

- 4 JAN 2002



**STUDIES OF THE POLYMORPHISMS OF ALPHA-
ISOPROPYLMALATE SYNTHASE GENE OF
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

WIMON CHANCHAEM

อภิรักษ์นพคุณ

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2000

ISBN 974-664-770-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH

Wjy57st

2000

3836844 SCMI/D : MAJOR : MICROBIOLOGY; Ph.D. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : POLYMORPHISMS / ALPHA-ISOPROPYLMALATE
SYNTHASE/*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

WIMON CHANCHAEM : STUDIES OF THE POLYMORPHISMS OF ALPHA-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE GENE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. THESIS ADVISORS: PRASIT PALITTAPONGARNPIM, M.D., KAVI RATANABANANGKON, Ph.D., WATANALAI PANBANGRED, D.Eng. SKORN MONGKOLSUK, Ph.D. 142 P. ISBN 974-664-770-9

Alpha-isopropylmalate synthase is the first committed step enzyme in the synthesis of leucine. The enzyme plays an important role in the growth of many kinds of microorganisms. Previously a polymorphic DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* was cloned and found to contain a part of the α -IPMS encoding gene or *leuA*. The gene contained a locus of variable number of 57 bp-long tandem repeats, which hasn't been found in *leuA* of any bacteria. The objectives of this study were, determining of the sequence and structure of *M. tuberculosis leuA* gene, studying the general properties of the gene product or α -IPMS and investigating for the effect of the 57 bp tandem repeat on the size of the protein product. The whole *leuA* gene of *M. tuberculosis* strain H37Rv and the sequences of the polymorphic DNA segments of other two strains of clinical isolates showing different copy number of the tandem repeats were also determined. Upon DNA sequence analysis, *leuA* gene of *M. tuberculosis* was 1950 bp long encoded 649 amino acids, the initiation and the termination codon were GTG and TAG respectively. As the gene was polymorphic according to the variable number of the 57 bp repeat which was not present in other microorganisms, the gene was proved to be functional by subcloning into pET17b and pET15b expression vector using PCR-based method then overexpressed in *E. coli* BL21(DE3). The enzyme products were purified from crude lysates by conventional method and affinity column chromatography, followed by enzyme characterization. The recombinant α -IPMS was purified to homogeneity and pure, indicated as a single band on sodiumdodecyl polyacrylamide gel electrophoresis at the position of about 80 kDa. Further analysis by gel filtration method suggested that the enzyme was a dimer of identical subunits. The optimal pH and optimal temperature of activity was at pH 8.5 and 37°C respectively. The enzyme was fairly stable. The K_m and V_{max} of of this enzyme for α -ketoisovalerate were 24.9 μ M and 256.41 units/ml respectively and those for acetyl CoA were 250 μ M and 666.67 units/ml respectively. Westernblot analysis of α -IPMS in 3 strains of *M. tuberculosis* harboring different copy number of the 57 bp tandem repeats using the rabbit anti-recombinant α -IPMS also showed polymorphisms of the enzyme corresponding to the polymorphisms of *leuA* gene.

3836844 SCMI/D : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา; ปร.ด. (จุลชีววิทยา)

วิมล จันทร์แจ่ม : การศึกษา Polymorphisms ภายในยีน Alpha-isopropylmalate synthase ของเชื้อวัณโรค (STUDIES OF THE POLYMORPHISMS OF ALPHA-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE GENE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์, M.D., กวี รัตนบรรณางกูร, Ph.D., วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D.Eng., ศกรณ์ มงคลสุข, Ph.D. 142 หน้า. ISBN 974-664-770-9

เอ็นไซม์ alpha-isopropylmalate synthase (α -IPMS) เป็นเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาแรกในขบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน Leucine ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลชีพหลายชนิด จากการศึกษาที่ผ่านมาสามารถโคลนส่วนที่มีคุณสมบัติ polymorphisms ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ชนิดนี้ ซึ่งมีชื่อว่า *leuA* จากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv โดยที่ยีนส่วนนี้มี repeated sequence ซึ่งมีความยาว 57 bp เรียงติดกัน 2 ชุด จำนวนชุดที่พบ repeated sequence นี้ มีความแตกต่างกันในเชื้อบางสายพันธุ์ แต่ไม่พบในยีน *leuA* ของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาลำดับเบสทั้งหมดและโครงสร้างของยีนนี้ รวมทั้งคุณสมบัติทั่วไปของเอ็นไซม์ α -IPMS ของเชื้อ *M. tuberculosis* นอกจากนี้ยังทำการสำรวจว่า การมี repeated sequence ซึ่งยาว 57 bp ในจำนวนชุดที่แตกต่างกันในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์นั้น เป็นสาเหตุให้โปรตีนนี้มีขนาดแตกต่างกันหรือไม่ จึงได้ทำการหาลำดับเบสของยีน *leuA* ซึ่งควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ α -IPMS ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ดังกล่าว และหาลำดับเบสของ repeated sequence ที่พบในเชื้อสายพันธุ์ที่มี repeated sequence 2 ชุด 4 ชุด และ 7 ชุด ผลการศึกษาพบว่ายีน *leuA* มีความยาว 1950 bp เอ็นไซม์ α -IPMS ซึ่งสร้างโดยยีนนี้ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 649 ตัว รหัสแรกของยีนคือ GTG และรหัสสุดท้ายคือ TAG ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการ subclone ยีนนี้ใส่ในพลาสมิด pET17b และ pET15b เพื่อใช้ผลิตเอ็นไซม์ปริมาณมากในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) จากนั้นทำการแยกเอ็นไซม์จากสารสกัดจากเซลล์ที่เลี้ยงและถูกเหนี่ยวนำให้สร้างเอ็นไซม์ หลังจากทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ได้แก่ วิธี anion exchange chromatography ตามด้วย gel filtration chromatography หรือวิธี affinity chromatography แล้วทำการศึกษาคุณสมบัติ พบว่าวิธี affinity chromatography สามารถทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ดี เมื่อนำเอ็นไซม์บริสุทธิ์มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ามีขนาดของ subunit ประมาณ 80 กิโลดาลตัน และเอ็นไซม์ประกอบด้วย 2 subunits ที่มีขนาดเท่ากัน

จากการศึกษาหาค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาพบว่ามีค่า pH 8.5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ และเอ็นไซม์มีความเสถียรค่อนข้างสูง การพบ tandem repeats ในส่วน coding region ไม่มีผลกระทบต่อคุณสมบัติเหล่านี้ เมื่อใช้สาร α -ketoisovalerate เป็นสารตั้งต้น สามารถคำนวณหาค่า K_m ได้เท่ากับ 24.9 μ M และค่า V_{max} เท่ากับ 256.41 units/ml แต่เมื่อใช้ acetylCoA เป็นสารตั้งต้น สามารถหาค่า K_m ได้เท่ากับ 250 μ M และค่า V_{max} เท่ากับ 666.67 units/ml ตามลำดับ จากการศึกษาตรวจดูเอ็นไซม์ในเชื้อ *M. tuberculosis* 3 สายพันธุ์ ซึ่งมีจำนวนชุดของ 57 bp tandem repeats ต่างกัน คือ 2 ชุด 3 ชุด และ 6 ชุด ด้วยวิธี Western blot พบว่าขนาดของเอ็นไซม์ที่พบ ซึ่งแสดงโดยตำแหน่งของโปรตีนบนแผ่นเมมเบรนมีความแตกต่างกันอย่างสอดคล้องกับจำนวนชุดของ 57 bp tandem repeats ที่พบบนยีน *leuA*