บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5580024

ชื่อโครงการ : การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ : ลักษณะสมบัติของโปรตีนที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสและการจำแนก miRNA ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : kunlaya.s@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 16 กรกฎาคม 2555 – 15 กรกฎาคม 2558

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เป็นสปีชีร์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย แต่การระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวทำให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจอย่างมาก ทั้งนี้เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อเชื้อไวรัส ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีน viral responsive protein 15 (*Pm*VRP15) ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นหลังจากกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และค้นหาและศึกษาลักษณะสมบัติของ miRNA ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *Pm*VRP15 โดยเทคนิค RNA interference ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว และอัตราการตายของกุ้งลดลง ชี้ให้เห็นว่ายีน *Pm*VRP15 มีความสำคัญกับการเพิ่มจำนวนไวรัสในกุ้ง และยังพบว่าโปรตีน WSV399 สามารถจับกับโปรตีน *Pm*VRP15 ด้วยตรวจสอบด้วยเทคนิค Yeast two-hybrid และ Co-immunoprecipiation เมื่อหาตำแหน่งบนไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย เทคนิค immunobloting analysis และ immunoelectron microscopy พบว่าโปรตีน WSV399 เป็นโปรตีนโครงสร้างที่อยู่ในส่วนของ Tegument นอกจากนี้ได้ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *Pm*VRP15 โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาลักษณะสมบัติของโปรโมเตอร์ของยีน *Pm*VRP15 จากนั้นทำการหาส่วนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน พบว่าบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -525 ถึง -428 และ ตำแหน่ง -287 ถึง -209 น่าจะเป็นบริเวณที่มี repressor และ activator มาจับและควบคุมการแสดงออกของยีนตามลำดับ จากนั้นใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ และใช้เทคนิค Site-directed mutagenesis ในการตรวจสอบตำแหน่งที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน จากผลการทดลองพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง - 525 ถึง -428 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับ interferon regulatory factor (IRF) ซึ่งคาดว่าทำหน้าที่เป็น repressor ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *Pm*VRP15 และ บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -287 ถึง -209 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับ octamer transcription factor (Oct-1) และ nuclear factor of activated T cells (NFAT) ที่คาดว่าทำหน้าที่เป็น activator ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *Pm*VRP15 งานวิจัยอีกส่วนหนึ่งได้ทำการค้นหาไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA; miRNA) ซึ่งเป็น RNA ขนาดเล็กที่ทำหน้าที่ควมคุมกระบวนการต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตรวมถึงระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้เทคนิค Next generation sequencing โดยสามารถระบุชนิดของ miRNA homolog ที่แสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ 46 ชนิด เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA homolog ที่สนใจจำนวน 16 ชนิดด้วยเทคนิค Stem-loop real-time RT-PCR พบว่ามี miRNA 11 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และ miRNA 2 ชนิด ได้แก่ pmo-miR-317 และ pmo-miR-750 มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก จากการทำนายยีนเป้าหมายของ miRNA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่า miRNA สามารถจับกับบริเวณ 5'UTR ORF และ 3'UTR ของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เช่นยีนในโปรแกรมการตายของเซลล์ เปปไทด์ต้านจุลชีพ ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส โปรติเนส ตัวยับยั้งโปรติเนส การสื่อสารของเซลล์ และโปรตีนฮีตช็อค จากนั้นศึกษาหน้าที่ของ pmo-bantam ที่มีความอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตด้วย Luciferase reporter assay พบว่า pmo-bantam สามารถควบคุมการแสดงออกของ Kunitz-type serine protease inhibitor (KuSPI) โดยจับที่บริเวณ 3'UTR ของยีนเป้าหมายได้ การแสดงออกของ pmo-bantam และยีนเป้าหมาย KuSPI ในอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว มีความสอดคล้องกัน จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า miRNA มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง

คำหลัก : กุ้งกุลาดำ; ระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส; ไวรัสตัวแดงดวงขาว; Viral responsive protein 15; microRNA

Abstract

Project Code : RSA5580024

Project Title : Study of antiviral immunity of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* : Characterization of a viral responsive gene and identification of miRNAs involved in WSSV infection

Investigator : Assistant Professor Dr. Kunlaya Somboonwiwat Chulalongkorn University

E-mail Address : kunlaya.s@chula.ac.th

Project Period : 16 July 2012 – 15 July 2015

Penaeus monodon is one of an important species for shrimp aquaculture in Thailand. However, viral infectious disease caused by white spot syndrome virus (WSSV) is vital to shrimp leading to economic collapse. To gain more knowledge on shrimp defense against viral infection, in this study, we characterized a viral responsive protein 15 (*Pm*VRP15), the highly up-regulated gene identified in hemocyte of WSSV-infected shrimp with unknown function, as well as identified and characterized miRNAs that are involved in antiviral response. RNAi-mediated silencing of *Pm*VRP15 gene in WSSV-infected shrimp showed a significant decrease in WSSV gene expression and the cumulative mortality of WSSV-infected shrimp suggesting its important role in viral propagation. The interaction between *Pm*VRP15 and a WSSV protein, WSV399, was identified by yeast two-hybrid screening and co-immunoprecipitation (Co-IP). Immunobloting analysis (*in vitro*) and immunoelectron microscopy (*in vivo*) identified WSV399 as the tegument protein. Moreover, the regulation of *Pm*VRP15 gene expression was studied by identification and characterization the promoter sequences. Promoter deletion assay identified (-525/-428) and (-287/- 209) nucleotide positions as repressor and activator binding sites, respectively. The computational analysis and site directed mutagenesis revealed that the repressor binding site (-525/-428) is regulated by interferon regulatory factor (IRF) and activator binding sites in (-287/-209) region are regulated by octamer transcription factor (Oct-1) and nuclear factor of activated T cells (NFAT). Moreover, microRNAs (miRNAs), a small RNA that functions in regulating various biological processes including immune system, were identified by Next generation sequencing. Forty-six miRNAs homologs that are expressed in WSSV-infected *P. monodon* hemocyte were identified and 16 interested miRNAs were analyzed for the expression profile by stem-loop real-time PCR. Eleven out of 16 miRNAs were differently expressed upon WSSV infection. Two miRNAs, pmo-miR-315 and pmo-miR-750, were highly responsive miRNAs upon WSSV infection. The target mRNAs focusing on immune-related genes of the identified miRNAs in *P. monodon* were predicted by in-house software against *P. monodon* EST database. From the prediction, miRNAs were targeted at 5'UTR, ORF and 3'UTR regions of several immune-related gene involved in apoptosis, antimicrobial peptides, prophenoloxidase system, proteinase and proteinase inhibitor, signaling transduction and heat-shock protein. To characterize the miRNA function, regulation of Kunitz-type serine protease inhibitor (KuSPI) by pmo-bantam which is highly conserved among organisms was analyzed by luciferase reporter assay. Correlation of pmo-bantam and KuSPI expression was revealed in lymphoid organ of WSSV-infected shrimp. These results implied that miRNA might play roles as immune gene regulators in shrimp antiviral response.

Keywords : *Penaeus monodon*; Antiviral immunity; White spot syndrome virus; Viral responsive protein 15 (*Pm*VRP15); microRNA