



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและการแสดงออกของยีนคาร์โบนิค แอนไฮเดรส
ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม

โดย ดร. สุธารทิพย์ เรืองประภาวุฒิ

มิถุนายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและการแสดงออกของยีนคาร์โบนิค แอนไฮเดรส
ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม

ผู้วิจัย ดร. สุธารทิพย์ เรืองประภาวุฒิ

หมวดวิชาชีวเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการโคลนและการแสดงออกของยีนคาร์โบนิค แอนไฮเดรตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ได้ดำเนินการมาตลอดเวลา 2 ปี ภายใต้การดูแลของ ศ.ดร. จิระพันธ์ กริ่งไกร ในฐานะนักวิจัยพี่เลี้ยง ดิฉันขอขอบพระคุณ ศ.ดร. จิระพันธ์ กริ่งไกร เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ ให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน รวมทั้งเอาใจใส่ดูแลในระหว่างการทำวิจัยอย่างยิ่ง จึงทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ดิฉันขอขอบพระคุณอาจารย์สุตารัตน์ กริ่งไกร ที่ได้ให้คำแนะนำพร้อมทั้งสละเวลาสอนเทคนิคต่างๆ ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ดิฉันขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกในระหว่างการใช้ห้องปฏิบัติการวิจัย

ดิฉันขอขอบคุณมหาวิทยาลัยรังสิตที่เปิดโอกาสและให้การสนับสนุนการทำงานวิจัยครั้งนี้

ท้ายสุดนี้ดิฉันขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ดิฉันหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะได้มีโอกาสได้รับการสนับสนุนจากทุกท่านที่กล่าวมาในโอกาสต่อไป

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ หมายเลข TRG 4580036
ชื่อโครงการ การโคลนและการแสดงออกของยีนคาร์บอนิก แอนไฮเดรสของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม
ชื่อนักวิจัย ดร. สุธารทิพย์ เรืองประภาวุฒิ หมวดีวิชาชีวะเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์
การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
E-mail address: sutarn@rangsit.rsu.ac.th.
ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อสืบหา ทำการโคลนยีนพร้อมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีน carbonic anhydrase (CA) ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (PfCA) ใน *Escherichia coli* จากการสืบค้นหายีนคาร์บอนิก แอนไฮเดรส (CA) ของเชื้อ *P. falciparum* ในฐานข้อมูลมาเลเรีย โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับเบสของยีน CA ที่พบในเชื้อ *P. falciparum* อยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีความเหมือนกันกับ CA ใน *P. yoelii* และใน Human และจัดอยู่ในกลุ่มอัลฟา โดยมีจำนวนกรดอะมิโน 235 ตัว เมื่อทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสของยีน CA รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีน CA ของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA) ใน *E. coli* พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จาก recombinant PfCA อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29 ± 1 กิโลดัลตัน สามารถเร่งปฏิกิริยาได้และถูกยับยั้งได้โดย acetazolamide และ sulfanilamide เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติทางด้านจลนศาสตร์เหมือนกับเอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อ *P. falciparum* หรือ native enzyme นอกจากนี้ยังพบว่า acetazolamide มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* ที่เลี้ยงในจานทดลอง (*in vitro*) ผลจากงานวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการค้นหายาชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CA เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนายาเป้าหมายในการรักษาโรคมาเลเรียต่อไป

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

Abstract

Project code : TRG 4580036
Project Title : Molecular cloning and expression of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase
Investigator : Sutarnthip Ruengprapavut, Unit of Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Paholyothin Rd., Patumthani 12000; Thailand.
E-mail address: sutarn@rangsit.rsu.ac.th.
Project Period : 2 years

The objective of this study is to clone and functional express *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase (CA) in *Escherichia coli*. The search of the malarial genome database yielded an open reading frame (ORF) on chromosome 11 similar to the α -CAs from various organisms, including human. The primary amino acid sequence of the PfCA gene has ~60% identity with a rodent parasite enzyme, namely *P. yoelii* (PyCA). The single ORF encoded 235 amino acid protein for PfCA. The PfCA gene was cloned, sequenced and expressed in *E. coli*. The purified recombinant PfCA enzyme was catalytically active. The recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE and has a molecular mass of 29 ± 1 kDa, close to the molecular mass of deduced amino acid sequence of PfCA and the native CA purified from the malarial culture. It was sensitive to acetazolamide and sulfanilamide inhibition. Kinetic properties of the recombinant PfCA revealed the authenticity to the wild type enzyme purified from *P. falciparum in vitro* culture. Furthermore, the PfCA inhibitors acetazolamide and sulfanilamide showed good antimalarial effect on the *in vitro* growth of *P. falciparum*. Our molecular tools developed for the recombinant enzyme expression will be useful for developing potential antimalarials directed at *P. falciparum* carbonic anhydrase.

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

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

การกลับมาระบาดของอีกครั้งของโรคมาเลเรียในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา เกิดจากการดื้อยาอย่างรวดเร็วของเชื้อมาเลเรียโดยเฉพาะสายพันธุ์พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดความรุนแรงต่อมนุษย์มากที่สุด ในแต่ละปีจะมีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้ประมาณ 1-2 ล้านคน โดยเฉพาะเด็กๆ ในทวีปแอฟริกา และเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันโรคมาเลเรียที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จึงมีความจำเป็นและเร่งด่วนในการค้นหาและพัฒนาตัวยาใหม่ๆ เพื่อใช้เป็นยาเป้าหมายในการรักษาโรคมาเลเรียให้ได้ผลอย่างเต็มที่ โดยเฉพาะยาที่ออกฤทธิ์โดยตรงต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อมาเลเรีย และเมื่อเร็วๆ นี้จากการศึกษาของทีมงานวิจัย (Krungkrai et al. 2001) ได้ค้นพบเอนไซม์ที่สำคัญอีกตัวหนึ่งในเชื้อ *P. falciparum* ได้แก่ เอนไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) โดยศึกษาพบว่าเอนไซม์ตัวนี้มีบทบาทและความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* และมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีพของ *P. falciparum*
2. มีคุณลักษณะทางชีวเคมีที่มีลักษณะจำเพาะและแตกต่างจากเอนไซม์ที่พบในมนุษย์
3. ตัวยับยั้ง (inhibitor) ของเอนไซม์มีผลในการขัดขวางการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* เมื่อศึกษาในจานทดลอง (*in vitro*)

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ได้มุ่งเป้าไปที่การสืบหาและศึกษายีนของ carbonic anhydrase (CA) ใน *P. falciparum* เพื่อจะเป็นแนวทางใหม่และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการค้นหาและพัฒนายาเป้าหมายสำหรับใช้รักษาโรคมาเลเรียให้ได้ผลดีและมีประสิทธิภาพมากที่สุด

วิธีการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาไปที่ยีนของ carbonic anhydrase (CA) ของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA) และเนื่องจากการแยกและสกัดเอนไซม์ CA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาเลเรียในจานทดลอง (*in vitro*) มีข้อจำกัดเพราะได้ปริมาณน้อยมาก จึงนำเอาวิธีพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาใช้ในการโคลนยีน และให้ยีนแสดงออกใน *E. coli* เพื่อให้ได้เอนไซม์ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อนำไปศึกษาและค้นหาตัวยับยั้งของเอนไซม์เพื่อใช้เป็นยาเป้าหมายในการรักษาโรคมาเลเรียต่อไป ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินงานดังต่อไปนี้

1. สืบหายีน carbonic anhydrase ของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA) ในฐานข้อมูลของมาเลเรีย (malaria genome data bank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul et al. 1990) และเปรียบเทียบความเหมือน (homology) ของลำดับเบสบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ (conserved region) ของยีน CA ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น ในแบคทีเรีย มนุษย์ เป็นต้น และนำไปใช้ในการออกแบบ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนในจีโนม (genomic DNA) เพื่อให้ได้ยีน CA ที่มีความยาวมากที่สุดโดยวิธี PCR (polymerase chain reaction)
2. นำยีน CA ที่ได้จากการทำ PCR จากข้อ 1 (full-length PfCA) ไปหาลำดับเบส และนำไปโคลนในพลาสมิดที่มีลำดับของฮิสทีดินติดอยู่ (His-tagged sequence) เมื่อทราบลำดับเบสของ PfCA รวมทั้งลำดับของกรดอะมิโนแล้วนำไปเปรียบเทียบความเหมือน (homology) กับ CA ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ซึ่งได้ทำการศึกษาลงรายละเอียดถึงในระดับโครงสร้างของผลึก (crystal structure) ไปแล้ว (Supuran and Scozzafava 2000, 2001)
3. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ในปริมาณ 10-30 มิลลิกรัม เช่น ดูเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำของ IPTG (time for IPTG induction) หาปริมาณที่เหมาะสมของ IPTG ในการเหนี่ยวนำ หรือศึกษาหาอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในระหว่างการเหนี่ยวนำ เป็นต้น
4. นำโปรตีนที่ได้จากข้อ 3 ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีโครมาโตกราฟีโดยใช้ Ni^{2+} -NTA-agarose affinity chromatography แล้วนำไปแยกต่อโดยใช้เทคนิค FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography) ใช้คอลัมน์ gel filtration เรียกเอนไซม์ที่สกัดจากวิธีนี้ว่า recombinant PfCA และนำไปศึกษาการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี (Krungkrai et al. 2001) โดยใช้ esterase assay รวมถึงการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีทั่วไป เช่น ศึกษาทางจลนศาสตร์เพื่อหาค่า K_m , K_i เป็นต้น และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับเอนไซม์ที่สกัดจากการเพาะเลี้ยงในจานทดลอง (*in vitro*) และศึกษาการทำงานของเอนไซม์แบบ staining on non-denaturing-PAGE gel
5. เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ในจานทดลอง (*in vitro*) โดยอาศัยวิธีของ Trager และ Jensen (Trager and Jensen 1976) หลังจากนั้นทำการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ในเชื้อมาเลเรียทั้ง 3 ไอโซไซม์ และศึกษาการแบ่งชนิดของ CA ออกเป็น α , β , γ (α -CA, β -CA, γ -CA family) ให้เข้าใจละเอียดมากขึ้น
6. ศึกษารูปแบบ (model) และโครงสร้างของเอนไซม์ CA ในรูปที่อิสระ (free) และรูปที่จับกันเป็นคอมเพล็กซ์ (complexed) กับตัวยับยั้งซัลโฟนาไมด์ (sulfonamide-based CA inhibitor) พร้อมทั้งทดสอบกับซัลโฟนาไมด์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของ Associate Professor Dr. Claudiu T. Supuran, University of Florence, Florence, Italy. โดยใช้ structure-activity relationship (SAR)

ผลการทดลอง (โปรดดูรายละเอียดใน manuscript ที่แนบมาด้วย)

