บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5480002

ชื่อโครงการ : การศึกษายีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Tudor staphylococcal nuclease ของกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งใน RNA-induced silencing complex

หัวหน้าโครงการ : ผศ. ดร. เฉลิมพร องศ์วรโสภณ

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: chalermporn.ong@mahidol.ac.th.

ระยะเวลาโครงการ :14 มิถุนายน 2554 – 15 มิถุนายน 2557

กระบวนการอาร์เอ็นเอไอเป็นกลไกต่อต้านการติดเชื้อไวรัสที่สำคัญในกุ้งพีเนียด อย่างไรก็ตาม กลไกของกระบวนการดังกล่าวยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก โดยเฉพาะหน้าที่และกลไกการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอาร์เอ็นเอไอ ในการศึกษานี้ได้ทำการโคลนและศึกษาบทบาทของโปรตีนทูดอร์สแตฟฟิโลคอกคอลนิวคลีเอส (TSN) ของกุ้งพีเนียดในกระบวนการเอ็นเอไอ ยีน TSN ของกุ้งกุลาดำ (PmTSN) ที่สมบูรณ์ประกอบด้วย 2,897 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นสายโพลีเปปไตด์ที่ประกอบด้วย 889 กรดอะมิโน เมื่อศึกษาไฟโลเจนีของโปรตีน TSN พบว่าโปรตีน PmTSN มีความใกล้เคียงกับโปรตีน TSN ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยมีความคล้ายกับโปรตีน TSN ของปลาม้าลายถึง 57% โปรตีน PmTSN ประกอบด้วยโดเมนสแตฟฟิโลคอกคอลนิวคลีเอสเรียงกัน 4 โดเมน (SN1-4) ตามด้วยโดเมนทูดอร์ (Tudor) และโดเมน SN5 เมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน PmTSN ด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่พบว่าประสิทธิภาพของกระบวนการ dsRNA-mediated gene silencing ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน PmRab7 และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหัวเหลืองลดลง แสดงให้เห็นว่าโปรตีน PmTSN มีส่วนร่วมในกระบวนการอาร์เอ็นเอไอในกุ้ง การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน PmTSN และโปรตีนอาร์โกนอทของกุ้งกุลาดำ (PmAgo) พบว่า โปรตีน PmTSN มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน PmAgo1 แต่ไม่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน PmAgo2 และ PmAgo3 แสดงให้เห็นว่าโปรตีน PmTSN เป็นองค์ประกอบของ PmAgo1-RISC นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน PmTSN ใช้โดเมน SN1 และ SN2 ในการมีปฏิสัมพันธ์กับโดเมนส่วนปลายเอ็นของ PmAgo1 การยับยั้งการแสดงออกของยีน PmAgo1 ทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการ dsRNA-mediated gene silencing ลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับการยับยั้งการแสดงออกของยีน PmTSN แสดงให้เห็นว่า PmAgo1 ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการอาร์เอ็นเอไอและมีโปรตีน PmTSN เป็นองค์ประกอบรองใน PmAgo1-RISC เมื่อศึกษายีนที่ถูกควบคุมโดยโปรตีน MjAgo1 และ MjTSN ของกุ้งคุรุมะด้วยวิธีไมโครอาเรย์พบว่ามียีนจำนวน 294 ยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน MjAgo1 ในกุ้งคุรุมะ นอกจากนี้ยังพบว่ามียีน 58 ยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออก

ของยีน MjAgo1 และกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน MjTSN ซึ่งเป็นไปได้ว่ายีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเหล่านี้จะถูกควบคุมโดยกระบวนการอาร์เอ็นเอไอ เมื่อทำการจัดจำแนกยีนเหล่านี้ตามหน้าที่ สามารถอนุมานได้ว่า กระบวนการทางชีวภาพในเซลล์กุ้งหลายๆกระบวนการถูกควบคุมด้วยกระบวนการอาร์เอ็นเอไอผ่านทาง Ago1-RISC นอกจากนี้ โปรตีน PmTSN ยังพบว่ามีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนตัวรับของลามินิน ผลจากการศึกษาความเกี่ยวข้องของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PmTSN และโปรตีนตัวรับของลามินินในขณะที่มีการติดเชื้อของไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสทอรา โดยวิธี *in vitro* pull down พบว่าการจับกันของโปรตีน PmTSN และ Lamr ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนห่อหุ้ม gp116 ของไวรัสหัวเหลือง หรือโปรตีนห่อหุ้ม VP1 ของไวรัสทอรา แสดงว่า การปฏิสัมพันธ์นี้ไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการติดเชื้อไวรัส กล่าวโดยสรุปโปรตีนทูดอร์สแตฟฟิโลคอกคอลนิวคลีเอสเป็นส่วนประกอบหนึ่งใน RNA-induced silencing complexes (PmAgo-1-RISC) และการปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PmTSN และโปรตีนตัวรับของลามินินน่าจะเกี่ยวข้องกับหน้าที่อื่นในกระบวนการทำงานต่างๆของกุ้งซึ่งไม่เกี่ยวข้องต่อการติดเชื้อไวรัส

คำหลัก: RISC; อาร์เอ็นเอไอ; อาร์เอ็นเอสายคู่, *in vitro* pull-down; yeast two-hybrid system; ไมโครอาเรย์; กุ้งกุลาดำ

Abstract

Project Code: RSA5480002

Project Title: Molecular characterization of RNA-induced silencing complex (RISC) - associated component, *Penaeus monodon* Tudor staphylococcal nuclease and its interacting proteins

Project Head: Chalermporn Ongvarrasopone, Ph.D., Asst. Prof.
Institute of Molecular Biosciences,
Mahidol University (Salaya Campus), Nakhon Pathom, Thailand

E-mail Address: chalermporn.ong@mahidol.ac.th.

Project Period: 14 June 2554 – 15 June 2557

RNA interference (RNAi) plays an important role in an antiviral defense in penaeid shrimp. However, the mechanism of shrimp RNAi pathway remains largely elusive, especially the role of the RNAi machineries. In this study, a gene encoding a RISC-associated factor, tudor staphylococcal nuclease (*PmTSN*) was identified from *Penaeus monodon* and its role in shrimp RNAi pathway was investigated. The full-length cDNA of PmTSN was 2897 bp with an open reading frame encoding a putative protein of 889 amino acids. Phylogenetic analysis and domain structure comparison revealed that PmTSN was more closely related to vertebrate TSN by sharing 57% amino acid sequence identity with *Danio rerio* TSN. PmTSN represented a new type of TSN protein by exhibiting the four tandem repeat of staphylococcal nuclease-like domain (SN1-4) followed by a Tudor and a partially truncated C-terminal SN5 domain. Knockdown of PmTSN partially diminished the activity of dsRNA-mediated gene silencing in either silencing of the endogenous *PmRab7* or inhibition of YHV replication, suggesting the involvement of PmTSN in shrimp RNAi pathway. The interaction between PmTSN and three shrimp Argonaute proteins (PmAgo) were characterized by yeast two-hybrid and *in vitro* pull-down assays. The results demonstrated that PmTSN interacted with PmAgo1 but not with PmAgo2 or PmAgo3, suggesting that PmTSN is a component of PmAgo1-RISC. The interaction between PmAgo1 and PmTSN was mediated through the N-terminal domain of PmAgo1 and the SN1-2 domains of PmTSN. Knockdown of *PmAgo1* substantially diminished the activity of dsRNA-mediated gene silencing when compared with the result which was observed in *PmTSN* knockdown, suggesting that PmAgo1 plays a crucial role in shrimp RNAi pathway and PmTSN is a minor component of PmAgo1-RISC. Microarray analysis was used to identify the transcripts which were regulated by *Marsupenaeus japonicus* Ago1 and TSN. The results showed that 294 transcripts were up-regulated upon *MjAgo1* knockdown. In addition, a common set of 58 transcripts were found to be up-regulated in both *MjAgo1-* and *MjTSN*-knockdown shrimps. These up-regulated genes represented the potential targets of RNAi. The microarray results implied that a variety of biological processes in shrimp cells are regulated by RNAi via Ago1-RISC. In addition, laminin receptor (Lamr) was identified as one of the PmTSN interacting proteins. To study the involvement of the interaction between PmTSN and laminin receptor upon yellow head virus (YHV) and taura syndrome virus (TSV) infection, the interaction of PmTSN and Lamr during YHV and TSV infection was investigated by an

in vitro pull down assay. The interaction of PmTSN and PmLamr cannot form a complex with viral binding proteins gp116 of YHV or VP1 of TSV. These results suggested that the effect of the interaction between PmTSN and Lamr may not play a significant role during viral infection. Taken together, PmTSN acts as one of the components in the RNA-induced silencing complexes (PmAgo-1-RISC) and the interaction between PmTSN and Lamr is possibly involved in other biological processes (not viral infection) in shrimp.

Keywords: RISC; RNAi; double-stranded RNA, *in vitro* pull-down; yeast two-hybrid system; microarray; black tiger shrimp