Abstract

New drugs are needed to overcome antimicrobial resistance. Riboswitches are promising new antibiotic targets that are widespread among different bacteria. Glucosamine (GlcN)-6-phosphate synthetase (*glmS*) gene activity in many bacterial species, including pathogens is controlled by a cis-regulatory riboswitch. The riboswitch undergoes self-cleavage in the presence of GlcN-6-phosphate (GlcN6P). Compounds that can activate the *glmS* riboswitch self-cleavage (ribozyme) activity could reduce the level of GlcN6P below the level needed for bacterial growth and thus act as effective, broad spectrum antibiotics. However, simple tools for screening *glmS* riboswitch activators are not available. In this study, an *Escherichia coli* cell-based system was established for facile characterization of ribozyme activity that could be used to screen compounds that can activate inducible ribozymes such as the *glmS* riboswitch. DNA cassettes were constructed for expression of reporter protein (toxic E protein, green fluorescent protein [GFP] and enhanced GFP-human dihydrofolate reductase [EGFP-hDHFR]) and RNaseJ1 enzyme required for degradation of ribozyme-cleaved RNA product in *E. coli.* The system was tested initially by cloning the reporter and RNaseJ1-encoding genes on separate plasmids. Active and inactive versions of the *glmS* and hammerhead (HH) ribozyme were inserted upstream of the reporter gene's Shine-Dalgarno sequence. The reporter activities in *E. coli* co-transformants were measured as growth inhibition, GFP fluorescence, and trimethoprim resistance phenotype or EGFP fluorescence, respectively. RNaseJ1 production was detected by western immunodetection assay. It was found that productions of reporters and RNaseJ1 were inconsistent, possibly due to variable plasmid copy number in the co-transformants. To overcome the inconsistency of protein productions, *egfp-hdhfr* reporter and RNaseJ1-encoding genes were integrated into non-essential chromosomal genes of *E. coli* BL21(DE3). A significant 30% reduction of EGFP reporter was observed in double integrants expressing RNaseJ1 and reporter with active ribozyme, whereas reporter activity was unchanged in integrants lacking RNaseJ1 or with inactive ribozyme upstream of the reporter gene. The double integrant was thus validated as a system for assessing ribozyme activity. However, the *glmS* riboswitch appeared to be active without exogenous GlcN inducer, suggesting that GlcN6P is naturally present in *E. coli* at levels high enough to fully activate the *glmS* riboswitch. Although the *E. coli* cell system is not suitable for screening of *glmS* riboswitch-targeting compounds, other sequences could be tested for ribozyme activity using the system.

Keywords: *glmS* riboswitch, drug target, antibiotic, *Escherichia coli* screening system, reporter gene

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีความจำเป็นในการพัฒนายาปฏิชีวนะที่มีเป้าหมายของยาใหม่ เพื่อใช้ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ของโรคติดเชื้อทั่วโลก มีรายงานพบว่ากลิมเอสไรโบสวิตช์ (*glmS* riboswitch) สามารถเป็นเป้าหมายของยาต้านแบคทีเรียได้ ไรโบสวิตช์นี้พบในตำแหน่ง 5′ ที่ไม่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนของยีน *glmS* ซึ่งเป็นยีนสำคัญในการสังเคราะห์ GlcN6P ในแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การแสดงออกของยีน *glmS* จะถูกควบคุมด้วยไรโบสวิตช์ โดย GlcN6P จะจับที่ลำดับเบสอาร์เอ็นเอของไรโบสวิตช์และกระตุ้นให้ไรโบสวิตช์ตัดตัวเองออกทำให้เกิดการลดการแสดงออกของยีนได้ หากมีสารที่เหนี่ยวนำการตัดตัวเองออกของกลิมเอสไรโบสวิตช์และทำให้ปริมาณ GlcN6P ลดลง สารนั้นจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และอาจนำมาพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะที่มุ่งเป้าต่อกลิมเอสไรโบสวิตช์ได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีวิธีการคัดกรองสารเหนี่ยวนำกลิมเอสไรโบสวิตช์ในระดับเซลล์แบคทีเรียแบบง่าย งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการสร้างระบบเซลล์อีโคไล (*Escherichia coli*) เพื่อการคัดกรองสารที่สามารถเหนี่ยวนำกลิมเอสไรโบสวิตช์ได้ คณะผู้วิจัยฯ ได้สร้างเชื้ออีโคไลดัดแปลงพันธุกรรมที่มีพลาสมิดรายงานผลและพลาสมิดสำหรับการสร้างเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเจวัน (RNaseJ1) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสายอาร์เอ็นเอที่เกิดจากการตัดตัวเองของไรโบไซม์ในเชื้ออีโคไล พลาสมิดรายงานผลมีลำดับเบสของยีนรายงานผล อันได้แก่ ยีนโปรตีนอีที่เป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย (E protein) ยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) และยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว EGFP ร่วมกับโปรตีนไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสของมนุษย์ (EGFP-hDHFR) โดยมีการแทรกลำดับเบสของกลิมเอสไรโบสวิตช์ทั้งชนิดปกติและชนิดไม่ตัดตัวเอง และแฮมเมอร์เฮดไรโบไซม์ชนิดปกติและชนิดไม่ตัดตัวเอง เข้าที่ส่วนหน้าของยีนรายงานผล จากนั้นตรวจสอบโปรตีนรายงานผลเพื่อศึกษาการทำงานของไรโบสวิตช์ โดยการวัดการเจริญเติบโต สัญญาณการเรืองแสงสีเขียว และการดื้อต่อยาไทรเมทโทรพิมหรือการเรืองแสงสีเขียว EGFP ในเชื้ออีโคไลดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนรายงานผลดังกล่าวข้างต้น ตามลำดับ และตรวจสอบเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเจวันด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท จากการตรวจสอบพบว่าการผลิตโปรตีนรายงานผลและเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเจวันในเชื้ออีโคไลดัดแปลงพันธุกรรมไม่คงที่ ซึ่งอาจเนื่องมาจากจำนวนพลาสมิดในเชื้อมีความแปรปรวนในแต่ละการทดลอง คณะผู้วิจัยฯ จึงได้ทำการสร้างเชื้อดัดแปลงพันธุกรรมแบบอินติแกรนท์ที่มีการแทรกยีนโปรตีน EGFP-hDHFR และยีนเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเจวันเข้าที่ตำแหน่งยีนไม่สำคัญในจีโนมของเชื้ออีโคไล BL21(DE3) เพื่อควบคุมให้จำนวนยีนรายงานผลและยีนเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเจวันมีหนึ่งยีนต่อหนึ่งเชื้อ ในเชื้ออีโคไลอินติแกรนท์มีที่ยีนรายงานผลภายใต้การควบคุมของกลิมเอสไรโบสวิตช์และยีนเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเจวัน พบว่าปริมาณการเรืองแสงสีเขียว EGFP ลดลง 30% เมื่อเทียบกับเชื้ออีโคไลอินติแกรนท์ที่ไม่มีกลิมเอสไรโบสวิตช์หรือไม่ผลิตเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเจวัน แสดงให้เห็นถึงการทำงานของกลิมเอสไรโบสวิตช์และเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเจวันในระบบเชื้ออีโคไล อย่างไรก็ตามการทำงานของกลิมเอสไรโบสวิตช์ดังกล่าวเกิดขึ้นโดยไม่อาศัยการเหนี่ยวนำด้วย GlcN6P จากภายนอกเซลล์ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า GlcN6P ภายในเซลล์อีโคไลมีปริมาณเพียงพอต่อการเหนี่ยวนำให้กลิมเอสไรโบสวิตช์ตัดตัวเองออก และอาร์เอ็นที่ถูกตัดถูกย่อยด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเจวัน โดยสรุป ถึงแม้ว่าระบบเซลล์อีโคไลในงานวิจัยนี้จะไม่เหมาะสมต่อการใช้คัดกรองสารออกฤทธิ์มุ่งเป้ากลิมเอสไรโบสวิตช์ อย่างไรก็ตาม ระบบเซลล์อีโคไลอาจสามารถใช้ทดสอบการทำงานของไรโบไซม์ชนิดอื่นๆ ได้

คำหลัก: กลิมเอสไรโบสวิตช์, เป้าหมายยา, ยาปฏิชีวนะ, ระบบคัดกรองสารแบบเซลล์อีโคไล, ยีนรายงานผล