สุพรรษา ปานทุม : การศึกษาการจับกับลิแกนด์และโครงสร้างสามมิติเชิงซ้อนของไคติเนส เอ จากเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่มีตัวยับยั้งอยู่ด้วย (STUDIES OF LIGAND BINDING, AND THREE DIMENSIONAL STRUCTURES OF CHITINASE A FROM *VIBRIO HARVEYI* IN COMPLEX WITH POTENTIAL INHIBITORS)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 269 หน้า.

ไคติเนส เอ จากเชื้อ *Vibrio harveyi* หรือ *Vh*ChiA จัดอยู่ในกลุ่มของไกลโคซิลไฮโดรเลสลำดับที่ 18 ซึ่งมีส่วนประกอบของโครงสร้างหลักแบ่งเป็นสามส่วนคือ 1) โดเมนจับไคตินที่ปลายด้านอะมิโน 2) โดเมนเร่งปฏิกิริยามีโครงสร้างแบบ $(\alpha/\beta)_8$-TIM-barrel และ 3) โดเมนเล็กแทรกระหว่างโดเมนจับไคตินกับโดเมนเร่งปฏิกิริยามีโครงสร้างแบบ $\alpha+\beta$ โดเมนจับไคตินทำหน้าที่สำคัญในการจับกับไคตินสายยาว ในขณะที่โดเมนเร่งปฏิกิริยามีหน้าที่สำคัญในการจับไคตินสายสั้นและมีหน้าที่ในกระบวนการย่อยสลายไคติน งานวิจัยส่วนแรกทำการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของกรดอะมิโน Ser33 Trp70 Trp231 และ Trp245 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จัดเรียงอยู่บนพื้นผิวของไคติเนส การศึกษาผลของการกลายพันธุ์พบว่า กรดอะมิโน Trp70 ซึ่งอยู่ที่ปลายสุดของโดเมนจับไคตินมีบทบาทสำคัญที่สุดในการจับและย่อยสลายไคตินสายยาว กรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญรองลงมาคือกรดอะมิโน Ser33 ส่วนกรดอะมิโน Trp231 และ Trp245 เป็นกรดอะมิโนที่อยู่ด้านนอกของโดเมนเร่งปฏิกิริยามีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไคตินแต่ไม่มีบทบาทในการช่วยจับกับไคตินสายยาว

ในงานวิจัยส่วนที่สองตัวยับยั้งทั้งเจ็ดชนิดของไคติเนสจากเชื้อ *V. harveyi* ได้ถูกค้นพบจาก Library of Pharmacologically Active Compounds (LOPAC) โดยวิธี high-throughput screening assay พบว่า ตัวยับยั้งที่มีศักยภาพดีที่สุดคือ dequalinium ซึ่งสามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ *Vh*ChiA ที่ค่า K_i เท่ากับ 70 nM ซึ่งตัวยับยั้งจำนวนหกชนิดจากเจ็ดชนิด ยกเว้น PEN จัดเป็นตัวยับยั้งชนิดใหม่ของไคติเนสแฟมิลี 18 จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติเชิงซ้อน 14 โครงสร้างของไคติเนสกับตัวยับยั้งเหล่านี้พบว่า ลักษณะการจับของตัวยับยั้งนั้นครอบครุมพื้นที่ส่วนบนของบริเวณเร่งและจับกับบริเวณที่ไม่มีขั้ว สองตำแหน่งคือตำแหน่ง glycone ที่บริเวณจับ -4 ถึง -2 และตำแหน่ง aglycone ที่บริเวณจับ +1 ถึง +2 ซึ่งแตกต่างจากการจับของตัวยับยั้งที่ถูกค้นพบก่อนหน้านี้ โดยที่ตัวยับยั้งเหล่านั้นมีลักษณะการจับคล้ายกับ reaction intermediate โดยจะจับในร่องของบริเวณเร่งปฏิกิริยาในตำแหน่งย่อยสลายสับสเตรทที่บริเวณ -1 ในการศึกษานี้พบว่า ตัวยับยั้งเข้าจับกับเอนไซม์ดั้งเดิมในตำแหน่ง aglycone กับกรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 ด้วยสัมพรรคภาพสูงเนื่องจากแสดงแผนที่ความหนาแน่นอิเลคตรอนของตัวยับยั้งอย่างเด่นชัด ขณะที่ตัวยับยั้งจับที่

ตำแหน่ง glycone กับกรดอะมิโน Trp168 และ Val205 เป็นการจับแบบไม่แน่นอนเนื่องจากมีแผนที่ความหนาแน่นอิเลคตรอนที่ไม่ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าการจับที่ตำแหน่ง glycone มีสัมพรรคภาพต่ำ การเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp275 ไปเป็นกรดอะมิโน Gly ส่งผลให้สัมพรรคภาพในการจับของตัวยับยั้งลดลงอย่างมากและมีการเปลี่ยนรูปแบบของการจับของตัวยับยั้งโดยที่ตัวยับยั้งทั้งสองจะจับกันแบบ stacking และจับกับกรดอะมิโน Trp397 ที่ตำแหน่ง aglycone การศึกษากลไกการจับของตัวยับยั้งกับไคติเนสโดยวิธี isothermal microcalorimetry พบว่า มีสามกลไก คือ 1) a single-site-binding mode 2) a two-independent-site binding mode และ 3) a two-sequential-site binding mode ตัวยับยั้งที่มีศักยภาพในการยับยั้งดีที่สุดคือ dequalinium ซึ่งสามารถยับยั้งได้ที่ความเข้มข้นระดับ nM ถือเป็นตัวยับยั้งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะนำไปพัฒนายารักษาโรคในคนที่มีพยาธิสภาพเกี่ยวข้องกับไคติเนส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

SUPANSA PANTOOM : STUDIES OF LIGAND BINDING, AND THREE DIMENSIONAL STRUCTURES OF CHITINASE A FROM *VIBRIO HARVEYI* IN COMPLEX WITH POTENTIAL INHIBITORS.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 269 PP.

CHITIN BINDING DOMAIN/CHITINASE INHIBITORS/*VIBRIO HARVEYI* CHITINASE A/LOPAC LIBRARY

Vibrio harveyi chitinase A or *Vh*ChiA (EC 3.2.1.14) is a member of family-18 glycoside hydrolases. The structure of *Vh*ChiA comprises three main domains: i) the *N*-terminal chitin binding domain (ChBD); ii) the $(\alpha/\beta)_8$ TIM barrel catalytic domain (CatD); and iii) the α+β small insertion domain. The ChBD is important for binding to long-chain substrates, while the CatD is important for binding to chitooligosaccharides and participating in enzyme catalysis. In the first part of this study, four surface-exposed residues (Trp70, Ser33, Trp231, and Tyr245) were investigated. Mutational analysis suggested that Trp70 located at the end of the ChBD is crucial for binding and catalytic activities of *Vh*ChiA towards chitin polymer. Ser33 located nearby also showed binding effects, but to a lesser extent. The other two residues, Trp231 and Tyr245, which are located outside the substrate-binding cleft, are involved in chitin hydrolysis, but do not play a major role in the chitin binding process.

In the second part of this study, seven inhibitors against *Vh*ChiA were identified from the Library of Pharmacologically Active Compounds (LOPAC) by a high throughput screening assay, with dequalinium being the most active with the K_i of 70 nM. Six out of the seven inhibitors are novel in their inhibitory effects against

family-18 chitinases. Fourteen *Vh*ChiA-inhibitor complexes revealed that all the inhibitor molecules only occupied the upper part of the substrate binding cleft in two hydrophobic areas (the glycone area around subsites -4 to -2 and the aglycone area around substies +1 and +2). Such findings are different from the previously-reported inhibitors that mimicked the reaction intermediate by occupying the bottom of the chitinase's active site at subsite -1. The binding of the inhibitors to the wild-type enzyme at the algycone sites are well defined and tightly associated with the two important aromatic residues Trp397 and Trp275, whereas interactions at the glycone sites are connected with two consensus residues, Trp168 and Val205, and are patchy with an ill-defined inhibitor density, indicating lower affinity of binding at the glycone subsites. When Trp275 was substituted with glycine (mutant W275G), the binding affinities towards all the inhibitors dramatically decreased and in most structures two inhibitor molecules were found to stack against Trp397 at the aglycone binding site. Isothermal microcalorimetry confirmed that the inhibitors occupied the active site of *Vh*ChiA in three different binding modes, including 1) a single-site-binding mode 2) a two-independent-site binding mode; and 3) a two-sequential-site binding mode. From chemical biology point of view, dequalinium, the most potent inhibitor with the inhibitory effect at low nM level, could serve as an extremely attractive lead compound for plausible development of therapeutics against human diseases involving chitinase-mediated pathologies.

School of Biochemistry Student's Signature _____

Academic Year 2011 Advisor's Signature _____

Co-adviser's Signature _____