STUDY OF ACTIVE-SITE SPECIFICITY OF PLASMODIUM FALCIPARUM PLASMEPSINS

PILAIWAN SIRIPURKPONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003

ISBN 974-04-2876-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P637a
2003
c.2

ก.17 ป.14

Copyright by Mahidol University

STUDY OF ACTIVE-SITE SPECIFICITY OF PLASMODIUM FALCIPARUM PLASMEPSINS

PILAIWAN SIRIPURKPONG 4137603 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: PRAPON WILAIRAT, Ph.D., JIRUNDON YUVANIYAMA, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D.

ABSTRACT

Plasmepsins I and II (PM I and II) are aspartic proteases involved in the initial steps of hemoglobin degradation in the food vacuole of *Plasmodium* parasite. These proteins are validated drug targets for antimalarial chemotherapy approved by WHO. The two enzymes are 73% identical, but have different substrate and inhibitor specificities. The X-ray structures of pro and mature forms of PM II are available, whereas the structure of PM I has not been determined yet. To understand the differences in the selectivity of the two enzymes, we have identified nine amino-acid residues, which are in proximity of pepstatin inhibitor in the PM II active site and whose sequences differ from those of PM I. These residues of PM II were mutated to the cognate amino acids of PM I. Kinetic parameters for substrate (*K*m, *k*cat, *k*cat/*K*m) and inhibitors (*K*i or IC_{50}) for the PM II-mutant were similar to those of wildtype PM II. Cleavage specificity was assessed using hemoglobin or a random decamer peptide library as substrate. Again, PM II-mutant behaved like PM II-WT rather than PM I-WT. These results suggest that differences in plasmepsin specificity might depend more on conformational differences of active site caused by distant amino acids than on specific variation in active-site amino acids.

KEY WORDS : PLASMEPSIN/ SPECIFICITY/ ACTIVE SITE CONFORMATION

175 P. ISBN 974-04-2876-2

Copyright by Mahidol University

การศึกษาความจำเพาะในบริเวณเร่งของเอนไซม์พลาสเมปซินใน *Plasmodium falciparum* (STUDY OF ACTIVE-SITE SPECIFICITY OF PLASMODIUM FALCIPARUM PLASMEPSINS)

พิไลวรรณ ศิริพฤกษ์พงษ์ 4137603 SCBD/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., จิรันดร ยูวะนิยม, Ph.D., Dr. Gerd Katzenmeier, Ph.D.

บทคัดย่อ

มาลาเรียเป็นโรคที่พบในเขตร้อน ซึ่งมีสาเหตุมาจากปรสิตพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. falciparum* ซึ่งเป็นปรสิตที่ดื้อต่อยาหลายชนิด ปัจจุบันได้มีการศึกษาพัฒนายาตัวใหม่เพื่อฆ่าปรสิตชนิดนี้ พลาสเมปซิน (plasmepsin) เป็นเอนไซม์ในปรสิตซึ่งพบว่าเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจกลุ่มหนึ่งในการผลิตยามายับยั้งการทำงานของเอนไซม์และมีผลทำให้ปรสิตตาย พลาสเมปซิน 1 และ 2 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม aspartic protease ซึ่งมีความสำคัญในขบวนการย่อยฮีโมโกลบินใน food vacuole ของปรสิตเพื่อนำเอากรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยสลายนี้มาใช้เป็นแหล่งพลังงาน เอนไซม์สองตัวนี้มีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกันมากถึง 73 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความแตกต่างกันของความจำเพาะ (specificity) ในบริเวณเร่ง (active site) ต่อสับสเตรท (substrate) และสารยับยั้ง (inhibitor) ปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาและหาโครงสร้าง (X-ray structure) ของ พลาสเมปซิน 2 ได้แล้วแต่โครงสร้างของพลาสเมปซิน 1 ยังไม่มีผู้ใดทราบและยากที่จะทำการตกผลึกโปรตีนนี้ (Protein crystallization) เราได้วิเคราะห์กรดอะมิโนในบริเวณเร่งของพลาสเมปซิน 2 จากโครงสร้างของโปรตีนที่ทราบแล้วเพื่อหากรดอะมิโนที่แตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ทั้งสองโดยเปรียบเทียบจากลำดับของกรดอะมิโน และได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน 9 ตัวในบริเวณเร่งของพลาสเมปซิน 2 ให้เป็นกรดอะมิโนที่พบใน พลาสเมปซิน 1 และให้ชื่อว่า พลาสเมปซิน 2-mutant หลังจากนั้นได้ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ (kinetic properties) ของพลาสเมปซิน 2-mutant กับ พลาสเมปซิน 1 และ 2 wild type โดยใช้ เปปไทด์ที่สามารถตรวจวัดโดยการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ (Fluorogenic peptide substrate) เป็นสับสเตรท นอกจากนั้นยังศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ทั้งสามตัวนี้โดยใช้ฮีโมโกลบินและ random peptide library เป็นสับสเตรท ผลการศึกษาทั้งหมดออกมาในทำนองเดียวกันว่า พลาสเมปซิน 2-mutant ยังมีคุณสมบัติเหมือน พลาสเมปซิน 2-wild type มากกว่าพลาสเมปซิน 1-wild type จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าความแตกต่างของความจำเพาะในบริเวณเร่งของเอนไซม์พลาสเมปซินทั้งสองต่อสับสเตรทหรือสารยับยั้งอาจจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของรูปร่างในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (ความกว้างหรือแคบของปากในบริเวณเร่ง) อันเนื่องมาจากความแตกต่างของกรดอะมิโนที่อยู่ไกลออกไปจากบริเวณเร่งนี้ มากกว่าความแตกต่างของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์โดยตรง

175 หน้า. ISBN 974-04-2876-2

Copyright by Mahidol University