



**ANTIMALARIAL ACTIVITY OF ANTISENSE
OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AGAINST *PLASMODIUM*
FALCIPARUM TOPOISOMERASE II GENE**

WIRAT NIMITSUNTIWONG

อธิษัฒนาการ

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE**

(BIOCHEMISTRY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2001

ISBN 974-665-340-7

TH

W 798 Q

2001

C.2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

3836510 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY; M.Sc.(BIOCHEMISTRY)

KEY WORDS : PHOSPHOROTHIOATE, ANTISENSE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES, *PLASMODIUM FALCIPARUM*,
ANTIMALARIAL ACTIVITY.

WIRAT MIMITSUNTIWONG : ANTIMALARIAL CTIVITY OF PHOSPHOROTHIOATE ANTISENSE OLIGODEOXYNUCLEOIDES AGAINST THE *PLASMODIUM FALCIPARUM* TOPOISOMERASE II GENE. THESIS

ADVISORS : WILAI NOOKPAKDEE, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D. 127 P.

ISBN 974-665-340-7

Four phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides (PS AS ODNs) were designed to target against specific sites of the *Plasmodium falciparum* topoisomerase II gene at different regions. PS AS ODN TOP 1 has been designed to direct against 5' cap site from bp 1 to bp 25, PS AS ODN TOP 2 against the sequence surrounding the start codon from bp 836 to bp 862, and PS AS ODN TOP 3 and 4 against the sequence downstream of the start codon, from bp 991 to bp 1020 and bp 1051 to bp 1074, respectively. Antimalarial activities of the 4 PS AS ODNs were tested against the *P. falciparum* K1 strain three in cultures compared with a PS AS ODN control, TOP 0, which targeted the same region of PS AS ODN TOP 1 but contained eight mismatches. After adding [³H] hypoxanthine incorporation assay, the cultures with a high concentration (1×10^{-5} M) of all PS AS ODNs showed antimalarial activity including the antisense control. The cultures with a low concentration, 1×10^{-8} M- 1×10^{-7} M, showed no antimalarial activities. Microscopic examination assay showed that at the high concentration, all antisense oligodeoxynucleotides showed antimalarial activities, but in a non sequence specific manner. However, at low concentrations, 1×10^{-8} M- 1×10^{-6} M, TOP 2 and 3 showed antimalarial activities when compared with the control TOP 0. The antimalarial activities of PS AS ODNs were confirmed by flow cytometry, using propidium iodide staining to determine the numbers of parasites, and were in good agreement with the microscopic examination method. Thus, at low concentrations, TOP 2 and 3 inhibit malaria parasite growth in a sequence specific manner. When the antimalarial activities of the 4 PS AS ODNs were compared with chloroquine, PS AS ODNs were less effective (IC_{50} TOP 1 = 2×10^{-6} M, IC_{50} TOP 2 = 1.4×10^{-6} M, IC_{50} TOP 3 = 6×10^{-6} M, IC_{50} TOP 4 = 1.1×10^{-6} M and IC_{50} chloroquine = 2×10^{-7} M). The results of this study suggest the need to design more antisense oligodeoxynucleotides drug for screening antimalarial activity in order to find a drug which has maximal antimalarial activity.

3836510 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี : วท.ม.(ชีวเคมี)

วิราช นิमितสันติวงศ์ : ฤทธิ์การต้านมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ของแอนติเซนต่อยีนส์ topoisomerase II (ANTIMALARIAL ACTIVITY OF PHOSPHOROTHIOATE ANTISENSE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AGAINST *PLASMODIUM FALCIPARUM* TOPOISOMERASE II GENE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิไล หนุณหุกถิติ, Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D. 127 หน้า ISBN974-665-340-7

แอนติเซนโอลิโกไดออกซีนิวคลีโอไทด์ที่ได้ออกแบบไว้จำนวน 4 ชนิดที่สามารถจับกับยีนส์ topoisomerase II ของมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ในตำแหน่งต่างๆ คือ แอนติเซน TOP 1 ได้ถูกออกแบบให้จับกับยีนส์บริเวณ 5' cap site (1-25) แอนติเซน TOP 2 ได้ถูกออกแบบให้จับกับลำดับเบสบริเวณ start codon (836-862) ของยีนส์ แอนติเซน TOP 3 และ 4 สามารถจับกับลำดับเบสของยีนส์ของ topoisomerase II ของมาลาเรียบริเวณที่ถัดไปจาก start codon (991-1020 และ 1051-1074 ตามลำดับ) แอนติเซนทั้งสี่ชนิดได้ถูกทดสอบหาฤทธิ์การต้านมาลาเรียเปรียบเทียบกับแอนติเซนควบคุม TOP 0 ซึ่งมีลำดับเบสเหมือนกับแอนติเซน TOP 1 แต่มีลำดับเบสที่เป็น mismatch 8 ตำแหน่ง จากการทดสอบหาฤทธิ์การต้านมาลาเรียด้วยการใช้สารกัมมันตภาพรังสี ($[^3\text{H}]$ hypoxanthine incorporation assay) พบว่า ที่ความเข้มข้นสูง (1×10^{-5} M) แอนติเซนทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์การต้านมาลาเรีย รวมทั้งแอนติเซนควบคุม ที่ความเข้มข้นต่ำ (1×10^{-8} M- 1×10^{-7} M) ไม่พบฤทธิ์การต้านมาลาเรีย การทดสอบฤทธิ์การต้านมาลาเรียด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงแอนติเซนทุกตัวมีฤทธิ์การต้านมาลาเรีย แต่เป็นการต้านมาลาเรียแบบไม่จำเพาะเจาะจง ลำดับเบสของแอนติเซน อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นต่ำ (1×10^{-8} M- 1×10^{-6} M) แอนติเซน TOP 2 และ 3 มีฤทธิ์การต้านมาลาเรียเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติเซนควบคุม TOP 0 เมื่อยืนยันฤทธิ์การต้านมาลาเรียของแอนติเซนด้วยการใช้ flow cytometer ด้วยการย้อมสี propidium iodide เพื่อนับจำนวนเชื้อมาลาเรีย พบว่า ฤทธิ์การต้านมาลาเรียมีผลสอดคล้องกับวิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นที่ความเข้มข้นต่ำ แอนติเซน TOP 2 และ 3 มีฤทธิ์การต้านมาลาเรียในลักษณะที่มีความจำเพาะต่อลำดับเบสของแอนติเซน เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์การต้านมาลาเรียของแอนติเซนทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกับคลอโรควิน จากการทดลองพบว่า แอนติเซนมีฤทธิ์การต้านมาลาเรียน้อยกว่า (IC_{50} ของ TOP 1 = 2×10^{-6} M, IC_{50} ของ TOP 2 = 1.4×10^{-6} M, IC_{50} ของ TOP 3 = 6×10^{-6} M, IC_{50} ของ TOP 4 = 1.1×10^{-6} M และ IC_{50} ของคลอโรควิน = 2×10^{-7} M)