

บทคัดย่อ

(Thai) การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของ CrustinPm1 และ CrustinPm7 จากกุ้งกุลาดำ
Penaeus monodon

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการค้นพบครัสติน (crustin) หลายไอโซฟอร์มจากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ครัสตินเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพ ที่มีประจุสุทธิเป็นบวก และประกอบไปด้วยซิสเทอีน (cysteine) เป็นจำนวนมาก โดยซิสเทอีนดังกล่าวเป็นองค์ประกอบของ single whey acidic protein (WAP) โดเมน ที่อยู่บริเวณ C-terminus ของครัสติน ครัสตินนั้นมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาสมบัติการจับ และฤทธิ์การต้านจุลชีพของ crustinPm1 และ crustinPm7 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่พบมากในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ มีรายงานว่า crustinPm1 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวกเท่านั้น ในขณะที่ crustinPm7 สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ จากการศึกษาการจับของครัสตินกับเซลล์แบคทีเรีย พบว่า ครัสตินทั้งสองไอโซฟอร์มสามารถ จับกับแบคทีเรียได้ ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ผลของ Enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay แสดงให้เห็นว่า ครัสตินสามารถจับกับ lipoteichoic acid (LTA) และ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แบบ Positive cooperative โดยมีค่า Hill slope (H) มากกว่า 2 ซึ่งบ่งชี้ว่า ครัสติน 2 โมเลกุล เข้าจับกับ LTA หรือ LPS 1 โมเลกุล นอกจากนี้ ครัสตินทั้งสองไอโซฟอร์มยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด bacterial agglutination และการเปลี่ยนแปลง สมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Inner membrane permeabilization) ของ *Escherichia coli* ได้อีกด้วย ภาพจาก Scanning Electron Microscopy (SEM) แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงบนผิวเซลล์ของ *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi* และ *E. coli* เมื่อบ่มแบคทีเรียดังกล่าวกับ crustinPm7 ในขณะที่ crustinPm1 สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวเซลล์ของ *S. aureus* และ *E. coli* เท่านั้น ซึ่งผลดังกล่าว สอดคล้องกับฤทธิ์การต้านจุลชีพของ crustinPm1 ซึ่งไม่มีฤทธิ์ต่อ *V. harveyi* จากการศึกษาทั้งหมด คาดว่า การทำให้เกิด bacterial agglutination และการเปลี่ยนแปลงบนผนังเซลล์แบคทีเรีย เป็นกลไกที่สำคัญของครัสติน ในการยับยั้งแบคทีเรีย จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกครัสติน พบว่า สามารถตกผลึก crustinPm1 ใน 0.2 M Lithium citrate tribasic tetrahydrate, 20% PEG 3350, pH 8.4 ได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึก crustinPm7

คำหลัก: Antimicrobial peptides, Bacterial agglutination, Crystallization, Crustin, Inner membrane permeabilization, lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid (LTA), *Penaeus monodon*

Abstract

(English) Structural and Functional Study of Crustin $Pm1$ and Crustin $Pm7$ from the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*

Several isoforms of crustin have been identified in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. These cationic cysteine-rich antimicrobial peptides contain a single whey acidic protein (WAP) domain at the C-terminus and exhibit antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. In this work, we investigate the binding properties and antimicrobial actions of crustin $Pm1$ and crustin $Pm7$, the two most abundant crustin isoforms found in the haemocyte of *P. monodon*. Previously, crustin $Pm1$ showed strong inhibition against Gram-positive bacteria, whilst crustin $Pm7$ acted against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. A binding study showed that both crustins can bind to Gram-positive and Gram-negative bacterial cells. Enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay suggested that crustins bind to the cell wall components, lipoteichoic acid (LTA) and lipopolysaccharide (LPS) with positive cooperativity of Hill slope (H) > 2. This indicates that at least two molecules of crustins interact with one LTA or LPS molecule. In addition, both crustins can induce bacterial agglutination and cause inner membrane permeabilization in *Escherichia coli*. Scanning Electron Microscopy (SEM) revealed the remarkable change on the cell surface of *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi* and *E. coli* after the bacteria were treated with the recombinant crustin $Pm7$. Meanwhile, crustin $Pm1$ can cause a visible change on the cell surface of *S. aureus* and *E. coli* only. This is in agreement with the fact that crustin $Pm1$ has shown no antimicrobial activity against *V. harveyi*. It is likely that the antimicrobial activity of crustins mainly relies on their ability to agglutinate bacterial cells and to disrupt the physiochemical properties of bacterial surface. Crystallization experiments were also carried out. Recombinant crustin $Pm1$ was crystallized in 0.2 M Lithium citrate tribasic tetrahydrate, 20% PEG 3350, pH 8.4. However, no crystallization condition for rcrustin $Pm7$ was found.

Keywords: Antimicrobial peptides, Bacterial agglutination, Crystallization, Crustin, Inner membrane permeabilization, lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid (LTA), *Penaeus monodon*