LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

02 JUN 1992

STUDIES ON DIHYDROFOLATE REDUCTASE FROM *Mycobacterium smegmatis*

อภินันทนาการ
จาก
.....

ATID CHANPONGSRI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

Copyright© by Mahidol University

18994

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเอ็นไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส จากเชื้อ *Mycobacterium smegmatis*
ผู้วิจัย นายอาทิตย์ จันทร์ผ่องศรี
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
วรชาติ สิรวราภรณ์ ปร.ด.
ยงยุทธ ยุทธวงศ์ D. Phil.
ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph. D.
วันที่สำเร็จการศึกษา ๒๗ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๓๔

บทคัดย่อ

เอ็นไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส (๕,๖,๗,๘-เตตราไฮโดรโฟเลต: $NADP^+$ ออกซิโดรีดักเทส E.C. 1.5.1.3) เป็นเอ็นไซม์เป้าหมายที่น่าสนใจยิ่งในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง, โรคติดเชื้อแบคทีเรียและปาราสิต เอ็นไซม์ดังกล่าวมีการศึกษาน้อยมากในเชื้อ mycobacteria ทั้งๆที่โรคที่เกิดจากเชื้อตัวนี้ เช่น โรคเรื้อนและวัณโรค ยังเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขในประเทศด้อยพัฒนา ดังนั้นการศึกษานี้ จึงเน้นศึกษา เอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส ในเชื้อ *M. smegmatis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ทำให้เกิดโรคแต่มีสายพันธุ์ใกล้ชิดกับเชื้อที่ร้ายแรง คือ *M. leprae* และ *M. tuberculosis* เชื่อว่าข้อมูลที่จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการแยกสายพันธุ์ยีนของเอ็นไซม์ดังกล่าวจากเชื้อ mycobacteria ที่ทำให้เกิดโรค เช่น โรคเรื้อนและวัณโรค เป็นต้น

การศึกษาได้ทำการแยกสกัดเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส จากเชื้อที่ดื้อและไม่ดื้อต่อยา trimethoprim โดยการใช้ Methotrexate-Sepharose และ Mono Q™ FPLC พบว่าสามารถแยกสกัดได้บริสุทธิ์ถึง ๒๕,๐๐๐ เท่า และได้ปริมาณเอ็นไซม์บริสุทธิ์ถึง ๒๖% เอ็นไซม์จากเชื้อที่ดื้อและไม่ดื้อยามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันที่ ๒๓ kDa เมื่อหาโดยวิธี Gel filtration (Sephadex G-100) และ SDS-PAGE ค่าอุณหภูมิพอเหมาะของเอ็นไซม์ทั้งสองเท่ากับ ๕๕°ซ แต่เอ็นไซม์จากเชื้อที่ไม่ดื้อยาไม่เสถียรต่ออุณหภูมิเมื่อเปรียบเทียบกับเอ็นไซม์จากเชื้อที่ดื้อยา นอกจากนี้ยังพบว่าเกลือ NaCl และ KCl ไม่สามารถยับยั้งเอ็นไซม์จากเชื้อที่ดื้อยาแต่สามารถยับยั้งเอ็นไซม์จากเชื้อที่ไม่ดื้อยาได้ถึง ๕๐% ที่ความเข้มข้นของเกลือ ๑ M ยูเรียมีผลน้อยมากต่อการทำงานของเอ็นไซม์ทั้งสอง ค่า K_m สำหรับไดไฮโดรโฟเลตและ NADPH ของเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์จากเชื้อที่ไม่ดื้อยาเป็น ๐.๕๐ ± ๐.๑ μM และ ๑๑.๔ ± ๐.๔ μM ตามลำดับ ค่า K_i สำหรับยา trimethoprim ของเอ็นไซม์บริสุทธิ์จากเชื้อที่ไม่ดื้อยามีค่า ๔.๐ ± ๐.๑ nM และค่า k_{cat} ที่ได้จากการคำนวนมีค่าประมาณ ๔๐๐ min^{-1} ลำดับกรดอะมิโน

Copyright by Mahidol University

ทางด้านปลาย N ของเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์จากเชื้อที่ไม่ดื้อยามีความคล้ายคลึงกับของเอ็นไซม์จากเชื้อพวกกรัมบวกอื่นๆ ข้อมูลที่ได้ชี้นำว่าการดื้อต่อยา trimethoprim ในเชื้อ *M. smegmatis* น่าจะมีส่วนเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ของยีนเป็นหลัก และอาจจะมีขบวนการอื่นๆเข้ามาเกี่ยวข้องกับการดื้อยาด้วย

ในการศึกษายีนของเอ็นไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทสนั้นได้ใช้ recombinant cosmid ec^2 493 ซึ่งมียีนของเอ็นไซม์จากเชื้อ *M. smegmatis* และ cosmid ดังกล่าวถูกนำเข้าไปอยู่ในเชื้อ *E. coli* การทดลองเบื้องต้นทำโดยการแยกสกัดเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส จากเชื้อ *E. coli* ที่มี recombinant cosmid ec^2 493 อยู่ โดยใช้ Methotrexate-Sepharose และ FPLC gel filtration และ Mono Q^{TM} FPLC ผลจากการทดลองพบว่าสามารถสกัดแยกเอ็นไซม์ให้ได้บริสุทธิ์ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ ๒๓ kDa เมื่อทำการหาโดย วิธี FPLC gel filtration และ SDS-PAGE เอ็นไซม์ที่ได้ยังมีลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N คล้ายคลึงกันอย่างมากกับของเอ็นไซม์ที่แยกสกัดมาจากเชื้อ *M. smegmatis* ที่ไม่ดื้อยา trimethoprim ผลจากการทำ hybridization ชี้นำได้ว่าเอ็นไซม์ที่สกัดได้นี้เป็นเอ็นไซม์สายผสมของเชื้อ mycobacteria ซึ่งมาจากการแสดงออกของยีนที่ถูกใส่เข้าไปใน cosmid

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Studies on Dihydrofolate Reductase from *Mycobacterium smegmatis*
Name Atid Chanpongsri
Degree Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee
Worachart Sirawaraporn, Ph. D.
Yongyuth Yuthavong, D. Phil.
Prapon Wilairat, Ph. D.
Date of Graduation 27 November B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

Dihydrofolate reductase (5,6,7,8-tetrahydrofolate:$NADP^+$ oxidoreductase E.C. 1.5.1.3) is an enzyme of chemotherapeutic interest. It is a target for a number of antitumor, antibacterial and antiprotozoal agents. However, there has been very little study of the enzyme from mycobacterium despite the fact that the organisms are causative agents of the diseases such as leprosy and tuberculosis. The present study involves purification and characterization of dihydrofolate reductase from *M. smegmatis* , a saprophytic organism closely related to *M. leprae* and *M. tuberculosis* . Dihydrofolate reductase from wide-type *M. smegmatis* was purified by affinity chromatography on Methotrexate-Sepharose followed by Mono Q^{TM} FPLC. These resulted in homogeneous enzyme of 26% yield with 25,000 fold purification. The enzymes from both wild-type and trimethoprim-resistant *M. smegmatis* showed similar apparent molecular weight of approximately 23 kDa upon gel filtration on Sephadex G-100 and SDS-PAGE. The optimum temperature for both enzyme was 55°C. However, the enzyme from wild type was more sensitive to thermal denaturation than the trimethoprim-resistant enzyme. The enzyme from trimethoprim-resistant organism was not significantly inhibited by NaCl and KCl, whereas 1 M NaCl and KCl inhibited about 50% of the activity of the trimethoprim-sensitive enzyme. The enzymes from both sources were slightly affected by urea (0.1-3.5 M). The K_m values for dihydrofolate and NADPH of the highly purified enzyme from sensitive organism were 0.50 ± 0.1 μM and 11.4 ± 0.4 μM, respectively. The K_i value for trimethoprim was 4.0 ± 0.1 nM.

The k_{cat} of about 400 min^{-1} was determined for the highly purified enzyme from this organism. The amino terminal sequence of highly purified DHFR from trimethoprim-sensitive *M. smegmatis* showed homology with DHFRs from other gram-positive organisms. The data suggested that mutation of DHFR gene and probably in combination with other mechanisms may contribute to trimethoprim resistance in *M. smegmatis*.

DHFR from *E. coli* harboring cosmid ec^2 493 was purified by combination of affinity chromatography, FPLC gel filtration and FPLC anion exchange chromatography. The final step yielded two homogeneous proteins which had the same apparent molecular weight of 23 kDa from FPLC gel filtration and SDS-PAGE. Both enzymes had the same amino terminal sequence which showed high homology to the sequence of DHFR from trimethoprim-resistant *M. smegmatis* . The results of hybridization have also proved that both enzymes should have resulted from the expression of the inserted DHFR gene in the cosmid.

Copyright by Mahidol University