

Molecular Docking และการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของซาร์สซีเอสเตอินโปรตีนเอสที่ยึดเหนี่ยวกับสับสเตรทจำเพาะ

ครองศักดิ์ ภัคธนนก¹ กนก รัตนะกนกชัย² คิน เลย์ คู³
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
พรเทพ สมพรพิสุทธิ์⁴
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
และ สุรพงษ์ พิณจกลาง⁵
มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ดินแดง กรุงเทพฯ 10400

รับเมื่อ 28 มิถุนายน 2550 ตอบรับเมื่อ 19 มิถุนายน 2551

บทคัดย่อ

ซีเอสเตอินโปรตีนเอสของไวรัสโคโรนา (CoVMPpro) เป็นเอนไซม์เป้าหมายเพื่อการวิจัยและพัฒนาายต้านไวรัสโรคระบบทางเดินหายใจรุนแรง (ซาร์ส) บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นร่องขนาดใหญ่ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นหน่วยย่อยได้หลายบริเวณ หน่วยย่อย S5-S4-S3-S2-S1-S1'-S2'-S3' มีความเหมาะสมกับสับสเตรทจำเพาะ octapeptide (P5Thr-P4Val-P3Lys-P2Leu-P1Gln-P1'Ala-P2'Gly-P3'Phe) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ octapeptide โดย molecular docking ร่วมกับการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล ผลการศึกษาบ่งชี้ว่า S3, S1 และ S4 เป็นหน่วยย่อยวิกฤติที่จำเพาะกับการยึดเหนี่ยวกับ octapeptide S3Glu47 จำเพาะกับ P3Lys แบบอันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้า S1 จำเพาะกับ P1Gln ด้วยพันธะไฮโดรเจน และ S4' Thr-cluster (residues 21, 24-26 และ 45) จำเพาะกับปลาย C-terminal ของ octapeptide ด้วยพันธะไฮโดรเจน และมีน้ำจำนวนมากในรัศมี 5 Å ของ octapeptide ที่มีส่วนในการยึดเหนี่ยว ขณะที่การจำลองพลวัตหลังจากเวลา 500 พิโควินาทีพบความยืดหยุ่นของสายโปรตีน one turn α -helix โดยทำให้เกิดลักษณะของ induced fit

คำสำคัญ : ซีเอสเตอินโปรตีนเอส / Molecular Docking / การจำลองทางพลวัต / ซาร์ส

*Corresponding author: E-mail: surapong_pin@utcc.ac.th

- 1 นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
- 2 รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
- 3 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
- 4 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
- 5 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation of SARS Cysteine Proteinase in Complex with Its Specific Substrate

Krongsakda Phakthanakanok ¹, Khanok Ratanakhanokchai ², Khin Lay Kyu ³,

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thakham, Bangkok, Bangkok 10150

Pornthep Sompornpisut ⁴,

Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok, 10330

and Surapong Pinitglang ^{5*}

The University of the Thai Chamber of Commerce, Dindaeng, Bangkok 10400

Received 28 June 2007 ; accepted 19 June 2008

Abstract

The coronavirus main cysteine proteinase (CoVMpro) is a key target for drug development against severe acute respiratory syndrome virus (SARS). The active site of the enzyme is large cleft which is divided with several subsites. Subsites region, S5-S4-S3-S2-S1S1'-S2'-S3' where accommodated with specific octapeptide (P5Thr-P4Val-P3Lys-P2Leu-P1Gln-P1'Ala-P2'Gly-P3'Phe). The research is to investigate interaction between the enzyme and the octapeptide using molecular docking including molecular dynamics simulation. The results indicated that S3, S1 and S4' should be critical subsites for specific octapeptide binding. S3Glu47 specific to P3Lys with electrostatic interaction, S1 specific to P1Gln, including S4Thr-cluster (residues 21, 24-26 and 45) specific to octapeptide at C-terminal with hydrogen bonds. Several waters within 5 Å of octapeptide related to binding mode. Molecular dynamics simulation after 500 ps indicated that protein chain of one turn α -helix was highly flexible and became to induced fit model in the latter.

Keywords : Cysteine Proteinase / Molecular Docking / Molecular Dynamics Simulation / SARS

* Corresponding author: E-mail: surapong_pin@utcc.ac.th

¹ Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

² Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

³ Assistant Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

⁴ Assistant Professor, Computational Chemistry Unit Cell, Department of Chemistry, Faculty of Science.

⁵ Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Science.

1. บทนำ

เมื่อกลางปี พ.ศ. 2546 โรคระบบทางเดินหายใจรุนแรง (Severe Acute Respiratory Syndrome) หรือโรคหวัดมรณะ หรือโรคซาร์ส (SARS) เป็นกลุ่มอาการที่มีลักษณะคล้ายโรคหวัด แต่มีอาการที่รุนแรงกว่า ในรายของผู้ป่วยที่ไม่สามารถรักษาได้ทันจะเสียชีวิตจากอาการปอดอักเสบภายในระยะเวลาไม่เกิน 60 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ [1-3] ซาร์สได้แพร่ระบาดไปทั่วโลกโดยเชื่อว่าต้นกำเนิดของโรคเริ่มระบาดมาจากนกหวัดกลางต้งของประเทศจีน องค์การอนามัยโลกได้รายงานอย่างเป็นทางการว่าซาร์สได้ระบาดจากภูมิภาคเอเชียไปสู่อเมริกาภายในระยะเวลาเพียงเดือนเดียว โดยประชากรโลกกว่า 10,000 คนติดเชื้อ และกว่า 1,000 คนเสียชีวิต [4] นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาจนพบว่าต้นเหตุของซาร์สเกิดจากไวรัสสายพันธุ์โคโรนา ซึ่งไวรัสชนิดนี้เป็นที่รู้จักกันมานานแล้วแต่ไม่เคยพบว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการปอดอักเสบชนิดรุนแรง ต่อมาภายหลังจึงมีรายงานว่าปอดโคโรนาไวรัสสายพันธุ์ใหม่ [5-6] แม้ว่าในปัจจุบันจะไม่มีรายงานจากองค์การอนามัยโลกถึงผู้ที่เสียชีวิตจากซาร์ส (อาจมีการแพร่ระบาดแต่หากรักษาอาการให้ตรงตัวก็ไม่น่าเป็นอันตรายถึงชีวิต) แต่ก็มีการศึกษาเพื่อค้นคว้าและพัฒนาายาต้านไวรัสรวมทั้งวัคซีนป้องกันการแพร่ระบาดของซาร์สกันอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากอาจมีความเป็นไปได้ที่ซาร์สจะกลับมาระบาดหนักอีกครั้งและอาจมีความรุนแรงกว่าที่เคยเกิดขึ้นในอดีต นักวิทยาศาสตร์สามารถพิสูจน์ได้ว่าเอนไซม์โปรตีนเอสของไวรัสโคโรนา (Coronavirus Main Proteinase; SARS CoVpro) ที่ไวรัสสร้างขึ้นมีความสำคัญในกระบวนการ gene replication เพื่อการขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ที่ถูก infect ดังนั้น SARS CoVpro จึงกลายเป็นโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญ เพื่อการวิจัยและพัฒนาายาต้านไวรัสซาร์สในเวลาต่อมา [7]

เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์ SARS CoVpro การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์รวมทั้งความจำเพาะของบริเวณเร่งปฏิกิริยาจึงเป็นสิ่งสำคัญ ข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปเป็นพื้นฐานเพื่อใช้ในการออกแบบโมเลกุลสารยับยั้งหรือโมเลกุลยาที่มีความจำเพาะและมีความปลอดภัยสูง ลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์นี้เคยมีรายงานว่าเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase ที่มี

กรดอะมิโน His และ Cys เป็น catalytic dyads อยู่ในบริเวณเร่งปฏิกิริยา แต่ลักษณะการขดตัวของโมเลกุลเอนไซม์กลับมีความคล้ายคลึงอย่างมากกับเอนไซม์ในกลุ่ม serine proteinase [8] โดยบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVpro มีพื้นที่กว้างกว่า 20 Å และสามารถแบ่งออกเป็นบริเวณย่อย (subsite) ได้จำนวนมาก ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีจำนวนมากถึง 10 subsites และสามารถยึดเหนี่ยวลิบสเตรทที่มีความยาวได้มากถึง 10 หน่วย (residue) โดยแต่ละ subsite ถูกกำหนดให้มีสัญลักษณ์เป็น S และ S' ดังนี้คือ S5-S4-S3-S2-S1-S1'-S2'-S3'-S4-S5' ในทำนองเดียวกันลิบสเตรทที่จะเข้ามายึดเหนี่ยวกับในแต่ละ subsite ถูกกำหนดให้มีสัญลักษณ์เป็น P และ P' ดังนี้คือ P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5' ทั้งนี้บริเวณที่เป็น catalytic site ที่มี catalytic dyad จะอยู่ระหว่าง S1 และ S1' ในอีกทางหนึ่งลิบสเตรทจะถูกลอยสลายที่ตำแหน่ง P1-↓-P1' เช่นกัน (ลูกศรคือตำแหน่งพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัด) [9-10] ต่อมาจึงมีรายงานว่าบริเวณยึดเหนี่ยววิกฤติของเอนไซม์ (critical binding site) ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการยึดจับกับลิบสเตรทรวมทั้งสารยับยั้งมีอยู่ด้วยกัน 6 subsites คือบริเวณ S3-S2-S1-S1'-S2'-S3' ซึ่งจากการศึกษาความจำเพาะของ subsites เหล่านี้ต่อลิบสเตรท พบว่า S2 และ S1 มีความจำเพาะต่อ P2Leu และ P1Gln ตามลำดับอย่างยิ่งยวด รูปแบบความจำเพาะนี้มีความเหมือนกับเอนไซม์โปรตีนเอสจากไวรัสสายพันธุ์อื่นจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ mouse hepatitis, picornavirus และ Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) ส่วนในกรณี subsite อื่นๆ นอกเหนือจากนี้ยังไม่มียาที่แน่นอนว่ามีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนของลิบสเตรทชนิดใด แต่มีการพิสูจน์แล้วว่า subsite อื่นๆ ไม่ได้มีความจำเพาะเหมือนกับเอนไซม์โปรตีนเอสจากไวรัสทั้งสามสายพันธุ์ที่กล่าวมาข้างต้น [10-15]

Fan และคณะ [16] ทำการศึกษา substrate specificity ของเอนไซม์ SARS CoV Mpro พบว่าลิบสเตรท octapeptide ที่มีลำดับของ P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3' คือ Thr-Val-Lys-Leu-Gln-Ala-Gly-Phe เป็นลิบสเตรทที่เกิดการยึดเหนี่ยวรวมทั้งการ hydrolysis ได้ดีที่สุด ซึ่งดีกว่าลิบสเตรทชนิดอื่นที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้

ถึง 4 เท่า [13, 16] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีความชัดเจนว่า กรดอะมิโนแต่ละ P ของสับสเตรทจำเพาะนี้มีความสำคัญต่อการเกิดอันตรกิริยาอย่างไรเมื่อเข้าไปยึดเหนี่ยวในแต่ละ subsite ของบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ขณะที่วิธีวิธีหนึ่งที่จะสามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลได้ดีและกำลังเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน คือการจำลองแบบทางโมเลกุล (molecular modeling) ในเชิงของ molecular docking ร่วมกับการศึกษาสมบัติทางพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics simulation; MD simulation) โดยวิธีวิธีนี้จะสามารถศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลในลักษณะ 3 มิติ ซึ่งถือเป็นการสังเกตพฤติกรรมของโมเลกุลที่เสมือนจริง โดยอาศัยการคำนวณอันตรกิริยาของอะตอมต่างๆ บนพื้นฐานของสมการทางเคมีเชิงฟิสิกส์ และนำผลที่ได้ในรูปแบบของค่าพลังงานอิสระ (ΔG) หรือพลังงานพลศาสตร์ (potential energy) มาใช้เพื่ออธิบายความจำเพาะหรือศักยภาพในการเกิดปฏิกิริยาของสารที่กำลังสนใจในระบบใดระบบหนึ่ง

งานวิจัยนี้ได้นำวิธีการ molecular docking และ molecular dynamics simulation มาใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ SARS CoVMpro กับโมเลกุลสับสเตรทจำเพาะที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ [14-17] โดยจะทำการจำลองระบบการเกิดปฏิกิริยาแบบเสมือนจริงควบคู่ไปกับการศึกษาลักษณะของปฏิกิริยาทางเคมีในแต่ละ subsite ของเอนไซม์ SARS CoVMpro ว่าสัมพันธ์กันอย่างไรกับโครงสร้างและรูปแบบของสับสเตรทจึงทำให้เกิดการยึดจับอย่างจำเพาะ ผลที่ได้จากการศึกษาคือข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปเป็นองค์ความรู้พื้นฐานเพื่อการออกแบบโมเลกุลยาที่มีศักยภาพสูงในการต้านไวรัสซาร์สในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 คอมพิวเตอร์และโปรแกรม

(1) ทุกขั้นตอนของงานวิจัยนี้ใช้ระบบคอมพิวเตอร์ทั้งหมดโดยอาศัยข้อมูลที่มีอยู่แล้วที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการมาใช้ในการสร้างระบบเสมือนจริงซึ่งโปรแกรม คอมพิวเตอร์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยโปรแกรม Insight II version 2001 และ modules

ต่างๆ ได้แก่ Builder, Discover, Biopolymer และ Homology ของ Accelrys, USA. โปรแกรม Autodock version 3.0.5 และ Autodock Tool ของ Scripp, USA. และโปรแกรม GROMACS version 3.3.1 ของ University of Groningen, Netherlands

(2) คอมพิวเตอร์ cluster ที่ประกอบด้วย AMD Athlon 3500+ 64Bit 2 nodes, AMD Athlon 2500+ 1 node, Intel Pentium IV 3.0 GHz 2 nodes และ Silicon Graphic O2 workstation R12000

2.2 การเตรียมโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์

SARS CoVMpro และสับสเตรท

(1) โครงสร้างของเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่ให้นำมาจากฐานข้อมูลธนาคารโปรตีนด้วยรหัส 1UK4 [10] โดยโครงสร้างจะมีองค์ประกอบของโมเลกุลน้ำและสารยับยั้ง จึงต้องลบโมเลกุลเหล่านี้ออกไปให้เหลือเพียงโครงสร้างหลักของเอนไซม์เท่านั้น ซึ่งโครงสร้างหลักของเอนไซม์มีลักษณะเป็น dimer form จึงนำโครงสร้าง dimer form นี้มาดำเนินการในขั้นตอนต่อไป และเนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์มีกรดอะมิโนที่ปลาย N และ C terminal หายไปจำนวนหนึ่งจึงทำการต่อเติมกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Builder ร่วมกับ Biopolymer จากนั้นทำการปรับสภาพโครงสร้างให้อยู่ในลักษณะเสถียรภาพ (ลักษณะโครงสร้างที่บริสุทธิ์ปราศจากโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งน่าจะเป็นโครงสร้างจริงในระบบของธรรมชาติ) ด้วยการทำ energy minimization โดยใช้วิธีการคำนวณแบบ Steepest descent 10,000 ครั้ง ต่อเนื่องด้วยวิธีการคำนวณแบบ Conjugate Gradient 10,000 ครั้ง โครงสร้างสุดท้ายที่ได้จะนำไปใช้ในการศึกษา molecular docking และ MD simulation ในลำดับต่อไป

(2) โครงสร้างของสับสเตรทที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ octapeptide ที่มีลำดับคือ Thr-Val-lys-Leu-Gln-Ala-Gly-Phe โดยทำการสร้าง octapeptide ด้วย Builder module จากนั้นปรับสภาพโครงสร้างในแบบเดียวกับที่ใช้สำหรับเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ (1) โครงสร้างสุดท้ายที่ได้จะนำไปใช้ในการศึกษา molecular docking และ MD simulation ในลำดับต่อไป

2.3 Molecular docking

งานวิจัยนี้จะทำการ docking octapeptide เข้าไปภายในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่ monomer A เท่านั้น โดยใช้โปรแกรม Autodock ในการศึกษาลักษณะการยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์ SARS CoV Mpro กับ octapeptide โดยกำหนดให้ศูนย์กลางของการคำนวณอันตรกิริยาคือกรดอะมิโน Cys145 ซึ่งเป็น catalytic dyad ของเอนไซม์ และกำหนดให้ octapeptide เข้าไปทำอันตรกิริยาในบริเวณเร่งปฏิกิริยาแบบยึดเหนี่ยวที่ C^α backbone แล้วทำการคำนวณประจุไฟฟ้าของเอนไซม์และ octapeptide แบบ Kollman และ Gasteiger [18] ตามลำดับ พารามิเตอร์ที่สำคัญสำหรับใช้ในการคำนวณของระบบได้กำหนดค่าดังนี้คือ ใช้ gridbox ขนาด 60x60x60 Å ใช้ Lamarckian genetic algorithm (LGA) energy evaluation = 5,000,000, generations = 270,000, population size = 100, mutation rate and cross over = 0.02 และ 0.8 constraint = 300 และใช้ pseudo-solis and Wets local search และ parameter นอกจากนี้ให้กำหนดเป็นค่า default ทั้งหมด จากนั้นทำการ run = 100 run เป็นจำนวน 50 รอบ โดยจะได้รูปแบบการยึดเหนี่ยวของ octapeptide ภายหลังจากคำนวณทั้งหมดเป็นจำนวน 5,000 แบบ จากนั้นทำการจัดกลุ่ม (cluster) รูปแบบที่ได้ด้วยการคัดกรองทางสถิติ root mean square deviation (RMSD) = 3.0 ซึ่ง octapeptide ที่มี conformation ต่างกันไม่เกิน 3.0 Å จะถูกจัดให้มาอยู่ใน cluster เดียวกัน จากนั้นให้เลือก cluster ที่มี population มากที่สุด และนำโครงสร้างที่มีค่าพลังงาน docking energy ต่ำที่สุดใน cluster นั้นมาวิเคราะห์ผลควบคู่ไปกับการทำ MD simulation ในขั้นตอนต่อไป

2.4 Molecular dynamics simulation

ใช้โปรแกรม GROMACS ในการจำลองระบบพลวัต โดยกำหนดให้โมเลกุลเอนไซม์เป็นแบบ dimer form ที่มี octapeptide จากผลของ molecular docking ยึดเหนี่ยวอยู่ ซึ่งเป็นระบบในน้ำบริสุทธิ์ที่อยู่ในกล่องจำลองขนาด 10x10x10 นาโนเมตร การปรับค่าเฉพาะของเอนไซม์เกี่ยวกับสภาพ protonate state และ charge ของ side chain ก่อนที่จะทำการ simulation ให้ปรับค่าตาม

งานวิจัยที่ได้ทำไว้ก่อนหน้านี้ [19] ต่อมาปรับ parameter ของระบบให้เหมาะสมกับงานวิจัยนี้คือ ใช้ GROMOS-96 force field ใช้น้ำ SPC โมเดล กำหนดระยะห่างของกล่องกับพื้นผิวโมเลกุลเอนไซม์เท่ากับ 1 นาโนเมตร ค่า electrostatic interaction ใช้วิธี Particle Mesh Ewald = 0.6, Lennard-Jones interaction = 9 Å, temperature constant = 310 K ด้วย Berendsen 0.1 ps, pressure = 1.0 bar ด้วย 1.0 ps, bonds length ใช้ LINCS algorithm, time step = 2fs อดตอมทั้งหมดในระบบมีจำนวน 96,800 อดตอม ทำการ initial state เพื่อปรับสภาพโมเลกุลน้ำก่อนโดยใช้ช่วงเวลา 100 ps จากนั้นจึงเข้าสู่ equilibrate state โดยใช้ช่วงเวลาของการ simulation เท่ากับ 2,000 ps เก็บค่าของการคำนวณทุกๆ 1 ps และ snapshot อันตรกิริยาทุกๆ 100 ps การทดลองทั้งระบบจะใช้เวลาประมาณ 120 ชม. และพื้นที่สำหรับเก็บข้อมูลประมาณ 5 Gb

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

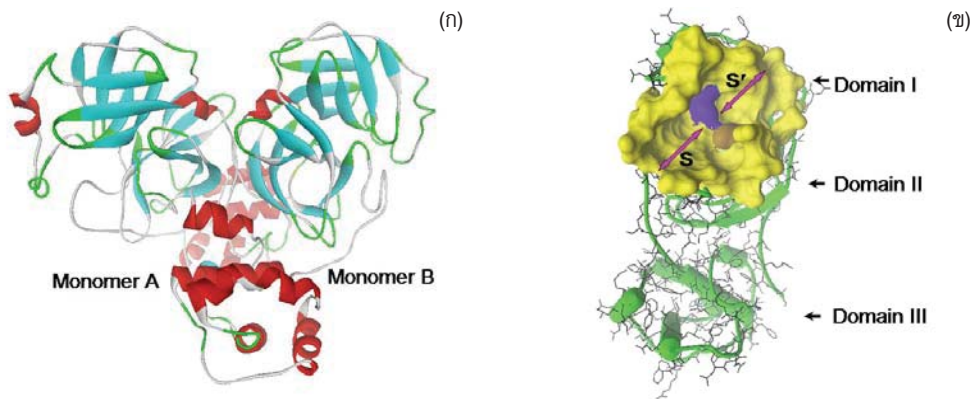
3.1 Energy minimization โครงสร้างของเอนไซม์ SARS CoVMpro

ขั้นตอนการเตรียมโครงสร้างของเอนไซม์จำเป็นต้องปรับสภาพโครงสร้างให้ดีก่อน โดยการทำ energy minimization เพื่อหลีกเลี่ยงสภาพการชนหรือเกี่ยวกันหรือ bad van der waals ของอดตอม ดังนั้นการเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างบางส่วนรวมทั้งการหมุนตัวของ side chain ของกรดอะมิโนจึงต้องเกิดขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การตรวจสอบโครงสร้างของเอนไซม์ภายหลังจาก minimization ก่อนที่จะนำโครงสร้างไปใช้ในขั้นตอนต่อไปจึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก

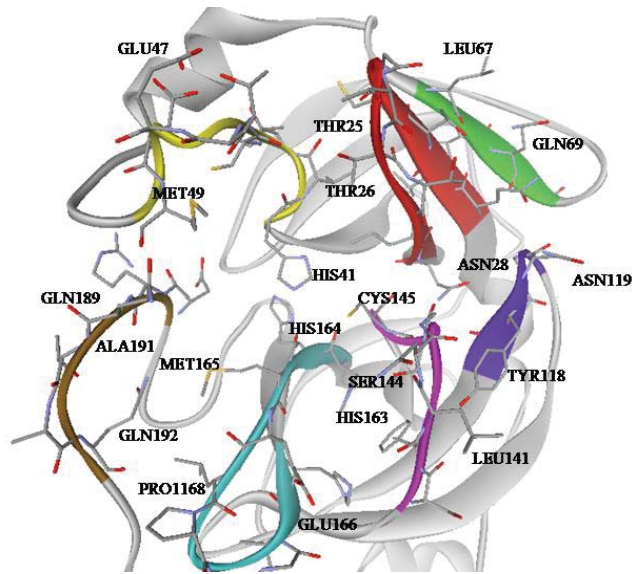
งานวิจัยนี้พบว่าโครงสร้างเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่นำมาใช้ (1UK4) มีกรดอะมิโนบางหน่วยขาดหายไปแต่สามารถต่อเติมจนสมบูรณ์ได้ โดยโครงสร้างเอนไซม์รวมทั้งบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ SARS CoVMpro ที่ได้ minimization แล้วแสดงดังรูปที่ 1 และ 2 โดยทั่วไปเอนไซม์ SARs CoVMpro มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 33 kDa และในธรรมชาติมักอยู่ในลักษณะเป็นโปรตีนโมเลกุลคู่ (dimer protein) มีลำดับของกรดอะมิโนทั้งหมดจำนวน 306 หน่วยต่อโปรตีนโมเลกุลเดี่ยว โดย

มีการแบ่งโครงสร้างเอนไซม์ออกเป็น 3 domain ได้แก่ domain I คือกรดอะมิโนลำดับที่ 8-10 domain II คือกรดอะมิโนลำดับที่ 102-184 และ domain III คือกรดอะมิโนลำดับที่ 201-303 นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่มีลักษณะเป็นสายยาว (long loop) คือกรดอะมิโนลำดับที่ 185-200 ซึ่งทำหน้าที่เชื่อม domain II และ III เข้าไว้เป็นโปรตีนสายเดียวกัน บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (รวมทั้งบริเวณยึดเหนี่ยว; binding site) เป็นบริเวณร่องกว้าง

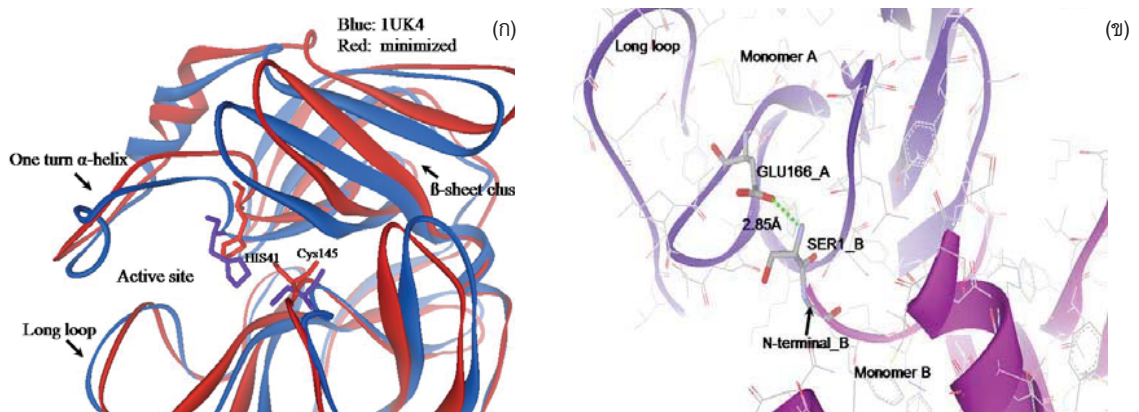
และลึก (cleft) อยู่ในช่องว่างระหว่าง domain I และ II หลังจากทำการปรับสภาพโครงสร้างของเอนไซม์ด้วย energy minimization 2 ขั้นตอน พบว่าโครงสร้างของเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย เมื่อนำโครงสร้าง C^αbackbone ของเอนไซม์ก่อนการ minimization มาซ้อนทับ (superposition) กับโครงสร้างของเอนไซม์หลังจากการ minimization และวัดค่าความแตกต่างด้วย RMSD พบว่ามีความแตกต่างกันเท่ากับ 1.24 Å



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลเอนไซม์ SARS CoVMpro หลังจากทำการปรับสภาพโครงสร้างด้วยการ minimization แล้ว (ก) ribbon model แสดงลักษณะการจับกันเป็นโปรตีนคู่ (dimer form) ของเอนไซม์ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในธรรมชาติ โดยเรียกแต่ละโปรตีนเดี่ยวว่า monomer A และ monomer B ซึ่งโครงสร้างของเอนไซม์ทั้งสอง monomer นี้มีโครงสร้างการขดตัว และลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกันร้อยละ 100 ส่วน (ข) ribbon model แสดงโครงสร้างเอนไซม์ 1 monomer ที่แบ่งออกเป็น domain I, II และ III โดยบริเวณเร่งปฏิกิริยาซึ่งมีลักษณะเป็นร่องขนาดใหญ่จะอยู่ระหว่าง domains I และ II (yellow surface model) บริเวณเร่งปฏิกิริยาถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ S subsite และ S' subsite โดยมีความกว้างตลอดแนว S ไปยัง S' ประมาณ 20 Å และ catalytic dyad ได้แก่ His41 (blue surface) และ Cys145 (brown surface)



รูปที่ 2 โครงสร้างบริเวณเร่งปฏิกิริยา รวมทั้งกรดอะมิโนที่แวดล้อมอยู่รอบๆ catalytic dyad (His41, Cys145) ของเอนไซม์ SARS CoVMpro โดยบริเวณนี้สามารถแบ่งออกเป็น 7 ส่วน คือ red β -sheet: residues 19-28, yellow one turn α -helix: residues 41-49, green β -sheet: residues 67-70, blue β -sheet: residues 117-120, pink loop: residues 139-145, sky blue loop: residues 163-172 และ brown long loop: residues 187-192 บริเวณที่ประกอบด้วยโครงสร้างชนิด β -sheet หลายๆ ส่วนรวมกันเรียกว่า β -sheet cluster และถูกกำหนดให้อยู่ในตำแหน่งของ S' subsite ขณะที่ส่วนอื่นๆ ซึ่งมีโครงสร้างเป็น loop ถูกกำหนดให้อยู่ในตำแหน่งของ S' subsite



รูปที่ 3 ลักษณะโครงสร้างบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro หลังการทำ energy minimization โดย (ก) คือ superposition เปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างก่อน (สีฟ้า) และหลัง (แดง) minimization ซึ่งตำแหน่งที่โครงสร้างมีความแตกต่างกันมากคือ one turn α -helix โดยค่าความแตกต่างของ RMSD เท่ากับ 4.65 Å แต่ยังคงถือว่าเป็นโครงสร้างที่เป็น active form เนื่องจากเคยพบลักษณะเช่นนี้ใน crystal structure [8, 10] และเรียกลักษณะการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า open mouth ส่วน (ข) คือ model แสดงกรดอะมิโน Glu166_A ที่พบว่ายังคงมีพันธะไฮโดรเจนอยู่กับ Ser1_B หลังจาก minimization

เมื่อทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างบริเวณเร่งปฏิกิริยารวมทั้ง side chain ของกรดอะมิโนรอบๆ catalytic dyad ของเอนไซม์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ C^αbackbone ที่ตำแหน่ง one turn α -helix (residues 41-49) และตำแหน่ง long loop (Residues 187-192) โดยมีค่าการเปลี่ยนแปลงของ RMSD เท่ากับ 4.65 และ 1.26 Å ตามลำดับ ส่วนตำแหน่ง β -sheet cluster พบว่าโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปน้อยมากโดยค่า RMSD มีค่าไม่เกิน 0.5 ในกรณีบริเวณ one turn α -helix (residues 41-49) มีการเปลี่ยนแปลงมากพอสมควรหลังจากการ minimization ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยศึกษามาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีความยืดหยุ่นสูง [19] และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของบริเวณนี้ยังขึ้นกับสภาพแวดล้อมอื่นๆ ด้วย เช่น ค่า pH ชนิดของ solvent และอุณหภูมิ เป็นต้น การศึกษาพลวัตก่อนหน้านี้บ่งชี้ว่าบริเวณนี้มีการเคลื่อนไหวของ C^αbackbone ตลอดเวลาของการ simulation รูปแบบการเคลื่อนไหวเช่นนี้มีลักษณะเหมือนการเปิดและปิดปาก (open and close mouth) [8-15] เช่นเดียวกับโครงสร้างของ crystal structure ของเอนไซม์ SARS CoV Mpro ที่มีในธนาคารโปรตีน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบริเวณนี้มีทั้งรูปร่างแบบ open mouth และ close ขึ้นกับชนิดของสารยับยั้งและสภาวะแวดล้อมในการตกผลึกของโครงสร้างนั้นๆ อย่างไรก็ตาม บริเวณ one turn α -helix (residues 41-49) ในงานวิจัยนี้มีลักษณะเป็น open mouth คือสายโปรตีนที่เคยขดตัวอยู่ได้คลายออกและเหยียดเป็นสายเรียบแต่ยังคงโค้งตัวเป็น turn model อยู่ (รูปที่ 3ก)

ลักษณะของ dimer protein ของ SARS CoVMpro จะมีเพียง monomer เดียวเท่านั้นที่เป็น active form โดย

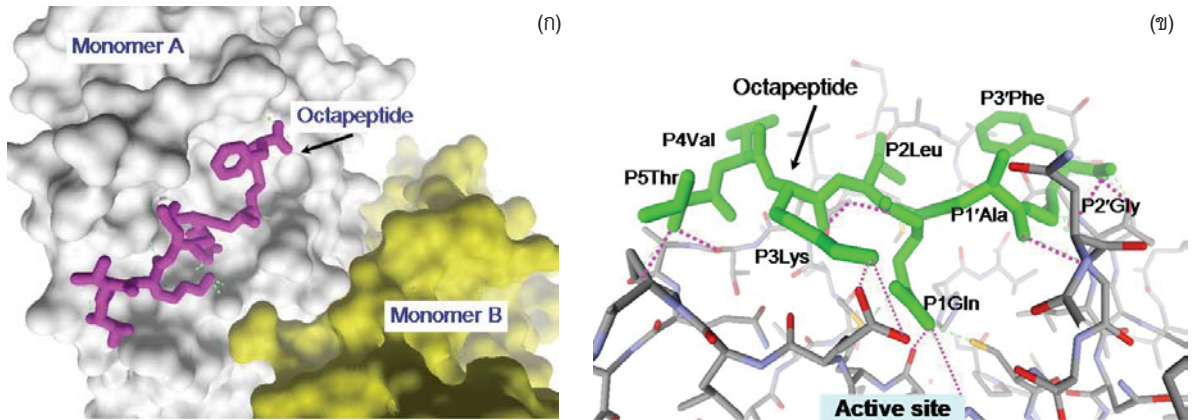
กำหนดให้ active monomer คือ monomer A ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากกรดอะมิโน Glu166_A จะต้องมีพันธะไฮโดรเจนกับ Ser1__B จึงเกิดการตรึง side chain ของ Glu166_A ไม่ให้เข้าไปขวาง S1 subsite pocket ในอีกทางหนึ่งที่ Glu166_B ไม่มีพันธะไฮโดรเจนกับ Ser1__A ในเวลาต่อมา side chain ของ Glu166_B จะหมุนตัวและชี้เข้าไปในโพรงของ S1 subsite สภาพเช่นนี้ sidechain ของ Glu166_B จะเป็นตัวกีดขวางไม่ให้สับสเตรทเข้ามายึดเหนี่ยวได้ เนื่องจาก S1 subsite เป็น critical binding site ของ SARS CoVMpro สำหรับลักษณะของ Glu166 ของงานวิจัยนี้หลังจากการ minimization แล้วพบว่า Glu166_A ยังคงมีพันธะไฮโดรเจนกับ Ser1__B อยู่ด้วยระยะทางเท่ากับ 2.85 Å (รูปที่ 3ข) โดยโครงสร้างของเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่ได้จากขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะนำไปใช้ในขั้นตอน molecular docking และ molecular dynamics simulation ต่อไป

3.2 Molecular docking

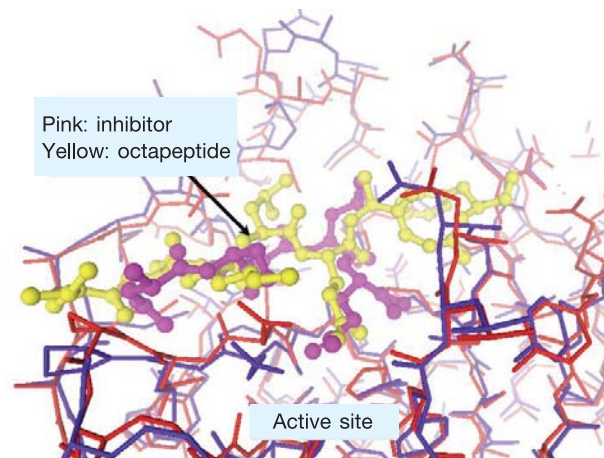
ในการศึกษาการยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยากับ octapeptide ด้วย Autodock นั้นกำหนดให้โมเลกุลเอนไซม์ rigid ขณะที่โมเลกุล octapeptide ยืดหยุ่น ผลของการศึกษาจะอยู่ในรูปแบบของค่าพลังงานที่เรียกว่า docking energy (kcal/mol) (ตารางที่ 1) ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำโครงสร้างของ octapeptide ที่อยู่ใน cluster ที่มี population มากที่สุดคือ cluster ที่ 6 มาทำการวิเคราะห์ (โดยทั่วไปโปรแกรมจะจัดโครงสร้างที่มีค่าพลังงานต่ำที่สุดไว้เป็นอันดับแรกใน cluster นั้นๆ) โดยผลของการยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์ SARS CoV Mpro กับ octapeptide แสดงดังรูปที่ 4

ตารางที่ 1 ค่าพลังงาน mean docking energy ของการคำนวณลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide กับเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่ได้จากการคำนวณของโปรแกรม Autodock โดยเลือก cluster ที่มี population มากที่สุด (cluster 6) เนื่องจากเชื่อว่าจะมีโอกาสเกิดขึ้นมากที่สุดในระบบจริง และเลือกโครงสร้างที่ให้ค่าพลังงาน docking energy ต่ำที่สุดใน cluster ที่ 6 มาใช้ในขั้นตอน MD simulation ต่อไป

Cluster	Mean docking energy (kcal/mol)	Population
1	-18.05	40
2	-16.46	24
3	-16.28	16
4	-14.84	12
5	-14.16	51
6	-13.45	1,482
7	-13.21	51
8	-13.02	15
9	-11.79	30
10	-10.46	980
11	-10.23	250
12	-9.43	160
13	-8.91	1,201
14	-8.21	150
15	-6.11	260
16	-5.21	80
17	-5.09	58
18	-1.22	29
19	+2.45	111



รูปที่ 4 ลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro โดย (ก) คือ ผลของการ docking ที่แสดงให้เห็นว่า octapeptide (pink stick model) สามารถเข้าไปยึดเหนี่ยวในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro monomer A (gray surface model) ได้อย่างแน่นแฟ้น ส่วน (ข) คือ model แสดงกรดอะมิโนของเอนไซม์ SARS CoVMpro ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ octapeptide ในรัศมี 5 Å ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจน (เส้นประสีชมพู) ซึ่งกันและกันระหว่าง octapeptide กับเอนไซม์จำนวน 13 พันธะ



รูปที่ 5 Superposition ระหว่างโครงสร้างเอนไซม์ที่ยึดเหนี่ยวกับสารยับยั้ง (crystal structure 1UK4) กับโครงสร้างเอนไซม์ที่ยึดเหนี่ยวกับ octapeptide แสดงให้เห็นว่าผลของการยึดเหนี่ยว octapeptide ที่ได้จากการ docking มีความถูกต้องแม่นยำเนื่องจากโครงสร้าง octapeptide อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับโครงสร้างของสารยับยั้งจาก crystal structure [10]

จากผลของการ docking พบว่า octapeptide สามารถเข้าไปยึดเหนี่ยวในบริเวณเร่งปฏิกิริยาได้อย่างพอดี และเพื่อเป็นการยืนยันว่าลักษณะการยึดเหนี่ยวจากการ docking นั้น อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องและน่าจะเป็นจริงมากที่สุด ในธรรมชาติ จึงได้มีการนำโครงสร้างของสารยับยั้งที่ได้ถูกดึงออกไปในตอนแรกกลับมาเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่ได้จากการ docking [10] ผลของการเปรียบเทียบแสดงดังรูปที่ 5 ซึ่งพบว่า C^αbackbone ที่ตำแหน่ง P5Thr-P4Val-P3Lys-P2Leu-P1Gln ของ octapeptide อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับ C^αbackbone ของสารยับยั้ง ตำแหน่งที่สำคัญมากเช่นตำแหน่งของ side chain ของ P1Gln ซึ่งหันเข้าไปใน pocket ของ S1 subsite และมีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือ ที่ Glu166 และ His163 เหมือนกันกับ P1Gln ของสารยับยั้งทุกประการ และสำหรับลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide ที่ได้จากการ docking นี้ได้ทำการคำนวณพันธะไฮโดรเจนที่

สามารถจะเกิดขึ้นได้ระหว่างเอนไซม์กับ octapeptide ภายในระยะทางไม่เกิน 3 Å และมุมอย่างน้อย $\theta = 135$ ซึ่งพบว่ามีพันธะไฮโดรเจนที่ว่าจะเกิดขึ้นได้ทั้งสิ้นจำนวน 13 พันธะ คือที่ S5(Thr190, Ala191)--P5Thr จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่ S4Gln189--P4, P1backbone จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่ S3Glu166--P3Lys จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่ S1(Ser144, His163, Glu166)--P1Gln จำนวน 3 ตำแหน่ง ที่ S2'Gly14--P2'backbone จำนวน 1 ตำแหน่ง และที่ปลาย C-terminal ของ octapeptide กับ Thr-cluster (residues 21, 24-26 และ 45) อีกจำนวน 3 ตำแหน่ง

เมื่อวิเคราะห์จากลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide สามารถจำแนกบริเวณ subsite ของเอนไซม์ออกเป็นตำแหน่งต่างๆ ได้ 8 subsites (ตารางที่ 2) โดยการจำแนก subsite ยึดถือตำแหน่งที่ตั้ง side chain ของแต่ละ P ของ octapeptide โดย side chain ของ Px หันไปทางใดให้กำหนดบริเวณของเอนไซม์นั้นๆ เป็น Sx pocket

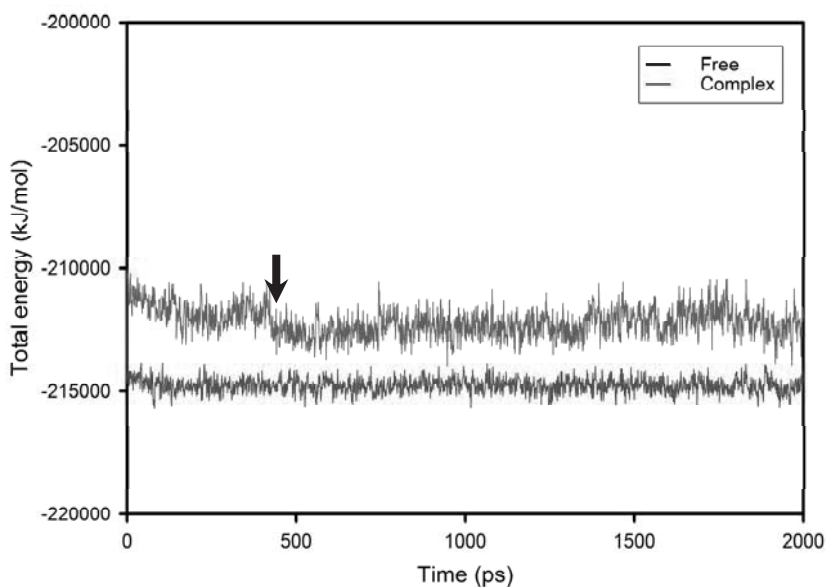
ตารางที่ 2 กรดอะมิโนที่ล้อมรอบ octapeptide ในรัศมี 5 Å ซึ่งอยู่ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro โดยจำแนกออกเป็น subsite ต่างๆ ได้ 8 subsites

Subsite	ลำดับกรดอะมิโน
S5	Pro168, Thr190, Gln192
S4	Leu167, Gln189
S3	Ala46, Glu47, Glu166
S2	Met49, Met165
S1	Phe140, Ser144, His163, His172
S1'	Asn142, Gly143
S2'	Leu27
S3'	Thr21, Thr24-26, Thr45

3.3 Molecular dynamics simulation

วิเคราะห์ผลของ MD simulation โดยสังเกตระบบที่ทำการทดสอบว่าเข้าสู่สมดุลแล้วหรือยัง โดยพิจารณาจากค่าพลังงานหลายๆ รูปแบบ เช่น potential energy, kinetic energy, Lennard-Jones energy เป็นต้น และ snapshot โครงสร้างในช่วงเวลาที่สมดุลมาวิเคราะห์ผล ซึ่งงานวิจัยนี้ได้้นำค่าพลังงานรวมของระบบ (total energy) ที่คิดจากผลรวมสมการของการคำนวณพลังงานในหลายๆ เทอมที่ได้จากการคำนวณของโปรแกรม

ในขณะที่ทำการ simulation มาใช้ในการพิจารณาสถานะภาพสมดุลของระบบ ซึ่งลักษณะของค่าพลังงานรวมของระบบ SARS CoVMpro กับ octapeptide ในน้ำบริสุทธิ์แสดงดังรูปที่ 6 ซึ่งพบว่าระบบได้เริ่มเข้าสู่สมดุลตั้งแต่เริ่มการ simulation ใน equilibrate state เนื่องจากการทดลองนี้ทำการ simulation ใน initial state เป็นเวลานานพอสมควร (100 ps) จึงทำให้ระบบเข้าสู่สมดุลในช่วง equilibrate state ที่เร็วขึ้น



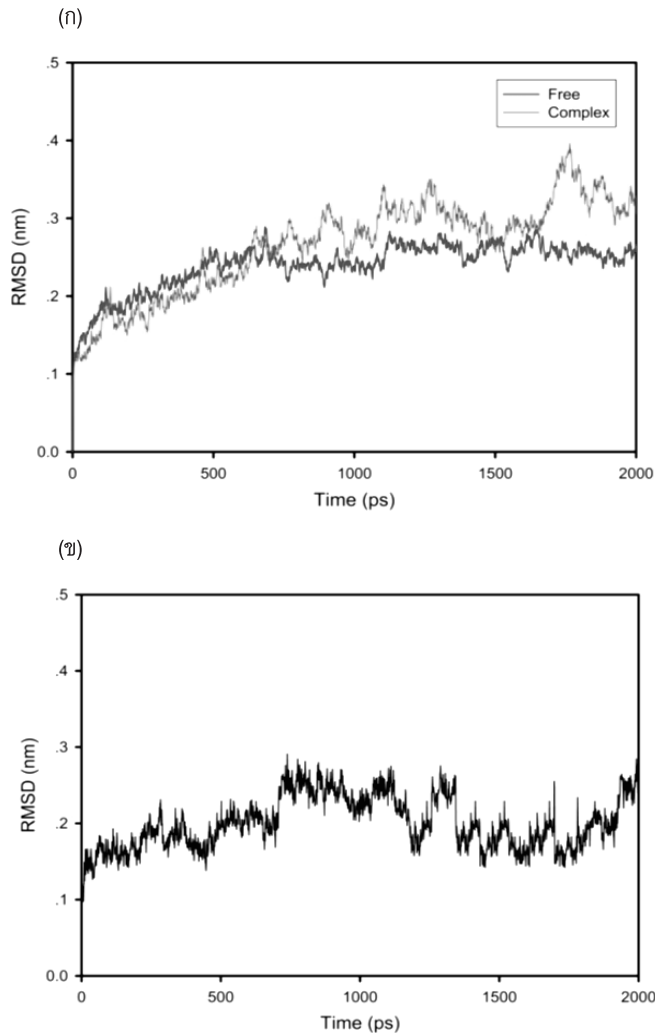
รูปที่ 6 Total energy profile ใน equilibrate state ที่ได้จากการคำนวณในระหว่างการ simulation อันตรกิริยาของ เอนไซม์ SARS CoVMpro แบบ free form และแบบที่ยึดเหนี่ยวกับ octapeptide

เมื่อทำการ simulation เอนไซม์ SARS CoVMpro แบบ freeform (โครงสร้างที่ได้หลังจาก minimization) ซึ่งไม่ได้จับอยู่กับสับสเตรทหรือ ligand ใดๆ เพื่อทำการเปรียบเทียบ กับผลของเอนไซม์ที่ยึดเหนี่ยวอยู่กับสับสเตรท พบว่าทั้งสองระบบเข้าสู่สมดุลตั้งแต่เริ่มการ simulation ซึ่งสังเกตได้ว่าระบบ free form จะเสถียรตั้งแต่เริ่มต้นและค่าพลังงานจะต่ำกว่าระบบยึดเหนี่ยว สภาพเสถียรได้ดำเนินไปจนกระทั่งสิ้นสุดการ simulation ด้วยแนวโน้มแบบราบเรียบ ในอีกทางหนึ่งสังเกตได้ว่าระบบยึดเหนี่ยวมีค่าพลังงานสูงกว่าระบบ free form (การศึกษาสมดุล

ของระบบในทางเคมีเชิงฟิสิกส์เชื่อว่าในสภาพธรรมชาติ นั้นค่าพลังงานต่ำกว่าจะมีแนวโน้มที่เสถียรกว่า) สภาพเสถียรของพลังงานเริ่มคงที่ที่เวลาประมาณ 500 ps (ลูกศรชี้) และเมื่อการ simulation กำลังดำเนินไป พลังงานมีการแปรปรวนเล็กน้อยตลอดเวลาจนกระทั่งสิ้นสุดการ simulation เสมือนว่ายังไม่ถึงจุดที่พลังงานจะเสถียรจริงๆ ปรากฏการณ์ที่แตกต่างกันของทั้งสองระบบเช่นนี้สามารถอธิบายได้ว่า ในระบบยึดเหนี่ยวมีการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับโมเลกุลของ octapeptide อันตรกิริยาดังกล่าวในทางชีวเคมี ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน

แรงกระทำ hydrophobic แรงกระทำ electrostatic และ อิทธิพลของน้ำ ซึ่งเมื่อเกิดอันตรกิริยาเหล่านี้ขึ้นย่อมส่งผล ต่อพลังงานของระบบ ดังนั้นค่าพลังงานของระบบยึดเหนี่ยวที่แปรปรวนนี้บ่งชี้ชัดเจนว่ามีการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ SARS CoVMpro กับ octapeptide ขึ้นในการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเอนไซม์

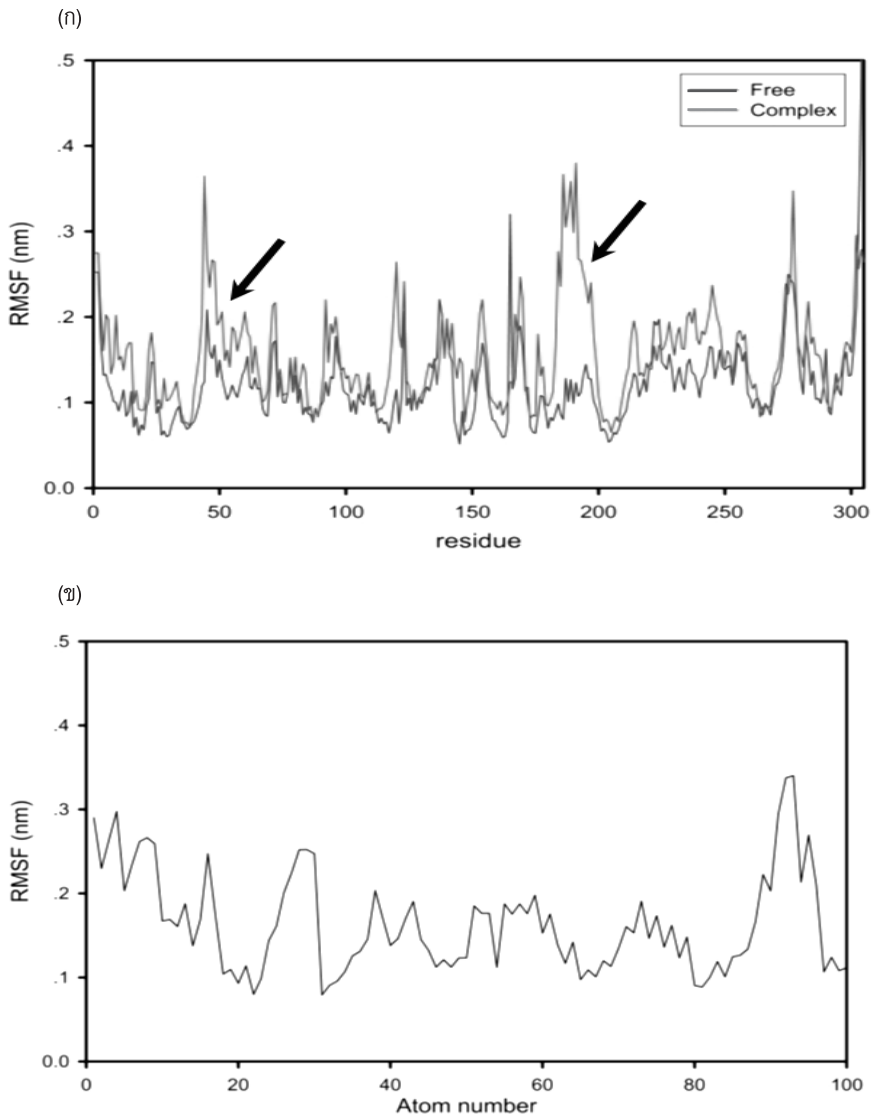
และสับสเตรทที่เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนแต่ละหน่วย P ของ octapeptide กับกรดอะมิโนแต่ละหน่วย S ของเอนไซม์นั้น พิจารณาได้จากกราฟแสดงการผันแปรโครงสร้าง Root Mean Square Deviation (RMSD) และ Root Mean Square Fluctuations (RMSF) ที่แสดงดังรูปที่ 7 และ 8 ตามลำดับ



รูปที่ 7 RMSD profile ในขณะ simulation โมเลกุล (ก) เอนไซม์ SARS CoVMpro แบบ free form และแบบที่ยึดเหนี่ยวอยู่กับ octapeptide (เส้นสีแดง) และ (ข) octapeptide ใน equilibrate state ตั้งแต่ 0 จนถึง 2,000 ps

ผลของกราฟแสดงการผันแปรของโครงสร้างชี้ให้เห็นว่าโครงสร้างของเอนไซม์ SARS CoVMpro ทั้งแบบ free form และแบบยึดเหนี่ยวมีการผันแปรโครงสร้างอย่างมากในช่วงเวลา 500 ps แรก ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกัน หลังจากนั้นการผันแปรโครงสร้างของเอนไซม์แต่ละแบบมีความต่างกัน โดยเอนไซม์แบบยึดเหนี่ยวที่มีค่า RMSD สูง

กว่าถูกบ่งชี้ว่ามีการผันแปรของโครงสร้างมากกว่าแบบ free form ขณะที่ RMSD ของเอนไซม์ free form ค่อนข้างคงที่ซึ่งสอดคล้องกับค่า total energy ส่วนค่า RMSD ของ octapeptide แสดงให้เห็นว่ามีการผันแปรของโครงสร้างอยู่ตลอดระยะเวลาของการ simulation และพบว่าเมื่อสิ้นสุดการ simulation ค่า RMSD ยังคงมีการแปรปรวนอยู่

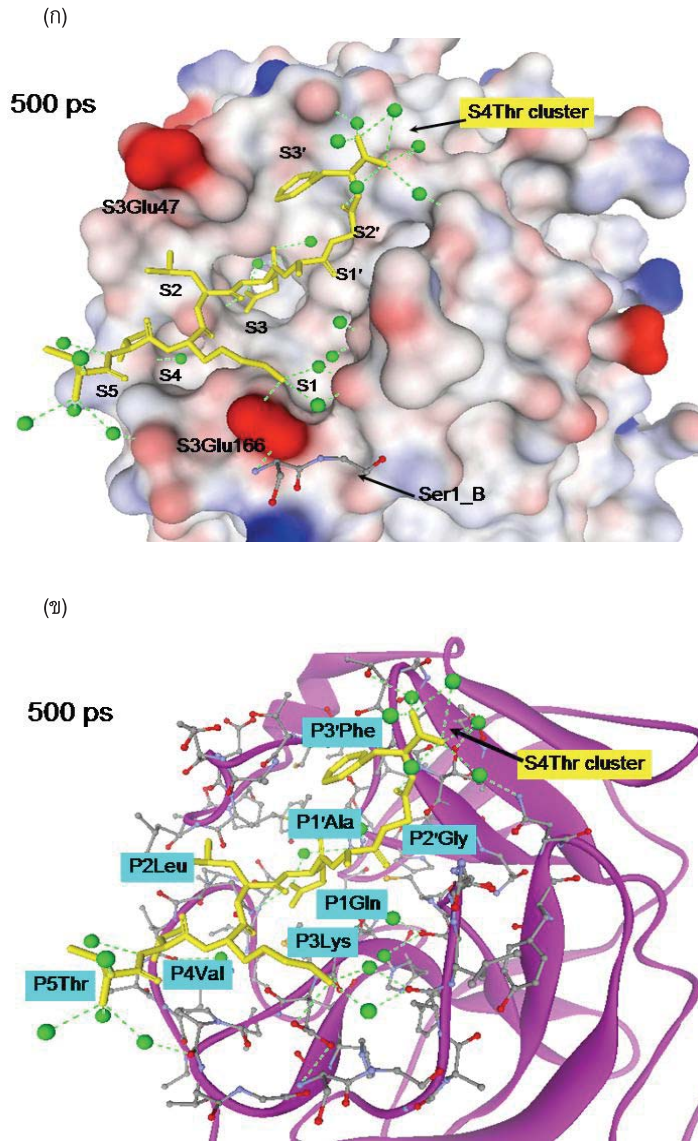


รูปที่ 8 RMSF profile แสดงการผันแปรโครงสร้างของโมเลกุล (ก) เอนไซม์ SARS CoVMpro แบบ free form (เส้นสีน้ำเงิน) และแบบที่ยึดเหนี่ยวอยู่กับ octapeptide (เส้นสีแดง) (ข) ลำดับอะตอมของสับสเตรท octapeptide

จากการศึกษาผลของ RMSF ซึ่งแสดงลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่มีการแปรผันของโครงสร้างในขณะที่ simulation (รูปที่ 8ก) ทั้งแบบ free form และแบบยึดเหนี่ยว พบว่ากรดอะมิโนของเอนไซม์จำนวนหลายหน่วยในแบบยึดเหนี่ยวจะผันแปรมากกว่าแบบ free form โดยเฉพาะกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ถูกรับพบว่ามีการผันแปรอย่างมาก ซึ่งในบริเวณดังกล่าวคือบริเวณ one turn α -helix (residue 41-60) และบริเวณ long loop (residue 187-192) ลักษณะเช่นนี้บ่งชี้ว่าในสองบริเวณนี้มีความยืดหยุ่นตลอดเวลาของการ simulation ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่าทั้งสองบริเวณนี้มีความยืดหยุ่นสูง [19] สำหรับค่า RMSF ของ octapeptide (รูปที่ 8ข) แสดงให้เห็นว่าอะตอมที่ 10, 30 และ 90 ซึ่งเป็นอะตอม α -carbon ของกรดอะมิโน P5Thr P3Lys และ P3'Phe ตามลำดับ มีการผันแปรของโครงสร้างมากที่สุด

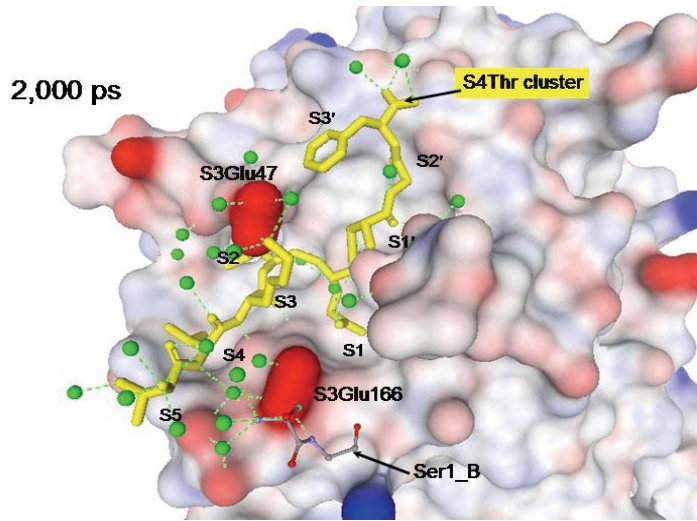
ขณะที่การ simulation เข้าสู่ช่วงเวลา 500 ps ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ระบบเริ่มเสถียร จากผลของ snapshot (รูปที่ 9) บ่งชี้ว่าลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide ที่ตำแหน่ง P2Leu และ P3'Phe เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างที่ได้จากการ docking ซึ่งสอดคล้องกับค่าการผันแปรของ RMSF ในรูปที่ 8 โดยกรดอะมิโน P2Leu เดิมซึ่งปลาย side chain ไปหา Met49 ต่อมาที่เวลา 500 ps ซ้ำปลายไปที่ Met165 ส่วนกรดอะมิโน P3'Phe เดิมซึ่งปลาย side chain มุดเข้าไปใน pocket แต่ต่อมาที่เวลา 500 ps ซ้ำปลายออกมาสู่น้ำ อย่างไรก็ตามแม้ว่า P3'Phe จะซ้ำปลายออกมาสู่น้ำแต่โครงสร้างที่ปลาย C-terminal ของ octapeptide ยังคงถูกตรึงไว้แน่นด้วยการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Thr-cluster (residues 21, 24-26, 45) ในกรณีของเอนไซม์พบว่าโครงสร้างของบริเวณเร่งปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลงไปบ้างเช่นกัน โดยพบว่ากรดอะมิโนที่ S4 ได้แก่ Gln189 และที่ S2 ได้แก่ Met49 และ Met165 มีการหมุนของ side chain อยู่ตลอดเวลา โดยเฉพาะ Gln189 พบว่าโครงสร้าง backbone มีการกระเพื่อมของ long loop อยู่ตลอดเวลา ซึ่งสอดคล้องกับค่า RMSF ที่ได้รายงานไว้ข้างต้น

หลังจากเวลา 500 ps จนกระทั่งสิ้นสุดการ simulation ที่เวลา 2,000 ps (รูปที่ 10) สังเกตได้ว่า octapeptide ได้เข้าไปยึดเหนี่ยวในบริเวณเร่งปฏิกิริยาแน่นยิ่งขึ้นกว่าที่เวลา 500 ps (รูปที่ 9) เมื่อพิจารณาที่ octapeptide ในช่วงเวลา 500 ps สุดท้าย (1,500-2,000 ps) พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอย่างมากที่ P3Lys โดยมีค่า RMSF สูงที่สุด การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนี้เกิดจากการหมุน side chain ของ P3Lys จากเดิมที่เกิดพันธะไฮโดรเจน (รวมทั้ง electrostatic) อยู่กับ S3Glu166 ของเอนไซม์ต่อมาได้หมุน side chain หันขึ้นไปหา S3Glu47 โดยสามารถตรวจพบ electrostatic interaction ระหว่าง S3Glu47--P3Lys ได้ด้วยระยะห่างเท่ากับ 2.25 Å ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ substrate specificity ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ [14-16] ไม่เคยกล่าวถึงความสำคัญของ S3Glu47 ที่มีต่อการยึดเหนี่ยว P3Lys แต่อย่างใด สำหรับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง S3Glu47 กับ P3Lys นี้พบว่าทำให้เกิดปรากฏของการเหนี่ยวนำที่พอดีในการยึดเหนี่ยว (induced fit model) โดยโครงสร้าง C^α-backbone ของสายโปรตีน one turn α -helix (residues 41-49) ได้เคลื่อนตำแหน่งจากเดิมเข้ามาใกล้กับสายโปรตีน long loop (residues 187-192) มากขึ้น (รูปที่ 11) โดยเมื่อทำการวัดระยะห่างระหว่างสายโปรตีนทั้งสองที่ตำแหน่ง C^α-backbone ของกรดอะมิโน Glu47 และ Glu166 พบว่า one turn α -helix ได้เคลื่อนตัวเข้ามาใกล้ long loop ตั้งแต่เวลา 500 ps เรื่อยมา โดยแต่เดิมจะอยู่ห่างกันประมาณ 20 Å และต่อมาได้เข้ามาใกล้กันจนอยู่ห่างกันประมาณ 10 Å ในขณะที่มีพันธะไฮโดรเจนระหว่าง P1Gln กับ S1 pocket ได้ช่วยตรึง octapeptide ไว้ไม่ให้เสียลักษณะการยึดเหนี่ยวที่ถูกต้อง นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับเอนไซม์แบบ free form ด้วย ซึ่งจากการวัดค่าระยะทางจากกราฟบ่งชี้ว่าไม่มีการเคลื่อนตัวของ one turn α -helix เข้ามาใกล้ long loop เหมือนกับในเอนไซม์แบบยึดเหนี่ยวอย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับการศึกษา MD simulation ของเอนไซม์ SARS CoVMpro monomer A แบบ free form ที่ Liu และคณะ [19] เคย simulation เอาไว้ก่อนหน้านี้

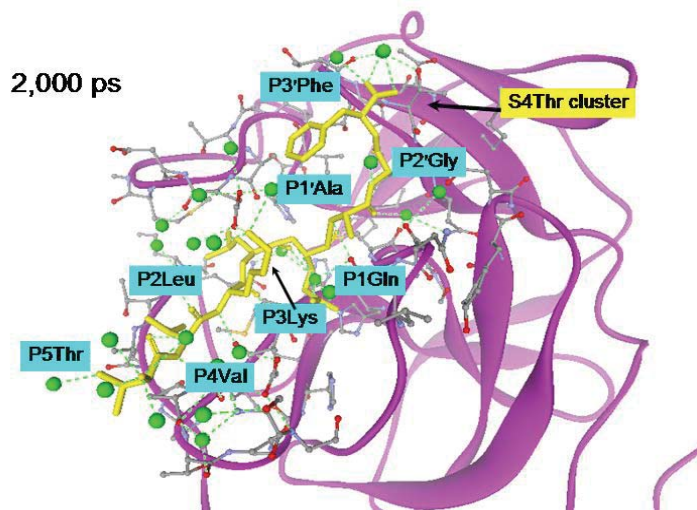


รูปที่ 9 ลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide (yellow stick) ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่ equilibrate state ณ เวลา 500 ps โดย (ก) แสดง electrostatic surface charge และ (ข) แสดง ribbon model ของเอนไซม์เมื่อ surface สีน้ำเงินคือบริเวณประจุบวก สีแดงคือบริเวณประจุลบ และสีขาวคือบริเวณประจุกลาง และพบว่า มีน้ำ (green ball) จำนวนหนึ่งยึดเหนี่ยวอยู่รอบๆ octapeptide ในรัศมี 5 Å

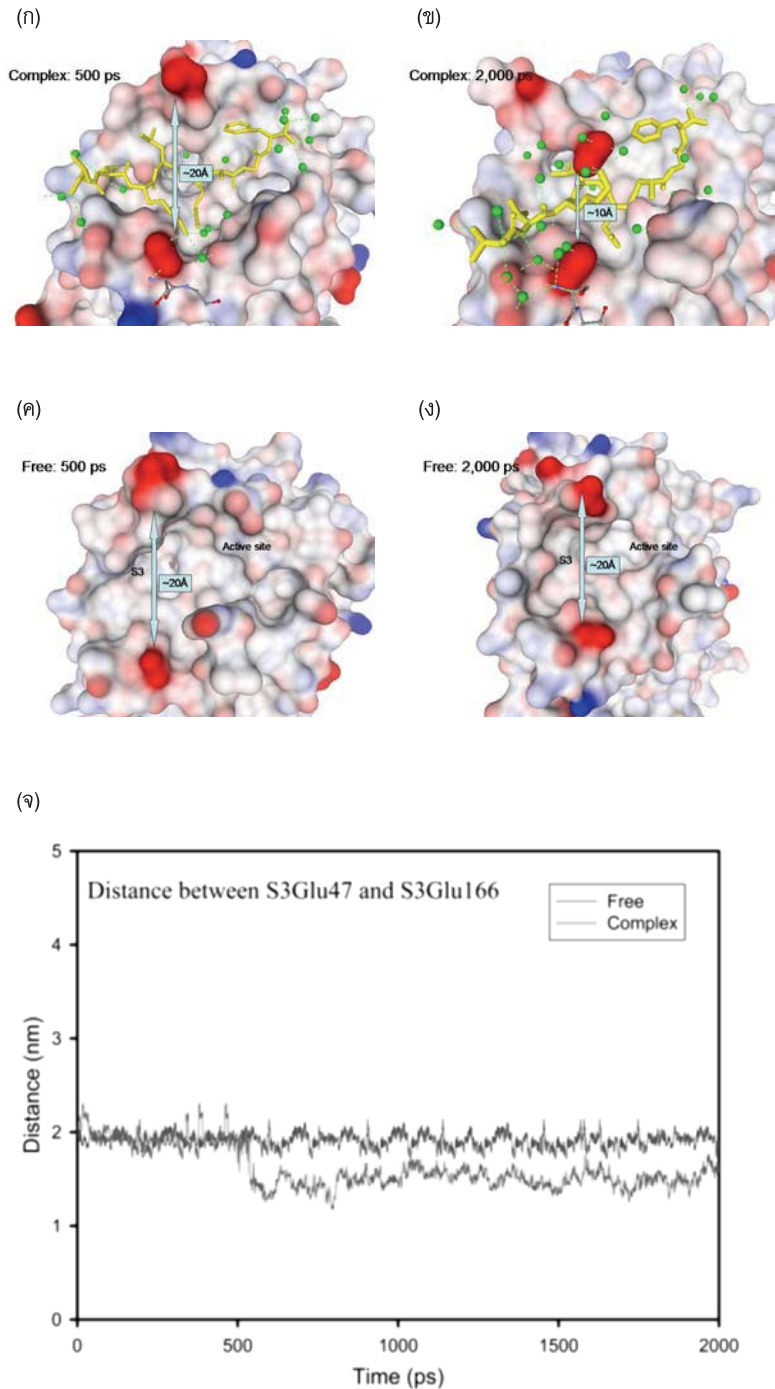
(ก)



(ข)



รูปที่ 10 ลักษณะการยึดเหนี่ยวของ octapeptide (yellow stick) ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro ที่ equilibrate state ณ เวลา 2,000 ps โดย (ก) แสดง electrostatic surface charge และ (ข) แสดง ribbon model ของเอนไซม์ เมื่อ surface สีน้ำเงินคือบริเวณประจุบวก สีแดงคือบริเวณประจุลบ และสีขาวคือบริเวณประจุกลาง และพบว่า มีน้ำ (green ball) จำนวนหนึ่งยึดเหนี่ยวอยู่รอบๆ octapeptide ในรัศมี 5 Å



รูปที่ 11 ลักษณะของ octapeptide ที่เหนี่ยวนำและทำให้เกิด induced fit model ของเอนไซม์ SARSCoVMpro ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา S3 subsite โดยพบลักษณะนี้ตั้งแต่เวลา 500 ps (ก) ขึ้นไปจนกระทั่งสิ้นสุดการ simulation ที่ 2,000 ps (ข) ทั้งนี้ไม่พบลักษณะการ induced fit กับเอนไซม์แบบ free form ตลอดระยะเวลาในการ simulation (ค) และ (ง) และสำหรับลักษณะการเกิด induced fit model นี้เกิดจากสายโปรตีน one turn α -helix ได้เคลื่อนตัวเข้ามาใกล้กับสายโปรตีน long loop เนื่องจากอิทธิพลของการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้าระหว่าง S3Glu47 กับ P3Lys ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยค่าระยะทางระหว่าง Glu47 กับ Glu166 (จ)

4. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะการยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์ SARS CoVMpro กับสับสเตรท octapeptide ด้วยวิธีการ molecular docking ร่วมกับวิธีการศึกษาพลวัตเชิงโมเลกุล สามารถนำมาอธิบายเพื่อสนับสนุนผลการทดลองในห้องปฏิบัติการให้มีความเข้าใจเพิ่มขึ้นว่า subsite ของเอนไซม์ที่เป็น critical subsite สำหรับการยึดเหนี่ยวสับสเตรทคือ S3, S1 และ S4' โดยสับสเตรทจำเพาะอย่าง Thr-Val-Lys-Leu-Gln-Ala-Gly-Phe สามารถยึดเหนี่ยวกับเอนไซม์ได้ดีเนื่องจากอิทธิพลของ P3Lys ที่เกิดอันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้ากับ S3Glu47 มากกว่าที่จะเกิดกับ Glu166 อย่างที่เข้าใจกัน นอกจากนี้อันตรกิริยาระหว่าง S1 pocket กับ P1Gln รวมทั้งอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นที่ปลาย C-terminal ของ octapeptide กับ S4Thr-cluster ด้วยพันธะไฮโดรเจนจำนวนมากหลายพันธะนั้นน่าจะมีส่วนสำคัญอย่างมากที่ช่วยส่งเสริมให้ octapeptide ที่มีลำดับ Thr-Val-Lys-Leu-Gln-Ala-Gly-Phe สามารถยึดเหนี่ยวกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SARS CoVMpro ได้

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก และโครงการวิจัยเคมีทางยาของฝ่ายวิชาการ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทยสำหรับเครื่องคอมพิวเตอร์ Silicon Graphic รวมทั้งโปรแกรม Insight II และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ MAEKA Cluster เพื่อใช้ในการคำนวณ Molecular docking

6. เอกสารอ้างอิง

1. Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G. M., Ahuja, A., Yung, M. Y., Leung, C. B., To, K. F., Lui, S. F., Szeto, C. C., Chung, S., and Sung, J. J., 2003, "A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong", *New England Journal of Medicine*, Vol. 348, pp. 1986-

1994.

2. Poutanen, S. M., Low, D. E., Henry, B., Finkelstein, S., Rose, D., Green, K., Tellier, R., Draker, R., Adachi, D., Ayers, M., Chan, A. K., Skowronski, D. M., Salit, I., Simor, A. E., Slutsky, A. S., Doyle, P. W., Krajden, M., Petric, M., Brunham, R. C., and McGeer, A. J., 2003, "Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome in Canada", *New England Journal of Medicine*, Vol. 338, pp. 1995-2005.

3. Holmes, K. V., 2003, "SARS-Associated Coronavirus", *New England Journal of Medicine*, Vol. 348, pp. 1948-1951.

4. Leng, Q., and Bentwich, Z., 2003, "A Novel Coronavirus and SARS", *New England Journal of Medicine*, Vol. 349, pp. 709.

5. Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M. H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A. D., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., and Bellini, W. J., 2003, "Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome", *Science*, Vol. 300, pp. 1394-1399.

6. Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S., Khattri, J., Asano, J. K., Barber, S. A., Chan, S. Y., Cloutier, A., Coughlin, S. M., Freeman, D., Girn, N., Griffith, O. L., Leach, S. R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S. B., Pandoh, P. K., Petrescu, A. S., Robertson, A. G., Schein, J. E., Siddiqui, A., Smailus, D. E., Stott, J. M., Yang, G. S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T. F., Bowness, D., Czub, M., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S.,

Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G. A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R. C., Krajden, M., Petric, M., Skowronski, D. M., Upton, C., and Roper, R. L., 2003, "The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus", *Science*, Vol. 300, pp.1399-1404.

7. Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E., and Ziebuhr, J., 2003, "Mechanisms and Enzymes Involved in SARS Coronavirus Genome Expression", *Journal of General Virology*, Vol. 84, pp. 2305-2315.

8. Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhvani, P., Mesters, J. R., and Hilgenfeld, R., 2003, "Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs", *Science*, Vol. 300, pp.1763-1767.

9. Xiong, B., Gui, C. S., Xu, X. Y., Luo, C., Chen, J., Luo, H. B., Chen, L. L., Li, G. W., Sun, T., Yu, C. Y., Yue, L. D., Duan, W. H., Shen, J. K., Qin, L., Shi, T. L., Li, Y. X., Chen, K. X., Luo, X. M., Shen, X., Shen, J. H., and Jiang, H. L., 2003, "A 3D Model of SARS__CoV 3CL Proteinase and Its Inhibitors Design by Virtual Screening", *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 24, pp. 497-504.

10. Yang, H., Yang, M., Ding, Y., Liu, Y., Lou, Z., Zhou, Z., Sun, L., Mo, L., Ye, S., Pang, H., Gao, G. F., Anand, K., Bartlam, M., Hilgenfeld, R., and Rao, Z., 2003, "The Crystal Structures of Severe Acute Respiratory Syndrome Virus Main Protease and Its Complex with an Inhibitor", *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, Vol. 100, pp. 13190-13195.

11. Chen, S., Chen, L., Tan, J., Chen, J., Du, L., Sun, T., Shen, J., Chen, K., Jiang, H., and Shen, X., 2005, "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3C-Like Proteinase N Terminus is

Indispensable for Proteolytic Activity but Not for Enzyme Dimerization; Biochemical and Thermodynamic Investigation in Conjunction with Molecular Dynamics Simulations", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, pp.164-173.

12. Toney, J. H., Navas-Martin, S., Weiss, S. R., and Koeller, A., 2004, "Sabadinine: a Potential Non-Peptide Anti-Severe Acute-Respiratory-Ryndrome Agent Identified Using Structure-Aided Design", *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 47, pp. 1079-1080.

13. Chou, K. C., Wei, D. Q., and Zhong, W. Z., 2003, "Binding Mechanism of Coronavirus Main Proteinase with Ligands and Its Implication to Drug Design Against SARS", *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol. 308, pp.148-151.

14. Anand, K., Palm, G. J., Mesters, J. R., Siddell, S. G., Ziebuhr, J., and Hilgenfeld, R., 2002, "Structure of Coronavirus Main Proteinase Reveals Combination of a Chymotrypsin Fold with an Extra Alpha-Helical Domain", *EMBO Journal*, Vol. 21, pp. 3213-3224.

15. Chen, L., Gui, C., Luo, X., Yang, Q., Gunther, S., Scandella, E., Drosten, C., Bai, D., He, X., Ludwig, B., Chen, J., Luo, H., Yang, Y., Yang, Y., Zou, J., Thiel, V., Chen, K., Shen, J., Shen, X., and Jiang, H., 2005, "Cinanserin is an Inhibitor of the 3C-Like Proteinase of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Strongly Reduces Virus Replication in Vitro", *Journal of Virology*, Vol. 79, pp. 7095-7103.

16. Fan, K., Ma, L., Han, X., Liang, H., Wei, P., Liu, Y., and Lai, L., 2005, "The Substrate Specificity of SARS Coronavirus 3C-Like Proteinase", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 329, pp. 934-940.

17. Bacha, U., Barrila, J., Velazquez-Campoy, A., Leavitt, S. A., and Freire, E., 2004, "Identification

of Novel Inhibitors of the SARS Coronavirus Main Protease 3CLpro”, *Biochemistry*, Vol. 43, pp. 4906-4912.

18. Gasteiger, J., and Marsili, M., 1980, “Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity-a Rapid Access to Atomic Charges”, *Tetrahedron*, Vol.

36, pp. 3219-3228.

19. Liu, H. L., Lin, J. H., Ho, Y., Hsieh, W. C., Chen, C. W., and Su, Y. C., 2004, “Molecular Dynamics Simulations of Various Coronavirus Main Proteinases”, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Vol. 22, pp. 65-77.