

Thesis Title	Production and Characterization of Recombinant Methionine Synthase of <i>Plasmodium falciparum</i>	
Author	Mr. Kitsanapong Reaksudsan	
Degree	Master of Science (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairattanakul	Advisor
	Dr. Chairat Uthaipibull	Co-advisor

ABSTRACT

The resistance to commonly used antimalarial drugs, and spread of insecticide resistant vectors constitute major causes behind the re-emergence and severity of a worldwide malaria problem. Methionine synthase(MS) plays a vital role in production of methionine that is subsequently used to generate folate derivatives(FDs). Rapidly dividing cells such as tumors, bacteria and malaria parasites rely heavily on the availability of FDs for their growth and development. Thus, inhibition of the MS activity can greatly affects cell division, through inhibition of DNA replication and protein synthesis. This feature has been exploited for the identification of MS gene in *Plasmodium falciparum* for the development of antimalarial drugs.

In this study we employed molecular biological techniques to identify, characterize and study the MS in *P. falciparum*. The MS candidate gene(PFL1625w) was amplified from genomic DNA of 3D7 strain *Plasmodium falciparum* by using polymerase chain reaction(PCR). Then, PFL1625w gene was ligated with pET28a vector and transformed into DH5a competence cell. After confirmed with DNA

sequencing, positive colonies were induced with 0.4 mM IPTG for protein expression. Moreover, protein band of interest was extracted and analyzed by LC-MS/MS. The result showed that our protein was appeared in insoluble fraction and showed complete homology with predicted protein from PFL1625w gene. To test whether our expressed protein possessed an biological activity of homocysteine methyl-transferase or not, a complementation assay was performed using RK4536, an *E. coli* strain lacking both cobalamin-dependent and –independent methionine synthase activities, cultured in M9 minimal media with or without methionine. Unfortunately, no growth from RK4536 cells harbouring pET28PFL1625w plasmid was observed from M9 minimal media without methionine.

This study demonstrated that our expressed protein wasn't possessed an activity for methionine synthase which might be caused by their conformation during expression process. In addition, further investigation is needed to improve the solubility of PFL1625w recombinant protein in order to be able to study its biological activity which is predicted to be important. The discovery of methionine synthase in *Plasmodium* spp. may lead to identification of novel drug target which is in need in the process of antimalarial drug discovery.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของรีคอมบิแนนท์เมโรไอโนน จีนเรสของพลาสมิเดียม ฟาซิพาลัม
ผู้เขียน	นาย กฤษณพงษ์ ฤกษ์สุดแสน
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ดร. ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การดื้อต่อยาต้านเชื้อมาลาเรียและการแพร่กระจายของพาหะที่ดื้อต่อยาฆ่าแมลงได้ส่งผลให้ปัญหาของโรคมาลาเรียได้มีการทวีความรุนแรงมากขึ้นในระดับโลก จากเหตุดังกล่าวทำให้การศึกษาเพื่อหาเป้าหมายใหม่ที่จะนำมาใช้พัฒนายาต้านเชื้อมาลาเรียชนิดใหม่ทวีความสำคัญมากขึ้นในปัจจุบัน ในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เมโรไอโนน จีนเรสโดยเอนไซม์เมโรไอโนน จีนเรสนี้จะมีหน้าที่ในการเมโรไอโนนและสารอนุพันธ์ของโฟเลตซึ่งจะมีความสำคัญในการสังเคราะห์และสร้างดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีระบบการแบ่งตัวของเซลล์อย่างรวดเร็วอันได้แก่ เซลล์มะเร็ง, เซลล์แบคทีเรีย และเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย จะมีความจำเป็นที่จะต้องพึ่งพาสารอนุพันธ์ของโฟเลตในการเจริญเติบโต ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้เอนไซม์เมโรไอโนน จีนเรสจะถูกนำมาศึกษาเพื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาเป็นเป้าหมายของยาต้านเชื้อมาลาเรียต่อไป

ในส่วนของงานวิจัย งานชิ้นนี้ได้เริ่มจากการนำชิ้นยีนที่คาดว่าจะทำหน้าที่สร้างเอนไซม์เมโรไอโนน จีนเรสในเชื้อมาลาเรีย พลาสมิเดียม ฟาซิพาลัมมาจากฐานข้อมูล ก่อนจะนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ปฏิกิริยาถูกลูโซฟอลิเมอเรส (PCR) ร่วมกับสารพันธุกรรมตั้งต้นจากเชื้อพลาสมิเดียม ฟาซิพาลัม หลังจากนั้นสารพันธุกรรมที่ถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้ถูกนำไปโคลนในพลาสมิด pET28 อัลฟา ก่อนจะถูกนำไปใส่ในเชื้อแบคทีเรียอี. โคไลโดยสารพันธุกรรมที่ได้จะถูกยืนยันความถูกต้องโดยวิธีการลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ซึ่งหลังจากยืนยันความถูกต้อง

ของสารพันธุกรรมแล้ว เชื้ออี โคไลที่บรรจุสารพันธุกรรมดังกล่าวจะถูกนำไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนโดยใช้ไอพิทีจี (IPTG) ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ โดยโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ออกมาจะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อโดยใช้เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์พบว่าโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ออกมาเป็นโปรตีนเดียวกันกับโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูล แต่พบว่าโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ออกมานั้นกลับอยู่ในรูปแบบที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการทำงานของโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ออกมาโดยใช้วิธี คอมพลีเมนต์เทชั่น (Complementation assay) โดยผลที่เกิดขึ้นพบว่าโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ออกมานั้นไม่สามารถทำหน้าที่ของเอนไซม์เมโรโอนิน ซินเรสได้ ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียไม่เกิดการเจริญเติบโตในที่สุด

อย่างไรก็ตามทางวิจัยยังคาดว่าโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นเอนไซม์เมโรโอนิน ซินเรสนี้น่าจะมีความสำคัญในแง่ของการนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาวัคซีนเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้ปัญหาแรกที่ต้องทำการพิจารณาก่อนการศึกษาโปรตีนนี้ก็คือการเพิ่มศักยภาพในการละลายให้กับโปรตีนดังกล่าวก่อน ซึ่งทางผู้วิจัยคาดว่าหากสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีนนี้ได้ ก็มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถศึกษาความสามารถในการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ได้ และอาจนำไปสู่การศึกษาเพื่อพัฒนาวัคซีนเชื้อมาลาเรียต่อไปได้ในอนาคต