Thesis Title Construction of Random Mutant Library of *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase and Its Use for Study of Evolution of Antifolate Resistance in *Plasmodium berghei* Model

Author Miss Wachiraporn Tipsuwan

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool Advisor

Dr. Chairat Uthaipibull Co-advisor

Dr. Sumalee Kamchonwongpaisan Co-advisor

ABSTRACT

The prevalence of drug resistance amongst the human malaria *Plasmodium* species has most commonly been associated with genomic mutation within the parasites. This phenomenon necessitates evolutionary predictive studies of possible resistance mutations, which may occur when a new drug is introduced. Therefore, identification of possible new *P. falciparum* dihydrofolate reductase (*Pf*DHFR) mutants that confer resistance to antifolate drugs is essential in the process of anti-malarial drug development.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A system to identify mutation in *Pfdhfr* gene that confers antifolate drug resistance using an animal *Plasmodium* parasite model was developed. By using error-prone PCR and *Plasmodium* transfection technologies, libraries of *Pfdhfr* mutant were generated and then episomally transfected to *P. berghei* parasites, from which pyrimethamine-resistant *Pf*DHFR mutant were selected. The principal mutation found from this experiment was S108N, coincident with the first pyrimethamine-resistance mutation isolated from the field. A transgenic *P. berghei*, in which endogenous *Pbdhfr* allele was replaced with the mutant $Pfdhfr^{S108N}$, was generated and confirmed to have normal growth rate comparing to parental non-transgenic parasite and also confer resistance to pyrimethamine. Furthermore, we generated libraries of *Pfdhfr* mutants by error-prone PCR using $Pfdhfr^{S108N}$ gene as a template followed by transfection and selection in *P. berghei*. Two clones of transgenic *P. berghei* expressing *Pf*DHFR with major interest due to the position of such mutations, *PbPf*DHFR3m1(M55I+S108N+S189C) and *PbPf*DHFR3m2(C50Y+S108N+F116S), were selected for drug sensitivity test. The transgenic parasite clones showed similar reproducibility with the parental transgenic *P. berghei* expressing *Pf*DHFR with mutation at S108N (*PbPf*S108N) in response to antifolate pyrimethamine.

This study demonstrated the power of the transgenic *P. berghei* system to predict drug-resistant *Pfdhfr* mutations in an *in vivo* parasite/host setting. The system could be utilized for identification of possible novel drug resistant mutants that could be arise against new antifolate compounds and for prediction the evolution of resistance.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การสร้างห้องสมุดกลายพันธุ์แบบสุ่มของยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทสของเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ การใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการการดื้อยาแอนติโฟเลทโดยใช้เชื้อ *Plasmodium berghei*

ผู้เขียน นางสาววชิราภรณ์ ทิพย์สุวรรณ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ดร. ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การดื้อต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อปรสิตพลาสโมเดียมที่พบในคนส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ภายในจีโนมของเชื้อปรสิต จากปรากฏการณ์นี้จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพื่อทำนายความเป็นไปได้ที่จะเกิดการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้ยาที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ดังนั้นการระบุการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทของเชื้อพลาสโมเดียมที่ทำให้เกิดการดื้อยาแอนติโฟเลทจึงเป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการพัฒนายาต้านมาลาเรีย

การศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาระบบเพื่อที่จะระบุการกลายพันธุ์ของยีนพลาสโมเดียมฟาลซิพารัมไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทสที่ดื้อต่อยาแอนติโฟเลทโดยใช้แบบจำลองของเชื้อพลาสโมเดียมในสัตว์ทดลอง ห้องสมุดกลายพันธุ์ของยีนพลาสโมเดียมฟาลซิพารัมไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทสได้ถูกสร้างขึ้นโดยใช้วิธี Error prone PCR ซึ่งเป็นการทำให้เกิดกลายพันธุ์ของยีนแบบสุ่มจากนั้นจึงถ่าย-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โอน (transfect) ห้องสมุดกลายพันธุ์ของยีนพลาสโมเดียมฟาลซิปารัมไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส ดังกล่าวไปยังพลาสโมเดียมเบอร์กิไอและทำการคัดเลือกด้วยยาที่ไพริเมธามีนในระดับที่สามารถยับยั้งเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอแบบดั้งเดิมได้ โดยเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอที่ถูกถ่ายโอนด้วยยีนพลาสโมเดียมฟาลซิพารัมไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส ที่ดื้อต่อยาไพริเมธามีนจะถูกคัดเลือก ผลการทดลองพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง S108N ซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งแรกที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทสที่ดื้อต่อยาแอนติโฟเลทที่พบในธรรมชาติ จากนั้นได้ทำการสร้างเชื้อปรสิตพลาสโมเดียมเบอร์กิไอแปลงพันธุ์โดยยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทสของเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอเองถูกแทนที่ด้วยยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเของเชื้อพลาสโมเดียมฟาลซิพารัมที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง S108N จากการตรวจสอบพบว่าเชื้อปรสิตแบบดั้งเดิมและเชื้อปรสิตแปลงพันธุ์ที่ดื้อต่อยาไพริเมธามีนมีอัตราการเจริญเติบโตเป็นปกติไม่แตกต่างกัน การศึกษาต่อไปได้สร้างห้องสมุดกลายพันธุ์เพิ่มเติมโดยใช้ ยีนพลาสโมเดียมฟาลซิพารัมไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทสที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ S108N เป็นแม่แบบจากนั้นถ่ายโอนห้องสมุดกลายพันธุ์ดังกล่าวไปยังพลาส-โมเดียมเบอร์กิไอและทำการคัดเลือกด้วยยาที่ไพริเมธามีน ผลการทดลองพบเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอแปลงพันธุ์สองโคลนมีการแสดงออกของเอนไซม์พลาสโมเดียมฟาลซิพารัมไดไฮโดรโฟ-เลทรีดักเทสที่เกิดการกลายพันธุ์ที่บริเวณใกล้เคียงกับ active site และ บริเวณที่จับกับยาแอนติโฟ-เลทคือ *PbPf*DHFR3m1 (S108N+M55I+S189C) และ *PbPf*DHFR3m2 (C50S+S108N+F116S) จากนั้นจึงได้นำเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอแปลงพันธุ์ทั้งสองโคลนมาศึกษาความไวต่อยาไพริเม-ธามีน พบว่าเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอแปลงพันธุ์ดังกล่าวมีระดับความไวในการตอบสนองต่อยาแอนติโฟเลทไพริเมธามีนคล้ายคลึงกับเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส-ไธมิดิเลทซินเทสที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง S108N

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระบบการสร้างเชื้อปรสิตแปลงพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนไฮโดรโฟเลทรีดักเทสของเชื้อพลาสโมเดียมฟาลซิพารัมในแบบจำลองของเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์-กิไอมีประสิทธิภาพที่จะทำนายการกลายพันธุ์ของยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทสของเชื้อพลาสโม-เดียมฟาลซิพารัมที่จะเกิดขึ้นมาใหม่และดื้อต่อยาแอนติโฟเลทได้และสามารถนำระบบนี้ไปใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยา และใช้ในการพัฒนายาต้านมาลาเรียต่อไปได้ในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved