รหัสโครงการ SUT3-304-53-24-03

รายงานการวิจัย

การโคลน และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ DNA helicase จากเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นเป้าหมายของยารักษาโรคมาลาเรียตัวใหม่

Cloning and Characterization of Malarial DNA helicase : a novel anti-malarial drug target

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-53-24-03

รายงานการวิจัย

การโคลน และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ DNA helicase จากเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นเป้าหมายของยารักษาโรคมาลาเรียตัวใหม่

Cloning and Characterization of Malarial DNA helicase : a novel anti-malarial drug target

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ ดร. พัตรา สุนทรฐิติเจริญ

หมวดวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๕๓ - ๒๕๕๔

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กุมภาพันธ์ ๒๕๕๙

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๓ ถึง ๒๕๕๔ โดยมีกรรมการประเมินข้อเสนอโครงการจากการวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติ ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร. พรทิพย์ เพ็ชรมิตร ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดลที่ได้ช่วยให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ด้วยดีตลอดมา และให้ใช้ห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยบางส่วน อีกทั้งขอขอบคุณ นายวิษณุ ศรีลา นักวิจัยประจำห้องปฏิบัติการอณูเทคโนโลยีชีวภาพ มทส ที่ได้ช่วยลงมือทำการวิจัยในส่วนการโคลนและผลิตเอนไซม์จนเป็นผลสำเร็จ รวมทั้งนักวิจัยคนอื่นในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร. นันทนิจ จารุเศรณีย์ และนางสาวณัชฌา พฤกษาเมธานันท์ นอกจากนี้แล้วยังขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ นางสาวเพ็ญสุดา สมภูงา นางสาวสุภมาส บัณฑิตสาธิสรรค์ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการ เป็นอย่างดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เป็นเชื้อโปรโตซัว ที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรีย ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญโรคหนึ่ง ในเขตร้อน และกึ่งร้อน ของโลก อีกทั้งยังเป็นโรคที่ยังต้องการยารักษาที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากเชื้อมีการดื้อยา การผลิตวัคซีนต่อโรคยังไม่ประสพผลสำเร็จ และ การกำจัดยุงพาหะก็ยังมีปัญหา เนื่องจากมีการดื้อต่อยากำจัดยุง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่จะต้องหาเป้าหมายใหม่ของยา เพื่อการรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพมากกว่าที่มีอยู่ในปัจจุบัน หนึ่งในเป้าหมายที่น่าสนใจคือ เอนไซม์ ดี เอน เอ เฮลิเคส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คลายเกลียว ดีเอนเอ เพื่อให้สามารถทำกิจกรรมต่างๆ ซึ่งมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดได้ โครงการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเอนไซม์เฮลิเคส ตัวใหม่ ที่ยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยมาก่อน โดยเริ่มตั้งแต่การโคลน การแสดงออก และวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ ของ เอนไซม์ ซึ่งเตรียมได้จาก จากยีน Pfl0910w ผลการวิจัยพบว่าสามารถทำการโคลน และ แสดงออกเอนไซม์โดยใช้ระบบการแสดงออกใน *อี โคไล* ได้สำเร็จ เรียกเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมาได้ว่า PfDHA86 โดยพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ที่ระดับ ๐.๓๙๕ มิลิกรัม ต่อ สารเลี้ยงเชื้อ ๑ ลิตร โดยเอนไซม์ ดีเอนเอ เฮลิเคส ปรับแต่งพันธุกรรมที่ผลิตขึ้นมาได้มีขนาด ๘๕.๕ กิโลดาลตัน ผลจากการวิเคราะห์คุณสมบัติในการทำกิจกรรมพบว่า สามารถทำงานได้ดีเมื่อใช้พลังงานจากการย่อย ATP, ทำงานลดลงเล็กน้อยเมื่อใช้ dATP, และทำงานได้น้อยเมื่อใช้ dCTP, dGTP, dTTP เป็นแหล่งพลังงาน อีกทั้งยังต้องการ Mg^{2+} ในการทำงาน และถูกยับยั้งการทำงานโดย 200 mM KCl, 200 mM NaCl และ EDTA เอนไซม์สามารถคลายเกลียว ดีเอนเอ สายคู่ ทั้งแบบสายสั้นและสายยาว จากการศึกษาผลของยา ในการทำงานของเอนไซม์พบว่า ยา ในกลุ่มแอนทราไซคลิน ได้แก่ daunorubicin และ doxorubicin สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ โดยมีค่า IC_{50} ของ daunorubicin และ doxorubicin เท่ากับ 30 และ 23 μM ตามลำดับ องค์ความรู้ที่ได้นี้จะสามารถใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียตัวใหม่ และยังเป็นองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเอนไซม์ เฮลิเคสในสิ่งมีชีวิต เชิงลึก อีกด้วย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Plasmodium falciparum is causative agent of malaria. It is one of the most important tropical diseases of public health in tropical and subtropical area. The new antimalarial drug is needed for the disease because there are still many problems, such as drug resistance, lack of effective vaccine, and mosquito resistance to insecticide. Therefore, there is an urgent need for a new drug target. DNA helicase is an essential enzyme for various DNA metabolisms that involve the separation of double stranded DNA to single stranded DNA. Therefore, this enzyme could be a competent new drug target. This aim of this study is to clone, express and characterize DNA helicase from *Pfl0910w* gene. The yield of the recombinant enzyme was 0.395 mg/L of culture volumn. The purified recombinant enzyme was about 85.5 kDa. Unwinding of DNA helicase activity was driven by hydrolysis of ATP and slightly decreased when dATP was used as an energy source. Almost no unwinding activity was detected when ATP was replaced with dCTP, dGTP or dTTP. The unwinding activity was depended on Mg^{2+}, and inhibited by 200 mM KCl, 200 mM NaCl and EDTA. This DNA helicase could unwind both short and long partial duplex DNA substrates. The study of drug inhibitory effect indicated that Antracycline, namely, Daunorubicin and Doxorubicin could inhibit the unwinding activity of Pfl0910w, with the IC_{50} for Daunorubicin and Doxorubicin at 30 and 23 μM, respectively. The knowledge obtained from this study could be the basis for the development of a novel anti-malarial drug as well as for more insight into the molecular biology and biochemistry of DNA helicases in general living organisms.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ **3**

บทคัดย่อภาษาไทย **4**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ **5**

สารบัญ **6**

บทที่ ๑ : บทนำ **8**

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 8

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 9

ขอบเขตของการวิจัย 9

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 9

บทที่ ๒: ทบทวนวรรณกรรม และ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง **11**

บทที่ ๓ : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย **14**

ผลการทำ Cloning and expression of DNA helicase 14

ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน 14

ผลการผลิตและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ DNA Helicase Pfl0910w 15

ผลการทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ 17

การเตรียมสารตั้งต้นสำหรับ DNA helicase assay 17

5' labeled helicase substrate 17

Standard DNA helicase assay 17

การเตรียม blunt ended duplex DNA helicase substrate 17

การเตรียม substrate ต่างๆ 18

ทำการ label oligonucleotide ตามวิธี 5' labeled helicase substrate เพื่อเตรียม substrate ชนิดต่างๆ และ anneal กับ single stranded M13mp18 DNA 18

บทที่ 4 : บทสรุป **28**

สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย 28

ข้อเสนอแนะ 30

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย **31**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก **34**

ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน 34

๑. ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ 34

๒. ผลงานเผยแพร่ในรูปแบบอื่นๆ 34

ภาคผนวก ข การผลิตบุคลากร 35

ประวัติผู้วิจัยหลัก **41**

ประวัติผู้วิจัยร่วม **42**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ ๑ : บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อปรสิต *Plasmodium* ที่เกิดได้ทั้งในคนและสัตว์ ซึ่งยังเป็นปัญหาอย่างมากในประเทศเขตร้อนชื้นรวมทั้งประเทศไทย จากรายงานล่าสุดพบว่าโรคนี้มีอัตราการติดเชื้อสูงถึง 500 ล้านคนต่อปี และมีอัตราการตายมากกว่าหนึ่งล้านคน [1, 2] โดยโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* เป็นชนิดที่ร้ายแรงที่สุด เนื่องจากมีการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ต่อยาต้านมาลาเรียเกือบทุกชนิดที่ใช้ในปัจจุบัน รวมถึงการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคก็ยังอยู่เพียงในขั้นเริ่มต้น [3] นอกจากนั้นยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคก็ยังดื้อต่อยาฆ่าแมลงด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่จะต้องพัฒนายาใหม่และหาเป้าหมายใหม่ในการออกฤทธิ์ของยา การพัฒนายาต้านมาลาเรียมีหลายวิธี เช่นการปรับเปลี่ยนและพัฒนาจากยาเดิมที่ใช้กันอยู่ การพัฒนายาให้มีความซับซ้อนน้อยลงและสังเคราะห์ง่ายขึ้น รวมทั้งการหายาใหม่จากเป้าหมายใหม่ โดยเป้าหมายใหม่ที่น่าสนใจอันหนึ่งคือ เอนไซม์ ดีเอ็นเอเฮลิเคส (DNA helicase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในขบวนการต่างๆ ของดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด รวมทั้งเชื้อมาลาเรียด้วย DNA helicase ทำหน้าที่แยก DNA สายคู่ให้เป็น DNA สายเดี่ยวโดยการสลายพันธะไฮโดรเจน เพื่อใช้ในขบวนการ metabolism ของทั้ง DNA และ RNA [2] เช่น DNA replication, recombination, repair ซึ่งเป็นกลไกที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียมีความซับซ้อน และมีขบวนการ ที่ต้องใช้ DNA helicase ในหลายขั้นตอน เช่น หลังจากที่เชื้อเข้าสู่เซลล์ตับ, ระหว่าง schizogony ในเซลล์เม็ดเลือดแดง, ระหว่าง gametogenesis, หลังจาก fertilization และ ใน oocysts ดังนั้น DNA helicase จึงเป็นเป้าหมายที่ดีสำหรับการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรีย

จากผลการศึกษาวิจัยเบื้องต้น โดย คณะของผู้วิจัยร่วม ได้ค้นพบ PfDH A เป็น DNA helicase ที่ได้จากเชื้อ *P. falciparum* ในระยะ schizont มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90 kDa มีทิศทางการทำงานโดยแยกสาย DNA จาก 3' – 5' DNA helicase [4] แต่พบในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องผลิตเป็น recombinant enzyme ให้ได้ในปริมาณมากเพียงพอ เพื่อใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเอนไซม์นี้ และคุณสมบัติต่างๆ รวมทั้งศักยภาพในการเป็นเป้าหมายของยาตัวใหม่ และความสามารถในการถูกยับยั้งด้วย inhibitor ต่างๆ โครงการวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาองค์ความรู้ใหม่เพื่อต่อยอดจากการค้นพบในเบื้องต้น ซึ่งเป็นการ clone, express และผลิต recombinant DNA helicase ให้ได้ปริมาณที่เพียงพอที่จะใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ดังกล่าว ซึ่งนอกจาก helicase inhibitor ที่ค้นพบจากโครงการนี้อาจสามารถพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียตัวใหม่ได้แล้ว ยังเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของ DNA helicase รวมทั้งบทบาทของเอนไซม์นี้ในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ DNA helicase จากเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งเป็นเป้าหมายของยารักษาโรคมาลาเรียตัวใหม่ เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่เชิงลึกเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเอนไซม์ DNA helicase และบทบาทในวงจรชีวิตเชื้อมาลาเรีย รวมทั้งการพัฒนายารักษาโรคมาเลเรียตัวใหม่ โดยแบ่งเป็นวัตถุประสงค์ย่อยต่างๆ ดังนี้

1.1 เพื่อทำการ clone และ express ยีนสำหรับ DNA helicase จาก *Plasmodium falciparum*

1.2 เพื่อทำการผลิต recombinant DNA helicase ให้ได้เป็นจำนวนมาก และ purify เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

1.3 เพื่อศึกษาลำดับของยีน โครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของ เอนไซม์ DNA helicase

1.4 เพื่อศึกษาความต้องการการใช้สารต่างๆ ในการทำงานของเอนไซม์

1.5 เพื่อศึกษาการทำงานของ DNA helicase โดยใช้สารตั้งต้นต่างๆ

1.6 เพื่อศึกษาหาสารยับยั้งการทำงานของ DNA helicase เพื่อเป็นต้นแบบ (lead) ในการพัฒนายาต้านมาลาเรียตัวใหม่ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการโคลนยีน DNA helicase จากยีน Pfl0910w ซึ่งเป็น DNA helicase ของเชื้อ *P. falciparum* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 85.5 kDa [4] โดยจะทำการโคลนยีน เพื่อผลิตเป็น recombinant DNA helicase โดยใช้ *E. coli* expression system จากนั้นทำการ purify ให้ได้ปริมาณมากเพียงพอเพื่อที่จะทำการวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ดังที่ได้กล่าวไว้ในวัตถุประสงค์ และวิธีการดำเนินการวิจัยของโครงการต่อไป

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ดีเอ็นเอเฮลิเคส (DNA helicase) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด รวมทั้งเชื้อมาลาเรีย [2] วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียมีความซับซ้อน และมีขบวนการ ที่ต้องใช้ DNA helicase ในหลายขั้นตอน เช่น หลังจากที่เชื้อเข้าสู่เซลล์ตับ, ระหว่าง schizogony ในเซลล์เม็ดเลือดแดง, ระหว่าง gametogenesis, หลังจาก fertilization และ ใน oocysts ดังนั้น DNA helicase จึงเป็นเป้าหมายที่ดีสำหรับการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรีย โดยเฉพาะ DNA helicase ในกระบวนการ replication ในระหว่างขบวนการ schizogony ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อกำลังแบ่งโครมาตินและไซโตพลาสมเรียกว่าระยะ schizont และเมื่อระยะ schizont แตกออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงจะทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการจับสั่น ระยะ schizont เป็นระยะที่มักไม่พบในกระแสเลือด เนื่องจากในระยะนี้เชื่อว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อจะมีปุ่ม (knob) เกิดกระจายบนผิวเม็ดเลือดจึงทำให้สามารถยึดติดกับ receptor complex บน endothelial cell และ ทำให้ผนังของหลอดเลือดฝอยที่อวัยวะภายในเกิดอุดตันโดยกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในหลายอวัยวะ [5] และถึงแม้ว่าในมนุษย์และสัตว์อื่นๆ ก็มี DNA helicase เช่นกัน แต่น่าจะมีโครงสร้าง หน้าที่ และคุณสมบัติเฉพาะที่

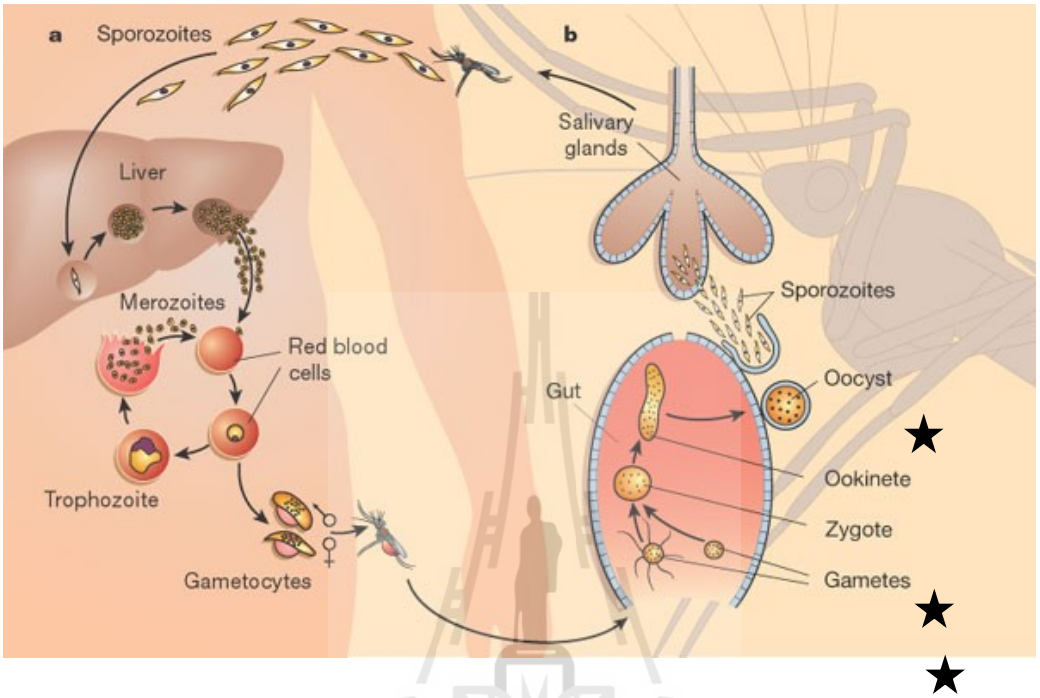
แตกต่างกันออกไปตามลำดับการวิวัฒนาการ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะสามารถหายาที่จะยับยั้งเฉพาะ DNA helicase ของเชื้อมาลาเรียอย่างเฉพาะเจาะจง เพื่อพัฒนาเป็นยารักษามาลาเรียตัวใหม่ต่อไปได้ โดยในปัจจุบัน ยีโนมของ *P. falciparum* ได้รับการ sequence เรียบร้อยแล้ว ดังนั้นการ clone ยีนของเอนไซม์ PfDH A จึงสามารถทำได้ไม่ยาก นอกจากนั้นแล้วเคยมีตัวอย่างความสำเร็จในการ express DNA helicase ชนิด PfDH60 [6] PfH45 มาก่อน ใน *E. coli* expression system มาก่อน [7] โดยสำหรับ PfDH45 [8] นั้นมีรายงานว่าต้องทำการปรับลำดับเบสให้เหมาะสมก่อนจึงสามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากขึ้น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่โครงการวิจัยนี้จะประสบความสำเร็จ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ ๒: ทบทวนวรรณกรรม และ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

มาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Plasmodium* มี 5 species ที่ทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale* และ *P. knowlesi* อัตราการติดเชื้อสูงถึง 500 ล้านคนต่อปี และอัตราการตายมากกว่าหนึ่งล้านคน [1, 2] *P. falciparum* เป็นชนิดที่ร้ายแรงที่สุด เนื่องจากมีการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมต่อยาต้านมาลาเรียเกือบทุกชนิดที่ใช้ในปัจจุบัน รวมถึงการศึกษาด้านวัคซีนป้องกันโรคก็ยังไม่สำเร็จ แม้ว่าปัจจุบันมีการผลิตวัคซีนที่กระตุ้นการป้องกันโดยการฉีด *Plasmodium falciparum* sporozoite โดยการให้ยุงกัด ก็ยังอยู่ในระหว่างอยู่ในระหว่างการทดลอง และต้องการการผลักดันให้มี phase 1 clinical trial [3] นอกจากนั้นยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคก็ยังดื้อต่อยาฆ่าแมลงด้วย [9] การดื้อยาต้านมาลาเรียเกิดจากหลายปัจจัยเช่น การใช้ยาต้านมาลาเรียสำหรับ prophylaxis ที่ไม่เหมาะสม การใช้ยาไม่ครบตามปริมาณที่กำหนด ปรสิตมีการปรับปรุงสายพันธุ์ในระดับยีนและ metabolism เช่น chloroquine เป็นยาต้านมาลาเรียที่ราคาถูกและรักษาได้ผลดี แต่เมื่อปี 1957 พบว่ามีการดื้อยานี้เกิดขึ้นในประเทศไทย และในปี 1988 พบว่าการดื้อยากระจายไปเกือบทั่วโลก โดยยานี้จะขัดขวางการรวมตัวกันของ heme ซึ่ง heme เป็น by product จากการสลาย hemoglobin โดย heme จะเป็นพิษต่อปรสิต การดื้อยาของ chloroquine พบว่าใน *P. falciparum* ที่ดื้อยา จะมีปริมาณยาไม่สูงพอที่จะทำหน้าที่ได้ จากการศึกษาพบว่ายีน *pfcrt* ซึ่งเป็น chloroquine resistant transporter เกิด mutation ขึ้น หรือการดื้อยาของยาในกลุ่ม antifolates ซึ่งมีเป้าหมายที่ dihydrofolate reductase โดยการดื้อยาเกิดจาก point mutation ของยีนเป้าหมาย [5] ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่จะพัฒนายาใหม่และหาเป้าหมายในการฆ่าเชื้อใหม่ [10] การพัฒนายาต้านมาลาเรียมีหลายวิธี เช่นการปรับเปลี่ยนและพัฒนาจากยาเดิมที่ใช้กันอยู่ การพัฒนายาให้มีความซับซ้อนน้อยลงและสังเคราะห์ง่ายขึ้น ตัวอย่างเช่น trioxalane derivative ซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการทำ clinical trials [2] ดีเอ็นเอเฮลิเคส (DNA helicase) เป็นเอนไซม์สำคัญในขบวนการต่างๆ ของดีเอ็นเอในเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกชนิด รวมทั้งเชื้อมาลาเรียด้วย โดยมีหน้าที่ในการแยก DNA สายคู่ให้เป็น DNA สายเดี่ยวโดยการสลายพันธะไฮโดรเจน เพื่อใช้ในขบวนการ metabolism ของทั้ง DNA และ RNA [2] เช่น DNA replication, recombination, repair และ transcription วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียมีความซับซ้อน และมีขบวนการ replication ของเชื้อมาลาเรียเกิดขึ้นหลายที่ ดังรูปที่ 1 เช่น หลังจากที่เชื้อเข้าสู่เซลล์ตับ, ระหว่าง schizogony ในเซลล์เม็ดเลือดแดง, ระหว่าง gametogenesis, หลังจาก fertilization และ ใน oocysts [11] โดย DNA helicase จะมีการทำงานร่วมกับโปรตีนอื่นๆ เป็นกระบวนการร่วมกัน [12] โดยทั่วไปเอนไซม์นี้มีปฏิกิริยาสามขั้นตอน ขั้นตอนแรกเอนไซม์จะจับกับ nucleic acid substrate จากนั้นจะจับกับ NTP และเกิด hydrolysis ตามด้วยการแยกสาย DNA [10] DNA helicase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งชนิดโปรแคริโอต และยูแคริโอต พบครั้งแรกในปี 1976 ใน *Escherichia coli* [13] ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดยังพบ DNA helicase ได้หลายชนิดด้วย [14] เช่นในมนุษย์ พบ DNA helicase อย่างน้อย 9 ชนิด [15] มีการประมาณว่าใน eukaryotic และ prokaryotic genome มียีนที่ทำหน้าที่ สร้าง DNA helicase อยู่ถึง 1% ของยีนทั้งหมด [15] การทำงานของดีเอ็นเอเฮลิเคส ต้องการ divalent cation และ nucleotide triphosphate ด้วย เอนไซม์นี้สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามทิศทางการทำงานคือ 3' – 5' และ 5'– 3' DNA helicase ขึ้นกับทิศทางการ

ทำงานและสายที่เอนไซม์เกาะ บางชนิดสามารถทำงานได้ทั้งสองทิศทางแต่พบไม่มาก [16] การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA helicase สามารถทำได้โดยการใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม anthracycline ตัวอย่างเช่น aclarubicin, daunorubicin สามารถยับยั้งการทำงานของ DNA helicase ใน *Escherichia coli*, SV40, HeLa cells และ *P. falciparum* [4, 12, 17] โดยยาในกลุ่มนี้จะจับกับ DNA ในสายทำให้มี



รูปที่. 1 วงจรชีวิตของมาลาเรีย [18] เครื่องหมาย ★ หมายถึงจุดที่มี replication ซึ่งเป็นจุดที่ต้องใช้ DNA helicase ในการทำงาน

melting temperature เพิ่มขึ้น และทำให้สภาพของ DNA เปลี่ยนแปลงไปโดยที่ DNA ที่จับกับ anthracycline จะเสียสภาพ ไม่สามารถบิดงอได้ หรืออาจยืดยาวผิดไป [10, 19]

ปัจจุบันยีโนมของ *P. falciparum* clone 3D7 ได้รับการ sequence เรียบร้อยแล้ว [20] จากนั้นจึงได้มีการศึกษาดีเอ็นเอฮิลิเคสจากการโคลนยีน เช่น *Plasmodium falciparum* DEAD-helicase 60 (PfDH60) เป็นดีเอ็นเอฮิลิเคสที่ได้จากการ express ดีเอ็นเอฮิลิเคส *P. falciparum* (3D7) ใน *E. coli* expression system พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 59.8 kDa สามารถทำงานได้ที่ pH 5.0-10.0 และพบในระยะ schizont และสามารถทำงานได้ทั้ง 2 ทิศทาง (bipolar) [21, 22] สำหรับ *Plasmodium falciparum* helicase 45 (PfH45) เป็นเอนไซม์ที่พบในทุกระยะของการพัฒนาเชื้อที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง [23] สำคัญในการอยู่รอดของปรสิต และกระตุ้นโดย substrate ที่เป็น fork like structure [24]

จากการศึกษาเอนไซม์ DNA helicase จาก *P. falciparum* ซึ่งทำโดยการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียให้ได้จำนวนมากแล้วทำการสกัดแยกเอนไซม์ออกมาด้วยวิธีการ column chromatography พบว่ามี DNA helicase หลายชนิด โดยหนึ่งในเอนไซม์ที่สกัดแยกมาได้นั้นได้ตั้งชื่อว่า PfDH A ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในระยะ schizont จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90 kDa มีทิศทางการทำงานโดยแยกสาย DNA จากปลาย 3' ไปยังปลาย 5' ของเส้น DNA [4] แต่พบในปริมาณที่น้อยมาก จึงไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน และวิเคราะห์คุณสมบัติอื่นๆ ต่อได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะ clone, express และผลิต DNA helicase ให้ได้ปริมาณที่เพียงพอที่จะใช้ทำการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ รวมศึกษาผลของยา และสารเคมีต่างๆ ในการยับยั้งทำงานของเอนไซม์ ซึ่ง helicase inhibitor ที่หามาได้อาจสามารถพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียตัวใหม่ ต่อไปได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

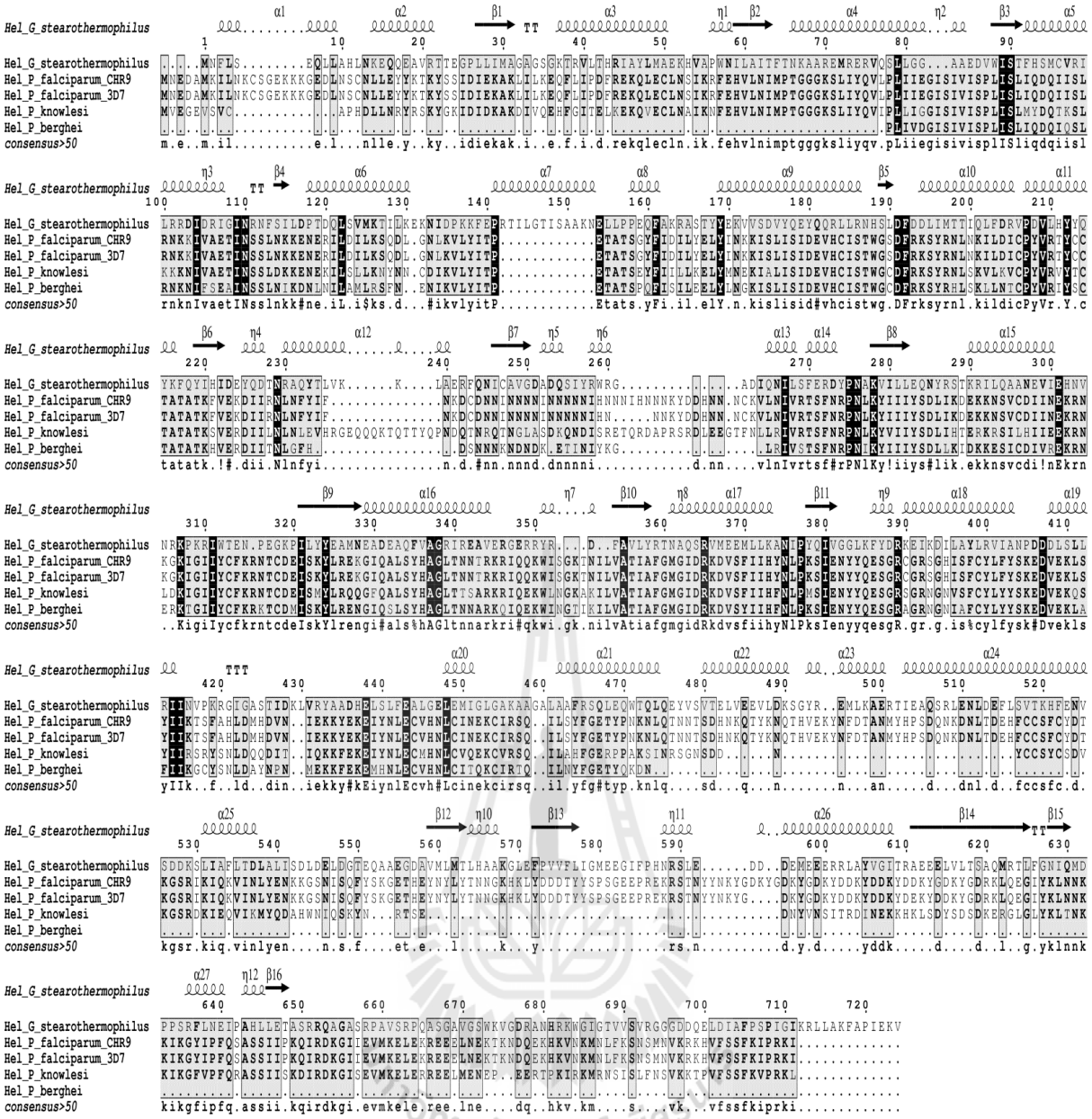
บทที่ ๓ : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

ทำการออกแบบ และสังเคราะห์ primer ที่ encode สำหรับ DNA helicase โดยการค้นหาใน PlasmoDB database จากนั้นทำการโคลนยีนด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ *P. falciparum* DNA เป็น template หลังจากได้ชิ้น gene ที่ต้องการแล้ว จึงทำการ clone เข้าสู่ vector (pET-15b) จากนั้นทำการหา sequence ของ clone ที่ได้แล้วทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของยีน และเอนไซม์ด้วยวิธีทาง bioinformatics รวมทั้งนำยีนไป express ใน *E. coli* BL21 (DE3) pLysS แล้วสกัด และ purify เอนไซม์ด้วย Nickle NTA column จากนั้นนำ DNA helicase ที่ได้มาทดสอบหา enzyme activity โดยสร้าง substrate โดยใช้ oligonucleotides ขนาด 17 mer มา label ด้วย [γ-^{32}P] ATP โดยใช้ T4 polynucleotide kinase จากนั้นนำมา anneal กับ circular DNA (M13mp19 DNA) .ให้ได้เป็น DNA duplex เพื่อใช้เป็น substrate สำหรับทดสอบหา DNA helicase activity รวมทั้งนำ DNA helicase ที่ได้มาทดสอบความต้องการของเอนไซม์ว่าต้องการสารใดบ้างในปฏิกิริยา เช่น divalent cation, nucleotide triphosphate, KCl และศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม ศึกษาทิศทางการทำงานและศึกษาชนิดของ substrate ที่เอนไซม์ทำงานได้ เช่น DNA-RNA substrate, blunt end substrate, fork-like substrate จากนั้นทำการทดสอบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ DNA helicase inhibitor ชนิดต่างๆ เช่น anthracycline antibiotics วิธีการในการ clone express และ purify ใช้ตามวิธีการที่ได้รับการตีพิมพ์มาแล้วโดยหัวหน้าโครงการวิจัย [25] ส่วนวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์ใช้วิธีการที่รับการตีพิมพ์มาแล้วโดยผู้ร่วมโครงการ [4]

ผลการทำ Cloning and expression of DNA helicase

ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

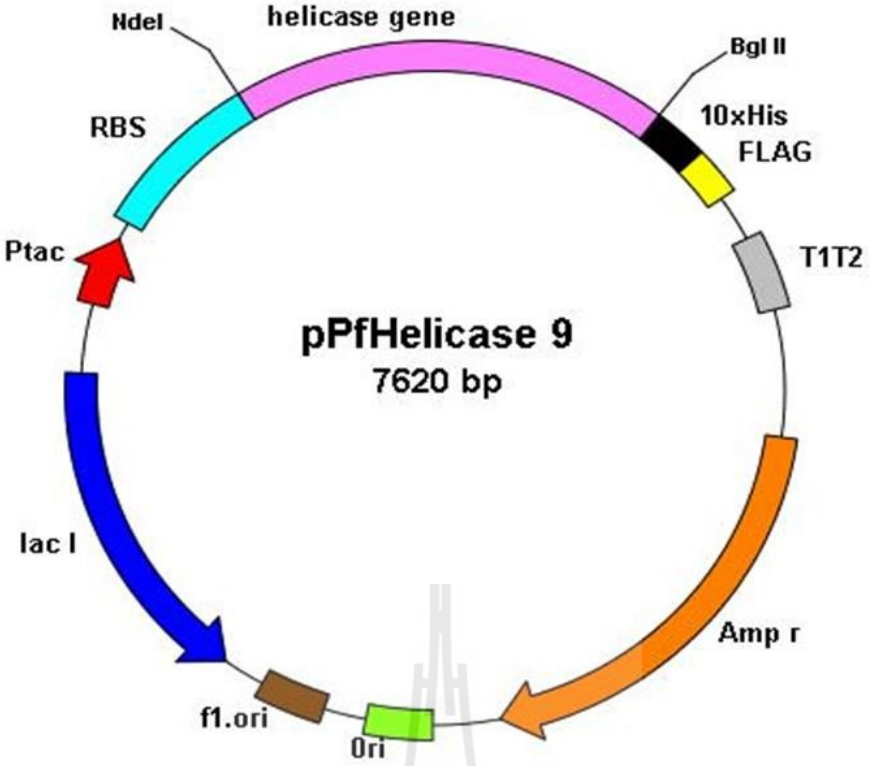
จากการโคลนยีน CHR9/PFI0910w ความยาว 2.2 kb โดยใช้ *P. falciparum* K1 ซึ่งคัดแยกมาได้ในประเทศไทย [4] เป็นต้นแบบในกระบวนการ PCR แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโน พบว่า ความยาวของยีนคือ 2280 คู่เบส ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ความยาว 760 กรดอะมิโน มีมวลโมเลกุล และ ค่า pI ทางทฤษฎี เท่ากับ 89.4 kDa และ 8.88 ตามลำดับ เรียกเอนไซม์ที่โคลนขึ้นมาได้นี้ว่า DNA Helicase Pfl0910w ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน พบว่าเป็นยีนที่เหมือนกับ ยีนของเอนไซม์ที่คาดว่า จะเป็น (putative) DNA helicase 3D7 โดยมีความเหมือน แบบ identity = 99% อย่างไรก็ตามพบว่า ยีนจาก *P. falciparum* K1 นั้นมีส่วนที่แทรกเพิ่มเข้ามา ที่ไม่มีใน ลำดับเบสในฐานข้อมูล plasmoDB 2 จุด คือ กรดอะมิโน NNIHN หลัง Asn-259 และ DKYG หลัง Gly-616 ผลจากการเปรียบเทียบกับ DNA helicase จากเชื้อ species อื่นแสดงดังรูปที่ ๒ ซึ่งผลการทดลองแสดงว่า เอนไซม์ DNA helicase นี้ อยู่ในกลุ่ม DEAD-box family



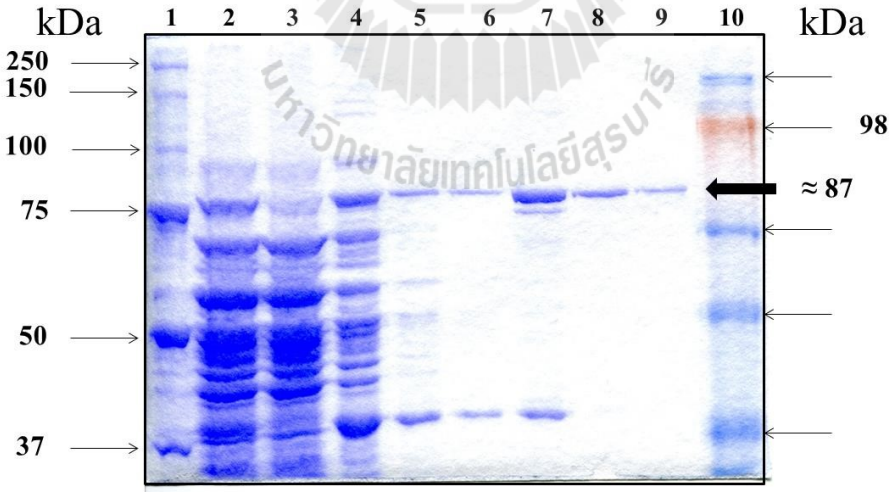
รูปที่ 2 ผลการเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนของ เอนไซม์ DNA helicase ที่โคลนได้จาก เชื้อ *P. falciparum* K1 กับเชื้อ *Plasmodium* อื่นๆ

ผลการผลิตและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ DNA Helicase Pfl0910w

ผู้วิจัยได้ทำการโคลนยีนของเอนไซม์ DNA Helicase Pfl0910w เข้าไปใน pET-base expression vector ดังรูปที่ ๓ จากนั้นทำการผลิตและทำให้บริสุทธิ์ ดังแสดงในรูปที่ ๔ ซึ่งผลจากการวิจัยพบว่า เชื้อ *E. coli* BL21 DE3 ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้จำนวนค่อนข้างต่ำ คือ 0.395 mg ต่อ 1 ลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณนี้ก็เพียงพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์ การทำงานของเอนไซม์ในขั้นต่อไป



รูปที่ 3 Expression Vector ที่ใช้สำหรับการผลิต recombinant DNA Helicase Pfl0910w เพื่อใช้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 4 ภาพ SDS-PAGE แสดงการผลิต และการทำ recombinant DNA Helicase Pfl0910 ให้บริสุทธิ์สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงชีวเคมี ด้านต่างๆ

ผลการทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

การเตรียมสารตั้งต้นสำหรับ **DNA helicase assay**

5' labeled helicase substrate

ทำการสังเคราะห์ oligodeoxynucleotides จาก BioDesign, ประเทศไทย สำหรับ DNA substrate ที่ใช้ใน helicase assays ประกอบด้วย ^{32}P labeled complementary oligodeoxynucleotide 1 (17 mer, 5′-GTAAAACGACGGCCAGT-3′) anneal กับ single stranded M13mp18 DNA (New England Biolabs, USA) เป็น partial (Tuteja et al.,1990) โดยใช้ 17-mer oligodeoxynucleotide 100 ng มา label ด้านปลาย 5' ด้วย T4 polynucleotide kinase และ [γ-^{32}P] ATP (Perkin-elmer, USA) (Sambrook, 1989) และทำให้ตกตะกอนด้วย absolute ethanol และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol นำ oligodeoxynucleotide มา anneal ด้วย single-stranded circular M13 mp19 DNA 2.5 µg ใน 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl และ 1 mM DTT ที่อุณหภูมิ 95 ^{o}C เป็นเวลา 1 นาที และ 65 ^{o}C 2 นาที และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที oligonucleotide ที่ไม่ anneal จะถูกแยกออกโดยใช้ Microspin S-400 1 ml (GE, USA)

Standard DNA helicase assay

DNA helicase assay ทำโดยการคลายเกลียว ^{32}P labeled DNA fragment จาก partial duplex DNA molecule (^{32}P labeled complementary oligodeoxynucleotide 1 (17 mer) anneal กับ single stranded M13mp18 DNA) ใน reaction mixture (10 µl) ประกอบด้วย DNA helicase 160 ng, 20 mM Tris-HCl (pH9.0), 8 mM DTT, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 10 mM KCl, 4% (w/v) sucrose, 80 µg/ml BSA และ ^{32}P labeled helicase substrate 1,000 cpm นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 20 min จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10x loading dye (Fermentas, USA) นำทั้งหมดไปแยกโดยใช้ 20% nondenaturing polyacrylamide gel ใน 0.5 X TBE ที่ 92 volts เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง นำ gel ไปประกบกับ x-ray film เป็นวิธี autoradiography

การเตรียม **blunt ended duplex DNA helicase substrate**

นำ oligonucleotide ขนาด 41mer-I มา 5′-ended label ด้วย T4 polynucleotide kinase และ [γ-^{32}P] ATP นำไป anneal กับ 41 mer-II ใน 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM $MgCl_2$ and 50 mM NaCl ที่อุณหภูมิ 65 ^{0}C เป็นเวลา 2 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปผ่าน Microspin S-400 ขนาด 1 ml เพื่อแยก free oligonucleotides

การเตรียม* substrate *ต่างๆ

ทำการ label oligonucleotide ตามวิธี 5' labeled helicase substrate เพื่อเตรียม substrate ชนิดต่างๆ และ anneal กับ single stranded M13mp18 DNA

เวลาที่ใช้ในการทำ unwinding activity ของ DNA helicase

ใช้ DNA helicase 160 ng ทำการทดลองเหมือนข้างต้น แต่เปลี่ยนเวลาเป็น 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ

ความต้องการสารต่างๆ ในการทำ DNA helicase assay

unwinding activity ของ DNA helicase ใช้ DNA helicase 160 ng โดยใช้ standard DNA helicase assay และเปลี่ยนสารต่างๆ

ความต้องการ NTPs

การทำงานของ DNA helicase ในการคลายเกลียว DNA ต้องใช้การจับและ hydrolysis ของ NTPs โดยทั่วไปจะใช้ ATP ดังนั้นจึงได้ทำการทดแทน ATP ด้วย nucleotide triphosphate อื่น ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP, และ dTTP ใน reaction mixture ใช้ 2mM ATP แทนด้วย 2 mM of dATP, dCTP, dGTP, และ dTTP

ความต้องการ divalent cation

การทำงานของ DNA helicase ในการคลายเกลียว DNA ต้องใช้ Divalent cation เป็น cofactor ดังนั้นใน standard reaction mixture ซึ่งมี 2 mM $MgCl_2$ จะเปลี่ยนเป็น 2 mM of $CaCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $NiCl_2$ และ $ZnCl_2$

การทดสอบการยับยั้งการทำงานของ DNA helicase โดย salt และ EDTA

ทำการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ DNA helicase โดยใช้ KCl 200 mM หรือ NaCl 200 mM และผลของ EDTA โดยการเติม 8 mM EDTA ลงใน reaction mixture

ผลของ inhibitors ต่อ DNA helicase

ทำการทดสอบ chemotherapeutic agents ต่อการทำงานของ DNA helicase โดยใช้ aphidicolin, daunorubicin, doxorubicin, genistein, mitoxantrone และ netropsin โดยการเตรียม stock solution โดยละลายยาใน dimethylsufoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 10^{-2} M เก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{o}C ทำการเจือจางยาโดยใช้ 10 mM Tris-HCl, pH 9 จากนั้นจะ incubate 17 mer DNA substrate กับยาที่มีความเข้มข้น 0.1-50 μM เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำ helicase assay โดยใช้เอนไซม์ 160 ng ในการหาค่า IC_{50} ของ inhibitor

ตารางที่ 1 Oligodeoxynucleotides ที่ใช้เป็น substrate สำหรับ DNA helicase assay และ การทดสอบกับ inhibitor

Oligonucleotide	Sequence
1. 17mer	5′-GTAAAACGACGGCCAGT-3′
2. 32mer - I	5′-TTTTTTTTTTTTTTTGTTTTCCCAGTCACGAC-3′
3. 32mer - II	5′-GTTTTCCCAGTCACGACTTTTTTTTTTTTTTT-3′
4. 34mer - I	5′-GACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAAT-3′
5. 34mer - II	5′-ATAAAAATTTTTAGAACCCTCATATATTTTAAAT-3′
6. 41mer - I	5′-AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTG-3′
7. 41mer – II	5′-CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATT-3′
8. 47mer	5′-TTTTTTTTTTTTTTTGTTTTCCCAGTCACGACTTTTTTTTTTTTTTT-3′

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2 ลักษณะของ substrate ที่สร้างขึ้น

Complex	Oligonucleotides
Short oligonucleotide	M13mp18 +17mer
Long oligonucleotide	M13mp18 + 34 mer -II
Blunted end	41 mer – I + 41 mer - II
3'overhang	M13mp18 + 32 mer –II
5'overhang	M13mp18 + 32 mer - I
3'&5' overhang	M13mp18 + 47 mer

DNA helicase activity

ทำการศึกษาเอนไซม์ recombinant DNA helicase activity โดยใช้เอนไซม์ปริมาณ 0.3, 1, 3 μl (รูปที่ 5) พบว่า DNA helicase ทำงานได้ดีโดยสามารถคลายเกลียวแยก DNA สายคู่ให้เป็น DNA สายเดี่ยว

การทำงานของ DNA helicase ในเวลาต่างๆ

การทำปฏิกิริยาระหว่าง substrate และ DNA helicase ใน standard reaction ใช้เวลา 20 นาที ดังนั้น จึงทำปฏิกิริยาในเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 นาที พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปจะได้ DNA สายเดี่ยวเพิ่มขึ้น และ ที่เวลาตั้งแต่ 30 นาที สามารถคลายเกลียวได้ 100 % (รูปที่ 6)

Reaction requirements and characterization of DNA helicase

ใน standard DNA helicase unwinding assay ประกอบด้วย ^{32}P labeled DNA fragment จาก partial duplex DNA molecule ใน reaction mixture (10 μl) ประกอบด้วย DNA helicase 160 ng, 20 mM Tris-HCl (pH9.0), 8 mM DTT, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 10 mM KCl, 4% (w/v) sucrose, 80 μg/ml BSA และ ^{32}P labeled helicase substrate 1,000 cpm เอนไซม์สามารถคลายเกลียว DNA ได้ 100% (ตารางที่ 3)

ทำการศึกษาคุณสมบัติของ DNA helicase เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์นี้ ต้องการ ATP โดยอาศัยพลังงานจากการเกิด hydrolysis ของ ATP ดังนั้นจึงทดสอบว่าสามารถใช้ deoxynucleotide อื่น พบว่า DNA helicase สามารถคลายเกลียวได้ 89% เมื่อใช้ dATP และจะทำงานลดลงเมื่อใช้ dCTP, dGTP หรือ dTTP มีค่า 30%, 21% และ 13% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ในการทำงานของเอนไซม์ต้องการ $MgCl_2$ เป็น cofactor เพื่อการทำงานที่สมบูรณ์ พบว่า เมื่อเปลี่ยน $MgCl_2$ เป็น $CuCl_2$, $CuSO_4$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $FeSO_4$ และ $MnSO_4$ จะคลายเกลียวได้ 82%, 55%, 77%, 73%, 44%, 76%, 73% และ 61% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

จากนั้นทำการศึกษาถึงผลของ salt และ EDTA ที่จะยับยั้งการทำงานของ DNA helicase พบว่า 200 mM KCl หรือ 200 mM NaCl สามารถยับยั้งการทำงานของ DNA helicase ได้ โดยมีค่า 27% และ 17% ตามลำดับ และพบว่าการทำงานของเอนไซม์นี้จะลดลง เมื่อมี 8 mM EDTA มีค่า 20% ในปฏิกิริยา (ตารางที่ 3)

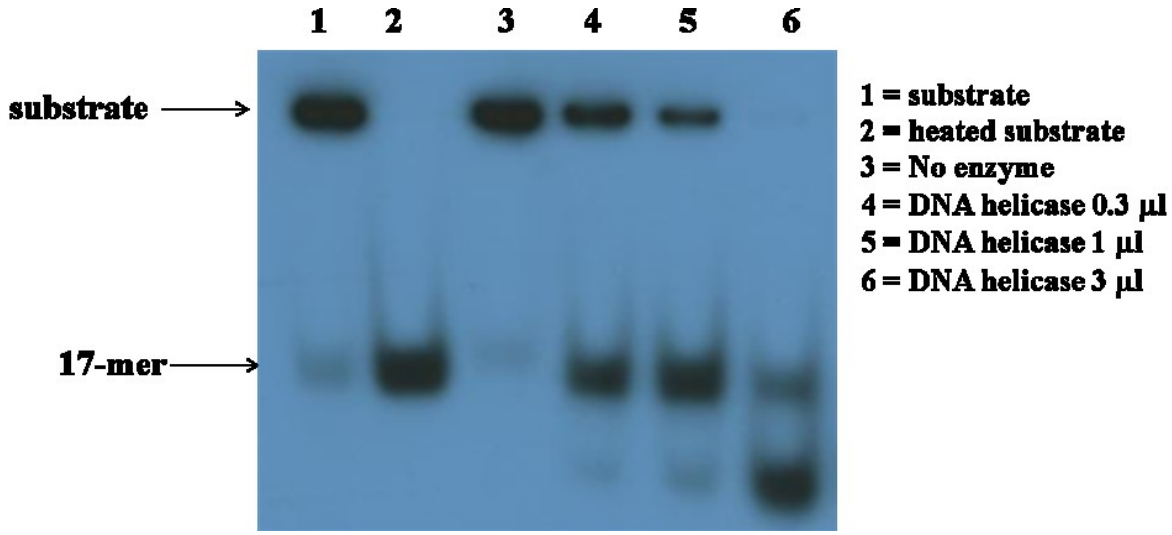
DNA helicase activity ต่อ substrates ต่างๆ

ทำการทดสอบ helicase activity ต่อ substrate แบบต่างๆ ดังรูปที่ 7 พบว่า DNA helicase สามารถคลายเกลียว partial duplex ขนาด 17 mer และ partial duplex ขนาด 34 mer (รูปที่ 7, A และ B) สำหรับ substrate ที่เป็น partial duplex substrate (17 mer) with 5′ tail (Fig. 7, C) DNA helicase ไม่สามารถทำงานได้ แต่ substrate ที่เป็น partial duplex substrate (17 mer) with 3′ tail ends (Fig. 7, D) พบว่า DNA helicase สามารถคลายเกลียวได้ แต่เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้กับ substrate (17 mer) ที่มีทั้ง 3′ และ 5′ tail ends (Fig. 7, E) เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ และเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้กับ substrate ที่เป็น 41-mer blunt end (Fig. 7, F)

ผลของ inhibitors ต่อการทำงานของ DNA helicase

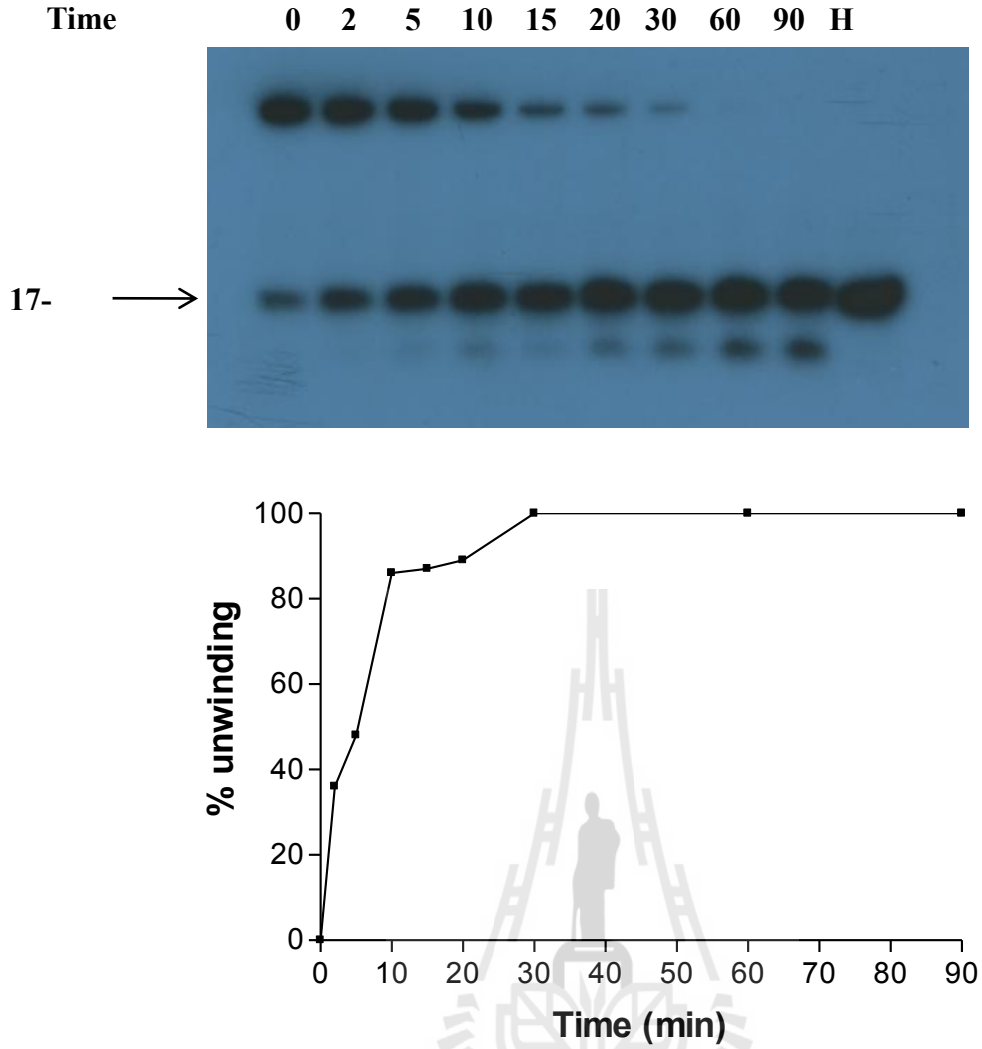
ทำการทดสอบ antibiotics กับการทำงานของ DNA helicase โดยทำการ incubate substrate กับ antibiotics ใน standard reaction โดย preincubate duplex M13-17 mer DNA substrate ด้วย antibiotics ได้แก่ doxorubicin, daunorubicin genistein, mitoxantrone, netropsin, aphidicolin ที่ความเข้มข้น 50 μM พบว่า doxorubicin และ daunorubicin สามารถยับยั้งการทำงานของ DNA helicase โดยเอนไซม์สามารถคลายเกลียว substrate ได้เพียง 11% และ 16% ตามลำดับ ในขณะที่ genistein, mitoxantrone, netropsin, aphidicolin โดยสามารถคลายเกลียว substrate ได้ 100%, 100%, 92% และ 95% ตามลำดับ (ตารางที่ 4 , รูปที่ 8)

ดังนั้น daunorubicin และ doxorubicin มาหาค่า IC_{50} โดยใช้ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 50 μM (รูปที่ 9-10) เมื่อนำค่า การคลายเกลียว DNA มาคำนวณ พบว่า IC_{50} ของ daunorubicin และ doxorubicin มีค่า 30 and 23 μM ตามลำดับ



รูปที่ 5 แสดง DNA helicase activity.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 6 การทำงานของ เอนไซม์ที่เวลาต่างๆ ปฏิกริยาประกอบด้วย DNA helicase 0.16 ug, H หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกทำให้หมดสภาพด้วยความร้อน substrate ที่ใช้คือ 17 mer/M13

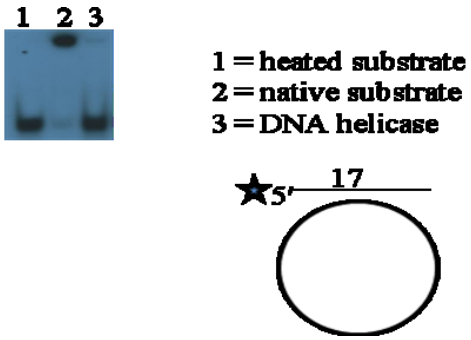
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3 Reaction requirement of DNA helicase unwinding activity.

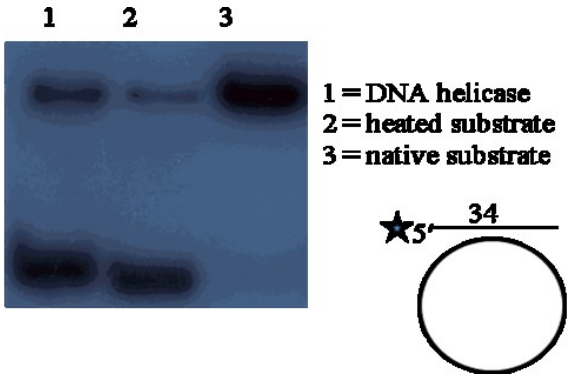
(-, without; +, with)

Reaction condition	Percentage unwinding
Complete	100
-ATP + dATP	89
-ATP + dCTP	30
-ATP + dGTP	21
-ATP + dTTP	13
-$MgCl_2$ + $CuCl_2$	82
-$MgCl_2$ + $CuSO_4$	55
-$MgCl_2$ + $NiCl_2$	77
-$MgCl_2$ + $CoCl_2$	73
-$MgCl_2$ + $CaCl_2$	44
-$MgCl_2$ + $ZnCl_2$	76
-$MgCl_2$ + $FeSO_4$	73
-$MgCl_2$ + $MnSO_4$	61
200 mM KCl	27
200 mM NaCl	17
8 mM EDTA	20

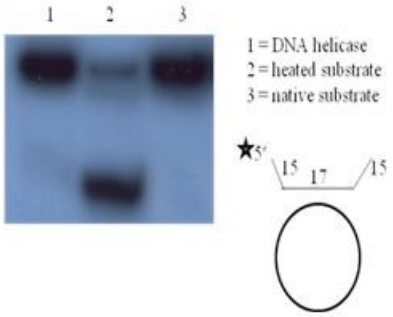
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



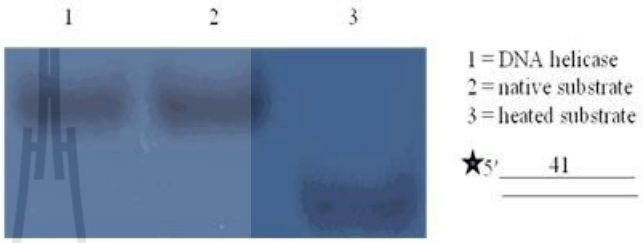
A: M13/17 mer



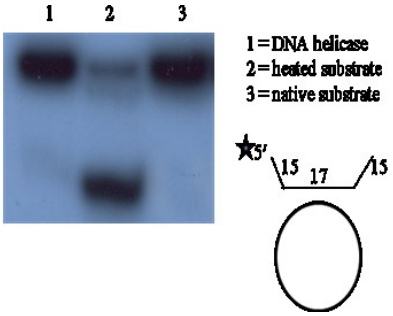
B: M13/34 mer



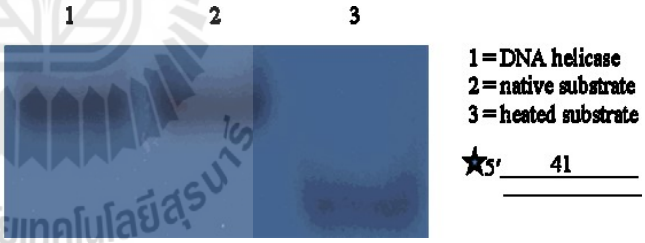
C: 5' tail, 32 mer-M13mp18



D: 3' tail, 32 mer-M13mp18



E: 3' and 5' tail, 47 mer-M13mp18



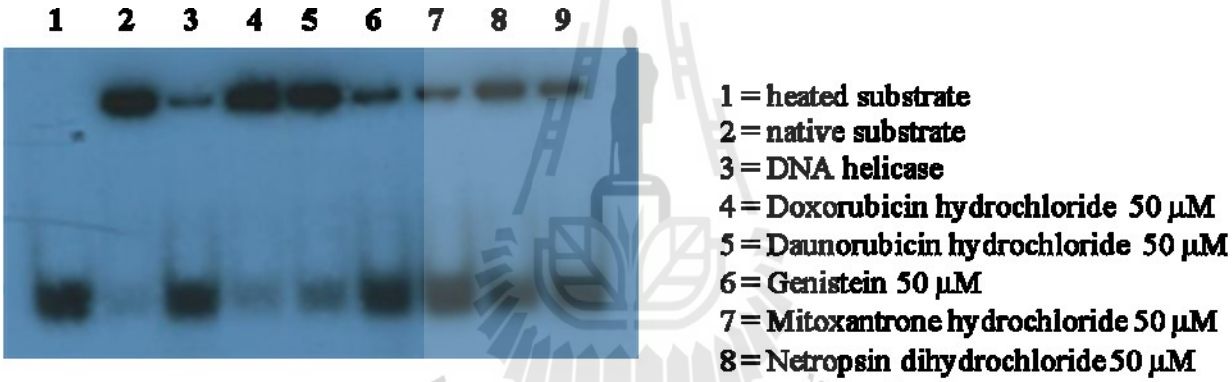
F: 41/41 mer

รูปที่ 7 ผลของ DNA helicase activity ต่อ substrate แบบต่างๆ

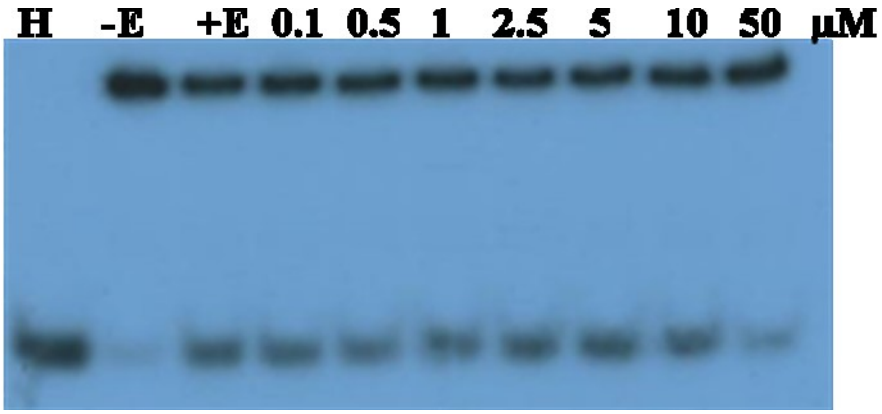
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4 **ผลของ inhibitors ต่อ DNA helicase ที่ความเข้มข้น 50 μM**

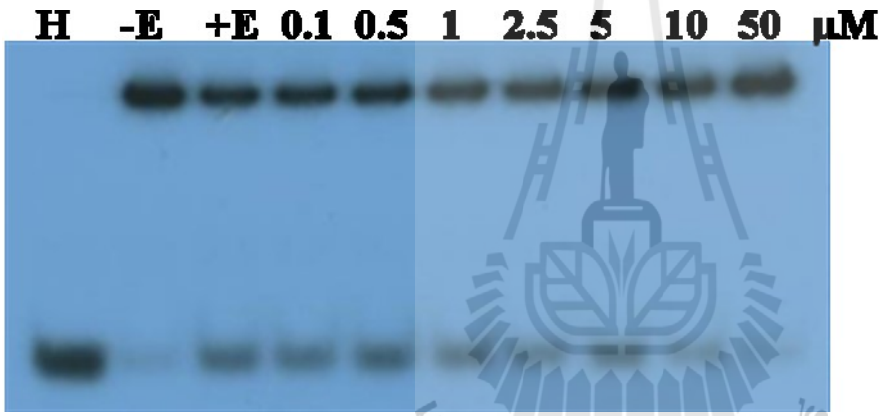
Inhibitors	Percentage unwinding
No inhibitor	100
Doxorubicin hydrochloride	11
Daunorubicin hydrochloride	16
Genistein	100
Mitoxantrone hydrochloride	100
Netropsin dihydrochloride	92
Aphidicolin	95



รูปที่ 8 ผลของ inhibitors ต่อ DNA helicase ที่ความเข้มข้น 50 □M



รูปที่ 9 ผลของ daunorubicin ต่อ DNA helicase



รูปที่ 10 ผลของ doxorubicin ต่อ DNA helicase

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4 : บทสรุป

สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษา DNA helicase จากเชื้อ *P. falciparum* โดยได้ทำการโคลนและแสดงออกของโปรตีนนี้ในเชื้อ *E. coli* เนื่องจากเอนไซม์นี้เป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพ ผลจากการวิจัย พบว่า ผู้วิจัยสามารถโคลนและทำการแสดงออก DNA helicase จากยีน Pfl0910w ใน *E. coli* ได้เป็นผลสำเร็จ โดยโปรตีนนี้มีขนาด 85.5 kDa เรียกโปรตีนที่พัฒนาขึ้นมานี้ว่า DNA helicase **PfDHA86** โดยสามารถผลิตเอนไซม์ นี้ใน *E. coli* ได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับเอนไซม์จากแบคทีเรียอื่นๆ ที่เคยทำมาก่อน แต่ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการผลิตเอนไซม์ DNA helicase จากเชื้อมาลาเรียอื่นๆ ที่ผ่านมา [6, 21, 34] อย่างไรก็ตาม เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์นั้นมีความไวสูงมาก เพราะใช้สารกัมมันตรังสี จึงไม่เป็นปัญหา และมีเพียงพอสำหรับการทำวิจัยนี้

จากการวิเคราะห์ malarial genome project พบว่าใน *P. falciparum* มี DNA helicase หลายชนิด [26] จากการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Suntornthiticharoen และคณะ ปี 2006 [4] พบ DNA helicase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สกัดจากตัวเชื้อ ชื่อว่า *P. falciparum* DNA helicase A (PfDH A) มีขนาดประมาณ 90 kDa มีขนาดใกล้เคียงกับ DNA helicase จากยีน Pfl0910w DNA helicase นี้ ซึ่งพบว่าเป็น homologue กับ human BS (BLM) helicase ของคน แต่มีขนาดเล็กว่า เพราะของคนมีขนาด 159 kDa [26] ในระหว่างที่ได้ทำการวิจัยอยู่นี้ ได้มีรายงานการโคลนและการแสดงออก DNA helicase จาก *P. falciparum* อีกหลายชนิดเช่น *Plasmodium falciparum* UvrD helicase (PfUvrD และ PfMLH) ซึ่งพบอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน (colocalize) ในระยะ schizont [22, 26, 27], DEAD box helicase Has1p [28], *Plasmodium falciparum* DEAD-box helicase 60 kDa (PfDH60) ซึ่งจะ express สูงสุด ในระยะ schizont [7], และ *P. falciparum* RuvB3 (PfRuvB3) ซึ่งจำเป็นใน ระยะ intraerythrocytic schizogony [27]

ในที่นี้จะเรียกเอนไซม์ DNA helicase ที่ได้โคลนขึ้นมานี้ว่า PfDHA86 ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่าทำหน้าที่คลายเกลียว DNA สายคู่ให้เป็น DNA สายเดี่ยวโดยจะต้องมีการจับและมีการ hydrolyse nucleoside triphosphate โดยเฉพาะ ATP ทำให้การทำงานของ DNA helicase เกิดขึ้นดีที่สุด และสามารถทำงานลดลงเล็กน้อย เมื่อใช้ dATP และลดลงมากกว่า 50% เมื่อใช้ dCTP, dGTP, dTTP

การทำงานของ DNA helicase ต้องการ divalent cation เป็น cofactor และมักใช้ $MgCl_2$ จึงทำการทดสอบ divalent cation หลายชนิด พบว่า DNA helicase นี้สามารถคลายเกลียวโดยใช้ $CuCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, $ZnCl_2$, $FeSO_4$ โดยทำงานได้ มากกว่า 70% ในขณะที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ ประมาณ 60% โดยใช้ $MnSO_4$, $CuSO_4$ และมีทำงานได้น้อยกว่า 50% เมื่อใช้ $CaCl_2$

DNA helicase activity จะถูกยับยั้งโดย salt โดยผลจากการทำการทดลองเติม KCl หรือ NaCl 200 mM สามารถลดการคลายเกลียว DNA ลงอย่างมาก รวมถึง EDTA 8 mM ก็สามารถยับยั้งการทำงานของ DNA helicase ด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้ตรงกันกับที่ได้จากการวิเคราะห์ native enzyme PfDHA ที่ผู้วิจัยได้ทำมาก่อนหน้านี้แล้ว [4] โดยที่ EDTA เป็น chelating agent สามารถไปจับกับ divalent cation ได้

ผลการทดสอบ helicase activity ต่อ substrate แบบต่างๆ พบว่า DNA helicase สามารถคลายเกลียว partial duplex ขนาดสั้น (17 mer) และ partial duplex ขนาดยาว (34 mer) และ substrate ที่เป็น partial duplex substrate (17 mer) with 5′ tail แต่ไม่สามารถทำงานได้กับ substrate ที่เป็น partial duplex substrate (17 mer) with 3′ tail ends และพบว่า DNA helicase สามารถคลายเกลียวได้ แต่เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้กับ substrate (17 mer) ที่มีทั้ง 3′ และ 5′ tail ends และ blunt end substrate

การที่จะทำความเข้าใจ mechanism ของ DNA helicase unwinding activity นั้น ต้องใช้ DNA binding agents หรือทำการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ [29] ด้วยสารประเภท 1) DNA intercalating agents เช่น daunorubicin, doxorubicin, mitoxantrone, 2) กลุ่มที่เป็น minor groove binder ซึ่งเป็นสารประเภท oligopyrrolamidine เช่น netropsin ซึ่งจะจับกับ minor groove ของ DNA และ 3) DNA polymerase alpha inhibitor ได้แก่ aphidicolin [30] doxorubicin และ daunorubicin เป็นสารในกลุ่ม anthracyclines โดย daunorubicin เป็น universal helicases inhibitors สามารถยับยั้งการทำงานของ helicase หลายชนิด เช่น HDHII, SV40 large T antgigen, PcDDH45, PfDH60, PfDH A และ viral helicase ใน Flaviridae family [21, 31-33]

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบผลของ DNA binding agents ต่างๆ ได้แก่ doxorubicin, daunorubicin genistein, mitoxantrone, netropsin, aphidicolin ต่อการทำงานของ DNA helicase PfDHA90 โดยทำการ incubate substrate กับ DNA binding agents ใน standard reaction โดย preincubate duplex M13-17 mer DNA substrate 10 นาที ที่ความเข้มข้น 50 μM พบว่า doxorubicin และ daunorubicin สามารถยับยั้งการทำงานของ DNA helicase ในขณะที่ genistein, mitoxantrone, netropsin, aphidicolin ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ DNA helicase นี้ได้ จากนั้นนำ daunorubicin และ doxorubicin มาหาค่า IC_{50} พบว่า IC_{50} ของ daunorubicin และ doxorubicin มีค่า 30 and 23 μM ตามลำดับ แสดงว่ามีความไวต่ำ หรือทนต่อ inhibitor มากกว่า PfDH60 และ PfDH A ซึ่งมีค่า IC_{50} ของ daunorubicin เท่ากับ 0.3 μM [21], และ 2.8 μM [4] ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

หากต้องการผลิตเอนไซม์นี้ในปริมาณมาก เช่นเพื่อนำไปเป็น antigen สำหรับผลิตแอนติบอดี เพื่อการศึกษาวิจัยเชิงลึก หรือใช้ในกระบวนกวนการคัดหายาแบบ high-throughput นั้น จำเป็นต้องปรับระบบการผลิตเอนไซม์ โดยการปรับลำดับเบสก่อน ดังแนวทางที่มีการรายงานมาเมื่อไม่นานมานี้ [8]

องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ นอกจากจะใช้เป็นพื้นฐานในการประยุกต์เพื่อการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียตัวใหม่แล้ว ยังเป็นพื้นฐานในการทำความเข้าใจการทำงานของเอนไซม์ DNA helicase ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดอีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Sachs, J., and Malaney, P. (2002). The economic and social burden of malaria. Nature *415*, 680-685.
2. Sahu, N.K., Sahu, S., and Kohli, D.V. (2008). Novel molecular targets for antimalarial drug development. Chem Biol Drug Des *71*, 287-297.
3. Seder, R.A., Chang, L.J., Enama, M.E., Zephir, K.L., Sarwar, U.N., Gordon, I.J., Holman, L.A., James, E.R., Billingsley, P.F., Gunasekera, A., et al. (2013). Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. Science *341*, 1359-1365.
4. Suntornthiticharoen, P., Petmitr, S., and Chavalitshewinkoon-Petmitr, P. (2006). Purification and characterization of a novel 3'-5' DNA helicase from Plasmodium falciparum and its sensitivity to anthracycline antibiotics. Parasitology *133*, 389-398.
5. Hyde, J.E. (2007). Drug-resistant malaria - an insight. FEBS J *274*, 4688-4698.
6. Pradhan, A., Chauhan, V.S., and Tuteja, R. (2005). Plasmodium falciparum DNA helicase 60 is a schizont stage specific, bipolar and dual helicase stimulated by PKC phosphorylation. Mol Biochem Parasitol *144*, 133-141.
7. Pradhan, A., and Tuteja, R. (2007). Bipolar, Dual Plasmodium falciparum helicase 45 expressed in the intraerythrocytic developmental cycle is required for parasite growth. J Mol Biol *373*, 268-281.
8. Evans, L., Gowers, D., Firman, K., and Youell, J. (2012). Enhanced purification and characterization of the PfeIF4A (PfH45) helicase from Plasmodium falciparum using a codon-optimised clone. Protein Expr Purif *85*, 1-8.
9. Winstanley, P.A. (2000). Chemotherapy for falciparum malaria: the armoury, the problems and the prospects. Parasitol Today *16*, 146-153.
10. Tuteja, R. (2007). Helicases - feasible antimalarial drug target for Plasmodium falciparum. FEBS J *274*, 4699-4704.
11. White, J.H., and Kilbey, B.J. (1996). DNA replication in the malaria parasite. Parasitol Today *12*, 151-155.
12. Bachur, N.R., Yu, F., Johnson, R., Hickey, R., Wu, Y., and Malkas, L. (1992). Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. Mol Pharmacol *41*, 993-998.

13. Abdel-Monem, M., Durwald, H., and Hoffmann-Berling, H. (1976). Enzymic unwinding of DNA. 2. Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme. Eur J Biochem *65*, 441-449.
14. Matson, S.W., and Kaiser-Rogers, K.A. (1990). DNA helicases. Annu Rev Biochem *59*, 289-329.
15. Tuteja, N., and Tuteja, R. (2004). Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. Eur J Biochem *271*, 1849-1863.
16. Vashisht, A.A., Pradhan, A., Tuteja, R., and Tuteja, N. (2005). Cold- and salinity stress-induced bipolar pea DNA helicase 47 is involved in protein synthesis and stimulated by phosphorylation with protein kinase C. Plant J *44*, 76-87.
17. Bachur, N.R., Johnson, R., Yu, F., Hickey, R., Applegren, N., and Malkas, L. (1993). Antihelicase action of DNA-binding anticancer agents: relationship to guanosine-cytidine intercalator binding. Mol Pharmacol *44*, 1064-1069.
18. Wirth, D.F. (2002). Biological revelations. Nature *419*, 495-496.
19. Priebe, W. (1995). "Anthracycline Antibiotics" New Analogues, Methods of Delivery, and Mechanisms of Action., (Washington DC: American Symposium Society).
20. Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., et al. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature *419*, 498-511.
21. Pradhan, A., and Tuteja, R. (2006). Plasmodium falciparum DNA helicase 60. dsRNA- and antibody-mediated inhibition of malaria parasite growth and downregulation of its enzyme activities by DNA-interacting compounds. FEBS J *273*, 3545-3556.
22. Shankar, J., and Tuteja, R. (2008). UvrD helicase of Plasmodium falciparum. Gene *410*, 223-233.
23. Pradhan, A., Chauhan, V.S., and Tuteja, R. (2007). 'DEAD-box' helicase from Plasmodium falciparum is active at wide pH and is schizont stage-specific. J Vector Borne Dis *44*, 12-22.
24. Pradhan, A., Hussain, E.M., and Tuteja, R. (2008). Characterization of replication fork and phosphorylation stimulated Plasmodium falciparum helicase 45. Gene *420*, 66-75.
25. Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseranee, N., and Buranabanyat, B. (2008). Secretion of recombinant Bacillus hydrolytic enzymes using Escherichia coli expression systems. J Biotechnol *133*, 50-57.
26. Tuteja, R. (2010). Genome wide identification of Plasmodium falciparum helicases: a comparison with human host. Cell Cycle *9*, 104-120.

27. Ahmad, M., Singh, S., Afrin, F., and Tuteja, R. (2012). Novel RuvB nuclear ATPase is specific to intraerythrocytic mitosis during schizogony of Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol *185*, 58-65.

28. Prakash, K., and Tuteja, R. (2010). A novel DEAD box helicase Has1p from Plasmodium falciparum: N-terminal is essential for activity. Parasitol Int *59*, 271-277.

29. Tran, N.Q., Pham, X.H., Tuteja, R., and Tuteja, N. (2011). Inhibition of unwinding and ATPase activities of pea MCM6 DNA helicase by actinomycin and nogalamycin. Plant Signal Behav *6*, 327-329.

30. Mehta, J., and Tuteja, R. (2011). Inhibition of unwinding and ATPase activities of Plasmodium falciparum Dbp5/DDX19 homolog. Commun Integr Biol *4*, 299-303.

31. Borowski, P., Niebuhr, A., Schmitz, H., Hosmane, R.S., Bretner, M., Siwecka, M.A., and Kulikowski, T. (2002). NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. Acta Biochim Pol *49*, 597-614.

32. Tuteja, N. (1997). Unraveling DNA helicases from plant cells. Plant Mol Biol *33*, 947-952.

33. Tuteja, N. (2003). Plant DNA helicases: the long unwinding road. J Exp Bot *54*, 2201-2214.

34. Umezu, K., Nakayama, K., and Nakayama, H. (1990). Escherichia coli RecQ protein is a DNA helicase. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 5363-5367.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน

๑. *ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ*

Suntornthiticharoen, P., Srila, W., Chavalitshewinkoon-Petmitr, P., Limudomporn, P., and Yamabhai, M. (2014). Characterization of recombinant malarial RecQ DNA helicase. Molecular and biochemical parasitology *196*, 41-44. [IF 2.243]

๒. *ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ*

Pruksametanan, N., Jaruseranee, N., Suntornthiticharoen, P., and Yamabhai, M. (2010). PCR-based cloning of DNA Helicase: PfDH A. In SUT Graduate Conference 2010 (poster) (Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. November 21-23).

Suntornthiticharoen, P., and Yamabhai, M. (2010). Molecular cloning of malarial helicase. In The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "International Conference on Biotechnology for Healthy Living" (poster) (Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22).

Suntornthiticharoen, P., Srila, W., Chavalitshewinkoon-Petmitr, P., and Yamabhai, M. (2012). Expression and Characterization of P. falciparum CHR 9/PFI0910w DNA helicase. In 8th Annual BioMalPar|EVIMalaR Conference : Biology and Pathology of the Malaria Parasite (poster) (EMBL Heidelberg, Germany, May 14-16).

๓. *ผลงานเผยแพร่ในรูปแบบอื่นๆ*

เผยแพร่ทาง website ของ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มทส
http://personal.sut.ac.th/montarop/2013WEBSITE/School_of_Biotech/Blog/Blog.html

ภาคผนวก ข การผลิตบุคลากร

ส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยนี้ ได้ใช้เป็นส่วนหนึ่งปริญญานิพนธ์ ของนักศึกษา ๖ คน จากมหาวิทยาลัยรังสิต ดังนี้

๑. นางสาวดวงใจ อ๊อดกัน
๒. นายชาญณรงค์ ช้างทอง
๓. นาวสาวเกศสิรินทร์ สุขอารมย์
๔. นางสาวศศิธร หมั่นกระโทก
๕. นางสาวภัทราวรรณ ตาปราบ
๖. นางสาวเพ็ญสุดา สมภูงา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ค ผลการวิจัยในรูปแบบที่ได้รับการตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ

ชื่อผลงาน

Characterization of recombinant malarial RecQ DNA helicase.

ชื่อวารสาร

Molecular and biochemical parasitology *196*, 41-44.

ค่าดัชนีผลกระทบ

IF 2.243

* ผลงานแสดงใน ๔ หน้าถัดไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Molecular & Biochemical Parasitology 196 (2014) 41–44

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology

Short communication

Characterization of recombinant malarial RecQ DNA helicase

Pattra Suntornthiticharoen[a], Witsanu Srila[b], Porntip Chavalitshewinkoon-Petmitr[c], Paviga Limudomporn[c], Montarop Yamabhai[b,*]

[a] Faculty of Science, Rangsit University, Thailand
[b] Molecular Biotechnology Laboratory, Suranaree University of Technology, Thailand
[c] Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 April 2014
Received in revised form 23 July 2014
Accepted 31 July 2014
Available online 9 August 2014

Keywords:
Malaria
Plasmodium falciparum
DNA helicase
RecQ
Cloning
Expression

ABSTRACT

RecQ DNA gene of multi-drug resistant *Plasmodium falciparum* K1 (PfRecQ1) was cloned, and the recombinant C-terminal-decahistidine-tagged PfRecQ1 was expressed in *Escherichia coli.* The purified enzyme could efficiently unwind partial duplex DNA substrate in a 3′ to 5′ direction. The malarial RecQ1 could not unwind substrates with both 5′ and 3′ overhangs, those with a 5′ overhang, or blunt-ended DNA duplexes. Unwinding of DNA helicase activity was driven by the hydrolysis of ATP. The drug inhibitory effects of six compounds indicated that only doxorubicin and daunorubicin could inhibit the unwinding activity.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

RecQ DNA helicases are a family of highly conserved DNA helicases that play a key role in protecting and stabilizing the integrity of the genome [1]. They have been recognized as the guardian of genomic integrity and shown to be a hallmark of both cancer and aging [2]. The RecQ helicases have gained significant interest in the past decade due to the association of three human RecQ helicases in rare genetic disorders, i.e. Bloom syndrome (BLM helicase), Werner syndrome (WRN helicase), and Rothmund-Thomson syndrome (RECQ4) helicases [1]. The roles of other two human RecQ helicases in humans, i.e. RECQ1 and RECQ5, are not yet known, although it is likely that more links between defects in DNA helicases and human diseases will be identified. So far, only RecQ DNA helicases from human, *E. coli*, yeast, and a few others bacteria and fungi have been investigated [3]. No RecQ homolog has been reported in any protozoa or parasite.

Helicases have been previously suggested to be one of the feasible drug targets for the control of malaria, one of the most devastating diseases worldwide [4]. However, since there are a number of helicases in *Plasmodium falciparum* and other living organisms, understanding the detailed mechanism of the unwinding reaction of different helicases is important to evaluate whether the enzyme is one of the potential candidates for drug targets.

The helicase gene of 2211 bp from the genomic DNA of *P. falciparum* K1 [5] was cloned using a PCR-based method, using genomic DNA as a template (GenBank accession number KM213514). The primers used for cloning were designed based on the DNA sequence of the putative helicase gene of *P. falciparum* 3D7, Gene ID PF3D7_0918600 (previous ID PFI0910w) from the PlasmoDB database.

Amino acid sequence analysis revealed that the RecQ1 helicase from *P. falciparum* strain K1 and 3D7 are almost identical, with 99.73% sequence identity. *P. falciparum* RecQ1 (designated PfRecQ1) shares low sequence identity with human BLM, RECQ1, and WRN at 24.47%, 23.11%, and 19.87%, respectively. PfRecQ1 from *P. falciparum* strain K1 contains two inserts that are missing in strain 3D7. Only human BLM contains a long N-terminal portion containing three acidic domains (see Supplementary material I).

The schematic diagram of the four aligned RecQ helicases is shown in the upper panel of Fig. 1, while the predicted 3D structure of the parasite PfRecQ1 in this study is illustrated in the bottom panel. The organization of the conserved domains is similar. There are two conserved domains in all RecQ helicases, namely helicase ATP-binding domain, helicase C-terminal or RQC domain. The DEAH box on human BLM was replaced by the DEVH box in human RECQ1 and plasmodium RecQ. Human RecQ BLM contains an additional 595 and 51 amino acids at the N-terminus and C-terminus,

* Corresponding author. Tel.: +66 44224152; fax: +66 44224150.
E-mail addresses: montarop@sut.ac.th, montarop@g.sut.ac.th, montarop@gmail.com (M. Yamabhai).

http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.07.013
0166-6851/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

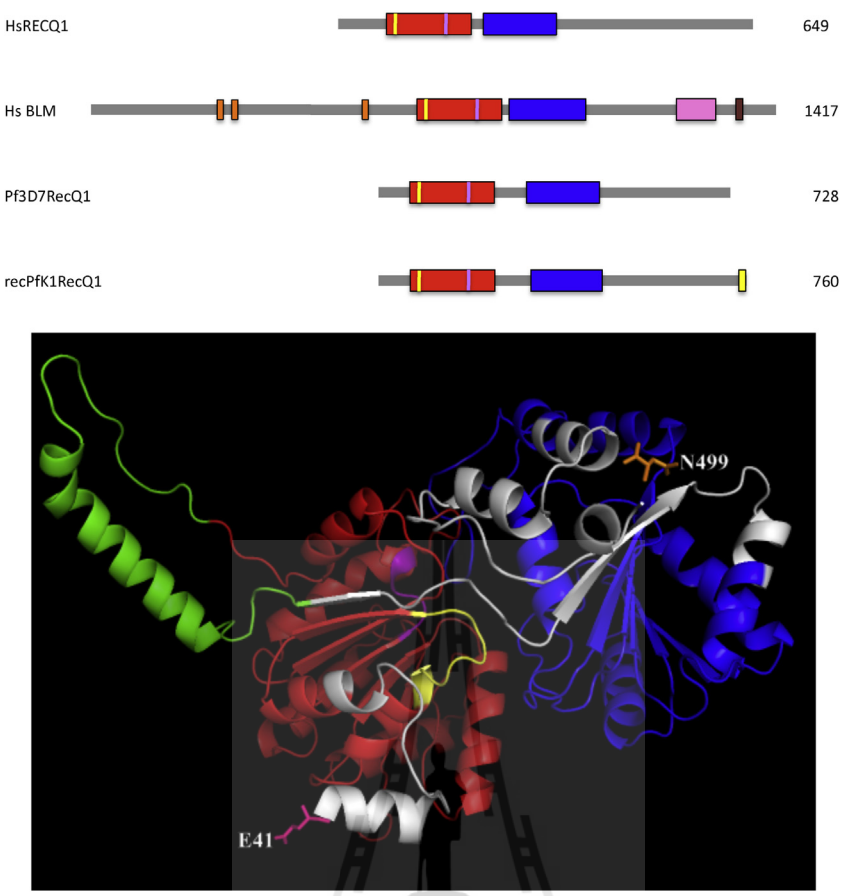


Fig. 1. Structural diagram of different RecQ helicases and 3D structure of PfRecQ1. *Upper panel* illustrates the schematic diagram of human and *Plasmodium* RecQ helicases referred to in this study. Yellow and purple amino acids indicated ATP binding domain and DExH box, respectively. Red box indicates the main helicase domain; blue box indicates the helicase C-terminal domain or RQC domain. Only human BLM contains HRDC and the nuclear localizing signal, which are indicated by the pink and brown boxes, respectively. Yellow box at the C-terminal of recombinant PfRecQ1 represents 10xHis, followed by FLAG tags. The number of amino acids in each protein is indicated on the right. The diagram is drawn to scale. The position of each bar is based on the CLUSTALW alignment in Fig. 2. *Bottom panel* illustrates the 3D structure of PfRecQ1 generated by SWISS-MODEL homology modeling software, using human RECQ1, PDB code: 2wwyA as a template. Only partial structure with high confidence (based on Phyre2) is shown, i.e., E41 to N499 are shown. Different colors indicate different conserved domains, which are indicated in the schematic model below. The green helix indicates an extra-loop that is only found in *Plasmodium* RecQ.

respectively. In addition, the putative nuclear localization signal and the HDRC domain were only found in human BLM. The 3D structure of PfRecQ1 was predicted using Swiss-model server and visualized by Pymol software, using human RECQ1 as a template [6]. The green helix protruding out of the compact structure of the compact helicase is a non-conserved additional insert that was only found in *P. falciparum* RecQ1.

The expression and purification of PfRecQ1 from *P. falciparum* strain K1 in this study was based on our previous successful method for the expression of various bacterial enzymes [7]. The recombinant PfRecQ1 could be purified by one-step Ni^{2+} affinity chromatography to apparent homogeneity (see supplementary material II). Biochemical characterization indicated that the helicase reaction required the presence of ATP as a cofactor, although dATP supported the unwinding at 89% of the efficiency of ATP. Other dNTPs, i.e. dCTP, dGTP, and dTTP, could support partial unwinding at 30%, 21%, and 13%, respectively. $MgCl_2$ is required for maximum helicase activity. $CuCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, $ZnCl_2$ and $FeSO_4$ could partially provide the unwinding activity at approx. 70–80% of activity in the absence of $MgCl_2$. In contrast, $CaCl_2$, $CuSO_4$ and $MnSO_4$ could slightly support the unwinding activity in the range of 44–61%. DNA helicase activity was significantly decreased in the presence of 8 mM EDTA, 200 mM KCl or 200 mM NaCl.

The helicase activity of recombinant PfRecQ1 on various substrates is shown in Fig. 2. The enzyme could unwind DNA substrates with 17- and 34-base pair duplex regions, as indicated in Fig. 2 A and B. The enzyme could not unwind 17-mer partial duplex DNA substrates with both 5′ and 3′ protruding ends (Fig. 2E) or 5′ protruding ends (Fig. 2C), and 41-mer duplex blunt end substrate (Fig. 2F). However, the enzyme could unwind 17-mer partial duplex DNA substrate with 3′ protruding end (Fig. 2D). These results indicated that the *Plasmodium* RecQ1 catalyzes DNA unwinding unidirectionally in the 3′ to 5′ direction along the bound strand, and could not unwind blunt-ended duplex DNA substrate.

The effects of various drugs on the activity of recombinant PfRecQ1 DNA helicase in a standard duplex DNA dissociation reaction were reported in Table 1. All drugs were pre-incubated with duplex M13-17-mer DNA substrate at the concentration of 50 μM. Only anthracycline antibiotics, i.e. doxorubicin and daunorubicin, could inhibit the DNA unwinding activity of the enzyme, at IC_{50}

Table 1
Effect of inhibitors on PfRecQ1 DNA helicase activity.

Inhibitors	IC_{50} (μM)
Aphidicolin	>50
Daunorubicin hydrochloride	30
Doxorubicin hydrochloride	23
Genistein	>50
Mitoxantrone hydrochloride	>50
Netropsin dihydrochloride	>50

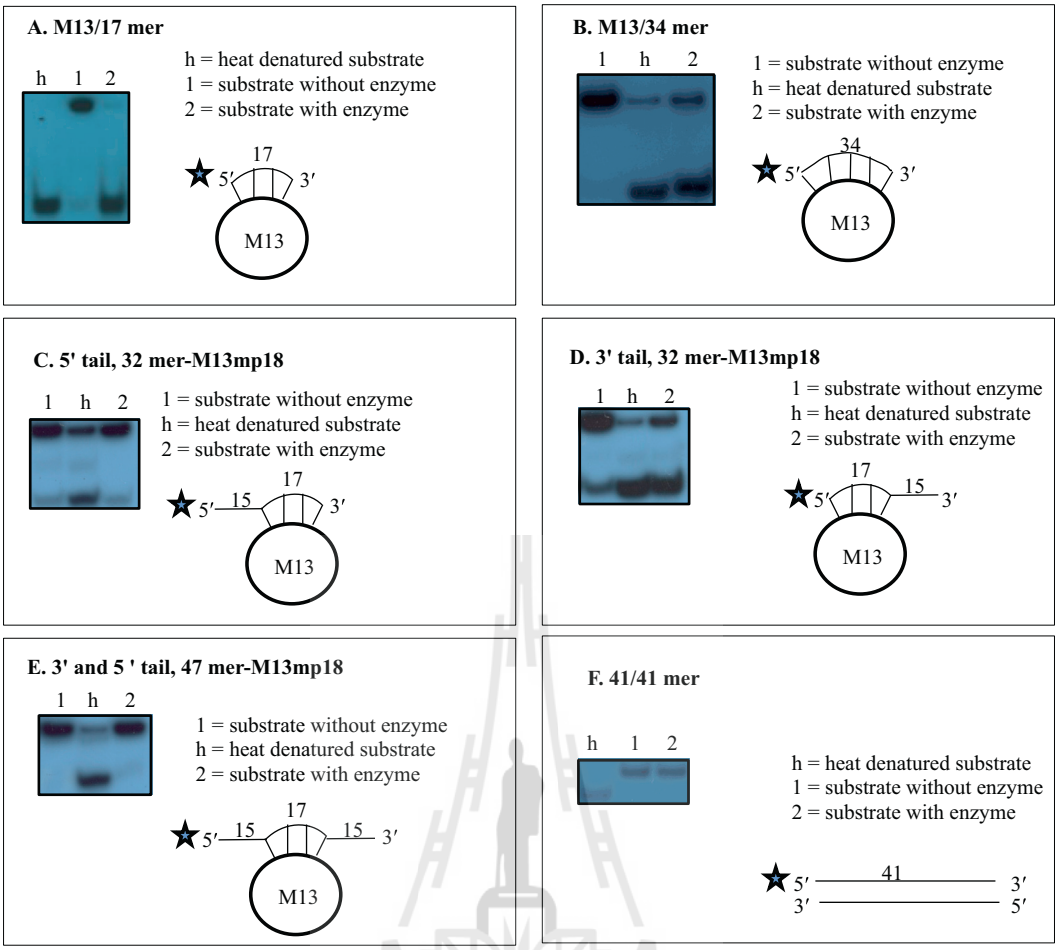


Fig. 2. Substrate specificity of PfRecQ1 helicase activity. Each panel shows the structure of the substrate used and the autoradiogram of the results from various conditions described. Top bands indicate DNA duplex substrates; bottom bands indicate ssDNA products. Asterisk denotes the end of DNA labeled with ^{32}P. Purified recombinant PfRecQ1 was analyzed as previously described [7,11]. The recombinant enzyme was fused with 10xHis tag, followed by FLAG tag. The enzyme was harvested after induction with 0.5 mM IPTG when the culture reach OD_{600} of 0.6, and further cultivated for 20 h at room temperature. The enzyme was further purified by one-step Ni^{2+} affinity chromatography to apparent homogeneity. The apparent molecular weight (MW) of the recombinant enzyme was approximately 87 kDa. The yield of the purified helicase was approx. 0.5 mg/L culture. Detail description of the expression construct and expression condition can be found in supplementary material.

values of 23 and 30 μM, respectively. Other drugs including mitoxantrone, a type II topoisomerase inhibitor, netropsin, an antibiotic that can bind to the minor groove of AT-rich sequence of ds DNA, aphidicolin, an inhibitor of DNA polymerase A and D, and genistein, an isoflavone that showed several biological activities including antihelmintic and inhibitor of topoisomerase II, could not inhibit the activity of PfRecQ1.

So far BLM and WRN RecQ helicases from human have been relatively well-studied [1] and only a few RecQ helicases from *E. coli*, yeast and some others bacteria and fungi have been investigated [3]. Recent research on the genome-wide identification of *P. falciparum* helicases indicated that there are two putative homologs of human RecQ helicases, i.e. BLM homolog and WRN homolog [8]. The PFI0910w or the PfRecQ1 from this study were indicated as homologs of human BLM [8]. However, our results demonstrated that the PfRecQ1 is indeed likely to be the homolog of human RECQ1 because the organization of the conserved domains and the size of the enzyme are much more similar than those between human BLM and PfRecQ1. Moreover, the results from homology modeling indicated that the three-dimensional structure of human RECQ1 is best fitted with the 3D structure of PfRecQ1. Human BLM and RECQ1 have been shown to display distinct DNA substrate specificity and different functions [9]; therefore, it can be proposed that human BLM helicase evolved from RECQ1 helicase, through the addition of N-terminal and HRDC domains, resulting in the diverse biological roles within each eukaryotic cell. Moreover, it can be suggested that the N-terminal part found in BLM may be required for the maintenance of more complex organisms, which is not necessary in parasites.

The unwinding characteristics of PfRecQ1 are similar to those of human BLM and WRN [10]. The ability of PfRecQ1 helicase to unwind a 3′-tailed duplex confirms the previous observation that a single-stranded 3′-tail is not a structural requirement for the unwinding of standard B-form DNA by these helicases [10]. Further analysis on the substrate preference of this enzyme, such as substrates with internal nicks, a blunt-ended duplex containing a centrally located single-stranded 'bubble', as well as a synthetic X-structure (a model for the Holliday junction recombination intermediate), should be conducted to try to understand the specific functions and interactions of these enzymes in the cells. In addition, since human RECQ1 has been shown to have a unique role in restoring active replication forks that have regressed by DNA topoisomerase I inhibition [2], it would be interesting to investigate whether the *Plasmodium* RecQ1 could possess a similar activity.

Previously PfDH A helicase has been identified from a crude extract of *P. falciparum* K1 [11]. The apparent molecular weight of the recombinant PfRecQ1 was approximately 87 kDa while that of PfDH A was 90 kDa. The polarity of both DNA helicases was 3′ to 5′ direction and both of them could not unwind blunt-ended duplex DNA. The unwinding activity of both PfRecQ1 and PfDH A depended

on hydrolysis of ATP or dATP, and could be inhibited by 200 mM KCl, 200 mM NaCl, and 8 mM EDTA.

The anthracyclines were used as antitumor antibiotics. These drugs will intercalate into double stranded DNA and generate DNA structural change. Various DNA-intercalating drugs have been used for the effect on prokaryotic and eukaryotic DNA helicase [12]. Drug inhibition assays indicated that only anthracycline antibiotics could inhibit recombinant PfRecQ1 helicase from *P. falciparum* strain K1 at higher IC_{50} values when compare to those of *P. falciparum* from the parasite culture [11], *P. cynomolgi* DEAD-box DNA helicase 45 (PcDDH45) [13], and *P. falciparum* helicase 45 (PfH45) [14]. This anti-cancer drug is an intercalating agent, which can also inhibit topoisomerase II. However, other inhibitors of topoisomerase II, i.e. mitoxantrone and genistein, did not inhibit the plasmodium RecQ1, indicating its distinctive mode of function. Mitoxantrone, an intercalator that places amino and hydroxyl groups into the major groove, and netropsin, a minor groove binder, have been shown to inhibit human WRN and BLM helicases activity at a concentration of $\geq$10 μM [15]. However, mitoxantrone and netropsin did not inhibit PfRecQ1 activity at a concentration of 50 μM. The different in drug sensitivity from human RecQ helicase indicated its potential use as a novel target for anti-malarial drug.

Even if PfRecQ1 is similar to human RECQ1 and BLM, 3D structure analysis indicated an extra loop is only present in malarial helicase. This could be the basis for difference in drug sensitivity. In addition, it also suggested that it is possible to use this enzyme as a potential anti-malarial drug target, provided that the drug is targeted to this extra loop.

The knowledge obtained from this study could provide more insight into the function of the RecQ family of DNA helicase in various eukaryotic cells and suggested that this enzyme could be a potential anti-malarial drug target.

Acknowledgements

This research was supported by the National Research Council of Thailand (grant number SUT3-304-53-24-03), Suranaree University of Technology (SUT), and by the Higher Education Research Promotion and National Research University (NRU) Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.07.013.

References

[1] Larsen NB, Hickson ID. RecQ helicases: conserved guardians of genomic integrity. Adv Exp Med Biol 2013;767:161–84.
[2] Berti M, Ray Chaudhuri A, Thangavel S, Gomathinayagam S, Kenig S, Vujanovic M, et al. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. Nat Struct Mol Biol 2013;20:347–54.
[3] Bohr VA. Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. Trends Biochem Sci 2008;33:609–20.
[4] Tuteja R. Helicases – feasible antimalarial drug target for *Plasmodium falciparum*. FEBS J 2007;274:4699–704.
[5] Thaithong S, Beale GH, Chutmongkonkul M. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to five drugs: an in vitro study of isolates mainly from Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983;77:228–31.
[6] Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL repository and associated resources. Nucleic Acids Res 2009;37:D387–92.
[7] Yamabhai M, Buranabanyat B, Jaruseranee N, Songsiriritthigul C. Efficient *E. coli* expression systems for the production of recombinant beta-mannanases and other bacterial extracellular enzymes. Bioeng Bugs 2011;2:45–9.
[8] Tuteja R. Genome wide identification of *Plasmodium falciparum* helicases: a comparison with human host. Cell Cycle 2010;9:104–20.
[9] Cui S, Klima R, Ochem A, Arosio D, Falaschi A, Vindigni A. Characterization of the DNA-unwinding activity of human RECQ1, a helicase specifically stimulated by human replication protein A. J Biol Chem 2003;278:1424–32.
[10] Mohaghegh P, Karow JK, Brosh Jr RM, Bohr VA, Hickson ID. The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. Nucleic Acids Res 2001;29:2843–9.
[11] Suntornthiticharoen P, Petmitr S, Chavalitshewinkoon-Petmitr P. Purification and characterization of a novel 3′-5′ DNA helicase from *Plasmodium falciparum* and its sensitivity to anthracycline antibiotics. Parasitology 2006;133:389–98.
[12] Tuteja N, Phan TN, Tuteja R, Ochem A, Falaschi A. Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents. Biochem Biophys Res Commun 1997;236:636–40.
[13] Tuteja R, Tuteja N, Malhotra P, Singh Chauhan V. Replication fork-stimulated eIF-4A from *Plasmodium cynomolgi* unwinds DNA in the 3′ to 5′ direction and is inhibited by DNA-interacting compounds. Arch Biochem Biophys 2003;414:108–14.
[14] Pradhan A, Hussain EM, Tuteja R. Characterization of replication fork and phosphorylation stimulated *Plasmodium falciparum* helicase 45. Gene 2008;420:66–75.
[15] Brosh Jr RM, Karow JK, White EJ, Shaw ND, Hickson ID, Bohr VA. Potent inhibition of werner and bloom helicases by DNA minor groove binding drugs. Nucleic Acids Res 2000;28:2420–30.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัยหลัก

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ ๘ มกราคม ๒๕๑๐ เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๒ แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา ๑ ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี ๒๕๓๖ ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา ๙ เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษา ระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. ๒๕๔๑ จากนั้นในปี พ.ศ. ๒๕๔๓-๒๕๔๕ ได้ทุนไปทำ postdoctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. ๒๕๔๖-๒๕๔๗ ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Insititute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ ๑๖ สิงหาคม ๒๕๔๗ และมีบุตร ๑ คน ชื่อ ดญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นรองศาสตราจารย์ และหัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) จนถึงปัจจุบันมีผลงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ๔๐ เรื่อง เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักของมหาบัณฑิต ๔ คน และดุษฎีบัณฑิต ๔ คน และเป็นหัวหน้า โครงการวิจัยทั้งหมด ๒๔ โครงการ แล้วเสร็จ ๒๐ โครงการ

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา ๓๐๐๐๐
โทร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๒-๔ ๒๒๔๒๓๔ หรือ ๒๔๔๓๘๘ โทรสาร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๐
Email: montarop@g.sut.ac.th

ประวัติผู้วิจัยร่วม

พัตรา สุนทรฐิติเจริญ เกิดเมื่อวันที่ ๒๐ มกราคม ๒๕๑๒ เป็นบุตรของนายสวัสดิ์ และ นางสุรีย์ สุนทรฐิติเจริญ จบการศึกษาระดับประถมและ มัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนสมรรถภาพวิทยา และ มัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสายปัญญา จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๒ ระดับปริญญาโทที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๗ จากนั้นเข้าทำงานที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปี พ.ศ. ๒๕๓๗-๒๕๔๒ และศึกษาระดับปริญญาเอกที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี ๒๕๔๒ ได้รับปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาอายุรศาสตร์เขตร้อน เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๔๘ ด้านพยาธิโปรโตซัว ปัจจุบันเป็นอาจารย์ประจำ หมวดวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านชีวเคมีของมาลาเรีย มุ่งเน้นการศึกษาด้านเอนไซม์ที่มีความสำคัญใน *Plasmodium falciparum* และการศึกษา endophytic fungi ในพืชสมุนไพรไทยที่สามารถออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ จนถึงปัจจุบันมีผลงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ๔ เรื่อง เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์หลักของบัณฑิต ๑๑ คน และเป็นกรรมการปริญญานิพนธ์ในระดับปริญญาตรีบัณฑิตคณะวิทยาศาสตร์และคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

หมวดวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยรังสิต

ถ. พหลโยธิน อ. เมือง จ. ปทุมธานี ๑๒๐๐๐

โทร ๐๒๙๙๗๒๒๒๒ ต่อ ๑๔๗๒

Email: lexpatra@hotmail.com

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี