

Abstract

Project Code: DBG5380031

Project Title: The activation mechanism of the prophenoloxidase system in shrimp by pattern recognition protein

Investigator: Dr. Piti Amparyup E-mail Address : piti.amp@biotec.or.th

Project Period: 31 May 2010 – 30 May 2012

The global shrimp industry still faces various serious disease related problems that are mainly caused by pathogenic bacteria and viruses. The understanding of the immune system in shrimp is necessary to provide the means to control and minimize the loss of production due to disease outbreaks. Melanization by prophenoloxidase (proPO) system is an important innate immune mechanism that plays a critical role in the defense against a wide range of pathogens in invertebrates. The activation of the proPO system, by the specific recognition of microorganisms by pattern recognition proteins (PRPs), triggers a serine proteinase cascade including a proPO-activating enzyme (PPAE), eventually leading to the cleavage of the inactive proPO to the active PO that functions to produce the melanin and toxic reactive intermediates against invading pathogens.

In this study, we focus on characterizing the role of a lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (*PmLGBP*) and *PmPPAE2* in the proPO system of shrimp *Penaeus monodon*. Transcript expression analysis revealed that *PmLGBP* and *PmPPAE2* transcripts were mainly expressed in hemocytes. Genomic organization analysis revealed that *PmPPAE1* gene consists of ten exons and nine introns, whilst *PmPPAE2* comprises of eight exons interrupted by seven introns. The ELISA binding studies indicated that recombinant (r)*PmLGBP* binds to beta-1,3-glucan and LPS with a dissociation constant of $6.86 \times 10^{-7} \text{M}$ and $3.55 \times 10^{-7} \text{M}$, respectively. Furthermore, r*PmLGBP* could enhance the phenoloxidase (PO) activity of shrimp hemocyte in the presence of LPS or beta-1,3-glucan. Double-stranded RNA-mediated suppression of *PmLGBP* and *PmPPAE2* transcript levels resulted in a significant decrease in the PO activity. Knockdown of *PmLGBP* significantly decreased the *PmLGBP* transcript level but had no effect on the expression of the other immune genes tested. However, suppression of proPO expression down-regulated *PmLGBP*, *PmPPAE2* and antimicrobial peptide transcripts. It is concluded that the *PmPPAE2* is a shrimp PPAE and possibly mediates the activation of *PmproPO* and *PmLGBP* function as a pattern recognition protein for LPS and beta-1,3-glucan in the shrimp proPO activating system.

Keywords : Shrimp, *Penaeus monodon*, immune system, phenoloxidase, pattern recognition protein, proteinase

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DBG5380031

ชื่อโครงการ : กลไกการกระตุ้นระบบโพรพีนอลออกซิเดสในกุ้งโดย pattern recognition protein

หัวหน้าโครงการ : ดร. ปิติ อัมพาศ

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

ระยะเวลาโครงการ: 31 พฤษภาคม 2553 – 30 พฤษภาคม 2555

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทั่วโลกยังคงประสบปัญหาภัยร้ายแรงต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคที่ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัสก่อโรค ความเข้าใจระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อใช้หาวิธีการควบคุมและลดการสูญเสียของผลผลิต อันเนื่องมาจากการระบาดของโรค การสร้างเมลาณินโดยระบบโพรพีนอลออกซิเดสเป็นกลไกที่สำคัญของภูมิคุ้มกัน ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการต่อต้านเชื้อโรคหลากหลายชนิดในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง การกระตุ้นระบบโพรพีนอลออกซิเดสเกิดขึ้นได้จากการจดจำอย่างจำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์โดย แพทเทิร์นรีคอกนิชันโปรตีนทำให้เกิดการกระตุ้น ซีรีนโปรตีนเนสแคสเคด รวมทั้งโพรพีนอลออกซิเดสแอคติเวตงเอนไซม์ ส่งผลให้เกิดการตัดของโพรพีนอลออกซิเดส ให้เป็นฟีนอลออกซิเดสเพื่อทำหน้าที่ในการผลิตเมลาณินและสารตัวกลางของปฏิกิริยาที่เป็นพิษมีผลต่อการต้านเชื้อโรคที่บุกรุก

ในการศึกษาครั้งนี้เรามุ่งเน้นศึกษาลักษณะบทบาทของโปรตีน *PmLGBP* และ *PmPPAE2* ในระบบโพรพีนอลออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่ายีน *PmLGBP* และ *PmPPAE2* แสดงออกมากในเม็ดเลือด เมื่อวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีนพบว่า *PmPPAE1* ประกอบด้วย 10 exon และ 9 intron ขณะที่ยีน *PmPPAE2* ประกอบด้วย 8 exon และแทรกโดย 7 intron จากการศึกษาการจับกันโดยเทคนิค ELISA พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน *PmLGBP* สามารถจับกับ beta-1,3-glucan และ LPS โดยมีค่า dissociation constant เท่ากับ 6.86×10^{-7} M and 3.55×10^{-7} M ตามลำดับ นอกจากนี้ *rPmLGBP* สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งที่มี LPS หรือ beta-1,3-glucan เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* และ *PmPPAE2* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดกุ้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* พบว่ายีน *PmLGBP* ของกุ้งมีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนอื่นๆในระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *proPO* พบว่าการแสดงออกของยีน *PmLGBP*, *PmPPAE2* และเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่ายีน *PmPPAE2* คือ PPAE ในกุ้งและอาจจะเป็นตัวกระตุ้น *proPO* และยีน *PmLGBP* ทำหน้าที่เป็น pattern recognition protein โดยจับ LPS และ beta-1,3-glucan และกระตุ้นระบบ *proPO*

คำหลัก : กุ้งกุลาดำ, ระบบภูมิคุ้มกัน, ฟีนอลออกซิเดส, แพทเทิร์น รีคอกนิชัน โปรตีน, โปรตีนเนส