

Abstract

Fortilin/translationally controlled tumor protein (TCTP), has been demonstrated to protect mammalian cells under stress from cell death. Fortilin/TCTP is an expressed protein found in wide range of organisms both the animal and plant kingdoms. Shrimp fortilin has a 64% identity in amino acid composition with human fortilin. In our previous work, shrimp fortilin (Pm-fortilin), when overexpressed in mammalian cells, protected them from cell death. To address the biological functions of shrimp fortilin, we established the cell survival assay with several kinds of toxic reagents in insect cell (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) using MTT assay. The results showed that overexpressed of shrimp fortilin can protect cell from death induced by etoposide, camptothecin and cycloheximide. Furthermore, we performed RNA interference (RNAi) experiment to suppress *fortilin* gene expression in Sf9 cell. The data presented that both dsRNA of shrimp *fortilin* and endogenous Sf- *fortilin* have a potential to decrease cell proliferation. Taken together, our results suggest that fortilin able to protect cell from death and also appears to regulate cell proliferation and survival in Sf9 cell. In addition, we demonstrate that RNAi can be applied to study the function of the transgene expressed in insect cell line. In our previous work, recombinant fortilin was used to protect viral infected shrimp with 80-100% survival and detection of very low viral gene by PCR. Fortilin is abundantly expressed in hemocytes, and this is involved in survival of shrimp during infection. In this study, a reverse genetic approach was used to test the function of Pm-fortilin, we established RNA interference (RNAi) experiment to suppress *Pm-fortilin* gene expression in the pacific white shrimp. We performed by injection of double-strand RNA (dsRNA) of *Pm-fortilin* gene into the shrimp, resulted in a significant reduction of *fortilin* in hemocytes at 24 and 48 hours after injection when compared with the silencing of control gene. This study suggest that dsRNA of fortilin gene is capable of silencing sequence-specific gene in shrimp. The silencing of *Pm-fortilin* in shrimp during viral infection showed the increasing mortality of shrimp in early infection period. The results indicate that shrimp fortilin was important for survival of shrimp during viral infection and may be involving in viral infection mechanism.

Keywords: Pm-fortilin, Sf-fortilin, shrimp, apoptosis, RNAi, Sf9

บทคัดย่อ

ยีนฟอติลิน (*Fortilin*) พบได้ทั่วไปทั้งในพืชและสัตว์ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการตายของเซลล์ภายใต้สภาวะกดดัน ฟอติลินของงูหรือ *Pm-fortilin* ซึ่งมีกรดอะมิโนที่คล้ายกับของมนุษย์ประมาณ 64% โดยการศึกษาเบื้องต้นในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าสามารถป้องกันการตายของเซลล์ได้ เพื่อที่จะยืนยันผลดังกล่าวนักวิจัยได้ทดสอบหน้าที่ *Pm-fortilin* โดยการทดสอบการรอดชีวิตด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์แมลง (*Sf9*) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับงูมากกว่า โดยการ *overexpressed* ยีนฟอติลินของงูในเซลล์แมลง และทดสอบด้วยสารที่ชักนำการตาย ผลการทดลองพบว่า *Pm-fortilin* สามารถป้องกันการตายอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบด้วยสาร etoposide, camptothecin และ cycloheximide นอกจากนี้นักวิจัยทำการทดลอง RNAi ของยีน *Pm-fortilin* ในเซลล์แมลง โดยผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการยับยั้งการแสดงออกของ *Pm-fortilin* ที่มีการ *overexpression* และ *Sf-fortilin* ในเซลล์แมลงเองนั้น พบว่าทั้งสองการทดลองมีผลทำให้การแบ่งเซลล์น้อยลง จากผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า ฟอติลินมีผลต่อการป้องกันการตายของเซลล์และอาจจะมีผลต่อการควบคุมการแบ่งเซลล์ของเซลล์แมลงด้วย นอกจากนี้นักวิจัย ได้ทำการทดลอง RNAi ในงูขาวเพื่อทดสอบหน้าที่ของ *Pm-fortilin* ในรูปแบบ reverse genetic approach เนื่องจาก Tonganunt และคณะ (2008) พบว่าโปรตีนลูกผสม *Pm-fortilin* มีผลทำให้งูรอดตายมากขึ้นเมื่องูติดเชื้อไวรัส และพบว่าติดงูไวรัสตัวแดงดวงขาวลดน้อยลง และยีนฟอติลินก็มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเมดเลือดงูเมื่อมีการติดเชื้อ โดยนักวิจัยได้เตรียม dsRNA ของยีน *Pm-fortilin* และฉีดเข้ากล้ามเนื้องู พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *Pm-fortilin* ในเมดเลือดงูลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระบบ RNAi ที่ใช้มีประสิทธิภาพดีและมีจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย เมื่อทำการลดระดับการแสดงออกของยีน *Pm-fortilin* ระหว่างการติดเชื้อไวรัสในงูพบว่าอัตราการตายของงูเพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรกของการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า *Pm-fortilin* มีความสำคัญต่อการติดเชื้อไวรัสในงูและอาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการติดเชื้อไวรัสในงู