



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส-ไทมิดิเลตซินเทส
จากเชื้อพลาสโมเดียมไวแว็กซ์

X-ray Crystallographic Investigation of *Plasmodium vivax*
Dihydrofolate reductase-Thymidylate synthase

นายพลังพล คงเสรี

ภาควิชาเคมี และศูนย์วิจัยโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

30 สิงหาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส-ไทมิดิเลตซินเทส
จากเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์

X-ray Crystallographic Investigation of *Plasmodium vivax*
Dihydrofolate reductase-Thymidylate synthase

นายพลังพล คงเสรี

ภาควิชาเคมี และศูนย์วิจัยโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA4780020

ชื่อโครงการ: การศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสไทมิดิเลตซินเทส
จากเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์

ชื่อนักวิจัย: นายพลังพล คงเสรี
ภาควิชาเคมี และ ศูนย์วิจัยโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม 6 เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10400
โทรศัพท์: 02-201-5190 โทรสาร: 02-354-7151

E-mail: scpks@mahidol.ac.th, palangpon@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 31 สิงหาคม 2547 ถึง 30 สิงหาคม 2550

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

เอนไซม์ PvDHFR ตกผลึกในสารละลาย polyethylene glycol MW4000 ที่ pH 7.2 ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับ NADPH และยาไพริเมทาโมน 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 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอันตรกิริยาระหว่างยาไพริเมทาโมนที่จับกับเอนไซม์ด้วยพันธะไฮโดรเจน (Asp-53, Ile13, Ile-173) π - π interactions (Phe-57) และมีแรงแรงแวลเดอวาลส์ในส่วนของ p-chlorophenyl กับ NADPH และมีพันธะไฮโดรเจนระหว่าง p-chlorine และ Ser-120 โดยได้ศึกษา เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาไพริเมทาโมน (SP21: Ser58Arg+Ser117Asn) ร่วมกับตัวยับยั้งหลายชนิด พบว่าผลจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Ser117→Asn ไปรบกวนการจับตัวของกลุ่ม p-chlorine ในตัวยาคือ

วง 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: $a = 62.366$, $b = 114.813$, $c = 198.901$ Å และมีปริมาณ solvent ประมาณ 50% โดยมีสองโมเลกุลของเอนไซม์ PvDHFR-TS ในแต่ละ asymmetric unit ใช้เทคนิค molecular replacement ในการโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ PvDHFR-TS ซึ่งพบว่ามี space group คือ $P2_12_12_1$ ผลจากการศึกษาโครงสร้างของทั้งชนิด PvDHFR และ PvDHFR-TS ได้แสดงให้เห็นถึงกลไกการจับตัวของยาไพริเมทามีนกับเอนไซม์เป้าหมาย และแสดงให้เห็นถึงกลไกการดื้อยาที่จะนำไปสู่ประโยชน์ในการออกแบบยารักษาโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นต่อไป

Keywords: dihydrofolate reductase, thymidylate synthase, crystal structure, malaria, DHFR, antifolates, drug resistance

Abstract

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-freezed 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 $P2_12_12_1$ 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.

Executive Summary

ในการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase เอนไซม์ PvDHFR บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น ประมาณ 10 mg/ml ในรูปของ ternary complex PvDHFR-NADPH-pyrimethamine พบว่าสภาวะใน polyethylene glycol ให้ผลดีโดยเห็นผลึกขนาดเล็ก หลักจากการปรับปรุงสภาวะในการตกผลึกสามารถเตรียมผลึกที่เป็นแผ่น โดยเริ่มเห็นผลึกในเวลาประมาณ 3 วัน และผลึกจะใช้เวลาโตเต็มที่ประมาณ 10-14 วัน โดยมีขนาดประมาณ $300 \times 200 \times 100 \mu\text{m}$ เมื่อนำผลึกที่ได้ไปวิเคราะห์โดยวิธี flash-freezing ด้วย nylon loop ที่อุณหภูมิ -160°C ด้วย imaging-plate R-Axis IV++ area detector บนเครื่อง rotating anode x-ray generator พบว่าผลึกสามารถกระจ่างรังสีเอกซ์ได้ดีกว่า $2.0 \text{ \AA}$ 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 โดยใช้ N-terminal DHFR domain ของ *Plasmodium falciparum* DHFR-TS เป็น search model โครงสร้างที่ได้แสดงให้เห็นส่วนของ insert-1 และ insert-2 ของ plasmodium DHFR ที่มีลักษณะเป็น loop และ helix ตามลำดับ ข้อมูลสำคัญที่สุดที่ได้จากโครงสร้างนี้คือ ลักษณะของ binding site ของ PvDHFR ที่แสดงให้เห็นว่า ser-117 มี side chain ใกล้กับ p-chlorine atom ของ pyrimethamine ซึ่งเมื่อเกิดการ mutation เกิดขึ้นที่ตำแหน่งนี้จาก serine เป็น asparagine จะทำให้เกิด steric repulsion และ pyrimethamine ไม่สามารถจับตัวกับเอนไซม์ได้ลดลง (ประมาณ 300 เท่า) การศึกษาโครงสร้างของ PvDHFR ชนิด double mutant (SP21: Ser117Asn + Ser58Arg) ร่วมกับ pyrimethamine แสดงให้เห็นถึงผลของ steric effect จาก Asn ที่ผลักกลุ่ม p-chlorine และทำให้เกิดการขยับของโมเลกุล pyrimethamine ออกจากตำแหน่งที่จับตัวได้ดี และนอกจากนั้น 120's loop (residues 118-125) ยังปรับตัวอันเป็นผลจาก residue Leu121 ผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงการ mutation ที่ตำแหน่ง 117 มีผลโดยตรงต่อการจับตัวของตัวยับยั้งกับเอนไซม์ ซึ่งนำไปสู่การดื้อต่อยาของเชื้อมาลาเรีย

ได้ศึกษาผลของ Ser117Asn ที่ผลักกับ p-chloro group ใน pyrimethamine โดยได้ตกผลึก des-chloropyrimethamine ที่มี sensitivity ต่อ mutation เพียง 5 เท่า กับ PvDHFR ทั้งชนิด wild-type และ double mutant พบว่า des-chloropyrimethamine จับกับ wild-type PvDHFR เช่นเดียวกับ pyrimethamine ทุกประการ ในขณะนี้พบ perturbation เพียงเล็กน้อยในกรณีของ double mutant enzyme แสดงให้เห็นถึงแนวทางในการออกแบบยารักษาโรคมาลาเรียที่ดีขึ้นได้

ได้ศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ *P. vivax* DHFR ชนิด wild-type ชนิด double mutant SP21 และ single mutant SS1 ที่ตกผลึกร่วมกับ WR99210 ที่เป็น flexible antifolate inhibitor ทำให้เข้าใจถึงลักษณะ binding mode ระหว่าง inhibitor และเอนไซม์ และพบว่า mutation ที่ตำแหน่ง 117 ไม่มีผลกระทบต่อการจับตัวของ WR99210 กับเอนไซม์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาโครงสร้างของ *P. vivax* DHFR กับตัวยับยั้งอื่นอีกหลายชนิด

ความพยายามที่จะศึกษาโครงสร้างของ bifunctional *P. vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase ได้มีความก้าวหน้าอย่างสำคัญ แม้ว่าเราจะตกผลึกได้ก่อนหน้านี้ แต่ผลึกที่ได้มีกระเจิงรังสีเอกซ์ได้ไม่ดีแม้ว่าจะพยายามอย่างมากและหลากหลายในระยะที่ผ่านมา ในช่วงระยะวิจัยนี้พบว่าผลึกที่เตรียมขึ้นใหม่จาก expression system ที่ปรับปรุงขึ้น และได้ผลึกที่สามารถกระเจิงรังสีเอกซ์ที่ประมาณ 3.5-3.8 Å resolution ทำให้สามารถหาโครงสร้างของ full-length enzyme ที่ 3.5 Å resolution ซึ่งแสดงให้เห็นถึง dimerization surface ของ TS domain ที่แตกต่างไปจากที่เคยมีผู้รายงานมาก่อนหน้านี้ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

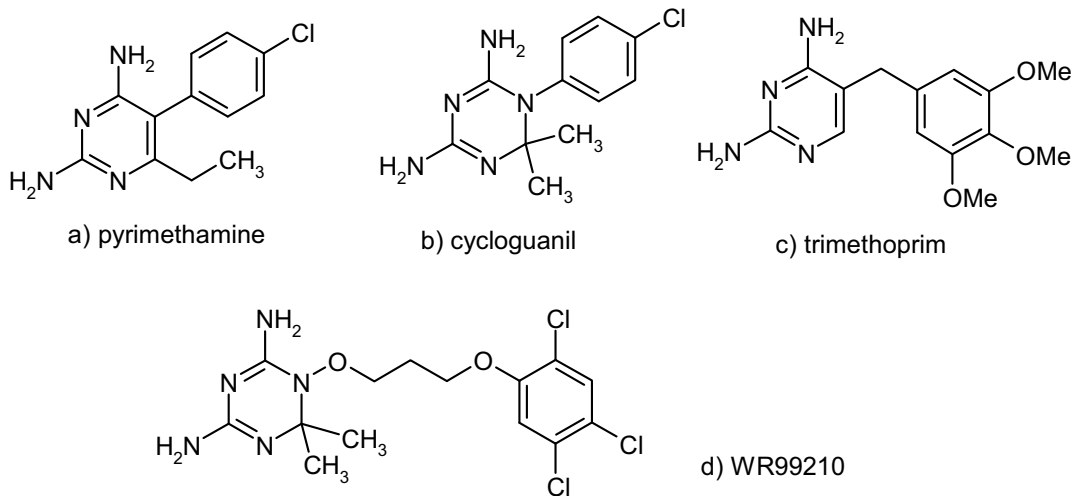
ในระยะเวลาวิจัยนี้ได้มีผลงานตีพิมพ์ในวารสาร Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2005), 102, 13046-13051 Crystal structures of wild-type and mutant dihydrofolate reductase from *Plasmodium vivax*: Pyrimethamine displacement linked with mutation-induced resistance รวมทั้งข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูลนานาชาติ Protein Data Bank อีกจำนวน 4 โครงสร้าง (2BL9, 2BLA, 2BLB, 2BLC) และมีผลงานตีพิมพ์ที่ได้รับการตีพิมพ์โดยมีการสนับสนุนจากโครงการนี้อีก 8 เรื่อง

สารบัญ

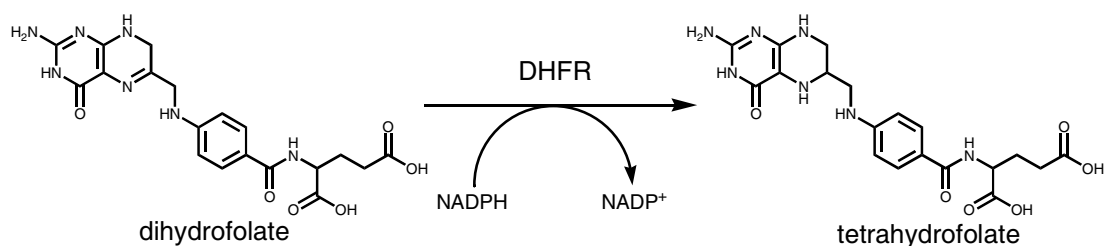
	หน้า
บทคัดย่อ	3
Abstract	5
Executive Summary	6
บทนำ	9
ผลงานวิจัย	
การผลิตเอนไซม์	13
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกเอนไซม์	13
การวิเคราะห์ด้วยรังสีเอกซ์ การเก็บข้อมูลและการหาโครงสร้าง	15
โครงสร้างของเอนไซม์ dihydrofolate reductase จากเชื้อ <i>Plasmodium vivax</i>	17
Pyrimethamine binding site	17
คุณภาพของโครงสร้าง	20
โครงสร้าง DHFR ใน <i>P. vivax</i> และ <i>P. falciparum</i>	21
กลไกการดื้อยาในกลุ่ม antifolates	24
โครงสร้างของ <i>P. vivax</i> DHFR กับตัวยับยั้งอื่น	26
อนุพันธ์ของ pyrimethamine	26
Trimethoprim	28
WR99210 – flexible inhibitor	31
Cycloguanils และอนุพันธ์	42
โครงสร้างของ <i>P. vivax</i> dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	50
OUTPUTS	56
ภาคผนวก	60

บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ ซึ่งพบในเขตร้อนชื้นซึ่งรวมถึงในเขตพื้นที่ของประเทศไทยเอง โดยมีประชาชนในพื้นที่เสี่ยงต่อโรคมามากกว่าสองพันล้านคน และในแต่ละปีจะมีผู้คนต้องเสียชีวิตเกินกว่าหนึ่งล้านคน ทำให้เกิดผลกระทบอย่างมากทั้งทางสังคมและเศรษฐกิจ โดยมีเชื้อพาราสิต (parasite) ที่ก่อโรคในคนทั้งหมดสี่ชนิด โดยชนิดพลาสโมเดียม ไวแวก (*Plasmodium vivax*) อยู่เป็นอันดับที่สอง รองจากชนิดพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) จากอดีตถึงปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่จะป้องกันโรคนี้ได้ นอกจากการรักษาด้วยวิธีการให้ยา แต่พบว่ายาที่เคยใช้ได้ดี เช่น chloroquine ในปัจจุบันมีประสิทธิภาพลดลง และมีรายงานเกี่ยวกับการดื้อยาในกลุ่มต่างๆ อีกหลายชนิดต่อมาอย่างค่อนข้างเร็ว โดยพบว่าการดื้อยาเร็วที่สุด เกิดภายในระยะเวลาเพียง 3-5 ปี เฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของเชื้อ *P. vivax* พบว่ามีการดื้อต่อยาในกลุ่มแอนติโฟเลท (รูปที่ 1.) เช่น pyrimethamine ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ dihydrofolate ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โฟเลท (folate) ซึ่งขั้นตอนในการสังเคราะห์สารตั้งต้นของการสร้างสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหรือ ดีเอ็นเอ ยาที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียในปัจจุบันมักจะใช้เป็นยาผสม (combinatorial drugs) ที่ออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์เป้าหมายตามชนิดของยาแต่ละชนิด เช่น การใช้ยา pyrimethamine-sulfadoxine ชื่อทางการค้า FansidarTM โดยยา sulfadoxine จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป้าหมาย คือ dihydropteroate synthase (DHPS) ที่สังเคราะห์ 7,8-dihydropteroate ขณะที่ pyrimethamine จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ dihydrodihydrofolate reductase (DHFR; 5,6,7,8-tetrahydrofolate:NADP⁺ oxidoreductase, EC 1.5.1.4) (รูปที่ 2.) เอนไซม์ DHFR ในเชื้อพลาสโมเดียมเป็นชนิด bifunctional โดยมีเอนไซม์ thymidylate synthase (TS; EC 2.1.1.45) ต่ออยู่กับ C-terminus ของ DHFR



รูปที่ 1. ยาในกลุ่มแอนติโฟเลต



รูปที่ 2. ปฏิกิริยารีดักชันของเอนไซม์ dihydrofolate reductase. Dihydrofolate (DHF) ถูกเปลี่ยนเป็น tetrahydrofolate (THF) โดยมี NADPH เป็น cofactor

เนื่องจากเชื้อพาราสิตต้องอาศัยเอนไซม์ DHFR และ TS ในการสังเคราะห์โฟเลตสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นของ pyrimidine ที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอ ดังนั้นการที่ยา pyrimethamine ยับยั้งการทำงานของ DHFR ทำให้กระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกในเชื้อพาราสิตไม่สามารถดำเนินการได้และทำให้เชื่อนั้นตายในที่สุด ดังนั้น การที่เอนไซม์เกิดการต้านทานต่อยาหรือไม่จับกับยานั้น จะต้องเกิดจากการเปลี่ยนแปลงหน้าตาของเอนไซม์จนยาไม่สามารถจับได้ ซึ่งเหตุการณ์นี้เกิดขึ้นโดยการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนเอนไซม์ DHFR ที่เกี่ยวข้องกับการจับกันกับยา นอกจากนี้การที่เอนไซม์

DHFR ในเชื้อพาราสิตและในมนุษย์มีความแตกต่างกัน ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสารเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในเชื้อมาลาเรียได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะศึกษาโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ DHFR เพื่อให้ทราบกลไกการทำงานของเอนไซม์นี้ และสามารถนำไปสู่การออกแบบและสังเคราะห์สารชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาลาเรียได้ดีขึ้น

จากค่าทางจลนศาสตร์และค่าการยับยั้งของยาตามตารางที่ 1. ยา pyrimethamine (Pyr) ถูกพบว่ามีการดื้อต่อเอนไซม์ DHFR ที่เกิดการกลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง Ser58 เป็น Arg และ Ser117 เป็น Asn (SP21-PvDHFR) มากกว่า 300 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT-PvDHFR) ขณะที่อนุพันธ์ของมัน คือ *des-chloro* pyrimethamine (*des-Cl* Pyr or Pyr 20) และ *m-chloro* pyrimethamine (*m-Cl* Pyr or Pyr 30) กลับให้ผลแตกต่าง โดยเกิดการดื้อเพียง 5 และ 13 เท่า ตามลำดับ โดยสารทั้งสามชนิดมีความแตกต่างที่ตำแหน่งของ chlorine เท่านั้น และเมื่อมองดูยาตัวอื่น ๆ เช่น ยา trimethoprim และ WR99210 ซึ่งจะมีส่วนที่หมุนหรือเคลื่อนไหวได้ในโครงสร้างของมัน จึงจัดเป็นกลุ่ม flexible inhibitor ขณะที่ pyrimethamine จัดเป็นกลุ่ม rigid inhibitor เราพบว่า การดื้อยา trimethoprim ของเอนไซม์ SP21-PvDHFR มีมากกว่า 150 เท่า คล้ายกับยา pyrimethamine แต่ในของ WR99210 กลับให้ผลที่แทบไม่แตกต่างจาก WT-PvDHFR เลย เพื่อหาคำอธิบายให้สอดคล้องกับผลของค่าการยับยั้งของยาที่ถูกรบกวนจากการกลายพันธุ์ เราจึงต้องเตรียมเอนไซม์ PvDHFR และตกผลึกร่วมกับยาเพื่อวิเคราะห์และหาคำตอบที่เกิดขึ้น

โดยความร่วมมือกับ ดร.อุบลศรี เลิศสกุลพานิช และ ศ.ดร.ยงยุทธ ยุทธวงศ์ นักวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ได้ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการโคลนและเพิ่มปริมาณยีนของ *P. vivax* ในรูปของยีน *PvDHFR* และ *PvDHFR-ts* จาก genomic DNA โดยมีทั้งเอนไซม์สายพันธุ์เดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ และทดสอบความสามารถในการถูกยับยั้งโดยสารประกอบแอนติโฟเลท พบว่าต้องใช้ปริมาณยาเพิ่มมากขึ้นในกรณีเอนไซม์สายพันธุ์กลาย เนื่องจากกรดอะมิโนในเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการจับกับยามีหลายตัว ดังนั้น การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่

