Thesis Title Generation of *Plasmodium berghei* Expressing *Plasmodium vivax* Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Enzyme for Antifolate Screening

Author Mr. Voravuth Somsak

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Plasmodium vivax is the most prevalent cause of human malaria in tropical regions outside the African continent. The lack of a routine continuous *in vitro* culture of this parasite makes it difficult to develop specific drugs for this disease. To facilitate the development of anti-*P. vivax* drugs, effective and *P. vivax*-specific screening models are needed. In this study, as an *in vivo* screening model, the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* was genetically modified to stably express either wild type or mutant *P. vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase

(DHFR-TS) enzymes replacing the host's own DHFR-TS enzyme. *P. berghei* parasite was transfected with DNA constructs bearing pyrimethamine sensitive (wild-type) and pyrimethamine resistant (mutant) alleles of *pvdhfr-ts*. Double crossover homologous recombination was used to replace the endogenous *pvdhfr-ts* with *P. vivax* homologous genes. In addition, small-scale in vitro culture and purification of P. berghei was also developed to obtain mature schizonts for a single transfection. The integration of *pvdhfr-ts* genes via allelic replacement was verified by PCR and Southern analysis. The transgenic parasite clones were validated as models by standard drug screening assays. Drug susceptibility assay showed that the transgenic *P. berghei* line stably expressing the wild type *Pv*DHFR-TS enzyme was as susceptible to antifolate drug, pyrimethamine, as the *P. berghei* parent line, whereas the transgenic *P. berghei* line stably expressing the double mutant *Pv*DHFR-TS (SP21; S58R/S117N) enzyme was resistant to pyrimethamine. The growth and sensitivity to other types of anti-malarial drugs in these transgenic parasites were otherwise indistinguishable from the parental parasites. With the permanent integration of *pvdhfr-ts* gene in the genome, these transgenic parasites expressing *Pv*DHFR-TS are genetically stable and will be useful for screening anti-*P. vivax* compounds targeting *Pv*DHFR-TS. It also demonstrates that the transfection system has the potential to provide a screening system for drug development and for studying drug resistance mechanisms in *P. vivax*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การสร้าง *Plasmodium berghei* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดัคเตส-ไธมิดิเลตซินเธสของเชื้อ *Plasmodium vivax* สำหรับการคัดกรองยาแอนติโฟเลต
ผู้เขียน	นายวรวุฒิ สมศักดิ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ดร. ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

เชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมาลาเรียในมนุษย์ที่แพร่หลายในภูมิภาคเขตร้อนที่อยู่นอกทวีปแอฟริกา และจากการไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสโมเดียมชนิดนี้ในห้องปฏิบัติการได้ จึงเป็นอุปสรรคต่อการพัฒนายาที่จำเพาะเจาะจงต่อโรคนี้ ดังนั้นโมเดลสำหรับเชื้อชนิดนี้ต่อการตรวจคัดกรองและพัฒนายาต้านต่อเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์จึงมีความจำเป็นอย่างมาก การศึกษาครั้งนี้ได้นำเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอที่เป็นเชื้อมาลาเรียในหนูมาเป็นโมเดลของสิ่งมีชีวิตสำหรับการตรวจคัดกรองยา โดยมีการดัดแปลงทางพันธุกรรมให้มีการแสดงออกแทนที่เอนไซม์ของเชื้อเจ้าบ้านด้วยเอนไซม์ไดไฮโดรโฟลเลตรีดักเตส-ไธมิดิเลตซินเตสชนิดปกติหรือชนิดกลายพันธุ์ของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ การดัดแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อพลาสโม

เดียมเบอร์กิไอจะอาศัยดีเอ็นเอพาหะที่มียีนของเอนไซม์ชนิดนี้โดยผ่านกระบวนการ double crossover homologous recombination ยีนไดไฮโดรโฟลเลตรีดักเตส-ไธมิดิเลตซินเตสของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ที่เกิดการรวมเข้าไปในจีโนมจะถูกตรวจสอบด้วยวิธี PCR และ Southern blot จากนั้นโคลนของเชื้อพลาสโมเดียมที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมแล้วนั้นจะถูกทำการพัฒนาการเป็นโมเดลด้วยวิธีมาตรฐานของการตรวจคัดกรองยา จากผลการทดสอบความไวต่อยาต้านมาลาเรียแสดงให้เห็นว่า เชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟลเลตรีดักเตส-ไธมิดิเลตซินเตสชนิดปกติของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ จะมีความไวต่อยาไพริเมธามีน ในขณะที่เชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์สองตำแหน่ง (SP21; S58R/S117N) จะมีการดื้อต่อยาไพริเมธามีน แต่การทดสอบด้วยยาต้านมาลาเรียกลุ่มอื่นนั้นพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียมที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรม ไม่มีความแตกต่างกันกับเชื้อพลาสโมเดียมตั้งต้น การศึกษาครั้งนี้ เชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กิไอที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟลเลตรีดักเตส-ไธมิดิเลตซินเตสชนิดปกติและชนิดกลายพันธุ์ของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ จะมีประโยชน์ต่อการตรวจคัดกรองยาหรือสารประกอบที่จำเพาะต่อเอนไซม์เป้าหมายนี้ นอกจากนั้นการศึกษาครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่า กระบวนการถ่ายทอดและดัดแปลงทางพันธุกรรม เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพต่อการตรวจคัดกรองเพื่อพัฒนายาต้านมาลาเรีย และการศึกษาถึงกลไกการดื้อต่อยาของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved