13/0161/42

การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของ *Plasmodium* sp. และผลกระทบต่อการศึกษาชีววิทยาโมเลกุลของเชื้อมาลาเรีย

รัฐ พิชญางกูร

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

The development of transfection of malaria parasite would greatly help answering the questions concerning the molecular biology of the malaria parasite. In the past decade many laboratories have been working on the development of an efficient method for the transfection of *Plasmodium* sp. The success arose in early 1993 when the gene encoding for the firefly luciferase was successfully transfected into *P. gallinaceum* and later success in *P. berghei* and *P. falciparum*. This has opened a new avenue in the parasitology research. Transfection of the malaria parasite would allow genetic manipulation of the parasite, which includes gene knockouts, mutation of gene (s), and introduction and expression of foreign gene in the parasite. However, the efficiency of the transfection is low and further development of the method must be accomplished. Currently, there have been development of DNA vectors as well as *in vitro* and *in vivo* models for the studying of the molecular biology of the parasite using this new technique.

Key words : transfection, *Plasmodium* sp.

บทคัดย่อ

การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย ช่วยให้เข้าใจและตอบคำถามทางด้านชีววิทยาโมเลกุลของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น นักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเทคนิคในการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Plasmodium* sp.ขึ้นและประสบความสำเร็จ ความสามารถในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ตัวปรสิตนี้ช่วยให้สามารถเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม และศึกษาการทำงานของสารพันธุกรรมในตัวปรสิตได้ ซึ่งไม่สามารถศึกษาได้โดยวิธีอื่นๆ ปัจจุบันทิศทางของการวิจัยในด้านการส่งถ่ายดีเอ็นเอนั้นได้ก้าวไปสู่การพัฒนาดีเอ็นเอพาหะที่เหมาะสม และการพัฒนาแบบจำลองการศึกษายีนต่างๆของปรสิตทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง

มาลาเรียและปัญหาสาธารณสุขของโลก

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอย่างยิ่งของโลก กว่า 30% ของประชากรโลก หรือคิดเป็นจำนวนประชากรราว 2,000 ล้านคน มีความเสี่ยงต่อการติดโรคนี้ (WHO estimation 1995) ประชากรที่มีความเสี่ยงค่อนข้างสูงได้แก่ประชากรในเขตร้อนชื้นซึ่งรวมถึงประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยนั้นโรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาอย่างมากโดยเฉพาะเขตแนวชายแดนบริเวณรอยต่อกับประเทศเพื่อนบ้าน

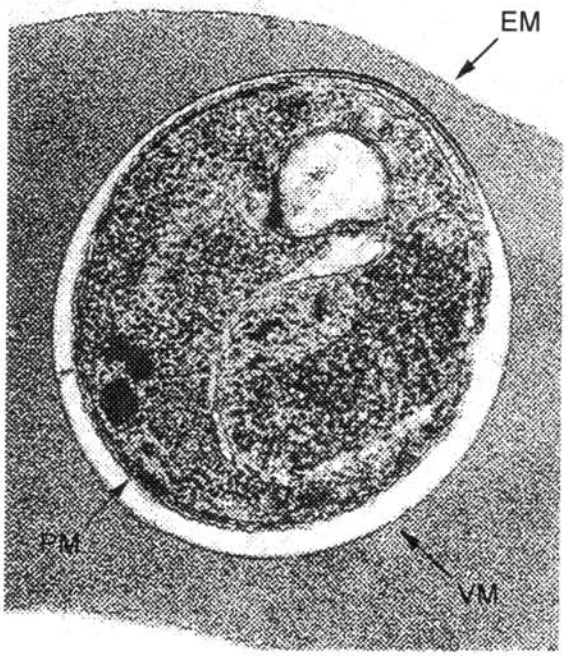
โรคมาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวขนาดเล็กที่เรียกว่า Plasmodia protozoa มียุงก้นปล่อง (*Anopheles* sp.) เป็นพาหะของโรค การวิจัยส่วนใหญ่ของโรคมาลาเรียในเมืองไทยได้มุ่งศึกษาเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสมาชิก 1 ใน 4 ของ *Plasmodium* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ การที่มีผู้ศึกษาเชื้อ *P. falciparum* เป็นส่วนมากนั้น เนื่องมาจากเชื้อ *P. falciparum* ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียที่มีความรุนแรงและภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยสูงกว่าเชื้อชนิดอื่น อีกทั้งพบว่า เชื้อ *P. falciparum* นี้สามารถปรับตัวต้านต่อยาได้หลายชนิดในเวลาอันสั้น จึงทำให้เกิดปัญหาในการป้องกันและรักษา

การศึกษาในเชื้อ *P. falciparum* ที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียนั้น สามารถแบ่งออกได้เป็นสามแนวทางใหญ่ๆ ได้แก่ การศึกษาชีววิทยารวมถึงกลไกการต้านยาของเชื้อ การพัฒนาวัคซีนและยาเพื่อป้องกันและรักษาผู้ที่ติดเชื้อ และการป้องกันและบำบัดรักษาผู้ติดเชื้อ ความเข้าใจถึงชีววิทยารวมถึงกลไกการต้านยาของเชื้อนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษารวมถึงการพัฒนาวัคซีนและยาที่จะใช้ ปัจจุบันการศึกษาชีววิทยาของ *P. falciparum* ได้ก้าวไปสู่ระดับโมเลกุล โดยสามารถแยกและศึกษาโปรตีนและยีนหลายชนิดของ *P. falciparum* ได้ (Cowman *et al.*, 1988, McAndrew *et al.*, 1993, Fox *et al.*, 1994, Hudson-Taylor *et al.*, 1995) แต่ความก้าวหน้าครั้งสำคัญในการศึกษาชีววิทยาโมเลกุลของ *P. falciparum* นั้นคือความสามารถในการส่งถ่ายสารพันธุกรรม หรือ ดีเอ็นเอ (transfection) เข้าสู่เซลล์ของ *P. falciparum*

การส่งถ่ายดีเอ็นเอ (Transfection)

การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์สิ่งมีชีวิตชั้นสูงนั้น ปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมีบางชนิดที่ทำให้เยื่อเซลล์เปิดรับโมเลกุลของดีเอ็นเอ การบรรจุดีเอ็นเอเข้ากับโมเลกุลสารบางชนิดที่สามารถแทรกผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ เช่น ลิโปโซม (liposomes) การตกตะกอนดีเอ็นเอหรือทำให้ดีเอ็นเอจับกับสารประกอบบางชนิดที่เซลล์จะรับเข้าไปในเซลล์ได้ เช่น $CaPO_4$DNA co-precipitate หรือ DEAE dextran การใช้พาหะทางชีวภาพจำพวกไวรัสหรือแบคทีเรียบางชนิด และการใช้วิธีทางกายภาพบางชนิด เช่น การเคลือบดีเอ็นเอบนผงโลหะแล้วยิงเข้าสู่เซลล์ (particle gun) หรือการใช้สนามไฟฟ้าแรงสูงเพื่อชักนำให้เกิดช่องบนเยื่อเซลล์ (electroporetion) เป็นต้น

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงโดยทั่วไปสามารถเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งได้ โดยดูจากความเหมาะสมและสภาพตามธรรมชาติของเซลล์ที่ต้องการส่งถ่ายดีเอ็นเอ สำหรับ *P. falciparum* นั้น นักวิทยาศาสตร์พบว่า การใช้วิธีอิเลคโตรพอร์เรชัน (electroporetion) เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากธรรมชาติของเซลล์ปรสิตถูกหุ้มด้วยเยื่อเซลล์หลายชั้น (ดังแสดงในรูปที่ 1) และปัจจุบันไม่พบว่ามีพาหะทางชีวภาพที่สามารถใช้ได้



