# การทำให้บริสุทธิ์ และการศึกษาคุณลักษณะของ เอนไซม์ไดไฮโดรออโรเทท ดีไฮโดรจีเนสในพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม

นางสาวณัฐประภา สุริยมณฑล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-582-451-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019647

# PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE IN PLASMODIUM FALCIPARUM

Miss Nattaprapa Suriyamontol

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Medical Science
Graduate School
Chulalongkorn University
1993

ISBN 974-582-451-8

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Purification and Characterization of Enzyme Dihydroorotate Dehydrogenase in Plasmodium falciparum. |
| By | Miss Nattaprapa Suriyamontol |
| Department | Medical Science |
| Thesis Advisor | Assistant Professor Jerapan Krungkrai, Ph.D |

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree of Science.

Thavorn Vajaraphaya Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajaraphaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Bungorn Chomdej Chairman
(Associate Professor Bungorn Chomdej, M.D.)

Jerapan Krungkrai Thesis Advisor
(Assistant Professor Jerapan Krungkrai, Ph.D.)

Songsak Petmitr Member
(Assistant Professor Songsak Petmitr, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว



ณัฐประภา สุริยมณฑล : การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ ไดไฮโดร-ออโรเทท ดีไฮโดรจีเนส ในพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE IN PLASMODIUM FALCIPARUM) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร, 90 หน้า ISBN 974-582-451-8

ไพริมิดีนเบสเป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิก ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต สำหรับในเชื้อมาลาเรียการสร้างไพริมิดีนเบสเกิดขึ้นเองในตัวเชื้อ กระบวนการนี้ประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยเรียงตามลำดับกัน โดยแต่ละปฏิกิริยาย่อยมีเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การศึกษาครั้งนี้มุ่งศึกษาเอนไซม์ลำดับที่ 4 ของกระบวนการสังเคราะห์ไพริมิดีนเบสคือเอนไซม์ไดไฮโดรออโรเทท ดีไฮโดรจีเนส (DHODase) ในเชื้อมาลาเรียของคนชนิดพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (P.falciparum) เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียโดยใช้เอนไซม์นี้เป็นตำแหน่งเป้าหมาย

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ DHODase ใน P.falciparum ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยสาร Triton X-100 จากส่วนตะกอน จากนั้นติดตามด้วย anion-exchange, Cibacron Blue F3GA-Agarose affinity และ gel filtration chromatography ด้วยเครื่องแยกโปรตีนประสิทธิภาพสูง ได้ผลดังนี้คือ เอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบเท่ากับ 55±5 กิโลดาลตันโดยการใช้เทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis และเท่ากับ 53±6 กิโลดาลตันโดยการใช้เทคนิค gel filtration chromatography เอนไซม์นี้เป็น monofunctional protein ที่มีปลาย N ที่ถูกปิดกั้น. Specific activity ของเอนไซม์นี้ในส่วน detergent solubilization มีค่าเฉลี่ย 3.30+2.61 nmol/min/mg (n=13) Specific enzyme activity มีค่าสูงที่สุดในเชื้อ ระยะ trophozoite และเอนไซม์นี้จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสมากกว่าที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส. ค่า Km ของเอนไซม์นี้ต่อสับเสตรท L-dihydroorotate (L-DHO) เท่ากับ 88.7±24.1 ไมโครโมล และค่า Kcat เท่ากับ 0.36±0.04 ต่อนาที, เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ของสาร 2 ชนิดได้แก่ 5-fluoroorotic acid และ 5-methylorotic acid พบว่ามี 50% inhibition ที่ความเข้มข้น 0.16 และ 5.41 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต ณัฐประภา สุริยมณฑล

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [illegible]

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม —

## C345055 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEY WORD: DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE/PLASMODIUM FALCIPARUM
NATTAPRAPA SURIYAMONTOL : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE IN PLASMODIUM FALCIPARUM. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. JERAPAN KRUNGKRAI, Ph.D. 90 pp.
ISBN 974-582-451-8

The growth of malarial parasite in erythrocytes requires a supply of purine and pyrimidine nucleotides for production of nucleic acids. Dihydroorotate dehydrogenase (DHODase), the fourth sequential enzyme in the de novo biosynthesis of pyrimidine, has been shown to be a particulate enzyme that catalyzed the oxidation of dihydroorotate (DHO) to orotate (OA). This thesis is focused on this aspect of parasite metabolism, pyrimidine biosynthesis through purification and characterization of the enzyme DHODase in Plasmodium falciparum (P.falciparum) in expectation that these studies will provide a basis for the development of novel antimalarial compound.

DHODase has been purified from P. falciparum by Triton X-100 solubization followed by anion-exchange, Cibacron Blue F3GA-Agarose affinity and gel filtration chromatography on a fast protein liquid chromatographic system. The purified enzyme had a relative molecular weight of 55 ± 5 kDa on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and of 53±6 kDa by gel filtration chromatography.The enzyme was found to be a monofunctional protein and had N-teminal blocked.The specific activity of the enzyme in Triton X-100 solubilization was 3.30+2.61 nmol/min/mg (n=13). Their specific activities and protein concentrations were highest in trophozoite stage parasite and the enzyme was more stable at -196 degree celsius than -20 degree celsius. The Km value for L-dihydroorotate of the enzyme was 88.7±24.1 µM and Kact value was 0.36 ± 0.04 per min. Analogs of the reaction product, 5-fluoroorotic acid and 5-methylorotic acid were competitive inhibitors with 50 % inhibition concentrations at 0.16 and 5.41 nM, respectively.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา Medical Science ลายมือชื่อนิสิต Nattaprapa Suriyamontol

สาขาวิชา Biochemistry ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [signature]

ปีการศึกษา 1992 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม —

# ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest and sincere gratitude and appreciation to Assistant Professor Jerapan Krungkrai, my advisor, for his invaluable and constructive advice and criticisms which enabled me to fulfill my Master of Science study. Without his guidance, the present study would not have been successfully accomplished.

Grateful appreciation is extended to Mrs. Sudarattana Krungkrai for her valuable advises and suggestions on laboratory technique. My thanks are also extended to Mrs. Paktiya Tangtatsawasdi for her valuable technical advice and providing some instruments in HPLC analysis.

I am in debt to all of all of the teaching staff in Department of Biochemistry, Faculty of Medicine Chulalongkorn University, for their valuable comments.

My acknowledgement is extended to all of all of the staff in Department of Biochemistry, Faculty of Medicine Chulalongkorn University and also all my friends for their encouragements and enjoyments.

The success of thesis is devoted to my understanding father and mother who continuously providing me with their encouragements which are one of the key factors of this success. My appreciation is also extended to my brother and sister who bear with me during all these times.

My sincere thank to Mr. Ueychai Tantha-Obhas for helping me preparing this paper and his encouragement until this thesis is completed.

This work is partially supported by the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases and Mahitlathibeth Fund.

LIST OF CONTENTS

Page

LIST OF TABLES.....IX

LIST OF FIGURES.....X

ACKNOWLEDGEMENT.....XII

ABSTRACT (THAI).....XIII

ABSTRACT (ENGLISH).....XIV

ABBREVIATIONS.....XV

INTRODUCTION

The Malaria Parasite.....1

Biology and Biochemistry of Malaria

1.Life cycle and Intraerythrocytic Stages of Malaria.....4

2.Biochemistry of Malaria

2.1.Glycolysis.....7

2.2.Pentose Phosphate Pathway.....8

2.3.Tricarboxylic Acid Cycle (Krebs cycle).....8

2.4.Amino Acid Metabolism and Protein Synthesis.....9

2.5.Phospholipid and Cholesterol Metabolism.....10

2.6.Genome Organization and Nucleic Acid Synthesis.....11

Page

OBJECTIVES..... 16

MATERIALS AND METHODS

1.Materials..... 17

2.Procedure for Handling P.falciparum Culture

2.1.Preparation of Stock RPMI 1640 Medium..... 19

2.2.Preparation of Sodium Bicarbonate, 5% (W/V)..... 19

2.3.Preparation of Human Serum..... 19

2.4.Preparation of Culture Medium..... 20

2.5.Preparation of Red Cells for Culture..... 20

2.6.Cultivation of P.falciparum..... 21

2.7.Changing Culture Medium..... 22

2.8.Parasitemia Determination

2.8.1.Geimsa's Stain..... 22

2.8.2.Phosphate Buffer..... 23

2.8.3.Staining..... 23

2.9.Synchronization of Culture..... 24

2.10.Cryopreservation of Malarial Parasites

2.10.1.Freezing

a) The Freezing Solution..... 24

b) Freezing Procedure..... 25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

2.10.2.Thawing.....25

2.11.P.falciparum Strain Used in the Experiment.....26

3.Procedure for Preparation of P.berghei Infected Mouse Red Cells.....26

4.Procedure for Quantitation of Protein

4.1.Reagent Preparation

4.1.1.Dye Reagent.....27

4.1.2.Protein Standard.....28

4.2.Sample Preparation.....28

5.Procedure for Enzyme Assay.....29

6.Procedure for Enzyme Purification

6.1.Parasite Preparation.....29

6.2.Enzyme Purification

6.2.1.Membrane Extraction.....30

6.2.2.Detergent Solubilization.....30

6.2.3.FPLC on Anion-Exchange Column.....31

6.2.4.Cibacron Blue F3GA-Agarose Affinity Column Chromotography.....31

6.2.5.FPLC on Gel Filtration Superose 12 Column.....31

Page

7.Procedure for Electrophoresis

7.1.Electrophoretic Buffer and Gel

7.1.1.SDS–PAGE Reagents.....32

7.1.2.Separating (Running) Gel.....33

7.1.3.Stacking Gel.....33

7.1.4.Running Buffe.....33

7.1.5. 2X Sample Buffer (SDS Reducing Buffer).....34

7.2.Coomassie Blue R Staining.....34

7.3.Destaining Solution.....34

7.4.Silver Staining.....35

8.Procedure for Goat Antimouse – Gold (GAM–Gold) Conjugated Immunoblot Assay

8.1.Solutions Used for the Immunoblot Assay

8.1.1.Blotting Buffer.....37

8.1.2.Tris Buffer Saline (TBS). .....37

8.1.3.Washing Solution (TTBS).....37

8.1.4.Blocking Solution (3% Gelatin – TBS).....38

8.1.5. 1% Gelatin TTBS.....38

8.1.6.Secondary Antibody Buffer.....38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

8.2.Electroblotting.....38

8.3.Antibody Staining.....39

9.Study of Specific Activity of Dihydroorotate Dehydrogenase (DHODase) and Protein Concentration in Ring, Trophozoite and Schizont Stages of P.falciparum.....40

10.Study of Physical and Kinetic Properties of the Enzyme

10.1.Molecular Weight Determination.....44

10.2.Study of Stability of the Enzyme.....44

11.Study of Kinetic Properties of the enzyme.....45

12.Study of Inhibitor of the Enzyme.....45

RESULTS

1.Demonstration of Enzyme Dihydroorotate Dehydrogenase in P.falciparum.....46

2.Purification of P.falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase.....51

3.Properties of Purified Dihydroorotate Dehydrogenase

3.1.Stability of Dihydroorotate Dehydrogenase.....58

3.2.Kinetic Parameters Determination.....58

Page

3.3.Inhibitor Studies.....58

3.4.Molecular Weight Determination.....64

3.5.$NH_2$-Terminal Sequence Analysis.....65

DISCUSSION.....70

SUMMARY.....77

REFERENCES.....78

BIOGRAPHY.....90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# LIST OF TABLES

Page


Table 1: Specific DHODase Activity in Crude Homogenate and detergent Solubilizations of P.falciparum.....47

Table 2 : Specific DHODase activity and protein concentration in Ring, Trophozoite and Schizont Stages of P.faciparum.....48

Table 3 : Purification of DHODase fron P.falciparum.....53

Table 4 : The Result of the Study of DHODase's stability at – 20°C and –196°C.....59

Table 5 : Kinetic Parameter Studies of P.falciparum DHODase.....61

Table 6 : The Results of the Study of Inhibition Ability of Two Compounds; .....63

Table 6a: 5–Fluoroorotic Acid (FOA)

Table 6b: 5–Methylorotic Acid ($CH_3OA$)


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES


Page

Fig. 1 Pyrimidine Biosynthesis Pathway.....3

Fig. 2 The Life Cycle of The Malaria Parasite.....6

Fig. 3a Ring stage parasite of P.falciparum.....41

Fig. 3b Trophozoite stage parasite of P.falciparum.....42

Fig. 3c Schizont stage parasite of P.falciparum.....43

Fig. 4 Specific DHODase activity and protein concentration in ring, trophozoite and schizont stage of P.faciparum.....49

Fig. 5 Western analysis pattern of Triton X-100 solubilized extract of P.falciparum probed with mouse-anti-DHODase antiserum.....50

Fig. 6 Profile of DHODase activity of P.falciparum, eluted from an anion - exchange Mono Q column of FPLC system.....54

Fig. 7 Profile of DHODase activity of P.falciparum after Mono Q column, eluted from a Cibacron Blue F3GA-Agarose affinity column of FPLC system.....55

Fig. 8 SDS-PAGE pattern of purification steps of P.faciparum DHODase.....56

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of P.falciparum DHODase .....57

Fig. 10 The result of stability study of P.falciparum DHODase at -20°C (freezer) and -196°C (liquid nitrogen).....60

Fig. 11 Michaelis Menten Kinetics and Lineweaver - Burk plot (inset) of P.falciparum DHODase.....62

Page

Fig. 12 Standard curve for molecular weight determination on immunoblotting techniques (SDS–PAGE).....66

Fig. 13 Gel–filtration chromatography (Superose 12) pattern of standard molecular weight markers.....67

Fig. 14 Standard curve for molecular weight determination on gel filtration chromatography (Superose 12).....68

Fig. 15 Profile of DHODase activity of P.falciparum after affinity column eluted from a gel filtration Superose 12 column of FPLC system.....69

Fig. 16 Proposed conversion of dihydroorotate to orotate.....71

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ABBREVIATIONS

| | |
|---|---|
| anh. | anhydrous |
| °C | degree celsius |
| cm | centimeter |
| $CO_2$ | carbondioxide |
| Da | dalton |
| DHODase | dihydroorotate dehydrogenase |
| $\epsilon$ | epsilon |
| g | centrifugal force |
| h | hour |
| Hb | hemoglobin |
| kDa | kilodalton |
| l | liter |
| M | molar |
| mg | milligram |
| min | minute |
| ml | milliliter |
| mM | millimolar |
| mm | millimeter |
| mol | mole |
| µl | microliter |
| µM | micromolar |
| µm | micrometer |
| N | normal |
| $N_2$ | nitrogen |
| nmol | nanomole |
| OD | optical density |
| $O_2$ | oxygen |
| rpm | round per minute |
| sec | second |
| V/V | volume by volume |
| W/V | weight by volume |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย