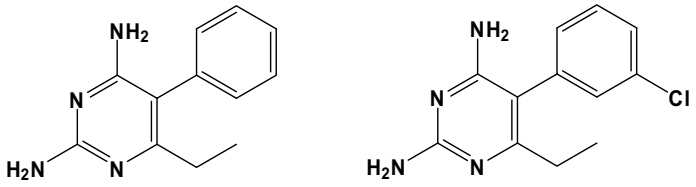
โครงสร้างของ *P. vivax* DHFR กับตัวยับยั้งอื่น

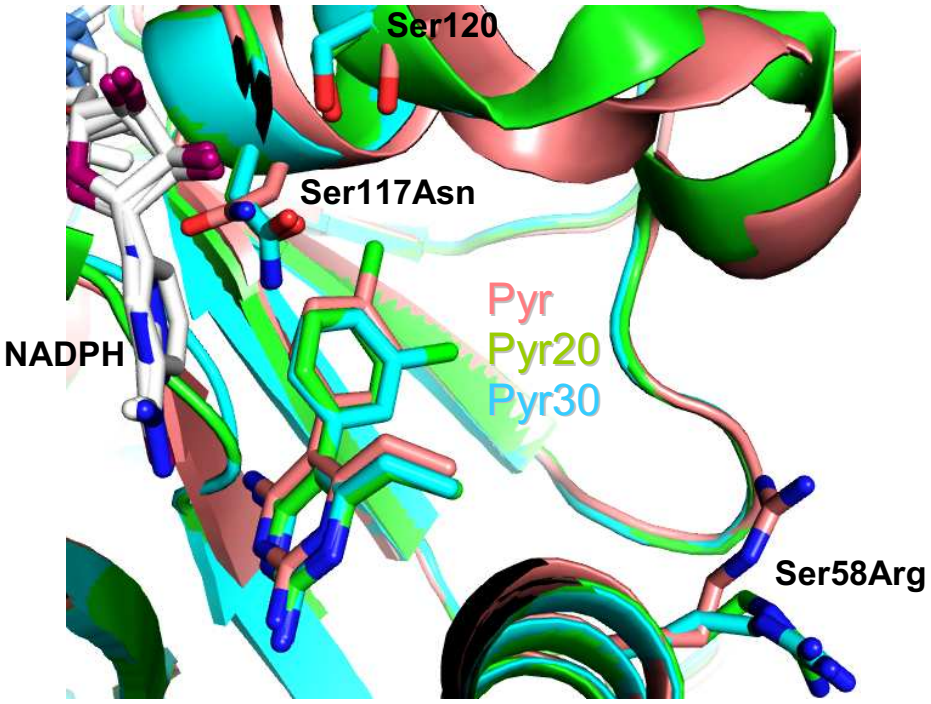
จากบทความที่ตีพิมพ์ไป ได้รายงานโครงสร้างของโปรตีนชนิด wild-type และ double mutant ที่ตกผลึกร่วมกับ pyrimethamine และ *des*-chloro pyrimethamine ขณะที่แบบ *m*-cholro pyrimethamine (รูปที่ 10.) ได้โครงสร้างเป็นแบบชนิด double mutant จึงไม่ได้สรุปถึงผลกระทบของตัวยับยั้งชนิดนี้ได้แน่นอน แต่เมื่อดูจากโครงสร้างและค่าการยับยั้งของยา (ตารางที่ 1.) พบว่ามีผลสอดคล้องกัน โดยในส่วน chloro phenyl group ที่ด้าน *meta*- จะมีอันตรกิริยา น้อยกว่าส่วนของ cholo phenyl group ที่ด้าน para- ทำให้สามารถสรุปได้ในขั้นต้นว่าการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่ง Ser117 เป็น Asn จะส่งผลต่อยาที่เคยเกิดอันตรกิริยาที่เหมาะสม และการมองถึงผลที่ตัวยาจะสามารถหลีกเลี่ยงจากบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงนั้น โดยจะกล่าวถึงรายละเอียดและความเข้าใจถึงกลไกการดื้อยาของยา pyrimethamine ต่อไป



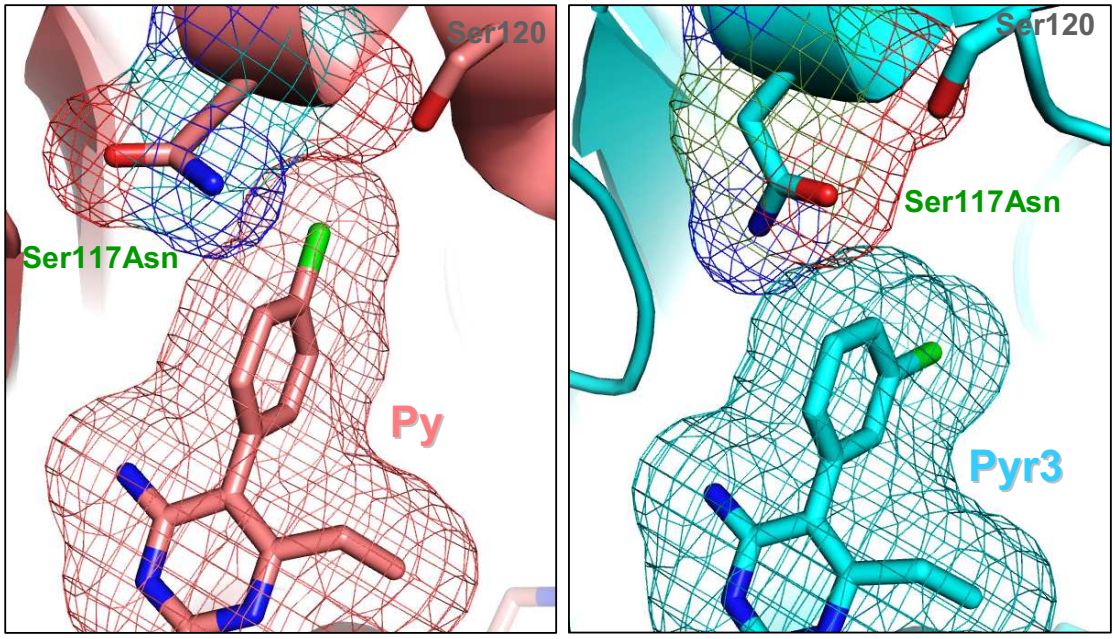
des-chloro Pyrimethamine, Pyr 20 *m*-chloro Pyrimethamine, Pyr 30

รูปที่ 10. แสดงโครงสร้างของ *des*-chloro pyrimethamine และ *m*-chloro pyrimethamine

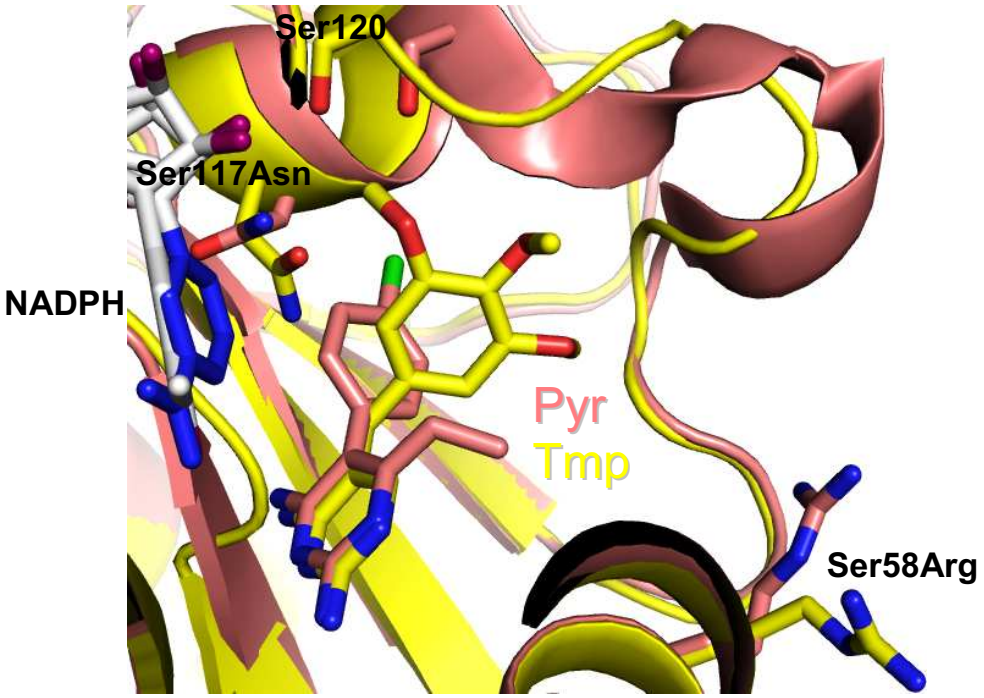
เมื่อนำโครงสร้างสามมิติมาเปรียบเทียบระหว่าง pyrimethamine, *des*-chloro pyrimethamine และ *m*-chloro pyrimethamine ของ SP21-PvDHFR เราพบว่า *p*-chloro phenyl จาก pyrimethamine มีผลต่อการดื้อยา โดยการเกิดอันตรกิริยากับ Asn117 ทำให้ดื้อยามากกว่า 300 เท่า ขณะที่เปลี่ยนตำแหน่ง chloro เป็นที่ *meta*- ($K_{i(\text{wild type})}$ = 0.73 nM, $K_{i(\text{Ser58Arg+Ser117Asn})}$ = 9.46 nM) และ/หรือ ไม่มี chloro ($K_{i(\text{wild type})}$ = 1.55 nM, $K_{i(\text{Ser58Arg+Ser117Asn})}$ = 7.33 nM) พบว่ามีพื้นที่ที่ทำให้ side chain ของ Asn117 เคลื่อนที่และอันตรกิริยาที่เกิด chloro ลดลง (การดื้อยามากขึ้น 5 เท่า ใน Pyr 20 และ 13 เท่า ใน Pyr 30) แสดงให้เห็นถึงผลของการลดลงของการดื้อยาในอนุพันธ์ของ pyrimethamine (รูปที่ 11 และ 12.)



รูปที่ 11. แสดงการซ้อนทับโครงสร้างเพื่อเปรียบเทียบของ SP21-PvDHFR ที่ตกผลึกกับ pyrimethamine, *des*-chloro pyrimethamine และ *m*-chloro pyrimethamine



รูปที่ 12. เปรียบเทียบบริเวณที่เกิดอันตรกิริยาของ *p*-Chloro pyrimethamine ที่ตำแหน่ง Asn117 กับ *m*-Chloro pyrimethamine ชนิดกลายพันธุ์สองตำแหน่ง (SP21-PvDHFR)



รูปที่ 13. แสดงการซ้อนทับโครงสร้างเพื่อเปรียบเทียบของ SP21-PvDHFR ที่ตกผลึกกับ pyrimethamine และ trimethoprim

ในส่วนของยา trimethoprime ซึ่งถูกใช้ในการรักษาเช่นเดียวกับยา pyrimethamine พบว่าเกิดการดื้อยามากกว่า 150 เท่า ($K_{i(\text{wild type})}$ = 3.1 nM, $K_{i(\text{Ser58Arg+Ser117Asn})}$ = 490 nM) แม้ว่าเมื่อดูโครงสร้างสาร ซึ่งสามารถที่หมุนได้ และเมื่อดูจากโครงสร้างสามมิติของมันที่ตกผลึกใน SP21-PvDHFR พบว่ามีพื้นที่ที่ทำให้ side chain ของ Asn117 เคลื่อนที่และไม่เกิดอันตรกิริยาที่บริเวณกรดอะมิโน เช่นเดียวกับในโครงสร้างสามมิติที่พบในอนุพันธ์ของ pyrimethamine แต่กลับมีความแตกต่าง ซึ่งสิ่งที่อาจช่วยอธิบายได้คือ การที่ตัวยาเองมีกลุ่ม methoxy และเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าว ทำให้ Ser120 เคลื่อนที่เข้าใกล้กลุ่ม methoxy มากกว่าเดิม (C_{methoxy} --- O Ser120 ระยะห่าง 3.05 Å) แสดงให้เห็นถึงผลของของการดื้อยาใน trimethoprime (รูปที่ 13.)

อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยากับกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ SP21-PvDHFR+ NADPH+*m*-chloro pyrimethamine และ SP21-PvDHFR+NADPH+trimethoprim แสดงในตารางที่ 2 และ 3. พร้อมแสดง crystal parameter และ refinement data ของโครงสร้างผลึก รวมทั้งค่า Ramachandran plot ที่ได้จากข้อมูลโครงสร้างที่ได้รายงานในการรายงานครั้งนี้

ตารางที่ 3. แสดงอันตรกิริยาระหว่าง DHFR domain กับยา

***m*-chloro Pyrimethmine-DHFR (SP21) domain**
Ile13, Cys14, Asp53, Phe57, Ser117, Ile121, Ile173, Thr194
Trimethoprim-DHFR (SP21) domain
Ile13, Cys14, Leu45, Asp53, Phe57, Ser117, Ser120, Ile173, Thr194

* อันตรกิริยาที่แสดงอยู่ในระยะ 2.5 – 3.6 Å

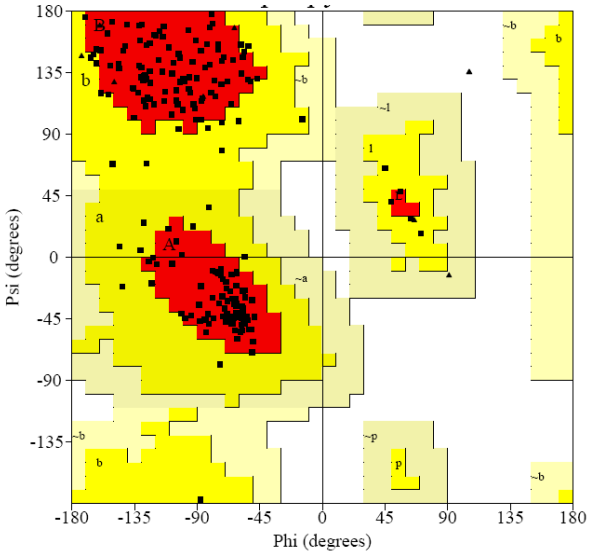
ตารางที่ 4. แสดง crystal parameter และ refinement data ของโครงสร้างผลึกของ SP21-PvDHFR+ NADPH+*m*-chloro pyrimethamine และ SP21-PvDHFR+NADPH+trimethoprim

Parameters	SP21+NADPH+*m*-Cl Pyr	SP21+NADPH+Tmp
Space group	C2	C2
Unit cell *a*, *b*, and *c*, Å;	135.80, 56.07, 45.80;	131.38, 55.80, 45.68;
and β, °	112.32	108.05
Resolution, Å	20 – 2.40	20 – 2.40
Completeness, %	99.6 (99.8)	99.3 (100.0)
(final shell, %)		
Unique reflections	15,556	12,369
Redundancy	3.63 (3.57)	2.39 (2.37)
*R*sym, (final shell)*	5.7 (31.3)	4.6 (30.5)
$\langle I / \sigma \rangle$ (final shell)	8.7 (1.9)	9.9 (2.1)
R factor / R_{free},† %	23.15/29.30	23.87/25.54
Average *B* factor, Å^2	85.5	52.1
rms deviation		
Bond lengths, Å	0.0101	0.0106
Bond angles, °	1.367	1.604

**R*sym = $|\Sigma I - \langle I \Sigma / | \rangle I$, where *I* is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the average intensity from multiple observations of symmetry-related reflections.

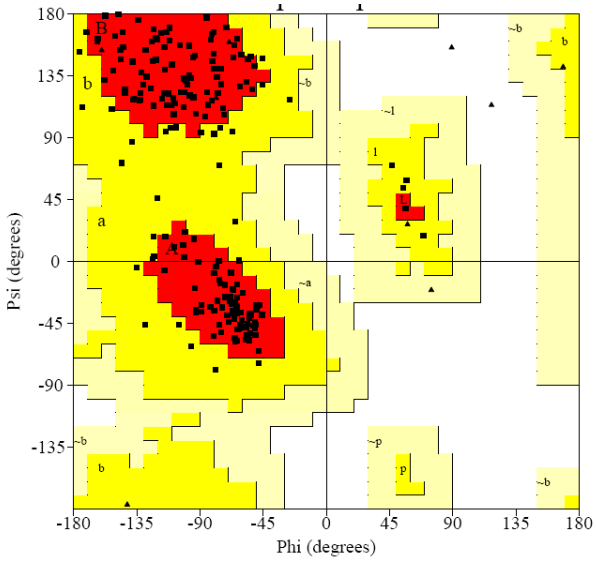
†*R* factor = $\Sigma hkl | Fo(hkl) - Fc(hkl) | / \Sigma hkl Fo(hkl)$, where *Fo*(*hkl*) and *Fc*(*hkl*) are the observed and calculated structure factor amplitudes for reflection *hkl*.

*R*free is computed by using randomly selected 5% of the data that were excluded throughout refinement.



Ramachandran plot statistics of SP21-PvDHFR+NADPH+*m*-cholo Pyrimethamine

Residues in most favoured regions	[A,B,L]	163	84.0%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	31	16.0%
Residues in generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	[XX]	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues		194	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)		7	
Number of glycine residues		9	
Number of proline residues		9	
Total number of residues		219	



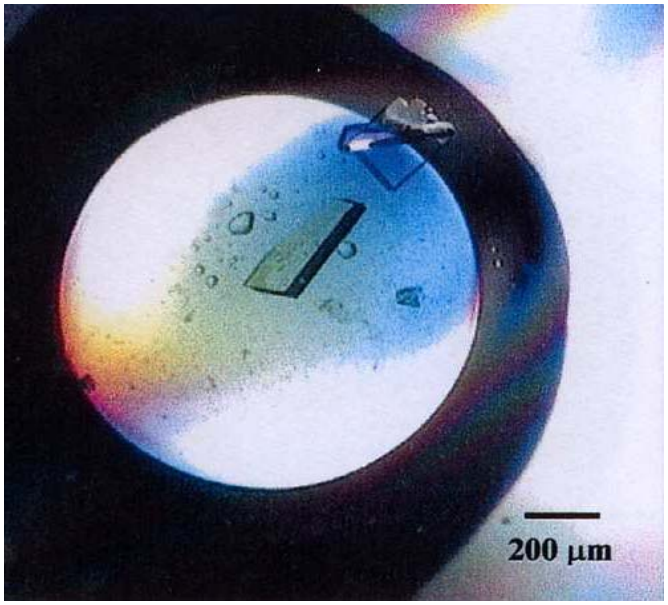
Ramachandran plot statistics of SP21-PvDHFR+NADPH+Trimethoprim

Residues in most favoured regions	[A,B,L]	162	83.5%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	32	16.5%
Residues in generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	[XX]	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues		194	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)		6	
Number of glycine residues		9	
Number of proline residues		9	
Total number of residues		218	

โครงสร้างของ Wild-type *P. vivax* DHFR-WR99210 complex

หลังจากที่เข้าใจเกี่ยวกับการดื้อต่อยาในกลุ่ม antifolate ซึ่งผลของ steric effect จาก Ser117 $\rightarrow$ Asn ที่มีต่อยา pyrimethamine ซึ่งเป็นสารที่มี rigidity สูง สิ่งที่ศึกษาต่อไปคือการจับตัวของเอนไซม์ PvDHFR กับ WR99210 ซึ่งเป็น flexible inhibitor ที่มีความ sensitive กับ mutation ที่ตำแหน่ง Ser117Asn น้อยกว่า inhibitor ในกลุ่ม pyrimethamine

กลุ่มผู้วิจัยได้ตกผลึก wild-type PvDHFR ร่วมกับตัวยับยั้งคือ WR99210 โดยใช้วิธี co-crystallization ผลึกที่เตรียมได้มีขนาดประมาณ 100-200 ไมครอน และสามารถกระเจิงรังสีเอกซ์ได้ดีถึง 2.1 Å resolution มี unit cell parameters คือ a = 133.04, b = 55.54, c = 45.52 Å และ β = 107.26° มีกลุ่มสมมาตร monoclinic มี space group C2 เช่นเดียวกับผลึกที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ การหาโครงสร้างของ wild-type PvDHFR-NADPH-WR99210 ใช้วิธี molecular replacement โดยใช้โครงสร้างของ wild-type PvDHFR-NADPH-pyrimethamine complex ด้วยโปรแกรม CCP4-AMoRe จากการวิเคราะห์ electron density maps ที่ได้แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของตัวยับยั้ง WR99210 อยู่ในบริเวณ active site ของเอนไซม์อย่างชัดเจน โครงสร้างที่ได้มีความละเอียดที่ 2.1 Å resolution และมีค่า R-factor เท่ากับ 23.30% (27.5 % R-free) (Fig. 14)

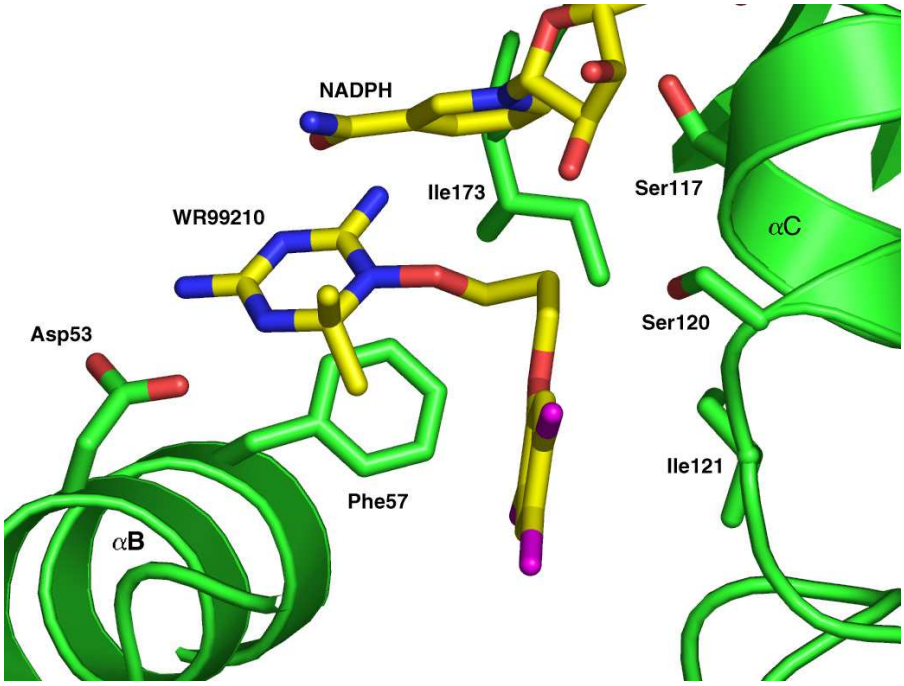


Parameters	PvDHFR(WT)+NADPH+WR99210
Space group	C2
Unit cell *a*, *b*, and *c*, Å; and *β*, °	133.04, 55.54, 45.52; 107.26
Resolution, Å	20 – 2.1
Completeness, % (final shell, %)	90.1 (92.8)
Unique reflections	16,917
Redundancy	2.7
R_{sym}, (final shell)*	3.0 (20.8)
$\langle I/I\sigma \rangle$ (final shell)	42.0 (3.9)
R factor / R_{free},† %	23.30 / 27.52
Average *B* factor, Å^2	53.5
No. of atoms	1,928
Nonhydrogen protein	1723
Ligands	72
Solvents	133
rms deviation	
Bond lengths, Å	0.0092
Bond angles, °	1.281

*$R_{sym} = \Sigma|I - \langle I \rangle|/\Sigma I$, where *I* is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the average intensity from multiple observations of symmetry-related reflections.

†*R* factor = $\Sigma_{hkl}|F_o(hkl) - F_c(hkl)|/\Sigma_{hkl}F_o(hkl)$, where $F_o(hkl)$ and $F_c(hkl)$ are the observed and calculated structure factor amplitudes for reflection *hkl*. R_{free} is computed by using randomly selected 5% of the data that were excluded throughout refinement.

รูปที่ 14 (บน) ผลึกของ PvDHFR-NADPH-WR99210 complex. (ล่าง) Crystal parameters และ refinement data ของโครงสร้างผลึก

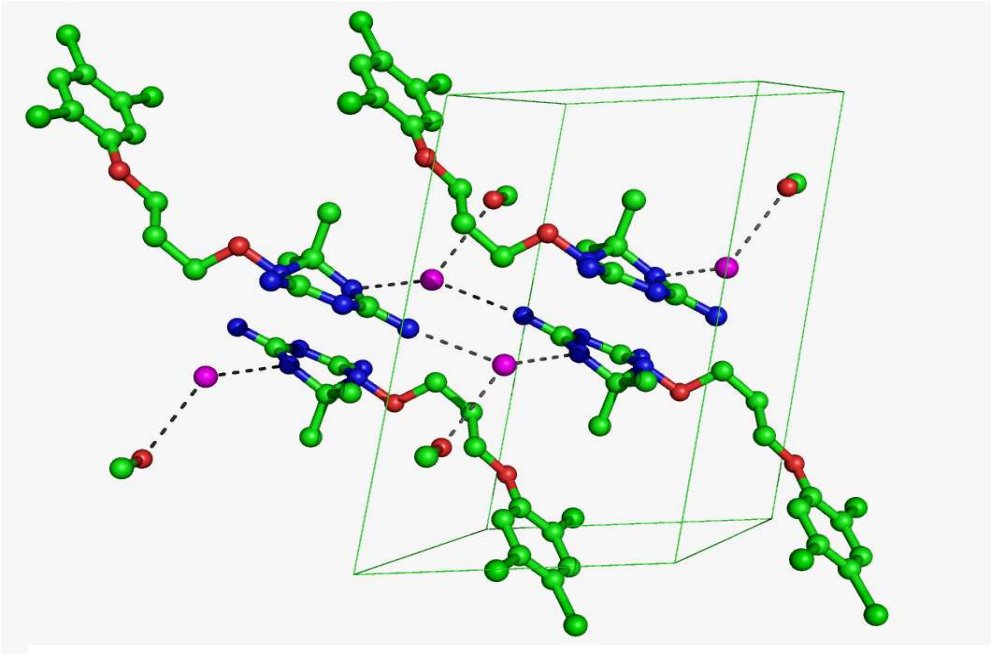


รูปที่ 15. โครงสร้างและการจับตัวของ WR99210 ใน active site ของ *P. vivax* DHFR

โครงสร้างผลึกของ WR99210 ในสภาวะ free-base และ enzyme-bound form

โครงสร้างของ inhibitor ที่มี flexibility อย่าง WR99210 อาจจะมีการจัดเรียงตัวได้ต่างกันในสภาวะที่เป็น enzyme-free และ enzyme-bound states ดังนั้นจึงได้มีการตกผลึก WR99210 เพื่อศึกษาโครงสร้างผลึก โดย WR99210 ถูกละลายด้วย diluted HCl ใน aqueous methanol และตกผลึกด้วยเทคนิค slow evaporation สามารถเตรียมผลึกเชิงเดี่ยวที่มีขนาดใหญ่เหมาะสมมีคุณภาพดี นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค X-ray analysis ด้วยเครื่อง 1kCCD Bruker-Nonius diffractometer พบว่ามีกลุ่มสมมาตรเป็นชนิด P-1 มี unit-cell parameters a = 8.5926(4), b = 9.3510(3), c = 14.6966(7) Åº $\alpha = 75.422(2)^{\circ}$, $\beta = 78.226(2)^{\circ}$, $\gamma = 70.194(3)^{\circ}$ โดย WR99210 ตกผลึกร่วมกันกับ methanol และ chloride ion (Fig. 10)

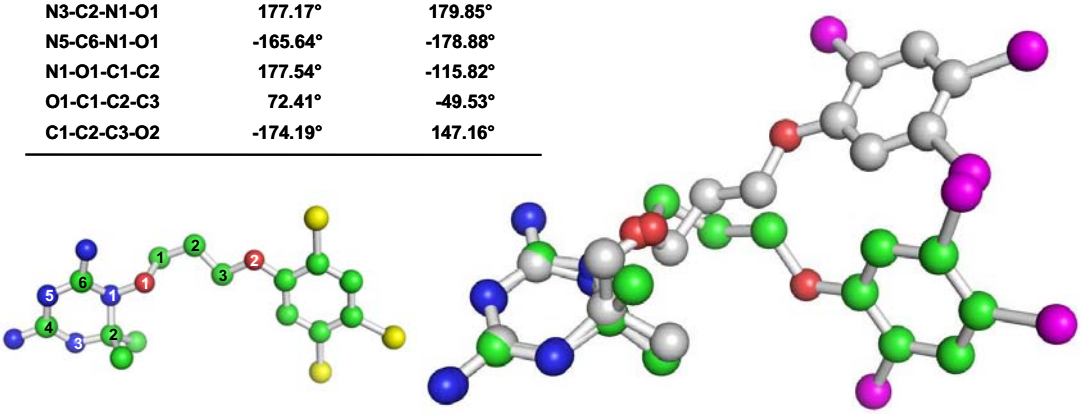
เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างของ WR99210 ที่จับตัวกับเอนไซม์ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมากตั้งแต่อะตอมของ O1 ที่เป็น side chain ออกจาก triazine ring ดังแสดงใน Fig. 11 แสดงให้เห็นว่า flexible inhibitor มีการปรับตัวเพื่อให้จับกับเอนไซม์ได้ดีในระดับ nanomolar ซึ่งแสดงให้เห็นถึง strategy ในการออกแบบยารักษาโรคมาลาเรียที่มี flexible linker ได้



รูปที่ 16 โครงสร้างผลึกของ WR99210-chloride methanol solvate ตกผลึกด้วยเทคนิค slow evaporation ที่ room temperature. ในรูปแสดง polar interactions ด้วย dotted lines.

