CLONING AND CHARACTERIZATION OF DOPAMINE RECEPTOR FROM BLACK TIGER SHRIMP

SUCHITRAPORN SUKTHAWORN 5137034 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: APINUNT UDOMKIT, Ph.D.,
SAKOL PANYIM, Ph.D., CHALERMPORN ONGVARRASOPONE, Ph.D.,
PONGSOPEE ATTASART, Ph.D.

ABSTRACT

Reproduction of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* is regulated by various neurohormones. Dopamine is one of the neurotransmitters that play important roles in ovarian maturation, presumably by the inhibition of a gonad-stimulating hormone (GSH). Like other neurotransmitters, dopamine modulates its physiological function through interacting with specific receptors. Therefore, the objectives of this study were to clone and characterize dopamine receptors in *P. monodon* (DAR_Pem). A cDNA encoding DAR_Pem was cloned by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). The results showed that DAR_Pem cDNA was 1,990 nucleotides long composing of 1,359 nucleotides of an open reading frame (ORF) that encodes a putative protein of 452 amino acids. The deduced amino acid of DAR_Pem sequence was highly homologous to type 1 of dopamine receptors of invertebrates in phylum arthropoda and was highly conserved among other G-protein coupled receptors. Determination of DAR_Pem mRNA expression in female broodstock shrimp at each ovarian developmental stage by RT-PCR showed that dopamine receptors were expressed in various tissues such as eyestalks, brain, hepatopancrease, abdominal nerve cord, ovary, and thoracic ganglia. The high expression levels were found in nervous tissues such as brain, thoracic ganglia, and eyestalk ganglia whereas the ovary exhibited low level of DAR_Pem mRNA expression. The increased expression of DAR_Pem in the brain of shrimp from ovarian developmental stage I through stage III before starting to decline in stage IV suggested that dopamine may be involved in ovarian maturation by acting through DAR_Pem to inhibit the release of GSH from the brain and indirectly affecting the ovarian maturation. The study of DAR_Pem protein expression by western blot analysis using polyclonal antibody raised against the C-tail region of DAR_Pem in various tissues of *P. monodon* was not successful, probably because the amount of DAR_Pem presented in shrimp tissues was below the sensitivity (10 ng) of the polyclonal antibody. In addition cross-reactivity of the rabbit pre-immunized serum to shrimp proteins was also found in ovarian tissue. Recombinant DAR_Pem was transiently expressed as a membrane protein in COS-1 cells. Investigation of functional activity of DAR_Pem showed that an induction by DA increased intracellular cAMP levels in COS-1 cells confirming that DAR_Pem was a member of dopamine receptor type1. Further investigation of specific ligand binding using agonist or antagonist will help to verify the pharmacological property of DAR_Pem.

KEY WORDS: *PENAEUS MONODON*/ DOPAMINE RECEPTOR/ GONAD-STIMULATING HORMONE (GSH)

107 pages

การโคลนชิ้น cDNA สายสมบูรณ์ และ ศึกษาคุณลักษณะของตัวรับ dopamine ในกุ้งกุลาดำ
CLONING AND CHARACTERIZATION OF DOPAMINE RECEPTOR FROM BLACK TIGER SHRIMP

สุจิตราภรณ์ สุขถาวร 5137034 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.,
เฉลิมพร องศ์วรโสภณ, Ph.D., พงโสภี อัตศาสตร์, Ph.D.

บทคัดย่อ

กระบวนการสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำถูกควบคุมโดยฮอร์โมนหลายชนิด ซึ่ง dopamine เป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งที่สันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนารังไข่ โดยทำหน้าที่ยับยั้งการสร้าง gonad-stimulating hormone (GSH) เนื่องจาก dopamine ทำงานโดยอาศัยตัวรับ dopamine ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ คือ การ clone ชิ้น cDNA สายสมบูรณ์และการศึกษาคุณลักษณะของตัวรับ dopamine ในกุ้งกุลาดำ (DAR_Pem) รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของตัวรับ dopamine ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งแม่พันธุ์ จากผลการศึกษาพบว่า ชิ้น cDNA สายสมบูรณ์ ของตัวรับ dopamine มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 1,990 คู่เบส ประกอบด้วย ORF ขนาด 1,359 คู่เบส ถอดรหัสให้โปรตีนที่มีความยาว 452 กรดอะมิโน ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของตัวรับ dopamine นี้คล้ายกับตัวรับ dopamine ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง กลุ่ม arthropod โครงสร้างของตัวรับ dopamine จัดอยู่ในกลุ่มของ G-protein coupled receptor การศึกษา การแสดงออกของตัวรับ dopamine ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ตัวรับ dopamine มีการแสดงออกในอวัยวะต่างๆ เช่น ก้านตา, สมอง, ตับ, รังไข่, เส้นประสาทส่วนท้องและปมประสาทส่วนอก อย่างไรก็ตาม dopamine มีการแสดงออกระดับสูงในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับศูนย์กลางระบบประสาท เช่น สมอง และก้านตา แต่ในรังไข่มีการแสดงออกของตัวรับ dopamine ในระดับต่ำ การแสดงออกของตัวรับ dopamine ในสมองจะเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งมีการพัฒนารังไข่จากกุ้งระยะที่ 1 ไปสู่ระยะที่ 3 และลดลงอย่างรวดเร็วในระยะที่ 4 เป็นไปได้ว่า dopamine อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนารังไข่โดยผ่านตัวรับ dopamine ในการยับยั้งการสร้างฮอร์โมน GSH ในสมอง และส่งผลทางอ้อมในรังไข่ นอกจากนี้ ปริมาณของตัวรับ dopamine ยังถูกศึกษาในระดับโปรตีน โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตจากปลาย C-tail ของตัวรับ dopamine แต่การศึกษานี้ไม่ประสบความสำเร็จ ซึ่งอาจเป็นเพราะมีการสร้างตัวรับ dopamine ในปริมาณน้อย นอกจากนี้แอนติบอดีที่ใช้ยังเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างซีรัมของสัตว์ที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดีกับโปรตีนในรังไข่ของกุ้ง จากการแสดงออกของตัวรับ dopamine ในเซลล์ COS-1 พบว่าตัวรับ dopamine มีการแสดงออกบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และตัวรับ dopamine ตอบสนองต่อสารสื่อประสาท dopamine ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มระดับของ cAMP ภายในเซลล์ บ่งบอกว่า ตัวรับ dopamine ในกุ้งกุลาดำนี้เป็นตัวรับชนิดที่ 1 อย่างไรก็ตาม ต้องทำการยืนยันคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของตัวรับ dopamine จากความจำเพาะของ ligand โดยการใช้ agonist และ antagonist

107 หน้า