

การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ออโรเทตฟอสโฟไรโบซิล ทรานเฟอเรสของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ในสภาวะที่มีตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง

วรัญญา อิมประสิทธิ์ชัย^{1*}, จิระพันธ์ กริ่งไกร², สุดารัตน์ กริ่งไกร³, ภัสราวดี เผ่าจินดา⁴

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล
มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช กรุงเทพมหานคร

²ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

³ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

⁴ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร

*Corresponding author email: waranya@nmu.ac.th

ได้รับบทความ: 22 มิถุนายน 2566

ได้รับบทความแก้ไข: 15 กันยายน 2566

ยอมรับตีพิมพ์: 5 ตุลาคม 2566

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อหาสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของ
เอนไซม์ออโรเทต ฟอสโฟไรโบซิล ทรานเฟอเรสของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม

วิธีดำเนินการวิจัย ทำการสร้างดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดต่อยีนของเอนไซม์ออโร
เทต ฟอสโฟไรโบซิล ทรานเฟอเรสจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เข้าสู่พลาสมิท และ
เพิ่มจำนวนโดยใช้เซลล์เอสเชอริเชีย โคลิสายพันธุ์เอ็มสิบห้า (*Escherichia coli* M15;
E.coli M15) หลังการพิสูจน์ว่าเป็นยีนที่ต้องการ จึงทำการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์
และทำการแยกเอนไซม์ นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการทำงาน และทดสอบโดยโลหะ
ไอออนเพื่อดูการกระตุ้นการทำงาน และทดสอบโดย Orotidine 5'-Monophosphate
(OMP) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้ในปฏิกิริยาเพื่อศึกษาการยับยั้งการทำงาน

ผลการวิจัย การทำงานของเอนไซม์ออโรเทต ฟอสโฟไรโบซิล ทรานเฟอเรส จำเป็นต้องอาศัยโคแฟกเตอร์ ในการทำงาน ซึ่งโคแฟกเตอร์ที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์นี้มีประสิทธิภาพดี คือ Mg^{2+} ซึ่งมีค่า $V_{max} = 64.25 \mu\text{mol/min}$ และ $K_m = 58.82 \mu\text{M}$ และ ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยไม่มีโคแฟกเตอร์จะเท่ากับศูนย์ เมื่อมีการเปลี่ยนโคแฟกเตอร์เป็น Zn^{2+} ประสิทธิภาพการทำงานลดลงมาก โดยมีค่า $V_{max} = 9.35 \mu\text{mol/min}$ และ $K_m = 136.24 \mu\text{M}$ ส่วนการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ OMP ผลที่ได้คือเป็นการยับยั้งแบบย้อนกลับ สรุป การทำงานของเอนไซม์มี Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ ที่ช่วยทำให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์เป็นตัวยับยั้งการทำงานแบบย้อนกลับ

คำสำคัญ: พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม / ออโรเทต ฟอสโฟไรโบซิล ทรานเฟอเรส / ตัวกระตุ้น / ตัวยับยั้ง / ไอออนของโลหะ

Kinetic Study of *Plasmodium falciparum* Orotate Phosphoribosyl Transferase in the Presence of Activator and Inhibitor

Waranya Imprasittichai^{1*}, Jerapan Krungkrai², Sudaratana Krungkrai³,
Patsarawadee Paojinda⁴

¹ Department of Basic Medical Science, Faculty of Medicine Vajira Hospital,
Navamindradhiraj University, Bangkok

² Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University, Bangkok

³ Department of Medical Science, Faculty of Science,
Rangsit University, Patumthani

⁴ Department of Medical Technology, Faculty of Science and Technology,
Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok

*Corresponding author email: waranya@nmu.ac.th

Received: 22 June 2023

Revised: 15 September 2023

Accepted: 5 October 2023

Abstract

Objective: To find the chemicals which have the stimulating or inhibitory properties on orotate phosphoribosyl transferase enzymes (OPRT) of *Plasmodium falciparum*

Method: construction of *PfOPRT* gene was ligated in pQE 30Xa plasmid and transfer into *E. coli* M15 and prove the construct recombinant plasmid. After it was proved to be the desired gene, the enzyme was expressed and purified. The performance was tested and metal ions were tested for activation and Orotidine 5'-Monophosphate (OMP) reaction products for inhibition.

Result: The effective cofactor of OPRT is Mg^{2+} with $V_{max} = 64.25$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ and $K_m = 58.82$ μM and the enzyme activity without a cofactor is equal to zero. The cofactor was converted to Zn^{2+} , the OPRT activity was reduced was show $V_{max} = 9.35$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ and $K_m = 136.24$ μM . A reverse inhibition test was performed using the product obtained from the reaction OMP, resulting in a competitive inhibition of OPRT.

Keywords: *Plasmodium falciparum* / orotate phosphoribosyl transferase / activation / inhibition / metal ion

บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่มีการแพร่ระบาดในประเทศทางแถบเขตร้อนอย่างกว้างขวาง โดยพบการแพร่ระบาดของเชื้อมากที่สุดใแถบแอฟริกา รองลงมาคือเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ [1,2] ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อประมาณ 450 ล้านคน และตายจากการติดเชื้อประมาณ 1.5-2.7 ล้านคน [3] ถึงแม้องค์การอนามัยโลกพยายามทำการควบคุมการติดเชื้อจนทำให้มีจำนวนผู้ติดเชื้อลดลง แต่อัตราการตายยังคงเดิม [1] นอกจากนี้ยังมีการรายงานความเป็นพิษของยา [4] และการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาอยู่ในปัจจุบัน [5] อีกทั้งวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันโรคมมาลาเรียยังอยู่ในขั้นการทดลองยังไม่สามารถนำมาใช้ได้จริง [6] จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนายารักษามาลาเรียตัวใหม่ขึ้นมา ในการที่จะผลิตยาตัวใดตัวหนึ่งนั้นมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความรู้พื้นฐานทางด้านชีวเคมีของเชื้อพลาสโมเดียมที่ก่อให้เกิดโรคมมาลาเรีย เพื่อที่จะได้ยารักษามาลาเรียตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสามารถนำไปใช้ในการรักษาได้จริง

เชื้อก่อโรคมมาลาเรียที่พบในมนุษย์เป็นเชื้อปรสิตในจีสพลาสโมเดียม มีทั้งสิ้น 5 สปีชีส์ ได้แก่ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*), พลาสโมเดียม ไวแวก (*Plasmodium vivax*), พลาสโมเดียม โอวาเล่ (*Plasmodium ovale*), พลาสโมเดียม มาลาเรียอี (*Plasmodium malariae*) และ พลาสโมเดียม โนโซไน (*Plasmodium knowlesi*) [7] โดยสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคมมากที่สุด คือ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม [8] มียุงก้นปล่องเป็นพาหนะนำโรค โดยวงจรของเชื้อจะอยู่ในสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด ดังนี้ ยุงก้นปล่องและมนุษย์ โดยวงจรชีวิตของเชื้อเริ่มจากที่มนุษย์ได้รับเชื้อในระยะสปอโรซอยต์ (sporozoites) ที่อยู่ในต่อมน้ำลายของยุงก้นปล่องเข้าทางกระแสเลือด แล้วไปพักตัวอยู่ที่เซลล์ตับมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนโดยที่เชื้อในระยะนี้จะเรียกว่าชิซอนต์ (schizonts) จนมีปริมาณมากพอที่จะทำให้เซลล์ตับแตกออก และเชื้อก็เข้าสู่กระแสเลือดเติบโตเป็น เมโรซอยต์ (merozoite) เป็นช่วงที่ทำให้เกิดอาการของโรคมมาลาเรีย จากนั้นจะมีเชื้อบางส่วนเข้าสู่วงจรชีวิตแบบอาศัยเพศซึ่งเป็นระยะที่เรียกว่าแกมีโตไซต์ (gametocyte) ซึ่งมีเพศผู้และเพศเมีย เพศเมียเรียกว่า แมโครแกมีโตไซต์ (macrogametocyte), เพศผู้เรียกว่าไมโครแกมีโตไซต์ (microgametocyte) ถ้ายุงมาดูดเลือดในระยะนี้เข้าไปเชื้อมาลาเรียก็จะเข้าสู่กระเพาะของยุงเกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ได้ตัวอ่อนเป็นไซโกต (zygotes) เจริญเติบโตเป็นโอโอไคไนต์ (ookinetes) ไซผนังกระเพาะยุงสู่ด้านนอก กลายเป็น โอโอซิสต์ (oocyst) ซึ่งเติบโตจนสุดท้ายสร้างสปอโรซอยต์ เมื่อโอโอซิสต์แตก สปอโรซอยต์เข้าสู่ต่อมน้ำลายเจริญเป็นสปอโรซอยต์ระยะติดต่อ [9-11]

