

รหัสโครงการ: RSA2544/15

T 150179

ชื่อโครงการ: การศึกษาโครงสร้างผลึกของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเทคนิคเอกซเรย์คริสตัลโลกราฟี การหาสภาวะการตกผลึกเบื้องต้นและการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase และ เอนไซม์ *Pseudomonas stutzeri* D-Phenylglycine aminotransferase

ชื่อนักวิจัย: นายพลังพล คงเสรี  
ภาควิชาเคมี และ ศูนย์วิจัยโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
ถนนพระราม 6 เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10400  
โทรศัพท์: 02-201-5190 โทรสาร: 02-245-8332

E-mail address: scpks@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 ธันวาคม 2543 – 30 พฤศจิกายน 2546

การศึกษาโครงสร้างผลึกของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิคเอกซเรย์คริสตัลโลกราฟี สามารถหาโครงสร้างสารผลึกได้มากกว่า 30 ชนิด ได้แก่สารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี จากพืช จากเชื้อรา รวมทั้งที่ได้จากกระบวนการ biotransformation การศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างที่แน่นอน ถูกต้องของสารที่สนใจ รวมทั้งข้อมูลเกี่ยวกับ relative stereochemistry โดยได้พัฒนาเทคนิคการหา absolute configuration ที่แน่นอนโดยใช้เทคนิค anomalous scattering method รวมทั้งได้พัฒนาเทคนิคในการตกผลึกต่างๆ นอกเหนือไปจาก slow evaporation เช่น slow-cooling crystallization, vapor diffusion เป็นต้น นอกจากผลงานที่ได้อยู่ในรูปของผลงานตีพิมพ์และยังทำให้มีความร่วมมือกับนักเคมีกลุ่มอื่นๆ ในประเทศ ในการศึกษาโครงสร้างผลึกของสารที่ซับซ้อน ทำให้ได้ทราบถึงโครงสร้างของสารที่แน่นอนโดยเวลาที่สั้นลง โดยไม่ต้องส่งสารที่น่าสนใจไปต่างประเทศ ซึ่งต้องใช้เวลาวิเคราะห์นานกว่าการวิเคราะห์ในประเทศมาก

เอนไซม์ D-Phenylglycine aminotransferase จาก *Pseudomonas stutzeri* ทำหน้าที่เปลี่ยน D-phenylglycine ให้เป็น L-glutamic acid โดยมี 2-oxoglutarate เป็น acceptor สามารถเตรียมเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ได้มากกว่า 20 มิลลิกรัม และประสบความสำเร็จในการตกผลึกเอนไซม์ D-PhgAT ในสารละลาย  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ที่ pH ประมาณ 6.5 ผลึกที่ได้กระเจิงรังสีเอกซ์ที่ NSLS Synchrotron Laboratory ได้ดีถึง 2.2 Å resolution จากการวิเคราะห์พบว่าผลึกมีกลุ่มสมมาตรชนิด trigonal มี space group คือ P3(1)21 มี unit cell parameter:  $a = b = 75.155 \text{ \AA}$ ,  $c = 147.559 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$  and  $V = 721792 \text{ \AA}^3$  โดยมีจำนวนโมเลกุลของโปรตีน 1 โมเลกุล ในแต่ละ asymmetric unit มี solvent content ประมาณ 50% (Matthews' constant of 2.4) ได้ประสบ

ความสำเร็จในการหาโครงสร้างผลึกของ D-PhgAT ด้วยเทคนิค molecular replacement ขณะนี้ โครงสร้างที่ได้มีความสมบูรณ์ประมาณกว่า 90% และเห็นว่า PLP cofactor ได้เกิดพันธะโควาเลนต์ กับ Lys-269 ใน active site ของ D-PhgAT อย่างไรก็ตามยังมีสองบริเวณที่มีการ disorder ซึ่งอยู่ใน บริเวณใกล้กับ active site ทำให้ยังไม่สามารถเข้าใจหน้าที่การทำงานของเอนไซม์นี้ได้อย่าง ผลงาน ในส่วนของการหาสภาวะในการตกผลึกและการศึกษาทาง X-ray diffraction เบื้องต้นได้ดีพิมพ์ในวารสาร *Acta Crystallographica Section D* (2003) 59(5), 953-954 ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างโปรตีนที่ได้ศึกษา จะนำไปสู่ความเข้าใจในการออกแบบเอนไซม์ amino acid aminotransferase ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ชนิดที่มี enantioselectivity ของ D-amino acid จาก  $\alpha$ -ketoacids ต่อไป

