

การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ซักซิเนต คีไอโครเจนส์

ของเชื้อพลาสโนเดิมน พลชิปาร์ม ไอโสเลตทีเก็ต



นาง นงลักษณ์ สุระวีระธรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จพด.สก.น.มหาวิทยาลัย
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-276-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION
OF ENZYME SUCCINATE DEHYDROGENASE IN
PLASMODIUM FALCIPARUM T₉ ISOLATE

Mrs. Nongluk Suraveratum

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Medical Science

Graduate school

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-633-276-7

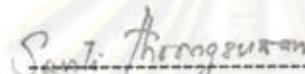
Thesis Title PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
ENZYME SUCCINATE DEHYDROGENASE IN
PLASMODIUM FALCIPARUM T₉ ISOLATE

By Mrs. Nongluk Suraveratum

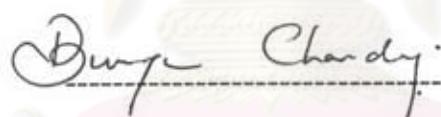
Department Medical Science

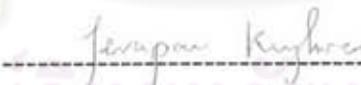
Thesis Advisor Associate Professor Jerapan Krungkrai, Ph.D.

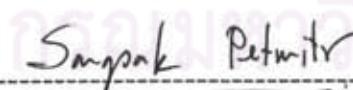
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree of Science

 Santi Tungsawan Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Tungsawan, Ph.D.)

Thesis Committee

 Bungorn Chomdej Chairman
(Associate Professor Bungorn Chomdej, M.D.)

 Jerapan Krungkrai Thesis Advisor
(Associate Professor Jerapan Krungkrai, Ph.D.)

 Songsak Petmitr Member
(Assistant Professor Songsak Petmitr, Ph.D.)

 Wanchai De-Eknakul Member
(Associate Professor Wanchai De-Eknakul, Ph.D.)

พิมพ์ครั้งที่ ๑ ฉบับบากถัดย่อ วิทยานิพนธ์ภาษาไทยของสืบต่อของที่ปรึกษาผู้เรียน

นงลักษณ์ สุรัชวิรชารรณ : การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ซักซิเนต
ดีไอโตรจีนของเชื้อพลาสโนมเดิมน พลซิปารัม ไอโซเลตทีเก้า (PURIFICATION AND
CHARACTERIZATION OF ENZYME SUCCINATE DEHYDROGENASE IN
PLASMODIUM FALCIPARUM T₉ ISOLATE) อ.ที่ปรึกษา : ดร. จริระพันธ์ กรุงไกร,
103 หน้า ISBN 974-633-276-7

เอนไซม์ซักซิเนต ดีไอโตรจีนเป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไปที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต โดยเป็นส่วนประกอบในวัฏจักรเครบส์ และในคอมเพล็กซ์ของระบบขนส่งออกซิเจน โดยออกซิเดชันซักซิเนตไปเป็นฟูมารดและสามารถส่งผ่านรีดิชิ่ง อิควิวะเลนต์ได้โดยตรง เอนไซม์นี้ประกอบด้วยส่วนแรกเป็นหน่วยย่อยฟลาโวโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 70 กิโลดอลตัน โดยมีส่วนประกอบของเอฟเอดีอยู่ ส่วนที่สองเป็นหน่วยย่อยเหล็กซัลเฟอร์โปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดอลตัน และยังมีหน่วยย่อยอื่นที่ไม่ขอบน้ำคือไซโตโกราฟี การศึกษารังนี้ได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ซักซิเนต ดีไอโตรจีนในเชื้อมาลาเรียของคนชนิดพลาสโนมเดิมน พลซิปารัม เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนายาต้านมาลาเรีย โดยมีเอนไซม์นี้เป็นตัวแทนที่มีน้ำหนักมาก

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ดังกล่าวในพลาสโนมเดิมน พลซิปารัมที่เตรียมให้บริสุทธิ์ โดยใช้ส่วนที่เป็นน้ำสาม่าผ่านคอลัมน์ของโนโน คิวแลกเปลี่ยนประจุบวก โนโน เอสแลกเปลี่ยนประจุลบ และชูปเปอร์โรส หกเฉลี่ยฟิลเตอร์ชั้นตามลำดับ ลักษณะร่องแยกโปรตีนประทิธิภาพสูง ให้ผลดังนี้คือเอนไซม์จะอยู่ในส่วนไซโตโซลของเชื้อมาลาเรีย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 86-91 กิโลดอลตัน เมื่อใช้วิธีเอส-เพจจะพบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย โดยหน่วยย่อยแรกมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 56.4 ± 3.4 กิโลดอลตัน และหน่วยย่อยที่สองมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 35.0 ± 1.7 กิโลดอลตัน และจะถูกตัดออกมาก มีความคงตัวที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียสมากกว่าที่ - 20 องศาเซลเซียส ค่าคงที่ของไนโตรเจนสีและค่าคงที่ของการเร่งปฏิกิริยาของสับสเตรทซักซิเนตเท่ากับ 3.01 ในโคลโนลาร์ และ 0.11 ต่อนาที ของสับสเตรทโคเอนไซม์คิวคูนีที่เท่ากับ 0.20 ในโคลโนลาร์ และ 0.06 ต่อนาที เมื่อทำการทดสอบความสามารถของสารต่างๆในการขับย้งการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ ฟูมารดซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยาไม่ค่าคงที่ของการขับย้งเท่ากับ 80.99 ในโคลโนลาร์ นาโนเมตและออกซิโลอะซีเตตเป็นสารขับย้งโครงสร้างคล้ายสับสเตรทมีค่าคงที่ของการขับย้งเท่ากับ 13.02 และ 12.06 ในโคลโนลาร์ตามลำดับ ส่วนพลัมบานจินพบว่ามีการขับย้ง 50 % ที่ความเข้มข้น 5 ในโคลโนลาร์ ส่วนยาต้านมาลาเรียได้แก่ คลอโรควิน อาร์มิสตินและอะโควาโนนไม่สามารถขับย้งเอนไซม์ได้รวมทั้งสารสองชนิดในอัตราฟูมารดหรือซีโคน คุณสมบัติที่พบจากการศึกษาเอนไซม์ดังกล่าวของเชื้อมาลาเรียนมีความแตกต่างจากเอนไซม์ของเซลล์สัตว์เลี้ยงสูกตัวชนิดเข้าบ้าน

ภาควิชา
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต ๖๐๑๗๙ ๕๘๑๒๔๘
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ๖๓๗๙ ๔๔๗

** C745075 MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEY WORD: SUCCINATE DEHYDROGENASE / PLASMODIUM FALCIPARUM /
PURIFICATION / CHARACTERIZATION
NONGLUK SURAVERATUM : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION
OF ENZYME SUCCINATE DEHYDROGENASE IN PLASMODIUM
FALCIPARUM T₉ ISOLATE. THESIS ADVISOR:ASSOC.PROF.
JERAPAN KRUNGKRAI, Ph.D. 103 pp. ISBN 974-633-276-7

Succinate dehydrogenase (SDH) functions in all aerobic organisms, as a membrane-bound enzyme and a component of both tricarboxylic acid cycle and complex II in electron transport chain. SDH catalyzes the oxidation of succinate to fumarate and is able to transfer the reducing equivalents directly to coenzyme Q (CoQ). The enzyme SDH is composed of four polypeptides. The large subunit which has molecular weight (M_r) of about 70 kilodaltons (kDa) contains covalently bound FAD, namely flavoprotein (Fp). The small subunit has M_r of about 30 kDa, namely iron sulfur protein (Ip). The other two small hydrophobic polypeptides, cytochrome b subunits with M_r of about 15 and 13 kDa, anchor the Fp and Ip subunits to mitochondrial inner membrane and provide the binding site for CoQ. This study is focused on the aspect of purification and characterization of the enzyme SDH in *P. falciparum* (T₉ isolate) and expected that the results will provide a basis for the development of novel antimalarial drug.

Malarial SDH was purified by using three-step purification protocol starting from the supernatant fraction of *P. falciparum* (T₉ isolate). These included Mono Q anion-exchange, Mono S cation-exchange and Superose 6 gel filtration chromatography on a fast protein liquid chromatographic system. The malarial SDH was located in cytosol, and found to be extremely labile. It was more stable at -19°C than -20°C. The purified enzyme had native M_r of 86-91 kDa. By SDS-PAGE, the malarial SDH revealed two subunits with M_r of 56.4±3.4 kDa for Fp subunit and 35.0±1.7 kDa for Ip subunit. The apparent Michaelis-Menten constants (K_m) and turnover number (k_{cat}) for succinate were 3.01 μM and 0.11 min⁻¹, respectively; for CoQ₀ they were 0.20 μM and 0.06 min⁻¹. Fumarate, the product of the enzyme, was a competitive inhibitor with K_i value of 80.99 μM. Malonate and oxaloacetate were substrate analog inhibitors with their K_i values of 13.02 and 12.06 μM, respectively. Plumbagin was found to inhibit more than 50 % at a concentration of 5 μM. Antimalarial drugs, such as chloroquine, artemisinine and atovaquone have no effect on the malarial SDH. It was relatively insensitive to 2-thienyltrifluoroacetone. Many properties observed in the malarial SDH were different from the host mammalian enzyme.

ภาควิชา.....
สาขาวิชา..... วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนักศึกษา..... ๖๐๗๗๔ ภานุวัฒน์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

LIST OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	IV
ABSTRACT (ENGLISH)	V
ACKNOWLEDGEMENT	X
LIST OF TABLES	XI
LIST OF FIGURES	XII
ABBREVIATIONS	XIV
INTRODUCTION	
The Malarial Parasite and Enzyme Succinate Dehydrogenase.....	1
Biology and Biochemistry of Malaria	
1. Life Cycle	9
2. Biochemistry of Malaria	
2.1 Carbohydrate metabolism.....	14
2.2 Amino Acid Metabolism and Protein Synthesis.....	16
2.3 Phospholipid and Cholesterol Metabolism.....	17
2.4 Genome Organization.....	18
2.5 Pyrimidine Biosynthesis and Purine Salvage.....	19

	Page
2.6 Energy Transformation and Mitochondria.....	20
 AIM OF THE THESIS.....	 23
 MATERIALS AND METHODS	
1. Materials	
1.1 Chemicals.....	24
1.2 Other Laboratory Supplies.....	27
2. Preparation of Stock Material for Culture Medium	
2.1 Stock RPMI 1640 Medium.....	27
2.2 Sodium Bicarbonate, 5 % (W/V).....	27
2.3 Serum.....	28
2.4 Culture Medium.....	28
2.5 Uninfected Red Blood Cells for Culture.....	29
3. Cultivation Techiques	
3.1 Preparation of Uninfected red blood cells.....	29
3.2 Cultivation of <i>P. falciparum</i>	29
3.3 Incubation of Culture in Candle jar.....	30
3.4 Changing Culture Medium.....	30
3.5 Parasitaemia Determination	
3.5.1 Geimsa's Stain.....	31
3.5.2 Phosphate Buffer.....	32
3.5.3 Staining.....	32
3.6 Cryopreservation of Malarial Parasites	
3.6.1 Freezing.....	32

	Page
3.6.1.1 The Freezing Solution.....	32
3.6.1.2 Freezing Procedure.....	33
3.6.2 Thawing.....	33
3.7 <i>P. falciparum</i> Strain Used in the Experiment.....	34
4. Procedure for Assay Protein	
4.1 Reagent Preparation.....	34
4.2 Protein Standard.....	35
4.3 Sample Preparation.....	35
4.4 Standard Assay Procedure.....	36
5. Procedure for Assay Enzyme.....	36
6. Procedure for Enzyme Purification	
6.1 Preparation of Intact Parasite.....	37
6.2 Preparation of Homogenate.....	38
6.3 Preparation of Supernatant Fluid.....	38
6.4 Preparation of Detergent Solubilization.....	38
6.5 FPLC on Mono Q Anion-Exchange Chromatography.....	39
6.6 FPLC on Mono S Cation-Exchange Chromatography.....	39
6.7 Gel Filtration Chromotography on Superose 6 FPLC Column.....	39
7. Procedure for Electrophoresis	
7.1 Electrophoretic Buffer and Gel.....	40
7.1.1 SDS-PAGE Reagents.....	40
7.1.2 Separating Gel.....	41
7.1.3 Stacking Gel.....	42
7.1.4 Running Buffer.....	42
7.1.5 Sample Buffer.....	42

	Page
7.2 Coomassie Blue R Staining.....	43
7.3 Destaining Solution.....	43
8. Study of Specific Activity of Succinate dehydrogenase.....	43
9. Molecular Weight Determination.....	44
10. Study of Kinetic Properties of the Enzyme.....	44
11. Study of Inhibitor of the Enzyme.....	44
 RESULTS	
1. Demonstration of Enzyme Succinate Dehydrogenase in <i>P. falciparum</i>	46
2. Purification of <i>P.falciparum</i> Succinate Dehydrogenase.....	49
3. Properties of Purified Succinate Dehydrogenase	
3.1 Stability of Succinate Dehydrogenase.....	56
3.2 Kinetic Parameters Determination.....	65
3.3 Inhibitor Studies.....	65
3.4 Molecular Weight Determination.....	78
 DISCUSSION.....	
SUMMARY.....	91
 REFERENCES.....	
BIOGRAPHY.....	103

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express appreciation to all those who participate in this study. First of all, to my adviser, Associate Professor Jerapan Krungkrai who spent a long time of assistance. I am especially grateful for his suggestion, criticism and encouragement throughout this research and during the preparation of this thesis.

Gratitude is also extended to Mrs. Sudaratana Krungkrai who has given me invaluable suggestion and criticism concerning my study in laboratory.

I would like also to express my sincere appreciation to Miss Rachanok Kanchanarithisak for her suggestion and technical assistance.

My acknowledgement is extended to all of the staffs in Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and also all my friends for their encouragements and enjoyments.

Finally, I would like to thank the WHO Special Programme for Research in Tropical Disease which provided me a research grant supporting this thesis.

LIST OF TABLES

	Page
Table 1. Composition of Complex II Among Three Organisms.....	8
Table 2. SDH Localization in Various Fractions of <i>P. falciparum</i> (T ₉ isolate).....	47
Table 3. Purification of SDH from <i>P. falciparum</i> (T ₉ isolate)....	57
Table 4. Stability of SDH Activity.....	63
Table 5. Kinetics Measurement of <i>P. falciparum</i> (T ₉ isolate) SDH by Varying Succinate Concentrations.....	66
Table 6. Kinetics Measurement of <i>P. falciparum</i> (T ₉ isolate) SDH by Varying CoQ ₀ Concentrations.....	68
Table 7. Kinetics Constants of <i>P. falciparum</i> (T ₉ isolate)SDH....	70
Table 8. Inhibitory Constants and Inhibitory effect of Antimalarial Drugs, Fumarate, Malonate, Oxaloacetate on <i>P. falciparum</i> (T ₉ isolate) SDH.....	74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

	Page
Fig. 1 The Tricarboxylic Acid Cycle.....	6
Fig. 2 Electron Transport Chain in Mammalian Mitochondria.....	7
Fig. 3 The Life Cycle of The Malaria Parasite.....	13
Fig. 4 Profile of SDH Activity of <i>P. falciparum</i> (T9 isolate) Eluted from the Anion-Exchange Mono Q Column of FPLC System.....	50
Fig. 5 Profile of SDH Activity of <i>P. falciparum</i> (T9 isolate) Eluted from the Cation-Exchange Mono S Column of FPLC System.....	52
Fig. 6 Profile of SDH Activity of <i>P. falciparum</i> (T9 isolate) Eluted from the Superose 6 Gel Filtration Column of FPLC System.....	54
Fig. 7 SDS-PAGE Pattern of SDH Purification in <i>P. falciparum</i> (T9 isolate).....	59
Fig. 8 Nondenaturing PAGE Analysis of Purified SDH from <i>P. falciparum</i> (T9 isolate).....	61
Fig. 9 Michaelis-Menten Kinetics and Lineweaver-Burk plot of <i>P.falciparum</i> (T9 isolate) SDH.....	72
Fig. 10 Structure of Antimalarial Drugs.....	76
Fig. 11 Standard Curve for Molecular Weight Determination by using SDS-PAGE Analysis.....	79

Fig. 12 Superose 6 Gel Filtration Chromatographic Pattern of Molecular Weight Marker Proteins.....	81
Fig. 13 Standard Curve for Molecular Weight Determination on the Superose 6 Gel Filtration Chromatography.....	83



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

$^{\circ}$ C	degree celcius
CO ₂	carbon dioxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
g	centrifugal force
hr	hour
KDa	kilodalton
M	Molar
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
μ l	microliter
μ M	micromolar
M _r	relative molecular weight
N ₂	nitrogen
O ₂	oxygen
rpm	round per minute
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
sec	second
SDH	succinate dehydrogenase
V/V	volume by volume
W/V	weight by volume