

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2545

การออกแบบและการสังเคราะห์โมเลกุลใหม่ที่สามารถตัด
โปรตีนโดยใช้ปฏิกิริยาทางแสง :
การศึกษาถึงผลของหมู่ไอออนิกที่ปลายของโมเลกุลต่อ
ประสิทธิภาพการจับและตัดโปรตีน

Design and synthesis of new protein photocleaving reagent :
role of ionic group in the probe side chain on the binding affinity
and the photocleavage of proteins

541.22
อ253ก

อภิญญา ชัยวิสุทธิทางกูร

Challa V. Kumar

มะยูโซ๊ะ กูโน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 วัฒนา กรุงเทพฯ 10110 โทร. 2584002-3



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนการวิจัย
จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2545

การออกแบบและการสังเคราะห์โมเลกุลใหม่ที่สามารถตัด
โปรตีนโดยใช้ปฏิกิริยาทางแสง:
การศึกษาถึงผลของหมู่ไอออนิกที่ปลายของโมเลกุลต่อ
ประสิทธิภาพการจับและตัดโปรตีน

Design and synthesis of new protein photocleaving
reagent: Role of ionic group in the probe side chain on the
binding affinity and the photocleavage of proteins

541.22
อ253ก

อภิญญา ชัยวิสุทธิทางกูร

Challa V. Kumar

มะยุไช้ะ กูโน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 วัฒนา กรุงเทพฯ 10110 โทร. 2584002-3



กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนให้ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2545 และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2545



บทคัดย่อ

โมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่คือ L-phenylalanine-1(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-L-Phe) ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันสองหมู่คือ กรดอะมิโน และหมู่ไพรีน โดยมีส่วนปลายสุดเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) จากการศึกษาโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี ได้แก่ absorption, fluorescence และ circular dichroism พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมของโมเลกุลนี้เมื่อมีการจับกับโปรตีน โดยมีค่าคงที่การจับ (K_b) เท่ากับ 3.3×10^5 และ $7.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ เมื่อจับกับ BSA และ lysozyme ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงนี้แสดงถึงปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลสังเคราะห์นี้กับโปรตีนในบริเวณที่มีการจับ (binding site) การคายแสงของ PMA-Phe จะเพิ่มขึ้นเมื่อจับกับ BSA ในขณะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อจับกับ lysozyme จากการศึกษาการยับยั้งการคายแสงของ PMA-Phe โดยใช้ hexamine cobalt(III) chloride (CoHA) เป็นตัวดับยั้ง (quencher) พบว่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการคายแสงไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อ PMA-Phe จับกับโปรตีนเมื่อเทียบกับไม่มีโปรตีน

Abstract

A new probe, L-phenylalanine-1(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-L-Phe) carrying a free amino terminus was synthesized. Spectroscopic studies, such as absorption, fluorescence, and circular dichroism spectroscopy, indicated the strong binding interactions of the probes with the target proteins. PMA-Phe binds to proteins, lysozyme and bovine serum albumin (BSA), with binding affinity constants (K_b) of 3.3×10^5 and $7.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectively. The fluorescence intensity of PMA-Phe is dramatically enhanced by the addition of BSA with 1 nm-red shift. In contrast, the fluorescence spectra of PMA-Phe in the presence of increasing concentrations of lysozyme indicate weak quenching of the pyrenyl fluorescence by the protein. The fluorescence quenching of PMA-Phe by hexamine cobalt(III) chloride (CoHA), recorded in the absence and presence of BSA or lysozyme, results in almost the same quenching constant.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	
การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ	4
วิธีการทดลอง	
การสังเคราะห์ L-phenylalanine-1(1-pyrene)-3-methylamide	9
การศึกษาถึงการจับกับโปรตีนโดยใช้ UV-Vis spectrophotometer	10
การศึกษาถึงการจับกับโปรตีนโดยใช้ CD spectropolarimeter	10
การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching)	10
ผลการทดลอง	
การสังเคราะห์ L-phenylalanine-1(1-pyrene)-3-methylamide	12
การศึกษาถึงการจับกับโปรตีนโดยใช้ UV-Vis spectrophotometer	12
การศึกษาถึงการจับกับโปรตีนโดยใช้ CD spectropolarimeter	13
การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching)	13
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	15
เอกสารอ้างอิง	17

บทนำ



ในปัจจุบันนี้ สารเคมีที่สามารถใช้ตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะมีน้อยมาก เนื่องจากพันธะเปปไทด์มีความเสถียรสูง (half life ~7 ปี ที่ 25 °C, pH 7)¹ ในทางตรงกันข้าม สารเคมีที่สามารถตัด DNA ได้นั้นมีการค้นพบกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการสังเคราะห์สารเคมีชนิดใหม่ที่มีขนาดเล็ก และสามารถทำหน้าที่แทนเอนไซม์ในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะได้ นอกจากการตัดโปรตีนหรือเปปไทด์ขนาดใหญ่ให้เล็กลงเพื่อเป็นประโยชน์ในการหาลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequencing) แล้ว โมเลกุลเหล่านี้ยังสามารถทำหน้าที่เป็น probe ในการศึกษาถึงโครงสร้างของโปรตีน (protein structural domains) และความสัมพันธ์ของ activity กับโครงสร้างของโปรตีน รวมทั้งการศึกษาถึงปฏิกิริยาของโมเลกุลขนาดเล็กในการเลือกจับกับโปรตีน ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการออกแบบและผลิตยาชนิดใหม่ได้ในอนาคต²⁻¹⁰

โมเลกุลเหล่านี้เมื่อจับกับโปรตีนแล้วสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ 2 ทาง คือ ปฏิกิริยาทางความร้อน (thermal reaction) และปฏิกิริยาทางแสง (photoreaction) ในการออกแบบโมเลกุล อาจทำได้โดยการสร้างโมเลกุลที่มีความจดจำอย่างจำเพาะต่อ binding site ของโปรตีน⁵⁻¹⁰ หรืออาจนำโมเลกุลไปเชื่อมติดกับกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งของโปรตีน¹¹⁻¹² ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนที่มี trifluoperazine (TFE) ต่อกับ iron(II)ethylenediamine (Fe(EDTA)) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน TFE-Fe(EDTA) เพื่อใช้ในการจับกับ calmodulin¹⁰ เนื่องจาก TFE สามารถจับกับ calmodulin ได้ที่ตำแหน่งจำเพาะ ดังนั้น TFE จะพาสารประกอบเชิงซ้อนนี้ไปที่ binding site ของ TFE ใน calmodulin จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนจะถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาโดยการเติม reducing agent และ H₂O₂ โดยกลไกของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบออกซิเดชัน (oxidative mechanism) โดยเกิด hydroxyl radicals (OH•) ซึ่งเป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนและทำให้เกิดการแตกของพันธะเปปไทด์ จากการทดลองพบว่า calmodulin ถูกตัดได้ 6 เปปไทด์ย่อย แต่วิธีนี้มักได้ผลผลิตของเปปไทด์ที่ถูกตัดในปริมาณที่ต่ำ

ตัวอย่างการออกแบบโมเลกุลอีกวิธีหนึ่งคือ การนำสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe³⁺ เชื่อมติดกับกรดอะมิโน cysteine-34 ของ bovine serum albumin (BSA)¹¹ พบว่า BSA ถูกตัดในบริเวณที่มีสารประกอบเชิงซ้อนติดอยู่ โดยอาศัยกลไกของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการตัด calmodulin และได้มีการนำวิธีเดียวกันนี้มาศึกษาถึงโครงสร้าง (conformation) ของ staphylococcal nuclease¹² โดยเชื่อมสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe(EDTA-2-aminoethyl)-2-pyridyl disulfide (EPD-Fe) เข้ากับ cysteine สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็นตัวสำคัญในการกำหนดบริเวณที่โปรตีนถูกตัด เช่น การใช้ SDS หรือ denaturing reagent และบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ พบว่าบริเวณที่ถูกตัดจะขึ้นกับโครงสร้างของโปรตีนที่สภาวะนั้น ซึ่งสามารถนำหลักการนี้ไปประยุกต์ใช้

ในการศึกษาถึงตัวกลางที่เกิดในสมดุลของการ folding (equilibrium folding intermediates) ของโปรตีนได้ แต่การดัดแปลงโปรตีนที่กรดอะมิโนจำเพาะจะทำได้ยาก

การใช้แสงเป็นเสมือนสารเคมีตัวหนึ่งในปฏิกิริยามีประโยชน์คือ นอกจากจะสะดวกในการใช้และราคาไม่แพงแล้ว ปฏิกิริยาสามารถควบคุมได้ง่าย (sharp control) โดยการเปิดและปิดแสง และลดสารตั้งต้นตัวหนึ่งในการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้การเลือกความยาวคลื่นที่จำเพาะในการกระตุ้นโมเลกุลให้เกิดปฏิกิริยา จะช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ ตัวอย่างงานที่มีการใช้แสงในการตัดโปรตีนคือ การใช้ vanadate ในการหา binding site สำหรับฟอสเฟต (phosphate) ในโปรตีน¹³⁻¹⁶ (phosphate binding protein เช่น myosin light chain kinase) โดย vanadate มีประจุเหมือนฟอสเฟต จึงเกิดการแข่งที่จะจับกับโปรตีน หลังจากที่ vanadate ได้รับพลังงานจากแสง (ที่ 366 nm) พันธะเปปไทด์หลังหมู่ serine ในโปรตีนจะถูกตัด ถึงแม้ว่าการตัดจะจำเพาะที่ serine แต่พบว่าการตัดที่กรดอะมิโนตัวอื่นด้วย นอกจากนี้ vanadate จะอยู่ในรูปสมดุลของโอลิโกเมอร์ (oligomers) ทำให้ยากในการศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยา และเนื่องจาก vanadate มี absorption extinction coefficient ที่ต่ำ (ที่ >320 nm) จึงต้องใช้ความเข้มข้นสูงในการดูดกลืนแสงให้เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี และการประยุกต์ใช้กับโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่จับกับฟอสเฟตเป็นไปได้อย่างจำกัด ดังนั้นการพัฒนาเพื่อหาโมเลกุลใหม่ที่สามารถจับกับโปรตีนได้ดีและสามารถตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงจึงได้รับความสนใจ

การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ

รายงานในระยะแรกได้มีการนำอนุพันธ์ของไพรีน คือ 4(1-pyrenyl)butyramine chloride (PBAC) (Chart 1) มาศึกษาการจับกับโปรตีน เช่น BSA lactoglobulin และ calmodulin พบว่า PBAC จับกับโปรตีนด้วย binding constant ที่สูง¹⁸ โดยการจับของ PBAC จะเลือกจับตรงบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่อยู่ใกล้กับหมู่ที่มีประจุ (ionic) ในโปรตีน ซึ่งจะทำให้การเลือกจับมีความจำเพาะกว่าการจับตรงบริเวณหมู่ที่ไม่ชอบน้ำเพียงอย่างเดียว หรือการจับตรงบริเวณที่มีหมู่ ionic เพียงอย่างเดียว

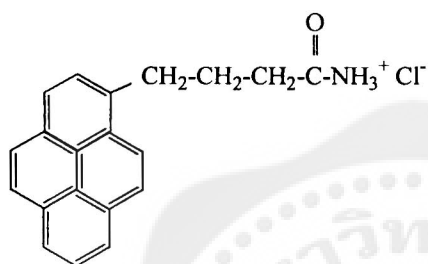


Chart 1 โครงสร้างของ 4(1-pyrenyl)butyramine chloride (PBAC)

การใช้ไพรีนมีข้อดีหลายประการ คือ 1) ไพรีนมี absorption extinction coefficient (>320 nm) ที่สูง ดังนั้นจึงสามารถใช้ความเข้มข้นน้อยในการรับแสงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา 2) ไพรีนที่สภาวะกระตุ้น (pyrene singlet excited state) จะมีช่วงเวลายาว (~ 200 ns) ก่อนที่จะกลับสู่สภาวะพื้น (ground state) และมีพลังงานสูง (~ 70 kcal/mol) ทำให้มีโอกาสในการก่อให้เกิดปฏิกิริยาทางแสงได้มาก (ปกติโมเลกุลที่มีช่วงเวลานี้สั้นและพลังงานต่ำจะกลับสู่ ground state อย่างรวดเร็วโดยไม่เกิดปฏิกิริยาใด) 3) เนื่องจากไพรีนดูดกลืนแสงและคายพลังงานแสงด้วยความเข้มสูง เราสามารถใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปีในการติดตามปฏิกิริยาได้ และ 4) สามารถใช้เทคนิคทาง flash photolysis ในการหา intermediate ที่เกิดขึ้น เพื่อศึกษาถึงกลไกการตัดโปรตีนได้

จากนั้นได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพรีนโมเลกุลใหม่ที่มีหมู่ที่จดจำอย่างจำเพาะ (recognition element) ซึ่งจะเป็นตัวที่พาโมเลกุลไปที่ตำแหน่งจำเพาะในโปรตีน โดยการเชื่อมปลายด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) ของ L-phenylalanine เข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของ 4-(1-pyrenyl)butyric acid เกิดเป็น N-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene)butyramide หรือเรียกย่อว่า Py-Phe (Chart 2)^{19,20}

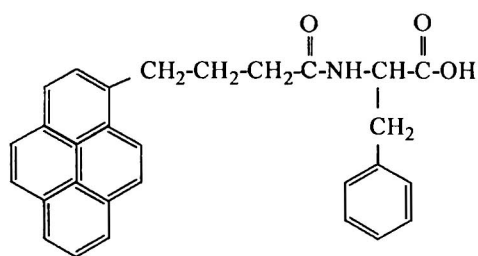


Chart 2 โครงสร้างของ N-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene)butyramide (Py-Phe)

จากการใช้โปรตีนตัวอย่าง คือ BSA และ lysozyme พบว่า Py-Phe สามารถจับกับ BSA และ lysozyme ด้วยค่าคงที่ของการจับ (binding constant) สูงถึง $6.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ และ $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ตามลำดับ²⁰ นอกจากนี้การศึกษาทางสเปกโตรสโคปี พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ของ Py-Phe เมื่อจับกับ BSA ในบัฟเฟอร์ จะเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งไปที่ความยาวคลื่นสูงขึ้น (red shift) ถึง 4 nm (λ_{max} ที่ 343 nm เป็น 347 nm) ซึ่งการเกิด red shift ของ Py-Phe นี้ พบว่าสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อละลาย Py-Phe ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น benzene นอกจากนี้ยังพบว่าการคายแสง fluorescence ของ Py-Phe จะลดลงเมื่อ Py-Phe จับกับ BSA และมี peak ใหม่เกิดขึ้น²¹ ($\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$) ซึ่งเป็น fluorescence ของ exciplex โดยเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไพรีนที่สภาวะกระตุ้น กับ tryptophan ใน BSA

การใช้ Hexamine cobalt(III) trichloride (CoHA) หรือ potassium iodide (KI) ในการยับยั้งการคายแสงของ Py-Phe (fluorescence quenching) เพื่อศึกษาความสามารถของ CoHA หรือ KI ในการเข้าถึง Py-Phe ขณะจับกับ BSA โดยเทียบกับความสามารถในการเข้าถึง Py-Phe อิสระในบัฟเฟอร์พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการคายแสงจะลดลงถึง 90 % แสดงให้เห็นว่า Py-Phe จะจับกับโปรตีนในลักษณะฝังหมู่ไพรีนตรงบริเวณที่เป็น hydrophobic ในโปรตีน ทำให้ CoHA ซึ่งอยู่ในบัฟเฟอร์ไม่สามารถเข้าถึงได้²⁰⁻²¹

