

**STUDIES ON TWO NOVEL SHRIMP RESPONSE PROTEINS
TO YELLOW HEAD VIRUS AND DEVELOPMENT OF
A PROTEIN INTERACTION NETWORK FOR SHRIMP
TAURA SYNDROME VIRUS**

THANAWAT SRIPHAJIT

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2014**

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

STUDIES ON TWO NOVEL SHRIMP RESPONSE PROTEINS TO YELLOW HEAD VIRUS
AND DEVELOPMENT OF A PROTEIN INTERACTION NETWORK FOR SHRIMP
TAURA SYNDROME VIRUS

THANAWAT SRIPHAIJIT 4837119 SCBT/D

Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: TIMOTHY W. FLEGEL, Ph.D., SAENGCHAN SENAPIN,
Ph.D., AMORN RAT PHONGDARA, Dr. Eng., WATANALAI PANBANGRED, Dr. Eng.

ABSTRACT

Shrimp farming is an important business in many Asian countries including Thailand. Despite their economic importance, relatively little is known about the shrimp themselves and about their interaction with pathogens (especially viral pathogens). This is due in part to the lack of continuous shrimp cell lines for conducting molecular and cellular studies. This research focused on interactions between shrimp and viral proteins and among shrimp virus proteins themselves. Using a yeast two-hybrid (Y2-H) screen between yellow head virus (YHV) proteins and hemocyte proteins of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*, two interacting shrimp proteins were discovered. One was the C-terminal region of SPH516 (SPH516-C) that interacted with a putative metal ion binding domain (MIB) encoded by ORF1b of the YHV genome. Subsequently, the full-length of SPH516 (*PmSPH516*) cDNA was obtained using 5' rapid amplification of cDNA ends (5' RACE) and it also bound specifically to the MIB domain only. *PmSPH516* domain features included a putative signal peptide, glycine-rich repeat motifs, a clip domain, an HDG triad and a trypsin-like serine protease domain. *PmSPH516* transcripts were highly expressed in hemocytes and gills and were found to be down-regulated after YHV infection. Immunohistochemistry using a polyclonal antibody raised against heterologously expressed SPH516-C protein revealed that it was present almost exclusively in shrimp hemolymph. The second YHV-interacting protein found was a leucine-rich repeat (*PmLRR*) sequence that also bound to the MIB domain. However, identification of this first full-length *PmLRR* from shrimp revealed that the initial partial sequence was not in-frame with the AD domain of pGADT7 plasmid used in the yeast two-hybrid assay. Thus, interaction was not observed between the full-length *PmLRR* and YHV MIB domain. The deduced protein of *PmLRR* contained a high proportion of leucine residues (17%) and had sixteen tandem LRR motifs of 23-24 amino acids in length in the primary sequence. The computed 3D structure revealed a horseshoe shape consisting of alternately repeated strand and helical domains. *PmLRR* expression was tissue-specific (i.e., highest in hemocytes, the intestine and lymphoid organ) suggesting that it may play some role in shrimp defense against pathogens. A preliminary test suggested that *PmLRR* was down-regulated after viral challenges. A second Y2-H screen using the BIR domain of Taura syndrome virus (TSV) as bait yielded the first reported *PmAmidase* from shrimp, but this was only partially characterized. With respect viral-viral protein interactions, a protein-protein interaction (PPI) network for TSV was established using 81 pairwise protein interaction tests that yielded 19 positive interactions. The TSV PPI map was visualized by cytoscape software and revealed a total number of 6 proteins (nodes) involved in 14 interactions (edges). Interestingly, the BIR and VP1 proteins had the highest number of interactions (5 edges) in the map, possibly suggesting important roles in the TSV life cycle. By *in vitro* pull-down assays, it was shown that the structural proteins alone (VP1, VP2 and VP3) could not form a complex without Hel protein involvement.

KEY WORDS: TSV / YHV / YEAST TWO-HYBRID / *PmLRR* / *PmSPH516*

127 pages

การศึกษายีนสองชนิดในกุ้งที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และการสร้างแผนที่ปฏิสัมพันธ์สำหรับโปรตีนของไวรัสทอรา
STUDIES ON TWO NOVEL SHRIMP RESPONSE PROTEINS TO YELLOW HEAD VIRUS AND DEVELOPMENT OF A PROTEIN
INTERACTION NETWORK FOR SHRIMP TAURA SYNDROME VIRUS

ธนวัฒน์ ศรีไพจิตร 4837119 SCBT/D

ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ทีมโมที ฟลิเกล, Ph.D., แสงจันทร์ เสนาปิ่น, Ph.D., อมรรรัตน์ พงศ์คารา, Dr. Eng., วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr. Eng.

บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมกุ้งมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยในแถบภูมิภาคเอเชียรวมทั้งประเทศไทยด้วย แต่ความรู้ความเข้าใจในกลไกของกุ้งต่อการตอบสนองเชื้อโรค โดยเฉพาะเชื้อไวรัสยังมีอยู่จำกัด ส่วนหนึ่งเป็นเพราะการที่ไม่มีเซลล์กุ้งที่เลี้ยงได้อย่างถาวรสำหรับใช้เพื่อศึกษาวิจัยด้านชีวโมเลกุล งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของกุ้งและโปรตีนของไวรัสรวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของไวรัสด้วยกันเอง โดยใช้เทคนิค yeast two-hybrid screen ผลการหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของไวรัสหัวเหลืองและโปรตีนจากเม็ดเลือดกุ้งกล่าวทำให้พบโปรตีนสองชนิดที่จับได้กับโดเมน metal ion binding domain (MIB) ของไวรัสหัวเหลืองซึ่งสร้างมาจากยีนในส่วน ORF1b ของไวรัส โดยโปรตีนชนิดแรกนั้น เป็นส่วนของปลายซี (C-terminus) ของโปรตีน serine protease homolog (SPH516) ต่อมาได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *PmSPH516* ด้วยเทคนิค 5' rapid amplification of cDNA ends (5' RACE) ซึ่งยังพบว่าโปรตีน SPH516 ที่สมบูรณ์มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน MIB ของไวรัส ลักษณะที่สำคัญของโปรตีน *PmSPH516* คือมีส่วนของ signal peptide, มีบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนซ้ำๆ (glycine-rich repeat), มีโดเมน clip, โดเมน HDG triad และโดเมน trypsin-like serine protease การศึกษาการแสดงออกของยีน *PmSPH516* พบว่ามีมากในเม็ดเลือดและเหงือกกุ้ง แต่จะลดลงเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ผลการศึกษาทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน SPH516 ด้านปลายซี พบว่าโปรตีน SPH516 อยู่ในน้ำเลือดกุ้ง โปรตีนชนิดที่สองที่ทำการศึกษา เริ่มจากการพบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่มีความเหมือนกับยีนที่สร้างโปรตีนที่มีกรดอะมิโนลิวซีนซ้ำๆ (leucine-rich repeat, LRR) แต่เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *PmLRR* แล้ว ทำให้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่พบแต่แรกนั้นไม่ได้เชื่อมต่อกับโดเมน AD ของพลาสมิด pGADT7 เมื่อทดสอบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนจึงไม่พบการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน *PmLRR* ที่สมบูรณ์กับโปรตีน MIB ของไวรัสหัวเหลือง ลักษณะเฉพาะของโปรตีน *PmLRR* คือมีกรดอะมิโนลิวซีนสูงถึง 17 เปอร์เซ็นต์ และมีโดเมน LRR ที่มีความยาว 23-24 กรดอะมิโน จำนวน 16 โดเมน การจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีน *PmLRR* พบว่ามีโครงสร้างเป็นรูปเกือกม้าที่ประกอบด้วยสายโปรตีนแบบแผ่นสลับกับแบบเกลียว การศึกษาการแสดงออกของยีนพบว่า *PmLRR* มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันในกุ้ง เช่น เม็ดเลือด ลำไส้และต่อมน้ำเหลือง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า *PmLRR* มีความเกี่ยวข้องกับต่อต้านเชื้อโรคในกุ้ง เมื่อทดสอบในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PmLRR* ลดลง การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโดเมน BIR ของไวรัสทอรา (Taura syndrome virus) และโปรตีนของกุ้ง ทำให้พบยีนที่ยังไม่เคยมีรายงานในกุ้งมาก่อน คือ *PmAmidase* ส่วนการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของไวรัสทอราด้วยกันเองนั้น พบปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน 19 คู่ จากการทดสอบทั้งหมด 81 คู่ เมื่อสร้างแผนที่ปฏิสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Cytoscape พบว่าในแผนที่ประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิด ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กันจำนวน 14 ปฏิสัมพันธ์ โดยโปรตีน BIR และโปรตีน VP1 เป็นโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนชนิดอื่นมากที่สุดถึง 5 ปฏิสัมพันธ์ อาจกล่าวได้ว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีความสำคัญต่อไวรัสทอรา จากการใช้เทคนิค pull-down assays พบว่าโปรตีนโครงสร้างของไวรัสได้แก่ โปรตีน VP1, VP2 และ VP3 ไม่สามารถมีปฏิสัมพันธ์กันได้โดยปราศจากโปรตีน Hel