บทคัดย่อ

ประเทศไทยเคยเป็นผู้ส่งออกกุ้งอันดับหนึ่งของโลกมาเป็นระยะเวลานาน แต่ต้องเผชิญกับปัญหาการระบาดของโรคตายด่วน หรือ early mortality syndrome (EMS) จนทำให้ผลผลิตกุ้งของประเทศลดลงกว่า 30% ดังนั้นงานวิจัยด้านระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจึงมีความสำคัญ เพื่อที่จะได้นำมาใช้พัฒนาหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรคระบาดในกุ้ง ในงานวิจัยที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยได้ค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งหลายชนิด แต่หน้าที่และกลไกการทำงานในวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องยังไม่มีการศึกษามากนัก ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทำการศึกษาในกลุ่มยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเมลานิน และโปรตีนต้านจุลชีพชนิดต่างๆ รวมทั้งกลุ่มยีนที่มีการตอบสนองสูงในสภาวะที่มีการติดเชื้อ

การใช้เทคนิค suppression subtractive hybridization (SSH) ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนฟีนอลออกซิเดส สามารถระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันหลายยีน โดยค้นพบยีนชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีนอลออกซิเดสที่ยังไม่เคยมีรายงานในกุ้ง คือยีน Pacifastin ผลจากการศึกษาวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *Pm*Pacifastin-like เป็นยีนสำคัญที่ทำหน้าที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และพบว่าสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสร้างเมลานินมีความสำคัญต่อการต้านทานแบคทีเรีย และยังพบว่าการสร้างเมลานินในกุ้งมีบทบาทต่อการต้านไวรัส WSSV แต่ไวรัสสามารถเอาชนะ โดยเข้าไปยับยั้งการกระตุ้นของเอนไซม์โปรติเนสในระบบ ในการศึกษาโปรตีนต้านจุลชีพหลักในกุ้ง ได้แก่ ครัสตินและแอนติลิโพพอลิแซคคาไรด์แฟคเตอร์ ผู้วิจัยได้ศึกษาลักษณะสมบัติเชิงโครงสร้าง หน้าที่และวิถีการควบคุมการสร้างโปรตีน โดยพบว่า crustin*Pm*4 ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในกุ้งมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ และมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีและยังมีผลต่อการก่อโรคของไวรัส WSSV ผู้วิจัยยังพบว่า crustin*Pm*1 และ crustin*Pm*7 ที่เคยรายงานมาก่อนหน้านั้นมีโครงสร้างทุติยภูมิที่คล้ายกัน และมีความสามารถจับกับลิปิดชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลชีพได้ใกล้เคียงกัน แต่กลับถูกควบคุมด้วยวิถีสัญญาณที่ต่างกัน ส่วนโปรตีนแอนติลิโพพอลิแซคคาไรด์แฟคเตอร์ 3 (ALF*Pm*3) ที่เคยมีรายงานว่ามีบทบาทในการต้านไวรัสได้นั้น ในงานวิจัยนี้เราสามารถระบุโปรตีนของ WSSV ที่จับกับ ALF*Pm*3 ทำให้เข้าใจกลไกในการต้านไวรัสของโปรตีนได้ดีขึ้น รวมทั้งพบว่า ALF*Pm*3 ถูกควบคุมด้วยวิถีสัญญาณ Toll และ IMD ได้ นอกจากนี้ในการศึกษาลักษณะสมบัติและหน้าที่ของยีนที่มีการตอบสนองสูงต่อเชื้อก่อโรค ทำให้เข้าใจบทบาท รวมทั้งกลไกระดับโมเลกุลของโปรตีนนี้ในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งความรู้เหล่านี้จะนำไปใช้วางแนวทางป้องกันโรคต่อไป

คำสำคัญ กุ้ง ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส โปรตีนต้านจุลชีพ

Abstract

Thailand was the number one shrimp exporter for the past several years but recently, the production declined more than 30% due to the outbreak of the emerging disease named Early Mortality Syndrome (EMS) or technically known as acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS). The molecular biological research of the immune system in shrimp is essential for the search of the effective method for controlling and preventing infectious diseases. In our previous studies, we identified and characterized some immune molecules in black tiger shrimp *Penaeus monodon* but the molecular mechanisms regulating the immune responses and the pathogenesis of shrimp pathogens are not well documented. Here, we further characterized the biological functions of the immune proteins associated with the prophenoloxidase (proPO)-activating system, antimicrobial peptides as well as several pathogen responsive proteins and the molecular mechanisms regulating these immune pathways were investigated.

Suppression subtractive hybridization of the proPO knockdown *P. monodon* identified several genes in shrimp hemocytes that are involved in the proPO system including *Pm*Pacifastin-like gene which was shown to function in the inhibition of hemolymph PO activity. The ability of melanization reaction products in killing a variety of bacteria and filamentous fungus was demonstrated suggesting the crucial functions of the proPO system in shrimp defense. Furthermore, we demonstrated that shrimp melanization has also antiviral role against white spot syndrome virus (WSSV) infection but the virus overcomes the shrimp immune response by suppressing melanization via the proteinase cascade. The two families of major antimicrobial peptides in shrimp, crustins and antilipopolysaccharide factors were further characterized their structures, functions and regulatory pathways. The most abundant crustin*Pm*4 exhibits sequence variations and recombinant protein (rcrustin*Pm*4) has strong antimicrobial activity against Gram positive bacteria and could affect pathogenicity of WSSV. Moreover, we demonstrated that crustin*Pm*1 and crustin*Pm*7 have similar secondary structures and exhibit strong binding to lipids which are components of microbial cell wall but distinct regulatory pathways. The molecular mechanism of antiviral activity of anti-lipopolysaccharide factor isoform 3 (ALF*Pm*3) was investigated and the interacting WSSV proteins were identified. Gene regulation of ALF*Pm*s was shown to be involved in Toll and IMD pathways. Functional characterization of several highly responsive immune proteins showed that they play crucial roles in shrimp defense against major pathogens especially WSSV. Altogether, this study revealed the role of several important immune proteins and the molecular mechanisms regulating their immune pathways. The knowledge gained from this research can be exploited for disease control in shrimp aquaculture.

Keywords: shrimp, immune system, prophenoloxidase, antimicrobial peptides