



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษากลุ่มยาที่มีผลยับยั้งโดยตรงต่อเอนไซม์
คาร์บอนิก แอนไฮเดรสของเชื้อมาเลเรีย

โดย ดร. สุรารัตน์ เรืองประภาวุฒิ

กรกฎาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษากลุ่มยาที่มีผลยับยั้งโดยตรงต่อเอนไซม์
คาร์โบนิค แอนไฮเดรสของเชื้อมาเลเรีย

ผู้วิจัย ดร. สุรารัตน์ เรืองประภาวดี

หมวดวิชาชีวเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการศึกษากลุ่มยาที่มีผลยับยั้งโดยตรงต่อเอนไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรซของเชื้อมาเลเรีย ได้ดำเนินการมาตลอดเวลา 2 ปี ภายใต้การดูแลของ ศ.ดร. จิระพันธ์ กริ่งไกร ในฐานะนักวิจัยพี่เลี้ยง ดิฉันขอขอบพระคุณ ศ.ดร. จิระพันธ์ กริ่งไกร เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ ให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน รวมทั้งเอาใจใส่ดูแลในระหว่างการทำวิจัยอย่างดี จึงทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ดิฉันขอขอบพระคุณ ดร.สุภารัตน์ กริ่งไกร ที่ได้ให้คำแนะนำพร้อมทั้งเวลาสอนเทคนิคต่างๆ ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ดิฉันขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกในระหว่างการใช้ห้องปฏิบัติการวิจัย

ดิฉันขอขอบคุณมหาวิทยาลัยรังสิตที่เปิดโอกาสและให้การสนับสนุนการทำงานวิจัยครั้งนี้

ท้ายสุดนี้ดิฉันขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ดิฉันหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะได้มีโอกาสได้รับการสนับสนุนจากทุกท่านที่กล่าวมาในโอกาสต่อไป

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ หมายเลข MRG4880092
ชื่อโครงการ การศึกษากลุ่มยาที่มีผลยับยั้งโดยตรงต่อเอนไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรสของเชื้อ
 มาเลเรีย
ชื่อนักวิจัย ดร. สุธารทิพย์ เรืองประภาวุฒิ หมวดวิชาชีวเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์
 การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
E-mail address: sutarnthip@hotmail.com
ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

จากการสืบค้นหายีนคาร์โบนิค แอนไฮเดรส (CA) สายยาวของของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (PfCA 2) ในฐานข้อมูลมาเลเรีย โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับเบสของยีน PfCA 2 อยู่บนโครโมโซมที่ 11 เมื่อเพิ่มปริมาณยีนจาก gDNA โดยวิธี PCR พบมีความยาว ~1.25 กิโลเบส และทำการโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิด pTOPO รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีน CA ของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA2) ใน *Escherichia coli* *E. coli* (Top10 strain) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PfCA 2 เหมือนกับในฐานข้อมูล GeneBank มีจำนวนกรดอะมิโน 418 ตัว เอนไซม์ที่สกัดได้จาก recombinant PfCA มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 ± 1 กิโลดัลตันเมื่อนำมาแยกโดยวิธี SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) และสามารถตรวจสอบโปรตีนโดยอาศัย Western blot โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์น้อยแต่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในภาวะที่มี Zn^{2+} และถูกยับยั้งได้โดย acetazolamide เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีน PfCA 2 โดยอาศัยพลาสมิด pET 160/GW/D-TOPO ใน *E. coli* (BL21 strain) แต่พบว่าโปรตีนที่ได้ยังมีปริมาณและความบริสุทธิ์น้อย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการแสดงออกของยีน PfCA 2 ที่เหมาะสมต่อไปเพื่อให้ได้โปรตีนในปริมาณที่มากเพียงพอต่อการนำไปศึกษาหาความสามารถในการทดสอบฤทธิ์ของยาในกลุ่ม aromatic sulfonamides เพื่อใช้เป็นแนวทางในการค้นหาตัวใหม่ในการรักษาโรคมาเลเรียให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด

Keywords : Malaria, *Plasmodium falciparum*, Drug target, Carbonic anhydrase, Acetazolamide

Abstract

Project code : MRG4880092
Project Title : Malarial carbonic anhydrase as drug target
Investigator : Sutarnthip Ruengprapavut, Unit of Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Paholyothin Rd., Patumthani 12000; Thailand.
E-mail address: sutarnthip@hotmail.com
Project Period: 2 years

The full-length of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase (PfCA 2) gene, located on chromosome 11 of *P. falciparum*, was amplified by using PCR from genomic DNA. The PfCA 2 amplified fragment was ~1.25 kb in length and then cloned into pTOPO expression vector in *Escherichia coli* (Top10 strain). The nucleotide sequence of PfCA 2 gene is identical to the nucleotide sequence in the genome of *P. falciparum* in GeneBank database. The single ORF encoded 418 amino acid residues for PfCA 2. The recombinant protein, containing N-terminal hexahistidine tag, in the IPTG-induced *Escherichia coli* supernatant was purified by using Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid agarose-affinity chromatographic column. The enzyme had a molecular mass of $\sim 45 \pm 1$ kDa as assessed by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) and it was also confirmed by Western blot using anti-His antibody. These results suggest that the recombinant enzyme obtained in this study was the full-length of *P. falciparum* carbonic anhydrase (PfCA 2). The recombinant protein preparation was not pure and displayed an active enzyme in the presence of Zn^{2+} . The enzyme activity was inhibited by acetazolamide, a known inhibitor. In order to increase the amounts of recombinant protein, the other expression system was tried, by cloning PfCA 2 gene into pET 160/GW/D-TOPO expression vector in *E. coli* (BL21 strain). However the yield and purity of recombinant protein from the latest system showed the same as former system. Therefore the suitable expression systems for producing higher expression level of recombinant enzyme must be tried further.

