

**EFFECT OF METALLOPROTEASE INHIBITORS
ON INVASION OF RED BLOOD CELL
BY *PLASMODIUM FALCIPARUM***

ANONG KITJAROENTHAM

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2005

ISBN 974-04-5630-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

บทบาทของ metalloprotease inhibitors ต่อการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม
(EFFECT OF METALLOPROTEASE INHIBITORS ON INVASION OF RED BLOOD CELL BY *PLASMODIUM FALCIPARUM*)

อนงค์ กิจเจริญธรรม 4236801 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย, Ph.D.,
พรทิพย์ เพ็ชรมิตร, Ph.D.

บทคัดย่อ

การเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อมาลาเรียเป็นการเริ่มต้นของวงจรชีวิตระยะไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดง ซึ่งทำให้เกิดอาการทางคลินิกพร้อมด้วย ภาวะบวมการที่เชื้อมาลาเรียระยะ merozoite ใช้ในการเข้าสู่เซลล์ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตและการติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดง อย่างไรก็ตามกลไกในระดับโมเลกุลยังไม่สามารถอธิบายให้แน่ชัดได้ ในระหว่างการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง มีการหลั่งออกของผิวชั้นนอกของ merozoite แสดงว่า proteolysis มีความเกี่ยวข้องและสำคัญต่อการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อมาลาเรีย เป็นที่ทราบกันว่า เอนไซม์ protease ของเชื้อมาลาเรียมีส่วนร่วมในกระบวนการนี้ที่ว่าชนิดของว่าเอนไซม์เหล่านี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด

จากการทดสอบ *P. falciparum* ระยะ schizont และ PEMS ด้วย 1,10-phenanthroline ซึ่งเป็น metal chelator และตัวยับยั้งของ metalloprotease พบว่าสามารถยับยั้งการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของ *P. falciparum* ได้ 50% ที่ความเข้มข้น $24.7 \pm 7.2 \mu\text{M}$ และ $28.9 \pm 7.7 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ในการศึกษาเพิ่มเติมถึงขั้นตอนที่ถูกยับยั้งในระหว่างการเข้าสู่เซลล์ ไม่พบว่าการสะสมของเชื้อมาลาเรียระยะ schizont แสดงว่า 1,10-phenanthroline มีผลจำเพาะต่อการเข้าสู่เซลล์ใหม่นั้น แต่ไม่รบกวนการออกจากเม็ดเลือดแดง ส่วน GM6001 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ metalloprotease ในกลุ่ม matrix และ disintegrin ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีประสิทธิภาพน้อยกว่า โดยยับยั้งการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของ *P. falciparum* ได้ 50% ที่ความเข้มข้น $112 \pm 20 \mu\text{M}$ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาไม่สามารถตรวจพบทั้ง metalloprotease activity และ gene homologues แต่เมื่อค้นหาด้วย zinc binding motif ในยีนโนมของ *Plasmodium* พบว่ามีความเป็นไปได้ที่ metalloprotease มีความเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อมาลาเรีย

นอกจากนั้นได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกที่ควบคุมการทำงานของ metalloprotease เมื่อนำ staurosporine ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ protein kinase มาทดสอบร่วมกับ 1,10-phenanthroline หรือ GM6001 ไม่พบการต้านยาร่วมกันของเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ เมื่อนำ 1,10-phenanthroline มาทดสอบร่วมกับ GM6001 ไม่พบการต้านยาร่วมกันของเชื้อมาลาเรีย ผลที่ได้จากการทดลองนี้เป็นข้อบ่งชี้ว่าการทำงานของ metalloprotease และ protein kinase ไม่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกัน ถึงแม้ว่าข้อมูลเหล่านี้ยังไม่เพียงพอที่จะสามารถชี้แนะ signaling pathway ได้ ผลจากการวิจัยในครั้งนี้บ่งชี้ว่า metalloprotease มีส่วนร่วมที่สำคัญในการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อมาลาเรีย

EFFECT OF METALLOPROTEASE INHIBITORS ON INVASION OF RED BLOOD CELL BY *PLASMODIUM FALCIPARUM*

ANONG KITJAROENTHAM 4236801 SCBC/D

Ph.D. (Biochemistry)

THESIS ADVISORS: PRAPON WILAIRAT, Ph.D., TUANGPORN SUTHIPHONGCHAI, Ph.D., PORNTIP PETMITR, Ph.D.

ABSTRACT

The entry of malaria parasites into their host's red blood cells (rbc) initiates the intra-erythrocytic asexual cycle that is responsible for the clinical manifestations of malaria. The process by which a merozoite invades rbc is crucial to the survival of the parasite and ensures maintenance of the blood stage infection. However, the molecular mechanism of rbc invasion by the malaria parasite is still poorly understood. Upon invading the host red cell, the merozoite surface coat is removed implicating that surface proteins proteolysis is essential for invasion to occur. Many malaria proteases have been implicated in the invasion process, but their specific types remain unclear.

To demonstrate the involvement of metalloprotease in the process of *Plasmodium falciparum* merozoite entry into host red blood cells, schizont-infected rbcs and parasitophorous vacuolar membrane-enclosed merozoite structures were treated with 1,10-phenanthroline, a metal chelator, resulting in a reduction of invasion with the IC₅₀ values of 24.7±7.2 and 28.9±7.7 μM, respectively. The absence of an accumulation of schizont stages after treatment with 1,10-phenanthroline indicated that the inhibitory effect was not due to suppression of merozoite release from rbcs, but on the invasion step. GM6001, a well-known inhibitor of the mammalian matrix and disintegrin metalloprotease family, was less effective with an IC₅₀ of 112±20 μM. Although neither metalloprotease activity nor gene homologs could be detected by gelatin zymography and similarity search, zinc-binding motif search in the *Plasmodium* genome database suggested the possibility of the malaria parasite making use of metalloprotease during invasion.

To probe for the mechanism regulating this metalloprotease, the effects of the combination of inhibitors were employed. Staurosporine, inhibitor of protein kinase with broad spectrum activity, had an additive effect with 1,10-phenanthroline and GM6001, suggesting that metalloproteases (MMP-like and/or metal requiring enzymes) and protein kinase(s) were likely to act independently. Although these data are insufficient to establish a signaling pathway involvement during merozoite invasion, nevertheless this study points to the importance of metal-requiring proteases in the process of invasion of host rbc by the malaria parasite.

KEYWORDS: *PLASMODIUM FALCIPARUM* / RED BLOOD CELL INVASION / METALLOPROTEASE / 1,10-PHENANTHROLINE

107 P. ISBN 974-04-5630-8