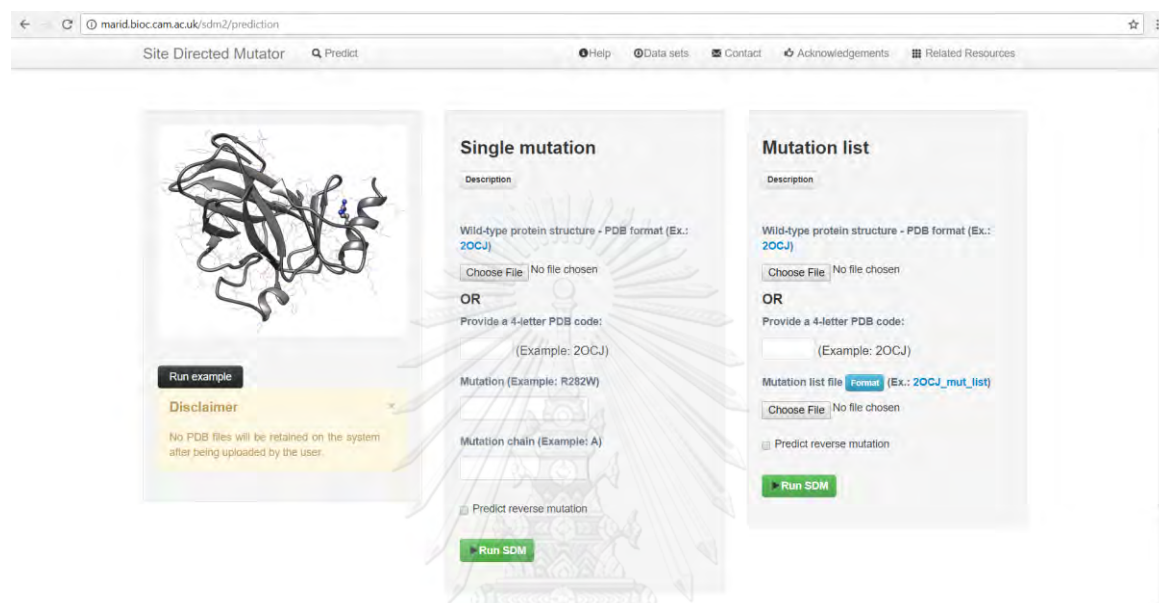
รูปที่ 17 CUPSAT ประมวลผลเสร็จและปรากฏข้อมูลต่าง ๆ ขึ้นมา

บทความและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.3.4 การทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุ์กลาย โดยใช้เครื่องมือ SDM2

ในการใช้งานเครื่องมือให้เริ่มต้นโดยเข้าไปในเว็บไซต์ <http://marid.bioc.cam.ac.uk/sdm2/prediction> จะพบหน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ SDM2 ซึ่งแบ่งระบบการกลายพันธุ์ตำแหน่งเดียวเป็นสองแบบคือแบบ กลายพันธุ์ครั้งเดียว (single mutation) และแบบกลายพันธุ์หลายครั้งจากรายการที่กำหนด (mutation list) แสดงดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 หน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ SDM2

ในการทดลองนี้ผู้ใช้เลือกระบบการกลายพันธุ์แบบหลายครั้งจากรายการที่กำหนด จากนั้นจึงระบุชื่อโปรตีนจากฐานข้อมูล ในช่อง “Provide a 4-letter PDB code:” หรือเลือกไฟล์โครงสร้างพันธุ์กลายนามสกุล .pdb ที่ต้องการคำนวณ โดยกดปุ่ม “Choose file” จากหัวข้อ “Wild-type protein structure - PDB format” ต่อไปจึงเลือกไฟล์ที่กำหนดข้อมูลโปรตีนพันธุ์กลายนามสกุล .txt โดยกดปุ่ม “Choose file” จากหัวข้อ “Mutation list file” ซึ่งทั้งคู่สามารถกดเลือกดูตัวอย่างไฟล์ที่ใช้ได้จากปุ่ม “(Ex.: 2OCJ)” และ “(Ex.: 2OCJ_mut_list)” และสุดท้ายคือปุ่มคำสั่งให้ทำการทำนายการกลายพันธุ์ย้อนกลับ (predict reverse mutation) จากนั้นกด “Run SDM” ในการศึกษานี้ผู้ใช้ได้ทำการทำนายทั้งสองแบบ คือ การทำนายความเสถียรของโครงสร้างพันธุ์กลายและการทำนายความเสถียรของโครงสร้างพันธุ์กลายย้อนกลับ ผลลัพธ์จาก SDM2 แสดงตัวอย่างในรูปที่ 19

Change In Protein Stability Upon Mutation

Predicted Stability Change ($\Delta\Delta G$):

Search:

Index	PDB File	Chain ID	Mutation	WT_SSE	WT_RSA (%)	WT_DEPTH (Å)	WT_OSP	WT_SS	WT_SN	WT_SO	MT_SSE	MT_RSA (%)	MT_DEPTH (Å)	MT_OSP	MT_SS	MT_SN	MT_SO	Predicted $\Delta\Delta G$	Outcome
1	1a87.pdb	A	D150K	I	86.8	3.3	0.2	False	False	False	g	90.7	3.3	0.14	False	False	False	0.12	Increased stability
2	1a87.pdb	A	D154K	H	81.3	3.2	0.18	False	False	False	H	90.0	3.3	0.12	False	False	False	0.5	Increased stability
3	1a87.pdb	A	D150R	I	86.8	3.3	0.2	False	False	False	g	86.5	3.3	0.12	False	False	False	1.05	Increased stability
4	1a87.pdb	A	D154R	H	81.3	3.2	0.18	False	False	False	H	89.0	3.4	0.13	False	False	False	0.64	Increased stability

Showing 1 to 4 of 4 entries

[Run another prediction](#)

[Download results](#)

Change In Protein Stability Upon Mutation

Predicted Stability Change ($\Delta\Delta G$):

Search:

Index	PDB File	Chain ID	Mutation	WT_SSE	WT_RSA (%)	WT_DEPTH (Å)	WT_OSP	WT_SS	WT_SN	WT_SO	MT_SSE	MT_RSA (%)	MT_DEPTH (Å)	MT_OSP	MT_SS	MT_SN	MT_SO	Predicted $\Delta\Delta G$	Outcome
1	1A87.pdb	A	D150K	I	86.8	3.3	0.2	False	False	False	g	90.7	3.3	0.14	False	False	False	-0.11	Reduced stability
2	1A87.pdb	A	D154K	H	81.3	3.2	0.18	False	False	False	H	90.0	3.3	0.12	False	False	False	-0.5	Reduced stability
3	1A87.pdb	A	D150R	I	86.8	3.3	0.2	False	False	False	g	86.5	3.3	0.12	False	False	False	-1.05	Reduced stability
4	1A87.pdb	A	D154R	H	81.3	3.2	0.18	False	False	False	H	89.0	3.4	0.13	False	False	False	-0.64	Reduced stability

Showing 1 to 4 of 4 entries

[Run another prediction](#)

[Download results](#)

รูปที่ 19 ผลลัพธ์จาก SDM2

การกลายพันธุ์ไปข้างหน้าและย้อนกลับ (บน และล่าง ตามลำดับ)

3.3.6 การทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุ์กลาย โดยใช้เครื่องมือ MAESTRO

ต่อไปเป็นการใช้โปรแกรม MAESTRO เพื่อทำนายความเสถียรของโครงสร้างโดยแสดงค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ รวมถึงการแสดงผลค่าความเชื่อมั่นในการทำนาย (confident estimation) เพื่อทราบถึงความถูกต้องและแม่นยำของเครื่องมืออีกด้วย

ในการใช้งานเครื่องมือให้เริ่มต้นโดยเข้าไปในเว็บไซต์ <https://biwww.che.sbg.ac.at/maestro/web/> จะพบหน้าต่างเริ่มต้นของเครื่องมือ MAESTRO โดยจะแบ่งระบบการคำนวณออกเป็นสองส่วน โดยขึ้นกับโปรตีนต้นแบบคือใช้ข้อมูลไฟล์ธนาคารข้อมูลโปรตีนจากฐานข้อมูลออนไลน์หรือใช้ข้อมูลจากไฟล์ธนาคารข้อมูลโปรตีนนามสกุล .pdb ของผู้ใช้งาน (custom structures) นอกจากนี้ในกรณีไฟล์ข้อมูลบทความและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ผู้ใช้มีข้อมูลที่สำคัญต่อการทำนายเช่นโครงสร้างจตุรภูมิที่สามารถทำนายการทำงานของโปรตีนได้ (biological assembly) สามารถเลือกให้นำไปใช้ในการทดลองได้ด้วย แสดงดังรูปที่ 20

รูปที่ 20 หน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม MAESTRO

ในการทดลองนี้ผู้ใช้เลือกการคำนวณโดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลออนไลน์ ในการทดลองนี้ผู้ใช้เลือกการคำนวณโดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลออนไลน์ จากนั้นจึงระบุชื่อโปรตีนที่ต้องการลงในช่อง “PDB ID” จากนั้นจึงกดปุ่ม “submit” ต่อไปจึงทำการเลือกสายโซ่ที่ต้องการทำนาย ในกรณีที่โครงสร้างมีหลายส่วนให้เลือกสายโซ่จากหัวข้อ “Asymmetric unit” หรือในกรณีต้องการทำนายจากโครงสร้างจตุรภูมิจึงเลือกหัวข้อ “biological assembly” แล้วกดปุ่ม “submit” แสดงดังรูปที่ 21

จากนั้นจึงเลือกรูปแบบการทำงาน แบ่งออกดังนี้คือการประเมินการกลายพันธุ์จำเพาะ (evaluate specific mutations) การคำนวณเสถียรภาพของกรดอะมิโนพันธุกลายสลับเก้าแบบ (calculate a mutation sensitivity profile) การค้นหากรดอะมิโนพันธุกลายที่คงตัว / ไม่คงตัว (Scan for (de)stabilizing mutations) และการประเมินพันธะไดซัลไฟด์ (Evaluate potential disulfide bonds) แสดงดังรูปที่ 22 โดยผู้ใช้เลือกวิธี “Evaluate specific mutations” จากนั้นกดปุ่ม “submit”

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

MAESTROweb

Create Project ? Help Contact About

Current Project: f87e784bb5dc9b52218a3c7bea2e4b18

1 Specify structure 2 Select task 3 Specify task 4 Results

PDB-ID
1A87

Asymmetric unit/NMR chains
A

Biological assembly
1

If you want to receive an e-mail when your job has finished, please insert your e-mail address below (optional):

รูปที่ 21 การตั้งค่าระบบโครงสร้างที่ต้องการในโปรแกรม MAESTRO

MAESTROweb

Create Project ? Help Contact About

Current Project: f87e784bb5dc9b52218a3c7bea2e4b18

1 Specify structure 2 Select task 3 Specify task 4 Results

Select a task

- Evaluate specific mutations
- Calculate a mutation sensitivity profile
- Scan for (de)stabilizing mutations
- Evaluate potential disulfide bonds

รูปที่ 22 การเลือกรูปแบบการทำงานที่ต้องการในโปรแกรม MAESTRO

ต่อไปจึงทำการเลือกตำแหน่งที่ต้องการทำการกลายพันธุ์ โดยทำการเลือกตำแหน่งและเลือกกรดอะมิโนที่ต้องการจากช่อง “Mutate” แล้วกดปุ่ม “add to list” เพื่อยืนยันการเลือกตำแหน่งนั้น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถปรับค่า pH ในระบบได้จากช่อง “pH value” และเลือกการกลายพันธุ์ได้สองแบบคือการกลายพันธุ์เพียงตำแหน่งเดียว (independent mutation) หรือการกลายพันธุ์หลายตำแหน่งพร้อมกัน (combined mutation) โดยผู้ใช้เลือกวิธี “combined mutation” ในตำแหน่งที่ D150 และ D154 เพื่อกลายพันธุ์เป็น R ทั้งสองตำแหน่ง แสดงดังรูปที่ 23

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รูปที่ 23 การกำหนดการกลายพันธุ์ที่ต้องการทำนายในโปรแกรม MAESTRO

จากนั้นกดปุ่ม “submit” เพื่อเริ่มการทำงานของเครื่องมือ MAESTRO หลังจากที่ได้ประมวลผลเสร็จ จะปรากฏข้อมูลต่าง ๆ ขึ้นมาเช่น ชื่อไฟล์โครงสร้างโปรตีนที่ทำการคำนวณ ผล $\Delta\Delta G_{pred}$ และผล C_{pred} แสดงดังรูปที่ 24

ผู้ใช้ได้ใช้งานเครื่องมือ MAESTRO ให้ทำงานทั้งหมดสี่ครั้งคือการทำนายความคงตัวของโครงสร้าง พันธูกลายดังนี้ D150RD154R D150RD154K D150KD154R และ D150KD154K โดยได้ข้อมูลไฟล์นามสกุล .csv ทั้งหมดสี่ชุด

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

MAESTROweb


Create Project ? Help Contact About

Current Project: f87e784bb5dc9b52218a3c7bea2e4b18

1 Specify structure 2 Select task 3 Specify task 4 Results

Specific mutations evaluation (1A87, chain A, pH=7)

1 substitution	$\Delta\Delta G_{pred.}$	$C_{pred.}$
D150.A(R),D154.A(R)	-0.269	0.867



Save CSV Save JPG JSmol

$\Delta\Delta G_{pred.}$... total predicted change in stability (kcal/mol). $\Delta\Delta G_{pred.} < 0.0$ indicates a stabilizing mutation. $C_{pred.}$... confidence estimation, given as value between 0.0 (not reliable) and 1.0 (highly reliable). For more information see [here](#).