เอนไซม์ *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (pvDHFR-TS) เป็นเป้าหมายของการพัฒนายารักษาโรคมalariaเรียในกลุ่ม antifolate ในโครงการวิจัยนี้ได้ผลิต pvDHFR-TS บริสุทธิ์มากกว่า 20 มิลลิกรัม และประสบความสำเร็จในการตกผลึกเอนไซม์ pvDHFR-TS ใน polyethylene glycol แต่ผลึกที่เตรียมได้ diffract X-ray ได้เพียง 6-8 Å ซึ่งไม่ดีพอที่จะวิเคราะห์หาโครงสร้างสามมิติ ความพยายามที่จะปรับปรุงคุณภาพของผลึกที่ได้ รวมทั้งพยายามที่จะหาสภาวะในการตกผลึกใหม่ ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพผลึกของ pvDHFR-TS กลุ่มผู้วิจัยจึงได้เตรียมเอนไซม์ pvDHFR ที่มีเพียง 240 amino acid ทางด้าน N-terminus โดยได้เตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผลิตได้จาก recombinant *E. coli* มากกว่า 10 มิลลิกรัม และมีความบริสุทธิ์สูงกว่า 95% ได้แก้ปัญหการละลายที่จำกัดของเอนไซม์ pvDHFR ทำให้สามารถเตรียมเอนไซม์ pvDHFR ที่ความเข้มข้นสูงถึง 8 mg/ml ได้ตกผลึกเอนไซม์ pvDHFR ในรูปของ ternary complex pvDHFR-NADPH-pyrimethamine ขนาดประมาณ  $300 \times 200 \times 100 \mu\text{m}$  ซึ่งสามารถกระเจิงรังสีเอกซ์ได้ดีกว่า 2.0 Å resolution โดยมีกลุ่มสมมาตรชนิด monoclinic มี space group C2 มี unit-cell parameters คือ  $a = 134.2848 \text{ \AA}$ ,  $b = 55.7365 \text{ \AA}$ ,  $c = 45.7163 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90.0^\circ$ ,  $\beta = 107.09^\circ$ ,  $\gamma = 90.0^\circ$  และ  $\text{volume} = 327066.6 \text{ \AA}^3$  มี 1 โมเลกุลของ pvDHFR ternary complex ในแต่ละ asymmetric unit และมี solvent content ประมาณ 58% โครงสร้างของ pvDHFR ได้ถูก solved ด้วยเทคนิค molecular replacement โครงสร้างที่ได้แสดงให้เห็นส่วนของ insert-1 และ insert-2 ของ plasmodium DHFR ที่มีลักษณะเป็น loop และ helix ตามลำดับ ลักษณะของ antifolate binding site ของ pvDHFR ที่แสดงให้เห็นว่า ser-117 มี side chain อยู่ใกล้กับ chlorine atom ของ pyrimethamine ทำให้สามารถอธิบายเกี่ยวกับ antifolate drug resistance ได้ ในการศึกษาที่เป็นไปได้ในระยะต่อไป จะเป็นการศึกษาโครงสร้างของ mutant เอนไซม์ ในการจับตัวกับ pyrimethamine รวมทั้งการศึกษการจับตัวของ pvDHFR กับยาในกลุ่ม antifolate ต่างๆ เป็นต้น เพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียที่ดีขึ้นต่อไป

In our chemical crystallographic structural investigation on bioactive compounds, over thirty crystal structures have been determined in our laboratory during the period of the TRF support. These bioactive compounds were from plants, microorganisms, synthetic chemistry and biotransformation processes. The crystal structural information, not only established the accurate chemical entity of the compounds of interests, but also provided geometrical features such as bond lengths, bond angles and spatial conformation. With the recent availability of modern X-ray detector in our laboratory, several detail studies of each particular compound can be carried out such as crystal polymorphism of cytotoxic cytochalasin D, conformational analysis of synthetic naphthoquinone esters, and diastereomeric mixtures of naphthopyrandiones. In addition to a conventional slow evaporation method used in crystallization, we developed other crystallization methods such as slow-cooling crystallization and vapor diffusion. In summary, our research efforts has firmly established x-ray crystallographic research in Thailand as indicated in our original research proposal.

Our research on macromolecular crystallography in the investigation of *Pseudomonas stutzeri* D-phenylglycine aminotransferase (D-PhgAT) and *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase(-thymidylate synthase), we have successfully expressed, purified, crystallized and determined the crystal structure of both enzymes. Both proteins were expressed in high quantity of over 10 milligrams. D-PhgAT, a pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme catalyzing a reversible transamination between D-phenylglycine and L-glutamate, was crystallized in the solution of ammonium sulfate at 4 °C over the period of two weeks. The crystal belonged to the trigonal space group of P3(1)21 with unit cell parameters of  $a = b = 75.155 \text{ \AA}$ ,  $c = 147.559 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$  and  $V = 721792 \text{ \AA}^3$ . With one molecule of D-PhgAT in the asymmetric unit, the solvent content was around 50%. A complete synchrotron x-ray data set was collected and processed to 2.2 Å resolution. Its crystal structure was determined using the molecular replacement technique. The structural model was built and has been refined to 2.4 Å resolution with over 90% of the polypeptide complete. The active site of the enzyme showed the PLP cofactor covalently linked to the catalytic lysine residue (Lys269) in a new orientation which may suggest a novel model of catalysis to explain the inversion of stereochemistry between the substrate and the product. However, the structural analysis of this protein still cannot be fully analyzed as a disorder problem was observed in a loop near the active site that is involved in the catalysis.

Our structural investigation of *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (pvDHFR-TS), a WHO's official target on antimalarial drug development, has yielded a crystal structure of the genetically engineered pvDHFR, the N-terminal domain of the bifunctional pvDHFR-TS. Previous biochemical studies revealed a point mutation of the DHFR gene was the cause of antifolate drug resistance in the field such as pyrimethamine and cycloguanil. We successfully expressed, purified and crystallized the bifunctional pvDHFR-TS but these crystals diffracted X-rays poorly to about 6.5-8 Å resolution, not good enough for structure determination. Despite our extensive efforts to improve the crystal's diffraction quality in many ways, no data sets with sufficient quality were collected. Our efforts on the genetically engineered pvDHFR domain, despite lower in its solubility than the natural bifunctional pvDHFR-TS, was also successfully crystallized and diffracted to high resolution beyond 2.0 Å. A ternary wild-type pvDHFR-NADPH-pyrimethamine was crystallized in polyethylene glycol 4000, pH 6.0-8.5 in various buffers at 4 °C. The crystal belonged to the monoclinic space group, C2 with unit cell parameters of  $a = 136.53 \text{ \AA}$ ,  $b = 55.61 \text{ \AA}$ ,  $c = 45.75 \text{ \AA}$  and  $\beta = 107.46^\circ$ . Complete data sets were collected at Daresbury synchrotron laboratory and at the CPSF to about 1.8 Å resolution with good data statistics. The crystal structure of pvDHFR was determined using the molecular replacement technique. The model was building and has been refined to 1.8 Å resolution with R-factor around 20% (25% R-free) with good geometries. The Insert-1 region adopted a loop with high mobility and the Insert-2 region adopted a helical structure. A region of 20-residue near the Insert-2 was disordered and not included in the final structure. The binding site of the enzyme revealed the NADPH cofactor and a well-defined pyrimethamine. In the crystal structure, ser117 was in proximity of the chlorine atom of the pyrimethamine. The larger side chain of asparagine at 117, a commonly found mutation in drug-resistant parasite, would interfere with the optimum drug binding and, hence, worsen the binding affinity of pyrimethamine by 300-1200 folds. The findings in this structural investigation of plasmodial DHFR have provided a better understanding of the enzyme's function, drug resistance mechanism and would provide a strong basis in the rational inhibitor design to combat with malaria in the future.