

12 MAY 2000



**MOLECULAR CLONING OF A cDNA ENCODING
NEUROPEPTIDE HORMONE IN THE CHH/MIH/GIH FAMILY
FROM *Penaeus monodon***

THIRANAN WONGSOMBAT

**With compliments
of**

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ส. นพรัตน์

**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**

2000

ISBN 974-663-590-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH

T445m

2000

c.2

43851 c.2

Copyright by Mahidol University

4036153 MBMG/M : MAJOR : MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING ; M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

KEY WORDS : *Penaeus monodon*, NEUROPEPTIDES, CHH/MIH/GIH, cDNA, RACE, RT-PCR.

THIRANAN WONGSOMBAT : MOLECULAR CLONING OF A cDNA ENCODING NEUROPEPTIDE HORMONE IN THE CHH/MIH/GIH FAMILY FROM *Penaeus monodon*. THESIS ADVISORS : APINUNT UDOMKIT, Ph.D., BURACHAI SONTAYANON, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D. 128 P. ISBN 974-663-590-5

Crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH) and gonad inhibiting hormone (GIH) are members of a novel neuropeptide family produced in the X-organ sinus gland complex in the eyestalks of crustacean. These hormones play important roles in controlling several physiological processes such as regulation of growth and maturation in crustaceans. This study was an attempt to clone and characterize the cDNA encoding neuropeptide hormone in the CHH/MIH/GIH family (Pem-CMG3) from black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by using the technique of Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). Total RNA from a single pair of eyestalk was used as a template for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The primer PM2, designed from the amino acid sequence that is conserved among the hormones in CHH/MIH/GIH family, was used to amplify the 3' fragment of Pem-CMG3 cDNA. Analysis of the nucleotide sequences of several recombinant clones and their deduced amino acid sequence revealed that four of them exhibited a high degree of homology (52-99%) with the hormones in the CHH/MIH/GIH family. The nucleotide sequence of 3'-CMG#71 showed the lowest degree of homology (48%) to the consensus among the four clones but shared 72% identity to a cDNA encoding growth-related peptide of *P. monodon*, Pem-CMG, that was successfully cloned in our laboratory. In order to generate the 5' end of the CMG3 cDNA, a set of specific primers (GSP1, GSP2, GSP3) were designed corresponding to the nucleotide sequences of the 3'UTR of 3'-CMG#71 clone. Nucleotide sequences analysis of the 5'-CMG3 recombinant clones revealed that three clones contained cDNA insert homologous to the cDNA of hormones in the CHH/MIH/GIH family. These three individual clones showed differences at 2 positions, one of them gave rise to change in amino acid level. The 5' and 3' fragments of CMG3 shared a 211 bp overlapping sequence. Differences in nucleotide sequences between these two fragments were found within the overlapping region, two of them caused change in one amino acid residue. The full-length cDNA of Pem-CMG3 was obtained by PCR amplification with specific primers, CMG-F and GSP1, designed according to the sequences at the 5' and 3' ends of the RACE products. Nucleotide sequence analysis of six recombinant clones revealed two types of cDNA encoding growth-related peptide that are different from each other at one encoded amino acid position. Four out of six clones shared one type, and the rest shared another type. The full-length cDNA of 617 bp revealed a 381 bp open reading frame of the Pem-CMG3, a 74 bp 5'UTR and a 161 bp 3'UTR. The deduced amino acid was composed of 74 amino acid residues of mature peptide and 53 amino acid residues of leader peptide. The mature peptide of Pem-CMG3 shared 31-93% identity in amino acid sequence to the hormones in the CHH/MIH/GIH family from several crustaceans. Using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method, the gene encoding the Pem-CMG3 was shown to be expressed in the eyestalk, not in the muscle and hepatopancrease.

In conclusion, the cDNA encoding a new member of the CHH/MIH/GIH family of *P. monodon* (Pem-CMG3) was successfully cloned. The Pem-CMG3 peptide contains all characteristics of this hormone family and the expression of Pem-CMG3 transcript seems to be restricted to the eyestalk.

4036153 MBMG/M : สาขาวิชา : อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ : วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

กิตติบัตร วิทยานิพนธ์ : การโคลน cDNA ที่สร้างเปปไทด์ฮอร์โมน ในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากกึ่งกลาง (MOLECULAR CLONNING OF A cDNA ENCODING NEUROPEPTIDE HORMONE IN THE CHH/MIH/GIH FAMILY FROM *Penaeus monodon*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D., บุษย์ สันทรานนท์, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D. 128 หน้า ISBN 974-663-590-5

CHH/MIH/GIH เป็นกลุ่มของเปปไทด์ ฮอร์โมนที่สร้างโดย X-organ sinus gland ในก้านตาของ crustacean ฮอร์โมนกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญต่อขบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาหลายด้าน เช่น การควบคุมการเจริญเติบโต และการลอกคราบ การศึกษาวิจัยนี้เป็นการโคลน cDNA สำหรับฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH (*Pem-CMG3*) จากกึ่งกลาง (*Penaeus monodon*) โดยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) โดยใช้ total RNA ซึ่งสกัดจากก้านตา 1 คู่ของกึ่งกลางเป็น template สำหรับปฏิกิริยา RT-PCR และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ (CEDCYN) ซึ่งพบในฮอร์โมนกลุ่มนี้ ในการสร้าง cDNA ทางด้านปลาย 3' พบว่ามี 4 โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งถอดรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับฮอร์โมนกลุ่มนี้ อย่างมีนัยสำคัญ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน 3'-CMG#71 แตกต่างอย่างชัดเจนกับอีก 3 โคลน (3'-CMG#38, 3'-CMG#90, 3'-CMG#91) แต่มีความคล้ายกับ cDNA ที่สร้าง growth-related peptide จากกึ่งกลาง (*Pem-CMG*) ซึ่งได้ทำการโคลนและ ศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิแล้ว ส่วนในการสร้าง cDNA ทางด้านปลาย 5' ของ *Pem-CMG3* นั้น ได้มีการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะโดยอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ทางด้านปลาย 3' ของ 3'-CMG#71 พบว่ามี 3 โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH และพบว่าในสามโคลนนี้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง ซึ่งทำให้ลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 1 ตำแหน่ง ขึ้น cDNA ทางด้านปลาย 3' และ 5' ที่โคลนได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ overlap กัน 211 นิวคลีโอไทด์ และมีความแตกต่างกันในบริเวณนี้ 3 ตำแหน่ง ซึ่งทำให้ลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 1 ตำแหน่ง ได้ทำการเพิ่มจำนวน full-length cDNA ของ *Pem-CMG3* โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบโดยอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ทางด้านปลาย 3' และ 5' ของ *Pem-CMG3* พบว่ามี cDNA ของ *Pem-CMG3* 2 แบบ แบบที่ 1 มีจำนวน 4 โคลนและแบบที่ 2 มีจำนวน 2 โคลน ขึ้น full-length cDNA ของ *Pem-CMG3* ทั้ง 2 แบบถอดรหัสได้เป็นลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง จากการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของ *Pem-CMG3* cDNA พบว่าประกอบด้วยส่วนของ open reading frame 381 นิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัสได้กรดอะมิโน 53 ตัวในส่วน leader peptide และ 74 ตัวในส่วน mature peptide ซึ่งส่วน mature peptide ของ *Pem-CMG3* นี้มีความเหมือนระหว่าง 31% ถึง 93% กับฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH ของ crustacean ชนิดต่างๆ การศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ของ *Pem-CMG3* ในเนื้อเยื่อต่างๆของกึ่งกลาง โดยวิธี RT-PCR พบว่า *Pem-CMG3* mRNA แสดงออกใน eyestalk แต่ไม่แสดงออกใน muscle และ hepatopancrease