รูปที่ 1 แสดง *P. falciparum* ภายในเม็ดเลือดแดง ลูกศรแสดงเยื่อหุ้มชั้นต่างๆของเซลล์ปรสิตในเม็ดเลือด EM แสดงเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือด VM แสดงเยื่อหุ้มแวคคูโอล์ PM แสดงเยื่อหุ้มเซลล์ปรสิต (ภาพจาก MALARIA, A Publication of the Tropical Programme of the Wellcome Trust, Edited by Knell A.J., Oxford University Press, 1991)

การส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Plasmodium* sp.

แนวความคิดเกี่ยวกับการนำชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของ *Plasmodium* sp นั้น ได้เริ่มต้นราวปี ค.ศ. 1987 (Waters *et al.*, 1996) หลังจากนั้นได้มีผู้ทดลองค้นคว้าเป็นจำนวนมากเพื่อหาวิธีนำชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *Plasmodium* sp. การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของ *Plasmodium* sp. นั้นมีความยากลำบากกว่าการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียหรือเซลล์พืชและสัตว์โดยทั่วไป เนื่องจากธรรมชาติของ *Plasmodium* sp. นั้นอาศัยอยู่ในเซลล์ของโฮสต์ ดังนั้นการที่จะส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของ *Plasmodium* sp. นั้นจะต้องผ่านเยื่อ

หุ้มเซลล์หลายชั้น นับตั้งแต่เยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ เยื่อหุ้มแวคคูโอล์ที่ปรสิตอาศัยอยู่ และเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวปรสิตเองด้วย

ในปี ค.ศ. 1993 Goonewardene และคณะ ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนที่สร้างเอนไซม์ลูซิเฟอร์เรสจากหิ่งห้อย (firefly luciferase) เข้าสู่เซลล์ของ *P. gallinaceum* ในระยะไซโกต (zygote) โดยใช้วิธีอิเลคโตรพอร์เรชัน และพบว่าสารพันธุกรรมดังกล่าวสามารถแสดงออกและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ สามปีต่อมา มีผู้รายงานความสำเร็จในการส่งถ่ายสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ของ *P. berghei* (Van Dijk *et al.*, 1996) และ *P. falciparum* (Wu *et al.*,1996) ความสำเร็จในครั้งนี้ได้เปิดวิถีทางใหม่ในการศึกษาชีววิทยาโมเลกุลของ *Plasmodium* sp.

ความสำเร็จในการนำชิ้นของดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *P. falciparum* นั้น มีความสำคัญอย่างยิ่งเพราะสามารถนำไปในการใช้พิสูจน์หน้าที่และการทำงานของยีนและโปรตีนต่างๆใน *P. falciparum* และยังสามารถนำไปใช้ในการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมใน *P. falciparum* เช่น การสร้าง genetic knockout clones (Sinden ,1998) หรือ สายพันธุ์ *P. falciparum* ที่บางส่วนของยีนหรือส่วนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของยีนถูกเปลี่ยนไป เพื่อศึกษาถึงกลไกการทำงานของยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอนั้นๆ (Wu *et al.*,1996 ; Crabb *et al.*, 1996) โดยวิธีโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน (homologous recombination) ได้อีกด้วยความสามารถในการเปลี่ยนแปลงและควบคุมการทำงานของสารพันธุกรรมใน *P. falciparum* นั้น เป็นกระบวนการที่สำคัญยิ่งในการที่จะช่วยให้เข้าใจถึงการทำงานของยีนต่างๆ ของ *P. falciparum* ปัจจุบันพบว่าสามารถนำชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของ *P. falciparum* และแสดงออกได้ไม่ว่าตัวปรสิตจะเจริญในระยะใด (ring form, schizont, merozoites) ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า แนวทางในการศึกษาชีววิทยาโมเลกุลใน *Plasmodium* sp. นั้นสามารถศึกษาในแง่ของพัฒนาการของปรสิตได้อีกด้วย

ผลกระทบต่อการศึกษาชีววิทยาโมเลกุลใน *Plasmodium* sp.

นับตั้งแต่นักวิจัยประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ *P. falciparum* ทำให้สามารถตอบคำถามต่างๆ ที่เกี่ยวกับชีววิทยาโมเลกุลของปรสิตที่ไม่สามารถตอบได้มาก่อน เช่น Wu และคณะ (1996) พิสูจน์ว่า การกลายพันธุ์ของยีน dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) เป็นเหตุให้เกิดการต้านยาไพริเมทามีนใน *P. falciparum* และยีนที่นำเข้าไปสู่เซลล์นั้น สามารถ integrate เข้าไปในโครโมโซมของ *P. falciparum* ที่ได้รับดีเอ็นเอนั้นอีกด้วย นอกจากนี้ Crabb และคณะ (1996) ได้ศึกษาถึง promoter ของยีน DHFR-TS ใน *Plasmodium* sp. ว่ามีการควบคุมการทำงานอย่างไร Van Dijk และคณะ (1996) ศึกษายีนที่ integrate เข้าไปในส่วน subtelomeric ของโครโมโซม ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นบริเวณที่ไม่มีการแสดงออกของยีนใน *P. berghei* แต่จากการทดลองพบว่า ยีนที่มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณนี้ สามารถแสดงออกได้อย่างปรกติ และในปีที่ผ่านมา ได้มีผู้นำเอายีนที่สร้างโปรตีนเรืองแสง green fluorescent protein (GFP) เข้าไป

แสดงออกใน *Plasmodium* sp. (Van Wye *et al.*, 1997; De Koning-Ward *et al.*, 1998) ซึ่งการแสดงออกของ GFP ในปรสิตนี้ สามารถช่วยในการติดตามปรสิตที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ หรือการทำ fusion protien ระหว่าง GFP และ โปรตีนของปรสิตทำให้สามารถติดตามโปรตีนนั้นในเซลล์ปรสิตขณะที่เซลล์ปรสิตยังมีชีวิตอยู่ได้ นอกจากที่กล่าวมาโดยสังเขปนี้แล้ว ยังมีงานที่ตีพิมพ์อีกเป็นจำนวนมากที่ได้ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาชีววิทยาโมเลกุลของ *Plasmodium* sp.

สภาวะที่ใช้ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Plasmodium* sp.

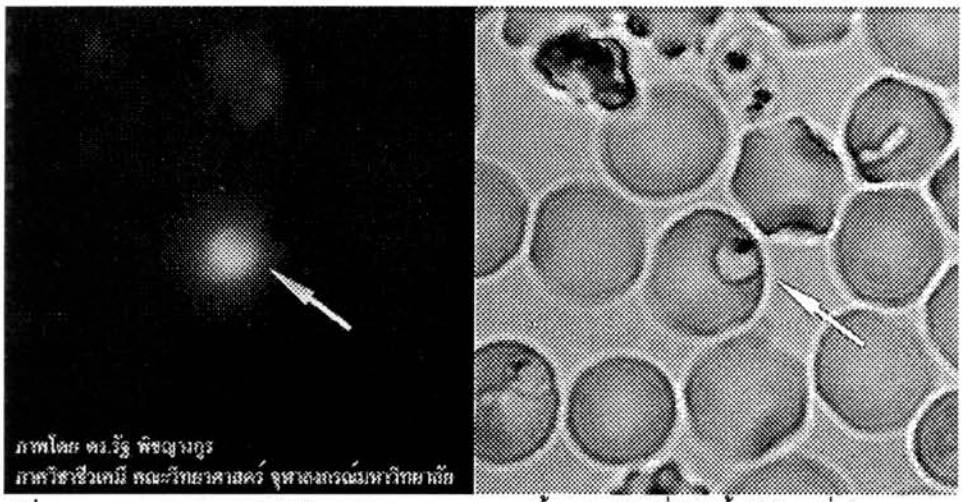
การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Plasmodium* sp. นั้น ปัจจุบันใช้วิธีอิเลคโตรพอร์เรชัน ดังที่กล่าวมาแล้ว มีวิธีการโดยสังเขปคือ นำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีตัวปรสิตมาล้างในสารละลายบัฟเฟอร์หรือ RPMI จากนั้นนำเซลล์มาแขวนลอย (resuspend) ในบัฟเฟอร์หรือ RPMI ในปริมาตรที่เหมาะสม เติมสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการจะส่งถ่ายเข้าเซลล์ปรสิต สารละลายนี้ควรมีปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 50 ถึง 100 ไมโครกรัม บรรจุสารละลายที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีปรสิตและดีเอ็นเอลงในคิวเวตต์สำหรับอิเลคโตรพอร์เรชัน แล้วนำไปผ่านการอิเลคโตร-พอร์เรชัน จากนั้นนำเซลล์มาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอต่อไป

จากการวิจัยเบื้องต้นของฝ่ายศูนย์วิจัยมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าสารละลายที่เหมาะสมที่ใช้เป็นตัวกลางในการทำอิเลคโตรพอร์เรชันคือ RPMI หรือ Incomplete cytomix (Wu *et al.*, 1996) โดยความต่างศักย์ที่ใช้ไม่ควรสูงกว่า 1200 V และตัวเก็บประจุขนาด 25 μF และปริมาตรที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 500 ถึง 800 ไมโครลิตร การใช้สนามไฟฟ้าสูงกว่านี้จะส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่รั่วและแตกในที่สุด ภายใต้สภาวะดังกล่าว สามารถส่งถ่ายยีนที่สร้าง GFP เข้าสู่ตัวปรสิตและสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนได้ (ดังแสดงในรูปที่ 2) ปัจจัยต่างๆ ที่ควรคำนึงถึงในการทำอิเลคโตรพอร์เรชันเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูง คือ สารละลายตัวกลาง ปริมาณดีเอ็นเอ ความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง (haematocrit) ความหนาแน่นของตัวปรสิต (parasitaemia) ความแรงของสนามไฟฟ้า และ ระยะเวลาในการให้สนามไฟฟ้า

อนาคตของงานวิจัยเกี่ยวกับการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Plasmodium* sp.

ปัจจุบันการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *Plasmodium* sp. ยังมีประสิทธิภาพต่ำ ประมาณ 1-2 เซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอ ต่อปรสิต 1000 เซลล์ (Van Wye *et al.*, 1997) และยังไม่มีผู้พัฒนาการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *P. falciparum* ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการไม่ได้ใช้ระบบรายงานผลที่เหมาะสม ในงาน

เบื้องต้นของ Goonewardene และคณะ (1993) และ Wu และคณะ (1995) นั้น ใช้แอคติวิตีของเอนไซม์ luciferase และ chloramphenicol acetyl transferase เป็นระบบรายงานผลประสิทธิภาพของการนำชิ้นดีเอ็น-เอเข้าสู่เซลล์ถูกแสดงออกมาในรูปของแอกติวิตีของเอนไซม์ จากผลงานทั้งสองนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าประสิทธิ-ภาพจริงๆ ของการนำชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์นั้นเป็นเท่าไร หรืออีกนัยหนึ่งคือ ค่าเอนไซม์แอกติวิตีที่วัดได้สูงแต่ไม่ทราบว่ามีจำนวนเซลล์เท่าไรที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอเข้าไป ผลงานของ Wu และคณะ 1996 ใช้ยีน DHFR-TS ที่กลายพันธุ์ไปเป็นตัวคัดเลือก *P. falciparum* ที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ แต่การทดลองดังกล่าวไม่ได้ให้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้นำชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด การใช้ยีนรายงายผลเช่น GFP นั้นน่าที่จะช่วยในการหาคำตอบนี้ได้ แต่จากผลงานวิจัยเบื้องต้นของฝ่ายศูนย์วิจัยมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าการตรวจนับปรสิต ที่มีการแสดงออกของ GFP นั้น เป็นไปได้ยากและมีความคลาดเคลื่อนสูง



รูปที่ 2 การแสดงออกของ GFP ใน *P. falciparum*: ลูกศรชี้แสดงปรสิตที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอที่สร้าง GFP และสามารถแสดงออกได้โดยเห็นได้จากการเรืองแสงเมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนท์

งานวิจัยการส่งถ่ายดีเอ็นเอในปัจจุบันนี้ ได้มุ่งเน้นไปในการสร้างดีเอ็นเอพาหะสำหรับใช้ในงานนี้โดยได้สร้างดีเอ็นเอพาหะที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้และมีเสถียรภาพที่ดีในตัวปรสิตและสามารถคัดเลือกปรสิตที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวได้ โดยใช้ยีน DHFR-TS ที่ต้านยาไพริเมทามีน (pyrimethamine) จาก *Toxoplasma gondii* แทรกไว้ในดีเอ็นเอพาหะ แล้วคัดเลือกปรสิตที่สามารถต้านยาไพริเมทามีนได้ นอกจากนี้แล้วยังได้เสนอแบบจำลองการศึกษาโดยใช้ระบบของสัตว์ทดลองไว้ด้วย ทำให้สามารถศึกษาหน้าที่และการทำงานของยีนในปรสิตทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง (Tomas *et al.*, 1998) จะเห็นได้ว่าในระยะเวลาเพียงสองปีที่ผ่านมา ผลงานและความรู้ที่ได้จากการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Plasmodium* sp. นั้น เพิ่มขึ้นอย่าง

มาก ดังนั้นจึงควรจับตามองว่างานวิจัยในด้านนี้จะมีอะไรที่น่าสนใจเกิดขึ้นอีกในอนาคตอันใกล้ ไม่ว่าจะเป็นกลไกในการต้านยาชนิดต่างๆ ของเชื้อ หรือโปรตีนชนิดใหม่ๆ ที่อาจนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น หรือ ความเข้าใจชีววิทยาโมเลกุลของเชื้อที่ดีขึ้น เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Crabb BS, and Cowman AF. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 7289-7294.
2. Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, and Foote SJ. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 9109-9113.
3. De Koning-Ward TF, Thomas AW, Waters AP, and Janse CJ. 1998. Mol. Biochem. Parasitol. 97: 247-252.
4. Goonewardene R, Daily J, Kaslow D, Sullivan TJ, Duffy P, Carter R, Mendis K, and Writh D. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 5234-5236.
5. Fox BA, and Bzik DJ. 1994. Mol. Biochem. Parasitol. 68: 133-144.
6. Hudson-Taylor DE, Dolan SA, Klotz FW, Fujioka H, Aikawa M, Koonin EV, and Miller LH. 1995. Mol. Microbiol. 15: 463-471.
7. McAndrew MB, Read M, Sims PF, and Hyde JE. 1993. Gene. 124: 165-171.
8. Sinden RE. 1998. Parasitology Today. 14: 88-90.
9. Van Dijk MR, Janse CJ, and Waters AP. 1996. Science. 271: 662-665.
10. Van Dijk MR, Waters AP, and Janse CJ. 1995. Science. 268: 1358-1362.
11. Van Wye JD, Haldar K. 1997. Mol. Biochem. Parasitol. 87: 225-229.
12. Waters AP, Writh DF, Wellems TE, and del Portillo HA. 1996. Parasitology Today . 12: 129-132.
13. Wu Y, David Sifri C, Lei H, Su X, and Wellems TE. 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 973-977.
14. Wu Y, Kirkman LA, and Wellems TE. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 1130-1134.