Thai J. Genet. 2013, 6(1) : 36-39

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน prefoldin กับโปรตีนคัลมอดุลินและโปรตีนคล้ายคัลมอดุลินจากข้าว (*Oryza sativa* L.)

Interaction studies of a prefoldin with calmodulin and CML proteins from rice (*Oryza sativa* L.)

จุฑามาศ อนันทยานนท์ และ ธีรพงษ์ บัวบูชา*

Jutamas Anantayanon and Teerapong Buaboocha*

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

**Corresponding author: Teerapong.B@chula.ac.th*

บทคัดย่อ

แคลเซียมซึ่งถือเป็นตัวส่งสัญญาณอันดับสอง (second messenger) จะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน cytosol ของเซลล์พืชเมื่อพืชได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งสัญญาณแคลเซียมนี้จะถูกถ่ายทอดโดยการทำงานของโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียม (calcium sensor protein) คัลมอดุลิน (calmodulin, CaM) ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียม จะทำงานโดยเข้าจับกับแคลเซียมไอออน แล้วส่งสัญญาณแคลเซียมต่อไป โดยเข้าจับและควบคุมการทำงานของโปรตีนเป้าหมายหลายชนิดภายในเซลล์ ซึ่งในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้พบโปรตีนเป้าหมายของโปรตีน OsCaM1 จากข้าว (*Oryza sativa* L.) อยู่หลายชนิดด้วยวิธี cDNA expression library screening และในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค yeast two-hybrid ในการตรวจสอบการจับกันของโปรตีน CaM และโปรตีนคล้ายคัลมอดุลิน (CaM-like: CML protein) กับโปรตีนเป้าหมายที่ได้ชนิดหนึ่งคือ prefoldin พบว่าโปรตีน prefoldin สามารถจับกับโปรตีน OsCML4 ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีแคลเซียมได้ แต่ไม่จับกับโปรตีนคัลมอดุลิน

ABSTRACT

Concentration of calcium, which is a second messenger, increases rapidly in cytosol when plants encounter environmental stress conditions. Calcium signals are then conveyed by the action of calcium sensors. Calmodulin (CaM), which is one of the calcium sensors, will bind to calcium ions and transmit the calcium signal by binding to and activating target proteins within the cell. The activities of target proteins affect physiological responses to specific stimuli received by plant cells. In previous study, we have identified several putative OsCaM1 target proteins from rice (*Oryza sativa* L.) by cDNA expression library screening. In this research, the yeast two-hybrid system was performed to examine the

interaction of CaM and CML proteins with Prefoldin, which is one of the identified putative target proteins. The result showed that Prefoldin was found to bind OsCML4 both in the presence and in the absence of calcium but not with CaM.

คำสำคัญ: โปรตีนรับสัญญาณแคลเซียม, คัลมอดุลิน, ข้าว, ระบบยีสต์ทูไฮบริด

Key words: calcium sensor protein, calmodulin, rice, yeast two-hybrid system

บทนำ

พืชมีกลไกในการตอบสนองต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ โดยพืชจะอาศัยสัญญาณที่ถูกสร้างขึ้นจากภายใน เมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อภาวะแวดล้อม เช่น ความเค็ม ความแล้ง การเกิดบาดแผล การถูกโจมตีจากเชื้อโรค ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ภายในไซโทซอล (cytosol) อย่างรวดเร็ว เมื่อระดับแคลเซียมไอออนเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียม (Ca^{2+} sensor protein) โปรตีนเหล่านี้มี EF-hand motif หรือ calcium-binding motif ที่ทำหน้าที่ในการจับกับแคลเซียมไอออน โปรตีนสำคัญในกลุ่มนี้ คือ คัลมอดุลิน (calmodulin, CaM) CaM เป็นโปรตีนที่ไม่มีแอคทิวิตี (activity) ในตัวเอง ทำงานโดยจับและควบคุมการทำงานของโปรตีนเป้าหมายชนิดต่างๆ ภายในเซลล์ โดยเมื่อ CaM จับกับแคลเซียมไอออนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปทำให้สามารถกระตุ้นโปรตีนเป้าหมาย เพื่อส่งผ่านสัญญาณต่อไปเป็นลำดับ จนกระทั่งถึงการแสดงออกของยีนที่สำคัญต่อการปรับตัวของพืชเพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมต่างๆ ในระดับเซลล์อย่างเหมาะสม โดยในไซโทซอลมีโปรตีนจำนวนมาก ที่อยู่ในกระบวนการส่งสัญญาณแคลเซียมนี้ แต่ตัวมันเองไม่สามารถจับกับแคลเซียมได้โดยตรง โปรตีนเหล่านี้จึงต้องอาศัย CaM มาเป็นโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียมขั้นต้น จึงเรียกได้ว่า CaM เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่การทำงานที่หลากหลาย เนื่องจากมีความสามารถในการกำหนดแอคทิวิตีของโปรตีนอื่นๆ ดังนั้นการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนคัลมอดุลิน จึงต้องค้นหาโปรตีนที่จับคัลมอดุลิน (calmodulin-binding protein) ภายในเซลล์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบโปรตีนเป้าหมายหลายชนิดของโปรตีน OsCaM1 จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธี expression library screening เรียกโปรตีนเหล่านี้ว่า putative CaM1-binding protein และในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาโปรตีน prefoldin ซึ่งเป็น putative CaM1-binding protein ชนิดหนึ่ง โดยศึกษาสมบัติการจับกันระหว่างโปรตีน prefoldin กับ CaM และ CMLs บางชนิดโดยใช้เทคนิค yeast two-hybrid system

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *prefoldin, CaM* และ *CMLs* จากข้าว

สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *prefoldin*, *CaM* และ *CMLs* จากฐานข้อมูลข้าว Rice Genome Annotation Project (http://rice.plantbiology.msu.edu/) จากนั้นออกแบบ forward และ reverse primer โดยใช้ลำดับเบส cDNA ของยีน *prefoldin* (OsPFD), *CaM1* (OsCaM1-1), *CML1* (OsCML1) และ *CML4* (OsCML4) ที่ได้จากฐานข้อมูลข้าว โดยให้ forward primer มีลำดับเบส CACC อยู่หน้า start codon และ reverse primer มี stop codon ต่อท้ายดังแสดงใน Table 1 จากนั้นเพิ่มจำนวนชิ้นยีนโดยใช้ full-length cDNA เป็นแม่แบบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แล้วเชื่อมชิ้นยีนเข้ากับ pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen)

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Gene	Primer	Sequence
OsCaM1-1	forward	5'-CACCATGGCGGACCAGCTCACC-3'
	reverse	5'-TCACTTGGCCATCATGACCTTG-3'
OsCML1	forward	5'-CACCATGGCGGACCAGCTCTCC-3'
	reverse	5'-TTACAGGATCACGCACTTCTGGC-3'
OsCML4	forward	5'-CACCATGGAAGGGCTGACGAGC-3'
	reverse	5'-TCACCCAGATATCTTCCGTTCAG-3'
OsPFD	forward	5'-CACCATGGCTACAAAACTCCGT-3'
	reverse	5'-TTATACAGATTTGTCCCCAGG-3'

และทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 คัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

การสร้างพลาสมิด Bait และ Prey

แลกเปลี่ยนชิ้นยีน (LR Recombination) *prefoldin* จากเวกเตอร์ pENTR™/D-TOPO® เข้าสู่เวกเตอร์ pDEST™32 (เป็น Bait) (Invitrogen) ยีน *CaM* และ *CMLs* จากเวกเตอร์ pENTR™/D-TOPO® เข้าสู่เวกเตอร์ pDEST™22 (เป็น Prey) (Invitrogen) โดยใช้ LR Clonase™ II enzyme mix (Invitrogen) แล้วทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 คัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ที่มียาปฏิชีวนะเจนตามัยซินและแอมพิซิลินตามลำดับ

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

นำพลาสมิดลูกผสมที่มียีนอยู่ใน pDEST™22 และ pDEST™32 เข้าสู่ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ MaV203 โดยวิธีโคทรานส์ฟอร์มเมชัน และศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองโดยคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดกรดอะมิโนลิวซีน ทริปโตเฟน และฮิสทิดิน (-LTH)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดสอบ Bait auto-activation โดยการโคลนชิ้นยีน *prefoldin* เข้าสู่เวกเตอร์ pDEST™32 แล้วทรานส์ฟอร์ม *prefoldin*-pDEST™32 และ pDEST™22 เข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ MaV203 พบว่า prefoldin สามารถเป็น bait ใน yeast two-hybrid system ได้โดยไม่เกิด auto-activation (Figure 1)

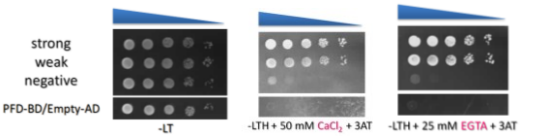

Figure 1 Testing the bait auto-activation. Yeast strains MaV203 co-transformed with the test constructs were grown at 30 °C for several days under selective (-LTH + 3-AT) and non-selective (-LT) conditions.

จากการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง prefoldin กับ CaM และ CMLs พบว่า prefoldin มี

ปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน CML4 ทั้งในภาวะที่มี และไม่มีแคลเซียม (Figure 2) อย่างไรก็ตามพบว่า prefoldin ไม่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน CaM1 และ CML1 ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าโปรตีน CaM มีความยืดหยุ่นสูง จึงอาจทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน prefoldin ได้ ถึงแม้ว่าโปรตีน prefoldin จะได้มาจากวิธี cDNA expression library screening โดยใช้โปรตีน CaM1 เป็นโพรบก็ตาม

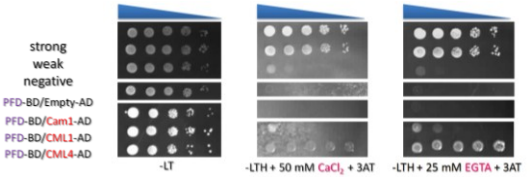

Figure 2 Interaction of prefoldin with CaM1, CML1 and CML4 in the yeast two-hybrid system. Yeast strains MaV203 co-transformed with prefoldin and CaM/CML constructs were grown at 30 °C for several days under selective (-LTH+3-AT) and non-selective (-LT) conditions. Serial dilutions of transformed cells are shown by narrowing triangles.

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง prefoldin มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน OsCML4 ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีแคลเซียม แต่ไม่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน CaM แสดงว่าแคลเซียมในเซลล์อาจไม่มีผลต่อการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน prefoldin กับโปรตีน OsCML4

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)

เอกสารอ้างอิง

Boonburapong B and Buaboocha T (2007) Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. BMC Plant Biol 7: 1471–2229.

Grabarek Z (2006) Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. J Mol Biol 359: 509–525.

Perochon A, Dieterle S, Pouzet C, Aldon D, Galaud J-P and Ranty B (2010) Interaction of a plant pseudo-response regulator with a calmodulin-like protein. Biochem Biophy Res Commun 398: 747–751.

Reddy ASN (2001) Calcium: silver bullet in signaling. Plant Sci 160: 381–404.