

การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูงจากกุ้งแชบ๊วย

Cloning and Characterization of High Temperature Requirement Protein A2 (HtrA2) Gene from *Fenneropenaeus merguensis*

กนกวรรณ ขอคำ¹ พันทิพา รุณแสง² อรณิชา รัตนกรณีย์ และ ประภาพร อุทารพันธุ์*

Kanokwan Khorha¹ Phanthipha Runsaeng² Onnicha Rattanaporn² and Prapaporn Utarabhand*

¹นักศึกษานิพนธ์โท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

^{2*,2}อาจารย์ประจำหลักสูตรชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

¹Graduate student in Master of Science (Biochemistry) of Science Faculty, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla, Thailand 90112

^{2*,2}Lecturer in Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla, Thailand 90112

*Corresponding author, E-mail: prapaporn.u@psu.ac.th

บทคัดย่อ

โปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูง (High temperature requirement protein A2, HtrA2) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์หรืออะพอพโทซิส (apoptosis) ผ่านบริเวณจับของโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิส (Inhibitor of apoptosis protein, IAP) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์แคสเปส (caspase) ในการศึกษาครั้งนี้ยีนสายเต็ม HtrA2 (*FmHtrA2*) ได้โคลนจากกุ้งแชบ๊วย โดยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ rapid amplification of cDNA ends (RACE) ซึ่งยีนสายเต็มที่โคลนได้มีความยาว 1,919 คู่เบส แปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 445 หน่วย ประกอบด้วยส่วนปลาย 5' ที่ไม่แปลรหัสยาว 43 คู่เบส และส่วนปลาย 3' ที่ไม่แปลรหัสยาว 538 คู่เบส มีมวลโมเลกุล 47.87 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เป็น 9.35 ภายในโครงสร้างของ *FmHtrA2* ประกอบด้วย 5 โดเมน คือ mitochondria targeting signal (MTS), transmembrane (TM) domain, IAP-binding motif (IBM), serine protease domain และ PDZ domain เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *FmHtrA2* ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความเหมือนกับ HtrA2 จากกุ้งกุลาดำมากที่สุดคือ 95% และจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *FmHtrA2* โดยวิธี RT-PCR พบการแสดงออกของยีนมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับและกล้ามเนื้อ แต่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่น ๆ น้อย จากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ได้ว่า *FmHtrA2* อาจมีบทบาทควบคุมการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสในกุ้ง

คำสำคัญ: โปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูง อะพอพโทซิส กุ้งแชบ๊วย

Abstract

High temperature requirement protein A2 (HtrA2) is an apoptosis-activating protein to enhance apoptosis process via its inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding motif with apoptosis dependent caspase activation. In this study, a full-length cDNA of HtrA2 named *FmHtrA2* was cloned and characterized from the banana shrimp, *Fenneropenaeus merguensis* by means of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. It was consisted of 1,919 bp including an open reading frame (ORF) of 1338 bp encoding 445 amino acids with a 5' untranslated region (UTR) of 43 bp and 3' UTR of 538 bp. The predicted molecular mass of *FmHtrA2* was 47.87 kDa with the theoretical isoelectric point of 9.35. *FmHtrA2* contains five different domains, namely, a mitochondrial targeting signal (MTS), a transmembrane (TM) domain, an IAP-binding motif (IBM), a serine protease domain, and a PDZ domain. The BLAST analysis revealed that the amino acid sequence of *FmHtrA2* was highly homologous (95% identity) to the high temperature requirement protein A2 of *Penaeus monodon* (*PmHtrA2*). By RT-PCR analysis, the expression of *FmHtrA2* was mainly found in the hepatopancreas and muscle but less in other tissues. These results suggested that *FmHtrA2* might function in the apoptosis regulation in shrimps.

Keywords: *HtrA2*, Apoptosis, *Fenneropenaeus merguensis*

1. บทนำ

กุ้งแชบ๊วยเป็นสัตว์ทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เป็นกุ้งขนาดใหญ่ ดูแลอนุบาลง่าย มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว แต่ปัจจุบันพบว่ากุ้งทะเลมีปริมาณลดน้อยลงสาเหตุหลักเนื่องมาจากการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งทั้งแบคทีเรียและไวรัสซึ่งทำให้กุ้งตาย (Bulgakov *et al.*, 2004) ก่อให้เกิดผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งมากขึ้น โดยกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งซึ่งเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) มีกลไกการป้องกันตนเองโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์และระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำ (Söderhäll and Cerenius, 1998) และนอกเหนือจากระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 2 ระบบ พบว่า ยังมีอีกหนึ่งกระบวนการที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน คือ การเกิดอะพอพโทซิส

อะพอพโทซิสเป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์ที่มีแบบแผน มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการพัฒนาการเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตและในการทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อ โดยกลไกนี้ได้ถูกอนุรักษ์ไว้ในทุก ๆ สิ่งมีชีวิต การเกิดอะพอพโทซิสขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์สำคัญที่มีชื่อว่า แคสเปส (caspase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มซิสเตอินโปรตีเอส (cysteine protease) ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนหลายชนิด เมื่อเอนไซม์ชนิดนี้ถูกกระตุ้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Wyllie *et al.*, 1980) แต่พบว่าในสภาวะปกติกระบวนการดังกล่าวถูกควบคุมโดยโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิส (inhibitor of apoptosis protein, IAP) (White, 1996) ซึ่งไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แคสเปส ส่งผลให้ไม่เกิดอะพอพโทซิส นอกจากนี้พบการรายงานถึงโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการเกิดอะพอพโทซิสด้วย

เช่นกัน คือ โปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูง (High temperature requirement protein A2, HtrA2) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิสผ่านบริเวณจับของโปรตีน IAP (Cande *et al.*, 2002)

โปรตีน HtrA2 อยู่ในกลุ่มของ high temperature requirement (HtrA) family พบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต (prokaryotes) และยูคาริโอต (eukaryotes) สามารถพบโปรตีนนี้ได้ ในไมโทคอนเดรีย มีลักษณะเฉพาะตัวเป็น serine protease และมี PDZ domain (Van de *et al.*, 2008) ซึ่งมีบทบาทเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิสโดยทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันการรวมตัวกันระหว่างโปรตีน IAP และเอนไซม์แคสเปส ส่งผลให้เอนไซม์แคสเปสเป็นอิสระจากการควบคุมของโปรตีน IAP ดังนั้น เอนไซม์แคสเปสจึงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสได้

ปัจจุบันมีรายงานโปรตีน HtrA2 ในกิ้งกูดดำ (*PmHtrA2*) ซึ่งเป็นการรายงานครั้งแรกในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน โดยภายในโครงสร้าง ประกอบด้วย 5 โดเมน คือ mitochondria targeting signal (MTS), transmembrane (TM) domain, IAP-binding motif (IBM), serine protease domain และ PDZ domain โปรตีน HtrA2 มี IBM เป็นบริเวณอนุรักษ์มีกรดอะมิโน 4 ตัว คือ อะลานีน (alanine), วาลีน (valine), กลูตามีน (glutamine) และ อะลานีน จะทำหน้าที่ไปจับกับโปรตีน IAP ผ่านโดเมน Zinc-finger baculovirus IAP repeat (BIR) (Verhagen *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน HtrA2 ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนยังมีไม่มากนัก อีกทั้งยังไม่ปรากฏรายงานของยีนนี้ในกิ้งกูดดำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะโคลนยีนและศึกษาสมบัติของยีน HtrA2 จากกิ้งกูดดำ ซึ่งงานวิจัยนี้อาจจะทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานระดับโมเลกุลที่สามารถนำไปสู่ความเข้าใจ

บทบาทหน้าที่ของโปรตีน HtrA2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเกิดอะพอพโทซิสในกิ้งกูดดำมากขึ้นในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อโคลนยีนโปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูง (HtrA2) สายเต็มจากกิ้งกูดดำ

2.2 เพื่อศึกษาสมบัติและการแสดงออกของยีน HtrA2 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกิ้งกูดดำ

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเตรียมเนื้อเยื่อจากกิ้งกูดดำ

