ABSTRACT

Previous evidence has indicated the requirement of sperm modification, as part of capacitation-like process, in a close-typed-thelycum shrimp, however, the molecular mechanism supported this event is scarcely available. Using *Penaeus monodon* as the model, we demonstrated thelycal-dependent sperm modification resulting in an enhanced acrosome reaction (AR) response and the involvement of sperm trypsin-like proteases in induction of AR. Modification of shrimp sperm membrane was mediated through an adsorption or removal of sperm peripheral and integral membrane proteins as indicated by the different profiles of these proteins in spermatophore and thelycal sperm. *In vitro* adsorption of Alexa-488 conjugated thelycal proteins onto the entire S-sperm surface confirmed protein transfer in a time-dependent manner. Anchoring of 83 and 140 kDa proteins to sperm peripheral proteins as well as 53/55 and 60 kDa proteins to sperm lipids suggested that both sperm membrane proteins and lipids served as acceptors for thelycal protein adsorption. Apart from membrane modification, a substantial increase in protein tyrosine phosphorylation was shown to be closely associated with thelycal-dependent sperm modification event. This sperm modification led to an enhanced AR in response to a natural inducer, egg water (EW). We further elucidated that components of EW bound to sperm membrane and initiated AR. This AR process is proven to be trypsin-dependent process coupled with an influx of calcium ion. Ability of denatured EW to induce AR favored the implication that intrinsic sperm trypsin ,rather than that in EW, was a key modulator of AR induction. Taken all together, the results clearly indicate a 3-day-period requirement for sperm modification in female thelycum to gain a full AR response. This AR process is initialized via the binding of EW components to the sperm surface and followed by the proteolytic process of trypsin-like enzyme release from the sperm acrosome.

บทคัดย่อ

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าเซลล์อสุจิของกุ้งที่มีถุงเก็บน้ำเชื้อหน้าท้อง (Thelycum) แบบปิดจำเป็นที่จะต้องผ่านขบวนการพัฒนาความสามารถในการปฏิสนธิ เรียกว่า ขบวนการ Capacitation อย่างไรก็ดี กลไกระดับโมเลกุลของขบวนการดังกล่าวยังไม่มีการรายงานในเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งมาก่อน ดังนั้น ในการศึกษานี้เราใช้กุ้งกุลาดำ (P. monodon) เป็นต้นแบบในการศึกษาขบวนการดังกล่าวเราพบว่าเซลล์อสุจิจะต้องถูกปรับเปลี่ยนโมเลกุลบนผิวเซลล์ ในขณะที่อาศัยอยู่ในถุงเก็บน้ำเชื้อหน้าท้อง ทั้งนี้รวมถึงการกำซาบ (adsorption) ของโปรตีนที่อยู่ในทีไลกัม และการหลุดลอก (removal) ของโปรตีนบนผิวเซลล์ทั้งสองชนิด ได้แก่ ชนิด peripheral และ integral เรายืนยันผลการทดลองดังกล่าวด้วยการใช้โปรตีนของทีไลกัมที่ติดฉลากเรืองแสงย้อมติดบนผิวของเซลล์อสุจิที่นำมาจากตัวผู้ และยังพบว่าโปรตีนของทีไลกัมที่มีขนาด 83 และ 140 kDa จับกับตัวรับชนิด peripheral protein บนผิวเซลล์อสุจิ และโปรตีนขนาด 53/55 และ 60 kDa จับกับตัวรับชนิดไขมันบนผิวเซลล์ นอกเหนือจากการปรับเปลี่ยนผิวเซลล์เรายังพบการเพิ่มระดับของ Tyrosine Phosphorylation ซึ่งจัดว่าเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของขบวนการ Capacitation อีกทั้งยังพบว่าเซลล์อสุจิจะมีการเพิ่มความสามารถในการเกิดขบวนการแตกของถุงเอนไซม์ (acrosome reaction, AR) มากขึ้นเรื่อยๆ ตามจำนวนเวลาที่ถูกเก็บไว้ในถุงทีไลกัม โดยความสามารถของการเกิด AR สูงสุด จะพบในวันที่ 3 หลังจากที่เซลล์อสุจิถูกเคลื่อนย้ายเข้ามาในทีไลกัม เราศึกษาต่อไปเกี่ยวกับขั้นตอนเชิงโมเลกุลในการเกิดขบวนการ AR พบว่าโมเลกุลที่อยู่ในน้ำคัดหลั่งจากไข่ (egg water, EW) สามารถจับบนผิวเซลล์อสุจิและเหนี่ยวนำการเกิด AR นอกจากนี้เรายังพบอีกว่าขบวนการ AR ในขั้นตอนเริ่มแรกเกี่ยวกับการหดตัว (depolymerization) ของ anterior spike บนเซลล์อสุจิขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาของเอนไซม์ทริปซินที่อยู่ในถุงเก็บเอนไซม์ของเซลล์อสุจิ แต่ไม่ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ทริปซินที่อยู่ใน EW อีกทั้งเรายังพบว่าขบวนการ AR นี้ขึ้นอยู่กับการผ่านเข้าสู่เซลล์ของแคลเซี่ยมที่อยู่ภายนอกเซลล์อสุจิอีกด้วย กล่าวโดยสรุปคือ เซลล์อสุจิต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วัน เพื่อปรับเปลี่ยนโมเลกุลบนผิวเซลล์ให้เกิดการเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิของเซลล์ สำหรับขบวนการ AR นั้น ขั้นตอนที่สำคัญได้แก่ การจับกันของโมเลกุลที่อยู่ใน EW กับผิวเซลล์อสุจิ ซึ่งนำไปสู่การผ่านเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียมนอกเซลล์ และเหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ทริปซินจากถุงเก็บเอนไซม์ของเซลล์อสุจิ