POST-TRANSLATIONAL ACTIVATION OF THE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRESS RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR STB5

SAOWANEE SUWANBENJAKUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2015

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

POST-TRANSLATIONAL ACTIVATION OF THE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRESS RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR STB5

SAOWANEE SUWANBENJAKUN 5436635 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: LARAN T. JENSEN, Ph.D. MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D., SARAWUT JITRAPAKDEE, Ph.D.

ABSTRACT

The increase in clinical infections from pathogenic fungi and the development of drug resistance demonstrates the need for new antifungal agents. We utilized the non-pathogenic baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model for pathogenic fungi such as *Candida*, *Aspergillus*, and *Cryptococcus* species to characterize possible drug targets. The number of targets for antifungal drugs is limited due to the similarity between fungi and animals; however, the zinc cluster transcription factor Stb5p is fungal specific, making it an ideal target for antifungal agents. The transcriptional regulator Stb5p is a central factor in oxidant sensing and drug resistance. The key targets of Stb5p are genes in the pentose phosphate pathway, a major source of NADPH. Increased production of reactive oxygen species is known to occur following exposure to many antifungal compounds, and the role of Stb5p in the response to antifungal agents may be linked to sensing of oxidants. However, the mechanism leading to activation of Stb5p in response to oxidants and antifungal agents is not known. The aims of this project are to gain insight into potential mechanisms that Stb5p may utilize to sense elevated levels of reactive oxygen species (ROS). We have examined several possible mechanisms for Stb5p activation including changes in phosphorylation of the DNA binding domain, direct oxidation of cysteine residues, and possible binding of nucleotide cofactors ($NADP^+$). In addition, the regulatory region of Stb5p was mapped to a 78 amino acid region within the central domain (MHR). Based on current results, the best model for Stb5p response to oxidants involves sensing changes in the $NADP^+$/NADPH balance although whether or not Stb5p directly binds to $NADP^+$ has not been determined. Understanding mechanisms through which Stb5p is activated has the potential to assist in the development of therapeutic agents to impair Stb5p function that may act as fungicides or enhance the effectiveness of currently available antifungal drugs.

KEY WORDS: TRANSCRIPTION FACTOR / STB5 / PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY / NADPH / $NADP^+$ / OXIDATIVE STRESS / ANTIOXIDANT MOLECULE / ANTIFUNGAL DRUGS

Copyright by Mahidol University

102 pages

ศึกษาการกระตุ้นหลังจากการแปลรหัสของโปรตีน Stb5p ที่ตอบสนองต่อความเครียด

POST-TRANSLATIONAL ACTIVATION OF THE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRESS RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR STB5

เสาวนีย์ สุวรรณเบญจกุล 5436635 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: LARAN T. JENSEN, Ph.D., มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D., ศราวุฒิ จิตรภักดี, Ph.D.

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการเพิ่มขึ้นของการติดเชื้อจากเชื้อราก่อโรคและการพัฒนาของการดื้อยา แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการพัฒนายาต้านเชื้อราตัวใหม่ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของยาต้านเชื้อรา การวิจัยใช้ยีสต์ขนมปังซึ่งจัดอยู่ในประเภทเชื้อราที่ไม่ก่อโรคเรียกว่า *Saccharomyces cerevisiae* เป็นแบบจำลองการศึกษาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเช่น *Candida*, *Aspergillus* และสายพันธุ์ *Cryptococcus* เพื่อศึกษาหาเป้าหมายใหม่ในการเพิ่มประสิทธิภาพของยาต้านเชื้อรา เนื่องจากการพัฒนายาต้านเชื้อราในปัจจุบันนั้นมีอยู่อย่างจำกัดเพราะความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อราและสัตว์ อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนถอดรหัสชื่อ Stb5p ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนถอดรหัสซึ่งทำงานโดยใช้สังกะสีเป็นโคแฟกเตอร์ โปรตีน Stb5p พบได้ในเฉพาะเชื้อเราเท่านั้น ซึ่งนับว่าเป็นเป้าหมายใหม่ที่เหมาะสมสำหรับพัฒนายาต้านเชื้อรา โปรตีนถอดรหัส Stb5p เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการตรวจจับอนุมูลอิสระและความต้านทานต่อยา มีความสำคัญในวิถีเพนโตสฟอสเฟต และการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระเรียกว่า NADPH โดยทั่วไปยาต้านเชื้อรานั้นทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ และโปรตีน Stb5p อาจมีบทบาทในการตอบสนองของอนุมูลอิสระจากยาต้านเชื้อรา ที่สำคัญคือการทำงานของโปรตีนถอดรหัส Stb5p ในการตอบสนองต่ออนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อรานั้นยังไม่ทราบชัดเจน วัตถุประสงค์สำคัญของงานวิจัยนี้คือเพื่อเข้าใจกลไก และการตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (ROS) ของโปรตีนถอดรหัส Stb5p เราพบว่ากลไกการทำงานที่อาจเป็นได้ของโปรตีนถอดรหัส Stb5p คือการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟอสเฟสของส่วนที่ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ การกระตุ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดอะมิโนซีสเทอีน และการควบคุมโดยโคแฟกเตอร์ $NADP^+$ ซึ่งทำหน้าที่จับกับนิวคลีโอไทด์ เราพบว่าส่วนที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของโปรตีนถอดรหัส Stb5p คือส่วนของกรดอะมิโนทั้งหมด 78 ตัว ที่อยู่ในส่วนกลาง ของโปรตีนถอดรหัส Stb5p จากผลการทดลองนี้สามารถทราบได้ว่ากลไกการทำงานในการตรวจจับอนุมูลอิสระของโปรตีนถอดรหัส Stb5p นั้นเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสมดุลระหว่าง $NADP^+$/NADPH แม้ว่ายังไม่ทราบชัดเจนว่าโคแฟกเตอร์ $NADP^+$ สามารถควบคุมการทำงานของโปรตีนถอดรหัส Stb5p ได้โดยตรงหรือไม่ ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของโปรตีนถอดรหัส Stb5p นั้นมีศักยภาพที่จะช่วยในการพัฒนายาต้านเชื้อราโดยการเสียการทำงาน Stb5p ที่อาจเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพของยาต้านเชื้อรา

Copyright by Mahidol University

102 หน้า