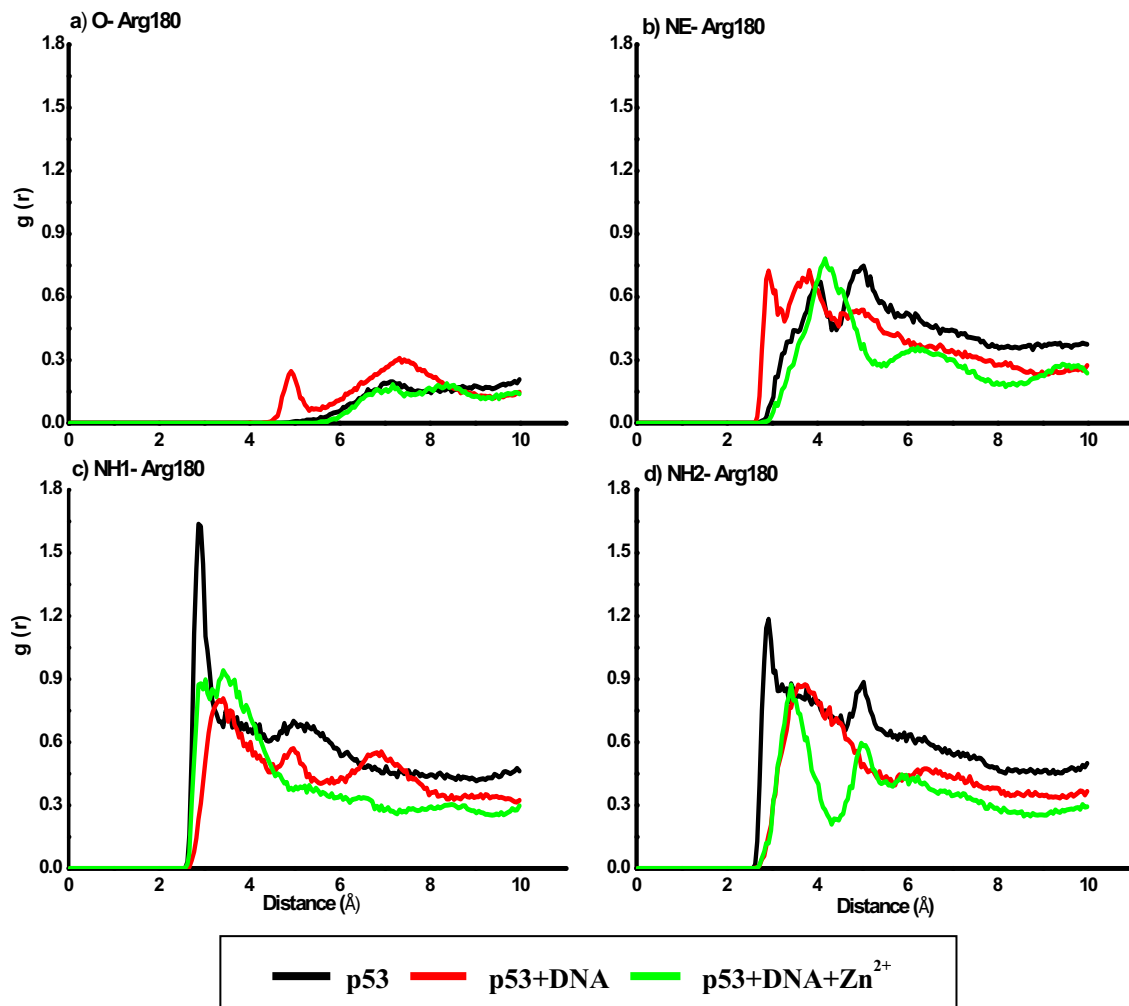


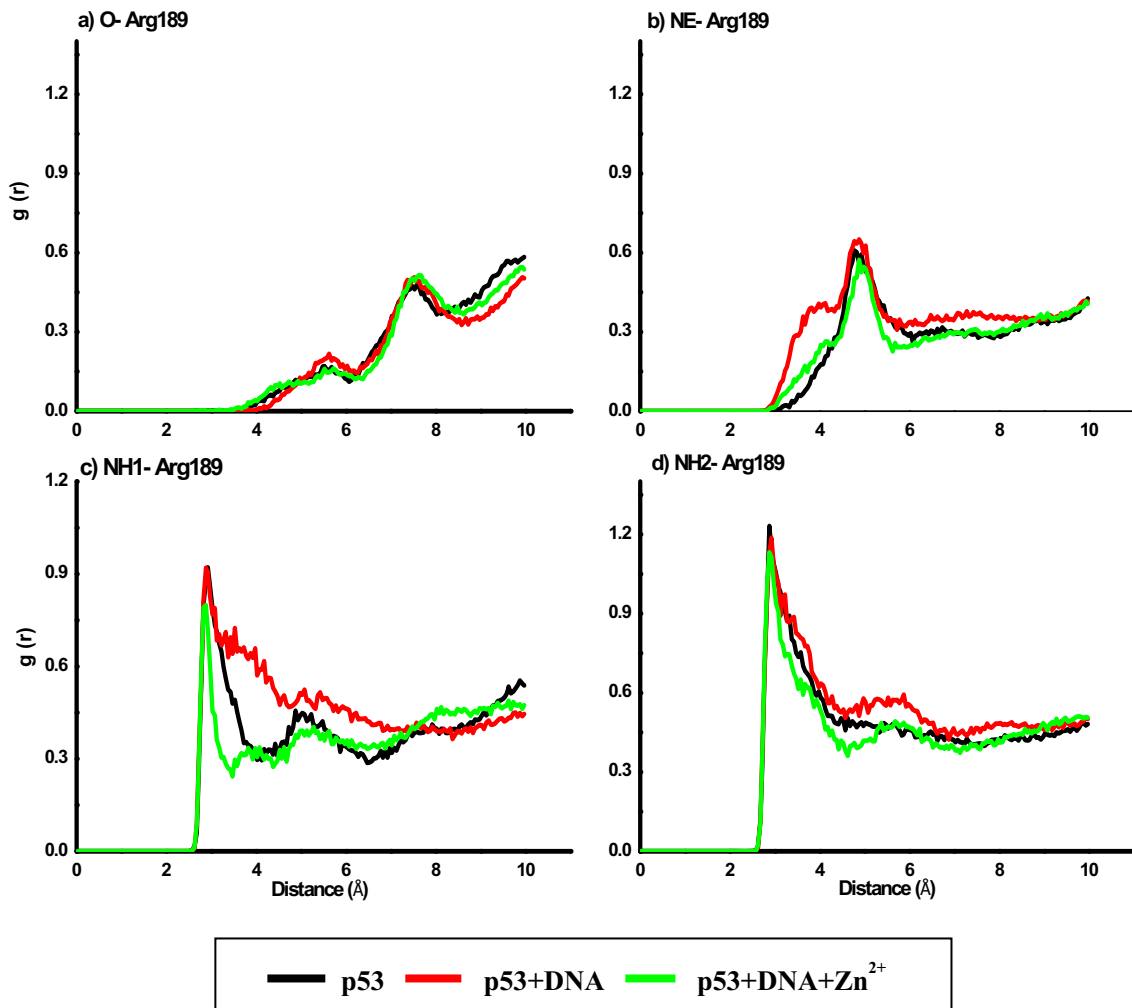
● Arginine ลำดับที่ 180 ของโปรตีน p53 (Arg180)



รูปที่ 50 กราฟ RDF ของโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบอะตอมของ Arg180

จากกราฟรูปที่ 50 แสดงให้เห็นว่ารอบๆ อะตอม NE, NH1 และ NH2 ของทั้ง 3 ระบบพบน้ำในลักษณะเดียวกันโดยพบที่รัศมี 2.5 Å แต่ก็มีลักษณะที่เป็น bulk ซึ่งโมเลกุลของน้ำสามารถเคลื่อนที่เข้า-ออกได้ตลอดเวลาในขณะที่อะตอม O พบน้ำที่รัศมีมากกว่า 4 Å ซึ่งเป็นน้ำที่ไม่มีความสำคัญจึงไม่นำไปวิเคราะห์ผลต่อ

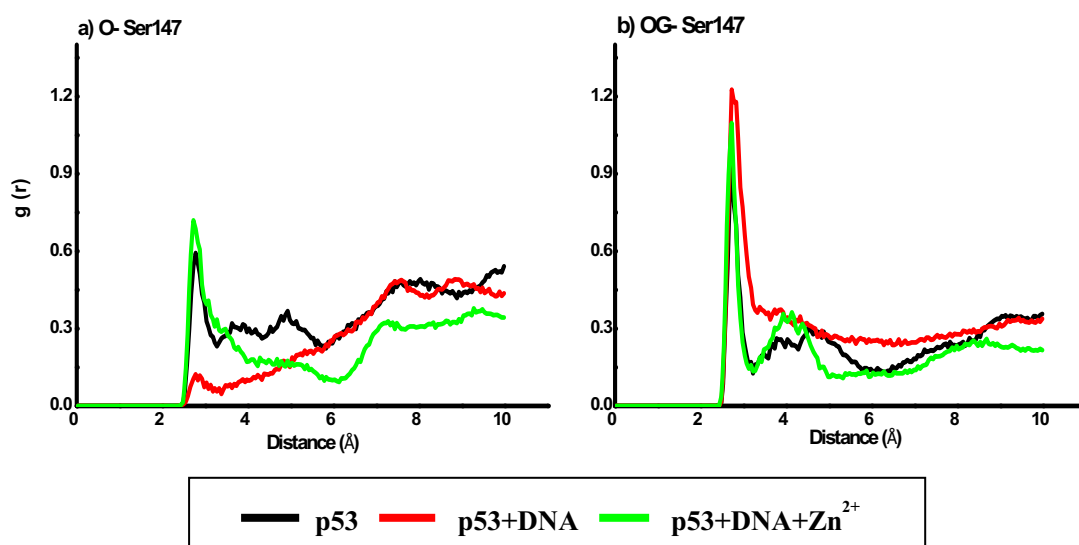
● Arginine ลำดับที่ 189 ของโปรตีน p53 (Arg189)



รูปที่ 51 กราฟ RDF ของโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบอะตอมของ Arg189

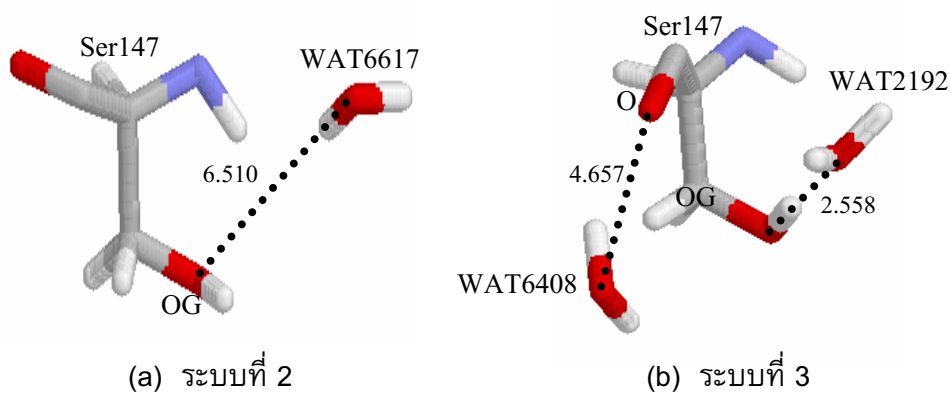
จากกราฟรูปที่ 51 แสดงให้เห็นว่ารอบๆ อะตอม NH1 และ NH2 ของทั้ง 3 ระบบพบน้ำในลักษณะเดียวกันโดยพบที่รัศมี 2.5 Å แต่น้ำมีลักษณะที่เป็น bulk ซึ่งโมเลกุลของน้ำสามารถเคลื่อนที่เข้า-ออกได้ตลอดเวลาในขณะที่อะตอม NE, O พบน้ำที่รัศมีมากกว่า 4 Å ซึ่งเป็นน้ำที่ไม่มีความสำคัญจึงไม่นำไปวิเคราะห์ผลต่อ

● Serine ลำดับที่ 147 ของโปรตีน p53 (Ser147)

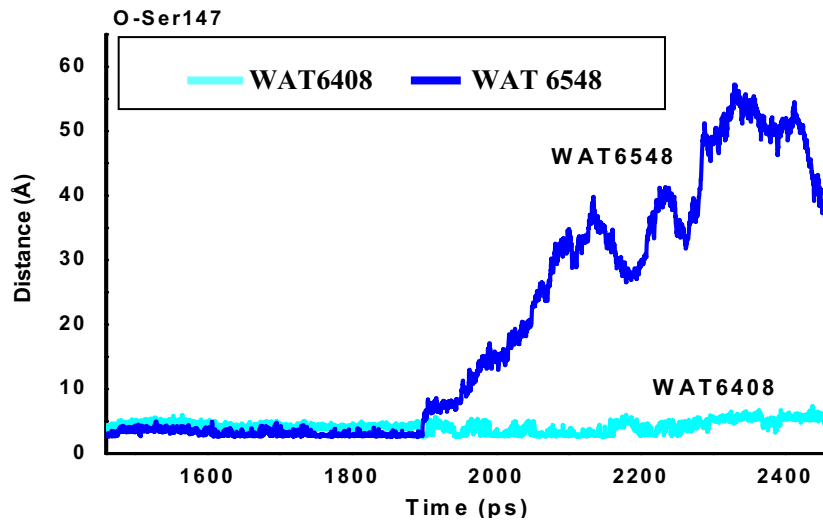


รูปที่ 52 กราฟ RDF ของโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบอะตอม Ser147

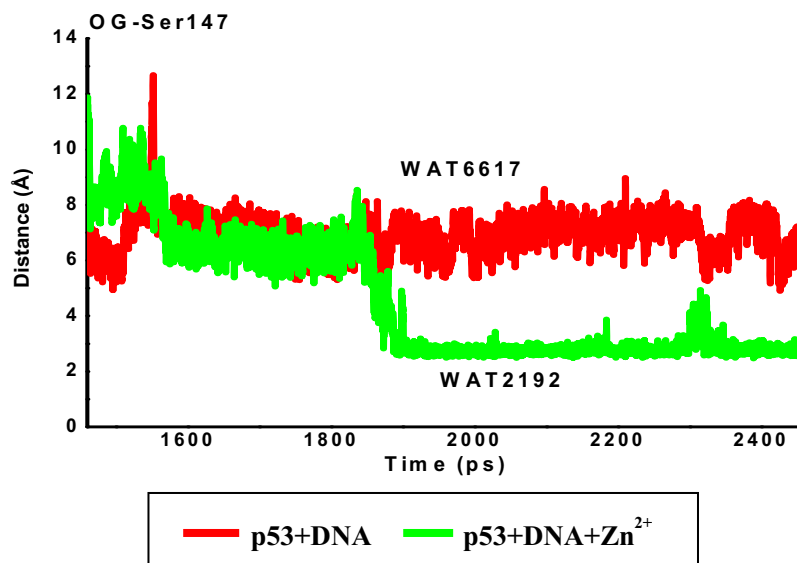
จากกราฟรูปที่ 52 แสดงให้เห็นว่ารอบๆ อะตอม O และ OG ของทั้ง 3 ระบบจะพบน้ำในลักษณะที่เหมือนกัน จากรูปที่ 52(a) ระบบที่ 1 และ 2 พบน้ำในบริเวณใกล้เคียงอะตอม O ที่รัศมี 2.5 Å แต่เป็นน้ำที่มีลักษณะเป็น bulk ในขณะที่ระบบที่ 3 จะพบน้ำในลักษณะที่เป็นชั้นน้ำ เมื่อวิเคราะห์พบน้ำลำดับที่ 6408 ดังแสดงในรูปที่ 53 เมื่อวิเคราะห์หาระยะห่างระหว่าง O ของโมเลกุลน้ำกับ O ของ Ser147 จะได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 54 และจากรูปที่ 52(b) จะเห็นว่าทั้ง 3 ระบบ พบน้ำในลักษณะที่เป็นชั้นน้ำที่รัศมี 2.5 Å โดยระบบที่ 1 เมื่อนำมาวิเคราะห์ไม่สามารถระบุตำแหน่งของน้ำได้ ในขณะที่ระบบที่ 2 และ 3 สามารถระบุตำแหน่งน้ำได้ ซึ่งระบบที่ 2 พบน้ำลำดับที่ 6617 และระบบที่ 3 พบน้ำลำดับที่ 2192 ดังแสดงในรูปที่ 53 เมื่อวิเคราะห์หาระยะห่างระหว่าง O ของโมเลกุลน้ำกับ OG ของ Ser147 จะได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 55



รูปที่ 53 ตำแหน่งโมเลกุลน้ำที่พบในบริเวณรอบๆ อะตอมของ Ser147

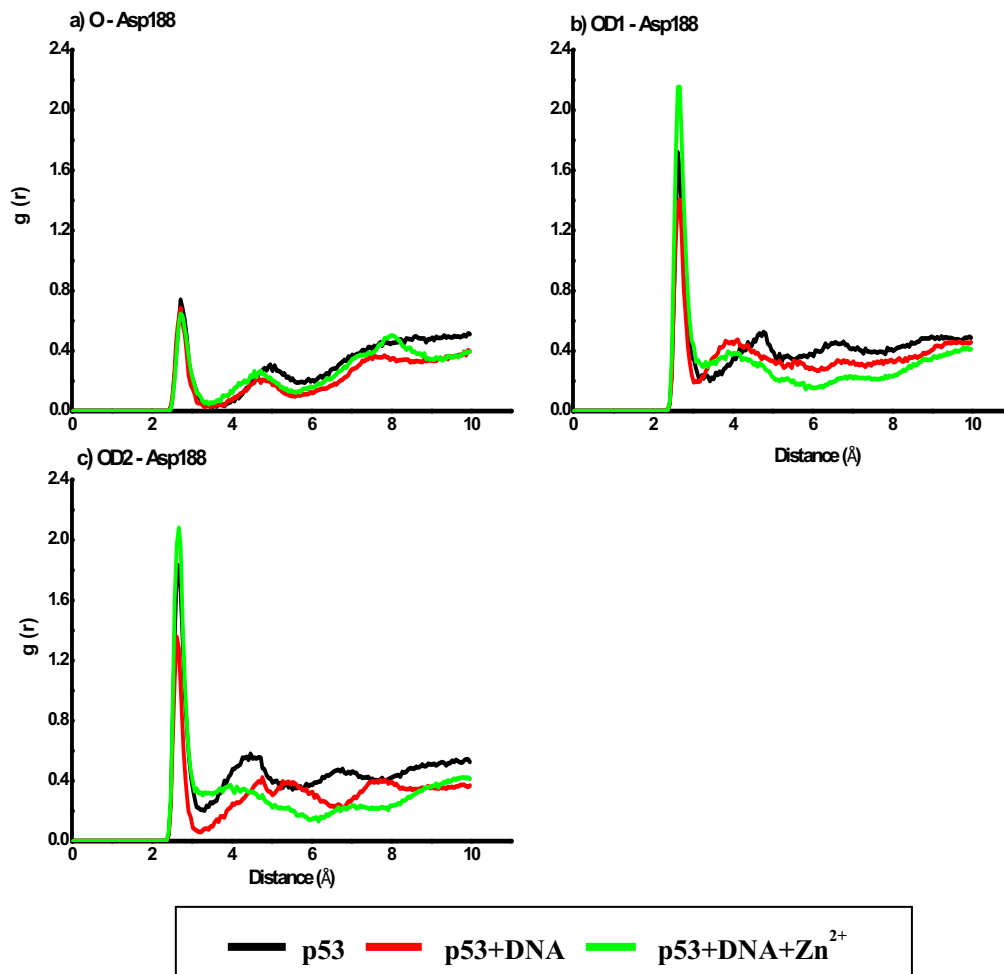


รูปที่ 54 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่างอะตอม O ของน้ำ กับอะตอม O ของ Ser147 ในระบบที่ 3 เทียบกับเวลา



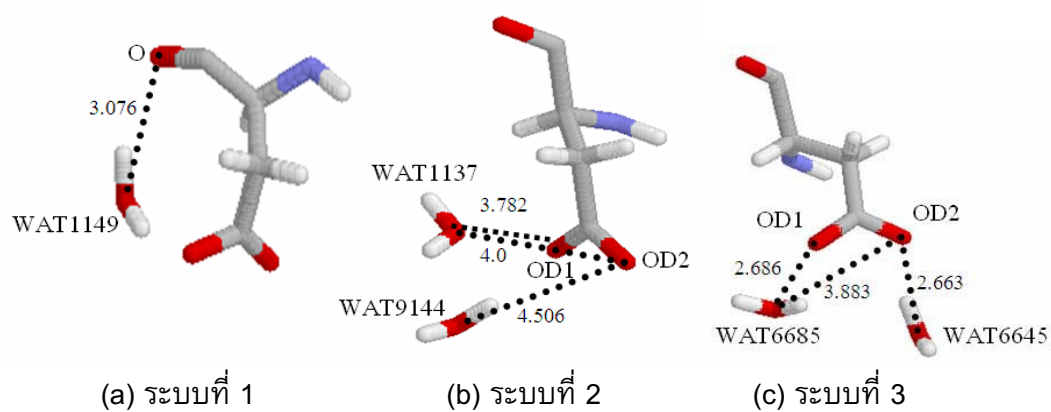
รูปที่ 55 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่างอะตอม O ของน้ำ กับอะตอม OG ของ Ser147 เทียบกับเวลา

