LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

12 JUL 1994

CONSTRUCTION OF SYNTHETIC GENES FOR *PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE-THYMIDYLATE SYNTHASE AND *PNEUMOCYSTIS CARINII* DIHYDROFOLATE REDUCTASE

อภินันทนาการ
จาก

PHISIT PRAPUNWATTANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

Copyright by Mahidol University

27139

ชื่อวิทยานิพนธ์	สายยีนสังเคราะห์สำหรับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตส-ไธมิไดเลทซินเทสของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารั่ม และเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตสของเชื้อนิวโมซิสติส คารินิอี
ผู้วิจัย	พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	ยงยุทธ ยุทธวงศ์, D.Phil. ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D. วิชัย สุทธิมูล, Ph.D. พิณทิพ รื่นวงษา, ปร.ด.
วันที่สำเร็จการศึกษา	17 พฤษภาคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

สายยีนสังเคราะห์สำหรับ เอนไซม์สองหน้าที่ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตส-ไธมิไดเลทซินเทสของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารั่ม (PfDHFR-TS) และเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตสของเชื้อนิวโมซิสติส คารินิอี (PcDHFR) ได้ถูกออกแบบ และสังเคราะห์ขึ้นโดยมีพื้นฐานจากลำดับของกรดอะมิโนที่มีผู้รายงานไว้เป็นอย่างดีแล้ว สายยีนสังเคราะห์ทั้งสองสายนี้ได้ถูกออกแบบให้มีแบบแผนการใช้รหัสพันธุกรรมตามความชอบของเชื้ออีโคไลเจ้าบ้านที่ใช้สำหรับการศึกษาการแสดงออกของสายยีนสังเคราะห์นี้ และอีกทั้งให้มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ไม่พบในสายยีนธรรมชาติกระจายอยู่ทั่วไปบนสายยีนในระยะห่างที่เท่าๆกันโดยประมาณ นอกจากนี้สายยีนสังเคราะห์เหล่านี้ยังถูกออกแบบให้มีหน่วยที่ช่วยในการแปลรหัสและหน่วยหยุดการถอดรหัสเป็นของตัวเอง

เอนไซม์ PcDHFR ที่ได้มาจากการแสดงออกของยีนPcDHFRสังเคราะห์นี้มีคุณสมบัติเทียบได้กับเอนไซม์ PcDHFR ที่ได้มาจากการแสดงออกของสายยีนธรรมชาติทุกประการ เอนไซม์ PcDHFRถูกทำให้กลายพันธ์ได้เอนไซม์มิวแตนท์ที่มีกรดอะมิโนเปลี่ยนไปตำแหน่งเดียวขึ้น 3 ชนิด และมิวแตนท์ที่รวมการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนทั้งสามตำแหน่งอีก 1 ชนิด กรดอะมิโนที่ถูกเปลี่ยนไปคือไอโซลูซีนที่ตำแหน่ง 33 ไปเป็นเฟนิอะลานีน (I33F) ไลซีนที่ตำแหน่ง 37 ไปเป็นกลูตามีน (K37Q) และเฟนิอะลานีนที่ตำแหน่ง 69 ไปเป็นแอสปาราจีน (F69N) จากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่ากรดอะมิโนทั้งสามตำแหน่งนี้มีส่วนสำคัญทำให้เอนไซม์ PcDHFR มีความไวต่อยาไตรเมโธปริมและอนุพันธ์ต่างไปจากเอนไซม์ชนิดเดียวกันของมนุษย์

ในตอนแรกสายยีนสังเคราะห์สำหรับPfDHFR-TSได้ถูกแยกสร้างเป็น 3 ส่วนเป็นเอกเทศจากกันนั่นคือส่วนDHFR ส่วนเชื่อม และส่วนTS ส่วนDHFRสามารถทำให้แสดงออกได้

Copyright by Mahidol University

ในระดับที่ทำให้เชื้ออีโคไลเจ้าบ้านต้านฤทธิ์ยาไตรเมโธปริมได้แต่ต่ำกว่าระดับที่จะสามารถตรวจวัดได้โดยวิธีทางเสปคโตรสโคปี ส่วนTSนั้นทำให้แสดงออกได้ในเชื้ออีโคไลแต่อยู่ในรูปของส่วนที่รวมตัวกันเป็นinclusion bodies และไม่สามารถทำให้อยู่ในรูปของเอนไซม์ที่ทำงานได้ได้ สายยีนสังเคราะห์สำหรับ PfDHFR-TS ที่สมบูรณ์สามารถทำให้แสดงออกเป็นเอนไซม์สองหน้าที่ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตส-ไธมิไดเลทซินเทสในระดับที่สูงกว่าที่เคยรายงานไว้ประมาณ 10 ถึง 20 เท่า เอนไซม์ได้ถูกทำให้อยู่ในสภาพกึ่งบริสุทธิ์ จากการศึกษาคุณสมบัติพบว่าคล้ายคลึงกับที่เคยรายงานไว้สำหรับเอนไซม์ตัวเดียวกันที่แสดงออกจากสายยีนธรรมชาติ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Construction of Synthetic Genes for *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase and *Pneumocystis carinii* Dihydrofolate Reductase
Name	Phisit Prapunwattana
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	Yongyuth Yuthavong, D.Phil. Prapon Wilairat, Ph.D. Wichai Suttimool. Ph.D. Pintip Ruenwongsa, Ph.D.
Date of Graduation	17 May B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

Based on the known protein sequences, two synthetic genes were designed and constructed. One encoded *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase (PcDHFR) and another encoded the bifunctional *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (PfDHFR-TS). The synthetic *P. falciparum* DHFR-TS was first constructed as 3 separate domains: DHFR (PfDHFR), junction and TS (PfTS) domains and all domains were joined together to create the synthetic entire DHFR-TS sequence. DNA sequences of all synthetic genes/domains were designed based on biased codon usage of *Escherichia coli* and to contain unnatural restriction sites interspersed evenly through out their coding regions. The synthetic PcDHFR, PfDHFR, PfTS and PfDHFR-TS genes were also designed so as to contain their own translation unit and also contain transcription terminator.

The synthetic PcDHFR was mutated to three single mutants and one triple mutant (combining all three mutations). The residues Ile-33, Lys-37 and Phe-69 were changed to their counterpart residues in human DHFR, Phe, Gln and Asn, respectively. These three residues were earlier proposed to be responsible for the difference in sensitivity to trimethoprim and its analogues of *Pneumocystis* and human DHFRs. The wild-type PcDHFR and mutants were expressed and purified to homogeneity. Steady state kinetic parameters of all enzymes were determined, and each was examined for

Copyright by Mahidol University

inhibition by several related antifolates. The data suggested that these three amino acids do contribute to the species selectivity as predicted.

The synthetic PfDHFR domain was expressed as active monofunctional DHFR enzyme in *E. coli* to a level that could overcome the inhibitory effect of trimethoprim present in the medium. The synthetic PfTS domain was expressed as inclusion bodies under T7 promoter control. The TS activity could not be recovered by refolding approach. The complete synthetic PfDHFR-TS gene could be expressed as the active bifunctional enzyme, and the expression level was higher than previously reported for the cloned natural gene. The enzyme was partially purified and kinetic parameter was determined, including effect of salts and urea. The enzyme properties observed were comparable to the one previously obtained from the cloned natural gene.

Copyright by Mahidol University