ANALYSIS OF HEAT-SHOCK PROTEIN GENE EXPRESSION PROFILES IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* SUBJECTED TO DIFFERENT ABIOTIC STRESSES

PARTHOMPONG VESURAI 5436636 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: KITTISAK YOKTHONGWATTANA, Ph.D. (AGRICULTURAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY), JAMORN SOMANA, M.D., Ph.D. (PLANT BIOCHEMISTRY)

ABSTRACT

Heat shock proteins (HSPs) are important proteins in living cells that play key roles in cellular adaptation to various stress conditions. The strict correlations between plant *HSP* gene expressions and abiotic stresses, albeit in bits and pieces, have been well-documented and reported. In this thesis, 25 *HSP* gene expression profiles in a model unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* were simultaneously observed under 4 abiotic stresses compared to the normal growth condition by semi-quantitative RT-PCR and, for selected genes, by qPCR. Such stresses included temperature rises, increasing salinity, exposure to excessive irradiance, and the transition from darkness to normal light intensity. The results showed that expression of 17 out of 25 *HSP* genes could be detected under normal growth conditions. Under abiotic stress treatments, 12 genes were up-regulated by heat stress, while *CLPB1* and *HSP33* were down regulated. Transcripts of 5 genes were enhanced by increasing irradiance. When the alga was subjected to increasing salinity for 2 hours, 7 genes were found to be up regulated. After overnight dark incubation followed by exposure to normal light conditions, mRNA of 7 genes were elevated. Four *HSP* genes showing significant up regulation profile by the semi-quantitative RT-PCR were selected for validation by qPCR. Analyses by qPCR correlated with the RT-PCR results. Notably, *HSP22A* gene significantly increased its expression profile under heat stress, as determined by qPCR, with a calculated fold change of about 3,500 times, making this gene a good candidate for further studies on heat-induced regulation of gene expression. Putative promoter sequences of the 4 selected genes (about 500 bp upstream of the start codon) were obtained from the genome database and the selected abiotic stress responsive elements were located using a computer program. The promoter analysed data suggested that the space between heat shock elements (HSEs) on their putative promoter sequences might play a key role in heat-induced gene expression.

KEY WORDS: *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* / HEAT SHOCK PROTEIN GENE / ABIOTIC STRESS / GENE EXPRESSION PROFILES / STRESS RESPONSIVE ELEMENTS

102 page

การศึกษาการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีนในสาหร่าย *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* ที่เลี้ยงภายใต้สภาพความเครียดต่าง ๆ

ANALYSIS OF HEAT-SHOCK PROTEIN GENE EXPRESSION PROFILES IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* SUBJECTED TO DIFFERENT ABIOTIC STRESSES

ปฐมพงศ์ เวศอุไร 5436636 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา, Ph.D. (AGRICULTURAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY), จามร สมณะ, Ph.D. (PLANT BIOCHEMISTRY)

บทคัดย่อ

ฮีทช็อคโปรตีนเป็นหนึ่งในบรรดาโปรตีนที่มีความสำคัญในการดำรงชีพของเซลล์สิ่งมีชีวิตเพื่อรับมือกับสภาพความเครียดต่าง ๆ มีการศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นว่าสภาพความเครียดมีความสัมพันธ์กับการเหนี่ยวนำให้ยีนฮีทช็อคโปรตีนมีการแสดงออก ในการศึกษานี้ยีนฮีทช็อคโปรตีนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* จำนวน 25 ยีนถูกเลือกมาเพื่อศึกษาการแสดงออกในสภาวะเครียดที่มีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น, การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแกง, การเพิ่มความเข้มแสง และเปลี่ยนจากที่มืดสู่สภาวะเลี้ยงในที่มีแสงด้วยเทคนิค semi-quantsitative RT-PCR และสำหรับยีนฮีทช็อคโปรตีนที่ถูกเลือกจะนำไปทำ qPCR เพื่อยืนยันผล RT-PCR ผลการศึกษาพบว่ามียีนฮีทช็อคโปรตีน 17 ยีนแสดงออกในสภาวะปกติ 12 ยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ ในขณะที่ยีน *CLPB1* และ *HSP33* ถูกลดการแสดงออก เมื่อเพิ่มความเข้มแสงมี 5 ยีนที่ถูกเพิ่มการแสดงออก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในระยะเวลา 2 ชั่วโมงพบว่ามี 7 ยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น เมื่อให้เซลล์อยู่ในความมืดข้ามคืนก่อนรับแสงที่ความเข้มปกติในวันรุ่งขึ้น พบว่ามี 7 ยีนที่มีการเพิ่มการแสดงออก ยีนฮีทช็อคโปรตีนสี่ยีนที่พบว่าเพิ่มการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญในสภาพเครียดได้ถูกเลือกเพื่อยืนยันผลการแสดงออกด้วยเทคนิค qPCR ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ semi-quantitative RT-PCR เป็นที่น่าสังเกตว่ายีน *HSP22A* เพิ่มการแสดงออกสูงขึ้นในสภาวะเพิ่มอุณหภูมิถึงราว 3,500 เท่า ซึ่งน่าสนใจและควรนำไปเป็นต้นแบบสำหรับศึกษาการตอบสนองต่อความร้อนในระดับการสร้างอาร์เอ็นเอ ลำดับดีเอ็นเอที่เชื่อว่าเป็นโปรโมเตอร์ของทั้งสี่ยีน (500 คู่เบสก่อนถึงโคดอนเริ่มต้น) จากฐานข้อมูลจีโนมถูกนำมาค้นหาและแสดงลำดับดีเอ็นเอที่สนองตอบความเครียดด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เป็นแผนผัง ซึ่งแผนผังที่ได้บ่งชี้ว่าระยะห่างระหว่างลำดับเหล่านั้นอาจมีบทบาทสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกด้วยความร้อน

102 หน้า