30 DEC 1999

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

PLASMODIUM FALCIPARUM DIHYDROFOLATE REDUCTASE: INTERACTION AMONG AMINO ACID RESIDUES RESPONSIBLE FOR ANTIFOLATE BINDING

AMORNRAT BUNWATTANAKUL

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1999

ISBN 974-663-161-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
A524p
1999

13313 c.1

3936090 SCBC/M : MAJOR: BIOCHEMISTRY; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : ANTIFOLATE / DIHYDROFOLATE REDUCTASE/ *PLASMODIUM FALCIPARUM*

AMORNRAT BUNWATTANAKUL : *PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE: INTERACTION AMONG AMINO ACID RESIDUES RESPONSIBLE FOR ANTIFOLATE BINDING, THESIS ADVISOR: WORACHART SIRAWARAPORN, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D. 88 p. ISBN 974-663-161-6

Linkages between point mutations in the dihydrofolate reductase (pfDHFR)domain of *Plasmodium falciparum* bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and antifolate resistance have been widely observed and well documented. Previous laboratory studies on the kinetic properties and inhibition by antifolate agents, e.g. pyrimethamine (Pyr) and cycloguanil (Cyc) of naturally occurring pfDHFR mutants revealed that the mutated amino acids synergistically interact for binding to antifolates Pyr and Cyc. The results raise questions as to whether such phenomenon are unique only for the naturally occurring mutants or can be observed in the laboratory constructed of naturally unfound mutant DHFRs.

In this study, a series of fifteen pfDHFR mutants were constructed by cassette mutagenesis in positions 16, 51, 59, 108, and 164. Expression in *E. coli* of each mutant were monitored by DHFR activity assay and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Except for N51I+I164L mutant which did not express DHFR, all other mutants yielded protein band of molecular mass ~27 kDa in the insoluble fraction. Only six out of fifteen mutants had detectable DHFR activity in the soluble extract. Among these are five double mutants (A16V+N51I, A16V+C59R, N51I+C59R, C59R+I164L, S108N+I164L) and one triple mutant (N51I+C59R+I164L). The DHFR from these six mutants were purified and characterized with respect to their kinetics and inhibition by Pyr and Cyc. The mutants with N51I+C59R, C59R+I164L, S108N+I164L, and N51I+C59R+I164L mutations conferred cross resistance to both Pyr and Cyc and showed good correlation with the naturally occurring mutant DHFRs (R= 0.934), while the mutants with A16V+N51I and A16V+C59R mutations conferred resistance to Cyc but remained susceptible to Pyr. The free energy ($\Delta G°$) and the interaction energy ($\Delta\Delta G°$) were calculated from the inhibition data to explain the molecular interactions among the combinations of mutagenized residues. Data for the six unnaturally occurring mutants reveal cooperative interactions among mutated residues for Pyr binding but not for Cyc. The results support the hypothesis that combinations of multiple mutations at specific residues contribute toward antifolate resistance, and that mutants which are either poorly resistance or have insufficient catalytic DHFR activity to support DNA synthesis do not survive under antifolates pressure.

Studies were also extended to two new DHFR mutants, C50R and Bolivia repeat, recently found in Bolivia. The results revealed no drastic changes in their kinetic parameters as compared to the wild-type enzyme. The C50R mutant and Bolivia repeat, however, did not markedly affect the drug resistivity to antifolate agents.

Copyright © by Mahidol University

3936090SCBC/M : สาขาวิชา: ชีวเคมี ; วท. ม (ชีวเคมี)

อมรรัตน์ บุญวัฒนกุล : การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการจับกันระหว่างแอนตี้โฟเลตและเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทสของเชื้อมาลาเรีย ฟัลซิฟารั่ม (*PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE: INTERACTION AMONG AMINO ACID RESIDUES RESPONSIBLE FOR ANTIFOLATE BINDING) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์:วรชาติ สิรวราภรณ์, ปร.ด. , ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., 88 หน้า ISBN 974-663-161-6

การศึกษาต่างๆที่ผ่านมาเกี่ยวกับการดื้อยาแอนตี้โฟเลตในเชื้อมาลาเรีย ได้พบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดจุดกลายพันธุ์ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 16, 51, 59, 108, และ 164 ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส (pfDHFR) และการดื้อยาไพริเมธามีนและไซโคลกวานิลในเชื้อมาลาเรีย ผลจากการศึกษาด้านจลศาสตร์และการยับยั้ง pfDHFR ด้วยสารแอนตี้โฟเลต ไพริเมธามีน และไซโคลกวานิลก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์กันในการดื้อยาทั้งไพริเมธามีนและไซโคลกวานิล ของเอนไซม์กลายพันธุ์ที่พบในธรรมชาติ การค้นพบนี้ได้นำไปสู่คำถามที่สำคัญว่าปรากฏการณ์เช่นนี้พบได้ทั่วๆไปในเอนไซม์กลายพันธุ์จากสายพันธุ์ที่ไม่พบในธรรมชาติด้วยหรือไม่

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้สร้างยีนกลายพันธุ์ที่ไม่พบในธรรมชาติจำนวนทั้งหมด 15 ชนิด โดยวิธี cassette mutagenesis และทำการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ pfDHFR ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยการติดตามหา activity ของเอนไซม์และการใช้ SDS-polyacrylamide gel electrophpresis (SDS-PAGE) ผลการวิจัยพบว่ายีนกลายพันธุ์ทุกชนิดยกเว้น N51I+I164L สามารถแสดงออกได้ในแบคทีเรีย โดยเห็นแถบโปรตีนขนาด 27 กิโลดาลตันเมื่อทำการศึกษาด้วย SDS-PAGE อย่างไรก็ตาม ได้พบว่ามี ยีนกลายพันธุ์เพียง 6 ชนิดที่สามารถพบ pfDHFR activity ได้ในส่วนที่เป็น soluble extract ในจำนวนยีนกลายพันธุ์เหล่านี้เป็นยีนที่มีจุดกลายพันธุ์ 2 แห่ง จำนวน 5 ชนิดคือ A16V+N51I A16V+C59R N51I+C59R C59R+I164L S108N+I164L และยีนกลายพันธุ์ที่มีจุดกลายพันธุ์ 3 แห่ง เพียง 1 ชนิด คือ N51I+C59R+I164L หลังจากที่ได้ทำการแสดงออกยีนกลายพันธุ์เหล่านี้ และทำการแยกบริสุทธิ์แล้วจึงนำเอนไซม์บริสุทธิ์เหล่านี้มาศึกษาสมบัติทางจลศาสตร์และทดสอบการยับยั้งกับสารต้านโฟเลต ไพริเมธามีน และไซโคลกวานิล ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์จากสายพันธุ์ N51I+C59R C59R+I164L S108N+I164L และ N51I+C59R+I164L ดื้อต่อยาทั้งไพริเมธามีน และไซโคลกวานิล เช่นเดียวกับเอนไซม์กลายพันธุ์จากสายพันธุ์ที่พบในธรรมชาติ ในขณะที่เอนไซม์กลายพันธุ์จากสายพันธุ์ A16V+N51I และ A16V+C59R ดื้อต่อยาไซโคลกวานิลเพียงอย่างเดียว จากการคำนวณค่าพลังงานเสรี (ΔG°) และพลังงานปฏิสัมพันธ์ ($\Delta\Delta G^\circ$) ที่ใช้ในการจับกันระหว่างยาแอนตี้โฟเลตและ pfDHFR โดยคำนวณจากค่าการยับยั้ง แสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์กันของจุดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกับการดื้อยาไพริเมธามีนเท่านั้น โดยไม่พบการเสริมฤทธิ์กันต่อการดื้อยาไซโคลกวานิล ผลการวิจัยสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าการ กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเฉพาะรวมกันหลายๆ ตำแหน่งจะก่อให้เกิดการดื้อยาแอนตี้โฟเลต และยีนกลายพันธุ์ซึ่งไม่พบในธรรมชาติ อาจเกิดจากความบกพร่องในประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และ/หรือ ไม่มีความดื้อยาในระดับเพียงพอที่ให้ถูกคัดเลือกจากธรรมชาติ

นอกจากนี้แล้ว ยังได้ศึกษาผลของยีนกลายพันธุ์ pfDHFRที่ค้นพบใหม่ในแถบโบลิเวีย 2 ชนิด คือ C50R และ Bolivia repeat ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติจลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์เหล่านี้เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ไวต่อยา อย่างไรก็ตาม เอนไซม์กลายพันธุ์จากทั้งสายพันธุ์ C50R และ สายพันธุ์ Bolivia repeat ยังคงไวต่อยาแอนตี้โฟเลต ไพริเมธามีน ไซโคลกวานิล และWR99210