Dihedral angles

Dihedral angle	Free-WR	WR in PvDHFR
N3-C2-N1-O1	177.17°	179.85°
N5-C6-N1-O1	-165.64°	-178.88°
N1-O1-C1-C2	177.54°	-115.82°
O1-C1-C2-C3	72.41°	-49.53°
C1-C2-C3-O2	-174.19°	147.16°



รูปที่ 17 Superposition structure ของ WR99210 ใน free-base state (white carbon model) และ WR99210 ใน PvDHFR complex. flexibility ของ linker ที่ O1-C1-C2-C3 ทำให้ inhibitor จัดตัวให้อยู่ในรูปร่างที่เหมาะสมกับการจับกับเอนไซม์ ข้อมูล dihedral angles ของโครงสร้างทั้งสองแสดงไว้ในตารางแนบ

โครงสร้างของ *P. vivax* DHFR mutants กับ NADPH และ WR99210

เพื่อที่จะศึกษาถึงผลของ mutation ที่ตำแหน่ง 117 ของ *P. vivax* DHFR ชนิดกลายพันธุ์กับ WR99210 เพื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างของเอนไซม์ชนิด wild-type จึงได้ทำการเตรียมเอนไซม์ *P. vivax* DHFR ชนิดกลายพันธุ์สองชนิดคือ double mutant SP21 (Ser58Arg + Ser117Asn) และชนิด single mutant SS1 (Ser117Asn) ซึ่งสามารถตกผลึกได้ในสภาวะที่คล้ายคลึงกันกับเอนไซม์ชนิด wild-type ผลึกที่เตรียมได้สามารถกระเจิงรังสีเอกซ์ได้ดีถึง 2.3 Å resolution unit-cell parameter ใกล้เคียงกัน โดยมีกลุ่มสมมาตรคือ monoclinic C2 เช่นเดียวกับผลึกของเอนไซม์ชนิด wild-type (ตารางที่ 1.)

หลังจากเก็บข้อมูลการกระเจิงรังสีเอกซ์บนเครื่อง Imaging-plate โครงสร้างของเอนไซม์ทั้งสองชนิด หาได้ด้วยวิธี molecular replacement โดยใช้โครงสร้างของเอนไซม์ชนิด wild-type เป็น search model ซึ่งมีเพียง 1 molecule ของเอนไซม์ในแต่ละ asymmetric unit

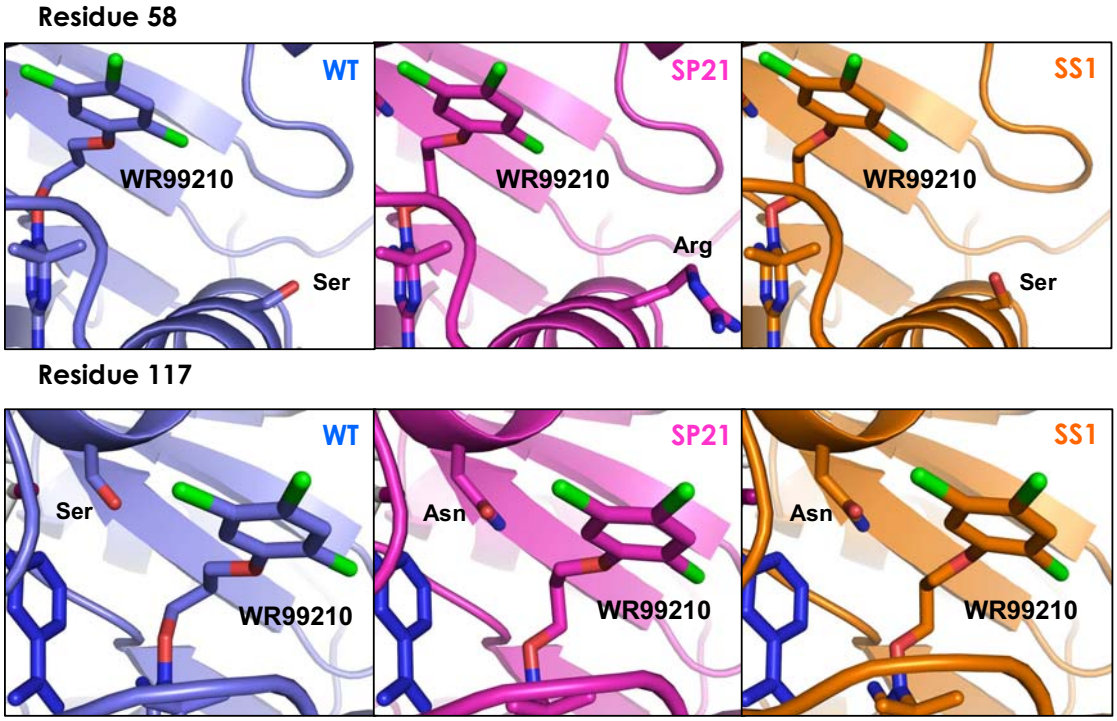
หลังจากกระบวนการ rigid-body refinement และ simulated annealing refinement เสร็จสิ้น ได้พิจารณาถึง electron density map บริเวณตำแหน่งของ Ser117 และ Ser58 และได้ปรับเปลี่ยน

กรดอะมิโนเป็น asparagines (Asn) และ arginine (Arg) ตามลำดับ และหลังจากการ simulated annealing refinement เพิ่มเติม ได้ใส่โมเลกุลของ WR99210 เข้าไป และใส่โมเลกุลของน้ำในลำดับสุดท้าย และทำการดูเปรียบเทียบกันของทั้ง 3 โครงสร้างในส่วนต่าง ๆ คือ ในส่วนบริเวณที่เกิดการกลายตามรูปที่ 5.

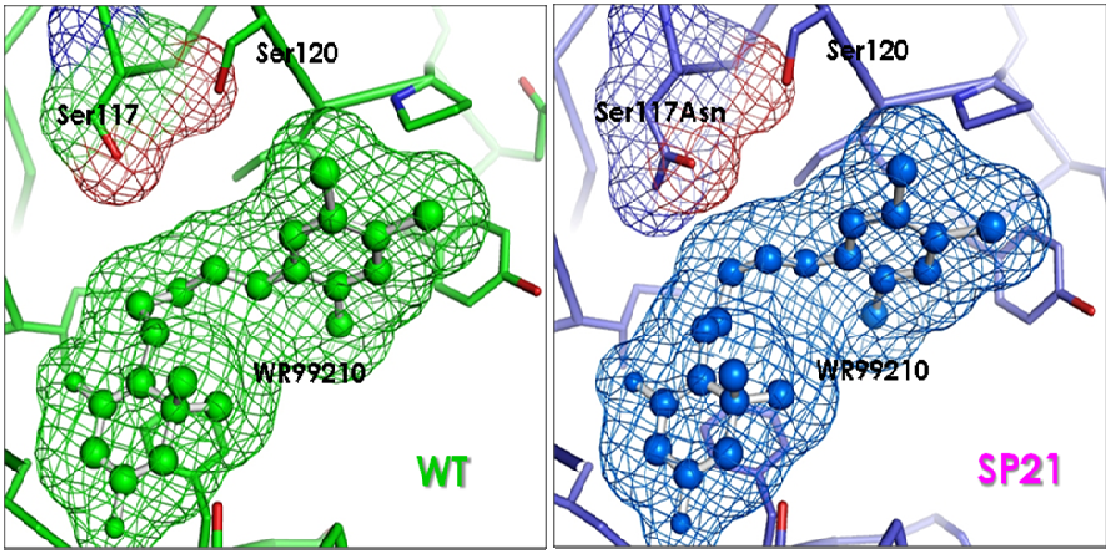
ตารางที่ 5. แสดง crystal parameter และ refinement data ของโครงสร้างผลึกของ SP21-PvDHFR+NADPH+WR99210 และ SS1-PVDHFR+NADPH+WR99210

Parameters	**WT+NADPH+WR**	**SP21[a]+NADPH+WR**	**SS1[b]+NADPH+WR**
Space group	C2	C2	C2
Unit cell *a*, *b*, and *c*, Å;	133.04, 55.54, 45.52;	133.03, 55.59, 45.56;	135.68, 55.27, 45.38;
and *β*, °	107.26	108.02	107.53
Resolution, Å	20 – 2.1	20 – 2.26	20 – 2.3
Completeness, %	90.1 (92.8)	99.7 (99.9)	94.6 (91.8)
(final shell, %)			
Unique reflections	16,917	14,379	13,592
Redundancy	2.7	3.7	2.6
R_{sym}, (final shell)*	3.0 (20.8)	2.9 (17.9)	7.4 (31.3)
$\langle I/\sigma \rangle$ (final shell)	42.0 (3.9)	14.3 (2.6)	8.5 (3.1)
***R* factor *I* R_{free},† %**	23.30/27.52	24.55/27.70	22.39/25.94
Average *B* factor, Å²	53.5	47.0	43.6
rms deviation			
Bond lengths, Å	0.0092	0.0088	0.0075
Bond angles, °	1.281	1.088	1.152

[a]SP21, double mutant (Ser58Arg+Ser117Asn)
[b]SS1, single mutant (Ser117Asn)
***R_{sym} = $\Sigma|I - \langle I \rangle|/\Sigma I$, where *I* is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the average intensity from multiple observations of symmetry-related reflections.**
†*R* factor = $\Sigma_{hkl}|F_o(hkl) - F_c(hkl)|/\Sigma_{hkl}F_o(hkl)$, where $F_o(hkl)$ and $F_c(hkl)$ are the observed and calculated structure factor amplitudes for reflection *hkl*. R_{free} is computed by using randomly selected 5% of the data that were excluded throughout refinement.

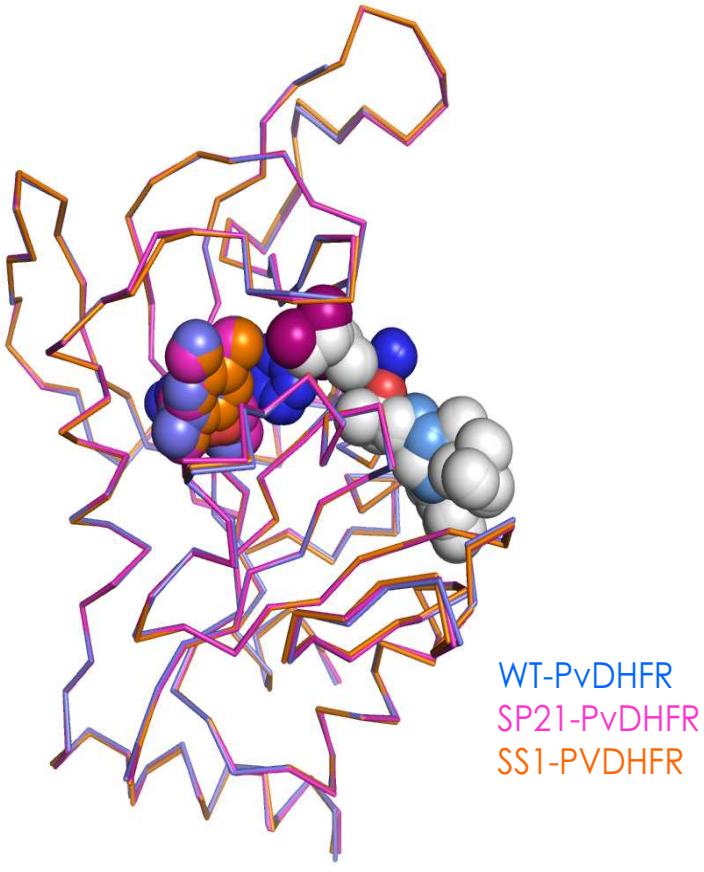


รูปที่ 18. แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนชนิดสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) Ser58 และ Ser117 เทียบกับที่เกิดการกลายชนิดสองตำแหน่ง (SP21) จาก Ser58Arg และ Ser117Asn และชนิดหนึ่งตำแหน่ง (SS1) จาก Ser58Arg และ Ser117



รูปที่ 19. เปรียบเทียบบริเวณที่เกิดอันตรกิริยาของ WR99210 กับบริเวณ active site ที่ตำแหน่ง Ser117 ของสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) กับชนิดกลายพันธุ์สองตำแหน่ง (SP21) ที่ตำแหน่ง Ser117 เป็น Asn

จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติที่บริเวณ active site ของ *P. vivax* DHFR ชนิดกลายพันธุ์กับ WR99210 เพื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างของเอนไซม์ชนิด wild-type พบว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง WR99210 ในส่วนที่เป็น long-chain ของ WR99210 กับตำแหน่งที่กลายพันธุ์ มีอันตรกิริยาที่แทบไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 18. โดยผลจากโครงสร้างของ WR99210 ที่ flexible มีส่วนช่วยให้มันหลบหลีกกับตำแหน่งที่เกิดกลายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับค่าการยับยั้งที่พบว่าแทบไม่มีความแตกต่างกันของการเกิด mutation นี้ ($K_{i(wild\ type)}$ = 6.0 nm, $K_{i(Ser58Arg+Ser117Asn)}$ = 8.1 nm) และเมื่อทำการซ้อนทับโครงสร้างผลึก PvDHFR กันระหว่างชนิด wild-type, SP21 และ SS1 พบว่าคล้ายกันอย่างมาก โดยมีค่า RMS deviation ของ C-alpha ทั้งหมด น้อยกว่า 0.5 Å แม้กระทั่งบริเวณ 120's loop ซึ่งแสดงให้เห็นว่า mutation ที่เกิดขึ้นไม่มีผลกระทบต่อ local conformation ของโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 19.



รูปที่ 20 Superposition structures ของ wild-type PvDHFR (blue) SP21-PvDHFR (pink) และ SS1-PvDHFR (orange) กับ NADPH and WR99210. rms deviations น้อยกว่า 0.5 Å

อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยากับกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ SP21-PvDHFR+ NADPH+WR99210 และ SS1-PvDHFR+NADPH+WR99210 แสดงในตารางที่ 5 และ 6. พร้อมแสดง crystal parameter และ refinement data ของโครงสร้างผลึก รวมทั้งค่า Ramachandran plot ที่ได้จากข้อมูลโครงสร้างที่ได้รายงานในการรายงานครั้งนี้

ตารางที่ 6. แสดงอันตรกิริยาระหว่าง DHFR domain กับยา

WR99210-DHFR (WT) domain
Ile13, Cys14, Leu45, Asp53, Phe57, Ile173, Tyr179, Thr194
WR99210-DHFR (SP21) domain
Ile13, Cys14, Asp53, Phe57, Ser117, Ile173, Tyr179, Thr194
WR99210-DHFR (SS1) domain
Ile13, Cys14, Asp53, Phe57, Ser117, Ile121, Pro122, Ile173, Thr194

* อันตรกิริยาที่แสดงอยู่ในระยะ 2.5 – 3.6 Å

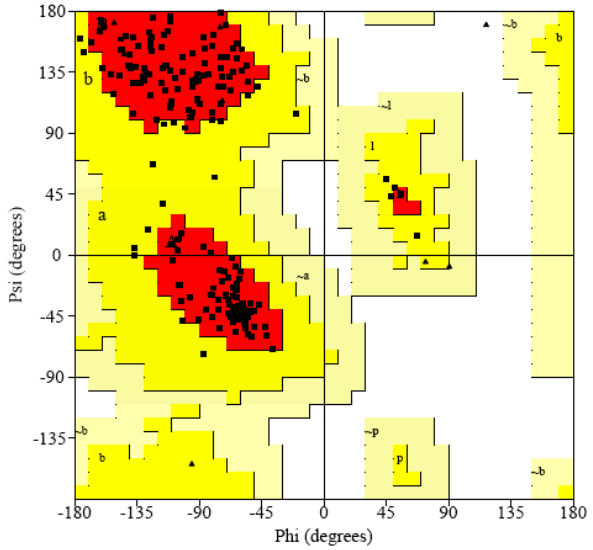
ตารางที่ 7. แสดง crystal parameter และ refinement data ของโครงสร้างผลึก SP21-PvDHFR+ NADPH+WR99210 และ SS1-PVDHFR+NADPH+WR99210