ตำแหน่งต่างกันก็จะส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านทานยาต่างกัน และหากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นหลายตำแหน่งก็จะทำให้เอนไซม์ที่จับกับยาได้แย่งส่งผลให้ดื้อยามากขึ้น นอกจากนี้ ยังพบว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบางตำแหน่งส่งผลให้เอนไซม์มีความจำเพาะในการดื้อยาแอนติโฟเลทบางชนิดอีกด้วย เพื่อความเข้าใจถึงเหตุผลที่สอดคล้องกับค่าฤทธิ์ต้านทานยาที่ต่างกัน และความเข้าใจถึงกลไกการดื้อยาดังกล่าว เราได้ใช้เทคนิค X-ray crystallography ของผลึกโปรตีนและศึกษาโครงสร้างสามมิติของ DHFR และ DHFR-TS ร่วมกับตัวยับยั้งชนิดต่างๆ

ตารางที่ 1. แสดงค่าทางจลศาสตร์และค่าการยับยั้งของยาต่อเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR)

Constructs	Kinetic Parameters				Inhibition constant K_i (nM)					
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m H ₂ foalte (μM)	K_m NADPH (μM)	k_{cat}/K_m^a	Pyr ^b (nM)	des-Cl Pyr (nM)	m-Cl Pyr (nM)	Cyc ^b (nM)	Tmp ^b (nM)	Wr ^c (nM)
WT-PvDHFR	15.4	4.7 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.3	0.16 ± 0.03	1.55 ± 0.12	0.73 ± 0.03	0.6 ± 0.2	3.1 ± 0.2	6.0 ± 1.2
SP21-PvDHFR (S58R+I17N)	7.7	32 ± 4.4	3.3 ± 0.1	0.02	50 ± 4.0	7.33 ± 0.49	9.46 ± 0.43	37 ± 4	490 ± 93	8.1 ± 0.5
SS1-PvDHFR (S117N)	1.3	54.3 ± 6.3	6.0 ± 0.7	0.25	645 ± 9.9	2.57 ± 0.65	16.14 ± 0.98	978 ± 85	ND	51 ± 10

^a Calculated from values for H₂foalte.

^b Based on competitive inhibition.

^c Based on noncompetitive inhibition.

ND, not determined.

วัตถุประสงค์

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกเอนไซม์ *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase กับ inhibitor ต่างๆ
2. ศึกษาโครงสร้างสามมิติโดยเทคนิค X-ray crystallography ของผลึกโปรตีนที่เตรียมได้
3. เตรียมผลึกของเอนไซม์ *P. vivax* DHFR-TS ที่สามารถกระเจิงรังสีเอกซ์ได้ดี
4. ผลิตกผลึกทางวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญทางด้าน X-ray crystallography ซึ่งเป็นพื้นฐานไปสู่การศึกษาวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้องต่อไป

ผลงานวิจัย

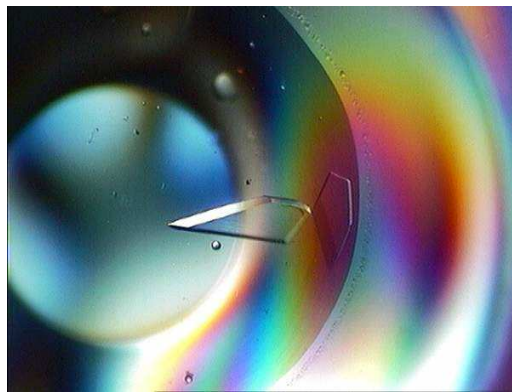
การเตรียมและผลิตเอนไซม์

Dihydrofolate reductase (DHFR) domain ของ bifunctional DHFR-thymidylate synthase (TS) enzyme ถูก cloned และ overexpressed ใน *E. coli* BL21(DE3)pLys และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ methotrexate (MTX)-affinity column และชะเอา DHFR ออกมาด้วย buffer ที่มี 4 mM dihydrofolate (DHF) ส่วนหนึ่งของเอนไซม์ DHFR ถูกผลิตในรูปของ inclusion body และส่วนที่นำมาทำให้บริสุทธิ์เป็นส่วนของโปรตีนที่ละลายได้ PvDHFR สามารถเตรียมได้ด้วยความบริสุทธิ์สูงกว่า 95% และสามารถเตรียมได้ด้วยความเข้มข้นประมาณ 6-10 mg/ml และทำการปรับสภาวะของสารละลายโปรตีนให้มีความเข้มข้นของ DHF, salt, buffer ต่ำลง

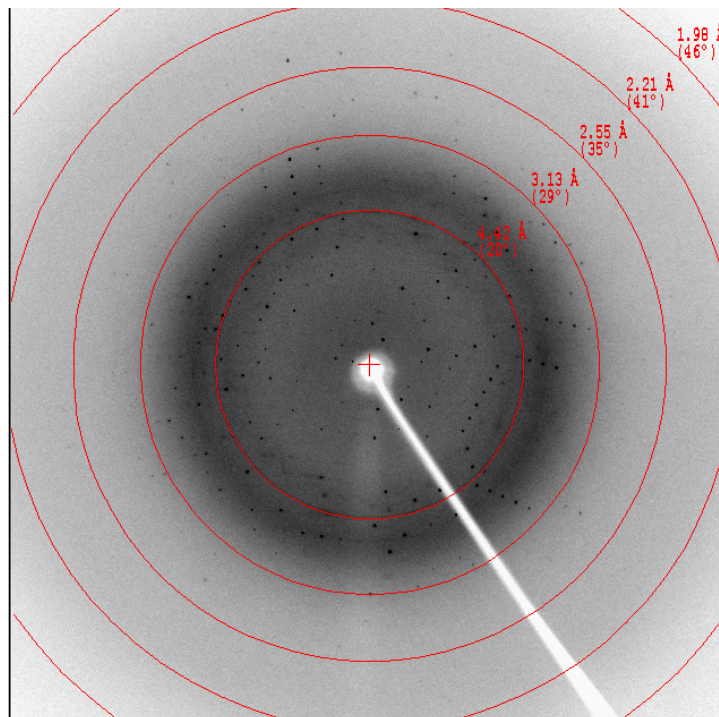
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึก

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกเอนไซม์ PvDHFR นั้น นำสารละลายเอนไซม์ PvDHFR ที่ความเข้มข้นประมาณ 10 mg/ml มาผสมกับ 1 mM NADPH และ 1 mM inhibitor โดยได้เก็บไว้ที่ 4 °C ประมาณ 10-12 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด complex อย่างสมบูรณ์ก่อนนำมาทำการทดลอง ในการหาสภาวะในการตกผลึกเบื้องต้น ใช้ sparse-matrix screening conditions ซึ่งเป็นวิธีการสุ่มอย่างกว้างๆ ด้วยสภาวะที่ใช้ได้ผลมาก่อนหน้านี้ ด้วยวิธี microbatch (crystallization under oil) โดยใช้

สารละลาย PvDHFR-NADPH-pyrimethamine 1 – 1.5 μL ร่วมกับ crystallizing solution ปริมาณเท่ากัน ขั้นตอนหา crystallization condition นี้ ร่วมกับการปรับปรุงคุณภาพผลึกที่ได้ใช้เวลาหลายเดือน และพบว่าผลึกที่ดีมีรูปร่างเป็นแบบแผ่น (plate-like) สามารถเตรียมได้จาก 30% polyethylene glycol (PEG) MW 4000 ที่ pH ประมาณ 6.0 - 6.5 ที่อุณหภูมิ 4 °C ในสภาวะที่เหมาะสม ผลึกจะเริ่มโตที่เห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากวันที่ 1-2 และโตต่อเนื่องไปถึงประมาณ 2-3 อาทิตย์ โดยมีขนาดเต็มที่ประมาณ $300 \times 200 \times 150$ micron ดังรูปที่ 3.



รูปที่ 3. ผลึกชนิดแผ่นของ wild-type PvDHFR-NADPH-pyrimethamine complex ที่โตเต็มที่



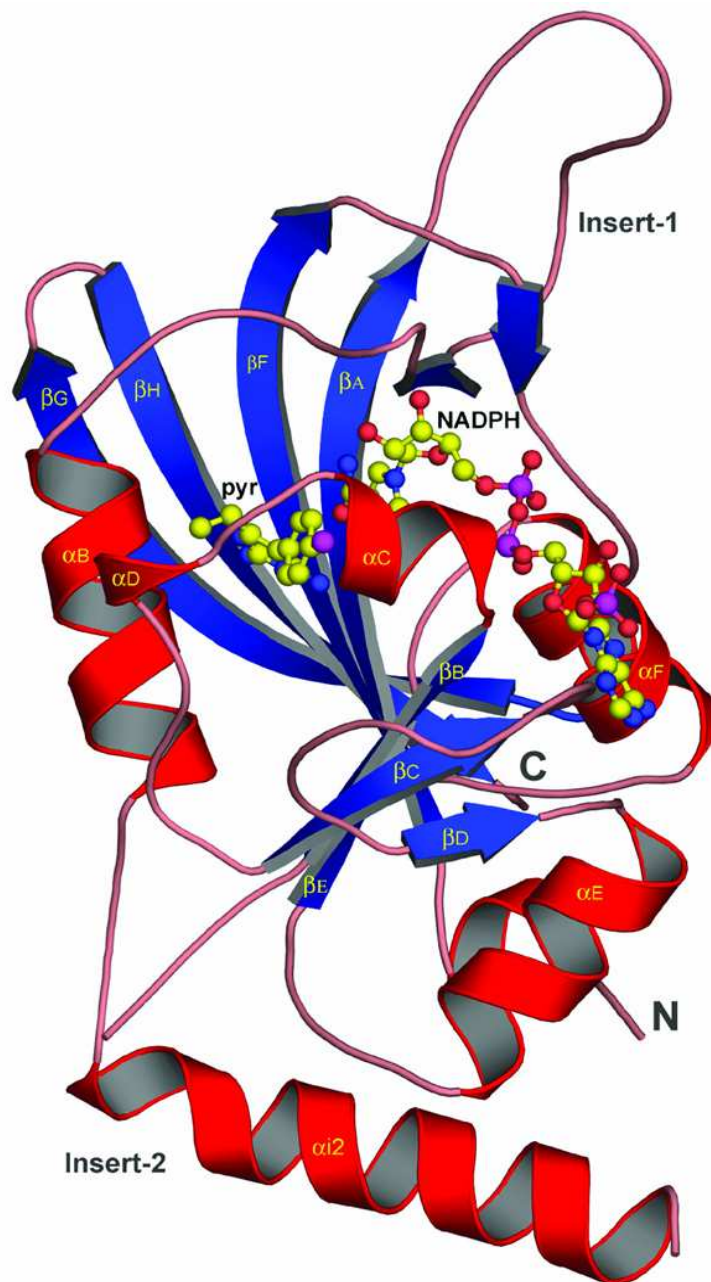
รูปที่ 4 X-ray diffraction pattern ของผลึก PvDHFR-NADPH-pyrimethamine

การวิเคราะห์ด้วยรังสีเอกซ์ การเก็บข้อมูลและการหาโครงสร้าง

ผลึกของ PvDHFR-NADPH-Pyr ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง R-Axis IV++ ที่ติดตั้งบน Rigaku X-ray generator ที่อุณหภูมิ 120 เคลวิน โดยพบว่ามีกลุ่มสมมาตรชนิด monoclinic มี space group เป็น C2 มี unit-cell parameters คือ $a = 136.53 \text{ \AA}$, $b = 55.61 \text{ \AA}$, $c = 45.75 \text{ \AA}$ and $\beta = 107.46^\circ$ ข้อมูลที่ได้มีความละเอียดถึง $1.9 \text{ \AA}$ resolution มีค่า mosaicity ประมาณ 0.6° มีความสมบูรณ์สูงถึง 99.8% ค่า $\langle I/\sigma(I) \rangle$ 19.5 ซึ่งนับว่ามี intensity ที่ดี มีค่า R_{merge} 6% unique reflection จำนวน 16,385 ขนาดของ unit cell ที่ได้สอดคล้องกับ DHFR (27 kDa) จำนวน 1 โมเลกุลในแต่ละ asymmetric unit มี solvent content ประมาณ 58% (Matthews' constant 3.0)

การหาโครงสร้างผลึกของ ternary complex PvDHFR-NADPH-pyrimethamine (Fig. 4) ใช้วิธี molecular replacement ด้วยโปรแกรม AMoRe ใน CCP4 program suite และโปรแกรม CNS โดยใช้ incomplete coordinates ของ *P. falciparum* DHFR-TS เป็นจุดเริ่มต้น

เมื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณต่อ และวิเคราะห์คุณภาพของ electron density map โดยใช้ molecular graphics program XtalView พบว่ามีความต่อเนื่องและมีความสอดคล้องกับโครงสร้างในระดับหนึ่ง โดยมีบางบริเวณของโครงสร้างไม่มี electron density เนื่องจากมีโครงสร้างที่ต่างกัน รวมทั้งในบริเวณของ side chain และ loop บางส่วนด้วย โครงสร้างที่ได้ได้ผ่านการแก้ไข manual model building และ editing และกระบวนการ refinement เพื่อลดข้อผิดพลาด หลายรอบ จนกระทั่งได้โครงสร้างที่เกือบสมบูรณ์โดยมีบริเวณ residue ที่ 85-105 ที่ไม่พบ electron density map เนื่องจากการ disorder



รูปที่ 5 โครงสร้างผลึกของเอนไซม์ *P. vivax* dihydrofolate reductase in complex with NADPH and pyrimethamine ที่ความละเอียด 1.9 Å resolution. ribbon diagram แสดงโครงสร้างที่เป็น helical (red) และ β -sheet (blue). NADPH cofactor และ pyrimethamine inhibitor แสดงด้วย ball-and-stick model

โครงสร้างของเอนไซม์ dihydrofolate reductase จากเชื้อ *Plasmodium vivax*

โครงสร้างของ *P. vivax* DHFR เป็นชนิด α/β ที่มี 8- β -stranded sheet อยู่ตรงกลางและมี α -helix อยู่ด้านนอก ส่วนของ insert-1 ที่อยู่ระหว่าง B-1 และ B-2 เป็น loop ที่ไม่มี secondary structure ส่วนของ insert-2 มีโครงสร้างเป็น helix และมีบางส่วนที่ disorder ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้เป็นส่วนที่พิเศษของเอนไซม์ DHFR ในกลุ่ม *Plasmodium* โดยทั้งสองส่วนนี้เป็นบริเวณที่มี flexibility สูงเมื่อเทียบกับบริเวณอื่นๆ สันนิษฐานได้ว่าอาจเป็นบริเวณที่ interaction กับ partner molecule อื่นๆ เนื่องจากส่วนเพิ่มเติมทั้งสองส่วนนี้ ห่างจาก binding site จึงไม่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดปฏิกิริยาหรือการจับกับยาของเอนไซม์นี้

Pyrimethamine binding site

เมื่อพิจารณา inhibitor binding site ของ *P. vivax* DHFR เพื่อทำความเข้าใจถึงกลไกการทำงานของ inhibitor ในกลุ่มแอนติโฟเลท พบว่า ส่วนของวง pyrimidine จับตัวผ่าน strong hydrogen bond กับ carboxylate group ของ aspartate-53 โดยมีระยะทางระหว่าง heteroatom (N-O) ประมาณ 2.5 และ 2.8 Å กลุ่ม amino ที่ C-4 เกิดพันธะ hydrogen ที่อ่อนกว่ากับ main chain oxygen ของ isoleucine-173 และกับกลุ่ม hydroxyl side chain ใน tyrosine-179 ขณะที่ Phenylalanine57 ที่ conserved ใน DHFR เกิด π - π interaction กับกลุ่ม pyrimidine โดยมีระยะห่างระหว่าง plane ประมาณ 3.7 Å Interaction กับ cofactor NADPH เป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่งในการจับตัวกันของแอนติโฟเลท (Fig. 5)

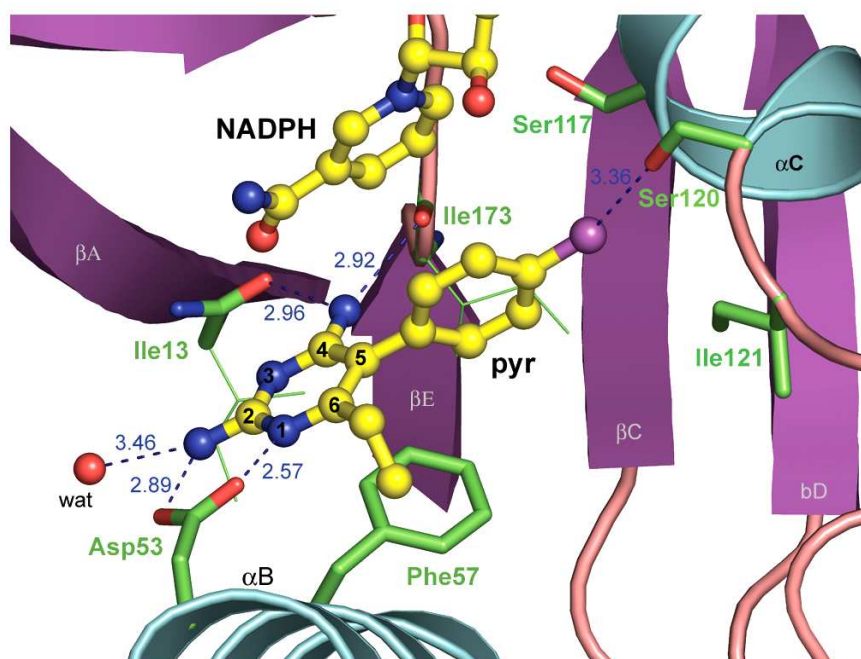


Fig 6. Pyrimethamine binding site ใน *P. vivax* DHFR (distance in Å unit in dotted lines). Hydrogen bonds มีความสำคัญในการจับตัวของ pyrimidine ring. ในรูปแสดง interactions กับ Asp53, Ile13 and Ile173. การจับตัวของ p-chlorophenyl group เป็นชนิด VDW and pi-pi interaction รวมทั้ง weak H-bond ระหว่าง CI and Ser120

