

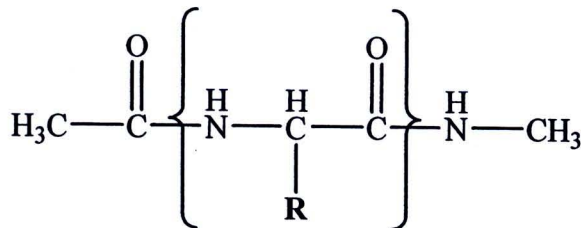


ระเบียบวิธีการทดลอง แบบจำลองที่ใช้ในการศึกษาและระเบียบวิธีการคำนวณ

1. แบบจำลองที่ใช้ในการศึกษา

1.1 ตัวยับยั้งรุ่นที่หนึ่งหรือรุ่นที่สองและบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1

โครงสร้างเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษา เพื่อเปรียบเทียบการกระจายพลังงานของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้ง nevirapine หรือ efavirenz กับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 จากฐานข้อมูลของโปรตีนซึ่งข้อมูลของโครง x-ray โดยเลือกโครงสร้างของเอนไซม์ที่ไม่มี การกลายพันธุ์ ซึ่งมีรหัส 1VRT.PDB และ 1FK9.pdb สำหรับ nevirapine และ efavirenz ตามลำดับ สำหรับโครงสร้างที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 ซึ่งกลายพันธุ์จาก Tyrosine กลายเป็น Cysteine ซึ่งมีรหัส 1JLB.PDB และ 1JKH.PDB สำหรับ nevirapine และ efavirenz ตามลำดับ หลังจากนั้นจะทำการเลือกเอนไซม์เฉพาะบริเวณโพรงการจับโดยการเลือกให้ตัวยับยั้งตัวยับยั้งเป็นศูนย์กลาง แล้วทำการเลือกกรดอะมิโนที่อยู่ในรัศมี 7 อังสตรอมที่อยู่รอบๆ ตัวยับยั้งของทั้งสามโครงสร้าง นอกจากนี้ ถ้าพบว่า ลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างในแต่ละสายที่ถูกเลือก มีลำดับของกรดอะมิโนหายไปไม่เกิน 3 กรดอะมิโน จะดำเนินการเลือกกรดอะมิโนดังกล่าวเข้ามาในแบบจำลองที่จะใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ด้วย จากวิธีการดังกล่าวพบว่าโครงสร้างบริเวณการจับที่เป็นไปตามเงื่อนไขดังกล่าวและสามารถกำหนดกรดอะมิโนให้เหมือนกันทั้งสี่โครงสร้างจะได้โครงสร้างที่มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 22 กรดอะมิโน ซึ่งได้ทั้งหมด 8 สายกรดอะมิโน หลังจากนั้นจะทำการเติมหมู่ $\text{CH}_3\text{CO}-$ และหมู่ $-\text{NHCH}_3$ ณ ตำแหน่งปลาย N และปลาย C ที่ถูกต้อง ดังแสดงในรูป 2-1



รูป 2-1 แสดงการเติมหมู่ หมู่ $\text{CH}_3\text{CO}-$ และหมู่ $-\text{NHCH}_3$ ณ ตำแหน่งปลาย N และปลาย C

ดังนั้นแบบจำลองของบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 มีกรดอะมิโนที่ติดต่อกัน 8 สายกรดอะมิโนดังนี้

1. $\text{CH}_3\text{CO-Pro95-NHCH}_3$
2. $\text{CH}_3\text{CO-Lue100-Lys101-Lys102-Lys103-Lys104-Ser105-Val106-NHCH}_3$
3. $\text{CH}_3\text{CO-Val179-Ile180-Tyr181-NHCH}_3$
4. $\text{CH}_3\text{CO-Tyr188-Val189-Gly190-NHCH}_3$
5. $\text{CH}_3\text{CO-Phe227-Leu228-Trp229-NHCH}_3$

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	
ห้องสมุดงานวิจัย	
วันที่.....	- 5 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน.....	246893
เลขเรียกหนังสือ.....	

6. $\text{CH}_3\text{CO-Leu234-His235-Pro236-NHCH}_3$
7. $\text{CH}_3\text{CO-Tyr318-NHCH}_3$ และ
8. $\text{CH}_3\text{CO-Glu138-NHCH}_3$

2. ระเบียบวิธีการคำนวณ

ระเบียบวิธีในการศึกษา โดยใช้ระเบียบวิธีดังต่อไปนี้ คือ

2.1 MP2/6-31G(d, p)

ระเบียบวิธี MP2/6-31G(d, p) ใช้สำหรับคำนวณการกระจายพลังงานที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งกับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ถ่ายแบบ เอช ไอ วี - 1

2.2 B3LYP/6-31G(d, p)

ระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d, p) ใช้สำหรับคำนวณการกระจายพลังงานที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งกับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ถ่ายแบบ เอช ไอ วี - 1

2.3 ONIOM2 (B3LYP/6-31G(d, p):PM3)

ระเบียบวิธี ONIOM2 (B3LYP/6-31G(d, p):PM3) ใช้สำหรับหาโครงสร้างที่เสถียร และพลังงานการจับระหว่างตัวยับยั้งกับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ถ่ายแบบ เอช ไอ วี - 1

2.4 BSSE (basis set super position error)

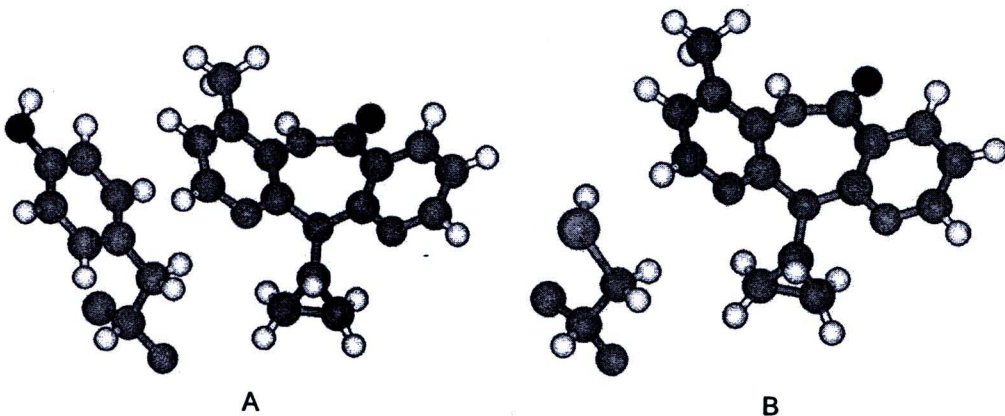
การคำนวณแบบ BSSE ใช้สำหรับการคำนวณการกระจายพลังงานที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งกับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ถ่ายแบบ เอช ไอ วี - 1 ซึ่งคาดว่าพลังงานที่ได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. พลังงานการจับระหว่างตัวยับยั้ง nevirapine และเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1

จากการศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้ง nevirapine ซึ่งเป็นตัวยับยั้งในรุ่นที่หนึ่งของตัวยับยั้งในกลุ่ม NNRTIs ที่อยู่ในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี - 1 โดยทำการปรับโครงสร้างด้วยระเบียบวิธี ONIOM2(B3LYP/6-31G(d,p):PM3) ของแบบจำลองของเอนไซม์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์และเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 และมีรูปแบบการกลายพันธุ์จากกรดอะมิโน Tyrosine กลายเป็น Cysteine (Y181C) ซึ่งโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณด้วย ONIOM2 จะนำไปใช้ในการศึกษาการกระจายพลังงานระหว่าง nevirapine กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี - 1

จากการคำนวณพลังงานการจับที่เกิดขึ้นของโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี ONIOM2 พบว่าโครงสร้างที่ไม่มีการกลายพันธุ์มีพลังงานการจับเท่ากับ 8.53 kcal/mol ส่วนโครงสร้างที่มีการกลายพันธุ์แบบ Y181C มีค่าพลังงานเท่ากับ 6.62 kcal/mol และผลต่างของพลังงานทั้งสองมีค่าเท่ากับ 1.91 kcal/mol ซึ่งจะเห็นได้ว่าพลังงานของโครงสร้างที่ไม่มีการกลายพันธุ์จะมีความเสถียรมากกว่าโครงสร้างที่มีการกลายพันธุ์ เนื่องจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 เป็นการเปลี่ยนโครงสร้างของกรดอะมิโนจาก Tyrosine เป็น Cysteine ซึ่งทำให้อันตรกิริยาระหว่าง nevirapine กับกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวซึ่งอันตรกิริยาแบบ H... π หายไป เมื่อพิจารณาลักษณะโครงสร้างการเกิดอันตรกิริยาที่ตำแหน่ง 181 ของทั้งสองโครงสร้างสามารถพิจารณาได้จากรูป 3-1 นอกจากนี้แล้วยังพบว่า เมื่อเกิดการปลดพันธะของเอนไซม์ในบริเวณดังกล่าวแล้ว ยังส่งผลทำให้อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้ง nevirapine กับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบเปลี่ยนแปลงด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลทำให้กรดอะมิโนบางส่วนเกิดอันตรกิริยาที่แข็งแรงมากขึ้น และบางส่วนของกรดอะมิโนมีอันตรกิริยาที่ลดลง แต่ก็มีกรด อะมิโนบางส่วนไม่มีผลต่ออันตรกิริยา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดนี้จะพิจารณาในส่วนต่อไป



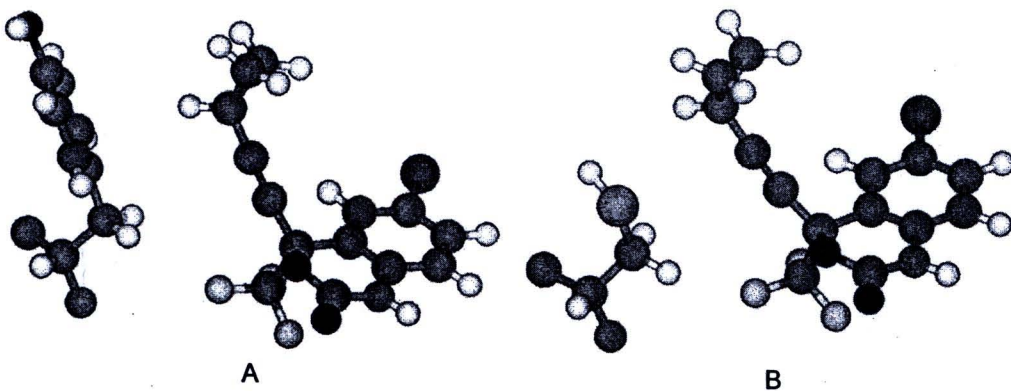
รูปที่ 3-1 อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง nevirapine กับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 181;

A) โครงสร้างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ B) โครงสร้างที่มีการกลายพันธุ์แบบ Y181C

2. พลังงานการจับระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz และเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1

จากการศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz ซึ่งเป็นโครงสร้างรุ่นที่ 2 ของตัวยับยั้งในกลุ่มเดียวกันนี้ โดยเกิดอันตรกิริยาในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี - 1 โดยทำการปรับโครงสร้างด้วยระเบียบวิธี ONIOM2(B3LYP/6-31G(d,p): PM3) ของแบบจำลองเอนไซม์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์และเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 และมีรูปแบบการกลายพันธุ์จากกรดอะมิโน Tyrosine กลายเป็น Cysteine (Y181C) ซึ่งโครงสร้างที่ได้จาก ONIOM2 จะนำไปใช้ในการศึกษาการกระจายพลังงานระหว่าง nevirapine กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี - 1

จากการคำนวณพลังงานการจับที่เกิดขึ้นของโครงสร้างที่ได้จากคำนวณด้วยระเบียบวิธี ONIOM2 พบว่าโครงสร้างที่ไม่มีการกลายพันธุ์มีพลังงานการจับเท่ากับ 12.80 kcal/mol ส่วนโครงสร้างที่มีการกลายพันธุ์แบบ Y181C มีค่าพลังงานเท่ากับ 17.82 kcal/mol ซึ่งจะเห็นได้ว่าตัวยับยั้งในรุ่นที่สองนี้ ถึงแม้เอนไซม์มีการกลายพันธุ์แต่ตัวยับยั้งยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ เอช ไอ วี - 1 ได้ เมื่อพิจารณาโครงสร้างอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz กับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 181 ของโครงสร้างที่ไม่มีการกลายพันธุ์และโครงสร้างที่มีการกลายพันธุ์แบบ Y181C ดังรูปที่ 3-2 พบว่า อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งรุ่นที่สองกับกรดอะมิโนในบริเวณ 181 เป็นอันตรกิริยาแบบอ่อน หรือไม่ได้เกิดอันตรกิริยาโดยตรงระหว่าง side chain ของกรดอะมิโนที่ไม่มีการกลายพันธุ์และที่มีการกลายพันธุ์แบบ Y181C ดังนั้น ถึงแม้จะเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ ตัวยับยั้ง efavirenz ซึ่งเป็นตัวยับยั้งในรุ่นที่สองนี้ยังสามารถใช้รักษาผู้ป่วยเอชไอวีได้ และตัวยับยั้งยังมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 3-2 อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง efavirenz กับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 181;

A) โครงสร้างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ B) โครงสร้างมีการกลายพันธุ์แบบ Y181C

3. อันตรกิริยาระหว่าง nevirapine กับเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1

จากการศึกษาพลังงานการจับที่เกิดขึ้นระหว่าง nevirapine กับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1 โดยการศึกษากับโครงสร้างของเอนไซม์ที่ยังไม่มีการกลายพันธุ์และเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1 ซึ่งมีรูปแบบการกลายพันธุ์จาก tyrosine เป็น Cysteine (Y181C) ด้วยการคำนวณเพื่อหาโครงสร้างที่เสถียรด้วยระเบียบวิธี ONIOM2 (B3LYP/6-31G(d,p):PM3) แล้วนำโครงสร้างที่ได้จากระเบียบวิธีดังกล่าวมาศึกษาการกระจายพลังงานของแต่ละกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับกับตัวยับยั้ง nevirapine ดังแสดงในตารางที่ 3-1 ซึ่งทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d,p) และในตารางที่ 3-2 ซึ่งทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d,p)

