

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน HtrA2 และ IAP ของกิ้งกูดดำ
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นายรักจิต สุวรรณบุรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.พงศ์ศักดิ์ ขุนแร่
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาประยุกต์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
พ.ศ.	2555

บทคัดย่อ

การตายของเซลล์แบบ apoptosis เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์เพื่อใช้ในการกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการ เช่นเซลล์ที่เสื่อมสภาพอันเกิดจากการติดเชื้อ โดยมีโปรตีน caspase เป็นโปรตีนสำคัญในการรับผิดชอบให้เกิดกระบวนการ apoptosis นอกจากนี้ยังมีโปรตีน IAP ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งกระบวนการ apoptosis ในขณะที่โปรตีน HtrA2 มีหน้าที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ผ่านการยับยั้งการทำงานของโปรตีน IAP โดยการไปจับที่ BIR domains ของโปรตีน IAP ซึ่งรูปแบบการควบคุมกระบวนการ apoptosis โดยกลุ่มโปรตีนดังกล่าวได้ถูกศึกษาพบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง และมีการอนุรักษ์รูปแบบอยู่ในสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต สำหรับกิ้งกูดดำนั้นมีการค้นพบโปรตีน *Pmcaspase*, *PmIAP*, และ *PmHtrA2* เช่นเดียวกับสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมและแมลงหวี่ โดยในปัจจุบันมีการยืนยันปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmIAP* กับ *Pmcaspase* ของกิ้งกูดดำแล้ว ขาดแต่เพียงปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน *PmIAP* กับ *PmHtrA2* ที่ยังไม่มีหลักฐานแสดงถึงปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกและผลิตโปรตีน *PmIAP*, BIR domains และ *PmHtrA2* ด้วยเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยมีการใช้การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Thioredoxin เพื่อช่วยส่งเสริมการแสดงออกของโปรตีนที่ศึกษา ผลที่ได้คือสามารถประสบความสำเร็จในการแสดงออกและการผลิตโปรตีน *PmHtrA2* และ BIR domains ได้ในปริมาณสูง อย่างไรก็ตามสำหรับโปรตีน *PmIAP* นั้นสามารถผลิตได้เฉพาะบางส่วนซึ่งมีขนาดเพียงแค่ 56.8 kDa จากทั้งหมด 92.5 kDa และเมื่อทำการศึกษาถึงความสามารถของโปรตีน *PmIAP* และ BIR domains ต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน *PmHtrA2* พบว่าโปรตีนทั้งสองไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน *PmHtrA2* ได้ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ากรดอะมิโนส่วนหนึ่งของจุดตัดเอนไซม์ TEV ที่เป็นส่วนเกินตรงบริเวณปลาย N-

คำสำคัญ : Apoptosis / HtrA2 / IAP / *Penaeus monodon*

Thesis Title	The study of interaction between HtrA2 and IAP proteins from <i>Penaeus monodon</i>
Thesis Credits	12
Candidate	Mr. Rukkit Suwannaboon
Thesis Advisor	Dr. Pongsak Khunrae
Program	Master of Science
Field of Study	Applied Microbiology
Department	Microbiology
Faculty	Science
B.E.	2555

Abstract

Apoptosis, a kind of program cell death, serves in multi-cellular organism immunity system to destruct atypical and disease cells. Three kinds of protein, Caspase, IAP, and HtrA2, play dominant roles in apoptosis. Active caspases cause a cell to apoptosis while IAP inhibits them. HtrA2, an IAP antagonistic protein, binding to BIR domains of IAP prevents the formation of IAP-caspase complex resulting in induction of cell death. This blueprint of apoptosis was found in several organisms and conserved in evolutionary tree. Recently, *Pmcaspase*, *PmIAP*, and *PmHtrA2* proteins were found in *Penaeus monodon* as well as in mammalian and drosophila. The interaction between *Pmcaspase* and *PmIAP* has been already confirmed in several studies. However, there has not been any report about the binding of *PmIAP* to *PmHtrA2*.

In this study, *PmIAP*, BIR domains and *PmHtrA2* protein were expressed and purified by using *Escherichia coli* expression system. Thioredoxin fusion was adopted in this study and could enhance the expression yield of *PmHtrA2* and BIR domains. However, *PmIAP* could only be expressed in a partial form, as indicated by the expression product of 56.8 kDa rather than the expected 92.5 kDa, which is the molecular mass of a complete form of *PmIAP*. The *in vitro* investigation of the interaction of *PmIAP* or BIR domains to *PmHtrA2* showed negative results, which could be because the left over residues of TEV cleavage site attached at the N-terminal of *PmHtrA2* may prevent the interaction between IBM of *PmHtrA2* and BIR domains of *PmIAP*.

Keywords : Apoptosis / HtrA2 / IAP / *Penaeus monodon*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้จะสำเร็จล่วงไปไม่ได้หากปราศจากการแนะนำของ ดร.พงศ์ศักดิ์ ขุนแร่ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ไทรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ ขอขอบคุณอาจารย์ทั้งสองซึ่งได้ให้คำปรึกษาข้อชี้แนะ ข้อคิดเห็น ทั้งในส่วนของการดำเนินงานวิจัยและด้านทฤษฎี รวมถึงช่วยชี้ทางแก้ปัญหาเมื่อเกิดปัญหาขึ้นในระหว่างการศึกษา

ขอขอบคุณ ดร.แสงจันทร์ เสนาปิ่น และ ดร.ภคกุล สังข์สุริยะ จากหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology; Centex Shrimp) ที่สละเวลาเพื่อเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และการให้ความร่วมมือในงานวิจัยร่วม และการแบ่งปันข้อมูลต่างๆ และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณบุคลากรทุกคนในห้องปฏิบัติการที่คอยช่วยเหลือในการทำงานต่างๆ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	น
รายการรูปประกอบ	ฉ
รายการสัญลักษณ์	ฉ
ประมวลศัพท์และคำย่อ	ฉ

บทที่

1. บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตของโครงการ	2
2. ตรวจเอกสาร	3
2.1 การตายของเซลล์	3
2.1.1 ลักษณะการตายของเซลล์	3
2.1.2 การตายของเซลล์กับระบบภูมิคุ้มกัน	6
2.2 กระบวนการ apoptosis	6
2.2.1 การกระตุ้นกระบวนการ apoptosis	7
2.2.2 การทำงานและการควบคุมกระบวนการ apoptosis	9
2.2.3 การอนุรักษ์กระบวนการ apoptosis ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ	12
2.2.4 การศึกษากระบวนการ apoptosis ในกิ้งกูดดำ	13
2.3 โครงสร้างและบทบาทของโปรตีน HtrA2 และ IAP ในกระบวนการ apoptosis	14
2.3.1 โครงสร้างและการทำงานของโปรตีน HtrA2	15
2.3.2 โครงสร้างของโปรตีน IAP	16

2.3.3	กระทำปฏิสัมพันธ์ระหว่าง IBM และ BIR domain	17
2.3.4	ลักษณะของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง IBM และ BIR domain ที่ถูกอนุรักษ์ไว้	20
3.	อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	24
3.1	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	24
3.1.1	เครื่องมือ 24	
3.1.2	สารเคมี 25	
3.2	เชื้อแบคทีเรีย พลาสมิด และยีน	25
3.3	วิธีการทดลอง	25
3.3.1	การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน <i>PmHtrA2</i>	25
3.3.1.1	การสร้างพลาสมิดลูกผสม pET28b ที่มียีน <i>PmHtrA2</i> และ พลาสมิดลูกผสม pET15bThio ที่มียีน <i>PmHtrA2</i> , <i>PmIAP</i> , <i>BIR2</i> , และ <i>BIR3</i>	25
3.3.1.2	การ Transformation พลาสมิดลูกผสม pET28b และ pET15bThio ที่มียีน เป้าหมายสู่เซลล์เจ้าบ้าน <i>E.coli</i> BL21 DE3 และ BL21 RIL	26
3.3.1.3	การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน	26
3.3.2	การผลิตและการทำบริสุทธิ์โปรตีน	27
3.3.2.1	การเลี้ยงเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน	27
3.3.2.2	การทำบริสุทธิ์โปรตีน	27
3.3.3	การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน <i>PmHtrA2</i> และ <i>PmIAP</i> ด้วยวิธี pull down assay	29
3.3.3.1	การตรวจสอบคุณภาพของโปรตีน	29
3.3.3.2	การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน	
4.	ผลการทดลอง	30
4.1	การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน <i>PmHtrA2</i>	30
4.2	การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน <i>PmHtrA2</i>	35
4.3	การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ โปรตีน <i>PmIAP</i>	37

4.4	การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน <i>PmHtrA2</i> และ <i>PmIAP</i> ด้วยเทคนิค pull down assay	41
5.	สรุปผลการทดลอง	44
	เอกสารอ้างอิง	50
	ภาคผนวก	58
ก	แผนที่พลาสมิด ลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโน	58
ข	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย	65
ค	วิธีการเฉพาะ	71
	ประวัติผู้วิจัย	76

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
2.1	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อเกิด apoptosis
2.2	ลักษณะ Apoptotic bodies ของเซลล์แมลง sf9 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2.3	ขั้นตอนการเกิด autophagocytosis
2.4	เซลล์ที่เกิด autophagocytosis
2.5	ลักษณะของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ necrosis
2.6	แผนภูมิกลไกการส่งสัญญาณ apoptosis จากภายนอกเซลล์
2.7	แผนภูมิกลไกการส่งสัญญาณ apoptosis จากภายในเซลล์
2.8	โครงสร้างโปรตีน IAP ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ
2.9	เปรียบเทียบ IBM จากโปรตีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลงหวี่
2.10	เปรียบเทียบกระบวนการ apoptosis ในสิ่งมีชีวิต 3 ชนิดได้แก่ หนอนตัวกลม สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และแมลงหวี่
2.11	บทบาทของโปรตีน HtrA2 ในเซลล์ที่เกิดกระบวนการ apoptosis
2.12	โครงสร้างและการตัดแปลงโปรตีน HtrA2 ไปสู่รูปแบบที่พร้อมใช้งาน (Mature HtrA2)
2.13	โครงสร้าง BIR2 groove ของโปรตีน DIAP
2.14	หน้าที่การทำปฏิสัมพันธ์ของ domain ต่างๆของโปรตีน IAP
2.15	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน IBM ของโปรตีนหลายชนิด
2.16	การสร้างพันธะไฮโดรเจนของอลานีนของ IBM ของ Grim กับ side chain ของกรดอะมิโนต่างๆใน BIR2 ของ DIAP
2.17	การสร้างพันธะแวนเดอร์วาลส์ของอลานีนของ IBM ของ Grim กับ side chain ของกรดอะมิโนต่างๆใน BIR2 ของ DIAP
2.18	การสร้างพันธะไฮโดรเจนของอลานีนของ IBM ของ Smac กับ side chain ของกรดอะมิโนต่างๆใน BIR3 ของ XIAP
2.19	ลักษณะการพับตัวที่ต่างกับของ BIR2 ของ DIAP และ BIR3 ของ XIAP
2.20	ลักษณะการอนุรักษ์กรดอะมิโนใน BIR domain
2.21	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างระดับสองของ BIR3 จาก PmIAP และ BIR3 จาก XIAP

รูปที่	หน้า
4.1 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน partial- <i>PmHtrA2</i> บนพลาสมิด pET28b ในเซลล์ BL21 DE3 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	30
4.2 แผนภาพลักษณะส่วนประกอบทางโครงสร้างของโปรตีน <i>PmHtrA2</i> บนพลาสมิด pET15bThio/ <i>PmHtrA2</i> และ pET28b/ <i>PmHtrA2</i>	32
4.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน <i>PmHtrA2</i> ด้วยพลาสมิด pET28b และ pET15bThio ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	33
4.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน <i>PmHtrA2</i> ด้วยพลาสมิด pET15bThio ในเซลล์เจ้าบ้าน BL21 DE3 และ BL21 RIL ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	34
4.5 การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีน <i>PmHtrA2</i> ด้วยวิธี Western blot	35
4.6 การวิเคราะห์คุณภาพโปรตีน <i>PmHtrA2</i> ที่ผ่านการถูกทำบริสุทธิ์ผ่าน Ni NTA column ในสภาวะ reducing และ non-reducing ด้วยวิธี SDS-PAGE	36
4.7 ผลการวิเคราะห์โปรตีน โปรตีน <i>PmHtrA2</i> ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ TEV protease ด้วยวิธี SDS-PAGE	37
4.8 ลักษณะโครงสร้างของโปรตีน <i>PmIAP</i> และ <i>BIR</i> ที่ถูกแสดงออกโดยพลาสมิด pET15bThio	38
4.9 รูปเจลที่ใช้ในการคำนวณและกราฟที่พล็อตระหว่างค่า log MW และค่า Rf ของ marker	39
4.10 แผนภาพโครงสร้างและขนาดของ domain ต่างๆของโปรตีน <i>PmIAP</i> ในพลาสมิด pET15bThio และขนาดของโปรตีน Thio- <i>PmIAP</i> ที่ถูกแสดงออก	40
4.11 การวิเคราะห์โปรตีน <i>PmIAP</i> , BIR2, และ BIR3 ภายหลังจากการทำบริสุทธิ์ โดย Ni NTA column ด้วยวิธี SDS-PAGE	41
4.12 การตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะ reducing และ non-reducing	42
4.13 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยวิธี pull down assay	43
5.1 ผลการทำ Western blot เพื่อทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน <i>PmHtrA2</i> และ โปรตีน <i>PmIAP</i> ในเซลล์ sf9 ด้วยเทคนิค co-immunoprecipitation โดย ดร.ภคกุล สังข์สุริยะ	47
ค.1 การประกอบชุด SDS-PAGE	72
ค.2 การสอด comb เพื่อสร้าง sample well ใน stacking gel	73
ค.3 ชุด Western blot	74

รายการสัญลักษณ์

A	=	alanine
D	=	aspartic acid
E	=	glutamic acid
L	=	leucine
Q	=	glutamine
T	=	threonine
W	=	tryptophan

ประมวลศัพท์และคำย่อ

g	=	กรัม
kDa	=	กิโลดาลตัน
l	=	ลิตร
M	=	โมลาร์
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
MW	=	มวลโมเลกุล
OD	=	ค่าคงที่การดูดกลืนแสง
PCR	=	polymerase chain reaction
pI	=	จุดไอโซอิเล็กตริก
Rf	=	retention factor
rpm	=	รอบต่อนาที
xg	=	ค่าทวีคูณของแรงโน้มถ่วง
°C	=	องศาเซลเซียส
μl	=	ไมโครลิตร
μg	=	ไมโครกรัม