

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code: TRG5980006

Project Title: การวิเคราะห์หายีนจีโปรตีนรีเซปเตอร์ที่เป็นตัวรับตัวใหม่ของฮอร์โมนเอกไดสเตอรอยด์ในการควบคุมการลอกคราบของปูทะเล *Scylla olivacea*

Investigator: ดร.สิรินาถ เตชา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

E-mail Address: sirinart.tec@biotec.or.th

Project Period: 2 ปี

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อค้นหาและศึกษาการทำงานของตัวรับฮอร์โมน 20-hydroxyecdysone (20-HE) ที่เป็นตัวรับชนิดใหม่ในปูทะเลดำ (*Scylla olivacea*) โดยตัวรับนี้มีตำแหน่งอยู่บนผิวเซลล์ โดยคาดว่าจะทำหน้าที่กระตุ้นการตอบสนองของฮอร์โมน 20-HE แบบรวดเร็ว (rapid signaling pathway) ตัวรับฮอร์โมนชนิดใหม่ที่พบนี้เป็นโปรตีนในกลุ่ม G-protein couple receptor (GPCR) ที่มีส่วนปลายทางด้าน C-terminus ของ seven-transmembrane domain เกาะอยู่กับ G-protein complex เมื่อฮอร์โมน 20-HE เข้าเกาะกับปลายทางด้าน N-terminus ที่อยู่ภายนอกเซลล์สัญญาณจะถูกส่งผ่าน G-protein complex ที่จะทำการสื่อสารผ่านสารสื่อสัญญาณต่อไป การค้นหายีน *GPCR* ในปูทะเลดำ ดำเนินการโดยการสร้าง transcriptomes ของ Y-organs จากระยะปกติ (intermolt) และระยะที่มีการเตรียมการลอกคราบ (ทั้งตามธรรมชาติและบังคับ) แล้วทำการเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GPCR* ที่พบในหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) เพื่อสร้างไพรเมอร์สำหรับค้นหายีน *GPCR* ใน cDNA ของ Y-organs ของปูทะเลดำ โดยสามารถค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (full-length sequence) ได้สองชนิด คือ *GPCR1* และ *GPCR2* รวมทั้งยีน *G-protein alpha-o subunit (Gao)* และ ยีน *β -arrestin* ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการถ่ายทอดและควบคุมสัญญาณของฮอร์โมน 20-HE เมื่อทำการวัดระดับการแสดงออกของยีน *GPCR1*, *GPCR2*, *G-proteins* และ *β -arrestin* จากเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ ต่อม Y-organs, สมอ, ปมประสาทใต้ท้อง (thoracic ganglia) และ ลำไส้ตอนท้าย (hind gut) ที่อยู่ในระยะ intermolt และ premolt พบว่า ต่อม Y-organs ในระยะ intermolt มีการแสดงออกของยีน *GPCR1*, *GPCR2*, *Gaq* และ *Gas* มากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการกระตุ้นต่อม Y-organs ด้วยการบ่มในฮอร์โมน 20-HE ที่ความเข้มข้นจำลองระยะ premolt พบว่า มีเพียงยีน *GPCR2* และ *Gao* เท่านั้นที่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนโดยที่ ยีน *GPCR2* มีเพิ่มการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญหลังจากบ่ม 1 ชั่วโมงแล้วลดระดับกลับมาระดับเริ่มต้น ในขณะที่ยีน *Gao* มีการลดระดับการแสดงออกหลังจากบ่มได้ 2 และ 6 ชั่วโมง ในขณะที่เดียวกันฮอร์โมน 20-HE มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อสัญญาณที่ทราบกันดีว่าเกี่ยวข้องกับ rapid signaling pathway ในต่อม Y-organs ได้แก่ Ca^{2+} , cAMP และ cGMP โดยพบ 1) ระดับของ Ca^{2+} มีการ

เปลี่ยนแปลงที่ 30 วินาทีแรก 2) ระดับของ cAMP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 15 นาทีแล้วคงระดับจนถึง 1 ชั่วโมง 3) ระดับของ cGMP มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 15 นาทีแล้วลดระดับลงทันที นอกจากนี้ได้มีการยืนยันผลการตอบสนองของยีน *GPCR2* ต่อฮอร์โมน 20-HE ในระดับโปรตีนด้วยการทำ immunohistochemistry พบว่า โปรตีน *GPCR2* พบอยู่บนผิวเซลล์ของต่อม Y-organs เป็นระดับพื้นฐาน (basal level) แล้วมีการเพิ่มระดับการแสดงออกหลังจากที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE ที่ 1 และ 6 ชั่วโมง จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ฮอร์โมน 20-HE สามารถกระตุ้นต่อม Y-organs ให้มีการถ่ายทอดสัญญาณแบบ rapid signaling pathway ผ่านสารสื่อสัญญาณได้แก่ Ca^{2+} , cAMP และ cGMP ในขณะที่โปรตีน *GPCR2* ที่ค้นพบในปฏะเลดำมีการตอบสนองต่อฮอร์โมน 20-HE อย่างจำเพาะเจาะจงแต่อย่างไรก็ดีผลทดลองในโครงการนี้ยังไม่สามารถบ่งชี้ได้อย่างแน่ชัดว่าโปรตีน *GPCR2* ทำหน้าที่เป็นตัวรับของฮอร์โมน 20-HE ได้ ซึ่งยังคงต้องมีการศึกษาเพื่อยืนยันหน้าที่ของโปรตีน *GPCR2* ดังกล่าวในระดับต่อไป

Keywords: ปฏะเลดำน้ำม การลอกคราบ ฮอร์โมน 20-HE ตัวรับฮอร์โมน G-protein coupled receptor