รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยชีวเคมีและ อณูชีววิทยาของวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีน ในเชื้อมาลาเรียของคน

Biochemistry and Molecular Biology of Pyrimidine Biosynthesis in Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิงหาคม 2548

สัญญาเลขที่ **BRG4580020**

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยชีวเคมีและ อณูชีววิทยาของวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีน ในเชื้อมาลาเรียของคน

Biochemistry and Molecular Biology of Pyrimidine Biosynthesis in Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
และคณะ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง **"ชีวเคมีและอณูชีววิทยาของวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรียของคน (Biochemistry and Molecular Biology of Pyrimidine Biosynthesis in Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*)"** ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตามสัญญาเลขที่ BRG4580020 ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี ตั้งแต่วันที่ 15 สิงหาคม 2545 ถึงวันที่ 14 สิงหาคม 2548 ผู้รับทุนขอกราบขอบพระคุณสำนักงานฯ ที่ให้การสนับสนุนอย่างเต็มที่ทำให้โครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วย และขอขอบคุณบุคคลต่อไปนี้ที่มีส่วนสำคัญให้โครงการสำเร็จได้แก่ ผู้ร่วมวิจัยชาวไทย 2 ท่านคือ อ. สุดารัตน์ กรึงไกร (PhD candidate at Osaka University, Japan; คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต) ผศ.ดร. พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ (คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ผู้ช่วยวิจัยและนักศึกษาคือ น.ส. สุภาภรณ์ เจริญสุข น.ส. ศรีสอางค์ แย้มศิริ น.ส. ชยาภรณ์ วิชิตกุล (ใช้ทุนบางส่วนจาก WHO) ผู้ร่วมวิจัยชาวต่างชาติ 2 ท่านคือ Professor Toshihiro Horii (Osaka University, Japan) Professor Jeffrey A. Smiley (Youngstown State University, USA) และนักศึกษาของผู้ร่วมวิจัยชาวต่างชาติทั้ง 2 ท่านคือ Ms. Sayaka Aoki, Mr. Brian J. DelFraino เลขานุการคือ น.ส. กาญจนา เคาวสุต รวมทั้ง ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในฐานะสถาบันต้นสังกัดที่ให้ความสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในโครงการวิจัยอย่างดียิ่ง

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญ	4
บทคัดย่อ	5
Abstract	7
Project Description	9
1.Introduction and Rationale	9
2.Objectives	11
3.Methodology and Results	12
4.Discussion	21
5.Conclusion and Future Prospect	24
6.References	25
Outputs	27
Appendix (ภาคผนวก)	29
1.บทความสำหรับการเผยแพร่	30
2.Reprints	32

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BRG4580020

ชื่อโครงการ: ชีวเคมีและอณูชีววิทยาของวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรียของคน

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ศาสตราจารย์ ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: fmedjkk@md2.md.chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 สิงหาคม 2545 - 14 สิงหาคม 2548

โครงการวิจัย:

ปัจจุบันมาลาเรียยังเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ ก่อให้เกิดอาการอย่างรุนแรงในคน และทำให้คนติดเชื้อทั่วโลกปีละถึง 500 ล้านคนและเสียชีวิตลงปีละ 1.5-2.7 ล้านคน การควบคุมโรคมาลาเรียทำได้ลำบากขึ้นจากการแพร่ระบาดของเชื้อที่ดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาและจากการพัฒนาและระบาดของยุงก้นปล่องที่ดื้อต่อยาฆ่าแมลง รวมทั้งการที่ยังไม่มีวัคซีนมาใช้ป้องกันโรค จึงเป็นสถานการณ์เร่งด่วนที่จะต้องพัฒนายารักษามาลาเรียชนิดใหม่ โดยอาศัยตำแหน่งเป้าหมายที่ได้จากโครงการจีโนม และความรู้ที่สะสมต่อเนื่องกันมานานหลายสิบปี ถึงกระนั้นความรู้ทางชีวเคมีของเชื้อมาลาเรียยังไม่กระจ่างนัก โดยเฉพาะการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

ในชุดโครงการวิจัยนี้ได้สร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับชีวเคมีและอณูชีววิทยาของวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรียของคน ทำให้มีความเข้าใจอย่างถ่องแท้ถึงยีนส์และเอนไซม์ 2 ชนิดคือ ออโรเทท ฟอสโฟไรโบสีลทรานซ์เฟอเรส (OPRT) และ ออโรทิไดเลท ดีคาร์บอกซีลเลส (OMPDC) โดยได้ทำการแยกเอนไซม์ทั้งสองออกมาได้อย่างบริสุทธิ์จากเชื้อมาลาเรียของคนที่เพาะเลี้ยงได้มากพอในห้องเพาะเชื้อ พบมีคุณสมบัติจำเพาะโดยเอนไซม์ทั้งสองมารวมอยู่ด้วยกันซึ่งแต่ละเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับที่ได้คาดการณ์ไว้ในฐานข้อมูลจีโนมของเชื้อ คุณสมบัติจำเพาะที่มารวมกันอยู่ของเอนไซม์ OPRT และ OMPDC เป็นการค้นพบเป็นครั้งแรกของเอนไซม์สองชนิดนี้ คุณสมบัติอื่นๆ อาทิเช่น ค่าจลนศาสตร์แสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์ การใช้ตัวยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์ทั้งสอง รวมทั้งได้ศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ของคนที่มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้แล้ว พบว่ามีคุณสมบัติแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์นี้ในเชื้อมาลาเรียและในคนอย่างสิ้นเชิง

ได้ทำการโคลนยีนส์ OPRT และ OMPDC ของเชื้อมาลาเรียของคน แล้วนำไปแสดงออกของยีนในแบคทีเรียอีโคไล การแยกเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ให้บริสุทธิ์ เอนไซม์ที่ได้ทำงานมีประสิทธิภาพสูง จึงศึกษาคุณสมบัติอย่างละเอียดทั้งในแง่จลนศาสตร์ กลไกการเร่งปฏิกิริยา รวมทั้งการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ รวมทั้งนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดมารวมกันในหลอดทดลองโดยสภาพจำลองให้เหมือนกับเอนไซม์อยู่ในตัวเชื้อมาลาเรีย พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมารวมกันได้และเกิดประสิทธิภาพของการเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์แต่ละชนิดที่ไม่ได้นำมารวมกัน และผลการรวมกันได้คุณสมบัติของเอนไซม์เหมือนกับที่ศึกษาที่แยกได้โดยตรงจากตัวเชื้อมาลาเรีย ได้วิเคราะห์จลนศาสตร์ของการรวมกันของเอนไซม์ทั้งสอง พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดจะรวมกันเองก่อนเป็นคู่ แล้วนำคู่ของเอนไซม์ทั้ง

สองมารวมกันอย่างละคู่ ได้ผลเป็นเอนไซม์คู่ผสม นอกจากนี้ตัวยับยั้งยังจับเอนไซม์คู่ผสมได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่แยกกันอยู่ ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียของคนได้ดี

ได้เสนอว่าเอนไซม์ที่ศึกษาทั้งสองชนิดอาจจะเป็นตำแหน่งเป้าหมายใหม่ในการพัฒนายารักษามาลาเรีย และควรศึกษาเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารไพริมิดีนให้ครบทั้งระดับยีนส์และโปรตีนเหล่านี้เพื่อสร้างองค์ความรู้นำไปใช้ออกแบบและพัฒนายารักษามาลาเรียตัวใหม่โดยมีตำแหน่งเป้าหมายที่การสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรีย คุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์ในเชื้อมาลาเรียน่าจะมีความสำคัญในแง่การเกิดวิวัฒนาการของเอนไซม์ทั้งสองที่พบในเซลล์ของสัตว์ชั้นต่ำและชั้นสูงรวมทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ความสำคัญในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองคงต้องศึกษาวิจัยต่อไป

ผลงานวิจัยในช่วงเวลา 3 ปีที่ได้รับทุนสนับสนุน มีผลงานได้รับการตีพิมพ์จำนวน 4 ผลงานในวารสารนานาชาติ [1). Biochemistry 2005, impact factor = 4.008; 2). Biochem Biophys Res Commun 2004, impact factor = 2.904; 3). Mol Biochem Parasitol 2004, impact factor = 2.803; 4). SE Asian J Trop Med Public Health 2003] รวมทั้งได้รับเชิญไปบรรยายเกี่ยวกับผลงานวิจัยดังกล่าว 3 ครั้ง [1). International Tropical Medicine Meeting 2002; 2). Florence University 2003; 3). International Conference on the Carbonic Anhydrases 2003]

คำหลัก: มาลาเรีย, พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม, เบสไพริมิดีน, ออโรเทท ฟอสโฟไรโบสีลทรานซ์-เฟอเรส, ออโรทิไดเลท ดีคาร์บอกซีลเลส

Abstract

Project Code: BRG4580020

Project Title: Biochemistry and Molecular Biology of Pyrimidine Biosynthesis in Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*

Investigator: Professor Dr. Jerapan Krungkrai

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

E-mail Address: fmedjkk@md2.md.ac.th

Project Period: 15 August 2002 – 14 August 2005

Project Description:

Malaria remains one of the world's major public health problems with 500 million infected patients annually. *Plasmodium falciparum*, the etiologic agent of the most lethal and severe form, is responsible for 1.5-2.7 million deaths per year. Chemotherapy of malaria is available but it is complicated both drug toxicity and widespread drug resistance. The need for more efficacious and less toxic agents, particularly rational drugs that exploit pathways and targets unique to the parasite, is therefore acute. The project is performed to better understanding in biochemistry and molecular biology of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway in human malaria parasite with the goal of illuminating new chemotherapeutic targets for drug development. Since the parasite depends on the *de novo* biosynthetic pathway for pyrimidines, precursors for DNA and RNA. Thus, inhibitors of the malarial pathway could be effective antimalarial agents.

We have exploited the unique metabolic features of *P. falciparum* by identification and characterization of two enzymes and their genes of the pyrimidine pathway, orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) and orotidylate decarboxylase (OMPDC), in asexual stage of the human parasite taken from *in vitro* culture. They are then purified and found to be an multienzyme complex. This is the first evidence to illustrate the malarial enzymes OPRT and OMPDC behaving the enzyme complex formation, which is not found in the analogous enzymes of other organisms so far studied. The physical and kinetic properties are well characterized. Molecular masses of both enzymes are determined and similar to their expected sizes in the malarial genome database. Some types of compounds are found to be inhibitors of the enzymes.

We have cloned the full-length open reading frame of both genes in *P. falciparum*, including gene isolation, sequencing and characterization. The cloned genes are functionally expressed as soluble proteins in a bacterial *Escherichia coli*. The recombinant proteins are then purified and found to have high catalytic efficiency. Detailed analyses on kinetic,

catalytic and inhibitory properties, and the *in vitro* re-association of both recombinant enzymes are then performed. The enzyme complex formation can occur and both enzymes in the complex show more both catalytic efficiency and sensitive to the inhibitors than the individual enzyme. They also have similar kinetic properties to those of the multienzyme complex purified directly from the parasite. The kinetic behaviors of the complex formation are as follows: 1) the monofunctional enzyme forms dimer; 2) the individual dimeric enzyme associates into a heteroterameric complex. Furthermore, their inhibitors have antimalarial activity on the *in vitro* growth of the human parasite.

Our results of the project suggest that: 1) the enzymes have unique properties as they may be a borderline between prokaryotes and eukaryotes, 2) they may play role in regulation of the pyrimidine pathway, 3) they are vital for the parasite survival, and 4) they may represent a putative chemotherapeutic target for drug development.

The outputs of the 3-year funding project are as follows:

1.There are 4 publications in international journals, these include: 1. Biochemistry 2005, impact factor = 4.008; 2. Biochem Biophys Res Commun 2004, impact factor = 2.904; 3. Mol Biochem Parasitol 2004, impact factor = 2.803; 4. SE Asian J Trop Med Public Health 2003.

2. There are 3 invited presentation and lecture, these include: 1. International Tropical Medicine Meeting 2002; 2. Florence University 2003; 3. International Conference on the Carbonic Anhydrases 2003.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, Pyrimidine, Orotate phosphoribosyltransferase, Orotidylate decarboxylase

Project Description

1.Introduction and Rationale

Malaria remains one of the world's major public health problems. Nearly half the world's population lives in tropical and subtropical areas where malarial parasites are endemic, and 500 million people worldwide are afflicted with the disease annually. *Plasmodium falciparum*, the etiologic agent of the most lethal and severe form of the four malarial species that infect humans, is responsible for 1.5-2.7 million deaths per year. *P. falciparum* is an obligate intracellular protozoan parasite that undergoes a number of developmental stages in the human host and multiplies asexually in the red blood cell to effect its clinical symptoms and lethal outcome. Chemotherapy of malaria is available but it is complicated both drug toxicity and widespread drug resistance. The need for more efficacious and less toxic agents, particularly rational drugs that exploit pathways and targets unique to the parasite, is therefore acute. The project supported from TRF (August 2002- August 2005) is intended to add to our basic and better understanding of a molecular and biochemical pathway of *P. falciparum* with the goal of illuminating new chemotherapeutic targets.

A dramatic metabolic discrepancy between *P. falciparum* and the human host involves pyrimidine metabolism. The pyrimidine biosynthetic pathway of *Plasmodium* sp. is clearly important for chemotherapeutic drug development given that, the malaria parasites, unlike their hosts, are unable to salvage pyrimidine bases and nucleosides (Scheibel 1988; Sherman 1979). The malarial parasite is dependent on the *de novo* biosynthetic pathway for its pyrimidine precursors (**Figure1**)(Gero *et al*. 1981, 1984; Gero and O'Sullivan 1990; Gutteridge *et al.* 1979; Krungkrai 1993, 1995; Krungkrai *et al*. 1990, 1991,1992; Rathod and Reyes 1983; Reyes *et al.* 1982). Thus, inhibitors of the malarial pathway could be effective antimalarial agents, as the infected patient could still synthesize their pyrimidine nucleotides from salvage pathways via uridine, thymidine, and cytidine nucleosides.

In the project supported from the TRF, we have exploited the unique metabolic features of *P. falciparum* by molecular and biochemical identification and characterization of the genes and enzymes of the pyrimidine pathway, especially the last two enzymes: orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) and orotidylate decarboxylase (OMPDC) (see **Figure 1** in a block diagram).

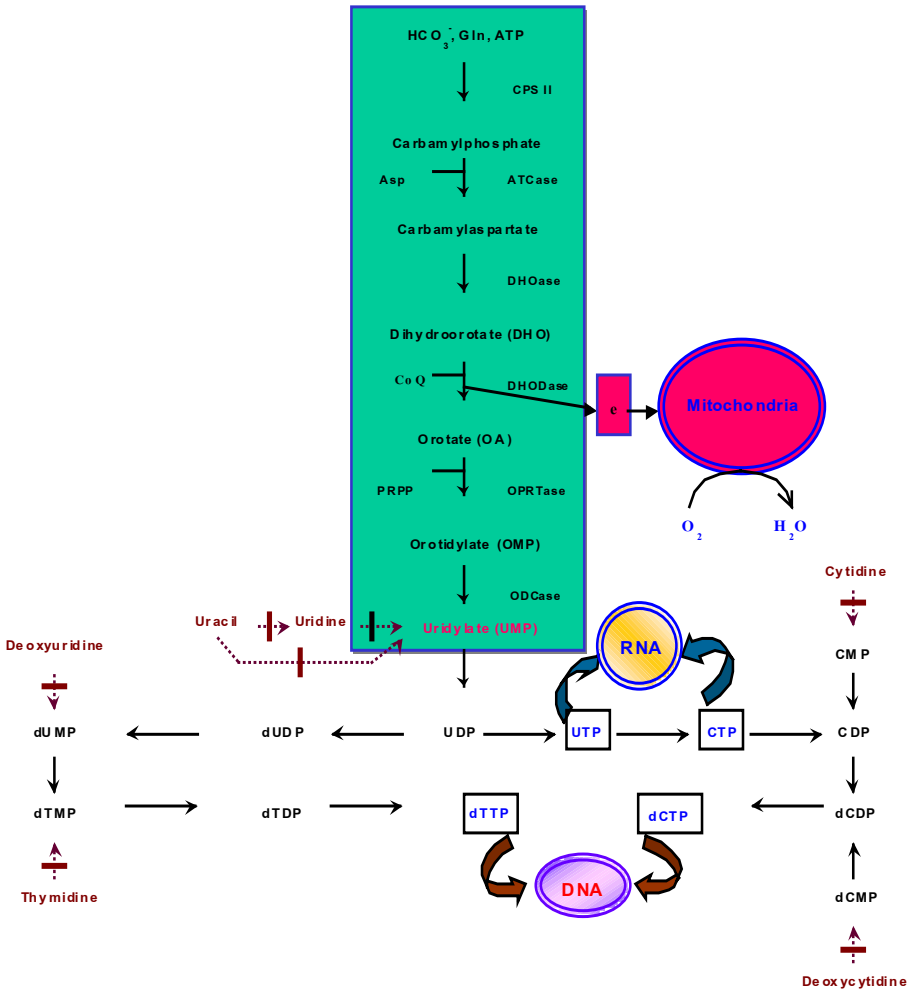


Figure 1. A proposed pyrimidine biosynthetic pathway in human malaria parasite(Krungkrai 2000). The first 6 enzymes of the *de novo* pyrimidine pathway are shown in the grey box (solid line). Genes encoding these enzymes are identified and characterized, as shown in this funding project (Krungkrai *et al*. 2003). The very low activity of the salvage pathway, shown by broken line, is also present in the parasite, as demonstrated in this funding project (Krungkrai *et al*. 2003). The human host contains both *de novo* and salvage pathways for pyrimidine requirement in the nucleotide metabolism and DNA & RNA synthesis. Detailed characterization, e.g., purification, cloning, expression, of the last two enzymes OPRT (OPRTase) and OMPDC (ODCase) are performed in this funding project (Krungkrai *et al.* 2004a, 2004b, 2005).

