

**EXPRESSION OF ARGONAUTE PROTEIN OF *PENAEUS*
MONODON AND CHARACTERIZATION OF ITS
BIOCHEMICAL FUNCTION**

NARAKORN KHUNWEERAPHONG

**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 974-04-7670-8
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การแสดงออกและการศึกษาคุณลักษณะหน้าที่ทางชีวเคมีของโปรตีน Argonaute ในกิ้งกูดาคำ
(EXPRESSION OF ARGONAUTE PROTEIN OF *PENAEUS MONODON* AND
CHARACTERIZATION OF ITS BIOCHEMICAL FUNCTION)

นรากร คุณวีระพงศ์ 4737243 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D., สกต พันธุ์อิม, Ph.D.,
เฉลิมพร องค์กรโสภณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

โปรตีน Argonaute เป็นองค์ประกอบหลักของโมเลกุล RISC ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมยีน ทำให้เกิดการตัดสาย mRNA แบบจำเพาะใน siRNA pathway หรือการยับยั้งการสร้างโปรตีนใน miRNA pathway กระบวนการนี้เรียกว่า RNA interference (RNAi) ซึ่งมีบทบาทในการป้องกันไวรัสในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด การศึกษาความเข้าใจกระบวนการ RNAi ในกิ้งกูดาคำจึงมีประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีป้องกันโรคไวรัสของกิ้งกูดาคำ

โปรตีน Argonaute มี 2 บริเวณอนุรักษ์ ได้แก่ บริเวณ PAZ ที่ใช้จับกับ RNA และ บริเวณ PIWI ที่มีโครงสร้างเหมือน endonuclease งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแสดงออกและวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนลูกผสม Argonaute ของกิ้งกูดาคำ (Pem-AGO) และ PAZ domain ในการทดลองนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม PAZ domain ในยีสต์ *Pichia pastoris* ทั้งในรูปของโปรตีนภายในเซลล์และโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ ด้วยเหตุนี้จึงทำการแสดงออกของโปรตีนใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS แทน โดยใช้พลาสมิด pET-15b เพื่อสร้างโปรตีนลูกผสมของ Pem-AGO และ PAZ domain ในรูปที่เชื่อมต่อกับ histidine ทางปลายอะมิโน โปรตีนลูกผสมที่แสดงออกมาในรูปที่ละลายน้ำได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการจับกับ RNA โดยวิธี Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) โดยใช้ RNA สายเดี่ยวที่ทำการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี พบว่าโปรตีน PAZ สามารถจับกับ RNA สายเดี่ยวและสายคู่ได้ดีกว่าการจับกับ DNA ส่วนหน้าที่ของโปรตีน Argonaute ที่ทดสอบโดยวิธี mRNA cleavage assay เพื่อศึกษาการตัดสาย mRNA แบบจำเพาะ อย่างไรก็ตามการทดลองเบื้องต้นยังไม่ประสบความสำเร็จ กล่าวโดยสรุป ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า Pem-AGO น่าจะมีบทบาทในกระบวนการ RNAi เนื่องจากมี PAZ domain ที่จับกับ RNA อย่างจำเพาะ ซึ่งเป็นคุณลักษณะอย่างหนึ่งของโปรตีน Argonaute ในกระบวนการ RNAi อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่า Pem-AGO ทำหน้าที่ในกระบวนการตัดสาย RNA แบบจำเพาะ (siRNA pathway) หรือ กระบวนการยับยั้งการสร้างโปรตีน (miRNA pathway)

EXPRESSION OF ARGONAUTE PROTEIN OF *PENAEUS MONODON* AND CHARACTERIZATION OF ITS BIOCHEMICAL FUNCTION**NARAKORN KHUNWEERAPHONG 4737243 MBMG/M****M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)****THESIS ADVISORS : APINUNT UDOMKIT, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D.,
CHALERMPORN ONGVARRASOPONE, Ph.D.****ABSTRACT**

Argonaute protein is the core component of RISC (RNA-induced silencing complex) that plays a critical role in post-transcriptional silencing of gene expression resulting in sequence-specific mRNA cleavage (siRNA pathway) or translation suppression (miRNA pathway). This mechanism is known as RNA interference (RNAi) which is responsible for antiviral mechanism in eukaryotes. The understanding of RNAi in shrimp is essential for development of an effective viral defense strategy in the future.

Argonaute proteins are defined by the presence of 2 conserved regions, RNA-binding PAZ domain and the endonuclease-like PIWI domains. This study emphasizes the expression of the recombinant Argonaute (Pem-AGO) and PAZ domain proteins of *P. monodon* and characterizes their biochemical function in the RNAi pathway. Recombinant PAZ domain protein was firstly expressed in *Pichia pastoris* expression system. However, the recombinant protein could not be observed in either the intracellular or extracellular compartment. Accordingly, the expression system was altered to *Escherichia coli* (BL21(DE3)pLysS) by utilizing pET-15b as an expression vector to produce the recombinant Pem-AGO and PAZ domain protein as N-terminal hexahistidine fusion-tagged proteins with the molecular weight 108 kDa for Pem-AGO and 19 kDa for PAZ domain protein. The soluble fractions were further purified by Ni²⁺ column affinity chromatography.

The RNA binding activity of the recombinant PAZ domain was investigated by Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) with ³²P-labeled ssRNA. By using ssRNA, dsRNA or ssDNA as competitors, the result revealed that the PAZ domain binds preferentially to RNA, either single- or double-stranded, rather than to DNA. The function of Argonaute protein in sequence-specific mRNA cleavage was characterized by mRNA cleavage assay. However, the primary attempt on mRNA cleavage assay to determine the function of Argonaute protein has not been successful. The results implied that Pem-AGO should participate in RNAi pathway as it possesses preferential RNA binding activity of the PAZ domain. Nevertheless, it cannot be concluded at this point whether Pem-AGO functions in the siRNA or miRNA pathway.

**KEY WORDS: ARGONAUTE/ RNA INTERFERENCE/ RISC/ PAZ/
PENAEUS MONODON**

195 P. ISBN 974-04-7670-8