

TRG 4780011 การศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์ desaturase ในการเป็นเป้าหมายใหม่ของ ยารักษาวัณโรคด้วย antisense เทคโนโลยี

ดร. เบญจวรรณ เพชรสุศิริ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

benjapks@health.moph.go.th 1 กรกฎาคม 2547 – 30 มิถุนายน 2549

บทคัดย่อ

ปัญหาการกลับระบาดของวัณโรคและวัณโรคดื้อยาทำให้มีการศึกษาพัฒนาตามความต้องการยารักษาวัณโรคใหม่ที่มีประสิทธิภาพดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งให้ได้ผลในการรักษาวัณโรคดื้อยา มีรายงานจากการศึกษาที่มีมาก่อนว่า Isoxyl (4, 4 diisomyloxydiphenylthiourea; thiocarlide) และสารประกอบอนุพันธ์ใหม่ของ thiourea ที่ได้จากการสังเคราะห์ มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคสามารถทำลายเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยและเชื้อวัณโรคดื้อยา ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุด 0.30-10.0 $\mu\text{g/ml}$ ผลของ thiocarlide ต่อเชื้อวัณโรคทำให้การสังเคราะห์กรดไขมัน oleic acid และ tuberculostearic acid ซึ่งสร้างจาก oleic acid ลดลง และมีการเพิ่มสะสมขึ้นของกรดไขมัน stearic acid บ่งชี้ว่า $\Delta 9$ stearoyl-desaturase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ oleic acid จาก stearic acid เป็นเอนไซม์ที่สาร thiocarlide ออกฤทธิ์ยับยั้ง การศึกษายีนที่สร้างเอนไซม์ $\Delta 9$ desaturase โดยทำให้ยีน *desA3* ในเชื้อวัณโรคแสดงออกมากขึ้นพบว่ามีการทำงานของเอนไซม์ $\Delta 9$ desaturase เพิ่มขึ้นเป็นผลให้ oleic acid ในเซลล์มีจำนวนมากขึ้น ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ใช้ antisense เทคโนโลยีเป็นเครื่องมือในการศึกษาเพื่อแสดงความสำคัญของยีน *desA3* ซึ่งสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็นเป้าหมายของยารักษาวัณโรค โดยการนำ oligodeoxynucleotide antisense ต่อ coding sequence ของยีน *desA3* ขนาด 10 μM เข้าเซลล์ด้วยวิธี electroporation ทำให้การเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อวัณโรคลดลง โดยเห็นผลชัดเจนในบางสายของ oligodeoxynucleotide antisense การตัดต่อ DNA และนำเข้าสู่เซลล์ซึ่ง DNA สามารถ transcribe ให้ oligodeoxynucleotide antisense ต่อ coding sequence และ regulatory region ของยีน *desA3* ทำให้เชื้อวัณโรคเจริญลดลง antisense นี้มีผลต่อการสังเคราะห์กรดไขมัน oleic acid และ unsaturated mycolic acids อื่นๆ โดยจากการติดตามสารเมตาโบไลต์ในขบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในเชื้อวัณโรคด้วย $[C]^{14}$ -acetate และวิเคราะห์กรดไขมันนี้ที่ถูกติดตามมีปริมาณลดลง ดังนั้น antisense เทคโนโลยี จึงมีประโยชน์ในการศึกษาเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายยาใหม่ โดยใช้แสดงความสำคัญของยีนและเอนไซม์ ใช้เป็นเครื่องมือศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยาและการพัฒนาาใหม่ จากการศึกษาที่สรุปได้ว่า $\Delta 9$ desaturase มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายของยาใหม่ในการรักษาวัณโรค

คำหลัก: Antisense, เชื้อวัณโรค, desaturase.

TRG 4780011 Targeting desaturase as a new therapeutic target for antituberculosis agents by antisense technology

Benjawan Phetsuksiri

National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nontaburi, Thailand. 11000

ABSTRACT

New therapeutic agents to combat the emerging pandemic of drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* are urgently needed. It was reported previously that the thiourea (thiocaride; 4, 4' diisoamyloxy diphenylthiourea) and new derivatives are effective anti-tuberculosis drug, active against a range of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* at 0.30 - 10.0 $\mu\text{g/ml}$. Treatment of *M. tuberculosis* with thiocarlide resulted in a dose dependent decrease in synthesis of oleic, consequently, tuberculostearic acid in *M. tuberculosis* and accumulation of stearic acid. The specificity of this inhibition pointed to a $\Delta 9$ stearoyl-desaturase as the drug target. The over-expression of *M. tuberculosis desA3* in *Mycobacterium bovis* BCG exhibited an increase of $\Delta 9$ desaturase activity and oleic acid synthesis suggesting the encoded gene. We now demonstrate the essentiality of *M. tuberculosis desA3* as a gene encoding a new therapeutic drug by antisense technology. Electroporation of *M. tuberculosis* with 10 μM antisense oligodeoxynucleotides (ODNs) against the mRNA of $\Delta 9$ desaturase reduced the *M. tuberculosis* proliferation. Some potent ODNs resulted in the significant inhibition of mycobacterial growth. Introducing of the $\Delta 9$ desaturase antisenses by cloning and transformation is an alternative approach. The transcribed $\Delta 9$ desaturase antisenses driven by cadmium inducible promoter of mycobacterial shuttle plasmid vector exhibited inhibition on the growth of *M. tuberculosis*. Whole-cell labeling of fatty and mycolic acids with $[\text{C}]^{14}$ -acetate demonstrated the inhibitory effects of antisense oligonucleotides against the $\Delta 9$ desaturase activity resulting in the decrease of oleic acid and hence unsaturated mycolic acid. The antisense technology proved to be a valuable tool to identify new drug targets, elucidate mechanisms of drug action and design new anti-tuberculosis drugs.

Keywords: Antisense, *Mycobacterium tuberculosis*, desaturase.