Parameters	SP21+NADPH+WR	SS1+NADPH+WR
Space group	C2	C2
Unit cell *a*, *b*, and *c*, Å;	133.03, 55.59, 45.56;	135.68, 55.27, 45.38;
and β, °	108.02	107.53
Resolution, Å	20 – 2.10	20 – 2.30
Completeness, %	99.8 (99.9)	94.6 (91.8)
(final shell, %)		
Unique reflections	18,582	13,592
Redundancy	3.74 (3.69)	2.62 (2.66)
*R*sym, (final shell)*	3.1 (30.1)	7.4 (31.3)
$\langle I / \sigma \rangle$ (final shell)	11.7 (1.5)	8.5 (3.1)
R factor / R_{free}, † %	24.77/27.92	21.67/25.21
Average *B* factor, Å^2	56.1	50.6
rms deviation		
Bond lengths, Å	0.0091	0.0107
Bond angles, °	1.524	1.613

*Rsym = $|\Sigma I - \langle I \Sigma I \rangle| I$, where I is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the average intensity from multiple observations of symmetry-related reflections.

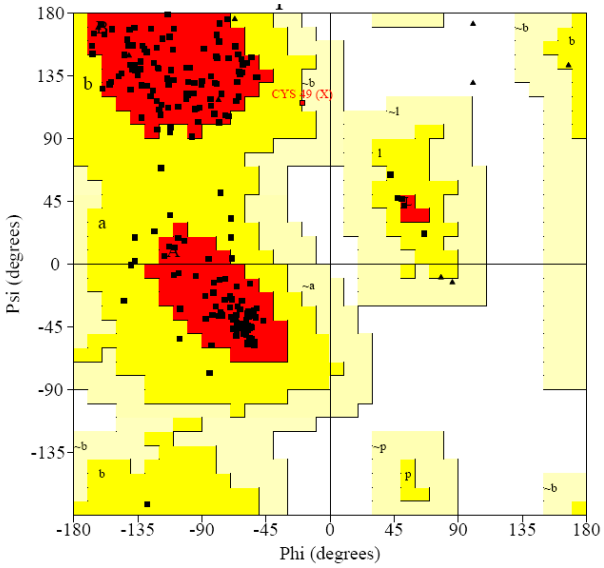
†R factor = $\Sigma hkl |Fo(hkl) - Fc(hkl)| I \Sigma hkl Fo(hkl)$, where $Fo(hkl)$ and $Fc(hkl)$ are the observed and calculated structure factor amplitudes for reflection hkl.

*R*free is computed by using randomly selected 5% of the data that were excluded throughout refinement.



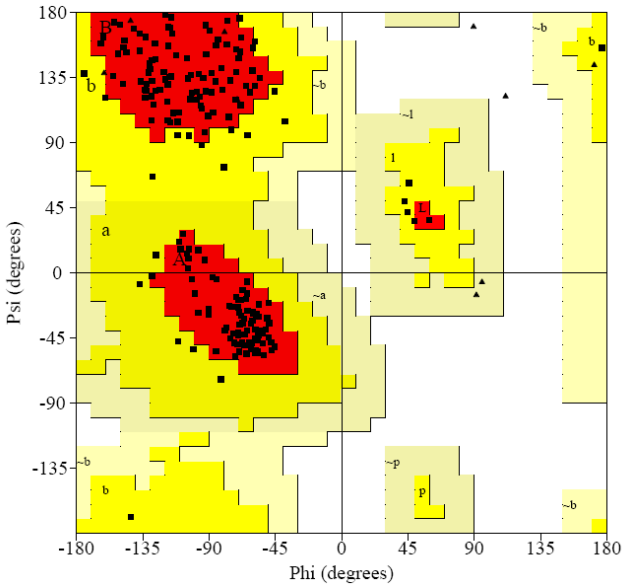
Ramachandran plot statistics of WT-PvDHFR+NADPH+WR99210

Residues in most favoured regions	[A,B,L]	164	87.7%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	23	12.3%
Residues in generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	[XX]	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues		187	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)		8	
Number of glycine residues		8	
Number of proline residues		9	
Total number of residues		212	



Ramachandran plot statistics of SP21-PvDHFR+NADPH+WR99210

Residues in most favoured regions	[A,B,L]	172	90.1%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	18	9.4%
Residues in generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	1	0.5%
Residues in disallowed regions	[XX]	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues		191	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)		6	
Number of glycine residues		9	
Number of proline residues		9	
Total number of residues		215	



Ramachandran plot statistics of SS1-PvDHFR+NADPH+WR99210

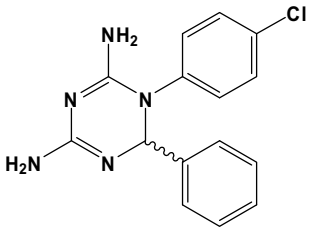
Residues in most favoured regions	[A,B,L]	166	86.9%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	25	13.1%
Residues in generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	[XX]	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues		191	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)		6	
Number of glycine residues		9	
Number of proline residues		9	
Total number of residues		215	

<u>โครงสร้างสามมิติของ PvDHFR กับ cycloguanils</u>

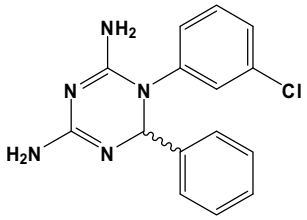
นอกจากโครงสร้างสามมิติที่ตกผลึกโปรตีนร่วมของยา pyrimethamine รวมทั้งอนุพันธ์ของมัน, WR9921 และ trimethoprim แล้ว เรายังทำการตกผลึกโปรตีนร่วมกับยา cycloguanil รวมทั้งอนุพันธ์ของมันอีก 4 ชนิด โดยส่วนที่เป็น chiral center เป็นองค์ประกอบ, มีส่วนของ chloro ที่ตำแหน่ง para- (cycloguanil 1), meta- (cycloguanil 2), para- และ meta- (cycloguanil 3) และ มีส่วนของ side-chain ที่คล้าย side-chain ของ WR99210 (cycloguanil 4) (รูปที่ 21)

โดยจุดประสงค์หลักที่ศึกษาอนุพันธ์ของ cycloguanil ที่เป็น chiral center ว่าจะเป็นสารที่มี configuration แบบ R หรือ S ที่จะสามารถจับกับเอนไซม์ได้ เราพบว่า configuration แบบ R จะเป็นตัวยับยั้ง ที่เข้าไปจับกับเอ็นไซม์

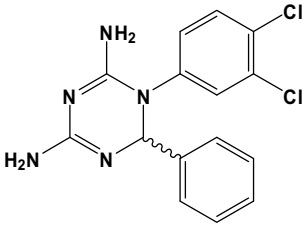
จากข้อมูลทางด้านโครงสร้างผลึกของยา cycloguanil รวมทั้งอนุพันธ์ของมัน (รูปที่ 22 และ 23.) ค่าที่ได้ยังต้องทำการปรับปรุงอีกครั้ง เพื่อให้ได้โครงสร้างที่ถูกต้องมากที่สุด และศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของค่าทางจนลศาสตร์และค่าการยับยั้งอีครั้งก่อนจะสรุปผลเพื่อตีพิมพ์ต่อไป