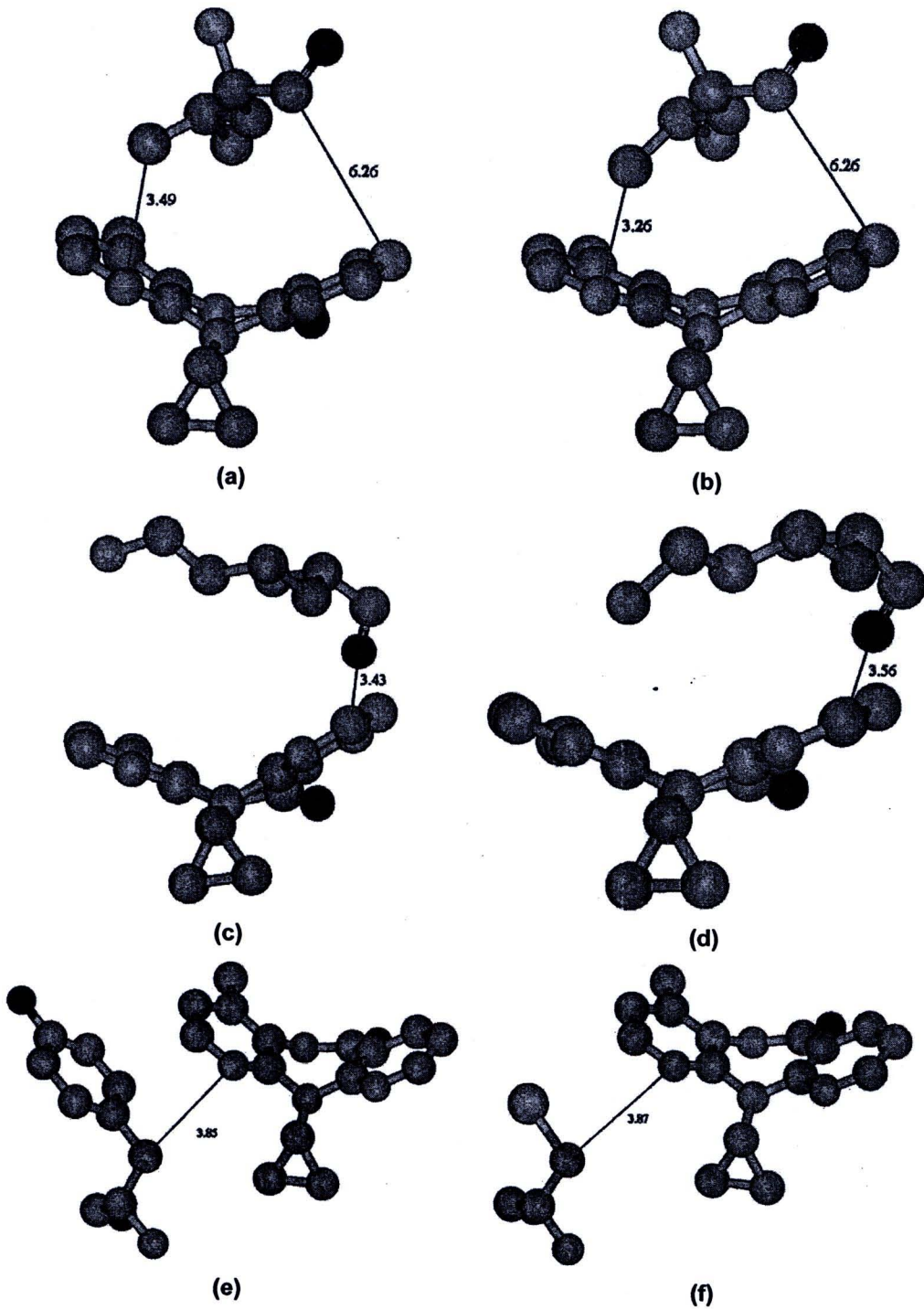
จากตารางที่ 3-2 พบว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะมีค่าเป็นลบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดอันตรกิริยาแบบดึงดูดกันระหว่างตัวยับยั้งกับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณโพรงการจับ แต่บางอันตรกิริยาเกิดการผลักกัน ไม่ว่าจะเป็นโครงสร้างของเอนไซม์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์หรือมีการกลายพันธุ์แบบ Y181C แต่อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นจะมีการกระจายพลังงานที่แตกต่างกัน ดังนั้นการออกแบบตัวยับยั้งจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมียันตรกิริยาที่แข็งแกร่งกับกรดอะมิโนในบริเวณนี้ เมื่อเปรียบเทียบอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้ง nevirapine กับเอนไซม์ที่ยังไม่มีการกลายพันธุ์และเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 พบว่า อันตรกิริยาที่เป็นลบของเอนไซม์ที่ยังไม่มีการกลายพันธุ์จะมีอันตรกิริยาที่แข็งแกร่งกว่าเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าพลังงานที่ทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d, p) มีค่าพลังงานเท่ากับ -2.77 kcal/mol และ -0.37 kcal/mol ตามลำดับ แต่เมื่อทำการปรับพลังงานด้วยระเบียบวิธี BSSE พบว่ามีค่าพลังงานเท่ากับ -6.92 kcal/mol และ -2.66 kcal/mol ตามลำดับ แต่ผลการคำนวณการกระจายพลังงานที่ทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d, p) ให้ค่าพลังงานที่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d, p) ให้ผลที่น่าเชื่อถือมากกว่า เพราะในระบบของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งเนวิราพินกับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบไม่ได้มีเฉพาะอันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจนเพียงอย่างเดียวแต่มีอันตรกิริยาแบบอื่นๆ อีกด้วย ซึ่งระเบียบวิธี B3LYP ไม่ได้คำนึงถึง เมื่อพิจารณาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นกับกรดอะมิโนอื่นที่อยู่ในบริเวณโพรงการจับพบว่า เมื่อเอนไซม์มีการกลายพันธุ์และเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ยังไม่มีการกลายพันธุ์พบว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน คือ กรดอะมิโนบางชนิดมีพลังงานเพิ่มขึ้น แต่บางกรดอะมิโนให้ค่าพลังงานลดลง และถ้าพิจารณาจากโครงสร้างการเกิดอันตรกิริยาของแต่ละคู่สามารถพิจารณาได้จากรูปที่ 3-3 ซึ่งเป็นโครงสร้างบางโครงสร้างให้พิจารณา จากรูปดังกล่าวจะเห็นได้ว่า พลังงานมีการเปลี่ยนแปลงแต่โครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน ถึงแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยก็ตาม แต่มีผลต่อโครงสร้างส่วนรวมที่ทำให้พลังงานการจับของโครงสร้างที่ไม่มีการกลายพันธุ์มีพลังงานการจับที่ต่ำกว่า

ตารางที่ 3-1 การกระจายพลังงานของแต่ละกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ
กับตัวยับยั้ง nevirapine ที่ทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ B3LYP/6-31G(d,p)

Residue	Interaction energy (kcal/mol)		
	WT	MT	$\Delta\Delta E$ (kcal/mol)
	corr.(uncorr.)	corr.(uncorr.)	corr.(uncorr.)
PRO095	2.36 (1.87)	-0.05 (-0.20)	2.41 (2.07)
LEU100	1.64 (-0.41)	1.98 (-0.32)	-0.34 (-0.09)
LYS101	-0.60 (-1.56)	-0.63 (-1.50)	0.03 (-0.06)
LYS102	0.31 (0.18)	0.33 (0.18)	-0.02 (-0.01)
LYS103	0.61 (-0.19)	0.36 (-0.37)	0.24 (0.18)
LYS104	0.07 (0.07)	0.07 (0.07)	0.00 (0.00)
SER105	-0.03 (-0.03)	-0.05 (-0.05)	0.02 (0.02)
VAL106	0.97 (-0.60)	5.13 (3.32)	-4.16 (-3.92)
VAL179	3.23 (2.54)	0.77 (0.31)	2.47 (2.23)
ILE180	-0.01 (-0.32)	0.02 (-0.07)	-0.03 (-0.24)
TYR181CYS	4.00 (1.13)	1.94 (0.41)	2.07 (0.72)
TYR188	-0.53 (-3.42)	0.90 (-1.82)	-1.43 (-1.59)
VAL189	0.19 (0.04)	0.18 (-0.18)	0.01 (0.21)
GLY190	0.40 (-0.23)	0.50 (-0.22)	-0.10 (-0.01)
PHE227	-1.13 (-2.03)	-0.08 (-1.41)	-1.05 (-0.62)
LEU228	-0.18 (-0.18)	-0.31 (-0.31)	0.13 (0.13)
TRP229	0.51 (-0.40)	0.67 (-0.44)	-0.16 (0.04)
LEU234	2.77 (1.64)	4.20 (2.94)	-1.43 (-1.30)
HIS235	-1.45 (-2.86)	-0.97 (-1.92)	-0.48 (-0.94)
PRO236	-0.24 (-1.39)	2.73 (1.93)	-2.97 (-3.32)
TYR318	-0.09 (-0.35)	1.09 (-0.27)	-1.18 (-0.08)
GLU138(b)	0.06 (-0.16)	-0.51 (-0.58)	0.57 (0.42)

ตารางที่ 3-2 การกระจายพลังงานของแต่ละกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ
กับตัวยับยั้ง nevirapine ที่ทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ MP2/6-31G(d,p)

Residue	Interaction energy (kcal/mol)		
	WT	MT	$\Delta\Delta E$ (kcal/mol)
	corr.(uncorr.)	corr.(uncorr.)	corr.(uncorr.)
PRO095	1.15 (0.20)	-0.73 (-0.92)	1.88 (1.12)
LEU100	-3.09 (-6.10)	-2.79 (-6.16)	-0.30 (0.06)
LYS101	-1.15 (-2.24)	-1.06 (-2.03)	-0.09 (-0.21)
LYS102	-0.31 (-0.50)	-0.32 (-0.53)	0.01 (0.04)
LYS103	-1.35 (-2.46)	-1.37 (-2.29)	0.02 (-0.17)
LYS104	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
SER105	-0.10 (-0.10)	-0.15 (-0.15)	0.06 (0.06)
VAL106	-1.86 (-4.09)	0.50 (-3.00)	-2.37 (-1.09)
VAL179	1.78 (0.52)	-0.44 (-1.08)	2.22 (1.60)
ILE180	-0.59 (-0.92)	-0.41 (-0.50)	-0.19 (-0.42)
TYR181CYS	-2.77 (-6.92)	-0.37 (-2.66)	-2.40 (-4.26)
TYR188	-4.65 (-8.46)	-5.04 (-9.12)	0.39 (0.66)
VAL189	-0.47 (-0.65)	-0.69 (-1.09)	0.21 (0.44)
GLY190	-0.41 (-1.19)	-0.34 (-1.23)	-0.08 (0.03)
PHE227	-1.88 (-2.91)	-1.71 (-3.20)	-0.17 (0.29)
LEU228	-0.20 (-0.20)	-0.36 (-0.37)	0.17 (0.17)
TRP229	-1.89 (-3.46)	-2.88 (-4.98)	0.99 (1.52)
LEU234	0.31 (-1.66)	1.22 (-0.89)	-0.91 (-0.78)
HIS235	-2.24 (-3.78)	-1.66 (-2.69)	-0.58 (-1.09)
PRO236	-1.42 (-2.88)	1.54 (0.02)	-2.97 (-2.90)
TYR318	-1.24 (-1.54)	-1.44 (-3.27)	0.20 (1.74)
GLU138(b)	-0.82 (-1.18)	-1.05 (-1.13)	0.23 (-0.05)



รูป 3-3 แสดงลักษณะโครงสร้างของการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง nevirapine กับกรดอะมิโนของโครงสร้างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (a) Lee100 (c) Lys1101 (e) Tyr181 และอันตรกิริยาระหว่าง nevirapine กับกรดอะมิโนของโครงสร้างที่มีการกลายพันธุ์แบบ Y181C (b) Lee100 (c) Lys1101 (e) Cys181 ที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี ONIOM2

4. อันตรกิริยาระหว่าง efavirenz กับเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1

จากการศึกษาพลังงานการจับที่เกิดขึ้นระหว่าง efavirenz กับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1 โดยการศึกษากับโครงสร้างของเอนไซม์ที่ยังไม่มีการกลายพันธุ์และเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1 ซึ่งมีรูปแบบการกลายพันธุ์จาก tyrosine เป็น Cysteine (Y181C) ด้วยการคำนวณเพื่อหาโครงสร้างที่เสถียรด้วยระเบียบวิธี ONIOM2 (B3LYP/6-31G(d,p):PM3) แล้วนำโครงสร้างที่ได้จากระเบียบวิธีดังกล่าวมาศึกษาการกระจายพลังงานของแต่ละกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับกับตัวยับยั้ง efavirenz ดังแสดงในตารางที่ 3-3 ซึ่งทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d,p) และในตารางที่ 3-4 ซึ่งทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d,p)

จากตารางที่ 3-4 พบว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะมีค่าเป็นลบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดอันตรกิริยาแบบดึงดูดกันระหว่างตัวยับยั้งกับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณโพรงการจับ แต่บางอันตรกิริยาเกิดการผลักกัน ไม่ว่าจะเป็นโครงสร้างของเอนไซม์ที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์หรือมีการกลายพันธุ์แบบ Y181C แต่อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นจะมีการกระจายพลังงานที่แตกต่างกัน ดังนั้นการออกแบบตัวยับยั้งจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมียอันตรกิริยาที่แข็งแกร่งกับกรดอะมิโนในบริเวณนี้ เมื่อเปรียบเทียบอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz กับเอนไซม์ที่ยังไม่มีการกลายพันธุ์และเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 พบว่า อันตรกิริยาที่เป็นลบของเอนไซม์ที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 181 จะมีอันตรกิริยาที่แข็งแกร่งกว่าเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างในรูป 3-4 และสอดคล้องกับผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการที่แสดงให้เห็นว่า ตัวยับยั้ง efavirenz สามารถใช้รักษาผู้ป่วยเอดส์ที่เอนไซม์การถ่ายแบบที่มีการกลายพันธุ์แบบ Y181C แต่ถ้าพิจารณาการกระจายพลังงานบนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 101 พบว่าพลังงานมีการเปลี่ยนแปลงพลังงานอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่ถ้าเปรียบเทียบพลังงานกับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 181 พบว่าอันตรกิริยาที่ตำแหน่ง 101 มีการกระจายพลังงานที่ดีกว่า จากข้อมูลดังกล่าวนี้สามารถอธิบายได้ว่า การเกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 181 ในบริเวณโพรงการจับจะไม่มีผลต่อตัวยับยั้ง efavirenz แต่ถ้าเกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 101 ต้องมีผลต่ออันตรกิริยาที่เกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในห้องปฏิบัติ

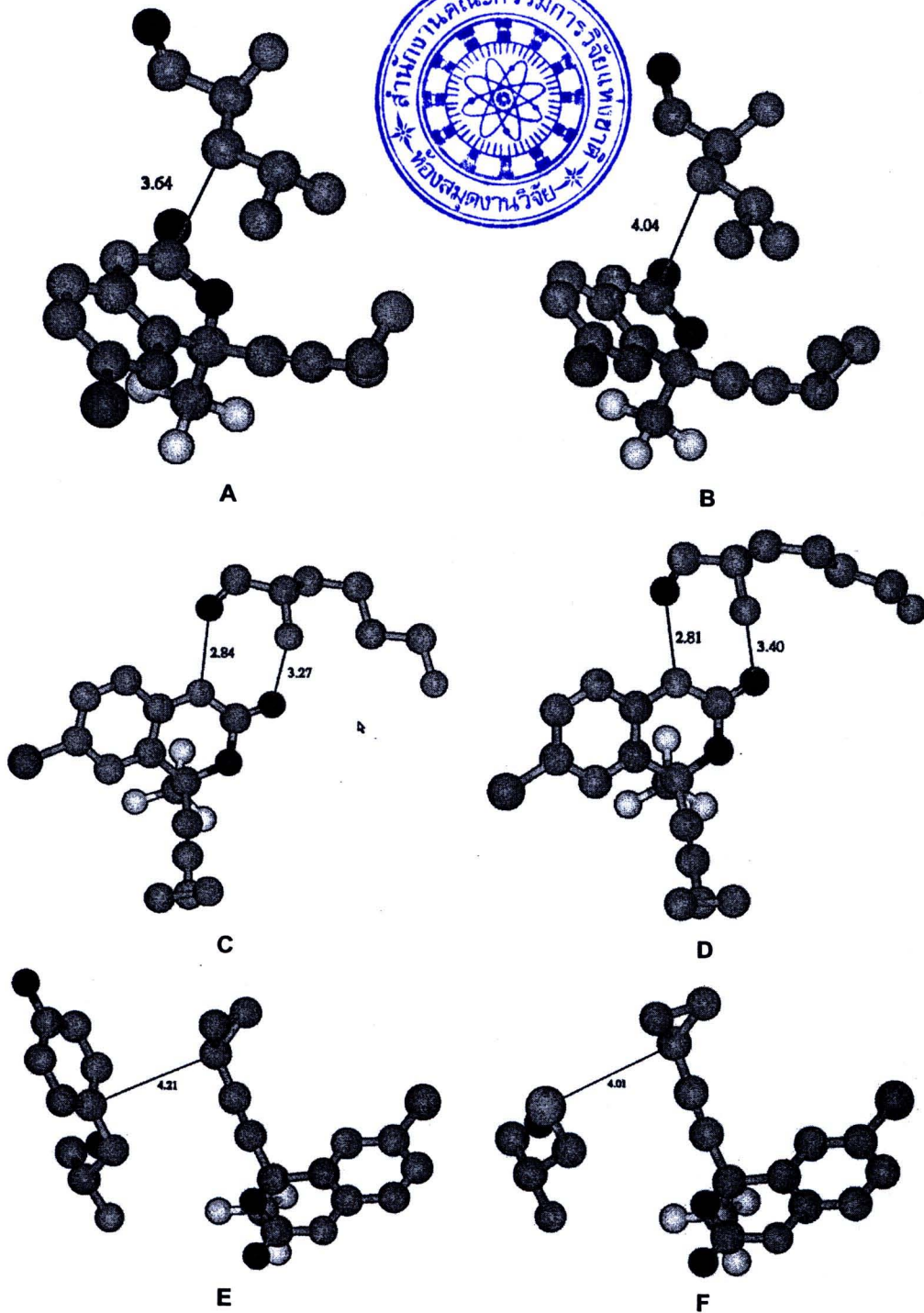
เมื่อพิจารณาการกระจายพลังงานของตัวยับยั้ง efavirenz ที่มีต่อกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์และมีการกลายพันธุ์แบบ Y181 ที่ตำแหน่ง 101 มีค่าพลังงานเท่ากับ -9.06 และ -9.94 kcal/mol ตามลำดับ เมื่อทำการคำนวณที่ B3LYP/6-31G(d,p) และเมื่อทำการปรับพลังงานด้วยระเบียบวิธี BSSE มีค่าพลังงานเท่ากับ -13.05 และ -14.20 kcal/mol ตามลำดับ ส่วนการกระจายพลังงานแบบเดียวกันที่มีต่อกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 181 มีค่าเท่ากับ -0.43 และ 0.50 ตามลำดับ เมื่อทำการคำนวณที่ MP2/6-31G(d,p) และเมื่อทำการปรับพลังงานด้วยระเบียบวิธี BSSE มีค่าพลังงานเท่ากับ -1.81 และ -0.93 kcal/mol ตามลำดับ

ตารางที่ 3-3 การกระจายพลังงานของแต่ละกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ
กับตัวยับยั้ง efavirenz ที่ทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ B3LYP/6-31G(d,p)

Residue	Interaction energy (kcal/mol)		
	WT	MT	$\Delta\Delta E$ (kcal/mol)
	corr.(uncorr.)	corr.(uncorr.)	corr.(uncorr.)
PRO095	1.48 (1.06)	2.37 (1.95)	-0.89 (-0.89)
LEU100	7.48 (4.44)	7.75 (4.74)	-0.27 (-0.30)
LYS101	-9.06 (-13.05)	-9.94 (-14.20)	0.89 (1.15)
LYS102	1.12 (0.96)	1.09 (0.93)	0.03 (0.03)
LYS103	1.79 (-0.20)	0.65 (-1.25)	1.14 (1.05)
LYS104	0.14 (0.14)	0.13 (0.13)	0.02 (0.02)
SER105	0.01 (0.01)	0.07 (0.07)	-0.06 (-0.06)
VAL106	2.79 (1.74)	3.26 (1.75)	-0.47 (-0.01)
VAL179	0.57 (-1.86)	-0.11 (-2.00)	0.69 (0.14)
ILE180	-0.10 (-0.16)	-0.05 (-0.08)	-0.05 (-0.09)
TYR181CYS	-0.43 (-1.81)	0.50 (-0.93)	-0.93 (-0.88)
TYR188	1.19 (-1.24)	1.62 (-1.67)	-0.43 (0.43)
VAL189	-0.11 (-0.34)	-0.12 (-0.57)	0.01 (0.23)
GLY190	0.29 (-0.66)	0.51 (-1.03)	-0.22 (0.36)
PHE227	1.13 (0.79)	0.78 (0.41)	0.35 (0.38)
LEU228	-0.04 (-0.04)	-0.15 (-0.15)	0.11 (0.10)
TRP229	1.12 (-0.15)	-0.13 (-1.23)	1.25 (1.08)
LEU234	2.58 (1.74)	2.04 (1.12)	0.54 (0.62)
HIS235	-0.51 (-2.06)	-0.99 (-2.26)	0.48 (0.20)
PRO236	1.05 (-0.25)	1.23 (0.42)	-0.18 (-0.67)
TYR318	0.43 (-0.20)	0.43 (-0.21)	0.00 (0.01)
GLU138(b)	1.31 (1.29)	-3.92 (-4.96)	5.23 (6.26)

ตารางที่ 3-4 การกระจายพลังงานของแต่ละกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ
กับตัวยับยั้ง efavirenz ที่ทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ MP2/6-31G(d,p)

Residue	Interaction energy (kcal/mol)		
	WT	MT	$\Delta\Delta E$ (kcal/mol)
	corr.(uncorr.)	corr.(uncorr.)	corr.(uncorr.)
PRO095	0.74 (-0.11)	1.59 (0.76)	-0.85 (-0.87)
LEU100	1.43 (-3.61)	1.68 (-3.64)	-0.26 (0.03)
LYS101	-10.17 (-15.13)	-11.07 (-16.29)	0.90 (1.16)
LYS102	0.46 (0.26)	0.37 (0.15)	0.09 (0.11)
LYS103	-1.29 (-4.03)	-2.18 (-4.68)	0.89 (0.65)
LYS104	0.08 (0.08)	0.06 (0.06)	0.02 (0.02)
SER105	-0.11 (-0.11)	-0.05 (-0.05)	-0.06 (-0.06)
VAL106	-0.06 (-2.40)	0.12 (-2.69)	-0.19 (0.29)
VAL179	-0.95 (-3.59)	-1.47 (-3.40)	0.52 (-0.19)
ILE180	-0.42 (-0.48)	-0.31 (-0.33)	-0.11 (-0.15)
TYR181CYS	-2.64 (-4.28)	-1.29 (-2.83)	-1.35 (-1.45)
TYR188	-1.71 (-4.29)	-1.88 (-5.45)	0.17 (1.16)
VAL189	-0.65 (-0.88)	-0.78 (-1.23)	0.13 (0.35)
GLY190	-0.37 (-1.32)	-0.24 (-1.79)	-0.14 (0.47)
PHE227	0.29 (-0.50)	-0.11 (-0.90)	0.40 (0.41)
LEU228	-0.06 (-0.06)	-0.16 (-0.16)	0.10 (0.10)
TRP229	-2.10 (-4.26)	-3.07 (-4.87)	0.97 (0.61)
LEU234	0.95 (-0.58)	0.15 (-1.65)	0.80 (1.07)
HIS235	-1.35 (-3.13)	-1.75 (-3.16)	0.40 (0.03)
PRO236	-0.23 (-2.18)	0.19 (-1.18)	-0.42 (-1.00)
TYR318	-1.46 (-2.22)	-1.38 (-2.16)	-0.08 (-0.07)
GLU138(b)	0.79 (0.77)	-4.64 (-5.79)	5.43 (6.56)



รูป 3-4 แสดงลักษณะโครงสร้างของการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง efavirenz กับกรดอะมิโนของโครงสร้างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (a) Lee100 (c) Lys1101 (e) Tyr181 และอันตรกิริยาระหว่าง efavirenz กับกรดอะมิโนของโครงสร้างที่มีการกลายพันธุ์แบบ Y181C (b) Lee100 (c) Lys1101 (e) Cys181 ที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี ONIOM2