ดูดฮีโมลิมฟ์จากแอ่งเลือดบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ของกิ้งกูดดำ ผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว นำไปเซนตริฟิวส์เพื่อเก็บตะกอนฮีโมไลต์ จากนั้นผ่าแยกเนื้อเยื่อต่าง ๆ ออกจากตัวกิ้งกูดดำ เก็บเนื้อเยื่อต่าง ๆ ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัด total RNA สำหรับเตรียมเป็นคิเอ็นเอแม่แบบต่อไป

3.2 การเตรียม total RNA

สกัด total RNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากกิ้งกูดดำด้วย TriPure Isolation Reagent วิเคราะห์ปริมาณ total RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หาความบริสุทธิ์ของ RNA จากอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) ค่าที่ได้ควรอยู่ในช่วง 1.7-2.1 สังเคราะห์ cDNA สายแรก (first-strand cDNA) โดยวิธี reverse transcription

3.3 การโคลนยีนคิเอ็นเอของยีน HtrA2 ของกิ้งกูดดำ

ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของยีน HtrA2 ซึ่งได้มาจากการเปรียบเทียบ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน HtrA2 จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีการศึกษามาแล้วจากธนาคารยีน (GenBank) ผ่านฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม Vector NTI เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ และทำการเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวมาใช้ ออกแบบและสังเคราะห์เป็น forward และ reverse primer นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ HtrA2 โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ cDNA สายแรกที่เตรียมได้จากกระเพาะอาหารของกุ้งแชบ๊วยเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มาวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอของยีน HtrA2 จากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction Kit นำชิ้นดีเอ็นเอของยีน HtrA2 บริสุทธิ์ไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ นำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป ตรวจสอบโคโลนีที่มีชิ้นยีน HtrA2 ด้วยวิธี colony PCR นำโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) ที่มี Ampicillin ปริมาตร 5 มิลลิกรัม จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน HtrA2 และตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ออกแบบไพรเมอร์จากส่วนปลายทั้งสองข้างของดีเอ็นเอของยีนชิ้นกลางเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้านปลาย 5' และด้านปลาย 3' ของยีน HtrA2 ด้วยเทคนิค RACE โดยเริ่มต้นจากการสกัด total RNA จากกระเพาะอาหารของกุ้งแชบ๊วย เพื่อใช้เตรียมเป็น cDNA สายแรกสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน HtrA2 โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ของยีน HtrA2 โดยการทำ PCR

วิเคราะห์ผลจากการทำ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis ทำการโคลนด้วยวิธีเดียวกับวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอชิ้นกลาง ปลาย 5' และปลาย 3' มาเหลื่อมต่อกัน (overlapping) เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์สายเต็ม (full-length) ของยีน *FmHtrA2*

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FmHtrA2* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HtrA2 ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน เพื่อวิเคราะห์หาความเหมือน (% identity) โดยใช้ BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Expert Protein Analysis System (<http://www.expasy.org>) หาตำแหน่ง IBM, serine protease และ PDZ domain ด้วย SMART service (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>) หาตำแหน่ง mitochondria targeting signal ด้วย MITOPORT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) หา trans membrane sequence ด้วยโปรแกรม TMPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) และหา signal peptide โดยใช้ โปรแกรม SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/signalP>)

3.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีน HtrA2 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย

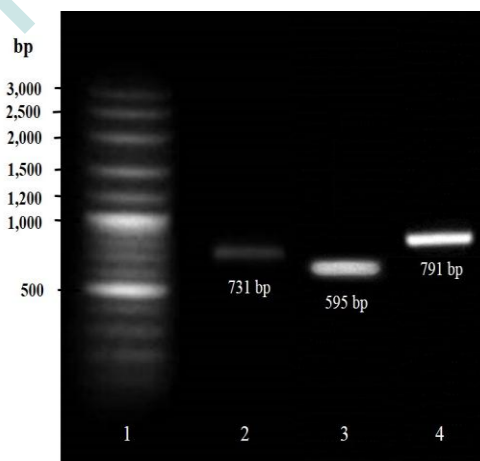
นำ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น เซลล์ฮีโมไซม์ กล้ามเนื้อ ลำไส้ หัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร lymphoid และเหงือก (จากข้อ 3.2) ไปศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *FmHtrA2* โดยวิธี RT-PCR ทำได้โดยเตรียม 1st cDNA ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่

กล่าวมาแล้วข้างต้น เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ของ *FmHtrA2* และ 18S rRNA ตรวจสอบการแสดงผลออกด้วยการวัดความเข้มของแถบ (band intensity) โดยใช้ Gel Document รุ่น BioDoc-It™ system ด้วยโปรแกรม Labworks 4.0 คำนวณค่าอัตราส่วนความเข้มของแถบ *FmHtrA2* เทียบกับของยีน 18S rRNA (relative intensity)

4. ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

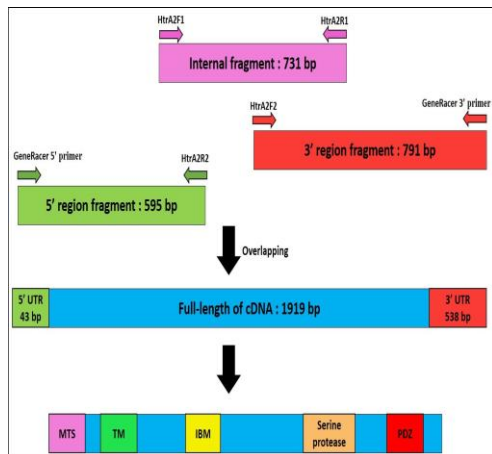
จากการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของยีน *HtrA2* จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ (*HtrA2-F1* และ *HtrA2-R1*) สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส โดยใช้ 1st cDNA ที่เตรียมได้จากกระเพาะอาหารเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการทดลองพบว่ายีนชิ้นกลางที่โคลนได้มีความยาว 731 คู่เบส (รูปที่ 1) และวิเคราะห์หาความเหมือนโดยใช้โปรแกรม BlastX พบว่ายีนชิ้นกลางที่โคลนได้มีความเหมือนกับ *HtrA2* จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มากที่สุดคือ 97% หลังจากนั้นใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนชิ้นกลางไปใช้ทำ 5'RACE และ 3'RACE โดยขึ้นยีนด้านปลาย 5' ใช้ไพรเมอร์ *HtrA2-R2* และขึ้นยีนด้านปลาย 3' ใช้ไพรเมอร์ *HtrA2-F2* และเมื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าขึ้นยีนด้านปลาย 5' มีขนาด 595 คู่เบส และปลาย 3' มีขนาด 791 คู่เบส (รูปที่ 1) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสามชิ้นมาเชื่อมต่อกันด้วยโปรแกรม Vector NTI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์สายเต็มของยีนโปรตีน *HtrA2* มีขนาด 1,919 คู่เบส โดยมีส่วนของ 5' untranslated region (5' UTR) 43 คู่เบส และ 3' UTR 538 คู่เบส ซึ่งส่วนที่เป็น 3' UTR มี polyadenylation signal เป็น AATAAA และมี poly A tail และสามารถถอดรหัส

เป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 445 หน่วย จากการวิเคราะห์ภายในโครงสร้างของ *FmHtrA2* พบว่าประกอบด้วย 5 โดเมน คือ mitochondria targeting signal (MTS), transmembrane (TM) domain, IAP-binding motif (IBM), serine protease domain และ PDZ domain (รูปที่ 2) จากนั้นวิเคราะห์โดยใช้ SignalP 4.1 พบว่าโปรตีน *HtrA2* ไม่มีส่วนที่เป็น signal peptide และมีมวลโมเลกุล 47.87 กิโลดาลตันและมีค่า pI เป็น 9.35 และจากการนำลำดับกรดอะมิโนของ *FmHtrA2* ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ด้วยโปรแกรม BlastP พบว่ามีความเหมือนกับ *HtrA2* จากกุ้งกุลาดำมากที่สุดคือ 95% (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองบ่งชี้ว่ายีนที่โคลนได้เป็นโปรตีน *HtrA2* จากกุ้งแชบ๊วย



รูปที่ 1 แบบแผน DNA ใน agarose gel electrophoresis ที่ได้จากการทำ PCR

- แถวที่ 1 100 bp DNA ladder maker
- แถวที่ 2 PCR product ของดีเอ็นเอชิ้นกลาง
- แถวที่ 3 PCR product ของดีเอ็นเอด้านปลาย 5'
- แถวที่ 4 PCR product ของดีเอ็นเอด้านปลาย 3'

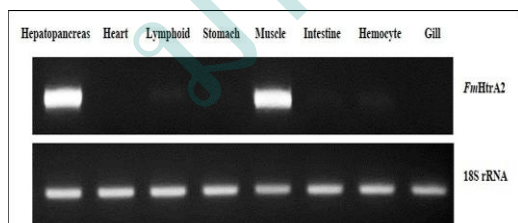


รูปที่ 2 แบบแผนการโคลนนิ่ง HtrA2 ของกุ้งแชบ๊วย

ตารางที่ 1 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน *FmHtrA2* กับของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

Species	% identity
<i>Penaeus monodon</i>	95
<i>Microplitis demolitor</i>	56
<i>Nasonia vitripennis</i>	51

ผลจากการศึกษาการแสดงออกของ *FmHtrA2* mRNA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธี RT-PCR พบว่ายีน *FmHtrA2* มีการแสดงออกมากที่สุดในระดับ รองลงมาคือกล้ามเนื้อ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การแสดงออกของ mRNA ของยีน HtrA2 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับ 18S rRNA ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม

5. การอภิปรายผล

HtrA2 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษา ยีนโปรตีน HtrA2 ในกุ้งแชบ๊วย โดยการโคลนนิ่งจากกระเพาะอาหารของกุ้งแชบ๊วย พบว่ายีนสายเต็มของ HtrA2 มีความยาว 1,919 คู่เบส โดยมีส่วนของ 5' UTR 43 คู่เบส 3' UTR 538 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 445 หน่วย ซึ่งความยาวของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนขนาดใกล้เคียงกับยีน HtrA2 ในกุ้งกุลาดำ และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ *FmHtrA2* มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนอื่น ๆ พบว่ามีความเหมือนกับ *PmHtrA2* จากกุ้งกุลาดำมากที่สุดคือ 95%

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ *FmHtrA2* พบว่า ประกอบด้วย 5 โดเมนอนุรักษ์ ซึ่งมีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ คือ mitochondria targeting signal (MTS), transmembrane (TM) domain, IAP-binding motif (IBM), serine protease domain และ PDZ domain โดย MTS เป็นโดเมนที่อยู่ปลาย N (N-terminus) ทำหน้าที่เป็นสัญญาณบ่งชี้ว่าโปรตีน HtrA2 ที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกขนส่งไปยังบริเวณที่จำเพาะของเซลล์ คือ ไมโทคอนเดรีย และ TM เป็นโดเมนที่บ่งชี้ว่าโปรตีน HtrA2 พบที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งทั้งสองโดเมนนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนที่ยังไม่สามารถทำหน้าที่ได้ (immature) ในสภาวะปกติ พบที่บริเวณไมโทคอนเดรีย แต่เมื่อมีสิ่งมากระตุ้นในสภาวะต่างๆ เช่น สภาวะความเครียด การติดเชื้อไวรัส อนุมูลอิสระต่างๆ เป็นต้น จากนั้นจะมีการส่งสัญญาณให้เกิดอะพอพโทซิสขึ้น ซึ่งส่งผลให้สายโพลีเปปไทด์ที่มีโดเมน IBM, serine protease domain และ PDZ domain สามารถทำงานได้ (mature) ทำให้

เกิดการเคลื่อนที่ออกจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาซึม โดยมี IBM อยู่ปลาย N ซึ่ง IBM เป็นบริเวณอนุรักษที่มีกรดอะมิโน 4 ตัว คือ alanine, valine, glutamine และ alanine ซึ่ง alanine และ valine ในตำแหน่งที่ 1 และ 2 เป็นตำแหน่งอนุรักษที่สามารถไปจับกับ BIR domain ของโปรตีน IAP ได้ ส่วน serine protease domain ทำหน้าที่สลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน IAP ได้ และ PDZ domain เป็นโดเมนที่สามารถไปจับจำเพาะกับโปรตีนที่จำเพาะกับ PDZ domain เพื่อให้บริเวณ active site เปิดออก ทำให้ serine protease สามารถทำหน้าที่ได้ โดยพบตำแหน่งจับของโปรตีน (protein binding site) 2 ตำแหน่ง ซึ่งทั้ง serine protease domain และ PDZ domain เป็นลักษณะเฉพาะของโปรตีน HtrA2 โดยมีความสอดคล้องกับการรายงานที่ผ่านมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่า FmHtrA2 อาจจะมีบทบาทในการกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิสในกิ้งก่าเหี้ยเช่นเดียวกัน

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน HtrA2 ในระดับ mRNA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ 18S rRNA เป็นยีนควบคุม พบว่ามีการแสดงออกของยีน HtrA2 ในทุกเนื้อเยื่อที่มีการทดสอบคือ ตับ หัวใจ lymphoid กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อลำไส้ เซลล์ฮีโมไซท์ และเหงือก โดยพบการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับ รองลงมาคือ กล้ามเนื้อ ส่วนหัวใจ lymphoid กระเพาะอาหาร ลำไส้ เซลล์ฮีโมไซท์ และเหงือกมีการแสดงออกน้อย จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า โปรตีน HtrA2 น่าจะเป็นโปรตีนที่มีบทบาทกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิสซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่าเหี้ย เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญมากในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ซึ่งภายในเนื้อเยื่อตับมีการแสดงออกของยีน HtrA2 จำนวนมาก เพื่อใช้ในกระบวนการกำจัดจุลินทรีย์บุกรุกต่าง ๆ โดยจากผล

การศึกษาดังกล่าว มีความสอดคล้องกับการศึกษาอะพอพโทซิสในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ซึ่งพบว่ามีการเกิดอะพอพโทซิสมากที่สุดในเซลล์ตับของหนู ปลาบู่ (goby) และปลาเทราท์ (rainbow trout) ซึ่งในสัตว์จำพวกนี้จะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดอัตราการซึมผ่านของสารจำพวก pro-apoptotic ออกจากไมโทคอนเดรียจำนวนมากในเซลล์ตับ จึงส่งผลให้ตับเป็นเนื้อเยื่อที่มีการเกิดอะพอพโทซิสสูง (Menze *et al.*, 2010) และนอกจากนี้กล้ามเนื้อเป็นอวัยวะที่มีการสัมผัสกับเชื้อโรคโดยตรงจากสิ่งแวดล้อมภายนอกได้บ่อย จึงมีการพบการแสดงออกของยีน HtrA2 มากรองลงมาจากตับ

6. บทสรุป

จากการโคลนและศึกษาคุณลักษณะของยีนโปรตีน HtrA2 ของกิ้งก่าเหี้ย สามารถโคลนขึ้นยีนจากกระเพาะอาหารของกิ้งก่าเหี้ย ได้ยีนสายเต็มของ HtrA2 มีความยาว 1,919 คู่เบส ซึ่งถอดรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 445 หน่วย ประกอบด้วย 5 โดเมน คือ mitochondria targeting signal (MTS), transmembrane (TM) domain, IAP-binding motif (IBM), serine protease domain และ PDZ domain ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิสผ่านการจับกับโปรตีน IAP และพบการแสดงออกของ mRNA ของยีน HtrA2 ในทุกเนื้อเยื่อที่มีการศึกษาโดยพบการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับ รองลงมาคือ กล้ามเนื้อ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน HtrA2 มีความสำคัญในการกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิสซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่าเหี้ย ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทหน้าที่และกลไกการทำงานของโปรตีน HtrA2 ในการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิสในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนมากยิ่งขึ้น

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนการศึกษาภายใต้โครงการความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี

8. เอกสารอ้างอิง

- Bulgakov, A. A., Park, K. I., Choi, K. -S., Lim, H. K., and Cho, M. (2004). Purification and Characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philipinarum* in Korea. *Fish Shellfish Immunol.* 16: 487-499.
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie.* 84: 215-222.
- Menze, M.A., Fortner, G., Nag, S., and Hand, S.C. (2010). Mechanism of apoptosis in Crustacea: what condition induce versus suppress cell death?. *Apoptosis.* 15: 293-321.
- Söderhäll, K., and Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 23-28.
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M., and Vandenabeele, P. (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ.* 15: 453-460.
- Verhagen, A. M., Kratina, T. K., Hawkins, C. J., Silke, J., Ekert, P. G., and Vaux, D. L. (2007). Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ.* 14: 348-357.
- White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10: 1-15.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.