Keywords- Malaria, *Plasmodium falciparum*, Drug target, carbonic anhydrase

เนื้อหาทางวิจัย

บทนำ

การดื้อยาของเชื้อมาเลเรียโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดความรุนแรงต่อมนุษย์มากที่สุด คือ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขทั่วโลกโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา โดยจะสังเกตได้จากการที่ยังคงมีอัตราการตายจากโรคมาเลเรียในแต่ละปีสูงถึง 2.5 ล้านคนและพบมากในเด็ก ๆ แถบทวีปแอฟริกา ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนหรือยาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมาเลเรียที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จึงได้มีความพยายามอย่างมากในการค้นหาและพัฒนาตัวยาใหม่ ๆ เพื่อใช้เป็นยาเป้าหมายและให้เกิดผลในการรักษาโรคมาเลเรียให้มากที่สุด โดยเฉพาะยาที่ออกฤทธิ์โดยตรงต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของเชื้อมาเลเรีย จากการศึกษาของทีมงานวิจัย (Krungkrai et al. 2001) ได้ค้นพบว่าเอนไซม์คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) ในเชื้อ *P. falciparum* มีบทบาทและความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการดำรงชีพของเชื้อ *P. falciparum* และมีคุณลักษณะทางชีวเคมีที่มีลักษณะจำเพาะและแตกต่างจากเอนไซม์คาร์บอนิก แอนไฮเดรส ที่พบในมนุษย์ นอกจากนั้นตัวยับยั้งของเอนไซม์ยังมีผลในการขัดขวางการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* ในจานทดลอง (*in vitro*) และพบเอนไซม์คาร์บอนิก แอนไฮเดรส อย่างน้อย 3 ไอโซไซม์ในเชื้อ *P. falciparum* ต่อมาทีมงานวิจัย (Ruengprapavut et al. 2004) ได้ทำการสืบหายีนและทำการโคลนยีนพร้อมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีนคาร์บอนิก แอนไฮเดรสในเชื้อ *P. falciparum* สายสั้นเรียกว่า PfCA I พบว่าลำดับเบสของยีน PfCA I สายสั้นมีความเหมือนกันกับ carbonic anhydrase (CA) ใน *Plasmodium yoelii* และใน Human CA และจัดอยู่ในกลุ่มอัลฟา (α) โดยมีจำนวนกรดอะมิโน 235 ตัวและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.7 กิโลดัลตัน เอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ นอกจากนั้นยาในกลุ่ม acetazolamide และ sulfanilamide มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PfCA I รวมทั้งได้มีศึกษาถึงผลของการยับยั้งเอนไซม์ PfCA I โดยยาในกลุ่ม aromatic sulfanamides (Krungkrai et al. 2004) และผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* พบว่ามียาหลายตัวในกลุ่มนี้มีผลยับยั้งการทำงานของ PfCA I (ค่า K_i อยู่ในช่วง 0.080-1.230 μM) โดยตัวที่มีผลยับยั้งเอนไซม์มากที่สุด ได้แก่ 4-(3,4-dichlorophenylureido-ethyl)-benzenesulfonamide มีค่า K_i 80 nM เนื่องจากยาดังนี้มีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมันจึงมีผลยับยั้งวงจรการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* ด้วย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2 μM ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์คาร์บอนิก แอนไฮเดรส น่าจะมีผลต่อการสังเคราะห์พรีมิดีนในเชื้อ *P. falciparum* แต่จะไม่มีผลต่อมนุษย์ ดังนั้นการศึกษาหาตัวใหม่ในกลุ่ม aromatic sulfanamides และสืบหายีนตัวใหม่ของ PfCA สายยาวหรือ PfCA 2 เพื่อศึกษาถึงความจำเพาะและผลในการยับยั้งของยาในกลุ่มนี้ที่มีต่อเอนไซม์คาร์บอนิก แอนไฮเดรสที่ได้จากทั้ง PfCA I และ PfCA 2 และทำให้เกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุดจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นเร่งด่วน เพื่อเป็นแนวทางในการค้นหาและพัฒนายาเป้าหมายสำหรับใช้รักษาโรคมาเลเรียให้ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด นอกจากนี้ต้นทุนในการผลิตยาในกลุ่มนี้ยังต่ำจึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะค้นคว้าและพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในกลุ่มประเทศที่ยากจน

วิธีการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาไปที่ยีนของ carbonic anhydrase (CA) สายยาวของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA 2) โดยการค้นหายีนและศึกษาการแสดงออกใน *E. Coli* เพื่อให้ได้เอ็นไซม์ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อนำไปศึกษาและค้นหาตัวยับยั้งของเอ็นไซม์ในกลุ่ม aromatic sulfanamides เพื่อใช้เป็นยาเป้าหมายในการรักษาโรคมาเลเรียต่อไป และมีขั้นตอนในการดำเนินงานดังต่อไปนี้

1. สืบหายีน carbonic anhydrase สายยาวของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA 2) ในฐานข้อมูลของมาเลเรีย โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul et al. 1990) ออกแบบ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนในจีโนม (genomic DNA) เพื่อให้ได้ยีน PfCA 2 ที่มีความยาวมากที่สุดโดยวิธี PCR (polymerase chain reaction)

2. ยีน PfCA 2 ที่ได้จากการทำ PCR จากข้อ 1 (full-length PfCA2) จะนำไปหาลำดับเบสและถูกนำไปโคลนในพลาสมิดที่มีลำดับของฮิสทีดีนติดอยู่ (His-tagged sequence) เช่น pTOPO เพื่อให้ง่ายต่อการทำให้เอ็นไซม์บริสุทธิ์ เมื่อทราบลำดับเบสของ PfCA 2 รวมทั้งลำดับของกรดอะมิโนแล้วนำไปเปรียบเทียบกับความเหมือน (homology) กับ CA ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

3. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ในปริมาณ 10-30 มิลลิกรัม เช่น ดูเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำของ IPTG (time for IPTG induction) หาปริมาณที่เหมาะสมของ IPTG ในการเหนี่ยวนำ หรือศึกษาหาอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในระหว่างการเหนี่ยวนำเป็นต้น จากขั้นตอนทั้งหมดที่กล่าวมานี้คาดว่าจะการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จะได้โปรตีนลูกผสมออกมาประมาณ 2-5 มิลลิกรัม

4. นำโปรตีนที่ได้จากข้อ 3 ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีโครมาโตกราฟีโดยใช้ affinity chromatography (Chirica et al. 2001) เรียกเอ็นไซม์ที่สกัดจากวิธีนี้ว่า recombinant PfCA 2 และนำไปศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Krungkrai et al. 2001) รวมถึงการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีทั่วไป เช่น ศึกษาทางจลนศาสตร์เพื่อหาค่า K_m K_i เป็นต้น และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับเอ็นไซม์ PfCA 1 และเอ็นไซม์ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงในจานทดลอง (*in vitro*)

5. ศึกษารูปแบบ (model) และโครงสร้างของเอ็นไซม์ CA ในรูปที่อิสระ (free) และรูปที่จับกันเป็นคอมเพล็กซ์ (complexed) กับตัวยับยั้งในกลุ่ม aromatic sulfonamides ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของ Professor Dr. Supuran, C.T. และ Professor Dr. Scozzafava, A. โดยใช้ structure-activity relationship (SAR)

6. ศึกษาผลของยาในกลุ่ม aromatic sulfonamides ในการยับยั้งเอ็นไซม์ PfCA 2 และ PfCA 1

7. ศึกษาผลของยาในกลุ่ม aromatic sulfonamides ที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Plasmodium falciparum*

ผลการทดลอง

1. สืบหายีน **carbonic anhydrase** สายยาวของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA 2) และเพิ่มจำนวนยีนโดยใช้วิธี **PCR** (polymerase chain reaction) วิธีที่ 1

1.1 จากการสืบค้นหายีนคาร์บอนิก แอนไฮเดรส (CA) สายยาวของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในฐานข้อมูลมาเลเรีย โดยใช้โปรแกรม BLAST พบ open reading frame อยู่บนโครโมโซมที่ 11 พบจำนวนกรดอะมิโน 418 ตัว และได้ออกแบบ primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

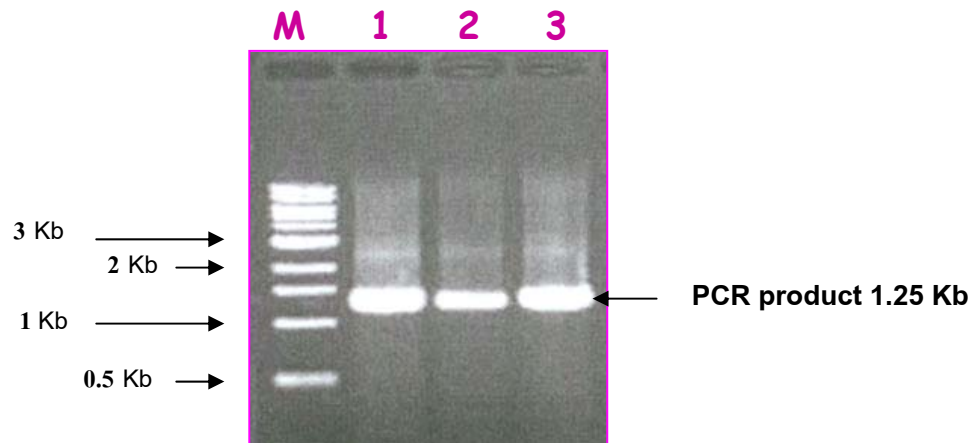
forward primer ได้แก่

5' CGCGGATCCATGCTTGAAATGATAGATAAATAT 3' จำนวน 33 mers

ส่วน reverse primer ได้แก่

5' CCCAAGCTTTTATTTATTACCTGAGCCGACGTG 3' จำนวน 33 mers

พร้อมกับได้ใส่ตำแหน่งที่สามารถตัดได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* (แสดงด้วยตัวอักษรตัวหนา) และนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน PfCA 2 โดยอาศัย genomic DNA (gDNA) เพื่อให้ได้ยีน PfCA 2 ที่มีความยาวมากที่สุดโดยใช้วิธี PCR ผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนโดย PCR ได้แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ผลการเพิ่มจำนวนยีน PfCA 2 ที่ได้จากการทำ PCR และนำมาแยกโดย 1% agarose electrophoresis

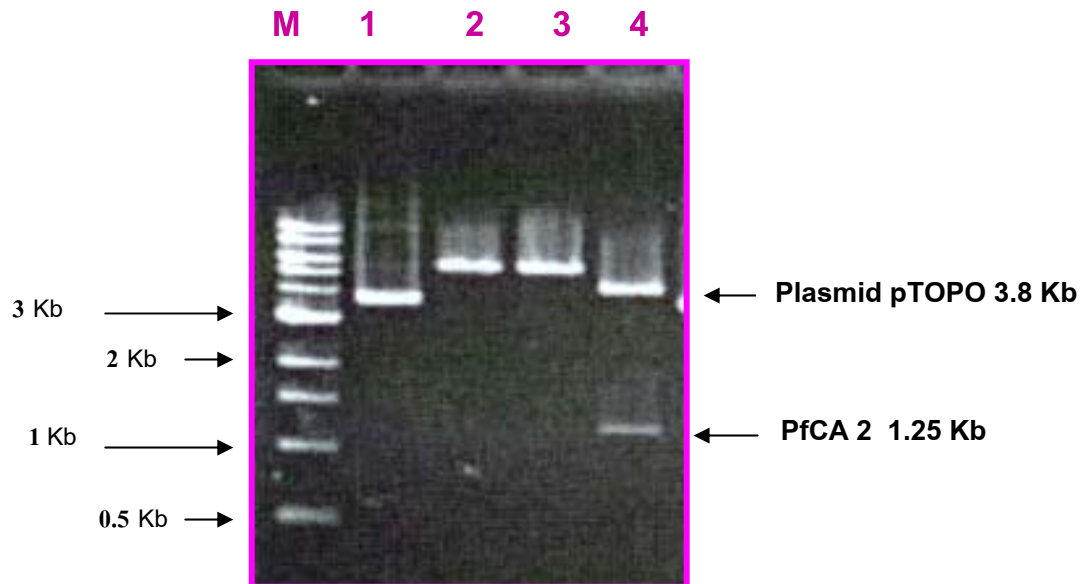
Lane M standard DNA ladder ขนาด 1Kb

Lane 1-3 ยีน PfCA 2 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนทำ PCR

พบว่าตำแหน่งของยีน PfCA 2 จะมีขนาด 1.25 Kb ดังแสดงใน Lane ที่ 1-3 เมื่อเทียบกับค่าดีเอ็นเอมาตรฐาน ใน Lane M

1.2 Cloning และ Plasmid Extraction

ต่อมาได้นำชิ้น DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยอาศัย PCR ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTOPO และนำพลาสมิดที่ได้หรือพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Top10 strain) และคัดเลือก cloned cells มาทดสอบดูพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* แล้วนำมาแยกด้วย electrophoresis ซึ่งผลที่ได้แสดงในรูปที่ 2

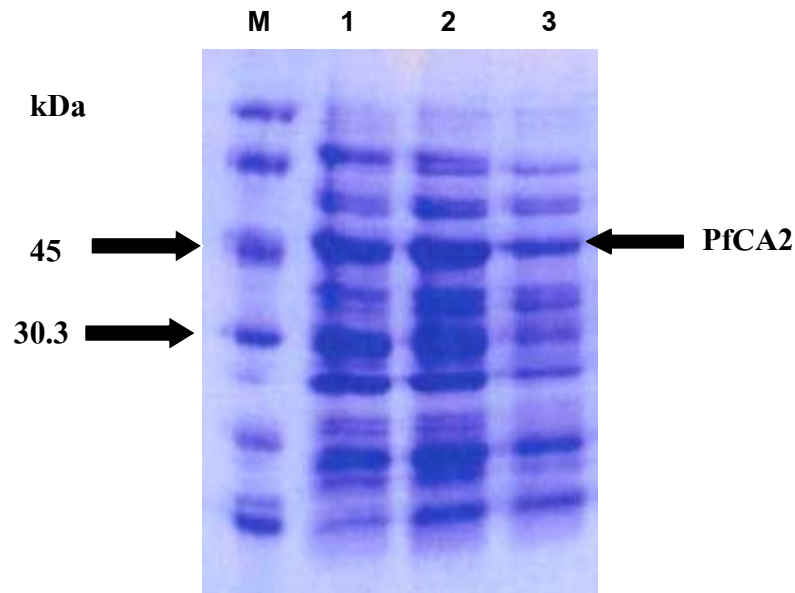


รูปที่ 2 แสดงแถบของ DNA จากพลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2
หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III*

- | | |
|--------|---|
| Lane M | standard DNA ladder ขนาด 1 Kb |
| Lane 1 | พลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2
ที่ยังไม่ได้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamH I</i> และ <i>Hind III</i> |
| Lane 2 | พลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2
ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamH I</i> |
| Lane 3 | พลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2
ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind III</i> |
| Lane 4 | พลาสมิด pTOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2
ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamH I</i> และ <i>Hind III</i> |

1.3 Protein Expression และ Identification

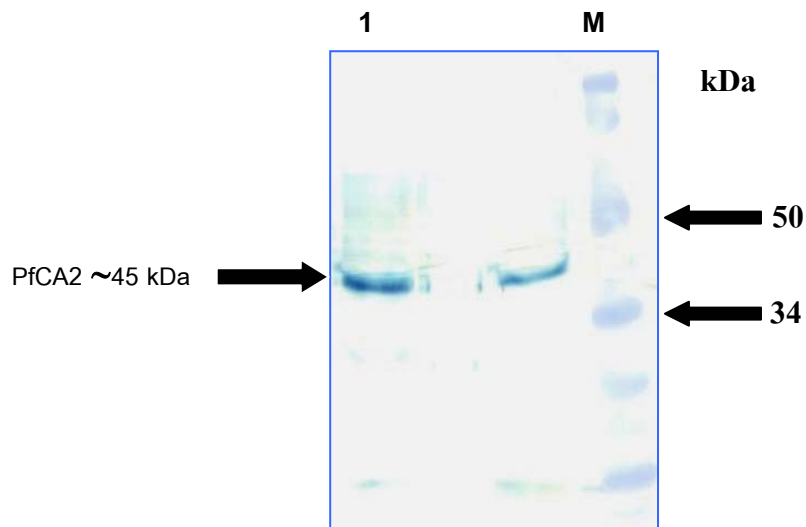
หลังจากนั้นนำเอาพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 มาทำการเหนี่ยวนำใน *E. Coli* โดยอาศัย IPTG ให้ผลิตโปรตีนออกมาและนำเอาโปรตีนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni^{2+} -NTA-agarose affinity gel column และนำโปรตีนไปแยกและทดสอบโดยอาศัย SDS-PAGE แสดงในรูปแบบที่ 3



รูปที่ 3 แสดงแถบโปรตีนที่สกัดจาก *E. Coli* หลังจากผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -column imidazole นำมาแยกโดยอาศัย SDS-PAGE

- Lane M standard protein molecular size marker
- Lane 1 แถบโปรตีนที่อยู่ในสารละลายส่วนใส (supernatant)
- Lane 2 แถบโปรตีนที่อยู่ในสารละลายส่วนใสที่ผ่าน Ni^{2+} -NTA-agarose affinity gel column
- Lane 3 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 1

ถึงแม้ว่าโปรตีนที่สกัดได้จะมีความบริสุทธิ์น้อยแตเมื่อนำมาทำการทดสอบหาตำแหน่งโปรตีนที่ต้องการโดยการทำ Western blot จะพบโปรตีนที่ต้องการในตำแหน่งที่คาดประมาณไว้ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 ± 1 kDa ดังแสดงในรูปแบบที่ 4



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบโปรตีนโดย Western Blot โดยอาศัย anti-His

Lane M standard protein molecular size marker

Lane 1 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 1

1.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน PfCA 2

นำเอาพลาสมิดที่มีชิ้นยีน PfCA 2 ไปหาลำดับเบสโดยการทำให้ DNA sequencing พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1257 bp ดังรูปที่ 5 และมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GeneBank 100% และพบว่ามีลำดับกรดอะมิโน 418 ตัว ดังรูปที่ 6

```

ATGCTTGAAATGATAGATAAATATAATACCCATTTTGTACAAACAACCAAACCTTATTACGAATTTAATG
TAACTAATCTAACTAATTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGAAAATCACCTGATCGGTTTCAGG
TGAAAATATGCAAAAAAAGGATGAAAAAATATAAAGGATTTTCATATAAATGATTATGAAATAGATGGG
AAAAAATTCATAATAAAGAGAACAAGGATTCCTTTAAAATGAATAAAAAATAAATTAACGATAACGAAG
AATTATTTTATATGGACAATATATTATCTTATAAACCAAATAAAAAGAAGTTGTTTACTTATTCCTTTTC
CGAAAATGAAGGAAATTCTGAAAAAGAAGAAACCTTTTATAATTTTAAAAATATGAAAAATATAAATAGC
GTACAAAATAATATTAACAAGACCTTTTTATATAACAAATTGAAAAATGTAGATTATTATGAGCATGGTT
ATAATTGGGATATAGGTCAATGTAAACAGGGAAATATCAATCTCCTGTTGATTTACCTATGAAAGATTT
AAAGGAGAGAGAATTAAAAAATAAAGTGATGTGTATTTAAATTTATTTGACGATGACAATTATGCATGG
AACAAATTATAACAAACCATGGATGAAAGGAGATTTTTTTTATTATTATGAATATTTTATAAAAAAATTG
TTATTAATAGACAAAATAATATATTTCAAATAAAAGCTGCAAGAGATGGAATAATACCATTTGGTGTGTT
ATTTACTACTGAACAACCTGCTATGTTTTATGCAGATCAAATCCATTTTCATGCTCCTAGCGAACATACA
TTTCAAGGTTTCAGGTAATAGAAGAGAAAATTGAAATGCAAATATTTTCATAGTACAAATTATTTTTATGATA
TACAAGATGATAAATCCAAATATAAAAAAATACGGGTTACATATATATAATAATTTAAAAAAAATTC
AAAAAGAACTTCAAAAAAAGATTCAAGTAGATATCATTCTTATCTTATGTCCTTTCTAATGAATAGCTTA
TCAAATGAACAATTACAAAACAAATATAATAAAAAAAGAATAAAAAAGATGAAAAACCAATATGAAG
TAATATCTATTACATTTACTAGTGCAGAAATTAATGCTTCAACTATTAATGCTTTTAAGAAATTACCATC
AGAAAAATTTCTAAGAACTATAATAAATGTATCAAGTGCAGTTTCACGTCGGCTCAGGTAATAAATAA

```

รูปที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน PfCA 2

MLEMIDKYNTHFVQTTKPYEYFNVTNLNSKSKKKKKKKRENHLIGSGENM
 QKKDEKNIKDFHINDYEIDGKTIHNKENKDSFKMNKNKLNDNEELFYMDN
 ILSYKPNKKKLFTYSFSENEGSEKEETLYNFKNMKNINSVQNNINKTFL
 YNKLKNVDYEHGYNWDIGQCKTGKYQSPVDLPMKDLKERELKNISDVYL
 NLFDDDDNYAWNYYNKPWMKGDFFYYYEYFIKKIVINRQNNIFQIKAARDG
 IIPFGVLFTTEQPAMFYADQIHFHAPSEHTFQGSNGNRREIEMQIFHSTNY
 FYDIQDDKSKYKKKYGLHIYNNLKKNSKETSKKDSSRYHSYLSFLLMNSL
 SNEQLQNKYNNKKRIKKMNQYEVISITFTSAEINASTINAFKKLPSEKF
 LRTIINVSSAVHVGSGNK

รูปที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนของ ยีน PfCA 2

1.5 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์

ได้มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์และนำเอาตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม acetazolamide มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Krungkrai et al. 2004 พบว่ามีตัวยาบางตัวมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ค่อนข้างดี (ตัวยับยั้งตัวที่ 1,2,5) เมื่อเทียบกับ aetemisinin ($K_i=2.4 \mu\text{M}$) ดังตารางที่ 1

ตัวยับยั้ง	$K_i (\mu\text{M})$
1	0.76
2	0.52
3	3.54
4	1.4
5	0.47
6	1.13
7	5.38
8	2.52
aetemisinin	2.41

ตารางที่ 1 การศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยยาในกลุ่ม acetazolamide

ความเข้มข้นของซับสเตรท $[S]=25 (\mu\text{M})$

ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง $[I]=10 (\mu\text{M})$

2. การเพิ่มปริมาณยีน PfCA 2 โดยวิธี PCR (polymerase chain reaction) วิธีที่ 2

เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตและสกัดจากวิธีแรกมีความบริสุทธิ์และปริมาณน้อย จึงได้เปลี่ยนระบบการ cloning และ expression ของ PfCA 2 โดยอาศัยวิธี Champion[™] pET Directional TOPO[®] Expression Kits with Lumio[™] Technology ซึ่งวิธีนี้จะสะดวก รวดเร็ว โปรตีนที่ได้สามารถตรวจสอบได้ง่าย รวดเร็ว และจำเพาะ โดยอาศัยวิธี Lumino[™] Green Detection Kit เนื่องจากอาศัยหลักการฟลูออเรสเซนส์ จึงทำให้สามารถตรวจหาโปรตีนได้ในระดับนาโนกรัม พร้อมกับได้ออกแบบ primer คู่ใหม่ โดยเติมเบส CACC เข้าหน้า forward primer เพื่อให้สามารถเชื่อมต่อกับลำดับเบส GTGG ที่อยู่บนพลาสมิดตัวใหม่ได้แก่ pET 160/GW/D-TOPO หรือ pET TOPO[®] vector (Invitrogen) ได้ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

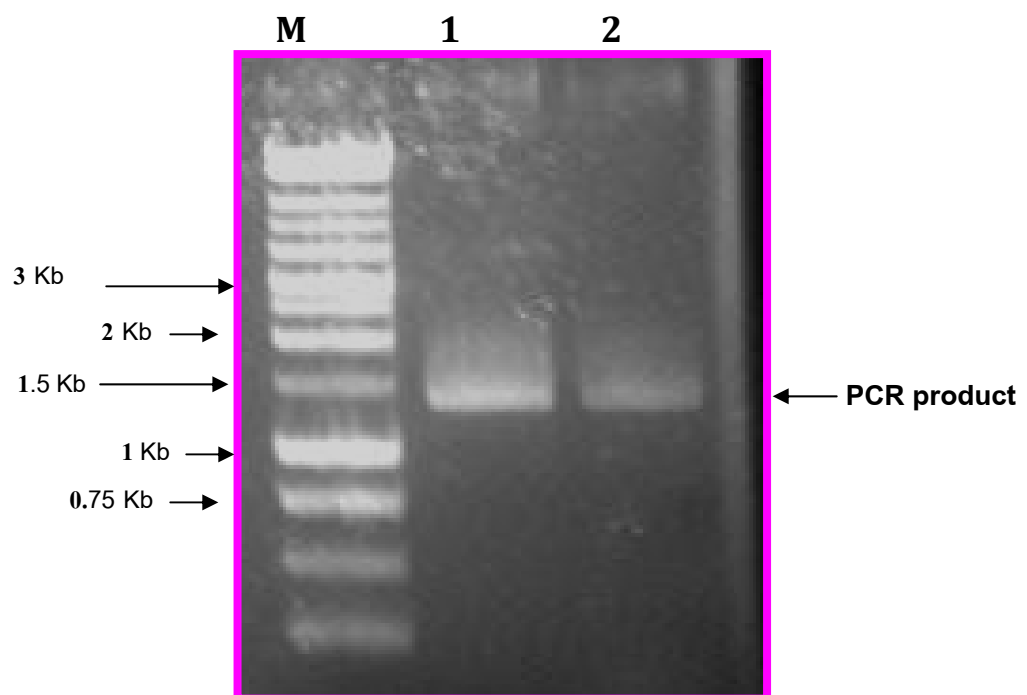
forward primer ได้แก่

5' CGCGGATCCACCATGCTTGAAATGATAGATAAATAT 3' จำนวน 36 mers

ส่วน reverse primer ได้แก่

5' CCCAAGCTTTTATTTATTACCTGAGCCGACGTG 3' จำนวน 33 mers

พร้อมกับได้ใส่ตำแหน่งที่สามารถตัดได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* ผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน PfCA 2 โดยวิธี PCR แสดงในรูปที่ 7



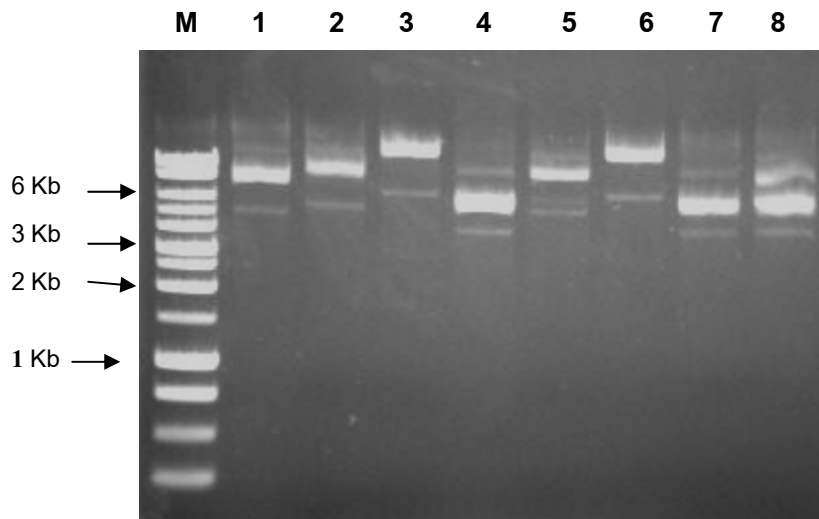
รูปที่ 7 PfCA 2 gene ที่ได้จากการทำ PCR วิธีที่ 2

Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1-2 ยีน PfCA 2 ที่ได้จากการทำ PCR

2.1 Cloning และ Plasmid Extraction

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อและใส่ลงไปใน pET 160/GW/D-TOPO ที่มีขนาด 5.8 kb และได้ clone cells มากมายดังแสงในรูปที่ 8

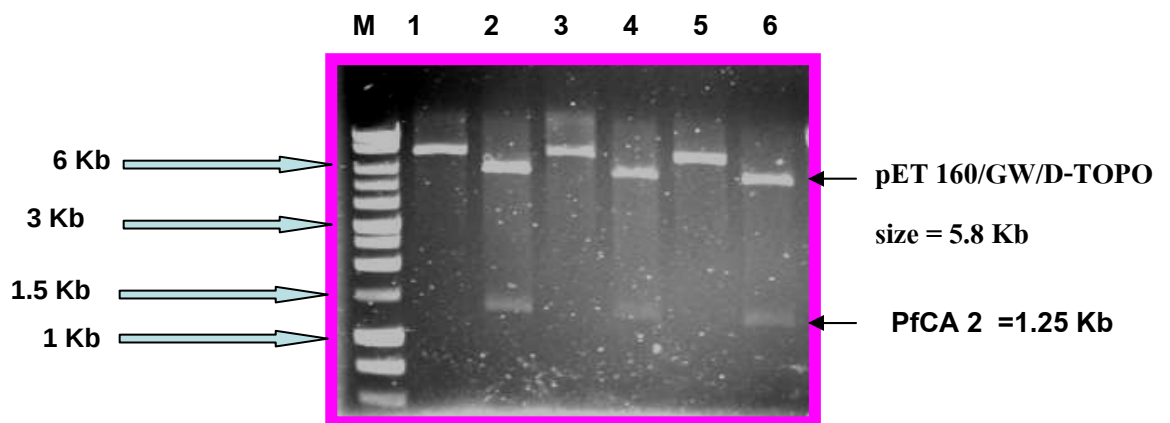


รูปที่ 8 พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกันส่วนยีน PfCA 2 กับพลาสมิด pET160/GW/D-TOPO

Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1-8 พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกันส่วนยีน PfCA 2 กับพลาสมิด pET160/GW/D-TOPO

ต่อมาคัดเลือกและทดสอบ clone cells ที่คาดว่าน่ามีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 ไปคัดเลือกด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* ได้ผลดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 พลาสมิด pET160/GW/D-TOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ

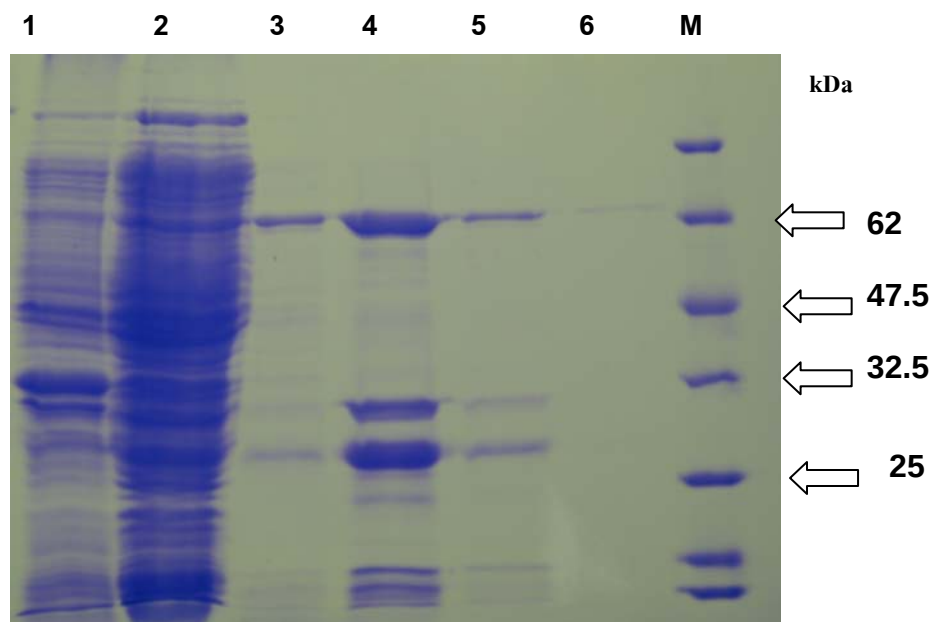
Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1, 3, 5 พลาสมิด pET160/GW/D-TOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA2 และถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamH I*

Lane 2, 4, 6 พลาสมิด pET 60/GW/D-TOPO ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 และถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamH I* และ *Hind III*

2.3 Protein Expression และ Identification

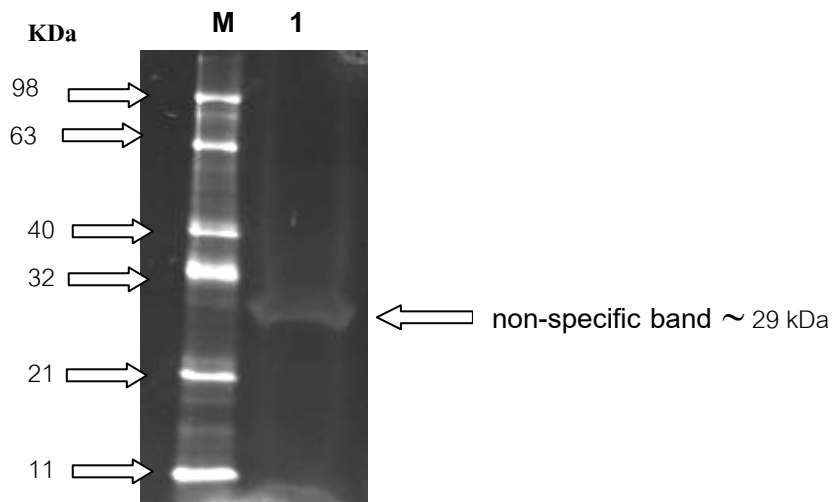
หลังจากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้ *E. Coli* (สายพันธุ์ BL21) ที่มีพลาสมิดลูกผสมที่มียีน PrCA 2 ให้มีการผลิตโปรตีนออกมาโดยอาศัย IPTG ที่อุณหภูมิ 18°C และนำเอาโปรตีนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni^{2+} - nitrilotriacetic acid agarose column และนำโปรตีนไปแยกและทดสอบโดยอาศัย SDS-PAGE แสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงแถบโปรตีนที่สกัดจาก *E. Coli* หลังจากผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -column imidazole นำมาแยกโดยอาศัย SDS-PAGE

- Lane 1 แถบโปรตีนที่อยู่ในสารละลายส่วนใส (supernatant)
- Lane 2 แถบโปรตีนที่อยู่ในสารละลายส่วนใสที่ผ่าน Ni^{2+} -NTA-agarose affinity gel column
- Lane 3 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 1
- Lane 4 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 2
- Lane 5 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 3
- Lane 6 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 4
- Lane M standard protein molecular size marker

แต่เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาทดสอบหาโปรตีนที่สนใจโดยวิธี LuminoTM Green Detection กลับไม่พบตำแหน่งโปรตีนที่ต้องการ เจาะเฉพาะ non-specific band ของ *E. Coli* ตรงตำแหน่งประมาณ 29 kDa ดังแสดงในรูปที่ 11



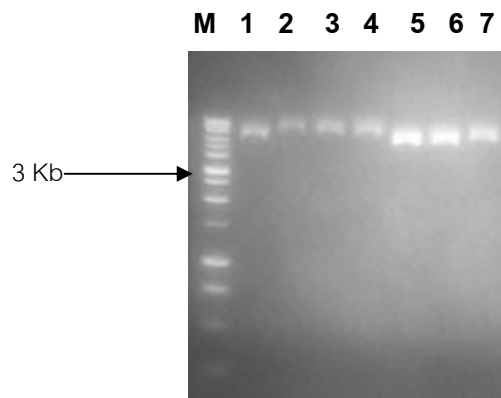
รูปที่ 11 แสดงแถบโปรตีนส่วนที่สกัดจาก *E. Coli* ที่ติดฉลากและตรวจสอบด้วยวิธี LuminoTM Green Detection

Lane M BenchMarkTM Fluorescent Protein Standard
 Lane 1 แถบโปรตีนที่อยู่ใน Elution หลอดที่ 2

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน PfCA 2 โดยอาศัยพลาสมิดตัวอื่น เช่น pQA30_a

เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตและสกัดจากยีน PfCA 2 จากวิธีต่างๆ ที่กล่าวมาได้จำนวนโปรตีนผลผลิตน้อยมากจึงได้มีการพยายามเชื่อมต่อยีน PfCA 2 เข้าไปในพลาสมิดตัวอื่นเช่น pQA30_a หลังจากนั้นนำพลาสมิดที่ได้หรือพลาสมิดลูกผสมนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (competent cell) และได้ cloned cells ดังแสดงในรูปที่

12

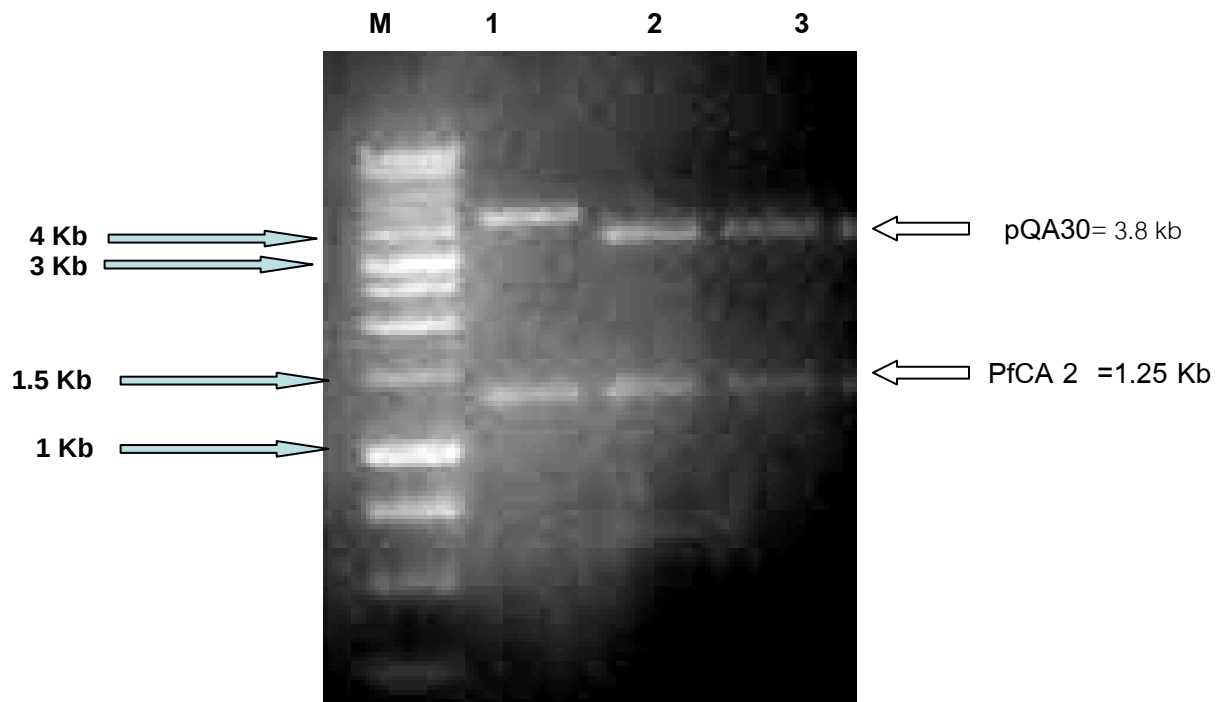


รูปที่ 12 พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อนชิ้นส่วนยีน PfCA 2 กับพลาสมิด pQA30_a

Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1-7 พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อนชิ้นส่วนยีน PfCA 2 กับพลาสมิด pQA30_a

ต่อจากนั้นนำเลือก cloned cells มาทดสอบดูพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 โดยการทำ electrophoresis หลังจากที่ได้ทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III* และผลที่ได้แสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 พลาสมิดลูกผสม pQA30 ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA 2 และถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH I* และ *Hind III*

Lane M standard DNA ladder ขนาด 1 Kb

Lane 1-3 พลาสมิด pQA30 ที่มีชิ้นส่วนยีน PfCA2 และถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamH I* และ *Hind III*

อย่างไรก็ดีเมื่อนำเอาพลาสมิดลูกผสมที่ได้มาศึกษาการแสดงออกปรากฏว่าไม่พบโปรตีนตรงตำแหน่งที่ต้องการ (ผลไม่ได้แสดง)

บทวิจารณ์

การศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่า ยีน ยีนคาร์โบนิค แอนไฮเดรส (CA) ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* อยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีลำดับเบส 1,250 ตัว มีลำดับกรดอะมิโน 418 ตัวและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 ± 1 กิโลดัลตัน และสามารถตรวจสอบโปรตีนโดยอาศัย Western blot และเมื่อสกัดเอา recombinant PfCA2 มาศึกษาพบว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์น้อยแต่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในภาวะที่มี Zn^{2+} และถูกยับยั้งได้โดยยาในกลุ่ม acetazolamide

อย่างไรก็ดีผลจากการวิจัยพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตและสกัดจากยีน PfCA 2 จากวิธี recombinant โดยอาศัยระบบของแบคทีเรียที่ได้ทำการศึกษามีผลผลิตออกมาปริมาณน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงจะดำเนินการศึกษาหาวิธีการผลิตและสกัดโปรตีนของ PfCA 2 โดยอาศัยวิธีต่าง ๆ อีกต่อไป ก่อนที่จะนำไปศึกษาวิจัยในด้านต่าง ๆ ต่อไป เช่น การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีทั่วไป ๆ การทำงานของเอนไซม์ รวมถึง ศึกษาถึงผลต่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ recombinant PfCA ของยาในกลุ่ม aromatic sulfonamides และ acetazolamide (AAZ) เพื่อให้สามารถใช้เป็นแนวทางในการค้นหาตัวอื่นๆ (drug screening test) และศึกษาถึงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CA อย่างลึกซึ้งเพื่อใช้ในการออกแบบยาเพื่อยับยั้งเชื้อมาเลเรียต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- [1] Armstrong, J. M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 5137-5149.
- [2] Krungkrai, S. R., Suraveratun, N., Rochanakij, S. and Krungkrai, J. (2001) *Inter. J. Parasitol.* 31, 661-668.
- [3] Krungkrai, J., Prapunwatana, P., Wichikul, C., Ruengprapavut, S., Krungkrai, S. R. and Horii T. *Southeast Asian J. Trop Med Public Health.* 2003; 34, S2:32-43.
- [4] Ruengprapavut, S., Krungkrai, S. R. and Krungkrai, J. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* 2004; 19: 249-256.
- [5] Krungkrai, J., Scozzafava, A., Ruengprapavut, S., Krungkrai, S. R., Rattanajak, R., Kamchonwongpaisan, S., and Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* 2005; 13:483-489.

Output ที่ได้จากงานวิจัย

-

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

คาดว่าผลงานวิจัยที่ได้เมื่อรวบรวมแล้วสามารถนำไปตีพิมพ์ในวารสาร Science Asia ได้
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชื่อมโยงทางวิชาการกับ Andrea Scozzafava และ Claudiu Supuran , University of Florence, Italy ในด้านการศึกษการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CA กับตัวยับยั้งชนิดต่างๆ

ผลงานอื่นๆ

- เสนอผลงานปากเปล่า เรื่อง “Malarial carbonic anhydrase as drug target” ในวันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จ.ชลบุรี