SULFONAMIDE RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

ARPAPORN SONTHITHAI

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 974-04-5028-8
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การดื้อยาซัลฟาในเชื้อโรคเรื้อน (SULFONAMIDE RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM LEPRAE*)

อาภาภรณ์ สนธิไทย 4236790 SCBC/M

วท.ม.(ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วรชาติ สิรวราภรณ์, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), สุมาลี ตั้งประดับกุล, Ph.D. (MOLECULAR BIOLOGY)

บทคัดย่อ

ไดไฮดรอพเทอโรเอท ซินเทส เป็นเอ็นไซม์หนึ่งที่สำคัญต่อขบวนการสังเคราะห์โฟเลทภายในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเอนไซม์นี้พบเฉพาะในเชื้อจุลชีพและไม่พบในมนุษย์ ดังนั้นเอ็นไซม์นี้จึงเป็นเป้าสำคัญต่อการพัฒนายาซัลฟา การดื้อยาซัลฟาในเชื้อจุลชีพหลายชนิดเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของยีนสังเคราะห์เอ็นไซม์ไดไฮดรอพเทอโรเอท ซินเทส ก่อนหน้านี้มีรายงานว่าพบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 53 และ 55 ในเอ็นไซม์ไดไฮดรอพเทอโรเอท ซินเทสที่สกัดได้จากเชื้อโรคเรื้อนที่ดื้อต่อยาซัลฟา แต่ยังไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้เกิดการดื้อยาซัลฟาในเชื้อโรคเรื้อน

ผู้วิจัยทำการโคลนยีนปรกติ ยีนผิดปรกติหนึ่งตำแหน่ง (T53I, P55R) และยีนผิดปรกติสองตำแหน่ง (T53I+P55R) เข้าตัวนำพาหะและทำการแสดงออกใน *E.coli* ที่ขาดเอ็นไซม์ไดไฮดรอพเทอโรเอท ซินเทส เพื่อความสะดวกในการแยกโปรตีนบริสุทธิ์ นิวคลีโอไทด์ชิ้นเล็กที่สังเคราะห์ฮีสทิดีน 6 ตัวถูกนำไปต่อไว้ด้าน 3' ของยีนไดไฮดรอพเทอโรเอท ซินเทส (*folP*) ตัวนำพาหะของไดไฮดรอพเทอโรเอท ซินเทสทั้งหมดสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไดไฮดรอพเทอโรเอท ซินเทสที่มีความสมบูรณ์ในการเร่งปฏิกริยา โดยสามารถส่งเสริมการเติบโตของ *E.coli* ที่ขาดเอ็นไซม์นี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สมบูรณ์ได้ ความเข้มข้นของยาซัลโฟนาไมด์ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของโคลนปรกติแต่ไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของโคลนผิดปรกติ แสดงให้เห็นว่าความผิดปรกติ T53I และ P55R ทำให้เชื้อวัณโรคเกิดการดื้อยาซัลฟา ผลการศึกษาเอ็นไซม์ไดไฮดรอพเทอโรเอท ซินเทสบริสุทธิ์ พบว่าเอ็นไซม์ผิดปรกติมีค่า K_m ต่อ *p*ABA สูงขึ้น 8-50 เท่า ค่า K_i และ IC_{50} ต่อยาซัลฟาสูงขึ้น 20-1,000 เท่า แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่ 53 และ 55 ในไดไฮดรอพเทอโรเอท ซินเทสของเชื้อโรคเรื้อนมีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกริยา โดยความผิดปรกติทั้งสองตำแหน่งมีผลต่อสามารถของเอ็นไซม์ในการจับ *p*ABA และยาซัลโฟนาไมด์

87 หน้า ISBN 974-04-5028-8

SULFONAMIDE RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

ARPAPORN SONTHITHAI 4236790 SCBC/M

M.Sc.(BIOCHEMISTRY)

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

ABSTRACT

The dihydropteroate synthase is one of several crucial enzymes in the *de novo* biosynthesis of folate cofactors. Since this enzyme is found only in microorganisms and is absent in the human cell, it is an ideal target for enzyme inhibitor development. It has long been known that sulfa drugs act by targeting this enzyme, and that resistance to sulfa drugs in many microorganisms has been associated with mutations in the gene coding for this enzyme. Mutations at residues 53 and 55 of *M.leprae* have previously been reported from dapsone-resistant strains, however, there is no definite evidence linking these mutations with the resistant phenotype in *M.leprae*.

I cloned the wild-type *M.leprae folP* gene and three mutants – two single mutants (T53I, P55R) and one double mutant (T53I+P55R) – inserted them into an expression vector, and expressed them in the dihydropteroate synthase-deficient *E.coli* strain. All recombinant plasmids encoding for dihydropteroate synthase produced functional enzymes that could complement the growth on the minimum media by *E.coli* lacking the gene encoding for this enzyme. Sulfonamide drugs at the concentration that inhibited the growth of the wild-type clone of dihydropteroate synthase did not inhibit the growth of mutant clones, indicating that the mutations at residues 53 and 55 – corresponding to mutants T53I and P55R – in the gene coding for the enzyme contributed to drug resistance in *M.leprae*. Prior to kinetic analysis, the enzymes were purified to homogeneity by means of a short nucleotide sequence encoding six histidine residues that had earlier been introduced at the 3' end of the *folP* gene. For the mutant enzymes, as compared to the wild type, analysis showed an 8- to 50-fold increase in K_m to the enzyme substrate (para-aminobenzoic acid) and a 20- to 1,000-fold increase in K_i to and IC_{50} of para-aminobenzoic analogues (enzyme inhibitors). The results suggest that residues 53 and 55 of dihydropteroate synthase in *M.leprae* are crucial for catalysis, since mutations at these two residues affect the affinity for binding both to the enzyme substrate and to enzyme inhibitors (sulfonamide compounds).

KEY WORDS: DIHYDROPTEROATE SYNTHASE / SULFONAMIDE RESISTANCE / *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

87 pp. ISBN 974-04-5028-8