นอกจากนี้ อะตอมคาร์บอนในตำแหน่งอัลฟา (α -carbon) ของกรดอะมิโนเป็นอะตอมคาร์บอนที่ไม่สมมาตร (asymmetric carbon atom) หรือเรียกว่า chiral carbon ดังนั้นกรดอะมิโนทุกตัวยกเว้นไกลซีนจะมีสัญญาณของ circular dichroism (CD) และหมู่ chiral carbon ของกรดอะมิโนยังสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้หมู่ไพรีนแสดงสัญญาณ CD ในช่วงความยาวคลื่นที่หมู่ไพรีนดูดกลืนแสงได้ (320-370 nm) พบว่าขณะจับกับโปรตีน CD spectrum ของ Py-Phe มีการเปลี่ยนแปลง จากข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่ได้บอกถึงการเปลี่ยนแปลงสภาวะรอบๆ หมู่ไพรีนจากบริเวณที่ชอบน้ำไปยังบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ นอกจากนี้ ยังพบว่า chirality ของ probe มีผลต่อการจับกับโปรตีน โดย L-isomer ของ Py-Phe (Py-L-Phe) จับกับ BSA ได้ดีกว่า D-isomer ของ

Py-Phe (Py-D-Phe) ถึง 100 เท่า แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของหมู่ chiral บนกรดอะมิโนต่อการจดจำจำเพาะในการจับโปรตีน²²⁻²³

การตัดโปรตีนเกิดขึ้นได้เมื่อนายแสงที่มีความยาวคลื่น 344 nm ($\lambda_{\max}$ ของ Py-Phe) ไปยังสารละลายผสมของโปรตีน Py-Phe และ CoHA ซึ่ง CoHA ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) จากไพรีนที่สภาวะกระตุ้น (Py^*) การแยกเปปไทด์ที่ได้จากการตัดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และการหาลำดับกรดอะมิโน พบว่า BSA ถูกตัดระหว่าง Leu 348 และ Arg 349 ในขณะที่ lysozyme ถูกตัดระหว่าง Val 108 และ Trp 109 โดยการตัดจะไม่เกิดขึ้นถ้าขาดสารตั้งต้นตัวใดตัวหนึ่งหรือขาดแสง¹⁹⁻²¹ การศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยาโดยเทคนิคทาง Flash photolysis พบว่าเกิดอนุมูลประจุบวกของไพรีน (pyrene cation radical; Py^+) เป็น intermediate หลังจาก CoHA รับอิเล็กตรอนจาก Py^* ซึ่ง Py^+ สามารถดึงอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom abstraction) บนคาร์บอนตำแหน่งอัลฟาของกรดอะมิโนในโปรตีน ซึ่งก่อให้เกิดการสลาย (hydrolysis) ของพันธะเปปไทด์¹⁹⁻²⁰

ต่อมาได้มีการใช้กรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้น (di- และ tripeptide) ตัวอื่น เช่น glycine, L-tryptophan, L-tyrosine และ L-histidine ต่อเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของ 4(1-pyrene)butyric acid แทน L-phenylalanine²⁴ พบว่าโปรตีนจะไม่ถูกตัดเมื่อใช้โมเลกุลที่มี Trp และ Tyr การศึกษาทาง flash photolysis แสดงถึงการยับยั้งการเกิด Py^+ จาก Py^* โดย Trp และ Tyr (intramolecular quenching) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงอิทธิพลของความยาวของโมเลกุลต่อการตัดโปรตีน โดยนำ glycine มาขึ้นระหว่าง 4(1-pyrene)butyric acid กับ L-phenylalanine ($\text{Py}-(\text{Gly})_n\text{-Phe}$; $n=0, 1, 2$) พบว่าความยาวของโมเลกุลไม่ช่วยให้การตัดโปรตีนดีขึ้น ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนลดลงเมื่อโมเลกุลมีความยาวเพิ่มขึ้น²¹

เมื่อใช้เทคนิคทาง molecular modeling โดยใช้ x-ray crystal structure ของ lysozyme พบว่ามีหมู่ arginine อยู่ใกล้กับตำแหน่งที่ lysozyme ถูกตัด ทำให้ได้สมมติฐานว่า อาจเกิดการจับแบบ salt bridge ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ phenylalanine (บน Py-Phe) กับประจุบวกของ lysine (บน lysozyme) จึงได้มีการใช้ C-methyl ester ของ Py-Phe แทน Py-Phe เพื่อทดสอบสมมติฐานเบื้องต้น พบว่า lysozyme ไม่ถูกตัด²⁰ จากผลการทดลองนี้ ทำให้ได้ข้อสรุปว่า ขั้วที่ปลายโมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีนมีความสำคัญในการจับกับโปรตีน จึงเป็นที่มาของสมมติฐานใหม่ว่า การกลับขั้วที่ปลายของโมเลกุล Py-Phe จากขั้วลบเป็นขั้วบวก โดยให้ปลายของอนุพันธ์ไพรีนเป็นหมู่อะมิโนของ phenylalanine แทนหมู่คาร์บอกซิล จากนั้นจะนำโมเลกุลที่สังเคราะห์ใหม่นี้ไปศึกษาถึงการจับกับโปรตีนโดยวิธีทางสเปกโตรสโคปี ซึ่งอาจก่อให้เกิดโมเลกุลใหม่ที่มีความจำเพาะในตำแหน่งที่ต่างออกไป และอาจจะทำให้เกิดการตัดของโปรตีนที่จำเพาะในตำแหน่งอื่น โดยติดตามผลด้วยการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และการหาลำดับกรดอะมิโน

โครงสร้างของโปรตีนบริเวณที่ถูกตัดจะถูกศึกษาโดยการสร้างโครงสร้างสามมิติของอนุพันธ์ไฟรีน และบริเวณ binding site ของโปรตีนที่สนใจโดยใช้ molecular modeling แล้วทำการปรับโครงสร้าง (optimize) ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัม จากนั้นจึงนำผลที่ได้มาพิจารณาถึงปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ไฟรีนกับโปรตีน เพื่อนำไปสู่การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนและกลไกการจับกับโปรตีนต่อไป ซึ่งได้กล่าวไว้แล้วในข้างต้น



วิธีการทดลอง



แผนการดำเนินการทดลองโดยรวมของการวิจัยนี้มีดังนี้

1. การสังเคราะห์ L-phenylalanine-1(1-pyrene)-3-methylamide
2. การศึกษาถึงการจับ (binding) กับโปรตีนโดยวิธีทางสเปคโตรสโคปี
3. การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching) โดยใช้ quencher เช่น

hexamine cobalt(III) trichloride (CoHA)

1. การสังเคราะห์ L-phenylalanine-1(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-Phe)

การสังเคราะห์ขั้นที่ 1

นำ 4(1-Pyrenyl)methylamine chloride (PMAC) (Sigma) ไปทำปฏิกิริยากับ N-t-Boc-L-phenylalanine (Sigma) โดยนำ PMAC (9.4 mg; 3.03×10^{-5} mol) และ N-t-Boc-L-phenylalanine (19.7 mg; 7.43×10^{-5} mol) มาละลายใน acetonitrile/ CH_2Cl_2 ปริมาตร 6 cm^3 จากนั้นจึงเติม Dicyclohexyl carbodiimide (DCC) (41.4 mg; 2.03×10^{-4} mol) และ 5% (w/v) sodiumbicarbonate (ละลายใน 80% acetonitrile/water) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.15 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ TLC (ใช้ CHCl_3 / Methanol เป็นตัวชะ) ทุกๆ ชั่วโมง เมื่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ไม่เกิดขึ้นจึงเติมน้ำ (7 cm^3) เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วทำการสกัดผลิตภัณฑ์ด้วย CH_2Cl_2 นำชั้น CH_2Cl_2 ที่ได้มารวมกันแล้วนำไปกำจัดน้ำโดยใช้ MgSO_4 anhydrous และระเหย ether จนแห้งภายใต้ความดัน

นำสารที่ได้ซึ่งเป็น N-t-Boc-L-phenylalanine-4(1-pyrene)methylamine chloride มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ column chromatography ใช้ silica gel เป็น stationary phase และใช้ตัวทำละลายผสมของ CHCl_3 / Methanol เป็นตัวชะ จากนั้นนำสารบริสุทธิ์มาตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้ UV, Fluorescence, IR และ NMR พบว่าข้อมูลทาง spectroscopy สอดคล้องกับโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ขั้นที่ 1

การสังเคราะห์ขั้นที่ 2

นำสารที่ได้มาทำการละลายหมู่ t-Boc ให้เกิดเป็น PMA-Phe โดยละลายสารที่ได้ใน 50% TFA/ CH_2Cl_2 + 5% triisopropylsilane คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยใช้ TLC พบว่าได้ PMA-Phe บริสุทธิ์ (16.6 mg) นำสารที่ได้มาตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้ UV, Fluorescence, IR และ NMR พบว่าข้อมูลทาง spectroscopy สอดคล้องกับโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ขั้นที่ 2

8

2. การศึกษาถึงการจับ (binding) กับโปรตีนโดยใช้ UV-Vis spectrophotometer

ทำได้โดยการเติมสารละลายโปรตีน (ความเข้มข้น 0-10 μM) ลงในสารละลาย PMA-Phe (2 μM) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 จากนั้นนำค่า absorbance ของ probe ที่ได้จาก λ_{max} ที่แต่ละความเข้มข้นของโปรตีน มาคำนวณหา binding constant²¹ จากสมการของ Scatchard

$$\text{Scatchard equation: } r/C_f = (n-r)/K$$

โดย r = อัตราส่วน ความเข้มข้นของ bound probe ต่อความเข้มข้นของโปรตีน ($C_b / [\text{protein}]$)

C_f = ความเข้มข้นของ free probe

n = จำนวน binding site

K = binding constant

3. การศึกษาถึงการจับ (binding) กับโปรตีนโดยใช้ CD spectropolarimeter

ทำได้โดยการเตรียมสารละลายผสมของโปรตีน (50 μM) และ PMA-Phe (30 μM) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 จากนั้นนำไป scan (300-400 nm) โดยใช้เครื่อง CD spectropolarimeter (Jasco-710, ด้วยความอนุเคราะห์ของ Professor Dr. Challa V. Kumar, Department of Chemistry, University of Connecticut, USA) เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ CD ระหว่างสารละลาย PMA-Phe ที่มีและไม่มีการจับกับโปรตีน

4. การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching)

การศึกษาถึงผลต่อ fluorescence ของ PMA-Phe (2 μM) ขณะจับอยู่กับโปรตีน (10 μM) จะทำได้โดยการ titration สารละลายผสมของ PMA-Phe กับโปรตีนด้วย quencher (hexamine cobalt(III) trichloride, CoHA) (0-1 mM) โดยวัดความเข้มแสง fluorescence ของ PMA-Phe ที่ λ_{max} ที่แต่ละความเข้มข้นของ CoHA จากนั้นนำมาคำนวณหา quenching constant จากสมการของ Stern-Volmer²¹ เปรียบเทียบกับ PMA-Phe อิสระ

$$\text{Stern-Volmer equation: } I_0 / I = 1 + K_{sv} [Q]$$

โดย I_0 และ I = ความเข้มแสง fluorescence ของ Probe ก่อนและหลังเติม CoHA ตามลำดับ

K_{sv} = Stern-Volmer quenching constant

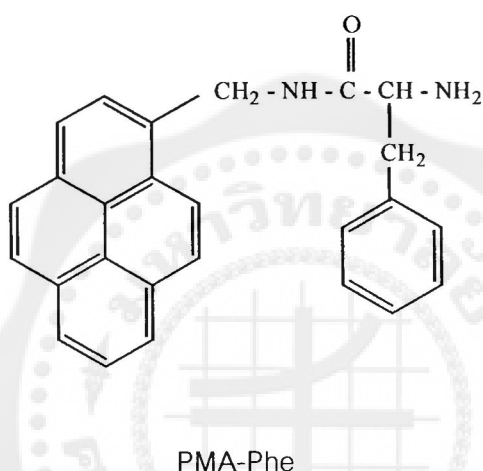
$[Q]$ = ความเข้มข้นของ quencher

ผลการทดลอง



1. การสังเคราะห์ L-phenylalanine-1(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-Phe)

จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี พบว่าอนุพันธ์ไพรีนที่สังเคราะห์ได้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (ในช่วงความยาวคลื่น 300-400 nm) ที่ 342 nm และการคายแสงสูงสุดที่ 377 nm (Ex. WL. = 342 nm) ข้อมูลจาก ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 7.9-8.3 ppm (9H), 7.2-7.3 ppm (5H), 5.2 ppm (2H), 4.0 ppm (1H), 3.7 ppm (1H), 2.0 ppm (2H), 1.7 ppm (2H) ข้อมูลจาก MS (FAB): m/e 758 (2MH^+) ได้อนุพันธ์ไพรีนที่มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1

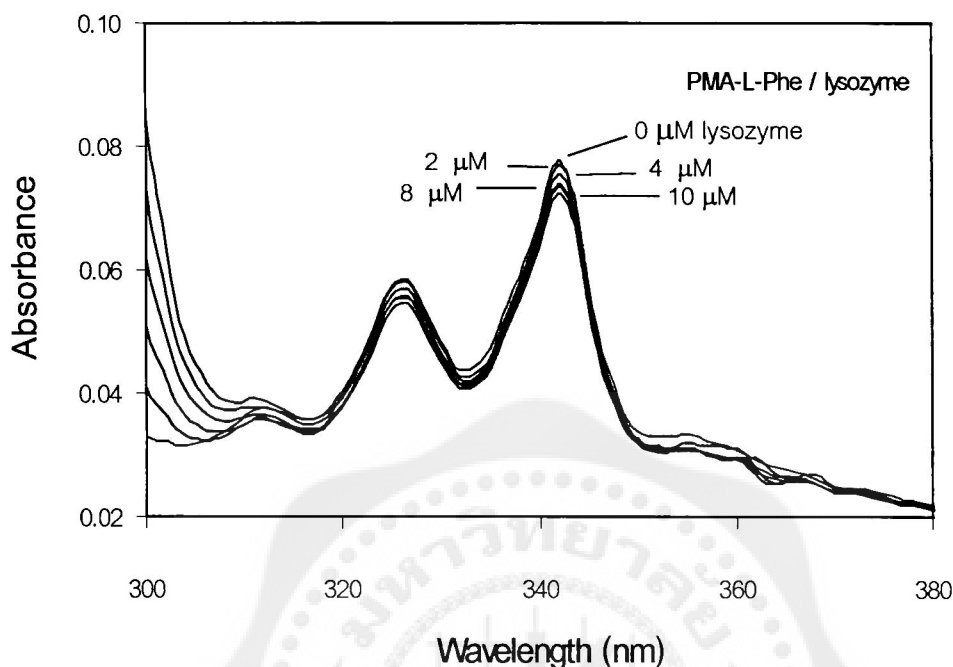


รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ PMA-Phe

2. การศึกษาถึงการจับ (binding) กับโปรตีน

พบว่าเมื่อ PMA-Phe จับกับ BSA จะทำให้เกิด red shift ประมาณ 2 nm ของ Absorption spectrum โดยมี isosbestic point ที่ความยาวคลื่น 338 และ 342.5 nm พร้อมทั้งเกิด hyperchromism ของสเปกตรัมขึ้น แต่เมื่อ PMA-Phe จับกับ lysozyme พบว่าเกิด hyperchromism (1.1% ที่ความยาวคลื่น 342 nm) ของสเปกตรัมขึ้นเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 2)

จากการคำนวณโดยใช้ Scatchard equation ได้ค่า binding constant เท่ากับ $3.3 \pm 0.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ สำหรับ PMA-Phe/lysozyme และ $7.8 \pm 0.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ สำหรับ PMA-Phe/BSA



รูปที่ 2 Absorption spectrum ของ PMA-Phe เมื่อจับกับ lysozyme

3. การศึกษาถึงการจับ (binding) กับโปรตีนโดยใช้ CD spectropolarimeter

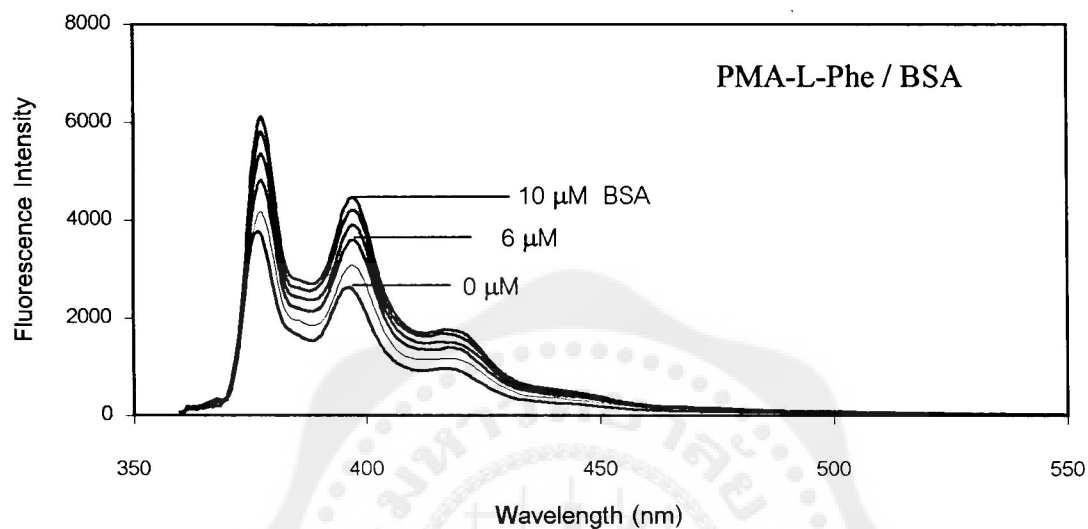
จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคทาง circular dichroism spectroscopy พบ peak ในสเปกตรัมของ PMA-Phe เป็น (-) 326 และ (-) 342 nm เมื่อละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ และเมื่อจับกับ BSA หรือ lysozyme พบว่า CD สเปกตรัมของ PMA-Phe ไม่มีการเปลี่ยนตำแหน่งของ peak

4. การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching)

การศึกษาถึงผลต่อ fluorescence ของ PMA-Phe ($0.7 \mu\text{M}$) ขณะจับอยู่กับโปรตีน ($0-10 \mu\text{M}$) พบว่า lysozyme ยับยั้งการคายแสงของ PMA-Phe น้อยมาก ในขณะที่ BSA ยับยั้งการคายแสงของ PMA-Phe ได้มากกว่า และมีการเกิด red shift 1 nm (รูปที่ 3)

จากการศึกษาการยับยั้งการคายแสงของ probe โดยใช้ hexamine cobalt(III) chloride (CoHA) เป็นตัวยับยั้ง (quencher) เพื่อดูความสามารถของ CoHA ในการเข้าถึง PMA-Phe ขณะจับกับโปรตีน โดยเทียบกับความสามารถของ CoHA ในการเข้าถึง PMA-Phe อิสระใน

บัฟเฟอร์ พบว่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการคายแสงเมื่อ PMA-Phe จับกับ BSA หรือ lysozyme ไม่แตกต่างจากของ PMA-Phe อิสระ โดยค่า K_{sv} ที่คำนวณได้มีค่าใกล้เคียงกัน



รูปที่ 3 Fluorescence spectrum ของ PMA-Phe เมื่อจับกับ BSA

**สรุปและอภิปราย
ผลการทดลอง**

จากการศึกษาทางสเปกโตรสโคปีโดยใช้โปรตีนตัวอย่าง คือ bovine serum albumin (BSA) และ lysozyme พบว่า PMA-Phe สามารถจับกับ BSA และ lysozyme ด้วยค่าคงที่การจับ (binding constant) ที่สูงถึง $7.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ และ $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ตามลำดับ สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ PMA-Phe เมื่อจับกับ BSA จะเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่มีความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น ในขณะที่สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ PMA-Phe แทบจะไม่มีเปลี่ยนแปลงเมื่อจับกับ lysozyme ซึ่งการเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่มีความยาวคลื่นเพิ่มขึ้นนี้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสภาพรอบๆ หมู่ไพริน แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้น้อยกว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากที่มีการศึกษาโดยใช้ Py-Phe เป็น probe²⁰⁻²¹ (ซึ่ง Py-Phe มีหมู่คาร์บอกซิลอยู่ที่ปลายของโมเลกุล)

จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคทาง circular dichroism spectroscopy และการยับยั้งการคายแสงของ PMA-Phe (fluorescence quenching) โดยใช้ CoHA เป็นตัวยับยั้ง (quencher) ไม่พบการเปลี่ยนตำแหน่งของ peak ใน CD spectrum ของ PMA-Phe เมื่อจับกับโปรตีนทั้งสองชนิด และประสิทธิภาพของการยับยั้งการคายแสงไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อ PMA-Phe จับกับโปรตีน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า การจับของ PMA-Phe กับโปรตีนทั้งสองชนิดอาจมีลักษณะการจับที่บริเวณใกล้เคียงด้านนอกของโปรตีนที่สัมผัสกับบัฟเฟอร์ จึงมีคุณสมบัติไม่แตกต่างจาก Py-Phe อี絲ะมากนัก

เอกสารอ้างอิง



1. Kahne, D. C., Skill, W. C. Hydrolysis of peptide bond in neutral water *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 7529
1. Zhu, L., Qin, L., Parac, T. N., Kostic, N. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 5218
2. Hegg, E. L., Burstyn, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 7015
3. Hegg, E. L., Burstyn, J. N. *Coord. Chem. Rev.* 1998, 173, 133
4. Rana, T. M., Meares, C. F. Iron chelate mediated proteolysis: Protein structure dependence *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 1859; Rana, T. M., Meares, C. F. Specific cleavage of a protein by an attached iron chelate *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 2457
5. Ghaim, J. B., Greiner, D. P., Meares, C. F., Gennis, R. B. Proximity mapping the surface of a membrane protein using an artificial protease *Biochemistry* 1995, 34, 11311
6. Ettner, N., Metzger, J. W., Lederer, T., Hulmes, J. D., Kisker, C., Hinrichs, W., Ellestad, G., Hillen, W. Proximity mapping of the Tet repressor-tetracycline-Fe²⁺ complex by hydrogen peroxide mediated protein cleavage *Biochemistry* 1995, 34, 22
7. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Cho, A., Chaudhari, A. Artificial Metallopeptidases: Regioselective Cleavage of Lysozyme *Chem. Comm.* 2000, 597
8. Buranaprapuk, A., Leach, S. P., Kumar, C. V., Bocarsly, J. Protein Cleavage by Transition Metal Complexes Bearing Amino Acid Substituents *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998, 1387, 309
9. Schepartz, A., Cuenoud, B. Site-specific cleavage of the protein calmodulin using a Trifluoperazine-based affinity reagent *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 3247
10. Cuenoud, B., Tarasow, T. M., Schepartz, A. A new strategy for directed protein cleavage *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 895
11. Ermacora, M. R., Ledman, D. W., Hellinga, H. W., Hsu, G. W., Fox, R. O. Mapping staphylococcal nuclease conformation using an EDTA-Fe derivative attached to genetically engineered cysteine residues *Biochemistry* 1994, 33, 13625
12. Maruta, S., Mitsuhashi, S., Yamada, M., Ikeke, M. ADP/vanadate mediated photocleavage of myosin light chain kinase at the autoinhibitory region *J. Biochem. (Tokyo)* 1998, 128, 557

13. Correia, J. J., Lipscomb, L. D., Dabrowiak, J. C., Isern, N., Zubieta, J. Cleavage of tublin by vanadate ion *Arch. Biochem. And Biophys.* 1994, 309, 94
14. Crans, D. C., Sudhakar, K. Zamborelli, T. Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions *Biochemistry* 1992, 31, 6812
15. Cremo, C. R., Loo, J. A., Edmonds, C. G., Hatlelid, K. M. Vanadate catalyzes photocleavage of adenylate kinase at proline-17 in the phosphate-binding loop *Biochemistry* 1992, 31, 491; Cremo, C. R., Long, G. T., Grammer, J. C. Photocleavage of myosin subfragment 1 by vanadate *Biochemistry* 1990, 29, 7982
16. Shrivastana, H. Y., Kanthimathi, M., Nair, B. U. Interaction of Schiff base with bovine serum albumin: Site-specific photocleavage *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 265, 311
17. Kumar, C. V., Tolosa, L. M. Interaction of hydrophobic probes with serum albumin- Influence of the side chain and exciplex formation at the binding site *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 13914; Kumar, C. V., Tolosa, L. M. The role of the side chain, charge, and hydrophobicity on the protein binding affinity of simple fluorescent molecules *FASEB J.* 1993, 7, A1131
18. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A. Site-Specific Photocleavage of Proteins *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997, 36, 2085
19. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Opiteck, G. J., Moyer, M. B., Jockusch, S., Turro, N. J. Photochemical protease: Site-specific photocleavage of hen egg lysozyme and bovine serum albumin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 10361
20. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A. Tuning the Selectivity of Protein Photocleavage: Spectroscopic and Photochemical Studies *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 4202
21. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Sze, H. C. Large Chiral Discrimination of a Molecular Probe by Bovine Serum Albumin *Chem. Comm.* 2001, 3, 297
22. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Sze, H. C., Jockusch, S., Turro, N. J. Chiral Protein Scissors: High Enantiomeric Selectivity for Binding and its Effect on Protein Photocleavage Efficiency and Specificity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002 99(9), 5810

24. Buranaprapuk, A., Kumar, C. V. Protein Scissors: Role of aromatic amino acids in the probe side chain on the binding affinity and the photocleavage of proteins *Tetrahedron*. 2000, 7019.

