ABSTRACT

A switch to sexual development (gametocytogenesis) is essential for the malarial parasites to be transmitted to mosquito and therefore the spread of the disease. Eventhough, there are more and more knowledge on the gene expression in this stage coming out, the molecular mechanisms of the gametocyte development are still largely unknown. With the aim to explore the change in gene expression that may govern the gametocytogenesis process, differentially display (DD) technique was used to compare the gene expression in ring stages of gametocyte producing and non-gametocyte producing lines of *Plasmodium falciparum*. Both lines of falciparum parasite, KT-3 isolate, were cultured to obtain synchronized ring stages prior to subject to DD technique. There were about 15-20 bands that appeared only in ring stage of gametocyte producing line and about 80 bands that were more intense in sample from gametocyte producing line compared to the one from non-gametocyte producing line. The selectively intense DD bands in ring stage of gametocyte producing line were cloned and sequenced. The sequences obtained were blasted into the parasite genome data base to search for the possible homoloque sequences. Whilst some clones were identified as genes of known function such as Pfs16, PfEMP1, pfRingA, nucleoside/nucleobase transporter, P-type ATPase III, Ser/Thr protein kinase, MAPK, Rifin, some appeared to be homoloques of sequenced but unidentified genes. Further analysis on selected genes; Pfs16, nucleoside/nucleobase transporter, P0type ATPase III and PfRingA, using real-time PCR, showed that only the expression of Pfs16 gene could be demonstrated in the higher level in ring stage from gametocyte-producing line. The DHFR gene showed the similar level of expression in either parasite line. Other identifed cDNA tags are waiting for further analysis.

Keywords

Plasmodium falciparum; malaria parasites; gametocyte; gametocytogenesis; sexual stage; differential display; Real-time PCR

บทคัดย่อ

การพัฒนาของเชื้อเข้าสู่ระยะวงจรชีวิตแบบใช้เพศของเชื้อมาลาเรีย มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายของโรค แต่การวิจัยศึกษาส่วนใหญ่มุ่งเป้าไปที่ระยะวงจรชีวิตแบบไม่ใช้เพศ เพราะเป็นระยะที่สัมพันธ์กับการแสดงอาการ และความรุนแรงของโรค เป็นเป้าหมายและมีผลต่อการรักษาในผู้ป่วย อย่างไรก็ตามหากมีความเข้าใจกระบวนการ หรือกลไกทางอณูชีววิทยาที่เกิดขึ้นในระยะแกมีโทไซท์ หรือการพัฒนาเข้าสู่ระยะแกมีโทไซท์ มากขึ้นเท่าใด ก็น่าจะยิ่งมีประโยชน์ในแง่การรักษาและควบคุมการแพร่กระจายของโรคได้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นเท่านั้น ด้วยจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่จำเพาะ และอาจเป็นตัวกำหนดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะการใช้เพศ เทคนิคที่เรียกว่า ดิฟเฟอเร็นเชี่ยลดิสเพลย์ (ดีดี) ได้ถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับการแสดงออกเป็น เอ็มอาร์เอ็นเอ ของยีนต่าง ๆ ระหว่างเชื้อในระยะวงแหวนของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดี่ยม ฟัลซิปารั่มสายพันธ์ที่สร้างแกมีโทไซท์ได้ และสูญเสียความสามารถนั้นไป จากการทดลองพบว่ามีจำนวนแถบดีดี ที่เข้มขึ้นในระยะวงแหวนของสายพันธุ์สร้างแกมีโทไซท์ได้อยู่ประมาณ 100 แถบ โดยเป็นแถบที่พบเฉพาะระยะวงแหวนของสายพันธุ์สร้างแกมีโทไซท์ได้อยู่ประมาณ 20 แถบ หลังจากการโคลน หาลำดับเบสของแถบที่สนใจ พบว่า โคลนที่ได้จำนวนหนึ่งมีลำดับเบสเหมือนกับยีนที่ได้มีการรายงานไว้แล้ว เช่น PfS16, PfEMP, pfRingA, nucleoside/nucleobase transporter, Ser/Thr protein kinase, mitogen-activated protein kinase, และ P-type ATPase III ในขณะที่บางโคลนยังไม่ทราบว่าเป็นยีนที่เป็นรหัสของโปรตีนใด ยีน 4 ชนิดคือ PfS16, pfRingA, nucleoside/nucleobase transporter, และ P-type ATPase III ได้ถูกนำมาศึกษาต่อเพื่อดูระดับการแสดงออกโดยอาศัยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ พบว่ามีเพียง PfS16 เท่านั้นที่สามารถวิเคราะห์ได้ และพบว่ามีการแสดงออกเฉพาะในเชื้อวงแหวนของสายพันธ์ที่ยังสามารถสร้างแกมีโทไซท์ได้ จากการใช้ยีนของไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสเป็นตัวศึกษาเปรียบเทียบพบว่าการแสดงออกของยีนไม่ต่างกันในทั้งสองสายพันธ์ สำหรับยีนอื่น ๆ ที่ได้วิเคราะห์หาลำดับเบสแล้วจะถูกวิเคราะห์ศึกษาต่อไป

คำหลัก

เชื้อมาลาเรีย; พลาสโมเดียมฟัลซิปารั่ม; ระยะการใช้เพศ; แกมีโทไซท์; แกมีไทไซโทเจเนซิส; เทคนิคดิเฟอเรนเชี่ยลดิสเพลย์; เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์