



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างแบบจำลองทางทฤษฎีเพื่อประมาณศักยภาพของสารเคมีที่ทำให้ไวต่อการกระตุ้น
อาการแพ้ของผิวหนัง

Generation of Theoretical Models to Estimate Skin Sensitization Potential of
Chemicals

นางดวงกมล กลีสัน

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558,2559

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างแบบจำลองทางทฤษฎีเพื่อประมาณศักยภาพของสารเคมีที่ทำให้ไวต่อการกระตุ้น
อาการแพ้ของผิวหนัง

Generation of Theoretical Models to Estimate Skin Sensitization Potential of
Chemicals

นางดวงกมล กลีสิน

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558,2559
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 00 266667
i.

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 147857
เอกสารนี้เข้าปก.ที่ 15 ก.ค. 2560
ใน.เดือน.ปี

เอกสารนี้เข้าปก.ที่ 15 ก.ค. 2560 สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การสร้างแบบจำลองทางทฤษฎีเพื่อประมาณศักยภาพของสารเคมีที่ทำให้ไวต่อการกระตุ้น
อาการแพ้ของผิวหนัง.....

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน.....

ประจำปีงบประมาณ 2558, 2559..... จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน..... บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2..... ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2558 ถึง กันยายน 2560.....

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ

นางดวงกมล กลีสัน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง..

บทคัดย่อ

ส่วนแรกของงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการนำระเบียบวิธีการคำนวณ ซึ่งเป็นวิธีที่มีราคาถูกรวดเร็วและไม่ต้องใช้
สัตว์ทดลอง มาทำนายการทำให้เกิดอาการแพ้ทางผิวหนังของสารเคมี โดยการจำลองแบบกลไกปฏิกิริยา Schiff base
(SB) ของสารประกอบ 22 ชนิด โดยจำแนกเป็นชนิดย่อย ๆ คือ aldehydes, ketones, 1,2, 1,3 diones, และอื่น ๆ
สำหรับกรณีของ 1,2 และ 1,3 diones แต่ละโมเลกุลประกอบด้วยหมู่ carbonyl 2 หมู่ ซึ่งจะส่งผลให้เกิด
nucleophilic attack ได้สองตำแหน่ง พบว่า Transition state (TS2) เป็นขั้นกำหนดอัตรา (rate determining step,
RDS) ซึ่งสัมพันธ์กับค่า pEC_3 ที่ได้จากการทดลอง (ค่ามากแสดงถึงความเป็นพิษมาก) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์
ระหว่าง pEC_3 และ RDS barrier มีค่า $r^2=0.63$ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกัน และที่สำคัญคือ
ความสัมพันธ์จากการคำนวณอย่างง่ายนี้ สามารถนำไปใช้ในการหาความสัมพันธ์ของความเสี่ยงต่อสารเคมีได้โดยไม่
จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองใด ๆ ปัจจัยอื่น ๆ อย่างเช่น clogP ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่ามีบทบาทสำคัญเช่นกัน งานวิจัยที่จะทำ
ต่อไป จะเป็นการนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ซับซ้อนขึ้นได้แก่ แบบจำลองพหุตัวแปร เพื่อที่จะปรับผลการทำนาย
ให้น่าเชื่อถือมากขึ้น

ส่วนที่สองของงานวิจัย จะเป็นการกล่าวถึงเรื่องทั่ว ๆ ไปในการนำระเบียบวิธี hybrid quantum mechanical/
molecular mechanical (QM/MM) มาประยุกต์ใช้กับการค้นพบตัวยา วิธี QM/MM สามารถใช้จำลองแบบกับระบบ
ทางชีววิทยา โดยใช้วิธีการคำนวณที่รวดเร็วและราคาถูกลง ในที่นี้ได้ใช้ประเมิน metalloproteins ของ human
deacetylases (HDACs) ซึ่งเป็น targets ของ medical conditions รวมไปถึงโรค neurodegenerative และการติด
เชื้อ HIV โดยที่ metalloproteins ที่เลือกมาศึกษาเป็นที่น่าสนใจในอุตสาหกรรมยา ในที่นี้ได้รายงานถึงผลการใช้
ระเบียบวิธี QM/MM ในคำนวณเพื่อศึกษา active site และการเร่งปฏิกิริยา เพื่อประกอบการศึกษากับระบบอื่น ๆ ได้

คำสำคัญ : LLNA, Skin sensitization, Schiff base, QM/MM, HDACs, metalloproteins

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Generation of Theoretical Models to Estimate Skin Sensitization Potential of Chemicals

Researcher: Duangkamol Gleeson

Faculty: of Science **Department:** of Chemistry

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

In the first part of this research project, we investigate the use of an inexpensive, rapid and ethical computational method to predict the skin sensitization potential of Schiff base (SB) chemicals. The mechanistic profile associated with 22 diverse SB compounds were modelled. The compounds can be sub-classified as aldehydes, ketones, 1,2, 1,3 diones and additional variants. In the case of 1,2 and 1,3 diones, each molecule contains two carbonyl groups leading to two plausible points for nucleophilic attack. Transition state (TS2) was found to be the rate determining step (RDS) and it is therefore expected that this should have the greatest relevance for the experimentally observed pEC3 (larger values = increased toxicity). Analysis of the relationship between the pEC3 and RDS barrier shows a reasonable correlation for this complex biological endpoint ($r^2=0.63$). Crucially, this type of relatively simple calculation allows us to prioritize the relative risk of chemicals, without the need for animal testing. Other factors such as clogP are also known to play a role. Further work is ongoing on more complex, multivariate models for improved predictive power.

In the second part of this work, we discuss some common issues with employing hybrid quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) methods in certain drug discovery applications. The QM/MM method provides a means to simulate large biological systems for moderate computational cost. We use the method to assess the metalloproteins, human deacetylases (HDACs), which are targets for a variety of medical conditions including neurodegenerative diseases and HIV infection. Metalloproteins in particular are a challenge to simulate using the rapid empirical methods preferred in the pharmaceutical industry. We report the use of a QM/MM scheme of only moderate computational cost to explore the active site as well as its catalytic reaction for the future study of the other systems.

Keywords : LLNA, Skin sensitization, Schiff base, QM/MM, HDACs, metalloproteins

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากงบประมาณแผ่นดิน และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ซึ่งได้รับการจัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัย ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 2 ปี ข้าพเจ้าจึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ ในการสนับสนุนงานวิจัยพื้นฐาน ให้มีความก้าวหน้าต่อไป

ดวงกมล กลีสัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	V
สารบัญภาพ.....	VI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม.....	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	8
4.1 LLNA Schiff Base.....	8
4.2 Application of QM/MM.....	16
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	19
บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย.....	20
เอกสารอ้างอิง.....	21
ภาคผนวก.....	25
ภาคผนวก ก.....งบประมาณเพื่อการวิจัย.....	25
ภาคผนวก ข.....ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงการวิจัยและได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่.....	27
ภาคผนวก ค.....สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย.....	28
ประวัตินักวิจัย.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิดของการเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารประกอบที่จำแนกโดย Silverman.....	3
3.1 ชุดของสารประกอบที่เลือกนำมาศึกษา.....	6
4.1 ตารางสรุปผลการคำนวณของสารประกอบลำดับที่ 1-9.....	10
4.2 ตารางสรุปผลการคำนวณของสารประกอบลำดับที่ 10-17.....	11
4.3 ตารางสรุปผลการคำนวณของสารประกอบลำดับที่ 18-22.....	12



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 Nucleophilic aromatic substitution by Addition-Elimination	2
4.1 Mechanism of Schiff base formation ของสารประกอบในตารางที่ 2	8
4.2 Three distinct steps are associated with the SB reaction mechanism	9
4.3 ตัวอย่างค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญของกลไกปฏิกิริยาแบบ SB.....	9
4.4 กราฟแสดง relative energy barrier ของกลุ่ม 1,2 -diones.....	13
4.5 กราฟแสดง relative energy barrier ของกลุ่ม 1,3 -diones.....	13
4.6 กราฟแสดง relative energy barrier ของกลุ่ม aldehydes.....	14
4.7 กราฟแสดง relative energy barrier ของปฏิกิริยา S_NAr	15
4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pEC3 กับ ค่า RDS barrier ที่คำนวณได้ของสารตัวอย่าง.....	16
4.9 แสดงกลไกปฏิกิริยา deacylation 4 กลไกที่เกี่ยวข้องกับ HDAC8.....	17
4.10 กราฟแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่คำนวณด้วยแบบจำลอง QM/MM (บน) และ QM (ล่าง).....	18



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

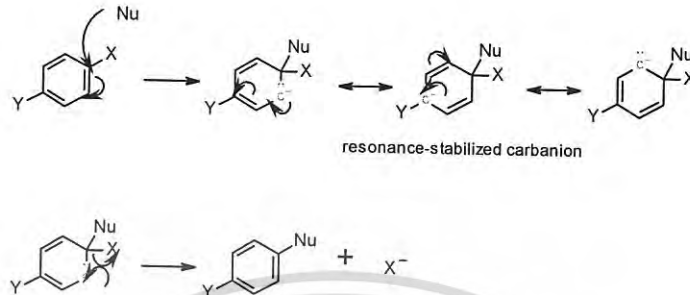
ผื่นผิวหนังอักเสบจากการสัมผัส (contact dermatitis) นั้นเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในปัจจุบัน เนื่องจากในชีวิตประจำวันและในชีวิตการทำงาน เราต้องเกี่ยวข้องกับสารเคมีซึ่งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานในสินค้าอุปโภคและบริโภคอยู่ตลอดเวลา ซึ่งการสัมผัสสารเคมีบางชนิดจะก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพ ผื่นผิวหนังอักเสบนั้นอาจจะมีสาเหตุมาจาก ปัจจัยทางกายภาพของสารเคมีที่ทำให้ระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อโดยตรง ที่เรียกว่าผื่นจากสารระคายเคืองสัมผัส (irritant contact dermatitis, ICD) ซึ่งรวมไปถึงตัวทำลาย กรด หรือเบส เป็นต้น การระคายเคืองจะเป็นผลมาจากการตอบสนองการแพ้อย่างรุนแรง หรือเรียกว่า ผื่นสัมผัสจากสารก่อภูมิแพ้ (allergic contact dermatitis, ACD) ซึ่งเป็นการตอบสนองที่ค่อนข้างซับซ้อนของระบบภูมิคุ้มกันต่อสารก่อภูมิแพ้ (allergen¹)

วิธีการทดสอบเพื่อที่จะตรวจหาสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้เมื่อสัมผัสกับผิวหนัง (skin sensitizers) ทำได้โดยการทดสอบสารเคมีโดยการทำให้เกิดอาการแพ้ทางผิวหนังอย่างมากที่สุดโดยการทดสอบกับหนูแกสบี้ (guinea pig maximization test, GPT) และเมื่อไม่นานมานี้เองได้มีการทดลอง ความไวต่อการระคายเคืองของผิวหนังโดยดูจากการตอบสนองของต่อมน้ำเหลืองของหนูทดลองเมื่อถูกสารเคมีที่ผิวหนังบริเวณใบหูแล้วทำให้เกิดอาการแพ้ เรียกว่าวิธี murine local lymph node assay, LLNA)² การทดสอบด้วยวิธี LLNA ในปัจจุบันเป็นทางเลือกซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่มีความถูกต้องมากขึ้น และองค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organization for Economic Co-operation and Development, OECD) ซึ่งเป็นเวทีแลกเปลี่ยนข้อคิดเห็นเกี่ยวกับการจัดการปัญหาต่าง ๆ ระหว่างประเทศสมาชิก ยังได้นำไปใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐาน (standard protocol³) อีกด้วย อย่างไรก็ตามสหภาพยุโรป (European Union, EU) ได้ออกระเบียบควบคุมวิธีทดสอบเหล่านี้กับสารเคมี ตั้งแต่ปี 2013 เป็นต้นไป ที่รู้จักในชื่อของ REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) เพื่อลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองและลดค่าใช้จ่ายในการทำวิจัยเพื่อทดสอบ ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาแนวทางการทดสอบใหม่ด้วยวิธีการทางเลือกที่อาจจะเป็นวิธีทางชีวภาพ (in-vitro) หรือ วิธีทางเคมี (in-chemico) หรือวิธีการทางทฤษฎี (in-silico) ซึ่งเป็นการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ มาศึกษาความสัมพันธ์ทางโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีต่อคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ ดังนั้นทั้งภาครัฐและภาคเอกชนจะต้องเตรียมความพร้อมถึงผลกระทบจากการควบคุมด้วยระเบียบ REACH เราจึงมีความจำเป็นที่สมควรได้รับการสนับสนุนให้มีการวิจัยด้วยทางทฤษฎี ต่อไป

จุดมุ่งหมายของงานวิจัยที่นำเสนอในที่นี้ เป็นการพัฒนาวิธีการทำนายคุณสมบัติทางกายภาพชีวภาพ และคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับสภาวะแวดล้อมของโมเลกุล โดยอาศัยข้อมูลจากวิธีการทดสอบ LLNA ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่าความไวต่อการกระตุ้นอาการแพ้ของผิวหนังเริ่มต้นมาจากสารที่ทำให้เกิดอาการแพ้เคลื่อนเข้าสู่ร่างกายโดยการเกิดพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนที่เป็นอิเล็กทรอนิกส์หรือนิวคลีโอไฟล์⁴ แล้วจะกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันซึ่งจะส่งผลให้ผิวหนังเกิดอาการแพ้ ดังนั้นการเข้าใจถึงความยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง่ายของสิ่งเหล่านี้ที่จะเกิดขึ้น จะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการใช้เหตุผลในการพิจารณาการตอบสนองต่อความไวของสารเคมี (ภาพที่ 1.1)



ภาพที่ 1.1 Nucleophilic aromatic substitution by Addition-Elimination

การศึกษาในที่นี้จะเริ่มต้นจากการทำความเข้าใจกับลักษณะของความไวของสารเคมีที่จะทำปฏิกิริยาโดยใช้แบบจำลองอิเล็กโตรไฟล์ ได้แก่ SCH_3^- กับสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ (sensitizers) ที่ทราบและกับสารที่ไม่ไวต่ออาการกระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ (non-sensitizers) โดยอาศัยการจำลองแบบเคมีควอนตัมและการวิเคราะห์ทางสถิติมาใช้ในการศึกษาปัญหากลไกปฏิกิริยาที่ส่งผลให้เกิดอาการแพ้ของผิวหนังและอาศัยผลของการศึกษา และข้อสรุปที่ได้จากการศึกษาเหล่านี้นำมาศึกษาเพิ่มเติมในด้านการพัฒนาแบบจำลองทางทฤษฎีในสามมิติในระดับที่อาจจะเป็นทำนายผลหรือทำการทดลองซ้ำ จากผลการทดลองที่มีในชุดข้อมูลของสารประกอบที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี LLNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

ปฏิกิริยาประเภททั่วไปในร่างกายที่มีโปรตีนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น เป็นที่รู้จักกันอย่างดีและได้มีการเขียนสรุปรายละเอียดโดย Silverman⁶ (ตารางที่ 2.1) ซึ่งระบุว่าอาการแพ้ทางผิวหนังมีสาเหตุมาจากความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาของโปรตีน ที่สมมติว่าเป็นปฏิกิริยาทั่วไปที่มีโปรตีนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีส่วนเกี่ยวข้องกับ skin sensitizer ในตอนนี้เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่าอาการแพ้ของผิวหนังเริ่มต้นมาจากสารที่ทำให้เกิดอาการแพ้เกิดพันธะโควาเลนต์ คือเกิดแรงยึดเหนี่ยวดึงเข้าหาโปรตีนที่เป็นอิเล็กโตรไฟล์ หรือนิวคลีโอไฟล์⁴ ที่ก่อให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันถึงแม้เราจะยังไม่รู้แน่ชัดว่าธรรมชาติของโปรตีนว่าจริง ๆ แล้วมีส่วนเกี่ยวข้องอย่างไร

ตารางที่ 2.1 ชนิดของการเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารประกอบที่จำแนกโดย Silverman⁶

Group transfer Reactions (Hydrolysis, Amination, Phosphorylation)
Reduction and oxidation
Monooxygenation
Dioxygenation
Substitutions
Carboxylation
Decarboxylation
Isomerization
Elimination and additions
Aldol and claisen reactions
Formylation, hydromethylations and methylations
Rearrangements

สำหรับอาการแพ้ของผิวหนัง ที่เกิดจากสารประกอบประเภททั่วไปที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนสามารถแบ่งได้เป็น 5 ประเภทย่อย ๆ ตามกลุ่มของสารเคมี การจัดจำแนกนี้ได้นำไปสู่กระบวนการที่นิยมได้แก่ read across approach ซึ่งเป็นการใช้ข้อมูลในจุดที่แสดงผล (endpoint) ของสารเคมีตัวหนึ่งเพื่อนำไปทำนาย endpoint ของสารเคมีอื่น ๆ ได้ โดยการพิจารณาสมบัติบางประการที่มีความคล้ายคลึงกันโดยการจัดประเภทสารเคมีตามกลุ่มกลไกปฏิกิริยา (reaction mechanistic domains) ซึ่งเป็นพื้นฐานในการศึกษาจากผลงานที่มีการตีพิมพ์มาแล้ว อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับกันดีว่าลักษณะของโครงสร้าง หรือลักษณะของความว่องไวเพียงอย่างเดียวไม่สามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดที่เชื่อถือได้ในเรื่องของคุณเป็นพิษ ทั้งนี้เนื่องมาจากยังไม่ได้พิจารณาคุณลักษณะโดยรวมของโมเลกุล และเนื่องจากยังไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิจารณาความจริงที่ว่า ระดับของการรับรู้ของเป้าหมาย (target recognition) นั้นอาจมีความจำเป็นในการเหนี่ยวนำให้เกิดผลกระทบที่เป็นพิษได้⁷ เป็นที่เชื่อกันว่าการเกิดพิษของโปรตีนนำไปสู่การไม่กระตุ้นของกลไกที่มีตัวเร่งของโปรตีนที่พิจารณา และส่งผลตามมากับการตอบสนองต่ออาการแพ้ด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ชัดเจนว่า การที่จัดอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งของปฏิกิริยาไม่ได้หมายความว่าสารประกอบนั้นจะเป็นสารประกอบที่มีศักยภาพทำให้เกิดอาการแพ้^{4,5,8,9}

ได้มีการพัฒนาแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ของสารเชิงปริมาณ (QSAR) ของจุดแสดงผลความเป็นพิษ (toxicity endpoints) ในปฏิกิริยาหลัก 5 ปฏิกิริยาดังที่กล่าวมาในตอนต้นหรือใช้กับแต่ละชุดของสารเคมีที่อยู่ในโดเมนเหล่านี้^{4,8,10-12} ความพยายามที่จะพัฒนาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ของสารเชิงปริมาณอย่างแท้จริงทั้งหมด กล่าวคือจะครอบคลุมความหลากหลายของชนิดของสารเคมีที่ทำให้เวตต่อการกระตุ้นอาการแพ้ ทั้งนี้โดยใช้วิธี RAI (relative alkylation index approaches¹³) หรือโดยทางทฤษฎีที่ใช้อธิบายโดยอาศัยพื้นฐานของวิธี QSAR^{14,15} นั้นยังไม่ประสบความสำเร็จเพียงพอที่จะทำให้สอดคล้องกับชุดที่สมบูรณ์ตามตัวชี้แนะของ OECD QSAR^{9,16} ซึ่งได้แก่ (a) การนิยาม endpoint (b) รูปแบบจำลองที่ชัดเจนของ QSAR ซึ่งจะต้อง (c) แปลผลของกลไกปฏิกิริยาได้ และนอกจากนี้แบบจำลองจะต้องมี (d) การทำนายได้กล่าวคือเหมาะสมกับวัตถุประสงค์และ (e) โดเมนที่กำหนดไว้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับแบบจำลองใด ๆ ก็ได้ แบบจำลอง QSAR ที่เหมาะสมที่สุดตามหลักของ OECD นั้นนิยามในเทอมของแบบจำลองกลไกเชิงปริมาณ (quantitative mechanistic models, QMM) และมีลักษณะคล้ายกับแบบจำลอง QSARs ที่ง่ายแต่ใช้งานได้ซึ่งได้รายงานเป็นครั้งแรกโดย Hansch และ Fujita ในราว ๆ ช่วง 1960s¹⁷ ซึ่งวิธีการ QSAR เหล่านี้มีมักจะใช้ตัวแปรบรรยายทางกายภาพและทางเคมี (physico-chemical descriptors) ที่ได้มาจากการทดลองและโดยทั่วไปแล้วจะต้องสำหรับชุดของสารเคมีที่ศึกษา¹⁰⁻¹² แต่พบปัญหาหลักคือวิธีการเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ descriptors ที่ได้มาจากการทดลอง (σ electronic และ π Taft steric parameters) ดังนั้นจะทำนายสารประกอบชนิดใหม่ไม่ได้ถ้าไม่ได้หาตัวแปร (parameters) เหล่านี้โดยตรงมาก่อน ดังนั้นวิธีการที่คล้ายกับวิธี QMM (QMM-like approach) ที่ขึ้นอยู่กับวิธีทางทฤษฎีอย่างเดียวจึงนับว่าเป็นสิ่งที่ต้องการ ถ้าสามารถจะให้ประสิทธิภาพการทำงานของ descriptors ตรงกับที่ได้จากการทดลอง

ดังนั้นในที่นี้เราจะเสนอการใช้แบบจำลองเคมีควอนตัมสามมิติ กับขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาที่เสนอเพื่อที่จะทดลองและอธิบายเหตุผลของความว่องไวของสารเคมีต่างชนิดกัน โดยอาศัยวิธีการที่เราได้ใช้มาก่อนหน้านี้¹⁸⁻²¹ ที่เป็นวิธีเคมีคำนวณ (computational chemistry) ซึ่งช่วยให้เราสามารถทดสอบสมมติฐานได้ภายในระยะเวลาเป็นนาที หรือเป็นชั่วโมง โดยใช้วิธีการคำนวณแบบธรรมดาซึ่งให้ผลลัพธ์ที่สูงวิธี QC มีข้อดีที่สำคัญกว่าวิธีกลศาสตร์เชิงโมเลกุล (molecular mechanics, MM) ตัวอย่างเช่นสามารถรวมประจุที่ไม่อยู่ประจำที่ หรือโพลาริเซชันของประจุ (charge delocalization/polarization) และนอกจากนี้ยังให้ผลการคำนวณที่ถูกต้องกับในระบบของโปรตีนที่มีอะตอมของโลหะเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย²²

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีแบบจำลอง QC สามารถใช้คำนวณพลังงานภายในได้อย่างถูกต้อง และอธิบายช่วงของอันตรกิริยา (interactions) ที่ซับซ้อนระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์ เช่นถ้าเป็นพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงมากจะอยู่ในช่วงระหว่าง 1.2-1.5Å ซึ่งจะพบในโปรตีนที่ว่องไวในการเร่งปฏิกิริยา สำหรับพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงปานกลางจะอยู่ในช่วง 1.5-2.2Å เช่นพันธะระหว่าง NH-O/N และ OH-O/N ส่วนพันธะไฮโดรเจนที่อ่อนเช่น CH-O และ CH-N จะอยู่ในช่วง ~2.0-3.0 Å²³ (π - π stacking, cation- π interactions)^{24,25} ในที่นี้เราจะนำวิธีใหม่ที่ได้รับการตรวจสอบแล้วว่าดีกับการศึกษาความว่องไวในการทำปฏิกิริยา²⁶ คือวิธี M062X QC ร่วมกับเบสเซต 6-311+G(d,p) และใช้แบบจำลองแบบต่อเนื่องแบบมีขั้วของตัวทำละลายที่ประกอบด้วยน้ำ²⁷ ซึ่งจะทำให้สามารถทำนายได้มากกว่าวิธีที่ขึ้นอยู่กับการวัดแบบง่ายซึ่งวัดจากความว่องไวของลิแกนด์ หรือวัดแถบช่องว่างระหว่าง HOMO-LUMO (HOMO-LUMO band gap¹⁵) และประมาณกำแพงศักย์จาก intermediate⁵ ที่มีพลังงานสูง ซึ่งจะแสดงให้เห็นแบบอย่างที่สำคัญของ QC ที่สามารถนำมาใช้เพื่อทำความเข้าใจสมบัติและการเปลี่ยนแปลงทั้งทางเคมีและทางชีวภาพได้²⁸⁻³²



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

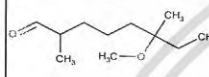


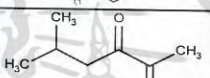

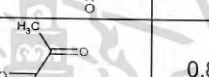
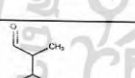
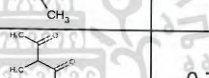

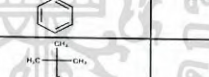
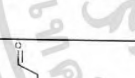

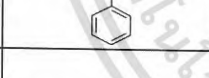
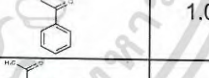


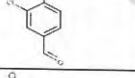
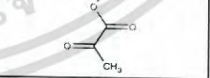
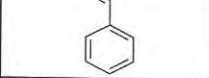
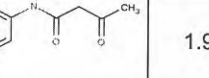

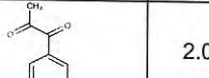
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 4 ขั้นตอนหลัก ๆ ดังนี้

- รวบรวมชุดข้อมูลของการวัด LLNA ที่เกี่ยวข้องจากการทบทวนเอกสารอ้างอิง และได้นำสารประกอบทั้งหมด 22 ตัวอย่าง โดยพิจารณาจากความแตกต่างของค่า pEC3 และค่า logP มาจำแนกออกเป็นกลุ่มตามความไวในการทำปฏิกิริยา ดังนี้คือ ไม่ไวปฏิกิริยา (non-reactive) ไวปฏิกิริยาน้อย (weakly reactive) ไวปฏิกิริยาปานกลาง (moderately reactive) ไวปฏิกิริยามาก (very reactive) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ชุดของสารประกอบที่เลือกนำมาศึกษา

No.	Structure	pEC3	Class	clogP	No.	Structure	pEC3	Class	clogP
1		0.00	Non Reactive	2.6	12		0.00	Non Reactive	2.8
2		0.80	Weakly Reactive	2.6	13		0.69	Weakly Reactive	1.8
3		1.27	Moderately Reactive	4.4	14		0.89	Weakly Reactive	0.4
4		1.33	Moderately Reactive	2.0	15		0.78	Weakly Reactive	2.3
5		1.39	Moderately Reactive	3.6	16		0.84	Weakly Reactive	3.9
6		1.60	Very Reactive	1.5	17		1.03	Moderately Reactive	2.9
7		3.00	Very Reactive	-0.3	18		1.42	Moderately Reactive	3.8
8		0.00	Non Reactive	2.1	19		1.63	Very Reactive	0.4
9		0.00	Non Reactive	1.7	20		1.97	Very Reactive	1.3
10		1.62	Very Reactive	0.0	21		2.06	Very Reactive	1.8
11		1.89	Very Reactive	2.2	22		3.61	Very Reactive	1.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แบ่งชุดข้อมูลนี้ออกเป็นปฏิกิริยาหลัก ๆ ก่อนที่จะเริ่มการวิเคราะห์ด้วย QC
3. ในการคำนวณด้วย QC ทั้งหมดจะใช้โปรแกรม Gaussian 09 โดยใช้ทฤษฎี density functional theory (DFT) ซึ่งติดตั้งบนด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (multicore personal computers) ที่ประมวลผลบน CentOS 6.2 linux OS ตามรายละเอียดดังนี้
 - a. จำลองแบบกลไกปฏิกิริยาของสารประกอบทั้ง 22 ชนิด โดยจำแนกเป็นกลุ่มประเภท อัลดีไฮด์ คีโตน 1,2 ไดโอน และ 1,3 diones และชนิดอื่น ๆ ลักษณะพิเศษสำหรับชนิด 1,2 และ 1,3 diones คือแต่ละโมเลกุลประกอบด้วยหมู่ carbonyl สองหมู่ ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดปฏิกิริยา nucleophilic attack ได้สองตำแหน่ง
 - b. สถานะที่จะศึกษามีดังนี้
 - i. the isolated reactants
 - ii. the non-bonded reactant complex
 - iii. the bonded intermediate complex (if stable)
 - iv. the non-bonded product complex
 - v. the isolated products, as well as (vi)
 - vi. all transition state(s) connecting the different complexes.
 - c. ในการศึกษาการดำเนินไปของปฏิกิริยานั้นจะจำลองแบบโดยใช้ hybrid meta exchange-correlation M062X functional^{26,33} ที่ดำเนินการคำนวณด้วยกลศาสตร์ควอนตัม ใช้เบสิสเซต triple zeta 6-311+G(d,p) มีการคำนวณความถี่ของการสั่นสำหรับ transition states (TS) ของโครงสร้างทั้งหมด เพื่อวิเคราะห์ว่ามีคุณสมบัติเป็น TS ที่แท้จริง จากการพิจารณาค่า imaginary frequency เพียงค่าเดียว และเมื่อได้ข้อมูลเหล่านี้สมบูรณ์แล้วขั้นต่อไป จะเป็นการวิเคราะห์ผลของข้อมูลที่ได้อย่างละเอียด โดยจะนำมาสัมพันธ์กับข้อมูลจากการทดลอง LLNA sensitization มาหาความสัมพันธ์ ของสารประกอบที่นำมาศึกษา
4. เพื่อให้ได้ผลจากการคำนวณด้วยกลศาสตร์ควอนตัมสมบูรณ์มากขึ้น จะทำการวิเคราะห์รายละเอียดและนำไปสัมพันธ์กับผลจากการทดลอง LLNA sensitization ของสารเคมีที่เลือกมาศึกษา โดยการ
 - a. วิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ระหว่างจลนศาสตร์และอุณหพลศาสตร์
 - b. ใช้ตัวอธิบายกลศาสตร์ควอนตัมอื่น ๆ เช่น HOMO-LUMO¹⁵ และการประมาณ barrier⁵ แล้วนำมาเปรียบเทียบความเหมือนและความต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

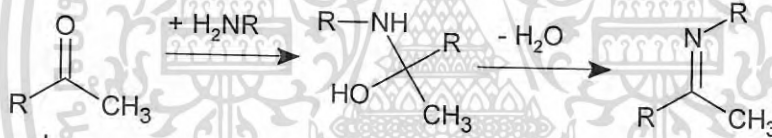
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 LLNA Schiff Base

อาการแพ้ของผิวหนังสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อสารที่ว่องไวต่ออาการแพ้ ได้แก่สารเคมีที่ว่องไวปฏิกิริยา เกิดพันธะโคเวเลนต์กับโปรตีนที่เป็น electrophile หรือ nucleophile ซึ่งส่งผลให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายซึ่งจะนำไปสู่การอักเสบของผิวหนังได้ สำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ความแรงของสารเคมีต่อความว่องไวต่ออาการแพ้ของผิวหนังนั้น มีการใช้วิธี local lymph node assay (LLNA) ซึ่งเป็นการทดลองที่ค่อนข้างใช้เวลานานและการทดสอบค่อนข้างมีราคาสูงและยังเป็นการทำร้ายสัตว์อีกด้วย ในการทดลองประเภทนี้ เมื่อมีการทดสอบสารประกอบแต่ละครั้งก็จะต้องคร่าชีวิตของหนูไปด้วย

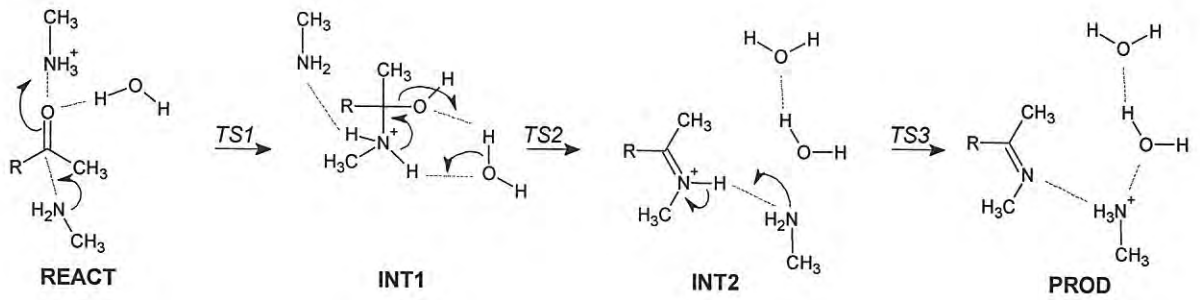
สำหรับงานวิจัยในที่นี่ เราได้ทำการศึกษาด้วยวิธีการที่นับว่าราคาไม่แพง ใช้เวลาไม่นานมาก และยังเป็นการช่วยชีวิตสัตว์ทดลองได้ นั่นคือ ระเบียบวิธีการคำนวณ ซึ่งสามารถใช้ทำนายความแรงของสารเคมีที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ของผิวหนัง ที่มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาประเภท Schiff base (SB) ดังแสดงในภาพที่ 4.1



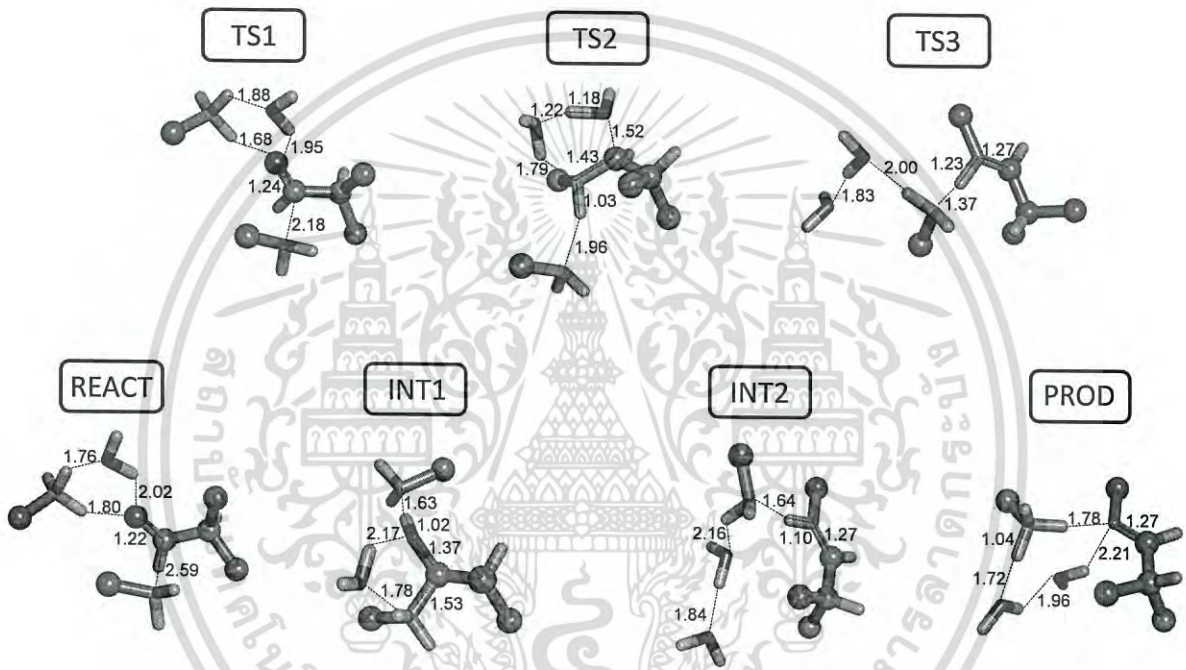
ภาพที่ 4.1: Mechanism of Schiff base formation for compounds of ตารางที่ 2

ได้มีการจำลองแบบปฏิกิริยาโดยอาศัยแผนภาพที่ 4.1 ซึ่งมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในภาพที่ 4.2 ในที่นี้โมเลกุลของน้ำ 2 โมเลกุล และโมเลกุลของ methanamine 2 โมเลกุล ที่ปรากฏในโครงสร้าง ทั้งนี้เพื่อใช้ในการจำลองปฏิกิริยาทางชีวเคมี และในภาพที่ 4.3 แสดงตัวอย่างของกลไกปฏิกิริยาเกี่ยวข้องกับ 4 ขั้นตอนหลัก (TS1, TS2 และ TS3) และ 2 intermediates (INT1 และ INT2) ที่มีค่าความยาวพันธะภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุล ณ บริเวณที่เกิดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2: Three distinct steps are associated with the SB reaction mechanism

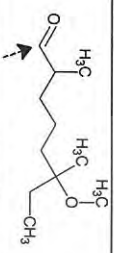
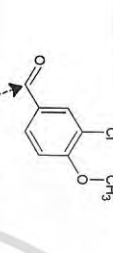
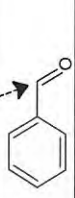
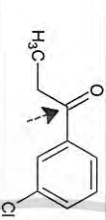
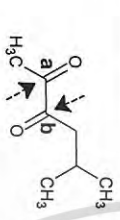

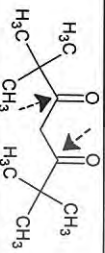
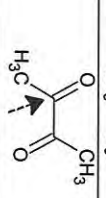


ภาพที่ 4.3: ตัวอย่างค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญของกลไกปฏิกิริยาแบบ SB

ผลการคำนวณพบว่า TS2 เป็นขั้นกำหนดอัตรา (rate determining step, RDS) และดังนั้นจึงคาดว่า ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนสำคัญที่สุดที่จะสัมพันธ์กับผลการทดลองที่รายงานด้วยค่า pEC3 กล่าวคือถ้ามีค่ามาก แสดงว่ามีความเป็นพิษสูงด้วย และในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการเกิดสารผลิตภัณฑ์นั้น กลไกการเกิดปฏิกิริยาดำเนินผ่านจาก INT2 ไปเป็น PROD ได้อย่างง่ายในขั้นตอนที่รวดเร็ว ทั้งนี้สังเกตได้จาก TS1 มีพลังงานที่ใกล้เคียงกับ INT2 ผลการคำนวณค่าพลังงานได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.1- 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

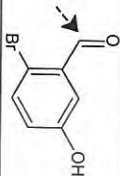
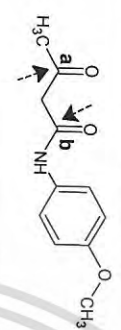
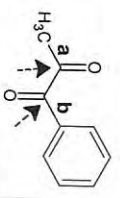

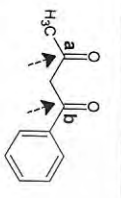
ตารางที่ 4.1 ตารางสรุปผลการคำนวณของสารประกอบลำดับที่ 1-9

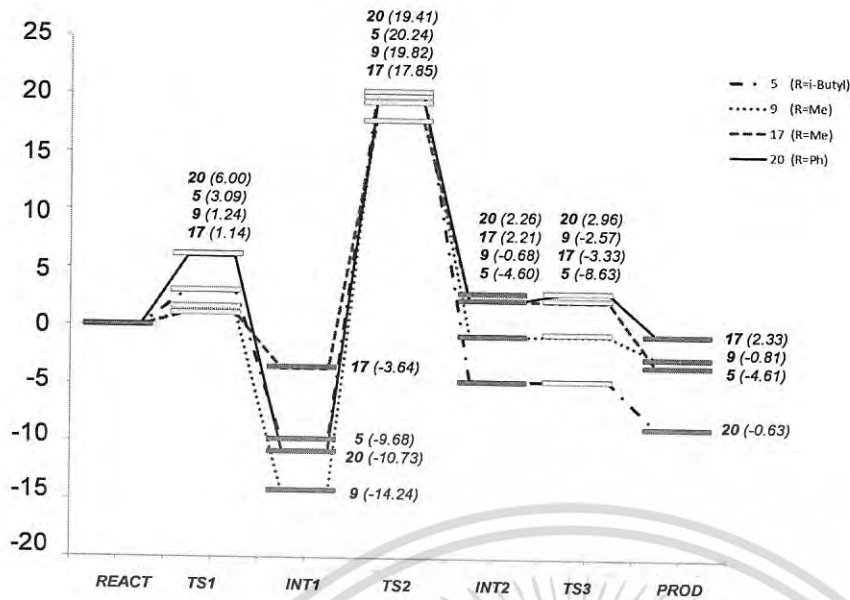
ID	Structure	pEC3 Obs.	pEC3 Pred.	TS1	INT1	TS2	INT2	TS3	PROD	clogP
1		0.00	0.63	0.75	-12.75	15.39 (28.14)	-8.85	-7.60 (1.25)	-10.09	2.62
2		0.00	0.54	2.42	-10.20	19.44 (29.63)	-8.45	-5.87 (2.58)	-9.71	2.13
3		0.00	0.65	1.62	-11.38	18.68 (30.06)	-7.55	-6.72 (0.84)	-10.75	1.69
4		0.00	0.23	6.14	-4.40	25.15 (29.55)	-6.19	-0.78 (0.57)	-2.38	2.84
5		0.69	0.62*	1.67	-13.01	20.63 (33.64)	-1.04	0.38 (1.42)	-9.54	1.83
6		0.78	-1.42	3.09	-9.68	20.24 (29.92)	-4.61	-4.60 (0.01)	-8.63	1.83
				3.07	-0.98	27.35 (28.33)	0.88	3.94 (3.06)	2.07	2.30
7		0.80	0.98	1.36	-11.14	15.33 (26.47)	-5.02	-6.67 (0.41)	-9.64	2.62
8		0.84	1.39	7.37	3.66	25.33 (21.66)	-2.56	-2.43 (0.13)	-6.55	3.93
9		0.89	0.40*	1.24	-14.24	19.82 (34.06)	-0.81	-0.68 (0.13)	-2.57	0.40

ตารางที่ 4.2 ตารางสรุปผลการคำนวณของสารประกอบลำดับที่ 10-17

ID	Structure	pEC3 Obs.	pEC3 Pred.	TS1	INT1	TS2	INT2	TS3	PROD	clogP
10		1.03	1.65	4.71	-3.46	20.86 (24.31)	11.76	-	-5.42	2.89
				22.40	11.10	33.78 (22.68)	4.47	4.50 (0.03)	2.06	2.89
11		1.27	0.002	0.87	-12.32	14.87 (27.19)	-7.03	-6.08 (0.96)	-10.06	4.42
12		1.33	0.71	1.42	-11.88	17.25 (29.13)	-7.57	-2.20 (5.37)	-11.14	2.00
13		1.39	0.48	1.35	-11.24	15.55 (26.79)	-7.13	-6.65 (0.48)	-9.61	3.57
14		1.42	1.65	7.65	0.02	20.70 (20.67)	2.51	5.40 (2.89)	-3.16	3.81
				18.02	2.22	27.91 (25.69)	-6.23	-5.72 (0.52)	-6.96	3.81
15		1.60	1.21	2.03	-9.57	18.34 (27.91)	-6.74	-0.98 (5.76)	-10.46	1.45
16		1.62	1.14*	0.00	0.00	31.54 (31.54)	0.89	10.00(99.99)	-2.45	0.00
17		1.63	3.02*	13.08	10.53	37.43 (26.90)	18.80	12.83 (-5.97)	12.00	0.45
				1.14	-3.64	17.85 (21.49)	2.33	2.21(-0.12)	-3.33	0.45

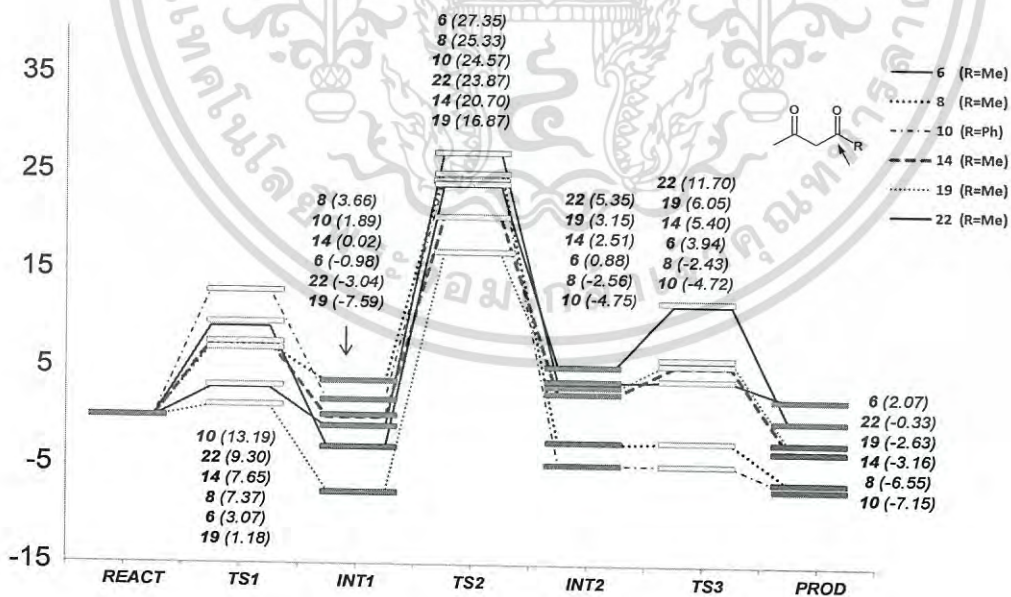
ตารางที่ 4.3 ตารางสรุปผลการคำนวณของสารประกอบลำดับที่ 18-22

ID	Structure	PEC3 Obs.	PEC3 Pred.	TS1	INT1	TS2	INT2	TS3	PROD	clogP
18		1.89	0.28	1.71	-12.97	17.88 (30.85)	-6.30	-5.21 (1.10)	-11.97	2.15
19		1.97	2.02	16.10	10.46	39.45 (28.99)	-0.67	-0.62 (0.06)	-0.80	1.28
				1.18	-7.59	16.87 (24.45)	3.15	6.05 (2.91)	-2.63	1.28
20		2.06	0.58*	3.83	-12.58	22.51 (35.09)	3.53	-1.24 (0.59)	-1.96	1.82
				8.35	-8.38	21.76 (30.14)	4.61	5.30 (0.69)	1.72	1.82
21		3.00	2.41	7.56	-2.94	23.03 (25.97)	-5.28	-5.16 (0.12)	-6.50	-0.27
22		3.61	3.00	9.30	-3.04	23.87 (26.91)	5.35	11.70 (6.35)	-0.33	1.75
				21.30	9.88	28.62 (18.74)	3.35	3.51 (0.16)	10.57	1.75



ภาพที่ 4.4 :กราฟแสดง relative energy barrier ของกลุ่ม 1,2 -diones

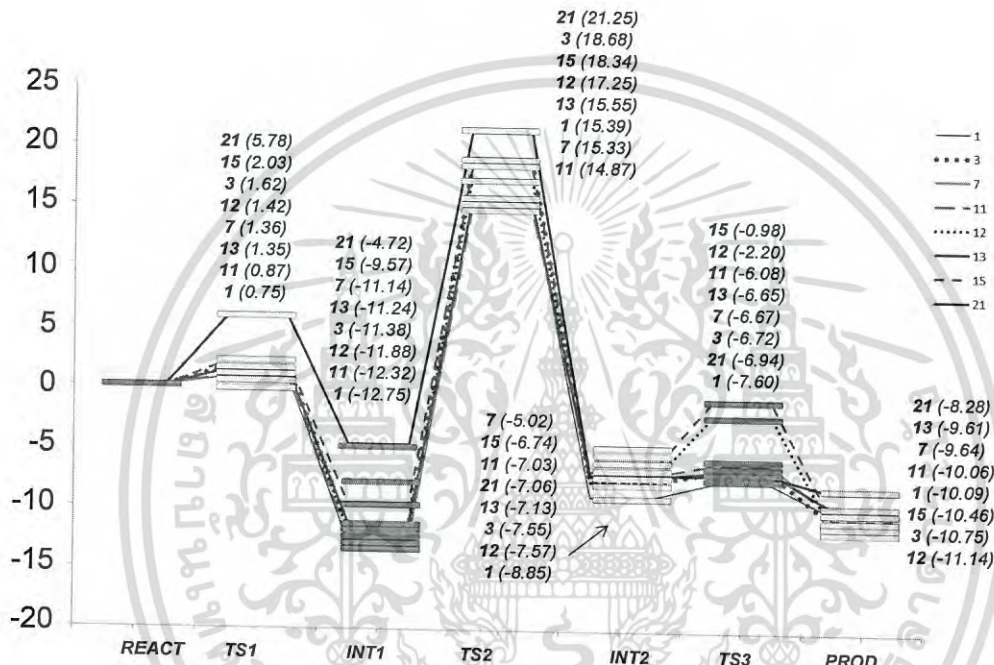
กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบในกลุ่ม 1,2-diones ดังแสดงในภาพที่ 4.4 ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกที่การเข้าทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ 2 ตำแหน่ง พบว่า INT1 ของสารประกอบ มีค่าพลังงานต่ำที่สุดและมีค่าต่ำกว่าสารผลิตภัณฑ์ กล่าวคือมีความเสถียรสูงสุด และสารประกอบ 9 มีความเสถียรสูงสุด ทั้งนี้อธิบายได้ว่าเนื่องจากเป็นผลของหมู่แทนที่ R=CH₃ ที่มีขนาดเล็ก ความเกะกะของหมู่แทนที่มีน้อย จึงส่งผลให้โมเลกุลมีพลังงานต่ำกว่า เมื่อเทียบกับหมู่แทนที่มีขนาดใหญ่



ภาพที่ 4.5 :กราฟแสดง relative energy barrier ของกลุ่ม 1,3 -diones

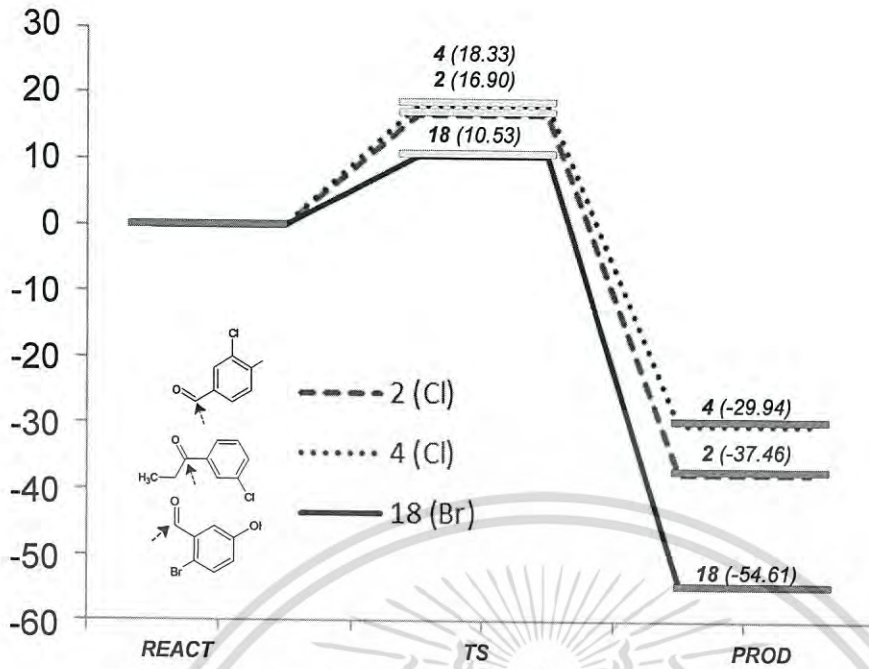
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวโน้มกลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบในกลุ่ม 1,3 -diones ดังแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่า มีแนวโน้มเป็นแบบเดียวกันกับปฏิกิริยาของสารประกอบในกลุ่ม 1,2 -diones ที่มีการเข้าทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ 2 ตำแหน่ง โดยการเข้าแทนที่ในตำแหน่งของหมู่แทนที่ $R=CH_3$ มีพลังงานต่ำกว่า เมื่อเทียบกับการเข้าแทนที่ในตำแหน่งที่หมู่ R ที่มีความเกะกะและมีขนาดใหญ่ และ INT1 เสถียรมากที่สุด ทั้งนี้แนวโน้มพลังงานและกลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารในกลุ่ม 1,2 -diones, 1,3 -diones และ aldehyde (ภาพที่ 4.6) มีแนวโน้มไปในลักษณะเดียวกัน



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดง relative energy barrier ของกลุ่ม aldehydes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

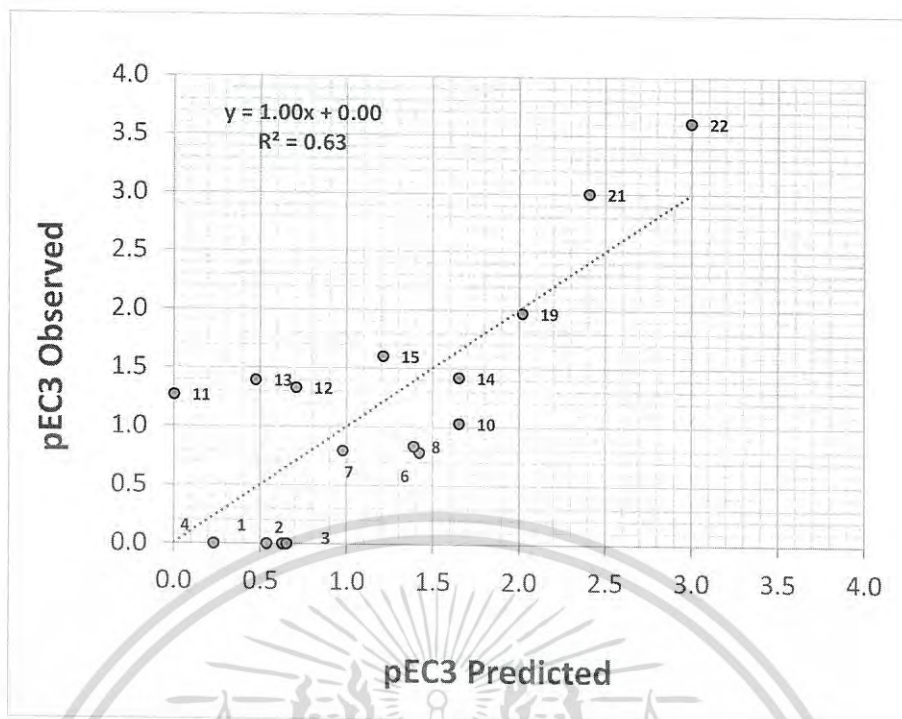


ภาพที่ 4.7 กราฟแสดง relative energy barrier ของปฏิกิริยา S_NAr

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ของปฏิกิริยา Schiff Base มาเปรียบเทียบกับค่าการแทนที่ของปฏิกิริยา S_NAr (ภาพที่ 4.7) ซึ่งได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ ซึ่งรายงานไว้ว่า สารประกอบที่มีค่า barrier ต่ำกว่า 10 kcal/mol จัดเป็นสารประกอบที่ว่องไวต่อการเกิดอาการแพ้ ค่าที่ทำนายได้จากการสุ่มโมเลกุล 2, 4, 18 ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดปฏิกิริยาแบบ S_NAr พบว่าแนวโน้มการทำนายของค่าพลังงานของ TS ให้ผลสอดคล้องกับค่า clogP จึงสามารถสรุปได้ว่าผลการทดลองไม่ว่าจะเป็นปฏิกิริยาแบบ Schiff Base หรือ S_NAr นั้นให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มไปในลักษณะเดียวกัน ซึ่งเป็นการยืนยันถึงระดับความน่าเชื่อถือของวิธีการคำนวณในลักษณะนี้ ว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับระบบอื่น ๆ ได้ในทำนองเดียวกัน

นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pEC₃ กับ RDS barrier ในภาพที่ 4.8 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกันสำหรับความซับซ้อนทางชีวภาพ ณ จุดสุดท้าย ($r^2=0.63$) จะสังเกตเห็นว่าความสัมพันธ์ประเภทนี้สามารถประมาณได้จากการคำนวณด้วยวิธีการที่ไม่ซับซ้อน และยังสามารถช่วยให้เราสามารถประเมินความเสี่ยงของสารเคมีได้โดยปราศจากการทำการทดลองโดยใช้สัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



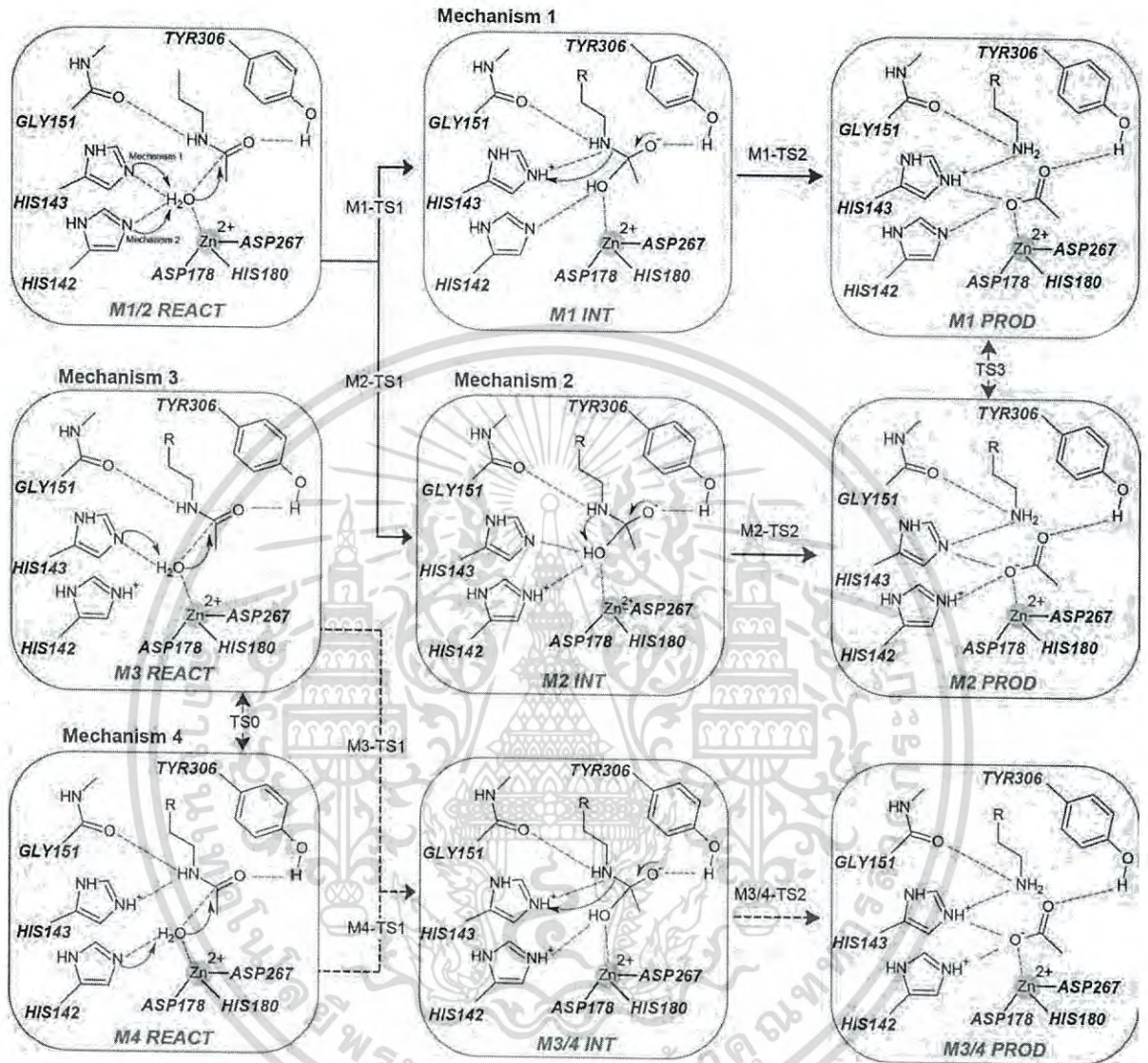
ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pEC3 กับ ค่า RDS barrier ที่คำนวณได้ของสารตัวอย่าง

4.2 Application of QM/MM

ในการนำระเบียบวิธีการคำนวณ QM/MM ที่มีเบซิสเซต M06/6-31G* (Lan12dz สำหรับโลหะ) มาประยุกต์ใช้ในการศึกษากลไกปฏิกิริยา deacylation ของ Histone deacetylases (HDACs) ในกลไกปฏิกิริยา (ภาพที่ 4.9) พบว่า mechanism 1 เกี่ยวข้องกับ His143 ทำหน้าที่เป็นเบส โดยจะรับโปรตอนจาก Zn²⁺ ที่มีน้ำล้อมรอบ ในขณะที่ mechanism 2 เกี่ยวข้องกับ His142 ทำหน้าที่รับโปรตอน ซึ่ง HDAC สามารถทำหน้าที่ได้แม้ว่าในตำแหน่งที่วงไวต่อปฏิกิริยาจะมีโปรตอนมาจับแล้ว ดังนั้นในที่นี้จึงได้เสนอ mechanism 3 ที่มีโปรตอนมาจับกับ His142 และ His143 ทำหน้าที่เป็นเบส ส่วน Mechanism 4 ที่มีโปรตอนมาจับกับ His143 และ His142 ทำหน้าที่เป็นเบส.

ในการเคลื่อนย้ายโปรตอนจาก His143 (Mechanism 1) และ His142 (Mechanism 2). ผลจากการคำนวณด้วย QM/MM แสดงให้เห็นว่าพลังงาน barrier เท่ากับ 24.1 kcal/mol ซึ่งจะเกิดไปเป็นสารมัธยันต์ (INT) โดยที่ His142 ทำหน้าที่เป็นเบส เมื่อเปรียบเทียบกับ His143 พบว่า barrier ต่ำกว่าคือมีพลังงาน 17.5 kcal/mol ความเสถียรสัมพันธ์ของสารมัธยันต์นี้ สอดคล้องไปในแนวทางเดียวกันกับ transition states (TS) ที่มีค่าพลังงาน 16.3 vs 12.2 kcal/mol ซึ่งสรุปได้ว่าเป็นผลเนื่องมาจากอันตรกิริยาระหว่าง ประจุ กับ ประจุ ซึ่งโมเลกุลมี Zn²⁺ เป็นศูนย์กลางนั่นเอง

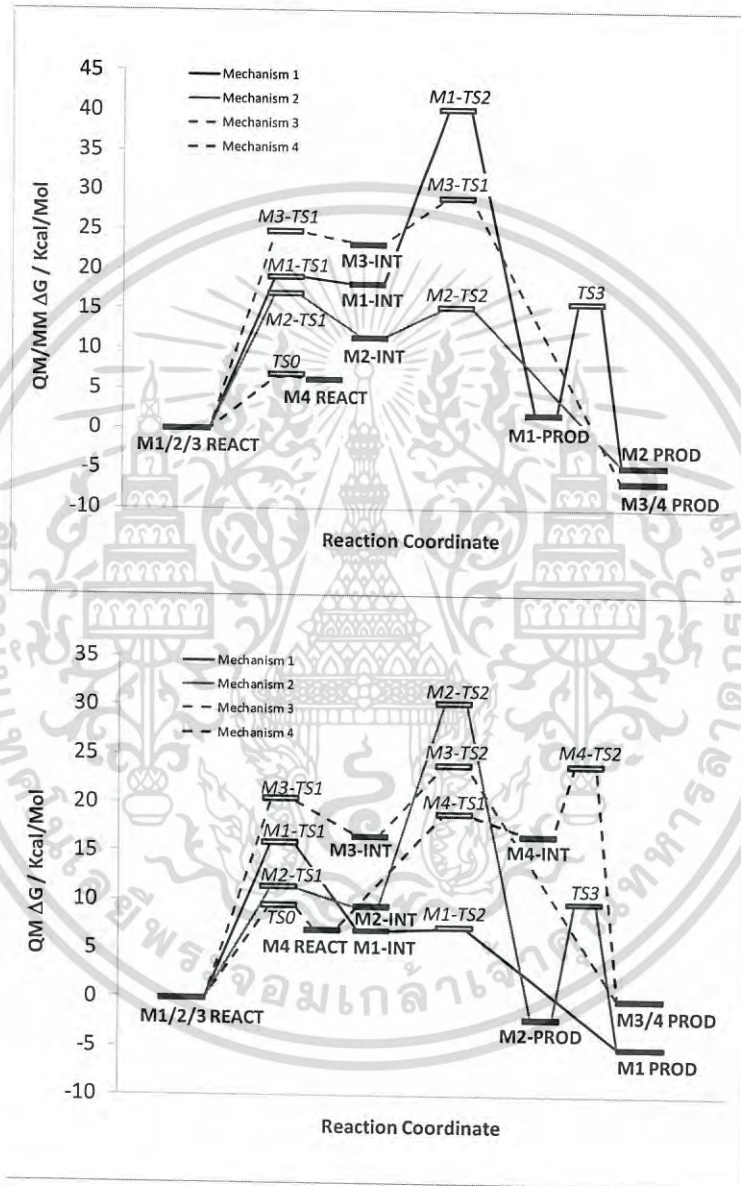
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 .แสดงกลไกปฏิกิริยา deacylation 4 กลไกที่เกี่ยวข้องกับ HDAC8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปฏิกิริยา HDAC8 deacylation จากภาพที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าการคำนวณด้วยระเบียบวิธี QM และ QM/MM ให้ผลที่สอดคล้องกัน ทั้งนี้โครงสร้างที่ได้จากการทำ optimized มีรูปร่างลักษณะใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ประจุที่ล้อมรอบในระบบที่คำนวณด้วยวิธี QM/MM ในการเปรียบเทียบ partial charges ที่ได้จากการคำนวณทั้งสองระเบียบวิธี ซึ่งให้เห็นว่าการแจกแจงของประจุภายในโปรตีน มีความสำคัญและมีผลกระทบมากกว่าประจุจากสิ่งแวดล้อม



ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่คำนวณด้วยแบบจำลอง QM/MM (บน) และ QM (ล่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยา Schiff bases ของสารประกอบ 22 ชนิด พบว่าผลการทำนายค่าความสัมพันธ์ระหว่าง RDS และ logP สามารถใช้สร้าง SAR เพื่อเป็นแนวทางในการวิเคราะห์ศักยภาพของความว่องไวต่ออาการแพ้ของผิวหนังได้ พิจารณาจากค่า RDS barriers ของ aldehydes, ketone, 1,2 และ 1,3 diones พบว่ามีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับค่าความว่องไวต่อปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นที่ได้จากผลการทดลอง ผลการคำนวณที่สอดคล้องกับการทดลองในที่นี้ สามารถแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของระเบียบวิธีการคำนวณว่า มีบทบาทสำคัญต่องานวิจัยในด้านการทำนายความว่องไวต่ออาการแพ้ของผิวหนังได้อย่างดี ในงานวิจัยที่กำลังดำเนินการต่อเนื่องจากงานวิจัยปัจจุบัน เป็นการนำปัจจัยอื่น ๆ ที่นับว่ามีบทบาทสำคัญต่อการวิจัยในด้านนี้เช่น clogP มาหาความสัมพันธ์โดยใช้แบบจำลองพหุตัวแปร (multivariate models) เพื่อปรับปรุงผลการทำนายให้มีคุณภาพที่ดียิ่งขึ้น

นอกเหนือจากการคำนวณด้วย QM ในที่นี้ได้มีการนำระเบียบวิธีการคำนวณ QM/MM มาศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากการใช้ระเบียบวิธีการคำนวณด้วย QM/MM มีบทบาทสำคัญอย่างมากในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการค้นพบตัวยาโดยเฉพาะ metalloproteins ซึ่งในที่นี้ใช้ Histone deacylases (HDACs) มาศึกษาด้วย QM และ QM/MM ทั้งนี้การเลือกตำแหน่งที่ว่องไวต่อปฏิกิริยานับว่ามีส่วนสำคัญเช่นกัน เพราะอาจจะมีส่วนในการทำให้ผลการทดลองที่ได้คลาดเคลื่อนได้ จากการศึกษาที่มีความสำคัญกับตัวยับยั้งโคเวเลนต์ ระเบียบวิธี QM/MM สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกสารประกอบเพื่อให้ได้ targets ที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด และลดความว่องไวที่ metabolic targets ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

Papers:

Chotpatiwetchkul, W., Boonyarattanakalin, K., Gleeson, D. and Gleeson, M. Paul. Exploring the catalytic mechanism of dihydropteroate synthase: elucidating the differences between the substrate and inhibitor. *Org. Biomol. Chem.*, 2017, 15, 5593-5601. (Impact factor = 3.654).

Gleeson, D.; and Gleeson, M. P. Application of QM/MM and QM methods to investigate histone deacetylase 8. *Med. Chem. Commun.*, 2015, 6, 477-485. (Impact factor = 2.495)

Gleeson, D.; and Gleeson, M. P. Theoretical Study on Skin Sensitization Potential for Schiff Base Reaction. *Chem. Res. Toxicol.* 2017, (Impact factor = 3.529) (In preparation for submission).

Poster presentations:

In PACCON 2017, 2-3 February 2017, Green Convergence on Chemical Frontiers, Bangkok, Thailand.

Gleeson, D., Jongkon, N., Boonyarattanakalin, K. and and Gleeson, M.P. Theoretical Studies Focused on the Prediction of the Skin Sensitization Potential of Schiff Bases. (PH-P-008).

Jongkon, N., Gleeson, D. and Gleeson, M.P. Theoretical study on pyrophosphoryl transfer catalyzed by 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase (HPPK): A key enzyme in folate pathway. (PH-P-005).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- (1) Kimber, I.; Basketter, D. A.; Gerberick, G. F.; Dearman, R. J. Allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 201-211.
- (2) Kimber, I.; Weisenberger, C. A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. Assay development and results of an initial validation study. *Arch Toxicol* **1989**, *63*, 274-282.
- (3) Anderson, S. E.; Siegel, P. D.; Meade, B. J. The LLNA: A Brief Review of Recent Advances and Limitations. *J. Allergy* **2011**, *2011*.
- (4) Aptula, A. O.; Patlewicz, G.; Roberts, D. W. Skin Sensitization: Reaction Mechanistic Applicability Domains for Structure–Activity Relationships. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1420-1426.
- (5) Enoch, S. J.; Roberts, D. W. Predicting Skin Sensitization Potency for Michael Acceptors in the LLNA Using Quantum Mechanics Calculations. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 767-774.
- (6) Silverman, R.: *The organic chemistry of enzyme catalysed* Academic Press, 2002.
- (7) Dimitrov, S. D.; Low, L. K.; Patlewicz, G. Y.; Kern, P. S.; Dimitrova, G. D.; Comber, M. H.; Phillips, R. D.; Niemela, J.; Bailey, P. T.; Mekenyan, O. G. Skin sensitization: modeling based on skin metabolism simulation and formation of protein conjugates. *Int J Toxicol* **2005**, *24*, 189-204.
- (8) Aptula, A. O.; Roberts, D. W. Mechanistic Applicability Domains for Nonanimal-Based Prediction of Toxicological End Points: General Principles and Application to Reactive Toxicity. *Chemical Research in Toxicology* **2006**, *19*, 1097-1105.
- (9) Roberts, D. W.; Patlewicz, G.; Kern, P. S.; Gerberick, F.; Kimber, I.; Dearman, R. J.; Ryan, C. A.; Basketter, D. A.; Aptula, A. O. Mechanistic applicability domain classification of a local lymph node assay dataset for skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1019-1030.
- (10) Roberts, D. W.; Aptula, A. O.; Patlewicz, G. Electrophilic Chemistry Related to Skin Sensitization. Reaction Mechanistic Applicability Domain Classification for a Published Data Set of 106 Chemicals Tested in the Mouse Local Lymph Node Assay. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 44-60.
- (11) Roberts, D. W.; Schultz, T. W.; Wolf, E. M.; Aptula, A. O. Experimental Reactivity Parameters for Toxicity Modeling: Application to the Acute Aquatic Toxicity of SN2 Electrophiles to *Tetrahymena pyriformis*. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *23*, 228-234.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (12) Roberts, D. W.; Aptula, A. O.; Patlewicz, G. Mechanistic Applicability Domains for Non-Animal Based Prediction of Toxicological Endpoints. QSAR Analysis of the Schiff Base Applicability Domain for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 1228-1233.
- (13) Roberts, D. W.; Fragnals, R.; Lepoittevin, J. P.; Benezra, C. Refinement of the relative alkylation index (RAI) model for skin sensitization and application to mouse and guinea-pig test data for alkyl alkanesulphonates. *Arch Dermatol Res.* **1991**, *286*, 387-394.
- (14) Li, Y.; Tseng, Y. J.; Pan, D.; Liu, J.; Kern, P. S.; Gerberick, G. F.; Hopfinger, A. J. 4D-Fingerprint Categorical QSAR Models for Skin Sensitization Based on the Classification of Local Lymph Node Assay Measures. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 114-128.
- (15) Miller, M. D.; Yourtee, D. M.; Glaros, A. G.; Chappelow, C. C.; Eick, J. D.; Holder, A. J. Quantum Mechanical Structure-Activity Relationship Analyses for Skin Sensitization. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 924-929.
- (16) Patlewicz, G.; Chen, M. W.; Bellin, C. A. Non-testing approaches under REACH – help or hindrance? Perspectives from a practitioner within industry. *SAR QSAR Env. Res.* **2011**, *22*, 67-88.
- (17) Hansch, C.; Fujita, T. ρ - σ - π analysis. a method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616-1626.
- (18) Gleeson, D. Skeletal Isomerization of Butene in Ferrierite: Assessing the Energetic and Structural Differences between Carbenium and Alkoxide Based Pathways. *The Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115*, 14629-14636.
- (19) Gleeson, D. A theoretical study of cis-trans isomerisation in H-ZSM5: probing the impact of cluster size and zeolite framework on energetics and structure. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2008**, *22*, 579-585.
- (20) Gleeson, D.; Limtrakul, J. The catalytic conversion of acetonitrile to acrylonitrile in zeolitic systems: Rationalization of experimental observations using theoretical simulations. *J Mol Struct-Theochem* **2007**, *824*, 23-31.
- (21) Gleeson, D.; Tehan, B.; Gleeson, M. P.; Limtrakul, J. Evaluating the enthalpic contribution to ligand binding using QM calculations: effect of methodology on geometries and interaction energies. *Organic & biomolecular chemistry* **2012**, *10*, 7053-7061.
- (22) Leach, A. R.: *Molecular Modelling. Principles and Applications*; Longman limited: Harlow, 1996.
- (23) Rozas, I. On the nature of hydrogen bonds: an overview on computational studies and a word about patterns. *Phys Chem Chem Phys* **2007**, *9*, 2782-2790.
- (24) Grimme, S. Do Special Noncovalent π - π Stacking Interactions Really Exist? *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 3430-3434.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (25) Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 1210-1250.
- (26) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-class Functionals and 12 Other Functionals. *Theor Chem Acc* **2008**, *120*, 215-241.
- (27) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A.: Gaussian 03, Revision C.02. Gaussian, inc: Wallingford CT, 2004.
- (28) De Vivo, M. Bridging quantum mechanics and structure-based drug design. *Front Biosci-Landmark* **2011**, *16*, 1619-1633.
- (29) Hansen, N.; Kerber, T.; Sauer, J.; Bell, A. T.; Keil, F. J. Quantum Chemical Modeling of Benzene Ethylation over H-ZSM-5 Approaching Chemical Accuracy: A Hybrid MP2:DFT Study. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 11525-11538.
- (30) Shaw, K. E.; Woods, C. J.; Mulholland, A. J.; Abraham, D. J.: QM and QM/MM Approaches to Evaluating Binding Affinities. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*; John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- (31) Jing, Y. Q.; Han, K. L. Quantum mechanical effect in protein-ligand interaction. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2010**, *5*, 33-49.
- (32) Schwöbel, J.; Ebert, R.-U.; Kühne, R.; Schüürmann, G. Modeling the H bond donor strength of -OH, -NH, and -CH sites by local molecular parameters. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *30*, 1454-1464.
- (33) Valero, R.; Gomes, J. R. B.; Truhlar, D. G.; Illas, F. Good performance of the M06 family of hybrid meta generalized gradient approximation density functionals on a

difficult case: CO adsorption on MgO(001) (vol 129, art no 124710, 2008). *J Chem Phys* 2009, 130, -.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก งบประมาณเพื่อการวิจัย

งบประมาณการวิจัย ปีที่ 1

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)	
	ปีละ	รวม
1. งบบุคลากร		
ค่าจ้างชั่วคราว		76,200
ค่าจ้างผู้ช่วยนักวิจัย วุฒิ ม.6 หรือเทียบเท่า 1 คน	76,200	
1 คน x 7,620 บาท x 10 เดือน		
2. งบดำเนินงาน		
2.1 ค่าตอบแทน		-
2.2 ใช้สอย		30,000
2.2.1 ค่าบริการตรวจเช็คและ/หรือซ่อมอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง	20,000	
2.2.2 ค่าจ้างจัดพิมพ์เอกสาร และจัดทำรูปเล่มรายงานการวิจัย	10,000	
2.3 ค่าวัสดุ		235,000
2.3.1 วัสดุคอมพิวเตอร์ (เช่น CPU, RAM, Motherboards, Powersupply, Harddisks, Cases, KVM switch)	145,000	145,000
2.3.2 วัสดุสำนักงาน		90,000
1) ค่าถ่ายเอกสาร	5,000	
2) ค่าเครื่องเขียน และอุปกรณ์สำนักงาน (เช่น กระดาษ แฟ้ม ปากกา สมุด ชั้นเก็บวัสดุภัณฑ์)	25,000	
3) ค่าวัสดุหนังสือ วารสารและตำรา	20,000	
4) ค่าหมึกพิมพ์สำหรับเครื่องพิมพ์เลเซอร์	20,000	
5) ค่าอุปกรณ์จัดเก็บ บันทึกข้อมูล	20,000	
2.4 ค่าสาธารณูปโภค		2,000
ค่าไปรษณีย์	2,000	
3. งบลงทุน		90,000
ค่าครุภัณฑ์		
3.1 ซอฟต์แวร์		
1) Statistica 10 for QSAR analysis	50,000	
3.2 เครื่องสำรองไฟ	40,000	
รวมงบประมาณที่เสนอขอปีที่ 1	สี่แสนสามหมื่นสามพันสองร้อยบาทถ้วน	433,200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งบประมาณการวิจัย ปีที่ 2

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)	
	ปีละ	รวม
1. งบบุคลากร		
ค่าจ้างชั่วคราว		76,200
ค่าจ้างผู้ช่วยนักวิจัย วุฒิ ม.6 หรือเทียบเท่า 1 คน	76,200	
1 คน x 7,620 บาท x 10 เดือน		
2. งบดำเนินงาน		85,000
2.1 ค่าตอบแทน	-	-
2.2 ใช้สอย		20,000
2.2.1 ค่าบริการตรวจเช็คและ/หรือซ่อมอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง	10,000	
2.2.2 ค่าจ้างจัดพิมพ์เอกสาร และจัดทำรูปเล่มรายงานการวิจัย	10,000	
2.3 ค่าวัสดุ		65,000
2.3.1 วัสดุสำนักงาน		
1) ค่าถ่ายเอกสาร	5,000	
2) ค่าเครื่องเขียน และอุปกรณ์สำนักงาน (เช่น กระดาษ แฟ้ม ปากกา สมุด)	20,000	
3) ค่าวัสดุหนังสือ วารสารและตำรา	20,000	
4) ค่าหมึกพิมพ์สำหรับเครื่องพิมพ์เลเซอร์	10,000	
5) ค่าอุปกรณ์จัดเก็บ บันทึกข้อมูล	10,000	
3. งบลงทุน		-
รวมงบประมาณที่เสนอขอปีที่ 2	หนึ่งแสนหกหมื่นหนึ่งพันสองร้อยบาทถ้วน	161,200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงการวิจัยและได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Exploring the catalytic mechanism of dihydropteroate synthase: elucidating the differences between the substrate and inhibitor†

Warot Chotpatiwetchkul,^a Kanokthip Boonyarattanakalin,^b Duangkamol Gleeson^c and M. Paul Gleeson^{d*}

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2017, 15, 5593

Received 24th May 2017,
Accepted 12th June 2017

DOI: 10.1039/c7ob01272a

rsc.li/obc

Dihydropteroate synthase (DHPS) catalyzes the condensation of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate (DHPPP) with *p*-aminobenzoic acid (*p*ABA) and is a well validated target for anti-malarial and anti-bacterial drugs. However, in recent years its utility as a therapeutic target has diminished considerably due to multiple mutations. As such, considerable structural biology and medicinal chemistry effort has been expended to understand and overcome this issue. To date no detailed computational analysis of the protein mechanism has been made despite the detailed crystal structures and multiple mechanistic proposals being made. In this study the mechanistic proposals for DHPS have been systematically investigated using a hybrid QM/MM method. We aimed to compare the energetics associated with S_N1 and S_N2 processes, whether the S_N1 process involves a carbocation or neutral DHP intermediate, uncover the identity of the general base in the catalytic mechanism, and understand the differences in substrate vs. inhibitor reactivity. Our results suggest a reaction that follows an S_N1 process with the rate determining step being C–O bond breaking to give a carbocation intermediate. Comparative studies on the inhibitor STZ confirm the experimental observations that it is also a DHPS substrate.

Introduction

Dihydropteroate synthase is a key enzyme in the folate pathway of prokaryotes and primitive eukaryotes. It catalyzes the condensation of *p*-aminobenzoic acid (*p*ABA) with 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate (DHPPP) to form 7,8-dihydropteroate and pyrophosphate (Scheme 1). Humans lack the enzyme meaning it represents an ideal target for the treatment of infections including those associated with bacteria and parasites. Since the 1930s members of the sulfonamide class of DHPS inhibitors have been used as *p*ABA competitive inhibitors for bacterial infections (*i.e.* sulfanilamide),^{1–3} and as 2nd line anti-malarial treatment in combination with the inhibitors of another folate enzyme dihydrofolate reductase

(DHFR) (*i.e.* sulfadoxine/pyrimethamine).⁴ Sulfonamides act as competitive inhibitors of DHPS and dead-end substrate analogs.^{5,6} However, in the past 2 decades their effectiveness has been reduced greatly as a result of mutations in the enzyme.^{4,7,8}

Given its status as a validated drug target there has been a renewed scientific effort to better understand the protein from a structural perspective, the role of mutations on substrate and inhibitor binding and reactivity, and the implementation of new strategies to allow the development of next generation inhibitors.^{9–12}

DHPS has a classic TIM barrel α/β structure in which the eight α -helices and β -strands form alternating, parallel repeating units.^{6,7,9,13,14} The DHPPP binding site is located towards the center of the enzyme (Fig. 1). The pterin scaffold of DHPPP makes two strong interactions with Asp101 and Lys220 while its pyrophosphate forms 4 interactions with the active site Mg^{2+} ion, Arg254 and His256. The octahedral Mg^{2+} interacts with a further 3 water molecules and the carbonyl of Asn27. *p*ABA binds towards the entrance of the active site pocket which is defined by two flexible loops. The substrate forms π -stacking interactions with Phe33 and Phe189, and comes into contact with the hydrophobic portion of the sidechains of Pro69 and Lys220 and a hydrogen bond (H-bond) with Ser221.⁷ Earlier research on DHPS suggested that the reaction

^aFaculty of Pharmacy, Siam University, 38 Petkasem Rd., Phasicharoen, Bangkok, 10160, Thailand

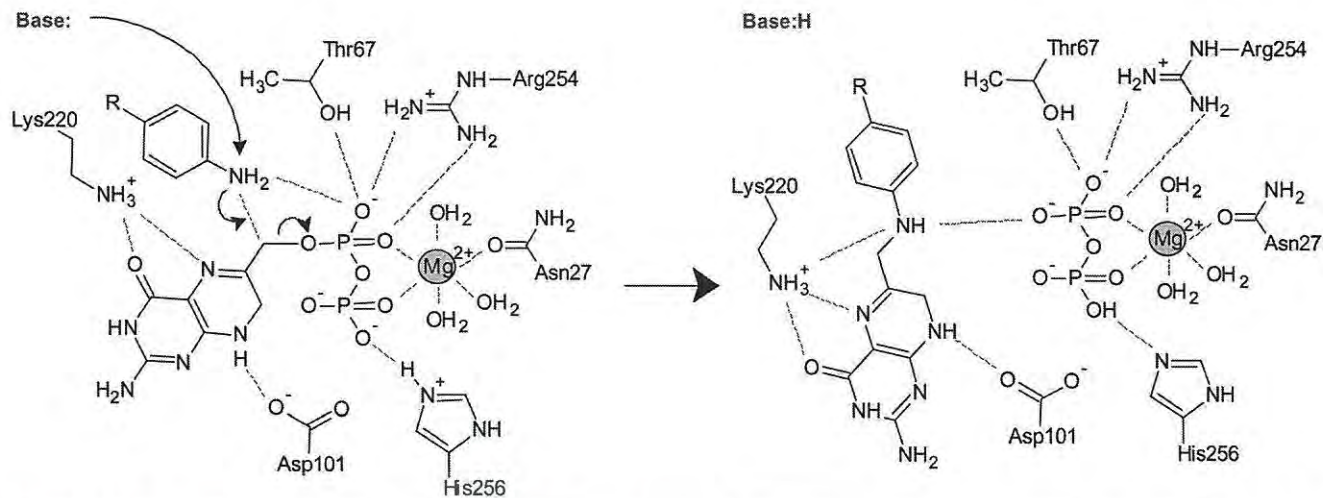
^bCollege of Nanotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

^dDepartment of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

E-mail: paul.g@kmitl.ac.th; Fax: +66 2 3298346; Tel: +66 8 69779678

† Electronic supplementary information (ESI) available: Active distances, charges and additional energies. See DOI: 10.1039/c7ob01272a



Scheme 1 A 2D illustration of the catalytic reaction of DHPS. The residues and substrates presented correspond to those included directly in the QM region of the QM/MM model used to study the catalytic reaction. It has been proposed that the reaction can occur *via* either S_N1 or S_N2 processes. The base required to activate the aniline nucleophile is unknown meaning that it is difficult to conclude which process is conclusively operating. R = carboxylate for *pABA* and *N*-(1,3-thiazol-2-yl)sulfonamide for STZ.

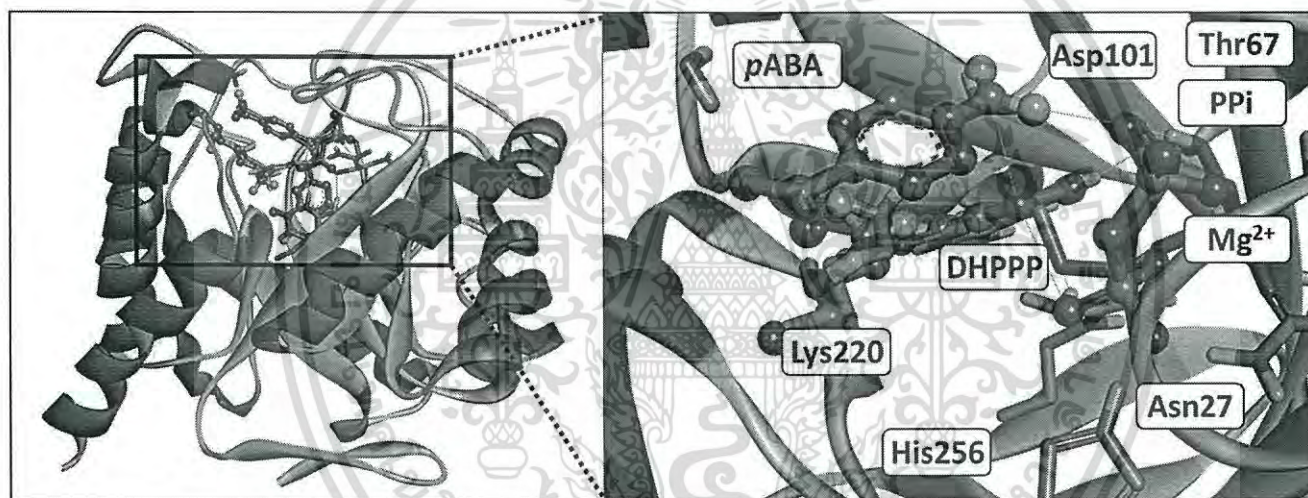


Fig. 1 Cartoon representation of DHPS with active sites shown in stick (left), and a comparison of the QM/MM optimized reactant structures (stick representation, Lys220(+1)) with the X-ray coordinates of the DHP intermediate PPI and *pABA* complex (PDB ID 3TYZ, ball & stick).

mechanism followed an S_N2 process, with nucleophilic attack by the *pABA* aniline (C9–N bond formation) and the pyrophosphate leaving (C9–O bond breaking) occurring in a concerted fashion.^{6,14} However, recent detailed crystallographic studies on *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* have revealed aspects of the reaction mechanism in unprecedented detail, pointing to the existence of an S_N1 process.⁷ Yun *et al.* obtained structures of reactant, product as well as intermediate-like states, where the pyrophosphate-pterin bond has already broken, but nucleophilic attack by *pABA* has not yet occurred. The authors subsequently performed QM cluster calculations on a DHPS model consisting of 188 active site atoms. The density functional theory (DFT)

calculations pointed to a significant charge transfer between the formally positively charged intermediate (termed DHP^+) and the surrounding active site. DHP^0 , formed by an additional proton transfer from pterin N8 to Asp101, was found to be unstable, decomposing to DHP^+ . This intermediate was found to have an energy of approximately 24 kcal mol⁻¹ higher than that of DHPPP. Whilst, confirming that an intermediate state was indeed stable, in agreement with the experimentally based crystallography data, the QM calculations did not include the *pABA* substrate, so the relative energetics associated with the S_N1 or S_N2 processes could not be evaluated, and indeed the identity of the general base required in the reaction remains unresolved.

In this study we report a detailed computational investigation of the reaction mechanism of DHPS using hybrid QM/MM calculations^{15–17} in conjunction with the most recent protein structure of DHPS. QM/MM methods offer a distinct advantage over QM cluster models in that they can describe the bond breaking and forming processes involved in chemical reactions while also including the steric and electronic effects imposed by the surrounding protein. In this way we can gain additional information regarding the catalytic events occurring within a protein, beyond the original X-ray structure. We use the QM/MM model to explore the full energetic profile associated with the reaction of *p*ABA and DHPP, S_N1 vs. S_N2 processes, the nature of the intermediate formed, and importantly, the identity of the base that deprotonates the *p*ABA amine to facilitate nucleophilic attack. In addition, since sulfonamide drugs are close structural analogs of *p*ABA, and exhibit their antimicrobial activity through competition, we were interested in comparing and contrasting their reactivity given the existence of data showing that the former are also substrates of the protein.⁷

Computational methods

The structural coordinates of DHPS from *Yersinia pestis* were downloaded from the RCSB protein data bank (PDB code: 3TYZ, Chain A, 2.07 Å).⁷ Amino acids with missing atoms were added using Discovery Studio 4.0 (Accelrys Inc., San Diego, CA). DHPPP was created by bonding the DHP intermediate with pyrophosphate. The protonation states of an ionizable amino acid residue were determined using the PROPKA program^{18,19} and based on a visual analysis of the amino acid environment surrounding each residue. Histidine residues 34, 43, 112, 140, 168, 196 and 208 were set as HIE, 167 as HID and 2, 108, 150, 203 and 257 as HIP. We use the residue numbering of DHPS from *Bacillus anthracis*, rather than *Yersinia pestis*, so as to be consistent with the original report of Yun *et al.*⁷

Molecular dynamics simulations

Molecular dynamics simulations were performed on the DHPS X-ray coordinates in order to obtain a reliable starting structure for QM/MM calculations. The system was solvated in a box of TIP3P water with a box gap of 1.2 nm. The model was neutralized using 0.15 mM NaCl. RESP charges for the substrates were obtained by optimizing each substrate (Gaussian 09 Revision d01²⁰) at the HF/6-31G(d) in conjunction with the RESP protocol of AmberTools 1.5.²¹ Ligand topology files were generated using the ACPYPE script and the GAFF force-field.^{22,23} All molecular dynamics simulations were performed using the Gromacs program v4.5²⁴ with the AMBER99SB force-field^{25,26} as follows: all atoms except for hydrogens were restrained for the initial optimization (harmonic restraint of 1 kcal mol⁻¹ Å⁻²). The structure was further optimized with the restraint placed on the protein backbone only. Molecular dynamics simulations were then performed for 1 ns to produce a reduced strain protein with DHPPP and *p*ABA

bound in a catalytically relevant conformation suitable for assessing protein reactivity.^{27–30} The system was heated to 300 K over 100 ps, followed by 200 ps of equilibration and 1 ns of production using the NPT scheme. All dynamics simulations employed a 1 nm VDW cutoff, the Lincs algorithm and a 2 fs time step. A Berendsen coupling thermostat³¹ and the particle mesh Ewald³² were employed.

QM/MM simulations

The QM region of the QM/MM model contained the key polar active site residues surrounding the active site: Asn27, Thr67, Asp101, Lys220, Arg254, His256, the substrate, metal cofactor (Mg²⁺) and five water molecules. A second QM region was investigated, adding residues Asn120 & Asp114 which can interact with the DHPPP pterin ring. However, this resulted in only minor energetic differences (Table S6†). Therefore, the former QM region was used, consisting of 136 atoms in total. Solvent molecules beyond the active site were removed, except for two at the mouth of the active site which were included in QM. Two separate models were created, one in which Lys220 was protonated (termed Lys220(+1)) and a second where it was deprotonated (termed Lys220(0)). All systems were maintained electroneutral.

All QM/MM calculations utilized the ONIOM scheme as provided in the Gaussian 09 D.01 program.²⁰ All stationary points were optimized with the density functional theory (DFT) M062X functional combined with the 6-31+G(d,p) basis set for the P atom and the 6-31G(d) basis set for H, C, N, O, S and Mg atoms. The MM region was modelled using the AMBER forcefield with the electronic embedding scheme. Residues beyond 12 Å of the substrate, and counter ions were fixed, as were the atoms that crossed the QM/MM boundary. All structures were fully characterized using normal coordinate analysis. The ΔH values were corrected for translational, electronic, rotational and vibrational motions to give the corresponding ΔG values (Table 1).

Table 1 QM/MM energies (ΔG) for the stationary points reported in this study (kcal mol⁻¹)

	Carbocation INT		Neutral INT	
	Lys220(+1)	Lys220(0)	Lys220(+1)	Lys220(0)
<i>p</i> ABA				
REACT	0.0	0.0	0.0	0.0
TS1	29.7	20.8	27.0	27.3
INT	24.2	17.0	18.1	17.0
TS2	33.1	17.5	33.1	24.5
PROD	2.0	-24.9	2.0	-24.9
STZ	Carbocation INT		Neutral INT	
	Lys220(+1)	Lys220(0)	Lys220(+1)	Lys220(0)
REACT	—	0.0	0.0	0.0
TS1	—	21.4	22.3	26.2
INT	—	14.8	11.7	13.1
TS2	—	18.3	26.8	32.7
PROD	—	-13.9	-6.1	-13.9

Results

Structure of the DHPS-DHPPP-*p*A BA complex

The QM/MM model of the reactant with Lys220 in the protonated form, termed the Lys220(+1) model contains DHPPP and *p*A BA bound to the active site and shares a close similarity to that of the experimentally determined structure used to generate it (Fig. 1). The Mg²⁺ cofactor exists in an octahedral configuration. Three water molecules are bound to Mg²⁺ with Mg–O distances of 2.07 Å, 2.05 Å and 2.04 Å. The pyrophosphate of the DHPPP substrate forms two interactions with Mg²⁺ having distances of 2.08 Å and 2.09 Å to the alpha phosphate and beta phosphate respectively. It forms a sixth interaction with the sidechain of Asn27 (2.05 Å) (Fig. 2). Arg254 forms a bidentate interaction with the alpha phosphate (2.11 and 2.07 Å) and Thr22 forms a H-bond with the beta phosphate (1.72 Å) which are critical to stabilize the PPI leaving group during the reaction. The pterin group of DHPPP forms a strong interaction with Lys220 (1.64 Å) *via* the O4 atom and with Asp101 (2.06 Å) *via* the N8 hydrogen. *p*A BA does not form such extensive interactions within the active site as the pterin group or PPI groups, which is consistent with its lower *K_m* and sensitivity to mutations.⁷ The molecule interacts with the beta phosphate of PPI *via* its NH₂ group (2.81 Å) and Lys220 (3.17 Å) with its nitrogen lone pair. *p*A BA also makes interactions with 2 QM water molecules and Ser222 towards the mouth of the pocket *via* its carboxylate group.

The condensation of *p*A BA and DHPPP to form 7,8-dihydropteroate and PPI requires 2 distinct steps to occur, (a) the breaking of the C9–O bond in DHPPP and the loss of PPI, and (b) the abstraction of a proton from the relatively weak NH₂ nucleophile of *p*A BA and the attack of the substrate C9 atom (Scheme 1). Experimental data point to an S_N1 reaction mechanism due to the existence of an experimental structure in which the C9–O bond is broken but the C9–N bond has yet to form. It has been postulated that the Mg²⁺ ion and residues on loops 1–2 are important in stabilizing the leaving PPI group. It is now believed that DHPS catalysis proceeds *via* an S_N1 reaction and that the conserved pterin-binding pocket is specifically designed to stabilize the DHP⁺ intermediate by charge delocalization.⁷ The negatively charged Asp101 plays a key role in stabilizing the carbocation intermediate (DHP⁺), although the QM cluster calculations suggest that this does not extend to accepting a proton. Lys220 is presumed to exist in its protonated form and the direct interaction with the proposed DHP⁺ intermediate must therefore be destabilizing.

Natural substrate pathway

Experimental data point to the rate determining step being the breaking of the DHP–PPI bond and subsequent QM calculations suggest that the process involves a cationic intermediate formed *via* the S_N1 process. However, the QM studies on DHPS⁷ relied on a relatively small QM cluster lacking the steric and electronic effects of the extended protein. In addition, the *p*A BA substrate was not modeled, so the assessment of whether an S_N1 or S_N2 reaction exists was not directly per-

formed, and indeed the general base required to activate *p*A BA is still not clear.

The reaction of *p*A BA and DHPPP to form 7,8-dihydropteroate and PPI was initially investigated using the Lys220(+1) QM/MM model. We first sought to identify possible bases close enough from *p*A BA for proton transfer to occur. Given that *p*A BA is a relatively weak nucleophile, we therefore hypothesize that proton transfer could occur towards the end of the N–C9 bond formation process. Analysis of the structural data suggests that only proton transfer to the beta phosphate of PPI is the only possibility in the Lys220(+) model. The QM/MM optimized reactant structure has a corresponding O...H distance of 2.81 Å.

PPI as the general base

Attempts to obtain a transition state in which both proton transfer and nucleophilic attack occurred in a concerted, S_N2 process, were unsuccessful due to the high acidic p*K_a* of the aniline group of *p*A BA and the distance to the PPI moiety. Two transition states were located following the elongation of the C9–O bond alone, one being carbocationic in nature (TS1-C), and the other having a neutral character due to the concomitant proton transfer from the pterin N8 to Asp101 (TS1-N). Proton transfer from His256 to PPI has already occurred in both transition states, aiding the stabilization of the PPI group leaving. The C9–O distance in TS1-C is 2.17 Å and slightly more elongated in TS1-N at 1.98 Å. In the latter case, the proton between pterin N8 and Asp101 has already been transferred (ESI, Table S1†). The net charges on the pterin DHP fragments were found to be 0.66 and –0.10 A.U., respectively (ESI, Table S2†). The predicted transition states are both high in energy (~30 kcal mol^{–1}) and lead to stable intermediates. The C9–O bond is broken yet the C9–N bond remains unformed (Fig. 2). INT-C and INT-N display C9–N distances of 2.80 and 2.84 Å, and C9–O distances of 2.77 and 2.83 Å, respectively. The Asp101–H distance is 1.61 Å in the cationic intermediate (termed DHP⁺) and 1.00 Å in the neutral intermediate (termed DHP⁰), resulting in a DHP pterin net charge of 0.77 and 0.09 A.U., respectively. Asp101 is also capable of delocalizing charge onto the Mg²⁺ center *via* a H-bond with one of the coordinated water molecules (Fig. S1 & S2†). The interaction is found to be stronger for the carbocation structures based on the shorter observed H-bond distances (Tables S1 & S2†). The DHP⁺ intermediate is predicted to have an energy of 24.2 kcal mol^{–1}, compared to 18.1 kcal mol^{–1} for DHP⁰. The former result is close in value to that reported from the earlier QM cluster calculations.⁷

The second step in the catalytic process involves the nucleophilic attack of the DHP⁰ intermediate by *p*A BA. PPI is the only general base that exists in the vicinity of the aniline nucleophile in the Lys220(+) QM/MM model (Fig. 1). The *p*A BA NH₂ approaches the C9 of pterin reaching a distance of 2.05 Å for DHP⁺ (TS2-C) and 1.91 Å for DHP⁰ (TS2-N) before the transition state is found. In both cases the energy is lower than that of TS1, indicating that it is not the rate determining step. The two transition states converge to the same product which has a C9–N distance of 1.47 Å and a C9–O distance of 2.99 Å.

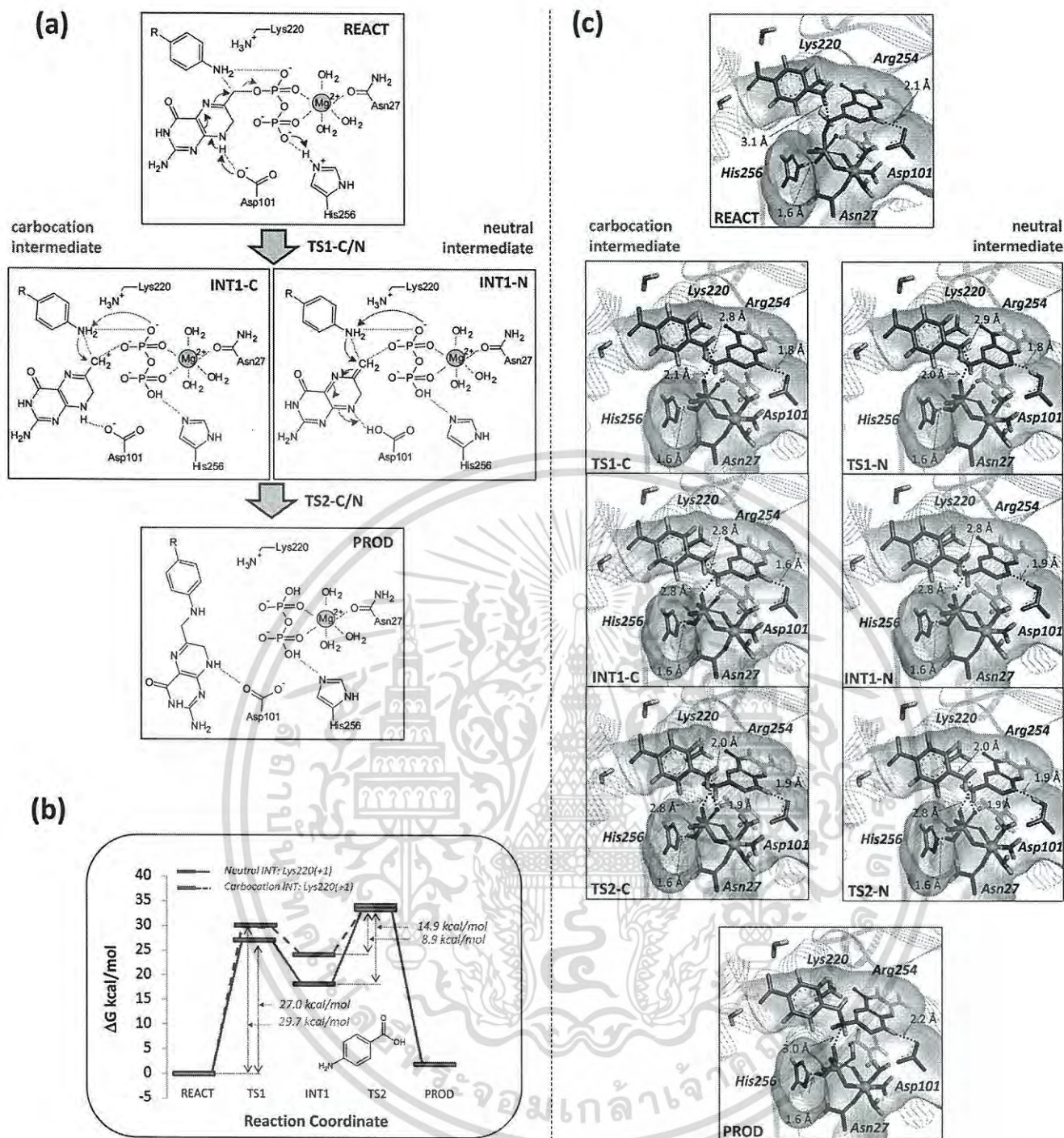


Fig. 2 Mechanism, predicted stationary points and energetics associated with the DHPS catalyzed reaction of *p*ABA with DHPP. The results were obtained using the Lys220(+1) model, where PPI acts as the general base.

The return of the proton from Asp101 to the pterin N8 position in the DHP⁰ model occurs after TS2-N in a barrier-less fashion.

Lys220 as the general base

The existence of Lys220 in the protonated state undoubtedly has a destabilizing effect on the carbocation intermediate formed following C9–O bond breaking. We therefore sought to

investigate the simulation of the reaction with Lys220 in the neutral state (Lys220(0) model) (Fig. 3). Indeed, the results from PROPKA3.0¹⁹ show that at pH 7.0 this residue has a predicted *pK_a* of 4.59, indicating that it exists preferentially in the neutral form. This would also open up the possibility that Lys220 could function as the general base in the second step of the reaction. The reactant obtained using the Lys220(0)

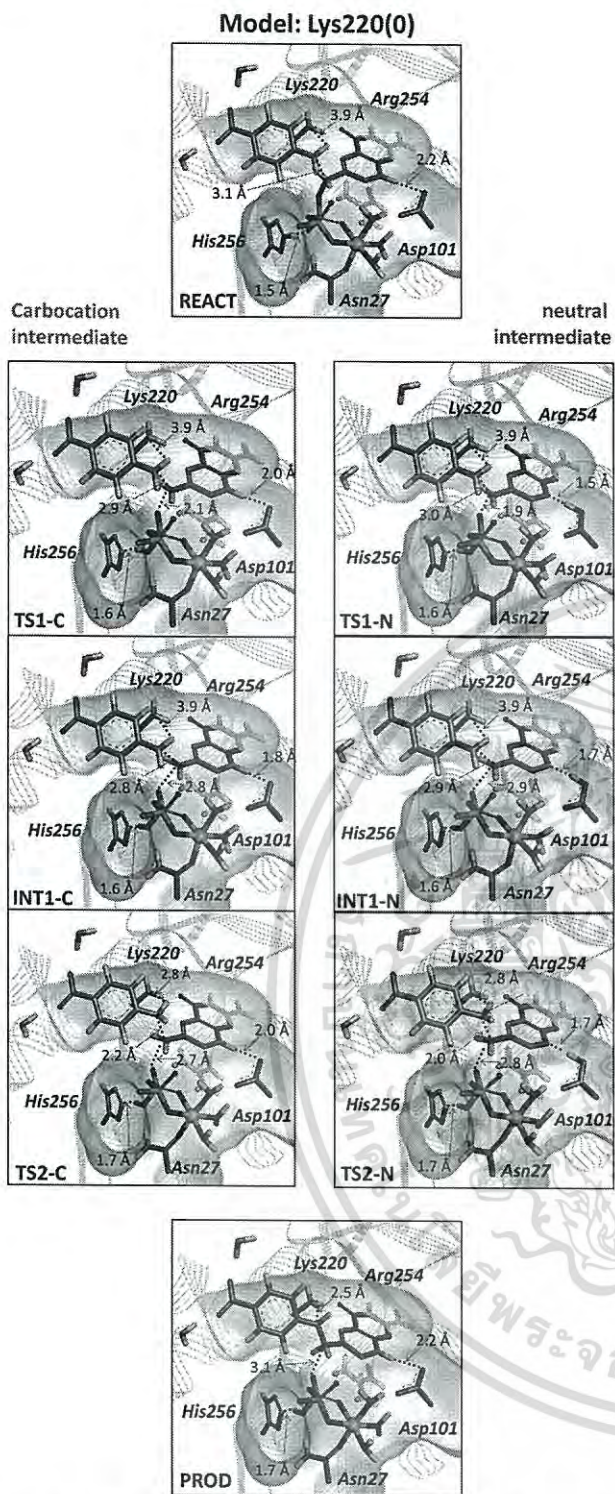


Fig. 3 The key distances associated with the DHPS-*p*ABA reaction mechanism Lys220(0) where Lys220 acts as the general base.

QM/MM model (Fig. 3 & Table S2†) differs from the Lys220(+1) in that the interaction with the pterin carbonyl is lost in preference to the N5 H-bond acceptor. In the latter model the interaction with the N5 acceptor is found to be considerably weaker than the 6 position carbonyl. Another difference between the

models is that *p*ABA shifts somewhat, now forming a stronger H-bond interaction with PPI (1.86 vs. 2.81 Å, respectively) as a result of the subtle translation of Lys220.

An S_N2 is not possible in the Lys220(0) model. The elongation of the C9–O bond distance also leads directly to a stable intermediate well before proton transfer can occur. Both DHP^+ and DHP^0 intermediates are observed, with the latter now being somewhat higher in energy than the former. The C9–O distance is found to be 2.81 Å, and the C9–N distance to be 2.17 Å in the DHP^+ intermediate and 2.92 Å and 1.98 Å in the DHP^0 intermediate respectively. His256 proton transfer has also occurred in both, while proton transfer between Asp101 and the pterin N5 atom has occurred prior to reaching the TS1 of the neutral intermediate. We find that the carbocation based process is more favorable, by 1.1 kcal mol⁻¹, than the neutral one. The net charge on DHP^+ was found to be almost identical to the comparable model where Lys220 was protonated, indicating that the decrease in energy compared to the Lys220(+1) model must be due to the reduced coulombic destabilization. Both DHP^+ and DHP^0 intermediates are predicted to have an energy of 17.0 kcal mol⁻¹ in the Lys220(0) model, considerably lower than those obtained in the Lys220(+1) model.

The nucleophilic attack of the DHP^0 intermediates occurs with the late transfer of the aniline proton to Lys220. The closer proximity of Lys220 to the *p*ABA amine, and its more basic pK_a , means that proton transfer to it alone can occur. The transition state (TS2) for DHP^+ was found at a C9–N bond distance of 2.20 Å, and at 2.02 Å for DHP^0 . Again, proton transfer from Asp101 to the pterin N5 has already occurred for DHP^0 (TS2-N). Proton transfer from *p*ABA NH₂ to Lys220 can only occur following the traversal of TS2, once the C9–N bond has essentially formed. TS2 in this case is found to be considerably lower than TS2 for the Lys220(+1) model in-line with the basicity of the general bases involved in each model. The products obtained are therefore considerably lower in energy than the corresponding reactants, and lower than those obtained from the Lys220(+) model.

Sulfonamide inhibitor pathway

Sulfonamide inhibitors such as sulfathiazole (STZ) are competitive inhibitors of DHPS and weak substrates. We therefore performed a similar analysis of the reactivity of STZ in both QM/MM models. STZ in the Lys220(+1) model binds in the same expected reactant conformation. The most significant difference is a slight translation of STZ towards the pyrophosphate of DHPPP. The aniline group of STZ is found to interact more strongly with the pyrophosphate of DHPPP than *p*ABA (1.86 Å vs. 2.81 Å, respectively). STZ bound to the Lys220(0) QM/MM model binds slightly more strongly with PPI than the comparable *p*ABA molecule (2.08 Å vs. 2.18 Å, respectively). The reaction stationary points obtained for STZ are also structurally very similar to those obtained for *p*ABA (Tables S1 and S2†). However in the Lys220(+1) QM/MM model the carbocation based process was not observed. This appears to be due to the fact that neutral STZ cannot stabilize the carbocation intermediate as effectively as the negatively charged *p*ABA.

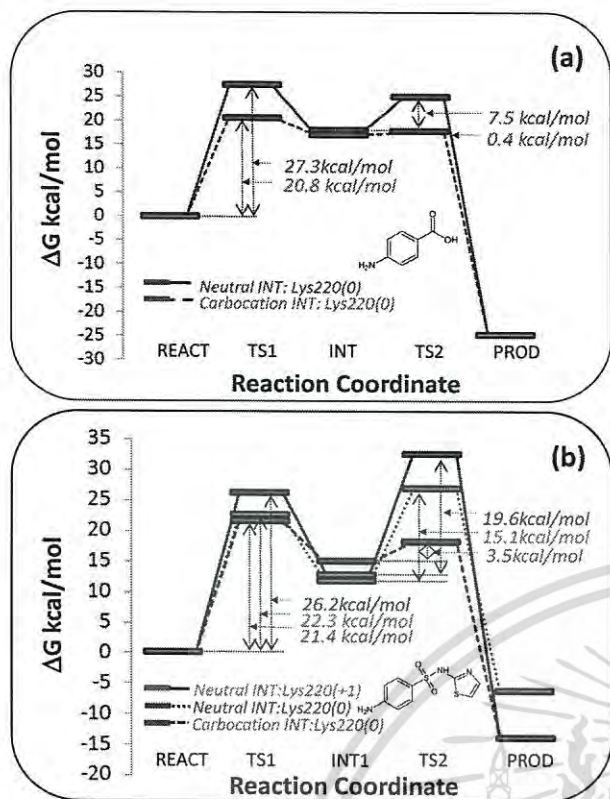


Fig. 4 Predicted reaction free energy profiles for the reaction of DHPPP with (a) pABA-Lys220(0) and (b) STZ-Lys220(+1) & Lys220(0).

Thus, for this QM/MM model we were only able to obtain a stable neutral intermediate.

The three TS1s obtained for STZ have C9–O distances of ~ 2.90 Å, with proton transfer from His256 having occurred, and that between Asp101 and the pterin N5 atom for the neutral intermediates also having taken place. The carbocation mediated process with Lys220 acting as the base is found to result in the lowest energy barrier (21.4 kcal mol⁻¹). This is higher than that observed for pABA and is consistent with the fact that a pABA bound Michaelis complex has not been determined, unlike STZ.⁷ TS1 is found to be the rate determining step for STZ and the products are energetically more favorable than the reactants (Fig. 4). Compared to pABA the products for STZ are 8.1 kcal mol⁻¹ more favorable in the Lys220(+1) model, and in the Lys220(0) model, is almost 12 kcal mol⁻¹ less favorable. This dramatic difference is a result of the formation of the protonated lysine, which provided electrostatic stabilization of the negatively charged pABA product, unlike STZ. These results would therefore point to pABA being the more reactive and more thermodynamically favorable substrate of DHPS.

Discussion

The experimental data reported by Yun and coworkers⁷ have demonstrated the existence of a transition state like intermedi-

ate structure where the pyrophosphate DHPPP has cleaved but the pABA nucleophile has not yet attacked. QM cluster calculation suggested that the intermediate was a carbocation, with stabilization of the positive charge provided by the surrounding residues. Our QM/MM calculations, which take into account the extended effect of the protein environment, and include the pABA nucleophile, also suggest the existence of a stable, high energy intermediate (Table 1 & Fig. 3). In our calculations, with Lys220 in the protonated form, the neutral intermediate is preferred over the carbocation. Proton transfer from the pterin N5 to Asp101 results in a thermodynamically more preferable intermediate with an energy of 18.1 kcal mol⁻¹, 6.0 kcal mol⁻¹ lower in energy than the carbocation equivalent. However, this model results in a high energy transition state of 27.0 kcal mol⁻¹. The energy of TS2 is 14.9 kcal mol⁻¹, with PPI acting as the general base required to abstract a pABA proton. This proton abstraction occurs well after TS2 has been reached due to the fact that aniline is a weak nucleophile/has a high acidic pK_a.

These findings prompted us to investigate alternative mechanistic possibilities. Lys220 interacts closely with the amine group of pABA in the product when in the protonated form, suggesting that it could potentially act as the base. Not only is it the closest base, its existence in a neutral state during step one would mean it could provide more effective stabilization of the intermediates, particularly the carbocation form. Our simulations showed that the resulting barrier for the carbocation intermediate was just 20.8 kcal mol⁻¹, resulting in an intermediate of 17.0 kcal mol⁻¹. The neutral intermediate was observed to be less favorable, having a transition state of 27.3 kcal mol⁻¹ and an intermediate with an energy of 17.0 kcal mol⁻¹. The results obtained with Lys220 in the deprotonated form show a relatively low rate determining barrier which is more consistent with the catalytic activity of the protein. The existence of a relatively low energy carbocation intermediate is also consistent with the conclusions derived from X-ray crystallography.⁷

Zhang *et al.*³³ have recently reported QM/MM studies focused on the PPI cleavage mechanism in three synthases (ATAS, TEAS, and FPPS). In this study C–O bond breakage is accompanied by C–C bond formation, in contrast to C–N bond formation in DHPS. Interestingly, they revealed an S_N1 process for TEAS (22.0 kcal mol⁻¹), S_N2 for FPPS (18.5 kcal mol⁻¹), and a borderline mechanism for ATAS (23.9 kcal mol⁻¹). For DHPS, the pterin intermediate can benefit from greater stabilization, favoring an S_N1 process and leading to a barrier of 20.8 kcal mol⁻¹.

For the purpose of comparison we evaluated the reactivity of the sulfonamide inhibitor STZ. STZ underwent condensation with DHPPP in DHPS with a relatively low energy barrier irrespective of the protonation state of Lys220. In the case where Lys220 was protonated and PPI acts as the general base the neutral intermediate mediated process was preferred with a rate determining barrier of 22.3 kcal mol⁻¹. When Lys220 was in the neutral form the carbocation process was preferred, displaying a rate determining barrier of 21.4 kcal mol⁻¹.

These results show that unlike the negatively charged *p*ABA substrate, STZ is not dramatically affected by the protonation state of Lys220. Overall we find that the lowest energy barrier for *p*ABA is 20.8 kcal mol⁻¹, 0.4 kcal mol⁻¹ lower than that observed for STZ which is in line with literature reports that it is a substrate, albeit slightly weaker.^{7,11}

Conclusions

In this study we present a detailed computational investigation into the reaction mechanism of DHPS using hybrid QM/MM calculations in conjunction with the most recent X-ray protein structure of the enzyme which captures a transition state like intermediate complex. Our QM/MM calculations differ from earlier QM studies in that we can take into account the extended effect of the protein environment, include the *p*ABA nucleophile, investigate the role of two possible general bases (PPI an Lys220) and the reactivity of the inhibitor STZ. Indeed, information regarding the reaction mechanism, the structure of the transition state at the rate determining step, or the individual protonation states of active site residues, can prove highly useful for structure based design.³⁴⁻³⁶

The QM/MM calculations reported here provide additional evidence to confirm that an S_N1 based mechanism is likely to operate in DHPS due to the weak nucleophilicity of the *p*ABA amine group. Stable high energy intermediates, both carbocation or neutral in nature could be observed, irrespective of the base involved in the second step of the reaction. The lowest energy pathway resulted when Lys220 was in its deprotonated form. This is the predicted protonation state of the residue according to PROPKA3.0.¹⁹ This favored the formation of a carbocation intermediate due to reduced destabilization of the carbocation pterin ring from the adjacent protonated lysine residue. Lys220 also functioned as the general base in the second step of the reaction. Further studies on the sulfonamide inhibitor STZ showed that the latter also reacted with DHPS with a slightly higher barrier. This observation is in line with experimental observations that sulfonamide inhibitors are also substrates of DHPS, being capable of functioning as competitive or dead-end inhibitors.

Acknowledgements

M. P. Gleeson would like to acknowledge financial support provided by the Thailand Research Fund (RSA570068). D. G. would like to acknowledge financial support from the King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (2558A11802059).

Notes and references

- 1 A. Bermingham and J. P. Derrick, *Bioessays*, 2002, **24**, 637-648.

- 2 S. Roland, R. Ferone, R. J. Harvey, V. L. Styles and R. W. Morrison, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 10337-10345.
- 3 G. Domagk, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 1935, **61**, 250-254.
- 4 T. Triglia, J. G. T. Menting, C. Wilson and A. F. Cowman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 13944-13949.
- 5 G. M. Brown, *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 536-540.
- 6 K. Babaoglu, J. Qi, R. E. Lee and S. W. White, *Structure*, 2004, **12**, 1705-1717.
- 7 M. K. Yun, Y. Wu, Z. Li, Y. Zhao, M. B. Waddell, A. M. Ferreira, R. E. Lee, D. Bashford and S. W. White, *Science*, 2012, **335**, 1110-1114.
- 8 M. W. Valderas, B. Andi, W. W. Barrow and P. F. Cook, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1780**, 848-853.
- 9 K. E. Hevener, M.-K. Yun, J. Qi, I. D. Kerr, K. Babaoglu, J. G. Hurdle, K. Balakrishna, S. W. White and R. E. Lee, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 166-177.
- 10 K. E. Hevener, W. Zhao, D. M. Ball, K. Babaoglu, J. Qi, S. W. White and R. E. Lee, *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, **49**, 444-460.
- 11 D. I. Hammoudeh, Y. Zhao, S. W. White and R. E. Lee, *Future Med. Chem.*, 2013, **5**, 1331-1340.
- 12 Y. Zhao, D. Hammoudeh, M.-K. Yun, J. Qi, S. W. White and R. E. Lee, *ChemMedChem*, 2012, **7**, 861-870.
- 13 I. C. Hampele, A. D'Arcy, G. E. Dale, D. Kostrewa, J. Nielsen, C. Oefner, M. G. Page, H. J. Schonfeld, D. Stuber and R. L. Then, *J. Mol. Biol.*, 1997, **268**, 21-30.
- 14 A. M. Baca, R. Sirawaraporn, S. Turley, W. Sirawaraporn and W. G. J. Hol, *J. Mol. Biol.*, 2000, **302**, 1193-1212.
- 15 H. M. Senn and W. Thiel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 1198-1229.
- 16 A. J. Mulholland, *Chem. Cent. J.*, 2007, **1**, 19.
- 17 J. Aqvist and A. Warshel, *Chem. Rev.*, 1993, **93**, 2523-2544.
- 18 C. R. Søndergaard, M. H. M. Olsson, M. Rostkowski and J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, **7**, 2284-2295.
- 19 M. H. M. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski and J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, **7**, 525-537.
- 20 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. M. Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision D.01*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2009.

- 21 D. A. Case, J. T. Berryman, R. M. Betz, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, G. Monard, P. Needham, H. Nguyen, H. T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D. R. Roe, A. Roitberg, R. Salomon-Ferrer, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, D. M. York and P. A. Kollman, *AMBER 15*, University of California, San Francisco, 2015.
- 22 J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman and D. A. Case, *J. Mol. Graphics Modell.*, 2006, **25**, 247–260.
- 23 J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman and D. A. Case, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1157–1174.
- 24 B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel and E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, **4**, 435–447.
- 25 E. Thompson, A. DePaul, S. Patel and E. Sorin, *PLoS One*, 2010, **5**, e10056.
- 26 V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg and C. Simmerling, *Proteins*, 2006, **65**, 712–725.
- 27 W. Chotpatiwetchkul, N. Jongkon, S. Hannongbua and M. P. Gleeson, *J. Mol. Graphics Modell.*, 2016, **68**, 29–38.
- 28 D. Gleeson and M. P. Gleeson, *MedChemComm*, 2015, **6**, 477–485.
- 29 N. Jongkon, W. Chotpatiwetchkul and M. P. Gleeson, *J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 11473–11484.
- 30 P. Pongprayoon and M. P. Gleeson, *J. Mol. Graphics Modell.*, 2014, **54**, 164–173.
- 31 H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola and J. R. Haak, *J. Chem. Phys.*, 1984, **81**, 3684–3690.
- 32 T. Darden, D. York and L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 10089–10092.
- 33 F. Zhang, N. Chen, J. Zhou and R. Wu, *ACS Catal.*, 2016, **6**, 6918–6929.
- 34 M. P. Gleeson and D. Gleeson, *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, **49**, 670–677.
- 35 M. De Vivo, *Front. Biosci., Landmark Ed.*, 2011, **16**, 1619–1633.
- 36 L. C. Menikarachchi and J. A. Gascon, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2010, **10**, 46–54.



CONCISE ARTICLE

Application of QM/MM and QM methods to investigate histone deacetylase 8†

Duangkamol Gleeson^a and M. Paul Gleeson^{*b}

Computational chemistry plays an important supporting role in the early stages of drug discovery research. Such methods are not without flaws, however they can be very useful in the development and testing of hypotheses as well as prioritizing aspects of the exploration process. In this paper we discuss some common issues with employing hybrid quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) methods in certain drug discovery applications. The QM/MM method provides a means to simulate large biological systems for moderate computational cost. We use the method to assess the metalloproteins, human deacetylases (HDACs), which are targets for a variety of medical conditions including neurodegenerative diseases and HIV infection. Metalloproteins in particular are a challenge to simulate using the rapid empirical methods preferred in the pharmaceutical industry. We report the use of a QM/MM scheme of only moderate computational cost to explore the active site as well as its catalytic reaction. We also demonstrate the value of the method over smaller QM clusters and show that the method is capable of describing the kinetic differences associated with replacing Zn²⁺ with other metal co-factors.

Received 17th October 2014,
Accepted 5th January 2015

DOI: 10.1039/c4md00471j

www.rsc.org/medchemcomm

1 Introduction

Biophysical techniques such as X-ray protein crystallography, nuclear magnetic resonance (NMR) and isothermal calorimetry (ITC) provide either direct or indirect information on ligand binding to proteins which can prove extremely useful in drug discovery.^{1–4} Protein crystallography can conclusively show the binding mode of inhibitors; NMR spectroscopy can be used to screen for active site binders indirectly and determine affinities; ITC provides useful information to optimize the enthalpic efficiency of inhibitors for their target.

Theoretical methods are also commonly used to estimate ligand binding modes to proteins, rationalise structure–activity relationships (SARs), estimate simple pairwise interactions or binding free energies, predict conformational preferences of substrates, estimate the reactivity of molecules or particular functional groups, as well as having many other uses.^{5,6} The ability to generate computationally derived atomic models to understand complex biological processes is desirable as the

results can be used to post rationalize observations as well as make future prediction. While computational methods are not without flaws,^{7–9} they are useful in that they allow scientists to develop and test hypotheses as well as prioritize aspects of the exploration process. The key to this process is the application of appropriate methods in appropriate situations.

Quantum mechanical (QM) methods offer a more accurate description of atomic systems yet in an industrial setting empirical molecular mechanics (MM) force fields dominate due to their greater simplicity and low computational time costs. Nevertheless, it is widely accepted that QM methods offer a better description of non-bonded interactions, metal–ligand association, charge distributions and conformational energies, as well as being able to simulate bond breaking and formation (*i.e.* reactions). The benefits of the more widespread introduction of QM based methods in the pharmaceutical industry are increasingly being discussed with the advent of cheaper, more capable personal computers and software tools.^{10–15}

Traditional *ab initio* or DFT QM methods are typically limited to relatively small atomic models for the reason of computational cost. For systems of biological interest this means that the key active site residues can be included in a model but the effects of the extended protein or solvent must be neglected. This has prompted interest in hybrid methods such as QM/MM.^{16–23} These methods, of which a number of implementations exist, split a model system into two, with the key active site residue treated using QM and the effects of

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, 50 Phaholyothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.
E-mail: paul.gleeson@ku.ac.th; Fax: +66 2 5793955;
Tel: +66 2 562 5555 extn 2210

† Electronic supplementary information (ESI) available: Additional active site graphics and tables containing energies and charges are provided. See DOI: 10.1039/c4md00471j

the extended protein and solvent treated using MM methods. Crucially, this method provides a means to represent large biological systems for potentially only moderate computational cost. Given the increasing interest in covalent inhibitors of late,^{24–26} such methods could offer real potential to computationally screen compounds to maximize reactivity at pharmacological targets and potentially minimise reactivity at metabolic targets.²⁷

Histone deacetylases (HDACs) are a family of Zn metalloproteins found in eukaryotic cells that catalyze the deacetylation of acetylated lysine residues of histones.^{28,29} They play a role in important cellular processes such as apoptosis, proliferation and senescence and have therefore received attention from a pharmaceutical development perspective.^{30,31} Two inhibitors of HDACs are currently licensed as anti-cancer agents while other molecules are in clinical development as neuro-degenerative treatments.³⁰

The HDAC family can be split into four distinct classes based on phylogenetic analyses: HDAC 1–3 & 8 constitute class I; HDAC 4–7, 9 & 10 class II; sirtuins 1–7, class III; and HDAC 11 alone constituting class IV.³² Class I/II HDACs have received the largest amount of attention in the literature due to their anti-cancer properties.³³ A number of X-ray crystal structures of class I protein HDAC8 have been reported in the literature and these have helped enormously to identify the structural features that give rise to the biochemical function of the overall family.^{34–36} The active site consists of a narrow pocket found deep within the protein, and contains the Zn metal cofactor. The Zn²⁺ metal exists in a square pyramidal configuration with bonds to the sidechains of His-180, Asp-178, Asp-267, and two bonds to the inhibitor. The reaction mechanism of class I/II HDACs has been postulated using crystal structure data reported for HDAC8.^{28,29}

The proteins in this family catalyse the deacetylation of substrates to give a free lysine residue and acetic acid. Catalysis is achieved *via* Zn²⁺ mediated nucleophilic attack of the carbonyl by an activated water nucleophile. This leads to the formation of a tetrahedral intermediate which can be stabilized through interaction with the side chain of Tyr-306.²⁸ The primary issue regarding the mechanism is the precise role of His-143/His-142 in the reaction, since either could act as the general base in the first step. In the second step of the reaction the tetrahedral intermediate decomposes by the reformation of the carbonyl bond, leading to the breakage of the N–C bond and the transfer of a proton to form the catalytic base.

Theoretical investigations into the reaction mechanism of HDAC8 have been reported by Zhang and co-workers.^{37,38} They used their Born–Oppenheimer *ab initio* QM/MM molecular dynamics methodology to estimate the free energy barriers rather than relying on the enthalpy alone. The inclusion of free energy effects while beneficial, comes at a cost, making the calculations lower in throughput and potentially unsuitable for use in virtual screening exercises. More recently Chen *et al.*³⁹ have employed QM/MM to investigate both HDAC8 inhibition and reactivity. Interestingly, the group noted that the wild-type reactivity profiles from different MD

snapshots gave very similar results. QM cluster calculations have been used to assess zinc binding motifs that have been the source of a number of interesting studies.^{40–42} Recent work supports the view that hydroxamic acids such as SAHA are highly effective due to their lower than expected acidic pK_a leading to their deprotonation (*via* His142) and therefore greater interaction with Zn²⁺ bound in the active site.³⁹

Novel inhibitors of HDACs are still being sought, with recent reports focusing on replacing the more common Zn²⁺ binding substituents such as carboxylates and hydroxamates with alternatives.⁴³ As such, higher throughput theoretical models to assess aspects of protein–ligand binding, and also reactivity, are desired. In this study we apply QM cluster calculations and QM/MM models to study substrate binding and reactivity at HDAC8 as the first step in our investigation of this protein. The goal of this work is to develop and validate QM and QM/MM HDAC8 models for use in a higher throughput manner. We employ a large QM active site representation, investigate the effect of the protein environment *vs.* an implicit solvent model, explore alternative mechanistic possibilities and assess the effect of ΔG correction derived from vibrational frequency calculations. We also attempt to further validate the methods by assessing how effectively the method can predict experimental rate constant differences associated with different metal co-factors. The overall aim is to identify more suitable computational models for use in analysing novel inhibitors targeting HDAC proteins, and in particular novel Zn binding moieties that are sub-optimally described by traditional MM methods.

2 Computational procedures

2.1 Model setup

The structural coordinates of HDAC8 were obtained from the RCSB protein data bank (PDB code: 2V5W, 2.0 Å).²⁹ Protein preparation was performed in the Discovery Studio (DS) 2.5 program with the CHARMM 22 force field⁴⁴ as described elsewhere. Briefly, the 623 da substrate was truncated to *n*-propyl-acetamide for the purpose of exploring the wild-type protein reactivity towards substrate deacetylation. The Y306F mutation was corrected in the model. Zn²⁺ and K⁺ counterions were retained as were X-ray water molecules.

The system was solvated in a cubic box of TIP3P water with Na⁺ and Cl[−] counterions (1.5 M) added to neutralize the system. RESP charges at the HF/6-31G(d) level were computed for the substrate.⁴⁵ Preparation was achieved using the following procedure: (1) hydrogen atoms alone were optimized in the first iteration, (2) with the backbone fixed, amino side chains, the substrate, counterions and water molecules were optimized, and (3) the backbone of the protein was harmonically restrained and the system underwent 1 ns of molecular dynamics (MD) under NPT conditions (heating 0.2 ps (0–300 K), equilibration 0.5 ps and production 0.2 ps).⁴⁶ The heavy atom RMSD between the initial X-ray structure and the protein following the MD preparation sequence was 2.1 Å.

2.1 QM/MM calculations

The MD coordinates were used to create a range of different QM and QM/MM models. In each case the QM region used to simulate the protein consisted of the side chains of key active site amino acid residues: His142, His143, Asp178, His180, Asp267, Tyr306, Zn²⁺ and the substrate (see the ESI,† Fig. S1). The valences of bonds that bridged the QM/MM interface were satisfied with hydrogen link atoms. Water molecules and Na⁺ and Cl⁻ counterions were excluded from subsequent models as the reactive center is buried within the protein. Additional QM/MM models were created by (a) adding a single proton to the system at either His142 or His143 or (b)

replacing Zn²⁺ ($S = 0/2$) with Co²⁺ ($S = 3/2$), Fe²⁺ ($S = 4/2$) and Mn²⁺ ($S = 5/2$). During the QM/MM optimization process all atoms except for the hydrogen link atoms and those beyond 15 Å of the active site were treated flexibly. The steric and electrostatic effects of the protein environment on the Zn²⁺ QM/MM model were also explored. This was achieved by extracting the active site region from the protein which was then optimized in the presence of a polarized continuum model of water. Atoms corresponding to the hydrogen link atoms were fixed in this model to limit the degrees of freedom of the system.

All QM and QM/MM calculations were performed using the Gaussian 09 program.⁴⁷ The former used a PCM solvent

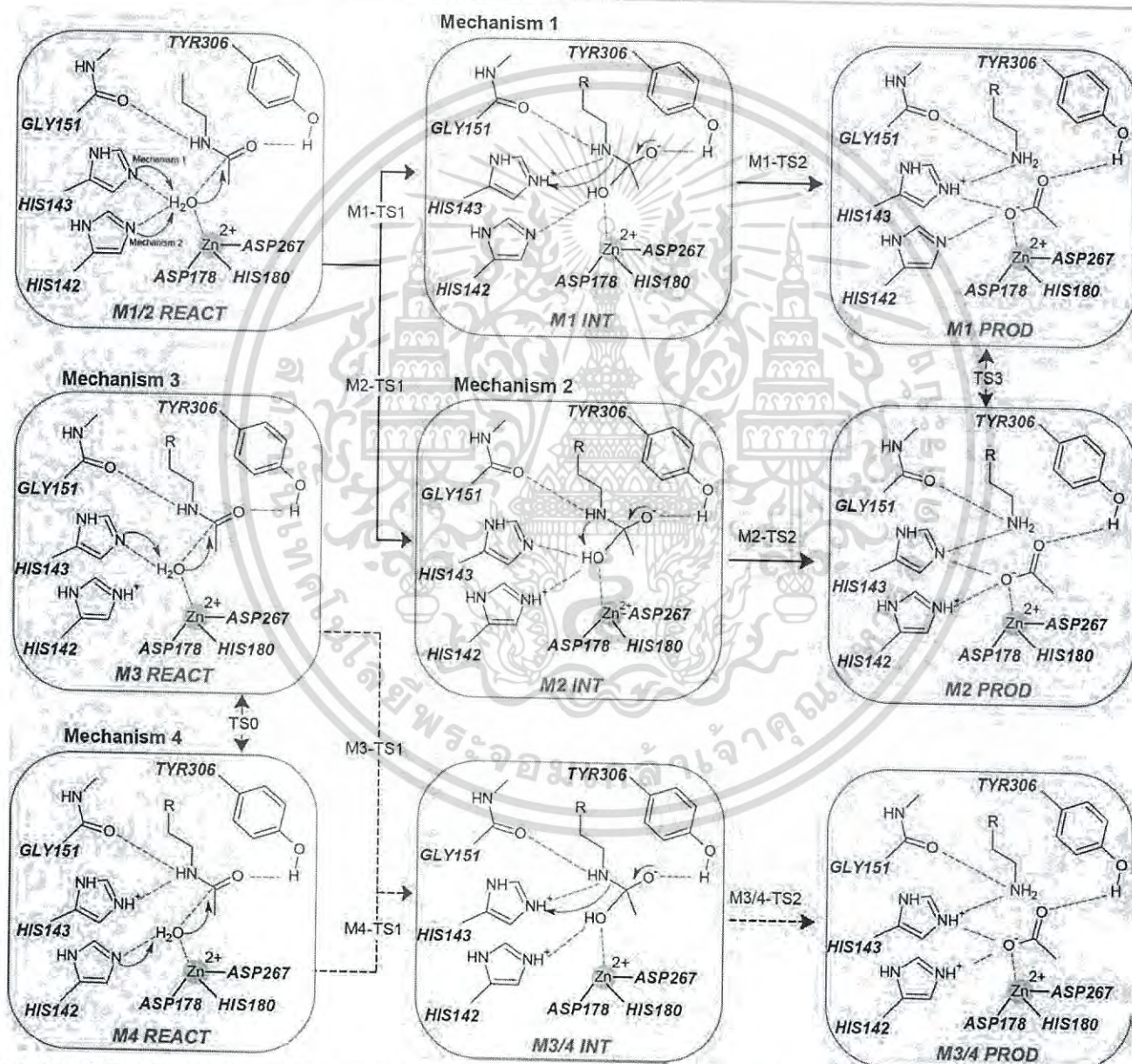


Fig. 1 Four distinct deacetylation pathways associated with HDAC8 are possible based on current proposals. Mechanisms 1 and 2 involve neutral His142 or His143 acting as the catalytic base in the initial step. Mechanisms 3 and 4 also involve either His142 or His143 acting as the general base with the other being in a protonated state.

model consisting of water while the latter employed the ONIOM methodology with the electronic embedding scheme.^{48,49} All structures were optimized at the M06/6-31G(d) for H, C, N and O, and Lanl2DZ for transition metals. Single point energies were obtained for all atoms at the M06/6-31+G(d,p) level. All structures were fully characterized using normal coordinate analysis. ΔH_s were corrected for translational, electronic, rotational and vibrational motion to give the corresponding ΔG_s . All calculations were performed on Intel i7 computers taking approximately 2–3 days per structure.

2 Results and discussion

We report the structures and energies for 4 possible mechanistic sequences (Fig. 1).^{38,50} To date, neither the structures nor the energetics associated with the full set of mechanistic possibilities have been reported. Mechanism 1 involves His143 acting as the general base by accepting a proton from a Zn^{2+} bound water molecule, while mechanism 2 involves His142 accepting the proton. It has also been reported that HDAC may function with an already protonated active site so we investigate mechanism 3 where His142 is protonated and His143 acts as the base and mechanism 4, where His143 is protonated and His142 acts as the base.

The QM/MM energetics associated with the 4 different mechanisms are reported in Fig. 2 (top) and the corresponding optimized structures are reported in Fig. 3. We also report the corresponding QM cluster model results in Fig. 2 (middle) as well as the residue partial charges in the ESI.† Finally, the predicted rate determining barriers for the substrate with Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} and Mn^{2+} co-factors are reported in Fig. 2 (bottom).

The M06/6-31G(d) (Lanl2dz on metals) based QM/MM model energies are found to correlate well with the corresponding single point QM/MM energies obtained at M06/6-31+G(d,p) ($r^2 = 0.94$, RMSE = 3.0 kcal mol⁻¹) and when the free energy corrections are included ($r^2 = 0.96$, RMSE = 3.3 kcal mol⁻¹). Henceforth we therefore limit our discussion of the QM/MM energies to the M06/6-31+G(d,p) single point energies, where the ΔG correction from the M06/6-31G(d) model has been included.

2.1 QM/MM protein reaction mechanism

The deacetylation reaction of HDAC8 initially requires the activation of the Zn^{2+} bound water molecule. Proton transfer can occur to either His143 (mechanism 1) or His142 (mechanism 2). In the optimized reactant complex, the Zn-bound water molecule interacts more strongly with His142 compared to His143 since the former is located closer to the metal center. The corresponding proton transfer distances in the reactant (M1/M2 REACT) are 1.70 Å and 1.91 Å, respectively. Transfer of a proton to either of the bases sees the concomitant attack of the substrate acetyl group by the resultant hydroxide anion. The QM/MM results show that a barrier of 24.1 kcal mol⁻¹ must be traversed to the intermediate (INT) with His142 acting as the base, compared to 17.5 kcal mol⁻¹ for

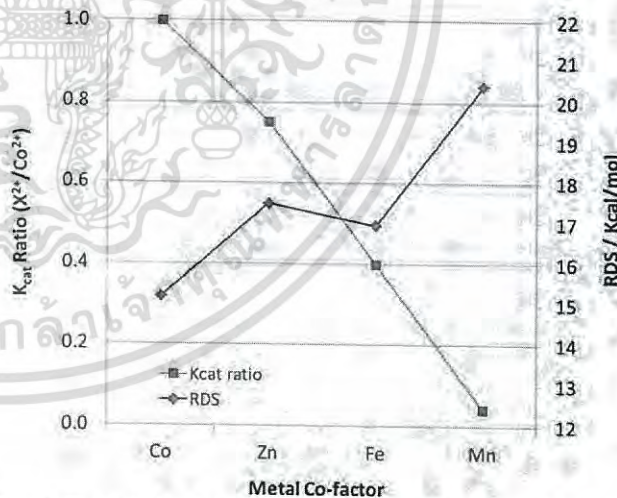
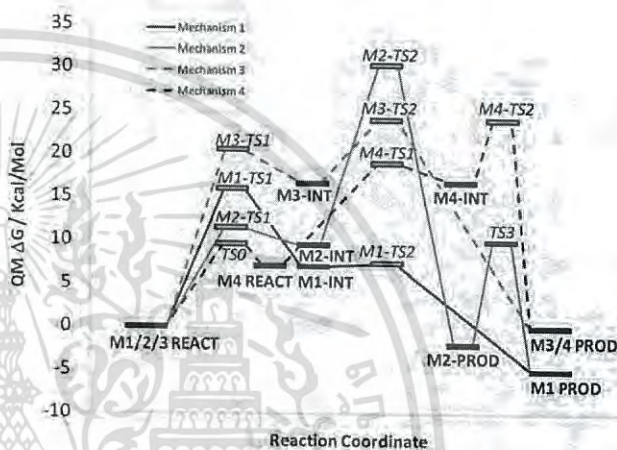
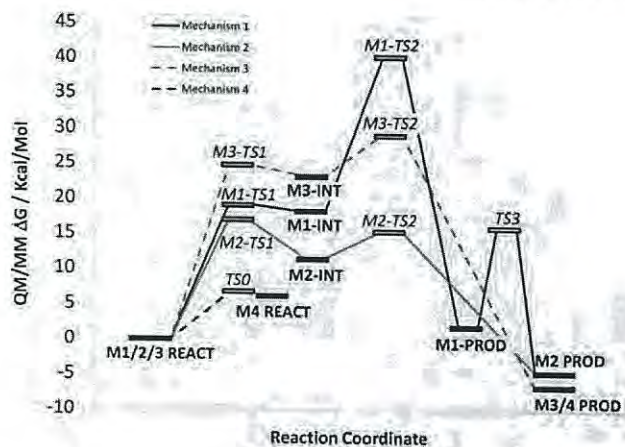


Fig. 2 Plot of the M06/6-31+G(d,p);AMBER//M06/6-31G(d);AMBER reaction profiles according to the QM/MM (top) and QM (middle) models. Also given is a plot of the predicted QM/MM rate determining step at the M06/6-31+G(d,p);AMBER//M06/6-31G(d);AMBER against the corresponding HDAC8 K_{cat} (below).

His143. The relative stability of the resulting intermediate follows the same trend of the transition states (TS) (16.3 vs.



Fig. 3 Optimized QM/MM minima and transition state structures obtained at the M06/6-31G(d)//AMBER level of theory. Shown in the inset are the key distances associated with each structure.

12.2 kcal mol⁻¹). This is presumably due to the unfavourable charge-charge interaction with the Zn²⁺ center.

Formation of a tetrahedral intermediate results in a dramatic change in the partial charges on the substrate, increasing from 0.22 in the reactant to -0.48 for mechanism 1 (His143) and -0.50 for mechanism 2 (His142). Decomposition of this short lived intermediate requires proton transfer to the substrate amide nitrogen atom from the acidic His residues, along with the breaking of the amide bond. The proton transfer process associated with mechanism 1 is the more facile of the two as amide nitrogen is optimally aligned. Transition state two for mechanism 1 is 3.0 kcal mol⁻¹ compared to the dramatically larger 28.8 kcal mol⁻¹ for mechanism 2. This is because M2-TS2 involves an intramolecular 4 membered transition state with the His142 proton being shuffled to the substrate with the aid of His143. Thus His143 is found to be the most favourable base/acid, at least when both of the His residues are unprotonated.³⁷

Both mechanisms ultimately lead to the same product M1-PROD with an energy of -1.7 kcal mol⁻¹. Following the traversal of M1/M2-TS2, proton transfer from the newly formed acetic acid group to His142 is found to be spontaneous as observed by others. Mechanism 2 first sees the formation of Product 2, with a protonated His142 residue. This can form Product 1 by the shuttling of a proton with the help of the bound acetic acid residue. This requires the traversal of a barrier of 18.3 kcal mol⁻¹.

An alternative proposal was made that suggested that one of the two His residues may already be protonated (HIP) before the catalytic reaction occurs.⁵¹ Again, there are two possible mechanistic sequences that could occur (Fig. 1). Firstly, we find that the energy difference, when His142 and His143 are protonated, is 8.0 kcal mol⁻¹ in favour of the former. The barrier for proton transfer between the two configurations (TS0), with the proton being shuffled by the bound water molecule, is 4.7 kcal mol⁻¹. The barrier between M3 REACT and M3/4 INT was found to be 27.2 kcal mol⁻¹. The intermediate was found to be considerably more endothermic than those obtained for mechanisms 1 and 2 at 21.7 kcal mol⁻¹. Attempts to locate M4 TS1 were unsuccessful as proton transfer from M4 REACT was found to lead preferably to the lower energy M3-REACT rather than M3/4-INT. M3/4-TS2 was found to be 9.2 kcal mol⁻¹ higher in energy than M3/4 INT and resulted in a product -6.6 kcal mol⁻¹ lower in energy than the M3-REACT.

The systematic analysis of the 4 possible reaction pathways associated with HDAC8 reveals that the active site in the deprotonated state results in a lower barrier to the reaction. We find that the rate determining barriers determined from the QM/MM calculations follow the trend: mechanism 1 < mechanism 3 < mechanism 2. It is found that His143 acting as the general base is preferred, with His143 also acting as the general acid. These findings are in good agreement with the more computationally demanding QM/MM-MD dynamics calculations reported for mechanism 1 by Zhang and co-workers.^{37,38} The latter studies relied on a QM/MM method

consisting of the B3LYP DFT functional, an active site model that did not include Tyr306 and included free energy effects differently.³⁷

The most recent report on the HDAC8 catalytic mechanism came from Chen *et al.*³⁹ Their results suggest that the K⁺ ion bound at site 1 plays a destabilizing role, in contrast to the stabilizing effect found by Wu *et al.*³⁷ A key difference between these two models is the addition of Tyr306 and two acidic residues (Asp176 & Asp183) to the latter which will help to stabilize the protonated His residues. In the presence of a K⁺ ion in site 1, Chen *et al.* found essentially the same transition states as found by Wu *et al.* (18.3 kcal mol⁻¹),³⁷ and found here (17.9 kcal mol⁻¹), but with a somewhat lower barrier (15.3 kcal mol⁻¹). The experimental barrier for HDAC8 is reported to be ~17.7 kcal mol⁻¹ (ref. 37) based on kinetic data.⁵² In the absence of K⁺ at site 1, Chen *et al.* obtained a barrier of 8.5 kcal mol⁻¹. In this mechanism His142 acts as the general base and His143 acts as the general acid, with a proton shuttle step in between. It is worth noting that KCl is known to have an important stabilizing role in HDAC8 (increasing the thermal stability by 5 °C).⁵³ Thus it is possible that the use of the K⁺ bound state to simulate the unbound K⁺ state might be inappropriate.

2.2 QM cluster reaction mechanism

Enthalpies obtained at the M06/6-31G(d) are in good agreement with those that incorporate single point or free energy corrections. This observation is important since structure based design processes require more computationally tractable calculations. We therefore decided to investigate how simpler QM cluster models would also perform.

QM clusters allow the use of very accurate levels of theory to study protein-ligand complexes; however the effect of the surrounding protein is approximated by a continuum solvent model such as water, or neglected. This approximation is reasonable if for example the differences in ligands being explored are not influenced by the protein framework (*i.e.* if evaluating small metal binding warheads only). QM cluster calculations are nevertheless employed for many tasks due to their relative ease in terms of setup and fast computation times.^{54,55}

The QM cluster models consisted of the same QM region as used in the QM/MM model. The link atoms were frozen to restrict the conformation to one that was close to the original protein model. Nevertheless, the lack of other enzyme residues means that the conformational freedom associated with the active site atoms increases. Furthermore, the use of a solvent model as opposed to partial charges of the extended protein atoms could have an effect on the structures and energies obtained.

Fig. 2 (middle) shows that the QM derived profile for HDAC8 deacetylation is qualitatively similar to that from the QM/MM calculations. The optimized structures obtained are also found to be very similar conformationally to their QM/MM counterparts. Indeed, it is clear from a comparison

of the partial charges obtained from both models that the charge distribution within the protein is dramatically influenced by the surrounding protein. However a key observation is that mechanism 4, which was not accessible from the QM/MM model, is now possible in the QM cluster calculation. This is because protonated His143 (HIP143) is found to interact more strongly with the amide nitrogen of the substrate thereby allowing proton transfer to the substrate from the Zn^{2+} bound water molecule to occur. The rate determining barriers for mechanisms 1 and 2 are very similar at 19.7 vs. 17.9 kcal mol⁻¹, but with His142 acting as the general base now being lower in energy. The QM/MM results in contrast were 17.5 vs. 24.1 kcal mol⁻¹. The rate determining barrier for mechanism 3 is found to be 26.34 kcal mol⁻¹ according to the QM model compared to 27.2 for the QM/MM process. More importantly, the rate determining barrier for mechanism 4 is found to be only 14.9 kcal mol⁻¹. This corresponds to the barrier between M4 REACT and M3/4 INT (TS0). This result is simply an artefact of a non-ideal model cut from the original X-ray structure.

We find that the rate determining barrier determined from the QM calculations follows the trend: mechanism 4 < mechanism 2 < mechanism 1 < mechanism 3. The results are dramatically different from the QM/MM models suggesting that the effect of the protein environment plays a critical role in terms of controlling the conformation of structures formed on the reaction coordinate and in their stabilization. These results suggest that cluster calculations for HDAC8 should be considered in cases where it is clear that the effect of the extended protein environment is not so important.

2.3 Effect of the metal co-factor of reaction barriers

As an additional assessment of the QM/MM model we undertook further calculations to determine whether the method is capable of describing differences in experimental rate constants of different HDAC8 protein complexes. Catalytic rate constants have been reported for HDAC8 with 4 different transition metals Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} and Mn^{2+} . We therefore set out to determine whether the QM/MM model developed was sufficiently descriptive to be able to rank order the different metal co-factors in terms of their relative reactivity. The Zn^{2+} ions found in all of the mechanism 1 stationary points were replaced with Co^{2+} , Fe^{2+} and Mn^{2+} . The models were re-optimized as before and the rate determining steps were then compared to their experimental rate constants (Fig. 2 (bottom)). The QM/MM model was found to rank-order the different metals well, with Co^{2+} predicted to be the most catalytically active, Zn^{2+} and Fe^{2+} predicted to be moderately active and Mn^{2+} the least active.

The results suggest that the model is quite successful in reproducing the relative reactivity of different transition metal centres. The ability to describe transition metal-ligand interactions is highly desirable since it is a known limitation of traditional molecular modelling methods used in designing metal chelating inhibitors.⁵⁶

Conclusions

QM/MM methods can provide an effective and efficient representation of large biological systems. These methods offer considerable advantages over MM methods in that bond breaking and formation can be considered, non-standard templates do not need prior parameterization, and metals and non-bonded interactions are more accurately described.

In this study we have investigated HDAC8, a metalloprotein of widespread pharmacological interest. We were interested in developing a reasonably rapid, accurate method as part of our ultimate goal to develop a combined virtual and experimental protocol to design and assess metal chelating inhibitors. With this in mind, we have both utilized QM and QM/MM methods to explore the aspects of the ligand reactivity at HDAC8. Our calculations show that relatively modest QM/MM methods can reproduce HDAC8 results obtained from higher basis set calculations or results where free energy effects have been included.

Computational methods are of course flawed representations of real systems. Nevertheless, it is our belief that these types of models, when used in the appropriate setting, could prove useful in the design or prioritization of experimental research, including for HDACs.⁴⁰⁻⁴² We find that gas phase cluster models do not perform so well due to the increased conformational freedom and electrostatic effects. Moreover, we have validated the accuracy of the QM/MM model in terms of the ability of the predicted rate determining step to rank-order the catalytic rate constants associated with different transition metals Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} and Mn^{2+} . The calculations correctly rank Mn^{2+} as the least catalytically active, Co^{2+} as the most catalytically active with Fe^{2+} and Zn^{2+} predicted correctly to have intermediate catalytic activities.

The QM/MM method could play a larger role in supporting early drug discovery research,⁵⁷ and in particular for metalloproteins such as HDACs. Selection of the active site is important, as this can have rather subtle differences in the observed results.³⁹ The key issue in the application of such methods is to know when and when not to employ them for a task under consideration. With the increasing interest in covalent inhibitors, QM/MM methods could offer real potential to computationally screen compounds to maximize reactivity at pharmacological targets and potentially minimize reactivity at metabolic targets.

Acknowledgements

MPG would like to acknowledge financial support from the Kasetsart University Research and Development Institute and the Thailand Research Fund (RSA5780068) is gratefully acknowledged. DG would like to acknowledge financial support from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (2558A11802059).

Notes and references

- 1 G. Holdgate, in *Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery*, ed. A. C. A. Roque, Humana Press, 2010, ch. 7, vol. 572, pp. 101–133.
- 2 A. Ciulli, in *Protein-Ligand Interactions*, ed. M. A. Williams and T. Daviter, Humana Press, 2013, ch. 13, vol. 1008, pp. 357–388.
- 3 C. H. Reynolds and M. K. Holloway, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2011, 2, 433–437.
- 4 G. G. Ferenczy and G. M. Keseru, *J. Chem. Inf. Model.*, 2010, 50, 1536–1541.
- 5 G. Sliwoski, S. Kothiwale, J. Meiler and E. W. Lowe, *Pharmacol. Rev.*, 2014, 66, 334–395.
- 6 A. R. Leach, *Molecular Modelling. Principles and Applications*, Longman limited, Harlow, 1996.
- 7 G. L. Warren, C. W. Andrews, A.-M. Capelli, B. Clarke, J. LaLonde, M. H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S. F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I. D. Wall, J. M. Woolven, C. E. Peishoff and M. S. Head, *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 5912–5931.
- 8 T. Scior, J. L. Medina-Franco, Q. T. Do, K. Martinez-Mayorga, J. A. Yunes Rojas and P. Bernard, *Curr. Med. Chem.*, 2009, 16, 4297–4313.
- 9 T. Scior, A. Bender, G. Tresadern, J. L. Medina-Franco, K. Martínez-Mayorga, T. Langer, K. Cuanalo-Contreras and D. K. Agrafiotis, *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, 52, 867–881.
- 10 K. Raha, M. B. Peters, B. Wang, N. Yu, A. M. WollaCott, L. M. Westerhoff and K. M. Merz, *Drug Discovery Today*, 2007, 12, 725–731.
- 11 M. B. Peters, K. Raha and K. M. Merz, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 2006, 9, 370–379.
- 12 K. Raha and K. M. Merz, *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 4558–4575.
- 13 K. E. Shaw, C. J. Woods, A. J. Mulholland and D. J. Abraham, in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- 14 M. P. Gleeson and D. Gleeson, QM/MM As a Tool in Fragment Based Drug Discovery. A Cross-Docking, Rescoring Study of Kinase Inhibitors, *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, 49, 1437–1448.
- 15 M. P. Gleeson and D. Gleeson, QM/MM Calculations in Drug Discovery: A Useful Method for Studying Binding Phenomena?, *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, 49, 670–677.
- 16 M. W. van der Kamp and A. J. Mulholland, *Biochemistry*, 2013, 52, 2708–2728.
- 17 R. Lonsdale, J. N. Harvey and A. J. Mulholland, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 3025–3038.
- 18 K. E. Shaw, C. J. Woods, A. J. Mulholland and D. J. Abraham, in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- 19 H. M. Senn and W. Thiel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, 48, 1198–1229.
- 20 H. Lin and D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.*, 2007, 117, 185–199.
- 21 H. M. Senn and W. Thiel, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, 11, 182–187.
- 22 H. Senn and W. Thiel, in *Atomistic Approaches in Modern Biology*, ed. M. Reiher, Springer Berlin Heidelberg, 2007, ch. 84, vol. 268, pp. 173–290.
- 23 L. Gorb, V. Kuzmin and E. Muratov, *Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2014.
- 24 R. Mah, J. R. Thomas and C. M. Shafer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24, 33–39.
- 25 J. Singh, R. C. Petter, T. B. Baillie and A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2011, 10, 307–317.
- 26 A. J. T. Smith, X. Zhang, A. G. Leach and K. N. Houk, *J. Med. Chem.*, 2008, 52, 225–233.
- 27 J. Kirchmair, M. J. Williamson, J. D. Tyzack, L. Tan, P. J. Bond, A. Bender and R. C. Glen, *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, 52, 617–648.
- 28 M. S. Finnin, J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow and N. P. Pavletich, *Nature*, 1999, 401, 188–193.
- 29 A. Vannini, C. Volpari, G. Filocamo, E. C. Casavola, M. Brunetti, D. Renzoni, P. Chakravarty, C. Paolini, R. De Francesco, P. Gallinari, C. Steinkuhler and S. Di Marco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101, 15064–15069.
- 30 M. Dokmanovic, C. Clarke and P. A. Marks, *Mol. Cancer Res.*, 2007, 5, 981–989.
- 31 C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen and M. Mann, *Science*, 2009, 325, 834–840.
- 32 I. Gregoret, Y.-M. Lee and H. V. Goodson, *J. Mol. Biol.*, 2004, 338, 17–31.
- 33 J. Sadowski, J. Gasteiger and G. Klebe, *J. Chem. Inf. Model.*, 1994, 34, 1000–1008.
- 34 J. R. Somoza, R. J. Skene, B. A. Katz, C. Mol, J. D. Ho, A. J. Jennings, C. Luong, A. Arvai, J. J. Buggy, E. Chi, J. Tang, B.-C. Sang, E. Verner, R. Wynands, E. M. Leahy, D. R. Dougan, G. Snell, M. Navre, M. W. Knuth, R. V. Swanson, D. E. McRee and L. W. Tari, *Structure*, 2004, 12, 1325–1334.
- 35 D. P. Dowling, S. L. Gantt, S. G. Gattis, C. A. Fierke and D. W. Christianson, *Biochemistry*, 2008, 47, 13554–13563.
- 36 R. Ficner, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2009, 9, 235–240.
- 37 R. Wu, S. Wang, N. Zhou, Z. Cao and Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 9471–9479.
- 38 R. Wu, P. Hu, S. Wang, Z. Cao and Y. Zhang, *J. Chem. Theory Comput.*, 2009, 6, 337–343.
- 39 K. Chen, X. Zhang, Y.-D. Wu and O. Wiest, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 11636–11643.
- 40 K. Chen, L. Xu and O. Wiest, *J. Org. Chem.*, 2013, 78, 5051–5055.
- 41 D. Wang, P. Helquist and O. Wiest, *J. Org. Chem.*, 2007, 72, 5446–5449.
- 42 K. Vanommeslaeghe, S. Loverix, P. Geerlings and D. Tourwé, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, 13, 6070–6082.
- 43 A. S. Madsen, H. M. E. Kristensen, G. Lanz and C. A. Olsen, *ChemMedChem*, 2014, 9, 614–626.
- 44 *Discovery Studio*, Accelrys, Inc, San Diego, CA, USA, 2.5 edn, 2010.
- 45 W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly and P. A. Kollmann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 9620–9631.
- 46 T. Somboon, J. Ochiai, W. Treesuwan, M. P. Gleeson, S. Hannongbua and S. Mori, *J. Mol. Graphics Modell.*, 2014, 52, 20–29.

- 47 M. J. T. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, *Gaussian, Inc.*, Wallingford CT, 2009.
- 48 S. Dapprich, I. Komaromi, K. S. Byun, K. Morokuma and M. J. Frisch, *J. Mol. Struct.*, 1999, 1-21, 461-462.
- 49 T. Vreven, K. S. Byun, I. Komaromi, S. Dapprich, J. A. Montgomery, K. Morokuma and M. J. Frisch, *J. Chem. Theory Comput.*, 2006, 2, 815-826.
- 50 D. P. Dowling, S. L. Gantt, S. G. Gattis, C. A. Fierke and D. W. Christianson, *Biochemistry*, 2008, 47, 13554-13563.
- 51 C. Corminboeuf, P. Hu, M. E. Tuckerman and Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 4530-4531.
- 52 S. L. Gantt, S. G. Gattis and C. A. Fierke, *Biochemistry*, 2006, 45, 6170-6178.
- 53 A. Vannini, C. Volpari, G. Filocamo, E. C. Casavola, M. Brunetti, D. Renzoni, P. Chakravarty, C. Paolini, R. De Francesco, P. Gallinari, C. Steinkühler and S. Di Marco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101, 15064-15069.
- 54 P. E. M. Siegbahn and F. Himo, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.*, 2011, 1, 323-336.
- 55 P. Siegbahn and F. Himo, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, 14, 643-651.
- 56 D. Santos-Martins, S. Forli, M. J. Ramos and A. J. Olson, *J. Chem. Inf. Model.*, 2014, 54, 2371-2379.
- 57 A. J. Mulholland, *Drug Discovery Today*, 2005, 10, 1393-1402.



GREEN CONVERGENCE ON CHEMICAL FRONTIERS



February 2-3, 2017

Centra Government Complex
Hotel & Convention Centre
Chaeng Watthana, Bangkok,
Thailand



PH
-P-
008

Theoretical studies focused on the prediction of the skin sensitization potential of Schiff bases



Duangkamol Gleeson^{1*}, Nathjanan Jongkon², Kanokthip Boonyarattanakalin³ and M. Paul Gleeson³

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

²Department of Social and Applied Science, College of Industrial Technology, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand

³College of Nanotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand

*e-mail: duangkamol.gi@kmitl.ac.th

- An inexpensive, rapid and ethical method to predict the skin sensitization potential of Schiff base (SB) chemicals is reported.
- The mechanistic profile of 22 SBs have been evaluated using DFT based gas phase models which results in the prediction of a rate determining barrier.
- We find that the rate determining barrier and the computed lipophilicity can be used to effectively estimate the skin-sensitization potential of new compounds.

Keywords: Skin sensitization; QM calculations; DFT; Schiff base; LLNA

PH
-P-
009

Theoretical study on the phosphorescence quantum yields of Ir(III) complexes with N-heterocyclic carbene ligands



Phoom Chumponanomakun and Yuthana Tantirungrotechai*


Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Thailand

*e-mail: yt203y@gmail.com

- Quantum efficiency of iridium complexes with N-heterocyclic carbene (NHC) ligands were theoretically investigated.
- The phosphorescence radiative rate constants of the complexes were calculated by time-dependent density functional theory (TDDFT) with quadratic response technique.
- The temperature-dependent nonradiative decay pathways were elucidated through the triplet potential energy surfaces by using density functional theory (DFT).
- The calculations that are consistent with the experiment allow us to predict the structure-property relationships for improvement in the quantum efficiency of the Ir(III) complexes.

Keywords: Iridium complexes; N-heterocyclic carbene; Phosphorescence; Quantum yields; DFT

PH

PH -P- 005	Theoretical study on pyrophosphoryl transfer catalyzed by 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase (HPPK): A key enzyme in folate pathway	
---------------------------------------	---	--

Nathjanan Jongkon¹, Duangkamol Gleeson² and M. Paul Gleeson³

¹Department of Social and Applied Science, College of Industrial Technology, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand


²Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand

*e-mail: nathjanan.j@cit.kmutnb.ac.th

- The reaction mechanism of HPPK protein with its natural substrate will be investigated using MD and QM/MM calculations.
- Computational approaches have been used to assess which of the possible acids and bases found within the wild-type (WT) active site contribute to the reactivity of the protein.

Keywords: Malaria; HPPK; phosphorylation; MD; QM/MM

PH -P- 006	Molecular engineering on meso-functionalized push-pull porphyrin based sensitizers : Effect of donor/acceptor on the light-harvesting ability	
---------------------------------------	--	--


Suparada Kimchompoo, Suwanan Phanloet and Siriporn Jungstutiwong^{*}

Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Thailand

*e-mail: siriporn.j@ubu.ac.th

- The structural, absorption and electronic transition of porphyrin derivatives in dye-sensitized solar cell were investigated.
- The objective is to study the factors, different donor units and bulky groups, affecting on power conversion efficiency of dye-sensitized solar cell.
- We found that diphenylamine unit is the best electron-donating group (EDG), and the alkoxy group is the best bulky group and carboxylic acid group is the best anchoring group.

Keywords: Dye-sensitized solar cell; Density functional theory (DFT); Porphyrin

PH -P- 007	High-conversion-efficiency dye-sensitized solar cell: molecular engineering on D-A featured organic indole dyes	
---------------------------------------	--	--

Kanokwan Wongkam¹, Apichart Bunlang² and Siriporn Jungstutiwong^{3*}

Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Thailand

*e-mail: siriporn.j@ubu.ac.th

- We have studied Indole derivatives with different structures used as dye sensitizer for dye-sensitized solar cell.
- The objective is to find out the dye sensitizers with an efficient electron donating ability and broad absorption spectrum to near-IR (NIR).
- We found that TK5, cyanoacrylic acid connected to hexagon Indole derivatives including -Br group at Phenyl position, methyl group at N-atom position as well as O-methoxy at the Indole derivatives, showed the best performance.

Keywords: Dye sensitized solar cell; Indole derivatives; Density functional theory

ภาคผนวก ค สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย

รายงานการเงินประจำปี 1 และ ปีที่ 2 ได้ส่งไปพร้อมกับรายงานประจำปีเรียบร้อยแล้ว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางดวงกมล กลีสัน
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Duangkamol Gleeson
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-8301-00301-13-1
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
เงินเดือน (บาท) 52,410 บาท
เวลาที่ใช้ทำวิจัย 10 ชั่วโมง : สัปดาห์
- หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถนนฉลองกรุง แขวงลำปลาทิว เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
e-mail : duangkamol.gl@kmitl.ac.th
- ประวัติการศึกษา
Ph.D. (Chemistry) พ.ศ. 2545 The University of Manchester
ประเทศสหราชอาณาจักร
วท.ม. (เคมีเชิงฟิสิกส์) พ.ศ. 2538 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประเทศไทย
วท.บ. (ศึกษาศาสตร์ เกียรตินิยม) พ.ศ. 2534 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเทศไทย
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Materials : molecular modelling on zeolite and nanostructured materials.
Cheminformatics : computational study on drug discovery and drug design.
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพ ในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย
7.1.1 ชื่อโครงการวิจัย การสร้างแบบจำลองทางทฤษฎีเพื่อประมาณศักยภาพของสารเคมีที่ทำให้ไวต่อการกระตุ้นอาการแพ้ของผิวหนัง
แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)
งบประมาณ 594,400 บาท
ระยะเวลาวิจัย 2 ปี (ตุลาคม พ.ศ. 2558 – กันยายน พ.ศ. 2560)
สัดส่วนที่รับผิดชอบ 100%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 7.1.2 ชื่อโครงการวิจัย อิทธิพลของโครงสร้างผลึกต่อความว่องไวในการทำปฏิกิริยาของตัวเร่ง
โครงสร้างนาโน
แหล่งทุน ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา
(สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ร่วมกับ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา)
งบประมาณ 1,200,000 บาท
ระยะเวลาวิจัย 3 ปี (มิถุนายน พ.ศ. 2551 – พฤษภาคม พ.ศ. 2554)
สัดส่วนที่รับผิดชอบ 100%
- 7.1.3 ชื่อโครงการวิจัย โครงสร้าง พลังงานและกลไกปฏิกิริยาของอะซิโพรไนไตรล์ในตัวเร่ง
โครงสร้างนาโน
แหล่งทุน ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (สำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย ร่วมกับ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา)
งบประมาณ 480,000 บาท
ระยะเวลาวิจัย 2 ปี (มิถุนายน พ.ศ. 2548 – พฤษภาคม พ.ศ. 2550)
สัดส่วนที่รับผิดชอบ 100%
- 7.1.4 ชื่อโครงการวิจัย อิทธิพลของโครงสร้างผลึกต่อความว่องไวในการทำปฏิกิริยาของตัวเร่ง
แหล่งทุน ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (สำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย ร่วมกับ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา)
งบประมาณ 480,000 บาท
ระยะเวลาวิจัย 2 ปี (มิถุนายน พ.ศ. 2546 – พฤษภาคม พ.ศ. 2548)
สัดส่วนที่รับผิดชอบ 100%

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน
หมายเหตุ แสดงเฉพาะผลงานวิจัยหลังปริญญาเอก และเป็นโครงการที่ทำในประเทศไทย
(ปี 2004- ปัจจุบัน)

1. Chotpatiwetchkul, W., Boonyarattanakalin, K., Gleeson, D. and Gleeson, M. Paul. Exploring the catalytic mechanism of dihydropteroate synthase: elucidating the differences between the substrate and inhibitor. *Org. Biomol. Chem.*, 2017, 15, 5593-5601.
Impact factor = 3.654
2. Gleeson, D. Gleeson M. P. Application of QM/MM and QM Methods to Investigate Histone Deacetylase 8. *Med. Chem. Comm.*, 2015, 6, 477-485.
Impact factor = 2.495

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Promkatkaew, M.; Gleeson, D.; Hannongbua, S.; Gleeson, M. P. Skin Sensitization Prediction Using Quantum Chemical Calculations: A Theoretical Model for the SNAR Domain. *Chem. Res. Toxicol.* 2014, 27, 51-60.
Impact factor = 3.529
4. Duangkamol Gleeson. 2013. The Skeletal Isomerization in Ferrierite: A Theoretical Assessment of the Bi-molecular Conversion of cis-butene to iso-butene. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical.* 368-369: 107-111.
Impact factor = 3.187.
5. Duangkamol Gleeson, Ben Tehan, Matthew Paul Gleeson and Jumras Limtrakul. 2012. Evaluating the Enthalpic Contribution to Ligand Binding using QM Calculations: Effect of Methodology on Geometries and Interaction Energies. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10 (35), 7053-7061.
Impact factor = 3.568.
6. Duangkamol Gleeson. 2011. Skeletal Isomerization of Butene in Ferrierite: Assessing the Energetic and Structural Differences between Carbenium and Alkoxide Based Pathways. *The Journal of Physical Chemistry A.* 115 (51): 14629-14636.
Impact factor = 2.771.
7. Duangkamol Gleeson, Supa Hannongbua, Matthew Paul Gleeson. 2010. QM Methods in Structure based design: Utility in Probing Protein-Ligand Interactions. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 29 (4): 507-590.
Impact factor = 2.325.
8. Matthew Paul Gleeson and Duangkamol Gleeson. 2009. QM/MM as a Tool in Fragment Based Drug Discovery, *Journal of Chemical Information and Modelling.* 49, 1437-1448.
Impact factor = 4.304.
9. Matthew Paul Gleeson and Duangkamol Gleeson. 2009. Assessing the Utility of Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Methods in Structure-Based Drug Design. *Journal of Chemical Information and Modelling.* 49, 670-677.
Impact factor = 3.760.
10. Duangkamol Gleeson. 2008. A theoretical study of cis-trans isomerisation in H-ZSM5: Probing the Impact of Cluster Size and Zeolite Framework on Energetics and Structure. *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 22 (8): 579-585.
Impact factor = 3.172.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. Duangkamol Gleeson. 2008. Application of QM simulations and Multivariate Analysis in the Study of Alkene Reactivity in the Zeolite H-ZSM5. *Journal of Chemometrics*. 22 (6): 372–377.
Impact factor = 1.937.
12. Duangkamol Gleeson and Jumras Limtrakul. 2007. The Catalytic Conversion of Acetonitrile to Acrylonitrile in Zeolitic Systems: Rationalization of Experimental Observations using Theoretical Simulations. *Journal of Molecular Structure-THEOCHEM*. 824 (1): 23–31.
Impact factor = 1.371.
13. Supawadee Namuangruk, Duangkamol Tantanak, and Jumras Limtrakul. 2006. Application of ONIOM Calculations to Study the Effect of the Zeolite Framework on the Adsorption of Alkenes to ZSM-5. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 256: 113 – 121.
Impact factor = 3.187.
14. Duangkamol Tantanak, Jumras Limtrakul, and Matthew Paul Gleeson. 2005. Probing the Structural and Electronic Factors Affecting the Adsorption and Reactivity of Alkenes in Acidic Zeolites using DFT Calculations and Multivariate Statistical Methods. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 45(5): 1303 – 1312.
Impact factor = 4.304.
15. Suwat Pabchanda, Piboon Pantu, Duangkamol Tantanak, and Jumras Limtrakul. 2004. Structure and Energetics of Nitrous Oxide and Methane Adsorption on the Fe-ZSM-5 Zeolite : ONIOM and Density Functional Studies. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 154 : 1844 – 1848.
Impact factor = 1.265.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้