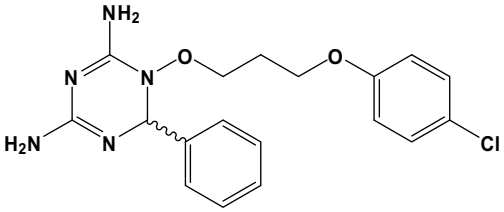
Cycloguanil 1, Cyc 1



Cycloguanil 2, Cyc 2



Cycloguanil 3, Cyc 3



Cycloguanil 4, Cyc 4

รูปที่ 21. แสดงอนุพันธ์ของcycloguanil แบบต่าง ๆ

อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างยากับกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ WT-PvDHFR กับ cycloguanil, cycloguanil 1, cycloguanil 3, cycloguanil 4 และ SP21-PvDHFR กับcycloguanil 2 แสดงในตารางที่ 8, 9 และ 10. พร้อมแสดง crystal parameter และ refinement data ของโครงสร้างผลึก รวมทั้งค่า Ramachandran plot ที่ได้จากข้อมูลโครงสร้างที่ได้

ตารางที่ 8. แสดงอันตรกิริยาระหว่าง DHFR domain กับยา

Cycloguanil 0-DHFR (WT) domain

Ile13, Cys14, Ala15, Asp53, Ser117, Ile121, Ile173, Thr194

Cycloguanil 1-DHFR (WT) domain

Ile13, Cys14, Asp53, Met54, Phe57, Ser117, Ser120, Ile121, Ile173, Thr194

Cycloguanil 3-DHFR (WT) domain

Ile13, Cys14, Asp53 Phe57, Ser117, Ile121, Pro122, Ile173, Thr194

Cycloguanil 4-DHFR (WT) domain

Ile13, Cys14, Asp53, Phe57, Ser117, Ile121, Pro122, Ile173, Thr194

Cycloguanil 2-DHFR (SP21) domain

Ile13, Cys14, Ala15, Leu45, Asp53, Met54, Phe57, Ser117, Leu128, Ile173, Thr194

* อันตรกิริยาที่แสดงอยู่ในระยะ 2.5 – 3.6 Å

ตารางที่ 9. แสดง crystal parameter และ refinement data ของโครงสร้างผลึกของ WT-PvDHFR+NADPH+ Cycloguanil, WT-PvDHFR+NADPH+Cycloguanil 1, WT-PvDHFR+NADPH+ Cycloguanil 3 และ WT-PvDHFR+NADPH+ Cycloguanil 4

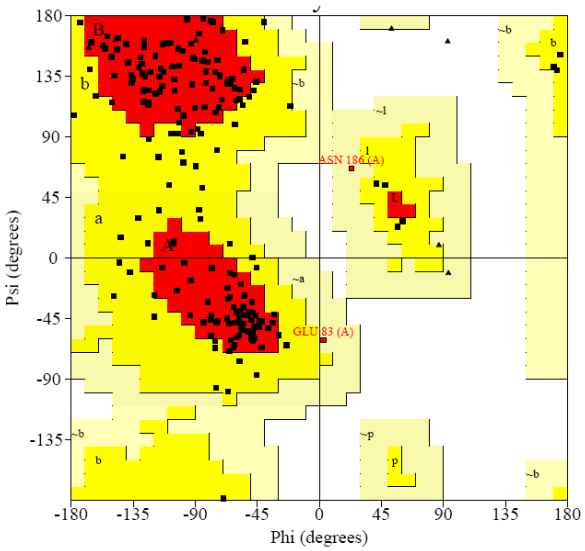
Parameters	WT+NADPH+Cycloguanil	WT+NADPH+Cycloguanil 1
Space group	C2	C2
Unit cell *a*, *b*, and *c*, Å;	135.43, 55.01, 45.59;	134.08, 55.90, 45.77;
and β, °	107.16	106.77
Resolution, Å	20 – 2.80	20 – 2.80
Completeness, %	95.4 (92.0)	95.7 (94.9)
(final shell, %)		
Unique reflections	14,765	14,976
Redundancy	2.01 (1.93)	1.79 (1.80)
*R*sym, (final shell)*	11.4 (33.3)	13.8 (36.3)
$\langle I / \sigma \rangle$ (final shell)	3.9 (1.1)	3.5 (1.3)
R factor / R_{free},† %	26.78/30.63	30.96/35.83
Average *B* factor, Å^2	56.0	28.1
rms deviation		
Bond lengths, Å	0.0132	0.0140
Bond angles, °	1.993	2.115

Parameters	WT+NADPH+Cycloguanil 3	WT+NADPH+Cycloguanil 4
Space group	C2	C2
Unit cell *a*, *b*, and *c*, Å;	137.00, 56.39, 45.71;	134.90, 55.54, 45.56;
and β, °	107.10	107.26
Resolution, Å	20 – 2.70	20 – 2.80
Completeness, %	98.6 (98.3)	24.0 (30.0)
(final shell, %)		
Unique reflections	17,646	1,704
Redundancy	1.72 (1.71)	4.74 (4.66)
*R*sym, (final shell)*	7.6 (31.6)	8.7 (32.7)
$\langle I / \sigma \rangle$ (final shell)	6.7 (1.6)	6.2 (1.7)
R factor / R_{free},† %	24.20/27.52	24.01/30.04
Average *B* factor, Å^2	37.9	51.7
rms deviation		
Bond lengths, Å	0.0107	0.0111
Bond angles, °	1.613	1.595

*$R\text{sym} = \left|\sum I - \langle I \sum I \rangle\right| I$, where I is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the average intensity from multiple observations of symmetry-related reflections.

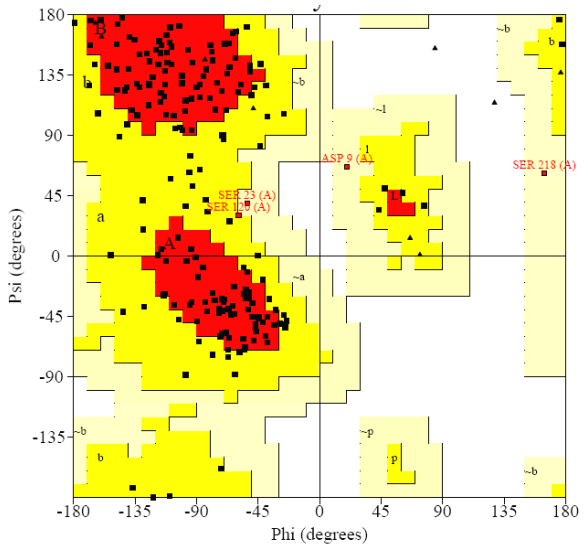
†R factor = $\sum hkl \left| Fo(hkl) - Fc(hkl) \right| / \sum hkl Fo(hkl)$, where $Fo(hkl)$ and $Fc(hkl)$ are the observed and calculated structure factor amplitudes for reflection hkl.

*R*free is computed by using randomly selected 5% of the data that were excluded throughout refinement.



Ramachandran plot statistics of WT-PvDHFR+NADPH+Cycloguanil

Residues in most favoured regions	[A,B,L]	139	71.6%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	53	27.3%
Residues in generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	2	1.0%
Residues in disallowed regions	[XX]	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues		194	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)		6	
Number of glycine residues		9	
Number of proline residues		9	
Total number of residues		218	



Ramachandran plot statistics of WT-PvDHFR+NADPH+Cycloguanil 1

Residues in most favoured regions	[A,B,L]	133	68.9%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	56	29.0%
Residues in generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	4	2.1%
Residues in disallowed regions	[XX]	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues		193	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)		6	
Number of glycine residues		9	
Number of proline residues		9	
Total number of residues		21	