LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
7 JUL 1993

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DNA POLYMERASES AND DNA TOPOISOMERASE II FROM PLASMODIUM FALCIPARUM

PORNTIP CHAVALITSHEWINKOON

อภินันทนาการ
จาก
"มหาวิทยาลัยมหิดล"

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)

IN

Copyright by Mahidol University

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

23233

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ดีเอนเอโพลี - เมอเรสและดีเอนเอโทโปไอโสเมอเรส II จากเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิปารั่ม

ผู้วิจัย พรทิพย์ ชวลิตชีวินกุล

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

ธนิต คูสำราญ, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 19 พฤษภาคม พ.ศ. 2536

บทคัดย่อ

เชื้อมาลาเรียฟัลซิปารั่ม เป็นเชื้อโปรโตซัวตัวหนึ่งที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคมาลาเรียมากที่สุดในบรรดาเชื้อมาลาเรียด้วยกัน ปัญหาการดื้อยารักษามาลาเรียแทบทุกชนิดของเชื้อฟัลซิปารั่ม ทำให้ต้องมีการค้นคว้าหายาฆ่าเชื้อมาลาเรียชนิดใหม่และค้นหาเอนไซม์เป้าหมายใหม่ เพื่อการรักษาโรคมาลาเรียพร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ชนิดนั้นทั้งในระดับชีวเคมีและระดับโมเลกุลอีกด้วย

เอนไซม์เป้าหมายใหม่ที่ทำการศึกษาครั้งนี้ เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการแบ่งตัวของดีเอนเอได้แก่ ดีเอนเอโพลีเมอเรสและดีเอนเอโทโปไอโสเมอเรส II จากการสกัดเอนไซม์จากเชื้อฟัลซิปารั่มโดยใช้ FPLC พบว่ามีเอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรสอยู่อย่างน้อย 2 ชนิด คือ ดีเอนเอโพลีเมอเรสที่มีคุณสมบัติของไพรเมสอยู่ด้วย ดังนั้นเอนไซม์นี้ควรจะเป็นดีเอนเอโพลีเมอเรสอัลฟา นอกจากนี้การทดสอบด้วยตัวยับยั้งชนิดต่างๆ ผลที่ได้ก็สนับสนุนว่าเอ็นไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรสนี้เป็นชนิดอัลฟาอย่างแน่นอน ยกเว้นผลของ ButylphenyldGTP ที่

Copyright by Mahidol University

IC_{50} สูงกว่าของดีเอนโพลีเมอเรสอัลฟาจาก eukaryotes ทั่วๆ ไป ซึ่งแสดงว่ามีความแตกต่างระหว่างเอนไซม์ของเจ้าบ้านและของเชื้อฟัลซิปารั่ม เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งคือ ดีเอนเอโพลีเมอเรสแกมม่า ซึ่งคุณสมบัติต่างๆ เหมือนกับเอนไซม์ชนิดนี้ใน eukaryotes อื่นๆ นอกจากนี้ดีเอนเอโพลีเมอเรสอัลฟาของเชื้อฟัลซิปารั่มถูกยับยั้งได้ด้วย diphosphorylated (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine (IC_{50}= 40 ไมโครโมลาร์)และดีเอนเอโพลีเมอเรสแกมม่า ถูกยับยั้งได้มากกว่าเอนไซม์ชนิดอัลฟาประมาณ 40 เท่า

ส่วนดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรส II ของเชื้อฟัลซิปารั่มได้ถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์โดย FPLC การทำงานของเอนไซม์ต้องการ ATP และ Mg^{2+} และเอนไซม์ทำงานได้สูงสุดเมื่อมี 100 mM KCl ในปฏิกิริยา camptothecin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรส I ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่การทำงานของเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งได้ด้วยตัวยับยั้งดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรส-II ของ prokaryotes และ eukaryotes

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง และผลของยา 9 - anilinoacridines ต่อเชื้อฟัลซิปารั่มในหลอดทดลองพบว่า การที่มีอะมิโนกรุ๊ปที่ตำแหน่งคาร์บอน ตัวที่ 3 และ 6, lipophilicity ต่ำ และ pKa สูง สามารถเพิ่มความสามารถในการยับยั้งของยาได้ ทั้งนี้ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการจับกับดีเอนเอของยาและฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย สารที่มีความสามารถสูงสุด และมีพิษต่ำสุดคือ 3,6-Diamino-1-amino-9-anilino acridine ซึ่งสารนี้และ pyronaridine สามารถยับยั้งการทำงานของดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรส IIได้ในหลอดทดลอง

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Isolation and Characterization of DNA Polymerases and DNA Topoisomerase II from Plasmodium falciparum
Name	Porntip Chavalitshewinkoon
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	
	Prapon Wilairat, Ph.D.
	Sakol Panyim, Ph.D.
	Thanit Kusamran, Ph.D.
Date of Graduation	19 May B.E. 2536 (1993)

ABSTRACT

Plasmodium falciparum is the sporozoan parasite that causes the most serious form of human malaria. Widespread multi-drug resistance raises an urgent need for new antimalarial drugs and investigation of potential target enzymes at the biochemical and molecular level.

Two enzyms involving DNA replication, DNA polymerases and DNA topoisomerase II, were chosen as possible target enzymes in this study. Fractionation of Plasmodium falciparum cellular extracts by FPLC identified at least two different DNA polymerases. One DNA polymerase fraction co - purified with a primase activity and therefore contained DNA polymerase α. Its sensitivity to a range of inhibitors was consistent with this conclusion.

Copyright by Mahidol University

The only exception was its relative resistance to Butyl-phenyl dGTP indicating possible structural differences between host and parasite DNA polymerase α. The other DNA polymerase matched eukaryotic DNA polymerase ϑ in all properties tested in this study. DNA polymerase α-like enzyme was inhibited by diphosphorylated (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)adenine with an IC_{50} at 40 μM and a ϑ-like DNA polymerase was 40-fold more sensitive.

DNA topoisomerase II was partially purified by FPLC. The enzyme showed ATP-and Mg^{2+}-dependent activities in a decatenation assay and the highest activity was detected in the presence of 100 mM KCl. Enzyme activity was not inhibited by the DNA topoisomerase I inhibitor, camptothecin, but was sensitive to both prokaryotic and eukaryotic DNA topoisomerase II inhibitors.

An *in vitro* investigation of the structure - activity profiles for a range of 9-anilinoacridines on drug-resistant *Plasmodium falciparum* showed that C-3, 6-diamino substitution, low lipophilicity, and high pKa values substantially increased inhibitory activity and there appeared to be no correlation with DNA binding. 3, 6-Diamino-1'-amino-9-anilinoacridine was the most active and least toxic compound. It and pyronaridine, a 9-anilino-aza-acridine inhibited decatenation activity of parasite DNA topoisomerase II.

Copyright by Mahidol University