

547.75

๒๕๖๓ ก

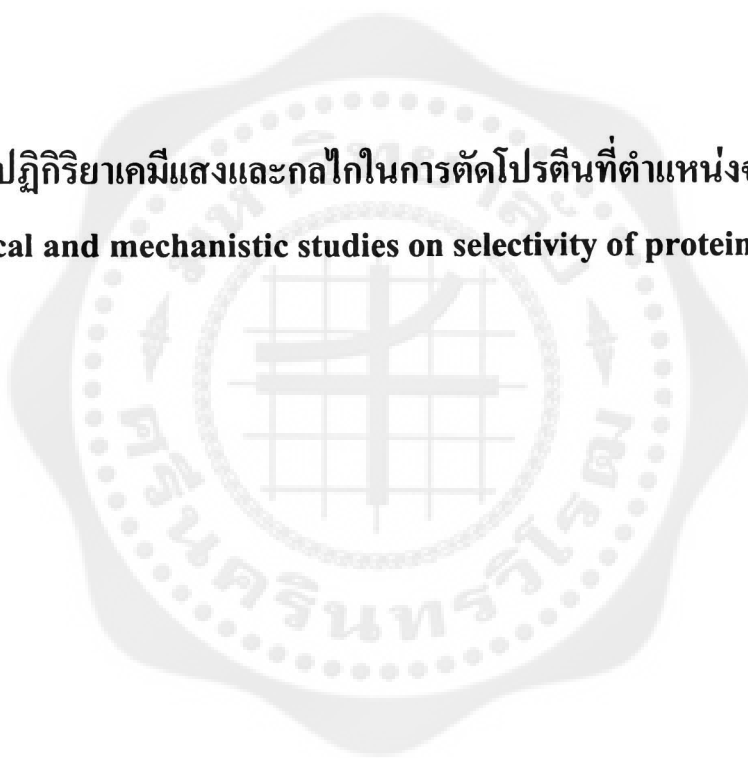
จ.๓

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2547

การศึกษาปฏิกิริยาเคมีแสงและกลไกในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ
(Photochemical and mechanistic studies on selectivity of protein cleavage)

25 พ.ค. 2549



อภิญญา ชัยวิสุทธางกูร

Challa V. Kumar

มะยูโซ๊ะ กูโน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

h 286489

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนให้ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2547 ขอขอบคุณ Professor Challa V. Kumar จาก Department of Chemistry, University of Connecticut, USA ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการทำวิจัย สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2549



Abstract

A new probe, L-phenylalanine-4(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-L-Phe) carrying a free amino terminus binds to both bovine serum albumin (BSA) and chicken egg-white lysozyme with high binding affinity. Photocleavage of the proteins by PMA-L-Phe can be achieved when the mixture of the protein and PMA-L-Phe is irradiated at 342 nm in the presence of Co(III)hexamine (CoHA). No reaction can occur in the absence of light, PMA-L-Phe or CoHA. Lysozyme is cleaved by PMA-L-Phe with high efficiency (57% yield) and specificity while BSA is cleaved with much less efficiency (<5% yield). From the N-terminal sequencing, the cleavage of lysozyme occurs between Trp-108 and Val-109.

Binding affinities of the two enantiomers with lysozyme, and bovine serum albumin (BSA), have been quantitated to determine chiral discrimination by these probes. Lysozyme indicates a six-fold selectivity for the D-isomer, and the binding constants are 3.3×10^5 and $2.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for the L- and the D-enantiomers, respectively. In contrast, BSA indicates ten-fold selectivity for the same enantiomer and the binding constants are 3.8×10^5 and $4.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for the L- and D-enantiomers, respectively. This aspect of chiral discrimination by the protein host is important, because the enantiomeric selectivities illustrate the crucial role of the chiral center in the probe-protein interactions. However, both enantiomers cleave lysozyme at the same location.

บทคัดย่อ

โมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่คือ L-phenylalanine-4(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-L-Phe) ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันสองหมู่คือ กรดอะมิโน และหมู่ไพรีน โดยมีส่วนปลายสุดเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) จากการศึกษาโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมของโมเลกุลนี้ เมื่อมีการจับกับโปรตีน เช่น bovine serum albumin (BSA) และ chicken egg-white lysozyme และเมื่อสารละลายผสมของโปรตีนและ PMA-L-Phe ถูกฉายแสงที่ 342 nm โดยมีตัวรับอิเล็กตรอน [Cobalt(III) hexammine chloride (CoHA)] อยู่ในสารละลายด้วย พบว่า โปรตีน lysozyme ถูกตัดด้วยเปอร์เซ็นต์การตัดสูงถึง 57% ในขณะที่การตัด BSA เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยการตัดโปรตีนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าขาด PMA-L-Phe, CoHA หรือ แสง ใดๆอย่างหนึ่ง และจากการหาลำดับกรดอะมิโน พบว่า lysozyme ถูกตัดระหว่าง Trp-108 และ Val-109

จากการศึกษา chiral recognition ของโมเลกุล PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe ในการจับกับโปรตีน แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ asymmetric center ในโมเลกุลของทั้งสองในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน ถึงแม้ว่าการตัด lysozyme ด้วยโมเลกุลทั้งสองจะเกิดการตัดที่ตำแหน่งเดียวกัน และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แต่จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี พบว่าการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PMA-D-Phe/BSA มีประสิทธิภาพมากกว่าการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PMA-L-Phe/BSA ถึง 10 เท่า และการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PMA-D-Phe/lysozyme มีประสิทธิภาพมากกว่าการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PMA-L-Phe/lysozyme ถึง 6 เท่า

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	
การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ	1
วิธีการทดลอง	
1. การหาลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้จากการตัด	7
2. การศึกษา chiral recognition	7
3. การศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง probe กับโปรตีน โดยใช้เทคนิคทาง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)	10
ผลการทดลอง	
1. การหาลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้จากการตัด	12
2. การศึกษา chiral recognition	12
3. การศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง probe กับโปรตีน โดยใช้เทคนิคทาง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)	14
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	16
เอกสารอ้างอิง	19
ภาคผนวก	22

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	13
ตารางที่ 2	14
ตารางที่ 3	14
ตารางที่ 4	17

สารบัญภาพประกอบ

	หน้า
Chart 1	5
Chart 2	12
รูปที่ 1	12
รูปที่ 2	13
รูปที่ 3	15





บทรนำ

การตัดโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายเล็กลงโดยทั่วไปเรานึกถึงเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งต่างกัน ในปัจจุบันมีการค้นพบสารเคมีที่ทำหน้าที่เหมือนเอนไซม์น้อยมาก จึงได้มีความพยายามในการสังเคราะห์โมเลกุลใหม่ที่มีความสามารถตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้นอกจากการทำหน้าที่ย่อยโปรตีนให้เล็กลงเพื่อประโยชน์ในการหาลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequencing) แล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เป็น probe ในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนในบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) การศึกษาถึงโครงสร้างของโปรตีน (protein structural domains) และความสัมพันธ์ของ activity กับโครงสร้างของโปรตีนได้ด้วย นอกจากนี้อาจใช้เป็นตัวช่วยยังการทำงานของเอนไซม์ โดยการจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ในการออกแบบยาชนิดใหม่ และยังใช้ในการศึกษาการหากกลไกในการจับของโมเลกุลขนาดเล็กกับโปรตีน หรือเอนไซม์ได้อีกด้วย¹⁻¹¹

การใช้แสงเป็นเสมือนสารเคมีตัวหนึ่งในปฏิกิริยามีประโยชน์คือ นอกจากจะสะดวกในการใช้และราคาไม่แพงแล้ว ปฏิกิริยาสามารถควบคุมได้ง่าย (sharp control) โดยการเปิดและปิดแสง และลดสารตั้งต้นตัวหนึ่งในการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้การเลือกความยาวคลื่นที่จำเพาะในการกระตุ้นโมเลกุลให้เกิดปฏิกิริยา จะช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ ตัวอย่างรายงานที่มีการใช้แสงในการตัดโปรตีนคือ การใช้ vanadate ในการหา binding site สำหรับฟอสเฟต (phosphate) ในโปรตีน¹²⁻¹⁵ (phosphate binding protein เช่น myosin light chain kinase) โดย vanadate มีประจุเหมือนฟอสเฟต จึงเกิดการแข่งที่จะจับกับโปรตีน หลังจากที่ vanadate ได้รับพลังงานจากแสง (ที่ 366 nm) พันธะเปปไทด์หลังหมู่ serine ในโปรตีนจะถูกตัด ถึงแม้ว่าการตัดจะจำเพาะที่ serine แต่พบว่ามีกรดอะมิโนตัวอื่นด้วย นอกจากนี้ vanadate จะอยู่ในรูปสมมูลของโอลิโกเมอร์ (oligomers) ทำให้ยากในการศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยา และเนื่องจาก vanadate มี absorption extinction coefficient ที่ต่ำ (ที่ >320 nm) จึงต้องใช้ความเข้มข้นสูงในการดูดกลืนแสงให้เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี และการประยุกต์ใช้กับโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่จับกับฟอสเฟตเป็นไปได้ยาก ดังนั้นการพัฒนาเพื่อหาโมเลกุลใหม่ที่สามารถจับกับโปรตีนได้ดีและสามารถตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงจึงได้รับความสนใจ

การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ

รายงานในระยะแรกได้มีการนำอนุพันธ์ของไพรีน คือ 4(1-pyrenyl)butyramine chloride (PBAC) มาศึกษาการจับกับโปรตีน เช่น BSA lactoglobulin และ calmodulin พบว่า PBAC จับกับโปรตีนด้วย binding constant ที่สูง¹⁶⁻¹⁷ โดยการจับของ PBAC จะเลือกจับตรงบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่อยู่ใกล้กับหมู่ที่มีประจุ (ionic) ในโปรตีน ซึ่งจะทำให้การเลือกจับมีความจำเพาะกว่าการจับตรงบริเวณหมู่ที่ไม่ชอบน้ำเพียงอย่างเดียว หรือการจับตรงบริเวณที่มีหมู่ ionic เพียงอย่างเดียว จากนั้นได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพรีน โมเลกุลใหม่ที่มีหมู่ที่จดจำอย่างจำเพาะ

(recognition element) ซึ่งจะเป็นตัวที่พาโมเลกุลไปที่ตำแหน่งจำเพาะในโปรตีน โดยการเชื่อมปลายด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) ของ L-phenylalanine เข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของ 4-(pyrenyl)butyric acid เกิดเป็น N-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene)butyramide หรือเรียกย่อว่า Py-Phe¹⁸

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

จากการศึกษาทางสเปกโตรสโคปี พบว่า Py-Phe สามารถจับกับโปรตีนตัวอย่าง คือ BSA และ lysozyme ด้วยค่าคงที่ของการจับ (binding constant) สูงถึง $6.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ และ $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ตามลำดับ¹⁹ นอกจากนี้ 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 ใหม่เกิดขึ้น²⁰ ($\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$) ซึ่งเป็น fluorescence ของ exciplex โดยเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไฟรีนที่สภาวะกระตุ้น กับ tryptophan ใน BSA การใช้ Hexamine cobalt(III) trichloride (CoHA) ในการยับยั้งการคายแสงของ Py-Phe (fluorescence quenching) เพื่อศึกษาความสามารถของ CoHA ในการเข้าถึง Py-Phe ขณะจับกับ BSA โดยเทียบกับความสามารถในการเข้าถึง Py-Phe อิสระในบัฟเฟอร์พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการคายแสงจะลดลงถึง 90 % แสดงให้เห็นว่า Py-Phe จะจับกับโปรตีนในลักษณะฝังหมู่ไฟรีนตรงบริเวณที่เป็น hydrophobic ในโปรตีน ทำให้ CoHA ซึ่งอยู่ในบัฟเฟอร์ไม่สามารถเข้าถึงได้²⁰

เนื่องจากอะตอมคาร์บอนในตำแหน่งอัลฟา (α -carbon) ของกรดอะมิโนเป็นอะตอมคาร์บอนที่ไม่สมมาตร (asymmetric carbon atom) หรือเรียกว่า chiral carbon ดังนั้น หมู่ chiral carbon ของกรดอะมิโนสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้หมู่ไฟรีนแสดงสัญญาณ CD ในช่วงความยาวคลื่นที่หมู่ไฟรีนดูดกลืนแสงได้ (320-370 nm) และพบว่าขณะจับกับโปรตีน CD spectrum ของ Py-Phe มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งข้อมูลต่างๆ ทางสเปกโตรสโคปีได้บอกถึงการเปลี่ยนแปลงสภาวะรอบๆ หมู่ไฟรีนจากบริเวณที่ชอบน้ำไปยังบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ

Chiral center ของ phenylalanine บนโมเลกุลของอนุพันธ์ของไพรีนมีผลต่อการจับและตัดโปรตีนอย่างมาก การใช้ D-phenylalanine แทน L-phenylalanine ในการสังเคราะห์ N-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene)butyramide พบว่า เมื่อ Py-Phe จับกับ BSA การคายแสง fluorescence ของ L-isomer จะลดลง²¹⁻²² ในขณะที่การคายแสง fluorescence ของ D-isomer จะเพิ่มขึ้น และการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ CD เป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม และพบว่า L-isomer สามารถเลือกจับกับ BSA ได้ดีกว่า D-isomer ถึง 100 เท่า (จากค่าคงที่ของการจับ) อย่างไรก็ตาม probe ทั้งสองนี้จะไม่แสดงผลต่อตำแหน่งของการตัดบนโปรตีน แต่ Py-L-Phe จะให้ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนที่สูงกว่า

จากการศึกษาการตัดโปรตีน พบว่า BSA ถูกตัดระหว่าง Leu 348 และ Arg 349 ในขณะที่ lysozyme ถูกตัดระหว่าง Val 108 และ Trp 109 เมื่อทำการฉายแสงที่ความยาวคลื่น 344 nm ไปยังสารละลายผสมของโปรตีน Py-Phe และ CoHA ซึ่ง CoHA ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) จากไพรีนที่สถานะกระตุ้น (Py^*) โดยการตัดโปรตีนจะไม่เกิดขึ้นถ้าขาดสารตั้งต้นตัวใดตัวหนึ่งหรือขาดแสง¹⁸⁻¹⁹ การศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยาโดยเทคนิคทาง Flash photolysis พบว่าเกิดอนุมูลประจุบวกของไพรีน (pyrene cation radical; Py^+) เป็น intermediate หลังจาก CoHA รับอิเล็กตรอนจาก Py^* ซึ่ง Py^+ สามารถดึงอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom abstraction) บนคาร์บอนตำแหน่งอัลฟาของกรดอะมิโนในโปรตีน ซึ่งก่อให้เกิดการสลาย (hydrolysis) ของพันธะเปปไทด์^{19,22}

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงอิทธิพลของความยาวของโมเลกุลต่อการตัดโปรตีน โดยนำ glycine มาขึ้นระหว่าง 4(1-pyrene)butyric acid กับ L-phenylalanine เกิดเป็นอนุพันธ์ของไพรีน ในรูปของ $Py-(Gly)_n-Phe$ ($n=0, 1, 2$) พบว่าความยาวของโมเลกุลไม่ช่วยให้การตัดโปรตีนดีขึ้น ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนลดลงเมื่อโมเลกุลมีความยาวเพิ่มขึ้น²³ และการตัดของ lysozyme โดยใช้โมเลกุลของ $Py-(Gly)_2-Phe$ เกิดขึ้น 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งแรกเกิดขึ้นระหว่าง Val 108 และ Trp 109 (major cleavage site) และ อีกตำแหน่งหนึ่งคือ ระหว่าง Ala 110 และ Trp 111 (minor cleavage site) โดยมีอัตราส่วนของการตัดที่ 2 ตำแหน่งนี้เป็น 6:1

การใช้กรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้น (di- และ tripeptide) ตัวอื่น เช่น glycine, L-tryptophan, L-tyrosine และ L-histidine ต่อเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของ 4(1-pyrene)butyric acid แทน L-phenylalanine²⁰ มีผลต่อการจับและตัดโปรตีน พบว่า BSA จะไม่ถูกตัดเมื่อใช้โมเลกุลที่มี Trp และ Tyr การศึกษาทาง flash photolysis แสดงถึงการยับยั้งการเกิด Py^+ จาก Py^* โดย Trp และ Tyr (intramolecular quenching)

จากการศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นการใช้ออนุพันธ์ไพรีนที่มีปลายของโมเลกุลเป็นหมู่คาร์บอกซิล (COOH) 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

arginine (บน lysozyme) และพบว่า lysozyme ไม่ถูกตัดเมื่อใช้ C-methyl ester ของ Py-Phe แทน Py-Phe¹⁹ ทำให้ได้ข้อสรุปว่าขั้วที่ปลายโมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีนมีความสำคัญในการจับกับโปรตีน จึงเป็นที่มาของสมมติฐานใหม่ว่า การกลับขั้วที่ปลายของโมเลกุล Py-Phe จากขั้วลบเป็นขั้วบวก โดยให้ปลายของอนุพันธ์ไพรีนเป็นหมู่อะมิโนของ phenylalanine แทนหมู่คาร์บอกซิล ได้โมเลกุลใหม่ คือ L-phenylalanine-4(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-L-Phe) (Chart 1)

ในการศึกษานี้ พบว่า PMA-L-Phe สามารถจับกับ BSA และ lysozyme ด้วยค่าคงที่การจับ (binding constant) ที่สูง สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-Phe เมื่อจับกับ BSA จะเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น ในขณะที่สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ PMA-Phe แทบจะไม่มีเปลี่ยนแปลงเมื่อจับกับ lysozyme ซึ่งการเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้นนี้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสภาวะรอบๆ หมู่ไพรีน แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้น้อยกว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากที่มีการศึกษาโดยใช้ Py-Phe เป็น probe²⁴ (ซึ่ง Py-Phe มีหมู่คาร์บอกซิลอยู่ที่ปลายของโมเลกุล) จากนั้นได้ทำการศึกษาการตัดโปรตีน และติดตามผลด้วยการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และการหาลำดับกรดอะมิโน และได้ทำการศึกษา chiral recognition ของโมเลกุลของ PMA-L-Phe โดยการสังเคราะห์โมเลกุลที่เป็น enantiomer คือ PMA-D-Phe (Chart 1) ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดถึงวิธีการทดลองและผลการทดลองที่ได้ในรายงานฉบับนี้

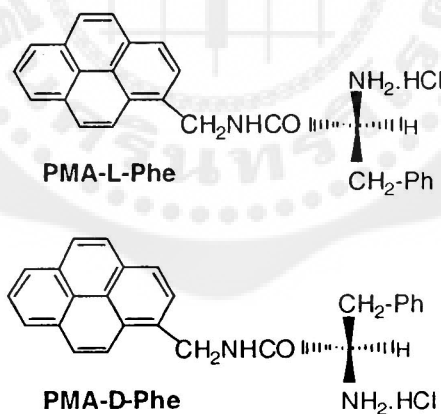


Chart 1 โครงสร้างของ L-phenylalanine-4(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-L-Phe) และ D-phenylalanine-4(1-pyrene)-3-methylamide (PMA-D-Phe).



แผนการดำเนินการทดลองโดยรวมของการวิจัยมีดังนี้

1. การหาลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้จากการตัด
2. การศึกษา chiral recognition
3. การศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง probe กับโปรตีน โดยใช้เทคนิคทาง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

1. การหาลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ถูกตัด

จากการตัด lysozyme โดยใช้ PMA-L-Phe ได้เปปไทด์ 2 band มี M.W. เท่ากับ 11 kDa และ 3 kDa ทำการ transfer เปปไทด์ที่แยกได้ลงบน PVDF membrane²⁴ และตัด band ที่ต้องการไปหาลำดับกรดอะมิโนทางปลายด้าน N (N-terminal) โดยนำส่งไปที่ Midwest Analytical, Inc., USA เพื่อหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเครื่อง amino acid automated sequencer

2. การศึกษา Chiral recognition

2.1 การสังเคราะห์ PMA-D-Phe

ขั้นที่ 1 ได้ทำการสังเคราะห์โมเลกุลของ D-phenylalanine-4(1-pyrene)methylamide (PMA-D-Phe) ซึ่งเป็น enantiomer ของ PMA-L-Phe โดยนำ 1(1-Pyrenyl)methylamide (PMAC) ไปทำปฏิกิริยากับ N-t-Boc-D-phenylalanine (จาก Sigma) ในสารละลาย acetonitrile/ CH₂Cl₂ และ 5% (w/v) sodiumbicarbonate (ละลายใน 80% acetonitrile/water) จากนั้นจึงเติม Dicyclohexyl carbodiimide (DCC) ลงไป คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ TLC (ใช้ CHCl₃ / Methanol เป็นตัวชะ) ทุกๆ ชั่วโมง เมื่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ไม่เกิดเพิ่มขึ้นจึงเติมน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วทำการสกัดผลิตภัณฑ์ด้วย CH₂Cl₂ นำชั้น CH₂Cl₂ ที่ได้มารวมกันแล้วนำไปกำจัดน้ำโดยใช้ MgSO₄ anhydrous และระเหยตัวทำละลายจนแห้งภายใต้ความดัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นผงสีเหลืองอ่อน (70% yield)

ขั้นที่ 2 นำสารที่ได้ซึ่งเป็น N-t-Boc-D-phenylalanine-4(1-pyrene)methylamide มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ column chromatography ใช้ silica gel เป็น stationary phase และใช้ตัวทำละลายผสมของ CHCl₃ / Methanol เป็นตัวชะ จากนั้นนำสารบริสุทธิ์มาตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้ UV, Fluorescence, IR และ NMR พบว่าข้อมูลทาง spectroscopy สอดคล้องกับโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ขั้นที่ 2

ขั้นที่ 3 นำสารที่ได้ในขั้นที่ 2 มาทำการละลายหมู่ t-Boc เพื่อให้เกิดหมู่ NH₂ อิสระที่ปลายของโมเลกุล โดยละลายสารที่ได้ใน 50% TFA/CH₂Cl₂ + 5% triisopropylsilane คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยใช้ TLC พบว่าได้ PMA-D-Phe บริสุทธิ์ นำสารที่ได้มาตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้ UV, NMR และ Mass spectrometry พบว่าข้อมูลทาง spectroscopy สอดคล้องกับโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ที่คาดหวังไว้ โดยมีข้อมูลดังนี้ PMA-D-Phe (70% yield); ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 7.9-8.2 ppm (9H), 7.1-7.2 ppm (5H),

5.0-5.2 ppm (2H), 4.0 ppm (1H), 3.7 ppm (1H), 2.1 ppm (2H), 1.7 ppm (2H). MS data (FAB): m/e 758.4 (2MH⁺), m.p.:120 °C.

2.2 การศึกษาการจับ (binding) ของ PMA-D-Phe กับโปรตีนโดยใช้ UV-Vis spectrophotometer เปรียบเทียบกับผลการทดลองของ PMA-L-Phe

ทำได้โดยการเติมสารละลายโปรตีน (BSA หรือ lysozyme ความเข้มข้น 0-10 μ M) ลงในสารละลาย PMA-D-Phe (2 μ M) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 จากนั้นนำค่า absorbance ของ probe ที่ได้จาก λ_{max} ที่แต่ละความเข้มข้นของโปรตีน มาคำนวณหา binding constant จากสมการของ Scatchard²⁵

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

โดย r = อัตราส่วน ความเข้มข้นของ bound probe ต่อความเข้มข้นของโปรตีน

$$(C_b / [\text{protein}])$$

C_f = ความเข้มข้นของ free probe

n = จำนวน binding site

K_b = binding constant

2.3 การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching)

การศึกษาถึงผลต่อ fluorescence ของ PMA-D-Phe (2 μ M) ขณะจับอยู่กับโปรตีน (10 μ M) จะทำได้โดยการ titration สารละลายผสมของ PMA-D-Phe กับโปรตีนด้วย quencher (hexamine cobalt(III) trichloride, CoHA) (0-1 mM) โดยวัดความเข้มแสง fluorescence ของ PMA-D-Phe ที่ λ_{max} ที่แต่ละความเข้มข้นของ CoHA จากนั้นนำมาคำนวณหา quenching constant จากสมการของ Stern-Volmer¹⁸ เปรียบเทียบกับ PMA-D-Phe อิสระ และผลการทดลองของ PMA-L-Phe ที่ได้ทำการศึกษาในเบื้องต้น

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

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

K_{sv} = Stern-Volmer quenching constant

$[Q]$ = ความเข้มข้นของ quencher

2.4 การศึกษาการตัดโปรตีนโดยใช้ PMA-D-Phe เปรียบเทียบกับการใช้ PMA-L-Phe

เตรียมสารละลายผสมของ PMA-D-Phe (15 μ M), protein (15 μ M) และ CoHA (1 mM) ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 และสารละลายผสมที่ขาด probe หรือ CoHA ในสถานะเดียวกัน (controls) แล้วทำการฉายแสงด้วยเครื่อง monochromator (PTI model 1010; 120 W) ที่

ความยาวคลื่น 342 nm ในช่วงที่หมู่ไพรินดูดกลืนแสง และจะเตรียมสารละลายผสมที่ไม่มีการฉายแสง (dark control) เพื่อเป็นการเปรียบเทียบ โดยการทดลองทั้งหมดทำในห้องมืด

จากนั้น นำสารละลายทั้งหมดที่ผ่านการฉายแสงและสารละลายที่ใช้ในการเปรียบเทียบมา ระเหยตัวทำละลายจนแห้ง ด้วยเครื่อง SpeedVac แล้วนำไปละลายใน loading buffer (24 μ l) ที่ ประกอบด้วย SDS (7 % w/v), glycerol (4% w/v), Tris (50 mM, pH 6.8), mercaptoethanol (2 % v/v), และ Bromophenol blue (0.01 % w/v) จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำมาแยกด้วย กระแสไฟฟ้าโดยวิธี SDS-PAGE²⁶ โดยใช้ 12% polyacrylamide gel สำหรับ lysozyme และใช้ 8% polyacrylamide gel สำหรับ BSA ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 60 โวลต์ สำหรับ stacking gel และ 110 โวลต์ สำหรับ separating gel ภายหลังจากการแยก โปรตีนถูกนำไป stain ด้วย staining solution (0.2% (w/v) Coomassie blue R-250 ใน 25% isopropanol, 10% acetic acid) และทำการ destain โดยใช้ 10% Acetic acid

จากนั้นจึงทำการ transfer เปปไทด์ที่ได้จากการตัดทำโดยการ transfer เปปไทด์บน gel ไปยัง PVDF membrane โดยวิธี blotting โดยใช้ semi-dry system เริ่มต้นจากการนำ gel ที่ได้ผ่าน กระแสไฟฟ้าเพื่อทำการแยกเปปไทด์แล้ว (โดยไม่ต้องข้อม gel) มาแช่ใน CAPS buffer, pH 10.5 เป็นเวลา 10-15 นาที นำ PVDF membrane ไปแช่ใน 100% methanol เป็นเวลา 5-10 วินาที แล้วจึง นำไปแช่ใน CAPS buffer, pH 10.5 เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นจึงนำ gel และ PVDF membrane ประกอบเข้าด้วยกันใน semi-dry system (BIORAD) และต่อกับ power supply โดยได้ทำการปรับ กระแสไฟฟ้าและเวลาที่ใช้ในการ transfer เพื่อให้การ transfer เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งได้ทำการทดลองใช้เวลา 0.5-1.5 ชั่วโมง

นำ PVDF membrane ที่ได้ทำการ transfer โปรตีนแล้วมา stain ใน Coomassie blue R-250 (0.1%) ที่ละลายใน methanol (45%) / acetic acid (10%) เป็นเวลาประมาณ 2 นาที (หรือจนเห็น band) แล้วจึงนำ PVDF membrane ไป destain โดยใช้ methanol (45%) / acetic acid (10%) ประมาณ 5 นาที แล้วจึงล้าง PVDF membrane ด้วยน้ำกลั่น ทำการตัด band ของเปปไทด์ที่ได้บน PVDF membrane แล้วส่ง band ที่ได้ไปยัง Midwest Analytical, Inc., USA เพื่อทำการหาลำดับ กรดอะมิโนต่อไป

หมายเหตุ : การศึกษา chiral recognition นี้เป็นการศึกษาเพิ่มเติมจากแผนการดำเนินงานที่ได้วางแผนไว้ ซึ่งในแผนงานวิจัยเดิมจะเป็นการศึกษาลักษณะโครงสร้างของโปรตีนตรงบริเวณที่มีการจับของอนุพันธ์ไพริน และเกิดการตัดขึ้นโดยใช้หลักการทาง Molecular modeling เพื่อศึกษากลไกของการจับและตัดโปรตีนภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) แต่เนื่องจากผู้วิจัยได้ทดลองทำการวิจัยแล้วและพบอุปสรรคในเรื่องของ software ที่ใช้ รวมทั้งการ interpret ผลการทดลองที่ได้ จึง

มีการทำการศึกษาทางด้าน chiral recognition เพิ่มเติม ซึ่งได้ทำการสังเคราะห์โมเลกุลใหม่คือ PMA-D-Phe ที่เป็น enantiomer กับ PMA-L-Phe และผลเป็นที่น่าพอใจมาก ในขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการรวบรวมข้อมูลเพื่อตีพิมพ์ผลงานในวารสารนานาชาติ

3. การศึกษาปฏิกิริยาโดยใช้ NMR

NMR spectrum ได้จาก NMR spectrometer (300 MHz, Bruker) โดยนำ NMR spectrum ของ สารละลายโปรตีน (lysozyme) และของสารละลายผสมโปรตีน และ probe ใน deuterium oxide (D_2O) หรือใน Phosphate buffer, pH 7.0 (ที่เตรียมใน D_2O) มาเปรียบเทียบ โดยดูจากค่า chemical shift ของกรดอะมิโนบนโปรตีนที่เปลี่ยนไปเมื่อ probe จับกับโปรตีน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่า chemical shift ที่เกิดขึ้นนี้สามารถใช้ในการทำนาย binding site บนโปรตีนได้





ผลการทดลอง

1. การหาลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ถูกตัด

จากการทำ N-terminal sequencing ของเปปไทด์ที่ได้จากการตัดทั้ง 2 เปปไทด์ คือ เปปไทด์ที่มี MW 11 kDa และเปปไทด์ที่มี MW 3 kDa จากปฏิกิริยาระหว่าง lysozyme และ PMA-L-Phe พบว่า เปปไทด์ที่มีขนาด 11 kDa จะมี sequence ทางปลายด้าน N เป็น KVFGK ส่วนเปปไทด์ที่มีขนาด 3 kDa จะมี sequence ทางปลายด้าน N เป็น VAWRN ดังนั้น เมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ lysozyme พบว่า lysozyme ถูกตัดตรงตำแหน่งระหว่าง Trp-108 และ Val-109 ดังแสดงใน Chart 2

Cleavage site

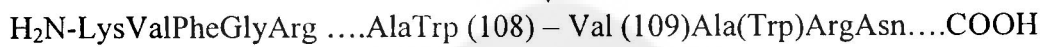
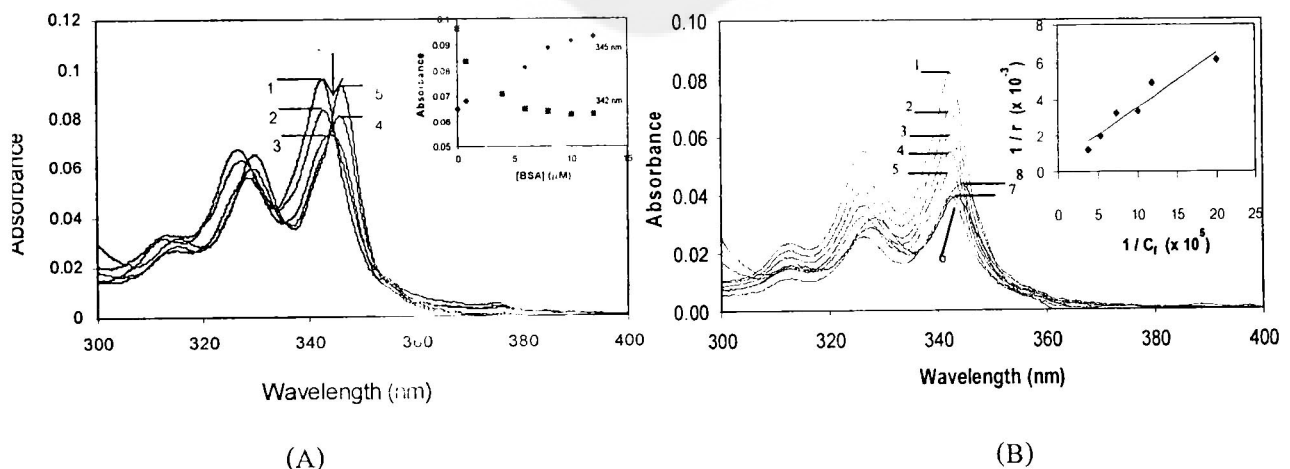


Chart 2 แสดง cleavage pattern ของ lysozyme โดยที่ (Trp) ตรงตำแหน่ง Trp-112 มีโครงสร้างที่ถูกเปลี่ยนแปลง (modified) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาเคมีแสง

2. การศึกษา Chiral recognition

2.1 การศึกษาการจับ (binding) ของ PMA-D-Phe กับโปรตีนโดยใช้ UV-Vis spectrophotometer เปรียบเทียบกับผลการทดลองของ PMA-L-Phe

พบว่าเมื่อ PMA-D-Phe จับกับ BSA จะทำให้เกิด red shift ประมาณ 3 nm ของ Absorption spectrum (รูปที่ 1) (พบ red shift ประมาณ 2 nm ของ Absorption spectrum ของ PMA-L-Phe/BSA) แต่เมื่อ PMA-D-Phe จับกับ lysozyme พบว่าเกิด hyperchromism ที่ความยาวคลื่น 342 nm ของสเปกตรัมขึ้นเพียงอย่างเดียว (สอดคล้องกับผลการทดลองของ PMA-L-Phe/lysozyme)



รูปที่ 1 Absorption spectrum ของ (A) PMA-D-Phe/BSA และ (B) PMA-L-Phe/BSA

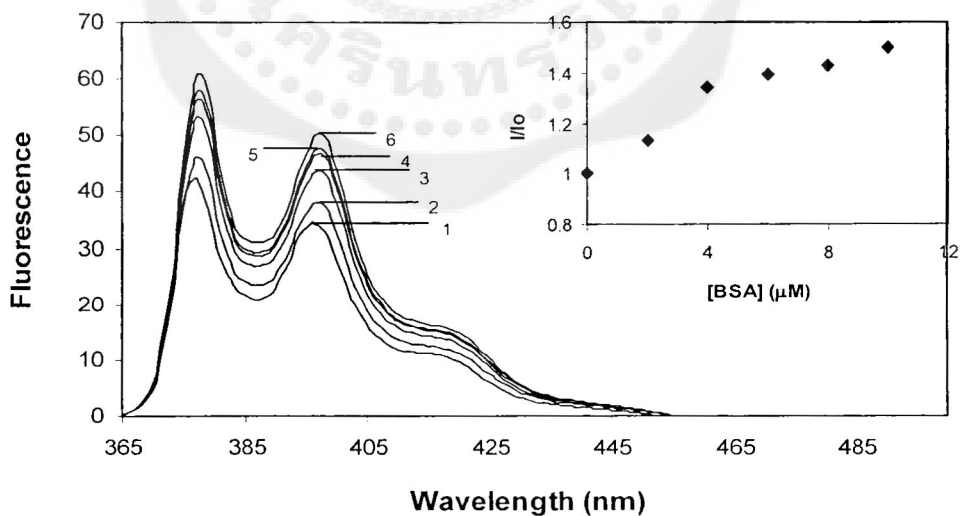
จากการคำนวณโดยใช้ Scatchard equation ได้ค่า binding constant (K_b) สำหรับ PMA-D-Phe/BSA เท่ากับ $4.0 \pm 0.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (K_b (PMA-L-Phe/BSA) = $3.8 \pm 0.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) และค่า binding constant สำหรับ PMA-D-Phe/lysozyme เท่ากับ $2.0 \pm 0.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (K_b (PMA-L-Phe/lysozyme) = $3.3 \pm 0.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า binding constant ของ PMA-D-Phe และ PMA-L-Phe เมื่อจับกับ BSA และ lysozyme

Probe/Protein	PMA-D-Phe /lysozyme	PMA-L-Phe /lysozyme	PMA-D-Phe /BSA	PMA-L-Phe /BSA
K_b (M^{-1})	2.0×10^6	3.3×10^5	4.0×10^6	3.8×10^5

2.2 การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching)

การศึกษาดังกล่าวต่อ fluorescence ของ PMA-D-Phe ($0.7 \mu\text{M}$) ขณะจับอยู่กับโปรตีน ($0-10 \mu\text{M}$) พบว่า lysozyme ยับยั้งการคายแสงของ PMA-D-Phe น้อยมาก ในขณะที่เมื่อเติม BSA ลงไปในสารละลาย PMA-D-Phe พบว่า fluorescence intensity สูงขึ้น และมีการเกิด red shift 1 nm (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 Fluorescence spectrum ของ PMA-D-Phe เมื่อไม่มี BSA (1) และมีการเติม BSA $2 \mu\text{M}$ (2), $4 \mu\text{M}$ (3), $6 \mu\text{M}$ (4), $8 \mu\text{M}$ (5) และ $10 \mu\text{M}$ (6) ภาพเล็กแสดงกราฟระหว่าง I/I_0 vs [BSA] โดยที่ I_0 = fluorescence intensity ของ PMA-D-Phe เมื่อไม่มี BSA และ I = fluorescence intensity ของ PMA-D-Phe เมื่อมี BSA

ซึ่งผลการศึกษาด้าน fluorescence ในการจับกับโปรตีนได้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของ fluorescence intensity ของ probe เมื่อจับกับ BSA และ lysozyme

Enantiomer	Probe+lysozyme	Probe+BSA
PMA-D-Phe	Weak quenching	Intensity enhancing
PMA-L-Phe	Weak quenching	Intensity enhancing

จากการศึกษาการยับยั้งการคายแสงของ probe โดยใช้ hexamine cobalt(III)chloride (CoHA) เป็นตัวยับยั้ง (quencher) เพื่อดูความสามารถของ CoHA ในการเข้าถึง PMA-Phe ขณะจับกับโปรตีน โดยเทียบกับความสามารถของ CoHA ในการเข้าถึง PMA-Phe อิสระในบัฟเฟอร์ พบว่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการคายแสงเมื่อ PMA-D-Phe จับกับ BSA หรือ lysozyme มีค่าน้อยกว่าของ PMA-D-Phe อิสระ โดยค่า K_{sv} ที่คำนวณได้แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่า K_{sv} สำหรับ free probe, probe/lysozyme และ probe/BSA

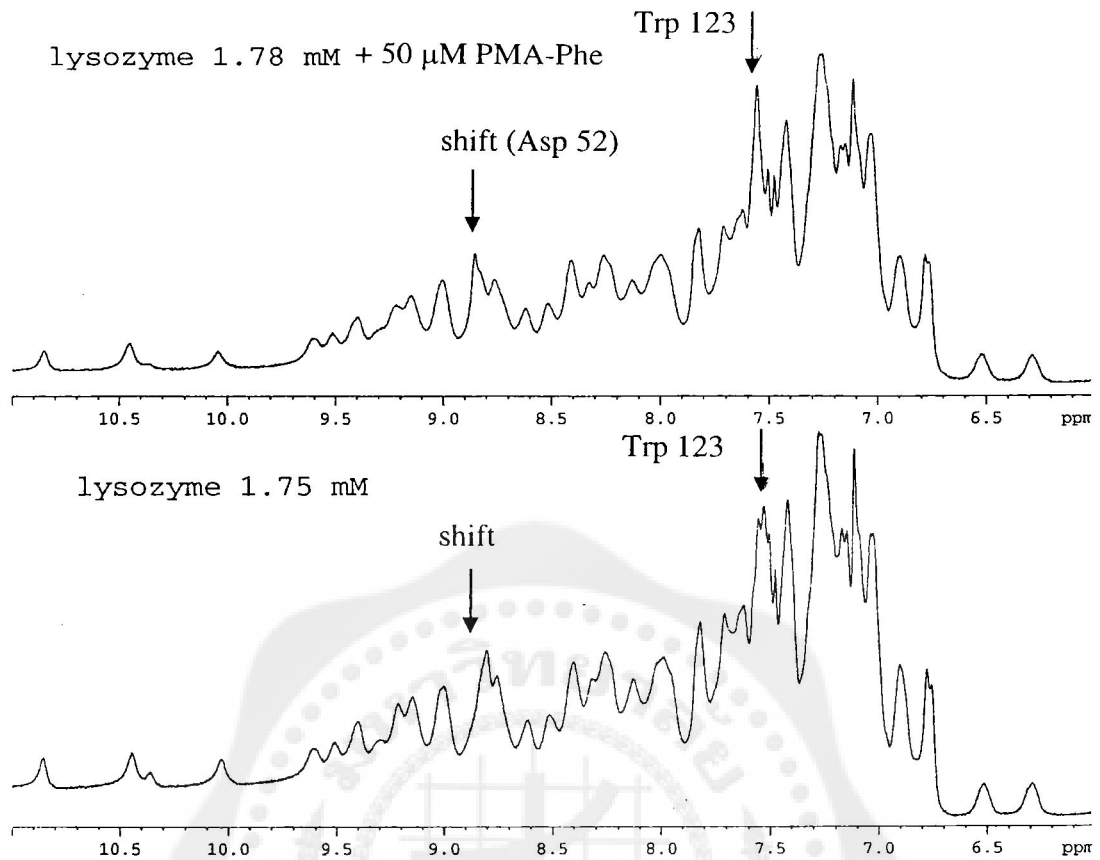
Enantiomer	Free probe (M^{-1})	Probe+lysozyme (M^{-1})	Probe+BSA (M^{-1})
PMA-D-Phe	2.31×10^3	0.72×10^3	0.15×10^3
PMA-L-Phe	1.28×10^3	0.79×10^3	Intensity enhancing

2.3 การศึกษาการตัดโปรตีนโดยใช้ PMA-D-Phe เปรียบเทียบกับการใช้ PMA-L-Phe

จากผลการทดลองพบว่า PMA-D-Phe ตัด lysozyme ด้วยประสิทธิภาพที่สูงเช่นเดียวกับผลการทดลองของ PMA-L-Phe และจากการหาลำดับกรดอะมิโน การตัดเกิดที่ตำแหน่งเดียวกัน คือระหว่าง Trp-108 และ Val-109 (Chart 2)

3. การศึกษาปฏิกิริยาโดยใช้ NMR

NMR spectrum ได้จาก NMR spectrometer (300 MHz, Bruker) โดยนำ NMR spectrum ของสารละลาย $1.75 \mu M$ lysozyme และของสารละลายผสมของ $1.78 \mu M$ lysozyme และ probe ใน deuterium oxide (D_2O) มาเปรียบเทียบ โดยดูจากค่า chemical shift ของกรดอะมิโนบนโปรตีนที่เปลี่ยนไปเมื่อ probe จับกับโปรตีน พบว่ามี shift ของ peak ที่ 7.80 ppm (spectrum ล่าง) ไปยัง 7.90 ppm (spectrum บน) ซึ่ง peak ที่ตำแหน่งนี้ตรงกับ Asp 52 ของ lysozyme²⁷ และมีการ split ของ peak ที่ 7.55 ppm ซึ่งตรงกับ peak ของ Trp 123 (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดง chemical shifts ของ NMR spectrum เมื่อมีการจับของ PMA-Phe กับ lysozyme



**สรุปและอภิปราย
ผลการทดลอง**

จากการศึกษาการตัดโปรตีนโดยใช้ PMA-L-Phe (มีหมู่ NH_2 อยู่ที่ปลายของโมเลกุล) เป็น probe โดยมีหมู่ไพรีนเป็น โมเลกุลที่ทำหน้าที่รับแสง ($\lambda_{\text{max}} = 342 \text{ nm}$ ในช่วงความยาวคลื่น 300-400 nm) พบว่า lysozyme ถูกตัดด้วยประสิทธิภาพสูงสุดถึง 57% (ตารางที่ 4) เมื่อทำการฉายแสงที่ความยาวคลื่น 342 nm ไปยังสารละลายผสมของ PMA-L-Phe (15 μM) + lysozyme (15 μM) + CoHA (1 mM) โดยที่การตัดโปรตีนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าขาดสารตัวใดตัวหนึ่งหรือขาดแสง ในขณะเดียวกัน การตัด BSA โดยใช้ PMA-L-Phe จะมีประสิทธิภาพในการตัดน้อยมาก (<5%) ซึ่งเมื่อเทียบกับการใช้ Py-L-Phe เป็น probe (ซึ่ง Py-L-Phe มีหมู่ COOH อยู่ที่ปลายของโมเลกุล) พบว่าการตัด lysozyme และ BSA จะมีประสิทธิภาพในการตัดต่างกัน (35% และ 21% ตามลำดับ) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของหมู่ฟังก์ชันที่ปลายของโมเลกุลของ probe ในการจับและตัดโปรตีน ซึ่งเป็นที่ยืนยันการศึกษาทางสเปกโทรสโกปี โดยแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างที่เกิดขึ้นของสเปกตรัม (UV, FL และ CD) และค่าคงที่การจับ (binding constant) เมื่อใช้ PMA-L-Phe และ Py-L-Phe ในการศึกษาการจับกับโปรตีน

ตารางที่ 4 แสดง % yield ของโปรตีนที่ได้จากการตัด

Probe	Protein	Time of irradiation (min)	%Yield
Py-L-Phe	BSA	20	21
	Lysozyme	10	35
PMA-L-Phe	BSA	20	<5
	Lysozyme	10	57

แต่อย่างไรก็ตาม การยืนยันที่จะบ่งบอกถึงความแตกต่างในการตัดโปรตีนได้ดีที่สุดคือการหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้จากการตัด จากการหาลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ที่ถูกตัดจากปลายด้าน N (N-terminal sequencing) พบว่าการตัด lysozyme เกิดขึ้นระหว่าง Trp-108 และ Val-109 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับที่ได้จากปฏิกิริยาของ Py-L-Phe แต่ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนจากปฏิกิริยาของ PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe จะสูงกว่าจากปฏิกิริยาของ Py-L-Phe มาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า การจับของ PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe บน lysozyme จะมี binding site อยู่ในบริเวณที่ CoHA จะสามารถเข้าถึงได้ดีกว่า (greater accessibility)

จากการศึกษา chiral recognition ของโมเลกุล PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe ในการจับกับโปรตีน แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ asymmetric center ในโมเลกุลของทั้งสองในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน ซึ่งจากข้อมูลของ binding constant พบว่าการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PMA-D-

Phe/BSA มีประสิทธิภาพมากกว่าการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PMA-L-Phe/BSA ถึง 10 เท่า และการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PMA-D-Phe/lysozyme มีประสิทธิภาพมากกว่าการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PMA-L-Phe/lysozyme ถึง 6 เท่า

ถึงแม้ว่าการตัดโปรตีน (lysozyme) โดยใช้ PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe จะเกิดขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกัน และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แต่จากข้อมูลทาง spectroscopy แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ chiral center ในโมเลกุลของ probe ในการเลือกจับกับโปรตีนของโมเลกุลทั้งสองที่เป็น enantiomer กัน

จากข้อมูลทาง NMR spectroscopy พบการเกิดการเปลี่ยนแปลงของ chemical shift ของ Trp 123 และ Asp 52 ของ lysozyme แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ว่า โมเลกุลของ probe อาจเกิดการจับกับโปรตีนในบริเวณที่ใกล้เคียงกับกรดอะมิโนทั้งสองนี้ และในขณะนี้ผู้วิจัยยังต้องศึกษากลไกของปฏิกิริยาต่อไปเพื่อให้เข้าใจถึงการจับและตัดโปรตีนของโมเลกุลเหล่านี้ได้ดียิ่งขึ้น



เอกสารอ้างอิง



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. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *173*, 133
3. Rana, T. M., Meares, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2457
4. Ghaim, J. B., Greiner, D. P., Meares, C. F., Gennis, R. B. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11311
5. Ettner, N., Metzger, J. W., Lederer, T., Hulmes, J. D., Kisker, C., Hinrichs, W., Ellestad, G., Hillen, W. *Biochemistry* **1995**, *34*, 22
6. Schepartz, A., Cuenoud, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3247
7. Cuenoud, B., Tarasow, T. M., Schepartz, A. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 895
8. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Cho, A., Chaudhari, A. *Chem. Comm.* **2000**, 597
9. Buranaprapuk, A., Leach, S. P., Kumar, C. V., Bocarsly, J. *Biochemica et Biophysica Acta.* **1998**, *1387*, 309
10. Ermacora, M. R., Ledman, D. W., Hellinga, H. W., Hsu, G. W., Fox, R. O. *Biochemistry* **1994**, *33*, 13625
11. Maruta, S., Mitsuhashi, S., Yamada, M., Ikeke, M. *J. Biochem. (Tokyo)* **1998**, *128*, 557
12. Correia, J. J., Lipscomb, L. D., Dabrowiak, J. C., Isern, N., Zubieta, J. *Arch. Biochem. and Biophys.* **1994**, *309*, 94
13. Crans, D. C., Sudhakar, K., Zamborelli, T. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6812
14. Cremo, C. R., Loo, J. A., Edmonds, C. G., Hatlelid, K. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 491
15. Shrivastana, H. Y., Kanthimathi, M., Nair, B. U. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *265*, 311
16. Kumar, C. V., Tolosa, L. M. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 13914
17. Kumar, C. V., Tolosa, L. M. *FASEB J.* **1993**, *7*, A1131
18. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A. *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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10361
20. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4202
21. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Sze, H. C. *Chem. Comm.* **2001**, *3*, 297
22. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Sze, H. C., Jockusch, S., Turro, N. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002** *99(9)*, 5810
23. Buranaprapuk, A., Kumar, C. V. *Tetrahedron.* **2000**, 7019

24. Buranaprapuk, A., Chaivisuthangkura, P., Svasti, J., and Kumar, C. V. *Lett. Org. Chem.* **2005**, *2(6)*, 554.
25. Scatchard, G. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660.
26. Schagger, H.; von Jagow, G. *Anal. Biochem.* **1987**, *166*, 368.
27. Bartik, K.; Dobson, C. M.; Redfield, C. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *215*, 255.





ภาคผนวก

การเผยแพร่งานวิจัย

งานวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 3 ปี ดังนี้

1. ชื่อโครงการ (Project) การออกแบบและการสังเคราะห์โมเลกุลใหม่ที่สามารถตัดโปรตีนโดยใช้ปฏิกิริยาทางแสง: การศึกษาถึงผลของหมู่ไอออนิกที่ปลายของโมเลกุล ต่อประสิทธิภาพการจับและตัดโปรตีน
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

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2545 จำนวนเงิน 239,000 บาท

2. ชื่อโครงการ (Project) การศึกษาปฏิกิริยาเคมีแสงของอนุพันธ์ไพรีนสังเคราะห์ในการตัดโปรตีน
Photochemical studies of novel pyrenyl probe on specific cleavage of proteins

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546 จำนวนเงิน 279,000 บาท

3. ชื่อโครงการ (Project) การศึกษาปฏิกิริยาเคมีแสงและกลไกในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ
Photochemical and mechanistic studies on selectivity of protein photocleavage

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2547 จำนวนเงิน 259,000 บาท

ผู้วิจัยได้มีผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ทั้งในวารสารต่างประเทศและการเสนอผลงานในรูปแบบ Oral presentation และ Poster presentation (Proceedings) ดังนี้

International Publications:

1. *Buranaprapuk, A., Chaivisuthangkura, P., Svasti, J., and Kumar, C. V. (2005) Efficient Photocleavage of Lysozyme by a new Chiral Probe *Letters in organic Chemistry* 2(6), 554-558.*
2. *Buranaprapuk, A., Malaikew, Y., Svasti, J., and Kumar, C. V. (2006) Chiral Protein Scissors: Enantioselective Binding and Photocleavage of Two Proteins (In preparation for submitting to *Journal of Physical Chemistry*).*

Proceedings:

1. *Buranaprapuk, A. and Kumar, C. V. "Site Specific Cleavage of Proteins Activated with Light", 28th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, October 24 –26, 2002. (Oral presentation)*
2. *Buranaprapuk, A. and Kumar, C. V. "Protein Scissors: Site Specific Photocleavage of Proteins", Protein Research Network Symposium 2002 on Protein Structure and Molecular Enzymology, Bangkok, Thailand, August 29 –30, 2002. (Oral presentation)*
3. *Chaivisuthangkura, A., Chavisuthangkura, P., Kumar, C. V., Svasti, J. "Cleavage of Proteins using Pyrenyl Probes Activated by Light", Joint Senior Research Scholar Meeting "Integration of Biological Science Protein Chemistry and Medicine", Bangkok, Thailand, September 14-15, 2004. (Oral presentation)*
4. *Chaivisuthangkura, A. and Kumar, C. V. "Photochemical Studies of Novel Pyrenyl Probe on Specific Cleavage of Proteins", 30th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, October 19 –21, 2004. (Poster presentation)*

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

Apinya Chaivisuthangkura (Buranaprapuk)

อภิญญา ชัยวิสุทธิทางกูร (บูรณประพุดกษ)

Date of birth: February 7, 1969

Sex/Marital status: Female; Married; 1 child

Academic position: Assistant Professor

Address: Department of Chemistry, Faculty of Science,
Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23,
Bangkok 10110, Thailand.

Phone: 664-1000 ext. 8452; 259-2097

Fax: 259-2097

Email: apinyac@swu.ac.th

Education

1988-1991 B.Sc. (Chemistry), Silpakorn University, Thailand

1993-1998 Ph.D. (Chemistry), University of Connecticut, USA

Awards

1998 Outstanding Ph.D. student award from Department of Chemistry, University of Connecticut, USA

2001 Outstanding Thesis Award, Chemistry and Pharmacy Section from National Research Council of Thailand

Invited Oral Presentations

2002 "Site-specific Photocleavage of Proteins", Department of Chemistry, University of Connecticut, USA.

Research and Professional Experiences:

1994-1998 Teaching assistant in General Chemistry Laboratory and Physical Chemistry Laboratory for undergraduate students, University of Connecticut, USA

1996-1997 Research assistant with Professor Challa V. Kumar, Department of Chemistry, University of Connecticut, USA

1998-2000 Research scientist with Professor Jisnuson Svasti, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok

2000-present Lecturer, Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok

Field of expertise:

1. Photochemistry
2. Organic synthesis
3. UV-Vis, Fluorescence, CD, NMR spectroscopic techniques

International Publications:

1. Kumar, C. V. and *Buranaprapuk, A.* (1997) Site-Specific Photocleavage of Proteins *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**, 2085-2087
(German version: Kumar, C. V. and *Buranaprapuk, A.* (1997) Site-Specific Photocleavage of Proteins *Angew. Chem.* **109**, 2175-2177)
2. *Buranaprapuk, A.*, Leach, S. P., Kumar, C. V. and Bocarsly, J. (1998) Protein Cleavage by Transition Metal Complexes Bearing Amino Acid Substituents *Biochemica et Biophysica Acta* **1387**, 309-316
3. Kumar, C. V., *Buranaprapuk, A.*, Opiteck, G. J., Moyer, M. B., Jockusch, S. and Turro, N. J. (1998) Photochemical protease: Site-specific photocleavage of hen egg lysozyme and bovine serum albumin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 10361-10366
4. *Buranaprapuk, A.*, Kumar, C. V. New protein scissors turned on by light, in News of the week, *Chemical & Engineering News* September 7, 1998, p.12
5. "Site-Specific Photocleavage of Proteins" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1997) **36**, 2085" was selected to be one of the four recent noteworthy articles in the area of photochemistry and photophysics *Inter-American Photochemical Society Newsletter* **21**(1), May 1998.
6. Kumar, C. V. and *Buranaprapuk, A.* (1999) Tuning the Selectivity of Protein Photocleavage: Spectroscopic and Photochemical Studies *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4262-4270

7. Kumar, C. V., *Buranaprapuk, A.*, Cho, A. and Chaudhari, A. (2000) Artificial Metallopeptidases: Regioselective Cleavage of Lysozyme, *Chem. Comm.* 597-599
8. *Buranaprapuk, A.*, Kumar, C. V., Jockusch, S., and Turro, N. J. (2000) Photochemical Protein Scissors: Role of Aromatic Residues on the Binding Affinity and Photocleavage Efficiency of Pyrenyl Peptides *Tetrahedron* 7019-7025
9. Kumar, C. V., *Buranaprapuk, A.*, and Sze, H. C. (2001) Large Chiral Discrimination of a Molecular Probe by Bovine Serum Albumin *Chem. Comm.* **3**, 297-299
10. Kumar, C. V., *Buranaprapuk, A.*, and Sze, H. C., Jockusch, S., and Turro, N. J. (2002) Chiral Protein Scissors: High Enantiomeric Selectivity for Binding and its Effect on Protein Photocleavage Efficiency and Specificity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(9), 5810-5815
11. Kumar, C. V., *Buranaprapuk, A.*, and Thota, J. (2002) Protein scissors: Photocleavage of proteins at specific locations *Proc. Indian Acad. Sci (Chem. Sci.)* **114**(6), 579-592
12. *Buranaprapuk, A.*, Chaivisuthangkura, P., Svasti, J., and Kumar, C. V. (2005) Efficient Photocleavage of Lysozyme by a new Chiral Probe *Letters in organic Chemistry* **2**(6), 554-558

Proceedings:

1. *Buranaprapuk, A.* and Kumar, C. V. "Site-Specific Photocleavage of Proteins" **25th Congress on Science and Technology of Thailand**, Bangkok, Thailand, October 19 –21, 1999. (Poster presentation)
2. *Buranaprapuk, A.* and Kumar, C. V. "Site Specific Cleavage of Proteins Activated with Light", **28th Congress on Science and Technology of Thailand**, Bangkok, Thailand, October 24 –26, 2002. (Poster presentation)
3. *Chaivisuthangkura, A.*, Ratananukul, P., Chanunpanich, N., Pinsem, W. and Fungtammasan, B. "Analysis of Biodiesel produced from Palm Stearin Oil using HPLC technique", **(Invited Lecture) 28th Congress on Science and Technology of Thailand**, Bangkok, Thailand, October 24 –26, 2002. (Oral presentation)
4. *Buranaprapuk, A.* and Kumar, C. V. "Protein Scissors: Site Specific Photocleavage of Proteins", **Protein Research Network Symposium 2002 on Protein Structure and Molecular Enzymology**, Bangkok, Thailand, October 29 –30, 2002. (Oral presentation)

5. *Chaivisuthangkura, A.*, Chavisuthangkura, P., Kumar, C. V., Svasti, J. “Cleavage of Proteins using Pyrenyl Probes Activated by Light”, **Joint Senior Research Scholar Meeting “Integration of Biological Science Protein Chemistry and Medicine”**, Bangkok, Thailand, September 14-15, 2004. (Oral presentation)

6. *Chaivisuthangkura, A.* and Kumar, C. V. “Photochemical Studies of Novel Pyrenyl Probe on Specific Cleavage of Proteins”, **30th Congress on Science and Technology of Thailand**, Bangkok, Thailand, October 19 –21, 2004. (Poster presentation)

National Publications:

Chaivisuthangkura, A. (2000) “Artificial proteases: site – specific photocleavage of proteins”, Srinakharinwirot University Science Journal, 16(1).

Research Grants:

1. **Design of Chemical Preteinases** from Thailand research fund (TRF) under senior research fellow grant of Professor M.R. Jisnuson Svasti, 2001-2007.
2. **Development of mangosteen extract for using as standards and HPLC fingerprints** from Office of the National Research Council of Thailand (NRCT), 659,000 baht, June 2005 - May 2006
3. **Photochemical and mechanistic studies on selectivity of protein photocleavage** from Srinakharinwirot University, 259,000 baht, March 2004 -February 2005
4. **Photochemical Studies of Novel Pyrenyl Probe on Specific Cleavage of Proteins** from Srinakariniwrot University, 279,000 baht, December 2002 – November 2003
5. **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** from Srinakharinwirot University, 239,000 baht, December 2001 – November 2002
6. **Travel grant** from Professor Challa V. Kumar (under NSF grant), 2,500 dollars, to do research at Department of Chemistry, University of Connecticut, USA, April–May 2001.
7. **Travel grant** from Srinakharinwirot University Travel Fellowship, 120,000 baht, to do research at Department of Chemistry, University of Connecticut, USA, 16 May–15 June 2002.