MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A cDNA ENCODING ARGONAUTE PROTEIN FROM *PENAEUS MONODON*

MANASAVE DECHKLAR

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-6899-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลนและการศึกษาหน้าที่ของ cDNA ที่สร้างโปรตีน Argonaute ในกุ้งกุลาดำ
(MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A cDNA ENCODING ARGONAUTE PROTEIN FROM *PENAEUS MONODON*)

มนัสวี เดชกล้า 4636878 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D., เฉลิมพร องศ์วรโสภณ, Ph.D., วิฑูรย์ ถิระโสภณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

Argonaute เป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่หลากหลายทั้งในกระบวนการเจริญเติบโตและในกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ ที่เรียกว่า RNA interference (RNAi) การศึกษาวิจัยนี้เป็นการโคลนยีน Argonaute ของกุ้งกุลาดำ โดยใช้อาร์เอ็นเอซึ่งสกัดจากต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำในการสังเคราะห์ชิ้น cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งใช้ไพร์เมอร์ที่ถูกออกแบบจากลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดนี้ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ชิ้นของ cDNA ที่สร้างโปรตีน Argonaute ของกุ้งกุลาดำ (Pem-AGO) มีขนาด 2,829 นิวคลีโอไทด์ และลำดับของกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยลักษณะสำคัญของโปรตีน Argonaute ได้แก่ส่วนอนุรักษ์ที่เรียกว่า PAZ และ PIWI domain การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ในกระบวนการ RNAi ได้ใช้วิธีการนำอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สังเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Argonaute เข้าสู่เซลล์ปฐมภูมิจากต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำ จากการทดลองพบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อ Argonaute มีผลทำให้มีการแสดงออกของ Argonaute ในเซลล์ลดลงประมาณ 30% การศึกษาผลกระทบของระดับ Argonaute ในเซลล์ ต่อกระบวนการ RNAi ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในกุ้งกุลาดำ พบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อตัวตอบรับซีโรโตนินสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนสร้างตัวตอบรับซีโรโตนินได้ในเซลล์ที่มี Argonaute ในระดับปรกติ ในทางตรงกันข้ามอาร์เอ็นเอสายคู่ของตัวตอบรับซีโรโตนินไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้เมื่อระดับของArgonaute ลดลง อย่างไรก็ตาม การศึกษาทำนองเดียวกันนี้กับยีนที่สร้างโปรตีนของไวรัสหัวเหลือง ไม่เห็นผลที่ชัดเจนของระดับของ Argonaute ในเซลล์ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนไวรัสหัวเหลืองด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะ กล่าวโดยสรุปยีนที่สร้าง Argonaute ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ มีความสำคัญต่อกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่หรือ RNAi ในเซลล์ของกุ้งกุลาดำ

117 หน้า ISBN 974-04-6899-3

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A cDNA ENCODING ARGONAUTE PROTEIN FROM *PENAEUS MONODON*

MANASAVE DECHKLAR 4636878 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS : APINUNT UDOMKIT, Ph.D.,
CHALERMPORN ONGVARRASOPONE, Ph.D., WITOON TIRASOPHON, Ph.D.

ABSTRACT

Argonaute proteins are present in diverse organisms ranging from yeast to humans. In addition to their role in developmental control, some Argonautes have been shown to play essential roles in a variety of post-transcriptional RNA-mediated gene silencing pathways, including RNA interference or RNAi mediated by sequence-specific double-stranded RNA. This work is aimed at the characterization of an Argonaute that associates with RNAi in the shrimp *Penaeus monodon* in order to provide an in-depth understanding of the RNA-mediated gene silencing mechanism in the shrimp. A total of 2,829 bp of the cDNA encoding Argonaute of *P. monodon* (Pem-AGO) was obtained from RT-PCR and RACE methods, using mRNA from the lymphoid (Oka) organ as a template. The deduced amino acid sequence of Pem-AGO contained the two conserved domains, PAZ and PIWI, which are the signature of the Argonaute family. The requirement for Pem-AGO in RNAi was explored in the primary Oka cell culture of *P. monodon*. Transfection with three dsRNAs corresponding to different regions in the Pem-AGO sequence resulted in approximately 30% reduction of Pem-AGO expression in the Oka cells. The subsequent effect of the depletion in Pem-AGO mRNA level on the efficacy of RNAi was determined by the amount of silencing in the endogenous 5-HT receptor gene by its specific dsRNA. Pem-AGO depletion led to impaired RNAi as demonstrated by partial restoration of 5-HT receptor gene expression in the cells that acquired dsRNAs, which target both the Pem-AGO and 5-HT receptor genes. By contrast, only slight or no impairment of RNAi was seen when the exogenous gene, the protease gene of yellow head virus, was targeted for silencing in Pem-AGO depleted cells. In summary, the results from this study suggest the involvement of Pem-AGO in RNA-mediated gene silencing by RNAi mechanism in *P. monodon*.

KEY WORDS: *PENAEUS MONODON*/ ARGONAUTE PROTEIN/ RNAi PATHWAY/ dsRNA/POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING

117 P. ISBN 974-04-6899-3