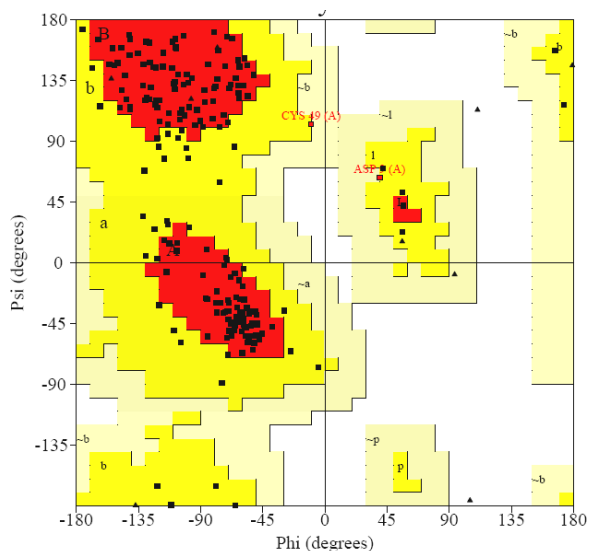


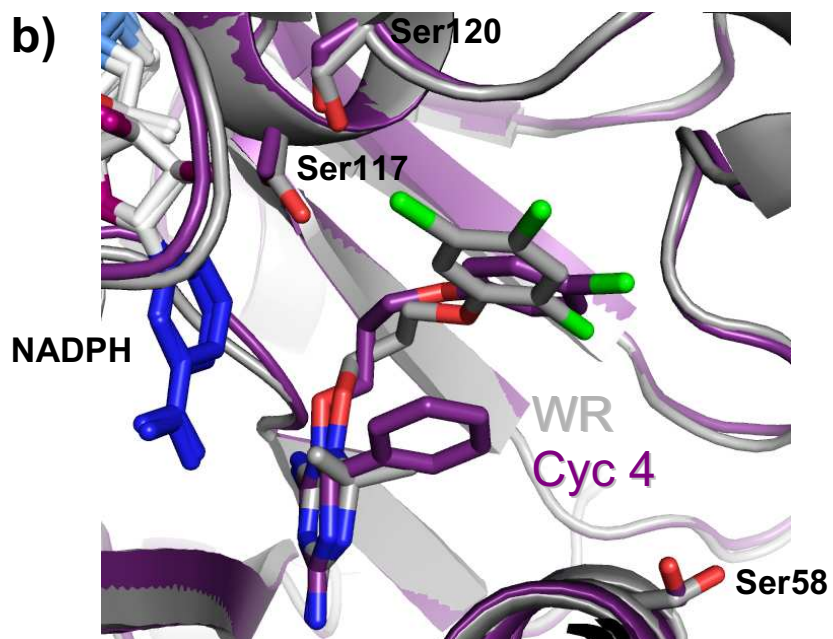
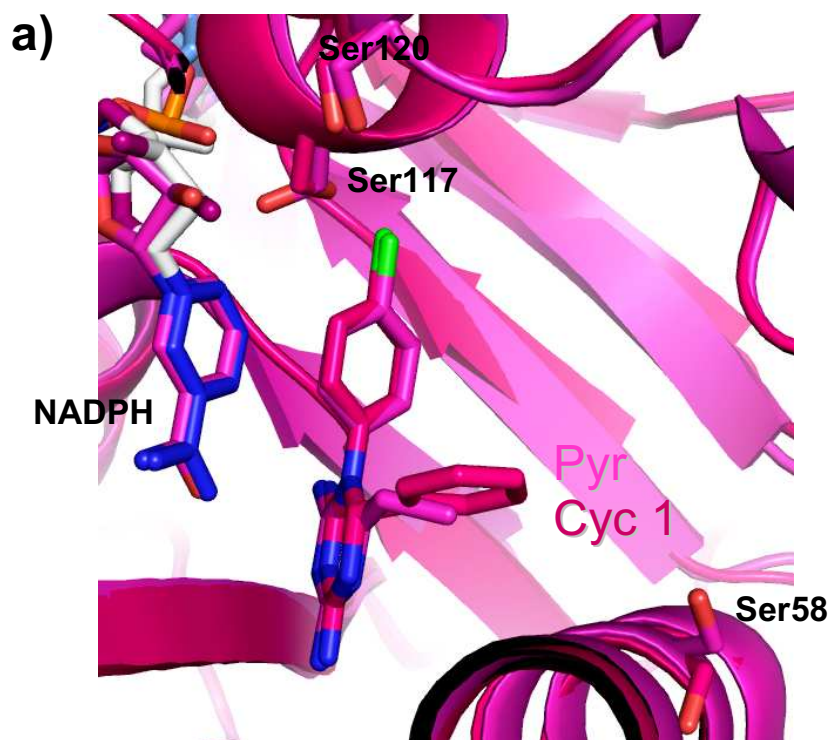
Ramachandran plot statistics of WT-PvDHFR+NADPH+Cycloguanil 3

Residues in most favoured regions	[A,B,L]	164	84.1%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	29	14.9%
Residues in generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	1	0.5%
Residues in disallowed regions	[XX]	1	0.5%
Number of non-glycine and non-proline residues		195	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		220	



Ramachandran plot statistics of WT-PvDHFR+NADPH+Cycloguanil 4

Residues in most favoured regions	[A,B,L]	154	79.4%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	38	19.6%
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	



รูปที่ 22. เปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติระหว่าง pyrimethamine กับ cycloguanil 1 ในเอนไซม์ WT-PvDHFR (a), และระหว่าง WR99210 กับ cycloguanil 4 (b)

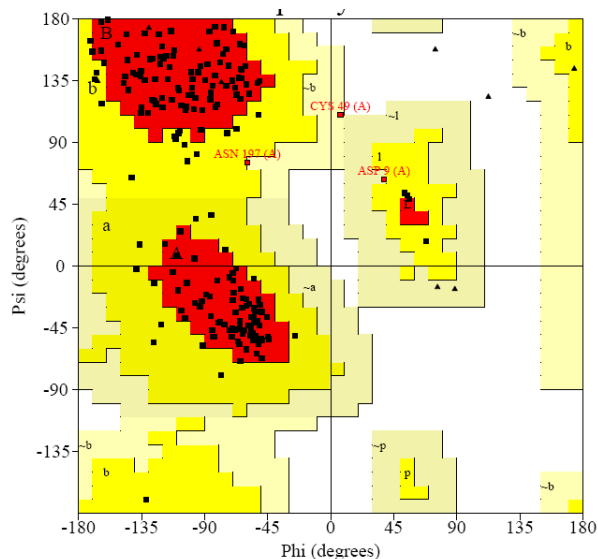
ตารางที่ 10. แสดง crystal parameter และ refinement data ของโครงสร้างผลึกของ SP21-PvDHFR+NADPH+Cycloguanil 2

Parameters	SP21+NADPH+Cycloguanil 2
Space group	C2
Unit cell <i>a</i> , <i>b</i> , and <i>c</i> , Å;	135.94, 56.20, 45.64;
and β , °	106.89
Resolution, Å	20 – 2.10
Completeness, % (final shell, %)	96.5 (94.0)
Unique reflections	7,583
Redundancy	1.74 (1.72)
<i>R</i> _{sym} , (final shell)*	8.3 (28.4)
$\langle I / \sigma \rangle$ (final shell)	5.4 (1.5)
<i>R</i> factor / <i>R</i> _{free} [†] , %	26.10/29.06
Average <i>B</i> factor, Å ²	34.0
rms deviation	
Bond lengths, Å	0.0100
Bond angles, °	1.557

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

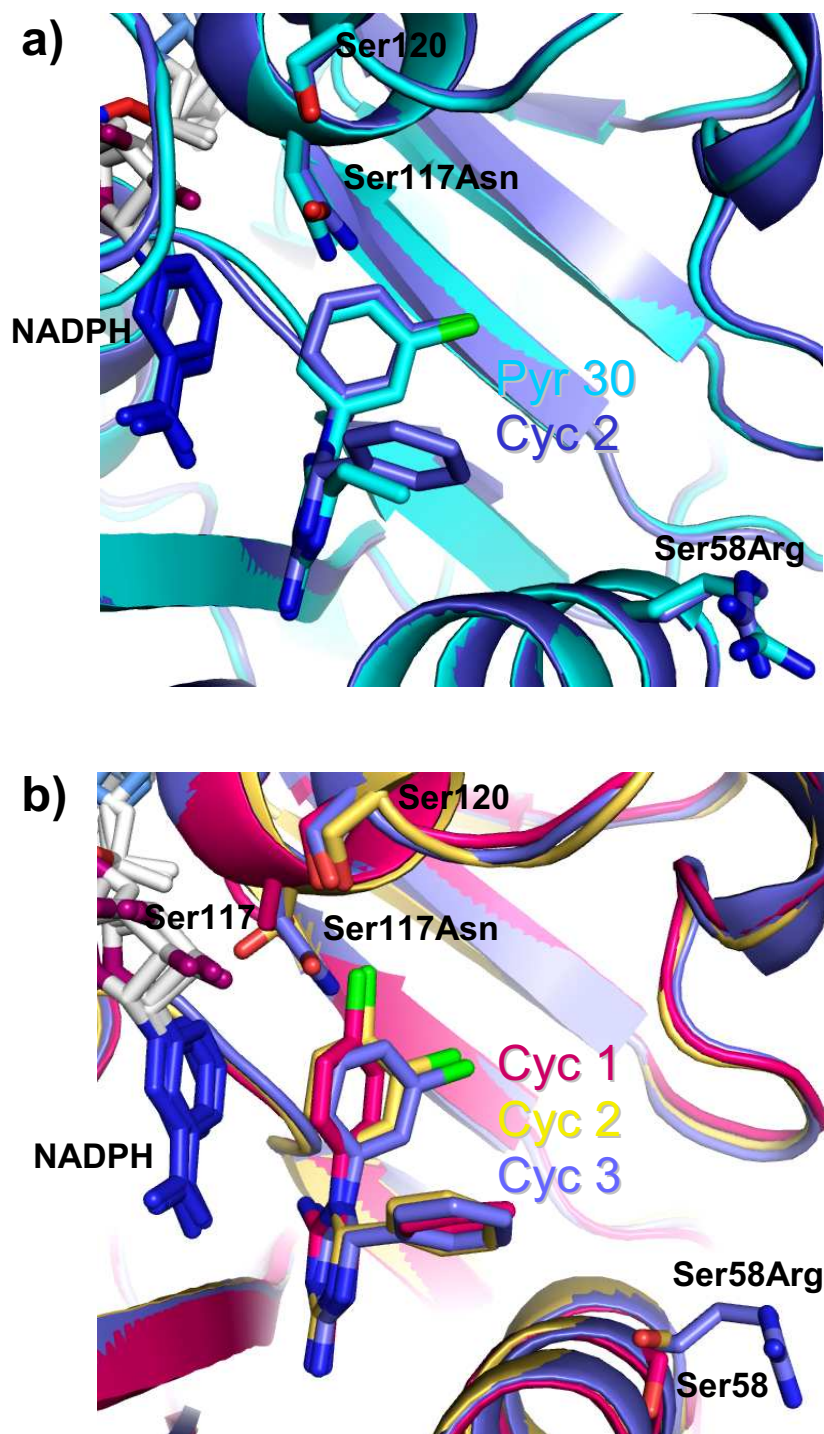
†*R* factor = $\sum |F_o(hkl) - F_c(hkl)| / \sum F_o(hkl)$, where *F*_o(*hkl*) and *F*_c(*hkl*) are the observed and calculated structure factor amplitudes for reflection *hkl*.

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



Ramachandran plot statistics of WT-PvDHFR+NADPH+Cycloguanil 4

Residues in most favoured regions	[A,B,L]	158	81.4%
Residues in additional allowed regions	[a,b,l,p]	33	17.0%
Residues in generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	3	1.5%
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	



รูปที่ 23. เปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติระหว่าง *m*-chloro pyrimethamine, Pyr 30 กับ cycloguanil 1 ในเอนไซม์ SP21-PvDHFR (a), และระหว่าง cycloguanil 1 กับ cycloguanil 3 ในเอนไซม์ WT-PvDHFR และ cycloguanil 2 ในเอนไซม์ SP21-PvDHFR (b)

โครงสร้างของ *P. vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS)

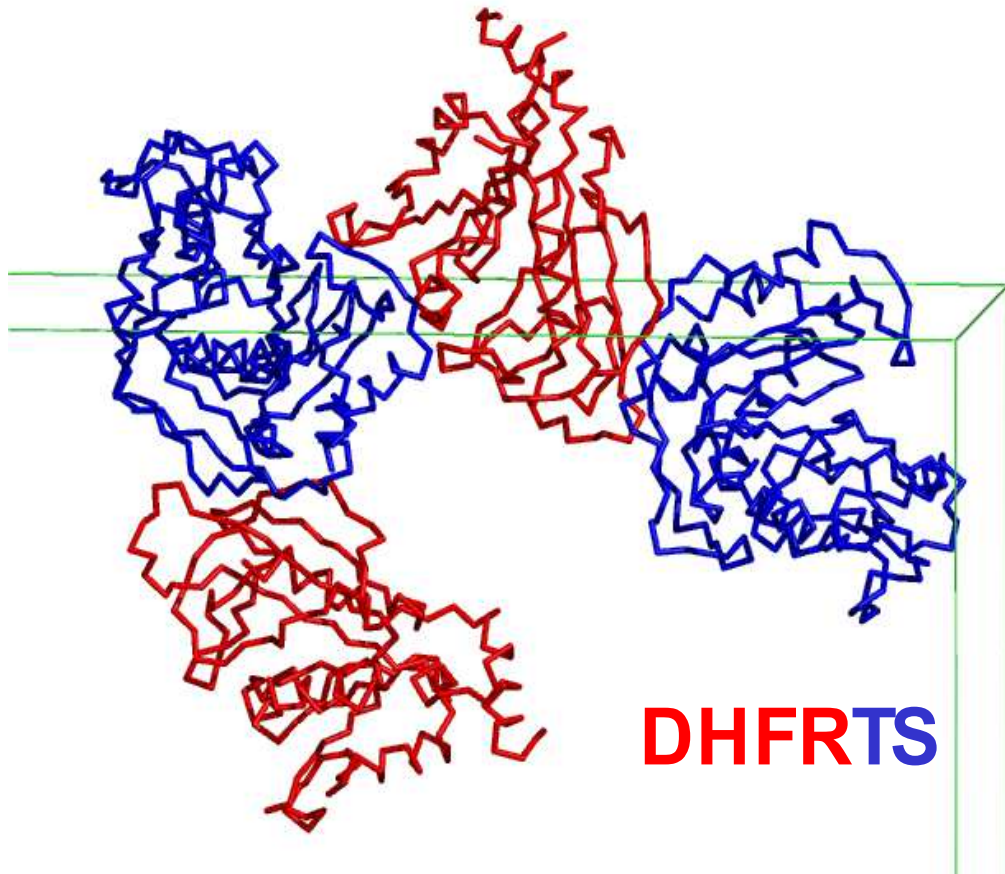
แม้ว่าเอนไซม์ *P. vivax* DHFR-TS สามารถตกผลึกได้เป็นเวลากว่า 2-3 ปี แต่ผลึกที่เตรียมได้ไม่สามารถกระเจิงรังสีเอกซ์ได้ดีพอในระดับที่จะใช้หาโครงสร้างผลึกได้ จะการวิเคราะห์ด้วยรังสีเอกซ์ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และทั้งที่แหล่งกำเนิดแสงซินโครตรอนพลังงานสูงที่ Daresbury Laboratory ประเทศอังกฤษ และที่ SPring-8 synchrotron ที่ประเทศญี่ปุ่น ผลึกของ bifunctional *P. vivax* DHFR-TS กระเจิงรังสีเอกซ์ได้ประมาณ 8-10 Å เท่านั้น ดังนั้นในระยะที่ผ่านมาความพยายามส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปที่การศึกษาโครงสร้างของ monofunctional *P. vivax* DHFR ที่ตกผลึกได้ดีหลังจากที่แก้ปัญหาเรื่องคุณสมบัติในการละลาย และใช้เป็น model ในการศึกษากลไกในการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย

ได้มี breakthrough ในการศึกษาโครงสร้างของ bifunctional *P. vivax* DHFR-TS โดยที่ผลึกที่ถูกแช่แข็งไว้ และนำไปวิเคราะห์ที่ Taiwan Light Source beamline-13B พบว่าผลึกแรกสามารถกระเจิงรังสีเอกซ์ได้ประมาณ 6.5 Å ซึ่งดีพอที่จะหา unit cell parameter และประมาณค่า solvent content รวมทั้งหากลุ่มสมมาตรได้ โดยได้เก็บข้อมูลที่ 6.5 Å resolution บนเครื่อง Quantum 3x3 CCD detector และเมื่อทดสอบด้วยผลึกใหม่ แม้ว่ามีขนาดเล็กกว่าพบว่าสามารถกระเจิงแสงซินโครตรอนได้ดีกว่า 3.8 Å และได้พยายามที่จะเก็บข้อมูลที่ 3.5 Å resolution จากการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่า ผลึกเป็นผลึกโปรตีน ที่มี unit-cell parameters คือ $a = 62.366$, $b = 114.813$, $c = 198.901$ Å มีกลุ่มสมมาตรเป็น orthorhombic และมี space group ที่เป็นไปได้คือ $P222 - P2(1)2(1)2(1)$ ถ้าประมาณว่า PvDHFR-TS มีขนาด 72000 Dalton จะมีค่า Matthews' constant = 2.48 มี %solvent = 50.3 และมี 2 molecule ของ *P. vivax* DHFR-TS ในแต่ละ asymmetric unit



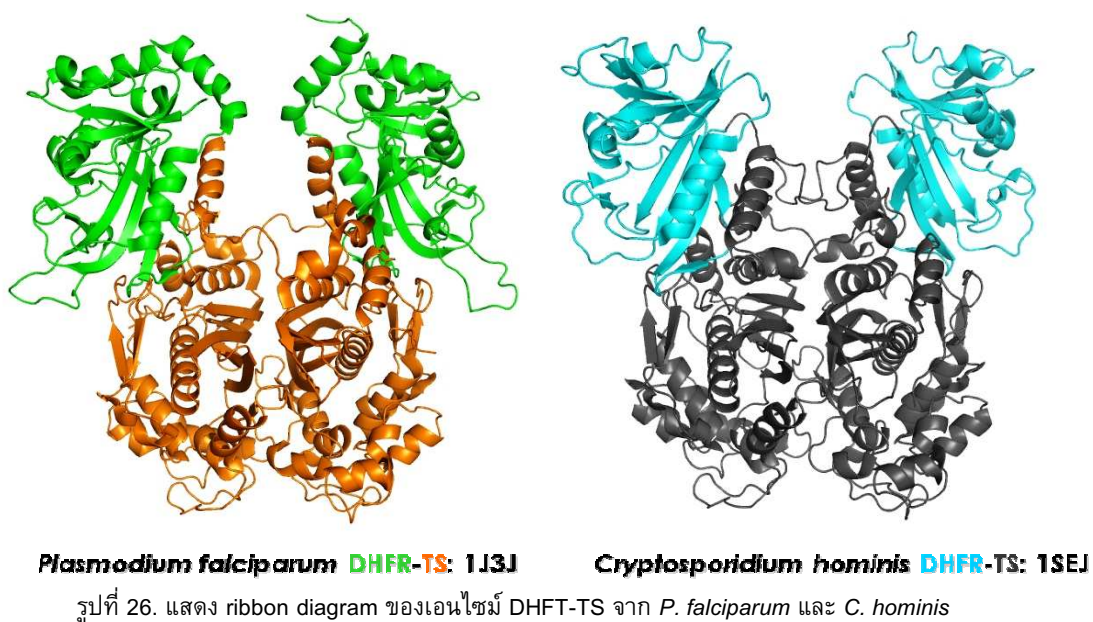
รูปที่ 24. ผลึกของ *P. vivax* DHFR-TS

ในขณะนี้ได้ดำเนินการหาโครงสร้างที่ 4 Å resolution ของ *P. vivax* DHFR-TS ด้วยเทคนิค molecular replacement โดยใช้ข้อมูลระหว่าง 8-4 Å resolution ด้วยโปรแกรม AMoRe ใน CCP4 และใช้ *P. falciparum* DHFR-TS เป็น search model พบว่าได้ 2 solutions ที่ชัดเจน หลังจากการทำ rigid-body refinement ด้วย CNS package ได้ลักษณะการจัดตัวของเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ 25.



รูปที่ 25 Crystal packing ของ *P. vivax* DHFR-TS ใน orthorhombic settings.

แม้ว่ายังไม่มีรายละเอียดของโครงสร้างทั้งหมดของเอนไซม์นี้อย่างครบถ้วน แต่สามารถที่จะพิจารณาได้จากการจัดเรียงตัวในผลึกว่า *P. vivax* DHFR-TS เป็น homodimer ที่มี dimerization interface ระหว่าง TS domain แต่ในโครงสร้างนี้พบว่าเอนไซม์นี้ใช้ บริเวณที่เกิด dimerization ต่างไปจากที่เคยพบมาแต่ก่อนทั้งหมด โดยดูการเปรียบเทียบจากโครงสร้างที่เคยมีการรายงานแล้ว ในฐานข้อมูลโปรตีน (Protein Data Bank) จากโครงสร้าง DHFR-TS ของ *Plasmodium falciparum* (PDB: 1J3J) และ *Cryptosporidium hominis* (PDB: 1SEJ) (รูปที่ 26.) และเป็นที่น่าสนใจว่าโดยปกติ thymidylate synthase เป็นเอนไซม์ที่มี homology สูง และพบไม่บ่อยที่จะมีการใช้ dimerization mechanism ที่เปลี่ยนไปเช่นนี้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป



ได้ศึกษาส่วนที่เกิดอันตรกิริยาระหว่าง DHFR กับ TS domain และ TS กับ TS domain โดยทำการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเป็น dimer ของ DHFR-TS และดูความแตกต่างกันของกรดอะมิโนที่ไม่เหมือนกันของทั้ง PvDHFR-TS และ PfDHFR-TS ที่มีผลต่อการเกิดเป็น dimer ที่ให้โครงสร้างที่แตกต่างกันของทั้งสองชนิด ดังแสดงในตารางที่ 11 และ 12. ซึ่งเราพบว่าในส่วนของ TS domain นั้นมีความคล้ายกันมากกว่า 90% (รูปที่ 27.) จึงเป็นสิ่งที่ท้าทายในการหาคำอธิบายถึงความแตกต่างดังกล่าว

ตารางที่ 11. แสดงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง DHFR กับ TS domain

PfDHFR domain	PfTS domain	PvDHFR domain	PvTS domain
Lys19	Asn595 and Val597	Lys18	Asn611 and Val613
Asn29	Lys373	Asn28	Lys389
Phe32	His598	Phe31	His614
Asn33	Tyr569	Ser32 ¹	Tyr585
Arg186	Pro568 and Pro570	Arg197	Pro584 and Pro586
Asn188	Pro570, Phe571, Asn595 and Val597	Asn199	Pro586, Phe587, Asn611 and Val613
Ser189	Asn595	Gly200	Asn611
Val210	Tyr322	Val221	Gln338 ²
Ser211	His323	Ser222	His339
Asp212	Tyr322 and Pro324	Glu223	Gln338 and Pro340
Val213	His323	Val224	His339
Tyr214	Gln364	Tyr225	Glu380
Thr215	Gln364	Asn226	Glu380
Thr220	Gln364, Phe571 and Thr573	Thr231	Glu380 , Phe587 and Thr589

¹สีแดง แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนใน DHFR domain

²สีเขียว แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนใน TS domain

ตารางที่ 12. แสดงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง TS กับ TS domain

PfTS domain (C)	PfTS domain (D)	PvTS domain (A)	PvTS domain (B)
Ans340	Tyr497 and Phe499	Ans356	Tyr513 and Phe515
Gln342	Val498	Gln358	Val514
Asp344	Arg470	Asp360	Arg486
Ser352	Tyr497	Ser368	Tyr513
Phe354	Lys359, Gln495, Tyr497 and Ile506	Phe370	Lys375, Gln511, Tyr513 and Ile522
Gly355	Lys359	Gly371	Lys359
Lys359	Gly355 and Phe354	Lys375	Phe370 and Gly371
Phe437	Val479	Phe453	Val495
Gly438	Lys480	Gly454	Lys496
Gln455	Val479	Gln471	Val495
Asn465	Arg345	Asn481	Arg361
Asp466	Arg345	Asn482	Arg361
Arg470	Asp344, Arg510 and Ser511	Arg486	Asp360, Arg526 and Ser527
Val479	Phe437 and Gln455	Val495	Phe453 and Gln471
Pro488	Arg471	Pro504	Arg487
Ile492	Leu493	Ile508	Leu509
Gln495	Tyr508 and Arg510	Gln511	Tyr524 and Arg526
Tyr497	Asn340, Ser352 and Phe354	Tyr513	Asn356, Ser368, and Phe370
Val498	Asn340 and Lys341	Val514	Asn356 and Lys357
Phe499	Lys359	Phe515	Lys376
Ile506	Phe354	Ile522	Phe370
Tyr508	Gln495	Tyr524	Gln511
Arg510	Arg470 and Gln495	Arg526	Arg486 and Gln511
Ile544	Phe354	Ile560	Phe370
Asn549	Tyr497	Asn565	Tyr513
Tyr553	Arg470	Tyr569	Arg486

¹สีแดง แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนใน TS domain

OUTPUTS

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

P. Kongsaree, P. Khongsuk, U. Leartsakulpanich, P. Chitnumsub, M.D. Walkinshaw, and Y. Yuthavong. Crystal structures of wild-type and mutant dihydrofolate reductase from *Plasmodium vivax*: Pyrimethamine displacement linked with mutation-induced resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2005), 102, 13046-13051. (Impact factor = 10.452)

ข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูลสากล Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org)

4 โครงสร้าง: 2bl9, 2blA, 2blB, 2blC

ผลงานวิจัยตีพิมพ์อื่นๆ ที่อ้างอิงถึงการสนับสนุนจาก สกว.

S. Kanokmedhakul, K. Kanokmedhakul, T. Prajuabsuk, S. Panichajakul, P. Panyamee, S. Prabpai and P. Kongsaree. Azadirachtin Derivatives from Seed Kernels of *Azadirachta excelsa*. Journal of Natural Products (2005), 68(7), 1047-1050.

M. Pohmakotr, T. Komutkul, P. Tuchinda, S. Prabpai, P. Kongsaree and V. Reutrakul. Syntheses of (\pm)-thuriferic acid ethyl ester, its analogues and (\pm)-picropodophyllone. Tetrahedron, 61(22), 5311-5321.

M. Isaka, N. Thong-orn, P. Maithip, S. Prabpai, P. Kongsaree and Y. Thebtaranonth. Hirsutellones A-E, antimycobacterial alkaloids from the insect pathogenic fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. Tetrahedron (2005), 61(23), 5577-5583.

F. Buttner, A. S. Norgren, S. Zhang, S. Prabpai, P. Kongsaree, P. I. Arvidsson. Cyclic β -tetra- and pentapeptides: Synthesis through on-resin cyclization and conformational studies by X-Ray, NMR and CD Spectroscopy, and theoretical calculations, Chemistry: A European Journal (2005), 11(21), 6145-6158.

S. Zhang, S. Prabpai, P. Kongsaree, P. I. Arvidsson. Poly-N-methylated α -peptides: Synthesis and X-ray structure determination of sheet-forming foldamers. Chemical Communications, (2006), 5, 497-499.

A. S. Norgren, F. Buttner, S. Prabpai, P. Kongsaree, P. I. Arvidsson. β -2-amino acids in the design of conformationally homogeneous cyclo-peptide scaffolds. Journal of Organic Chemistry (2006) 71, 6814-6821.

S. Kanokmedhakul, K. Kanokmedhakul, P. Nasomjai, K. Soyong, M. Isobe, P. Kongsaree, S. Prabpai, A. Suksamrarn. Antifungal Azaphilones from the Fungus *Chaetomium cupreum* CC3003. Journal of Natural Products (2006) 69(6), 891-895.

P. Seephonkai, P. Kongsaree, S. Prabpai, M. Isaka, Y. Thebtaranonth. Transformation of an Irregularly Bridged Epidithiodiketopiperazine to Trichodermamide A. Organic Letters (2006) 8(14), 3073-75.

การเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ

1. Palangpon Kongsaree. Crystal structure of dihydrofolate reductase from *Plasmodium vivax*: Pyrimethamine displacement linked with mutation-induced resistance. (Invited Speaker) Second Protein Research Network Symposium on "Proteins: Structure, Function, and Proteomics" Chulabhorn Research Institute Conference Center, 22-23 October, 2005
2. Puttapol Khongsuk & Palangpon Kongsaree. Structural studies of *Plasmodium vivax* DHFR (Oral presentation) Workshop on Synchrotron Protein Crystallography (Diffraction data and Phase Analyses) and Its Applications 20 - 23 กรกฎาคม 2549 ณ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอน อ.เมือง จ.นครราชสีมา
3. Puttapol Khongsuk & Palangpon Kongsaree. Structural investigation between *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase and WR99210 inhibitor (Poster presentation) First Annual Symposium of Protein Society of Thailand: Challenges in Protein Research in Thailand 24 - 25 ตุลาคม 2549 Chulabhorn Research Institute Conference Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok.
4. Palangpon Kongsaree. Drug resistance in malaria: structure of malarial dihydrofolate reductase and drug development. P. Kongsaree, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, Republic of China, 14 August, 2006.
5. Puttapol Khongsuk & Palangpon Kongsaree. Crystallization and Preliminary Structural Elucidation of *Plasmodium vivax* Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase (Oral Presentation) PERCH-CIC Congress V วันที่ 6 - 9 พฤษภาคม 2550 ณ Jomtien Palm Beach Resort Pattaya, Chonburi.

รายชื่อนักศึกษาที่เกี่ยวข้อง

นักศึกษาระดับปริญญาโทที่จบการศึกษา

Mr. Puttapol Khongsuk, M.Sc., Chemistry, Mahidol University, Research area: X-ray crystallographic analysis of *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase.

Miss Anothai Supanpong, M.Sc., Organic Chemistry, Mahidol University
Thesis title: Spectroscopic and X-ray crystallographic studies of metacycloprodigiosin complexed with DNA (เมษายน 2549)

Miss Kornkamon Kalapakornchai, M.Sc., Organic Chemistry, Mahidol University
Thesis title: Cassava linamarase in glucoside synthesis: enantioselectivity, non-aqueous synthesis, and enzyme immobilization (พฤศจิกายน 2549)

Miss Supreeya Cheewarat, M.Sc., Organic Chemistry, Mahidol University,
Thesis title: Investigation of bioactive compounds from *Phomopsis* spp., endophytic fungi of *Casuarina glauca* and *Stephanandra chinensis* (เมษายน 2549)

นักศึกษาระดับปริญญาเอกที่กำลังศึกษา

Mr. Puttapol Khongsuk, Ph.D. student in Organic Chemistry, Mahidol University,
Research area: X-ray crystallographic analysis of *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase

Miss Srisuda Trirakarn, Ph.D. candidate in Organic Chemistry, Mahidol University.
Research area: Cloning and expression of dihydrofolate reductase enzymes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*.

Miss Chariwat Samanchart, Ph.D. candidate in Organic Chemistry, Mahidol University, Research area: X-ray crystallographic analysis of *Pseudomonas stutzeri* D-phenylglycine aminotransferase

Mr. Samran Prabpai, Ph.D. student in Organic Chemistry, Mahidol University,
Research area: Bioactive compounds from microorganisms

นักศึกษาระดับปริญญาตรี

1. นางสาวเอมอร ทองเป็นใหญ่ สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) ปี 2549 ศึกษาต่อระดับปริญญาเอก สาขาเคมี ณ มหาวิทยาลัย Madison at Wisconsin, สหรัฐอเมริกา
2. นางสาวธัญญพร วงศ์เนตร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี (เกียรตินิยมอันดับสอง) ปี 2550 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล
3. นายพรวิทย์ อนันต์ทรัพย์ สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี ปี 2550 ได้รับรางวัลผลงานวิจัยระดับปริญญาตรี ประเภท Profession Vote อันดับสอง ในการแสดงผลงานวิจัยโครงการ IRPUS

การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ

1. ดร.อุบลศรี เลิศสกุลพานิช / ศ.ดร.ยงยุทธ ยุทธวงศ์ / ดร.เพ็ญจิตร จิตรนำทรัพย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
2. ศ.ดร.ชัชณัฐสร สวัสดิวัฒน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. ศ.น.พ.สุทัศน์ ฟูเจริญ ศูนย์วิจัยโรคธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา
4. Prof. Malcomb Walkinshaw, University of Edinburgh, UK
5. Prof. Per I. Arvidsson, Uppsala University, Sweden
6. Prof. Chun-Jung Chen, National Synchrotron Radiation Research Center, Taiwan
7. Prof. Chun-Cheng Lin, the National Tsing-Hua University, Taiwan.

ลงนาม

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลังพล คงเสรี)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ภาคผนวก

Crystal structures of wild-type and mutant dihydrofolate reductase from *Plasmodium vivax*:
Pyrimethamine displacement linked with mutation-induced resistance.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2005), 102, 13046-13051.

Crystal structure of dihydrofolate reductase from *Plasmodium vivax*: Pyrimethamine displacement linked with mutation-induced resistance

Palangpon Kongsaree[†], Puttapol Khongsuk[†], Ubolsree Leartsakulpanich[†], Penchit Chitnumsub[†],
Bongkoch Tarnchompoo[‡], Malcolm D. Walkinshaw[§], and Yongyuth Yuthavong^{†¶}

[†]Department of Chemistry and Center for Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand; [‡]BIOTEC, National Science and Technology Development Agency, 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand; and [§]Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, Kings Buildings, Mayfield Road, Edinburgh EH9 3JR, Scotland

Edited by Robert M. Stroud, University of California, San Francisco, CA, and approved July 22, 2005 (received for review March 3, 2005)

Pyrimethamine (Pyr) targets dihydrofolate reductase of *Plasmodium vivax* (PvDHFR) as well as other malarial parasites, but its use as antimalarial is hampered by the widespread high resistance. Comparison of the crystal structures of PvDHFR from wild-type and the Pyr-resistant (SP21, Ser-58 → Arg + Ser-117 → Asn) 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. These structural insights suggest a general approach for developing new generations of antimalarial DHFR inhibitors that, by only occupying substrate space of the active site, would retain binding affinity with the mutant enzymes.

drug resistance | malaria | antifolates

A major share of the global malaria burden, with an estimated 80 million cases annually, is caused by *Plasmodium vivax* (Pv) (1, 2). The problem has recently been worsened by emergence of resistance of the parasite to chloroquine (3–6). Pyrimethamine (Pyr) and other antifolates are generally not used against vivax malaria, because of the resistance of the parasite, which has commonly been considered to be inherent (7). It recently has been shown, however, that wild-type (WT) *P. vivax* dihydrofolate reductase (PvDHFR), the target of antifolates, is susceptible to inhibition by Pyr and other antifolates (8–11), whereas for the mutant parasites, of which the common one is the double mutant (SP21, Ser-58 → Arg + Ser-117 → Asn), the affinities for binding with the antifolates are much reduced, rendering them ineffective. A similar, but less severe, situation was shown for *Plasmodium falciparum* (Pf), in which the homologous double mutant (K1, Cys-59 → Arg + Ser-108 → Asn) PfDHFR has reduced affinities for the antifolates (12–14). In the case of *P. falciparum*, there was only a moderate reduction in affinity (50- to 90-fold) relative to the WT enzyme, and a moderate level of resistance ensued, which was augmented by further mutations at other sites (14–17). The crystal structures of the bifunctional enzyme dihydrofolate reductase (DHFR)-thymidylate synthase (TS) of *P. falciparum* (PfDHFR-TS) revealed basic structural features of Plasmodial DHFR-TS, including the insert regions and the junction region (18). Comparison of the structures of the WT and mutant forms of PfDHFR-TS demonstrates that Pyr is involved in steric conflict with the side chain of Asn-108, resulting in antifolate resistance (13, 19, 20). However, the steric conflict did not appear to result in major displacement of Pyr in the active site of *P. falciparum*. In contrast, analogous mutations in *P. vivax* resulted in relatively larger reduction in binding affinity of Pyr. Because the crystal structure of PvDHFR, either of the WT or the SP21 double-

mutant strain, had not been determined before, it was unclear how Pyr binds to the active site and how this binding is affected by the resistance mutations. Here, we report the structures of the 238-residue PvDHFR domain of the bifunctional PvDHFR-TS, of both the WT and double-mutant SP21, in complex with NADPH and inhibitor of either Pyr or Pyr20, an analog lacking the *p*-Cl atom. These structures allowed us to explore the relationship between the modes of drug binding and affinities to the active site, which are in turn linked with the levels of drug resistance. We show that, although the structures of the enzymes and the modes of binding are similar for both parasites, there are significant differences that explain the relatively higher effect of homologous mutations on PvDHFR on Pyr-binding affinity and generation of resistance. We show further that, unlike Pyr, Pyr20, which stays mainly in the confine of the space occupied by the substrate [dihydrofolate (DHF)], still largely retains its binding affinity to the mutant enzyme.

Materials and Methods

Protein Expression, Purification, and Crystallization. The protein expression and protein purification were carried out according to a protocol described in ref. 10. Briefly, *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS harboring pETPvDHFR was cultured in a LB broth with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ampicillin and 34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ chloramphenicol at 18°C with isopropyl β -D-thiogalactoside induction. The WT PvDHFR and SP21 double-mutant PvDHFR were purified by a single-step affinity chromatograph on a methotrexate-Sepharose column and eluted by a solution of 4 mM DHF in 20 mM *N*-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, and 10 mM DTT. The purified enzymes were desalted and concentrated to 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ by using a Centricon filter.

Before crystallization, a 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PvDHFR solution was mixed with 1 mM NADPH and 1 mM Pyr ($K_i = 0.16$ nM) and incubated overnight at 4°C. Suitable crystals of ternary PvDHFR–NADPH–inhibitor complexes were grown by the microbatch method (21) with a mixture of 1.5 μl of protein complex and the same volume of 30% polyethylene glycol 4000, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), and 10% glycerol. PvDHFR crystals grown under these conditions have the typical dimensions of $0.10 \times 0.15 \times 0.20$ mm and belong to the monoclinic space group C2. With one molecule of PvDHFR complex per asymmetric unit, the solvent content was 59%. Cocrystals of WT PvDHFR

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: DHF, dihydrofolate; DHFR, DHF reductase; Pf, *Plasmodium falciparum*; Pv, *Plasmodium vivax*; Pyr, pyrimethamine; rmsd, rms deviation; TS, thymidylate synthase.

Data deposition: The atomic coordinates have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID codes 2bl9, 2blb, 2bla, and 2blc).

[¶]To whom correspondence should be addressed. E-mail: yongyuth@biotec.or.th.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA