บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG58800247
ชื่อโครงการ : เชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม: บทบาท transcription-associated proteins ในการควบคุมการแสดงออกของยีนต่อยาในกลุ่มอาร์ทีมีซินิน
ชื่อนักวิจัย : อาจารย์ ดร. องค์อุมา ณ ถลาง คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิยาลัยธรรมศาสตร์
E-mail Address : onguma382@yahoo.com
ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

มาลาเรียยังคงเป็นโรคที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากและเป็นหนึ่งในโรคที่มีการติดเชื้ออย่างแพร่หลาย พบการติดเชื้อในประชากรมากกว่า 200ล้านคน และพบการเสียชีวิตอย่างน้อย 600,000 คนต่อปี ปัจจุบันยาในกลุ่มอาร์ทีมีซินิน Artemisinin based combination (ACT) ถูกใช้เป็นการรักษาหลักเมื่อมีการติดเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้ได้พบการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียต่อยาชนิดนี้ จึงถือเป็นภัยคุกคามที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษาโรคมาลาเรีย แม้ว่ามีความพยายามในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยา แต่ปัจจุบันก็ยังคงไม่สามารถอธิบายกลไกได้อย่างถ่องแท้ เมื่อไม่นานมานี้ การศึกษาทรานสคริปโตมและโปรตีโอมิกส์พบว่าการตอบสนองต่อยาของเชื้อมาลาเรียอาจจะมีผลจากการควบคุมการแสดงออกของยีนส์โดย transcription-associated proteins (TAPs) โดยการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนนี้อาจจะมีส่วนร่วมในการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนส์ของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาในกลุ่มอาร์ทีมีซินิน ดังนั้นเราจึงศึกษาบทบาทของ TAPs ในการควบคุมการแสดงออกของยีนส์โดยเฉพาะการตอบสนองของเชื้อมาลาเรียต่อยาในกลุ่มอาร์ทีมีซินิน เนื่องจากการขาดแคลนของ Antibody ในการศึกษา transcription-associated proteins ในเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม เราจึงได้พัฒนาเทคนิคการtransfection สำหรับเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม เพื่อการผลิต stable episomal transfectionเพื่อการติดฉลากโปรตีนด้วยสารเรืองแสงสีเขียว โดยการใช้เทคนิคโคลนนิ่งและติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีเขียว การเข้าถึงคุณลักษณะของโปรตีนเหล่านี้จะถูกติดตามโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อให้เห็นลักษณะของตำแหน่งของโปรตีนในเชื้อมาลาเรีย การศึกษาแสดงออกของยีนส์ TAPs โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเรียลไทม์เพื่อติดตามการแสดงออกของยีนส์ในระยะต่างๆของเชื้อมาลาเรีย จากการพัฒนาเทคนิคการ transfection เพื่อสร้างพลาสมิดสำหรับ episomal transfection นั้นในการศึกษานี้ สามารถทำได้การสำเร็จในการติดฉลากโปรตีนด้วยสารเรืองแสงสีเขียว การติดตามตำแหน่งของ TAPs ใน 3 โปรตีนคือ PF3D7_1128600, PF3D7_1006200 และ PF3D7_1126900 พบว่ามีการแสดงออกที่ตำแหน่งต่างๆกัน โดยพบได้ที่ไซโตพลาสซึมของระยะโทรโฟซอยต์และไชซอนต์ การศึกษาแสดงออกของยีนส์ TAPs ใน 18 ยีนส์ พบว่ามี 15 ยีนส์ ที่มีการแสดงออกของยีนส์ที่สูงขึ้นและ 3 ยีนส์ ที่มีการแสดงออกของยีนส์ที่ต่ำลงจากการตอบสนองต่อยาในกลุ่มอาร์ทีมีซินิน การศึกษานี้พบว่าการพัฒนาเทคนิคการ transfection ของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมเป็นเทคนิคที่ประสิทธิภาพในการใช้ศึกษาติดตามการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม TAPs ในด้านติดตามตำแหน่งของโปรตีนในเชื้อมาลาเรีย การศึกษาเพิ่มเติมในยีนส์อื่นๆในกลุ่มควรจะมีเพื่อการเข้าใจภาพรวมของ RNA binding proteins ของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม การศึกษานี้ได้เขยายมิติใหม่ในศึกษาการแสดงออกของยีนส์ของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม และทำให้เพิ่มองค์ความรู้ในการศึกษากลไกการตอบสนองของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านในกลุ่มอาร์ทีมีซินิน การรวบรวมผลการศึกษานี้กับการศึกษาการแสดงออกของยีนส์ที่มีอยู่ในขณะนี้ทำให้เราสามารเข้าใจในชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียมากขึ้นและสามารถนำไปสู่การพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียในอนาคตต่อไป

คำหลัก: อาร์ทีมีซินิน, **gene expression,** เชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม, **Transcription factor Proteins** (TAPs)

Abstract

Project Code : TRG58800247

Project Title : Development of molecular techniques for characterization of transcription-associated proteins in *Plasmodium falciparum* in response to artemisinins

Investigator : Dr.Onguma Natalang, Faculty of allied health sciences, Thammasat university

E-mail Address : onguma382@yahoo.com

Project Period : 2 years

Malaria remains the most important parasitic infection and one of the most prevalent infectious diseases. More than 200 million cases and at least 600,000 consequent deaths are estimated to occur annually. Artemisinin based combination (ACT) drugs have been recommended by the World Health Organization as the first-line treatment to be used effectively against *P. falciparum*. Artemisinin and its derivatives resistance have emerged. It is considered as a major threat to global plans to control and eliminate malaria as the artemisinins are a key component of antimalarial treatment in the malaria-endemic World. Although progressed efforts have been made, the mechanism underpinning drugs action has not been well understood. Recently, it was suggested that transcription-associated proteins (TAPs) are importance and essential in parasitic response to artemisinins. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Plasmodium* spp. suggested the differential expression of these genes encoding regulatory factors may contribute to the global changes in the transcriptome observed in the artemisinin resistant parasites. Therefore, we studied the role of TAPs in the regulation of gene expression of *Plasmodium falciparum* is particularly of interesting in the mechanism of malaria parasite responding to artemisinins. Due to the lack of antibodies against transcription-associated proteins for *P. falciparum*, we developed transient transfection platform for *P. falciparum* to produce the stable episomal transfection parasite which TAPs tagging with green fluorescent protein (GFP) protein by using DNA Cloning and tagging with green fluorescent protein (GFP) protein. The characterization of TAPs were performed using fluorescence microscope to visualize and localize the proteins within malaria parasite. The expression profile of TAPs were performed by using quantitative real-time PCR technique to investigate gene expression profiles during erythrocyte stage development. Plasmids were successfully construction for episomal transfection *P.falciparum* which TAPs tagging with green fluorescent protein (GFP) protein. The localization of TAPs proteins were performed for 3 proteins: PF3D7_1128600, PF3D7_1006200 and PF3D7_1126900 showing differences location within malaria parasite but mainly to cytoplasm of trophozoite and schizont stages. Gene expression of transcription-associated proteins (TAPs) of 18 genes studying showed 15 genes are over-expressed and 3 genes are under-expressed which have dynamic changes of the transcription reflecting drug-exposure. The result demonstrates that the developed transient transfection platform for *P. falciparum* is an effective tool to visualize the localization of particular RNA binding proteins of the malaria parasite. The characterization of TAPs is importance for studying mechanism of malaria parasite responding to artemisinins. The further study for the other RNA binding protein fused to GFP proteins could be generated and would provide a better overall view of RNA binding proteins in *P. falciparum.* This studies provide novel insights into the parasite transcription and thus allow better understanding of mechanism of the drug action. This study together with the previously published expression profiles will help for better understanding of *P. falciparum* biology and may lead to the potential development of novel therapeutic agents for malaria.

Keywords: Artemisinins; gene expression; *Plasmodium falciparum*; Transcription factor Proteins (TAPs)