This results are stored for seven days and can be accessed using the following link:
<https://biwww.che.sbg.ac.at/maestro/Web/result/f87e784bb5dc9b52218a3c7bea2e4b18>

รูปที่ 24 ผลลัพธ์จากโปรแกรม MAESTRO

3.4 การยืนยันโครงสร้างโปรตีนพันธุกรรมด้วยการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยใช้เครื่องมือ NAMD

ต่อไปจะเป็นการใช้โปรแกรม NAMD เพื่อทำการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล เพื่อยืนยันความเสถียรของโครงสร้างและการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทุติยภูมิโดยการคำนวณทางฟิสิกส์และจำลองระบบสภาพแวดล้อมที่โปรตีนพันธุกรรมอยู่ในน้ำ

แบ่งออกเป็นสามขั้นตอนคือขั้นเตรียมข้อมูลโดยใช้โปรแกรม ProteinPrepare และ VMD ต่อมาเป็นขั้นสั่งใช้งานโปรแกรม NAMD และขั้นตอนสุดท้ายการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม VMD อีกครั้ง

บทความและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

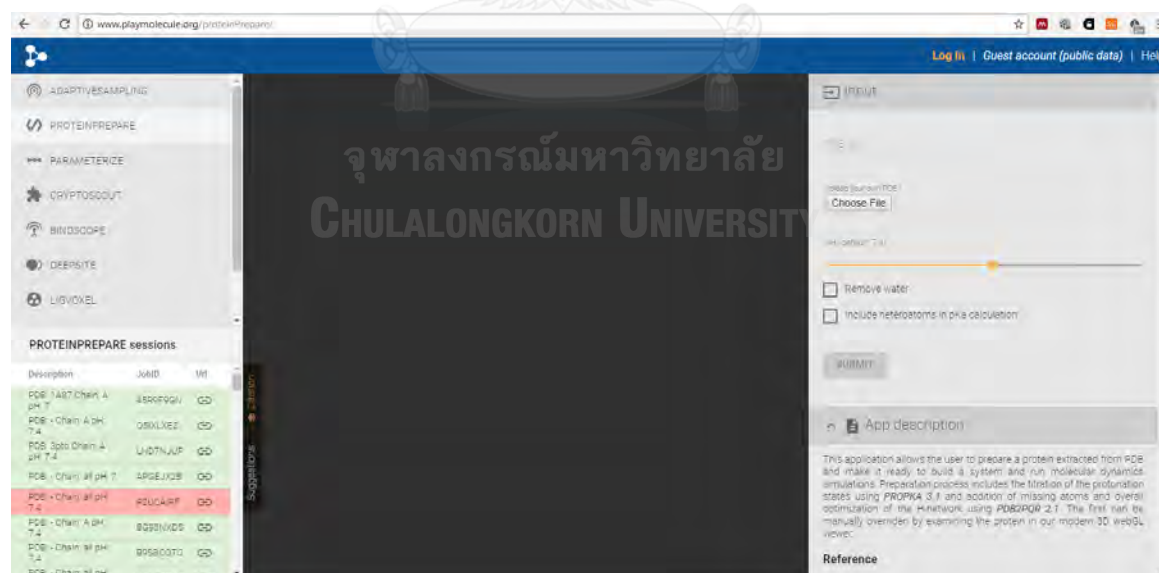
3.4.1 การเตรียมไฟล์ที่จำเป็นสำหรับการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

ไฟล์ที่จำเป็นต่อการสั่งทำงานโปรแกรม NAMD ได้แก่ ไฟล์โครงสร้างโปรตีน (protein structure file, psf) ซึ่งเป็นไฟล์โครงสร้างที่มีการระบุตำแหน่ง ชนิด และการเชื่อมต่อของแต่ละอะตอมอยู่ครบ รวมถึงอะตอมไฮโดรเจน ส่วนที่สองคือ ไฟล์ตัวแปรสนามพลัง (force field parameter file) และส่วนที่สามคือไฟล์กำหนดค่า (configuration file) ซึ่งเป็นตัวกำหนดการทำงานของโปรแกรมตามคำสั่งที่ระบุไว้ในไฟล์นี้

จะใช้ส่วนเสริม QwikMD ของโปรแกรม VMD (38) เพื่อเตรียมไฟล์ที่จำเป็นทั้งหมด โดยจะต้องป้อนโครงสร้างโปรตีนในรูปแบบของไฟล์ธนาคารข้อมูลโปรตีน (protein data bank file, pdb) เป็นตัวตั้งต้น โดยจะต้องทำการกำหนดสภาพการโปรโตเนชันของแต่ละ residue ใน pdb file เสียก่อน ในขั้นนี้จะใช้โปรแกรม ProteinPrepare ซึ่งเป็นเว็บแอปพลิเคชัน ที่ทำนายสภาพโปรโตเนชันโดยอาศัย PROPKA 3.1 และ PDB2PQR 2.1 (39) จากนั้นจึงนำ pdb file ที่ระบุสภาพโปรโตเนชันเรียบร้อยแล้ว ป้อนเข้าไปใน QwikMD เพื่อทำการเตรียมไฟล์ที่จำเป็นต่อไป

การกำหนดสภาพโปรโตเนชันของโปรตีน โดยใช้เครื่องมือ ProteinPrepare

เข้าไปที่ <http://www.playmolecule.org/proteinPrepare/> จะพบหน้าเริ่มต้นของโปรแกรม ProteinPrepare ซึ่งมีส่วนป้อนเข้า (input) ปรากฏอยู่ แสดงในรูปที่ 25

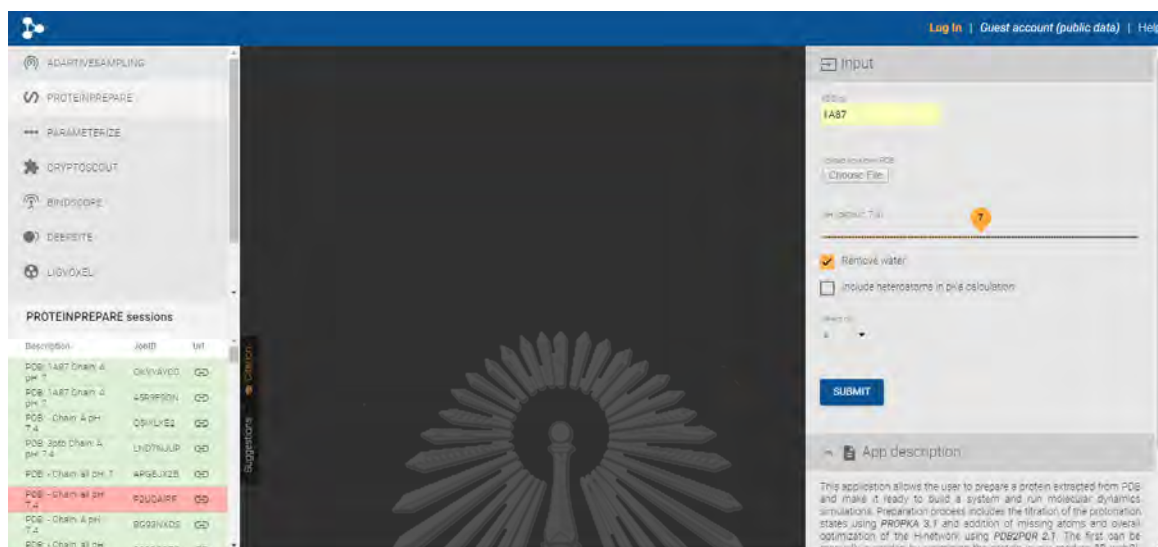


รูปที่ 25 หน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม ProteinPrepare

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ในการกำหนดค่าคำสั่ง แสดงดัง โดยกรอก “1A87” ในช่อง pdb และปรับ pH เป็น 7 คลิก เลือก “Remove water” เพื่อลบโมเลกุลน้ำผลึกออกจากไฟล์นามสกุล .pdb และเลือก “Chain A” จากนั้น กด “SUBMIT” แสดงดังรูปที่ 26

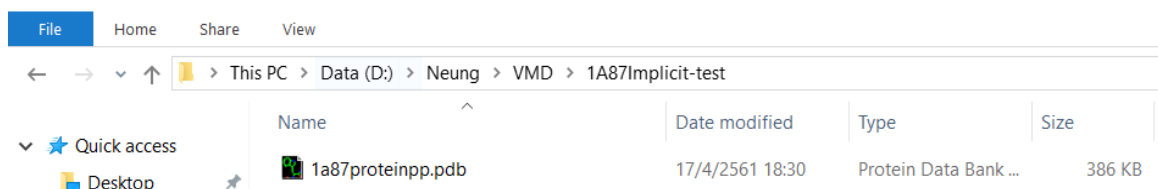


รูปที่ 26 การปรับเลือกค่าที่ใช้ด้วยโปรแกรม ProteinPrepare

เมื่อเสร็จสมบูรณ์จะปรากฏโครงสร้างแบบบริบบอนขึ้น ให้กดปุ่ม “DOWNLOAD CURRENT PDB” เพื่อดาวน์โหลดไฟล์ pdb ที่มีการกำหนดสภาพโปรตีนขึ้นที่ pH 7 แล้ว

การเตรียมไฟล์โครงสร้าง ตัวแปรสนามพลัง และไฟล์กำหนดค่า โดยใช้เครื่องมือ QwikMD

จะใช้ QwikMD ซึ่งเป็นส่วนเสริมของ VMD ในการเตรียม โดยขั้นแรกให้เตรียมไฟล์ pdb จากขั้นตอนก่อนหน้า โดยในการทดลองนี้ผู้ใช้ทำการเก็บไฟล์ไว้ใน folder ชื่อ 1A87Implicit-test โดยที่ผลข้อมูลที่สร้างจาก VMD ในภายหลังจะถูกเก็บใน folder นี้เช่นกัน แสดงดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 การเตรียมไฟล์เดอริบรจไฟล์ pdb ที่ใช้ในโปรแกรม VMD

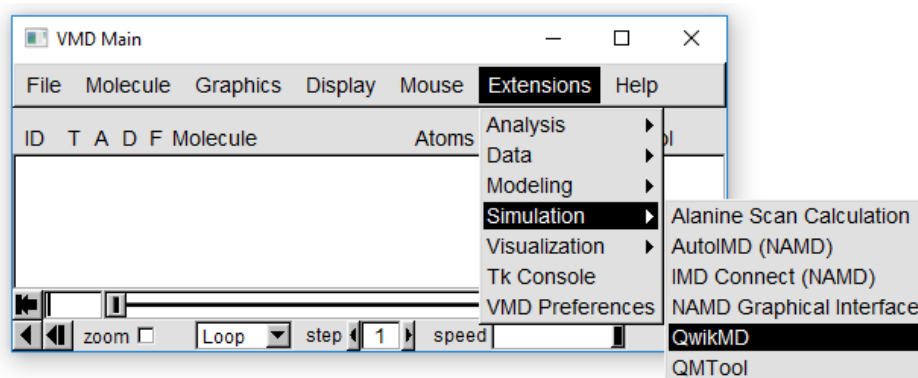
จากนั้นเปิดโปรแกรม VMD จะปรากฏหน้าต่าง “VMD main” เข้าสู่ QwikMD โดยเลือกจากแถบเมนูกดเข้าตามลำดับดังนี้ “Extensions > Simulation > QwikMD” แสดงดังรูปที่ 28 จากนั้นจะปรากฏหน้าต่างชื่อ “QwikMD - Easy and Fast Molecular Dynamics” แสดงดัง รูปที่ 29

บทความและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

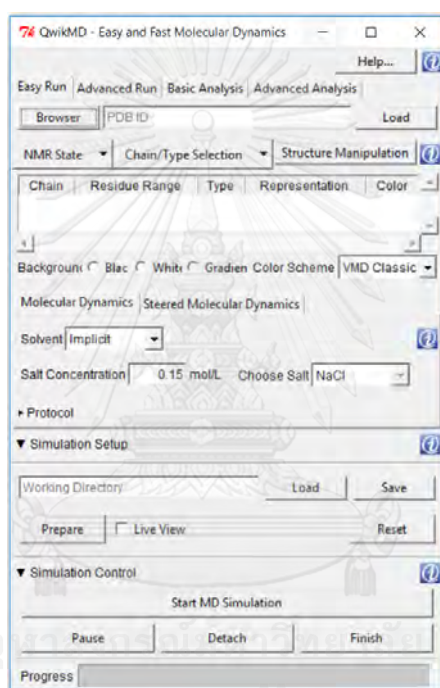
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 28 หน้าต่าง VMD Main และการเข้าสู่โปรแกรม QwikMD

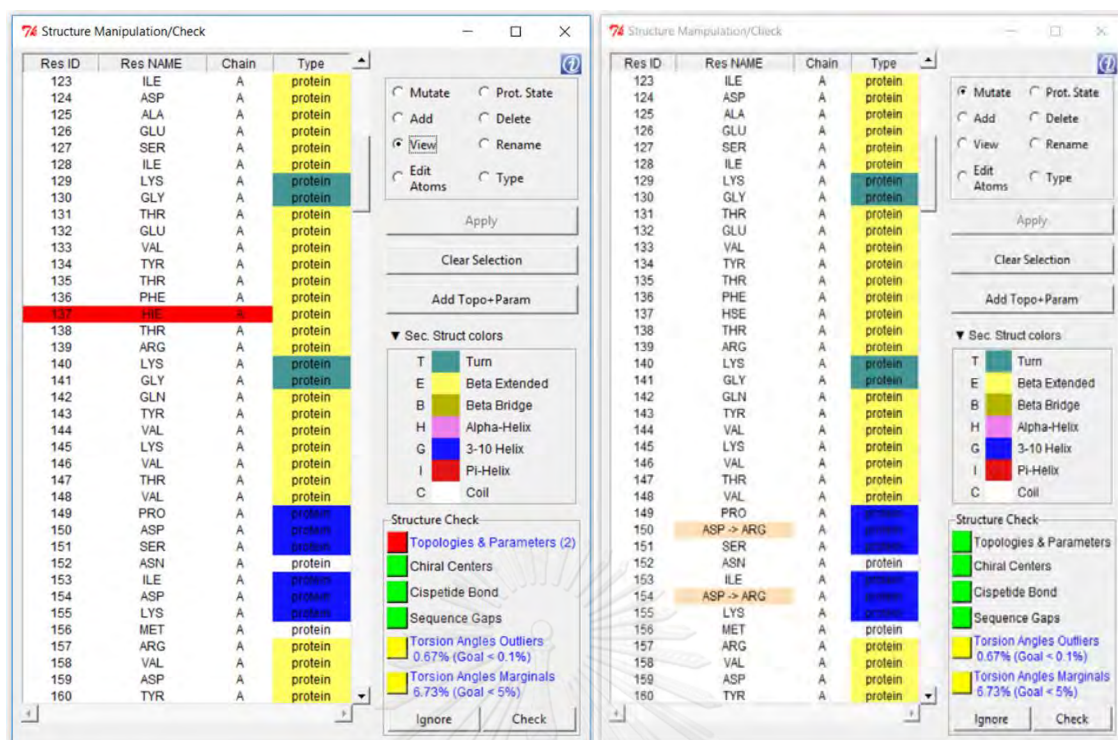


รูปที่ 29 หน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม QwikMD

จากนั้นเลือกหัวข้อ “Easy Run” แล้วเลือกโครงสร้างนามสกุล .pdb โดยกดที่ปุ่ม “Browser” จากนั้นกดปุ่ม “Load” เพื่อเรียกข้อมูลลงมาในโปรแกรม จากนั้นทำการเอาโมเลกุลน้ำออกจากโครงสร้าง โดยกดที่ปุ่ม “Chain/Type Selection > แล้วเลือก A and Water ออก” จากนั้นทำการเลือกตำแหน่งที่ต้องการจะทำการละลายพันธะโดยกดที่ปุ่ม “Structure Manipulation” จะปรากฏหน้าต่างชื่อ “Structure Manipulation/Check” แสดงดังรูปที่ 30 (ซ้าย)

บทความและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 30 หน้าต่าง Structural Manipulation/Check ของโปรแกรม QwikMD

จากนั้นทำการแก้ไขโครงสร้างตามที่ต้องการโดยการกดปุ่ม “Mutate” แล้วจึงเลือกตำแหน่งที่ต้องการเพื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน จากนั้นจึงทำการกดปุ่ม “Check” โดยผู้ใช้ได้ทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 150 และ 154 จาก ASP เป็น ARG เมื่อสำเร็จจะดังรูปที่ 30 (ขวา) จากนั้นให้ปิดหน้าต่างนี้ทิ้งไป

สำหรับ protocol ที่ใช้ในที่นี้จะใช้ค่าเริ่มต้น คือ ทำการจำลองระบบที่ 27 องศาเซลเซียสหรือ 300 เคลวิน โดยมีกรอบเวลา 10 นาโนวินาที แสดงดังรูปที่ 31

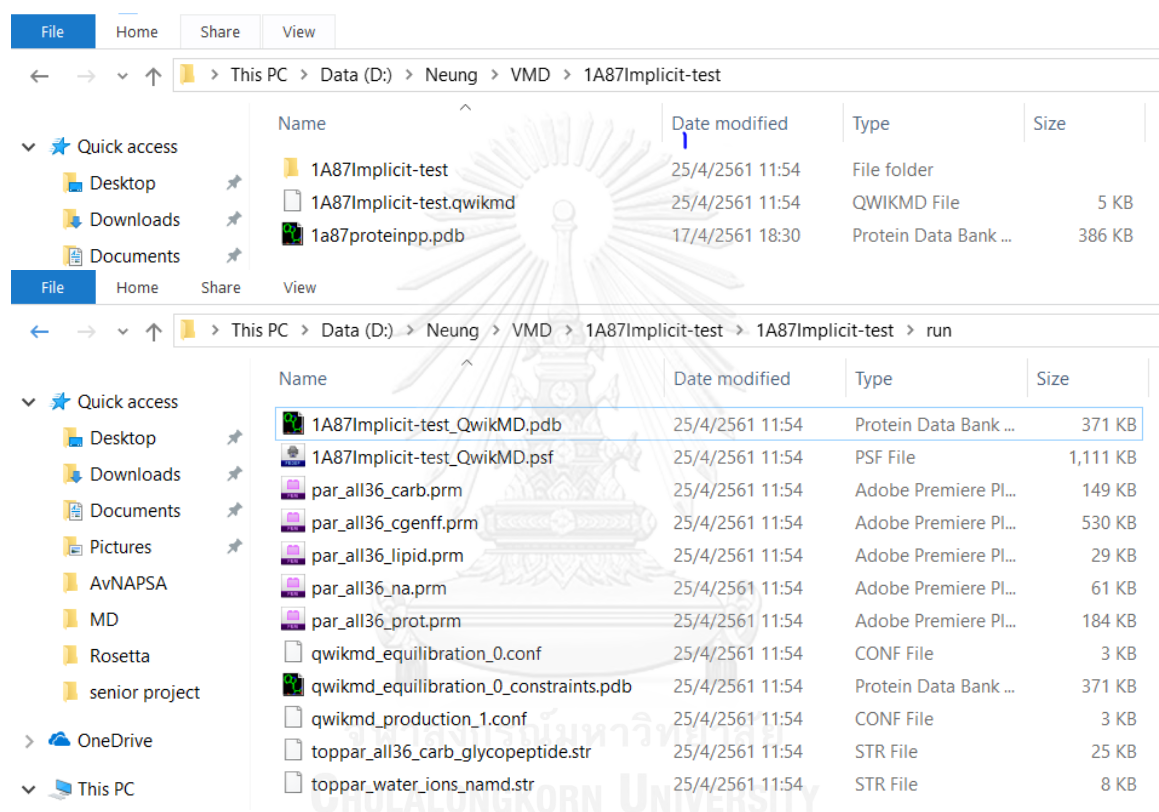


รูปที่ 31 โปรโตคอลตั้งต้นของ Easy Run ในโปรแกรม QwikMD

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

จากนั้นทำการเลือกประเภทของสารละลายโดยรอบจากปุ่ม “Solvent” ซึ่งแบ่งเป็นสามแบบคือ implicit, explicit และ vacuum โดยผู้ใช้ได้เลือกแบบ “implicit” จากนั้นทำการตั้งค่าการจำลอง (Simulation Setup) ที่จะนำไปใช้ในการจำลองแบบ พลวัตเชิงโมเลกุล โดยกดที่ปุ่ม “Prepare” เพื่อเลือกสถานที่เก็บระบบจำลองขึ้น เมื่อยืนยันแล้วจะพบไฟล์ข้อมูลระบบอีกสองอันใน folder คือไฟล์นามสกุล .qwikmd และ folder ระบบที่พร้อมนำไปใช้ในเครื่องมือ NAMD ได้ต่อไป โดยข้อมูลระบบที่จะนำไปใช้ต่อคือ folder ชื่อ “run” โดยให้ย้าย folder นี้เข้าไปใน server ที่มีเครื่องมือ NAMD เพื่อการทำงานในขั้นถัดไป แสดงดังรูปที่ 32



รูปที่ 32 โพลเดอร์ไฟล์ที่ถูกเตรียมขึ้นจากโปรแกรม QwikMD

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.3.2 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยใช้เครื่องมือ NAMD

ในขั้นตอนนี้จะทำบนเซิร์ฟเวอร์ซึ่งปฏิบัติการด้วยระบบลินุกซ์ กรณีนี้จะเข้าถึงเซิร์ฟเวอร์โดยใช้โปรแกรม Bitvise SSH Client โดยให้ย้ายโฟลเดอร์ run ที่เตรียมขึ้นจาก QwikMD ไปยังเซิร์ฟเวอร์

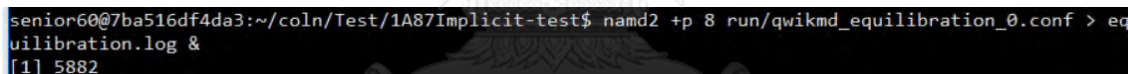
เริ่มการทำงานของ NAMD ด้วยคำสั่ง

```
“namd2 +p 8 ชื่อไฟล์.conf > ชื่อไฟล์.log &”
```

โดย p แสดงถึงจำนวนการใช้ตัวประมวลผลรวม ไฟล์กำหนดค่าที่เตรียมขึ้น หรือกรณีที่อยู่ในไดเรกทอรีที่สูงกว่า ให้พิมพ์ชื่อโฟลเดอร์แล้วตามด้วยเครื่องหมาย “ / ” สุดท้ายตามด้วยชื่อไฟล์ของชุดคำสั่งของ NAMD นามสกุล .conf เป็นอันเสร็จสิ้นคำสั่ง โดยหลังจากนี้อาจใช้คำสั่ง “ > ” ต่อท้ายคำสั่งแล้วตามด้วยตั้งชื่อ log ไฟล์ที่จะจัดเก็บข้อมูล และตัว “ & ” โดยคำสั่งนี้มีเพื่อให้คำสั่งทำงานในโหมดเบื้องหลัง

โดยจะต้องทำดำเนินการจำลองที่ละขั้นตอน กรณีนี้คือทำการ minimization และ equilibration ก่อน โดยสั่งผ่าน qwikmd_equilibration_0.conf ซึ่งรวมทั้งสองขั้นตอนข้างต้นไว้ด้วยกัน เมื่อเสร็จแล้วจึงทำ production run โดยสั่งผ่าน qwikmd_production_0.conf

ในการทดลองนี้ผู้ใช้ได้ใช้คำสั่งดังนี้ “namd2 +p 8 run/qwikmd_equilibration_0.conf > equilibration.log &” จากนั้นจะปรากฏ process id แสดงดังรูปที่ 33



```
senior60@7ba516df4da3:~/coln/Test/1A87Implicit-test$ namd2 +p 8 run/qwikmd_equilibration_0.conf > equilibration.log &
[1] 5882
```

รูปที่ 33 การสั่งงานเริ่มต้นโปรแกรม NAMD

หลังจากโปรแกรมดำเนินการเสร็จสิ้นจะได้ผลข้อมูล (output) ออกมาสองที่ได้แก่ log file ที่แสดงการคำนวณ ซึ่งข้อมูลจะอยู่ใน folder ที่ผู้ใช้ขณะสั่งทำงาน NAMD และข้อมูลอีกส่วนคือ ไฟล์โครงสร้างโปรตีนพันธะกลายนามสกุล .psf กับ ไฟล์นามสกุลต่าง ๆ เช่น .dcd .coor และ .xst เป็นต้น แสดงดังรูปที่ 34 โดยข้อมูลที่ผู้ใช้นำมาประเมินจะเป็นข้อมูลแสดงโครงสร้างทุติยภูมิซึ่งได้จากไฟล์นามสกุล .psf และ .dcd ของไฟล์ขั้นตอน production

ผู้ใช้ได้ใช้งานเครื่องมือ NAMD ให้ทำงานครั้งเดียวคือใช้โปรตีนตำแหน่ง D150RD154R ในการคำนวณ โดยได้ชุดข้อมูลออกมาเป็นไฟล์นามสกุลต่าง ๆ ตามขั้นตอนที่ใช้คือขั้น equilibration และขั้น production ใน folder run รวมหนึ่งชุด

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Remote files

/home/senior60/impliciteasy_2

Name	Size	Type	Date Modified	Permissions
1a87Bom_QwikMD.pdb	379,117	Protein Data...	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
1a87Bom_QwikMD.psf	1,136,776	PSF File	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
par_all36_carb.pm	151,831	Adobe Prem...	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
par_all36_cgenff.pm	542,643	Adobe Prem...	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
par_all36_lipid.pm	29,404	Adobe Prem...	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
par_all36_na.pm	62,276	Adobe Prem...	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
par_all36_prot.pm	188,120	Adobe Prem...	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.check	5	CHECK File	18/4/2561 07:19	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.conf	2,052	CONF File	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.coor	379,105	COORD File	18/4/2561 07:19	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.dcd	3,526,836	DCD File	18/4/2561 07:17	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.log	1,448,426	Text Docum...	18/4/2561 07:19	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.restart.coor	113,716	COORD File	18/4/2561 07:17	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.restart.coor...	113,716	OLD File	18/4/2561 07:09	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.restart.vel	113,716	VEL File	18/4/2561 07:17	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.restart.vel.old	113,716	OLD File	18/4/2561 07:09	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.restart.xsc	89	XSC File	18/4/2561 07:17	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.restart.xsc....	89	OLD File	18/4/2561 07:09	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.vel	379,104	VEL File	18/4/2561 07:19	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.xsc	88	XSC File	18/4/2561 07:19	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0.xst	1,017	XST File	18/4/2561 07:17	-rw-rw-r-
qwikmd_equilibration_0_constraints...	379,117	Protein Data...	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.check	5	CHECK File	21/4/2561 22:22	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.conf	1,922	CONF File	17/4/2561 19:41	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.coor	379,106	COORD File	21/4/2561 22:22	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.dcd	28,440,276	DCD File	21/4/2561 22:22	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.log	8,095,117	Text Docum...	21/4/2561 22:22	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.restart.coor	113,716	COORD File	21/4/2561 22:22	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.restart.coor....	113,716	OLD File	21/4/2561 22:11	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.restart.vel	113,716	VEL File	21/4/2561 22:22	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.restart.vel.old	113,716	OLD File	21/4/2561 22:11	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.restart.xsc	90	XSC File	21/4/2561 22:22	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.restart.xsc.old	90	OLD File	21/4/2561 22:11	-rw-rw-r-
qwikmd_production_1.vel	379,105	VEL File	21/4/2561 22:22	-rw-rw-r-
qwikmd production 1.xsc	89	XSC File	21/4/2561 22:22	-rw-rw-r-

รูปที่ 34 ผลลัพธ์จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลด้วยโปรแกรม NAMD

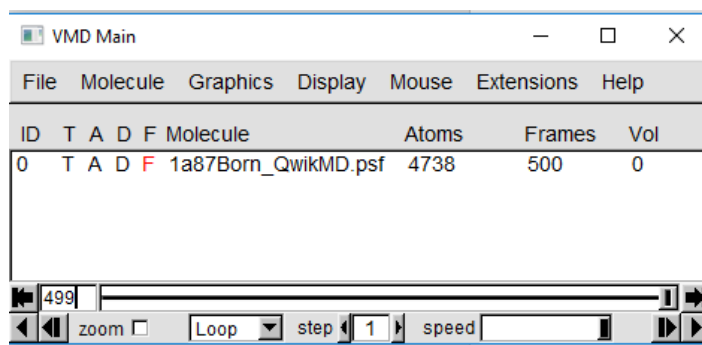
3.3.3 การวิเคราะห์ผลจากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยใช้เครื่องมือ VMD

