MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF DIHYDROPTEROATE SYNTHASE FROM *M. TUBERCULOSIS* AND *M. LEPRAE*

VANIDA NOPPONPUNTH

With compliments
of

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2000

ISBN 974-663-535-2

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
V856m
2000
43955 C.2

3737635 SCBC/D : MAJOR: BIOCHEMISTRY; Ph.D.(BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : DIHYDROPTEROATE SYNTHASE / *M. tuberculosis* / *M. leprae* / DRUG TARGET / RESISTANCE /TUBERCULOSIS / LEPROSY

VANIDA NOPPONPUNTH : MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF DIHYDROPTEROATE SYNTHASE FROM *M. TUBERCULOSIS* AND *M. LEPRAE*. THESIS ADVISORS : WORACHART SIRAWARAPORN, Ph.D., YONGYUTH YUTHAVONG, D.Phil., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D. 240 p. ISBN 974-663-535-2

Dihydropteroate synthase (EC.2.5.1.15, DHPS) is an obligatory enzyme in the *de novo* folate biosynthesis of prokaryotes and protozoan, whereas human cells can salvage and utilize exogeneous folates. Such a difference in folate metabolism has made DHPS an attractive target for chemotherapy. This research concerns the cloning and expression of DHPS from *M. tuberculosis* and *M. leprae*. Sufficient amounts of recombinant enzymes will provide opportunities for further studies that might lead to rational drug design of new effective anti-mycobacterial agents. The gene coding for DHPSs of *M. tuberculosis* and *M. leprae* were cloned from gDNA libraries by hybridization using probes derived from the polymerase chain reaction. DNA sequencing revealed an open-reading-frame of 840 bp, encoding a protein of 280 amino acids for *M. tuberculosis* DHPS, and of 852 bp encoding a protein of 284 amino acids for *M. leprae* DHPS. Both DHPSs were monofunctional enzymes. The enzymes were successfully expressed under the control of T5 promoter in a DHPS deficient strain of *E. coli*C600Δ*folP*::Km^r. Using three chromatographic steps, i.e. DEAE-Sepharose, DyeMatrex Gel Green A and Hydroxyapatite, the DHPSs of *M. tuberculosis* and *M. leprae* were purified to ~98% homogeneity. SDS-PAGE revealed molecular mass of 29 kDa and 30 kDa for *M. tuberculosis* and *M. leprae* DHPS, respectively. Gel filtration of both enzymes showed a molecular mass of ~ 60 kDa indicating the existence of a dimer of identical subunits in the native enzyme. Steady-state kinetic analysis showed that the K_m for *p*-aminobenzoic acid and 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate of *M. tuberculosis* DHPS were 0.37 $\pm$ 0.08 μM and 1.03 $\pm$ 0.07 μM, respectively, whereas those for *M. leprae* DHPS were 0.6 $\pm$ 0.1 μM and 1.2 $\pm$ 0.3 μM, respectively. The inhibitory effects of sulfa drugs, dapsone and *p*-aminosalicylic acid were studied. Dapsone was found to be the most potent inhibitor against the recombinant mycobacterial DHPSs, whereas *p*-aminosalicylic acid, a putative DHPS inhibitor, was a poor inhibitor of the enzyme.

3737635 SCBC/D : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; ปร.ด. (ชีวเคมี)

วนิดา นพพรพันธุ์ : การโคลนยีนและการแสดงออกของยีนสำหรับเอ็นไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส จากเชื้อ *M. TUBERCULOSIS* และ *M. LEPRAE* (MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF DIHYDROPTEROATE SYNTHASE FROM *M. TUBERCULOSIS* AND *M. LEPRAE*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วรชาติ สิรวราภรณ์, ปร.ด., ยงยุทธ ยุทธวงศ์, D.Phil., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D., 240 หน้า. ISBN 974-663-535-2

ไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส (DHPS) เป็นเอ็นไซม์ที่มีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการสังเคราะห์โฟเลตภายในเซลล์ โดยเฉพาะในจุลชีพชั้นต่ำและโปรโตซัวซึ่งไม่สามารถรับโฟเลตจากสารอาหารภายนอกเซลล์ได้ DHPS จึงเป็นเอ็นไซม์ที่น่าสนใจในเชิงเคมีบำบัด โครงการนี้จึงมีเป้าหมายที่จะโคลนยีนสำหรับเอ็นไซม์ DHPS จากเชื้อ *M. tuberculosis* และ *M. leprae* และทำการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียเพื่อให้ได้เอ็นไซม์สายผสมในปริมาณมากเพียงพอที่จะทำการศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์ การยับยั้งด้วยสารยับยั้งประเภทซัลฟา ตลอดจนศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์ ผู้วิจัยสามารถเลือกโคลนยีน *dhps* จาก genomic DNA libraries ที่เตรียมได้จากเชื้อ *M. tuberculosis* และ *M. leprae* แล้วทำการศึกษาหาลำดับเบส พบว่ายีน *dhps* ของ *M. tuberculosis* มีขนาด 840 เบสคู่ ส่วนยีน *dhps* ของ *M. leprae* มีขนาด 852 เบสคู่ ยีนทั้งสองเป็น monofunctional gene เมื่อทำการแสดงออกของยีน *dhps* ในเชื้อ *E. coli* C600 $\Delta folP$::Km^r ซึ่งเป็นสายพันธ์ที่มีความบกพร่องของเอ็นไซม์ DHPS ได้ผลการแสดงออกของเอ็นไซม์ตามต้องการ เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์เอ็นไซม์ด้วย DEAE-Sepharose ตามด้วย DyeMatrex Gel Green A และ Hydroxyapatite พบว่า เอ็นไซม์ DHPS ของทั้ง *M. tuberculosis* และ *M. leprae* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์เอ็นไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ด้วย SDS-PAGE พบว่าเอ็นไซม์ DHPS ของ *M. tuberculosis* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29 กิโลดาลตัน ขณะที่เอ็นไซม์ DHPS ของ *M. leprae* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นว่าเอ็นไซม์ DHPSs ของ *M. tuberculosis* และ *M. leprae* น่าจะประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย การศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์บริสุทธิ์พบว่า ค่า K_m สำหรับ *p*-aminobenzoic acid และ 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate สำหรับเอ็นไซม์ DHPS ของ *M. tuberculosis* เป็น 0.37 $\pm$ 0.08 μM และ 1.03 $\pm$ 0.07 μM ตามลำดับ ค่า K_m สำหรับเอ็นไซม์ DHPS ของ *M. leprae* เป็น 0.6 $\pm$ 0.1 μM และ 1.2 $\pm$ 0.3 μM ตามลำดับ ผลการศึกษาการยับยั้งเอ็นไซม์ด้วยกลุ่มยาซัลฟา dapsone และ *p*-aminosalicylic acid พบว่า dapsone เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ขณะที่ *p*-aminosalicylic acid ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ได้น้อยที่สุด