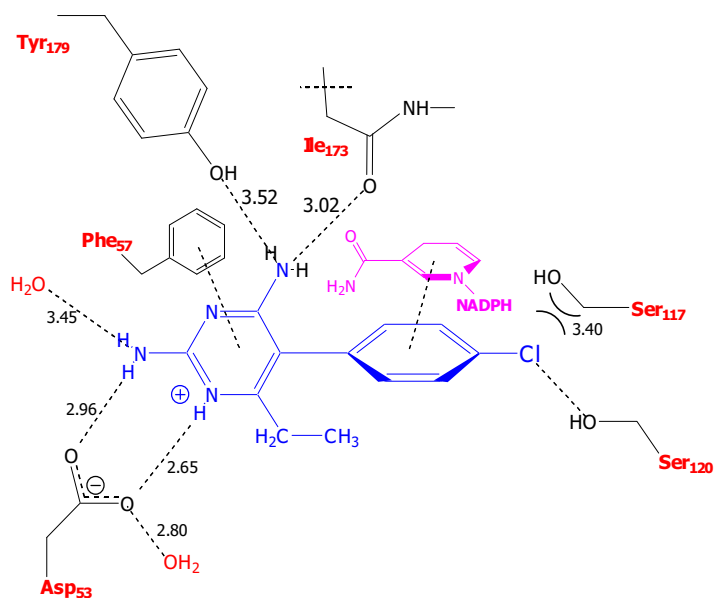


Fig. 7 Schematic diagram แสดง pyrimethamine binding site ใน *P. vivax* DHFR (distance in Å unit.)

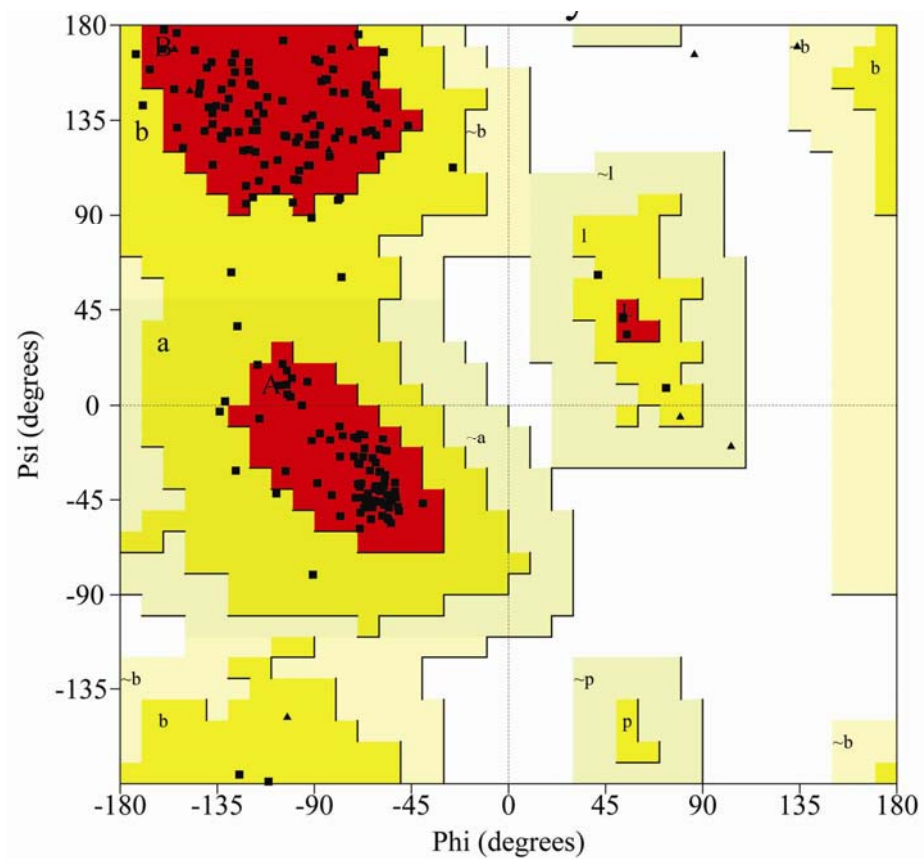
ตารางที่ 2 แสดง interaction ระหว่าง pyrimethamine และ เอนไซม์ DHFR

pyrimethamine		DHFR			Distance (Å)
Pyr	N1	Cys	14	N	3.44
		Cys	14	CA	3.21
		Phe	57	CD1	3.49
		Cys	14	C	3.38
Pyr	C3	Ndp	1239	NO7	3.38
Pyr	C5	sp	53	OD2	3.46
Pyr	N6	sp	53	CG	3.45
		sp	53	OD2	2.61
Pyr	C12	Ndp	1239	NC4	3.35
Pyr	N13	Ile	13	O	2.94
		Ile	173	O	2.95
Pyr	N14	W t	219	O	3.45
		Cys	14	C	3.46
		Cys	14	O	3.16
		Thr	194	OG1	3.14
		sp	53	OD1	2.86
		sp	53	OD2	3.42
Pyr	C15	sp	53	OD2	3.42
Pyr	CL1	Ser	117	O	3.09
		Ser	120	OG	3.38

คุณภาพของโครงสร้างโปรตีน

Ramachandran Plot

จากการวิเคราะห์ Ramachandran plot ของโครงสร้างของ PvDHFR-NADPH-pyrimethamine complex ไม่พบว่าส่วนของโครงสร้างอยู่ใน *disallowd regions* โดยกรดอะมิโนทั้ง 194 ตัว (non-glycine และ non-proline) อยู่ใน *most favored* และ *additional allowed regions* (89.2% และ 10.8% ตามลำดับ)



โครงสร้าง DHFR ใน *P. vivax* และ *P. falciparum*

ในการหาโครงสร้างสามมิติของ PvDHFR ได้ใช้โครงสร้างสามมิติของ PfDHFR เป็นต้นแบบ โดยอาศัยข้อมูลที่ทราบกันดีแล้วว่า ลำดับกรดอะมิโนของทั้งสองชนิดมีความคล้ายกันมากกว่า 60% (รูปที่ 8.) ขณะเดียวกันเมื่อศึกษากรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในบริเวณส่วนเร่งปฏิกิริยา และ/หรือ ที่เกิดการกลายพันธุ์ เราพบว่ามีความแตกต่างในส่วนที่เกิดการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด จากตารางที่ 3. แสดงกรดอะมิโนที่พบว่าเกิดการกลายพันธุ์ ดังนั้นจึงต้องเข้าใจในความแตกต่างในลักษณะเฉพาะของ PvDHFR เองที่ไม่เหมือนกับ PfDHFR และจากข้อมูลในการเกิดการกลายพันธุ์

ตารางที่ 3. แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่เกิดการกลายพันธุ์ของ DHFR ระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax*

<i>P. falciparum</i> dhfr allele	<i>P. vivax</i> dhfr allele
Ala16 (Val)	Ala15 (Ser)
C50 (Arg)	Cys49*
Asn51 (Ile)	Asn50 (Ile)
Cys59 (Arg)	S58 (Arg)
Ser108(Asn, Thr)	Ser117(Asn,Thr)
Ile164(Leu)	Ile173(Leu, Phe)
Val213(Ala)	Val222*

* ไม่พบการกลายพันธุ์ใน PvDHFR

ในปัจจุบันมีการค้นพบการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนของเอนไซม์ PvDHFR ตั้งแต่ 1 ตำแหน่ง จนถึง 5 ตำแหน่ง ซึ่งในแต่ละชนิดของการกลายพันธุ์ จะเกิดการดื้อต่อยาที่แตกต่างกัน ขณะที่ยาแต่ละแบบ หรือแม้กระทั่งอนุพันธ์ของมันให้ค่าที่แตกต่างกันด้วย ในที่นี้แสดงถึงรูปแบบของการกลายพันธุ์ที่มีอยู่ในขณะนี้ของเอนไซม์ PvDHFR:-

Single mutation (1 ตำแหน่ง)

P33L, N50I, F57L, S58R, T61M, N109H, **S117N**, S117T, R131G, I173L, A199V

Double mutation (2 ตำแหน่ง)

N50I+S117N, N50K+S117N, F57L+S58R, F57L+S117N, F57L+S117T, **S58R+S117N**,

S58R+S117T, S58R+I173L, S117N+I173L

Triple mutation (3 ตำแหน่ง)

F57L+S58R+N109C, F57L+S58R+S117N, F57L+S58R+S117T, S58R+T61M+S117T,
S58R+S117N+H99S, S58R+S117N+L159A, S58R+S117N+L159V, S58R+S117N+F171L,
S58R+S117N+I173L, S58R+S117N+I188V, S58R+S117N+A199V

Quadruple mutation (4 ตำแหน่ง)

A15S+F57L+S117T+I173F, R37G+S58R+N109H+L159A, F57L+S58R+T61M+S117N,
F57L+S58R+T61M+S117T, F57L+V111L+S117T+I173F

Pentuple mutation (5 ตำแหน่ง)

I13L+F57L+S58R+T61M+S117T, C49R+F57L+S58R+T61M+S117T

DHER

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	
<i>P. vivax</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	84
<i>P. falciparum</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	85
<i>C. hominis</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	47
<i>P. chabaudi</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	81
<i>P. berghei</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	82
<i>L. major</i>	1	MSRAARFKIPMPETKADFAPPSLRFS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	68
<i>E. coli</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	36
<i>L. casei</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	35
<i>H. sapiens</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	84
	90	100	110	120	130	140	150	160		
<i>P. vivax</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	166
<i>P. falciparum</i>	85	SQGGDNTSGDNTHGGDNADKLQNVVMGRSSWESIPKQYKPLPNRINVLSTLTKEVDKEK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	166
<i>C. hominis</i>	86	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157
<i>P. chabaudi</i>	48	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	114
<i>P. berghei</i>	82	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	118
<i>L. major</i>	83	LKNNVELN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	166
<i>E. coli</i>	69	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	149
<i>L. casei</i>	37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	88
<i>H. sapiens</i>	36	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	90
	170	180	190	200	210	220	230	240		
<i>P. vivax</i>	167	YKCFIIGGAQVYRECLSRN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	240
<i>P. falciparum</i>	158	YKCFIIGGSVYQEFLEKK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	231
<i>C. hominis</i>	115	IENIFVCGGESIYRDALKDN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	178
<i>P. chabaudi</i>	159	YKCFIIGGASVYKEFLDRN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	230
<i>P. berghei</i>	167	YKCFIIGSSVYKEFLDRN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	238
<i>L. major</i>	150	IETAYCVGGAQVYADAMLSPCIEKLQEVYLTRIYATAPACTRFFFPFP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	231
<i>E. coli</i>	89	-PEIMVIGGRVYEQL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	159
<i>L. casei</i>	91	DQELVIAGGAQIFTAFK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	162
<i>H. sapiens</i>	110	VDVMVIVGSSVYKEAMNHP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	187

รูปที่ 8. แสดงลำดับความเหมือนของการอะมิโนในเอนไซม์ dihydihydrofolate reductase ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

Antifolate resistance mechanism

จากข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าการเกิดการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ codon ของ Ser117 ที่เกิดการกลายเป็น Asn แสดง antifolate binding site ใน *P. vivax* DHFR พบว่า phenyl ring ของ pyrimethamine เกิด π - π interaction กับกลุ่ม nicotinamide ของ NADPH (ประมาณ 1-5 kcal/mol) อะตอมของ chlorine ที่ตำแหน่ง para- ของ phenyl ring นั้นอยู่ใกล้กับ Ser117 โดยมีระยะห่างประมาณ 3.4 Å (Fig. 6) แต่จากรูปที่ 8 และ 9 แสดงให้เห็นคุณสมบัติที่ชัดเจนคือการที่มี van der Waals interaction กับเอนไซม์ด้วย การที่ mutation ที่ตำแหน่ง 117 จาก serine ในเอนไซม์ชนิด wild-type เป็น asparagine ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะทำให้การจับของ pyrimethamine กับเอนไซม์ไม่ดีดังเดิม โดยเกิด steric interaction กับกลุ่ม para-chloro และอาจเป็นผลให้สูญเสียทั้ง π - π interaction และ/หรือ van der Waal's interaction ไปบางส่วน ผลของการเกิด mutation นี้ทำให้เกิดการดื้อยา pyrimethamine กว่า 300 เท่า ($K_{i(wild\ type)} = 0.16\ nm$, $K_{i(Ser58Arg+Ser117Asn)} = 50\ nm$)

งานวิจัยในส่วนของการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ *P. vivax* DHFR เป็นการร่วมมือกับ ดร. อุบลศรี เลิศสกุลพานิช และ ศ.ดร.ยงยุทธ ยุทธวงศ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ผลงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างของ *P. vivax* DHFR-NADPH-pyrimethamine ที่นำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการดื้อยา ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Proceedings of National Academy of Science, USA มี Journal impact factor 10.45 ซึ่งวารสารนี้เป็นวารสารที่มีชื่อเสียงและได้รับการยอมรับทางวิชาการอย่างสูง