

**CHARACTERIZATION OF HEAT SHOCK PROTEIN 90B  
(HSP90B) GENE AND ITS PROMOTER IN THE UNICELLULAR  
GREEN ALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***



**SOMCHOKE TRAEWACHIWIPHAK**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2017**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

CHARACTERIZATION OF HEAT SHOCK PROTEIN 90B (*HSP90B*) GENE AND ITS PROMOTER IN THE UNICELLULAR GREEN ALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

SOMCHOKE TRAEWACHIWIPHAK 5237117 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: KITTISAK YOKTHONGWATTANA, Ph.D., JAMORN SOMANA, M.D., Ph.D., CHOTIKA YOKTHONGWATTANA, Dr.Sc.

ABSTRACT

The heat shock proteins (HSPs) are proteins that play important roles in cellular protein homeostasis. There are six classified groups of the HSP proteins: HSP100/Clp, HSP90, HSP70, HSP60/chaperonin, small heat-shock proteins, and calnexin/calreticulin. Due to relatively scarce information at the gene regulation level in the literature, HSP90 family was the subject of interest in this study. In the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, there are three *HSP90* genes: *HSP90A*, *HSP90B*, and *HSP90C*. Among the three, *HSP90B* is the least studied, especially in photosynthetic organisms. In this dissertation, the attempt was made to characterize the *HSP90B* gene as well as the promoter sequence in the model alga *C. reinhardtii*. I found that the *HSP90B* genome contained 13 exons and 12 introns encoding for ER-localized protein of 819 amino acids. The *HSP90B* expression was strongly induced by heat while short-term exposure to other abiotic stresses, such as salinity, or light stress did not appear to affect the expression. Promoter truncation analysis revealed a core constitutive promoter sequence between -1 to -387 bp from the ATG site. Promoter sequence analyses along with ChIP assay followed by qPCR and DNA-protein pull-down assay suggested that the sequence upstream of the core promoter contained repressive elements including sequences with high histone-binding preference as well as putative repressor binding site(s).

KEY WORDS: *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*/ HEAT SHOCK PROTEIN 90B/ PROMOTER ANALYSIS/ ER

120 pages

การศึกษาลักษณะของยีนและโปรโมเตอร์ของ HEAT SHOCK PROTEIN 90B (*HSP90B*) ในสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

CHARACTERIZATION OF HEAT SHOCK PROTEIN 90B (*HSP90B*) GENE AND ITS PROMOTER IN THE UNICELLULAR GREEN ALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

สมโชค แตรวจีวิภาค 5237117 SCBC/D

ปร.ค. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา, Ph.D., จามร สมณะ, M.D., Ph.D., โชติกา หยกทองวัฒนา, Dr.Sc.

#### บทคัดย่อ

ฮีตช็อกโปรตีน (HSPs) มีบทบาทที่สำคัญในระดับเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยโปรตีน HSPs สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ๆ โดยแบ่งแยกตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล ดังนี้: HSP100/Clp, HSP90, HSP70, HSP60/chaperonin, small heat-shock proteins และ calnexin/calreticulin ซึ่งในงานวิจัยชิ้นนี้จะสนใจศึกษาโปรตีนในกลุ่ม HSP90 เนื่องจากในบทความงานวิจัยที่อธิบายเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีนในกลุ่มนี้มีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับ HSPs กลุ่มอื่นๆ ในสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Chlamydomonas reinhardtii* มียีนที่สร้างโปรตีน HSP90 อยู่ 3 ชนิด ได้แก่ *HSP90A*, *HSP90B* และ *HSP90C* แต่ยีน *HSP90B* ในสาหร่ายชนิดนี้ยังไม่ค่อยมีใครศึกษา โดยเฉพาะในพืช งานวิจัยนี้จะศึกษาคุณลักษณะของยีนและส่วนของโปรโมเตอร์ในสาหร่าย *C. reinhardtii* จากการศึกษาพบว่าในจีโนมของ *HSP90B* ที่ถอดรหัสได้โปรตีนความยาวจำนวน 819 กรดอะมิโนที่ทำงานอยู่ใน ER ประกอบไปด้วย exon จำนวน 13 ส่วน และ intron จำนวน 12 ส่วนตามลำดับ จากนั้นก็มาดูการแสดงออกของยีนพบว่า ความร้อนเท่านั้นที่เหนี่ยวนำในการแสดงออกของยีน *HSP90B* ขณะที่ปัจจัยความเครียดอื่นๆ ไม่มีผล นอกจากนี้ผลการศึกษารื่อง Promoter truncation analysis พบว่าบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนจะอยู่บริเวณที่ตำแหน่งเบส -1 ถึง -387 จากตำแหน่ง ATG และผลการศึกษาลำดับโปรโมเตอร์พ่วงด้วยวิธี ChIP-qPCR และวิธี DNA-protein pull-down พบว่าบริเวณที่อยู่เหนือ (upstream) จากแกนโปรโมเตอร์ (core promoter) ประกอบไปด้วยตำแหน่งที่มีอิทธิพลทางลบซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีน *HSP90B* ในเซลล์ ซึ่งส่วนนี้เป็นบริเวณที่มีโปรตีน histone มาเกาะอย่างหนาแน่นและเป็นบริเวณที่โปรตีน repressor มาลงเกาะเพื่อควบคุมการทำงานของโปรโมเตอร์