บทคัดย่อ

ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเทส (dihydrofolate reductase, DHFR) เป็นเป้าสำคัญในเชิงเคมีบำบัด (chemotherapy) เอ็นไซม์ DHFR ทำหน้าที่ในการรีดิวส์ H_2folate ให้เป็น H_4folate ในขบวนการสังเคราะห์โฟเลตโดยอาศัย NADPH เป็นโคแฟคเตอร์ ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาเอ็นไซม์ DHFR จากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* และ *Mycobacterium leprae* ซึ่งเป็นสาเหตุของวัณโรคและโรคเรื้อนตามลำดับ ผลการวิจัยนี้อาจนำไปสู่การออกแบบตลอดจนการพัฒนายา antifolates ใหม่ๆ ซึ่งมีประสิทธิภาพต่อเชื้อที่ดื้อยาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัณโรคซึ่งมีแนวโน้มที่จะสร้างปัญหามากขึ้นจากผลกระทบของการแพร่ระบาดของเชื้อเอดส์ที่เพิ่มขึ้นในประเทศไทย

จากการใช้ชิ้นส่วนยีนไทมิไดเลต ซินเทส (thymidylate synthase, TS) จากเชื้อ BCG เป็นตัวตรวจสอบ (probe) คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการ screen หาโคลนที่มีชิ้นของยีน DHFR จาก gDNA libraries ของ *M. leprae* และ *M. tuberculosis* เมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของโคลนที่ได้พบว่า DHFR ของ *M. leprae* มีความยาว 498 เบสคู่ สามารถให้กรดอะมิโน 165 ตัว และ DHFR ของ *M. tuberculosis* มีความยาว 480 คู่ แปลให้กรดอะมิโน 159 ตัว ผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ DHFR จากเชื้อทั้งสองมีความคล้ายคลึงกันมาก

DHFR ของ *M. leprae* มีน้ำหนักมวล 18 กิโลดาลตันโดยประมาณ และแสดงออกใน *E. coli* ในลักษณะเป็น inclusion bodies เมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.4 mM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยยังไม่สามารถทำการแสดงออก DHFR ของ *M. tuberculosis* ภายใต้สภาวะเดียวกัน ผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนสภาวะการแสดงออก และพบว่าหากลดอุณหภูมิลงถึง 20 องศาเซลเซียส และเพิ่มเวลาเหนี่ยวนำเป็น 10-12 ชั่วโมง DHFR ของ *M. leprae* จะสามารถแสดงออกในรูปของ soluble enzyme ที่สามารถเร่งปฏิกริยาได้ เมื่อทำการแยกเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วย affinity chromatography โดยใช้ MTX-Sepharose และนำเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์นี้มาศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์ ตลอดจนการถูกยับยั้งด้วยสาร antifolates พบว่า DHFR ของเชื้อ *M. leprae* มีค่า K_m ต่อสับสเตรท H_2folate และโคแฟคเตอร์ NADPH เท่ากับ 5.6 μM และ 9.2 μM ตามลำดับ เอ็นไซม์ DHFR ของ *M. leprae* ถูกยับยั้งด้วย trimethoprim ได้ดีที่สุดมีค่า K_i 0.07 μM และถูกยับยั้งด้วย pyrimethamine และ cycloguanil ด้วย K_i 0.3 μM และ 78 μM ตามลำดับ ขณะรายงานคณะผู้วิจัยยังอยู่ในระหว่างการปรับปรุงการแสดงออกเอ็นไซม์ DHFR ของ *M. tuberculosis*