

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อในเขตร้อนซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญมากของโลก ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อหลายร้อยล้านคนซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของผู้ป่วยมากกว่าล้านคน ผู้ป่วยที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ในแต่ละปีมีประมาณ 80-100 ล้านคน โดยการรายงานว่าเชื้อเริ่มดื้อต่อไพริเมทาซิน คลอโรควินรวมทั้งไพริเมทาซินทำให้ปัญหาของโรคมาลาเรียรุนแรงขึ้น เอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) ของเชื้อ *Plasmodium vivax* ถูกยับยั้งด้วยยาไพริเมทาซินและไซโคลกัวนิล ผลจากการกลายพันธุ์ในบริเวณ active site ของเอนไซม์ DHFR ทำให้การจับกับตัวยับยั้งลดลง การศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ในการวิจัยนี้ เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจที่ดีขึ้นเกี่ยวกับกลไกการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย

เอนไซม์ PvDHFR ตกผลึกในสารละลาย polyethylene glycol MW4000 ที่ pH 7.2 ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับ NADPH และยาไพริเมทาซิน ผลึกที่ได้มีกลุ่มสมมาตรชนิด monoclinic C2 มี cell parameters: $a = 136.53 \text{ \AA}$, $b = 55.61 \text{ \AA}$, $c = 45.75 \text{ \AA}$ and $\beta = 107.46^\circ$ มีปริมาณ solvent 59% โครงสร้างของเอนไซม์หาได้โดยเทคนิค molecular replacement ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอันตรกิริยาระหว่างยาไพริเมทาซินที่จับกับเอนไซม์ด้วยพันธะไฮโดรเจน (Asp-53, Ile13, Ile-173) π - π interactions (Phe-57) และมีแรงแรงแคตวาล์วในส่วน of p-chlorophenyl กับ NADPH และมีพันธะไฮโดรเจนระหว่าง p-chlorine และ Ser-120 โดยได้ศึกษา เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาไพริเมทาซิน (SP21: Ser58Arg+Ser117Asn) ร่วมกับตัวยับยั้งหลายชนิด พบว่าผลจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Ser117→Asn ไปรบกวนการจับตัวของกลุ่ม p-chlorine ในตัวยาคือ phenyl ขยับไปจากตำแหน่งที่พบในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม การขยับนี้มีผลให้เสียพันธะไฮโดรเจนกับ Ser120

โครงสร้างผลึกของเอนไซม์ *P. vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (PvDHFR-TS) ได้รับการศึกษาที่ความละเอียด 3.5 Å เอนไซม์ PvDHFR-TS ตกผลึกในกลุ่มสมมาตรชนิด orthorhombic โดยมี cell parameters: $a = 62.366$, $b = 114.813$, $c = 198.901 \text{ \AA}$ และมีปริมาณ solvent ประมาณ 50% โดยมีสองโมเลกุลของเอนไซม์ PvDHFR-TS ในแต่ละ asymmetric unit ใช้เทคนิค molecular replacement ในการโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ PvDHFR-TS ซึ่งพบว่ามี space group คือ P2₁2₁2₁ ผลจากการศึกษาโครงสร้างของทั้งชนิด PvDHFR และ PvDHFR-TS ได้แสดงให้เห็นถึงกลไกการจับตัวของยาไพริเมทาซินกับเอนไซม์เป้าหมาย และแสดงให้เห็นถึงกลไกการดื้อยาที่จะนำไปสู่ประโยชน์ในการออกแบบยารักษาโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นต่อไป

Malaria is a major public health disease that affects over half a billion people worldwide with millions of death annually. Four species of Plasmodium parasites could infect human and *Plasmodium vivax* is responsible for 80 million cases per year. Chemotherapy against vivax malaria includes primaquine and chloroquine but not antifolate drugs such as pyrimethamine (Pyr), because its inherit resistance towards *P. vivax* has been commonly considered. This critical problem needs serious attention upon the emergence of resistance of the parasite to chloroquine. It has been recently demonstrated that wild-type *P. vivax* dihydrofolate reductase, (DHFR), a cellular target of antifolates approved by the WHO, be in fact sensitive to the inhibition by pyrimethamine, cycloguanils, and other antifolates. Mutant parasites, with the most common double mutant (SP21, (SP21, Ser-58 → Arg + Ser-117 → Asn), showed reduced affinities towards these antifolates by as much as 1,000 times, causing these drugs ineffective for *P. vivax* treatment. Previous biochemical studies revealed point mutations of the DHFR gene was the cause of antifolate drug resistance such as pyrimethamine and cycloguanil. To elucidate the detailed mechanism of the antifolate drug resistance in *P. vivax*, we investigated the three-dimension structures of both wild-type and mutant DHFRs by means of X-ray crystallography.

Our crystallographic investigation has yielded the 1.9 Å resolution crystal structure of the genetically engineered DHFR domain in complex with several inhibitors in both wild-type and mutant forms. Successful crystallization efforts of the ternary PvDHFR complex of the NADPH cofactor and the Pyr inhibitor, in PEG4000 at pH 7.2, yielded the monoclinic crystal with unit cell parameters of $a = 136.53$ Å, $b = 55.61$ Å, $c = 45.75$ Å and $\beta = 107.46^\circ$. The flash-frozen crystal diffracted beyond 2.0 Å resolution and data were measured from both in-house diffractometer and synchrotron radiation facilities. One copy of PvDHFR ternary complex occupied the asymmetric unit, corresponding to the solvent content of 59%. The protein structure was solved in the space group C2 by the molecular replacement method. The binding site of the enzyme revealed the NADPH cofactor and a well-defined pyrimethamine. Pyrimethamine interacted with the enzyme with extensive hydrogen bonds (Asp-53, Ile-13, Ile-173) and π - π interactions (Phe-57) in the pyrimidine ring and van de Waals interaction in the p-Cl phenyl ring (NADPH) and a weak hydrogen bond between p-chlorine atom and Ser-120's OH group. In the wild-type PvDHFR crystal structure, Ser-117 was in close proximity of the chlorine atom of the pyrimethamine. To understand the basis of pyrimethamine drug resistance, crystal structures of the double mutant SP21 PvDHFR-pyrimethamine complex (with Pyr and des-chloropyrimethamine) were investigated. Comparison of the crystal structures of PvDHFR from wild-type and the Pyr-resistant strain as complexes with NADPH and Pyr or its analog lacking p-Cl (Pyr20) clearly shows that the steric conflict arising from the side chain of Asn-117 in the mutant enzyme, accompanied by the loss of binding to Ser-120, is mainly responsible for the reduction in binding of Pyr. Pyr20 still effectively inhibits both the wild-type and SP21 proteins, and the x-ray structures of these complexes show how Pyr20 fits into both active sites without steric strain.

The long-awaited crystal structure of *P. vivax* DHFR-TS has been determined. The protein crystallized in the orthorhombic space group with cell parameters of $a = 62.366$, $b = 114.813$, $c = 198.901$ Å. The calculated solvent content was 50% with two copies of PvDHFR-TS in each asymmetric unit. The structure was solved by molecular replacement in the space group P2₁2₁2₁ and the current resolution is 3.5 Å resolution. These 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.