การทำจีโนมโปรเจกของเชื้อมาลาเรียได้ประสบความสำเร็จในปี ค.ศ. 2002 เป็นการลำดับเบสของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ทำให้ทราบว่าเชื้อมีโครโมโซม 14 คู่ ซึ่ง

ประกอบด้วย 5,300 ยีน [7] และมีปริมาณของเบส A และ T รวมกันมากกว่าเบส G และ C [12] ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีประโยชน์ในการนำไปศึกษาวิจัย เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียม

จากการศึกษาข้อมูลการทำจีโนมโปรเจกของเชื้อมาลาเรียทำให้พบบริเวณเป้าหมายที่เหมาะสมต่อการพัฒนายา ได้แก่ กระบวนการสังเคราะห์เบสไพริมิดีน ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เนื่องจากการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมจะสังเคราะห์ได้เฉพาะกระบวนการสร้างใหม่ (*de novo pathway*) เท่านั้นเนื่องจากขาดเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการรีไซเคิล (*salvage pathway*) [13-15,25] ซึ่งต่างจากกระบวนการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนในมนุษย์ที่จะสังเคราะห์ได้จาก 2 กระบวนการ คือ จากกระบวนการสร้างใหม่ (*de novo pathway*) และ ใช้วิธีรีไซเคิล (*salvage pathway*) [16] ดังนั้นการที่จะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งในกระบวนการสังเคราะห์เบสไพริมิดีนของเชื้อพลาสโมเดียม ก็จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

เอนไซม์ที่น่าสนใจต่อการศึกษาค้นคว้า คือ ออโรเทต ฟอสฟอโรโบซิลทรานเฟอร์ส (*orotate phosphoribosyl transferase: OPRT, EC 2.4.2.10*) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวที่ 5 ในการบวนการสังเคราะห์ไพริมิดีน โครงสร้างของเอนไซม์นี้ถ้านำไปเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดเดียวกันในมนุษย์จะพบว่า เอนไซม์ออโรเทต ฟอสฟอโรโบซิล ทรานเฟอร์ส ของเชื้อพลาสโมเดียมจะอยู่ในโครงสร้างที่เป็นหนึ่งโปรตีนหนึ่งการทำงาน (*monofunctional enzyme*) มีส่วนของยีนที่เพิ่มขึ้นมาบริเวณปลายและด้านในยีน ซึ่งเป็นข้อแตกต่างจากเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่พบในมนุษย์ และบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ในการที่จับกับเอนไซม์ออโรทีดีน 5'-โมโนฟอสเฟต ดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งทำให้เอนไซม์ทั้ง 2 ตัวทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น [17-23]

ออโรเทต ฟอสฟอโรโบซิล ทรานเฟอร์ส มีบทบาทในการเปลี่ยนออโรเทต (*orotate: OA*) และ 5-ฟอสเฟตโรโบซิล-1-ไพโรฟอสเฟต (*5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate: PRPP*) ได้เป็น โอโรทีดีน 5'-โมโนฟอสเฟต (*orotidine 5'-monophosphate: OMP*) และ ไพโรฟอสเฟต (*pyrophosphate: PP_i*) [17-19,24,31] โดยในปฏิกิริยาจะมีโลหะไอออนเป็นโคแฟกเตอร์ (*cofactor*) ได้แก่ แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ช่วยในการทำงานของออโรเทต ฟอสฟอโรโบซิล ทรานเฟอร์ส โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ถ้าไม่มี Mg^{2+} ออกจากปฏิกิริยาจะทำให้ไม่เกิดการดำเนินงานของออโรเทต ฟอสฟอโรโบซิล ทรานเฟอร์ส และยังพบอีกว่าการจับกันของออโรเทต ฟอสฟอโรโบซิล ทรานเฟอร์สกับ Mg^{2+} เป็นการจับกันด้วยแรงอ่อน ๆ [17-18,25-26] จากการศึกษเอนไซม์ออโรเทต ฟอสฟอโรโบซิล ทรานเฟอร์ส ในยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) พบว่า OA/Mg^{2+} -PRPP จับกันเป็นกลุ่มในรูปของ ternary complex [27,28] ดังนั้นจะสรุปได้ว่า

การทำงานของออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิล ทรานเฟอเรส มีความจำเป็นจะต้องอาศัยโลหะไอออนในปฏิกิริยา

จากการศึกษาข้อมูลของเชื้อพลาสมิเดียม ฟัลซิพารัมทำให้เห็นถึงความสำคัญของเชื้อนี้ต่อการแพร่ระบาดของในหมู่ประชากรของประเทศในแถบเขตร้อน รวมถึงประเทศไทยด้วย จึงเล็งเห็นถึงความสำคัญและจำเป็นในการหาวิธียับยั้งการแพร่ระบาด รวมทั้งการรักษาโรคมาลาเรีย โดยการคิดพัฒนาตัวยาใหม่เพื่อใช้กับการรักษาเชื้อที่คือต่อยาที่ใช้รักษาอยู่ในปัจจุบัน

วัสดุและวิธีการ

การวิจัยครั้งนี้เพื่อหาสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นและสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรสของเชื้อพลาสมิเดียม ฟัลซิพารัม

วิธีดำเนินการวิจัย

การตัดต่อและถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรส เข้าในเซลล์แบคทีเรีย นำยีน *PfOPRT* เชื่อมเข้ากับ pQE30Xa plasmid โดยอาศัยเอนไซม์ ligase จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ถ่ายเข้าไปในเซลล์ *E. coli* M15 นำเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาแอมพิซิลิน (ampicillin) 100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร และ กานามัยซิน (kanamycin) 10 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การคัดเลือกและตรวจสอบพลาสมิดหลังจากที่ถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คัดเลือกเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) นำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *BamHI* และ *HindIII* เพื่อเป็นการยืนยันเซลล์ว่ามีชิ้นยีนจริง ตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis

การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสมและการเตรียมโปรตีนลูกผสมให้บริสุทธิ์ นำเซลล์ที่มีส่วนของพลาสมิดลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB เหลว ปริมาตร 1 ลิตร มียาแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร และ กานามัยซิน 10 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.4 เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนโดย 1mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18

ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเซลล์ที่ได้ ไปเติม lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10% glycerol, 1% triton x-100, 0.1%(w/v) lysozyme, 0.1% RNase and protease inhibitor cocktail) แตกเซลล์ด้วยเครื่อง sonicator นำไปปั่นแยกเซลล์ออก เก็บส่วนใสเข้าสู่การทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน 2 กระบวนการ คือ Ni²⁺-NTA affinity chromatography และ Hi-trap Q HP anion-exchange column โดยมีการปรับความเข้มข้นของ NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 150, 250 และ 500 mM เพื่อชะล้างโปรตีนออกจาก column ตรวจสอบโดย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การทดสอบจลนศาสตร์ของเอนไซม์ออโรเทต ฟอสโฟไรโบซิลทรานเฟอเรส นำเอนไซม์ออโรเทต ฟอสโฟไรโบซิล ทรานเฟอเรส ที่ผ่านกระบวนการเพิ่มความบริสุทธิ์ไปทดสอบค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์ โดยการใช้ OA และ PRPP เป็นสารตั้งต้น วัดการทำงานของเอนไซม์โดยศึกษาการลดลงของ OA ที่ความยาวคลื่น 285 นาโนเมตร โดยเครื่อง UV spectrophotometer

การทดสอบจลนศาสตร์ของเอนไซม์ในสภาวะที่มีตัวกระตุ้น และสภาวะที่มีตัวยับยั้ง วัดการทำงานของเอนไซม์โดยการเติมตัวกระตุ้นได้แก่ กลุ่มของโลหะไอออน ได้แก่ Mg²⁺ และ Zn²⁺ และวัดการทำงานของเอนไซม์โดยการเติม OMP โดยการทดลองจะมีการเปลี่ยนหลายความเข้มข้นเพื่อนำมาคำนวณหารูปแบบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสมการ Michaelis-Menten

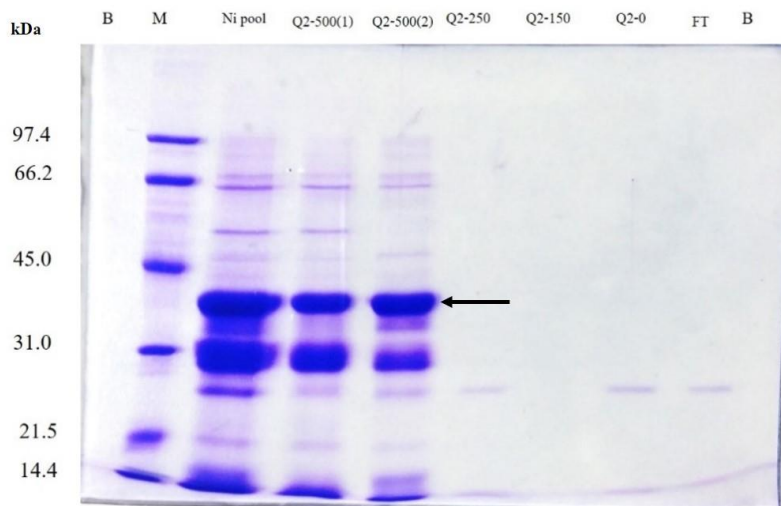
ผลการศึกษา

การคัดเลือกและตรวจสอบพลาสมิดหลังจากที่ถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสมจากพลาสมิดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับตำแหน่ง ด้านหน้าและ ด้านหลัง OPRT โดย BamHI และ HindIII ตามลำดับ จากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่าจะได้เส้นดีเอ็นเอลูกผสม ที่มีขนาด 843 bp ซึ่งเป็นขนาดของ OPRT

การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสมและการเตรียมโปรตีนลูกผสมให้บริสุทธิ์

การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม OPRT โดยการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Ni-NTA affinity column และจากนั้นนำไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยการนำไปผ่าน Hi-Trap Q anion exchange chromatography แล้วนำไปตรวจสอบผ่าน SDS-PAGE electrophoresis จะได้แถบโปรตีนที่ขนาด 33 kDa (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 SDS-PAGE electrophoresis ของเอนไซม์ OPRT ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA affinity column และ Hi-Trap Q anion exchange chromatography โดย Lane B: Blank, Lane M: Low Range Protein Ladder, Lane Ni-pool: การทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Ni-NTA affinity column, Lane Q2-500(1): 500 mM NaCl ครั้งที่ 1, Lane Q2-500(2): 500 mM NaCl ครั้งที่ 2, Lane Q2-250: 250 mM NaCl, Lane Q2-150: 150 mM NaCl, Lane Q2-0: 50mM TrisHCl pH 8.0 and Lane FT: flow through

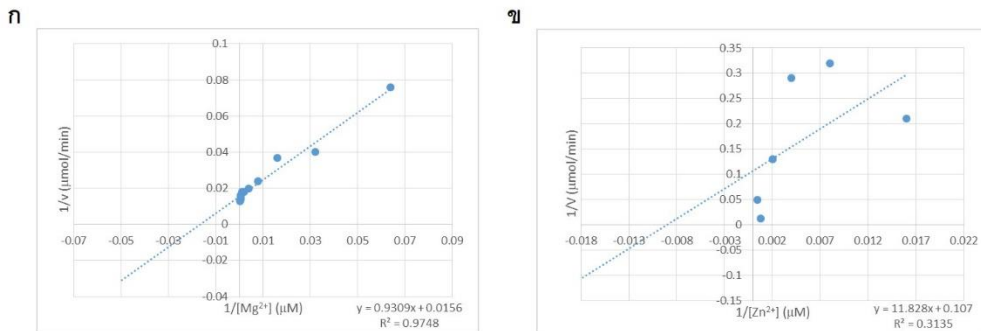
การทดสอบจลนศาสตร์ของเอนไซม์ออโรเทต ฟอสโฟไรโบซิลทรานเฟอเรส

การทำงานของเอนไซม์ OPRT เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Ni-NTA affinity column การทำงานของเอนไซม์มีค่า เท่ากับ 379.505 nmol/min และเมื่อนำไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นค่าการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 328.995 nmol/min เท่ากับค่า recovery ร้อยละ 86.69

การทดสอบจลนศาสตร์ของเอนไซม์ในสถานะที่มีตัวกระตุ้น และสถานะที่มีตัวยับยั้ง

การทดสอบในสถานะที่มีตัวกระตุ้น โดยการใส่สารที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ OPRT โดยใช้ Mg^{2+} และ Zn^{2+} จากการทดลองพบว่า Mg^{2+} ส่งเสริมให้การทำงานของเอนไซม์ OPRT สูงกว่าการใช้ Zn^{2+} และเอนไซม์จะไม่ทำงานโดยไม่มีโคแฟกเตอร์ ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยมี Mg^{2+} มีค่า $V_{max} = 64.25 \mu\text{mol}/\text{min}$ และ $K_m = 58.82 \mu\text{M}$ และ Zn^{2+} มีค่า $V_{max} = 9.35 \mu\text{mol}/\text{min}$ และ $K_m = 136.24 \mu\text{M}$ (ภาพ

ที่ 2) การทดสอบในภาวะที่มีตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยการใช้ OMP คือ $= 26.56 \pm 3.41$ nM



ภาพที่ 2 ก. Lineweaver-Burk plots แสดงจลนศาสตร์ของเอนไซม์ OPRT ในภาวะที่มี Mg²⁺

ข. Lineweaver-Burk plots แสดงจลนศาสตร์ของเอนไซม์ OPRT ในภาวะที่มี Zn²⁺

วิจารณ์

ในการเลือกใช้วิธีการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยการใช้ Ni-NTA affinity column จะได้โปรตีนที่ต้องการ เนื่องจากที่บริเวณปลายด้านหมู่อะมิโน (N-terminus) มี 6xHistidine tag ซึ่งจับกับ Ni-NTA affinity column ได้ดีกว่า โปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย *E. Coli* ที่เป็น host cell และการเลือกใช้ Hi trap Q anion exchange chromatography ในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการแยกโปรตีนที่เราต้องการออกจากโปรตีนโดยการใช้ประจุที่อยู่บนโครงสร้างของโปรตีนในการแยกสาร โดยอาศัยความเข้มข้นของ NaCl ในการชะเอาโปรตีนที่มีประจุบนผิวโปรตีนต่างกันออกมาในแต่ละความเข้มข้นของ NaCl ที่เปลี่ยนไป ทำให้สามารถแยกโปรตีนที่ต้องการได้ จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการแยกโปรตีนลูกผสม OPRT ด้วยวิธีการ Ni-NTA affinity column และ Hi trap Q anion exchange chromatography จะได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และโปรตีนที่ได้สามารถทำงานได้ [17-19] แต่การทำให้บริสุทธิ์จะส่งผลให้ปริมาณโปรตีนลดลง แต่เป็นผลดีที่ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์มีค่ามากขึ้น

ในการทำงานของเอนไซม์ออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรส จะมีการใช้ Mg²⁺ เป็นโคแฟกเตอร์ในการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งจากการวัดประสิทธิภาพการทำงานของ

เอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยจำแนกเป็น 3 กรณี คือ ใช้ Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์, Zn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ และการวัดการทำงานของเอนไซม์โดยที่ไม่ใส่โคแฟกเตอร์พบว่าการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์ออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรสสามารถทำงานได้ดีที่สุดในภาวะที่มี Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ ส่วนการไม่มีโคแฟกเตอร์ จะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ หรือทำงานได้เพียงเล็กน้อย ส่วนการใช้ Zn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ ส่งผลให้เอนไซม์ออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรส ในระดับต่ำ และไม่คงที่ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ เมื่อใช้ Zn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ ค่าการทำงานของเอนไซม์จะลดลง และลักษณะการทำงานของเอนไซม์ไม่แปรผันไปตามความเข้มข้นของ Zn^{2+} เมื่อเทียบกับการใช้ Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งต่างจากรายงานการวิจัยของ Bhatin et al., 1993; Victor et al., 1979 ทำการศึกษาปฏิกิริยาของ ไฮโปแซนทีน-กัวนีน ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรส (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: HGPRT) พบโคแฟกเตอร์ที่สามารถทำงานร่วมในปฏิกิริยาได้ คือ Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} และ Zn^{2+} ที่ Zn^{2+} สามารถนำมาแทน Mg^{2+} เอนไซม์ก็ยังคงทำงานได้ แต่จากการทดลองที่ทางกลุ่มผู้วิจัยได้ลงมือปฏิบัติกลับพบว่า Zn^{2+} ไม่สามารถทำให้การทำงานของเอนไซม์ออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรส มีประสิทธิภาพสูงเท่าเทียมกับการใช้ Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ [25-26] และจากการทดลองของ Bhatin et al., 1993, Stefano Donini et al., 2017 ที่ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ OPRT ใน yeast OPRT และ *Mycobacterium tuberculosis* OPRT นอกเหนือจาก Mg^{2+} ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ OPRT แล้ว ยังมี Mn^{2+} และ Fe^{3+} ที่ส่งผลให้เอนไซม์ทำงานได้ ซึ่งการทดลองโดยการเปลี่ยนโคแฟกเตอร์จะไม่มีผลต่อการจับกันของสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการเกิดปฏิกิริยา [25,28]

ในส่วนของการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรส แบ่งเป็นการยับยั้งการทำงานโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา โดยในปฏิกิริยาการทำงานของออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรสจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น OMP และ PP_i ในการศึกษาการยับยั้งโดยการใช้ OMP ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนไซม์ในปริมาณสูง จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบย้อนกลับ (feedback inhibition) ชนิดแข่งขัน (competitive inhibitor) โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารตั้งต้นไปหลายๆค่า จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การทำงานของเอนไซม์ออโรเทต ฟอสฟอไรโบซิลทรานเฟอเรส ใช้สารตั้งต้น (substrate) ในปฏิกิริยา 2 ตัว คือ PRPP และ OA ถ้ามีกำหนดความเข้มข้นของ PRPP ให้คงที่ และเปลี่ยนความเข้มข้นของ OA ไปหลายๆค่า จะพบว่า PP_i เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) OMP มี

คุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) [17-18] โดยงานวิจัยนี้เป็นแนวทางพื้นฐานเพื่อนำไปต่อยอดในงานวิจัยในด้านการผลิตยาต้านมาเลเรีย

การทำงานของเอนไซม์มี Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ ที่ช่วยในการทำให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และ ผลิตภัณฑ์ OMP ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์เป็นตัวยับยั้งการทำงานแบบย้อนกลับ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนส่งเสริมวิจัยทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ปี 2558

เอกสารอ้างอิง

1. World malaria report 2022. Geneva: World Health Organization. 2022.
2. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 2005;434(7030):214-7.
3. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. The New England journal of medicine 2009;361(5):455-67.
4. Ridley RG. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. Nature 2002;415(6872):686-93.
5. White NJ. Antimalarial drug resistance. The Journal of clinical investigation 2004;113(8):1084-92.
6. Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. Malaria journal 2012;11:11.
7. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature 2002;419(6906):498-511.
8. Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, et al. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. PLoS medicine 2010;7(6):e1000290.
9. Burton J. Bogitsh, & CEC, Oeltmann TN. Human Parasitology. New York:

- Elsevier; 2005.
10. Bray RS, Garnham PC. The life-cycle of primate malaria parasites. *British medical bulletin* 1982;38(2):117-22.
 11. Markell E, Voge M. *Medical parasitology*. 4 ed. Philadelphia: WB Saunders; 1976.
 12. Frugier M, Bour T, Ayach M, Santos MA, Rudinger-Thirion J, Théobald-Dietrich A, et al. Low Complexity Regions behave as tRNA sponges to help co-translational folding of plasmodial proteins. *FEBS letters* 2010; 584(2):448-54.
 13. Gero AM, O'Sullivan WJ. Purines and pyrimidines in malarial parasites. *Blood cells* 1990;16(2-3):467-84.
 14. Krungkrai J, Cerami A, Henderson GB. Pyrimidine biosynthesis in parasitic protozoa: purification of a monofunctional dihydroorotase from *Plasmodium berghei* and *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* 1990;29(26): 6270-5.
 15. Reyes P, Rathod PK, Sanchez DJ, Mrema JE, Rieckmann KH, Heidrich HG. Enzymes of purine and pyrimidine metabolism from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 1982;5(5):275-90.
 16. Huang M, Graves LM. De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emergin emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 2003;60(2):321-36.
 17. Krungkrai SR, Prapunwattana P, Horii T, Krungkrai J. Orotate phosphoribosyl transferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase exist as multienzyme complex in human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *Biochemical and biophysical research communications* 2004;318(4):1012-8.
 18. Krungkrai SR, Aoki S, Palacpac NM, Sato D, Mitamura T, Krungkrai J, et al. Human malaria parasite orotate phosphoribosyltransferase: functional expression, characterization of kinetic reaction mechanism and inhibition profile. *Molecular and biochemical parasitology* 2004;134(2):245-55.
 19. Krungkrai SR, DelFraino BJ, Smiley JA, Prapunwattana P, Mitamura T, Horii

- T, et al. 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* 2005;44(5):1643-52.
20. Kanchanaphum P, Krungkrai J. Kinetic benefits and thermal stability of orotate phosphoribosyl transferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase enzyme complex in human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:337-41.
21. Paojinda P, Imprasittichai W, Krungkrai SR, Palacpac NMQ, Horii T, Krungkrai J. Bifunctional activity of fused *Plasmodium falciparum* orotate phosphoribosyl transferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Parasitol Int* 2018;67(1):79-84.
22. Imprasittichai W, Krungkrai SR, Krungkrai J, Paojinda P. Expression and enzyme kinetic of fused *Plasmodium falciparum* orotate phosphoribosyl transferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase in different *Escherichia coli*. *Open Biochem. J* 2023;17:1-8.
23. Imprasittichai W, Roytrakul S, Krungkrai SR, Krungkrai J. A unique insertion of low complexity amino acid sequence underlines protein-protein interaction in human malaria parasite orotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Asian Pac J Trop Med* 2014;7:184-92.
24. Krungkrai J, Prapunwatana P, Wichitkul C, Reungprapavut S, Krungkrai SR, Horii T. Molecular biology and biochemistry of malarial parasite pyrimidine biosynthetic pathway. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 2003;34:32-43.
25. Bhatia MB, Grubmeyer C. The Role of Divalent Magnesium in Activating the Reaction Catalyzed by Orotate Phosphoribosyltransferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993;303(2):321-5.
26. Victor J, Leo-Mensah A, Sloan DL. Divalent metal ion activation of the yeast orotate phosphoribosyltransferase catalyzed reaction. *Biochemistry* 1979;18(16):3597-604.

27. Gonzalez-Segura L, Witte JF, McClard RW, Hurley TD. Ternary Complex Formation and Induced Asymmetry in Orotate Phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* 2007;46(49):14075-86.
28. Donini S, Ferraris DM, Miggiano R, Massarotti A, Rizzi M. Structural investigations on orotate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme of the de novo pyrimidine biosynthesis. *Scientific reports* 2017;7(1):1-11.
29. Rathod PK, Leffers NP, Young RD. Molecular targets of 5-fluoroorotate in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1992;36(4):704-11.
30. Scott HV, Gero AM, O'Sullivan WJ. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by pyrazofurin, an inhibitor of pyrimidine biosynthesis de novo. *Molecular and biochemical parasitology* 1986;18(1):3-15.
31. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, Binka F, et al. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *The Lancet Infectious diseases* 2002;2(9):564-73.