ชื่อวิทยานิพนธ์ การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของ Syntenin Binding Protein ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

ผู้เขียน นางสาวมลธิรา ทองอนันต์

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

กุ้งมีการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ทั้งที่เพิ่มขึ้นและลดลงเมื่อมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีน Syntenin ในกุ้งกุลาดำซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อมีการตอบสนองในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในระยะเฉียบพลัน เพื่อเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีน Pm-syntenin กับการติดเชื้อไวรัสในกุ้งต่อไป ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้นำเทคนิค Yeast two-hybrid มาใช้ในการค้นหาโปรตีนที่สามารถจับกับ Pm-syntenin จากห้องสมุดดีเอ็นเอของกุ้งกุลาดำโดยใช้ Pm-syntenin เป็นตัวล่อ จากการทดลองพบว่ามีหกโคลนประกอบด้วย Alpha-2-macroglobulin (α_2M), Proteasome subunit alpha type 6, Lysosyme, Elongation factor-2 (EF2), Elongation factor-1-alpha (EF1α) และ β-actin ระหว่างทั้งหกโปรตีนที่ได้มา เราสนใจส่วน Receptor-binding domain ของ α_2M ที่สามารถการจับกับ Pm-syntenin อย่างมีความจำเพาะเจาะจง และจากการวิเคราะห์การจับกันในหลอดทดลองโดยเทคนิค GST-pull down พบว่า GST-α_2M สามารถจับกับ Syntenin ได้แต่ส่วน GST อย่างเดียวจะจับกับ Syntenin ไม่ได้ อีกทั้งผลจากการวิเคราะห์โดย GST-pull down อีกแบบหนึ่งพบว่า GST-syntenin สามารถจับกับ α_2M ได้ แต่ส่วน GST อย่างเดียวจะจับกับ α_2M ไม่ได้ นอกจากนี้ผลการทดลองการจับกันของโปรตีนพบว่าส่วน N-termanal ประกอบด้วย 131 กรดอะมิโน ของ Syntenin จะเป็นส่วนที่สามารถจับกับส่วน C-terminal หรือ Receptor binding domain ของ α_2M ได้ อีกทั้งผลของการแสดงออกของยีน α_2M พบว่าเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อกุ้งมีการติดเชื้อไวรัส แสดงให้เห็นว่าทั้ง Syntenin และ α_2M มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อมีการตอบสนองในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในระยะเฉียบพลัน รวมทั้งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการแสดงให้เห็นว่าทั้ง Syntenin และ α_2M มีการพบว่าอยู่ใน exosome ของ Dendritic cell line เหมือนกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Syntenin มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันต่อการตอบสนองของการติดเชื้อไวรัสของกุ้งผ่านการจับกันกับ α_2M

Thesis Title	Cloning and Characterization of Syntenin Binding Protein in Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*)
Author	Miss Moltira Tonganunt
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2006

ABSTRACT

Shrimp exhibit a diverse response to viral infection that is manifested in drastic up- and down-regulations of a variety of genes. In our previous work, we identified syntenin of the shrimp *Penaeus monodon* (Pm) as a dynamic responder to white spot syndrome virus (WSSV) infection, its message being greatly upregulated in the acute phase of the infection. In order to further explore the link between Pm-syntenin and viral infection, we performed a yeast two-hybrid screening of a *P. monodon* cDNA library, using Pm-syntenin as bait. The yeast two hybrid screening led to the isolation of six clones including an in frame of alpha-2-macroglobulin (α_2M), proteasome subunit alpha type 6, lysosyme, elongation factor-2 (EF2), elongation factor-1-alpha (EF1α) and β-actin. Among the six syntenin binding proteins, we interested in the receptor binding domain of α_2M that specifically interacted with Pm-syntenin. A GST pull-down assay showed that GST-α_2M, but not GST alone, was capable of co-precipitating syntenin. Another GST pull-down assay showed that GST-syntenin, but not GST alone, was capable of co-precipitating α_2M. In addition, mutant analyses showed that the N-terminal 131 amino acids of syntenin were both necessary and sufficient to bind the C-terminus receptor binding domain of α_2M. Furthermore, WSSV infected Pm showed a significant upregulation of the α_2M message, suggesting that both syntenin and its protein partner α_2M are upregulated in the acute phase of a WSSV infection. Taken together with a previous report showing the co-localization of α_2M and syntenin in the exosome of a dendritic cell line, it is likely that syntenin, through its interaction with α_2M, plays an important role in the immune defense mechanisms of viral infections of shrimps.