บทฟื้นฟูวิชาการ

สารยับยั้งเอ็นไซม์ที่สำคัญต่อการลอกแบบของดีเอ็นเอ: เป้าหมายใหม่ของยารักษาโรคมาลาเรีย

พรทิพย์ ชวลิตชีวินกุล*

Chavalitshewinkoon P. DNA replicating enzymes inhibitors: new targets for antimalarials. Chula Med J 1994 Jun;38(6): 349-360

Plasmodium falciparum 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. So far, two enzymes involving DNA replication, DNA polymerases and DNA topoisomerase II were studied as possible target enzymes. Fractionation of P. falciparum cellular extracts by fast protein liquid chromatography identified at least two different DNA polymerases. One DNA polymerase fraction copurified with a primase activity and therefore contained DNA polymerase α Its relative resistance to butylphenyl dGTP indicates that there is possible structural differences between host and parasite DNA polymerase α. The other DNA polymerase matched eukaryotic DNA polymerase γin all properties tested and it was sensitive to diphosphorylated (s)-9-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl) adenine which is an antiviral agent. Partially purified DNA toposiomerase II from P.falciparum showed ATP-and Mg^{2+}-dependent activities in decatenation assay the same as in other eukaryotes. This enzyme was sensitive to both prokaryotic and eukaryotic DNA topoisomerase II inhibitors. In addition, 9-anilinoacridines and pyronaridine were able to inhibit the enzyme activity and also inhibited the parasite growth in vitro.

Key words: *Plasmodium falciparum, DNA polymerase, DNA topoisomerase II.*

Reprint request: Chavalitshewinkoon P, Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

Received for publication. May 20, 1994.

*ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาใหญ่ต่อสุขภาพของประชากรทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่อยู่ในบริเวณเขตร้อน ซึ่งมียุงก้นปล่องซึ่งเป็นพาหะของโรคนี้อยู่ชุกชุม สิ่งที่ก่อให้เกิดปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการควบคุมและรักษาโรคมาลาเรีย คือการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาของเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะชนิดพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม วิธีหนึ่งที่จะช่วยแก้ไขปัญหาการดื้อต่อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้คือการค้นคว้าหายาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยเลือกหาเอ็นไซม์เป้าหมายใหม่ที่ถูกยับยั้งการทำงานได้โดยยาชนิดนั้นแล้วมีผลทำให้เชื้อมาลาเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ยาที่นำมาใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียในปัจจุบันนี้ส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายที่อยู่ในไซโตปลาสมของเชื้อ หรือยาบางชนิดมี การนำมาใช้โดยที่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานของยาชนิดนั้น ทราบเพียงแต่ว่ายานั้นสามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียได้

การดำรงชีวิตของเชื้อมาลาเรียในร่างกายมนุษย์จะต้องมีการแบ่งตัวทั้งในระยะที่อาศัยอยู่ในเซลล์ตับและในระยะที่อาศัยในเซลล์เม็ดโลหิตแดง ในขณะที่มีการแบ่งตัวของเชื้อนั้นจะมีการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจากเซลล์แม่ไปยังเซลล์ลูก โดยเกิดขบวนการสร้างดีเอ็นเอชุดใหม่ที่ลอกข้อความพันธุกรรมจากดีเอ็นเอสายเดิมขบวนการนี้เรียกว่า DNA replication ขบวนการนี้เกิดขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์ โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์หลายชนิด เช่น helicase ทำหน้าที่แยกสายคู่ของดีเอ็นเอ ออกจากกัน DNA topoisomerase ทำหน้าที่คลายเกลียวของดีเอ็นเอ primase ทำหน้าที่สร้าง RNA primer DNA polymerase ทำหน้าที่สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ โดยนำนิวคลีไทด์แต่ละโมเลกุลมาเชื่อมต่อกันโดยมีดีเอ็นเอสายเดิมเป็นแม่แบบ (template) exonuclease ทำหน้าที่ในการตัดนิวคลีโอไทด์ที่ต่อผิดลำดับออกจากดีเอ็นเอสายใหม่ RNase H ทำหน้าที่กำจัด RNA primer ภายหลังจากการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่แต่ละสายเสร็จแล้ว และเอ็นไซม์ ligase ทำหน้าที่เชื่อมต่อปลายของดีเอ็นเอสายใหม่แต่ละชิ้นเข้าด้วยกัน ให้เป็นดีเอ็นเอสายยาว

ในปัจจุบันนี้มีการศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ดังกล่าวในเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม เพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ เอ็นไซม์ DNA polymerase และ DNA topoisomerase

DNA polymerases

DNA polymerases (EC 2.7.7.7) เป็นเอ็นไซม์ทำหน้าที่เชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP dCTP dGTP และ dTTP เข้ากับสาย primer เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ โดยมีเอ็นเอสายเดิมเป็นแม่แบบ DNA polymerases มี 2 ประเภท คือ prokaryotic และ eukaryotic DNA polymerases ใน eukaryotes ได้มีการค้นพบเอ็นไซม์ชนิดนี้ครั้งแรกใน calf thymus ในปี ค.ศ.1960[1] เรียกชื่อว่า DNA polymerase α ต่อมาภายหลังมีการค้นพบเอ็นไซม์ชนิดนี้ขึ้นอีกรวมเป็น 5 ชนิด คือ α, β, γ, δ และ ε

DAN polymerase αทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายสั้นๆ (Okazaki fragments) ที่ lagging strand ของดีเอ็นเอแม่แบบ เอ็นไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วย 4 subunits และมี primase activity อยู่ด้วยโดยอยู่ในรูปของ Pol α-primase complex การทำงานของเอ็นไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้งได้ด้วย aphidicolin (aphidicolin-sensitive polymerase) ปริมาณของเอ็นไซม์ชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงที่เซลล์มีการแบ่งตัว[2]

DNA polymerase β พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1978[3] เป็นเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ (repair enzyme) เอ็นไซม์ชนิดนี้มีความสามารถสร้างดีเอ็นเอสายสั้นๆ ได้เท่านั้นไม่ว่าดีเอ็นเอแม่แบบจะมีความยาวเท่าใดก็ตาม เอ็นไซม์ชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าชนิดแรก คือมีน้ำหนักโมเลกุล 40 กิโลดาลตัน การทำงานของเอ็นไซม์ชนิดนี้ไม่ถูกยับยั้งโดยสาร aphidicolin แต่จะถูกยับยั้งได้โดย N-ethylmaleimide

DNA polymerase γ เอ็นไซม์ชนิดนี้ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Fridlender et al ในปี ค.ศ. 1972[4] โดยแยกสกัดมาจาก Hela cells และพบเอ็นไซม์ชนิดนี้อยู่ในส่วนของไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ทำให้เชื่อว่าเอ็นไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่เกี่ยวกับขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย เอ็นไซม์นี้สามารถทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ oligo dT และ poly rA (ribonucleoside 5'-triphosphate of adenine) เป็น primer และ template ตามลำดับ การทำงานของเอ็นไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้งได้ N-ethylmaleimide ส่วน aphidicolin ไม่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์นี้

DNA polymerase δ ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกจากไขสันหลังของกระต่ายในปีค.ศ.1975 โดย Weissbach *et al.*[5] เอ็นไซม์นี้มีคุณสมบัติแตกต่างจากเอ็นไซม์ชนิดอื่นๆ คือ มี 3'-5' exonuclease activity อยู่ด้วยทำให้สามารถเพิ่มความถูกต้องของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอที่กำลังสังเคราะห์ได้มากขึ้น เอ็นไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่บริเวณ leading strand ของดีเอ็นเอแม่แบบ เอ็นไซม์นี้จะถูกกระตุ้นให้สามารถในการสร้างสายดีเอ็นเอให้ยาวมากขึ้นด้วย PCNA (proliferating cell nuclear antigen) การทำงานของเอ็นไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้งได้ด้วย aphidicolin และ N-ethylmaleimide

DNA polymerase ε เพิ่งถูกค้นพบเมื่อปีค.ศ.1990[6] โดยเรียกชื่อว่า DNA polymerase δ_2 เพราะว่ามี 3'-5' exonuclease activity และสามารถสร้างดีเอ็นเอสายยาวได้เหมือนกับเอ็นไซม์ DNA polymerase δ แต่ไม่ต้องมีการกระตุ้นจาก PCNA[7] การทำงานของเอ็นไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้งได้โดย aphidicolin และ N-ethylmaleimide เช่นกัน แต่สามารถต้านต่อฤทธิ์ของ carbonyl diphosphate ซึ่งเป็นสาร triphosphate analog ได้[6]

DNA polymerases ของ *Plasmodium falciparum*

การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์

การศึกษาเอ็นไซม์ DNA polymerase ของ *P.falciparum* เริ่มต้นจากการเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองให้ได้ปริมาณมากๆ[8] แยกเชื้อออกจากเม็ดโลหิตแดง บดให้เซลล์ของเชื้อแตก ทำให้นิวเคลียสแตกโดยใช้สารละลาย KCl ความเข้มข้นสูง แยกและทำให้เอ็นไซม์บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)[9] โดยผ่าน column ต่างๆ ตามลำดับดังนี้ Mono Q Hydroxyapatite และ Mono S พบว่าเมื่อผ่าน Mono S column จะได้เอ็นไซม์ 2 ชนิดด้วยกัน คือ ชนิดที่ถูกยับยั้งได้ด้วย aphidicolin (aphidicolin sensitive, As DNA polymerase) ซึ่งถูกชะออกจาก column ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.12-0.25 M และชนิดที่มีความสามารถต้านทานต่อฤทธิ์ของ aphidicolin ได้ (aphidicolin resistant, Ar DNA polymerase) ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.26-0.42 M ต่อจากนั้นเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิด As จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการผ่าน Mono Q และ Mono S analytical columns ตามลำดับ พบว่าเอ็นไซม์ที่ได้ครั้งนี้มี primase activity อยู่ด้วย ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเอ็นไซม์ชนิดนี้คือ DNA polymerase α ส่วนเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิด Ar นั้นพบว่าเมื่อนำมาผ่าน Mono Q analytical column จะมีความบริสุทธิ์ถึง 315 เท่าของ crude extract เมื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ ชนิดนี้พบว่าการทำงานของเอ็นไซม์นี้ถูกยับยั้งได้ด้วย N-ethymlaleimide แต่สามารถต้านทานต่อ aphidicolin ได้ และมีความสามารถสร้างดีเอ็นเอสายยาวๆ ได้ (high processivity) จึงสรุปได้ว่าเอ็นไซม์ชนิดนี้คือ DNA polymerase γ การศึกษาขนาดโมเลกุลของ As และ Ar DNA polymerases ด้วยวิธีการทำ sedimentation ใน glycerol gradient พบว่าค่า S-values ของ As และ Ar DNA polymerases มีค่าประมาณ 18 S และ 9.2 S ตามลำดับ

นอกเหนือจากการค้นพบเอ็นไซม์ DNA polymerase α ของ *P.falciparum* โดยวิธีดังกล่าวแล้ว ยังได้มีผู้ทำการตรวจหาเอ็นไซม์นี้จาก crude extract โดยตรงโดยใช้ monoclonal antibody ต่อเอ็นไซม์ DNA polymerase α ของคนเป็นตัวตรวจหา ผลการทดลองพบว่าเอ็นไซม์ DNA polymerase α ของ *P. falciparum* ประกอบด้วย 4 subunits คือ 180,130,105 และ 72 กิโลดาลตันตามลำดับ และพบว่าปริมาณของเอ็นไซม์ขนาด 105 และ 72 กิโลดาลตันมีมากกว่าอีก 2 subunits คือ 180 และ 130 กิโลดาลตัน แต่ไม่พบเอ็นไซม์ DNA polymerase β ซึ่งเป็นหนึ่งในเอ็นไซม์ชนิด Ar เลย[10]

ผลของตัวยับยั้งชนิดต่างๆ ที่มีต่อการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิด As และ Ar จาก *P.falciparum*

ได้ทำการศึกษาผลของยาชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ทั้งสองชนิด โดยแสดงโครงสร้างโมเลกุลของยาเหล่านั้นใน รูปที่ 1 สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

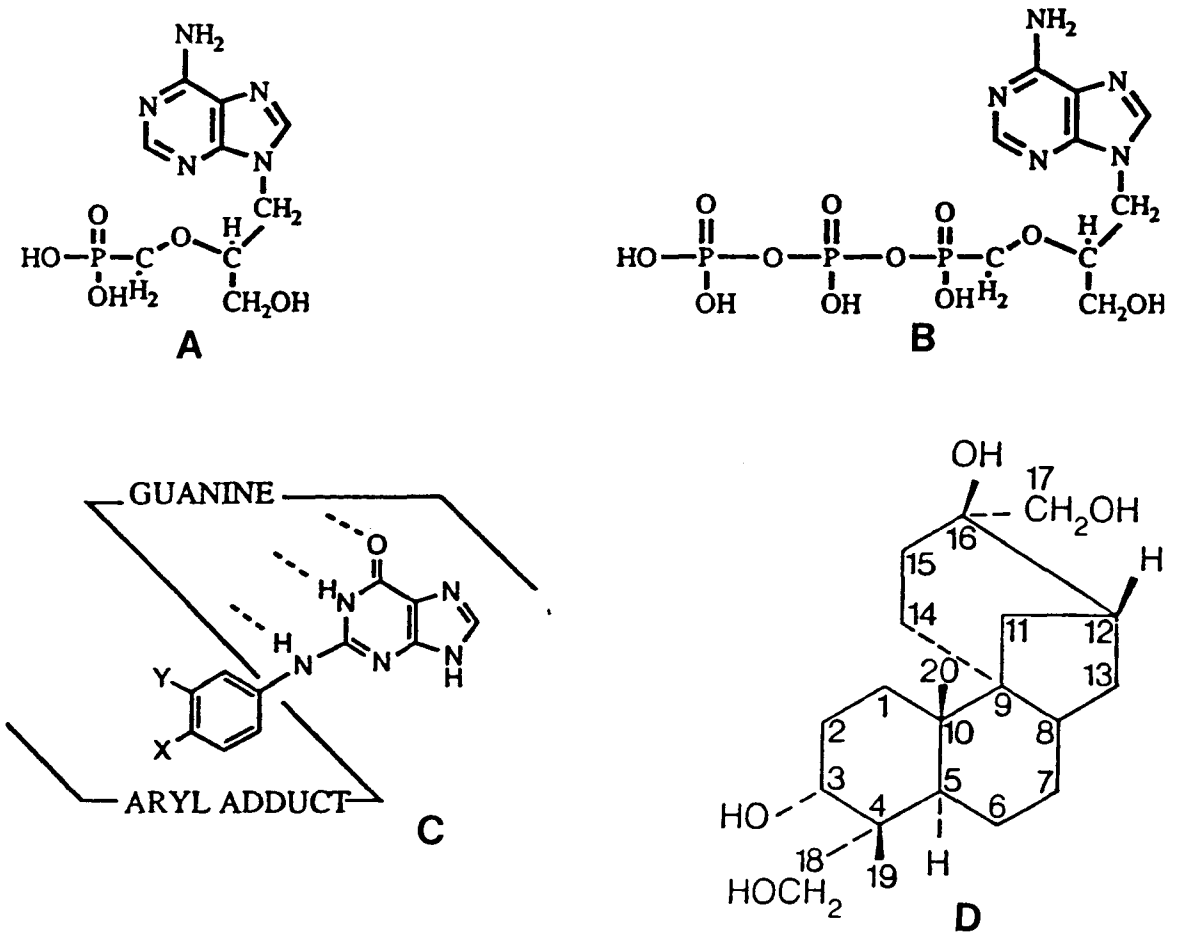

Figure 1. Structure of DNA polymerase inhibitors.
A, HPMPA; B, HPMPApp; C, BuPdGTP; D, Aphidicolin.

Aphidicolin

การทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิด As ถูกยับยั้งได้โดย aphidicolin ความเข้มข้น 40 mg/ml ส่วนเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิด Ar ไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารชนิดเดียวกันนี้ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 80 mg/ml

2,3-Dideoxythymidine triphosphate (ddTTP)

การทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิด As ไม่ถูกยับยั้งโดยสารละลายผสม ddTTP/dTTP ในอัตราส่วน 10 ต่อ 1 (molar ratio) ส่วนเอ็นไซม์ชนิด Ar ถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารละลายผสม ddTTP/dTTP ในอัตราส่วนเพียง 1.3 ต่อ 1 เท่านั้น

Arabinofuranosyladenine 5 -triphosphate (Ara-ATP)

Ara-ATP ความเข้มข้น 20.5 μM สามาถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิด As ได้ แต่ต้องใช้ความเข้มข้นถึง 2 เท่าจึงสามารถยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase ชนิด Ar ได้

N-ethylmaleimide (NEM)

การทำงานของเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถถูกยับยั้งด้วย NEM ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันโดยความเข้มข้นของ NEM ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase ชนิด As ได้จะน้อยกว่าที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิด Ar ถึง 5 เท่า

Butylphenyl dideoxyguanidine 5'-triphosphate (BuPdBTP)

การศึกษาฤทธิ์ของ BuPdGTP ต่อเอ็นไซม์ทั้ง 2 ชนิดนั้นจะใช้ poly dA2000:oligo dT12-18 ในอัตราส่วน 10:1 เป็น substrate แทน activated calf thymus DNA พบว่า DNA polymerase ชนิด As จะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 6.6 μM แต่ต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 10 μM จึงสามารถยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase ชนิด Ar ได้

(S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl) adenine (HPMPA)

ยานี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นและพบว่าสามารถใช้เป็นยาต้านเชื้อไวรัสได้ดี โดยสามารถยับยั้งขบวนการ DNA replication ของ DNA virus หลายชนิดได้[11] เมื่อยานี้เข้าในเซลล์จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ diphosphoryl form ($HPMPA_{pp}$) โดยเอ็นไซม์ภายในเซลล์[12] $HPMPA_{pp}$ สามารถยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase ชนิด Ar ได้ดีกว่าชนิด As ถึง 40 เท่า (IC_{50} ของ Ar เท่ากับ 1 μM)[9]

การศึกษาเปรียบเทียบผลของยาชนิดนี้ต่อการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerases จาก *P.falciparum* และ *P.berghei* ดังแสดงสรุปได้ในตารางที่ 1

Table 1. IC50 values for several DNA polymerases inhibitors on As and Ar DNA polymerases from *P.falciparum* and *P. berghei.*

	P. berghei		*P. falciparum*	
	A^S	A^R	A^S	A^R
Aphidicolin	7.4 μM	4000.0 μM	2.70 μM	>1000.0 μM
BuPdGTP	25.0 μM	22.0 μM	6.60 μM	17.0 μM
AraATP	-	-	20.50 μM	>40.0 μM
N-ethylmaleimide	<1.0 mM	8.0 mM	0.25 mM	<0.1 mM
ddTTP	0.8 mM	resistant	resistant	sensitive
HPMPApp	38.0 μM	520.0 μM	39.0 μM	1.0 M

Processivity ของ DNA polymerase ชนิด As และ Ar จาก P.falciparum

Processivityเป็นตัวบ่งถึงความสามารถของเอ็นไซม์ที่สังเคราะห์สายดีเอ็นเอได้ยาวมากน้อยเพียงใด การศึกษา processivity ของเอ็นไซม์ DNA polymerase ที่แยกสกัดได้จาก *P.falciparum* นั้นใช้ poly dA2000 เป็น template และ oligo dT_{12-18} เป็น primer พบว่า As DNA polymerase สามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอได้ยาวที่สุดประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์เมื่อใช้อัตราส่วน primer ต่อ template เท่ากับ 1 ต่อ 40 แต่เมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนของ primer ต่อ template เป็น 1:2 พบว่าเอ็นไซม์นี้ สามารถสังเคราะห์สายดีเอได้ความยาวไม่เกิน 100 นิวคลีโอไทด์ ส่วน Ar DNA polymerase สามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอได้ยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ ไม่ว่าจะใช้อัตราส่วนของ primer ต่อ template เป็น 1:2 หรือ 1:40

ส่วนเอ็นไซม์ DNA polymerases ของเชื้อมาลาเรียในหนูคือ *P.berghei* นั้น พบว่า มีเอ็นไซม์ DNA polymerase ทั้งชนิด As และ Ar เช่นเดียวกับใน P.falciparum แต่เอ็นไซม์ชนิด As นั้นมี 2 แบบคือ เอ็นไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็น DNA polymerase α และ β แต่ไม่พบ primase activity ซึ่งต่างจากเอ็นไซม์ DNA polymerase α ของ *P.falciparum* ที่พบว่ามี primase activity ด้วย ส่วนเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิด Ar ที่พบใน *P.berghei* มีคุณสมบัติเป็น DNA polymerase β เพราะดื้อต่อ NEM และ ddTTP[13]

DNA topoisomerases

DNA topoisomerases เป็นเอ็นไซม์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในขบวนการ DNA replication, transcription

และ recombination โดยทำหน้าที่เปลี่ยน topology ของสายดีเอ็นเอ โดยการตัด (nicking) และเชื่อม (resealing) phosphodiester backbone ของสายดีเอ็นเอ หรืออีกนัยหนึ่งคือเปลี่ยนโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของสายดีเอ็นเอนั่นเอง[14] DNA topoisomerases แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ DNA topoisomerase I (EC 5.99.1.2) มีหน้าที่ตัดและเชื่อมดีเอ็นเอสายเดี่ยว และ DNA topoisomerase II (EC 5.99.1.3) มีหน้าที่ตัดและเชื่อมดีเอ็นเอสายคู่ พบเอ็นไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ทั้งใน prokaryotes และ eukaryotes[14,15]

Eukaryotic DNA topoisomerase I

คุณสมบัติของเอ็นไม์นี้ใน eukaryotes จะคล้ายคลึงกับใน prokaryotes (ตารางที่ 2) คือสามารถดำเนินปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องใช้ Mg^{2+} หรือ ATP DNA topoisomerase I เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปร่างดีเอ็นเอจาก supercoiled เป็น relaxed form เรียกว่า relaxation โดยมีกลไกการทำงานดังนี้ คือ เอ็นไซม์จะตัดดีเอ็นเอหนึ่งสายแล้วให้ดีเอ็นเออีกสายหนึ่งผ่านรอยตัดนี้ หลังจากนั้นจะทำการเชื่อมดีเอ็นเอสายแรกให้ติดกันเหมือนเดิมผลที่ได้จากปฏิกิริยาคือทำให้มีการลดจำนวนเกลียว (linking number) ของสายดีเอ็นเอได้เท่ากับ n-1 ข้อแตกต่างกันระหว่างเอ็นไซม์ชนิดนี้ใน prokaryotic และ eukaryotes คือ tyrosine residue ที่บริเวณ active site ของ prokaryotic DNA topoisomerase I จะจับกับ 5' phosphoryl group ของสายดีเอ็นเอเส้นที่ถูกตัด [16] ส่วน tyrosine residue ที่บริเวณ active site ของ eukaryotic DNA topoisomerase I จะจับกับ 3' phosphoryl group ของดีเอ็นเอสายที่ถูกตัด [17]

Table 2. The properties of DNA topoisomerase I and II.

Property	Type I		Type II	
	E.coli[a]	Eukaryotic[b]	Gyrase	Eukaryotic
DNA strands cleaved	one	one	two	two
Subunit mass (kDa)	~100	~95	97,90	~150
Subunits	monomer	monomer	A_2B_2	homodimer
ATP requirement	no	no	yes	yes
Mg^{2+} requirement	yes	no	yes	yes
DNA-dependent ATPase	no	no	yes	yes
Makes(-)supercoils	no	no	yes	no
Relaxes(-)supercoils	yes	yes	no[c]	yes
Relaxes(+)supercoils	no	yes	yes[d]	yes
Catenation,knotting	yes	yes	yes	yes

[a]E coli topo I and topo III.

[b]Yest TOP3 most likely encodes a type I enzyme with characteristics similar to those of the *E.coli* rather than the eukaryotic enzymes.

[c]Yes in the absence of ATP

[d]By introduction of negative supercoils.

Eukaryotic DNA topoisomerase II

เอ็นไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่เหมือน DNA topoisomerase I แต่มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาแตกต่างกัน คือ เอ็นไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ตัดสายคู่ของดีเอ็นเอเส้นหนึ่งแล้วให้ดีเอ็นเอสายคู่อีกเส้นหนึ่งผ่านรอยตัดนี้ หลังจากนั้นจะทำการเชื่อมดีเอ็นเอสายคู่เส้นเดิมให้ติดกันเหมือนเดิม ผลที่ได้จากปฏิกิริยาทำให้มีการลดจำนวนเกลียวของสายดีเอ็นเอได้เท่ากับ n-2 การทำงานของเอ็นไซม์ต้องอาศัย ATP นอกจากนั้นเอ็นไซม์ชนิดนี้ยังทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา catenation decatenation, knotting และ unknotting อีกด้วย (ตารางที่ 2)

หน้าที่ของเอ็นไซม์ชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด จากผลการศึกษาใน SV 40 cell-free replication system พบว่า eukaryotic DNA topoisomerase II มีความสำคัญสำหรับการแยก daugther DNA ออกจาก ดีเอ็นเอแม่แบบ

มีการแยกสกัดเอ็นไซม์นี้จากสิ่งที่มีชีวิตหลายชนิด เช่น *Drosophila melanogaster*,[18] yeast,[19] Hela cells,[20] Calf thymus,[21] *Leishmania donovani*[22] และ *P.berghei*[23] พบว่าเอ็นไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันตั้งแต่ 150-180 กิโลดาลตัน[14] และอยู่ในรูปของ dimer

การศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ชนิดนี้ใน *P.berghei* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียในหนู พบว่า ประกอบด้วย 2 subunits มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160 กิโลดาลตัน การทำงานของเอ็นไซม์ต้องอาศัย Mg^{2+} และ ATP นอกจากนั้นยังพบว่ายาต้านมาลาเรียที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันรวมทั้งสารที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNA gyrase ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ชนิดนี้ได้[23]

DNA topoisomerase II ของ *P.falciparum*

การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์

P.falciparum ได้ถูกนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองให้มีปริมาณมาก[8] แล้วทำการแยกสกัดเอ็นไซม์ DNA topoisomerase II และทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ FPLC[24] โดยนำ crude extract ไปผ่าน columns ต่าง ๆ ดังนี้คือ Econo Pac Q (anion exchange column), heparin-agarose column และ Mono Q column ซึ่งเอ็นไซม์ที่ได้ในแต่ละขั้นตอนนี้จะทำการทดสอบหา activity โดยวิธี decatenation assay ซึ่งใช้ kinetoplast DNA จาก *Crithidia fasciculata* เป็น substrate ผลิตผลที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์นี้คือ minicircular DNA ซึ่งมีขนาด 2.5 กิโลเบสในรูปของ open circular และ closed circular DNA (รูปที่ 2) และย้อมติดด้วย ethidium bromide ใน agarose gel นอกจากนี้ความเข้มข้นของ ATP และ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยาคือ 0.5 และ 10 mM ตามลำดับ แต่ในขณะเดียวกันควรมี KCl 100 mM อยู่ในการทำปฏิกิริยาด้วย การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอ็นไซม์นี้โดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเอ็นไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 141 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเอ็นไซม์ DNA topoisomerase II ของ *P.berghei* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160 กิโลดาลตัน[23] อย่างไรก็ตามเอ็นไซม์นี้ในเชื้อ *P.falciparum* ยังมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเอ็นไซม์ DNA topoisomerase II ใน eukaryotes ชนิดอื่นๆ [14]

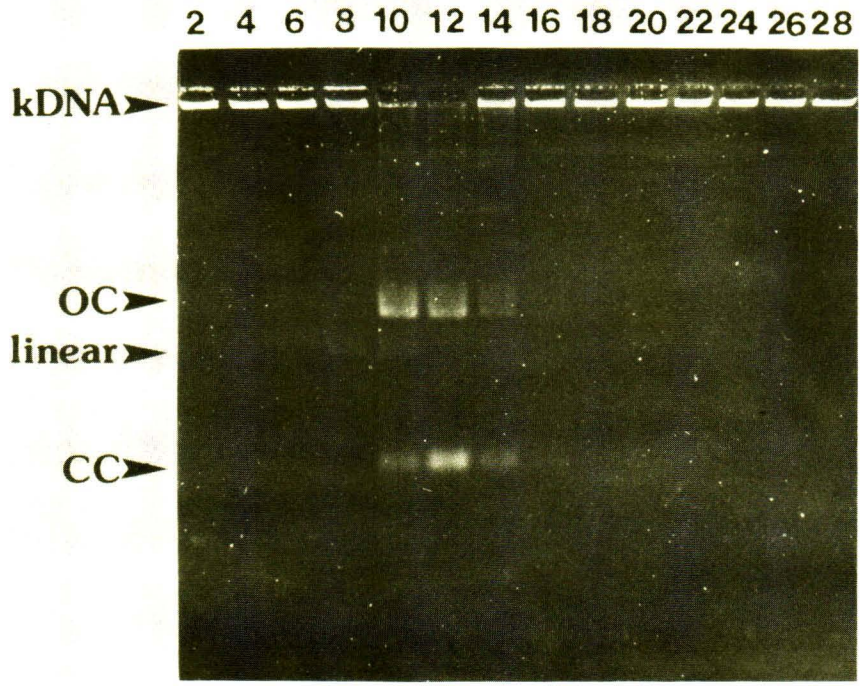

Figure 2. Decatenation Activity of partially purified DNA topoisomerase II of *Plasmodium falciparum* in fractions eluted from the Mono Q column. Kinetoplast (kDNA),open circular (OC),linear and closed circular Molecules (CC) are indicated.

ผลของตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการทำงานของเอ็นไซม์ DNA topoisomerase II ของ *P.falciparum*

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNA topoisomerase II ของ *P.falciparum* โดยใช้ยาชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ชนิดนี้ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงชนิดอื่นๆ และในบักเตรีบางชนิดดังแสดงสูตรโครงสร้างโมเลกุลในรูปที่ 3 เช่น amsacrine หรือ m-AMSA ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสาร intercalating agent และเป็นสารต้านมะเร็งพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ DNA topoisomerase II ของ *P.falciparum* ได้ในระดับความเข้มข้น 1 mM ในขณะที่ IC50 ของ M-AMSA ต่อการเจริญของเชื้อ *P.falciparum* ในหลอดทดลองมีค่าเท่ากับ 0.5 μM[25] แต่ยา chloroquine มีฤทธิ์เป็น intercalating agent ตัวหนึ่งไม่มีผลต่อการทำงานของ DNA topoisomerase II ของ *P.falciparum* เลย เพราะถึงแม้ว่าใช้ความเข้มข้นของยาสูงถึง 10 mM ก็ยังไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์นี้เลย ส่วน etoposide หรือ VP16 ซึ่งเป็น non-intercalating agent นั้นก็มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNA topoisomerase II ของ *P.falciparum* ได้เช่นเดียวกันที่ความเข้มข้น 1.3 mM ผลจากการทดสอบยาที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งก็คือ การที่ยา ofloxacin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ prokaryotic DNA topoisomerase II (DNA gyrase) สามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNA topoisomerase II จากเชื้อ *P.falciparum* ซึ่งเป็น eukaryotic cell ได้ในระดับความเข้มข้น 10 mM และพบว่ายา ofloxacin รวมทั้งยา fluoroquinolones ตัวอื่นๆ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P.falciparum* ในหลอดทดลองได้ดี[26]

นอกจากนี้ยา acridine derivatives ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่จำพวกหนึ่งคือ 9-anilinoacridines[27] สามารถออกฤทธิ์ฆ่า *P.falciparum* ได้ในหลอดทดลอง[28] และพบว่าถ้าเติม di-NH_2 ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และ 6 ของ acridine ring แล้วจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาลาเรียให้สูงยิ่งขึ้น[24] ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยาเหล่านี้จึงได้ทำการทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของ DNA topoisomerase II จากเชื้อ *P.falciparum* พบว่า 9-anilinoacridines พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์นี้ได้ พร้อมกันนี้ยังพบว่ายา pyronaridine ซึ่งเป็นยาตัวใหม่ที่ใช้รักษาโรคมาลาเรียอย่างได้ผลดี[29] ก็มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์นี้เช่นเดียวกัน[24]

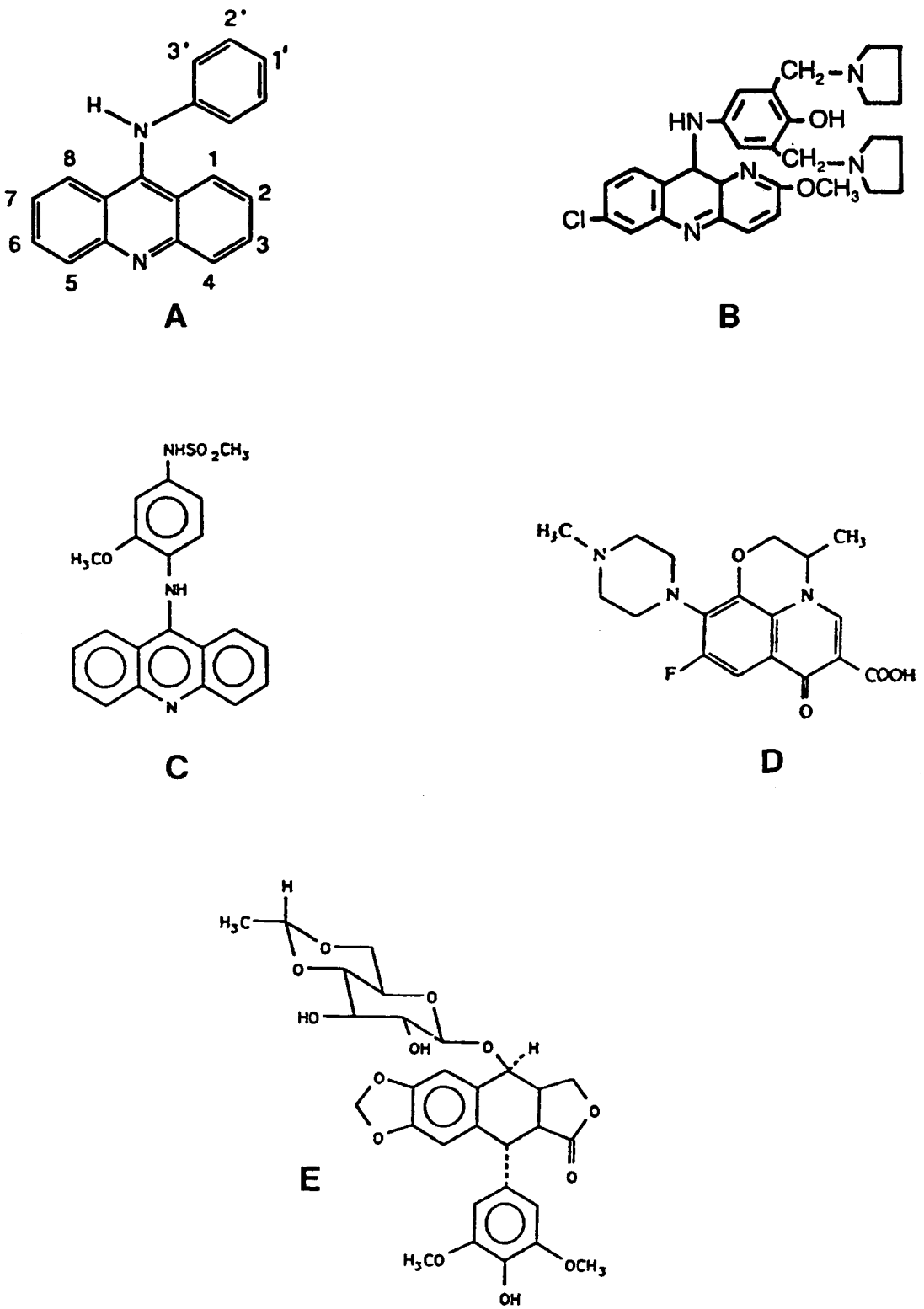

Figure 3. Structure of DNA topoisomerase II inhibitors.
A, 9-anilinoacridines B, Pyronaridine; C, m-AMSA;
D, Ofloxacin; E, Etoposide.

วิจารณ์และสรุป

เอ็นไซม์ DNA polymerases ที่พบในเชื้อมาลาเรีย *P.falciparum* แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ DNA polymerase α และ DNA polymerase γ คุณสมบัติของ DNA polymerase α พบใน *P.falciparum* นั้นส่วนใหญ่จะคล้ายคลึงกับคุณสมบัติของ DNA polymerase α ใน eukaryotes อื่นๆ ทั่วไป ยกเว้นค่า IC_{50} ของ butylphenyl dGTP (6.6 μM) นั้นมีค่าสูงกว่าที่พบใน DNA polymerase α ของ eukaryotes ทั่วๆ ไป การที่เอ็นไซม์ DNA polymerase ของ *P.falciparum* มีความว่องไวต่อการถูกยับยั้งการทำงานด้วยสาร nucleotide analogue ที่แตกต่างกันกับเอ็นไซม์ชนิดเดียวกันของ eukaryotes นี้ ทำให้คาดได้ว่ามีโครงสร้างโมเลกุลของ nucleotide binding sites แตกต่างกันระหว่างเอ็นไซม์ชนิดนี้ของเชื้อ *P.falciparum* และของมนุษย์ ซึ่งความแตกต่างนี้ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะสร้าง specific inhibitors ต่อ DNA polymerase α ของ *P.falciparum* เพื่อใช้รักษาโรคมาลาเรียได้ต่อไปในอนาคต ส่วนเอ็นไซม์ DNA polymerase γ ของ *P.falciparum* ก็มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ DNA polymerase γ ของ eukaryotes อื่นๆ เช่นเดียวกัน แต่มีข้อที่น่าสังเกตว่าโดยปกติเอ็นไซม์ DNA polymerase γ ของ eukaryotes นั้นจะพบอยู่ในไมโตคอนเดรียเท่านั้น ใน cellular extract จะมีปริมาณของเอ็นไซม์นี้น้อยกว่าเอ็นไซม์ DNA polymerase α แต่เอ็นไซม์ DNA polymerase γ ของ *P.falciparum* ที่สกัดจาก cellular extract นั้นมีปริมาณมากพอ ๆ กันเอ็นไซม์ DNA polymerase α

เนื่องจาก DNA polymerase γ เป็นเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการลอกแบบของดีเอ็นเอ (DNA replication) ของไมโตคอนเดรีย และเมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาพบว่า *P.falciparum* มีดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) อยู่ 2 ชนิด ได้แก่ linear DNA มีขนาด 6 กิโลเบสซึ่งพบว่าอยู่ใน mitochondria [30,31] และ circular DNA ขนาด 35 กิโลเบสซึ่งยังไม่ทราบตำแหน่งที่อยู่ของภายในเซลล์ของเชื้อ *P.falciparum* แต่พบว่ามียีนที่คล้ายคลึงกับยีนของ RNA polymerase ในคลอโรพลาสของพืช[32] ขณะนี้ยังไม่พบหลักฐานใดๆ ที่สามารถยืนยันได้ว่า *P.falciparum* มี organelle ใดที่คล้ายคลอโรพลาสของพืช จากความรู้เบื้องต้นดังกล่าวมาแล้วมีความเป็นไปได้ว่า DNA polymerase γ และ *P.falciparum* มีหน้าที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของ extrachromosomal DNA ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสองชนิด นอกจากนี้ จากการที่เอ็นไซม์ DNA polymerase α และ γ ของ *P.falciparum* ถูกยับยั้งได้ด้วย $HPMPA_{pp}$ แบบ competitive inhibition กับ dATP[33] เป็นการยืนยันว่า DNA polymerases ของ *P.falciparum* เป็นเอ็นไซม์เป้าหมายของสารจำพวก nucleotide analoge โดยจะแข่งขันกับ dATP เข้าจับกับ nucleotide binding sites ของเอ็นไซม์และพบว่า HPMPA สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.falciparum* ได้โดยมี IC_{50} เท่ากับ 47 nM ซึ่งมีค่าต่ำกว่า cytotoxic dose ของคน (CD_{50} = 72 μM)[33] ซึ่งผลที่ได้นี้จะเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาโรคมาลาเรียในอนาคต สำหรับ DNA topoisomerase II ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในขบวนการลอกแบบของดีเอ็นเอของ *P.falciparum* นั้น แม้ว่าคุณสมบัติคล้ายกับเอ็นไซม์ใน eukaryotes ก็ตาม แต่การที่ DNA topoisomerase II ของ *P.falciparum* ซึ่งเป็น eukaryote ตัวหนึ่งถูกยับยั้งได้ด้วย ofloxacin ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียของทางเดินปัสสาวะ และมีกลไกการออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของ DNA gyrase (DNA topoisomerase II ของ prokaryotes) ในเชื้อแบคทีเรียนั้นๆ โดยไม่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ DNA topoisomerase II ของมนุษย์ นอกจากนี้สาร 9-anilinoacridines และ pyronaridine ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* ในหลอดทดลองสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNA topoisomerase II ของ *P.falciparum* ได้และพบว่ายาเหล่านี้มีผลการทำงานของเอ็นไซม์ชนิดเดียวกันในเซลล์ของมนุษย์น้อยมาก[24] ด้วยเหตุดังกล่าวแล้วนี้ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะเลือกเอ็นไซม์นี้เป็นเป้าหมายใหม่อีกตัวหนึ่งในการพัฒนาหายาใหม่ๆ เพื่อใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียแทนที่ยาซึ่งใช้กันอยู่ในปัจจุบันนี้ที่นับวันเชื้อมาลาเรียก็พัฒนาตนเองให้ดื้อต่อยาเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น

อ้างอิง

1. Bollum FJ. Calf thymus polymerase. J Biol Chem 1960 Aug;235(8):2399-403
2. Chang LMS, Bollum FJ. A comparison of associated enzyme activities in various deoxyribonucleic acid polymerases. J Biol Chem 1978 May;248(10):3398-404
3. Hubscher U, Kuenzle CC, Spadari S. Variation of DNA polymerase-alpha, -beta and -gamma during perinatal tissue growth and differentiation. Nucleic Acids Res 1977 Aug;4(8):2917-29
4. Fridlender B, Fry M, Muller R, Citareklla T, Weissbach A. A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells. (Hela-fibroblast-synthelic oligonucleotides-template-purified enzymes). Proc Natl Acad Sci USA 1972 Feb;69:452-5
5. Weissbach A, Baltimore D, Bollum FJ, Gallo RC, Korn D. Nomenclature of eukakryotic DNA polymerases. Science 1975 Oct 24; 190(4212):401-2
6. Syvaoja J, Svomensari S, Nishide C, Goldsmith JS, Chui GSJ, Tain S, Linn S. DNA polymerases alpha, delta and epsilon: three district enzymes from Hela cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990 Sep;87(17):6664-8
7. Syvaoja J, Linn S. Characterization of a large form of DNA polymerase delta from Hela cells that is insenstitive to proliferating cell nuclear antigen. J Biol Chem 1989 Feb;264(5): 5924-8
8. Chavalitshewinkoon P, Wilairat P. A simple techique for large scale in vitro culture of Plasmodium Falciparum. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991 Dec;22(4): 544-7
9. Chavalitshewinkoon P, DeVries E, Franssen FFJ, Overdulve JP, Van der Vliet PC. Purification and charafterization of DNA polymerases from Plasmodium Falciparum. Mol Biochem Parasitol 1993 Oct;61(2):243-54
10. Choi I, Mikkelsen RB. Cell cycle-dependent biosynthesis of Plasmodium falciparum DNA polymerase α. Exp Parasitol 1991 Jul;73 (1):93-100
11. De Clercq E, Holy A, Rosenberg I. Sakuma T, Balzarin J, Maudgal PC. A novel selective broad - spectrum anti-DNA virus agent. Nature 1986 Oct2;323(6087):464-7
12. Votruba I, Bernaerts R, Sakumna T, De Clercq E, Merta A, Rosenberg I, Holy A. Intracellar phosphorylation of broad-spectrum anti-DNA virus agent (S) -9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) adenine and inhibition of viral DNA synthesis. Mol Pharmacol 1989;32:524-9
13. De Vries E, Stam JG, Frassen FFJ, Van der Vliet PC, Overdulve JP. Purification and Characterization of DNA polymerase from Plasmodium Berghei. Mol Biochem Parasitol 1991 Apr;45(2):223-32
14. Wang JC. DNA topoisomerases. Annu Rev Biochem 1985;54:665-97
15. Osheroff N. Biochemical basis for the interaction of Type I and Type II topoisomerase with DNA. Pharm Ther 1989;41(1-2):223-41
16. Depew E, Liu LF, Wang JC. Interaction between DNA and Escherichia Coli protein. J Biol Chem 1978 Jan;253(2):511-8
17. Champoux JJ. Proteins that affect DNA conformation. Annu Rev Biochem 1978; 47:449-79
18. Sander M, Hsich T. Double s trand DNA cleavage by type II topoisomerase from Drosophila Melanogaster. J Biol Chem 1983 Jul;258(13):8421-8
19. Goto T, Laipis P, Wang JC. The purification and characterization of DNA topoisomerases I and II of the yeast Saccharomyces Cerrevisiae. J Biol Chem 1984 Aug; 259(16): 10422-9

20. Miller KG, Liu LF, Englund PT. A homogeneous type II topoisomerase from Hela nuclei. J Biol Chem 1981 Sep;256(17):9334-9
21. Prell M, Voscberg HP. Analysis of covalent complex formed between calf thymus DNA topoisomerase and single-stranded DNA. Eur J Biochem 1980 Jul;108(2):389-98
22. Chakraborty AK, Majumder HK. Decaatenation of kinetoplast DNA by an dATP-dependent DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate Leishmania Donovani. Mol Biochem Parasitol 1987;26(2):215-24
23. Riou JF, Gabillot M, Philippe M, Schrevel J, Riou G. Purification and characterization of Plasmodium Berghei DNA topoisomerase I and II: Drug action,inhibition of decatenation and relaxation and stimulation of DNA cleavage. Biochemistry 1986 Apr; 25(7):1471-9
24. Chavalitshewinkoon P, Leelaphiwat S, Wilairat P. Partial purification and characterization of DNA topoisomerase II from Plasmodium Falciparum. Southeast Asian J Trop Med Pubic Health 1994 Mar; 25(1): 32-6
25. Chavalitshewinkoon P, Wilairat P, Gamage S, Denny W, Figgitt D, Ralph R. Structure-activity relationships and modes of action of 9-anilinoacidines against chloroquine-resistant Plasmodium Falciparum in Vitro. Antimicrob Agents Chemother 1993 Mar;37(3):403-6
26. Divo AA, Sartorelli AC, Patton CL, Bia FJ. Activity of fluoroquinolone antibiotics against Plasmodium Falciparum in Vitro. Antimicrob Agents Chemother 1988 Jul; 32(7):1182-6
27. Rewcastle GW, Baguley BC, Atwell GJ, Denny WA. Potential antitumour agents: 52. Carbamate analouges of amsacrine with in vitro activity against multidrug-resistant P 338 leukemia. J Med Chem 1987 Sep; 30(9):1576-81
28. Figgitt D, Denny B, Chavalitshewinkoon P, Wilairat P, Ralph R. Anticancer acridines as potential antitrypanosomal/antimalarial agents. Antimicrob Agents Chemother 1992 Aug;36(8):1644-7
29. Fu S, Xiao SH. Pyronaridine: a new antimalarial drug. Parasitol Today 1991;7:310-3
30. Feagin JE. The 6-kb element of Plasmodium Falciparum encodes mitochondrial cytochrome genes. Mol Biochem Parasitol 1992 May; 52(1):145-8
31. Feagin JE, Werner E, Gardner MJ, Williamson DH, Wilson RJM. Homologies between the continuous and fragmented rRNAs of the two Plasmodium Falciparum extrachromosomal DNAs are limited to core sequencs. Nucleic Acids Res 1992 Feb 25;20(4):879-87
32. Garder MJ, Williamson DH, Wilson RJM. A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts. Mol Biochem Parasitol 1991 Jan;44(1):115-24
33. De Vries E, Stam JG, Franssen FFJ, Nieu wenhuijs H, Chavalitshewinkoon P, De clercq E, Overdulve JP, Van der Vliet PC. Inhibition of the growth of Plasmodium Falciparum and Plasmodium Berghei by the DNA polymerase inhibitor HPMPA. Mol Biochem Parasitol 1991 Jun;47(1):43-50