1. จากการสืบค้นหายีนคาร์โบนิค แอนไฮเดรส (CA) ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในฐานข้อมูลมาเลเรีย โดยใช้โปรแกรม BLAST พบ open reading frame อยู่บนโครโมโซมที่ 11 โดยมีจำนวนกรดอะมิโน 235 ตัว และลำดับเบสของยีน CA ที่พบในเชื้อ *P. Falciparum* มีความเหมือนกันกับ CA ใน *P. yoelli* ประมาณ 60 % เมื่อศึกษาถึงบริเวณ active site พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มอัลฟา
2. จากการโคลนยีนและหาลำดับเบสของยีน CA รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีน CA ของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA) ใน *E. coli* พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.9 ± 1 กิโลดัลตัน
3. นำเอนไซม์ที่สกัดได้จาก recombinant PfCA มาทดสอบกับตัวยับยั้งในกลุ่ม acetazolamide (AAZ) และ sulfanilamide (SFA) พบว่าตัวยับยั้งเหล่านี้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carbonic anhydrase ได้ และเมื่อเปรียบเทียบค่าทางชีวเคมีต่าง ๆ เช่น K_m , k_{cat} , K_i ของตัวยับยั้งทั้งสองที่มีต่อเอนไซม์ CA ที่เป็น recombinant CA และ native CA พบว่าให้ผลคล้ายกัน นอกจากนี้ AAZ ยังมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาเลเรีย *P. Falciparum* เมื่อศึกษาในงานทดลอง (in vitro)

บทวิจารณ์ (โปรดดูรายละเอียดใน manuscript ที่แนบมาด้วย)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่ายีน CA ของเชื้อ *P. Falciparum* หรือ *P. falciparum* (PfCA) อยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีลำดับกรดอะมิโน 235 ตัวและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.9 ± 1 กิโลดัลตัน เมื่อสกัดเอา recombinant PfCA มาศึกษาพบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาได้และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกับเอนไซม์ CA ที่สกัดจากเชื้อ *P. Falciparum* หรือ native enzyme แต่มีคุณสมบัติแตกต่างจาก CA ใน human

ตัวยับยั้งในกลุ่ม acetazolamide (AAZ) และ sulfanilamide (SFA) มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ recombinant PfCA และ acetazolamide (AAZ) มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาเลเรีย *P. Falciparum* เมื่อศึกษาในงานทดลอง (in vitro)

เอนไซม์ CA ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการค้นหาตัวอื่น ๆ (drug screening test) และศึกษาถึงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CA อย่างลึกซึ้งเพื่อใช้ในการออกแบบยาเพื่อยับยั้งเชื้อมาเลเรียต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Altschul, S.F. et al. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**: 403.
2. Krungkrai, S.R. et al. (2001) *Inter. J. Parasitol.* **31**: 661.
3. Supuran, C.T. and Scozzafava, A. (2000) *Exp. Opin. Ther. Patents* **10**: 575.
4. Supuran, C.T. and Scozzafava, A. (2001) *Curr. Med. Chem.* **1**: 61.
5. Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) *Science* **193**: 673.

Output ที่ได้จากงานวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. **Ruengprapavut, S.**, Krungkrai, S. R. and Krungkrai, J. *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase is a possible target for malaria chemotherapy *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2004**, vol. 19, in press.
2. Jerapan Krungkrai, Phisit Prapunwatana, Chayaporn Wichikul, **Sutarnthip Ruengprapavut**, Sudaratana R Krungkrai, Toshihiro Horil. Molecular biology and biochemistry of malarial parasite pyrimidine biosynthetic pathway. *Southeast Asian J. Trop Med Public Health.* **2003**, vol. 34,S2, pp. 32-43, 2003.

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เชื่อมโยงทางวิชาการกับ Andrea Scozzafava และ Claudiu Supuran , University of Florence, Italy. ในด้านการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CA กับตัวยับยั้งชนิดต่างๆ
2. มอบหมายให้ น.ส. ชุติมา โชติประสิทธิ์ นักศึกษาระดับปริญญาตรีคณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ทำงานวิจัยเรื่อง "Enhanced expression of recombinant PfCA in *E. Coli* by co-transforming cell with RIG plasmid.

ผลงานอื่น ๆ

1. เสนอผลงาน ในการประชุม 6th **International conference on the carbonic anhydrase** ในระหว่างวันที่ 20-25 มิถุนายน 2546 ที่ Smolenice castle , Slovakia. **Sutarnthip Ruengprapavut**, Sudaratana R Krungkrai and Jerapan Krungkrai. Human malarial parasite carbonic anhydrase : molecular cloning, functional expression and characterization.

2. เสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง "Molecular cloning and expresslon of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase" ในวันที่ 9-11 มกราคม 2547 ที่โรงแรมเฟลิทซ์ จ. กาญจนบุรี
3. เป็นวิทยากรเรื่อง "Molecular cloning of *P. Falciparum* carbonic anhydrase" ในการประชุมวิชาการของภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในเดือนมีนาคม 2546

ภาคผนวก

Special Issue

Plasmodium falciparum Carbonic Anhydrase is a Possible Target for Malaria Chemotherapy

SUTARNTHIP REUNGPRAPAVUT^a, SUDARATANA R. KRUNGKRAI^a and JERAPAN KRUNGKRAI^{b,*}

^aUnit of Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Pathumthani 12000, Thailand;

^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Rd., Bangkok 10330, Thailand

(Received 9 January 2004; In final form ????)

Plasmodium falciparum is responsible for the majority of life-threatening cases of human malaria. The global emergence of drug-resistant malarial parasites necessitates identification and characterization of novel drug targets. Carbonic anhydrase (CA) is present at high levels in human red cells and in *P. falciparum*. Existence of at least three isozymes of the α class was demonstrated in *P. falciparum* and a rodent malarial parasite *Plasmodium berghei*. The major isozyme CA1 was purified and partially characterized from *P. falciparum* (PfCA1). A search of the malarial genome database yielded an open reading frame similar to the α -CAs from various organisms, including human. The primary amino acid sequence of the PfCA1 has 60% identity with a rodent parasite *Plasmodium yoelii* enzyme (PyCA). The single open reading frames encoded 235 and 252 amino acid proteins for PfCA1 and PyCA, respectively. The highly conserved active site residues were also found among organisms having α -CAs. The PfCA1 gene was cloned, sequenced and expressed in *Escherichia coli*. The purified recombinant PfCA1 enzyme was catalytically active. It was sensitive to acetazolamide and sulfanilamide inhibition. Kinetic properties of the recombinant PfCA1 revealed the authenticity to the wild type enzyme purified from *P. falciparum* in vitro culture. Furthermore, the PfCA1 inhibitors acetazolamide and sulfanilamide showed good antimalarial effect on the in vitro growth of *P. falciparum*. Our molecular tools developed for the recombinant enzyme expression will be useful for developing potential antimalarials directed at *P. falciparum* carbonic anhydrase.

Keywords: Malaria; *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium berghei*; Drug target; Carbonic anhydrase; Acetazolamide

INTRODUCTION

Malaria is a disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*. The disease afflicts approximately 5 hundred million and kills up to 2.5 million annually, mainly children in African countries.¹ Four species infect humans but *P. falciparum* is responsible for the majority of deaths. The limitation and toxicity of antimalarial drugs currently used, and the spread of drug-resistant malarial parasites accompanied by a world-wide resurgence of malaria, requires the development of new drugs for management of the disease. In intraerythrocytic stage of development, the parasites require purines and pyrimidines for DNA and RNA synthesis during their exponential growth and replication. The parasites, known as purine auxotroph, salvage the preformed purines from the human host, but they have to synthesize pyrimidines *de novo* from HCO_3^- , adenosine 5'-triphosphate, glutamine and aspartate.^{2–4} These properties on both purine and pyrimidine biosynthesis represent key differences between the parasite and human host.

Carbonic anhydrase (CA; EC 4.2.1.1) is a zinc-containing enzyme catalyzing the reversible hydration of CO_2 [$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$]. The first CA was purified from bovine red cells in 1933,⁵ followed by the identification of several isozymes widely distributed in mammals, plants and bacteria.^{6–8} Recent advances regarding the crystal structure and biochemistry of CAs from various

*Corresponding author: Tel: + 66-2-2564482. E-mail: fmedjkk@md2.md.chula.ac.th

organisms revealed that they evolved independently and have been categorized into 4 classes: α , β , γ and δ .⁹ The first three classes have no significant sequence identity and structural differences, their active sites function with a single zinc ion essential for catalysis. Recently, we have demonstrated the existence of three active CA isozymes in the human malarial parasite *P. falciparum*.¹⁰ The major isozyme, *P. falciparum* CA1 (PfCA1), has been purified and its characteristics have been partially studied due to the paucity of parasitic materials from *in vitro* culture with human red cells.

Based on our previous observation, this prompted us to identify the PfCA1 gene in the malarial genome database, and then clone and heterologously express it in *Escherichia coli*. This is the first CA cloned and functionally expressed from a protozoan parasite. The recombinant enzyme is catalytically active for both *p*-nitrophenylacetate and α -naphthylacetate as substrates, and was strongly inhibited by acetazolamide (2-acetyl-amino-1,3,4-thiazole-5-sulfonamide, AAZ) and sulfanilamide (4-aminobenzenesulfonamide, SFA). Physical and kinetic properties indicate authenticity of the recombinant PfCA1 to the wild type enzyme purified from *P. falciparum*. The PfCA1 also differs from the human CA II. The PfCA1 inhibitors AAZ and SFA show good antimalarial effect on the *in vitro* growth of *P. falciparum*. In addition to *P. falciparum* CAs, we report the existence of four isozymes of CA and their sensitivity to AAZ inhibition in a rodent parasite *P. berghei*.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Chemicals

Restriction enzymes, biochemicals and chemicals were purchased from Promega, Sigma, Fluka and Amersham Biosciences. These were of the highest quality commercially available and were used without further purification. Nickel(II)-nitrilotriacetic acid (Ni^{2+} -NTA)-agarose affinity gel was obtained from Qiagen. Molecular mass markers for SDS-PAGE and gel filtration chromatography were purchased from Amersham Biosciences and BioRad.

Cultivation of *P. berghei* and *P. falciparum*

P. berghei was cultivated in Swiss albino mice with 50–60% parasitemia before collecting the blood. The *P. berghei*-infected blood, mainly at the trophozoite stage, was passed through CF-11 cellulose columns to remove all white blood cells and platelets. *P. falciparum* (T₉ isolate) was cultivated by a modification of the candle jar method of Trager and Jensen,¹¹ using a 5% hematocrit of human red cell type O suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 25 mM Hepes, 32 mM NaHCO_3

and 10% fresh human serum type O. The cultures, started at low parasitemia (~1–2%), were changed with the medium twice daily until the cultures had ~30% parasitemia and then harvested for enzyme and nucleic acid preparations. The parasites were isolated from the infected red cells by incubating in 0.15% saponin in the RPMI medium for 20 min at 37°C. The host cell-free parasites were obtained after centrifugation at $8,000 \times g$ for 10 min and washed at least 4 times with phosphate buffered saline (5 mM phosphate buffer/145 mM NaCl/pH 8.0) (PBS) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and then lysed according to the reported procedure.⁴

Purification of Enzyme on Fast Protein Liquid Chromatographic System

The parasite supernatant obtaining after centrifugation of the parasite lysate at $27,000 \times g$ for 60 min was dialyzed with 20 mM Na_2HPO_4 (pH 6.0) containing 1 mM PMSF, and concentrated. It was then loaded onto a Pharmacia Mono S cation-exchange fast protein liquid chromatographic (FPLC) column, which had been equilibrated with the phosphate buffer. The column was washed with the same buffer and then eluted with a linear gradient of phosphate buffer from pH 6.0–8.0 at a flow rate of 1 ml per min. The eluates were collected into 30 fractions, each 1.0 ml-fraction was assayed for CA activity and protein concentration. All *P. berghei* CA activities were eluted at fractions 3–8, pooled and prepared for activity staining on nondenaturing-PAGE. For the *P. falciparum* CA, the major isozyme CA1 was further purified to near homogeneity using two more sequential columns on Mono Q anion-exchange and Superose 12 gel filtration FPLC as described previously.¹⁰

Enzyme Assay and Kinetic Studies

The esterase activity of CA was measured by using the modified method of Armstrong *et al.*¹² The enzyme activity was determined by following the change in absorbance at 348 nm of *p*-nitrophenylacetate to 4-nitrophenoxide ion (extinction coefficient = $18.1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) over a period of 3 min at 37°C using a Shimadzu 1601 spectrophotometer equipped with a temperature-controlled unit. The enzymatic reaction, in a total volume of 1.0 ml, contained 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.25 mM *p*-nitrophenylacetate and 10–100 μl enzyme preparations. This measurement was then repeated in the presence of the inhibitor AAZ at a concentration of 0.1 mM, to obtain the net CA activity. One unit of enzyme activity was expressed as 1 μmol of *p*-nitrophenylacetate hydrolyzed per min at 37°C. Kinetic constants, K_m and k_{cat} , were determined by fitting data to the Michaelis-Menten equation using non-linear regression with an Elsevier

Biosoft Enzfitter program. Inhibitor constants (K_i) were determined from Dixon's plots as described.¹³

Identification and Characterization of *P. falciparum* Carbonic Anhydrase Homolog

Homology search of the parasite PfCA1 was performed with the BLAST program of the U.S. National Center for Biotechnology Information server.¹⁴ Using α -CA sequences from other organisms, significant homology for PfCA1 was found within a sequence on chromosome 11 in a malaria genome database. A single continuous *P. falciparum* open reading frame (ORF) encoding CA homolog was further characterized by the TBLASTN program.¹⁴ In addition, an ORF encoding CA homolog was identified in *P. yoelii* genome database (PyCA). Pair-wise and multiple sequence alignments of PfCA1 and PyCA with other organisms were performed using the CLUSTALW program.¹⁵

Cloning and Sequencing of *P. falciparum* Carbonic Anhydrase

Genomic DNA was isolated from *P. falciparum* by DNAzol™ reagent (Invitrogen). PCR was used to amplify DNA encoding PfCA1. The forward primer was 5'TCTGGATCCATGAAAGATTAAA-GGAGAGAGAA3' and the reverse primer was 5'CCCAAGCTTTTATTTATTACCTGAGCCGACGT-G3', which introduce BamH I and Hind III restriction sites respectively (shown in bold).

The PCR cycling parameters include denaturation at 95°C (1 min), annealing at 55°C (1 min) and extension at 68°C (3 min). After 30 cycles, a single band of the predicted size was visualized on an 0.8% agarose gel. The PCR products from gDNA were purified from the gel by using gel extraction kit (Qiagen). PCR products were ligated into a cloning vector pDrive (Qiagen). The PfCA1 sequence was determined in both directions by the dideoxy chain-termination method using an automated Applied Biosystems Procise sequencer. The construct plasmid was subcloned into expression vectors. Attempts were done with at least three expression vectors having different promoters, i.e., pQE30 (Qiagen), pTOPO (Invitrogen), pET 15b (Novagen). The PfCA1 was expressed only with the pET15b expression vector. This approach will produce the recombinant protein fused to N-terminal His₆-thrombin cleavage site and the expressed recombinant protein can be detected by monoclonal antibody directed against His₆-tag.

Recombinant Protein Expression and Purification of *P. falciparum* Carbonic Anhydrase from *E. coli*

The competent *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the pET15b having the fused His₆-PfCA1. The cells were grown in LB medium

(37°C) to an OD_{600 nm} of 0.5, and induced with 1 mM isopropyl α -D-thiogalactopyranoside (IPTG), harvested by centrifugation (8,000 \times g) after IPTG induction for 3 h at 37°C, washed three times with ice-cold PBS, and stored as cell paste by freezing in -80°C until used.

All protein purification steps were performed at 4°C or on ice. Frozen cell pellets were suspended in four cell paste volume of buffer A (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0/300 mM NaCl/10 mM imidazole). A protease inhibitor cocktail was added to the cell suspension. The mixture was sonicated with an ultrasonic homogenizer. The *E. coli* lysate was then centrifuged for 30 min at 18,000 \times g.

The supernatant (8 ml) was loaded onto a 2 ml bed volume of Ni²⁺-NTA-agarose affinity gel equilibrated with buffer A. The column was washed with 20 ml of buffer B (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0/300 mM NaCl/20 mM imidazole), and then eluted with 6 ml of buffer C (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0/300 mM NaCl/250 mM imidazole). The eluted protein from the Ni²⁺-NTA-agarose column was dialyzed extensively against PBS, prior to thrombin protease treatment (10 unit/mg protein, overnight at 22°C) for His₆-tag removal. The recombinant protein, after concentration using centricon 10 devices, was assayed for CA activity staining on nondenaturing-PAGE gel. The purified enzyme was determined for kinetic properties and inhibitory effect by AAZ and SFA inhibitors using the esterase assay as described.¹²

In Vitro Antimalarial Test

Growth of *P. falciparum* during drug-screening tests was measured by using incorporation of [³H] hypoxanthine into parasite DNA and RNA and asynchronizing culture with starting parasitemia of 0.5% as described.¹⁶ Aliquots of stock solution of drugs were placed in 96-well tissue culture plates, to final concentrations of 0.001–1000 μ M in sterile water after the addition of *P. falciparum* infected red cell suspension (0.5%) in RPMI 1640 culture medium. The plates were incubated in candle jars at 37°C for 24 h. [³H] hypoxanthine (0.5 μ Ci; 1 Ci/mol) in 25 μ l of the culture medium was then added to each well. The incorporation of [³H]hypoxanthine in each well was examined after 48 h of drug-treated culture and the radioactivity was measured by liquid scintillation counting. The drug-free control of *P. falciparum*-infected red cells incubated under the same condition had radioactivity of 18,000 \pm 1,000 cpm. The control red cells without harboring parasites incubated as described had 400 \pm 50 cpm. All compounds were run in triplicate at each concentration. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was defined as the concentration of the compound causing 50% inhibition of the [³H]

hypoxanthine incorporation, compared with the drug-free control of the parasite culture. In parallel studies, antimalarial activity against *P. falciparum* in *in vitro* growth was quantified by measuring % parasitemia in a 96-hour culture in the presence of the drugs at various concentrations.¹⁶ All compounds were tested in triplicate at each concentration used. The morphological changes of *P. falciparum* were also observed in the culture treated with 100 μ M AAZ in one intraerythrocytic cycle (~44–48 h) starting with the synchronized ring stage.

Other Methods

Human CA II was purified from normal red blood cells, which had been cultivated as well as *P. falciparum*-infected red cell using the same procedure as described for the malarial CA. Mouse red cells were prepared from the normal Swiss albino mice. The number of cells was determined by a hemacytometer. Parasitemia and parasite morphological characteristics were performed on methanol-fixed and Giemsa-stained blood film of the malarial culture and then counted by using a Nikon microscope, equipped with a camera unit.

Protein concentrations were determined by the method of Bradford¹⁷ using bovine serum albumin as standard. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed on a Bio-Rad minislab gel apparatus with a 5% acrylamide stacking gel and 10% acrylamide running gel in the discontinuous buffer system of Laemmli.¹⁸ Nondenaturing-PAGE was performed by using the modified Laemmli's method in the absence of SDS and reducing agents of all reagents used, and 5% acrylamide running gel was applied. The enzyme activity was also detected on the nondenaturing-PAGE gel after electrophoresis in the presence of substrate α -naphthylacetate using the method described by Tashian.¹⁹ The inhibitor AAZ (at 1 mM) was also included during enzyme activity staining as a control. The proteins on the SDS-PAGE gels were stained with Coomassie Blue R dye and visualized by a Kodak 1D image analysis software.

Western blot analysis was performed to confirm the authenticity of the His₆-tagged recombinant protein by using the method as described.²⁰ The detection system was QIA express™ kit (Qiagen) containing monoclonal antibody directed against His₆-tag with horseradish peroxidase-conjugate.

RESULTS AND DISCUSSION

The enzyme CA has previously been characterized from many species of animals, plants, yeast, bacteria, including human protozoa.^{6–8,10} The crystal

structures of the enzyme CA isolated from many sources have been identified.⁹ The enzyme is the target for sulfonamide drugs, such as AAZ and methazolamide, for the treatment of human glaucoma.^{8,21–22} In the present study, it is shown that in addition to the human parasite *P. falciparum*, the rodent parasite *P. berghei* propagated in the mouse system has its own CA activity and exhibits at least four isozymes, which are sensitive to the inhibitor AAZ. The PfCA1 gene encoding *P. falciparum* CA1 was identified in the malarial genome database, and then cloned and functionally expressed in *E. coli*. The recombinant enzyme is catalytically active and sensitive to AAZ and SFA inhibition. It has authenticity to the wild type native enzyme purified from *P. falciparum*, and is also different from the human CA II. The PfCA1 inhibitors AAZ and SFA show good antimalarial effects on the *in vitro* growth of *P. falciparum* as observed by both [³H] hypoxanthine incorporation and morphological abnormality, suggesting the therapeutic potential of the malarial parasite enzyme.

Existence of Carbonic Anhydrase Activity in Rodent Malarial Parasite *P. berghei*

To demonstrate the existence of CA activity in *P. berghei*, the isolated parasites freed from mouse red cells were used for CA assay by the esterase method, including the specific inhibitor AAZ, and compared to the CA activities in normal and *P. berghei*-infected red cells. The results are shown in Table I. There was a 4–5-fold increase in total activity of the enzyme in the infected red cells, compared to the uninfected and normal red cells. It was found that specific activity (mU/mg protein) of the enzyme in isolated parasites was ~9–10 times more than that in the normal red cells. When subjecting the parasite supernatant to the cation-exchange Mono S FPLC column, most CA activities were associated in the fractions 3–8 eluting at pH 6.2–6.6. These fractions were pooled, concentrated and then analyzed on nondenaturing-PAGE, followed by CA activity staining on the gels (Figure 1). There were four-activity bands, typing

TABLE I Carbonic anhydrase activity in normal and *P. berghei*-infected mouse red cells and in isolated parasites

Cell	Activity ^a	
	mU/10 ⁹ cells	mU/mg protein
Normal mouse red cell	250 \pm 20 ^b	0.04 \pm 0.005
<i>P. berghei</i> -infected red cell ^c	1,100 \pm 130	0.63 \pm 0.07
Isolated parasites	960 \pm 90	0.35 \pm 0.03

^a mU of enzyme activity is expressed as nmol per min at 37°C. ^b The values are mean \pm S.D., taken from three separate experiments of parasite and enzyme preparations. ^c The red cells were infected with ~60–70% parasitemia, harboring mainly the trophozoite stage.

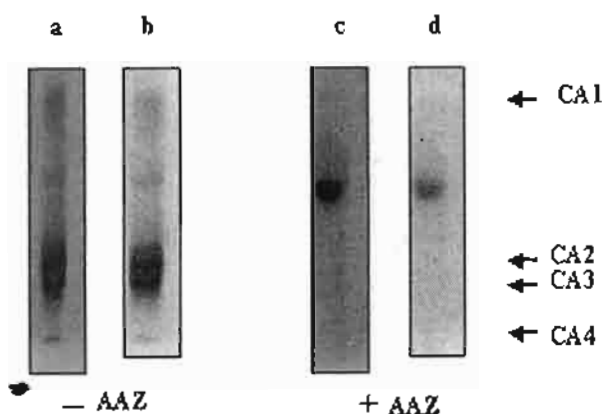


FIGURE 1 Enzyme activity staining of *P. berghei* carbonic anhydrase on nondenaturing-PAGE gels using α -naphthylacetate as substrate in the absence (a,b) and presence (c,d) of 1mM acetazolamide (AAZ). The enzyme was concentrated from the pooled fractions 3–8 eluting at pH 6.2–6.6 of the cation-exchange Mono S FPLC column. Four-activity bands were observed to be sensitive to AAZ inhibition, and typing as CA1, CA2, CA3, and CA4 based on their mobility of the gels.

as isozymes CA1, CA2, CA3, and CA4, in the order of their mobility on the gel from cathode to anode, as described previously for the *P. falciparum* enzyme.¹⁰ The isozymes CA2 and CA3 were major forms. In the presence of 1mM AAZ, all four malarial CA activities were completely inhibited. Our results indicate the existence of at least four CA isozymes in *P. berghei*. This is consistent to our previous study on the occurrence of three CA isozymes in *P. falciparum*,¹⁰ however, the majority of CA isozymes and their sensitivity to AAZ inhibition are markedly different between

the human and the rodent malarial parasites. Purification of the major isozymes in *P. berghei* remains to be studied.

Cloning and Expression of *P. falciparum* Carbonic Anhydrase in *E. coli*

Recently, the nucleotide sequence of the *P. falciparum* genome, having 14 chromosomes with 23 Mb, has been completed.²³ It is now possible to identify the sequences that encode CA isozymes in this parasite. By using the bioinformatics approaches, TBLASTN searching of the malarial genome database was performed with the protein CA sequences obtained from other organisms. The search of the malarial genome database yielded an open reading frame (ORF) on chromosome 11 similar to the α -CAs from various organisms, including human. The primary amino acid sequence of the PfCA1 gene has ~60% identity with a rodent parasite enzyme, namely *P. yoelii* (PyCA). The single ORFs encoded 235 and 252 amino acid proteins for PfCA1 and PyCA, respectively. Low homology (~35–51%) of the PfCA1 and PyCA were found when compared to the insect *Drosophila melanogaster* and human CA I, II sequences. Nevertheless, the highly conserved active site residues responsible for binding of substrate and catalysis were also found among organisms having α -CAs (Figure 2). The consensus signature sequence remained variable.

The full-length PfCA1 gene was cloned using PCR and genomic DNA extracted from *P. falciparum*, and the nucleotide of the cloned gene was sequenced to confirm its authenticity. The construct plasmid having

<i>D. melanogaster</i>	MSHHWGYTEENGPAHWAKEYPQASGHRQSPVDITPSSAKKSGELNVAPLKWKYVPEHTKS
<i>H. sapiens</i>	MSHHWGYGKENGPEHWEKDFPIAKGERQSPVDITHTAKYDP--SLKPLSVSYDQATSLR
<i>P. falciparum</i>	MKDLKERELKNISDVYLNLEDD-DNYAWNYYNKPWMKG-----DFFYYEYFIKKIVIN
<i>P. yoelii</i>	MHTLKERELKNLSDFYLNAFYDNDEYSWNNFNRPWFKG-----DIFYYENLINKIIN
	*
<i>D. melanogaster</i>	LVNPGYCWVRVDN-GAOSLTTGGPLGDIQFKLEQFCHWGCCTDSKSGSEHTVDGV--SYSG
<i>H. sapiens</i>	ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGTIRLIQFHFHWGSLDQGSSEHTVDKK--KYAA
<i>P. falciparum</i>	RQNNIFQIKAAADGIIFFGVLTTEQPAEFYADQIFHA-----PSEHTFQSGCNRREI
<i>P. yoelii</i>	RQNNMFQIKASNEIIPFGVLTTEPTIFYSHHINFHS-----PSEHTFQSGCNRREI
	*
<i>D. melanogaster</i>	ELHLVBNWNTTKYSFGAAAAAPDGLAVLGVFLKAGNHHAELDKVTSLLQFVLHKGDRVTL
<i>H. sapiens</i>	ELHLVBNW-TKYGDFGKAVQPDGLAVLGI FLKVGSAKPGLOKVVVDVLSIKTKGKSADF
<i>P. falciparum</i>	EMQIFHSTNYFYDIQDDKSKYKKYGLHIYNNLKNKSKTSKKDSSRYHSYLSFLLMNSL
<i>P. yoelii</i>	EMQIFHSTNEIYDYDENK-----WNGVFEKKNYKKNNETN-----IQHSYILTFLLMNSL
	*
<i>D. melanogaster</i>	PQGCDFGQLLPDVHTYNTYEGSLTTPFCSESVINIVFRTPIEVSDDQLNAMRNLNAYDVK
<i>H. sapiens</i>	TN-FDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLECVTHIVLKEPIVSSEQLVKFRKLNENEGG
<i>P. falciparum</i>	SNEQLQNKYNNKKR-----IKMKQNYEVISITFTSAEINASTINA
<i>P. yoelii</i>	SNPHLGQYTKNKKRNKRSKSLYNSIRLDENGKNTKRENYQVISITFSSAEIDKSTINN

<i>D. melanogaster</i>	EECPNEFNGKVINNFPPPLPKRELREIGGH-
<i>H. sapiens</i>	EPE-----ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF--
<i>P. falciparum</i>	FKKLPSSEKFLRTIINVSSAVHVGSGNK-----
<i>P. yoelii</i>	FKKLPSSEKFLRTILEASQNVVPVGSSEKKNIFIYS

FIGURE 2 Amino acid sequences of *P. falciparum* and *P. yoelii* CAs, deduced from the open reading frame of PfCA1 and PyCA genes. The predicted amino acid sequences of PfCA1 (235 residues) and PyCA (252 residues) are shown aligned with *D. melanogaster* (270 residues) and human CA II isozyme (260 residues). The amino acids responsible for binding and catalysis are identical among the four sequences and shown by boldface letters. The identical amino acids and conservative replacements are shown by star and dot symbols, respectively.

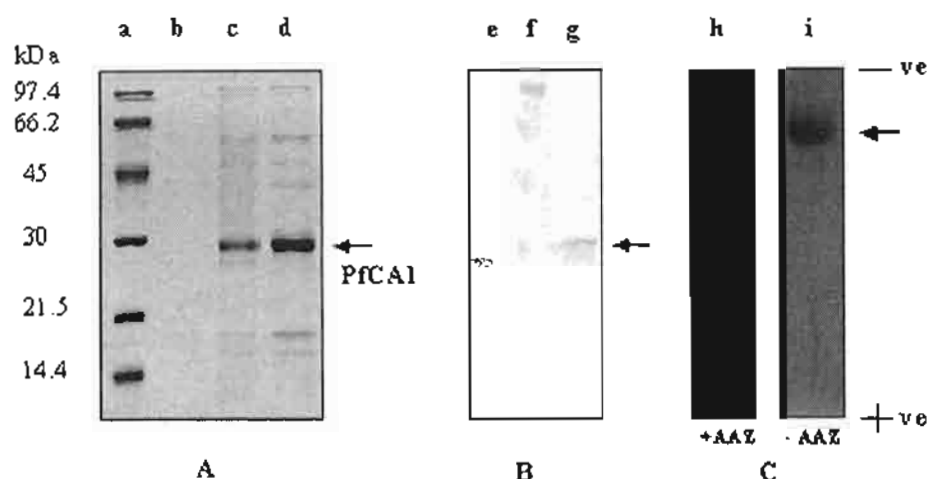


FIGURE 3 Analysis of recombinant *P. falciparum* carbonic anhydrase from IPTG-induced *E. coli* harboring PfCA1 construct pET15b plasmid. Panel A shows a SDS-PAGE analysis of purified PfCA1 from Ni²⁺-NTA chromatography (>90% purity). The gel was stained with Coomassie Blue R; lane a, known proteins with molecular masses indicated in kDa; lanes b and c, 7.5 and 15 μ g of the purified enzyme respectively; arrow indicates position of the recombinant enzyme. Panel B shows Western blot analysis of purified PfCA1 with monoclonal antibody directed against His₆ with HRP conjugate; lane d, 2 μ g of control recombinant His₆-tagged dihydrofolate reductase (molecular mass of 26 kDa) obtained from Qiagen; lane e, pre-stained marker proteins; lane f, 2 μ g of purified PfCA1. Panel C shows activity staining on denaturing-PAGE gels using α -naphthylacetate as substrate in the presence (lane h) or absence (lane i) of 1 mM acetazolamide (AAZ). The concentrated recombinant PfCA1 enzyme, after His₆-tag removal by thrombin, was used.

PfCA1 gene was then expressed in *E. coli*. The recombinant PfCA1 protein expression was obtained by a cloning and expression strategy using a His₆-tagged fusion protein at N-terminus, containing a thrombin cleavage site. It was shown that the PfCA1 was functionally expressed in *E. coli* as soluble protein. The recombinant protein in the IPTG-induced *E. coli* supernatant was purified using Ni²⁺-NTA agarose-affinity chromatographic column, and analyzed by SDS-PAGE (Figure 3A). The purity of the enzyme preparation was >90% after analysis by a Kodak 1D image software. It has a molecular mass of 29 ± 1 kDa, close to the molecular mass of the deduced amino acid sequence of PfCA1 (Figure 2) and the native CA1 purified from the malarial culture.¹⁰ The authentic recombinant protein having N-terminal His₆-tag was confirmed using the Western blot analysis and monoclonal antibody directed against His₆-tag (Figure 3B). Furthermore, the recombinant PfCA1 was shown to express its activity after His₆-tag removal on the nondenaturing-PAGE gels, and was completely inhibited by 1 mM AAZ (Figure 3C). The purified recombinant PfCA1 was then studied kinetically

for comparison with the wild type native *P. falciparum* CA1.

Kinetic Characterization of Recombinant *P. falciparum* Carbonic Anhydrase

Characterization of the purified recombinant PfCA1 was performed and compared with the purified human red cell CA II and the native CA1 purified from *P. falciparum* culture as described previously.¹⁰ The kinetic parameters including K_m , k_{cat} , K_i of two specific inhibitors, AAZ and SFA, were found to be similar between the native and recombinant enzymes (Table II). AAZ and SFA were found to be typical competitive inhibitors for the malarial enzyme as determined by Dixon's plots (data not shown). The kinetic and inhibitory constants were different between the human and the parasite enzymes. These results suggest that the recombinant PfCA1 enzyme shows most properties similar to the native enzyme. The protein obtained here will be used for drug-screening tests and crystal structure analysis for a purpose of mechanism-based drug design in the near future.

TABLE II Comparison of kinetic parameters and inhibitory constants of human red cell CA II, native and recombinant *P. falciparum* carbonic anhydrases

Source	K_m^a (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	K_i^{AAZ} (nM)	K_i^{SFA} (μ M)
Human CA II	10.1 ± 0.8^b	74.1 ± 5.7	99 ± 6	145 ± 2
Native PfCA1	3.7 ± 0.2	10.4 ± 1.2	247 ± 14	56 ± 4
Recombinant PfCA1	5.6 ± 0.3	8.2 ± 1.6	315 ± 26	84 ± 10

^aThis assay is based on esterase assay using *p*-nitrophenylacetate as substrate. ^bThe values are mean \pm S.D., taken from 3–4 separate experiments of the enzyme preparations.