

รหัสโครงการ : RSA5980055

ชื่อโครงการ : หน้าท้อง miRNAs ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อเชื้อก่อโรค

ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร.กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ระยะเวลาโครงการ : 16 มิถุนายน 2559 – 15 มิถุนายน 2562

ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNAs) เป็น noncoding RNA ขนาดเล็ก ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการควบคุมการแสดงออกหลังการเกิดการถอดรหัส ของยีนในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ miRNA ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งยังไม่เป็นทราบแน่ชัด ในปัจจุบันโรคระบาดที่มีความรุนแรงในกุ้ง ได้แก่ โรคตายด่วน หรือ acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (VP_{AHPND}) ที่สามารถผลิตโปรตีนสารพิษ Pir และโรคตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV) ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและศึกษาหน้าที่ของ miRNA ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าทำให้กุ้งขาว *Penaeus vannamei* เครียดด้วยความร้อน (non-lethal heat shock; NLHS) ส่งผลให้กุ้งต้านทานการติดเชื้อ VP_{AHPND} มากขึ้นและเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ทรานสคริปโตมของเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ VP_{AHPND} หลังจากถูกกระตุ้นด้วย NLHS สามารถแยกยีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลง (DEGs) และ miRNA ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงในสถานะ NLHS และทำการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ของ miRNA และ mRNA พบว่าสถานะ NLHS สามารถเหนี่ยวนำยีนในกระบวนการโพธิ์ฟีนอลออกซิเดส (proPO) วิถีอาร์คูลของเซลล์เม็ดเลือด และกระบวนการผลิตเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป จากผลการศึกษา miRNA ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ VP_{AHPND} ที่น่าสนใจพบว่า lva-miR-4850 สามารถจับบริเวณ 3'-UTR ของยีน *PO2* ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PO2* และแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส แต่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียในกุ้งภายหลังจากการฉีด lva-miR-4850 นอกจากนี้ ได้ศึกษา miRNA ที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส WSSV ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* คือ pmo-miR-315 ซึ่งจากการทำนายโดยใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์พบว่ายีนเป้าหมายของ pmo-miR-315 คือ ยีน *PmPPAE* ชนิดใหม่ ในที่นี้เรียกว่า *PmPPAE3* โดยจากงานวิจัยนี้พบว่า *PmPPAE3* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบโพธิ์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้ง จากนั้นศึกษาการแสดงออกและปฏิสัมพันธ์ระหว่าง pmo-miR-315 และ *PmPPAE3* พบว่า การแสดงออกของ pmo-miR-315 มีรูปแบบที่แปรผกผันกับการแสดงออกของ *PmPPAE3* โดย pmo-miR-315 สามารถจับกับบริเวณจับบนยีน *PmPPAE3* ได้ ทั้งนี้ยังพบว่าการให้ pmo-miR-315 เข้าสู่กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส WSSV ส่งผลให้การแสดงออกของยีน *PmPPAE3* และแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสลดลง แต่มีผลให้จำนวนไวรัส WSSV ในเซลล์เม็ดเลือดเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า pmo-miR-315 ทำหน้าที่ลดการกระตุ้นระบบโพธิ์ฟีนอลออกซิเดสผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE3* ซึ่งมีผลช่วยให้ไวรัส WSSV เพิ่มจำนวนมากขึ้นในกุ้ง จากผลการวิจัยข้างต้นจึงสรุปได้ว่า ข้อมูลทรานสคริปโตมของกุ้งที่ติดเชื้อก่อโรคและ NLHS รวมกับการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกัน แสดงให้เห็นถึงความซับซ้อนของการตอบสนองภูมิคุ้มกันของกุ้งเพื่อส่งเสริมกลไกการป้องกันตัวเองอย่างมีประสิทธิภาพในกุ้ง องค์ความรู้ด้านหน้าที่ของ miRNA และปฏิสัมพันธ์ของ miRNA กับยีนเป้าหมาย จากงานวิจัยนี้จะนำมาประมวลเพื่อหาแนวทางการป้องกันและควบคุมโรคระบาดในกุ้ง ซึ่งมีความสำคัญยิ่งต่อความยั่งยืนของอุตสาหกรรมกุ้ง

คำหลัก : ไมโครอาร์เอ็นเอ ภาวะเครียดจากความร้อน ยีนในระบบภูมิคุ้มกัน ภูมิคุ้มกันของกุ้ง เชื้อก่อโรคในกุ้ง

Abstract

Project Code : RSA5980055

Project Title : Role of miRNAs in shrimp immunity against pathogens

Investigator : Associate Professor Dr. Kunlaya Somboonwiwat Chulalongkorn University

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

Project Period : 16 June 2016 – 15 June 2019

MicroRNAs (miRNAs), the small noncoding RNAs, play a pivotal role in posttranscriptional gene regulation in various cellular processes. However, the miRNA function in shrimp immunity against pathogens is still elusive. Currently, acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) caused by *Vibrio parahaemolyticus* producing Pir toxin (VP_{AHPND}) and white spot disease (WSD) caused by white spot syndrome virus (WSSV) are the severe bacterial and viral diseases in shrimp. Hence, this research aims to identify and uncover the function of miRNAs in shrimp immunity. As reported previously, non-lethal heat shock (NLHS) could enhance the resistance of *Penaeus vannamei* to VP_{AHPND} infection and induce the expression of immune-related genes. Herein, transcriptomic analysis of *P. vannamei* hemocyte infected with VP_{AHPND} upon NLHS treatment identified NLHS-induced differentially expressed genes (DEGs) and differentially expressed miRNAs (DEMs) and the miRNA/mRNA regulatory network. Pathway analysis of the NLHS-induced DEMs and their target DEGs which have immune-related functions demonstrated that NLHS induces changes in expression of genes involved in prophenoloxidase (proPO) system, hemocyte homeostasis and antimicrobial peptide production in *P. vannamei*. Among the VP_{AHPND}-responsive miRNAs identified, lva-miR-4850, targeting 3'-UTR of prophenoloxidase 2 (*PO2*) gene was of interest. Introducing the lva-miR-4850 mimic into the VP_{AHPND}-infected shrimp caused the reduction of the *PO2* transcript and the PO activity but significantly increased the number of bacteria in the VP_{AHPND} targeted shrimp tissues. Moreover, the WSSV-responsive miRNA, pmo-miR-315, identified from *Penaeus monodon* hemocytes was characterized. The predicted pmo-miR-315 target mRNA is a novel *PmPPAE* gene called *PmPPAE3*. Therefore, *PmPPAE3* was characterized and its function in PO activity activation was shown. The negative correlation of expression and the interaction of pmo-miR-315 and *PmPPAE3* were revealed. Introducing the pmo-miR-315 into the WSSV-infected shrimp caused the reduction of the *PmPPAE3* transcript level and, hence, the PO activity activated by the *PmPPAE3* whereas the WSSV copy number in the shrimp hemocytes was increased. Our findings state a significant role of pmo-miR-315 in attenuating proPO activation via *PPAE3* gene suppression and facilitating the WSSV propagation in shrimp upon WSSV infection. In conclusions, the profiling of transcriptome-wide interactions during pathogen infections and NLHS and protein function analysis, revealed the complexity of the shrimp innate immune responses to promote effective host defense. The knowledge of miRNA function and interaction with target genes will be used in establishing a new strategy for disease control which will lead to sustainable shrimp aquaculture.

Keywords: miRNA, Non-lethal heat stress, Immune-related genes, Shrimp immunity, Shrimp pathogens