

EFFECT OF NON-LETHAL HEAT SHOCK ON HSP70
SYNTHESIS, PROTECTION AGAINST THERMAL
STRESS AND *Vibrio alginolyticus*
INFECTION OF THE ASIAN GREEN
MUSSEL, *Perna viridis*

NOR AFIQAH ALENG

MASTER OF SCIENCE
UNIVERSITI MALAYSIA TERENGGANU

2014

**EFFECT OF NON-LETHAL HEAT SHOCK ON
HSP70 SYNTHESIS, PROTECTION AGAINST
THERMAL STRESS AND *Vibrio alginolyticus*
INFECTION OF THE ASIAN GREEN MUSSEL,
*Perna viridis***

NOR AFIQAH ALENG

**Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirement for
the Degree of Master of Science in the Institute of
Marine Biotechnology
Universiti Malaysia Terengganu**

June 2014

Abstract of the thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science.

**EFFECT OF NON-LETHAL HEAT SHOCK ON HSP70 SYNTHESIS,
PROTECTION AGAINST THERMAL STRESS AND *Vibrio alginolyticus*
INFECTION OF THE ASIAN GREEN MUSSEL, *Perna viridis***

NOR AFIQAH ALENG

June 2014

Main Supervisor : Professor Mohd. Effendy Abd. Wahid, Ph.D.

Co- Supervisor : Associate Professor Yeong Yik Sung, Ph.D.
Associate Professor Ahmad Shamsuddin Ahmad, Ph.D.

Institute : Institute of Marine Biotechnology

The Asian green mussel, *Perna viridis*, often faces multiple stressors such as environmental temperature changes and bacterial infection, which threaten the survival of this species. Mild heat stress promotes thermotolerance and cross-protection against pathogens in several aquatic animals, probably rendered by the accumulation of heat shock protein 70 (Hsp70), among other molecular chaperones. This study was designed to investigate the synthesis of Hsp70 in *P. viridis* adults after 30 min exposure to non-lethal heat shock (NLHS), and the potential for Hsp70 to protect *P. viridis* against an otherwise lethal thermal challenge and *Vibrio alginolyticus* infection. Non-lethal temperatures, median-lethal (LT_{50}) and lethal heat temperature (LHT) were determined for *P. viridis* prior to the examination of Hsp70 synthesis. Non-lethal temperatures were 40°C and below, whereas LT_{50} and LHT for *P. viridis* occurred at 42°C and 44°C, respectively. The accumulation of Hsp70 was studied in adductor muscle, foot, gill and

mantle by exposing *P. viridis* acclimatized at 28°C to heat shock from 30°C to 40°C at 2°C intervals for 30 min, followed by 6 h recovery at 28°C. As demonstrated by immunoprobings of western blots, constitutive (*PvHsp70-1*) and inducible (*PvHsp70-2*) Hsp70 were enhanced in all organs of *P. viridis* upon heat shock at 38°C. Hsp70 synthesis was further investigated by heating *P. viridis* at temperature, determined in previous experiments, without and with different periods of recovery. Augmentation of *PvHsp70-1* and *PvHsp70-2* in all organs occurred upon heat shock at 38°C for 30 min followed by 6 h recovery, conditions representing NLHS used in subsequent experiments. Characterization by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and Mascot sequence matching software revealed that the constitutive and heat-inducible Hsp70 isotypes respectively corresponded most closely to Hsp70 from *P. viridis* and *Mytilus galloprovincialis*. Priming of adult mussels with NLHS promoted tolerance to LT₅₀, LHT, and *V. alginolyticus* infection, enhancing survival when compared to mussels not receiving NLHS. The parallel induction of Hsp70, enhanced thermotolerance and cross-protection against *V. alginolyticus*, suggests a role for Hsp70 in heat resistance and cross-tolerance in the Asian green mussel.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk Ijazah Master Sains

**KESAN KEJUTAN HABA BUKAN MAUT KE ATAS SINTESIS HSP70,
PERLINDUNGAN TERHADAP HABA DAN JANGKITAN *Vibrio alginolyticus*
DI DALAM KUPANG HIJAU ASIA, *Perna viridis***

NOR AFIQAH ALENG

Jun 2014

Penyelia Utama : Profesor Mohd. Effendy Abd. Wahid, Ph.D.
Penyelia Bersama : Profesor Madya Yeong Yik Sung, Ph.D.
Profesor Madya Ahmad Shamsuddin Ahmad, Ph.D.
Institut : Institut Bioteknologi Marin

Kupang hijau Asia, *Perna viridis* sentiasa berhadapan dengan pelbagai tekanan seperti perubahan suhu persekitaran dan pencemaran bakteria, yang mengancam kemandirian spesis ini. Tekanan haba yang sederhana telah menunjukkan kemampuan untuk menggalakkan pertahanan terhadap haba dan patogen di dalam beberapa haiwan akuatik. Kejadian ini kemungkinan disebabkan oleh pengumpulan heat shock protein 70 (Hsp70). Kajian ini bertujuan untuk menyiasat sintesis Hsp70 di dalam *P. viridis* dewasa selepas 30 minit pendedahan kepada kejutan haba bukan maut (NLHS), dan kebolehan Hsp70 untuk melindungi *P. viridis* terhadap cabaran haba yang membawa kematian dan jangkitan *V. alginolyticus*. Suhu yang tidak membawa kematian, suhu yang membawa separuh kematian (LT_{50}) dan suhu yang membawa semua kematian (LHT) telah ditentukan sebelum sintesis Hsp70 dikaji. Suhu yang tidak membawa kematian adalah pada 40°C dan ke bawah, manakala, LT_{50} dan LHT masing-masing berlaku pada suhu

42°C dan 44°C. Sintesis Hsp70 dikaji pada otot, kaki, insang dan mantel dengan mendedahkan *P. viridis* yang telah disesuaikan pada suhu 28°C kepada kejutan haba dari 30°C sehingga 40°C, selang 2°C selama 30 minit diikuti dengan 6 jam tempoh pemulihan pada suhu 28°C. Berdasarkan immunoprobings western blots, constitutive (*PvHsp70-1*) dan inducible (*PvHsp70-2*) Hsp70 telah meningkat di dalam semua organ *P. viridis* selepas kejutan haba pada 38°C. Sintesis Hsp70 yang optimum dikaji dengan lebih mendalam dengan memanaskan *P. viridis* dengan kejutan haba pada 38°C selama 30 minit tanpa dan bersama tempoh pemulihan yang berbeza. Secara keseluruhan, peningkatan *PvHsp70-1* dan *PvHsp70-2* di dalam semua organ berlaku pada kejutan haba pada 38°C selama 30 minit diikuti dengan 6 jam tempoh pemulihan. Oleh itu, situasi ini telah dianggap sebagai NLHS yang ideal untuk *P. viridis*. Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) dan perisian Mascot mengenal pasti bahawa constitutive dan inducible Hsp70 masing-masing hampir sama dengan Hsp70 dari *P. viridis* dan *Mytilus galloprovincialis*. Pendedahan awal dengan NLHS dapat meningkatkan toleransi kupang dewasa apabila dicabar dengan LT_{50} , LHT dan *V. alginolyticus*, di mana berlaku peningkatan jumlah kupang hidup apabila dibandingkan dengan jumlah kupang hidup yang tidak didedahkan dengan NLHS. Peningkatan toleransi terhadap haba dan perlindungan terhadap jangkitan *V. alginolyticus* berlaku selari dengan induksi Hsp70, mencadangkan Hsp70 memainkan peranan di dalam rintangan haba dan perlindungan terhadap patogen di dalam kupang hijau.