● Aspartic acid ลำดับที่ 188 ของโปรตีน p53 (Asp188)

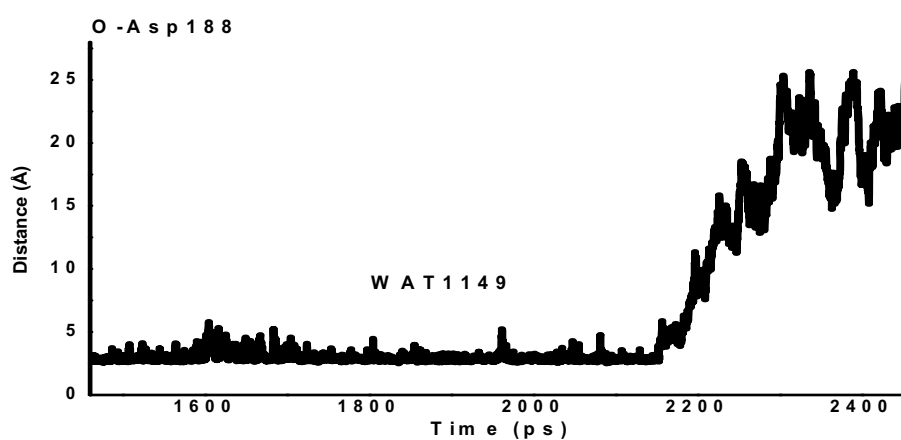


รูปที่ 56 กราฟ RDF ของโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบอะตอม Asp188

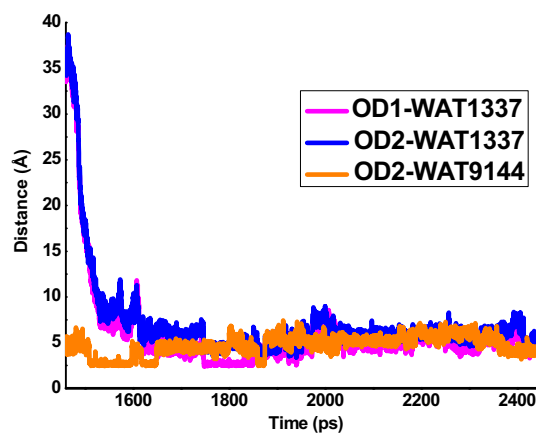
จากกราฟรูปที่ 56 แสดงให้เห็นว่ารอบๆ อะตอม O, OD1 และ OD2 ของทั้ง 3 ระบบจะพบ น้ำในลักษณะที่เหมือนกัน จากรูปที่ 56(a) จะเห็นว่าทั้ง 3 ระบบ พบน้ำในลักษณะที่เป็นชั้นน้ำ ที่รัศมี 2.5 Å โดยระบบที่ 2 และ 3 เมื่อนำมาวิเคราะห์ไม่สามารถระบุตำแหน่งได้ ขณะที่ระบบที่ 1 พบน้ำลำดับที่ 1149 ดังแสดงในรูปที่ 57 เมื่อวิเคราะห์หาระยะห่างระหว่าง O ของน้ำกับ O ของ Asp188 จะได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 58 ในขณะที่รูปที่ 56(b), (c) พบว่าทั้ง 3 ระบบ พบน้ำ ในลักษณะที่เป็นชั้นน้ำที่รัศมี 2.5 Å โดยระบบที่ 1 เมื่อนำมาวิเคราะห์ไม่สามารถระบุตำแหน่งได้ ในขณะที่ระบบที่ 2 พบน้ำที่เข้ามาใกล้อะตอม OD1 และ OD2 คือน้ำลำดับที่ 1137, 9144 ตามลำดับ และ ระบบที่ 3 พบน้ำที่เข้ามาใกล้อะตอม OD1 และ OD2 คือน้ำลำดับที่ 6685, 6645 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 57 เมื่อวิเคราะห์หาระยะห่างระหว่าง O ของน้ำกับ O ของ OD1 และ OD2 ของ Ser147 จะได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 59 และรูปที่ 60 ตามลำดับ



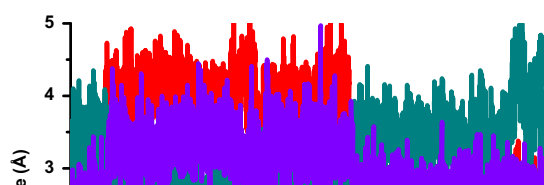
รูปที่ 57 ตำแหน่งโมเลกุลน้ำที่พบรอบๆ อะตอมของ Asp188



รูปที่ 58 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่างอะตอม O ของน้ำกับอะตอม O ของ Asp188 ในระบบที่ 1 เทียบกับเวลา



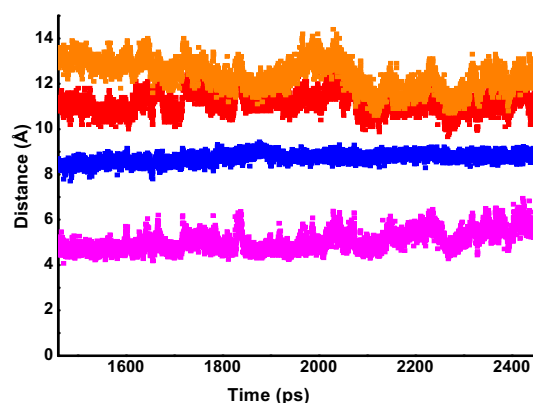
รูปที่ 59 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่างอะตอม O ของน้ำกับอะตอม O, OD1, OD2 ของ Asp188 ในระบบที่ 2 เทียบกับเวลา



รูปที่ 60 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่างอะตอม O ของน้ำ
กับอะตอม OD1, OD2 ของ Asp188 ระบบที่ 3 เทียบกับเวลา

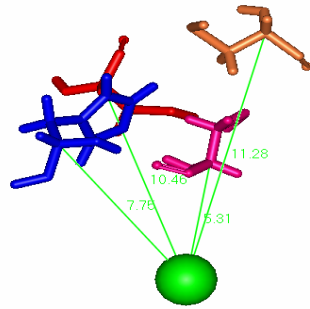
8. ระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} กับอะตอมที่ล้อมรอบ

จากโครงสร้าง x-ray crystallography พบว่ากรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบ Zn^{2+} มี 4 ตำแหน่งคือ ได้แก่ Cys83, His86, Cys145 และ Cys149 เมื่อวิเคราะห์หาระยะห่างระหว่าง Zn^{2+} กับอะตอมคาร์บอนแอลฟา (CA) ของ Cys83, His86, Cys145 และ Cys149 จะได้ค่าเท่ากับ 4.27, 4.53, 3.75 และ 4.57 ตามลำดับ เมื่อนำโครงสร้างจากการศึกษาด้วยวิธี MD simulation มาหาระยะห่างอีกครั้ง จะได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 61 พบว่ากรดอะมิโน ณ ตำแหน่ง Cys83 มีระยะห่างคงที่เท่ากับ โครงสร้าง x-ray crystallography ในขณะที่ His86, Cys145 และ Cys149 มีระยะห่างที่เพิ่มขึ้นกว่า โครงสร้าง x-ray crystallography ดังรูปที่ 62 ซึ่งแสดงว่า Zn^{2+} มีการเคลื่อนที่ออกจากตำแหน่งยึดจับของ Zn^{2+} เดิม



รูปที่ 61 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่าง Zn^{2+}

กับ CA ของ Cys83 (—), His86(—), Cys145(—) และ Cys149(—) เทียบกับเวลา

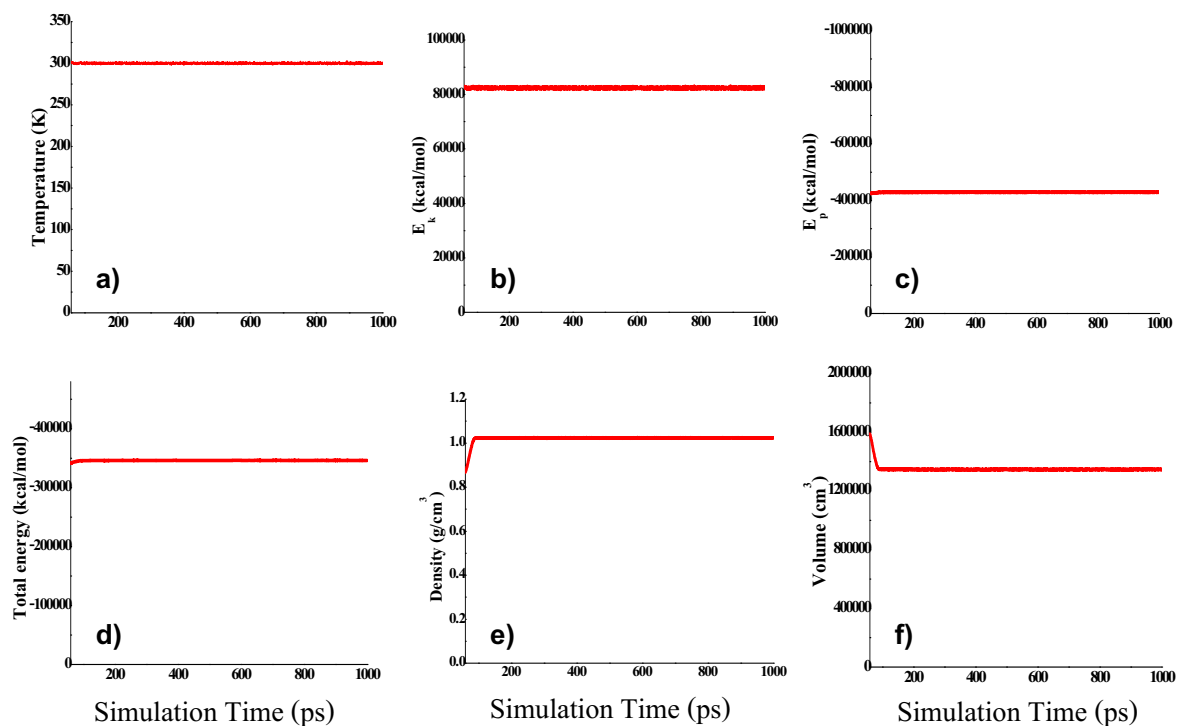


รูปที่ 62 ระยะห่างระหว่าง Zn^{2+} กับ CA ของ Cys83, His86, Cys145 และ Cys149
ที่ได้จากการทำ MD simulation

ตอนที่ 2 การศึกษา MD simulation ของ tetramer p53 ในส่วนที่เป็น core domain

1. สภาวะของระบบ

การวิเคราะห์สภาวะสมดุลของระบบจะทำการวิเคราะห์หาค่าอุณหภูมิ, พลังงานจลน์, พลังงานศักย์, พลังงานรวม, ความหนาแน่น และปริมาตรของระบบในระหว่างการทำ MD simulation ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

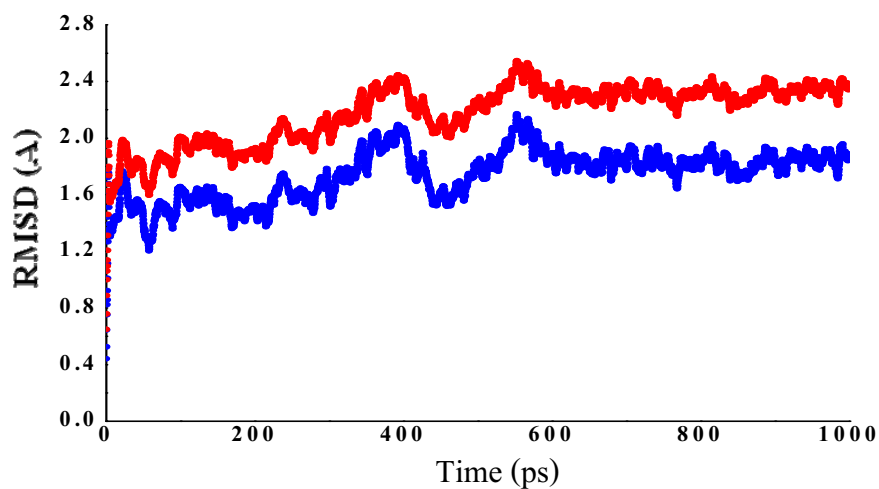


รูปที่ 63 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (a) อุณหภูมิ (b) พลังงานจลน์ (c) พลังงานศักย์
(d) พลังงานรวม (e) ความหนาแน่น และ (f) ปริมาตรของระบบ เปรียบเทียบกับเวลา

จากรูปที่ 63 แสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน p53 เข้าสู่ภาวะสมดุลเรียบร้อยแล้วสังเกตได้จากค่าอุณหภูมิ, พลังงานศักย์, พลังงานจลน์, พลังงานรวม, ความหนาแน่น และปริมาตรของระบบมีค่าคงที่ตลอดช่วงการทำ MD simulation ซึ่งจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิ (T) ของระบบจะมีค่าเท่ากับ 300 K, พลังงานศักย์มีค่า 80000 kcal/mol, พลังงานจลน์มีค่า - 400000 kcal/mol, พลังงานรวมมีค่า - 350000 kcal/mol, ความหนาแน่นมีค่า 1.0 g/cm³ และปริมาตรมีค่า 1300000 cm³

2. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน p53

ก่อนที่จะนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปวิเคราะห์หาปริมาณต่างๆจะต้องตรวจสอบก่อนว่าระบบที่ทำการศึกษามีความเสถียรหรือไม่ โดยพิจารณาจากค่า (RMSD) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีน p53 ณ เวลาใดๆ เปรียบเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น ซึ่งถ้าค่า RMSD คงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบ แสดงว่าระบบนั้นมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างน้อย ซึ่งถือว่าระบบมีความเสถียร ถ้าไม่คงที่แสดงว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำ MD simulation มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตลอดเวลา ซึ่งถือว่าระบบไม่เสถียร แต่ถ้าค่า RMSD มีค่ามากหมายความว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำ MD simulation กับโครงสร้างเริ่มต้นมีความแตกต่างกันมาก แต่ถ้าค่า RMSD มีค่าน้อยแสดงว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำ MD simulation ไม่แตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้น

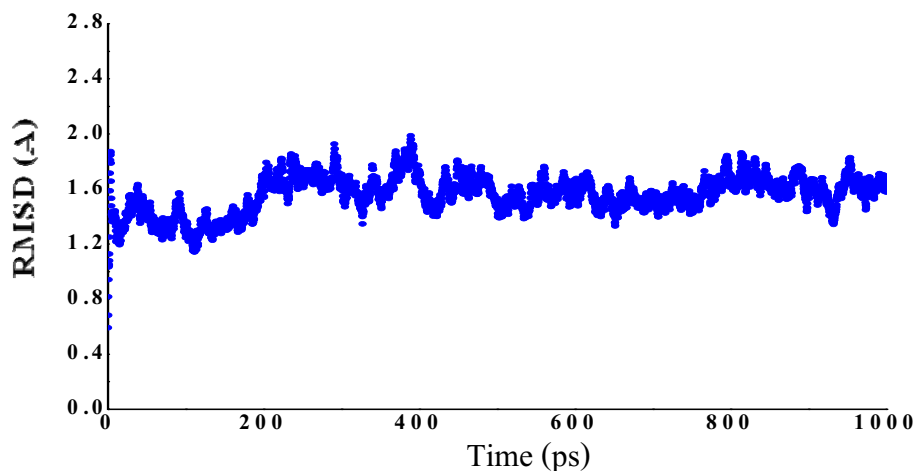


รูปที่ 64 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RMSD ของอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของโปรตีน p53 (สีน้ำเงิน) และอะตอมทั้งหมดของโปรตีน p53 (สีแดง) เทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 64 พบว่าค่า RMSD ของโปรตีน p53 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกซึ่งเป็นช่วงที่ทั้งระบบมีการเพิ่มอุณหภูมิและมีการปรับโครงสร้างเพื่อทำให้ระบบมีความเสถียรหลังจากที่โครงสร้างของระบบเข้าสู่ภาวะสมดุลแล้วจะพบว่าค่า RMSD จะมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบลงและมีค่าค่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่าระบบเข้าสู่ภาวะสมดุลแล้วในการวิเคราะห์สมบัติต่างๆของ

สารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน p53 จึงเลือกช่วงเวลา 760 - 1060 ps ซึ่งเป็นช่วงที่ระบบอยู่ในสภาวะสมดุล นอกจากนี้ยังพบว่าค่า RMSD ของทุกอะตอมของโปรตีน p53 มีค่ามากกว่าค่า RMSD ของอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของโปรตีน p53 ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาทุกอะตอมของโปรตีน p53 จะรวมเอา Side chain ของกรดอะมิโน ทำให้มีจำนวนอะตอมมากขึ้นและบริเวณ Side chain ยังสามารถหมุนหรือเปลี่ยนมุมพันธะได้ง่ายซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและส่งผลให้ค่า RMSD มากกว่าอะตอมที่เป็นสายโซ่หลัก ซึ่งประกอบด้วยอะตอม C, CA และ N อะตอมเท่านั้น

3. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA

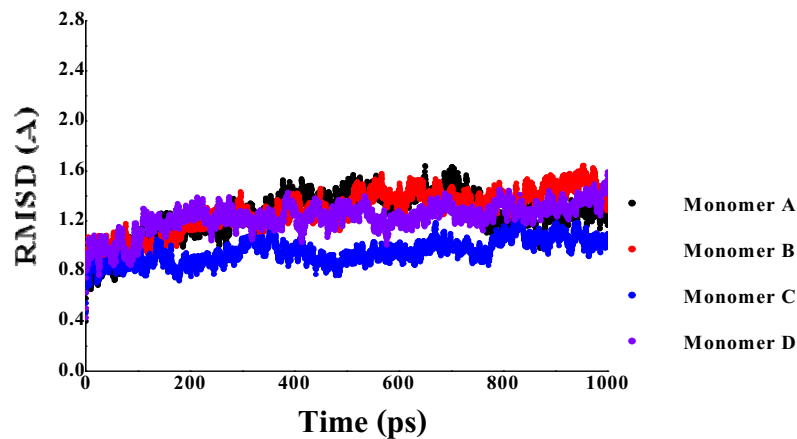


รูปที่ 65 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RMSD ของ DNA เทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 65 พบว่าค่า RMSD ของ DNA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกซึ่งเป็นช่วงที่ระบบมีการเพิ่มอุณหภูมิและการปรับโครงสร้างเพื่อให้ระบบมีความเสถียรหลังจากที่โครงสร้างของระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลแล้วจะพบว่าค่า RMSD จะมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบลง และมีค่าค่อนข้างคงที่ เช่นเดียวกับโปรตีน p53

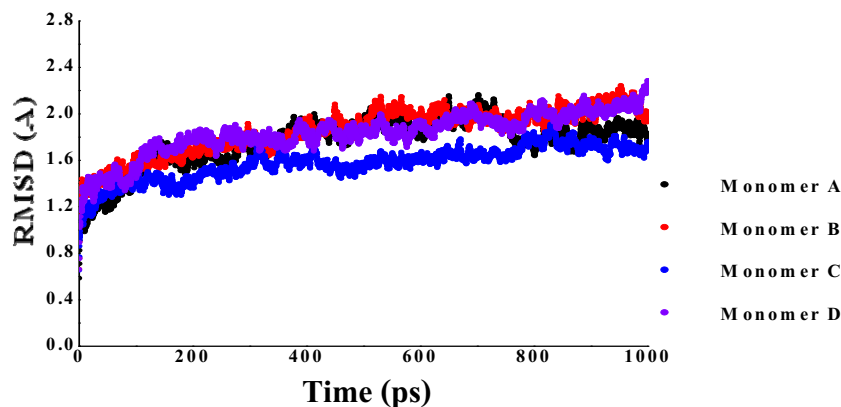
4. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน p53 แต่ละโมโนเมอร์

จากการคำนวณหาค่า RMSD ของโปรตีน p53 แต่ละโมโนเมอร์จะได้ผลการทดลองดังกราฟในรูปที่ 66 - 67



รูปที่ 66 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RMSD ของอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของโปรตีน p53 แต่ละโมโนเมอร์เทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 66 จะเห็นได้ว่าค่า RMSD ของอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของโปรตีน p53 ในช่วงแรกมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นในช่วงเวลา 760 - 1060 ps ค่า RMSD ของแต่ละโมโนเมอร์จะค่อนข้างคงที่ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าทั้ง 4 โมโนเมอร์ จะมีค่า RMSD ที่ใกล้เคียงกันโดยโมโนเมอร์ C จะมีค่า RMSD น้อยที่สุด แสดงว่าโปรตีน p53 แต่ละโมโนเมอร์มีโครงสร้างคล้ายกันและแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นใกล้เคียงกัน โดยโมโนเมอร์ C จะมีการเปลี่ยนแปลงจากโครงสร้างเริ่มต้นน้อยที่สุด

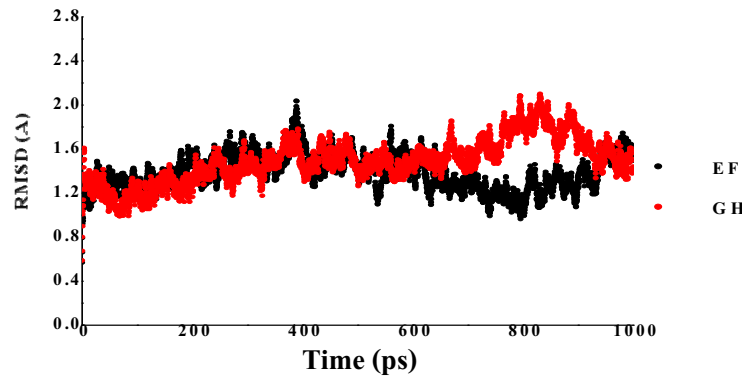


รูปที่ 67 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RMSD ของอะตอมทั้งหมดของโปรตีน p53 แต่ละโมโนเมอร์เทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 67 จะเห็นได้ว่าค่า RMSD ของทุกอะตอมของโปรตีน p53 จะมีลักษณะคล้ายกับการศึกษา RMSD ของอะตอมสายโซ่หลักของโปรตีน p53 ในรูปที่ 66 เพียงแต่ในรูปที่ 67 ค่า RMSD จะมีค่ามากกว่าเนื่องจากการศึกษาอะตอมทั้งหมด ซึ่งจะรวมเอา Side chain ของกรดอะมิโนด้วย ทำให้จำนวนอะตอมมากขึ้น ค่า RMSD ในรูปที่ 67 จึงมากกว่ารูปที่ 66

5. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA แต่ละคู่สาย

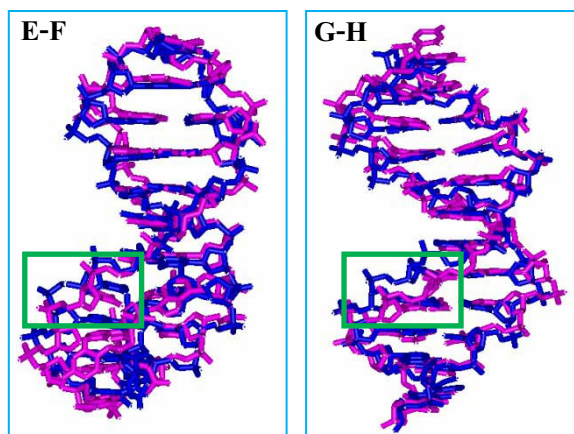
จากการคำนวณหาค่า RMSD ของ DNA แต่ละคู่สายได้ผลการทดลองดังรูปที่ 68



รูปที่ 68 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RMSD ของ DNA แต่ละคู่สายเทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 68 แสดงให้เห็นค่า RMSD ของ DNA ในแต่ละคู่ คือ สาย E-F ที่อยู่ระหว่างโมโนเมอร์ A กับ B และ สาย G-H ที่ยึดจับอยู่ระหว่างโมโนเมอร์ C กับ D ในช่วงแรกโครงสร้าง DNA ทั้ง 2 คู่สายมีค่า RMSD ใกล้เคียงกัน แสดงว่าในช่วงแรกโครงสร้าง DNA ทั้ง 2 คู่สายมีโครงสร้างใกล้เคียงกันหรือเหมือนกันแต่ในช่วงเวลา 760 - 1060 ps พบว่าค่า RMSD ของทั้ง 2 คู่สายมีค่าแตกต่างกัน โดยคู่สาย G-H จะมีค่า RMSD มากกว่าคู่สาย E-F โดยคู่สาย G-H มีค่า RMSD อยู่ในช่วง 1.5 - 2.0 Å ในขณะที่คู่สาย E-F มีค่า RMSD อยู่ในช่วง 1.0 - 1.6 Å ซึ่งแสดงว่าโครงสร้างของ DNA ทั้ง 2 คู่สายในช่วงเวลาดังกล่าวมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน

จากค่า RMSD ที่แตกต่างกัน ทางคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาต่อเพื่อดูว่าโครงสร้าง DNA ทั้ง 2 คู่สายมีความแตกต่างกันอย่างไร โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้าง DNA ที่ได้จาก X-ray กับโครงสร้าง DNA ที่ได้จากการศึกษา MD simulation เวลา 950 ps ทั้ง 2 คู่สาย ด้วยโปรแกรม spdvb ซึ่งจะนำโครงสร้างทั้ง 2 มาซ้อนทับกันเพื่อเปรียบเทียบดูความแตกต่างของโครงสร้างทั้งสอง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 69



รูปที่ 69 การเปรียบเทียบโครงสร้างเริ่มต้น (สีน้ำเงิน) ของ DNA กับโครงสร้างที่ได้จากการศึกษา MD simulation ในช่วงเวลา 750 - 950 ps (สีชมพู) ของทั้ง 2 คู่สาย

จากกราฟรูปที่ 69 จะเห็นได้ว่าโครงสร้าง DNA ทั้ง 2 คู่สาย เมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างโครงสร้าง DNA เริ่มต้น กับโครงสร้าง DNA ที่ได้จากการศึกษา MD simulation ที่เวลา 950 ps พบว่าทั้ง 2 คู่สายซ้อนทับกับโครงสร้างเริ่มต้นไม่สนิท โดยคู่สาย E-F จะคล้ายกับโครงสร้างเริ่มต้นมากกว่าคู่สาย G-H ซึ่งจะได้เห็นได้ชัดเจนบริเวณกรอบสี่เหลี่ยมในรูปที่ 69 ทำให้ค่า RMSD ของคู่สาย E-F น้อยกว่าคู่สาย G-H

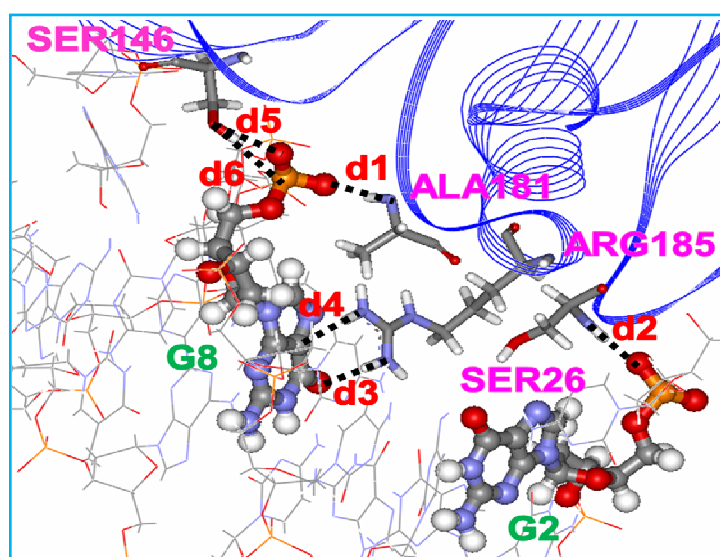
6. พันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA

การวิเคราะห์หาพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA จะกระทำโดยการให้โปรแกรมค้นหาพันธะไฮโดรเจนที่กำหนดให้โดยจะกำหนดให้โปรตีน p53 เป็นตัวรับโปรตอน (proton acceptor) และ DNA เป็นตัวให้โปรตอน (proton donor) และทำการสลับให้ DNA เป็นตัวรับโปรตอน (proton acceptor) และโปรตีน p53 เป็นตัวให้โปรตอน (proton donor) เพื่อให้สามารถค้นหาพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA ได้ครบถ้วน นอกจากนี้ยังได้กำหนดให้ค่ามุมของพันธะไฮโดรเจนอยู่ระหว่าง 120 - 180 องศา และความยาวของพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่า 4 Å โดยศึกษาในช่วงเวลา 760 - 1060 ps

ตารางที่ 2 แสดงพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA

Donor (DNA)		Acceptor (Protein)			% Occupied
20@O2P	G8F	229@H	229@N	ALA181A	100
8@O2P	G8E	422@H	422@N	ALA181B	99.83
32@O2P	G8G	615@H	615@N	ALA181C	99.62
44@O2P	G8H	808@H	808@N	ALA181D	99.92
2@O2P	G2E	74@H	74@N	SER26A	99.74
14@O1P	G2F	266@H	266@N	LYS25B	99.55
38@O2P	G2H	459@H	459@N	LYS25C	99.11
26@O2P	G2G	652@H	652@N	LYS25D	99.68
20@O6	G8F	233@HH12	233@NH1	ARG185A	99.74
8@O6	G8E	426@HH12	426@NH1	ARG185B	99.26
32@O6	G8G	619@HH12	619@NH1	ARG185C	100
44@O6	G8H	812@HH12	812@NH1	ARG185D	90.87
20@C5	G8F	233@HH22	233@NH2	ARG185A	95.82
8@C5	G8E	426@HH22	426@NH2	ARG185B	97.75
32@C6	G8G	619@HH12	619@NH1	ARG185C	92.87
44@C6	G8H	812@HH12	812@NH1	ARG185D	97.56
20@O1P	G8F	194@HG	194@OG	SER146A	97.69

Donor (DNA)		Acceptor (Protein)			% Occupied
8@O1P	G8E	385@HD22	385@ND2	ASN144B	100
32@O1P	G8G	580@HG	580@OG	SER146C	97.17
44@O1P	G8H	773@HG	773@OG	SER146D	97.17
20@P	G8F	194@HG	194@OG	SER146A	99.23
8@P	G8E	385@HD22	385@ND2	ASN144B	98.78
32@P	G8G	580@HG	580@OG	SER146C	92.16
44@P	G8H	773@HG	773@OG	SER146D	94.22

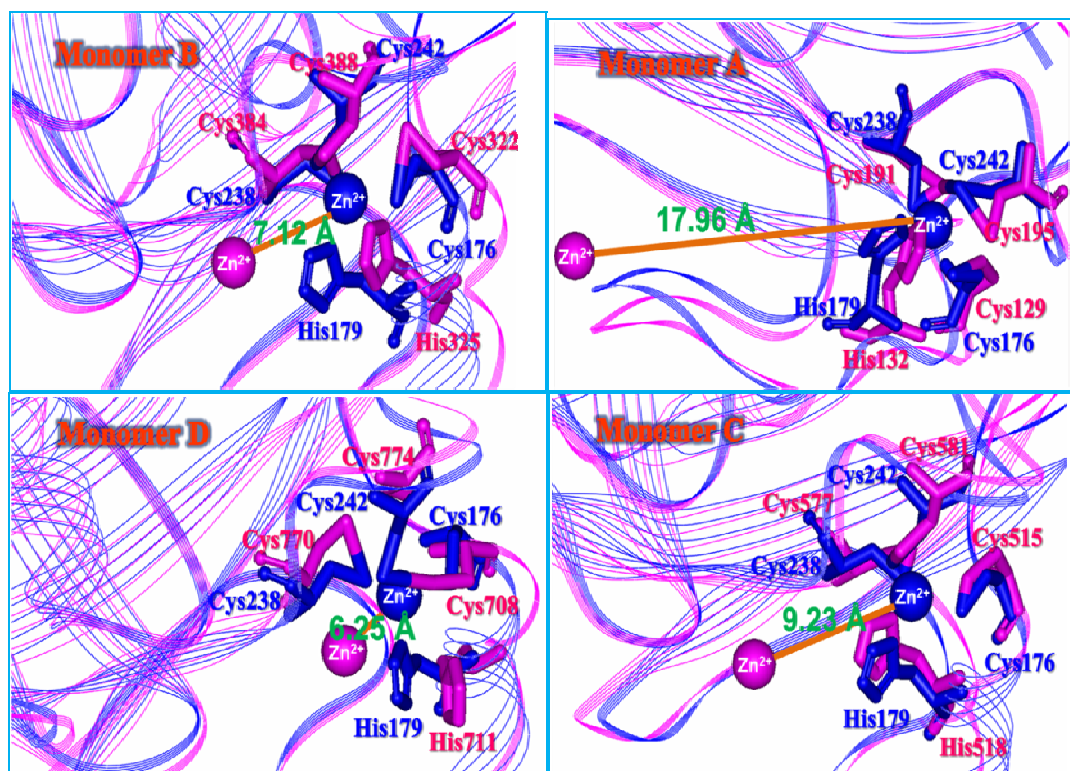


รูปที่ 70 พันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA โมโนเมอร์ A

จากการวิเคราะห์หาพันธะไฮโดรเจนที่ยึดจับระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA พบว่ามีพันธะไฮโดรเจนจำนวนมากที่ยึดจับกับโปรตีน p53 กับ DNA คณะผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาเฉพาะพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นมากกว่า 90 % ของเวลาที่ทำ MD simulation ดังแสดงในตารางที่ 2 จากการศึกษาพบพันธะไฮโดรเจนทั้งหมด 6 พันธะ โดยพันธะไฮโดรเจนทั้ง 6 พันธะจะยึดจับกันระหว่าง DNA ทั้งหมด 2 ตำแหน่ง คือ DNA ลำดับที่ 2 และ 8 ของแต่ละสายยึดจับโปรตีน p53 ทั้ง 4 โมโนเมอร์ จากตารางที่ 2 สัญลักษณ์ G2E คือเบส (guanine, G) ของ DNA สาย E ที่ยึดจับกับโปรตีน p53 ลำดับที่ 26, 146, 181 และ 185 ของแต่ละโมโนเมอร์ของโปรตีน p53 ซึ่งช่วยทำให้โปรตีน p53 ยึดจับกับ DNA ได้แข็งแรงขึ้น จากตารางที่ 2 พบว่าสัญลักษณ์ G2E คือเบส (guanine, G) ของ DNA สาย E จับกับ SER26A คือกรดอะมิโน Serine ลำดับที่ 26 ของโมโนเมอร์ A โดยลักษณะของพันธะไฮโดรเจนได้แสดงดังรูปที่ 70 ซึ่งกำหนดพันธะไฮโดรเจนด้วยสัญลักษณ์ d1-d6

7. ตำแหน่งของไอออน Zn^{2+} ในโปรตีน p53 แต่ละโมโนเมอร์

การวิเคราะห์ตำแหน่งของไอออน Zn^{2+} ก่อนและหลังการศึกษาด้วย MD simulation ทั้ง 4 โมโนเมอร์ด้วยโปรแกรม spdvb ซึ่งจะทำให้การเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างจากเทคนิค X-ray crystallography กับโครงสร้างสุดท้ายของการทำ MD simulation โดยการนำโครงสร้างทั้ง 2 มาซ้อนทับกันเพื่อเปรียบเทียบดูของตำแหน่งของไอออน Zn^{2+} ในโครงสร้าง ดังรูปที่ 71



รูปที่ 71 การเปรียบเทียบตำแหน่งของไอออน Zn^{2+} ในโครงสร้างเริ่มต้น (สีน้ำเงิน) กับโครงสร้างที่ได้จาก MD simulation (สีชมพู) ของแต่ละโมโนเมอร์

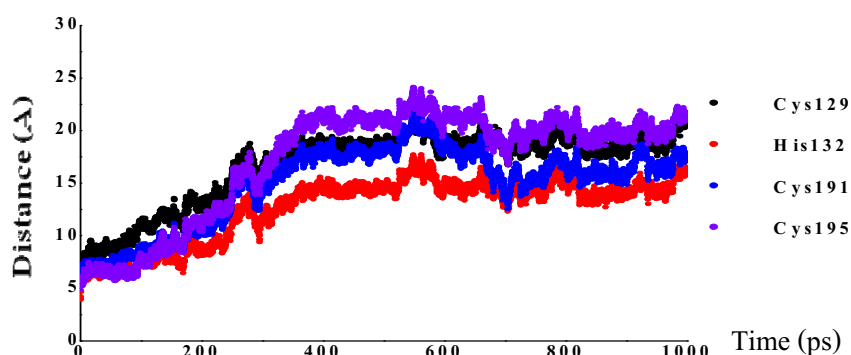
จากรูปที่ 71 แสดงตำแหน่งการเคลื่อนที่ของไอออน Zn^{2+} ของแต่ละโมโนเมอร์ ในกรณีของโมโนเมอร์ A ไอออน Zn^{2+} เคลื่อนที่ออกจากตำแหน่งเดิมในโครงสร้างจากเทคนิค X-ray crystallography เป็นระยะทาง 17.96 Å โมโนเมอร์ B 7.12 Å โมโนเมอร์ C 9.23 Å และ โมโนเมอร์ D 6.25 Å จากค่าระยะห่างของไอออน Zn^{2+} กับกรดอะมิโนทั้ง 4 ที่ล้อมรอบ พบว่าโมโนเมอร์ A มีค่าการเคลื่อนที่ของไอออน Zn^{2+} ระยะห่างมากที่สุดในการศึกษา MD simulation

8. ระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} กับกรดอะมิโนที่ล้อมรอบ

การวิเคราะห์ระยะห่างระหว่างอะตอม C α ของกรดอะมิโน Cysteine และ Histidine ของทั้ง 4 โมโนเมอร์กับอะตอมของไอออน Zn^{2+} (รูปที่ 72 - 74)

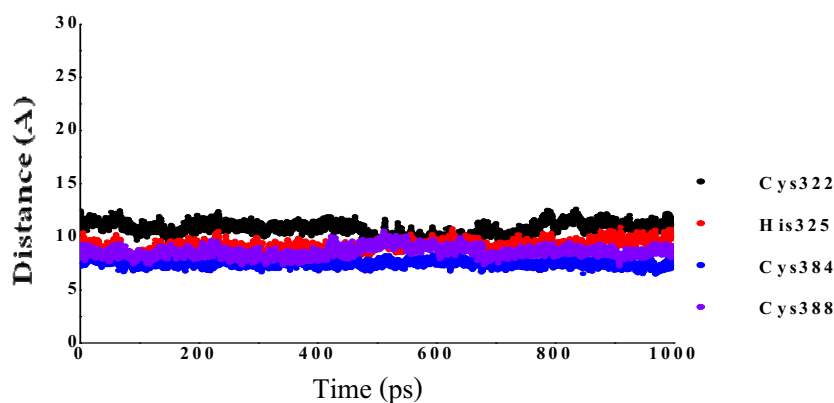
ตารางที่ 3 แสดงระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} และอะตอม C_α ของกรดอะมิโนที่ล้อมรอบในโครงสร้างจากเทคนิค X-ray crystallography

กรดอะมิโน	ระยะห่าง (Å)			
	Cys176	His179	Cys238	Cys242
Monomer A	4.27	4.53	3.75	4.57
Monomer B	4.32	4.57	3.82	4.46
Monomer C	4.35	4.54	3.79	4.54
Monomer D	4.29	4.57	3.87	4.50



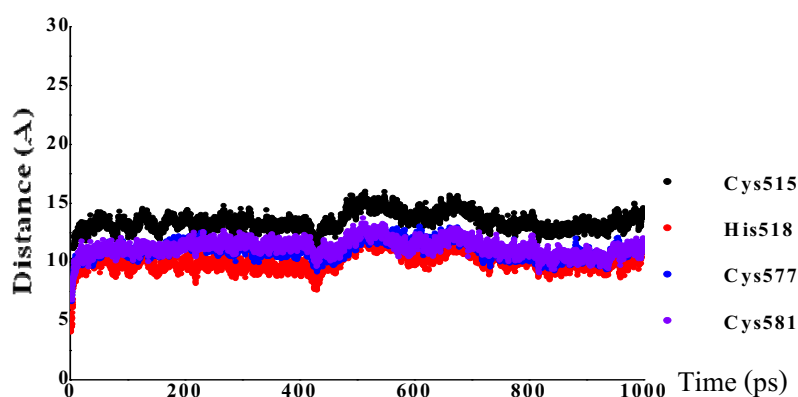
รูปที่ 72 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ A กับกรดอะมิโน Cys129, His132, Cys191 และ Cys195 เทียบกับเวลา

จากกราฟในรูปที่ 72 แสดงให้เห็นค่าระยะห่างระหว่างกรดอะมิโนทั้ง 4 กรดอะมิโนที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ A เมื่อเทียบกับระยะห่างของโครงสร้างเริ่มต้น ซึ่งพบว่าค่าระยะห่างจะเพิ่มขึ้นเรื่อยในช่วง 400 ps แล้วค่อยๆ คงที่ ที่ 15 - 20 Å เมื่อเปรียบเทียบกับค่าระยะห่างในโครงสร้างจากเทคนิค X-ray crystallography ของโมโนเมอร์ A ซึ่งอยู่ในช่วง 3 - 4.5 Å อาจกล่าวได้ว่าไอออน Zn^{2+} ค่อยๆ เคลื่อนที่ออกห่างจากกรดอะมิโนทั้ง 4 ที่ล้อมรอบจนอยู่ในสภาวะสมดุลพบว่าค่าระยะห่างจะอยู่ในช่วง 15 - 20 Å ซึ่งมีค่ามากที่สุดเมื่อเทียบกับโมโนเมอร์อื่นๆ



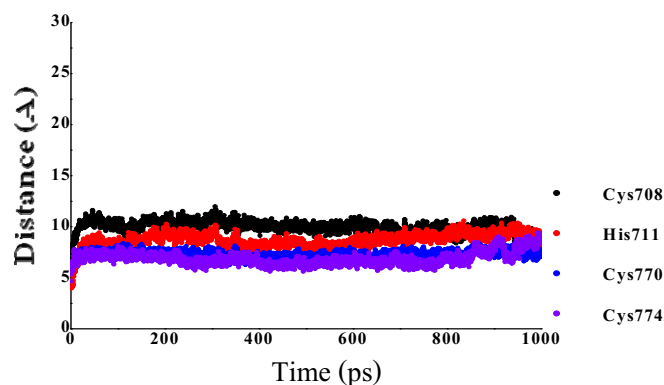
รูปที่ 73 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ B กับกรดอะมิโน Cys322, His325, Cys384 และ Cys388 เทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 73 แสดงให้เห็นค่าระยะห่างระหว่างกรดอะมิโนทั้ง 4 กรดอะมิโนที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ B เมื่อเทียบกับระยะห่างของโครงสร้างเริ่มต้น ซึ่งพบว่าค่าระยะห่างจะเพิ่มขึ้นเรื่อยในช่วง 400 ps แล้วค่อยๆ คงที่ ที่ 6 - 13 Å เมื่อเปรียบเทียบกับค่าระยะห่างในโครงสร้าง X-ray ของโมโนเมอร์ B ซึ่งอยู่ในช่วง 3 - 4.5 Å อาจกล่าวได้ว่าไอออน Zn^{2+} ค่อยๆ เคลื่อนที่ออกจากกรดอะมิโนทั้ง 4 ที่ล้อมรอบจนอยู่ในสภาวะสมดุลพบว่าค่าระยะห่างจะอยู่ในช่วง 6 - 13 Å



รูปที่ 74 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ C กับกรดอะมิโน Cys515, His581, Cys577 และ Cys581 เทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 74 แสดงให้เห็นค่าระยะห่างระหว่างกรดอะมิโนทั้ง 4 กรดอะมิโนที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ C เมื่อเทียบกับระยะห่างของโครงสร้างเริ่มต้น ซึ่งพบว่าค่าระยะห่างจะเพิ่มขึ้นเรื่อยในช่วง 400 ps แล้วค่อยๆ คงที่ ที่ 6 - 14 Å เมื่อเปรียบเทียบกับค่าระยะห่างในโครงสร้าง X-ray ของโมโนเมอร์ C ซึ่งอยู่ในช่วง 3 - 4.5 Å อาจกล่าวได้ว่าไอออน Zn^{2+} ค่อยๆ เคลื่อนที่ออกจากกรดอะมิโนทั้ง 4 ที่ล้อมรอบจนอยู่ในสภาวะสมดุลพบว่าค่าระยะห่างจะอยู่ในช่วง 6 - 14 Å

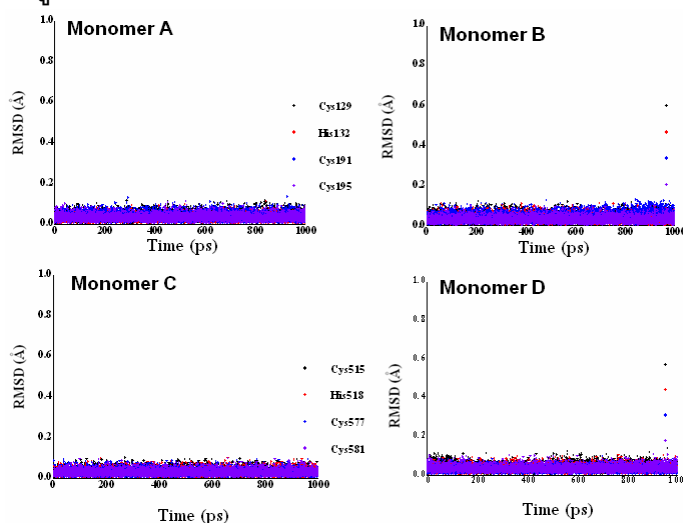


รูปที่ 75 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ D กับกรดอะมิโน Cys708, His711, Cys770 และ Cys774 เทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 75 แสดงให้เห็นค่าระยะห่างระหว่างกรดอะมิโนทั้ง 4 กรดอะมิโนที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ D เมื่อเทียบกับระยะห่างของโครงสร้างเริ่มต้น ซึ่งพบว่าค่าระยะห่างจะเพิ่มขึ้นเรื่อยในช่วง 400 ps แล้วค่อยๆ คงที่ ที่ 5 - 11 Å เมื่อเปรียบเทียบกับค่าระยะห่างในโครงสร้าง X-ray ของโมโนเมอร์ D ซึ่งอยู่ในช่วง 3 - 4.5 Å อาจกล่าวได้ว่าไอออน Zn^{2+} ค่อยๆ เคลื่อนที่ออกจากกรดอะมิโนทั้ง 4 ที่ล้อมรอบจนอยู่ในสภาวะสมดุลพบว่าค่าระยะห่างจะอยู่ในช่วง 5 - 11 Å

9. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกรดอะมิโนที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+}

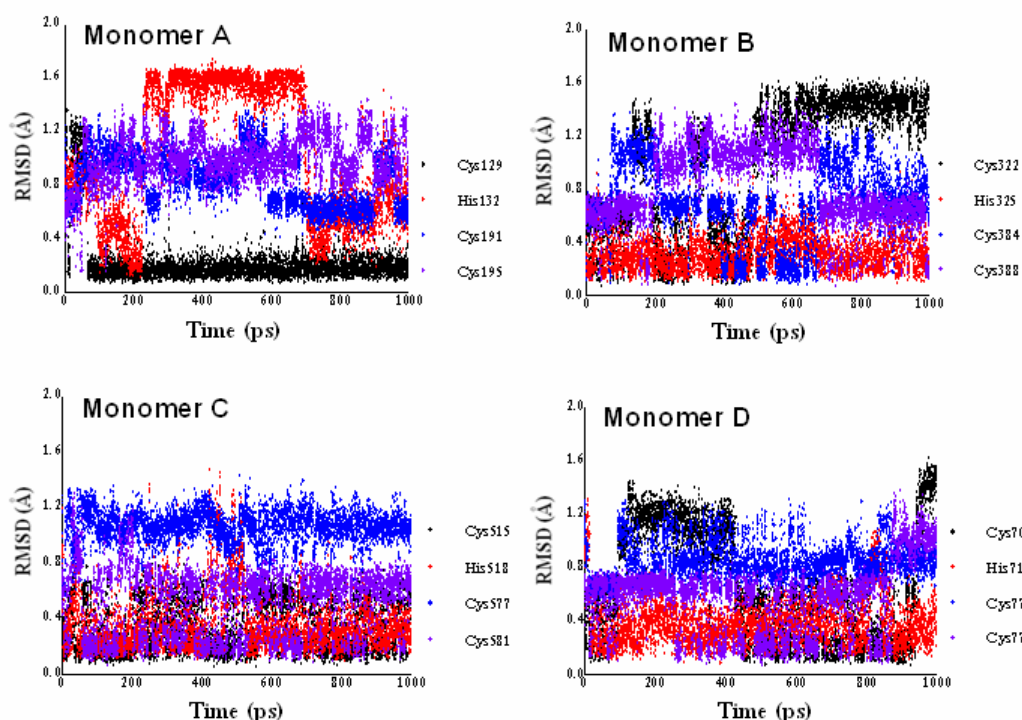
จากโครงสร้างสามมิติของสารประกอบเชิงซ้อน p53 และ DNA พบว่ามีกรดอะมิโน 4 กรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ซึ่งได้แก่ Cysteine 3 กรดอะมิโน และ Histidine 1 กรดอะมิโน ซึ่งจากการศึกษาตำแหน่งของไอออน Zn^{2+} ผู้ทำการวิจัยจึงศึกษาค่า RMSD ของกรดอะมิโนที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกรดอะมิโนดังกล่าว ได้ผลการทดลองดังรูป



รูปที่ 76 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RMSD ของอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของแต่ละโมโนเมอร์เทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 76 เป็นค่า RMSD ของอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของ Cysteine และ Histidine ที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ในทุกๆ โมโนเมอร์ซึ่งพบว่าค่า RMSD มีค่าน้อยกว่า 0.2 Å ทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของกรดอะมิโนทั้ง 4 กรดอะมิโน ในทุกๆ โมโนเมอร์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและตำแหน่ง เมื่อเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นเนื่องจากค่า RMSD น้อยมาก ๆ นั้นแสดงว่าอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของทั้ง 4 กรดอะมิโนไม่เปลี่ยนแปลงและไม่เป็นสาเหตุของการเคลื่อนที่ของไอออน Zn^{2+}

ค่า RMSD ของกรดอะมิโน Cysteine และ Histidine ของทุกอะตอมที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ในทุกๆ โมโนเมอร์ ได้ผลการทดลองดังรูป

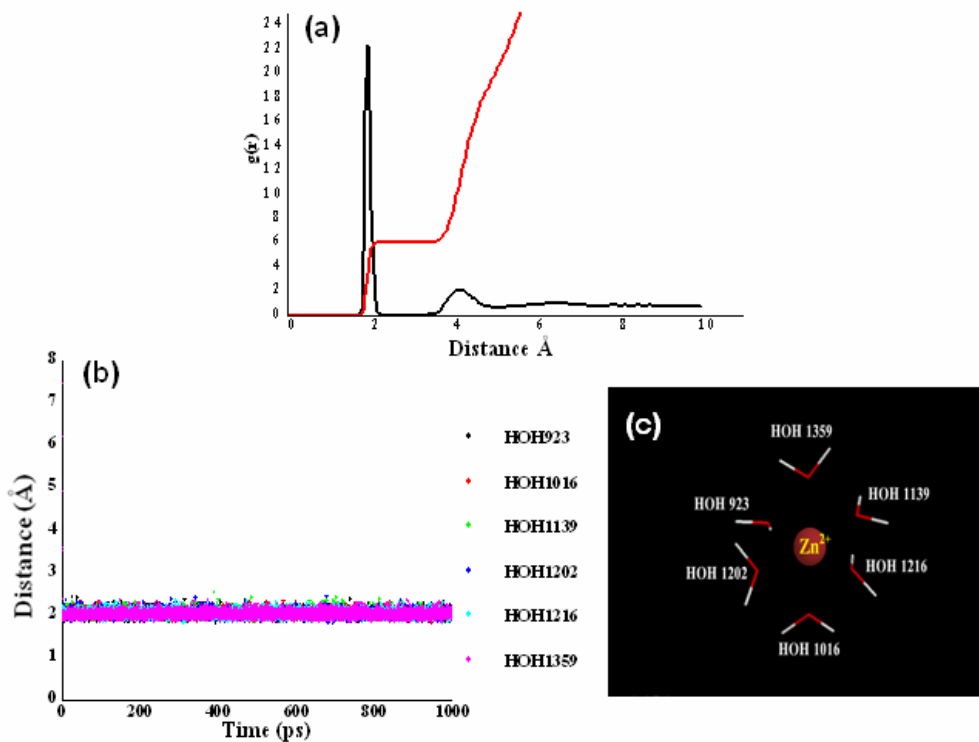


รูปที่ 77 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RMSD ของอะตอมทั้งหมดของกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของแต่ละโมโนเมอร์ A เทียบกับเวลา

จากกราฟรูปที่ 77 เป็นค่า RMSD ของทุกอะตอมซึ่งรวมเอาอะตอม Side chain ของ Cysteine และ Histidine ที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ในทุกๆ โมโนเมอร์เอาไว้ด้วย ซึ่งพบว่าค่า RMSD มีค่าค่อนข้างจะกว้างไม่คงที่ทั้ง 4 โมโนเมอร์ แสดงให้เห็นว่าอะตอมที่ Side chain ของกรดอะมิโนทั้ง 4 กรดอะมิโน ในทุกๆ โมโนเมอร์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและตำแหน่ง เมื่อเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นเนื่องจากค่า RMSD ที่มาก นั้นแสดงว่าอะตอมที่เป็น Side chain ของทั้ง 4 กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ไอออน Zn^{2+} สามารถเคลื่อนที่ออกจากตำแหน่งเดิมได้

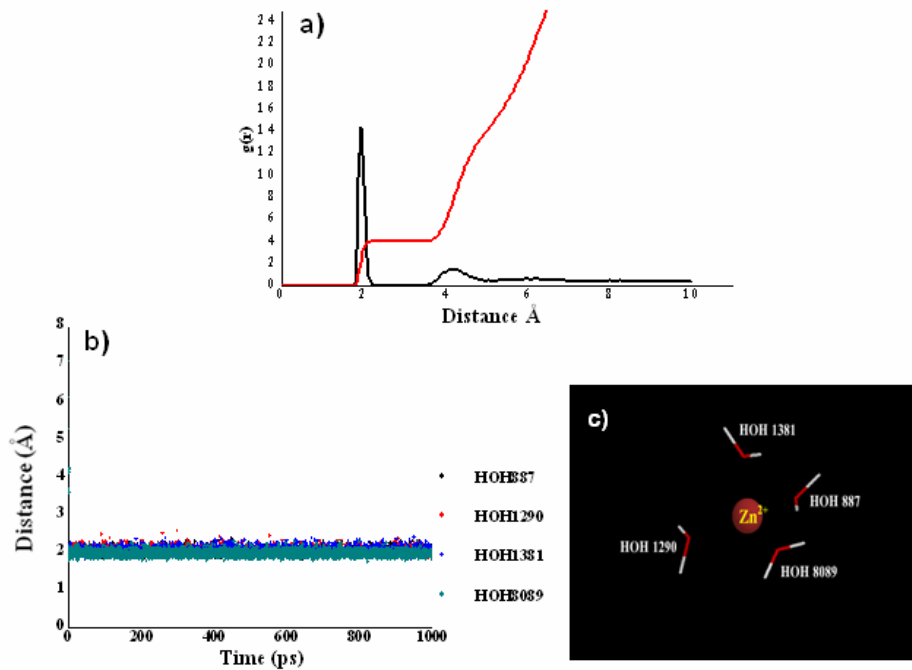
10. การกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมี (RDF) ล้อมรอบไอออน Zn^{2+}

จากผลการคำนวณค่าการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมี (RDF) ที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} พบว่ามีน้ำกระจายตัวอยู่ในช่วงประมาณ 2 Å ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ในทุกโมโนเมอร์ (รูปที่ 78-81)



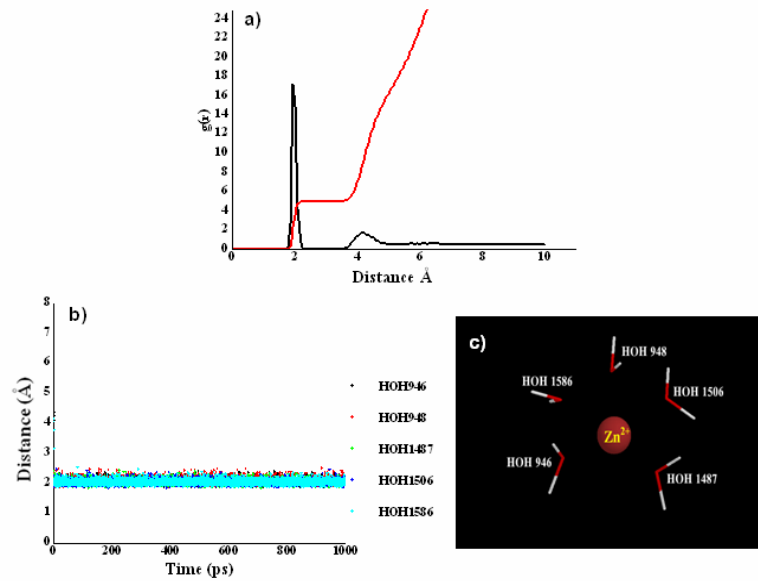
รูปที่ 78 a) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีที่อยู่ล้อมรอบอะตอมของไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ A
 b) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} ของ โมโนเมอร์ A กับโมเลกุลน้ำลำดับที่ 923, 1016, 1139, 1202, 1216 และ 1359 เทียบกับเวลา
 c) รูปแสดงตำแหน่งของโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+}

จากกราฟรูป 78 เป็นการศึกษาค่าการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ A ซึ่งพบว่าจากกราฟในรูปที่ 78(a) แสดงให้เห็นว่ามีโมเลกุลน้ำล้อมรอบไอออน Zn^{2+} โดยอยู่ห่างจากไอออน Zn^{2+} 2 Å สังเกตจากกราฟเส้นสีดำที่ขึ้น peak ที่ตำแหน่ง 2 Å ซึ่งโมเลกุลน้ำที่ระยะทาง 2 Å มีจำนวนทั้งสิ้น 6 โมเลกุล สังเกตจากกราฟเส้นสีแดงที่คงที่ ที่ตำแหน่ง 6 ของแกน y เมื่อทำการศึกษาต่อไปพบว่าน้ำทั้ง 6 โมเลกุลอยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} เป็นระยะทาง 2 Å ตลอดเวลาที่ศึกษา MD simulation สังเกตได้จากกราฟในรูปที่ 78(b) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างของไอออน Zn^{2+} กับโมเลกุลน้ำทั้ง 6 โมเลกุล และเมื่อดูจากโครงสร้างสามมิติที่ได้จากการศึกษา MD simulation ก็พบว่าทั้ง 6 โมเลกุลในลักษณะที่แสดงดังกราฟในรูปที่ 78(c) จะเห็นได้ว่ากราฟทั้ง 3 รูปให้ผลที่สอดคล้องกันดังที่อธิบายไปแล้วข้างต้น



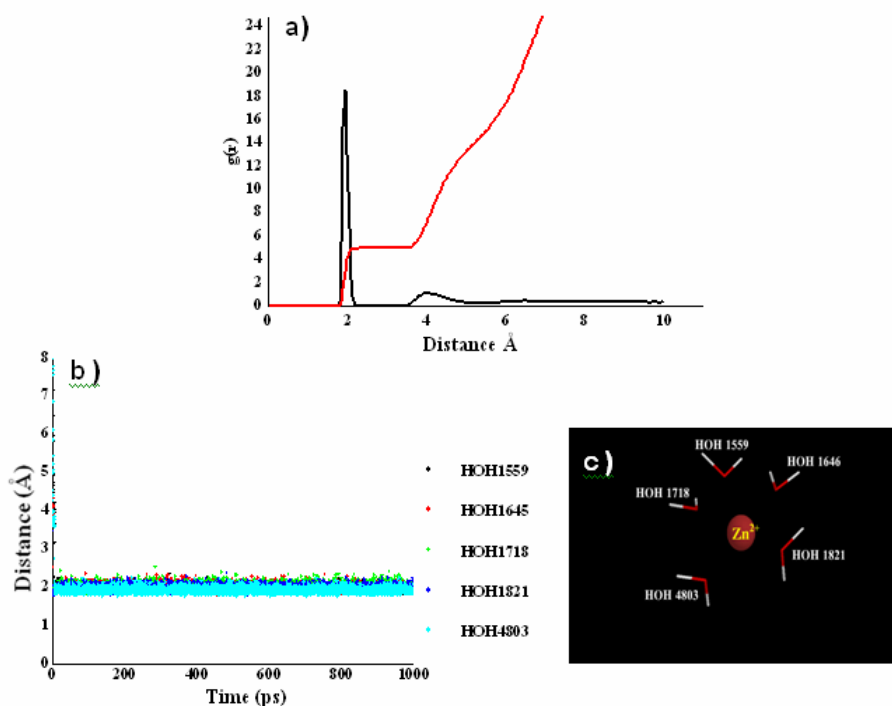
- รูปที่ 79** a) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีที่อยู่ล้อมรอบอะตอมของไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ B
- b) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ B กับโมเลกุลน้ำลำดับที่ 887, 1290, 1381 และ 8089 เทียบกับเวลา
- c) รูปแสดงตำแหน่งของโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+}

จากกราฟรูป 79 เป็นการศึกษาระยะห่างของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ A ซึ่งพบว่าจากกราฟในรูปที่ 79(a) แสดงให้เห็นว่ามีโมเลกุลน้ำล้อมรอบไอออน Zn^{2+} โดยอยู่ห่างจากไอออน Zn^{2+} 2 Å สังเกตจากกราฟเส้นสีดำที่ขึ้น peak ที่ตำแหน่ง 2 Å ซึ่งโมเลกุลน้ำที่ระยะทาง 2 Å มีจำนวนทั้งสิ้น 6 โมเลกุล สังเกตจากกราฟเส้นสีแดงที่คงที่ ที่ตำแหน่ง 6 ของแกน y เมื่อทำการศึกษาต่อไปพบว่าน้ำทั้ง 4 โมเลกุลอยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} เป็นระยะทาง 2 Å ตลอดเวลาที่ศึกษา MD simulation สังเกตได้จากกราฟในรูปที่ 79(b) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างของไอออน Zn^{2+} กับโมเลกุลน้ำทั้ง 4 โมเลกุล และเมื่อดูจากโครงสร้างสามมิติที่ได้จากการศึกษา MD simulation ก็พบน้ำทั้ง 4 โมเลกุลในลักษณะที่แสดงดังกราฟในรูป 79(c) จะเห็นว่ากราฟทั้ง 3 รูปให้ผลที่สอดคล้องกันดังที่อธิบายไปแล้วข้างต้น



- รูปที่ 80** a) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีที่อยู่ล้อมรอบอะตอมของไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ C
- b) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ C กับโมเลกุลน้ำลำดับที่ 946, 948, 1487, 1506 และ 1586 เทียบกับเวลา
- c) รูปแสดงตำแหน่งของโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+}

จากกราฟรูป 80 เป็นการศึกษการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ A ซึ่งพบว่าจากกราฟในรูปที่ 80(a) แสดงให้เห็นว่ามีโมเลกุลน้ำล้อมรอบไอออน Zn^{2+} โดยอยู่ห่างจากไอออน Zn^{2+} 2 Å สังเกตจากกราฟเส้นสีดำที่ขึ้น peak ที่ตำแหน่ง 2 Å ซึ่งโมเลกุลน้ำที่ระยะทาง 2 Å มีจำนวนทั้งสิ้น 6 โมเลกุล สังเกตจากกราฟเส้นสีแดงที่คงที่ ที่ตำแหน่ง 6 ของแกน y เมื่อทำการศึกษาต่อไปพบว่าทั้ง 5 โมเลกุลอยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} เป็นระยะทาง 2 Å ตลอดเวลาที่ศึกษา MD simulation สังเกตได้จากกราฟในรูปที่ 80(b) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างของไอออน Zn^{2+} กับโมเลกุลน้ำทั้ง 5 โมเลกุล และเมื่อดูจากโครงสร้างสามมิติที่ได้จากการศึกษา MD simulation ก็พบว่าทั้ง 5 โมเลกุลในลักษณะที่แสดงดังกราฟในรูปที่ 80(c) จะเห็นได้ว่ากราฟทั้ง 3 รูปให้ผลที่สอดคล้องกันดังที่อธิบายไปแล้วข้างต้น



รูปที่ 81 a) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีที่อยู่ล้อมรอบอะตอมของไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ D
 b) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ D กับโมเลกุลน้ำลำดับที่ 1559, 1646, 1718, 1821 และ 4803 เทียบกับเวลา
 c) รูปแสดงตำแหน่งของโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+}

จากกราฟรูป 81 เป็นการศึกษาระยะห่างของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของโมโนเมอร์ A ซึ่งพบว่าจากกราฟในรูปที่ 81(a) แสดงให้เห็นว่ามีโมเลกุลน้ำล้อมรอบไอออน Zn^{2+} โดยอยู่ห่างจากไอออน Zn^{2+} 2 Å สังเกตจากกราฟเส้นสีดำที่ขึ้น peak ที่ตำแหน่ง 2 Å ซึ่งโมเลกุลน้ำที่ระยะทาง 2 Å มีจำนวนทั้งสิ้น 6 โมเลกุล สังเกตจากกราฟเส้นสีแดงที่คงที่ ที่ตำแหน่ง 6 ของแกน y เมื่อทำการศึกษาต่อไปพบว่าทั้ง 5 โมเลกุลอยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} เป็นระยะทาง 2 Å ตลอดเวลาที่ศึกษา MD simulation สังเกตได้จากกราฟในรูปที่ 81(b) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างของไอออน Zn^{2+} กับโมเลกุลน้ำทั้ง 5 โมเลกุล และเมื่อดูจากโครงสร้างสามมิติที่ได้จากการศึกษา MD simulation ก็พบน้ำทั้ง 5 โมเลกุลในลักษณะที่แสดงดังกราฟในรูปที่ 81(c) จะเห็นได้ว่ากราฟทั้ง 3 รูปให้ผลที่สอดคล้องกันดังที่อธิบายไปแล้วข้างต้น

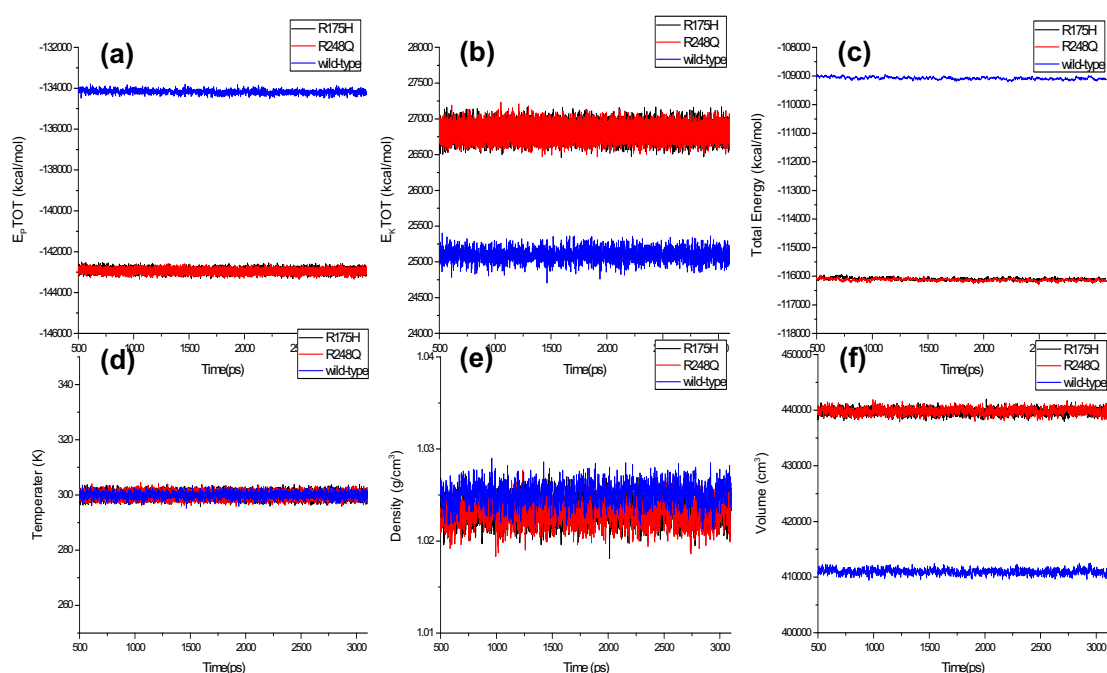
จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบไอออน Zn^{2+} และระยะห่างของน้ำล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ของทั้ง 4 โมโนเมอร์ จะพบว่าโมโนเมอร์ A มีจำนวนโมเลกุลน้ำมากที่สุด คือ 6 โมเลกุล เป็นผลทำให้ไอออน Zn^{2+} เคลื่อนที่ออกจากตำแหน่งเดิมมากกว่าโมโนเมอร์อื่น เนื่องจากน้ำเป็นสาเหตุที่ดึงให้ไอออน Zn^{2+} เกิดการเคลื่อนที่ แต่ถ้าทุกโมโนเมอร์มีจำนวนโมเลกุลน้ำที่เท่ากันระยะห่างก็จะใกล้เคียงกัน แต่ถ้าไม่มีโมเลกุลน้ำเลยไอออน Zn^{2+} ก็จะไม่เกิดการเคลื่อนที่

ไปจากตำแหน่งเดิม ส่วนโมโนเมอร์ B โมโนเมอร์ C และโมโนเมอร์ D ที่มีโมเลกุลน้ำจำนวนที่ไม่แตกต่างกันมาก คือ 4 โมเลกุล และ 5 โมเลกุล จึงทำให้มีค่าระยะห่างที่ใกล้เคียงกัน

ตอนที่ 3 การศึกษา MD simulation ของ monomer p53 ที่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนที่เป็น core domain

1. สภาวะของระบบ

จากการศึกษา MD simulation ผู้วิจัยได้ทำการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรที่บ่งบอกสภาวะของระบบเทียบกับเวลาในหน่วย ps ซึ่งตัวแปรดังกล่าว ได้แก่ พลังงานศักย์, พลังงานจลน์, พลังงานรวม, อุณหภูมิ, ความหนาแน่น, และปริมาตรของระบบ



รูปที่ 82 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (a) พลังงานศักย์ (b) พลังงานจลน์ (c) พลังงานรวม (d) อุณหภูมิ (e) ความหนาแน่น และ (f) ปริมาตรของระบบ เปรียบเทียบกับเวลา

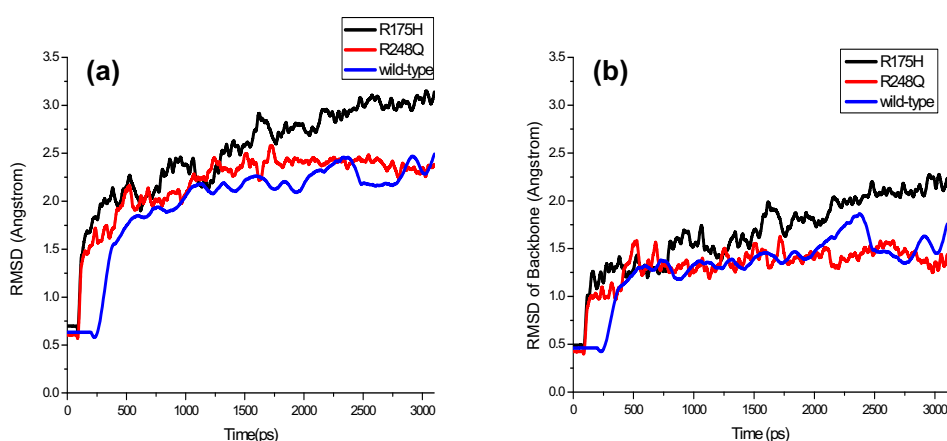
จากกราฟทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าช่วงเวลาในการเก็บข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ผลของทั้ง 3 ระบบเป็นช่วงที่สภาวะของระบบค่อนข้างคงที่ สังเกตได้จากตัวแปรทั้งหมดมีค่าคงที่ในช่วงเวลา 2100-3100 ps ซึ่งเมื่อพิจารณาอุณหภูมิและความหนาแน่น (d และ e) พบว่าทั้ง 3 ระบบมีค่าเท่ากัน กล่าวคือ ทั้ง 3 ระบบมีอุณหภูมิคงที่ที่ 300 K และความหนาแน่นคงที่ที่ประมาณ 1.024 mg/L ส่วนปริมาตรพบว่าระบบ wild-type มีปริมาตรต่ำกว่าระบบ R175H และ R248Q เนื่องจากในระบบ wild-type มีจำนวนกรดอะมิโนน้อยกว่าอีก 2 ระบบจึงทำให้มีปริมาตรต่ำกว่าระบบ R175H และ R248Q เมื่อพิจารณาค่าพลังงานจลน์พบว่าระบบ wild-type มีค่าพลังงานจลน์น้อยกว่าระบบ R175H และ R248Q เนื่องจากพลังงานจลน์จะแปรผันตรงกับจำนวนอะตอม ดังนั้นในระบบ wild-type ซึ่งมีจำนวนอะตอมน้อยกว่า จึงมีค่าพลังงานจลน์น้อยกว่าระบบ R175H และ R248Q ส่วนค่า

พลังงานศักย์พบว่าระบบ wild-type มีค่าพลังงานศักย์มากกว่าระบบ R175H และ R248Q เนื่องจากพลังงานศักย์จะแปรผันตรงกับจำนวนอะตอมเช่นเดียวกับพลังงานจลน์ แต่พลังงานศักย์จะมีเครื่องหมายลบ ดังนั้นแนวโน้มของค่าพลังงานศักย์จึงตรงกันข้ามกับค่าพลังงานจลน์ โดยในระบบ wild-type ซึ่งมีจำนวนอะตอมน้อยกว่าจะมีค่าพลังงานศักย์มากกว่าระบบ R175H และ R248Q ส่วนพลังงานรวมจะเห็นว่าระบบ wild-type มีค่าพลังงานรวมมากกว่าระบบ R175H และ R248Q เนื่องจากพลังงานรวมเป็นผลรวมระหว่างพลังงานศักย์กับพลังงานจลน์

2. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน p53

ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน p53 ในระหว่างการศึกษาด้วยเทคนิค MD simulation ผู้วิจัยได้ทำการคำนวณค่า Root mean square distance (RMSD) ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของระยะห่างระหว่างอะตอมแต่ละอะตอมในโครงสร้างที่ได้จากการทำ MD simulation แต่ละขั้นตอนกับโครงสร้างเริ่มต้นหรือโครงสร้างอ้างอิง โดยถ้าค่า RMSD มีค่ามากแสดงว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำ MD Simulation แต่ละขั้นตอนแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นหรือโครงสร้างอ้างอิงมาก แต่ถ้าค่า RMSD มีค่าน้อยแสดงว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำ MD Simulation แต่ละขั้นตอนไม่แตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นมากนัก นอกจากนี้ค่า RMSD ยังบ่งบอกถึงสภาวะสมดุลของระบบได้อีกด้วย โดยถ้าค่า RMSD มีค่าคงที่ในช่วงเวลาใดๆ แสดงว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำ MD Simulation ในช่วงเวลาดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงน้อยเมื่อเวลาผ่านไป หรืออาจกล่าวได้ว่าระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลแล้วนั่นเอง แต่ถ้าค่า RMSD มีค่าไม่คงที่แสดงว่าโครงสร้างยังมีการเปลี่ยนแปลงมากเมื่อเวลาผ่านไปหรืออาจกล่าวได้ว่าระบบยังไม่อยู่ในสภาวะสมดุล

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการคำนวณค่า RMSD ของอะตอมทุกอะตอมในระบบและอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของโปรตีน p53 ในแต่ละระบบเทียบกับเวลาที่ผ่านไป โดยใช้โครงสร้างเริ่มต้นเป็นโครงสร้างอ้างอิงในการเปรียบเทียบ ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ดังกราฟในรูปที่ 83



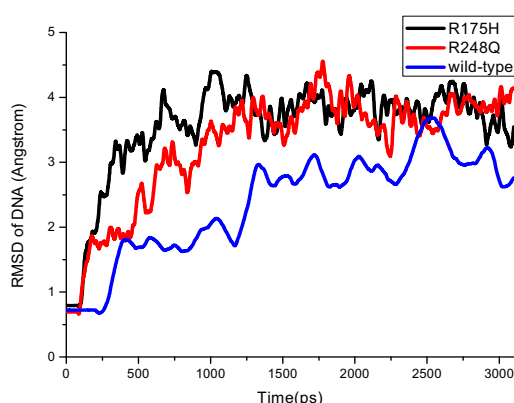
รูปที่ 83 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (a) ค่า RMSD ของอะตอมทั้งหมดในระบบและ (b) ค่า RMSD ของอะตอมที่เป็นสายโซ่หลักของโปรตีน p53 เปรียบเทียบกับเวลา

จากรูปที่ 83 พบว่าลักษณะของเส้นกราฟในรูป (a) และ (b) มีความคล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างกันที่กราฟในรูป 83(a) มีค่า RMSD มากกว่ากราฟในรูป 83(b) เนื่องจากกราฟในรูป 83(a) เป็นการคำนวณค่า RMSD ของอะตอมทั้งหมดในระบบ ทำให้จำนวนอะตอมที่นำมาคำนวณมีจำนวนมากกว่ากราฟในรูป 83(b) ซึ่งเป็นการคำนวณค่า RMSD ของอะตอมในสายโซ่หลักของโปรตีน p53 เท่านั้น (C, C α , N) อีกทั้งบริเวณหมู่แทนที่ของกรดอะมิโนยังเป็นบริเวณที่มีความยืดหยุ่นสูง กล่าวคือ โครงสร้างสามารถเปลี่ยนแปลงได้ง่ายจึงทำให้ค่า RMSD ของอะตอมทั้งหมดซึ่งรวมเอาอะตอมของหมู่แทนที่เข้าไปด้วย (รูปที่ 83(a)) มีค่าสูงกว่าค่า RMSD ของอะตอมที่เป็นสายโซ่หลัก (รูปที่ 83(b))

เมื่อพิจารณาค่า RMSD ของแต่ละระบบในรูป 83(a) และ 83(b) พบว่าในช่วงเวลา 0-500 ps ค่า RMSD เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทุกระบบ เนื่องจากเป็นช่วงที่มีการปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นและโครงสร้างของระบบกำลังเปลี่ยนแปลงเพื่อเข้าสู่สภาวะสมดุล หลังจากนั้นค่า RMSD ของระบบ wild-type และ R248Q จะเพิ่มขึ้นช้าๆ และค่อนข้างคงที่หลังจาก 2100 ps ส่วนในระบบ R175H พบว่าค่า RMSD จะยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แสดงให้เห็นว่าระบบ R175H ยังมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของอะตอมในระบบอยู่ตลอดเวลา จึงทำให้ระบบนี้เข้าสู่สภาวะสมดุลช้ากว่าระบบ wild-type และ R248Q ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า RMSD จะพบว่าค่า RMSD ของ R175H มีค่ามากกว่าระบบ wild-type และ R248Q จึงกล่าวได้ว่าโครงสร้างที่ได้จากการศึกษาด้วย MD Simulation ของระบบ R175H จะแตกต่างจากโครงสร้างเริ่มต้นมากที่สุด

3. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA ผู้วิจัยได้คำนวณหาค่า RMSD ของอะตอมทั้งหมดใน DNA เทียบกับเวลาที่ผ่านไป เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของอะตอมทั้งหมดในโครงสร้างของ DNA ระหว่างการศึกษาด้วย MD Simulation โดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นของ DNA

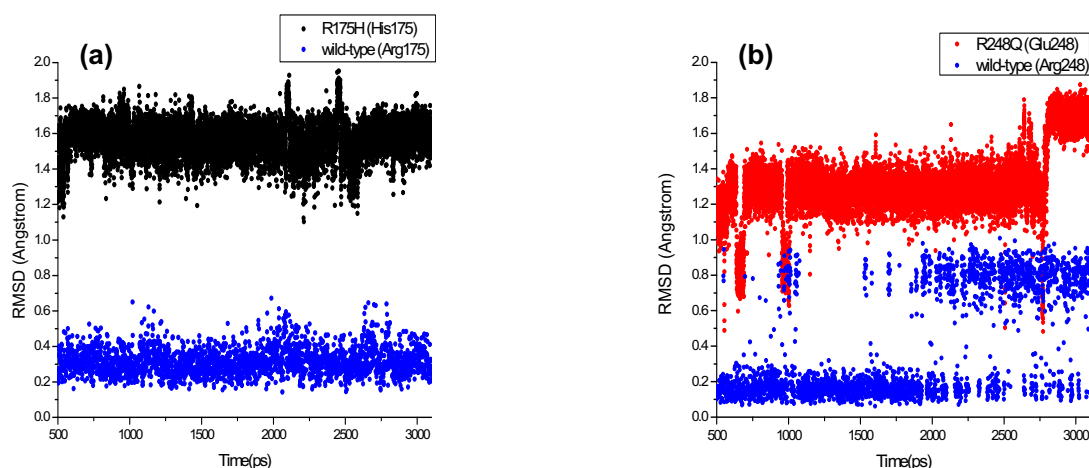


รูปที่ 84 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RMSD ของ DNA เทียบกับเวลา

จากรูปที่ 84 จะเห็นได้ว่าทุกระบบมีค่า RMSD เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0-500 ps หลังจากนั้นค่า RMSD โดยเฉลี่ยของแต่ละระบบจะเพิ่มขึ้นช้าๆ และค่อนข้างคงที่หลังจาก 2100 ps เช่นเดียวกับกราฟในรูป 83 เมื่อพิจารณาค่า RMSD ของแต่ละระบบพบว่า DNA ในระบบ wild-type มีค่า RMSD น้อยกว่าในระบบ R175H และ R248Q นั้นแสดงให้เห็นว่าโครงสร้าง DNA ในระบบ wild-type ใกล้เคียงกับโครงสร้างเริ่มต้นมากที่สุด หรืออาจกล่าวได้ว่าเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในโปรตีน p53 จะส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA ด้วย

4. โครงสร้างของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ ผู้วิจัยได้คำนวณหาค่า RMSD ของอะตอมทั้งหมดในกรดอะมิโนที่เกิดการกลายพันธุ์ของทั้ง 3 ระบบ ได้แก่ His175 ในระบบ R175H, Glu248 ในระบบ R248Q และ Arg175 กับ Arg 248 ในระบบ wild-type เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนดังกล่าวในระหว่างการศึกษาด้วย MD Simulation โดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นของตัวมันเอง

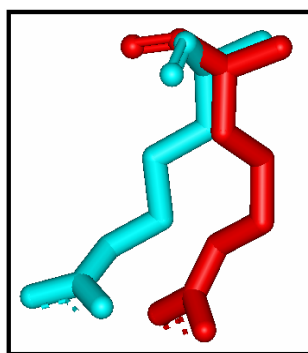


รูปที่ 85 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (a) ค่า RMSD ของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 175 ของระบบ R175H และระบบ wild-type (b) ค่า RMSD ของกรดอะมิโนในตำแหน่ง 248 ของระบบ R248Q และระบบ wild-type เปรียบเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น เทียบกับเวลา

จากกราฟในรูปที่ 85(a) จะเห็นได้ว่าค่า RMSD ของ Arg175 ในระบบ wild-type มีค่าค่อนข้างน้อย โดยค่า RMSD เฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.3 Å และค่า RMSD ค่อนข้างคงที่ตลอดการศึกษาด้วย MD Simulation แสดงว่าโครงสร้างของ Arg175 ในระบบ wild-type มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปจากโครงสร้างเริ่มต้นน้อยมาก และไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ชัดเจนในระหว่างการศึกษาด้วย MD Simulation ส่วน Arg248 ในระบบ wild-type (รูปที่ 85(b)) พบมีการเปลี่ยนแปลงค่า RMSD ในช่วง 2000 – 3000 ps โดยจะเป็นการเปลี่ยนแปลงระหว่างค่า RMSD เฉลี่ย 2 ค่าคือ 0.1 Å และ 0.8 Å นั้น

แสดงว่ากรดอะมิโนดังกล่าวมีโครงสร้าง 2 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 86 และสามารถสลับไปมาระหว่างกันได้ในช่วงการศึกษาด้วย MD Simulation

เมื่อพิจารณาค่า RMSD ของกรดอะมิโนทั้ง 2 ตำแหน่งในระบบที่เกิดการกลายพันธุ์คือ His175 ในระบบ R175H และ Glu248 ในระบบ R248Q พบว่าทั้ง 2 ตำแหน่งมีค่า RMSD มากกว่าระบบ wild-type เนื่องจากในระบบ R175H และ R248Q มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนเพื่อสร้างโปรตีน p53 ที่เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ระบบต้องหาโครงสร้างที่เสถียรของกรดอะมิโนชนิดใหม่จึงมีการเปลี่ยนแปลงสูงมาก นอกจากนี้ยังพบว่า His175 ในระบบ R175H มีค่า RMSD ค่อนข้างคงที่แสดงว่าโครงสร้างของ His175 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงการทำ MD Simulation ส่วน Glu248 ในระบบ R248Q จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า RMSD ที่เวลา 2750 ps แสดงว่า Glu248 มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในช่วงการศึกษาด้วย MD Simulation เช่นเดียวกับระบบ wild-type

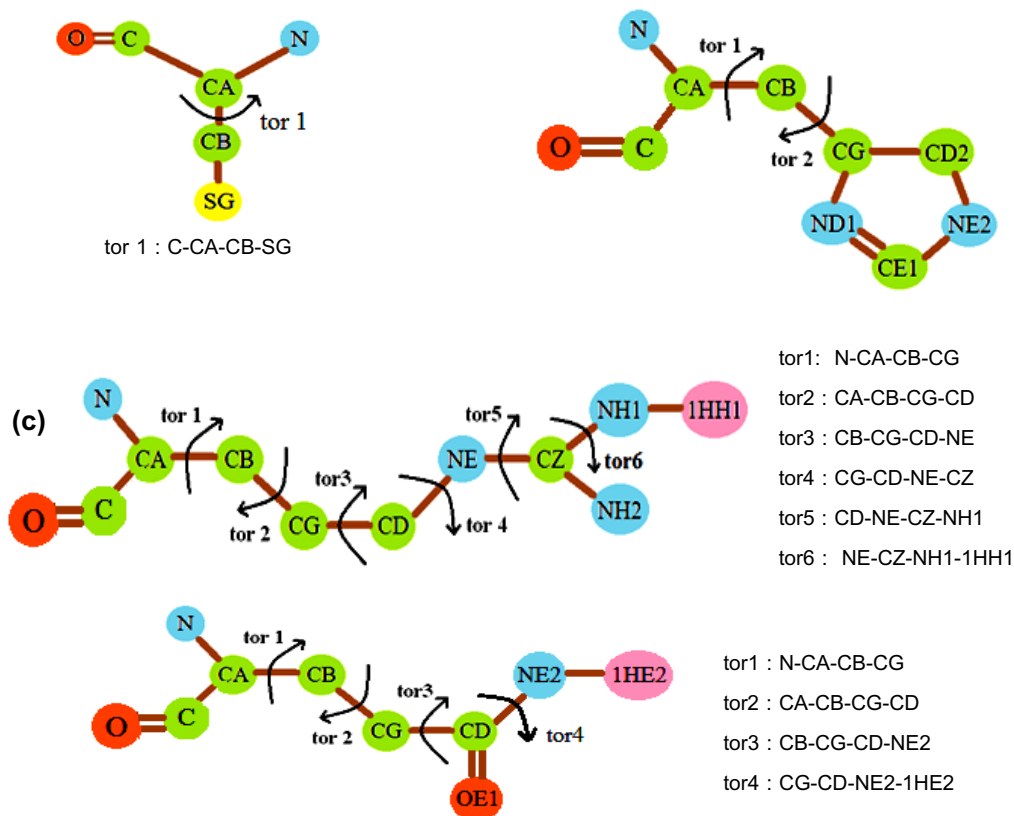


รูปที่ 86 โครงสร้างของกรดอะมิโน Arg248 ในระบบ wild-type โดยสีฟ้า คือ Arg248 ที่เวลา 2049 ps และสีแดง คือ Arg248 ที่เวลา 3100 ps

5. การหมุนพันธะของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์

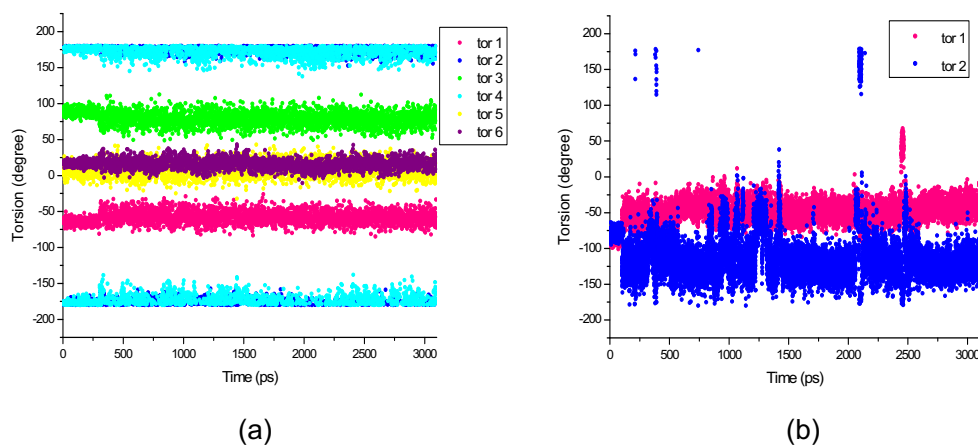
ในการศึกษาการหมุนพันธะภายในกรดอะมิโน ผู้วิจัยได้คำนวณหาค่า torsion angle ของพันธะภายในกรดอะมิโนที่เกิดการกลายพันธุ์ของทั้ง 3 ระบบ ได้แก่ His175 ในระบบ R175H, Glu248 ในระบบ R248Q และ Arg175 กับ Arg 248 ในระบบ wild-type เพื่อให้ทราบถึงการหมุนของพันธะเคมีภายในกรดอะมิโน ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างของกรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลงในช่วงการศึกษาด้วย MD Simulation โดยเทียบกับค่า torsion angle ของพันธะเดียวกันในโครงสร้างเริ่มต้น

จากการศึกษาโครงสร้างของ Histidine, Glutamine และ Arginine พบว่าสามารถนิยาม torsion angle ของพันธะภายในกรดอะมิโนดังกล่าวได้ดังรูปที่ 87(a), 87(b) และ 87(c) ตามลำดับ



รูปที่ 87 แสดงการกำหนดอะตอมเพื่อใช้ศึกษาการหมุนพันธะ

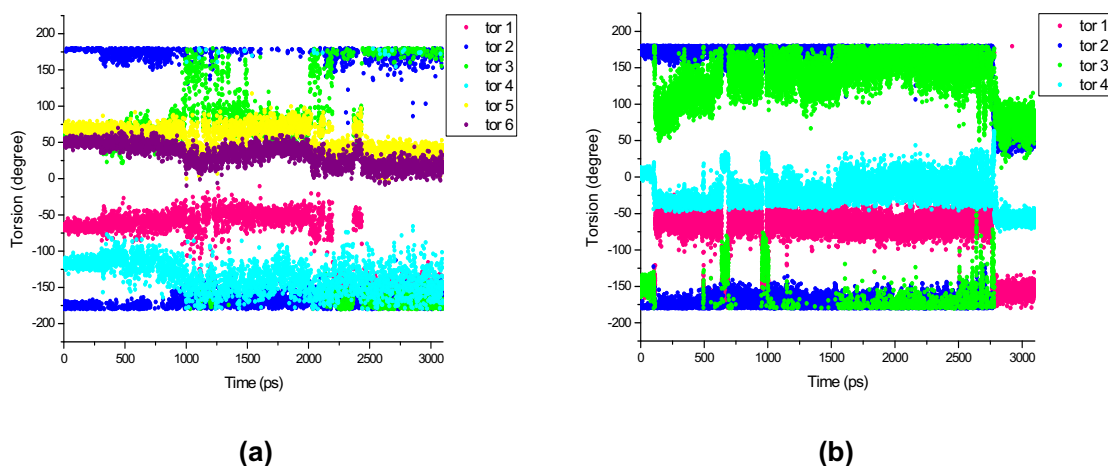
(a) Cysteine (b) Histidine (c) Arginine (d) Glutamine



รูปที่ 88 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า torsion angle ของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 175 เทียบกับเวลา โดย (a) ระบบ wild-type (Arg175) (b) ระบบ R175H (His175)

จากกราฟในรูปที่ 88 เป็นการเปรียบเทียบการหมุนพันธะระหว่างการศึกษาด้วย MD Simulation ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 175 ในระบบ wild-type (Arg175) กับระบบ R175H (His175) ซึ่งจะเห็นว่าค่า torsion angle ทั้งหมดของ Arg175 มีค่าคงที่ตลอดการศึกษาด้วย MD Simulation โดยค่า tor1 - tor6 จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ -70, 180, 85, 0 และ 20 องศา ตามลำดับ แสดงว่าพันธะทุกพันธะของ Arg175 ในระบบ wild-type ไม่เกิดการหมุนพันธะเลย ซึ่งสอดคล้องกับค่า RMSD ของ Arg175 ในระบบ wild-type (กราฟเส้นสีน้ำเงินในรูปที่ 85(a)) ที่มีค่าคงที่ตลอดการศึกษาด้วย MD Simulation แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของ Arg175 ในระบบ wild-type ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเลย

ส่วนในกรณีของ His175 พบว่าค่า torsion angle มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงอยู่ในช่วงกว้างกว่า Arg175 ในระบบ wild-type โดยเฉพาะมุม tor2 จะมีการแกว่งขึ้นลงของค่า torsion angle ค่อนข้างมาก แต่ก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า torsion angle อย่างถาวร ซึ่งสอดคล้องกับค่า RMSD ของ His175 ในระบบ R175H (กราฟเส้นสีดำในรูปที่ 85(a)) ที่มีค่า RMSD ส่วนใหญ่คงที่แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของ His175 ในระบบ R175H มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าในระบบ wild-type



รูปที่ 89 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า torsion angle ของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 248 เทียบกับเวลา (a) ระบบ wild-type (Arg248) (b) ระบบ R248Q (Glu248)

จากกราฟในรูปที่ 89 เป็นการเปรียบเทียบการหมุนพันธะระหว่างการศึกษาด้วย MD Simulation ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 248 ในระบบ wild-type (Arg248) กับระบบ R248Q (Glu248) ซึ่งจะเห็นว่าค่า torsion angle ของ Arg248 นั้นมี 4 มุมที่มีค่าไม่คงที่ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยแต่ไม่ชัดเจน คือ มุมที่ 2 (tor 2), มุมที่ 4 (tor 4), มุมที่ 5 (tor 5) และมุมที่ 6 (tor 6) โดยมีค่าเท่ากับ 180, -175, 60, และ 50 องศาตามลำดับ แสดงว่าพันธะทั้ง 4 พันธะนี้เกิดการหมุนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนอีก 2 มุมคือมุมที่ 1 (tor 1) และมุมที่ 3 (tor 3) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงมุมการหมุนพันธะอย่างชัดเจน โดยมุมที่ 1 มีค่าเปลี่ยนแปลงจาก -70 องศาเป็น -160 องศา และมุมที่ 3 มีค่าเปลี่ยนแปลงสลับไปมาระหว่าง 60 กับ -180 แสดงว่าพันธะระหว่าง CA กับ CB และ CG กับ CD ของ Arg248 ในระบบ wild-type มีการหมุนพันธะ ซึ่งสอดคล้องกับค่า RMSD ในรูปที่ 85(b) (กราฟเส้นสีแดงในรูปที่ 85(b)) ที่มีค่า RMSD ไม่คงที่ แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของ Arg248 มีการเปลี่ยนแปลงสลับไปมาได้ 2 โครงสร้าง

ส่วนในกรณีของ Glu248 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทั้ง 4 มุมที่เวลา 2750 ps คือ มีการหมุนไปพร้อมๆ กันทั้ง 4 พันธะ แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงมุมการหมุนพันธะของ Glu248 ในระบบ R248Q ที่เวลาดังกล่าวทั้ง 4 พันธะ ซึ่งสอดคล้องกับค่า RMSD ในรูปที่ 85(b) (กราฟเส้นสีแดงในรูปที่ 85(b)) ที่ค่า RMSD ไม่คงที่ แสดงว่าโครงสร้างของ Glu248 มีการเปลี่ยนแปลง

6. พันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA

การวิเคราะห์หาพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA เพื่อศึกษาผลกระทบของการกลายพันธุ์ที่มีต่อพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA โดยผู้วิจัยกำหนดให้โปรตีน p53 เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Electron acceptor) และ DNA เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Electron donor) จากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งโดยทำการสลับให้ DNA เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและโปรตีน p53 เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เพื่อให้ได้พันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA ครบถ้วน โดยศึกษาพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 2100-3100 ps

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์หาพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA ทั้ง 3 ระบบ

Donor (DNA)		Acceptor (Protein)			% Occupied		
Atom	Residue	H-Atom	Heavy Atom	Amino Acid	wild-type	R175H	R248Q
O2P	G8B	H	N	ALA276	14.71	99.48	99.98
O2P	G8B	HH22	NH2	ARG280	0.45	100	98.04
O1P	G8B	HG	OG	SER241	99.74	98.86	74.74
O1P	G8B	HD21	ND2	ASN239	-	0.12	99.98
O1P	G8B	H	N	ALA276	0.19	95.16	71.16
N7	G8B	HH12	NH1	ARG280	90.26	76.46	99.72
N7	G8B	HH22	NH2	ARG280	99.42	0.32	17.28
C6	G8B	HH12	NH1	ARG280	97.42	0.12	5.24
C8	G8B	HH12	NH1	ARG280	1.81	92.84	84.40
H8	G8B	HH12	NH1	ARG280	-	93.52	59.00
P	G8B	HG	OG	SER241	99.48	93.18	87.18
P	G8B	H	N	ALA276	0.06	94.38	90.10
O2P	T7B	HH12	NH1	ARG273	99.81	12.84	98.28
O2P	T7B	HH22	NH2	ARG273	91.16	20.90	85.94
O1P	T7B	HE	NE	ARG248	99.42	99.66	-
O1P	T7B	HH21	NH2	ARG248	95.29	76.10	-
O1P	T7B	HH12	NH1	ARG273	24.26	99.70	20.76

O5'	T7B	HH22	NH2	ARG273	93.87	99.42	94.60
P	T7B	HH12	NH1	ARG273	94.45	97.12	88.52
P	T7B	HE	NE	ARG248	74.52	97.32	-
P	T7B	HH22	NH2	ARG273	90.52	86.94	87.12
O3'	A6B	HH21	NH2	ARG248	68.39	91.34	-
O2P	G12A	HH22	NH2	ARG248	20.58	98.30	-
O1P	G12A	HH12	NH1	ARG248	8.97	99.92	-
P	G12A	HH12	NH1	ARG248	48.71	97.08	-
P	G12A	HH22	NH2	ARG248	2.19	98.52	-
O2P	G2A	H	N	LYS120	0.13	96.12	99.16
O3'	C1A	H	N	LYS120	-	91.48	-
Total (จำนวนพันธะไฮโดรเจนทั้งหมด)					12	20	8

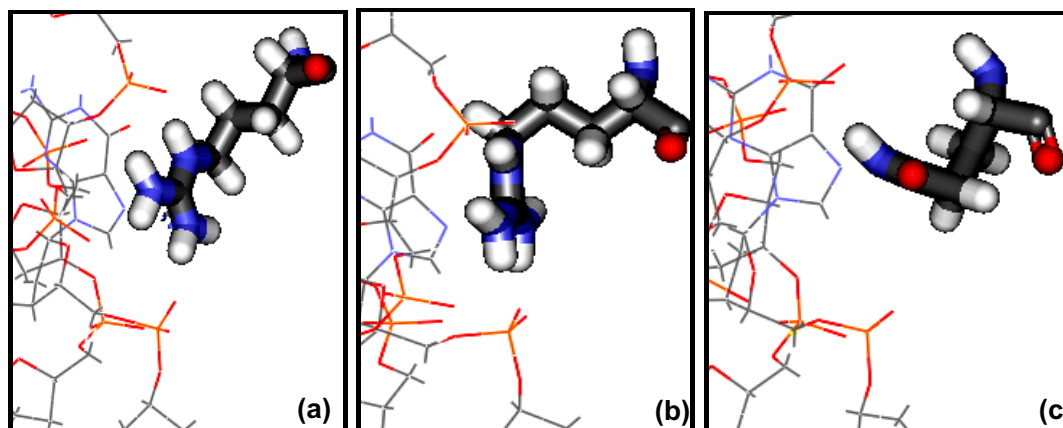
จากการวิเคราะห์หาพันธะไฮโดรเจนที่ยึดจับระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA พบว่ามีพันธะไฮโดรเจนจำนวนมากที่ยึดจับระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA คณะผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาเฉพาะพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น 90 % ขึ้นไปของเวลาที่ศึกษาด้วย MD Simulation ทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งจากการศึกษาพบพันธะไฮโดรเจนในระบบ wild-type ทั้งสิ้น 12 พันธะ, ระบบ R175H พบ 20 พันธะ และระบบ R248Q พบ 8 พันธะ โดยพันธะไฮโดรเจนทั้งหมดที่พบจะมี DNA เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและโปรตีน p53 เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และเป็นพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นที่ DNA 6 ตำแหน่ง คือ DNA ลำดับที่ 8 ของสาย B, 7 ของสาย B, 6 ของสาย B, 12 ของสาย A, 2 ของสาย A และ 1 ของสาย A กับโปรตีน p53 ดังตารางที่ 4 โดยสัญลักษณ์ G8B, T7B, A6B, G12A, G2A และ C1A มีความหมายดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความหมายของสัญลักษณ์ในลำดับสาย DNA

สัญลักษณ์	ความหมาย
G8B	เบส guanine ของ DNA สาย B ลำดับที่ 8
T7B	เบส Thymine ของ DNA สาย B ลำดับที่ 7
A6B	เบส Adenine ของ DNA สาย B ลำดับที่ 6
G12A	เบส Guanine ของ DNA สาย A ลำดับที่ 12
G2A	เบส Guanine ของ DNA สาย A ลำดับที่ 2
C1A	เบส Cytosine ของ DNA สาย A ลำดับที่ 1

จากการวิเคราะห์พันธะไฮโดรเจนพบว่าระบบ R175H มีจำนวนพันธะไฮโดรเจนมากที่สุด ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนที่ตำแหน่ง Arg248 ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ถึง 5 พันธะ ขณะที่ในระบบ

wild-type และระบบ R248Q ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA หรือเกิดได้น้อยกว่า 90% ที่กรดอะมิโนตำแหน่งนี้ ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณหมู่แทนที่ของ Arg248 ในระบบ R175H มีลักษณะโครงสร้างของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 89 ตัวอย่างเช่น ตำแหน่งไนโตรเจนอะตอมของ Arg248 ในระบบ R175H มีลักษณะชี้ลงพุ่งเข้าหาตำแหน่งฟอสเฟตในสาย DNA ทำให้ระยะห่างระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวใกล้เคียงกับฟอสเฟตมากขึ้นจนเกิดเป็นพันธะไฮโดรเจนได้ ในขณะที่ไนโตรเจนอะตอมของ Arg248 ในระบบ wild-type มีระยะห่างระหว่างฟอสเฟตในสาย DNA มากกว่าจึงทำให้ไม่พบพันธะไฮโดรเจน ส่วนในระบบ R248Q ตำแหน่งที่ 248 คือตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์จาก Arg เป็น Glu ทำให้หมู่แทนที่ของกรดอะมิโนดังกล่าวมีลักษณะสั้นกว่ากรดอะมิโนเดิม และมีระยะห่างมากขึ้น ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งนี้ไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ ซึ่งพันธะไฮโดรเจนเหล่านี้มีผลช่วยทำให้โปรตีน p53 ยึดจับกับ DNA ในระบบ R175H ได้แข็งแรงมากขึ้นและยังส่งผลไปยังค่าพลังงานในการยึดจับทำให้มีค่าพลังงานในการยึดจับต่ำและโครงสร้างมีความเสถียรใกล้เคียงกับระบบ wild-type อีกด้วย



รูปที่ 90 แสดงลักษณะการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง DNA กับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 248

(a) wild-type (b) R175H (c) R248Q

7. พันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ในระบบ wild-type, R175H และ R248Q กับกรดอะมิโนอื่นๆ ที่อยู่ล้อมรอบ

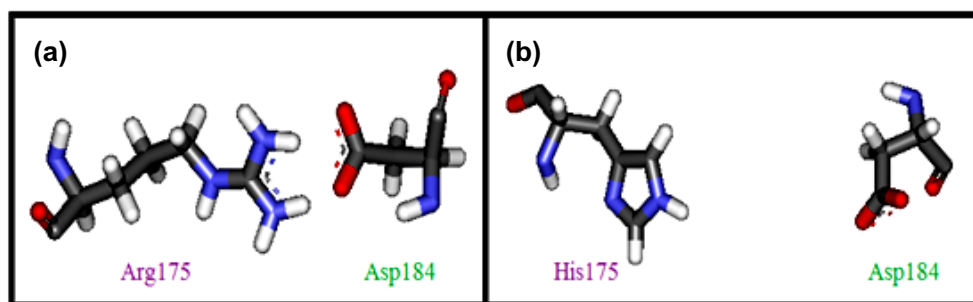
การวิเคราะห์หาพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์กับกรดอะมิโนอื่นๆ ที่อยู่ล้อมรอบของโปรตีน p53 เพื่อศึกษาผลกระทบของการกลายพันธุ์ที่มีต่อพันธะไฮโดรเจนภายในโครงสร้างของโปรตีน p53 กับกรดอะมิโนอื่นๆ ที่อยู่ล้อมรอบของโปรตีน p53 ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 175 และ 248 กับกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบของโปรตีน p53 โดยเปรียบเทียบระหว่าง His175 ระบบ R175H กับ Arg175 ในระบบ wild-type และเปรียบเทียบระหว่าง Glu248 ในระบบ R248Q กับ Arg248 ในระบบ wild-type ซึ่งกำหนดให้กรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบของโปรตีน p53 เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและกรดอะมิโนตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์เป็นตัวให้

อิเล็กตรอน จากนั้นทำการวิเคราะห์อีกครั้งโดยสลับให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบของโปรตีน p53 เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เพื่อให้สามารถค้นหาพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบของโปรตีน p53 และกรดอะมิโนตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ได้อย่างครบถ้วน โดยศึกษาพันธะไฮโดรเจนในช่วงเวลา 2100-3100 ps

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์หาพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 กับกรดอะมิโนตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ 3 ระบบ

Donor		Acceptor			% Occupied		
Atom	Amino Acid	H-Atom	Heavy Atom	Amino Acid	Wild-type	R175H	R248Q
O	Pro191	HH11	NH1	Arg175	99.74	-	-
		HE2	NE2	His175	-	2.64	-
OD2	Asp184	HH22	NH2	Arg175	99.68	-	-
CG	Asp184	HH12	NH1	Arg175	99.03	-	-
CG	Asp184	HH22	NH2	Arg175	97.48	-	-
OD2	Asp184	HH12	NH1	Arg175	96.90	-	-
OD1	Asp184	HH12	NH1	Arg175	96.00	-	-
O	Met237	HE	NE	Arg175	94.97	-	-
		HE2	NE2	His175	-	0.16	-

จากการวิเคราะห์ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาเฉพาะพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นมากกว่า 90% ของเวลาที่ศึกษาด้วย MD Simulation ดังแสดงในตารางที่ 6 จากการศึกษาพันธะไฮโดรเจนพบว่าในระบบ wild-type มีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นระหว่าง Pro191, Asp184 และ Met237 กับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ Arg175 จำนวน 7 พันธะ เมื่อทำการศึกษาลักษณะของโครงสร้างพบว่าเมื่อผ่านการทำ MD Simulation กรดอะมิโนตำแหน่ง Asp184 กับกรดอะมิโนตำแหน่ง Arg175 มีลักษณะโครงสร้างที่หันหมู่แทนที่เข้าหากัน ทำให้ระยะห่างของกรดอะมิโนทั้ง 2 ตำแหน่งใกล้กันจึงสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ ขณะที่ระบบ R175H กรดอะมิโนระหว่าง Asp184 กับ His175 มีระยะห่างมาก และหมู่แทนที่ของ His175 มีลักษณะสั้นกว่า Arg175 ทำให้ไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ ดังแสดงในรูปที่ 90 แสดงให้เห็นว่าระบบ R175H ที่เกิดการกลายพันธุ์นั้นส่งผลทำให้มีพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลโปรตีน p53 ลดน้อยลง ซึ่งอาจจะมีผลต่อความเสถียรของโปรตีนเอง ส่วน Glu248 ในระบบ R248Q และ Arg248 ในระบบ wild-type ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นมากกว่า 90%



รูปที่ 91 ลักษณะการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 กับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 184

(a) wild-type (b) R175H

8.

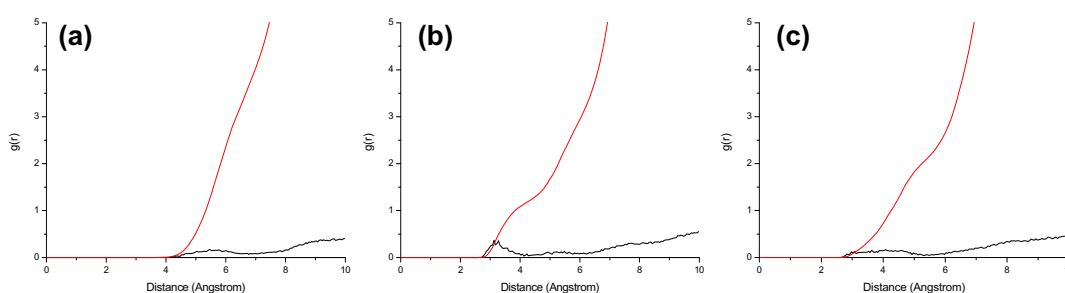
ก า ร

กระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมี (RDF) ล้อมรอบอะตอมของกรดอะมิโนต่าง ๆ

การวิเคราะห์หาการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบกรดอะมิโน เป็นการวิเคราะห์หาโมเลกุลน้ำที่มีบทบาทหน้าที่สำคัญต่อการทำงานของโปรตีน p53 ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำล้อมรอบกรดอะมิโนที่เกิดการกลายพันธุ์ของแต่ละระบบได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ Arg175 และ Arg248 ในระบบ wild-type, His175 ในระบบ R175H และ Glu248 ในระบบ R248Q โดยกำหนดให้อะตอมศูนย์กลางของ Arg และ His คืออะตอมไนโตรเจนในหมู่แทนที่ และอะตอมศูนย์กลางของ Glu คืออะตอมไนโตรเจนกับอะตอมออกซิเจน และกำหนดให้หาโมเลกุลน้ำในระยะ 0.05-10 Å ซึ่งวัดจากอะตอมที่สนใจไปยังอะตอมออกซิเจนของน้ำ โดยศึกษาหาการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีในช่วงเวลา 2100-3100 ps

●

ระบบ wild-type (Arg175)



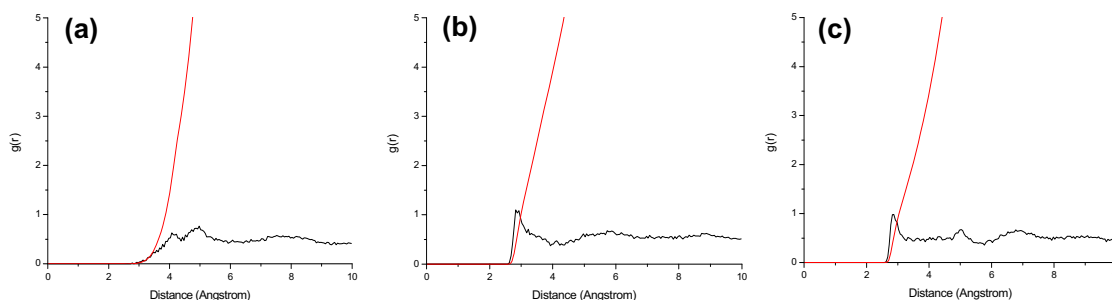
รูปที่ 92 กราฟ RDF ของโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบ Arg175 ในระบบ wild-type

(a) อะตอม NE (b) อะตอม NH1 (c) อะตอม NH2

จากกราฟรูปที่ 92 เป็นการศึกษาค้นหาการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบอะตอม NE, NH1 และ NH2 ของ Arg175 ในระบบ wild-type โดยเส้นกราฟสีแดงแสดงถึงความน่าจะเป็นในการพบน้ำที่รัศมีต่างๆ ส่วนเส้นกราฟสีดำแสดงถึงค่าผลรวมพื้นที่ใต้กราฟของเส้นสีแดง ซึ่งสามารถบอกถึงจำนวนน้ำที่รัศมีต่างๆ ได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าความน่าจะเป็นที่จะพบน้ำ

ต่ำมาก ซึ่งถือว่าไม่มีโมเลกุลน้ำที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอม NE, NH1 และ NH2 ในกรดอะมิโนตำแหน่ง Arg175 ในระยะ 10 Å สังเกตได้จากกราฟเส้นสีดำที่ไม่มี peak พุ่งขึ้นอย่างชัดเจนเลย

- ระบบ wild-type (Arg248)

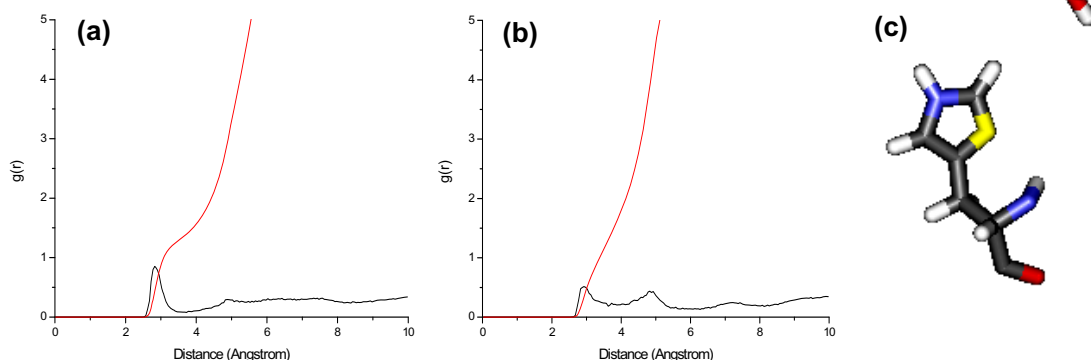


รูปที่ 93 กราฟ RDF ของโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบ Arg248 ในระบบ wild-type

(a) อะตอม NE (b) อะตอม NH1 (c) อะตอม NH2

จากกราฟรูปที่ 93 เป็นการศึกษาการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบอะตอม NE, NH1 และ NH2 ของ Arg248 ในระบบ wild-type จากการวิเคราะห์พบว่ารูปที่ 93(a) ไม่มีโมเลกุลน้ำที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับอะตอม NE ในตำแหน่ง Arg248 สังเกตได้จากกราฟเส้นสีดำที่ไม่มี peak พุ่งขึ้นอย่างชัดเจน ส่วนรูปที่ 93(b) และ 93(c) จะเห็นว่ากราฟเส้นสีดำมี peak ขึ้นแต่น้อยมาก และเส้น peak ลงมาไม่ถึงแกน X แสดงว่าบริเวณอะตอม NH1 และ NH2 มีโมเลกุลน้ำผ่านเข้าออก แต่โมเลกุลน้ำที่ผ่านเข้ามานั้นไม่อยู่กับที่ กล่าวคือ โมเลกุลน้ำดังกล่าวมีการผ่านเข้ามาแคร่ระยะเวลานั้นๆ เมื่อเวลาผ่านไปก็มีการเคลื่อนย้ายออกไป แสดงว่าบริเวณอะตอม NH1 และ NH2 ไม่มีโมเลกุลน้ำที่มีบทบาทสำคัญต่อกรดอะมิโน Arg248 ในระบบ wild-type

- ระบบ R175H (His175)

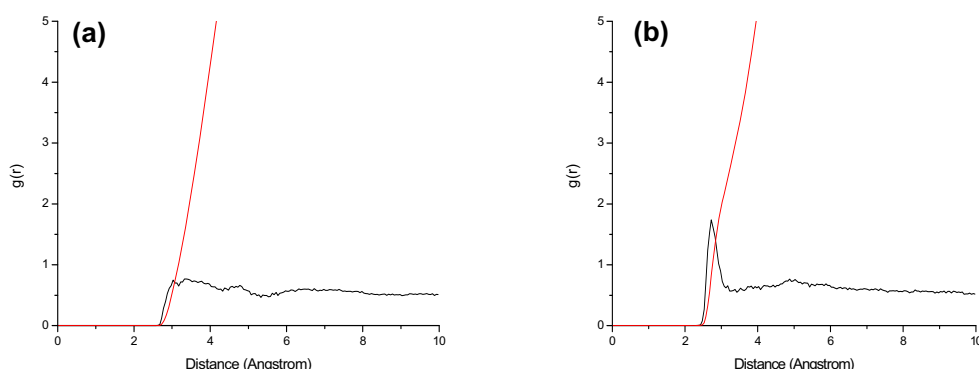


รูปที่ 94 กราฟ RDF ของโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบ His175 ในระบบ R175H

(a) อะตอม ND1 (b) อะตอม NE2 (c) ตำแหน่งโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบ His175

จากกราฟรูปที่ 94 เป็นการศึกษาการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบอะตอม ND1 และ NE2 ของ His175 ในระบบ R175H พบว่าจากรูปที่ 94(a) แสดงให้เห็นว่ามีโมเลกุลน้ำล้อมรอบ His175 บริเวณอะตอม ND1 ซึ่งสังเกตได้จากกราฟเส้นสีดำที่มี peak ขึ้นที่ระยะทางประมาณ 3 Å โดยโมเลกุลน้ำที่ระยะทาง 3 Å มีจำนวนทั้งสิ้น 1 โมเลกุล สังเกตจากกราฟเส้นสีแดง เมื่อดูจากโครงสร้างสามมิติที่ได้จากการศึกษา MD Simulation ก็พบน้ำโมเลกุลนี้ในลักษณะที่แสดงดังรูปที่ 94(c) ส่วนรูปที่ 94(b) แสดงให้เห็นว่ามีโมเลกุลน้ำผ่านเข้าออกบริเวณอะตอม NE2 แต่ไม่อยู่กับที่ สังเกตได้จากกราฟเส้นสีดำที่ขึ้น peak น้อยมาก และ peak ลงมาไม่ถึงแกน X แสดงว่าบริเวณอะตอม ND1 และ NE2 ของ His175 ไม่มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลน้ำ และโมเลกุลน้ำที่ผ่านเข้าบริเวณอะตอม ND1 ก็ไม่มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างของกรดอะมิโน His175 ด้วย

● ระบบ R248Q (Glu248)



รูปที่ 95 กราฟ RDF ของโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบ Glu248 ในระบบ R248Q

(a) อะตอม NE2 (b) อะตอม OE1

จากกราฟรูปที่ 95 เป็นการศึกษาการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีล้อมรอบอะตอม NE2 และ OE1 ของ Glu248 ในระบบ R248Q พบว่าจากกราฟทั้ง 2 กราฟแสดงให้เห็นว่ามีโมเลกุลน้ำผ่านเข้าออก แต่ไม่มีโมเลกุลน้ำที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับอะตอม NE1 และ OE2 ในตำแหน่ง Glu248 สังเกตได้จากกราฟรูปที่ 95(a) พบว่าเส้นสีดำไม่มี peak ขึ้น ส่วนกราฟรูปที่ 95(b) จะมี peak ขึ้นแต่ไม่ลงมาไม่ถึงแกน X แสดงว่าไม่พบโมเลกุลน้ำที่มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างของกรดอะมิโน Glu248

9.

พลังงา

นในการยึดจับระหว่างโปรตีน p53 และ DNA (Binding Energy)

การวิเคราะห์หาค่าพลังงานในการยึดจับระหว่างโปรตีน p53 และ DNA เพื่อศึกษาความเสถียรของโครงสร้างในแต่ละระบบ ซึ่งถ้าพลังงานที่ได้ยังมีค่าต่ำแสดงว่าระบบมีความเสถียร แต่ถ้าค่าพลังงานสูงก็แสดงว่าระบบนั้นๆ ไม่เสถียร โดยผู้วิจัยได้เลือกใช้โครงสร้างสุดท้ายในการวิเคราะห์ผล ได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 7

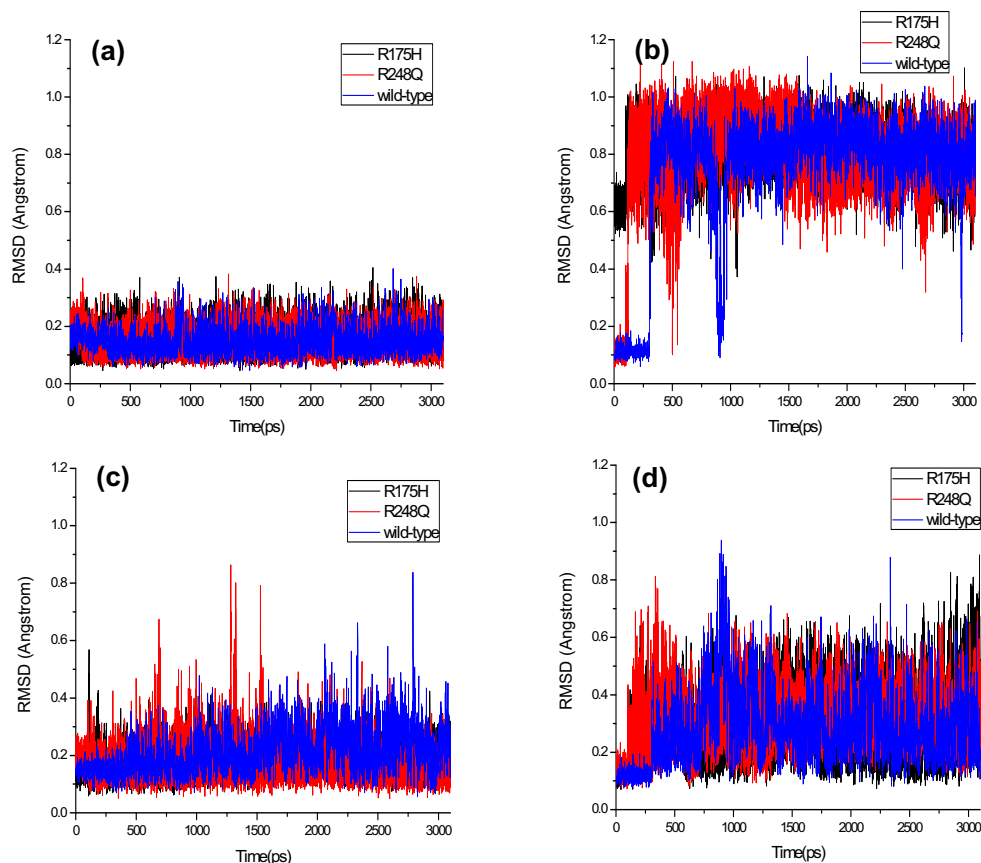
ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบค่าพลังงานในการยึดจับระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA ทั้ง 3 ระบบ

ระบบ	E_{complex} (kcal/mol)	$E_{\text{p53+Zn}}$ (kcal/mol)	E_{DNA} (kcal/mol)	E_{binding} (kcal/mol)
Wild-type	-3101.0545	-651.2484	-1397.7984	-1052.0077
R175H	-4732.4186	-1751.4428	-1957.3575	-1023.6183
R248Q	-4791.7360	-2293.3350	-1661.0751	-837.3259

จากตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์หาค่าพลังงานในการยึดจับระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA พบว่าในระบบ wild-type มีค่าพลังงานต่ำที่สุดคือ -1052.0077 kcal/mol และระบบ R248Q มีค่าพลังงานสูงที่สุดคือ -837.3259 kcal/mol ส่วนในระบบ R175H มีค่าพลังงานเท่ากับ -1023.6183 kcal/mol ดังนั้นการกลายพันธุ์ของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีน p53 มีผลทำให้ความสามารถในการยึดจับระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA ลดลง และยังส่งผลให้ความเสถียรของโครงสร้างลดลงด้วย

10. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+}

จากโครงสร้างจากเทคนิค X-ray crystallography ของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีน p53 พบว่ามี Zn^{2+} อยู่ภายในโครงสร้าง และมีกรดอะมิโนล้อมรอบ Zn^{2+} อยู่ 4 กรดอะมิโน ได้แก่ Cysteine 3 กรดอะมิโน (Cysteine ตำแหน่งที่ 176, Cysteine ตำแหน่งที่ 238, Cysteine ตำแหน่งที่ 242) และ Histidine 1 กรดอะมิโน (Histidine ตำแหน่งที่ 179) ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาหาค่า RMSD ของอะตอมทุกอะตอมในกรดอะมิโนดังกล่าว เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ในระหว่างการทำ MD Simulation โดยเทียบกับตำแหน่งอะตอมของโครงสร้างกรดอะมิโน เริ่มต้น ซึ่งการวิเคราะห์หาค่า RMSD ของกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด ได้ผลดังนี้



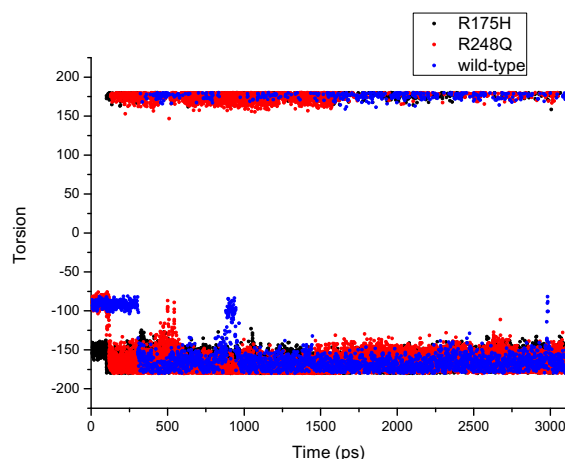
รูปที่ 96 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RMSD ของกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} เทียบกับเวลา

- (a) Cysteine ตำแหน่งที่ 176 (b) Cysteine ตำแหน่งที่ 238
(c) Cysteine ตำแหน่งที่ 242 (d) Histidine ตำแหน่งที่ 179

จากรูปที่ 96 พบว่า Cysteine ตำแหน่งที่ 176 แทบจะไม่มีเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเลย สังเกตได้จากค่า RMSD ที่ค่อนข้างคงที่และแกว่งอยู่ในช่วงแคบ คือมีค่าไม่เกิน 0.4 Å ส่วน Cysteine ตำแหน่งที่ 242 และ Histidine ตำแหน่งที่ 179 มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพียงเล็กน้อย สังเกตได้จาก RMSD มีค่าไม่เกิน 1 Å ในขณะที่ Cysteine ตำแหน่งที่ 238 มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในช่วงเวลา 0-300 ps อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยผลของมุมการหมุนพันธะ เมื่อพิจารณาค่า RMSD ของทุกระบบพบว่า มีค่า RMSD ต่ำกว่า 1 Å ซึ่งถือว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำ MD Simulation ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างเริ่มต้นมากนัก

11. การหมุนพันธะของ Cysteine ในตำแหน่งที่ 238 ทั้ง 3 ระบบ

การวิเคราะห์การหมุนพันธะของ Cys238 ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาค่ามุมในการหมุนพันธะของ Cys238 ทั้ง 3 ระบบ เพื่อให้ทราบถึงตำแหน่งของพันธะเคมีที่มีผลทำให้โครงสร้างของ Cys238 เกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการทำ MD Simulation โดยเทียบกับค่ามุมเริ่มต้น ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่

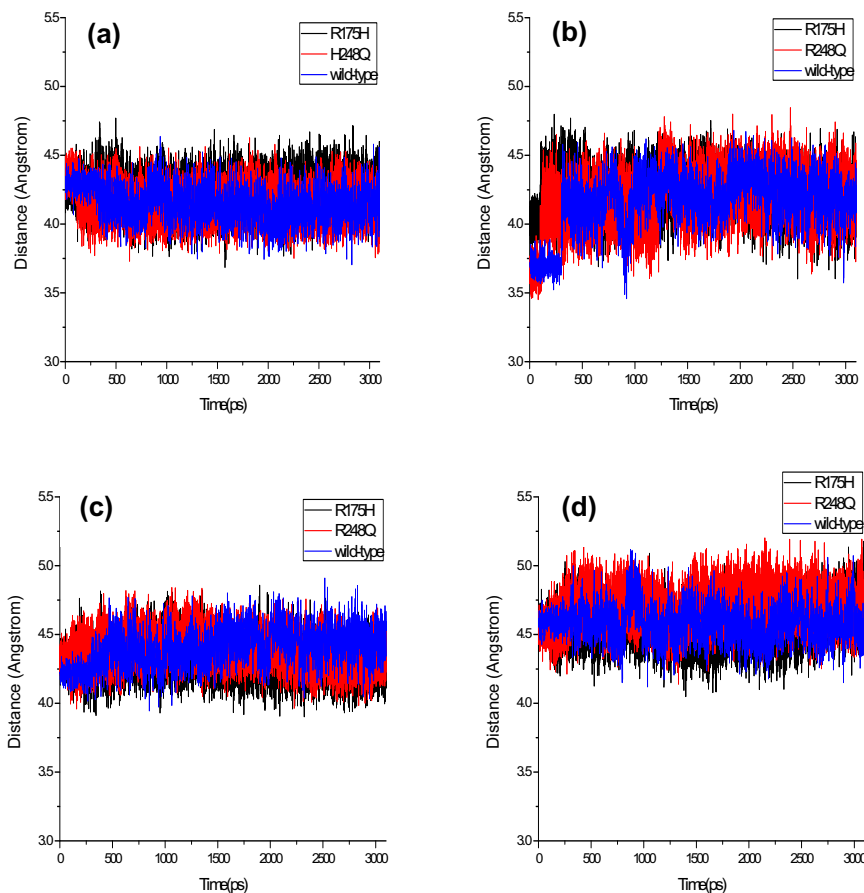


รูปที่ 97 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า torsion angle ของ Cys238 เทียบกับเวลา

จากการวิเคราะห์ค่ามุมการหมุนพันธะของ Cys238 พบว่ามุมการหมุนพันธะที่ทำให้ค่า RMSD ของ Cys238 มีการเปลี่ยนแปลง คือ การหมุนของพันธะระหว่าง CA กับ CB (ดังรูปที่ 87(a)) ซึ่งจากรูปที่ 97 กราฟแสดงให้เห็นว่าระบบทั้ง 3 ระบบ มีการเปลี่ยนแปลงค่ามุมการหมุนพันธะเหมือนกัน โดยเปลี่ยนจาก -100 องศาเป็น -180 องศา ส่งผลให้โครงสร้างของ Cys238 มีการเปลี่ยนแปลง และการเปลี่ยนแปลงมุมการหมุนพันธะจะอยู่ในช่วงเวลา 0-300 ps ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Cys238 สังเกตได้จากค่า RMSD ที่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาดังกล่าว และลักษณะของการเปลี่ยนแปลงก็มีความสอดคล้องกัน ดังรูปที่ 96(b)

12. การวิเคราะห์หาระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} กับกรดอะมิโนที่ล้อมรอบ

การวิเคราะห์หาระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} กับกรดอะมิโนที่ล้อมรอบ เป็นวัฏระยะห่างจากไอออน Zn^{2+} ไปยังกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของระยะห่างในระหว่างการทำ MD Simulation ซึ่งผู้ทำวิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาระยะห่างโดยกำหนดให้วัดจากไอออน Zn^{2+} ไปยังตำแหน่ง C_α ของกรดอะมิโน Cysteine 3 กรดอะมิโน (Cysteine ตำแหน่งที่ 176, Cysteine ตำแหน่งที่ 238, Cysteine ตำแหน่งที่ 242) และ Histidine 1 กรดอะมิโน (Histidine ตำแหน่งที่ 179) ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 96 และทำการวิเคราะห์หาระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} กับกรดอะมิโนที่ล้อมรอบ โดยเปรียบเทียบระหว่างระยะห่างที่ได้จากเทคนิค X-ray crystallography กับระยะห่างที่ได้จากการทำ MD Simulation ได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 8



รูปที่ 98 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างของกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} เทียบกับเวลา

- (a) Cysteine ตำแหน่งที่ 176 (b) Cysteine ตำแหน่งที่ 238
(c) Cysteine ตำแหน่งที่ 242 (d) Histidine ตำแหน่งที่ 179

จากกราฟจะเห็นได้ว่ามีความสอดคล้องกับค่า RMSD ของกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} โดย Cysteine ตำแหน่งที่ 176, Cysteine ตำแหน่งที่ 242 และ Histidine ตำแหน่งที่ 179 มีค่าระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} ค่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนดังกล่าวยังยึดจับกับไอออน Zn^{2+} ได้ดี ในระหว่างการทำ MD Simulation ทำให้โครงสร้างไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วน Cysteine ตำแหน่งที่ 238 พบว่าเมื่อทำ MD Simulation ระยะห่างระหว่าง Cys238 กับ Zn^{2+} มีค่ามากขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปของ Cys238

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} กับกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบ ที่ได้จากเทคนิค X-ray crystallography กับระยะห่างที่ได้จากการทำ MD Simulation

กรดอะมิโนของ โปรตีน p53	ระยะทาง (Å)			
	เทคนิค X-ray crystallography	MD Simulation		
		Wild-type	R175H	R248Q
Cysteine 176	4.27	4.15	4.24	4.15
Cysteine 238	3.75	4.16	4.23	4.19
Cysteine 242	4.57	4.46	4.31	4.39
Histidine 179	4.53	4.42	4.56	4.70

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่าระยะห่างระหว่างไอออน Zn^{2+} กับกรดอะมิโนล้อมรอบที่ได้จากระยะในโครงสร้าง X-ray crystallography และ MD Simulation พบว่า Cys176, Cys242 และ His179 มีการเปลี่ยนแปลงระยะห่างน้อยมาก หรืออาจกล่าวได้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระยะห่าง ส่วน Cys238 มีการเปลี่ยนแปลงของระยะห่างมากที่สุดเมื่อเทียบกับตำแหน่งอื่นๆ แต่ก็เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Cys238 ซึ่งผลการวิเคราะห์มีความสอดคล้องกันกับรูปที่ 96

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การศึกษา MD simulation ของ monomer p53 ในส่วนที่เป็น core domain

จากการศึกษาสมบัติทางไดนามิกส์ของโปรตีน p53 ในสภาวะต่างๆ คือ โปรตีน p53 อิสระที่อยู่ในรูป monomer (ระบบที่ 1), โปรตีน p53 ที่อยู่ในรูป monomer และยึดจับกับ DNA (ระบบที่ 2) และโปรตีน p53 ที่อยู่ในรูป monomer ซึ่งยึดจับกับ DNA และมี Zn^{2+} อยู่บริเวณ binding site (ระบบที่ 3) ด้วยวิธี MD simulation เป็นเวลา 2460 ps โดยใช้ผลการทดลองในช่วง 1460-2460 ps ซึ่งระบบอยู่ในสภาวะสมดุลแล้ว มาวิเคราะห์ RMSD, Torsion angle, พันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA และการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวรัศมีรอบล้อมกรดอะมิโนในตำแหน่ง hot spots (Arg82, Gly152, Arg155, Arg156, Arg180 และ Arg189) จากการศึกษาพบว่าการยึดจับของ DNA และ Zn^{2+} ในโครงสร้างของโปรตีน p53 มีผลโดยรวมทำให้โครงสร้างของโปรตีน p53 เสถียรขึ้นสังเกตจากค่าพลังงานรวมของระบบที่ 2 และ 3 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระบบที่ 1 และเมื่อพิจารณาจากค่า RMSD และ Torsion angle พบว่า DNA และ Zn^{2+} มีผลทำให้โครงสร้างของ Arg155 และ Arg180 เสถียรมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อโครงสร้างของ Arg82, Arg156, Gly152 และ Arg189

เมื่อวิเคราะห์พันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA พบว่ามีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ยึดจับกับ DNA ในระบบที่ 2 ได้แก่ Ser28, Ser148, Arg155 และ Arg180 แต่เมื่อระบบมี Zn^{2+} ในบริเวณ binding site (ระบบที่ 3) จะทำให้จำนวนพันธะไฮโดรเจนลดลง โดยกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ยึดจับกับ DNA จะ

เหลือเพียง Arg155 และ Arg180 เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้^{17, 28, 29} และเมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของโมเลกุลน้ำจะพบว่าในระบบที่ 2 และ 3 จะมีโมเลกุลน้ำเคลื่อนที่เข้ามาใกล้กรดอะมิโนที่ทำการวิเคราะห์มากกว่าระบบที่ 1 แสดงว่า DNA และ Zn^{2+} มีส่วนช่วยทำให้โมเลกุลของน้ำเคลื่อนที่เข้ามาใกล้โปรตีน p53 โดยโมเลกุลน้ำที่เข้ามาใกล้กรดอะมิโนอาจมีส่วนช่วยทำให้โครงสร้างมีความเสถียรมากขึ้นเนื่องจากอาจมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีน p53 ซึ่งตรงกับงานวิจัยที่อ้างอิง¹⁷

ตอนที่ 2 การศึกษา MD simulation ของ tetramer p53 ในส่วนที่เป็น core domain

จากการศึกษาสมบัติเชิงไดนามิกส์ของโปรตีน p53 ที่อยู่ในรูปเตตระเมอร์ที่ยึดจับกับ DNA และมีไอออน Zn^{2+} อยู่บริเวณ binding site ด้วยวิธี MD simulation เป็นเวลา 1060 ps โดยใช้ผลการทดลองในช่วง 760 - 1060 ps ซึ่งระบบอยู่ในสภาวะสมดุลแล้ว ในการวิเคราะห์หาค่า RMSD, พันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 และ DNA และการกระจายตัวของโมเลกุลน้ำในแนวนอนมีรอบล้อม ไอออน Zn^{2+} ทั้ง 4 โมโนเมอร์ จากการวิเคราะห์ผลพบว่าโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีน p53 เมื่อทำ MD simulation ในช่วงเวลา 760 - 1060 ps ค่า RMSD ของแต่ละโมโนเมอร์จะค่อนข้างคงที่ ค่า RMSD ที่ใกล้เคียงกัน แสดงว่าโปรตีน p53 แต่ละโมโนเมอร์มีโครงสร้างคล้ายกัน จากการวิเคราะห์พันธะไฮโดรเจนที่ยึดจับระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA พบว่ามี DNA 2 ตำแหน่งที่ยึดจับโปรตีน p53 ทั้ง 4 โมโนเมอร์ คือ DNA ลำดับที่ 2 (guanine) และ 8 (guanine) ของแต่ละสายยึดจับกับโปรตีน p53 ทั้ง 4 โมโนเมอร์ โดยยึดจับกับโปรตีน p53 ลำดับที่ 26, 146, 181 และ 185 ซึ่งเป็นกรดอะมิโน Ser, Ser, Ala, Arg ตามลำดับของแต่ละโมโนเมอร์ ซึ่งช่วยทำให้โปรตีน p53 ยึดจับกับ DNA ได้แข็งแรงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าไอออน Zn^{2+} ของแต่ละโมโนเมอร์ เกิดการเคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงตำแหน่งไปจากโครงสร้าง X-ray เป็นระยะทาง 17.96, 7.12, 9.33, 6.25 Å สำหรับ โมโนเมอร์ A, B, C และ D ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลมาจากการดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและตำแหน่งของหมู่แทนที่ที่ทำให้แรงยึดเหนี่ยวของกรดอะมิโนดังกล่าวกับไอออน Zn^{2+} ลดน้อยลง น้ำจึงสามารถเข้าไปแทนที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ได้และดึงไอออน Zn^{2+} ออกจากตำแหน่งเดิม โดยไอออน Zn^{2+} ในโมโนเมอร์ A จะเคลื่อนที่ออกมาไกลที่สุดเนื่องจากมีจำนวนของโมเลกุลน้ำล้อมรอบ 6 โมเลกุล ในขณะที่โมโนเมอร์อื่นๆ มีน้ำล้อมรอบน้อยกว่า 6 โมเลกุลเป็นผลทำให้ไอออน Zn^{2+} เคลื่อนที่ออกจากตำแหน่งเดิมมากกว่าโมโนเมอร์อื่น เนื่องจากน้ำเป็นสาเหตุที่ดึงให้ไอออน Zn^{2+} เกิดการเคลื่อนที่

ตอนที่ 3 การศึกษา MD simulation ของ monomer p53 ที่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนที่เป็น core domain

จากการศึกษาการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีน p53 กับดีเอ็นเอ โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างโปรตีน p53 ที่เกิดการกลายพันธุ์ (R175H, R248Q) และไม่เกิดการกลายพันธุ์ (wild-type) และศึกษาเป็นเวลาทั้งสิ้น 3100 ps โดยใช้โครงสร้างในช่วงเวลา 2100-3100 ps มาทำการวิเคราะห์ผล ซึ่งในการศึกษาจะทำการศึกษาเฉพาะมอนอเมอร์ A เท่านั้น เนื่องจาก

ทั้ง 4 มอนอเมอร์มีลำดับกรดอะมิโนตรงกันทุกๆ มอนอเมอร์และสามารถซ้อนทับกันได้สนิท จากการวิเคราะห์ผลพบว่าโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีน p53 เมื่อทำ MD Simulation ค่า RMSD ของโครงสร้างโดยรวมในระบบ wild-type และ R248Q ค่อนข้างคงที่ ส่วนระบบ R175H ยังมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในสารประกอบเชิงซ้อนอยู่ตลอดเวลา สังเกตจากค่า RMSD ของโปรตีน p53 ยังเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทำให้ระบบเข้าสู่สมดุลช้ากว่าระบบ wild-type และ R248Q จากการวิเคราะห์ค่า RMSD ในระหว่างการศึกษา MD Simulation ของกรดอะมิโนที่เกิดการกลายพันธุ์ พบว่า His175 ในระบบ R175H และ Glu248 ในระบบ R248Q มีค่า RMSD มากกว่า Arg175 และ Arg248 ในระบบ wild-type เนื่องจากทั้ง 2 กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน ทำให้ระบบต้องหาโครงสร้างที่เสถียรของกรดอะมิโนชนิดใหม่ จากการวิเคราะห์การหมุนพันธะพบว่าภายหลังที่ระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลแล้ว โครงสร้างของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 175 ในระบบ wild-type และ R175H ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมุมพันธะเกิดขึ้น แต่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 248 ในระบบ wild-type พบว่ามีค่ามุมพันธะ 2 ค่าที่สามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ แสดงให้เห็นว่ามี 2 โครงสร้างที่สภาวะสมดุล ส่วนในกรณีของกรดอะมิโนตำแหน่ง 248 ในระบบ R248Q พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงมุมพันธะที่เวลา 2750 ps ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในสภาวะสมดุล จากการวิเคราะห์หาพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 กับดีเอ็นเอ พบว่ามีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นในระบบ wild-type, R175H และ R248Q เป็นจำนวน 12, 20 และ 8 พันธะตามลำดับ ซึ่งในระบบ R175H มีพันธะไฮโดรเจนเกิดมากที่สุด และมากกว่าระบบ wild-type เนื่องจากหมู่แทนที่ของ Arg248 ในระบบ R175H มีลักษณะแตกต่างจากอีก 2 ระบบ และทำให้สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอได้ ในขณะที่อีก 2 ระบบหมู่แทนที่ไม่สามารถสร้างพันธะกับหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอได้ จากการวิเคราะห์หาพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีน p53 กับกรดอะมิโนตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ พบว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง Arg175 ในระบบ wild-type เพียงระบบเดียว ส่วนระบบ R175H และ R248Q ไม่พบพันธะไฮโดรเจน แสดงว่าการกลายพันธุ์ของทั้ง 2 ระบบมีผลต่อการยึดจับระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 175 และ 248 กับโปรตีน p53 จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของน้ำในแนวนรัศมีที่ล้อมรอบกรดอะมิโนที่เกิดการกลายพันธุ์ทั้ง 3 ระบบ พบว่าทั้ง 3 ระบบไม่พบน้ำที่มีความสำคัญกับสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีน p53 กับดีเอ็นเอ

จากการวิเคราะห์ค่าพลังงานในการยึดจับ พบว่าระบบ wild-type มีค่าพลังงานในการยึดจับต่ำที่สุด แสดงว่าโครงสร้างมีความเสถียรมากที่สุด ซึ่งระบบ R175H และ R248Q มีค่าพลังงานในการยึดจับสูงกว่า ทำให้โครงสร้างมีความเสถียรน้อยกว่า ทั้งนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ที่มีผลทำให้ความสามารถในการยึดจับลดลง จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบไอออน Zn^{2+} ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ได้แก่ Cys176, Cys238, Cys242 และ His179 พบว่ามีการหมุนของพันธะใน Cys238 ส่งผลให้โครงสร้างของ Cys238 มีการเปลี่ยนแปลง และลักษณะของการเปลี่ยนแปลงก็มีความสอดคล้องกันกับค่า RMSD ด้วย และยังพบว่าเมื่อทำ MD Simulation ระยะห่างระหว่าง Cys238 กับ Zn^{2+} มีค่ามากขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปของ Cys238 เมื่อพิจารณากรดอะมิโนแต่ละตำแหน่งโดยรวมแล้ว พบว่ามีค่า RMSD ต่ำกว่า 1 Å ซึ่งถือว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำ MD Simulation ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างเริ่มต้นมากนัก

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. เนื่องจากโปรตีน p53 จัดอยู่ในกลุ่มของยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) โดยจะทำหน้าที่ตรวจสอบและซ่อมแซม DNA ที่ระยะ G1 ในวัฏจักรเซลล์ก่อนเข้าสู่ระยะ S หากซ่อมแซมไม่ได้ก็จะทำให้เซลล์ตายด้วยกระบวนการที่เรียกว่า apoptosis หรือหากความผิดปกติของ DNA ร้ายแรงเกินกว่าจะแก้ไขได้ก็จะหยุดวงจรการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ระยะ G1 ซึ่งกระบวนการควบคุมต่างๆ เหล่านี้ผ่านการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 กับลำดับ DNA ที่จำเพาะ ซึ่งกลไกการตรวจสอบ DNA ของโปรตีน p53 ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน ดังนั้นจึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาเปรียบเทียบการยึดจับและสมบัติต่างๆ ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA ที่ปกติและผิดปกติ เพื่อที่จะได้ทราบความแตกต่างในยึดจับระหว่างโปรตีน p53 กับ DNA ที่ปกติและผิดปกติ นอกจากนี้ยังจะเข้าใจถึงการทำงานของโปรตีน p53 มากขึ้นด้วย
2. โปรตีน p53 ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งสิ้น 393 กรดอะมิโน โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วนตามหน้าที่ คือ N-terminal domain, Central domain และ C-terminal domain ซึ่งบริเวณ Central domain หรือ Cord domain จะเป็นบริเวณที่มีการสัมผัสกับ DNA ในการตรวจสอบความผิดปกติของ DNA ดังนั้นบริเวณ Central domain จึงเป็นบริเวณที่สำคัญที่สุดต่อการทำงานของโปรตีน p53 โดยบริเวณ Central domain จะทำงานในรูป tetramer ดังนั้นการศึกษาต่างๆ เกี่ยวกับบริเวณ Central domain ของโปรตีน p53 จึงควรศึกษาในรูปที่เป็น tetramer

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ
 - มีการพัฒนาการเรียนการสอน
 - งานวิจัยนี้ได้ใช้การศึกษาบางส่วนเป็นวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาตรีของนักศึกษา สาขาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ
 - นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9 และครั้งที่ 10
 - นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมประจำปีกลุ่มวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส สกว.
 - นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานแสดงผลงานวิจัย CHM & BMS ประจำปีการศึกษา 2552 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต