20 JUN 2003

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

PROTEIN ENGINEERING OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE MUTANTS FOR INCREASED SOLUBILITY

DEANPEN JAPRUNG

With compliments
of
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
2003

TH
D284p
2003
c.2

ISBN 974-04-3163-1
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

PROTEIN ENGINEERING OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE MUTANTS FOR INCREASED SOLUBILITY

DEANPEN JAPRUNG 4436757 SCBC/M

M.Sc.(BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: PRAPON WILAIRAT, Ph.D., SUDSANGUAN CHUSACULTANACHAI, Ph.D., JIRUNDON YUVANIYAMA, Ph.D.

ABSTRACT

Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (pfDHFR) is an important enzyme in deoxythymidine monophosphate synthesis pathway and is an important drug target in malarial chemotherapy. For rational drug design and development, it is critical to obtain structures of the target protein. To date, the crystalline structure of pfDHFR is not available. One major problem is in the solubility of pfDHFR. The protein can be expressed and purified in large amounts; however, it exhibits very low solubility and aggregates at about 2 mg/ml, which is much lower than the crystallizable concentration.

In this study, we have developed an in *vivo* screening system to select for functional pfDHFR mutants with increased solubility using bacterial complementation assay and green fluorescence protein (GFP) as a reporter gene. When fused to proteins of interest, the GFP signal is related to the productive folding and solubility of the tested proteins. A chimeric pfDHFR was constructed and used as template for the construction of DNA libraries. Mutant pfDHFR libraries were constructed using two different strategies. From homology model of pfDHFR, two hydrophobic amino acids (Y35 and F37) were predicted to be on the surface of the pfDHFR and possibly were responsible for aggregation. These residues were mutated to the other 19 amino acids randomly by employing degenerated oligonucleotides polymerase (DOP). Additionally, the entire pfDHFR gene was randomly mutated using error-prone PCR. Both libraries were screened for soluble mutants with increased fluorescence signal using fluorometer and fluorescence activated cell sorter (FACS). pfDHFR mutants with high solubility were purified and their solubility and kinetic properties were characterized. Four selected mutants were obtained from DOP and error-prone PCR approach, respectively (Y35Q+F37R, Y35L+F37T, Y35G+F37L, Y35L+F37R and K27E). In all mutants hydrophobic residues had been changed to amino acids with lower hydrophobicity.

Kinetic parameters of the purified pfDHFR mutants without GFP were similar to wild type enzyme. The solubility of the enzymes was measured by determining absorbance at 595 nm and by observation under a microscope. GFP could increase solubility of the fusion protein and can be used as a reporter for pfDHFR solubility. All mutants had solubility higher than that of the wild type pfDHFR, especially the mutant K27E, which was six times more soluble than the wild type. It is of interest to note that the solubility of the selected mutants likely correlates with the ratio of the amino acid hydrophobicity of the wild type to mutant enzymes.

KEY WORDS: DIHYDROFOLATE REDUCTASE / PROTEIN SOLUBILITY / GREEN FLUORESCENCE PROTEIN

131 P. ISBN 974-04-3163-1

Copyright by Mahidol University

การคัดเลือกเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลท รีดักเตส จาก เชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิฟารัม ชนิดกลายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการละลายเพิ่มขึ้น (PROTEIN ENGINEERING OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE MUTANTS FOR INCREASED SOLUBILITY)

เดือนเพ็ญ จาปรุง 4436757 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., สุดสงวน ชูสกุลธนะชัย, Ph.D., จิรันดร ยูวะนิยม, Ph.D.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตส เป็นเอนไซม์เป้าหมายในการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติ เพื่อพัฒนายาสำหรับรักษาโรคมาลาเรีย ถึงแม้ว่าในปัจจุบันนี้เราจะสามารถผลิตและสกัดแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ปริมาณมาก แต่เอนไซม์ที่ได้นั้นมีคุณสมบัติในการละลายต่ำ และจับกลุ่มตกตะกอนได้ง่าย จึงเป็นอุปสรรคในการตกผลึกเพื่อหาโครงสร้าง 3 มิติที่แท้จริง ดังนั้นเราจึงทำการคัดเลือก หาเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตส ชนิดกลายพันธุ์ที่มีความสามารถในการละลายสูงขึ้นและยังมีแอคติวิตี้ โดยใช้วิธีการที่เรียกว่า แบคทีเรีย คอมพลีเมนเทชัน และใช้กรีนฟลูออเรสเซน โปรตีน เป็นตัวรายงานสัญญาณ เนื่องจากเคยมีรายงานว่าสัญญาณ ฟลูออเรสเซน ของ ฟลูออเรสเซนโปรตีน มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ติดอยู่กับฟลูออเรสเซนโปรตีน

จากการศึกษาแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตสของเชื้อมาลาเรีย พลาสโมเดียมฟัลซิฟารัมพบว่ามีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง บริเวณพื้นผิวของเอ็นไซม์ตัวนี้ (ไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 35 และ ฟีนิลอลานินที่ตำแหน่ง 37) ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุของการตกตะกอนของเอนไซม์ตัวนี้ก็เป็นได้ เราจึงได้ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆทั้ง 19 ชนิดโดยวิธีการที่เรียกว่า Degenerated Oligonucleotides Polymerase (DOP) นอกจากนี้เรายังได้ทำการสร้างเอ็นไซม์กลายพันธุ์อีกแบบหนึ่งโดยการใช้ error-prone PCR เอ็นไซม์กลายพันธุ์ที่ได้จากทั้งสองวิธีถูกคัดเลือกหาตัวที่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนสูงกว่าเอ็นไซม์ดั้งเดิมโดยใช้เครื่อง ฟลูออโรมิเตอร์และฟลูออเรสเซนแอคติเวทเซลล์ซอสเตอร์ และหาตัวที่มีแอคติวิตี้โดยใช้วิธีแบคทีเรีย คอมพลีเมนเทชัน

จากผลการคัดเลือกโดยวิธีดังกล่าวพบว่ามีเอ็นไซม์กลายพันธุ์ 4 ตัวที่ได้รับการคัดเลือกจาก DOP Library (Y35Q+F37R, Y35L+F37T, Y35G+F37L และ Y35L+F37R) และ 1 ตัวจาก Error prone PCR (K27E) เอ็นไซม์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมดนี้ล้วนแล้วแต่มีค่าความชอบน้ำสูงกว่าเอ็นไซม์ดั้งเดิมทั้งสิ้น

เมื่อนำเอ็นไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 5 ตัวไปสกัดแยกให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปศึกษาหาค่า Kinetic พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่า Kinetic ของเอ็นไซม์ดั้งเดิมมาก อีกทั้งยังมีค่าความสามารถในการละลายสูงกว่าด้วย โดยเฉพาะเอ็นไซม์กลายพันธุ์ K27E ซึ่งมีความสามารถในการละลายสูงกว่าเอ็นไซม์ดั้งเดิมมากกว่า 6 เท่าตัว และสิ่งที่น่าสนใจอีกข้อหนึ่งคือความสามารถในการละลายของเอ็นไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 5 ตัวนี้มีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนระหว่างค่าความไม่ชอบน้ำของเอ็นไซม์ดั้งเดิมกับเอ็นไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 5 ตัวนี้ด้วย

131 หน้า. ISBN 974-04-3163-1

Copyright by Mahidol University