Thesis Title Investigation of Methionine Synthase in Malaria Parasites as Anti-Malarial Drug Target

Author Miss Pimpisa Teeyakasem

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool Advisor

Dr. Chairat Uthaipibull Co-advisor

ABSTRACT

Malaria is a tropical disease caused by the protozoa (*Plasmodium* spp.) that can be transmitted by *Anopheles* mosquito vector to different hosts including human being, rodent and avian leading to serious symptoms and death. *Plasmodium* parasites are increasingly resistant to anti-malarial drugs continuously in many endemic areas. Modification of the drug used and formulation of combined drugs can increase efficiency of anti-malarial activity and lower incidence of the drug resistance. Metionine synthase (MS) involves the synthesis of methionine (Met) which is important for catalysis of DNA methylation in all living cells. A previous study reported that cultured *P. falciparum* had 105-kDa MS enzyme. If so, inhibition of the MS activity can affect division and development of malaria parasites. The *Plasmodium* MS could be the target along with thymidylate synthase (TS) of anti-folate drug to increase the efficiency and reduce the resistance of anti-malarial drugs.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In this study, we validated conventional biochemical techniques to identify, characterize and study the MS in mouse liver, and utilized the techniques to detect the MS in *Plasmodium* malaria parasites.

We successfully isolated MS from the mouse hepatocytes (70% purity, 0.28% yield). Possibly, fraction 2 obtained from Sephadex G200 gel filtration contained the MS with a molecular weight of 143 kDa. The fraction dose-dependently catalyzed the conversion of homocysteine (HCy) to Met along with that of methyltetrahydrofolate (CH_3-THF) to tetrahydrofolate (THF). Increase of OD at 350 nm of spectrophotometry and peak height at a retention time of 5.95 min of the HPLC demonstrated the MS-catalyzed production of THF. Appearance of Met peak at a retention time of 20.09 minute in HPLC assay indicated the produced Met. Output of the study was utilized as a model to investigate MS enzyme in human malaria parasites (*P. falciparum*) and rodent malaria parasite (*P. berghei*).

In SDS-PAGE analysis ranged 90-135 kDa, *P. berghei* lysate contained only one protein band with an approximate molecular weight of 115 kDa while *P. falciparum* lysate contained three suspected protein bands. However, the parasite lysates neither catalyzed the production of Met nor THF.

In conclusion, MS was not found in *P. berghei*- and *P. falciparum*-parasitized red blood cells. Possibly, amount of the *Plasmodium* MS may be too low to be detectable. Thoughtfully, the malaria parasite may not require the MS for synthesis of methionine like the other organisms but directly utilize abundant methionine derived from hemoglobin degradation. Moreover, *Plasmodium* MS still remains obscured and genomic tools are necessary for further investigations to confirm the existent or absence of this enzyme.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาเอนไซม์เมทไทโอนีนซินเทสในปรสิตมาลาเรีย
เพื่อเป็นเป้าหมายของยาต้านมาลาเรีย

ผู้เขียน นางสาวพิมพ์พิศา ตียเกษม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ดร. ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ไข้มาลาเรียเป็นโรคเขตร้อนที่ติดต่อกันได้โดยอาศัยยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะนำเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium* spp.) สู่ร่างกายเจ้าบ้านที่เป็นมนุษย์ หนูและสัตว์ปีกจนทำให้เกิดอาการรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ อย่างไรก็ตามเชื้อพลาสโมเดียมมีการดื้อต่อยาต้านและรักษาโรคมาลาเรียเพิ่มขึ้นเรื่อยๆอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ระบาดหลายแห่ง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณยารวมทั้งการดัดแปลงเป็นสูตรยาหลายตัวร่วมกันจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของยาและลดการดื้อยาได้ เอนไซม์เมไทโอนีนซินเทส มีความเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เมไทโอนีนซึ่งมีความสำคัญต่อการ เร่งปฏิกิริยาเมตทิลเลชันของดีเอนเอในเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกชนิด จากการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าเชื้อ *P. falciparum* มี เอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสขนาด 105 กิโลดาลตัน ดังนั้นผลยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์เมไทโอนีนซินเทส นี้จะรบกวนการแบ่งตัวและเจริญเติบโตของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อพลาสโมเดียม เอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสของเชื้อพลาสโมเดียมสามารถเป็นเป้าหมายร่วมกับเอนไซม์ไธมิดิเลต ซินเทสสำหรับยากลุ่มต้านโฟเลทเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดการดื้อยาต้านมาลาเรีย งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาเอกลักษณ์ คุณลักษณะและการทำงานของเอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสในเซลล์ตับหนูเมาส์ด้วยวิธีการทางชีวเคมี เพื่อนำแนวทางมาใช้ตรวจสอบเอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสในเชื้อพลาสโมเดียมต่อไป

เราสามารถแยก เอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสในเซลล์ตับหนูที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ (70% purified, 0.28% yield) ซึ่งส่วนที่ 2 จากการทำเจลฟิลเตรชั่นผ่าน Sephadex G200 มีความเป็นไปได้ที่จะมีเอนไซม์เมไทโอนีนซินเทส ที่มีขนาดโมเลกุล 143 กิโลดาลตันและสามารถเร่งการเปลี่ยนโฮโมซิสเตอีนเป็นเมไทโอนีนพร้อมกับมีการเปลี่ยน โคเอนไซม์เมทิลเตตระไฮโดรโฟเลตเป็นเตตระไฮโดรโฟเลต ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ 350 นาโนเมตรและจุดสูงสุดของกราฟที่เวลา 5.95 นาทีโดยวิธี HPLC แสดงให้เห็นถึงการสังเคราะห์ เตตระไฮโดรโฟเลต โดยการเร่งของเอนไซม์เมไทโอนีนซินเทส ส่วนจุดสูงสุดของกราฟที่เวลา 20.09 นาทีโดยวิธี HPLC แสดงให้เห็นถึงปริมาณของเมไทโอนีนที่เกิดขึ้น ผลลัพธ์ที่ได้นี้เป็นแบบอย่างที่จะนำไปใช้ศึกษาเอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสในเชื้อมาลาเรียในมนุษย์คือ *P. falciparum* และในหนูคือ *P. berghei*

ในการวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE ในช่วง 90-135 กิโลดาลตัน พบว่า *P. berghei* lysate มีแถบโปรตีนแถบเดียวที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 115 กิโลดาลตัน ในขณะที่ *P. falciparum* lysate มีแถบโปรตีน 3 แถบที่น่าจะเป็นไปได้ อย่างไรก็ตามทั้งสองกลุ่มไม่มีการสังเคราะห์ทั้งเมไทโอนีนและเตตระไฮโดรโฟเลต

อาจสรุปได้ว่า ไม่มีการพบเอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสทั้งในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. berghei* และ *P. falciparum* ซึ่งเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสของเชื้อทั้งสองมีปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่ำเกินกว่าทีจะตรวจพบได้ เป็นไปได้ว่าเชื้อมาลาเรียอาจไม่ต้องการเอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสในการสังเคราะห์เมไทโอนีนเหมือนสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่อาจได้เมโทโอนีนมาจากการย่อยฮีโมโกลบินโดยตรง ยิ่งไปกว่านั้น เอนไซม์เมไทโอนีนซินเทสของเชื้อพลาสโมเดียมยังคงต้องได้รั บการศึกษาเพิ่มเติมและการศึกษาด้านยีนมีความจำเป็นในการยืนยันทั้งการมีอยู่และการขาดหายไปของเอนไซม์ชนิดนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved