

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46256

CONSTRUCTION OF RANDOM MUTANT LIBRARY OF *Plasmodium*
falciparum DIHYDROFOLATE REDUCTASE AND ITS USE FOR
STUDY OF EVOLUTION OF ANTIFOLATE RESISTANCE
IN *Plasmodium berghet* MODEL

WACHIRAPORN TIPSUWAN

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOCHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
JANUARY 2012

600259000

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



**CONSTRUCTION OF RANDOM MUTANT LIBRARY OF *Plasmodium*
falciparum DIHYDROFOLATE REDUCTASE AND ITS USE FOR
STUDY OF EVOLUTION OF ANTIFOLATE RESISTANCE
IN *Plasmodium berghei* MODEL**



WACHIRAPORN TIPSUWAN

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOCHEMISTRY**

**THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
JANUARY 2012**

CONSTRUCTION OF RANDOM MUTANT LIBRARY OF *Plasmodium falciparum* DIHYDROFOLATE REDUCTASE AND ITS USE FOR STUDY OF EVOLUTION OF ANTIFOLATE RESISTANCE IN *Plasmodium berghei* MODEL

WACHIRAPORN TIPSUWAN

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOCHEMISTRY

EXAMINING COMMITTEE

 CHAIRPERSON

Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool

 MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Chakrit Hirunpetcharat

 MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Ratana Banjerdpongchai

 MEMBER

Dr. Chairat Uthaiyibull

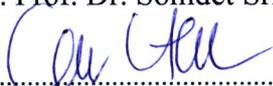
 MEMBER

Dr. Sumalee Kamchonwongpaisan

THESIS ADVISORY COMMITTEE

 ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool

 CO-ADVISOR

Dr. Chairat Uthaiyibull

 CO-ADVISOR

Dr. Sumalee Kamchonwongpaisan

10 January 2012

ACKNOWLEDGEMENT

Firstly, I wish to express my sincere gratitude and deepest appreciation to my major advisor, Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool for his valuable advices, excellent guidance and support throughout the course of my study.

I would like to thank to my co-advisors Dr. Chairat Uthaipibull, Dr. Sumalee Kamchonwongpaisan and Professor Yongyuth Yuthavong who always gave kind expert guidance, continuous encouragement and allowed me a chance to learn an advanced technology *in P. berghei* transfection at Protein-Ligand Engineering and Molecular Biology Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).

My special thanks are extended to all members of Protein-Ligand Engineering and Molecular Biology Laboratory at BIOTEC, for providing research techniques, friendship and entertainment during my thesis research time at BIOTEC. I also gratefully thank all staffs of Biochemistry Department for supporting during my study.

I am indebted to Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for financial support and thank Medical Faculty Endowment Fund for partial support.

Finally, thanks must go to all member of my family for love and inspiration throughout my life.

Wachiraporn Tipsuwan

Thesis Title Construction of Random Mutant Library of *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase and Its Use for Study of Evolution of Antifolate Resistance in *Plasmodium berghei* Model

Author Miss Wachiraporn Tipsuwan

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

E46256

The prevalence of drug resistance amongst the human malaria *Plasmodium* species has most commonly been associated with genomic mutation within the parasites. This phenomenon necessitates evolutionary predictive studies of possible resistance mutations, which may occur when a new drug is introduced. Therefore, identification of possible new *P. falciparum* dihydrofolate reductase (*Pf*DHFR) mutants that confer resistance to antifolate drugs is essential in the process of anti-malarial drug development.

A system to identify mutation in *Pfdhfr* gene that confers antifolate drug resistance using an animal *Plasmodium* parasite model was developed. By using error-prone PCR and *Plasmodium* transfection technologies, libraries of *Pfdhfr* mutant were generated and then episomally transfected to *P. berghei* parasites, from which pyrimethamine-resistant *PfDHFR* mutant were selected. The principal mutation found from this experiment was S108N, coincident with the first pyrimethamine-resistance mutation isolated from the field. A transgenic *P. berghei*, in which endogenous *Pbdhfr* allele was replaced with the mutant *Pfdhfr*^{S108N}, was generated and confirmed to have normal growth rate comparing to parental non-transgenic parasite and also confer resistance to pyrimethamine. Furthermore, we generated libraries of *Pfdhfr* mutants by error-prone PCR using *Pfdhfr*^{S108N} gene as a template followed by transfection and selection in *P. berghei*. Two clones of transgenic *P. berghei* expressing *PfDHFR* with major interest due to the position of such mutations, *PbPfDHFR3m1*(M55I+S108N+S189C) and *PbPfDHFR3m2*(C50Y+S108N+F116S), were selected for drug sensitivity test. The transgenic parasite clones showed similar reproducibility with the parental transgenic *P. berghei* expressing *PfDHFR* with mutation at S108N (*PbPfS108N*) in response to antifolate pyrimethamine.

This study demonstrated the power of the transgenic *P. berghei* system to predict drug-resistant *Pfdhfr* mutations in an *in vivo* parasite/host setting. The system could be utilized for identification of possible novel drug resistant mutants that could be arise against new antifolate compounds and for prediction the evolution of resistance.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การสร้างห้องสมุดกลายพันธุ์แบบสุ่มของยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตสของเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ การใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการการดื้อยาแอนติโฟเลทโดยใช้เชื้อ *Plasmodium berghei*

ผู้เขียน

นางสาวชราภรณ์ ทิพย์สุวรรณ

ปริญญา

วิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ดร. ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร. สุมาลี กำจรวรศรีไพศาล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

๕46256

การดื้อต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อปรสิตพลาสโมเดียมที่พบในคนส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ภายในจีโนมของเชื้อปรสิต จากปรากฏการณ์นี้จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพื่อทำนายความเป็นไปได้ที่จะเกิดการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้ยาที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ดังนั้นการระบุการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทของเชื้อพลาสโมเดียมที่ทำให้เกิดการดื้อยาแอนติโฟเลทจึงเป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการพัฒนายาต้านมาลาเรีย

การศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาระบบเพื่อที่จะระบุการกลายพันธุ์ของยีนพลาสโมเดียมฟาลซิพาร์มไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตสที่ดื้อต่อยาแอนติโฟเลทโดยใช้แบบจำลองของเชื้อพลาสโมเดียมในสัตว์ทดลอง ห้องสมุดกลายพันธุ์ของยีนพลาสโมเดียมฟาลซิพาร์มไดไฮโดรโฟเลทรีดักเตสได้ถูกสร้างขึ้นโดยใช้วิธี Error prone PCR ซึ่งเป็นการทำให้เกิดกลายพันธุ์ของยีนแบบสุ่มจากนั้นจึงถ่าย-

ไอออน (transfect) ห้องสมุดกลายพันธุ์ของยีนพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทส ดังกล่าวไปยังพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสและทำการคัดเลือกด้วยยาที่ไพริเมธาอิมินในระดับที่สามารถยับยั้งเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสได้ โดยเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่ดื้อต่อยาไพริเมธาอิมินจะถูกคัดเลือก ผลการทดลองพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง S108N ซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งแรกที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีนไคโรโฟเลทรีดักเทสที่ดื้อต่อยาแอนติโฟเลทที่พบในธรรมชาติ จากนั้นได้ทำการสร้างเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสของเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสเองแทนที่ด้วยยีนไคโรโฟเลทรีดักเทสของเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง S108N จากการตรวจสอบพบว่าเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสแบบดั้งเดิมและเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่ดื้อต่อยาไพริเมธาอิมินมีอัตราการเจริญเติบโตเป็นปกติไม่แตกต่างกัน การศึกษาต่อไปได้สร้างห้องสมุดกลายพันธุ์เพิ่มเติมโดยใช้ยีนพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ S108N เป็นแม่แบบจากนั้นถ่ายไอออนห้องสมุดกลายพันธุ์ดังกล่าวไปยังพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสและทำการคัดเลือกด้วยยาที่ไพริเมธาอิมิน ผลการทดลองพบเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่ดื้อต่อยาไพริเมธาอิมินมีการแสดงออกของเอนไซม์พลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่เกิดการกลายพันธุ์ที่บริเวณใกล้เคียงกับ active site และ บริเวณที่จับกับยาแอนติโฟเลทคือ *PbPjDHFR3m1* (S108N+M55I+S189C) และ *PbPjDHFR3m2* (C50S+S108N+F116S) จากนั้นจึงได้นำเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่ดื้อต่อยาไพริเมธาอิมิน พบว่าเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่ดื้อต่อยาไพริเมธาอิมินพบว่าเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่ดื้อต่อยาไพริเมธาอิมินคล้ายคลึงกับเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ไคโรโฟเลทรีดักเทส-โธมิโดเลทซินเทสที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง S108N

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระบบการสร้างเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่มีการกลายพันธุ์ของยีนไคโรโฟเลทรีดักเทสของเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสในแบบจำลองของเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสของเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสของเชื้อพลาสมิโดมัลติโคลอนิซิงไคโรโฟเลทรีดักเทสที่เกิดขึ้นมาใหม่และดื้อต่อยาแอนติโฟเลทได้และสามารถนำระบบนี้ไปใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยา และใช้ในการพัฒนายาต้านมาลาเรียต่อไปได้ในอนาคต

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENT	iii
ABSTRACT	iv
LIST OF TABLES	xvi
LIST OF FIGURES	xviii
ABBREVIATION	xxii
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
1.1 Malaria disease	1
1.2 Malaria life cycle	2
1.3 Antimalarial drug target	6
1.4 Dihydrofolate reductase of <i>Plasmodium falciparum</i> (PfDHFR)	7
1.5 Antifolate drugs	10
1.5.1 Antifolate therapy in <i>P. falciparum</i>	10
1.5.1.1 DHFR inhibitors	11
1.5.1.2 DHPS inhibitors	14
1.6 Antifolate drug resistance in malaria	14
1.6.1 Approaches for studying the mechanism of antifolate resistance	15
1.7 Random library gene creation	17
1.8 Selection of <i>Pfdhfr</i> resistance mutant in non- <i>Plasmodium</i> system	18
1.8.1 Yeast complementation system for expression of <i>Pfdhfr</i> mutants	18
1.8.2 Bacterial complementation system for expression of <i>Pfdhfr</i> mutants	19

1.9	<i>Plasmodium</i> transfection system	19
1.9.1	Transient transfection	20
1.9.2	Stable transfection	21
1.9.3	Selectable markers	22
1.9.4	Parameters for gene targeting in <i>Plasmodium</i> species	23
1.9.4.1	Targeting plasmids	23
1.9.4.2	Linear DNA and circular DNA	25
1.9.4.3	Integration	25
1.10	<i>Plasmodium berghei</i> parasite	26
1.11	<i>Plasmodium berghei</i> transfection	27
1.12	Goal of this study	29
1.13	Workplan	30
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS		34
2.1	Chemicals and Reagents	34
2.2	Materials	34
2.2.1	Plasmid vectors	34
2.2.2	Bacterial strains	34
2.2.3	Templates for gene amplification by PCR method	35
2.2.3.1	3'UTR of <i>Plasmodium berghei</i> dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	35

2.2.3.2	Wild-type <i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	35
2.2.3.3	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase mutant genes	35
2.2.4	Oligonucleotide primers	36
2.2.5	DNA purification kits	38
2.3	Methods	40
2.3.1	Construction of <i>P. berghei</i> transfection plasmid	40
2.3.1.1	Plasmid isolation and purification	40
2.3.1.2	Plasmid analysis by agarose gel-electrophoresis	40
2.3.1.3	Amplification of 3'UTR of <i>Pbdhfr-ts</i> 1.0 kb and ligation into pL0017 plasmid	41
2.3.1.4	Transformation of <i>E. coli</i> by high-voltage electroporation	45
2.3.1.4.1	Preparation of competent <i>E. coli</i> cells for electroporation	45
2.3.1.4.2	Transformation using electrocompetent cell	46
2.3.1.5	Screening of bacterial colonies by PCR method	47
2.3.1.6	Amplification of wild-type <i>Pfdhfr-ts</i> and ligation into pY001 plasmid	47
2.3.1.7	Transformation using calcium chloride treatment/heat shock method	49
2.3.1.7.1	Preparation of competent <i>E. coli</i> cells using calcium chloride treatment	49

2.3.1.7.2 Transformation of CaCl ₂ competent cells	50
2.3.1.8 Amplification of mutant <i>Pfdhfr-ts</i> and ligation into pY003 plasmid	50
2.3.1.9 Amplification of wild-type <i>Pfdhfr-ts</i> containing <i>Bam</i> HI cloning site and ligation into pY001 plasmid	52
2.3.1.10 Construction <i>Pfdhfr</i> mutant library by using wild-type or mutant <i>Pfdhfr</i> as template	54
2.3.2 Experimental animals	56
2.3.3 Parasite manipulation	56
2.3.3.1 Parasite strain	56
2.3.3.2 Infection of experimental animal with blood stage parasites	57
2.3.3.3 Giemsa stained blood film	57
2.3.3.4 Cryopreservation of blood stage parasites	57
2.3.4 <i>Plasmodium berghei</i> transfection	57
2.3.4.1 DNA preparation for transfection	
2.3.4.1.1 Preparation of DNA for episomal plasmid transfection	57
2.3.4.1.2 Preparation of linearized DNA for transfection	58
2.3.4.2 Blood stage <i>P. berghei</i> parasite culture	59
2.3.4.3 Mature schizont purification	60
2.3.4.4 Electroporation of healthy schizonts by Amaxa device	60
2.3.5 <i>In vivo</i> antimalarial drug testing	61

2.3.5.1	Determination of pyrimethamine sensitivity of PbGFP parasites	61
2.3.5.2	Determination of pyrimethamine sensitivity of transgenic (<i>PbPfK1</i>) parasite (episomal form)	62
2.3.5.3	Determination of pyrimethamine sensitivity of transgenic <i>P. berghei</i> expressing <i>Pfdhfr</i> mutant	62
2.3.6	Selection and identification of resistant <i>Pfdhfr</i> in transfected <i>P. berghei</i> parasites	63
2.3.7	Cloning of transgenic <i>P. berghei</i> parasites	63
2.3.8	Genetic analysis of transgenic <i>P. berghei</i> parasite	63
2.3.8.1	PCR analysis of transgenic <i>P. berghei</i> parasite	64
2.3.8.1.1	PCR analysis for checking 5' and 3'UTR integration	64
2.3.8.1.2	PCR analysis for checking <i>Pbdhfr-ts</i> gene	64
2.3.8.1.3	PCR analysis for checking <i>Pfdhfr</i> gene	65
2.3.8.2	Southern analysis of transgenic <i>P. berghei</i> parasite	66
2.3.8.2.1	Leukocytes removal from parasitized red blood cells	66
2.3.8.2.2	Genomic DNA restriction digestion and Southern probe hybridization	66
2.3.8.2.3	Preparation of Digoxigenin-labelled hybridization probe	67

2.3.8.2.4 Digoxigenin chemiluminescent detection using DIG Kit	69
2.3.9 <i>Pf</i> DHFR-TS expression profile by transgenic mutant parasite	69
2.3.9.1 Total RNA isolation	70
2.3.9.2 cDNA preparation	70
2.3.9.3 PCR amplification of cDNA	74
2.4 Data analysis	76
 CHAPTER 3 RESULTS	 77
3.1 Construction of <i>P. berghei</i> transfection plasmid	77
3.1.1 Construction of pY001 plasmid	77
3.1.2 Construction of pY003 plasmid	82
3.1.3 Construction of pY003K1, pY003CSL and pY003VIS plasmids	87
3.1.4 Construction of pY005 plasmid	93
3.2 Determination of pyrimethamine sensitivity of wild-type PbGFP parasites	98
3.3 Introduction of known <i>Pfdhfr</i> mutants to <i>P. berghei</i> parasite by transfection	101
3.4 Construction of <i>Pfdhfr</i> random mutant library using wild-type <i>Pfdhfr</i> as template	104
3.5 Transfection and selection of transfected resistant mutant parasite from wild-type <i>Pfdhfr</i> random libraries	108
3.6 Construction of <i>Pfdhfr</i> random mutant library using single mutant <i>Pfdhfr</i> as a template	113

3.7 Transfection and selection of transfected resistant mutant parasite from <i>Pfdhfr</i> S108N random libraries	117
3.8 Generation of transgenic <i>P. berghei</i> stably expressing <i>PfDHFR</i> S108N single mutant (<i>PbPfS108N</i> parasite)	127
3.9 Generation of transgenic <i>P. berghei</i> stably expressing <i>PfDHFR</i> M55I+S108N+S189C triple mutant (<i>PbPfDHFR3m1</i> parasite)	128
3.10 Generation of transgenic <i>P. berghei</i> stably expressing <i>PfDHFR</i> C50Y+S108N+F116S triple mutant (<i>PbPfDHFR3m2</i> parasite)	131
3.11 Southern blot analysis of transgenic <i>P. berghei</i> parasite stably expressing <i>PfDHFR</i> mutants	138
3.12 Expression profile analysis of transgenic <i>P. berghei</i> expressing <i>PfDHFR</i> mutants	141
3.13 Determination of growth rate of transgenic <i>P. berghei</i> expressing <i>PfDHFR</i> mutants	145
3.14 Determination of pyrimethamine sensitivity in transgenic <i>P. berghei</i> expressing single mutant <i>PfDHFR</i> S108N parasite	148
3.15 Determination of pyrimethamine sensitivity in transgenic <i>P. berghei</i> expressing triple mutant <i>PbPfDHFR3m1</i> and <i>PbPfDHFR3m2</i> parasite	151
3.16 Comparison of pyrimethamine sensitivity among transgenic parasites <i>PbPfS108N</i> , <i>PbPfDHFR3m1</i> and <i>PbPfDHFR3m2</i>	155
3.17 Determination of pyrimethamine sensitivity in <i>PbPfK1</i> parasite	159

CHAPTER 4 DISCUSSION AND CONCLUSION	162
REFERENCES	172
APPENDICES	181
Appendix A	182
Appendix B	186
Appendix C	187
CURRICULUM VITAE	189

LIST OF TABLES

Table	Page
2.1 Sequence of primers used in this study	36
2.2 DNA purification kits	38
2.3 RT-PCR reactions composed of the template and primer from master mix 1 with reverse transcriptase enzyme	72
2.4 The RT-PCR reactions composed of the template and primer from master mix 1 without reverse transcriptase enzyme	73
3.1 Inhibition of wild-type PbGFP parasite by pyrimethamine in mice	99
3.2 Variation of <i>Pfdhfr</i> mutation constructed in bacteria compared with wild type <i>Pfdhfr</i> template	106
3.3 Variation of <i>Pfdhfr</i> mutation constructed in bacteria compared with <i>Pfdhfr</i> S108N template	115
3.4 Variation of <i>Pfdhfr</i> mutations recovered from transfected pyrimethamine-resistant parasites compared with <i>Pfdhfr</i> S108N template after transfection and selection with pyrimethamine	124
3.5 Summary of the variation of <i>Pfdhfr</i> mutation compared with S108N template after transfection to <i>P. berghei</i> parasite	126
3.6 Growth profile of wild-type PbGFP parasite and transgenic <i>P. berghei</i> expressing <i>PfDHFR</i> mutant in mice	146
3.7 Inhibition of transgenic <i>PbPfS108N</i> parasite by pyrimethamine in mice	149

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Distribution of malaria disease	4
1.2 <i>Plasmodium falciparum</i> life cycle	5
1.3 Folate pathway of <i>Plasmodium falciparum</i>	9
1.4 Structure of pyrimethamine, cycloguanil, proguanil and chlorproguanil	13
1.5 Gene targeting constructs for <i>Plasmodium</i> parasite.	24
1.6 Overview of work	31
2.1 Circular map of pL0017	39
2.2 Circle map of pL0002 vector	44
3.1 Agarose gel-electrophoresis of pL0017 plasmid backbone and 3'UTR PCR product, digested with <i>NheI</i> and <i>KasI</i>	79
3.2 Restriction analysis of the selected 3 recombinant clones and pL0017 plasmid control	80
3.3 Construction of pY001 plasmid	81
3.4 Agarose gel-electrophoresis of pY001 plasmid backbone and <i>Pfdhfr-ts</i> PCR product, digested with <i>AgeI</i> and <i>NheI</i>	84
3.5 Restriction analysis of the selected 2 recombinant clones and pY001 plasmid control	85
3.6 Construction of pY003 plasmid	86
3.7 Agarose gel-electrophoresis of pY003 plasmid backbone and PCR product of known <i>Pfdhfr-ts</i> mutants, digested with <i>AgeI</i> and <i>NheI</i>	89
3.8 Construction pY003K1, pY003CSL and pY003V1S plasmids	90

3.9	Restriction analysis of the selected 3 recombinant clones of each known <i>Pfdhfr-ts</i> mutant digested with <i>HindIII</i> and <i>AflIII</i>	91
3.10	Restriction analysis of the selected 3 recombinant clones of each known <i>Pfdhfr-ts</i> mutant digested with <i>AflIII</i> and <i>KasI</i>	92
3.11	Agarose gel-electrophoresis of pY001 plasmid backbone and <i>Pfdhfr-ts</i> 1.8 kb PCR product (lane 2), digested with <i>AgeI</i> and <i>NheI</i>	95
3.12	Restriction analysis of the selected 3 recombinant clones	96
3.13	Construction of pY005 plasmid	97
3.14	Dose-inhibition curve of pyrimethamine against wild-type PbGFP parasite	100
3.15	Development of transgenic parasites transfected with a mixture of plasmids containing wild-type and known <i>Pfdhfr-ts</i> mutants under 0.25 mg/kg pyrimethamine selection	102
3.16	Sequence alignment of known mutant <i>Pfdhfr</i> double mutant, triple mutant and quadruple mutant with wild-type <i>Pfdhfr</i>	103
3.17	Agarose gel-electrophoresis of pY005 plasmid backbone and random mutant <i>Pfdhfr</i> PCR product (wild-type <i>Pfdhfr</i> template), digested with <i>BamHI</i> and <i>AflIII</i>	105
3.18	Development of transfected <i>P. berghei</i> parasite harbouring random mutant <i>Pfdhfr</i> library (wild-type <i>Pfdhfr</i> template)	110
3.19	Agarose gel-electrophoresis of PCR product of 0.7 kb from genomic DNA of parasites transfected with mutant <i>Pfdhfr</i> library	111
3.20	Sequence alignment of two <i>Pfdhfr</i> variations from parasite transfected with random mutant <i>Pfdhfr</i> library (wild-type <i>Pfdhfr</i> template)	112

3.21	Agarose gel-electrophoresis of digested pY005 plasmid backbone and random mutant <i>Pfdhfr</i> PCR product	114
3.22	Development of transfected <i>P. berghei</i> parasite harbouring random mutant <i>Pfdhfr</i> library (S108N template) in two mice	118
3.23	Agarose gel-electrophoresis of PCR product from genomic DNA of parasites transfected with mutant <i>Pfdhfr</i> library (S108N template) in mouse I, II	119
3.24	Sequence alignment of <i>Pfdhfr</i> variations (clone 1-6) from parasite transfected with random mutant <i>Pfdhfr</i> library (S108N template)	120
3.25	Sequence alignment of <i>Pfdhfr</i> variations (clone 7-12) from parasite transfected with random mutant <i>Pfdhfr</i> library (S108N template)	122
3.26	The model of double mutant <i>PfDHFR</i> -TS (C59R+S108N; PfDHFR2M) in complexed with pyrimethamine (positions of interest mutation, M55 and S189)	130
3.27	The model of double mutant <i>PfDHFR</i> -TS (C59R+S108N; PfDHFR2M) in complexed with pyrimethamine (positions of interest mutation, C50 and F116)	133
3.28	Replacement strategy of mutant <i>Pfdhfr-ts</i> into <i>Pbdhfr-ts</i> locus by double cross-over homologous recombination	134
3.29	PCR analysis of 5' and 3'UTR integration of <i>Pfdhfr-ts</i> replacing endogenous <i>Pbdhfr-ts</i> locus on genomic DNA isolated from transgenic <i>P. berghei</i> parasites expressing <i>PfDHFR</i> mutants	135

3.30	PCR analysis of <i>Pfdhfr</i> in genomic DNA isolated from transgenic parasites, <i>PbPfS108N</i> , <i>PbPfDHFR3m1</i> and <i>PbPfDHFR3m2</i>	136
3.31	PCR analysis of <i>Pbdhfr-ts</i> in genomic DNA isolated from transgenic mutant parasites	137
3.32	Restriction analysis pattern for Southern analysis of transgenic <i>P. berghei</i> parasites expressing <i>PfDHFR</i> mutants	139
3.33	Southern blot analysis of transgenic <i>P. berghei</i> parasite expressing <i>PfDHFR</i> mutant	140
3.34	RT-PCR analysis of mutant <i>Pfdhfr</i> expression in transgenic <i>P. berghei</i> (detection <i>Pfdhfr</i>)	142
3.35	RT-PCR analysis of mutant <i>Pfdhfr</i> expression in transgenic <i>P. berghei</i> (detection <i>Pbdhfr</i>)	143
3.36	RT-PCR analysis of mutant <i>Pfdhfr</i> expression in transgenic <i>P. berghei</i> (detection Pb alpha tubulin)	144
3.37	Growth curves of transgenic <i>P. berghei</i> expressing <i>PfDHFR</i> mutants and wild-type PbGFP in mice	147
3.38	Dose-inhibition curve of pyrimethamine against transgenic <i>PbPfS108N</i> parasite	150
3.39	Pyrimethamine susceptibility profile of transgenic <i>PbPfS108N</i> , <i>PbPfDHFR3m1</i> and <i>PbPfDHFR3m2</i> parasites	154
3.40	Dose-inhibition curve of pyrimethamine against transgenic <i>PbPfK1</i> parasite (episomal form)	161

ABBREVIATIONS

Ala	alanine
Arg	arginine
Asn	asparagine
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
bp	base pair
°C	degree Celsius
CaCl ₂	calcium chloride
Cyc	cycloguanil
Cys	cysteine
<i>dhfr</i>	dihydrofolate reductase gene
DHF	dihydrofolate
DHFR	dihydrofolate reductase enzyme
DHFS	dihydrofolate synthase enzyme
DHPS	dihydropteroate synthase enzyme
<i>dhfr-ts</i>	dihydrofolate reductase thymidylate synthase gene
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytidine triphosphate

dGTP	deoxyguanosine triphosphate
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
dTMP	deoxythymidine 5' -monophosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
dUMP	deoxyuridine 5' -monophosphate
dssurna	double strand small subunit ribosomal ribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	effective dose
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
<i>g</i>	gravity
g	gram
GCH1	GTP-cyclohydrolase I enzyme
GFP	green fluorescent protein
HCl	hydrochloric acid
hr	hour
IC ₅₀	inhibitory concentration at 50%
i.p.	intraperitoneal injection
i.v.	intravenous
Ile	isoleucine
kb	kilobase
kV	kilovolt
LB	Luria-Bertani (broth)

Leu	leucine
MgCl ₂	magnesium chloride
min	minute
mol	mole
ml	milliliter
mM	millimolar (millimole/liter)
mRNA	messenger RNA
MTX	methotrexate
NaCl	sodium chloride
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NaOAc	sodium acetate
NaOH	sodium hydroxide
ng	nanogram
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pfdhfr-ts</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase thymidylate synthase gene

<i>Pf</i> DHFR-TS	<i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase thymidylate synthase enzyme
PPPK	hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase enzyme
PTPS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase
Pyr	pyrimethamine
RBC	red blood cell
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
rpm	revolution per minute
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sec	second
Ser	serine
SSC	saline-sodium citrate
TE	Tris-EDTA
TS	thymidylate synthase
THF	Tetrahydrofolate
Thr	Threonine
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>

U	unit
UTR	untranslated region
v/v	volume by volume
Val	valine
μg	microgram
μJ	microjoule
μl	microliter
μM	micromolar