MUTAGENESIS OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE: LINKAGES BETWEEN ANTI-FOLATE RESISTANCE AND MUTATION AT RESIDUE 108

SUGANYA YONGKIETTRAKUL

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

1996

TH
S947m
1996

ชื่อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 108 ในเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่ม และการดื้อยาแอนตี้โฟเลต
ผู้วิจัย	สุกัญญา ยงเกียรติตระกูล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	วรชาติ สิรวราภรณ์, ปร.ด. ยงยุทธ ยุทธวงศ์, D.Phil ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	29 มกราคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

จากหลักฐานข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมา ได้บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาแอนตี้-โฟเลต และการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 108 จากกรดอะมิโน serine เป็น asparagine ในเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส ของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่ม การศึกษานี้ต้องการที่จะเข้าใจความสำคัญของกรดอะมิโน serine ที่ตำแหน่ง 108 จึงได้นำเอายีนสังเคราะห์สำหรับเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทสของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่ม มาเป็นแม่แบบในการสร้างยีนกลายพันธุ์ โดยทำให้ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 108 ซึ่งปรกติเป็น serine ถูกทดแทนด้วยกรดอะมิโนอื่นอีก 19 ชนิด จากผลการทดลองพบว่า ยีนกลายพันธุ์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส เฉพาะสายพันธุ์ซึ่งมีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 108 เป็น lysine เท่านั้นที่ไม่สามารถแสดงออก (expression) โปรตีนในเชื้อแบคทีเรียได้ ในขณะที่สายพันธุ์กลายซึ่งมีกรดอะมิโนอื่นๆ อีก 19 ชนิด ที่ตำแหน่ง 108 สามารถแสดงออกโปรตีนในแบคทีเรียในรูปของ inclusion bodies ที่มีขนาด 27 กิโลดาลตัน เมื่อนำ inclusion bodies เหล่านี้มาทำให้คืนสภาพโดยวิธีการ refolding ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

Copyright by Mahidol University

จะสามารถทำให้เอ็นไซม์กลับคืนสู่สภาพที่สามารถเร่งปฏิกริยาได้ ผลการศึกษาได้พบว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 มีผลกระทบต่อคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์ และทำให้การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ด้วยสารแอนตี้โฟเลต เช่น ไพริเมธามีน และไซโคลกัวนิล เปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ เมื่อกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 108 ถูกแทนด้วย threonine และ asparagine จะทำให้การทำงานของเอ็นไซม์ลดลงถึง 50% เมื่อเทียบกับเอ็นไซม์สายพันธุ์แท้ (wild-type) ที่มี serine ที่ตำแหน่ง 108 ผลการทดลองยังได้พบอีกว่า ยีนกลายพันธุ์ของเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 เป็น glycine, alanine, glutamine, cysteine, valine, leucine และ methionine จะมีอัตราเร่งของเอ็นไซม์ที่ต่ำลงมาก ในขณะที่ยีนกลายพันธุ์ของเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 เป็น isoleusine, arginine, proline, aspartic acid, histidine, tyrosine, phenylalanine, tryptophan และ glutamine ไม่สามารถเร่งปฏิกริยาได้เลย

จากการศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์บริสุทธิ์ที่แยกจากสายพันธุ์ 4 ชนิด ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 เป็น glycine, cysteine, alanine และ glutamine ตลอดจนการยับยั้งเอ็นไซม์เหล่านี้ด้วยสารแอนตี้โฟเลต เช่น ไพริเมธามีน และไซโคลกัวนิล พบว่ายีนกลายพันธุ์ของเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 เป็น glutamine ให้เอ็นไซม์ที่ดื้อต่อสารแอนตี้โฟเลตทั้งสองชนิดและมีค่า K_m ต่อสับสเตรทสูง ส่วนยีนกลายพันธุ์ของเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโน glycine, cysteine และ alanine ที่ตำแหน่ง 108 นั้นไม่ดื้อต่อยาเลย เมื่อทำการศึกษาจลศาสตร์ของเอ็นไซม์บริสุทธิ์ที่มีกรดอะมิโน asparagine และ glutamine ที่ตำแหน่ง 108 ได้พบว่า การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ด้วยไพริเมธามีน และไซโคลกัวนิล มีลักษณะของการยับยั้งเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) เช่นเดียวกับของเอ็นไซม์ wild-type จากข้อมูลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า การกลายพันธุ์จากกรดอะมิโน serine เป็น asparagine ที่พบในเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาแอนตี้โฟเลตในธรรมชาตินั้น น่าจะเหมาะสมและเป็นประโยชน์แก่การอยู่รอดของเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้เนื่องจากเอ็นไซม์กลายพันธุ์ที่ได้นั้นมีเสถียรภาพ อีกทั้งมีความสามารถต้านทานต่อยาแอนตี้-โฟเลตได้ ในขณะที่การกลายพันธุ์ไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นนั้นไม่เหมาะสมที่จะเกิดขึ้นในธรรมชาติ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Mutagenesis of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: linkage between anti-folate resistance and mutation at residue 108
Name	Suganya Yongkiettrakul
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	Worachart Sirawaraporn, Ph.D. Yongyuth Yuthavong, D. Phil. Prapon Wilairat, Ph.D.
Date of Graduation	29 January B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

The roles of residue 108 of *Plasmodium falciparum* DHFR in conferring anti-folate resistance were investigated. Mutants containing mutations at residue 108 of synthetic plasmodial DHFR were constructed by combinatorial cassette mutagenesis, a process by which the target codon is mutated to encode for all possible amino acids. With the exception of S108K, all other DHFR mutants highly expressed DHFR as inactive inclusion bodies of molecular mass about 27 kDa in *E. coli* system. Active DHFR activity could be recovered upon refolding of the inclusion bodies. Substitution of Ser108 by other amino acids affected the kinetic parameters of the enzymes and altered the inhibitory effects against pyrimethamine and cycloguanil. Mutants with Thr or Asn at residue 108 caused approximately 50% reduction in DHFR activity as compared to the wild-type enzyme. Poor

Copyright by Mahidol University

DHFR activities were observed from mutants with Gly, Ala, Gln at residue 108, and mutants with Cyc, Val, Leu and Met showed very poor DHFR activities. Mutations at residue 108 from Ser to Ile, Arg, Pro, Asp, His, Tyr, Phe, Trp, Glu yielded inactive enzyme. The mutant DHFRs from S108G, S108C, S108A and S108Q were purified to homogeneity by methotrexate-sepharose affinity chromatography. The kinetic parameters and inhibition by antifolates of the mutant enzymes were investigated. Mutant DHFR with Ser108 to Gln mutation was highly resistant to both pyrimethamine and cycloguanil with elevated K_m values for the substrates. However, other mutant DHFRs were susceptible to the drugs. Inhibition studies also revealed that the wild-type DHFR and DHFRs from S108N and S108Q mutants were competitively inhibited by pyrimethamine and cycloguanil. The data suggested that mutation at residue 108 from Ser to Asn was more preferably selected over other amino acids in nature, presumably due to its stability and ability to confer resistance to anti-folates, while substitutions with other amino acids might not be favorable or parasite survival.

Copyright by Mahidol University