

ผลงานวิจัยดีเด่นของ มหาวิทยาลัยมหิดล

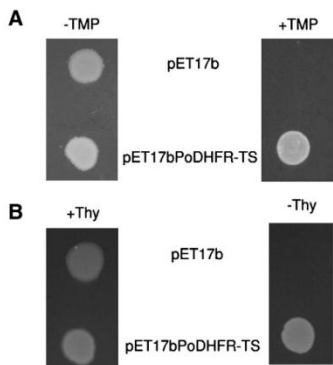


มหาวิทยาลัยมหิดล
กรุงเทพฯ ๑๕๑

งานสารสนเทศงานวิจัย กองบริหารงานวิจัย
สำนักงานอธิการบดีมหาวิทยาลัยมหิดล
โทร. 02-849-6241-6 โทรสาร 02-849-6247
E-mail : dircopra@mahidol.ac.th

Cloning and heterologous expression of *Plasmodium ovale* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene

เอนไซม์ dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) ในเชื้อพาราสิตชนิดพลาสโมเดียมเป็นเอนไซม์เป้าหมายของยารักษาโรคมาลาเรีย ในงานวิจัยนี้ยีน dhfr-ts ของเชื้อ *Plasmodium ovale* สามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า DHFR ถูกตัดออกไปมีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการทำงานของเอนไซม์ dihydrofolate reductase และ thymidylate synthase เอนไซม์ PoDHFR-TS ถูกทำให้แสดงออกในเชื้อ *Escherichia coli* BL21 (DE3) และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วย affinity purification โดย methotrexate-sepharose column ผลการศึกษาทางชีวเคมีและคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ PoDHFR-TS มีความคล้ายกับเอนไซม์ DHFR จากเชื้อพลาสโมเดียมอื่นๆ โดยมี catalytic activity ต่ำกว่าแต่ทำงานที่ค่าพีเอชต่ำได้ดีกว่า สิ่งที่สำคัญในการศึกษานี้พบว่า เอนไซม์ PoDHFR จากเชื้อ Thai isolate EU266602 ยังคงมีการตอบสนองที่ดี ต่อยาฆ่าเชื้อมาลาเรียในกลุ่ม antifolate เช่น pyrimethamine cycloguanil ซึ่งต่างไปจากเอนไซม์จากเชื้อ *P. falciparum* and *P. vivax* ที่มักจะพบการดื้อของเชื้อต่อยาในกลุ่มนี้



Kinetic parameters of purified PoDHFR-TS in comparison with PfDHFR-TS and PvDHFR-TS.

Plasmodium enzyme	DHFR activity			DHFR inhibition	
	K_m [H ₂ folate] (μ M)	K_m [NADPH] (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	K_i [PYR] (nM)	K_i [CYC] (nM)
PoDHFR-TS	2.42±0.25	3.71±0.51	8.5±0.6	0.67±0.08	0.96±0.15
PfDHFR-TS	1.0±0.1 ^a	4.2±0.2 ^a	80 ^a	0.2±0.02 ^c	0.3±0.00 ^c
PvDHFR-TS	1.6±0.1	1.1±0.2	21.2	0.21±0.03 ^c	0.31±0.04

Bacterial complementation assays to demonstrate DHFR and TS functions of PoDHFR-TS coded sequence.

Srisuda Tirakarn, Pinpunya Riengrunroj, Palangpon Kongsaree, Mallika Imwong, Yongyuth Yuthavong, Ubolsree Leartsakulpanich. Cloning and heterologous expression of *Plasmodium ovale* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Parasitology International* 61 (2012) 324–332.

ติดต่อขอรายละเอียดเพิ่มเติม

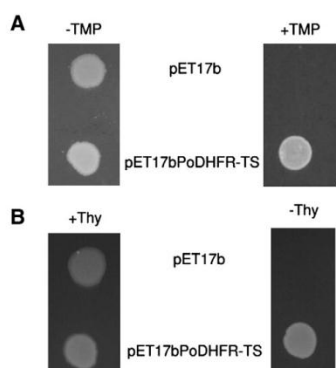


หัวหน้าโครงการ : รศ.ดร.พลังพล คงเสรี
ที่อยู่ : ภาควิชาเคมีและหน่วยวิจัยโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
โทร : 0-22015190
E-mail : palangpon.kon@mahidol.ac.th

Research Management and Development
Office of the President
Tel : 02-849-6241-6 Fax : 02-849-6247
E-mail : dircopra@mahidol.ac.th

Cloning and heterologous expression of *Plasmodium ovale* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene

Plasmodial bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) is a validated antimalarial drug target. In this study, expression of the putative dhfr-ts of *Plasmodium ovale* rescued the DHFR chemical knockout and a TS null bacterial strain, demonstrating its DHFR and TS catalytic functions. PoDHFR-TS was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and affinity purified by Methotrexate-Sepharose column. Biochemical and enzyme kinetics characterizations indicated that PoDHFR-TS is similar to other plasmodial enzymes, albeit with lower catalytic activity but better tolerance of acidic pH. Importantly, the PoDHFR from Thai isolate EU266602 remains sensitive to the antimalarials pyrimethamine and cycloguanil, in contrast to *P. falciparum* and *P. vivax* isolates where resistance to these drugs is widespread.



Kinetic parameters of purified PoDHFR-TS in comparison with PfDHFR-TS and PvDHFR-TS.

Plasmodium enzyme	DHFR activity			DHFR inhibition	
	K_m [H ₂ folate] (μ M)	K_m [NADPH] (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	K_i [PYR] (nM)	K_i [CYC] (nM)
PoDHFR-TS	2.42±0.25	3.71±0.51	8.5±0.6	0.67±0.08	0.96±0.15
PfDHFR-TS	1.0±0.1 ^a	4.2±0.2 ^a	80 ^a	0.2±0.02 ^c	0.3±0.00 ^c
PvDHFR-TS	1.6±0.1	1.1±0.2	21.2	0.21±0.03 ^c	0.31±0.04

Bacterial complementation assays to demonstrate DHFR and TS functions of PoDHFR-TS coded sequence.

Srisuda Tirakarn, Pinpunya Riengrunroj, Palangpon Kongsaree, Mallika Imwong, Yongyuth Yuthavong, Ubolsree Leartsakulpanich. Cloning and heterologous expression of *Plasmodium ovale* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Parasitology International* 61 (2012) 324–332.



Name (PI)
Address

Tel
E-mail

For More Information

: Assoc. Prof. Palangpon Kongsaree
: Department of Chemistry and Center for Protein Structure and Function
Faculty of Science, Mahidol University
: 0-2201-5190
: palangpon.kon@mahidol.ac.th