T137078

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA/14/2543

ชื่อโครงการ: การแยกสกัดและศึกษาสมบัติของเอนไซม์ดีเอนเอเฮลิเคสจากเชื้อมาลาเรียฟัลซิปารั่ม

ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร.พรทิพย์ เพ็ชรมิตร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address: tmppm@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี ตั้งแต่ 1 ธันวาคม 2542- 30 พฤศจิกายน 2545

เชื้อมาลาเรียในร่างกายของคนเรานั้นจะมีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วทั้งในระยะที่อาศัยอยู่ในเซลล์ตับและระยะในเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขณะที่มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อมาลาเรียนั้นต้องมี DNA replication เกิดขึ้นซึ่งต้องอาศัยการทำงาน ของ DNA helicase ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะทำงานวิจัยเพื่อให้ทราบถึงความรู้พื้นฐานของ DNA helicase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่แยกดีเอ็นเอสายคู่(double-stranded DNA) ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว 2 สาย(single-stranded DNA) ถ้าเราสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ได้ก็จะส่งผลทำให้เชื้อมาลาเรียไม่สามารถแบ่งตัวและเจริญเติบโตต่อไป โดยแยกสกัด DNA helicase จาก *Plasmodium falciparum*(K1 strain)จากการเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณมากและนำ nuclear extrat ผ่าน column ชนิดต่างๆและ fast protein liquid chromatography system (FPLC) และตรวจหา DNA helicase activity ซึ่งใช้ [α^{32}P] labelled partial duplex DNA ซึ่งได้แก่ oligonucleotide ที่ anneal อยู่กับ single-stranded circular M13mp19 ซึ่งจะตรวจหา product (labelled oligonucleotide) ได้โดยใช้ 20% nondenaturing polyacrylamide gel แล้วนำไปทำ autoradiography แล้ววัดปริมาณของ DNA unwinding หลังจากที่ได้ทำการแยกสกัดเอนไซม์ DNA helicase ที่ผ่านมาพบว่ามี DNA helicase อยู่อย่างน้อย 2 ชนิดตามคุณสมบัติของทิศทางการทำงานของเอนไซม์ (directionality) คือ 5'-3' และ 3'-5' เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการใช้ partial duplex DNA และ fork-liked substrate ที่แตกต่างกันแต่ช้ blunt-ended substrateไม่ได้เหมือนกัน เมื่อทดสอบกับ DNA helicase inhibitors ชนิดต่างๆพบว่า 5'-3' และ 3'-5' DNA helicses มีIC_{50} ของยาต่างๆคือ aclarubicin = 4x 10^{-6}และ 9x 10^{-6} M daunorubicin=7.5x 10^{-6} และ 2x 10^{-6} M doxorubicin = 3.6 x 10^{-6} และ 8 x 10^{-6} M ตามลำดับ แต่ DNA binders ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ประมาณ 6 ชนิดไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ของเอนไซม์ทั้งสอง (IC_{50} >10^{-5} M) นอกจากนั้นยังพบว่ายังมี DNA helicase ใน 80% ammonium sulfate อีกหนึ่งชนิดซึ่งต้องทำให้บริสุทธิ์และทำการศึกษาต่อไป ส่วนของ 55% ammonium sulfate มี DNA helicases อีกอย่างน้อย 2 ชนิดดังนั้นในอนาคตควรจะมีการศึกษาและจำแนกชนิดของเอนไซม์เหล่านี้เพิ่มเติมเพื่อที่จะได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ที่สุดเกี่ยวกับ DNA helicases ในเชื้อมาลาเรียฟัลซิปารั่ม

TE 137078

ABSTRACT

Project Code: RSA/14/2543

Project Title: Isolation and characterization of DNA helicases from *Plasmodium falciparum*

Investigator: Assoc.Prof. Dr. Porntip Petmitr Faculty of Tropical Medicine Mahidol University

E-mail Address: tmppm@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years (1 December 1999- 30 November 2002)

Most of antimalarial drugs is rapidly losing their effectiveness. There is an urgent need for new antimalarial drugs so intensified investigation of potential target enzymes should be performed. Since, DNA helicases can catalyze the unwinding of double stranded DNA to provide single stranded templates for DNA replication, repair and recombination so DNA helicases may serve as possible target enzymes combating malaria. In this study, there was at least two types of DNA helicases were isolated and purified from *Plasmodium falciparum* namely 5'-3' and 3'-5' DNA helicases. 5'-3' DNA helicase was isolated from *Plasmodium falciparum* (K1 strain) then various columns were used to puriy the isolated enzymes under fast protein liquid chromatography system. DNA helicase activity was detected by measuring the unwinding of ^{32}P-labeled partial duplex DNA. The product was separated by 20% non-denaturing gel electrophoresis and visualized by auto-radiography. 5'-3' and 3'-5' DNA helicases prefered differently in using partial dupex DNA and fork-liked DNA as substrates however both of them showed the same property of their inability to unwind blunt-ended duplex DNA. DNA helicase inhibitors such as aclarubicin, daunorubicin, and doxorubicin, were tested against *P. falciparum* 5'-3' and 3'-5' DNA helicases and IC_{50} values were 4.0×10^{-6} and 9.0×10^{-6} for aclarubicin, 7.5×10^{-6} and 2×10^{-6} M for daunorubicin, 3.6×10^{-6} and 8×10^{-6} M for doxorubicin respectively. Both 5'-3' and 3'-5' DNA helicases were not inhibited by six synthetic DNA binder compounds at 10^{-5} M. In addition, one type of DNA helicase in 80% ammonium sulfate precipitation and two more types of enzymes were found in 55% ammonium sulfate precipitation but have not yet been purified and characterized therefore purification and characterization of three unknown enzymes should be done in order to obtain new knowledge and clearly understand types and important roles of all types of DNA helicases in *P. falciparum*.