ในขั้นนี้จะกลับไปใช้โปรแกรม VMD โดยใช้ส่วนเสริม Timeline เพื่อวิเคราะห์ติดตามโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนตลอดช่วงระยะเวลาที่ทำการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลว่ามีการเปลี่ยนแปลงไป เมื่อเทียบกับ wild type หรือไม่

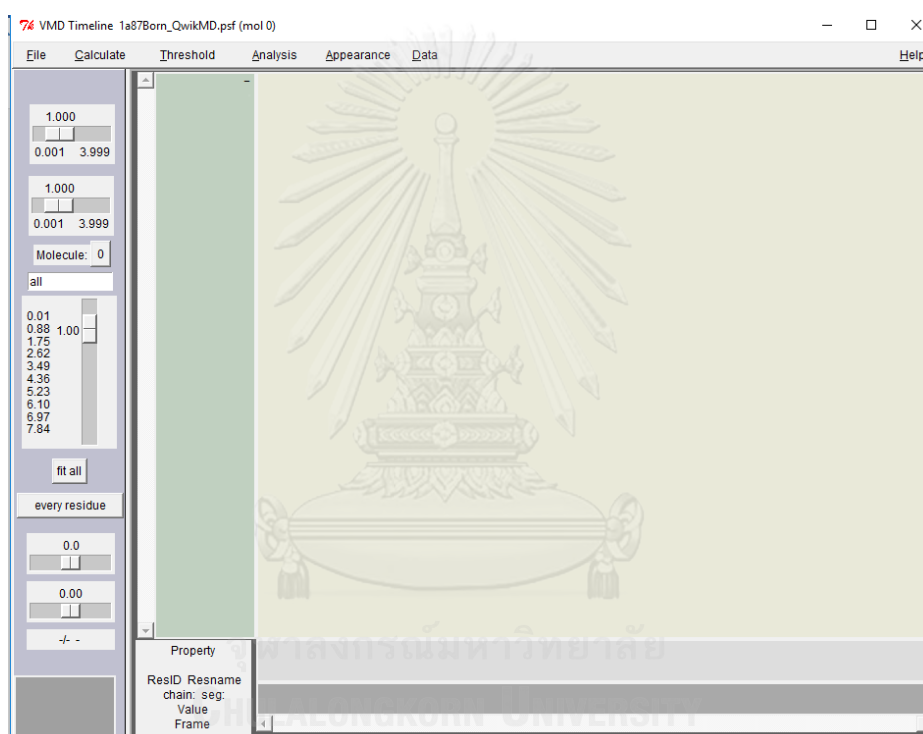
โดยขั้นแรกให้โหลดไฟล์นามสกุล .psf จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเข้าสู่โปรแกรม VMD โดยเลือกเมนู File > New Molecule จากนั้นกด Load จากนั้นให้โหลดไฟล์นามสกุล .dcd ในขั้น production สู้ไฟล์นามสกุล .psf ที่ได้เปิดไว้ก่อนหน้า หน้าจอจะปรากฏดังรูปที่ 35 จากนั้นเข้าสู่ตัวเสริม Timeline โดยเลือกเมนู Extensions > Analysis > Timeline จะปรากฏหน้าจอเริ่มต้นแสดงดังรูปที่ 36

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 35 หน้าจอ VMD main หลังจากโหลดไฟล์ผลลัพธ์จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลในโปรแกรม VMD

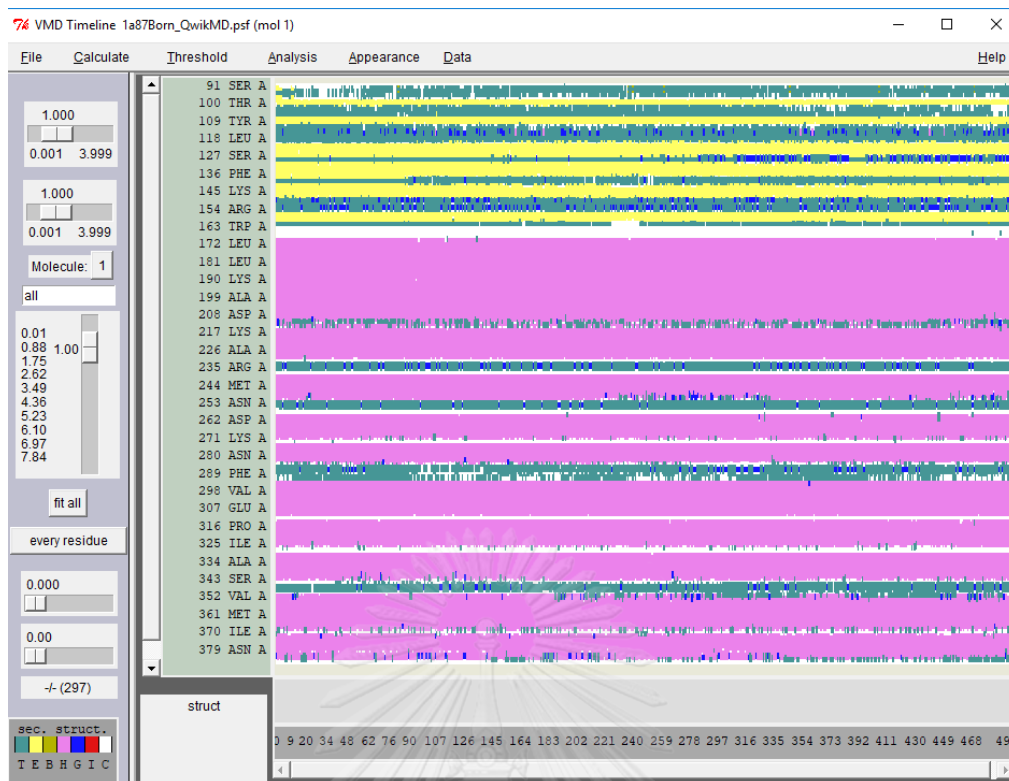


รูปที่ 36 หน้าจอเริ่มต้นของ Timeline ในโปรแกรม VMD

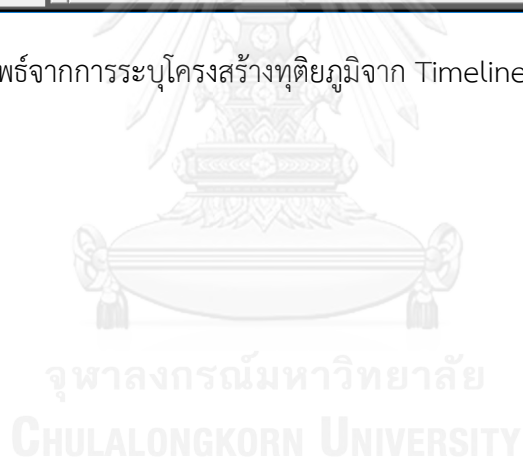
จากนั้นเลือกเมนู Calculate > Cal. Sec. Struct. เพื่อระบุโครงสร้างทุติยภูมิตลอดทั้งช่วงกรอบเวลา โดยใช้ DSSP ในการระบุโครงสร้างดังกล่าว จะปรากฏผลลัพธ์แสดงดังรูปที่ 37 จากนั้นทำอีกครั้งโดยโหลดโมเลกุลไฟล์นามสกุล .pdb ของ wild type เข้าสู่โปรแกรม จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกัน

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 37 ผลลัพธ์จากการระบุโครงสร้างทุติยภูมิจาก Timeline ในโปรแกรม VMD



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การออกแบบโปรตีนพันธุวิศวกรรม

4.1.1 ผลการวิเคราะห์ การเปิดสัมผัสของผิว ด้วย Supercharge

จากการคำนวณค่า AvNAPSA value ด้วยเครื่องมือ Rosetta supercharge พบว่ากรดอะมิโน (D, E) ในช่วงโดเมนอาร์ และพี มีค่า AvNAPSA value อยู่ระหว่าง 59 ถึง 119 แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่า AvNAPSA value ของกรดอะมิโนประจุลบ
ในช่วงโดเมนอาร์และพีของโคลิซินเอ็นจากโปรแกรม Rosetta

Amino acid	Residue	AvNAPSA value
E	96	92
D	102	110
E	115	69
E	126	114
D	150	79
D	154	59
D	159	104
E	186	99
E	189	92
E	194	114
E	201	85
D	208	101
E	212	76

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

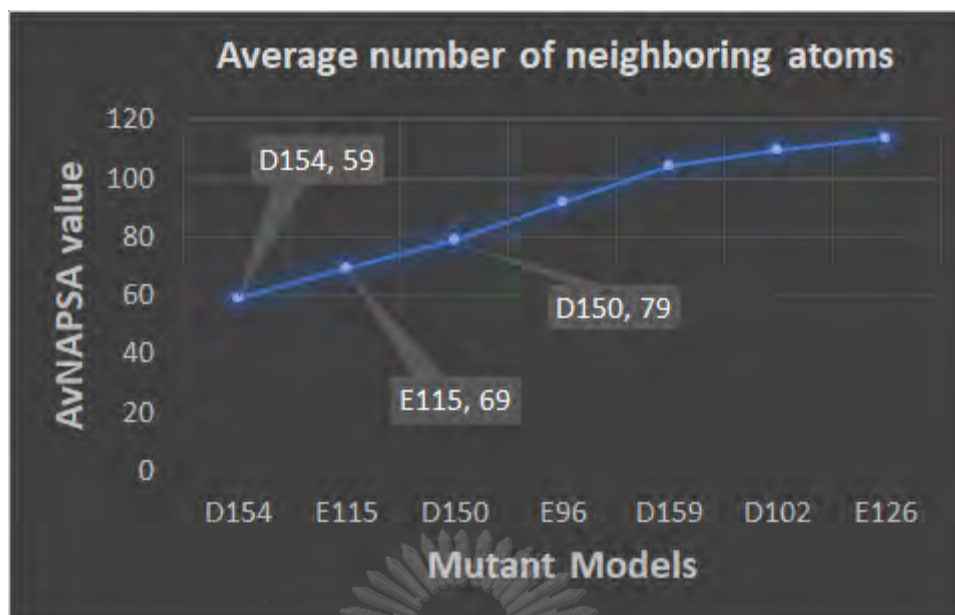
ตารางที่ 4 (ต่อ)

Amino acid	Residue	AvNAPSA value
E	224	99
E	242	96
D	264	91
D	277	74
D	293	75
E	299	103
E	303	99
E	307	115

โดยค่า AvNAPSA value จะแสดงถึงความหนาแน่นของกรดอะมิโนรอบข้าง ยังมีค่าต่ำหมายถึงมีกรดอะมิโนโดยรอบน้อย ทำให้แสดงถึงการที่ตำแหน่งที่สนใจอยู่ที่โครงสร้างส่วนนอกและมีอันตรกิริยาต่อโมเลกุลภายนอกได้ง่าย นอกจากนี้ตำแหน่งที่สนใจกลายเป็นประจุลบ (D และ E) เนื่องจากการเพิ่มประจุบวกที่รวดเร็วและให้ค่าสูงสุดจะเกิดจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนประจุลบให้กลายเป็นกรดอะมิโนประจุบวก ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการค้นหาตำแหน่งกรดอะมิโนประจุเป็นลบที่มีค่า AvNAPSA ต่ำเพื่อให้ได้มาซึ่งกรดอะมิโนที่มีการตอบสนองต่อภายนอกได้สูงและเพิ่มประจุบวกได้มากนั่นเอง จึงทำให้ตำแหน่งที่เหมาะสมในลำดับกรดอะมิโนช่วง โดเมนอาร์ ที่มีค่าต่ำที่สุดคือ E115K, D150K และ D154K โดยมีค่า AvNAPSA เท่ากับ 69, 79 และ 59 แสดงดังรูปที่ 38

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 38 ค่า AvNAPSA เรียงจากต่ำไปสูงของลำดับกรดอะมิโนประจุลบ
ในช่วงโดเมนอาร์จากโปรแกรม Rosetta

4.1.2 ผลการวิเคราะห์การเกิดพันธะไฮโดรเจน ด้วย Supercharge

จากการคำนวณเพื่อหาตำแหน่งที่เกิดพันธะไฮโดรเจนด้วยเครื่องมือ Supercharge ในบริเวณโดเมนอาร์ พบว่าตำแหน่งที่มีการเกิดพันธะมีดังนี้คือ 96, 111, 112, 113, 115, 117, 124, 138, 142, 152, 162 และ 163

4.1.3 สรุปผลการออกแบบโปรตีนพันธะคู่กลาย

เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนมีความสำคัญในการเกิดความคงตัวของโครงสร้าง จึงต้องหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงในบริเวณที่มีพันธะเกิดขึ้นเพื่อป้องกันการแตกหักของโครงสร้าง พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่ง 115 สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ จึงมีความไม่เหมาะสมแก่การกลายพันธุ์ในตำแหน่งนี้ ทำให้เหลือเพียงสองตำแหน่งที่ผู้วิจัยเลือกทำการกลายพันธุ์คือตำแหน่ง 150 และ 154

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

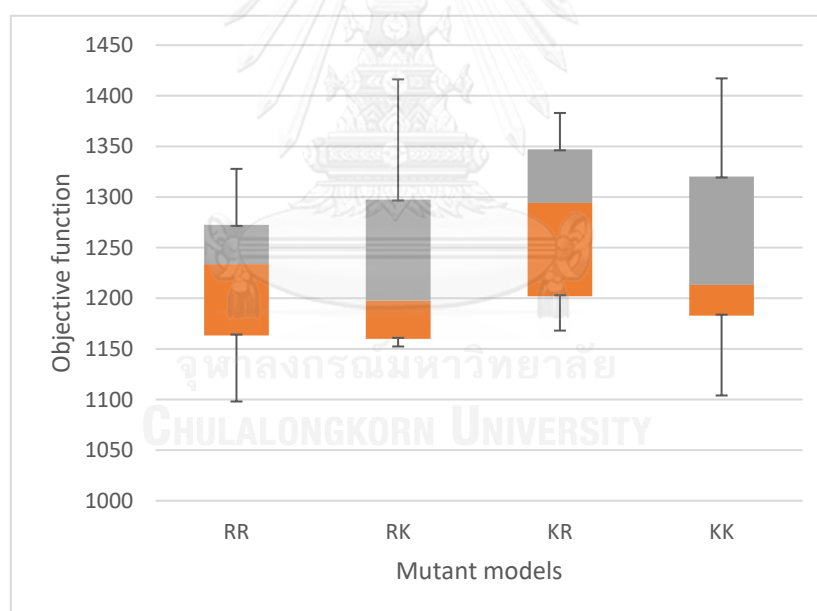
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.2 ผลการคัดเลือกโปรตีนพันธุกลาย

4.2.1 ผลการทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุกลายโดยการจำลองโครงสร้าง

ผลการจำลองโครงสร้างด้วย MODELLER

จากการคำนวณค่า ฟังก์ชันจุดประสงค์ ด้วยเครื่องมือ MODELLER ที่บริเวณ โดเมนอาร์ ของโคลิซินเอ็น โดยกลายพันธุ์ในตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 150 และ 154 โดยทำการกลายพันธุ์ให้เป็นกรดอะมิโนจำพวกมีประจุเป็นบวก [Arg (R), Lys (K) และ His (H)] จากกรดอะมิโนดั้งเดิมคือ Asp (D) เปลี่ยนเป็น Arg (R) หรือ Lys (K) ตามลำดับดังนี้ ลำดับที่ 150 และ 154 เปลี่ยนเป็นอาร์จีนีนทั้งคู่ (แสดงด้วย D150RD154R), ลำดับที่ 150 และ 154 เปลี่ยนเป็น ไลซีน ทั้งคู่ (แสดงด้วย D150KD154K), ลำดับที่ 150 เปลี่ยนเป็น อาร์จีนีน และ 154 เปลี่ยนเป็น ไลซีน (แสดงด้วย D150RD154K) และสุดท้ายลำดับที่ 150 เปลี่ยนเป็น ไลซีน และ 154 เปลี่ยนเป็น อาร์จีนีน (แสดงด้วย D150KD154R) โดยคำนวณทั้งหมดแบบละลิสตัวอย่าง รวมได้สี่ลิสตัวอย่าง พบว่ามีค่า ฟังก์ชันจุดประสงค์ อยู่ในช่วงประมาณ 1,000 ถึง 1,400 แสดงดังรูปที่ 39



รูปที่ 39 แผนภาพกล่องแสดง ฟังก์ชันจุดประสงค์ ของโปรตีนพันธุกลายแต่ละโมเดล

พบว่าค่า ฟังก์ชันจุดประสงค์ ของโคลิซินเอ็นพันธุกลายทั้งสี่แบบ ได้แก่ D150RD154R, D150RD154K, D150KD154R และ D150KD154K นั้นมีค่ามัธยฐานใกล้เคียงกันมาก โดยมีค่าเท่ากับ 1233.69 1197.73 1294.09 และ 1213.27 ตามลำดับ และจากการจำลองโครงสร้างพันธุกลายที่มีลำดับกรดอะมิโนเดียวกันออกมาอย่างละลิสแบบทำให้เห็นว่าความแตกต่างกันภายในกลุ่มมีผลน้อยมาก จึงกล่าวได้ว่าโปรตีนพันธุกลายทั้งสี่ลิสแบบในเบื้องต้นนั้นมีโครงสร้างที่คงตัวใกล้เคียงกันนั่นเอง

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

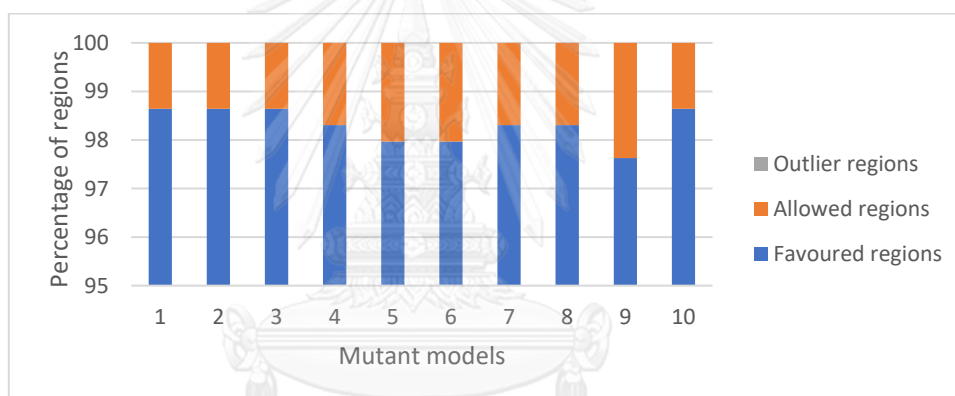
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ผลการประเมินโครงสร้างจำลองด้วย RAMPAGE

จากการคำนวณแผนภาพรามจันทรัน ด้วยเครื่องมือ RAMPAGE โดยใช้โคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย ทั้งสี่แบบในการคำนวณคือ D150RD154R, D150KD154K, D150RD154K และ D150KD154R เป็นไฟล์โปรตีนนามสกุล .pdb ที่คำนวณจากเครื่องมือ Modeller รวมทั้งหมดสี่สิบตัวอย่าง ซึ่งแผนภาพรามจันทรันจะแสดงถึงค่า Favoured region, Allowed region และ Outlier region ออกมาเป็นจำนวนกรดอะมิโนและเปอร์เซ็นต์ โดยมี %favoured region ในช่วง 97.3 ถึง 98.6 มี %allowed region ในช่วง 1.4 ถึง 2.4 และมี %outlier region ในช่วง 0 ถึง 0.3 แสดงดังรูปที่ 40 ถึง รูปที่ 43

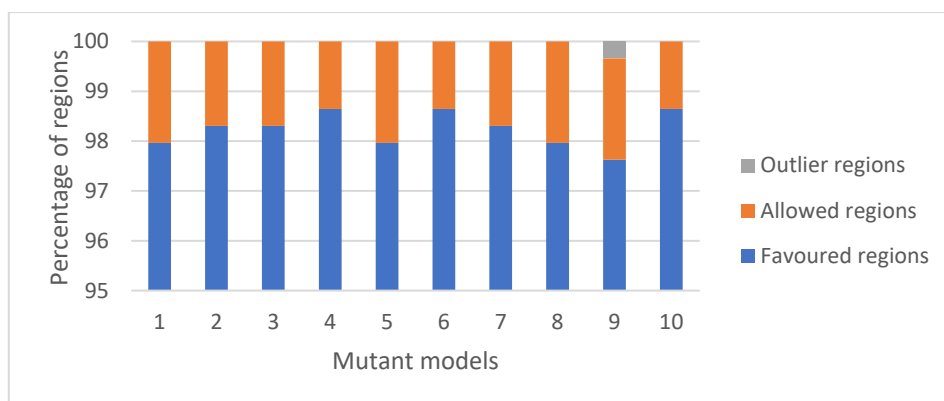
พบว่าโปรตีนพันธุ้กลายทั้งสี่แบบ มีค่า Favoured region มากกว่า 97.0% และในโปรตีนพันธุ้กลายแบบ D150RD154R ไม่พบถึง Outlier region เลย, แบบ D150RD154K และ D150KD154R พบ Outlier region เพียง 1 residue และสุดท้ายแบบ D150KD154K พบ Outlier region เพียง 3 residues แสดงถึงความเหมาะสมของการจัดเรียงโครงสร้าง



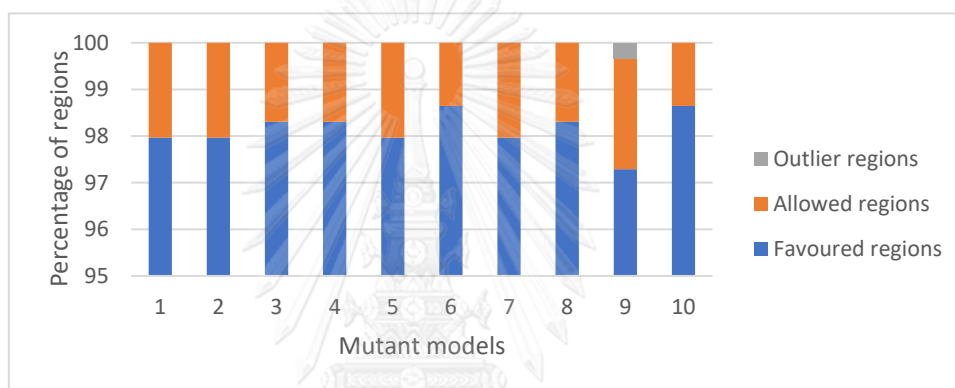
รูปที่ 40 แผนภูมิคอลัมน์ซ้อนแสดงร้อยละของกรดอะมิโนที่ตกอยู่ในบริเวณ Favoured region, Allowed region และ Outlier region ของโคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย D150R,D154R ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

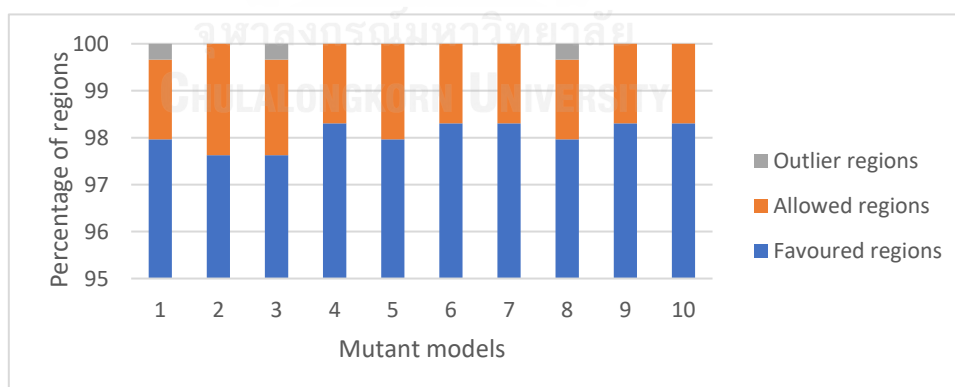
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 41 แผนภูมิคอลัมน์ซ้อนแสดงร้อยละของกรดอะมิโนที่ตกอยู่ในบริเวณ Favoured region, Allowed region และ Outlier region ของโคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย D150R,D154K ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง



รูปที่ 42 แผนภูมิคอลัมน์ซ้อนแสดงร้อยละของกรดอะมิโนที่ตกอยู่ในบริเวณ Favoured region, Allowed region และ Outlier region ของโคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย D150K,D154R ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง



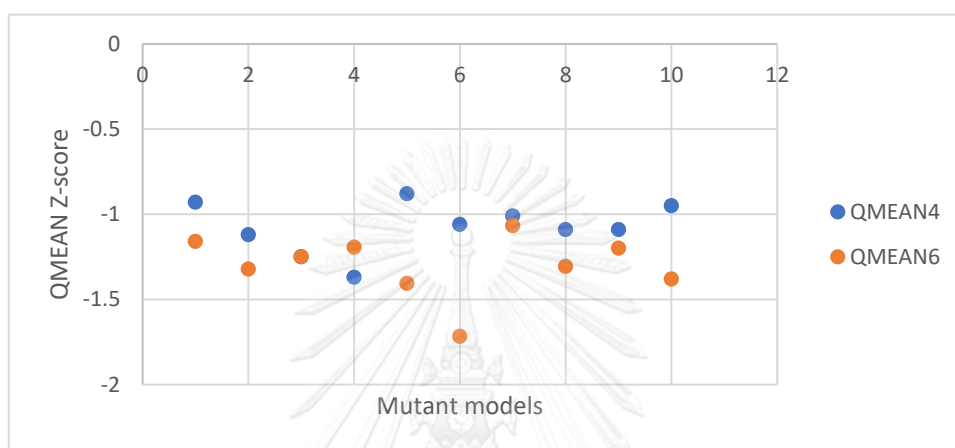
รูปที่ 43 แผนภูมิคอลัมน์ซ้อนแสดงร้อยละของกรดอะมิโนที่ตกอยู่ในบริเวณ Favoured region, Allowed region และ Outlier region ของโคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย D150K,D154K ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

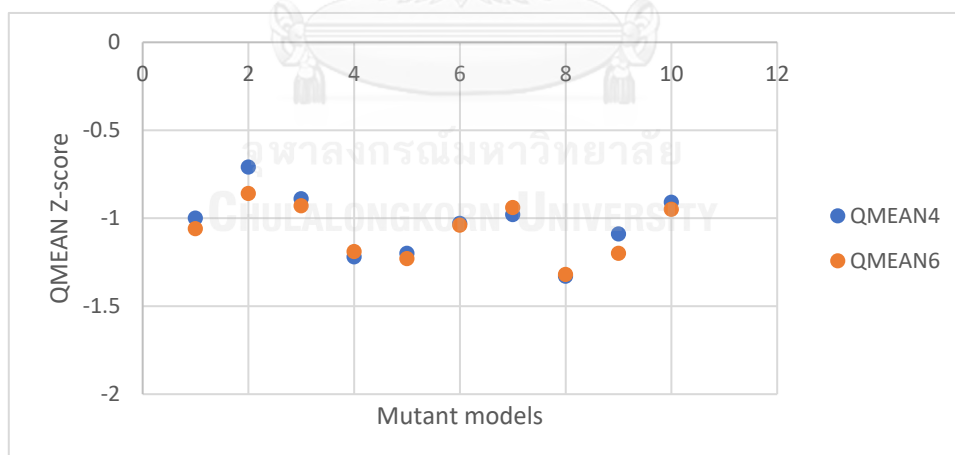
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ผลการประเมินโครงสร้างจำลองด้วย QMEAN

จากการคำนวณค่า QMEAN score ด้วยเครื่องมือ QMEAN SWISS-MODEL โดยใช้โคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย ทั้งสี่แบบในการคำนวณคือ D150RD154R, D150RD154K, D150KD154R และ D150KD154K ซึ่งใช้ไฟล์โปรตีนนามสกุล .pdb ที่คำนวณจากเครื่องมือ Modeller รวมทั้งหมดสี่ตัวอย่าง โดย QMEAN Z-score แบ่งได้เป็น Global score values สองแบบคือ QMEAN4 และ QMEAN6 โดยมีค่า QMEAN4 ในช่วง -1.44 ถึง -0.71 และค่า QMEAN6 ในช่วง -1.717 ถึง -0.75 แสดงดังรูปที่ 44 ถึงรูปที่ 47



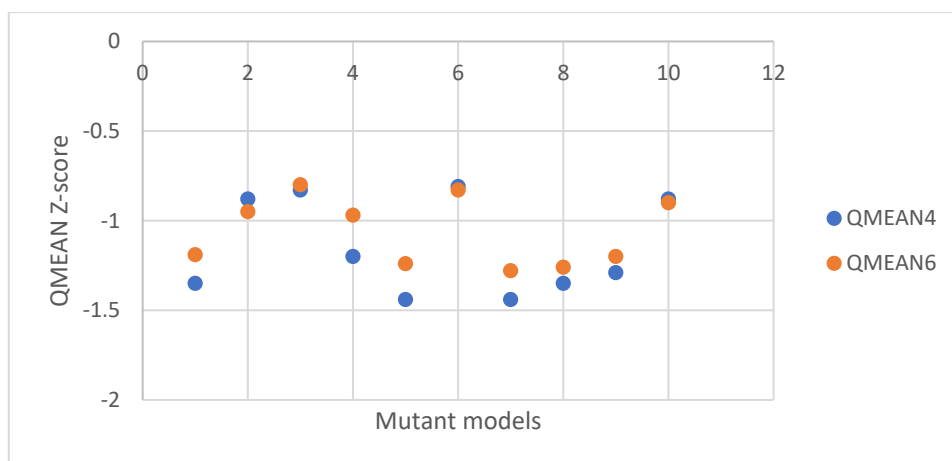
รูปที่ 44 แผนภาพกระจายค่า QMEAN score values ของโคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย ตำแหน่ง D150R,D154R ทั้งหมดสี่ตัวอย่าง จากโปรแกรม QMEAN



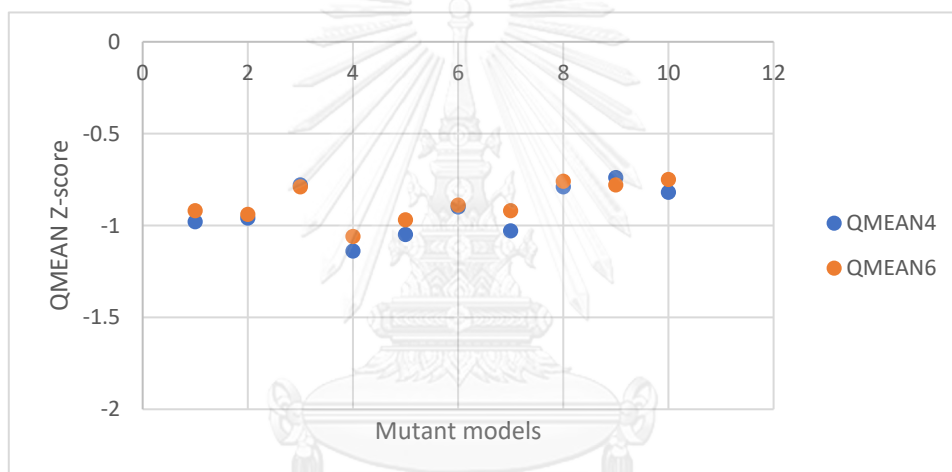
รูปที่ 45 แผนภาพกระจายค่า QMEAN score values ของโคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย ตำแหน่ง D150R,D154K ทั้งหมดสี่ตัวอย่าง จากโปรแกรม QMEAN

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 46 แผนภาพกระจายค่า QMEAN score values ของโคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย ตำแหน่ง D150K,D154R ทั้งหมดสีบตัวอย่าง จากโปรแกรม QMEAN



รูปที่ 47 แผนภาพกระจายค่า QMEAN score values ของโคลิซินเอ็นพันธุ้กลาย ตำแหน่ง D150K,D154K ทั้งหมดสีบตัวอย่าง จากโปรแกรม QMEAN

พบว่าโปรตีนพันธุ้กลายทั้งสี่แบบมีค่า Z-Score สัมบูรณ์ หรือ $|Z\text{-Score}|$ อยู่ในช่วง 0 ถึง 2 ซึ่งเป็นค่าจุดตัดมาตรฐานที่แสดงถึงคุณภาพของโครงสร้างโปรตีนที่ดีและแสดงให้เห็นว่าแต่ละโครงสร้างพันธุ้กลายไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใด

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.2.1 ผลการทำนายความคงตัวของโปรตีนพันธุ้กลายโดยใช้เครื่องมือทำนาย

ผลการทำนายความคงตัวด้วย CUPSAT

จากการคำนวณค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 150 และ 154 ด้วยเครื่องมือ CUPSAT โดยใช้โปรตีนโคลิซินเอ็น ทำการกลายพันธุ์ในระบบการทดลองแบบใช้ความร้อน (thermal) และใช้สารทำให้เสียสภาพ (denaturant) โดยจะแสดงเป็นค่าความเสถียรโดยรวม (overall stability) การบิด (torsion) และค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ พบว่าในระบบการทดลองแบบใช้ความร้อน ค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ของกรดอะมิโนตำแหน่ง 150 อยู่ในช่วง -1.82 ถึง 0.87 และค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ของกรดอะมิโนตำแหน่ง 154 อยู่ในช่วง -0.93 ถึง 1.41 และในระบบการทดลองแบบ ใช้สารทำให้เสียสภาพ ค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ของกรดอะมิโนตำแหน่ง 150 อยู่ในช่วง -0.38 ถึง 7.61 และค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ของกรดอะมิโนตำแหน่ง 154 อยู่ในช่วง -0.82 ถึง 1.13 แสดงดังตารางที่ 5 และตารางที่ 6

พบว่าโคลิซินเอ็นพันธุ้กลายที่ตำแหน่ง 150 (Asp) และ 154 (Asp) เปลี่ยนเป็นอาร์จีนีน และ ไลซีน มีค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ในระบบการทดลองแบบใช้ความร้อน และ ใช้สารทำให้เสียสภาพ ดังนี้คือในระบบการทดลองแบบ ใช้ความร้อน ที่ตำแหน่ง D150K และ D154K มีความเสถียรโดยรวมดี และมีค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ เท่ากับ 0.45 kcal/mol และ 0.33 kcal/mol ตามลำดับ และในระบบการทดลองแบบ ใช้สารทำให้เสียสภาพ ที่ตำแหน่ง D150R และ D150K มีความเสถียรโดยรวมที่ดี และมีค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ เท่ากับ 0.38 kcal/mol และ 0.22 kcal/mol ตามลำดับ

โดยค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ที่ได้จากการคำนวณจากเครื่องมือ CUPSAT จะแสดงถึงความคงตัวของโครงสร้าง ยังมีค่าสูง ยิ่งแสดงถึงความคงตัวที่ดี โดยในระบบการทดลองแบบ ใช้ความร้อน ที่ตำแหน่ง D150K และ D154K มีความเสถียรโดยรวมที่เหมาะสมและมีค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ที่สูงที่สุดในตำแหน่งเดียวกัน และในระบบการทดลองแบบ ใช้สารทำให้เสียสภาพ ที่ตำแหน่ง D150R และ D154R มีความเสถียรโดยรวมที่เหมาะสมและมีค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ที่สูงที่สุดในตำแหน่งเดียวกัน จึงอาจแสดงให้เห็นว่าแต่ละโครงสร้างพันธุ้กลายไม่มีความแตกต่างกันมากนัก แสดงดังรูปที่ 48

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 5 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโคไลซินเอ็นที่ลำดับกรดอะมิโน 150 และ 154 หลังจากการกลายพันธุ์เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ในการทดลองแบบใช้ความร้อน จากโปรแกรม CUPSAT

Experiment: thermal							
Residue: 150				Residue: 154			
Mutant	Overall stability	Torsion	Predicted $\Delta\Delta G$ (kcal / mol)	Mutant	Overall stability	Torsion	Predicted $\Delta\Delta G$ (kcal / mol)
HIS	Stabilising	Favourable	0.7	ALA	Stabilising	Favourable	0.43
LYS	Stabilising	Favourable	0.45	GLU	Stabilising	Favourable	0.41
GLN	Stabilising	Favourable	0.32	LYS	Stabilising	Favourable	0.33
ARG	Stabilising	Favourable	0.06	LEU	Stabilising	Favourable	0.3
ASN	Destabilising	Favourable	-0.08	MET	Stabilising	Favourable	0.28
GLY	Destabilising	Favourable	-1.05	ARG	Stabilising	Favourable	0.28
CYS	Stabilising	Unfavourable	-0.87	GLN	Stabilising	Favourable	0.16
GLU	Stabilising	Unfavourable	-0.43	TRP	Stabilising	Favourable	0.01
LEU	Stabilising	Unfavourable	0.14	SER	Destabilising	Favourable	-0.12
ALA	Destabilising	Unfavourable	-0.27	PRO	Destabilising	Favourable	-0.68
THR	Destabilising	Unfavourable	-0.41	CYS	Stabilising	Unfavourable	1.41
TYR	Destabilising	Unfavourable	-0.49	HIS	Stabilising	Unfavourable	0.22
PRO	Destabilising	Unfavourable	-0.52	THR	Stabilising	Unfavourable	0.07
SER	Destabilising	Unfavourable	-0.55	ASN	Destabilising	Unfavourable	-0.24
TRP	Destabilising	Unfavourable	-0.6	TYR	Destabilising	Unfavourable	-0.27
PHE	Destabilising	Unfavourable	-0.74	GLY	Destabilising	Unfavourable	-0.3
MET	Destabilising	Unfavourable	-1.12	ILE	Destabilising	Unfavourable	-0.32
VAL	Destabilising	Unfavourable	-1.16	PHE	Destabilising	Unfavourable	-0.53
ILE	Destabilising	Unfavourable	-1.82	VAL	Destabilising	Unfavourable	-0.93

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

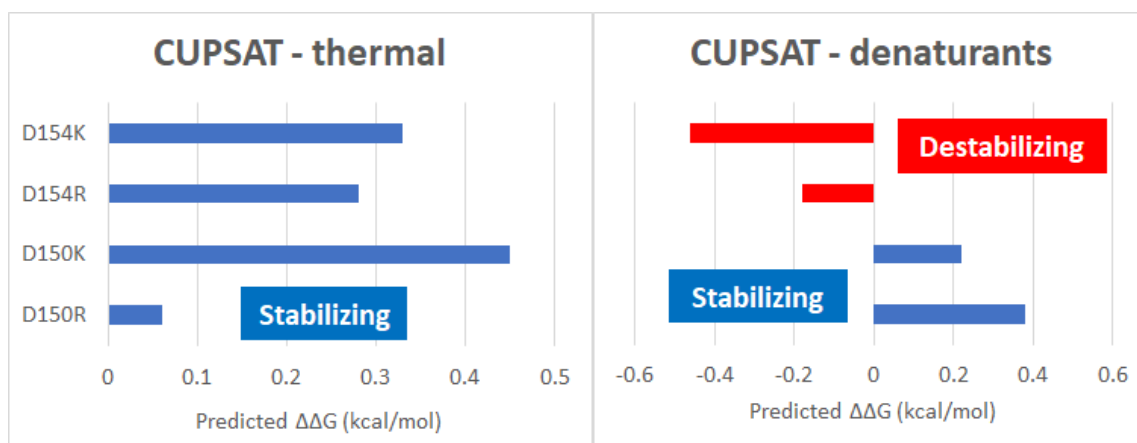
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 6 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโคลิซินเอ็นที่ลำดับกรดอะมิโน 150 และ 154 หลังจากการกลายพันธุ์เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ในการทดลองแบบใช้สารทำให้เสียสภาพ จากโปรแกรม CUPSAT

Experiment: denaturants							
Residue: 150				Residue: 154			
Mutant	Overall stability	Torsion	Predicted $\Delta\Delta G$ (kcal / mol)	Mutant	Overall stability	Torsion	Predicted $\Delta\Delta G$ (kcal / mol)
GLY	Stabilising	Favourable	1.58	MET	Stabilising	Favourable	0.36
GLN	Stabilising	Favourable	0.57	ALA	Stabilising	Favourable	0.09
ARG	Stabilising	Favourable	0.38	GLN	Stabilising	Favourable	0.02
HIS	Stabilising	Favourable	0.34	ILE	Stabilising	Unfavourable	1.13
LYS	Stabilising	Favourable	0.22	VAL	Stabilising	Unfavourable	0.82
PRO	Stabilising	Unfavourable	7.61	THR	Stabilising	Unfavourable	0.67
CYS	Stabilising	Unfavourable	5.64	CYS	Stabilising	Unfavourable	0.52
ILE	Stabilising	Unfavourable	4.02	HIS	Stabilising	Unfavourable	0.13
VAL	Stabilising	Unfavourable	3.28	GLY	Stabilising	Unfavourable	0.03
LEU	Stabilising	Unfavourable	3.07	ARG	Destabilising	Favourable	-0.18
MET	Stabilising	Unfavourable	2.79	LEU	Destabilising	Favourable	-0.22
THR	Stabilising	Unfavourable	2.68	SER	Destabilising	Favourable	-0.3
TRP	Stabilising	Unfavourable	2.05	PRO	Destabilising	Favourable	-0.38
PHE	Stabilising	Unfavourable	1.97	LYS	Destabilising	Favourable	-0.46
ALA	Stabilising	Unfavourable	1.59	GLU	Destabilising	Favourable	-0.49
SER	Stabilising	Unfavourable	1.57	TRP	Destabilising	Favourable	-0.82
TYR	Stabilising	Unfavourable	0.54	PHE	Destabilising	Unfavourable	-0.1
GLU	Stabilising	Unfavourable	0.41	TYR	Destabilising	Unfavourable	-0.57
ASN	Destabilising	Favourable	-0.38	ASN	Destabilising	Unfavourable	-0.61

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

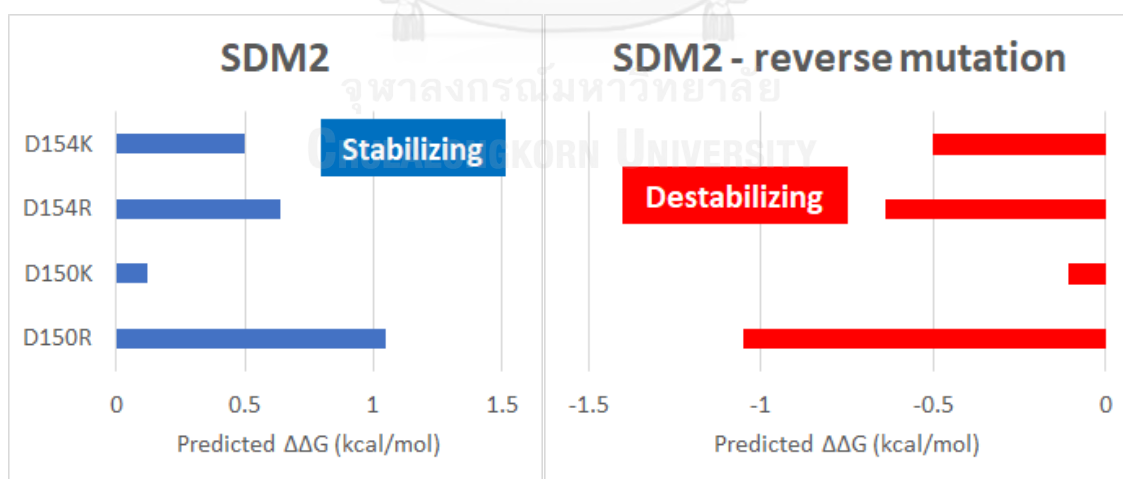


รูปที่ 48 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโคลิซินเอ็นที่กลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 150 และ 154 จากแอสปาร์เตตเป็น อาร์จินีน และ ไลซีน จากโปรแกรม CUPSAT

Predicted $\Delta\Delta G$ ในระบบการทดลองแบบ ใช้ความร้อน (ซ้าย) และใช้สารทำให้เสียสภาพ (ขวา)

ผลการทำนายความคงตัวด้วย SDM2

จากการคำนวณค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ด้วยเครื่องมือ SDM2 โดยใช้โคลิซินเอ็น ทำการกลายพันธุ์กรดอะมิโนเฉพาะที่คือตำแหน่ง D150R, D150K, D154R และ D154K แล้วแสดงเป็นค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ หรือค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ของการกลายพันธุ์ย้อนกลับ ได้ พบว่ามีค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ในช่วง 0.12 ถึง 1.05 kcal/mol และค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ของการกลายพันธุ์ย้อนกลับ ในช่วง -1.05 ถึง -0.11 kcal/mol แสดงดังรูปที่ 49



รูปที่ 49 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโคลิซินเอ็นที่กลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนลำดับที่ 150 และ 154 จากแอสปาร์เตตเป็น อาร์จินีน และ ไลซีน จากโปรแกรม SDM2

Predicted $\Delta\Delta G$ ของการกลายพันธุ์ไปข้างหน้า (ซ้าย) และย้อนกลับ (ขวา)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โดยค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ที่ได้จากการคำนวณจากเครื่องมือ SDM2 จะแสดงถึงความคงตัวของโครงสร้าง ยังมีค่าสูง ยิ่งแสดงถึงความคงตัวที่ดี พบว่าโคลิซินเอ็นที่ตำแหน่งกลายพันธุ์ D150RD154R มีค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ที่สูงที่สุด และจากการทำการกลายพันธุ์ย้อนกลับ ทำให้ทราบถึงค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ย้อนกลับด้วย ซึ่งที่ตำแหน่งกลายพันธุ์ D150RD154R มีค่าที่ต่ำที่สุด ซึ่งถือว่าสมเหตุสมผลเพราะมีการกลายพันธุ์แล้วทำให้มีความคงตัวดีขึ้นและเมื่อทำการกลายพันธุ์กลับมาเป็นตัวต้นแบบย่อมทำให้มีความคงตัวลดลง จึงสามารถยืนยันได้ว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ D150RD154R มีความเหมาะสมที่สุดนั่นเอง

ผลการทำนายความคงตัวด้วย MAESTRO

จากการคำนวณค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ด้วยเครื่องมือ MAESTRO โดยใช้ ทำการกลายพันธุ์โคลิซินเอ็นคือตำแหน่ง D150RD154R, D150RD154K, D150KD154R และ D150KD154K พบว่ามีค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ดังนี้คือ -0.270, -0.269, -0.054 และ -0.0000375 kcal/mol ตามลำดับ รวมถึงการแสดงผลค่าความเชื่อมั่นในการทำนาย ดังนี้คือ 0.889, 0.867, 0.889 และ 0.899 แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ และ Confident estimation ของโปรตีนโคลิซินเอ็นที่กลายพันธุ์ ตำแหน่ง D150RD154R, D150RD154K, D150KD154R และ D150KD154K จากโปรแกรม MAESTRO

Mutation site	Predicted $\Delta\Delta G$ (kcal / mol)	Confident estimation
D150R,D154K	-0.270162729	0.889433785
D150R,D154R	-0.269214658	0.867311473
D150K,D154R	-0.054033879	0.889586816
D150K,D154K	-3.75E-05	0.899268612

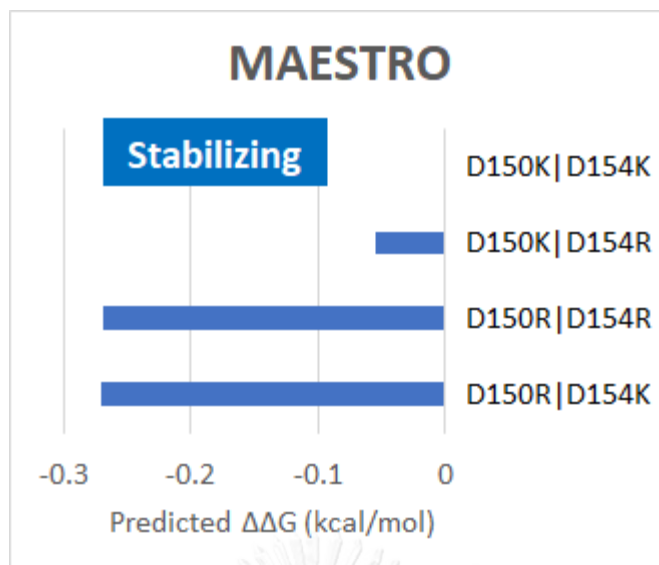
โดยค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ที่ได้จากการคำนวณจากเครื่องมือ MAESTRO จะแสดงถึงความคงตัวของโครงสร้าง ยังมีค่าต่ำ ยิ่งแสดงถึงความคงตัวที่ดี พบว่าโปรตีนพันธุ์กลายที่ตำแหน่ง D150RD154K และ D150RD154R มีค่าผลต่างของพลังงานอิสระกิบส์ ต่ำที่สุด ซึ่งแสดงถึงตำแหน่งที่กลายพันธุ์แล้วมีความเสถียรของโปรตีนพันธุ์กลายสูงสุด แสดงดังรูปที่ 50 นอกจากนี้ค่าความเชื่อมั่นในการทำนายที่ได้จากการคำนวณจะแสดงถึงความน่าเชื่อถือของข้อมูลด้วย ยิ่งค่าเข้าใกล้ 1.0 ยิ่งมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด พบว่าค่าความเชื่อมั่นในการทำนายของทุกตำแหน่งต่างก็มีค่าเกิน 85% ซึ่งแสดงถึงความน่าเชื่อถือที่สูงและมีความสม่ำเสมอของเครื่องมือ MAESTRO ได้

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 50 ค่า Predicted $\Delta\Delta G$ ของโปรตีนโคลิซินเอ็นที่กลายพันธุ์ตำแหน่ง D150RD154R, D150RD154K, D150KD154R และ D150KD154K จากโปรแกรม MAESTRO

4.2.3 สรุปผลการคัดเลือกโปรตีนพันธุ์กลาย

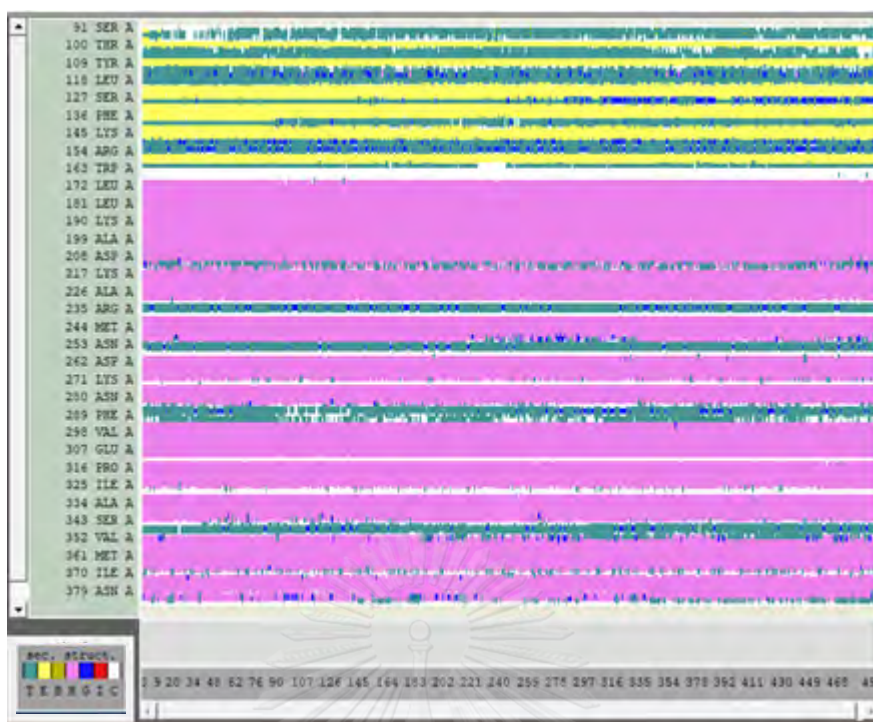
จากการจำลองโครงสร้างพบว่าพันธุ์กลายแต่ละแบบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และให้โครงสร้างที่มีคุณภาพ ขณะที่การทำนายจากเครื่องมือทำนายความคงตัวชี้ให้เห็น D150R และ D154R เป็นการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด จึงเลือกการกลายพันธุ์รูปแบบดังกล่าว ไปจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลต่อไป

4.3 ผลการยืนยันโครงสร้างโปรตีนพันธุ์กลาย

จากการติดตามโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนพันธุ์กลายตำแหน่ง D150RD154R ตลอดช่วงกรอบเวลาที่ทำการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลโดยใช้ Timeline พบว่ามีโครงสร้างทุติยภูมิดังนี้คือ T แสดงถึง hydrogen bonded turn, E แสดงถึง extended strand in β -ladder, B แสดงถึง residue in isolated β -bridge, H แสดงถึง α -helix, G แสดงถึง 3-helix (3/10 helix), I แสดงถึง 5-helix (π -helix) และ C แสดงถึง coil แสดงดังรูปที่ 51

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

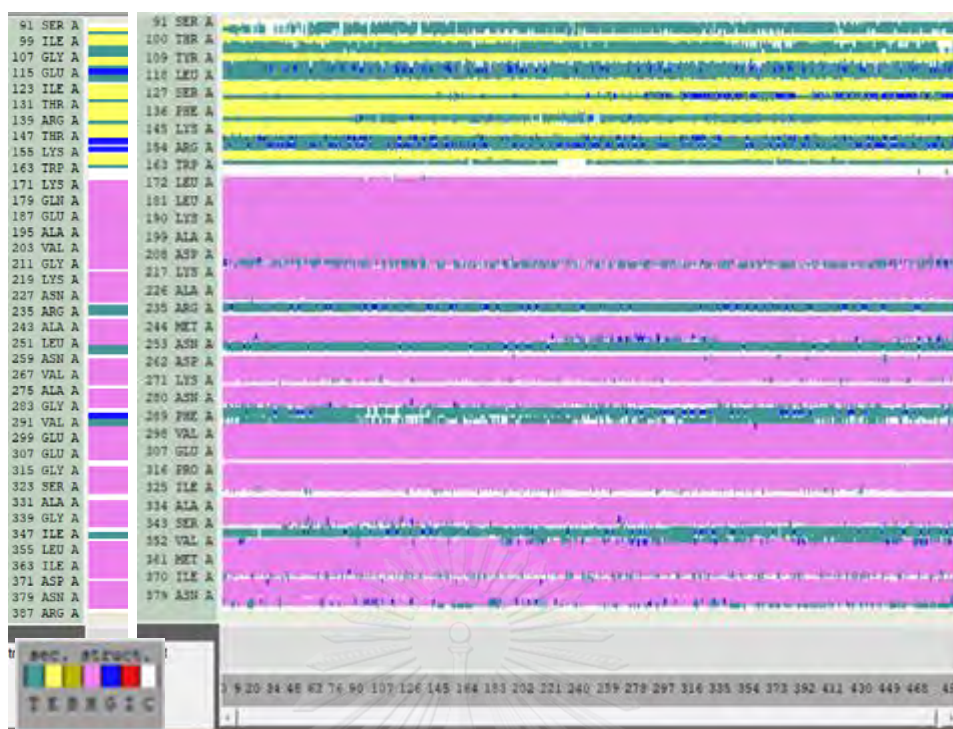


รูปที่ 51 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนพันธุกลายตำแหน่ง D150RD154R ตลอดช่วงกรอบเวลาที่ทำการศึกษาที่คำนวณจากโปรแกรม NAMD

ในการอ่านข้อมูลโดยแกนแนวนอนแสดงถึงช่วงกรอบเวลาที่ทำการศึกษาโครงสร้าง และแกนแนวตั้งแสดงถึงตำแหน่งกรดอะมิโน ซึ่งสีต่าง ๆ ที่ปรากฏแสดงถึงโครงสร้างทุติยภูมิที่จุดเวลาหนึ่งเมื่อนำมารวมติดต่อกันก็จะเห็นเป็นแถบสีดังปรากฏนั่นเอง หากมีโครงสร้างเดียวกันตลอดช่วงเวลาก็จะมีสีเป็นแถบเดียวไปตลอดทั้งช่วงเวลา แสดงถึงความคงตัวของโครงสร้างไม่ปรับเปลี่ยนไปมาเป็นต้น นอกจากนี้ โครงสร้างที่คงตัวมักไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณกลางของโครงสร้างทุติยภูมิแต่ยังรับได้หากส่วนปลายของโครงสร้างทุติยภูมิเปลี่ยนแปลงไป โดยการแปลผลของโครงสร้างทุติยภูมิสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนต้นแบบกับโปรตีนพันธุกลายในช่วงกรอบเวลาต่าง ๆ ในที่นี้คือการเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนโคลิซินเอ็นต้นแบบกับโปรตีนโคลิซินเอ็นพันธุกลายตำแหน่ง D150RD154R ในช่วงกรอบเวลานานสิบนาโนวินาที พบว่าโครงสร้างโดยรวมไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปมากเกินในช่วงกรอบเวลาทั้งหมด ซึ่งสังเกตจากแถบสีโครงสร้างที่เกิดขึ้นเป็นสีเดียวกันตลอดทั้งช่วงกรอบเวลา หรืออาจเปลี่ยนไปบ้างแต่ก็เปลี่ยนไปในช่วงกรอบเวลาที่สั้น จึงสามารถแสดงถึงความคงตัวของโครงสร้างได้ แสดงดังรูปที่ 52

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 52 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนโคลิซินเอ็นต้นแบบเทียบกับพันธู์กลายตำแหน่ง D150RD154R ตลอดช่วงกรอบเวลาที่ทำการจำลอง ในช่วง โดเมนอาร์ ที่คำนวณจากโปรแกรม NAMD
 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนโคลิซินเอ็นต้นแบบ (ซ้าย) และพันธู์กลาย D150RD154R (ขวา)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
 เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
 are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มประจวบแกโครงสร้าง รวมถึงคัดเลือกโครงสร้างที่มีความคงตัวเพื่อนำไปใช้ในการทดลองในห้องปฏิบัติการต่อไป โดยการประยุกต์ใช้ข้อมูลทางชีวสารสนเทศร่วมกับการทำนายและประเมินโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์ ทำให้สามารถคัดกรองข้อมูลจำนวนมากได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เริ่มต้นด้วยการค้นหาบริเวณที่เหมาะสมแก่การ กลายพันธุ์ด้วยเครื่องมือ Supercharge พบว่าที่ตำแหน่ง 150 และ 154 มีความเหมาะสมที่สุดและไม่มีการรบกวนต่อพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นเหมือนตำแหน่ง 115 จากนั้นจึงทดลองทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนเดิมให้เป็นประจวบคืออาร์จินีนและไลซีน แล้วจึงทำการคัดกรองโครงสร้างพันธุกลายต่าง ๆ โดยทำการทดสอบความคงตัวของโครงสร้างพันธุกลายผ่านการทำนายด้วยเครื่องมือทางคอมพิวเตอร์คือ SDM2 CUPSAT และ MAESTRO ซึ่งพบว่าค่า $\Delta\Delta G$ ของโครงสร้างโดยรวมมีความคงตัวที่ดีและใกล้เคียงกัน ซึ่งพบว่าตำแหน่งที่เหมาะสมที่สุดคือตำแหน่ง D150RD154R จากนั้นจึงทำการจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีนพันธุกลายและการตรวจสอบคุณภาพของโครงสร้างด้วยเครื่องมือ RAMPAGE และ QMEAN พบว่าค่า %favoured region และค่า QMEAN Z-score ที่ได้มีค่าไม่ต่ำกว่ามาตรฐานของความคงตัวที่กำหนดคือ %favoured region สูงกว่า 95 และค่าสัมบูรณ์ของ QMEAN Z-score ไม่เกิน 2 หน่วย แสดงถึงโครงสร้างมีความเสถียรสูงและใกล้เคียงกันมาก จากผลดังกล่าวจึงนำมาสู่ผลการคัดเลือกให้ตำแหน่ง D150RD154R ที่มีความเหมาะสมที่สุด จากนั้นจึงยืนยันผลสุดท้ายด้วยการสร้างการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลที่มีความแม่นยำสูงในการใช้เพื่อทำนายในด้านเสถียรภาพของโครงสร้าง ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างของโครงสร้างทุติยภูมิระหว่างโครงสร้างโปรตีนต้นแบบและโปรตีนพันธุกลาย ในที่สุดจึงสามารถยืนยันได้ว่าโครงสร้างโปรตีนพันธุกลายโคลิซินเอ็นทีที่เพิ่มประจวบในตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีนที่ 150 และ 154 (D150RD154R) มีความคงตัวและเหมาะสมที่สุด และทำให้ประจวบรวมของโครงสร้างเพิ่มขึ้นจาก +14 เป็น +18 ได้

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาและวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทางคอมพิวเตอร์ จึงควรทำการทดลองทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมเช่น การยืนยันโครงสร้างโปรตีนพันธุกลายด้วยเครื่องมือ circular dichroism spectroscopy หรือการทดสอบประจุไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยการทำ isoelectronic focusing เพื่อใช้ในการยืนยันความแม่นยำของเครื่องมือและวิธีการ ก่อนการนำโปรตีนพันธุกลายไปใช้ทดสอบต่อเซลล์มะเร็งได้ หรืออาจต่อยอดโดยงานวิจัยทำการทดลองกลายพันธุ์เพิ่มประจุให้แก่โปรตีนอย่างมาก แล้วนำไปทดสอบต่อเซลล์มะเร็งในห้องปฏิบัติการเช่นกัน เพื่อใช้ในการศึกษาเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มประจุและการออกฤทธิ์ได้

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สุดท้ายนี้การใช้วิธีทางคอมพิวเตอร์ในการทำนายและประเมินโครงสร้างสารชีวโมเลกุล จะช่วยเพิ่มความมั่นใจในการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ รวมถึงช่วยลดค่าใช้จ่ายในการทำปฏิบัติการและลดระยะเวลาในการคัดกรองสารที่สนใจได้อีกด้วย นอกจากนี้ในปัจจุบันพบว่าเครื่องมือที่ใช้ในการทำนายความคงตัวของโปรตีนและโปรตีนพันธุกรรมจากคอมพิวเตอร์มากมาย โดยที่เครื่องมือต่าง ๆ ก็มีประสิทธิภาพ ความแม่นยำและความหลากหลายมากขึ้น ซึ่งทำให้สามารถทำนายข้อมูลได้อย่างครอบคลุมและรวดเร็วเหมาะแก่การใช้เพื่อคัดกรองมากยิ่งขึ้นด้วย



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รายการอ้างอิง

1. WHO's Cancer Fact Sheets [Internet]. World Health Organization. 2018 [cited 2018 Mar 23]. Available from: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Lancaster LE, Wintermeyer W, Rodnina M V. Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells, Mol Dis.* 2007 Jan 1;38(1):15–8.
3. Nishio K, Ma J, Arora S, Kaur S, Kaur S. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Front Pharmacol.* 2015;6.
4. Sharma O, Zakharov SD, Zhalnina MV, Yamashita E, Cramer WA. Colicins. In: *Handbook of Biologically Active Peptides.* Elsevier; 2013. p. 93–100.
5. Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Llobès R, Postle K, et al. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007 Mar 1;71(1):158–229.
6. Kleanthous C. Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec 9;8(12):843–8.
7. Vetter IR, Parker MW, Tucker AD, Lakey JH, Pattus F, Tsernoglou D. Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Structure.* 1998 Jul 15;6(7):863–74.
8. Jakes KS. Daring to be different: colicin N finds another way. *Mol Microbiol.* 2014 May 1;92(3):435–9.
9. Kim YC, Tarr AW, Penfold CN. Colicin import into *E. coli* cells: A model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014 Aug 1;1843(8):1717–31.
10. Johnson CL, Solovyova AS, Hecht O, Macdonald C, Waller H, Grossmann JG, et al. The Two-State Prehensile Tail of the Antibacterial Toxin Colicin N. *Biophys J.* 2017 Oct 17;113(8):1673–84.
11. P08083 (CEAN_ECOLX). In: UniProtKB. UniProt Consortium; 2018.
12. Lakey JH, Ridley H. Antibacterial toxin colicin N and phage protein G3p compete with TolB for a binding site on TolA. *Microbiology.* 2015 Mar 1;161(3):503–15.
13. Johnson CL, Ridley H, Marchetti R, Silipo A, Griffin DC, Crawford L, et al. The antibacterial toxin colicin N binds to the inner core of lipopolysaccharide and close to its translocator protein. *Mol Microbiol.* 2014 May 1;92(3):440–52.

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

**The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.**

รายการอ้างอิง (ต่อ)

14. Sillitoe I, Lewis TE, Cuff A, Das S, Ashford P, Dawson NL, et al. CATH: comprehensive structural and functional annotations for genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan 28;43(D1):D376–81.
15. Shi D. Cancer Cell Surface Negative Charges: A Bio-Physical Manifestation of the Warburg Effect. 2017;
16. Chen B, Le W, Wang Y, Li Z, Wang D, Lin L, et al. Targeting Negative Surface Charges of Cancer Cells by Multifunctional Nanoprobes. *Theranostics.* 2016;6(11):1887–98.
17. Alves AC, Ribeiro D, Nunes C, Reis S. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016 Sep 1;1858(9):2231–44.
18. Lawrence MS, Phillips KJ, Liu DR. Supercharging Proteins Can Impart Unusual Resilience. *J Am Chem Soc.* 2007 Aug 22;129(33):10110–2.
19. Thompson DB, Cronican JJ, Liu DR. Engineering and Identifying Supercharged Proteins for Macromolecule Delivery into Mammalian Cells. *Methods Enzymol.* 2012 Jan 1;503:293–319.
20. Der BS, Kluwe C, Miklos AE, Jacak R, Lyskov S, Gray JJ, et al. Alternative Computational Protocols for Supercharging Protein Surfaces for Reversible Unfolding and Retention of Stability. Salsbury Jr F, editor. *PLoS One.* 2013 May 31;8(5):e64363.
21. Leaver-Fay A, Tyka M, Lewis SM, Lange OF, Thompson J, Jacak R, et al. Rosetta3: An Object-Oriented Software Suite for the Simulation and Design of Macromolecules. *Methods Enzymol.* 2011 Jan 1;487:545–74.
22. Kulshreshtha S, Chaudhary V, Goswami GK, Mathur N. Computational approaches for predicting mutant protein stability. *J Comput Aided Mol Des.* 2016 May 9;30(5):401–12.
23. Feyfant E, Sali A, Fiser A. Modeling mutations in protein structures. *Protein Sci.* 2007 Sep 1;16(9):2030–41.
24. Webb B, Sali A. Protein Structure Modeling with MODELLER. *Protein Structure Prediction.* 2014. 1-15 p.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รายการอ้างอิง (ต่อ)

25. Khoury GA, Smadbeck J, Kieslich CA, Floudas CA. Protein folding and de novo protein design for biotechnological applications. Trends Biotechnol. 2014 Feb 1;32(2):99–109.
26. Salsbury FR, Jr. Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. Curr Opin Pharmacol. 2010 Dec;10(6):738–44.
27. Martí-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Šali A. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2000 Jun;29(1):291–325.
28. Khan FI, Wei DQ, Gu KR, Hassan MI, Tabrez S. Current updates on computer aided protein modeling and designing. Int J Biol Macromol. 2016;85:48–62.
29. Parthiban V, Gromiha MM, Schomburg D. CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. Nucleic Acids Res. 2006 Jul 1;34(Web Server):W239–42.
30. Pandurangan AP, Ochoa-Montaña B, Ascher DB, Blundell TL. SDM: a server for predicting effects of mutations on protein stability. Nucleic Acids Res. 2017 Jul 3;45(W1):W229–35.
31. Laimer J, Hofer H, Fritz M, Wegenkittl S, Lackner P. MAESTRO - multi agent stability prediction upon point mutations. BMC Bioinformatics. 2015 Dec 16;16(1):116.
32. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, et al. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. Curr Protoc Bioinforma. 2006 Sep 1;15(1):5.6.1-5.6.30.
33. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. J Mol Graph. 1996 Feb;14(1):33–8, 27–8.
34. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. J Comput Chem. 2005 Dec 1;26(16):1781–802.
35. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, de Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by C α geometry: ϕ, ψ and C β deviation. Proteins Struct Funct Bioinforma. 2003 Jan 8;50(3):437–50.
36. Williams LD. Φ/Ψ torsion angles [Internet]. MACROMOLECULAR STRUCTURE PROTEINS AND NUCLEIC ACIDS. 2016. Available from:
<https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/structure/index.html>

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รายการอ้างอิง (ต่อ)

37. Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 2011 Feb 1;27(3):343–50.
38. Ribeiro J V., Bernardi RC, Rudack T, Stone JE, Phillips JC, Freddolino PL, et al. QwikMD — Integrative Molecular Dynamics Toolkit for Novices and Experts. *Sci Rep*. 2016 Sep 24;6(1):26536.
39. Martínez-Rosell G, Giorgino T, De Fabritiis G. PlayMolecule ProteinPrepare: A Web Application for Protein Preparation for Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Inf Model*. 2017 Jul 24;57(7):1511–6.



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.