29 MAR 2002

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

# STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF SOME IMMUNE GENES IN THE BLACK TIGER SHRIMP, PENAEUS MONODON

KALLAYA SRITUNYALUCKSANA

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOTECHNOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2001

ISBN 974-04-0988-1

COPYRIGTH OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
K14st
2001
c.2

Copyright by Mahidol University

3937588 SCBT/D: MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; PH.D. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS: INNATE IMMUNITY / PROPHENOLOXIDASE ACTIVATING SYSTEM / PROPHENOLOXIDASE / CELL ADHESION / PEROXINECTIN / PATTERN RECOGNITION PROTEIN / β1,3-GLUCAN BINDING PROTEIN /PENAEUS MONODON

KALLAYA SRITUNYALUCKSANA : STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF SOME IMMUNE GENES IN THE BLACK TIGER SHRIMP, PENAEUS MONODON. THESIS ADVISORS : TIMOTHY W. FLEGEL, Ph.D., KENNETH SÖDERHÄLL, Ph.D., BOONSIRM WITHYACHUMNARNKUL, M.D., Ph.D., VICHAI BOONSAENG, Ph.D., KAVI RATANABANANGKOON, Ph.D. 69 P. ISBN 974-04-0988-1

The prophenoloxidase activating system (the proPO system) is considered to be a non-self recognition and defence system in invertebrates including crustaceans. In this study, we isolated and characterized several immune genes and their gene products associated with the proPO system, which have been reported in other invertebrate species to be part of a defence system, in the hemolymph of the black tiger shrimp, *P. monodon*. Prophenoloxidase (proPO), a zymogen of this cascade has been cloned from the shrimp hemocyte cDNA library. The shrimp proPO has a 3,002 bp cDNA and contains an open reading frame of 2,121 bp encoding a putative polypeptide with 688 amino acids and with a molecular mass of 78.7 kDa. Two putative copper binding sites are present and they have a highly conserved sequence around these sites. Shrimp proPO mRNA is synthesized in the hemocytes and not in the hepatopancreas. Comparison of amino acid sequences showed that shrimp proPO is more closely related to another crustacean proPO, namely crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, than to insect proPOs. Upon activation of the proPO system in shrimp, cell adhesion activity in the hemolymph is generated. A cell adhesion assay showed that a high number of granular cells (60%) adhered to coverslips coated with a shrimp hemocyte lysate supernantant, whereas a very low number of cells adhered to coverslips coated with bovine serum albumin. Inhibition of adhesion by an antiserum against crayfish peroxinectin, a cell adhesion protein, revealed that the cell adhesion activity detected in shrimp hemocyte lysate supernatant might result from a peroxinectin-like molecule in shrimp. A cDNA clone encoding shrimp peroxinectin was isolated, which had an open reading frame of 2,337 nucleotides with a polyadenylated sequence and a poly A tail. It encodes a protein of 778 amino acids including a 20 amino acid signal peptide. Two putative integrin binding motifs, RGD (Arg-Gly-Asp) and KGD (Lys-Gly-Asp) were found in shrimp peroxinectin. Sequence comparison shows that the shrimp protein is similar to various peroxidases and putative peroxidases from invertebrates and vertebrates. Northern blot analysis revealed that peroxinectin is constitutively expressed in shrimp hemocyte and was reduced significantly in shrimp injected with a β1,3-glucan, laminarin, to mimic a fungal infection. Also found in shrimp hemolymph was a 31 kDa-β1,3-glucan that could bind to β-1,3-glucan polymers such as curdlan and zymosan, but not to lipopolysaccharide. The cDNA sequence of shrimp β-1,3-glucan binding protein show 61% identity and 76% similarity to crayfish lipopolysaccharide-and β-1,3-glucan binding protein and to other insect recognition proteins, including bacterial β-1,3-glucanases and β1,3-, 1,4-glucanases. Shrimp injected with an insoluble β-1,3-glucan, curdlan or heat-killed *Vibrio harveyi* did not have any significant changes of its mRNA level which suggests that the shrimp β-1,3-glucan-binding protein gene is constitutively expressed. These results contribute to an improved understanding of the black tiger shrimp response to microbial pathogens, a necessary prerequisite for development of rational strategies to improve health management in shrimp aquaculture.

Copyright by Mahidol University

3937588 SCBT/D: สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ ; ปร. ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

กัลยาณ์ ศรีธัญญลักษณา : การวิเคราะห์โครงสร้างและคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF SOME IMMUNE GENES IN THE BLACK TIGER SHRIMP, PENAEUS MONODON) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ทิมโมที เฟลเกล, Ph.D., เคนเนธ โซเดอฮอล, Ph.D., บุญเสริม วิทยชำนาญกุล, M.D., Ph.D., วิชัย บุญแสง, Ph.D., กวี รัตนบรรณางกูร, Ph.D. 69 หน้า ISBN 974-04-0988-1

ระบบproPOเป็นระบบที่ได้มีการรายงานในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังรวมทั้งสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนว่า เป็นระบบที่ใช้ในการจดจำและเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ โครงสร้างในระดับปฐมภูมิของproPOในกุ้งกุลาดำเหมือนมากที่สุดกับproPOที่พบในกุ้งน้ำจืดอีกชนิดหนึ่ง(*Pacifastacus leniusculus*)มากกว่าในกลุ่มของแมลง โครงสร้างบริเวณที่จับกับทองแดงที่มีความเหมือนกันมาก ตำแหน่งของHistidineทั้ง 6 ตัวมีตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงเหมือนกัน โครงสร้างในระดับปฐมภูมิของproPOในกุ้งกุลาดำ ประกอบด้วยจำนวนคู่เบส 3,002 คู่ อยู่ในORFจำนวน 2,121 คู่ ถอดรหัสเป็นจำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 688 ตัว คิดเป็นมวลโมเลกุลประมาณ 78.7 kDa เราพบการสร้างmRNA ของproPOที่เซลเม็ดเลือดแต่ไม่พบในเซลตับ ในขณะที่กระตุ้นให้เอนไซม์ในระบบproPOทำงาน เราพบว่ามีโปรตีนอีกตัวหนึ่งคือ peroxinectinถูกกระตุ้นให้ทำงานด้วย จากการทดลองพบว่า เซลล์เม็ดเลือดชนิด granular cell (60%) สามารถเกาะติดกับพื้นผิวcoverslipซึ่งเคลือบไว้ด้วยน้ำเลือดของกุ้ง แอนติบอดีต่อperoxinectinในกุ้งน้ำจืดสามารถลดจำนวนเซลล์ที่เกาะติดได้ บ่งชี้ว่าน่าจะมีperoxinectinในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ โครงสร้างในระดับปฐมภูมิของperoxinectinในกุ้งกุลาดำ ประกอบด้วยคู่เบสในORFเป็นจำนวน 2,337 คู่ ถอดรหัสเป็นจำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 778 ตัว รวมทั้งกรดอะมิโนสำหรับsignal peptide จำนวน 20 กรดอะมิโน คิดเป็นมวลโมเลกุลประมาณ 84.8 kDa เราพบบริเวณที่สามารถจับกับ integrin (KGD, RGD motif)ด้วย จึงเป็นไปได้ว่าตัวจับจำเพาะของperoxinectinบนผิวเซลล์เป็นโปรตีนในกลุ่มintegrin เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างระดับปฐมภูมิของperoxinectinพบว่ามีความเหมือนกับโครงสร้างระดับปฐมภูมิของเอนไซม์peroxidaseที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด การฉีดผนังเซลล์ของสาหร่ายซึ่งมีส่วนประกอบของ β-1,3-glucan เข้าไปในสัตว์ทดลอง พบว่าระดับmRNA ของperoxinectinมีอยู่ตลอดเวลาและลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงหลังจากการฉีด การทดลองโดยผสมน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีส่วนประกอบของ β-1,3-glucan พบว่ามีโปรตีนขนาด 31 kDa ที่อยู่ในน้ำเลือดของกุ้งสามารถจับกับβ-1,3-glucanได้ เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และเทคนิคทาง Immunoblotting โดยใช้แอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากแอนติเจน LPS- และ β-1,3-glucan-binding protein (LGBP) ในกุ้งน้ำจืด บ่งชี้ว่าแอนติบอดีนี้สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีขนาด 31 kDa ในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้ ยังพบว่า โปรตีนที่มีขนาด 31 kDa นี้ไม่สามารถจับกับ LPS โครงสร้างระดับปฐมภูมิของ β-1,3-glucan binding protein พบว่ามีความเหมือนโปรตีนที่พบในกุ้งน้ำจืดชื่อว่า LGBP และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการจดจำในแมลง รวมทั้งเอนไซม์glucanases ที่พบในแบคทีเรียและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง การฉีดส่วนประกอบของเชื้อราและ *Vibrio harveyi* ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของ β-1,3-glucan binding protein พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงเป็นไปได้ว่าเป็นโปรตีนที่มีการสร้างอยู่ตลอดเวลา ผลจากการศึกษานี้ทำให้สามารถเข้าใจระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำต่อการติดเชื้อมากขึ้นซึ่งจะเป็นพื้นฐานนำไปสู่การจัดการสุขภาพกุ้งและพัฒนาการเลี้ยงกุ้งต่อไป

Copyright by Mahidol University