

Abstract

Project Code : DBG4980005

Project Title : Characterization of a glycine-rich-single whey acidic protein-domain (GWAP) antimicrobial peptide from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Investigator : Dr. Piti Amparyup

E-mail Address : piti.amp@biotec.or.th

Project Period : 20 July 2006 – 19 July 2008

Proteins containing a whey acidic protein (WAP) domain have been found in several species of vertebrates and invertebrates and exhibit a variety of functions including proteinase inhibitory and antimicrobial activities. The WAP domain comprises of approximately 50 amino acids including eight cysteine residues which form a four-disulfide core. In this research, two novel genes of crustin-like antimicrobial peptide (Crus-like*Pm*) and single WAP domain (SWD)-containing proteins were identified from haemocytes of *Penaeus monodon*. The deduced amino acid sequence of a full-length Crus-like*Pm* cDNA consists of 124 amino acid residues of the mature peptide and a signal peptide of 17 amino acid residues. The mature peptide of a Crus-like*Pm* contains a glycine-rich domain at the *N*-terminus and 12 conserved cysteine residues containing a single WAP domain at the *C*-terminus. For SWD-containing proteins, the deduced peptides of the cDNAs representing three isoforms of SWD proteins (SWD*Pm*1, SWD*Pm*2 and SWD*Pm*3) revealed that they contain a putative signal peptide of 24 amino acids and encode for a mature peptide of 69, 68 and 56 amino acids, respectively, which contain typical characters similar to those of the shrimp SWD proteins with a Pro-Arg region and a WAP domain towards the *C*-terminus. Phylogenetic tree obtained indicates that Crus-like*Pm* is closely related to the other shrimp crustin proteins, while SWD*Pm* proteins were grouped within the cluster of SWD and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) from various shrimp species. Genomic organization of genes revealed the presence of two exons and one intron of a Crus-like*Pm* gene and three exons interrupted by two introns of a SWD*Pm*2 gene. The 5'-flanking regions of a Crus-like*Pm* gene contain multiple putative transcription factor binding sites. Tissue distribution analysis by RT-PCR showed that a Crus-like*Pm* and all three SWD*Pm* transcripts were primarily found in haemocytes. Transcript expression of a Crus-like*Pm* and SWD*Pm* were differentially

regulated upon bacterial and viral infections. To characterize the biological functions of Crus-like*Pm* and SWD*Pm*2 proteins, the mature protein encoding cDNA were cloned and expressed in *Escherichia coli*. The purified recombinant (r)Crus-like*Pm* and rSWD*Pm*2 showed strong antimicrobial activity at low MIC values. In addition, rSWD*Pm*2 exhibits proteinase inhibitory activity against subtilisin A and is a competitive inhibitor of subtilisin A with an inhibition constant (K_i) of 1.98 nM. The presence of Crus-like*Pm* and SWD*Pm* transcripts in hemocyte and its protein functions as an anti-bacteria and anti-proteinase suggested that they are potent immune effectors to protect the shrimp from pathogen infection.

Keywords : *Penaeus monodon*, antimicrobial peptide, WAP domain

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DBG4980005
ชื่อโครงการ : การศึกษาลักษณะสมบัติของของเปปไทด์ต้านจุลชีพ GWAP จากกุ้ง
กุลาดำ *Penaeus monodon*
Investigator : ดร. ปิติ อัมพาศัย
E-mail Address : piti.amp@biotec.or.th
ระยะเวลาโครงการ: 20 กรกฎาคม 2549 – 19 กรกฎาคม 2551

โปรตีนที่ประกอบด้วย WAP domain พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง และมีหน้าที่ทางชีวภาพหลายชนิดประกอบด้วย การยับยั้งโปรตีนเนสและสมบัติการต้านทานจุลชีพ โดย WAP domain ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 50 ตัว และมีบริเวณอนุรักษ์กรดอะมิโนซิสเตอีนจำนวน 8 ตัว ซึ่งสามารถสร้าง 4 พันธะไดซัลไฟด์ ในงานวิจัยนี้ได้ค้นพบยีนใหม่ 2 ยีนในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำซึ่งประกอบด้วย crustin-like antimicrobial peptide (Crus-likePm) และ single WAP domain (SWD)-containing proteins เมื่อทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน Crus-likePm พบว่ามีกรดอะมิโนของ mature peptide จำนวน 124 ตัว และ signal peptide จำนวน 17 ตัว โดย mature peptide ของยีน Crus-likePm ประกอบด้วย glycine-rich domain ที่ปลาย N และ บริเวณอนุรักษ์กรดอะมิโนซิสเตอีนจำนวน 12 ตัว โดยรวม WAP domain ที่ปลาย C ในส่วน SWD-containing proteins พบยีน SWD จำนวน 3 ยีน (SWDPm1, SWDPm2 and SWDPm3) โดยโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนของ signal peptide จำนวน 24 ตัว และ mature peptide จำนวน 69, 68 และ 56 ตัว ตามลำดับ โดยโปรตีน SWD ของกุ้งกุลาดำมีลักษณะคล้ายกับ SWD ในกุ้ง ซึ่งประกอบด้วย Pro-Arg region และ WAP domain ที่ปลาย C จากการสร้างแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการพบว่ายีน Crus-likePm มีความใกล้ชิดกับยีน crustin ในกุ้ง ในขณะที่ยีน SWDPm จัดอยู่ในกลุ่มของยีน SWD และยีน SLPI ในกุ้งหลายชนิด การศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนพบว่ายีน Crus-likePm ประกอบด้วย 2 exons และ 1 intron ส่วนยีน SWDPm2 ประกอบด้วย 3 exons และ 2 introns จากการศึกษาบริเวณทางด้าน 5'-flanking region ของยีน Crus-likePm พบ transcription factor binding site หลายตำแหน่งเมื่อตรวจการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ พบว่ายีน Crus-likePm และยีน SWDPm มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด และพบว่ายีน Crus-likePm และ SWDPm มีการควบคุมการแสดงออกแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส จากการศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2 โดยการโคลน และแสดงออกใน *Escherichia coli* พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ

Crus-likePm และ SWDPm2 มีสมบัติในการต้านทานจุลชีพโดยมีค่า MIC ต่ำ นอกจากนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ SWDPm2 มีสมบัติในการยับยั้งโปรตีนเนส subtilisin A และมีค่า inhibition constant (K_i) เท่ากับ 1.98 nM ผลจากการศึกษายืนยัน Crus-likePm และ SWDPm ที่พบว่ามีการแสดงออกในเม็ดเลือดและการมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียและการยับยั้งโปรตีนเนส แสดงให้เห็นว่า Crus-likePm และ SWDPm2 เป็นโมเลกุลที่สำคัญในการป้องกันกึ่งจากการติดเชื้อในกึ่ง

คำหลัก : กึ่งกลาดำ, เปปไทด์ต้านจุลชีพ, โดเมน WAP