

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BRG4880006

ชื่อโครงการ: เอนไซม์ของวิธีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนเป็นตำแหน่งเป้าหมายของการพัฒนายาในเชื้อมาลาเรียของคน

ชื่อนักวิจัย: ศาสตราจารย์ ดร. จิระพันธ์ กริ่งไกร

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail address: fmedjkk@md.chulalong.ac.th, jerapan.k@gmail.com.

ระยะเวลาโครงการ: 28 กรกฎาคม 2548 – 27 กรกฎาคม 2551

โครงการวิจัย:

โครงการวิจัยนี้ต้องการสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับวิธีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรียของคนให้มีความเข้าใจอย่างถ่องแท้ และใช้เป็นตำแหน่งเป้าหมายของการพัฒนายารักษาต่อไป จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงว่าการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมมีความแตกต่างระหว่างเชื้อมาลาเรียและของคน ดังนั้นถ้ายับยั้งการทำงานของวิธีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรียได้ จะต้านการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย สามารถนำสารยับยั้งดังกล่าวมาสู่การพัฒนาการรักษาโรคมาลาเรียชนิดใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังนี้ (1) ได้สร้างความรู้เกี่ยวกับชีวเคมีและอนุชีววิทยา ของคุณลักษณะวิธีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรียของคน ที่เกี่ยวกับไดไฮโดรออโรเทท (DHO) เอนไซม์ตัวที่สามของวิถี และ (2) มีความเข้าใจอย่างถ่องแท้ถึงโครงสร้างเอนไซม์ 2 ชนิดคือ ออโรเทท ฟอสโฟไรโบซิลทรานซ์เฟอเรส (OPRT) และ ออโรทีไดเลท ดีคาร์บอกซิลเลส (OMPDC) เอนไซม์ตัวที่ห้าและหกของวิธีการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในเชื้อมาลาเรีย โดยมีเป้าหมายในการได้มาซึ่งโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่ศึกษาอยู่เป็นตำแหน่งเป้าหมายใหม่ในการออกแบบและพัฒนายารักษาโรคมาลาเรีย

ผลการวิจัยที่ได้จากโครงการในระยะเวลา 3 ปีที่ผ่านมา โดยครอบคลุมวัตถุประสงค์ข้างต้น สรุปได้ดังนี้

1. ได้ทำการแยกเอนไซม์ DHO ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน carbamoyl aspartate ไปเป็น dihydrorotate ได้อย่างบริสุทธิ์จากเชื้อมาลาเรียของคนทีเพาะเลี้ยงได้มากพอในห้องทดลอง และได้ทำการโคลนยีน DHO ซึ่งพบว่าอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 14 แล้วนำไปแสดงออกของยีนนี้ในแบคทีเรียอีโคไล ทำการแยกเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ให้บริสุทธิ์และมีการทำงานได้ประสิทธิภาพสูง เอนไซม์ที่เตรียมได้ทั้งจากเชื้อมาลาเรียและรีคอมบิแนนท์ข้างต้นแสดงคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาแบบโมเลกุลเชิงเดี่ยวได้เหมือนกับคุณสมบัติของเอนไซม์แบบที่ 2 ที่มีผู้ศึกษามาก่อน และยังคงแสดงคุณสมบัติทั้งในแง่จลนศาสตร์และผลการใช้สาร

ยับยั้งเอนไซม์ เช่น orotate และอนุพันธ์ของมันเหมือนกับคุณสมบัติของเอนไซม์แบบที่ 1 ที่พบได้ในเอนไซม์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงรวมทั้งของคนด้วย ผลการวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์และเก็บข้อมูลไว้ในฐานข้อมูลสากล

