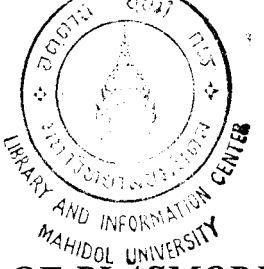
27 JUN 2003



MUTATIONAL STUDIES OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE: IDENTIFICATION OF POTENTIAL AMINO ACIDS ASSOCIATED WITH WR99210 BINDING

PORNPUN THEINSATHID

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003

ISBN 974-04-3048-1
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P836m
2003
c.2

Copyright by Mahidol University

MUTATIONAL STUDIES OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE: IDENTIFICATION OF POTENTIAL AMINO ACIDS ASSOCIATED WITH WR99210 BINDING

PORNPUN THEINSATHID 4136795 SCBC/M

M.Sc.(BIOCHEMISTRY) MAJOR BIOCHEMISTRY

THESIS ADVISOR: WORACHART SIRAWARAPORN, Ph.D.(BIOCHEMISTRY), PRAPON WILAIRAT,Ph.D.(BIOCHEMISTRY)

ABSTRACT

Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (pfDHFR) is a validated target of antifolate antimalarial drugs such as pyrimethamine and cycloguanil, two of the few drugs once used effectively in the treatment of malaria. Resistance to these drugs has been shown to be due to mutations which reduce the binding affinity of the drugs to the enzyme. The fact that the WR99210 has been shown to be effective against both wild-type and mutants that are cross resistant to other antifolates has made WR99210 a potentially attractive inhibitor.

The goal of this study was to investigate whether resistance to WR99210 (BRL 6231[4,6-diamino-α,2-dihydro-2,2-dimethyl-l-(2,4,5-trichlorophenoxypropyloxy)-1,3,5triazine]) could be induced and, if so, which amino acids in the DHFR were responsible for the resistance. Our strategy therefore included identification of amino acid residues which are at close proximity to the 2',4',5'- trichlorophenoxy propyloxy group of WR99210. We succeeded in developing a bacterial complementation assay based on the ability of *pf-dhfr* gene to complement *E. coli* in which the endogenous bacterial DHFR activity was inhibited by trimethoprim (Tmp). Thus the ability of the cell to survive on minimal agar plate was dependent solely upon the activity of pfDHFR expression. On selective media containing Tmp and WR99210 the growth of the wild-type pfDHFR and other drug-sensitive mutants were inhibited. Only the cells expressing mutant DHFRs with the ablility to overcome the inhibitory effect of the tested inhibitors could survive. Randomly mutated libraries of *pfdhfr* were constructed using degenerate oligonucleotide *pfu* mutagenesis (DOP) to randomly mutate residues 50-55, 110-115, 189-191 and 213-215. Using the synthetic gene encoding the wild-type *pfdhfr* as template, mutants resistant to WR99210 were selected by bacterial complementation system.

Both natural and non natural mutants were identified (C50R and Y191N). Cell-based assay and kinetic studies showed that these mutants exhibited ~3-4 fold more resistance to WR99210 than the wild-type enzyme. This powerful selection system should be useful in obtaining other mutants for inhibition screening. Biochemical and structural analyses of these mutants would lead to a better understanding of enzyme-inhibitor interactions which in turn would provide insight into the design and development of novel effective anti-malarials.

KEY WORDS : DIHYDROFOLATE REDUCTASE / *PLASMODIUM FALCIPARUM* / ANTIFOLATE RESISTANT MUTANTS

87 P. ISBN 974-04-3048-1

Copyright by Mahidol University

การศึกษากรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทสของเชื้อมาลาเรียฟัลซิปารั่ม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจับกับยา WR99210 (MUTATIONAL STUDIES OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* DIHYDROFOLATE REDUCTASE: IDENTIFICATION OF POTENTIAL AMINO ACIDS ASSOCIATED WITH WR99210 BINDING)

พรพรรณ เธียรสถิตย์ 4136795 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วรชาติ สิรวราภรณ์, ปร.ด., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.,

บทคัดย่อ

เอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดัคเตส ของเชื้อมาลาเรียฟัลซิปารัม เป็นเป้าสำคัญของยาต้านมาลาเรียชนิดแอนติโฟเลต ซึ่งได้แก่ไพริเมธามีน (Pyrimethamine) และไซโครกัวนิล (Cycloguanil) การกลายพันธุ์ที่เปลี่ยนกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์ DHFR ทำให้เอ็นไซม์จับกับสารยับยั้งได้แน่นน้อยลงและส่งผลให้เชื้อมาลาเรียดื้อยา ในการวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาหากรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา WR99210 ซึ่งเป็นสารยับยั้งที่ยังไม่มีรายงานผลเกี่ยวกับการดื้อยาต่อโรคมาลาเรีย ทางคณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการศึกษาการดื้อยาโดยการดูความสามารถของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีความบกพร่องของยีน *dhfr* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal media แบบวุ้นที่มียา ไตรเมโทรปริม (Trimetroprim) ซึ่งยับยั้งเอ็นไซม์ DHFR ของเชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีผลต่อเอ็นไซม์ DHFR ของเชื้อมาลาเรีย วิธีการดังกล่าวสามารถใช้ในการตรวจกรอง (screening) หาโคลนที่สามารถแสดงออกเอ็นไซม์ DHFR ของเชื้อมาลาเรียทั้งสายพันธุ์ที่ไวต่อยาและสายพันธุ์ที่ดื้อยา คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากรดอะมิโนซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการดื้อ WR99210 โดนการสร้างห้องสมุดยีนของเอ็นไซม์ DHFR ของมาลาเรีย ที่มีการกลายพันธุ์แบบสุ่มของกรดอะมิโนช่วงต่างที่อยู่ระหว่างตำแหน่ง 50-55 , 110-115, 189-191 และ 213-215 โดยใช้วิธี Degenerated oligonucleotide *pfu* mutagenesis (DOP) หลังจากนั้นจึงทำการคัดเลือกเอ็นไซม์กลายพันธุ์ที่ดื้อต่อ WR99210 โดยใช้ระบบและวิธีการตรวจกรองที่ได้พัฒนาขึ้น

ผลการทดลองพบโคลนที่เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี WR99210 โคลนที่ได้มีสองชนิดคือ C50R และ Y191N หลังจากที่ได้ทำการแสดงออกยีนกลายพันธุ์ทั้งสอง แยกบริสุทธิ์เอ็นไซม์แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์และทดสอบความดื้อต่อไพริเมธามีน ไซโคลกัวนิล และ WR99210 พบว่าเอ็นไซม์กลายพันธุ์ทั้งสองจับกับ WR99210 ได้น้อยกว่าเอ็นไซม์ DHFR ของเชื้อมาลาเรียที่ไวต่อยาประมาณ 3-4 เท่า ประโยชน์ของระบบดังกล่าวยังสามารถประยุกต์ใช้ในงาน ตรวจกรอง ในการคัดเลือกเอ็นไซม์ที่ดื้อต่อยา ความรู้ที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์กลายพันธุ์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการออกแบบสารยับยั้งที่ประสิทธิภาพได้ในอนาคต

87 หน้า ISBN 974-04-3048-1

Copyright by Mahidol University