การยับยั้งไดไฮโดรพเทอโรเอตซินเทสจาก Escherichia coli โดยสารจำพวกกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดฮัลคาโนอิก

นางสาว นุชรัตน์ เตียวปิยกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2530

ISBN 974-567-444-3

INHIBITION OF DIHYDROPTEROATE SYNTHASE FROM ESCHERICHIA COLI BY p-AMINOBENZENESULFONAMIDOALKANOIC ACIDS

Miss Nutcharat Tiewpiyakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-567-444-3

Thesis Title	Inhibition of Dihydropteroate Synthase from Escherichia coli by p-Aminobenzenesulfonamidoalkanoic Acids
By	Miss Nutcharat Tiewpiyakul
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Wichai Suttimool, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya ..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Jariya Boonjawat ..... Chairman

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Wichai Suttimool ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Wichai Suttimool, Ph.D.)

Siriporn Sitthipraneed ..... Member

(Assistant Professor Siriporn Sitthipraneed, Ph.D.)

Sunanta Pongsamart ..... Member

(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การยับยั้งไดไฮโดรพเทอโรเอตซินเทสจาก Escherichia coli โดยสารจำพวกกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิก

ชื่อนิสิต นางสาว นุชรัตน์ เตียวปิยกุล

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย สุทธิมูล

ภาควิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2529

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอตซินเทส จาก Escherichia coli โดยสารจำพวกกรด พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิก จำนวน 7 ชนิด โดยการหาค่า inhibitor constant เอนไซม์ที่ใช้ได้ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนซึ่งเท่ากับ 417 เท่าโดยใช้ affinity chromatography ซึ่งมี 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonylglycine เป็น ligand พบว่าอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียสและ pH 8.55 ตามลำดับ บริเวณ active site ของเอนไซม์อาจจะมีกรดอะมิโนชนิด cysteine, lysine และ arginine ค่า K_m ของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเท่ากับ 1.30×10^{-6} โมล/ลิตร ค่า K_i ของ sulfanilamide, N-(p-aminobenzenesulfonyl) glycine, N-(p-aminobenzenesulfonyl)tyrosine, N-(p-aminobenzenesulfonyl) alanine, N-(p-aminobenzenesulfonyl) phenylalanine, N-(p-aminobenzenesulfonyl)methionine, N-(p-aminobenzenesulfonyl) leucine และ N-(p-aminobenzenesulfonyl) valine เท่ากับ 4.8×10^{-5}, 4.0×10^{-5}, 13.8×10^{-5}, 23.5×10^{-5}, 24.0×10^{-5}, 49.3×10^{-5}, 84.0×10^{-5}, และ 100.0×10^{-5} โมล/ลิตร ตามลำดับ จาก Dixon plot พบว่าสารที่นำมาศึกษาทุกตัวเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์แบบแข่งขัน (competitive inhibitor) โดยแข่งขันกับกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก ในการจับกับ active site ของเอนไซม์ เมื่อลงแผนระหว่าง $1/K_i$ กับค่าไฮโดรโฟบิซิตีของ side chains ของกรดอะมิโนของกรด พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโด-อัลคาโนอิก (ค่า Δft และ π) พบว่า $1/K_i$ จะลดลงเมื่อค่า Δft และ π มีค่า 0-1500

แคลอรี/โมล และ 0-1.5 ยูนิต ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่า $1/K_i$ จะสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อ Δft และ π มีค่า 1500-2500 แคลอรี/โมล และ 1.5-2.63 ยูนิต ตามลำดับ

Thesis Title Inhibition of Dihydropteroate Synthase from Escherichia coli by p-aminobenzenesulfonamidoalkanoic Acids

Name Miss Nutcharat Tiewpiyakul

Thesis Advisor Associate Professor Wichai Suttimool, Ph.D.

Department Biochemistry

Academic Year 1986

ABSTRACT

Seven p-aminobenzenesulfonamidoalkanoic acids were selected, and their inhibitory activities against dihydropteroate synthase from Escherichia coli were studied by the determination of the inhibitor constant. The enzyme was partially purified to 417 fold by affinity chromatography in which 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonyl-glycine is a ligand. The optimum temperature and pH of the enzyme were 42^{o} C and 8.55 respectively. The enzyme active site might contain the amino acid residues of cysteine, lysine and arginine. The K_m value for p-aminobenzoic acid was 1.30×10^{-6} mol/l. The K_i values for sulfanilamide, N-(p-aminobenzenesulfonyl) glycine, N-(p-aminobenzene-sulfonyl) tyrosine, N-(p-aminobenzenesulfonyl) alanine, N-(p-amino-benzenesulfonyl) phenylalanine, N-(p-aminobenzenesulfonyl) methionine, N-(p-aminobenzenesulfonyl) leucine, and N-(p-aminobenzenesulfonyl) valine were 4.8×10^{-5}, 4.0×10^{-5}, 13.8×10^{-5}, 23.5×10^{-5}, 24.0×10^{-5}, 49.3×10^{-5}, 84.0×10^{-5} and 100.0×10^{-5} mol/l respectively. The Dixon plot indicates that each compounds was an inhibitor competing with p-aminobenzoic acid for the binding to the enzyme active site. The plots of the $1/K_i$ values versus the hydrophobicity

of the amino acid side chain of p-aminobenzenesulfonamidoalkanoic acids (Δft and π) indicate that the $1/K_i$ values were decreased when Δft and π were 0-1500 cal/mol and 0-1.5 units respectively. However, the $1/K_i$ values were slightly increased when Δft and π were 1500-2500 cal/mol and 1.5-2.63 units respectively.

ACKNOWLEDGEMENT

The author would like to express her deepest gratitude to Dr.Wichai Suttimool, her advisor, for valuable advice, understanding, initiating ideas and constant encouragement throughout this work.

The author wishes to express her appreciation :

To Dr.Jariya Boonjawat, Dr.Siriporn Sittipraneed and Dr.Sunanta Pongsamart for serving as thesis committee and for their helpful discussion about this work.

To Dr.Naline Nilubol, Dr.Sumalee Pichyangkura, Dr.Songsri Kulpreecha and Dr.Pairoh Pinphanichakarn from the Department of Microbiology for their permission and valuable suggestion for the use of the fermentation and the diaflo ultrafiltration equipments.

To Dr.Chaiyute Thunpithayakul, Dr.Vicha Vanadurongwan and Mr.Narong Chaiyapan from the Department of Chemical Technology for their permission and valuable suggestion for the use of the conductometer.

To all members of the Department of Microbiology, especially Miss Siriluk Teeradakorn, Miss Kajeenart Potivejkul, Mr.Jaturaporn Pornsilapatip and to all members of the Department of Biochemistry for their help, sincerity and friendship.

To Mr.Sopon Pinpet and Mrs.Somporn Sattayasunsakun for their help in the preparation of the phenol (Folin-Ciocalteau) reagent.

To the Department of Chemistry for providing the melting point apparatus.

To the Department of Biochemistry for providing laboratory facilities for this work.

To the Graduate School, Chulalongkorn University and to the "Chulalongkorn University Alumni Association under the Royal Patronage of the King" for providing the supporting fund.

To Prince of Songkla University for granting a study leave.

CONTENTS

Page

Page

LIST OF TABLES

Table | Page

LIST OF FIGURES

Figure Page

ABBREVIATION

BSA	Bovine serum albumin
DHP	7,8-Dihydropteroate
DHPP	2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine pyrophosphate
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
K_i	Inhibitor constant
K_m	Michaelis constant
PABA	p-Aminobenzoic acid
PMB	p-Chloromercuribenzoic acid
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane