

Abstract

Project Code : TRG5280019

Project Title : Activity and function of antimicrobial peptides from the black tiger shrimp

Penaeus monodon

Investigator : Dr. Premruethai Supungul

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science,

Chulalongkorn University E-mail Address : premruethai.sup@biotec.or.th

Project Period : 2 years

This project was to characterize and investigate the functions of lysozymes and penaeidins from *Penaeus monodon*. The c-type (*PmLyzc*) and the two-catalytic residue ablated i-type lysozymes (*PmLyzi1* and 2) were identified from the *Penaeus monodon*. By RT-PCR, *PmLyzc* and *PmLyzi2* transcripts were highly expressed in hemocyte and heart, respectively while the *PmLyzi1* transcript was expressed only in hepatopancreas. The up-regulation of mRNA transcription after bacterial challenge was observed only with *PmLyzc*. Although the turbidimetric assay revealed that only recombinant *PmLyzc* possessed the muramidase activity, all of them variably exhibited antimicrobial activity against both Gram-positive and -negative bacteria. No synergistic effect was observed among these lysozymes. These results demonstrated that the ability of lysozyme to inhibit the growth of bacteria did not depend only on the muramidase activity and indicated the multifunction of lysozyme as immune defense and digestive enzymes in *P. monodon*.

From the *Penaeus monodon* EST database two isoforms of penaeidins were identified, *PenmonPEN3* and *PenmonPEN5*. Both penaeidin transcripts were mainly expressed in the hemocyte, and were up-regulated about 1.5 and 1.8 fold, respectively at 24h after WSSV-challenge. The recombinant proteins of both penaeidins were overproduced in the yeast *Pichia pastoris*. The *rPenmonPEN3* and *rPenmonPEN5* exhibited antibacterial activity against Gram-positive bacteria. However, no synergistic effect was observed in these penaeidins. The suppression of *PenmonPEN5* transcript levels by RNA interference mediated gene silencing led to an increase of WSSV copy numbers about 1.9 fold. Moreover, incubation of the *P. monodon* hemocyte primary cell culture with the mixture of WSSV and *rPenmonPEN5* inhibited the propagation of WSSV only 6.25 μ M but not at higher concentration of the protein. These results suggest a possible role of *P. monodon* penaeidins in the shrimp's antibacterial and antiviral immunity but its antiviral mechanism requires further investigation.

Keywords : *Penaeus monodon*, Antimicrobial peptide, muramidase activity, antiviral immunity

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5280019

ชื่อโครงการ: ฤทธิ์และหน้าที่ของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ

ชื่อนักวิจัย: ด.ร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนม กุ้ง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : premrueThai.sup@biotec.or.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

โครงการนี้ เป็นการศึกษาลักษณะสมบัติและหน้าที่ของกลุ่มยีน lysozyme และยีน penaeidin ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน c-type lysozyme (*PmLyzc*) และ สองไอโซฟอร์ม ของ i-type lysozyme ซึ่งขาด active residues (*PmLyzi1* และ *PmLyzi2*) ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค RT-PCR พบ *PmLyzc* แสดงออกมากที่สุดที่เม็ดเลือด *PmLyzi2* แสดงออกมากที่สุดที่หัวใจ ในขณะที่ *PmLyzi1* แสดงออกที่ hepatopancreas เพียงอวัยวะเดียว และเฉพาะ *PmLyzc* เท่านั้นที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นให้กุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* แม้ว่าจะพบฤทธิ์ของ muramidase เฉพาะใน *PmLyzc* เท่านั้น แต่พบว่า รีคอมบิแนนท์ของทั้งสามไอโซฟอร์มสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อย่างไรก็ตาม ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันของ lysozyme ทั้งสามในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียไม่ได้ขึ้นกับ muramidase activity แสดงถึงหน้าที่ของ lysozyme นอกจากเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแล้ว ยังน่าจะเกี่ยวข้องกับระบบย่อยของกุ้งอีกด้วย จากห้องสมุด EST ของกุ้งกุลาดำพบ penaeidin ทั้งหมดสองไอโซฟอร์ม คือ *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* โดยทั้งสองไอโซฟอร์มมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเป็น 1.5 และ 1.8 เท่าที่ 24 ชั่วโมง หลังจากกระตุ้นให้กุ้งติดเชื้อ WSSV เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของทั้งสองไอโซฟอร์ม พบสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี แต่ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาหน้าที่ของ *PenmonPEN5* โดยใช้เทคนิค RNAi พบว่า กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* แล้วฉีดเชื้อ WSSV มีการแสดงออกของยีน VP28 เพิ่มมากขึ้นเป็น 1.9 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ เมื่อป้อน primary cell culture ของเม็ดเลือดกับ รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผสมกับ WSSV พบ เฉพาะรีคอมบิแนนท์โปรตีน *PenmonPEN5* ความเข้มข้น 6.25 μM เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเกิด propagation ของ WSSV จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่า penaeidin นอกจากเป็นเพปไทด์ที่สำคัญในการต้านการติดเชื้อแบคทีเรียแล้ว ยังน่าจะมียับยั้งการติดเชื้อไวรัสอีกด้วย สำหรับกลไกการยับยั้งไวรัสนั้นยังต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำหลัก : *Penaeus monodon*, Antimicrobial peptide, muramidase activity, antiviral immunity