| | |
|---|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 108 ในเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่ม และการดื้อยาแอนตี้โฟเลต |
| ผู้วิจัย | สุกัญญา ยงเกียรติตระกูล |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) |
| คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ | วรชาติ สิรวราภรณ์, ปร.ด.<br>ยงยุทธ ยุทธวงศ์, D.Phil<br>ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D. |
| วันที่สำเร็จการศึกษา | 29 มกราคม พ.ศ. 2539 |

## บทคัดย่อ

จากหลักฐานข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมา ได้บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาแอนตี้-โฟเลต และการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 108 จากกรดอะมิโน serine เป็น asparagine ในเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส ของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่ม การศึกษานี้ต้องการที่จะเข้าใจความสำคัญของกรดอะมิโน serine ที่ตำแหน่ง 108 จึงได้นำเอายีนสังเคราะห์สำหรับเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทสของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่ม มาเป็นแม่แบบในการสร้างยีนกลายพันธุ์ โดยทำให้ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 108 ซึ่งปรกติเป็น serine ถูกทดแทนด้วยกรดอะมิโนอื่นอีก 19 ชนิด จากผลการทดลองพบว่า ยีนกลายพันธุ์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส เฉพาะสายพันธุ์ซึ่งมีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 108 เป็น lysine เท่านั้นที่ไม่สามารถแสดงออก (expression) โปรตีนในเชื้อแบคทีเรียได้ ในขณะที่สายพันธุ์กลายซึ่งมีกรดอะมิโนอื่นๆ อีก 19 ชนิด ที่ตำแหน่ง 108 สามารถแสดงออกโปรตีนในแบคทีเรียในรูปของ inclusion bodies ที่มีขนาด 27 กิโลดาลตัน เมื่อนำ inclusion bodies เหล่านี้มาทำให้คืนสภาพโดยวิธีการ refolding ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

Copyright by Mahidol University

จะสามารถทำให้เอ็นไซม์กลับคืนสู่สภาพที่สามารถเร่งปฏิกริยาได้ ผลการศึกษาได้พบว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 มีผลกระทบต่อคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์ และทำให้การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ด้วยสารแอนตี้โฟเลต เช่น ไพริเมธามีน และไซโคลกัวนิล เปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ เมื่อกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 108 ถูกแทนด้วย threonine และ asparagine จะทำให้การทำงานของเอ็นไซม์ลดลงถึง 50% เมื่อเทียบกับเอ็นไซม์สายพันธุ์แท้ (wild-type) ที่มี serine ที่ตำแหน่ง 108 ผลการทดลองยังได้พบอีกว่า ยีนกลายพันธุ์ของเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 เป็น glycine, alanine, glutamine, cysteine, valine, leucine และ methionine จะมีอัตราเร่งของเอ็นไซม์ที่ต่ำลงมาก ในขณะที่ยีนกลายพันธุ์ของเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 เป็น isoleusine, arginine, proline, aspartic acid, histidine, tyrosine, phenylalanine, tryptophan และ glutamine ไม่สามารถเร่งปฏิกริยาได้เลย

จากการศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์บริสุทธิ์ที่แยกจากสายพันธุ์ 4 ชนิด ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 เป็น glycine, cysteine, alanine และ glutamine ตลอดจนการยับยั้งเอ็นไซม์เหล่านี้ด้วยสารแอนตี้โฟเลต เช่น ไพริเมธามีน และไซโคลกัวนิล พบว่ายีนกลายพันธุ์ของเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่ง 108 เป็น glutamine ให้เอ็นไซม์ที่ดื้อต่อสารแอนตี้โฟเลตทั้งสองชนิดและมีค่า $K_m$ ต่อสับสเตรทสูง ส่วนยีนกลายพันธุ์ของเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโน glycine, cysteine และ alanine ที่ตำแหน่ง 108 นั้นไม่ดื้อต่อยาเลย เมื่อทำการศึกษาจลศาสตร์ของเอ็นไซม์บริสุทธิ์ที่มีกรดอะมิโน asparagine และ glutamine ที่ตำแหน่ง 108 ได้พบว่า การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ด้วยไพริเมธามีน และไซโคลกัวนิล มีลักษณะของการยับยั้งเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) เช่นเดียวกับของเอ็นไซม์ wild-type จากข้อมูลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า การกลายพันธุ์จากกรดอะมิโน serine เป็น asparagine ที่พบในเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาแอนตี้โฟเลตในธรรมชาตินั้น น่าจะเหมาะสมและเป็นประโยชน์แก่การอยู่รอดของเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้เนื่องจากเอ็นไซม์กลายพันธุ์ที่ได้นั้นมีเสถียรภาพ อีกทั้งมีความสามารถต้านทานต่อยาแอนตี้-โฟเลตได้ ในขณะที่การกลายพันธุ์ไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นนั้นไม่เหมาะสมที่จะเกิดขึ้นในธรรมชาติ

Copyright by Mahidol University