

Abstract

Project Code: RSA5580046
Project Title: Role of the prophenoloxidase system in defense against pathogens in shrimp
Investigator: Dr. Piti Amparyup E-mail Address : piti.amp@biotec.or.th
Project Period: 16 July 2012 – 15 July 2015

Shrimp farming industry is highly affected by infectious pathogens. The knowledge of the shrimp immunity is necessary to provide the means to control the loss of production due to diseases outbreaks. Prophenoloxidase (proPO)-mediated melanization is a rapid defense mechanism in invertebrates. In this research, we focus on the role of shrimp melanization in defense against bacterial and viral infections. Gene silencing of two prophenoloxidase *PmproPOs* resulted in increased cumulative shrimp mortality after white spot syndrome virus (WSSV) infection, whereas incubation of WSSV with the melanization reaction prior to injection into shrimp significantly increased the shrimp survival rate. Using yeast two-hybrid (Y2H) and co-immunoprecipitation (Co-IP) assays, WSSV453 protein was found to interact with the shrimp proPO-activating enzyme *PmPPAE2*. Moreover, the activation of PO activity in shrimp hemolymph by *PmPPAE2* was significantly decreased by preincubation with recombinant WSSV453, suggested that the inhibition of the proPO system by WSSV partly occurs via the *PmPPAE2*-inhibiting activity of WSSV453.

In addition, we found that systemic infection of two *PmproPOs*-silenced shrimp with the fungus, *Fusarium solani*, led to a significantly increased mortality. Using mono- and di-phenols as substrate, the melanization reaction products exhibited antimicrobial activities towards Gram-negative and Gram-positive bacteria. SEM analysis revealed the morphological changes and damage of cell membranes of *Vibrio harveyi* and *F. solani* after treatment with shrimp melanization reaction products. These findings demonstrate the crucial functions of the proPO system and the importance of melanization reaction products in the shrimp's immune system.

Furthermore, we found that knockdown of *PmClipSP2*, *PmMasSPH1* or *PmMasSPH2* in shrimp displayed a significantly reduced PO activity. Injection of lipopolysaccharide (LPS) induced mortality and a significant decrease in the number of total hemocytes, with clear morphological changes in the hemocyte surface, of the *PmClipSP2*-knockdown shrimp. Recombinant *PmClipSP2* was shown to bind to LPS and to activate PO activity. Recombinant *PmMasSPH1* and *PmMasSPH2* also show binding activity to peptidoglycan (PGN). Using a Y2H and Co-IP, we found that *PmMasSPH1* specifically interacted with a proteinase *PmPPAE2*. Furthermore, the presence of both *PmMasSPH1* and *PmPPAE2* enhances PGN-induced PO activity in vitro. Taken together, these results reveal that *PmClipSP2* and *PmMasSPHs* act as pattern-recognition proteins, binding to microbial cell wall components and likely activating the proPO system in shrimp.

Keywords : Shrimp, immune system, phenoloxidase, melanization, white spot syndrome virus

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5580046

ชื่อโครงการ : บทบาทของระบบโปรตีนออกซิเดสในการป้องกันโรคในกุ้ง

หัวหน้าโครงการ : ดร. ปิติ อ่ำพ่าย

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

ระยะเวลาโครงการ: 16 กรกฎาคม 2555 – 15 กรกฎาคม 2558

อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งได้รับผลกระทบอย่างมากจากปัญหาโรคติดเชื้อ องค์ความรู้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจึงมีความจำเป็นต่อการค้นหาวิธีการควบคุมการสูญเสียผลผลิตอันเนื่องมาจากการระบาดของโรค การสร้างเมลานินโดยระบบโปรตีนออกซิเดสเป็นกลไกการป้องกันโรคที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาบทบาทของกลไกการสร้างเมลานินต่อการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้ง จากการยับยั้งการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิเดส *PmproPO* จำนวน 2 ชนิดในกุ้ง พบว่ากุ้งมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นภายหลังจากฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ในขณะที่กุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัส WSSV ที่บ่มกับปฏิริยาเมลานินมีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค ยีสต์ทูไฮบริด (Y2H) และ co-immunoprecipitation (Co-IP) พบว่าโปรตีนไวรัส WSSV453 สามารถจับได้กับโปรตีนออกซิเดส แอคติเวติงเอนไซม์ *PmPPAE2* ของกุ้ง นอกจากนี้พบว่าการบ่มโปรตีน WSSV453 กับเลือดกุ้งส่งผลให้การกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดยเอนไซม์ *PmPPAE2* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ผลจากการศึกษาวิจัยแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งระบบโปรตีนออกซิเดสโดย WSSV ส่วนหนึ่งเกิดขึ้นผ่านกิจกรรมการยับยั้ง *PmPPAE2* โดยโปรตีน WSSV453

นอกจากนี้ จากการศึกษาการติดเชื้อของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิเดสทั้งสองชนิด (*PmproPOs*) โดยเชื้อรา *Fusarium solani* พบว่ากุ้งมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากการใช้สารโมโนฟีนอลและไดฟีนอลเป็นสับสเตรทพบว่าสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสร้างเมลานิน มีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และรา *F. solani* เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและความเสียหายภายหลังจากบ่มด้วยปฏิกิริยาการสร้างเมลานินของกุ้ง การค้นพบนี้แสดงให้เห็นถึงหน้าที่สำคัญของระบบโปรตีนออกซิเดสและความสำคัญของสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสร้างเมลานินในระบบภูมิคุ้มกันกุ้ง

นอกจากนี้พบว่า การยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmClipSP2* *PmMasSPH1* หรือ *PmMasSPH2* ส่งผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าเมื่อกระตุ้นกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmClipSP2* โดยการฉีดด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ส่งผลให้กุ้งมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น และมีจำนวนเม็ดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญรวมถึงมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่ชัดเจนของพื้นผิวเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง จากการศึกษารีคอมบิแนนท์โปรตีน *PmClipSP2* พบว่าสามารถจับกับ LPS และกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ส่วน *PmMasSPH1* และ *PmMasSPH2* สามารถจับได้กับเปปติโดไกลแคน (PGN) จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนโดยใช้เทคนิค Y2H และ Co-IP พบว่าโปรตีน *PmMasSPH1* สามารถจับกับโปรตีน *PmPPAE2* นอกจากนี้พบว่าโปรตีน *PmMasSPH1* และ *PmPPAE2* สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่กระตุ้นด้วย PGN ในหลอดทดลองได้ ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *PmClipSP2* และ *PmMasSPHs* ทำหน้าที่เป็นโปรตีนจดจำเชื้อโรค ซึ่งสามารถจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และสามารถกระตุ้นระบบโปรตีนออกซิเดสในกุ้ง

คำหลัก : กุ้ง, ระบบภูมิคุ้มกัน, ฟีนอลออกซิเดส, เมลานิน, ไวรัสตัวแดงดวงขาว