

Abstract

Control, and ultimately eradication of malaria will require a variety of new antimalarial drugs. Progress towards this goal is hampered by inadequate reverse-genetic tools for identifying drug targets and antimalarial mode of action. The aim of the project was to refine the *glmS* ribozyme reverse genetic tool developed in our laboratory. This tool can be used to attenuate the expression of essential genes, including drug targets. Clonal integrant transgenic parasites were established for the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and deoxyhypusine synthase (DHS) genes. For the DHS gene, transgenic parasites with both the active *glmS* ribozyme and the inactive M9 variant as a control were obtained. Up to ten-fold attenuation of target gene expression was observed in transgenic parasites carrying insertion of the active *glmS* ribozyme when treated with D-glucosamine (GlcN). In contrast, no significant attenuation of DHS expression was observed in DHS modified parasites with the M9 variant inactive ribozyme. Attenuation of DHFR-TS and DHS expression in transgenic parasites led to a significant growth defect, thus validating these genes as essential. A chemogenomic profiling method was developed in which growth inhibition of antimalarial compounds was quantified under normal and gene-attenuated conditions in the transgenic parasites. The mode of action of antimalarial compounds was manifested as increased sensitivity to growth inhibition under gene-attenuated conditions. Two novel inhibitors of DHFR-TS were identified from screening the Malaria Box compound library of 400 compounds. Using the same method, the DHS gene was identified as the target of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, a known inhibitor of DHS enzymes in other organisms. In conclusion, a novel antimalarial target (the DHS gene) and the mode of action of two novel antimalarial compounds were identified. Future studies utilizing the tools and methods developed from this study could lead to identification of more drug targets and greater understanding of antimalarial mode of action.

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน เป้าหมายในการควบคุมอัตราการเกิดโรคมะเร็งหรือการทำให้โรคมะเร็งหมดไปนั้น ยังต้องอาศัยการพัฒนาต้านมะเร็งใหม่ๆ เพื่อนำมาต่อสู้กับปัญหาเชื้อมะเร็งดื้อยา อย่างไรก็ตามความคืบหน้าของการพัฒนาต้านมะเร็งยังมีข้อจำกัดอันเนื่องมาจากการขาดแคลนเครื่องมือทางรีเวอร์สเจเนติกส์สำหรับการพิสูจน์เป้าหมายของยาใหม่ๆ และการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยาใหม่ๆ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการนำกลิมเอสโรโบโซมซึ่งเป็นเครื่องมือทางรีเวอร์สเจเนติกส์ที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการฯ ของคณะผู้วิจัยมาใช้ในการศึกษายีนที่สำคัญรวมถึงการพิสูจน์ยีนที่อาจเป็นเป้าหมายของยาต้านมะเร็งในเชื้อพลาสมาเดียมฟาลซิพารัมซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งในคน กลิมเอสโรโบโซมสามารถถูกกระตุ้นด้วยน้ำตาลกลูโคซาเมีนให้ตัดสายลำดับเบสเอ็มอาร์เอ็นเอของตัวเองออก จึงมีการนำกลิมเอสโรโบโซมมาใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในเชื้อมะเร็ง ในโครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้สร้างเชื้อมะเร็งปรับแต่งพันธุกรรมที่ถูกแทรกลำดับเบสของกลิมเอสโรโบโซมเข้าไปที่ท้ายของยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทสโฮมิโอเลพทินเทส (DHFR-TS) และยีนดีออกซีไฮเพอซินซินเอส (DHS) ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคซาเมีนพบว่าเชื้อปรับแต่งพันธุกรรมมีการลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้ถึงสิบเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะปกติ ทั้งนี้ได้มีการสร้างเชื้อมะเร็งปรับแต่งพันธุกรรมที่ถูกแทรกลำดับเบสของกลิมเอสโรโบโซมชนิดกลายพันธุ์ซึ่งจะไม่ถูกกระตุ้นด้วยน้ำตาลกลูโคซาเมีนเข้าไปที่ท้ายของยีน DHS อีกด้วย ในกรณีนี้ไม่พบการลดการแสดงออกของยีน DHS ในเชื้อปรับแต่งพันธุกรรมแม้ว่าจะมีการเติมน้ำตาลกลูโคซาเมีน การลดการแสดงออกของยีน DHFR-TS หรือ DHS ในเชื้อปรับแต่งพันธุกรรมส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เป็นการพิสูจน์ว่ายีนทั้งสองนี้เป็นยีนที่สำคัญในเชื้อพลาสมาเดียมฟาลซิพารัม นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาริธีที่เรียกว่า Chemogenomic profiling เพื่อพิสูจน์ที่เป็นเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยการตรวจสอบความไวของเชื้อปรับแต่งพันธุกรรมต่อสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งในสภาวะที่ถูกลดการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อที่ถูกลดการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของยาหรือสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งจะมีความไวต่อยาหรือสารนั้นๆ สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีการแสดงออกของยีนปกติ จากหลักการดังกล่าวคณะผู้วิจัยได้นำเชื้อปรับแต่งพันธุกรรมที่มีลำดับเบสของกลิมเอสโรโบโซมแทรกที่ท้ายของยีน DHFR-TS มาทดสอบกับสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง 400 สารจากคลังสารมะเร็งบ็อกซ์ ทำให้สามารถพิสูจน์กลไกการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ 2 สารที่มุ่งเป้าต่อยีน DHFR-TS และจากวิธี Chemogenomic profiling นี้สามารถพิสูจน์ได้ว่ายีน DHS ในเชื้อพลาสมาเดียมฟาลซิพารัมเป็นเป้าหมายของสาร N1-guanlyl-1, 7-diaminoheptane ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของโปรตีน DHS ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อีกด้วย โดยสรุป โครงการวิจัยนี้สามารถพิสูจน์ว่ายีน DHS เป็นเป้าหมายของยาต้านมะเร็งใหม่ได้ และยังสามารถพิสูจน์กลไกการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งใหม่ได้อีก 2 สารอีกด้วย คณะผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าการใช้กลิมเอสโรโบโซมซึ่งเป็นเครื่องมือทางรีเวอร์สเจเนติกส์และการใช้วิธี Chemogenomic profiling จะสามารถนำไปสู่การพิสูจน์เป้าหมายของยาต้านมะเร็งใหม่ๆ รวมไปถึงการค้นพบกลไกการออกฤทธิ์ของยาหรือสารใหม่ๆ เพิ่มขึ้นได้ในอนาคต