DIHYDROFOLATE REDUCTASE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* : EFFECTS OF JUNCTIONAL PEPTIDE ON ENZYME KINETICS

CAPT. NAPAPORN WINIJNAIYAPARK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

ISBN 974-04-4775-9
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

เอ็นไซน์ไดไฮโดรโฟเลท รีดักเตส ของเชื้อมาลาเรียฟัลซิปารั่ม: การศึกษาผลกระทบของเปปไทด์เชื่อมที่มีต่อจลศาสตร์ของเอ็นไซม์ (DIHYDROFOLATE REDUCTASE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM*: EFFECTS OF JUNCTIONAL PEPTIDE ON ENZYME KINETICS.

นภาพร วินิจนัยภาค 4336163 SCBC/M
วท.ม. (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วรชาติ สิรวราภรณ์, ปร.ด., สุมาลี ตั้งประดับกุล, ปร.ด.

บทคัดย่อ

ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส (DHFR) และไทมิไดเลต ซินเทส (TS) เป็นเอ็นไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการสร้างไทมิไดเลตซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์สารพันธุกรรมดีเอ็นเอในเชื้อมาลาเรียฟัลซิปารั่ม (*Plasmodium falciparum*) เป็นที่ทราบกันว่าเอ็นไซม์ทั้งสองอยู่บนสายโปลีเปปไทด์เดียวกัน และเชื่อมต่อกันโดยมีสายเปปไทด์สั้นๆ (Junctional Region, JR) ซึ่งเชื่อมต่อระหว่างเอ็นไซม์ทั้งสอง เอ็นไซม์ DHFR-TS เป็นเอ็นไซม์เป้าสำคัญของยาบำบัดมาลาเรียที่สำคัญเช่นไพริเมธามีนและไซโครกัวนิว ดังนั้นองค์ความรู้ที่นำไปสู่ความเข้าใจด้านโครงสร้างของเอ็นไซม์ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอ็นไซม์กับยาจึงน่าที่จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนายาใหม่ให้สามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อที่ดื้อยาได้ การศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ DHFR เปรียบเทียบกับเอ็นไซม์ DHFR ที่มีส่วนของ JR ที่มีความยาวต่างๆ กันทางด้านปลายคาร์บอกซีของ DHFR จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการศึกษาบทบาทหน้าที่ของบริเวณ JR

คณะผู้วิจัยต้องการที่จะศึกษาบทบาทของส่วนของเปปไทด์เชื่อมที่มีต่อการเร่งปฏิกิริยาและคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์ DHFR จึงได้ทำการสร้างโคลนและแสดงออกยีนในส่วนของ DHFR ซึ่งมีส่วนของเปปไทด์เชื่อมขนาดต่างๆ ทางด้านปลายคาร์บอกซีของเอ็นไซม์จำนวน 4 โคลน และทำการแสดงออกในเชื้อแบคทีเรียอี โคไล และทำการศึกษาจลศาสตร์ของเอ็นไซม์บริสุทธิ์และการยับยั้งเอ็นไซม์ที่ได้จากโคลนเหล่านี้

จากผลการทดลองพบว่าการที่มีส่วนเปปไทด์เชื่อมขนาดต่างๆ กันที่ปลายด้านคาร์บอกซีของ DHFR ไม่ได้ช่วยเพิ่มระดับของการแสดงออกของยีนหรือสามารถทำให้เอ็นไซม์มีความเสถียรขึ้นเมื่อเทียบกับคุณสมบัติของเอ็นไซม์ที่มีเพียงส่วนของ DHFR อย่างเดียว ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ DHFR ที่มี JR ต่ออยู่ที่ปลายคาร์บอกซีมีคุณสมบัติทางจลศาสตร์คล้ายกับเอ็นไซม์ pfDHFR

74 หน้า ISBN 974-04-4775-9

DIHYDROFOLATE REDUCTASE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* : EFFECTS OF JUNCTIONAL PEPTIDE ON ENZYME KINETICS

NAPAPORN WINIJNAIYAPARK 4336163 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: WORACHART SIRAWARAPORN, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), SUMALEE TUNGPRADABKUL, Ph.D. (MOLECULAR BIOLOGY)

ABSTRACT

Dihydrofolate reductase and thymidylate synthase are two essential enzymes in the *de novo* synthesis of thymidylate required for DNA synthesis. In a malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, these two enzymes exist as a bifunctional protein and are linked by a junction region. The junction of these two enzymes in *P. falciparum* is an important drug target of antifolate antimalarials such as pyrimethamine and cycloguanil in malarial chemotherapy. A thorough understanding of the enzyme structure and its interaction with antifolates would aid in the development of new antifolates effective against resistant malaria. Comparative analysis of the kinetic properties of dihydrofolate reductase and the kinetics of the enzyme with junction peptides of varying lengths would be a possible means to investigate their effects on the enzyme's properties.

The goal of this study was to investigate the roles of the junction region on the catalytic activity and kinetic properties of dihydrofolate reductase in *P. falciparum*. I have constructed four recombinant clones of genes encoding for this enzyme containing different lengths of junction peptides extending toward the carboxyl-terminus of this enzyme. Expression and purification of the recombinant proteins in *E. coli* was performed. Kinetic studies and inhibition by antifolates were carried out on the recombinant proteins and the results obtained were compared to those of the dihydrofolate reductase in *P. falciparum*.

My results showed that the presence of junction peptide extending toward the carboxyl-terminal of the dihydrofolate reductase in *P. falciparum* did not improve the level of expression of the enzyme nor affect its stability. The kinetic properties of enzymes with different lengths of junction peptides were comparable to those of the dihydrofolate reductase in *P. falciparum*.

KEY WORDS : DIHYDROFOLATE REDUCTASE / JUNCTION REGION / *PLASMODIUM FALCIPARUM*

74 pp. ISBN 974-04-4775-9