2. ได้ทำการโคลนยีนส์ OPRT และ OMPDC จากเชื้อมาลาเรียของคน ซึ่ง OPRT เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน orotate และ 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate ไปเป็น orotidine 5'-monophosphate (OMP) และ OMPDC เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน OMP ไปเป็น uridine 5'-monophosphate (UMP) แล้วนำไปแสดงออกของยีนส์ทั้งสองในแบคทีเรียอีโคไล ทำการแยกเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ทั้งสองให้บริสุทธิ์ เอนไซม์ที่ได้ทำงานมีประสิทธิภาพสูง ได้ศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ของคนที่มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้แล้วพบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์นี้ในเชื้อมาลาเรียและในคนอย่างสิ้นเชิง จากนั้นนำเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ *Pf*OMPDC ที่บริสุทธิ์สูงและมีปริมาณมากพอไปทำให้เกิดผลึกโดยอาศัยสาร polyethylene glycol เป็นตัวตกผลึก นำผลึกที่ได้ไปทำให้เกิดการหักเหของ X-ray โดยใช้เครื่อง synchrotron ที่กำลังขยาย 2.7 อังสตรอม สมมาตรของผลึกเป็น trigonal และ R3 space group ผลการวิจัยนี้มีการร่วมมือกับ Professor T. Horii และคณะ แห่ง Osaka University และได้รับการตีพิมพ์

3. ได้ทำการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ *Pf*OMPDC ในรูปแบบของเอนไซม์อิสระ ของเอนไซม์ที่มี substrate OMP จับอยู่ และของเอนไซม์ที่มี product UMP จับอยู่แทน OMP โดยการนำผลึกของเอนไซม์ทั้ง 3 รูปแบบข้างต้นที่ได้ ไปใช้เครื่อง synchrotron ที่ Spring-8 Japan ที่กำลังขยายขนาด 2.7, 2.65 และ 2.6 อังสตรอมตามลำดับ โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่ได้ ทำให้ทราบกลไกการเร่งปฏิกิริยาเริ่มตั้งแต่การที่ substrate OMP จับกับ active site มีการจัดเรียงใหม่ของ hydrogen network มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ และการกำจัดหมู่คาร์บอกซิลออกจาก OMP ให้ได้ UMP ในที่สุด โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่ได้นำไปเป็นตำแหน่งเป้าหมายใหม่ในการใช้ออกแบบและการพัฒนายารักษามาลาเรีย ซึ่งกลุ่มของเราเป็นกลุ่มแรกที่ได้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ OMPDC จากเชื้อมาลาเรียของคนชนิดพัลซิพาร์ม ผลการวิจัยนี้มีการร่วมมือกับ Professor T. Horii และคณะ แห่ง Osaka University และได้รับการตีพิมพ์และเก็บข้อมูลโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ทั้ง 3 รูปแบบไว้ในฐานข้อมูลสากล

4. ได้ทำการโคลนยีนส์ OPRT และ OMPDC ที่ถูกตัดด้านปลายอะมิโนให้สั้นลงจากเชื้อมาลาเรียของคน ซึ่งทั้ง OPRT และ OMPDC ของเชื้อมีขนาดใหญ่กว่าเอนไซม์เดียวกันที่อยู่ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงรวมทั้งของคนโดยพบว่าที่ด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์จากเชื้อมีจำนวนกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น แล้วนำไปแสดงออกของยีนส์ที่สั้นลงทั้งสองในแบคทีเรียอีโคไล ซึ่งยีน truncated mutant OPRT เท่านั้นที่มีการแสดงออกและในปริมาณที่ต่ำมาก แต่ก็ทำ การแยกเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ mutant OPRT ออกมาได้และมีความเสถียรและมี

ประสิทธิภาพที่ไม่ดีเมื่อเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ที่เป็น wild type OPRT ที่ได้จากข้อ 2 งานวิจัยส่วนนี้จะมีการดำเนินต่อไปโดยเป็นวิทยานิพนธ์ของนิสิตระดับปริญญาเอก 2 คน

ผลงานวิจัยของโครงการนี้ในช่วงเวลา 3 ปีที่ได้รับทุนสนับสนุน มีการผลิตปริญญาโท-เอก มีการเสนอผลงาน มีการร่วมมือกับต่างประเทศ มีการเก็บข้อมูลยีนและข้อมูลโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไว้ในฐานข้อมูลสากล มีผลงานวิจัยจากโครงการโดยตรงได้รับการตีพิมพ์จำนวน 4 เรื่อง (1-4) และจากโครงการทางอ้อมอีก 4 เรื่อง (5-8) ดังนี้

1) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase from the human parasite *Plasmodium falciparum*. *Acta Crystallographica* **F62**, 542-545 (2006)

2) Structural basis for the decarboxylation of orotidine 5'-monophosphate (OMP) by *Plasmodium falciparum* OMP decarboxylase. *Journal of Biochemistry* **143**, 69-78 (2008)

3) Dihydroorotase of human malarial parasite *Plasmodium falciparum* differs from host enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **366**, 821-826 (2008)

4) Malaria parasite: genomics, biochemistry and drug target for antimalarial development. *Chulalongkorn Medical Journal* **50**, 127-142 (2006)

5) Malarial parasite carbonic anhydrase and its inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **7**, 909-917 (2007)

6) The alpha-carbonic anhydrase from the malarial parasite and its inhibition. *Current Pharmaceutical Design* **14**, 631-640 (2008)

7) Putative metabolic roles of the mitochondria in asexual blood stages and gametocytes of the malaria parasite. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **1**, 31-49 (2008)

8) Biochemistry research in Thailand: present status and foresight studies. *ScienceAsia* **34**, 1-6 (2008)

Abstract

Project Code: BRG4880006

Project Title: Pyrimidine Biosynthetic Enzymes as Drug Target in Human Malaria Parasite

Investigator: Prof. Dr.Jerapan Krungkrai, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Rd., Pathumwan, Bangkok, Thailand.

E-mail Address: fmedjkk@md.ac.th.,jerapan.k@gmail.com.

Project Period: 28 July 2005–27 July 2008

Project Description:

This project is performed to better understanding of *P. falciparum* metabolic pathway with the goal of illuminating new chemotherapeutic targets for drug development. Since *P. falciparum* is totally dependent on *de novo* synthesis of pyrimidine nucleotides from small precursors, and differs from its human host, having both the *de novo* and salvage pathways. Thus, interference of this unique pathway in *P. falciparum* will result in an effective mean to control the disease.

The specific objectives of the project (TRF supported) are: (1) to conduct molecular and biochemical characterization of the third enzyme of the pathway, namely, dihydroorotase (DHO), catalyzing formation of dihydroorotate from carbamoyl aspartate, and (2) to characterize structural, kinetic, and functional properties of the recombinant orotate phosphoribosyltransferase (OPRT, reaction: [orotate + 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) $\rightarrow$ orotidine 5'-monophosphate (OMP) + PP_i]), and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (OMPDC, reaction: [OMP $\rightarrow$ uridine 5'-monophosphate (UMP)]), the fifth and sixth enzymes of the pyrimidine pathway in human malarial parasite, *P. falciparum*. One of our ultimate goal for the ongoing project in my laboratory is structure-based design of antimalarial drug development based on the known 3-dimensional structure of the enzymes.

In the 3-year project, we have the following results to fulfill our objectives:

1. The enzyme DHO has been purified from *P. falciparum* obtained from *in vitro* cultivation, and the gene encoding *P. falciparum* DHO (*PfDHO*) has been identified and located on chromosome 14, cloned, sequenced and functionally expressed as soluble protein in *Escherichia coli*. Both native and recombinant *PfDHO*, exhibiting a monofunctional enzyme similarly to type II DHO, are shared kinetic properties and inhibitory effects by orotate and its 5-substituted

derivatives similarly to type I DHO which is found in higher organisms like human enzyme. The results were published in *Biochem. Biophys. Res. Commun.* vol. 366, pp. 821-826 (2008). The nucleotide sequence of the gene *PfDHO* was deposited in GenBank/EMBL/DDBJ databases with accession number AB373011.

2. Genes encoding *P. falciparum* OPRT (*PfOPRT*) and *P. falciparum* OMPDC (*PfOMPDC*) were functionally expressed in *E. coli*. The recombinant *PfOMPDC* has been purified homogeneity in a large amount and then crystallized by the seeding method in the hanging drop using polyethylene glycol as the precipitant. The complete set of X-ray diffraction data from the crystal was collected to 2.7 Å resolution at 100 K using synchrotron radiation. The crystal exhibits trigonal symmetry (space group *R*3). This work was cooperated with Prof T. Horii at Osaka University, Japan. The results were published in *Acta Crystallogr.* vol. F62, pp. 542-545 (2006).

3. The crystal structures were analyzed from the X-ray diffraction and data collected at SPring-8 Japan, and the works have been collaborated with Osaka University. The X-ray analysis of apo, substrate OMP or product UMP-complex form of *PfOMPDC* at 2.7, 2.65 and 2.6 Å, respectively. Our results provide insight into the substrate recognition mechanism with dynamic structural changes and the rearrangement of the hydrogen network at the active site of the enzyme. The structural basis for the 3-dimensional structure of substrate or product binding to *PfOMPDC* will help to uncover the decarboxylation mechanism and facilitate structure-based optimization of new antimalarial drugs. We were the first group in the world to discover this. We had one publication for the crystal structure works which was published in *J. Biochem.* vol.143, pp. 69-78 (2008). The three crystal structures complexed with substrate or product or uncomplexed forms were deposited in ProteinDataBank with the PDB entries ID: 2ZA1, 2ZA2 and 2ZA3.

4. Lastly, since both *PfOPRT* and *PfOMPDC* malarial proteins contain long N-terminal extension that the unique properties have never been found in these two enzymes of other organisms, constructions of N-terminally truncated *PfOPRT* and *PfOMPDC* enzymes were then performed by our two PhD graduates. The N-terminally truncated *PfOPRT* was produced as the mutant enzymes, however, its very low yield was obtained. The truncated mutant *PfOMPDC* was not expressed in *E. coli*. Our preliminary study suggests that the truncated *PfOPRT* mutant enzyme is less active and stable than the wild type *PfOPRT*. Further characterization of the mutant enzymes will be studied in

details. This part will be the PhD thesis of these students in the coming years.

In the 3-year project, we have outputs for our activities as follows:

a) There are four publications:

1. Krungkrai S.R., Kusakari, Y., Tokuoka, K., Inoue, T., Adachi, H., Matsumura, H., Takano, K., Murakami, S., Mori, Y., Kai, Y., Krungkrai, J., and Horii, T. (2006) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase from the human parasite *Plasmodium falciparum*. *Acta Crystallographica* **F62**, 542-545.

2. Tokuoka K., Kusakari Y., Krungkrai S.R., Matsumura H., Kai Y., Krungkrai J., Horii T., Inoue T. (2008) Structural basis for the decarboxylation of orotidine 5'-monophosphate (OMP) by *Plasmodium falciparum* OMP decarboxylase. *Journal of Biochemistry* **143**, 69-78.

3. Krungkrai, S.R., Wutipraditkul, N., and Krungkrai, J. (2008) Dihydroorotase of human malarial parasite *Plasmodium falciparum* differs from host enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **366**, 821-826.

4. Krungkrai, J., and Krungkrai, S. (2006) Malaria parasite: genomics, biochemistry and drug target for antimalarial development. *Chulalongkorn Medical Journal* **50**, 127-142.

b) Graduation:

One MSc student was graduated, two PhD students are being trained.

c) Presentation:

There was a poster presentation in "The second Thailand-Japan joint forum on infectious diseases" with topic entitled: "Functional characterization of *Plasmodium falciparum* pyrimidine enzymes orotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase".

d) Collaboration:

We have solid collaborations with expert groups in Osaka University (Japan) and University of Florence (Italy).

e) There are four publications related to the ongoing project:

1) Krungkrai, J., Krungkrai, S.R., and Supuran, C.T. (2007) Malarial parasite carbonic anhydrase and its inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **7**, 909-917.

2) Krungkrai, J., and Supuran, C.T. (2008) The alpha-carbonic anhydrase from the malarial parasite and its inhibition. *Current Pharmaceutical Design* **14**, 631-640.

3) Krungkrai, J., Kanchanaphum, P., Pongsabut, S., and Krungkrai, S.R. (2008) Putative metabolic roles of the mitochondria in asexual blood stages and gametocytes of the malaria parasite. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **1**, 31-49.

4) Krungkrai, J., Incharoensakdi, A., and Tungpradabkul, S. (2008) Biochemistry research in Thailand: present status and foresight studies. *ScienceAsia* **34**, 1-6.