LIBRARY AND INFO
MAHIDOL UNI.

9 AUG 1996

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF DNA REPLICATING ENZYMES FROM HUMAN MALARIA PARASITE, *PLASMODIUM FALCIPARUM*

SUPATRA LEELAPHIWAT

With compliments
of
.....

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

Copyright by Mahidol University

TH
S959p
1996

26095

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งตัวของดีเอนเอ จากเชื้อมาลาเรียของคน, พลาสโมเดียมฟัลซิปารั่ม

ผู้วิจัย สุพัตรา ลีลาภิวัฒน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph.D.

วรชาติ สิรวราภรณ์, ปร.ด.

วันที่สำเร็จการศึกษา 10 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียที่เป็นอันตรายต่อคนที่สำคัญที่สุดเกิดจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่ม ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการควบคุมและรักษาโรคนี้ เกิดจากการดื้อต่อยาที่ใช้รักษาแทบทุกชนิด วิธีหนึ่งที่จะช่วยแก้ไขปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้คือ การค้นคว้าหายาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น และการเลือกหาเอนไซม์เป้าหมายใหม่ที่สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดยยาชนิดนั้นแล้วมีผลทำให้เชื้อมาลาเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้

ในการศึกษานี้ เอนไซม์ 2 ตัว ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการแบ่งตัวของดีเอนเอของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่มได้ถูกนำมาศึกษา เอนไซม์ทั้งสองนี้ได้แก่ เอนไซม์ดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรส II และเอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรสแกมมา เอนไซม์ดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรส II ได้จากการสกัดโดย FPLC ด้วยการใช้ Econo Pac Q, heparin - agarose และ Mono Q column พบว่า

Copyright by Mahidol University

สามารถแยกสกัดได้บริสุทธิ์ 3 เท่า และได้ปริมาณเอนไซม์บริสุทธิ์ 25% เมื่อวิเคราะห์เอนไซม์ที่ได้โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเอนไซม์ดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรส II ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่มนี้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160 กิโลดาลตัน ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกันกับเอนไซม์ดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรสที่สกัดจากเซลล์ eukaryotic ชนิดอื่น ๆ และ จากการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรส II ที่สกัดจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่มกับ Polyclonal antibody ดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรส II ของคน พบว่า เอนไซม์ทั้งสองนี้มีความแตกต่างกันในส่วนของ C-terminal

ส่วนการแยกสกัดเอนไซม์ ดีเอนเอ โพลีเมอเรสแกมมาโดย FPLC ด้วย column Econo Pac Q และ Mono S นั้น แม้ว่าเอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรส แกมมาซึ่งดื้อต่อ aphilicolin จะไม่สามารถแยกออกจากเอมไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรสที่ไวต่อ aphilicolin แต่ยังคงพบว่ามีโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล 150 kDa ปรากฏเด่นชัดขึ้นตามลำดับขั้นตอนการแยกสกัดเอนไซม์และจากการศึกษาลำดับการเรียงตัวของโปรตีนของเอนไซม์ ดีเอนเอโพลีเมอเรสแกมมาของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่ม โดยวิธี automatic Edman degradation พบว่า ทางด้าน N-terminal มีลำดับการเรียงตัวของโปรตีน 9 ตัวแรกเป็น Met Glu Asn Lys Glu Lys Val Leu Asp (MENKEKVLD).

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Purification and Characterization of DNA Replicating Enzymes from Human Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum*

Name Supatra Leelaphiwat

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Prapon Wilairat, Ph D

Worachart Sirawaraporn, Ph D

Date of Graduation 10 May B E 2539 (1996)

ABSTRACT

Plasmodium falciparum, the most virulent of the four human malaria parasites, has now developed resistance to nearly all of the widely available antimalarial drugs Thus development of new antimalarial drugs and identification of potential target enzymes are urgently needed

Two enzymes involved in DNA replication of *P falciparum*, DNA topoisomerase II and DNA polymerase γ, were chosen as possible target enzymes in this study DNA topoisomerase II was partially purified by FPLC using three columns Econo Pac Q, heparin-agarose, Mono Q The fold purification was 3 with 25 % yield Silver staining of SDS-polyacrylamide gel showed that the size of *P falciparum* DNA topoisomerase II was 160 kDa which was similar to that

Copyright by Mahidol University

observed in other eukaryotes Reaction with a commercial polyclonal anti-human topoisomerase II antibody showed that *P. falciparum* topoisomerase II did not share a common C-terminal epitope

Purification of DNA polymerase γ was conducted using two columns of FPLC Econo Pac Q and Mono S Although activity of *P. falciparum* DNA polymerase γ (aphidicolin-resistant) could not be separated from aphidicolin-sensitive DNA polymerase, a band of 150 kDa become prominent during the purification steps N-terminal sequencing of this putative DNA polymerase γ by Edman degradation showed an assignment of Met Glu Asn Lys Glu Lys Val Leu Asp (MENKEKVLD)

Copyright by Mahidol University