181210

ใน *Spirulina platensis* กระบวนการสังเคราะห์ GLA มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการเติมพันธะคู่ คือ Δ9- Δ12- และ Δ6 desaturase ซึ่งเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่ง Δ9, Δ12 และ Δ6 ของ stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1$^{\Delta 9}$) และ linoleic acid (C18:2$^{\Delta 9,12}$) ตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสามชนิดถูกสร้างโดยการทำงานของ *desC, desA* และ *desD* ตามลำดับ วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาการแสดงออกของยีน desaturases ดังกล่าวที่ระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ของ *S. platensis* Z19/2 ในระดับ transcription โดยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ 16S rRNA เป็น internal control เนื่องจากพบว่ามีการแสดงออกของยีนคงที่ตลอดระยะการเจริญเติบโตแต่จะลดลงในระยะ death และศึกษาการแสดงออกในระดับ translation โดยวิธี Western Blot Analysis ในพลาสมา และไทลาคอยด์เมมเบรน ผลจากการศึกษาพบว่า ระยะการเจริญเติบโตมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน desaturase โดยการแสดงออกของยีน *desC* และ *desD* เพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงกลางระยะ log (ชั่วโมงที่ 92) การเพิ่มขึ้นของยีน *desC* สอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์ Δ9 desaturase ในพลาสมาเมมเบรน อาจเนื่องมาจากในช่วงแรกเซลล์ต้องการเอนไซม์ Δ9 desaturase ปริมาณมากเพื่อเปลี่ยน C18:0 ไปเป็น C18:1$^{\Delta 9}$ ซึ่งเป็น substrate ในการสังเคราะห์ C18:2$^{\Delta 9,12}$ และ C18:3$^{\Delta 6,9,12}$ ต่อไป แต่ในไทลาคอยด์เมมเบรนปริมาณเอนไซม์ Δ9 desaturase ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ส่วนการเพิ่มของยีน *desD* สอดคล้องกับปริมาณของเอนไซม์ Δ6 desaturase ที่เพิ่มขึ้นทั้งในพลาสมา และไทลาคอยด์เมมเบรน หลังจากนั้นการแสดงออกของยีน *desC* และ *desD* ลดลง และมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ในระยะ stationary ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับปริมาณของเอนไซม์ Δ9 desaturase ในพลาสมาเมมเบรน และ Δ6 desaturase ในพลาสมา และไทลาคอยด์เมมเบรน ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน *desC* ในพลาสมาเมมเบรนถูกควบคุมที่ระดับ transcription ขณะที่ในไทลาคอยด์เมมเบรนถูกควบคุมที่ระดับ translation ส่วนยีน *desD* ทั้งในพลาสมา และไทลาคอยด์เมมเบรนถูกควบคุมที่ระดับ transcription ในขณะที่ยีน *desA* พบว่ามีการแสดงออกคงที่ตลอดระยะการเจริญเติบโต แต่กลับพบว่าเอนไซม์ 45 kDa- และ 40 kDa-Δ12 desaturase ในไทลาคอยด์เมมเบรนเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงเริ่มแรกระยะ log หลังจากนั้นลดลง และคงที่ถึงระยะ early stationary แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงปลายระยะ stationary ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งหนึ่ง ส่วนปริมาณเอนไซม์ 45 kDa-Δ12 desaturase ในพลาสมาเมมเบรน พบว่าเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงปลายระยะ log หลังจากนั้นลดลงในช่วงเริ่มแรกระยะ stationary และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ช่วงปลายระยะ stationary ในขณะที่ C18:2$^{\Delta 9,12}$ ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะการเจริญเติบโต แต่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงปลายระยะ stationary และ death [12] อาจเนื่องมาจากในช่วงแรกของการเจริญปริมาณเอนไซม์ Δ12 desaturase สูงขึ้นเพื่อเปลี่ยน C18:1$^{\Delta 9}$ ไปเป็น C18:2$^{\Delta 9,12}$ แต่ขณะเดียวกันเอนไซม์ Δ6 desaturase ก็มีปริมาณสูงขึ้นด้วย ทำให้ C18:2$^{\Delta 9,12}$ เปลี่ยนเป็น C18:3$^{\Delta 6,9,12}$ ทำให้ปริมาณ C18:2$^{\Delta 9,12}$ ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง ส่วนในช่วงปลายระยะ stationary ปริมาณ C18:2$^{\Delta 9,12}$ ที่สูงขึ้นนั้นสอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงดังกล่าว และอาจเป็นผลมาจากการที่ปริมาณเอนไซม์ Δ6 desaturase ลดลง ทำให้เกิดการสะสมของ C18:2$^{\Delta 9,12}$ มากขึ้นด้วย จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายีน *desA* ในพลาสมาและไทลาคอยด์เมมเบรน น่าจะถูกควบคุมที่ระดับ translation

Abstract

181210

In *Spirulina platensis*, the synthesis of γ-linolenic acid (GLA) involves three desaturases, Δ9- Δ12- and Δ6 desaturase. These enzymes introduce double bonds at Δ9 Δ12 and Δ6 position of stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1$^{\Delta 9}$) and linoleic acid (C18:2$^{\Delta 9,12}$), which are regulated by *desC, desA* and *desD*, respectively. This thesis aims to study the expression of desaturase genes at various growth phases of *S. platensis* Z19/2 at the transcriptional level by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using 16S rRNA as an internal control (because of its constance throughout the experiment before decreasing in the death phase) and the translational level in the plasma and thylakoid membrane by western blot analysis. The results demonstrated the effect of growth phase on the expression of desaturase genes. The expression of *desC* and *desD* increased in the mid log phase (92 hours) corresponding to high level of Δ9 desaturase in the plasma membrane. This might be because of Δ9 desaturase is initially needed by the cells for the transformation of C18:0 to C18:1$^{\Delta 9}$, which is the precursor of C18:2$^{\Delta 9,12}$ and C18:3$^{\Delta 6,9,12}$. However, Δ9 desaturase in the thylakoid membrane was at a constant level. The increase of *desD* expression corresponded to Δ6 desaturase in the plasma and thylakoid membrane. After that, *desC* and *desD* expression decreased and kept at constant level in the stationary phase, corresponding to Δ9 desaturase in the plasma membrane and Δ6 desaturase in the plasma and thylakoid membrane. The results demonstrated that the expression of *desC* was regulated at the transcriptional level in the plasma membrane, but at the translational level in the thylakoid membrane, whereas the *desD* was regulated at the transcriptional level in both the plasma and thylakoid membrane. In the case of *desA*, the constant level of gene expression during various growth phases was found. However, 45 kDa- and 40 kDa-Δ12 desaturases in the thylakoid membrane increased in the early log phase, and changed to decreased and then to constant level until the early stationary phase. Finally, this enzyme was increased again in the late stationary phase. On the other hand, 45 kDa-Δ12 desaturase in the plasma membrane increased in the late log phase and decreased in the early stationary phase and then to increase in the late stationary phase. Nevertheless, the level of C18:2$^{\Delta 9,12}$ was constant during various growth phases, but increased in the late stationary and death phase [12]. This might be due to the increase of Δ12 desaturase that is required for transformation of C18:1$^{\Delta 9}$ to C18:2$^{\Delta 9,12}$. However, Δ6 desaturase increased that affects transformation of C18:2$^{\Delta 9,12}$ to C18:3$^{\Delta 6,9,12}$. Therefore, C18:2$^{\Delta 9,12}$ was not changed. In the late stationary, the increase of C18:2$^{\Delta 9,12}$ corresponded to the increase level of Δ12 desaturase and the decrease level of Δ6 desaturase, resulting in the accumulation of C18:2$^{\Delta 9,12}$. The results indicated that *desA* in the plasma and thylakoid membrane were regulated at the translational level.

Keywords: *Spirulina platensis* / Gene Expression / Desaturase / Transcription / Translation