The pyrimidine biosynthetic pathway represents one of the oldest metabolic pathways, and the first six sequential steps from ATP, HCO^-_3, and Gln, leading to the production of UMP, have remained intact throughout evolution, although the primary structures of the enzymes deviate significantly among prokaryotes, parasitic protozoa, fungi, and animals, including human (Gao *et al.* 1999). In prokaryotes, the *pyr* genes

have been reported that they are both scattered (in many bacterial species and *E.coli*) (O'Donovan and Neuhard, 1970), and cluster as an operon on a 12.5 kb of the *Bacillus subtilis* chromosomal DNA, resulting in polycistronic transcription from a defined promoter (Quinn *et al.* 1991). As for the localization of human *pyr* genes (*pyr1, pyr2, pyr3, pyr4, pyr5, pyr6* encoding CPSII, ATC, DHO, DHOD, OPRT and OMPDC, respectively), the *pyr1-3-2*, *pyr4* and *pyr5-6* are reported to localize on different chromosomes, 2p22-21, 16q22, and 3q13, respectively (Database accession number: MIM:114010, MIM:274270, and MIM:258900). Conceptually, operons, the genes are co-transcribed from an upstream promoter with the results of polycistronic mRNA, are most commonly found in eubacteria and archaebacteria, the most well known probably being the *lac* operon of *E. coli*. Eukaryotes, on the other hand, produce monocistronic mRNA under the control of an individual 5' promoter. There are some exceptions to this rule, in trypanosomatids and malarial parasites (Carlton *et al*. 1999), which produce polycistronic mRNA of multiple genes from a single promoter. For *pyr* genes of the first six enzymes of the pyrimidine pathway, *Trypanosoma cruzi* has recently reported that the *pyr* genes are organized as operon-like cluster or synteny (Gao *et al*. 1999), as similar to that of the *B. subtilis* genes (Quinn *et al*. 1991). This prompts us to investigate molecular organization of the first six *pyr* genes in *P. falciparum* by using bioinformatics and the malarial genome database. The information obtained from the *pyr* genes works will provide an understanding of the gene regulation in human malarial parasite.

2. Objectives

In the funding project, we have performed three main objectives to achieve ultimate goals as follows:

2.1.Characterization of molecular organization of the genes encoding the first six enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway

2.2.Identification of a salvage pathway for the pyrimidine nucleotide biosynthesis

2.3.Functional and biochemical analysis of the last two enzymes of the pathway: orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) and orotidylate decarboxylase (OMPDC), including purification, cloning and expression.

It is consistent to our long-term goal of the study to illuminate new target enzymes for human malaria parasite. This will be the first time to validate the enzymes OPRT and OMPDC as malarial drug targets.

3.Methodology and Results

3.1 Characterization of molecular organization of the pyrimidine genes encoding the first six enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway

More recently, *P. falciparum* genome sequencing has been completed (Gardner *et al.* 2002). The sequencing of *P. falciparum* chromosome is accomplished as part of the International Malaria Genome Project and is supported by the Burroughs Wellcome, the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, and the U.S. Department of Defense. It is now possible to identify the sequences which encode the pyrimidine enzymes in this parasite. Using bioinformatics approach, the TBLASTN searching of the TIGR malarial genome database is performed with the protein sequences from bacteria (e.g., *E. coli*), yeast (e.g., *Saccharomyces cerivisae*), other parasites (e.g., *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Caenorhabditis elegans*, *Ascaris suum*) and mammalian (e.g., mouse, human) enzymes as query sequences. Pair-wise amino acid sequence and multiple sequence alignments of pyrimidine enzymes from *P. falciparum* with other organisms are performed using CLUSTALW. All other sequence data used in this study are collected from the EMBL, GenBank, DDBJ and SWISSPROT databases. Determinations of hydrophobicity and secondary structure (α-helix, β-pleated sheet) of the malarial enzymes are done using a Hitachi DNASIS version 2.6 software. Phylogenetic analyses to produce the gene tree are performed by the neighbor-joining method using a distance matrix estimated by the maximum likelihood method. The reliability is assessed by the bootstrap method with 1000 pseudo-replications.

The six pyrimidine genes (*pyr1 = pfCPSII*, *pyr2 = pfATC*, *pyr3 = pfDHO*, *pyr4 = pfDHOD*, *pyr5 = pfOPRT*, *pyr6 = pfOMPDC*) are then identified. The *pyr1-pyr6* ORFs are organized on different locations of various chromosomes: *pfCPSII* (chromosome 13), *pfATC* (chromosome 13), *pfDHO* (chromosome 14), *pfDHOD* (chromosomes 6), *pfOPRT* (chromosomes 5), *pfOMPDC* (chromosome 10). The locations and organizations of all 6 pyrimidine genes are summarized in **Table 1**. The characteristics of the pyrimidine genes are as follows: 1) single ORF, genes having no intron, 2) only one copy, and 3) loci closed to hypothetical proteins on the same chromosome. It is then concluded that the molecular organization of the malarial pyrimidine genes is separated from each other and is not operon-like cluster. This differs from its analogous parasitic protozoan *Trypanosoma* and *Leishmania*, which the *pyr1-pyr6* genes (as operon-like cluster) constitute a polycistronic transcript unit on a 25 kb segment of the 800 kb chromosomal DNA (Gao *et al*., 1999). The malarial pyrimidine genes are also different from human in that the single

gene *pyr1-pyr2-pyr3* (chromosome 2p22-21) encodes the multifunctional CAD protein catalyzing the first three enzymes activities and the other gene *pyr5-pyr6* (chromosome 3q13) produces the bifunctional UMP synthase activity (Jones, 1980; Gao *et al*., 1999).

Table 1. A proposed molecular organization of the pyrimidine genes in human parasite *P. falciparum*

Gene	Chromosome	Locus	Size (kb)
Pyr1 (*pfCPSII*)	13	PF13_0044	7.329
Pyr2 (*pfATC*)	13	PF13_0240	1.435
Pyr3 (*pfDHO*)	14	PF14_0697	1.076
Pyr4 (*pfDHOD*)	6	MAL6P1.36	1.709
Pyr5 (*pfOPRT*)	5	PFE0630c	0.846
Pyr6 (*pfOMPDC*)	10	PF10_0225	0.972

The identified ORFs of the *pyr1- pyr6* genes of *P. falciparum* are deduced to amino acid sequences of the pyrimidine enzymes. Using multiple sequence alignments and phylogenetic analyses of these sequences, the malarial *pf*CPSII, *pf*DHO and *pf*OPRT are conserved to bacterial counterparts. The malarial *pf*ATC, *pf*DHOD and *pf*OMPDC are mosaic variations, which are homologous to both bacterial and eukaryotic counterparts, including human. An analysis with the ATC sequence of *Toxoplasma gondii*, a parasitic protozoan, reveals only 30% identity to the *pf*ATC gene. The *pf*DHO sequence is closed to most bacterial sequences, yeast *S. cerevisae* and plant *Arabidopsis thalina*, indicating that *P. falciparum* may carry the monofunctional DHO whose gene may have acquired by the horizontal transfer from the proteobacteria, i.e., *E. coli*, *N. gonorrhoeae*.

The *pf*DHOD is ~ 48-51% similar to the human and *E. coli* DHODs. The *pf*OPRT is 60% and 28% sequence similarity to *E. coli* and human OPRTs, respectively) The sequences between *P. falciparum* and *T. cruzi* OPMDCs is 50% similarity, whereas the malarial and human enzymes is 37%. In addition, the OMPDC are identified in other *Plasmodium* species, e.g., *P. knowlesi* (a monkey parasite), *P. berghei* and *P. yoelii* (rodent parasites). These four malarial OMPDCs are high similarity. Phylogenetic analysis of the pyrimidine enzymes, for example the *P. falciparum* OMPDC is placed in the monophyletic subtree containing the *Mycobacterium smegmatis*, *Thermus thermophilus* and *T. cruzi*, and is also closed to other bacterial OMPDCs, i.e., *E. coli* and *B. subtilis*.

The OMPDC sequences of many eukaryotes examined, except the trypanosome and malaria parasites, are relatively monophyletic. The results on the malarial OMPDC sequence are consistent with the observation of Gao *et al*. (1999) and Nara *et al*. (2000) on the trypanosomatid parasites. This suggests that the malarial parasite or its ancestor may have acquired an eubacterial OMPDC (i.e., *Mycobacterium*) and elaborated a new gene product, OMPDC, that is the longest sequence (323 amino acids) to date. The origin of this *pf*OMPDC gene remains to be determined.

Our results in a human malarial parasite also support the evolutionary implications of the mosaic pyrimidine biosynthetic pathway in many eukaryotes. The horizontal gene transfer(s) and endosymbiosis may be responsible for establishing this mosaic pathway (Nara *et al*., 2000).

In conclusion for this objective of the project, the results were published in **Krungkrai et al. (2003) Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 34 (Suppl 2), 32-43.** These results were orally presented as invited lecture at the Joint International Tropical Medicine Meeting, Bangkok, Thailand, 20-22 November 2002, and also at Department of Chemistry, Florence University, Italy, 15 June 2003.

3.2.Identification of a salvage pathway for the pyrimidine nucleotide biosynthesis

The use of sensitive assays of radiometric (Reyes *et al.*, 1982) and HPLC methods (Krungkrai *et al*., 1989), provides the evidence that *P. falciparum* and *P. berghei* lack the enzyme activity of thymidine kinase in that salvage preformed thymidine from host to form thymidine 5'-monophosphate (TMP), suggesting that there is no thymidine pyrimidine salvage pathway operating in the parasites. However, UMP may not be only produced by synthesis *de novo* but also from preformed uracil via a salvage pathway (**Figure 1**). This is achieved either in one step enzymatic reaction by the activity of uracil phosphoribosyltransferase (UPRT), or by the sequential action of the enzymes uridine phosphorylase (UP) and uridine kinase (UK). In this study, the three enzyme activities are assayed in the cell-free extracts of *P. falciparum* and *P. berghei* using the recently developed HPLC methods (Krungkrai *et al.* 2001).

As shown in **Table 2**, the malarial parasites have the three enzymes, in the order from high to low specific activities: UPRT, UK and UP. The human red cell enzymes are not detected, the mouse red cell have detectable activities of UK and UP in a much lower level than those of the rodent parasite.

Table 2. Enzymatic activities inter-converting uracil, uridine and UMP of a pyrimidine salvage pathway (uracil phosphoribosyltransferase, UPRT; uridine kinase, UK; uridine phosphorylase, UP) in the malarial parasites, human and mouse red cells.

Sources	Enzyme specific activity (nmol/min/mg protein)[a]		
	UPRT	UK	UP
P. falciparum	0.325±0.044	0.221±0.010	0.076±0.005
P. berghei	0.266±0.072	0.179±0.016	0.092±0.010
Human red cell	N.D.[b]	N.D.	N.D.
Mouse red cell	N.D.	<0.015	<0.015

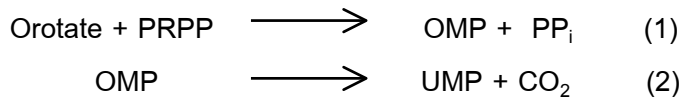
[a] Values are mean ± SD of 4-7 separate experiments of the enzyme preparations from cell-free extract..
[b] N.D., the enzyme activity is not detected.

Moreover, the *pfUP* homologue (size = 0.737 kb) encoding uridine phosphorylase is also identified on chromosome 5 locus PFE06660c. The ORF of the *pf*UP is 68% and 37% sequence similarity to *E. coli* and human enzymes respectively. The *pf*UP sequence is also closed to other bacterial UPs. The *pfUP* gene has been cloned, sequenced and expressed in *E. coli*. However, low level expression of the *pfUP* in *E. coli* is obtained, limiting detailed characteriztion of the recombinant *pf*UP protein. Our results indicate that a uracil pyrimidine salvage pathway is present in the malarial parasites. This is consistent to the similar findings of the salvage pathway existing in other protozoan, i.e., *T. brucei* and *T. gondii*.

In conclusion for this objective of the project, exploring both the genes and enzymatic activities demonstrates that the uracil pyrimidine salvage pathway do exist in the parasite. The findings were published in **Krungkrai et al. (2003) Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 34 (Suppl 2), 32-43**, and were orally presented as invited lecture at the Joint International Tropical Medicine Meeting, Bangkok, Thailand, 20-22 November 2002, and also at Department of Chemistry, Florence University, Italy, 15 June 2003. One M.Sc. student was graduated (C. Wichitkul, 2003) with thesis entitled ”Cloning and expression of uridine phosphorylase gene in *Plasmodium falciparum*” (ISBN 974-17-5153-2).

3.3.Functional and biochemical analysis of the last two enzymes of the pathway: orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) and orotidylate decarboxylase (OMPDC), including purification, cloning and expression

The OPRT catalyzes the formation of orotidylate (OMP) from orotate and phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) in the presence of Mg^{2+} as cofactor (reaction 1), whereas the OMPDC catalyzes decarboxylation of OMP to uridylate (UMP) (reaction 2).



3.3.1. Cultivation and preparation of human malarial parasite *P. falciparum*

The asexual stages of human malarial parasite *P. falciparum* are used for the enzymes OPRT and OMPDC. The parasites are obtained from *in vitro* culture using the method of Trager and Jensen (1976). Mass cultivation of human parasite is performed to obtain enough materials for purification and biochemical characterization. Synchronization of the parasite is achieved to get mainly trophozoite stage that active in both nucleic acid and protein synthesis. Once the parasites are obtained as the infected host red cells, the free parasites are then prepared and disrupted by using combined methods of freeze-thaw and ultra-sonication. The supernatant fluid as crude extract is collected from the cell lysate after centrifugation. The crude extract of the parasites, stored as aliquots at -80°C, are used as enzyme sources.

3.3.2. Purification and biochemical characterization of *P. falciparum* OPRT and OMPDC

After having enough crude extracts as starting materials and developing a sensitive and reliable HPLC micro-assays for measuring the OPRT and OMPDC enzymes (Krungkrai *et al*. 2001), we have purified the enzymes by using fast-protein liquid chromatographic (FPLC) system which is available in our laboratory. The purification scheme is performed, this includes cation-exchange (Mono S column) and anion-exchange (Mono Q column), UMP-affinity, and gel-filtration (Superose 12 column) chromatographic techniques. The techniques are assembled to a fast FPLC system that allow rapid purification in each step. Both enzyme are found to be labile, stabilizers (i.e.,1 mM dithiothreitol, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, etc) are also added to all enzyme preparation including all buffers used in the study.

The activities of both enzymes are co-eluted in every chromatographic steps during 6-8 purifications. The physical properties are then characterized with the enzyme obtained after the affinity step as described earlier. The SDS-PAGE analyses indicate the enzymes are near homogenous preparation. Molecular masses of the enzyme OPRT and OMPDC are determined by analytical gel-filtration FPLC column. The results in the physical properties and purification characteristics indicate that the molecular mass of native enzymes *P. falciparum* OPRT and OMPDC exist as 140$\pm$ 8 kDa (n=8) and the molecular masses of each enzyme subunit are 32$\pm$ 3 and 38$\pm$ 3 kDa.

The kinetic properties for both substrates and inhibitors are further characterized, i.e., K_m k_{cat} and K_I values. Unlike the OPRT, the OMPDC does not require metal ion during catalysis (Lee and Houk 1997). We have found that Zn^{2+} and Mg^{2+} show no affect on the enzyme activity when assays with OMP substrate at low (5-25 μM) or high (50-250 μM) concentrations. The activities of the enzymes are sensitive to inhibition by their known and specific inhibitors (Scott *et al.* 1986; Seymour *et al.* 1994).

An inhibitor of malarial OPRT pyrazofurin with K_i of 14.2 μM, has antimalarial effect on the *in vitro* growth of *P. falciparum* with IC_{50} of ~10 μM. A potent antimalarial 5-fluoroorotate with IC_{50} of ~10 nM (substrate analog of orotate), is metabolized to 5-fluoro-UMP by the malarial OPRT and OMPDC. The 5-fluoroorotate and 5-fluoro-UMP are found to be inhibitors of the malarial OPRT and OMPDC respectively. The Ki values of 5-fluoroorotate and 5-fluoro-UMP for the malarial OPRT and OMPDC are 1.4 and 0.7 μM respectively. In addition, both uracil and uridine are not substrates of the malarial OPRT enzyme, they do inhibit the enzyme at high concentrations, e.g., >100 μM. Moreover, kinetic parameters and inhibitory constants of both OPRT and OMPDC activities are found to be different to the bifunctional human red cell UMP synthase. Our results suggest the malarial OPRT and OMPDC enzymes have unique properties as a multienzyme complex and are vital for the parasite. They may represent a possible chemotherapeutic target for new drug development.

In conclusion for this objective of the project, the discovery on the existence of the multienzyme complex of the malarial OPRT and OMPDC enzymes was published in **Krungkrai *et al*. (2004a) Biochemical and Biophysical Research Communications 318, 1012-1018 (Impact factor = 2.904)**. This provides the first example of OPRT and OMPDC existing as a multienzyme complex.

3.3.3. Cloning and expression of gene encoding *P. falciparum* OPRT

Methodology for cloning and expression of the *pyr5* or *pfOPRT* gene encoding *P. falciparum* OPRT in a bacterial *E. coli* has been described in our publication (Krungkrai *et al*. 2004b). The results are then summarized.

The *pfOPRT* is identified in the *P. falciparum* genome database. The deduced amino acid sequence for *pf*OPRT is compared with OPRTs from other organisms and found to be most similar to that of *E. coli*. The catalytic residues and consensus sequences for substrate binding in the enzyme are conserved among other organisms. The *pf*OPRT is exceptional in that it contained a unique insertion of 20 amino acids and an amino-terminal extension of 66 amino acids, making the longest amino acid sequence (281 amino acids with a predicted molecular mass of 33 kDa).

The cDNA of the *pf*OPRT gene is cloned, sequenced and functionally expressed in soluble form. The recombinant *pf*OPRT is purified from the *E. coli* lysate by two steps, nickel metal-affinity and gel filtration chromatography. From 1 liter of *E. coli* culture, 1.2-1.5 mg of pure *pf*OPRT is obtained. SDS-PAGE reveals that the *pf*OPRT has a molecular mass of 33 kDa and analytical gel filtration chromatography shows that the enzyme activity elutes at approximately 67 kDa. Using 3,3'-dimethyl suberimidate to cross-link neighboring subunits of the *pf*OPRT, it is confirmed that the native enzyme exists in a dimeric form. The steady state kinetics of initial velocity and product inhibition studies indicates that the enzyme *pf*OPRT follows a random sequential kinetic mechanism. Compounds aimed at the *pf*OPRT nexus may act against the parasite through at least two mechanisms: by directly inhibiting the enzyme activity, or be processed to an inhibitor of thymidylate synthase (Rathod *et al*. 1992).

In conclusion for this objective of the project, the results on production and characterization of the recombinant *P. falciparum* OPRT enzyme were published in **Krungkrai *et al*. (2004b) Molecular Biochemical and Parasitology 134, 245-255 (Impact factor = 2.803)**. This provides a working system to investigate new antimalarial agents targeted against *P. falciparum* OPRT.

3.3.4. Cloning and expression of gene encoding *P. falciparum* OMPDC

Methodology for cloning and expression of the *pyr6* or *pfOMPDC* gene encoding *P. falciparum* OMPDC in a bacterial *E. coli* has been described in our publication (Krungkrai *et al*. 2005). The results are then summarized.

The open reading frame of *pf*OMPDC gene is identified in the *P. falciparum* genome database, and *pf*OMPDC is cloned from cDNA of *P. falciparum*, functionally expressed in *E. coli*, purified, and characterized. The protein sequence consists of 323 amino acids and it has <20% identity with human OMPDC and four microbial OMPDC for which crystal structures are known (*B. subtilis*, *E. coli*, *M. thermoautotrophicum* and *S. cerevisae*). The *pf*OMPDC protein sequence is more similar to the protozoan (*T. cruzi*, *L. mexicana*) and to some bacterial counterparts, e.g., *Thermus thermophilus*, with a range of 32-27 % identity. Similar to the *pf*OPRT, the *pf*OMPDC contains an extension of 32 amino acids from its N-terminus (Met1 to Phe32) and a unique insertion of 12 amino acids from Arg72 to Phe83, displaying a hydrophobic index of +1.0. The *pf*OMPDC is one of the longest OMPDC sequences known to date.

The recombinant *pf*OMPDC protein is purified to apparent homogeneity using the nickel metal-affinity column. The N-terminal His_6-tag of the *pf*OMPDC is removed, and the protein was further purified by the Superose 12 gel filtration FPLC column. Recombinant *pf*OMPDC is catalytically active in a dimeric form. The purified recombinant enzyme has a specific activity of ~8-10 μmol min^{-1} mg^{-1} protein, 220-fold purification and 30% yield, and up to 3 mg of pure protein is obtained from 1 liter of cell culture.

In conclusion for this objective of the project, the results on production and characterization of the recombinant *P. falciparum* OMPDC enzyme were published in **Krungkrai *et al.* (2005) Biochemistry 44, 1643-1652 (Impact factor = 4.008)**.

3.3.5. Characterization of the multienzyme complex formation between the recombinant *P. falciparum* OPRT and OMPDC

By using re-association studies of a mixture of the recombinant *pf*OPRT and *pf*OMPDC in a stoichiometric ratio of 1:1, the association complex is analyzed by the Superose 12 gel filtration FPLC column after incubating the enzymes with the substrates orotate and PRPP. Both enzyme activities are co-eluted as a single, symmetrical peak at a retention time correspondiing to a molecular mass of 140 $\pm$ 6 kDa (n = 6). There are no enzyme activities remaining at their dimeric positions, and also no activities in fractions corresponding to molecular masses higher than 140 kDa, indicating the essentially complete heterotetrameric complex formation between $OPRT)_2$ and $(OMPDC)_2$. The re-association studies of both enzymes are also performed by incubating the enzymes in the presence or absence of the product UMP, similar results to the enzymes incubated with the substrates are obtained. The results suggest that the complex would be stabilized by

substrate, product, and salt. The fractions containing both *pf*OPRT and *pf*OMPDC are pooled and then analyzed by SDS-PAGE, whereupon two bands are observed at their monomeric forms of 33 and 38 kDa for *pf*OPRT and *pf*OMPDC respectively.

To confirm the complex formation, a second approach using chemical crosslinking of either *pf*OPRT or *pf*OMPDC is performed by incubating the enzymes with 3,3'-dimethyl suberimidate (DMS) in a ratio of 1:2 for protein (each 10 μg) to 40 μg DMS at 25 ^{o}C for various times interval, and then analyzed by SDS-PAGE. When the reaction mixture of *pf*OPRT and *pf*OMPDC (1:1) incubating with DMS, there is significant formation of tetramer at 10-min incubation, as shown in **Figure 2**.

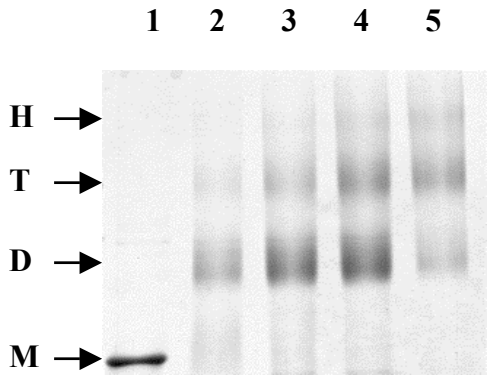


Figure 2. SDS-PAGE analysis of oligomeric formation between *pf*OPRT and *pf*OMPDC crosslinked with dimethyl suberimidate (DMS). SDS-PAGE on a 7 % polyacrylamide gel shows time-course of crosslinking between *pf*OPRT and *pf*OMPDC (each 10 μg) and DMS (40 μg) at 0 min (lane 1), 5 min (lane 2), 10 min (lane 3), 15 min (lane 4) 30 min (lane 5). The letters M, D, T and H indicate positions of monomeric, dimeric, tetrameric and hexameric forms. The apparent monomer, dimer, tetramer and hexamer have log molecular mass of 4.58, 4.85, 5.15, 5.33 respectively.

At 30 min, more than 70% of the proteins are crosslinked as tetrameric form. There is little hexameric form and no octameric form after 45-120-min incubation. The molecular masses of the crosslinked oligomers are also determined by the Superose12 gel filtration FPLC column. The tetrameric form has a molecular mass of 140 $\pm$ 12 kDa (n = 6), corresponding to the size of the native multienzyme complex from *P. falciparum*.

Kinetics of crosslinking of both associated enzymes are shown in **Figure 3**, indicating that the time-dependent oligomerization of each enzyme corresponded to that expected for sequential crosslinking of monomer $\rightarrow$ dimer $\rightarrow$ tetramer. Taken together, these results demonstrate that the two pyrimidine enzymes, (*pf*OPRT)$_2$ and (*pf*OMPDC)$_2$, form major oligomeric complex in a heterotetrameric structure.

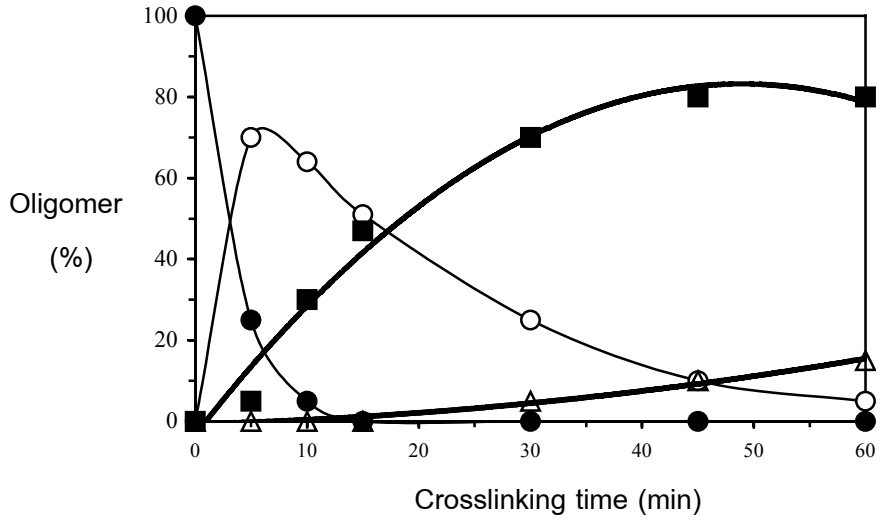


Figure 3. Kinetics of crosslinking formation between the *pf*OPRT and *pf*OMPDC by dimethyl suberimidate. The experimental details are described in Figure 2. The time dependence of the percentage of each size of oligomers as indicated by the ratio of its band density to the total density of all detected bands is illustrated. The symbols used are as follows: monomer (●), dimer (O), tetramer (■) and hexamer (Δ).

In conclusion for this objective of the project, the results on kinetic characterization of the multienzyme complex formation between the recombinant *P. falciparum* OPRT and OMPDC enzyme were published in **Krungkrai *et al*. (2005) Biochemistry 44, 1643-1652 (Impact factor = 4.008)**.

4. Discussion

It is well understood that the human malaria parasite *P. falciparum* depends on the *de novo* biosynthetic pathway for pyrimidines, precursors for DNA and RNA. Much thanks to the malarial genome project (Gardner *et al.* 2002), the *pyr* genes encoding the first six enzymes of pyrimidine pathway (*pyr1* = *pfCPSII*, *pyr2* = *pfATC*, *pyr3* = *pfDHO*, *pyr4* = *pfDHOD*, *pyr5* = *pfOPRT*, *pyr6* = *pfOMPDC*) are identified on different locations of various chromosomes. It is then concluded that the molecular organization of the malarial pyrimidine genes is separated from each other and is not operon-like cluster, which are different from the operon of *B. subtilis* (Quinn *et al*. 1991) and *T. cruzi* (Gao *et al*. 1999). Our results on multiple alignments of the sequences of the six enzymes to other organisms support the evolutionary implications of the mosaic pyrimidine biosynthetic pathway found in many eukaryotes (Nara *et al*. 2000). The horizontal gene transfer(s) and endosymbiosis may be responsible for establishing this mosaic pathway.

Moreover, the *pfUP* homologue encoding uridine phosphorylase is identified and the *pfUP* gene is cloned, sequenced and expressed in *E. coli*. The malaria parasites show detectable activities of uracil salvage enzymes, uracil phosphoribosyltransferase, uridine kinase and uridine phosphorylase. The specific activities of the uracil salvage enzymes are only 1% of those for the OPRT-OPMDC of the *de novo* pathway (Krungkrai *et al.* 2003, 2004a). Our results indicate that a pyrimidine salvage pathway is present in the malarial parasites. This is consistent to the similar observation of the existence of the salvage pathway in other protozoan, i.e., *T. brucei* (Hammond and Gutteridge, 1982) and *T. gondii* (Schumacher *et al*., 1998).

Since there is very little information on the pyrimidine pathway operating in the human malarial parasite *P. falciparum*. Therefore, we have exploited the unique metabolic features of *P. falciparum* by identification and characterization of OPRT and OMPDC enzymes. They are purified and found to be the multienzyme complex. This is the first evidence that the malarial enzymes OPRT and OMPDC can form the enzyme complex, which is not found in the analogous enzymes of other organisms so far studied. Both genes and enzymes of the parasite are different from the human. The human OPRT and OMPDC are encoded from the fused genes and expressed as a bifunctional enzyme on the same polypeptide (Jones, 1980; Suchi *et al*. 1997).

We have then cloned the *pfOPRT* and *pfOMPDC*, and functionally expressed as the soluble proteins in *E. coli*. The recombinant proteins are purified and found to have high catalytic efficiency. Detailed analyses on kinetic, catalytic and inhibitory properties, and the *in vitro* re-association of both recombinant enzymes are then performed. The enzyme complex formation can occur and both enzymes in the complex show more both catalytic efficiency and sensitive to the inhibitors than the monofunctional enzyme. They also have similar kinetic properties to those of the multienzyme complex purified directly from the parasite. The kinetic behaviors of the complex formation are as follows: 1) the monofunctional enzyme forms dimer; 2) the individual dimeric enzyme associates into a heteroterameric complex (**Figure 4**). Their properties on the multienzyme complex may be a borderline between prokaryotes (monofunctional enzymes) and eukaryotes (bifunctional enzymes).

Furthermore, their inhibitors have antimalarial activity on the *in vitro* growth of the human parasite. Thus, the *pfOPRT* and *pfOMPDC* may represent a new target for chemotherapeutic drug development.

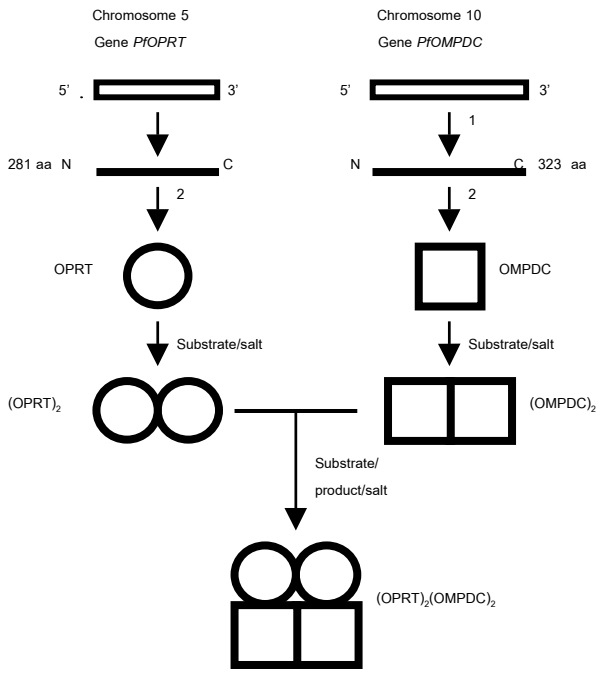


Figure 4. A proposed model for multienzyme $(OPRT)_2(OMPDC)_2$ complex formation of *P. falciparum* OPRT and OMPDC. The OPRT and OMPDC are synthesized separately, the individual enzymes form homodimers. Both enzymes are functioning in a tightly associated heterotetrameric $(OPRT)_2(OMPDC)_2$.

All four crystal structures of OMPDCs are composed of two identical subunits, each containing one active site located at the top of the TIM barrel, near the subunit-subunit interface, and showing both the N- and C-termini extending side-by side on one surface of the protein (see Appleby *et al*. 2000; Wu *et al.* 2000, 2002). It is postulated that the N-terminal of *pf*OMPDC could bind to the N-terminal of the *pf*OPRT, leading to a heterotetrameric $(pf\text{OPRT})_2$ $(pf\text{OMPDC})_2$ complex formation. However, this proposal remains to be studied.

Finally, it should be mentioned here that the cloning and expression of both *pfOPRT* and *pfOMPDC* genes from the malarial parasite are performed by an Australian group (Menz *et al*. 2002; Christopherson *et al*. 2004) during the ongoing of our funding project. However, our works from the project supported by the Thailand Research Funds have much more basic and advanced knowledge of both *pfOPRT* and *pfOMPDC* in the pyrimidine biosynthesis of human malarial parasite *P. falciparum* (Krungkrai *et al*. 2004b, 2005).

5. Conclusion and Future Propect

The first six genes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway and one gene of the uracil salvage pathway are identified in the human malarial parasite. The very low activities of the three uracil salvage enzymes are present in the parasite. The last two enzymes of the *de novo* pathway, OPRT and OMPDC, behave unique properties as the heterotetrameric complex formation, a borderline between prokaryotes and eukaryotes. The pyrimidine enzymes are vital for the parasite survival. Finally, they may represent a new chemotherapeutic target for drug development.

We plan to continue better understanding in both biochemistry, molecular and structural biology of the pyrimidine pathway, for instance, functional expression of the other pyrimidine genes in heterologous systems and comparison to native enzymes purified directly from the parasite, mechanism of the multienzyme complex formation and their kinetic and stability benefits, 3-D structure of the recombinant OPRT, OMPDC and their complex by crystallization and X-ray diffraction. The accumulating knowledge will lead to antimalarial drug design based on the pyrimidine enzymes as new chemotherapeutic targets.

6. References

Appleby, T.C., Kinsland, C., Begley, T.P., and Ealick, S.E. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2005-2010.

Carlton, J.M.R., Galinski, M.R., Barnwell, J.W., and Dame, J.B. (1999) Mol. Biochem. Parasitol. 101, 23-32.

Christopherson, R.I., Cinquin, O., Shojaei, M., Kuehn, D., and Menz, R.I. (2004). Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 23, 1459-1465.

Gao, G., Nara, T., Shimada, N.J., and Aoki, T. (1999) J. Mol. Biol. 285, 149-161.

Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., *et al*. (2002) Nature 419, 498-511.

Gero, A. M., Tetley, K., Coombs, G.H., and Phillips, R.S. (1981) Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75, 719-720.

Gero, A.M., Brown, G.V., and O'Sullivan, W.J. (1984) J. Parasit. 70, 536-541.

Gero, A.M., and O'Sullivan, W. J. (1990) Blood Cells 16, 467-484.

Gutteridge, W.E., Dave, D., and Richards, W.H.G. (1979) Biochim. Biophys. Acta. 582, 390-401.

Hammond, D.J., and Gutteridge, W.E. (1982) Biochim. Biophys. Acta 718, 1-10.

Jones, M.E. (1980) Annu. Rev. Biochem. 49, 253-279.

Krungkrai, J. (1993) Drugs Fut. 18, 441-450.

Krungkrai, J. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1243, 351-360.

Krungkrai, J. (2000) Trends Comp. Biochem. Physiol. 6, 95-107.

Krungkrai, J., Yuthavong, Y., and Webster, H.K. (1989) J. Chromatogr. 487, 51-59.

Krungkrai, J., Cerami, A., and Henderson, G.B. (1990) Biochemistry 29, 6270-6275.

Krungkrai, J., Cerami, A., and Henderson G.B. (1991) Biochemistry 30, 1934-1939.

Krungkrai, J., Krungkrai, S.R., and Phakanont, K. (1992) Biochem. Pharmacol. 43, 1295-1301.

Krungkrai, J., Wutipraditkul, N., Prapunwatana, P., Krungkrai, S.R., and Rochanakij, S. (2001) Anal. Biochem. 299, 162-168.

Krungkrai, J., Prapunwattana, P., Wichitkul, C., Reungprapavut, S., Krungkrai, S.R., and Horii, T. (2003) SE Asian J. Trop. Med. & Public Health 34(Suppl 2), 32-43.

Krungkrai, S.R., Prapunwattana, P., Horii, T., and Krungkrai, J. (2004a) Biochem. Biophys. Res. Commun. 318, 1012-1018.

Krungkrai, S.R., Aoki, S., Palacpac, N.M.Q., Sato, D., Mitamura, T., Krungkrai, J., and Horii, T. (2004b) Mol. Biochem. Parasitol. 134, 245-255.

Krungkrai, S.R., DelFraino, B. J., Smiley, J.A., Prapunwattana, P., Mitamura, M., Horii, T., and Krungkrai, J. (2005) Biochemistry 44, 1643-1652.

Lee, J.K., and Houk, K.N. (1997) Science 276, 942-945.

Menz, R.I., Cinquin, O., and Christopherson, R.I. (2002) Ann. Trop. Med. Parasitol. 96, 469-476.

Nara, T., Hshimoto, T., and Aoki, T. (2000) Gene 257, 209-222.

O'Donovan, G.A., and Neuhard, J. (1970) Bacteriol. Rev. 34, 278-343.

Quinn, C.L., Stephenson, B., and Switzer, R.L. (1991) J. Biol. Chem. 266, 9113-9127.

Rathod, P.K., and Reyes, P. (1983) J. Biol. Chem. 258, 2852-2855.

Rathod, P.K., Leffers, N.P., and Young, R.D. (1992) Antimicrob. Agents Chemother. 36, 704-711.

Reyes, P., Rathod, P.K., Sanchez, D. j., Mrema, J.E.K., Rieckmann, K, H., and Heidrich, H. G. (1982) Mol. Biochem. Parasitol. 5, 275-290.

Scheibel, L.W. (1988) In "Malaria", Wernsdorfer, W.H., and McGregor, I., eds., vol. I, Churchill Livingstone, New York, pp.171-217.

Schumacher, M.A., Carter, D., Scott, D.M., Roos, D., Uiikan, B., and Brennan, R.G. (1998) EMBO J. 17, 3219-3232.

Scott, H.V., Gero, A.M., and O'Sullivan, W.J. (1986) Mol. Biochem. Prasitol. 18, 3-15.

Seymour, K.K., Lyons, S.D., Phillips, L., Rieckmann, K. H., and Christopherson, R. I. (1994) Biochemistry 33, 5268-5274.

Sherman, I.W. (1979) Microbiol. Rev. 43, 453-495.

Suchi, M., Mizuno, H., Kawai, Y., Tsuboi, T., Sumi, S., Okajima, K., Hodgson, M.E., Ogawa, H., and Wada, Y. (1997) Am. J. Hum. Genet. 60, 525-539.

Trager, W., and Jensen, J.B.(1976) Science 193, 673-675.

Wu, N., Mo, Y., Gao, J., and Pai, E.F. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2017-2022.

Wu, N., Gillon, W., and Pai, E.F. (2002) Biochemistry 41, 4002-4011.

Outputs

1. Publications from the funding project (4 publications)

1.1. Krungkrai, S.R., DelFraino, B. J., Smiley, J.A., Prapunwattana, P., Mitamura, M., Horii, T., and Krungkrai, J. (2005) A novel enzyme complex of orotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase in human malaria parasite Plasmodium falciparum: physical association, kinetics and inhibition characterization. Biochemistry 44, 1643-1652. (Impact factor = 4.008)

1.2. Krungkrai, S.R., Aoki, S., Palacpac, N.M.Q., Sato, D., Mitamura, T., Krungkrai, J., and Horii, T. (2004) Human malaria parasite orotate phosphoribosyltransferase: functional expression, characterization of kinetic reaction mechanism and inhibition profile. Molecular Biochemical and Parasitology 134, 245-255. (Impact factor = 2.803)

1.3. Krungkrai, S.R., Prapunwattana, P., Horii, T., and Krungkrai, J. (2004) Orotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase exist as multienzyme complex in human malaria parasite Plasmodium falciparum. Biochemical and Biophysical Research Communications 318, 1012-1018. (Impact factor = 2.904)

1.4. Krungkrai, J., Prapunwattana, P., Wichitkul, C., Reungprapavut, S., Krungkrai, S.R., and Horii, T. (2003) Molecular biology and biochemistry of malarial parasite pyrimidine biosynthetic pathway. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 34(Suppl 2), 32-43.

2. Publications from our laboratory funding from TDR/WHO, NSTDA (career development award) and TRF (postdoc) and acknowledge to TRF (3 publications)

2.1. Krungkrai, J., Scozzafava, A., Reungprapavut, S., Krungkrai, S.R., Rattanajak, R., Kamchonwongpaisan, S., and Supuran, C.T. (2005) Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of Plasmodium falciparum carbonic anhydrase with aromatic sulfonamides: towards antimalarials with a novel mechanism of action? Bioorganic & Medicinal Chemistry 13, 483-489. (Impact factor = 2.185)

2.2. Reungprapavut, S., Krungkrai, S.R., and Krungkrai, J. (2004) Plasmodium falciparum carbonic anhydrase is a possible target for malaria chemotherapy. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 19, 249-256. (Impact factor = 1.423)

2.3. Krungkrai, J. (2004) The multiple roles of the mitochondrion of the malarial parasite. Parasitology 129, 511-524. (Impact factor = 1.685)

3. Invited presentation to international symposium and lecture (3 times)

3.1. Joint International Tropical Medicine Meeting, 20-22 November 2002, Bangkok, Thailand

3.2. Invited lecture on recent advance in malarial parasite biochemistry, 15 June 2003, Department of Chemistry, Florence university, Italy,

3.3. The Sixth International Conference on the carbonic Anhydrases, 20-25 June 2003, Smolenice Castle, Slovakia.

4. Graduate students involving in the project (4 peoples)

4.1. Sudaratana R. Krungkrai

4.2. Chayaporn Wichitkul

4.3. Sayaka Aoki

4.4. Brian J. DelFraino

5. Oversea collaborators and investigators (3 groups)

5.1. Professor Toshihiro Horii, Osaka University, Japan

5.2. Professor Jeffrey A. Smiley, Youngtown State University, USA

5.3. Professor Claudiu Supuran, Florence University, Italy

Appendix

(ภาคผนวก)

1. บทความสำหรับการเผยแพร่

บทความสำหรับการเผยแพร่

โครงการเรื่อง"ชีวเคมีและอณูชีววิทยาของวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรียของคน"

ปัจจุบันมาลาเรียยังเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ ก่อให้เกิดอาการอย่างรุนแรงในคน และทำให้คนติดเชื้อทั่วโลกปีละถึง 500 ล้านคนและเสียชีวิตลงปีละ 1.5-2.7 ล้านคน การควบคุมโรคมาลาเรียทำได้ด้วยความยากลำบากขึ้นเนื่องจากมีการแพร่ระบาดของเชื้อที่ดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา ยาที่ใช้มักมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย การพัฒนาและการแพร่กระจายของยุงก้นปล่องที่ดื้อต่อยาฆ่าแมลง อีกทั้งยังไม่มีวัคซีนที่จะนำมาใช้ในการป้องกันโรคในขณะนี้ รวมทั้งการที่ยังไม่มีวัคซีนมาใช้ป้องกันโรค จึงเป็นสถานการณ์เร่งด่วนที่จะต้องพัฒนาการควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพ อาทิเช่น การพัฒนาวัคซีน การพัฒนายารักษามาลาเรียชนิดใหม่ๆ ขึ้นมาทดแทนให้ทันใช้โดยอาศัยตำแหน่งเป้าหมายที่ได้จากโครงการจีโนม และความรู้ที่สะสมต่อเนื่องกันมานานหลายสิบปี ถึงกระนั้นความรู้ทางชีวเคมีของเชื้อมาลาเรียยังไม่กระจ่างนัก โดยเฉพาะการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียของคน

องค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับชีวเคมีและอณูชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียจะเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการนำไปออกแบบและพัฒนายารักษามาลาเรียตัวใหม่ ในการศึกษาวิจัยของโครงการเรื่อง **"ชีวเคมีและอณูชีววิทยาของวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรียของคน"** จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อจะสร้างองค์ความรู้ดังกล่าว

เมื่อผู้ป่วยมาลาเรียมีการติดเชื้อเกิดขึ้น เชื้อมาลาเรียจะแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและเจริญเติบโตเพื่อให้มีชีวิตรอดอยู่ได้ในผู้ป่วย เชื้อมีความจำเป็นจะต้องสร้างสารพันธุกรรมขึ้นมาเพื่อการดังกล่าว สารตั้งต้นที่สำคัญตัวหนึ่งในการสร้างสารดังกล่าวคือเบสไพริมิดีน ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเป็นวงแหวนรูป 6 เหลี่ยม การสร้างเบสดังกล่าวต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโมเลกุลขนาดเล็ก อาทิเช่น คาร์บอนไดออกไซด์ อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต กรดอะมิโนกลูตามีนและแอสปาเตต จนได้เป็นโมเลกุลของไพริมิดีน อาศัยหลักฐานทางชีวเคมีที่ทำก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อมาลาเรียมีเอนไซม์ต่างๆในการสร้างไพริมิดีนดังกล่าว และเรียกว่า "วิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรีย" จึงได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับอณูชีววิทยาของจีนที่กำหนดเอนไซม์ลำดับที่ 1 ถึง 6 ในวิถีดังกล่าว พบว่าจีนในเชื้อมาลาเรียมีความแตกต่างไปจากเซลล์ของสัตว์ชั้นต่ำและชั้นสูง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และรวมทั้งของคนด้วย แต่มีความเหมือนกับจีนในเซลล์ของแบคทีเรียมากกว่า

ในชุดโครงการวิจัยนี้ได้สร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับชีวเคมีและอณูชีววิทยาของวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรียของคน ทำให้มีความเข้าใจอย่างถ่องแท้ถึงชีวเคมีและอณูชีววิทยาของเอนไซม์ลำดับที่ 5 และ 6 พร้อมกันทั้ง 2 ชนิดคือ ออโรเทท ฟอสโฟไรโบสีลทรานซ์เฟอเรส และ ออโรทิไดเลท ดีคาร์บอกซีลเลส โดยได้ทำการแยกเอนไซม์ทั้งสองออกมาได้อย่าง

บริสุทธิ์จากเชื้อมาลาเรียของคนที่เพาะเลี้ยงได้มากพอในห้องเพาะเชื้อ พบมีคุณสมบัติจำเพาะโดยเอนไซม์ทั้งสองมารวมอยู่ด้วยกันซึ่งแต่ละเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับที่ได้คาดการณ์ไว้ในฐานข้อมูลจีโนมของเชื้อ คุณสมบัติจำเพาะที่มารวมกันอยู่ของเอนไซม์ทั้งสองเป็นการค้นพบเป็นครั้งแรกของเอนไซม์สองชนิดนี้ในเชื้อมาลาเรีย และไม่มีรายงานการค้นพบคุณลักษณะแบบนี้ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ คุณสมบัติอื่นๆ อาทิเช่น ค่าจลนศาสตร์แสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์ การใช้ตัวยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์ทั้งสอง รวมทั้งได้ศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ของคนที่มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้แล้ว พบว่าคุณสมบัติเหล่านี้มีความแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ในเชื้อมาลาเรียและในคนอย่างสิ้นเชิง

ได้ทำการโคลนจีนที่กำหนดเอนไซม์ทั้งสองจากเชื้อมาลาเรียของคน แล้วจึงนำไปแสดงออกของจีนในแบคทีเรียอีโคไล การแยกเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ให้บริสุทธิ์ เอนไซม์ที่ได้ทำงานมีประสิทธิภาพสูง จึงศึกษาคุณสมบัติอย่างละเอียดทั้งในแง่จลนศาสตร์ กลไกการเร่งปฏิกิริยา รวมทั้งการใช้สารยับยั้งเอนไซม์ รวมทั้งนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดมารวมกันในหลอดทดลองโดยสภาพจำลองให้เหมือนกับเอนไซม์อยู่ในตัวเชื้อมาลาเรีย พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมารวมกันได้และเกิดประสิทธิภาพของการเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์แต่ละชนิดที่ไม่ได้นำมารวมกัน และผลการรวมกันได้คุณสมบัติของเอนไซม์เหมือนกับที่ศึกษาที่แยกได้โดยตรงจากตัวเชื้อมาลาเรีย ได้วิเคราะห์จลนศาสตร์ของการรวมกันของเอนไซม์ทั้งสอง พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดจะรวมกันเองก่อนเป็นคู่ แล้วนำคู่ของเอนไซม์ทั้งสองมารวมกันอย่างละคู่ ได้ผลเป็นเอนไซม์คู่ผสม นอกจากนี้ตัวยับยั้งยังจับเอนไซม์คู่ผสมได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่แยกกันอยู่ ยิ่งกว่านั้นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียของคนได้ดีอีกด้วย

ได้เสนอว่าเอนไซม์ที่ศึกษาทั้งสองชนิดอาจจะเป็นตำแหน่งเป้าหมายใหม่ในการพัฒนายารักษามาลาเรีย และควรศึกษาเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารไพริมิดีนให้ครบทั้งระดับจีนและโปรตีนเหล่านี้เพื่อสร้างองค์ความรู้นำไปใช้ออกแบบและพัฒนายารักษามาลาเรียตัวใหม่โดยมีตำแหน่งเป้าหมายที่การสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรีย คุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์ในเชื้อมาลาเรียน่าจะมีความสำคัญในแง่การเกิดวิวัฒนาการของเอนไซม์ทั้งสองที่พบในเซลล์ของสัตว์ชั้นต่ำและชั้นสูง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้งของคนด้วย นอกจากนี้ความสำคัญในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองในวิถีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีน คงต้องศึกษาวิจัยต่อไป

ผลงานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจาก สกว. ในโครงการวิจัยชุดนี้ ได้รับการตีพิมพ์จำนวน 4 บทความในวารสารนานาชาติ ดังนี้: วารสาร Biochemistry ปี 2005 มี impact factor = 4.008, วารสาร Molecular and Biochemical Parasitology ปี 2004 มี impact factor = 2.803, วารสาร Biochemical and Biophysical Research Communications ปี 2004 มี impact factor = 2.904; วารสาร Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health ปี 2003 ได้รับเชิญไปบรรยายเกี่ยวกับผลงานวิจัยดังกล่าวจำนวน 3 ครั้ง มีผลงานวิจัยที่ทำร่วมกับนักวิจัยต่างชาติ 2-3 กลุ่ม และการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโทและเอก 3-4 คนรวมทั้งชาวต่างชาติด้วย

Appendix

(ภาคผนวก)

2. Reprints of four publications

1. Krungkrai, S.R., DelFraino, B. J., Smiley, J.A., Prapunwattana, P., Mitamura, M., Horii, T., and Krungkrai, J. (2005) A novel enzyme complex of orotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase in human malaria parasite Plasmodium falciparum: physical association, kinetics and inhibition characterization. Biochemistry 44, 1643-1652. (Impact factor = 4.008)

2. Krungkrai, S.R., Aoki, S., Palacpac, N.M.Q., Sato, D., Mitamura, T., Krungkrai, J., and Horii, T. (2004) Human malaria parasite orotate phosphoribosyltransferase: functional expression, characterization of kinetic reaction mechanism and inhibition profile. Molecular Biochemical and Parasitology 134, 245-255. (Impact factor = 2.803)

3. Krungkrai, S.R., Prapunwattana, P., Horii, T., and Krungkrai, J. (2004) Orotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase exist as multienzyme complex in human malaria parasite Plasmodium falciparum. Biochemical and Biophysical Research Communications 318, 1012-1018. (Impact factor = 2.904)

4. Krungkrai, J., Prapunwattana, P., Wichitkul, C., Reungprapavut, S., Krungkrai, S.R., and Horii, T. (2003) Molecular biology and biochemistry of malarial parasite pyrimidine biosynthetic pathway. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 34 (Suppl 2), 32-43.