



**EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF FUNCTIONALLY  
ACTIVE THYMIDYLATE SYNTHASE OF *PLASMODIUM  
FALCIPARUM* IN *ESCHERICHIA COLI***

**MANEENOP YIMYAM**

//

อธิปัทนศาสตราจารย์

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

**2001**

**ISBN 974-04-0609-2**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH

M9742

2001

4136798 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)  
KEY WORDS : THYMIDYLATE SYNTHASE / DYHYDROFOLATE  
REDUCTASE / PROTEIN-PROTEIN INTERACTION

MANEENOP YIMYAM : EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF  
FUNCTIONALLY ACTIVE THYMIDYLATE SYNTHASE OF *PLASMODIUM  
FALCIPARUM* IN *ESCHERICHIA COLI*. THESIS ADVISORS : WORACHART  
SIRAWARAPORN, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D. 127 p. ISBN 974-04-0609-2

Thymidylate synthase (TS) of *Plasmodium falciparum* exist as bifunctional protein together with dihydrofolate reductase (DHFR) and the two domains are connected by a junctional region (JR). Although expression of pfDHFR domain yields catalytically active DHFR, the TS domain of *P. falciparum* has never been obtained in an active form. The knowledge of the molecular interactions between the DHFR and TS domains are therefore important and will provide insight into a better understanding of structure-function of this potentially important malarial target.

We report the cloning and investigation of the property of *P. falciparum* TS domain (pfTS) and an additional three constructs which contained varying lengths of junctional sequence, extended towards the amino-terminal end of the TS domain (pfTS-JR935, pfTS-JR1004, pfTS-JR1079) to complement the growth of TS-deficient *E. coli*  $\chi$ 2913(DE3) in minimum agar plate without thymidine supplementation.

Our data revealed that the pfTS domain was not functionally active. When co-transformed with plasmid expressing active pfDHFR, only the pfTS domain with the appropriate length of JR (pfTS-JR1079) was found to be functionally active. Evidences to support the expression of active TS included: a) ability to complement the growth of TS-deficient *E. coli*  $\chi$ 2913(DE3) in the absence of thymidine supplementation, b) ability to detect TS activity in crude extract of bacteria by spectrophotometric method, and c) positive autoradiogram from  $^3\text{H}$ -FdUMP binding.

The interaction process to yield active TS was species-specific, requiring catalytically active DHFR. The presence of inactive pfDHFRs and DHFRs from other species did not yield active pfTS activity. The results obtained demonstrated that interaction between pfDHFR domain and pfTS-JR domain was species-specific and requires only fully active pfDHFR.

4136798 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

มณีนพ ยิ้มแย้ม : การศึกษาการแสดงออกและคุณสมบัติในส่วนของเอ็นไซม์ไทมิโดเลตซินเทส ของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมในแบคทีเรียอี โคไล (EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF FUNCTIONALLY ACTIVE THYMIDYLATE SYNTHASE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN *ESCHERICHIA COLI*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิชาชาติ สิริวราภรณ์, ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., 127 หน้า. ISBN 974-04-0609-2

ในเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม (pf) พบว่าเอ็นไซม์ไทมิโดเลตซินเทส (TS) อยู่บนสายโพลิเปปไทด์เดียวกับเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส (DHFR) โดยมีส่วนเปปไทด์เชื่อม (JR) อยู่ระหว่างเอ็นไซม์ทั้งสอง การแสดงออกสำหรับส่วนของเอ็นไซม์ DHFR ในแบคทีเรียมุ่งเน้นอยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ แต่ในส่วนของเอ็นไซม์ TS ยังไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการแสดงออกของเอ็นไซม์นี้ในรูปที่ทำงานได้ เพื่อให้ได้เอ็นไซม์เพียงพอสำหรับการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน

คณะผู้วิจัยได้ทำการโคลนและแสดงออกของยีนสำหรับส่วนเอ็นไซม์ TS (pFTS) และส่วนของเอ็นไซม์ TS ที่มีขนาดต่างๆของส่วนเปปไทด์เชื่อมติดอยู่ (pFTS-JR935, pFTS-JR1004, pFTS-JR1079) ในเชื้อแบคทีเรียอี โคไล พบว่าเอ็นไซม์ดังกล่าวไม่สามารถแสดงออกในรูปที่เร่งปฏิกิริยาได้จากข้อมูลที่บ่งชี้ถึงความสำคัญของปฏิสัมพันธ์ระหว่างส่วน pDHFR และส่วน pFTS นำไปสู่ผลสำเร็จของการแสดงออกในส่วนของเอ็นไซม์ TS ที่มีส่วนเปปไทด์เชื่อมติดอยู่ โดยอาศัยความช่วยเหลือของส่วน pDHFR และความยาวที่เหมาะสมของส่วนเปปไทด์เชื่อม การแสดงออกของส่วนเอ็นไซม์ TS ที่มีส่วนเปปไทด์เชื่อมติดอยู่ (pFTS-JR1079) ในรูปที่เร่งปฏิกิริยาได้ ยืนยันผลโดยความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียที่มีความบกพร่องของยีน ts บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นที่เป็น minimum media, ความสามารถในการตรวจวัด activity ของเอ็นไซม์ได้ และพบแถบการแสดงออกของโปรตีน โดยใช้เทคนิค autoradiography นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบกับส่วน pDHFR ในรูปที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ หรือ DHFR จากสายพันธุ์อื่น พบว่าไม่ได้ช่วยเหลือส่วน pFTS-JR1079 ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ เหมือนในกรณีของส่วน pDHFR สายพันธุ์แท้ (wild-type) จากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่างส่วน pDHFR และส่วน pFTS-JR ที่เกิดขึ้น ต้องการเฉพาะ DHFR ของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม และต้องอยู่ในรูปที่เร่งปฏิกิริยาได้