การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ซักซิเนต ดีไฮโดรจีเนส ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ไอโสเลตที่เก้า

นาง นงลักษณ์ สุระวีระธรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-276-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 18202160

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME SUCCINATE DEHYDROGENASE IN PLASMODIUM FALCIPARUM T_9 ISOLATE

Mrs. Nongluk Suraveratum

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 T_9 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 Thongsuwan Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Tungsuwan,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-Eknamkul Member

(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul,Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นงลักษณ์ สุระวีระธรรม : การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ซักซิเนต ดีไฮโดรจีเนสของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ไอโสเลตทีเก้า (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME SUCCINATE DEHYDROGENASE IN PLASMODIUM FALCIPARUM T_9 ISOLATE) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร, 103 หน้า. ISBN 974-633-276-7

เอนไซม์ซักซิเนต ดีไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไปที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต โดยเป็นส่วนประกอบในวัฏจักรเครบส์ และในคอมเพล็กสองของระบบขนส่งอิเลคตรอน โดยออกซิเดชั่นซักซิเนตไปเป็นฟูมาเรตและสามารถส่งผ่านรีดิวซิ่ง อิควิวาเลนต์ได้โดยตรง เอนไซม์นี้ประกอบด้วยส่วนแรกเป็นหน่วยย่อยฟลาโวโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน โดยมีส่วนประกอบของเอฟเอดีอยู่ ส่วนที่สองเป็นหน่วยย่อยเหล็กซัลเฟอร์โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน และยังมีหน่วยย่อยอื่นที่ไม่ชอบน้ำคือ ไซโตโครม บี การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ซักซิเนต ดีไฮโดรจีเนสในเชื้อมาลาเรียของคนชนิดพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรีย โดยมีเอนไซม์นี้เป็นตำแหน่งเป้าหมาย

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ดังกล่าวในพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัมที่เตรียมให้บริสุทธิ์ โดยใช้ส่วนที่เป็นน้ำใสมาผ่านคอลัมน์ของโมโน คิวแลกเปลี่ยนประจุบวก โมโน เอสแลกเปลี่ยนประจุลบ และซุปเปอร์โรส หกเจลฟิลเตรชั่นตามลำดับ ด้วยเครื่องแยกโปรตีนประสิทธิภาพสูง ให้ผลดังนี้คือเอนไซม์จะอยู่ในส่วนไซโตซอลของเชื้อมาลาเรีย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 86-91 กิโลดาลตัน เมื่อใช้วิธีเอสดีเอส-เพจจะพบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย โดยหน่วยย่อยแรกมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 56.4 ± 3.4 กิโลดาลตัน และหน่วยย่อยที่สองมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 35.0 ± 1.7 กิโลดาลตัน และจะสลายตัวง่ายมาก มีความคงตัวที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียสมากกว่าที่ - 20องศาเซลเซียส ค่าคงที่ของไมเคิลลิสเมนเตนและค่าคงที่ของการเร่งปฏิกิริยาของสับสเตรทซักซิเนตเท่ากับ 3.01 ไมโครโมลาร์ และ 0.11 ต่อนาที ของสับสเตรทโคเอนไซม์คิวศูนย์เท่ากับ 0.20 ไมโครโมลาร์ และ 0.06 ต่อนาที เมื่อทำการทดสอบความสามารถของสารต่างๆในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ ฟูมาเรตซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยามีค่าคงที่ของการยับยั้งเท่ากับ 80.99 ไมโครโมลาร์, มาโลเนตและออกซาโลอะซีเตตเป็นสารยับยั้งโครงสร้างคล้ายสับสเตรทมีค่าคงที่ของการยับยั้งเท่ากับ 13.02 และ12.06 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ส่วนพลัมบาจินพบว่ามีการยับยั้ง 50 % ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ส่วนยารักษาโรคมาลาเรียได้แก่ คลอโรควิน อาตีมิสินีนและอะโตวาโคนไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้รวมทั้งสารสองธีโนอิลไตรฟูออโรอะซีโตน คุณสมบัติที่พบจากการศึกษาเอนไซม์ดังกล่าวของเชื้อมาลาเรียมีความแตกต่างจากเอนไซม์ของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเจ้าบ้าน

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต นงลักษณ์ สุระวีระธรรม

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

** C745075 MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEY WORD: SUCCINATE DEHYDROGENASE / PLASMODIUM FALCIPARUM / PURIFICATION / CHARACTERIZATION
NONGLUK SURAVERATUM : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME SUCCINATE DEHYDROGENASE IN PLASMODIUM FALCIPARUM T_9 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* (T_9 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* (T_9 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 -196°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 (Km) and turnover number (kcat) for succinate were 3.01 μM and 0.11 min^{-1}, respectively ; for CoQ_0 they were 0.20 μM and 0.06 min^{-1}. Fumarate, the product of the enzyme, was a competitive inhibitor with Ki value of 80.99 μM. Malonate and oxaloacetate were substrate analog inhibitors with their Ki 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-thenoyltrifluoroacetone. Many properties observed in the malarial SDH were different from the host mammalian enzyme.

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ 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 *P. falciparum*----------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 *P. falciparum* 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 *P. falciparum*----46

2. Purification of *P.falciparum* 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----85

SUMMARY----91

REFERENCES----93

BIOGRAPHY----103

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express appreciation to all those who participate in this study. First of all, to my adviser, Associate Professer 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 *P. falciparum* (T_9 isolate)----------47

Table 3. Purification of SDH from *P. falciparum* (T_9 isolate)----57

Table 4. Stability of SDH Activity----------63

Table 5. Kinetics Measurement of *P. falciparum* (T_9 isolate) SDH by Varying Succinate Concentrations----------66

Table 6. Kinetics Measurement of *P. falciparum* (T_9 isolate) SDH by Varying CoQ_0 Concentrations---------- ---------68

Table 7. Kinetics Constants of *P. falciparum* (T_9 isolate)SDH---70

Table 8. Inhibitory Constants and Inhibitory effect of Antimalarial Drugs, Fumarate, Malonate, Oxaloacetate on *P. falciparum* (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 *P. falciparum* (T_9 isolate) Eluted from the Anion-Exchange Mono Q Column of FPLC System----50

Fig. 5 Profile of SDH Activity of *P. falciparum* (T_9 isolate) Eluted from the Cation-Exchange Mono S Column of FPLC System----52

Fig. 6 Profile of SDH Activity of *P. falciparum* (T_9 isolate) Eluted from the Superose 6 Gel Filtration Column of FPLC System----54

Fig. 7 SDS-PAGE Pattern of SDH Purification in *P. falciparum* (T_9 isolate)----59

Fig. 8 Nondenaturing PAGE Analysis of Purified SDH from *P. falciparum* (T_9 isolate)----61

Fig. 9 Michaelis-Menten Kinetics and Lineweaver-Burk plot of *P.falciparum* (T_9 isolate) SDH----72

Fig. 10 Structure of Antimalarial Drugs----76

Fig. 11 Standard Curve for Molecular Weight Determination by using SDS-PAGE Analysis----79

Page

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
µl	microliter
µM	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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย