



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกการกระตุ้นระบบโพรพีนอลออกซิเดสในกุ้งโดย pattern recognition protein

โดย
ดร. ปิติ อำพำ

พฤษภาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกการกระตุ้นระบบโพรตีนออกซิเดสในกุ้ง โดย pattern recognition protein

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ดร. ปิติ อำพาฬ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว. และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code: DBG5380031

Project Title: The activation mechanism of the prophenoloxidase system in shrimp by pattern recognition protein

Investigator: Dr. Piti Amparyup E-mail Address : piti.amp@biotec.or.th

Project Period: 31 May 2010 – 30 May 2012

The global shrimp industry still faces various serious disease related problems that are mainly caused by pathogenic bacteria and viruses. The understanding of the immune system in shrimp is necessary to provide the means to control and minimize the loss of production due to disease outbreaks. Melanization by prophenoloxidase (proPO) system is an important innate immune mechanism that plays a critical role in the defense against a wide range of pathogens in invertebrates. The activation of the proPO system, by the specific recognition of microorganisms by pattern recognition proteins (PRPs), triggers a serine proteinase cascade including a proPO-activating enzyme (PPAE), eventually leading to the cleavage of the inactive proPO to the active PO that functions to produce the melanin and toxic reactive intermediates against invading pathogens.

In this study, we focus on characterizing the role of a lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (*PmLGBP*) and *PmPPAE2* in the proPO system of shrimp *Penaeus monodon*. Transcript expression analysis revealed that *PmLGBP* and *PmPPAE2* transcripts were mainly expressed in hemocytes. Genomic organization analysis revealed that *PmPPAE1* gene consists of ten exons and nine introns, whilst *PmPPAE2* comprises of eight exons interrupted by seven introns. The ELISA binding studies indicated that recombinant (r)*PmLGBP* binds to beta-1,3-glucan and LPS with a dissociation constant of $6.86 \times 10^{-7} \text{M}$ and $3.55 \times 10^{-7} \text{M}$, respectively. Furthermore, r*PmLGBP* could enhance the phenoloxidase (PO) activity of shrimp hemocyte in the presence of LPS or beta-1,3-glucan. Double-stranded RNA-mediated suppression of *PmLGBP* and *PmPPAE2* transcript levels resulted in a significant decrease in the PO activity. Knockdown of *PmLGBP* significantly decreased the *PmLGBP* transcript level but had no effect on the expression of the other immune genes tested. However, suppression of proPO expression down-regulated *PmLGBP*, *PmPPAE2* and antimicrobial peptide transcripts. It is concluded that the *PmPPAE2* is a shrimp PPAE and possibly mediates the activation of *PmproPO* and *PmLGBP* function as a pattern recognition protein for LPS and beta-1,3-glucan in the shrimp proPO activating system.

Keywords : Shrimp, *Penaeus monodon*, immune system, phenoloxidase, pattern recognition protein, proteinase

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DBG5380031

ชื่อโครงการ : กลไกการกระตุ้นระบบโพรพีนอลออกซิเดสในกุ้งโดย pattern recognition protein

หัวหน้าโครงการ : ดร. ปิติ อ้าพ้าย

E-mail Address: piti.amp@biotec.or.th

ระยะเวลาโครงการ: 31 พฤษภาคม 2553 – 30 พฤษภาคม 2555

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทั่วโลกยังคงประสบปัญหาภัยร้ายแรงต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคที่ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัสก่อโรค ความเข้าใจระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อใช้หาวิธีการควบคุมและลดการสูญเสียของผลผลิต อันเนื่องมาจากการระบาดของโรค การสร้างเมลา닌โดยระบบโพรพีนอลออกซิเดสเป็นกลไกที่สำคัญของภูมิคุ้มกัน ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการต่อต้านเชื้อโรคหลากหลายชนิดในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง การกระตุ้นระบบโพรพีนอลออกซิเดสเกิดขึ้นได้จากการจดจำอย่างจำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์โดย แพทเทิร์นรีคอกนิชันโปรตีนทำให้เกิดการกระตุ้น ซีรีนโปรตีนเนสแคสเคด รวมทั้งโพรพีนอลออกซิเดสแอคติเวตงเอนไซม์ ส่งผลให้เกิดการตัดของโพรพีนอลออกซิเดส ให้เป็นพีนอลออกซิเดสเพื่อทำหน้าที่ในการผลิตเมลา닌และสารตัวกลางของปฏิกิริยาที่เป็นพิษมีผลต่อการต้านเชื้อโรคที่บุกรุก

ในการศึกษาครั้งนี้เรามุ่งเน้นศึกษาลักษณะบทบาทของโปรตีน *PmLGBP* และ *PmPPAE2* ในระบบโพรพีนอลออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่ายีน *PmLGBP* และ *PmPPAE2* แสดงออกมากในเม็ดเลือด เมื่อวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีนพบว่า *PmPPAE1* ประกอบด้วย 10 exon และ 9 intron ขณะที่ยีน *PmPPAE2* ประกอบด้วย 8 exon และแทรกโดย 7 intron จากการศึกษาการจับกันโดยเทคนิค ELISA พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน *PmLGBP* สามารถจับกับ beta-1,3-glucan และ LPS โดยมีค่า dissociation constant เท่ากับ 6.86×10^{-7} M and 3.55×10^{-7} M ตามลำดับ นอกจากนี้ *rPmLGBP* สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์พีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งที่มี LPS หรือ beta-1,3-glucan เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* และ *PmPPAE2* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์พีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดกุ้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* พบว่ายีน *PmLGBP* ของกุ้งมีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนอื่นๆในระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน proPO พบว่าการแสดงออกของยีน *PmLGBP*, *PmPPAE2* และเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่ายีน *PmPPAE2* คือ PPAE ในกุ้งและอาจจะเป็นตัวกระตุ้น proPO และยีน *PmLGBP* ทำหน้าที่เป็น pattern recognition protein โดยจับ LPS และ beta-1,3-glucan และกระตุ้นระบบ proPO

คำหลัก : กุ้งกุลาดำ, ระบบภูมิคุ้มกัน, พีนอลออกซิเดส, แพทเทิร์น รีคอกนิชัน โปรตีน, โปรตีนเนส

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท ทุนวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์ “การผลิตสัตว์น้ำเศรษฐกิจ” ในโครงการวิจัยเรื่อง “กลไกการกระตุ้นระบบโพर्फิรินออกซิเดสในกิ้งโดย pattern recognition protein” จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปี 2553 ตามสัญญาเลขที่ DBG5380031 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ. ดร. อัญชลี ทศนาจร หัวหน้าศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกิ้ง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิตและนักวิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนช่วยให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

Executive summary

ชื่อโครงการ กลไกการกระตุ้นระบบโพรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งโดย pattern recognition protein

ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร. ปิติ อ่ำพ่าย
ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ปัญหา ที่มา และวัตถุประสงค์ของโครงการ

ปัญหาโรคระบาดจากเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส เป็นปัญหาสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง ส่งผลเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย การเข้าใจกลไกการป้องกันโรคของกุ้งจึงมีความสำคัญต่อการหาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดปัญหาโรคระบาดในกุ้ง และช่วยให้อาชีพการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความมั่นคงและยั่งยืน

การสร้างเมลานิน เป็นกลไกของระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลัง กลไกนี้ เกิดขึ้นจากการทำงานของระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (proPO) เมื่อสิ่งมีชีวิตมีการติดเชื้อจากเชื้อโรค ระบบ proPO จะถูกกระตุ้น โดยมีโปรตีน Pattern Recognition Proteins (PRPs) มาจับกับส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลชีพ ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ซีรีนโปรติเนส (clip-SPs) โดยจะถูกกระตุ้นในลักษณะที่เป็นลำดับขั้น และส่งผลให้ clip-SP ตัวสุดท้ายที่ชื่อว่า PPAAE ทำหน้าที่เปลี่ยน proPO ให้เป็นฟีนอลออกซิเดส (PO) ทำหน้าที่เปลี่ยนสารประกอบฟีนอลให้เป็นควิโนน เป็นโมเลกุลที่ทำให้เกิดเมลานินซึ่งเป็นจุดสีน้ำตาลที่บริเวณที่เกิดบาดแผล หรือรอบ ๆ บริเวณที่มีเชื้อโรคนุกรมและสามารถฆ่าเชื้อโรคได้ อย่างไรก็ตามการศึกษากลไกการกระตุ้นระบบ proPO ในกุ้งยังขาดองค์ความรู้ และขาดความเข้าใจกลไกการกระตุ้นของ PRP โดยเชื้อโรค ผ่านการทำงานของกลุ่มยีน PPAAE เพื่อกระตุ้น PO ให้ทำหน้าที่ในการทำลายเชื้อโรค

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีน *PmLGBP* และ *PmPPAAE2* ซึ่งเป็นยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกุ้งกุลาดำ โดยยีน *PmLGBP* เป็นโปรตีน PRP ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์จุลชีพ และยีน *PmPPAAE2* คือ clip-SP ที่ทำหน้าที่กระตุ้น proPO

ผลการดำเนินงาน

จากการศึกษาหน้าที่ของยีน *PmLGBP* และ *PmPPAAE2* ในระบบโพรฟีนอลออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ ผู้วิจัยได้ค้นพบหน้าที่ของโปรตีน *PmLGBP* ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและรา และกระตุ้นระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และค้นพบหน้าที่ของ *PmPPAAE2* ต่อการกระตุ้นระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และความสำคัญต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ในกุ้ง ทำให้สามารถเข้าใจการต้านทานต่อเชื้อก่อโรคในกุ้ง เพื่อนำไปสู่การเพาะเลี้ยงกุ้งต้านทานโรคได้

หน้าที่ของ LGBP ในการเป็น PRP ในกุ้ง

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษามวลในการจับกันของ *PmLGBP* กับเชื้อจุลชีพ และพบว่า *PmLGBP* สามารถจับได้ทั้ง LPS และ β -1,3-glucan แต่ไม่จับกับ Lysine-type PGN แสดงให้เห็นว่าโปรตีน *PmLGBP* ทำหน้าที่เป็น PRP สำหรับ LPS และ β -1,3-glucan โดยมีค่า K_d ของ *PmLGBP* กับ LPS เท่ากับ $3.55 \pm 1.03 \times 10^{-7}$ M และ β -1,3-glucan เท่ากับ $6.86 \pm 1.86 \times 10^{-7}$ M เมื่อศึกษาความสามารถในการกระตุ้นระบบ proPO ของโปรตีน *PmLGBP* พบว่าการจับกันของโปรตีนกับ LPS หรือ β -1,3-glucan สามารถกระตุ้นระบบ proPO ได้ นอกจากนั้นจากการศึกษารั้งนี้พบว่ากุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* โดยใช้เทคนิค RNA interference ส่งผลให้เกิดการลด PO activity อย่างมีนัยสำคัญจากข้อมูลทั้งหมด สนับสนุนว่า *PmLGBP* ทำหน้าที่เป็น PRP ที่จดจำกับ LPS และ β -1,3-glucan และกระตุ้นระบบ proPO จากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* พบว่าไม่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่ได้ตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *PmLGBP* อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อลดการแสดงออกของยีน proPO พบว่ายีน AMP (penaeidin และ crustin-

like peptide) และขึ้นในระบบ proPO (*PmLGBP* และ *PmPPAE2*) มีการแสดงออกลดลง แสดงให้เห็นว่าขึ้น proPO มีความสำคัญทั้งในการควบคุมระบบ proPO และการสังเคราะห์ AMP ในกุ้ง

สรุปได้ว่า จากผลการทดลองทั้งแบบในตัวกุ้ง (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) ชี้ให้เห็นว่า *PmLGBP* เป็น PRP ที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO ของกุ้ง และมีสมบัติในการจับกับ LPS และ β -1,3-glucan และสามารถกระตุ้นระบบ proPO ได้

หน้าที่ของ PPAAE ในการกระตุ้นระบบ proPO และความสำคัญต่อการทำลายเชื้อก่อโรคกุ้ง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาหน้าที่ของขึ้น *PmPPAE2* โดยเทคนิค RNA interference เพื่อยับยั้งการแสดงออกของขึ้น พบว่ากุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของขึ้น *PmPPAE2* มี PO activity ลดลง 41% แสดงว่าขึ้น *PmPPAE2* เป็นขึ้นที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO เมื่อทำการทดสอบความสำคัญของขึ้น *PmPPAE2* ต่อความอยู่รอดของกุ้งหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* 639 พบว่ากุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของขึ้น *PmPPAE2* มีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อตรวจสอบจำนวนของเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของขึ้นพบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของขึ้น *PmPPAE2* มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มกุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA ผลจากการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าขึ้น *PmPPAE2* เป็นขึ้นที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO และระบบนี้เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษารูปแบบการเรียงตัวของขึ้นพบว่าขึ้น *PmPPAE1* ประกอบด้วย 10 exon และ 9 intron และ *PmPPAE2* ประกอบด้วย 8 exon และ 7 intron และจากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของขึ้น *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ในตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของลูกกุ้ง พบว่ารูปแบบการแสดงออกของขึ้น *PmPPAE1* มีความคล้ายคลึงกับขึ้น *PmproPO2* และรูปแบบการแสดงออกของขึ้น *PmPPAE2* มีความคล้ายคลึงกับขึ้น *PmproPO1* ซึ่งจากผลที่ได้สามารถวิเคราะห์ได้ว่า *PmPPAE1* อาจจะเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ตัดและกระตุ้นการทำงานของ *PmproPO2* ในขณะที่ *PmPPAE2* น่าจะเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ตัดและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ *PmproPO1* ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ PPAAE และ proPO ในระบบ proPO ของกุ้งได้

ผลจากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า เราทราบหน้าที่ของขึ้น *PmPPAE2* ว่าเป็นขึ้นที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO และมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งในการต้านเชื้อ *V. harveyi* และ ยังได้ทราบการเรียงตัวของขึ้น *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* และแนวทางความสัมพันธ์ระหว่าง PPAAE ทั้งสองชนิดนี้กับเอนไซม์ proPO ทั้งสองชนิดในกุ้งกุลาดำ

สรุปกลไกการกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำ

ผลจากงานวิจัยทั้งหมดจากโครงการนี้สามารถสรุปกลไกการกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำเมื่อมีเชื้อจุลินทรีย์บุกรุก โปรตีนจดจำในตัวกุ้ง ชื่อ *PmLGBP* ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น LPS จากแบคทีเรียแกรมลบ หรือ β -glucan จากเชื้อรา ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของกลุ่มขึ้นโปรตีนที่ชื่อว่า proPO-activating enzyme (*PmPPAE1* และ *PmPPAE2*) ทำหน้าที่เปลี่ยน prophenoloxidase (*PmproPO1* และ *PmproPO2*) ให้เป็นเอนไซม์ phenoloxidase (PO) ทำหน้าที่สร้างเมลานิน (melanization) ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

ประโยชน์และผลกระทบจากผลงานที่เกิดขึ้น

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

ผลงานจากงานวิจัย ได้มีการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติแล้วจำนวน 2 เรื่อง (เป็นวารสารที่มี Impact factor มากกว่า 5 จำนวน 1 เรื่อง และมากกว่า 3 จำนวน 1 เรื่อง) และอยู่ระหว่างการพิจารณา 1 เรื่อง ซึ่งเป็น Review article

รางวัลวิจัย

ดร. ปิติ อ่ำพาศพ์ ได้รับรางวัล "นักชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุลดาวรุ่ง/รุ่นเยาว์ (Young BMB Award) ประจำปี พ.ศ. 2554 จาก สาขาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

1. บทนำ

ในการพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งให้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เพื่อที่จะสามารถป้องกันหรือแก้ไขปัญหาโรคระบาดและเพื่อให้กุ้งมีสุขภาพดีได้นั้นองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมีความสำคัญอย่างมากซึ่งจะทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมีความมั่นคงและยั่งยืนมากยิ่งขึ้น โรคระบาดจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัสเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง โรคระบาดที่ส่งผลกระทบร้ายแรงเสียหายมากที่สุดได้แก่ โรคตัวแดงดวงขาว โรคหัวเหลือง และการติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงซึ่งเป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างมากต่อกุ้งที่อยู่ในระยะเพาะฟัก สำหรับการแก้ปัญหาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันคือการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ และการใช้สารเคมี ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ เพื่อช่วยให้สามารถเข้าใจหน้าที่และกลไกการทำงานของยีนต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อและนำไปสู่การหาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดปัญหาโรคระบาดในกุ้งกุลาดำ และช่วยให้อาชีพการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความมั่นคงและยั่งยืน

ระบบภูมิคุ้มกันในครัสเตเชียนเป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่มีมาแต่กำเนิดเรียกว่า innate immunity ประกอบด้วย humoral และ cellular immune response โดยระบบภูมิคุ้มกันหลักอยู่ในส่วนของเลือด เช่น การกลืนทำลาย การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม การแข็งตัวของเลือด การสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ และการเกิดขบวนการ melanization โดยการกระตุ้นของระบบ prophenoloxidase activating system (proPO system) (Cerenius et al., 2008)

ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (proPO system) จัดเป็นหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่มีความสำคัญต่อการต้านทานการรุกรานจากเชื้อก่อโรคในสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยมีฟีนอลออกซิเดส (PO) เป็นเอนไซม์หลักของระบบทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสารประกอบฟีนอลให้เป็นควิโนนซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์เม็ดสีหรือเมลานิน โดยเม็ดสีที่เกิดขึ้นจะใช้ในการล้อมรอบและทำลายเชื้อโรคต่อไป นอกจากนี้สารพิษที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาการสร้างเม็ดสีโดยระบบโพรฟีนอลออกซิเดส ได้แก่ ควิโนนและอนุมูลอิสระ reactive oxygen species ยังสามารถทำลายเชื้อก่อโรคโดยตรงได้ (Sritunyaluksana and Söderhäll, 2000; Cerenius and Söderhäll, 2004; Cerenius et al., 2008; Kanost and Gorman, 2008)

กลไกการทำงานของระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (proPO system) เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน 3 กลุ่มหลัก คือกลุ่มที่ 1 คือ pattern recognition protein เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อโรคและกระตุ้นการทำงานของโปรตีนกลุ่มที่ 2 คือยีน clip domain serine proteinase (Clip-SP) เป็นโปรตีนที่มีการทำงานกระตุ้นเป็นลำดับขั้น โดย Clip-SP ตัวสุดท้ายมีชื่อเรียกว่า proPO-activating enzyme (PPAE) ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้นโปรตีนกลุ่มที่ 3 คือเอนไซม์ proPO ที่อยู่ในรูป inactive form ให้เป็น PO ทำหน้าที่สร้างเมลานิน

1.1 หน้าที่ของกลุ่มยีน pattern recognition protein ต่อกลไกการกระตุ้นระบบ proPO

กลไกสำคัญอย่างหนึ่งในการกระตุ้นการสร้างเมลานินโดยระบบ proPO คือกลุ่มของโปรตีน Pattern Recognition Proteins (PRPs) ทำหน้าที่ในการจับกับส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อโรค เช่น lipopolysaccharides (LPS) จากแบคทีเรียแกรมลบ, peptidoglycans (PG) จากแบคทีเรียแกรมบวก และ β -1,3-glucans จากเชื้อรา และส่งผลให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ เช่น กระตุ้นระบบ proPO กระตุ้น Toll pathway เพื่อสังเคราะห์เพปไทด์ต้านจุลชีพ และกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือด (blood clotting system) (Janeway and Medzhitov, 2002; Iwanaga and Lee, 2005) โดยโปรตีน PRPs ที่พบใน arthropods แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มหลัก คือ (1) โปรตีน β -glucan binding proteins (β GBPs) (2) LPS and glucan binding proteins (LGBPs) (3) Gram-negative binding proteins (GNBPs) และ (4) peptidoglycan-binding proteins (PGBPs)

สิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียนนั้นถึงแม้จะมีรายงานการค้นพบยีน β GBPs และ LGBP ในกุ้ง crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Cerenius et al., 1994; Lee et al., 2000; Romo-Figueroa et al., 2004) และกุ้งหลายชนิด ตัวอย่างเช่นการพบยีน

β GBPs และ LGBP ในกุ้งกุลาดำ (Sritunyalucksana et al., 2002) กุ้ง *Marsupenaeus japonicus* (Lin et al., 2008) กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Cheng et al., 2005) กุ้ง *Litopenaeus stylirostris* และกุ้งจีน *Fenneropenaeus chinensis* (Du et al., 2007; Liu et al., 2009) อย่างไรก็ตามรายงานส่วนใหญ่เป็นการค้นพบและศึกษาการตอบสนองของยีน ยกเว้นในกุ้ง crayfish ได้มีการศึกษาหน้าที่ของทั้งโปรตีน β GBPs และ LGBP และความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO โดยพบว่า LGBP สามารถจับกับ LPS และ β -1,3-glucans และกระตุ้นระบบ proPO ส่วนในกุ้งกุลาดำมีเพียงรายงานการค้นพบยีน β GBP และไม่มีรายงานการพบยีน PRPs อื่นๆ รวมถึงยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนกลุ่มนี้ในกุ้งทำให้ขาดข้อมูลองค์ความรู้ และขาดความเข้าใจกลไกการกระตุ้นของ PRPs โดยเชื้อโรค ผ่านการทำงานของกลุ่มยีน Clip-SPs ใน serine proteinase cascade เพื่อกระตุ้น PO ให้ทำหน้าที่ในการทำลายเชื้อโรค

1.2 หน้าที่ของกลุ่มยีน Clip-SPs ต่อกลไกการกระตุ้นระบบ proPO

การกระตุ้นการทำงานของยีน Clip-SPs เป็นกลไกที่สำคัญของระบบ proPO โดยกลุ่มโปรตีนนี้ถูกกระตุ้นในลักษณะที่เป็น cascade โดยมีการเปลี่ยนจากรูป inactive ให้เป็น active form (Lee et al., 1998a, 1998b) และส่งผลให้ Clip-SPs ตัวสุดท้ายที่ชื่อว่า PPAE ทำหน้าที่กระตุ้นโปรตีน proPO ให้เกิด PO activity ยีน Clip-SP ที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังประกอบด้วย clip domain ที่ปลายด้าน N และ SP domain ที่ปลายด้าน C ในภาวะปกติ Clip-SP จะอยู่ในรูป zymogen หรือ inactive form และถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป active form โดยเอนไซม์โปรตีนเอส ที่ตัดอย่างจำเพาะที่กรดอะมิโน arginine และ lysine ระหว่าง clip domain และ SP domain หลังจากที่ถูกตัดแล้วบริเวณ clip domain และ SP domain จะยังคงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ disulfide

มีรายงานการแยกและศึกษา ยีน Clip-SP ในแมลงหลายชนิด เช่น beetle *Holotrichia diomphalia* (Kwon et al., 2000), silkworm *Bombyx mori* (Satoh et al., 1999), tobacco hornworm *Manduca sexta* (Yu et al., 2003) และในกลุ่มครึ่งเตี๊ยนคือกุ้ง crayfish *P. leniusculus* (Wang et al., 2001) ยีน Clip-SP สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ (1) catalytic group เป็นกลุ่มที่มี proteolytic activity พบใน *H. diomphalia* PPAF-I, -III, *B. mori* PPAE และ *M. sexta* PAP-I และ (2) noncatalytic group เป็นกลุ่มที่ไม่มี proteolytic activity เนื่องจากมีการแทนที่กรดอะมิโน serine ด้วย glycine ในบริเวณ active site ซึ่งพบได้ใน *H. diomphalia* PPAF-II และ *M. sexta* serine proteinase homolog (SPH)-I, -II (Jiang et al., 2003) ในแมลง *H. diomphalia* มีการโคลนและศึกษา ลักษณะสมบัติของยีน PPAF จำนวน 3 ยีน (PPAF-I, -II และ -III) (Lee et al., 1998a, 1998b; Kwon et al., 2000) และพบว่ากลไกในการกระตุ้น proPO (I และ II) ที่มีขนาด 79 kDa ให้อยู่ในรูป active PO เป็นการทำหน้าที่ของยีน PPAF-I โดยตัด proPO ขนาด 79 kDa ให้มีขนาดเล็กลงเป็น 76 kDa และขั้นตอนต่อไปโปรตีน PPAF-I และโปรตีน PPAF-II ซึ่งทำหน้าที่เป็น cofactor จะเปลี่ยน proPO ขนาด 76 kDa ให้อยู่ในรูป active PO มีขนาด 66 kDa ในกระบวนการนี้ ยีน PPAF-III จะทำหน้าที่ตัด PPAF-II อย่างจำเพาะที่กรดอะมิโน arginine ภายใน clip domain ในรูป inactive form ให้อยู่ในรูป active form ซึ่งทำหน้าที่เป็น cofactor ของ PPAF-I (Lee et al., 1998a, 1998b)

ส่วนในแมลง *M. sexta* ได้มีรายงานการแยก serine proteinases 25 ชนิดในเมดเลือดของ *M. sexta* larvae และได้มีการศึกษาหน้าที่และความเกี่ยวข้องของ serine proteinase กับระบบ proPO โดยพบว่าเมื่อมีการกระตุ้นด้วย β -1,3-glucan จะทำให้ serine proteinase HP14 เกิด autoactivate ทำให้สามารถตัด inactive proHP21 ให้เป็น active HP21 และมีผลไปกระตุ้น inactive proPAP-2 ให้เป็น active PAP-2 ซึ่งจะส่งผลให้ active PAP-2 สามารถเปลี่ยน inactive proPO ให้เป็น active PO โดยทำงานร่วมกับ cofactor (*M. sexta* SPH-1 และ SPH-2) ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครึ่งเตี๊ยนนั้น มีเพียงกุ้ง crayfish *P. leniusculus* ชนิดเดียวที่มีการพบและศึกษาหน้าที่ของยีน PPA โดยพบว่าโปรตีนนี้สามารถกระตุ้น proPO ให้เป็น active PO ได้โดยไม่ต้องอาศัย cofactor PPAF อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานหรือการศึกษาโปรตีน Clip-SP ที่เกี่ยวข้องใน upstream process ของโปรตีน Clip-SP ว่ามีการเกิดการกระตุ้น serine proteinase cascade ได้อย่างไร

1.3 หน้าที่ของกลุ่มยีน proPO ต่อการต้านทานโรค

ยีน proPO ถูกค้นพบครั้งแรกใน crayfish *P. leniusculus* (Aspán et al., 1995; Aspán and Söderhäll, 1991) และต่อมาได้มีรายงานในกลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดในคริสต์ศตวรรษที่ยี่สิบ proPO เพียงชนิดเดียว ในขณะที่ในแมลงพบยีน proPO พบมากกว่าหนึ่งชนิด (Cerenius and Söderhäll, 2004)

การกระตุ้น prophenoloxidase (proPO) ทำให้เปลี่ยนเป็น phenoloxidase (PO) ซึ่งเป็น key enzyme ของระบบโพรฟีนอลออกซิเดส เอนไซม์ PO ทำหน้าที่ที่เปลี่ยนสารประกอบ phenol ให้เป็น quinone ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญต่อกระบวนการสร้างเมลานิน ในบริเวณที่มีเชื้อโรคบุกรุก โดยสารที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาการสร้างเมลานินโดยระบบโพรฟีนอลออกซิเดส ได้แก่ quinone, 5,6-dihydroxyindole (DHI) และอนุมูลอิสระ reactive oxygen species สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้โดยตรงได้ มีรายงานในแมลง *M. sexta* (Zhao et al., 2007; 2011) และใน crayfish (*P. leniusculus*) (Cerenius et al., 2010) พบว่าเมื่อใช้ L-dopa ในปฏิกิริยาของฟีนอลออกซิเดส, dopamine และ DHI สามารถทำลายเชื้อ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อราและไวรัส ความสามารถในการทำลายเชื้อของสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในระบบโพรฟีนอลออกซิเดสนั้นมีระดับความรุนแรงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ นอกจากนั้นเชื้อที่ใส่ทดสอบไม่ใช่เชื้อที่ก่อโรคของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น

1.4 งานวิจัยระบบโพรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำ

จากการค้นหา และศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO จากฐานข้อมูลจีโนมกุ้งกุลาดำ (<http://pmonodon.biotech.or.th>) (Tassanakajon et al., 2006) คณะผู้วิจัยได้ค้นพบยีนที่มีความสำคัญใน serine proteinase cascade ในระบบ proPO ประกอบด้วยยีน *PmPPAE1* (Charoensapsri et al., 2009) ซึ่งเป็นยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งเมื่อติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้ง และทำการศึกษาน้ำที่ของยีน และโปรตีน *PmMasSPH1* พบว่าเป็นมีการแสดงออกของยีนมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (Amparyup et al., 2007) และโปรตีนมีหน้าที่ทางชีวภาพได้หลายอย่างเช่น hemocyte adhesion, bacterial binding และ antimicrobial activity (Jitvaropas et al., 2009) นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยได้ค้นพบยีนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ชนิดที่ 2 (*PmproPO2*) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน เมื่อศึกษาน้ำที่โดยทำ gene knockdown ด้วยเทคนิค RNA interference พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และมีผลต่อการติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง (Amparyup et al., 2009)

จากงานวิจัยที่ได้กล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าระบบโพรฟีนอลออกซิเดสเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ อย่างไรก็ตามการศึกษาระบบโพรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งยังมีไม่มากนัก ซึ่งการศึกษาน้ำที่ของยีนและโปรตีนในระบบนี้มี ความสำคัญต่อความเข้าใจกลไกการทำงานของยีนและโปรตีนในระบบโพรฟีนอลออกซิเดสของกุ้ง เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มภูมิคุ้มกันของกุ้งให้กุ้งต้านทานโรค

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ค้นหา ยีน pattern recognition protein (PRP)
2. ศึกษาหน้าที่ของยีน PRP โดยใช้เทคนิค RNA interference
3. ศึกษาหน้าที่ และสมบัติทางชีวภาพของโปรตีน PRP โดยการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์

3. วิธีการทดลองวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำกุ้งกุลาดำน้ำหนักประมาณ 15 – 20g มาปรับสภาพในบ่อเลี้ยงที่ความเค็ม 20 ppt เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บเม็ดเลือดจากกุ้งโดยเก็บเลือดกุ้งปกติใน anti-coagulant solution (10%(w/v) trisodium citrate dihydrate) แล้วปั่นเก็บเซลล์ที่ $800 \times g$ 4 °C เป็นเวลา 10 min จากนั้นนำตะกอนของเม็ดเลือดแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บตัวอย่างไว้ที่ -80 °C เพื่อนำไปสกัด RNA ในขั้นตอนต่อไป สำหรับเนื้อเยื่ออื่นๆ ได้แก่ ตับ, หัวใจ, อวัยวะน้ำเหลือง, ลำไส้, และหัวใจ รวมทั้งตัวอย่างของกุ้งกุลาดำจาก 4 ระยะ ได้แก่ นอเพลียส 3 (N3), โพรโตซูเอีย 2 (Z2), ไมซิส 2 (M2) และโพสลาวา 15 (PL15) ได้ทำการเก็บตัวอย่างแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและ -80 °C ตามลำดับเพื่อนำไปสกัด RNA ต่อไป ในส่วนของการทดลองฉีดเชื้อก่อโรค ได้ทำการฉีดเชื้อ *V. harveyi* (10^6 CFU) ที่เจือจางด้วยน้ำเกลือ (150 mM NaCl) เข้าสู่กุ้งกลุ่มทดลอง และฉีดน้ำเกลือที่ปริมาตรเดียวกันเข้าสู่กุ้งในกลุ่มควบคุม เก็บเม็ดเลือดจากกุ้งแต่ละกลุ่มที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 h ตามลำดับ เพื่อนำไปสกัด RNA

3.2 การสกัด total RNA, การสกัด genomic DNA และการสังเคราะห์ cDNA

ทำการสกัด total RNA จากเนื้อเยื่อและตัวอย่างระยะต่างๆ ของกุ้งกุลาดำด้วย TRI Reagent® (Molecular Research Center) กำจัด DNA ที่ปนเปื้อนออกโดยย่อยด้วยเอนไซม์ RNase-free DNase I (Promega) ทำการสกัด mRNA จาก total RNA ด้วย QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit (GE Healthcare) หลังจากนั้นสร้าง first-strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcriptase System Kit (Promega) ในส่วนของ genomic DNA ได้ทำการเตรียม DNA ของกุ้งกุลาดำจากขาว่ายน้ำด้วยวิธี phenol/chloroform วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ DNA ด้วย agarose gel electrophoresis และ spectrophotometry ตามลำดับ

3.3 การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น cDNA บางส่วนของยีน *PmPPAE2* ในกุ้งกุลาดำ

ทำการออกแบบ degenerate primer (ตารางที่ 1) จากบริเวณกรดอะมิโนอนุรักษ์ที่พบในโดเมนซีรีน โพรตีนของยีน *PPAE* ที่มีรายงานในกุ้ง crayfish และแมลงจากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR โดยใช้ cDNA ที่เตรียมได้จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำเป็นแม่แบบ ทำการวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis แล้วตัดแถบ DNA ที่มีขนาดตรงตามที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega) ทำการสกัดพลาสมิดด้วย Plasmid DNA Extraction Kit (Qiagen) แล้วนำพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณอนุรักษ์

3.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์โดยเทคนิค Rapid Amplification of cDNA End (RACE)-PCR

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PmPPAE2* จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่ได้จากการใช้ degenerate primer จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน cDNA ที่สมบูรณ์ด้วย SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) โดยใช้ mRNA ที่เตรียมได้จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำเป็นแม่แบบในการเตรียม 5' และ 3' RACE cDNA ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PmPPAE2* ที่ได้ออกแบบไว้ (ตารางที่ 1) ทำการวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นตัดแถบ DNA ที่มีขนาดตามที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Qiagen DNA Purification Kit (Qiagen) แล้วโคลนชิ้น DNA เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega) เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์

3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของแต่ละยีนโดยใช้โปรแกรม GENETYX (GENETYX Corporation) จากนั้นทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ทำนายส่วน signal peptide และโดเมนที่มีความสำคัญด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) และโปรแกรม simple modular architecture research tool (SMART)

(<http://www.smart.emblheidelberg.de/>) ตามลำดับ ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับของกรดอะมิโนระหว่างยีนที่สนใจ โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)

3.6 การศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ภายในจีโนมของกิ้งกูดาคำ

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน genomic DNA ของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* โดยทำการเพิ่มปริมาณชิ้น genomic DNA ด้วย BD Advantage™ Genomic PCR Kit (Clontech) โดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน cDNA ของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis แล้วตัดแถบ DNA ที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์ โคลนขึ้น DNA เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.7 การศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกิ้งกูดาคำด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกิ้งกูดาคำ โดยทำการสกัด total RNA จากเนื้อเยื่อ 6 ชนิด ได้แก่ ตับ, หัวใจ, อวัยวะน้ำเหลือง, ลำไส้, หัวใจ และเม็ดเลือดด้วย TRI Reagent® (Molecular Research Center) แล้วนำ total RNA ที่ได้ไปสร้าง first-strand cDNA ด้วย ImProm-II™ Reverse Transcriptase System Kit (Promega) ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละยีน (ตารางที่ 1) และใช้ยีน EF-1α เป็นยีนควบคุม วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

3.8 การศึกษาการแสดงออกของยีนในตัวอย่างเนื้อเยื่อต่างๆ ของกิ้งกูดาคำด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

สร้าง first-strand cDNA จาก total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของกิ้งกูดาคำ 4 ระยะ ได้แก่ อนุพลีส 3 (N3), โพรโทซัว 2 (Z2), ไมซิส 2 (M2) และโพสลาวา 15 (PL15) จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละยีน (ตารางที่ 1) และใช้ยีน EF-1α เป็นยีนควบคุม ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

3.9 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR

ทำการสร้าง first-strand cDNA จาก total RNA ที่สกัดได้จากกิ้งกูดาคำและกิ้งกูดาคำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* เพื่อนำมาใช้เป็น DNA แม่แบบสำหรับการทำ real-time RT-PCR ด้วยเครื่อง iCycler-iQ™ System (Bio-Rad) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละยีนที่ได้ออกแบบไว้ (ตารางที่ 1) และติดตามระดับการแสดงออกของยีนจาก signal ของสี SYBR Green I (Bio-Rad) โดยใช้ยีน EF-1α เป็นยีนควบคุม จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือตามวิธีของ Pfaffl (Pfaffl 2001)

3.10 การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน r*PmLGBP*

เพิ่มจำนวนยีน *PmLGBP* โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase (Promega) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ คือ *PmLGBP*exp-F/R ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* และ *XhoI* อยู่ทางปลายด้าน 5' ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET-28b(+) แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) เหมียวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG เป็นเวลา 6 h ทำการเก็บเซลล์โดยนำไปปั่นที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 15 min ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 20 mM Tris-HCl pH 8 แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง ultrasonic oscillator ทำโปรตีน r*PmLGBP* ให้บริสุทธิ์และ refold ตามวิธีของ Amparyup et al. (2008) วัดความเข้มข้นโปรตีน r*PmLGBP* ด้วย Bradford assay จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot analysis โดยใช้ anti-His-tag monoclonal antibody

3.11 การศึกษาผลการจับกัน (binding activity) ของโปรตีน r*PmLGBP* กับ PAMPs

ทำการยัดติด β-glucan (*Laminaria digitata*; Sigma), LPS (*E. coli* O127:B8; Sigma) และ soluble Lys-type PGN (*Staphylococcus aureus*; InvivoGen) อย่างละ 20 μg ลงในแต่ละ well ของ 96-well microplate ทิ้งให้แห้งที่ 37 °C เป็นเวลา

ข้ามคืน นำไปบ่มต่อที่ 60°C เป็นเวลา 1h จากนั้น block ด้วย bovine serum albumin (BSA) ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 h แล้วล้างโปรตีนที่ไม่ถูกจับออกด้วย TBS จากนั้นเติมโปรตีน rPmLGBP(0-10 μ M) ลงในแต่ละ well แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 h หลังจากล้างโปรตีนที่ไม่ถูกจับออกด้วย TBS แล้วทำการติดตามการจับกันของโปรตีนกับ PAMPs แต่ละชนิดโดยใช้ anti-His-tag monoclonal antibody(1:10,000) เป็น primary antibody และใช้ alkaline phosphatase-conjugated rabbit-anti-mouse IgG (1:10,000) เป็น secondary antibody โดยใช้ *p*-nitrophenyl phosphate (1 mg/mL in diethanolamine buffer) เป็น substrate แล้วติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader (Molecular Devices)

3.12 การศึกษาหน้าที่ของ rPmLGBP ในการกระตุ้นระบบ proPO

เตรียมเม็ดเลือดกึ่งกลูตาด้วยการเก็บเลือดลงใน anti-coagulant solution ทำการปั่นเก็บเซลล์ที่ 800 $\times$ g 4 °C เป็นเวลา 10 min ล้างตะกอนของเม็ดเลือดด้วย cacodylate buffer (CAC) pH 7 บดเซลล์เม็ดเลือดในบัฟเฟอร์เดียวกัน และนำไปปั่นที่ 25,000 $\times$ g 4 °C เป็นเวลา 25 min เก็บสารละลาย hemocyte lysate supernatant (HLS) ที่ได้เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

ทำการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน rPmLGBP ในการกระตุ้นระบบ proPO โดยบ่ม HLS (250 μ g) กับ LPS (0.1 μ g/mL), β -1,3-glucan (0.1 μ g/mL) หรือ PGN (0.1 μ g/mL) ในสภาวะที่มีและไม่มี rPmLGBP (4 μ M) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 min โดยกลุ่ม negative control ใช้น้ำกลั่นแทน HLS จากนั้นเติมสับสเตรท L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-dopa) (Fluka) แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 min หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดแอสติกเข้มข้น 10% (v/v) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm และรายงานผลเป็นค่า PO activity (PO activity = ΔA_{490} /mg total protein/min)

3.13 การเตรียม double-stranded RNA (dsRNA)

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PmPPAE2*, *PmLGBP*, *PmproPO1* และ *PmproPO2* และขึ้นควบคุม green fluorescent protein (GFP) เพื่อนำมาใช้เตรียม DNA แม่แบบสำหรับสร้าง single-stranded RNA (ssRNA) ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยให้ไพรเมอร์เส้นหนึ่งมีส่วนของ T7 promoter อยู่ที่ปลาย 5' และอีกเส้นไม่มีส่วนของ T7 promoter (ตารางที่ 1) สังเคราะห์ RNA ด้วยวิธี *in vitro* transcription โดยใช้ T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems Kit (Promega) จากนั้นนำ ssRNA สาย sense และ anti-sense ที่ปริมาณเท่ากันมา anneal กัน ทำการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของ dsRNA ที่สร้างได้ด้วย spectrophotometry และ agarose gel electrophoresis ก่อนนำไปฉีดเข้าสู่ตัวกุ้ง

3.14 การยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วย dsRNA

ทำการฉีด dsRNA ของยีน *PmPPAE2*, *PmLGBP*, *PmproPO1* และ *PmproPO2* เข้าสู่กุ้ง ในอัตราส่วน 2 μ g ต่อกุ้งน้ำหนัก 1 g โดยกลุ่มควบคุมจะฉีดด้วย GFP dsRNA และน้ำเกลือ (150 mM NaCl) เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 24h แล้วทำการฉีด dsRNA หรือน้ำเกลือที่มี lipopolysaccharide (LPS) และ laminarin (β -1,3-glucan) ผสมอยู่ซ้ำอีกครั้ง ทำการเลี้ยงกุ้งต่อไปอีกเป็นเวลา 48 h

3.15 การตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

ทำการเก็บเลือดจากกุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของ *PmPPAE2*, *PmLGBP*, *PmproPO1* และ *PmproPO2* และกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย dsRNA ของ GFP และน้ำเกลือเป็นเวลา 48h ภายหลังจากการฉีด dsRNA ครั้งที่ 2 มาสกัด total RNA ด้วย NucleoSpin® RNA II Kit (MACHEREY-NAGEL) ทำการสร้าง first-strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcriptase System Kit (Promega) ตรวจสอบประสิทธิภาพการลดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยใช้ยีน EF-1 α เป็นยีนควบคุม หลังจากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของ dsRNA ในการลดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Clip-SPs (*PmPPAE1*, *PmClipSP1* และ *PmClipSP2*) และ Clip-SPHs (*PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3*) (ตาราง

ที่ 1) ซึ่งพบในกุ้งกุลาดำเป็นตัวตรวจสอบความจำเพาะของ *PmPPAE2* dsRNA ในการลดการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

ตรวจระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันอื่นเมื่อมีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* หรือ *PmproPOs* โดยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะของยีน antimicrobial peptides (penaeidin: PEN3, crustin: crus-like*Pm* and SWDP*m2* and lysozyme;*PmLyze*), ยีนในระบบ proPO (*PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* และยีน Toll receptor (ตารางที่ 1) และใช้ยีน EF-1 α เป็นยีนควบคุม

3.16 การตรวจสอบ phenoloxidase (PO) activity ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน

ทำการเก็บเลือดจากกุ้งหลังจากฉีด dsRNA ของยีน *PmPPAE2* และ *PmLGBP* และกุ้งในกลุ่มควบคุมที่เวลา 48 h หลังจากการฉีด dsRNA ครั้งที่ 2 จากนั้นวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ Bradford AssayKit (Bio-Rad) และทำการตรวจสอบ PO activity โดยบ่มโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งกับสับสเตรท L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-dopa) (Fluka) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 min แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 10% (v/v) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm

3.17 การศึกษาอัตราการตายของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi*

ทำการเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* 639 ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 h ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic soy agar) จากนั้นนำเชื้อ 1 โคลอนีมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (tryptic soy broth) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลาข้ามคืน แล้วจึงนำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 40 μ L มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 8mL ที่อุณหภูมิ 30 °C ทำการวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยวัดค่า OD₆₀₀ และใช้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 2×10^5 CFU ฉีดเข้าสู่กุ้งเพื่อตรวจสอบอัตราการตายของกุ้ง โดยได้ทำการฉีด dsRNA ของยีน *PmPPAE2* เข้าสู่ตัวกุ้งในอัตราส่วน dsRNA 2 μ g ต่อกุ้งน้ำหนัก 1 g สำหรับกุ้งในกลุ่มควบคุมจะฉีดด้วย GFP dsRNA และ 150 mM NaCl ทำการเลี้ยงกุ้งต่อไปเป็นเวลา 24 h จากนั้นทำการฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* 639 (2×10^5 CFU) จดบันทึกอัตราการตายของกุ้งหลังจากฉีดเชื้อ 3h จนกระทั่งครบ 5 วัน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำและใช้กุ้ง 9-10 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง

3.18 การตรวจสอบจำนวนเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน

ฉีด dsRNA ของยีน *PmPPAE2* เข้าสู่ตัวกุ้งในอัตราส่วน dsRNA 2 μ g ต่อกุ้งน้ำหนัก 1 g และกลุ่มควบคุมฉีดด้วย GFP dsRNA ทำการเลี้ยงกุ้งต่อไปเป็นเวลา 24 h แล้วจึงทำการฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับเชื้อ *V. harveyi* 639 (2×10^5 CFU) หลังจากนั้นเก็บเลือดจากกุ้งแต่ละกลุ่มที่เวลา 6h ภายหลังจากการฉีดเชื้อ แล้วนำเลือดไปนับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* โดยวิธี total plate count โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และใช้กุ้ง 3-4 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาระบบ proPO ในกุ้งกุลาดำ

Primer	Sequence (5'-3')	Primer	Sequence (5'-3')
Cloning and Recombinant protein expression		Lysozyme	
PmLGBP		PmLyzc-F	5' GCGGCAGCGATTATGGCAAG 3'
5PmLGBP-F	5' TTCTTATCCACAGCAGGATG 3'	PmLyzc-R	5' TTGGAACCACGAGACCAGCACT 3'
3PmLGBP-R	5' TATTACAGTTTGTGGAAGGATTTA 3'	Toll receptor	
PmLGBPexp-F	5' CATGCCATGGCAGACATCGTGGAGCCCGA 3'	PmToll-F	5' GAATGCTTCCTCGGGTCTGC 3'
PmLGBPexp-R	5' GCCTCGAGCTAATGATGATGATGATGATGC	PmToll-R	5' GCTCAGCCATGACGAGATTTC 3'
	TGCTCGGTGCTCTCCATCT 3'	EF1 α	
Real-time PCR		EF1 α -F	5' GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC 3'
PmLGBP		EF1 α -R	5' CGTTCGGTGATCATGTTCTTGATG 3'
PmLGBP-F2	5' TCGACAACGATATCTGGGA 3'	Gene silencing	
PmLGBP-R2	5' CCCGCGGCCGTTTCATGCCCCAC 3'	PmLGBP	
Semi-quantitative RT-PCR analysis		PmLGBP α -F	5' AGGGCTTCGTAGCGTCGGTC 3'
PmproP01		PmLGBP α -R	5' CGAAGGAACCTGTATTTGCT 3'
PO1RT-F	5' GGTCTTCCCCTCCGCTTCG 3'	T7PmLGBP α -F	5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGA
PO1RT-R	5' GCCGCAGGTCTTTGGCAGC 3'		GGGCTTCGTAGCGTCGGTC 3'
PmproP02		T7PmLGBP α -R	5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGC
PO2RT-F	5' GCCAAGGGGAACGGGTGATG 3'		GAAGGAACCTGTATTTGCT 3'
PO2RT-R	5' TCCCTCATGGCGGTCGAGGT 3'	PmPPAE2	
PmPPAE1		PmPPAE2 α -F	5' GCGGCGGTGACGCTCCTTGTTTC 3'
PmPPAE1-F	5' ATGAAGGGCGTGACGGTGGTTCTATG 3'	PmPPAE2 α -R	5' ACTCTCGGGGACGCTTGTTG 3'
PmPPAE1-R	5' CTCTTCTTCAAGCTCACCCTCTCTATCT 3'	T7PmPPAE2 α -F	5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGG
PmPPAE2			GCGGCGGTGACGCTCCTTGTTTC 3'
PPAE2-F	5' ATGCACTACGGGTTCACGATC 3'	T7PmPPAE2 α -R	5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGG
PPAE2-R	5' CTAAGGTTTGAGATTCTGCACG 3'		ACTCTCGGGGACGCTTGTTG 3'
5PPAE2-F	5' ACGCGGGAGGGAGCAGCTAC 3'	PmPPAE1	
3PPAE2-R	5' AGATACTAGATAGGCCTGATTACGA 3'	PPA α -F	5' CGTCTGCTTCATTGAGGGAGTG 3'
PmClipSP1		PPA α -R	5' GTAGTAGATGGTGCCCCAGCCT 3'
PmSP1rt-F	5' TGAGAGCACAAATAGTGGAGGGGTA 3'	T7PPA α -F	5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGG
PmSP1rt-R	5' TGGAGGCAGGCACACAGGCAAC 3'		CGTCTGCTTCATTGAGGGAGTG 3'
PmClipSP2		T7PPA α -R	5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGG
PmSP2rt-F	5' GCGGTTGGTCTTCACTGCTCTC 3'		GTAGTAGATGGTGCCCCAGCCT 3'
PmSP2rt-R	5' CAGAACTGCCTTCCAAGGATAG 3'	GFP	
PmMasSPH1		GFP-F	5' ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3'
PmSPH1rt-F	5' TACGTACTCATTGATATCAGGTTTG 3'	GFP-R	5' TTACTTGACAGCTCGTCCA 3'
PmSPH1rt-R	5' GCCTCGTTATCCTTGAATCCAGTGA 3'	GFPT7-F	5' TAATACGACTCACTATAGGATGGTG
PmMasSPH2			AGCAAGGGCGAGGA 3'
PmSPH2rt-F	5' CCGTGAACGAGGATGTCCTTA 3'	GFPT7-R	5' TAATACGACTCACTATAGGTTACTT
PmSPH2rt-R	5' GCCACACTCTCCGCTGCTCCG 3'		GTACAGCTCGTCCA 3'
PmMasSPH3		RACE-PCR	
PmSPH3rt-F	5' GCTCTTGGTGCTGCCGCTGTTG 3'	PmPPAE2	
PmSPH3rt-R	5' CACCGTCCACGCACAGGTAATA 3'	PPAE-SP-F	5' CGATACGTCYTGACSGCSGCNCAYTG 3'
Penaeidin		PPAE-SP-R	5' TGCATGTGCGGRCCRCRGARTCNCC 3'
PEN3-F	5' GGTCTTCTGCGCTCCTTCG 3'	PPAE2-F1	5' ATCCGTCTCGGCGAATACGACTTCTCCA 3'
PEN3t-R	5' TTTGCATCACAAACGTCCTA 3'	PPAE2-F2	5' CCTGAGCAAGTCGTCCTCCATC 3'
Crustin-like peptide		PPAE2-R1	5' GCCCTCTCTGTATGTCCCCAGCCAATC 3'
Crus72-F	5' CGGCAGGTGTCCACAGATTTCG 3'	PPAE2-R2	5' GAAGGAGCCGACGTTTAAGCCA 3'
Crus72-R1	5' AATTGATGAGTCGAACATGCAGGCCTAT 3'		
Single WAP domain-containg protein			
SWDPm2-F	5' CGGCATCATCACACGTGCGAG 3		
SWDPm2-R	5' TCAGTAACCTTTCCAGGGAGAC 3'		

4. ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาหน้าที่ของ pattern recognition protein ในระบบโพธิ์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้ง

โปรตีน lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) เป็นโปรตีนในกลุ่ม pattern recognition protein (PRP) ที่สำคัญในระบบ proPO โดยเมื่อมีเชื้อโรคนุกรม โปรตีน PRP จะทำหน้าที่จับกับจุลชีพที่บุกรุกเข้ามา เกิดการกระตุ้นการทำงานของยีนกลุ่ม proteinase ซึ่งส่งผลกระตุ้น phenoloxidase ให้สร้างเมลานินในการฆ่าจุลชีพ ในกุ้งกุลาดำได้ค้นพบยีน LGBP ซึ่งมีความคล้ายกับยีน LGBP ของ crayfish *Pacifastacus leniusculus* ถึง 76% อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการศึกษาหน้าที่ของยีน LGBP ในกุ้งกุลาดำมาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาหน้าที่และความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ของยีน LGBP ในกุ้งกุลาดำ โดยให้ชื่อยีนเป็น *PmLGBP*

4.1.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *PmLGBP*

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PmLGBP* พบว่าเมื่อถูกแปลรหัสจะได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 349 ตัว (accession number JN415536) มีค่ามวลโมเลกุลและ isoelectric point (pI) เท่ากับ 39.8 kDa และ 4.28 ตามลำดับ มีเปปไทด์สัญญาณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 17 ตัวและเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SMART พบว่าโปรตีน *PmLGBP* มีส่วนอนุรักษ์ของโดเมน glycoside hydrolase family 16 ที่ตำแหน่ง 79-290 ซึ่งประกอบด้วยส่วน polysaccharide binding motif, glucanase recognition motif และ beta-glucan recognition motif และมี integrin binding motif (RGD) อยู่ 2 บริเวณที่ตำแหน่ง 106 และ 157 ผลการทำ BLASTX พบว่า *PmLGBP* มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ β -GBP ของกุ้งกุลาดำถึง 99% แสดงให้เห็นว่ายีน *PmLGBP* น่าจะเป็นยีนเดียวกันกับที่เคยมีรายงาน อย่างไรก็ตาม ยีน *PmLGBP* มีความเหมือนของกรดอะมิโนกับยีน LGBPs ในครัสเตเชียนมากที่สุด โดยมีความเหมือน 81-95% ดังนั้น *PmLGBP* คือโปรตีนกลุ่มเดียวกับยีน LGBP ที่พบในครัสเตเชียน

4.1.2 การแสดงออกของยีน *PmLGBP* ในเนื้อเยื่อต่างๆ และการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

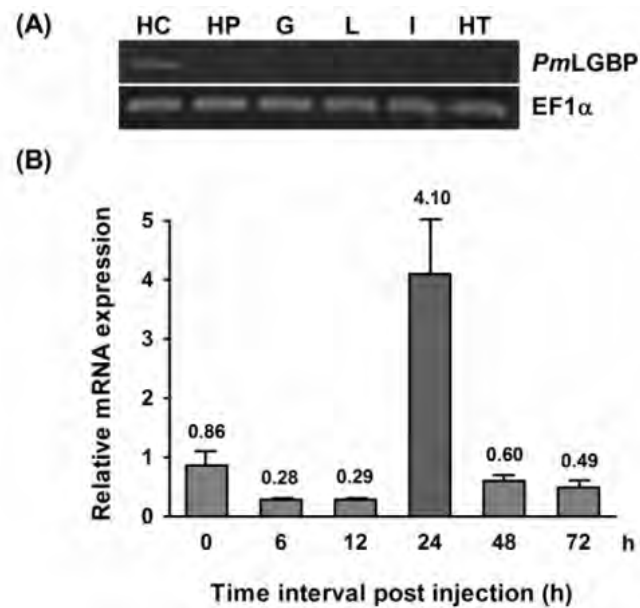
เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *PmLGBP* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งปกติ ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่ายีน *PmLGBP* มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือดของกุ้ง (รูปที่ 1A) เมื่อเทียบกับยีนควบคุม EF-1 α โดยไม่แสดงออกในเนื้อเยื่ออื่นของกุ้ง

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *PmLGBP* ในเม็ดเลือดของกุ้งภายหลังการติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 h ด้วยวิธี real-time RT-PCR พบว่าที่เวลา 24h ยีน *PmLGBP* มีอัตราการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นมากอย่างมีนัยสำคัญ (4.77 เท่าเมื่อเทียบกับที่ 0 h) หลังจากติดเชื้อ *V. harveyi* (รูปที่ 1 B) แสดงว่ายีน *PmLGBP* มีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อเชื้อ *V. harveyi*

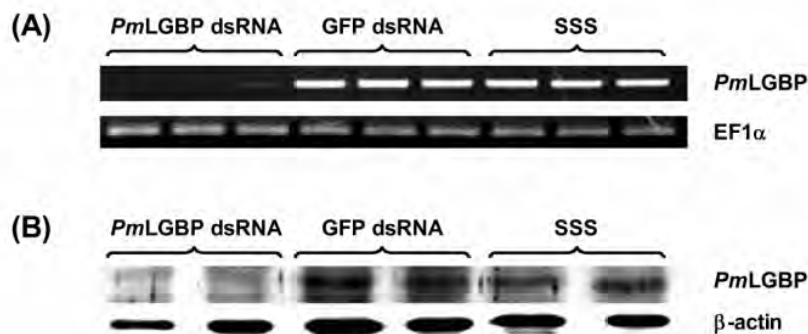
4.1.3 การศึกษาหน้าที่ของยีน *PmLGBP* ในกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค RNA interference

เพื่อศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนและความเกี่ยวข้องของยีน *PmLGBP* ต่อระบบ proPO ได้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* ด้วย RNAi และศึกษาผลกระทบต่อเอกทิวติของ phenoloxidase (PO) ในเลือดกุ้ง พบว่าจากการทดลองฉีด dsRNA ของยีน *PmLGBP* หรือ GFP (กลุ่มควบคุม) เข้าสู่ตัวกุ้งในปริมาณ 5 μ g dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g หลังจาก 24 h ทำการฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับกระตุ้นด้วย LPS และ laminarin (β -glucan) เพื่อให้โปรตีนในระบบ proPO ถูกกระตุ้น ทำการเลี้ยงกุ้งต่ออีก 48 h เก็บเลือดมาสกัด RNA และสร้าง cDNA วิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน ผลจากการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *PmLGBP* (*PmLGBP*i-F และ *PmLGBP*i-R) พบว่า dsRNA ของยีน *PmLGBP* สามารถลดการแสดงออกของยีน *PmLGBP* (รูปที่ 2A) ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย dsRNA

GFP หรือ NaCl เมื่อตรวจสอบโปรตีน *PmLGBP* โดยการทำให้ immunoblotting พบว่ากุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2 B)



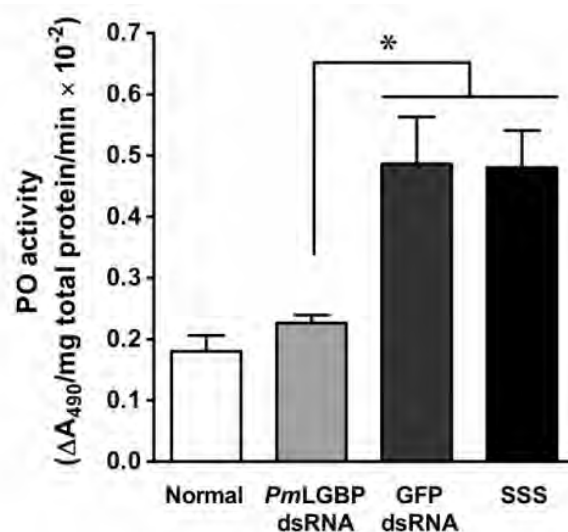
รูปที่ 1 การแสดงออกของยีน *PmLGBP* (A) การแสดงออกของยีน *PmLGBP* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR; Hemocyte (HC), hepatopancreas (HP), gill (G), lymphoid (L), intestine (I) และ heart (HT) โดยใช้ยีน EF-1 α เป็น internal control (B) การแสดงออกของยีน *PmLGBP* ในเม็ดเลือดของกุ้งหลังการฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 h ด้วยวิธี real-time RT-PCR



รูปที่ 2 การยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีน *PmLGBP* ของกุ้งกุลาดำด้วยวิธี RNAi ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* (A) และโปรตีน (B) หลังฉีด dsRNA และวิเคราะห์ด้วย semi-quantitative RT-PCR และ western blot analysis โดยกุ้งที่ถูกฉีดด้วย dsRNA ของยีน GFP และน้ำเกลือ (SSS) เป็นกลุ่มควบคุม ใช้ยีน EF-1 α เป็นยีนควบคุมสำหรับ RT-PCR และใช้ β -actin เป็นโปรตีนควบคุม

4.1.4 การตรวจสอบ phenoloxidase (PO) activity หลังยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP*

ผลจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* และตรวจสอบ PO activity ของกุ้งที่ถูก knockdown พบว่ากุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmLGBP* และกระตุ้นด้วย PAMP (LPS และ β -1,3-glucan) มีค่า PO activity ลดลง 39% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย NaCl ในขณะที่ PO activity ของกลุ่มที่ฉีดด้วย GFP dsRNA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกุ้งที่ฉีดด้วย NaCl เมื่อวิเคราะห์ระดับ PO activity ในกุ้งปกติที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้นด้วย PAMP (LPS และ β -1,3-glucan) พบว่า มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกุ้งกลุ่มที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า *PmLGBP* เป็นโปรตีน PRP ที่ทำงานในระบบ proPO และถูกกระตุ้นด้วย LPS และ β -1,3-glucan



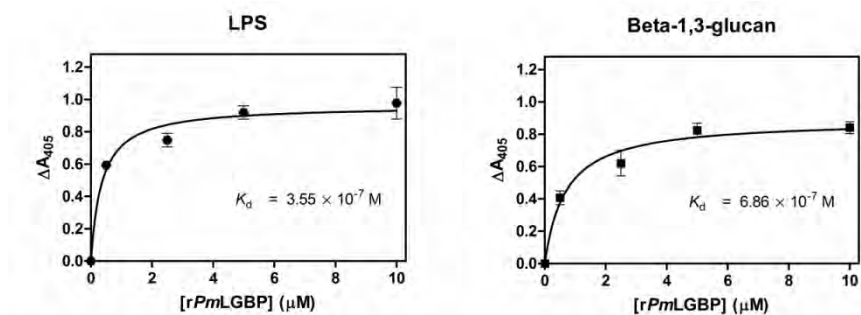
รูปที่ 3 PO activity ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* ด้วยเทคนิค RNAi เก็บเลือดกุ้งที่ 48 h หลังจากฉีด dsRNA (หรือน้ำเกลือ) ครั้งที่ 2 ค่าแอกทิวิตีของ PO ในเลือดกุ้งปกติใช้เป็นแอกทิวิตีพื้นฐานในกุ้งกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PAMP (LPS และ β -1,3-glucan)

4.1.5 การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน *PmLGBP*

เนื่องจากยีน *PmLGBP* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มของ pattern recognition protein (PRP) จึงน่าจะประกอบด้วยส่วนที่จับกับผนังเซลล์จุลชีพ คือ glucanase-like domain ซึ่งคาดว่าจะสามารถจับกับ β -glucan จากผนังเซลล์เชื้อรา ดังนั้นจึงได้ทำการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ r*PmLGBP* เพื่อมาศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพ ผลจากการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์พบว่า มีการแสดงออกอยู่ในส่วน inclusion bodies จึงทำให้ละลายโดยใช้ 8 M urea แยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ nickel-NTA และนำไป refold ใน 20mM Tris-HCl pH 8 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 40 kDa ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ 40.8 kDa ที่คำนวณได้จากกรดอะมิโน แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตและแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ให้บริสุทธิ์ได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพต่อไป

4.1.6 การศึกษาการจับกันของโปรตีน *PmLGBP* กับ PAMP ด้วยวิธี ELISA

ทำการวิเคราะห์สมบัติของ *PmLGBP* ในการเป็น PRP โดยศึกษาการจับกันของโปรตีน *PmLGBP* กับ PAMP จำนวน 3 ชนิดคือ LPS, β -1,3-glucan และ Lys-type PGN ด้วยวิธี ELISA (รูปที่ 4) พบว่าโปรตีน *PmLGBP* สามารถจับกับ LPS และ β -1,3-glucan (laminarin) ได้ แต่ *PmLGBP* ไม่สามารถจับกับ Lys-type PGN การจับของโปรตีน *PmLGBP* กับ LPS และ β -1,3-glucan เพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ LPS และ β -1,3-glucan ที่เพิ่มขึ้น (concentration dependent manner) โดยมีค่า dissociation constant (K_d) ของ *PmLGBP* กับ LPS และ β -1,3-glucan เท่ากับ $3.55 \pm 1.03 \times 10^{-7}$ M และ $6.86 \pm 1.86 \times 10^{-7}$ M ตามลำดับ (รูปที่ 4) สรุปได้ว่าโปรตีน *PmLGBP* เป็น PRP ที่สามารถจับกับ LPS และ β -1,3-glucan ได้



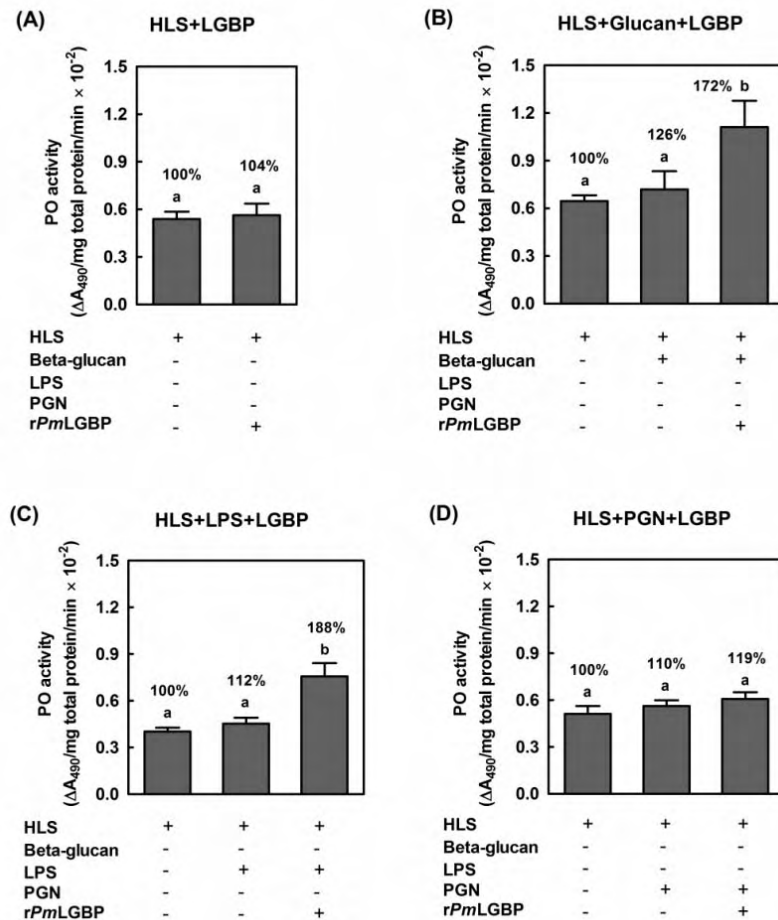
รูปที่ 4 การจับของ *rPmLGBP* กับ β -1,3-glucan และ LPS โดยใส่ปริมาณ *rPmLGBP* (0 ถึง 10 μM) กับ LPS หรือ β -1,3-glucan ที่ความเข้มข้นคงที่ และวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณได้ค่า dissociation constant (K_d) สำหรับ LPS ($K_d = 3.55 \pm 1.03 \times 10^{-7}$ M) และ β -1,3-glucan ($K_d = 6.86 \pm 1.86 \times 10^{-7}$ M)

4.1.7 การศึกษาการกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดกุ้งด้วยโปรตีน *PmLGBP* โดยใช้

ตัวกระตุ้น β -glucan หรือ LPS และตรวจสอบ PO activity

จากการทดลองข้างต้นพบว่าโปรตีน *PmLGBP* สามารถจับกับ β -1,3-glucan และ LPS จึงต้องการศึกษาความเกี่ยวข้องของ β -1,3-glucan และ LPS กับขึ้น *PmLGBP* ต่อการกระตุ้นระบบ proPO โดยนำ β -1,3-glucan หรือ LPS มาบ่มกับโปรตีนในเม็ดเลือด (HLS) ของกุ้งกุลาดำ และใส่โปรตีน *PmLGBP* แล้วตรวจสอบแอกทิวิตีของ PO พบว่าเมื่อนำโปรตีน *PmLGBP* และ HLS ของกุ้งบ่มกับ β -1,3-glucan หรือ LPS แล้ว สามารถกระตุ้นแอกทิวิตีของ PO เพิ่มขึ้น 72% (รูปที่ 5B) และ 88% (รูปที่ 5C) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้น (รูปที่ 5A)

ในทางตรงกันข้ามการบ่มเม็ดเลือดกับ β -1,3-glucan หรือ LPS โดยไม่ใส่โปรตีน *PmLGBP* พบว่าแอกทิวิตีของ PO เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อบ่มโปรตีน *PmLGBP* และโปรตีนในเม็ดเลือด (HLS) กับ PGN พบว่าไม่สามารถกระตุ้น PO activity ได้ (รูปที่ 5 D) ผลจากการทดลองสรุปได้ว่า *PmLGBP* สามารถจับกับ β -1,3-glucan และ LPS ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราและแบคทีเรียแกรมลบ แล้วส่งผลกระตุ้นการทำงานของระบบ proPO ในกุ้ง



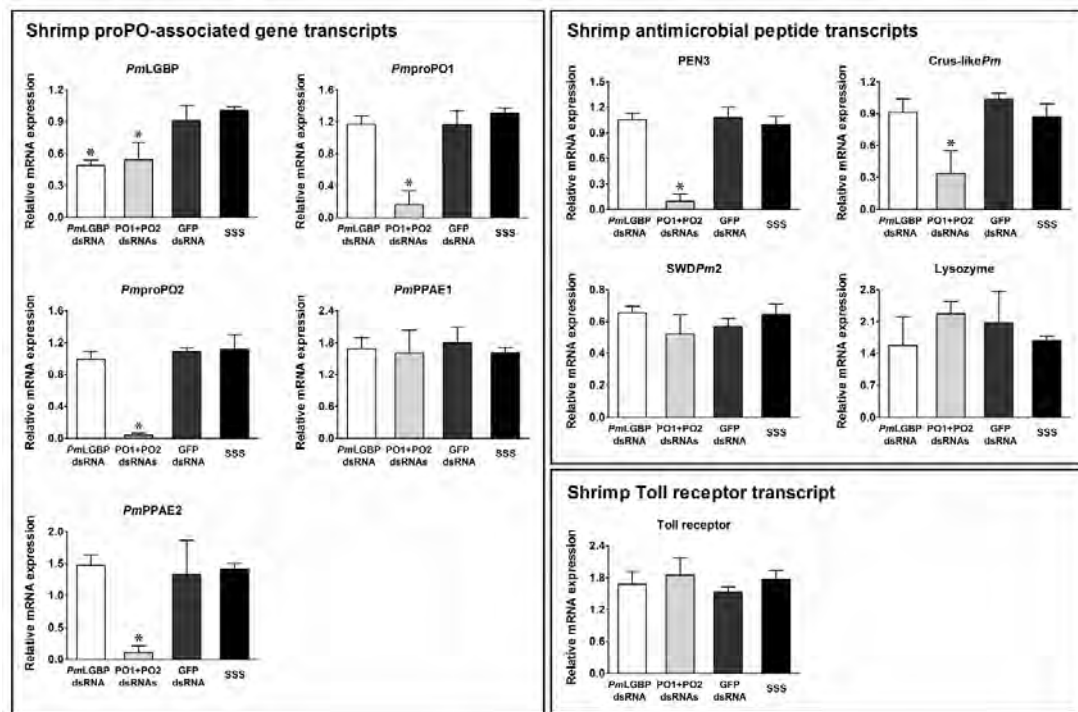
รูปที่ 5 การกระตุ้นแอกทิวิตีของ PO โดย β -1,3-glucan (laminarin) หรือ LPS เมื่อใส่โปรตีน *PmLGBP* (A) ไม่เติมตัวกระตุ้น (HLS + *PmLGBP*) (B) เติม β -1,3-glucan เป็นตัวกระตุ้น (HLS + β -glucan + *PmLGBP*) (C) เติม LPS เป็นตัวกระตุ้น (HLS + LPS + *PmLGBP*) (D) เติม PGN เป็นตัวกระตุ้น (HLS + PGN + *PmLGBP*) วัดค่าแอกทิวิตีของ PO ในรูป $\Delta A_{490}/\text{mg total protein/min}$ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4.1.8 การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* และ *proPO* ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง

เนื่องจากมีรายงานถึงความเกี่ยวข้องของระบบ *proPO* กับระบบภูมิคุ้มกันอื่น ๆ เช่นมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน antimicrobial peptide (AMP) งานวิจัยนี้จึงได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* และ *PmproPO* ซึ่งประกอบด้วยยีนในระบบ *proPO* คือ ยีน *PmLGBP*, *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1*, *PmPPAE2*; ยีน AMP คือ ยีน *PEN3*, *crus-likePm*, *SWDPm2*, *lysozyme*; และยีน Toll receptor

เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* พบว่า ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่ได้ทำการศึกษาทั้งหมด (รูปที่ 6) จากผลแสดงให้เห็นว่า *PmLGBP* ไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ AMP ในกุ้ง อย่างไรก็ตามเมื่อลดการแสดงออกของยีน *proPO* (*PmproPO1* และ *PmproPO2*) พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนในระบบ *proPO* (*PmLGBP* และ *PmPPAE2*) และยีนในกลุ่ม AMP (*PEN3* and *crus-likePm*) มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6) แสดงให้เห็น

ว่าขึ้น proPO ไม่เพียงแต่ควบคุมการแสดงออกของขึ้นใน proPO cascade แต่ยังควบคุมการแสดงออกของขึ้นในกลุ่ม AMP ของกุ้งด้วย



รูปที่ 6 ผลของการยับยั้งขึ้น *PmLGBP* และ *PmproPOs* ด้วยวิธี RNAi ต่อการแสดงออกของขึ้นในกลุ่ม antimicrobial peptide, proPO-associated gene และ Toll receptor ขึ้นในกลุ่ม antimicrobial peptide: *PEN3*, *Crus-likePm*, *SWDPm2*, *lysozyme*; ขึ้นที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO: *PmLGBP*, *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1*, *PmPPAE2*; และขึ้น Toll receptor ตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อขึ้นแต่ละขึ้น และใช้ขึ้น EF-1 α เป็นขึ้นควบคุม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4.2 การศึกษาหน้าที่ของขึ้น *PmPPAE2* ใน serine proteinase cascade ของกุ้ง

Serine proteinase (SP) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการกระตุ้นระบบ proPO โดยขึ้น SP ที่พบมี clip domain อยู่ที่ปลาย N และ serine proteinase อยู่ที่ปลาย C เรียก SP กลุ่มนี้ว่า clip domain serine proteinase ซึ่งสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มหลักคือ clip domain serine proteinase (Clip-SP) ซึ่งมีสมบัติ trypsin-like activity และ clip domain serine proteinase homologue (Clip-SPH) ซึ่งไม่มีสมบัติของเอนไซม์แต่ทำหน้าที่เป็น protein cofactor จากการค้นหาและวิเคราะห์ขึ้นในกุ้งได้พบขึ้น *PmPPAE2* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Clip-SP และมีความเหมือนและลักษณะสมบัติคล้ายกับขึ้น PPAE ที่มีรายงานถึงความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาหน้าที่ของขึ้น *PmPPAE2* ในกุ้ง

4.2.1 การโคลนและศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *PmPPAE2*

จากการใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ในส่วนโดเมนซีรีนโปรตีนของยีน PPAE ที่มีรายงานใน arthropod มาเพิ่มปริมาณ cDNA จากเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูด้า ได้ยีน *PmPPAE2* ซึ่งมีความคล้ายกับยีน PPAE (*MsPAP-1*) ในแมลง *Manduca sexta* มากที่สุด จึงได้ทำการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *PmPPAE2* เพิ่มเติม โดยได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *PmPPAE2* (accession number FJ620685) พบว่า mature protein ประกอบด้วยกรดอะมิโน 346 ตัว และ signal peptide จำนวน 25 ตัว โดย mature protein ประกอบด้วยโดเมนที่สำคัญ คือ clip domain ที่ปลาย N และ serine proteinase domain ที่ปลาย C (รูปที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนกันกับยีนที่มีรายงานใน GenBank พบว่า ยีน *PmPPAE2* มีความเหมือนกันกับยีน PPAE (*MsPAP-1*; AAX18636) ของ *M. sexta* ถึง 51% แสดงให้เห็นว่า ยีน *PmPPAE2* อาจมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกิ้งกูด้า จึงได้นำมาศึกษาความเกี่ยวข้องต่อระบบ proPO ด้วยเทคนิค RNAi ต่อไป

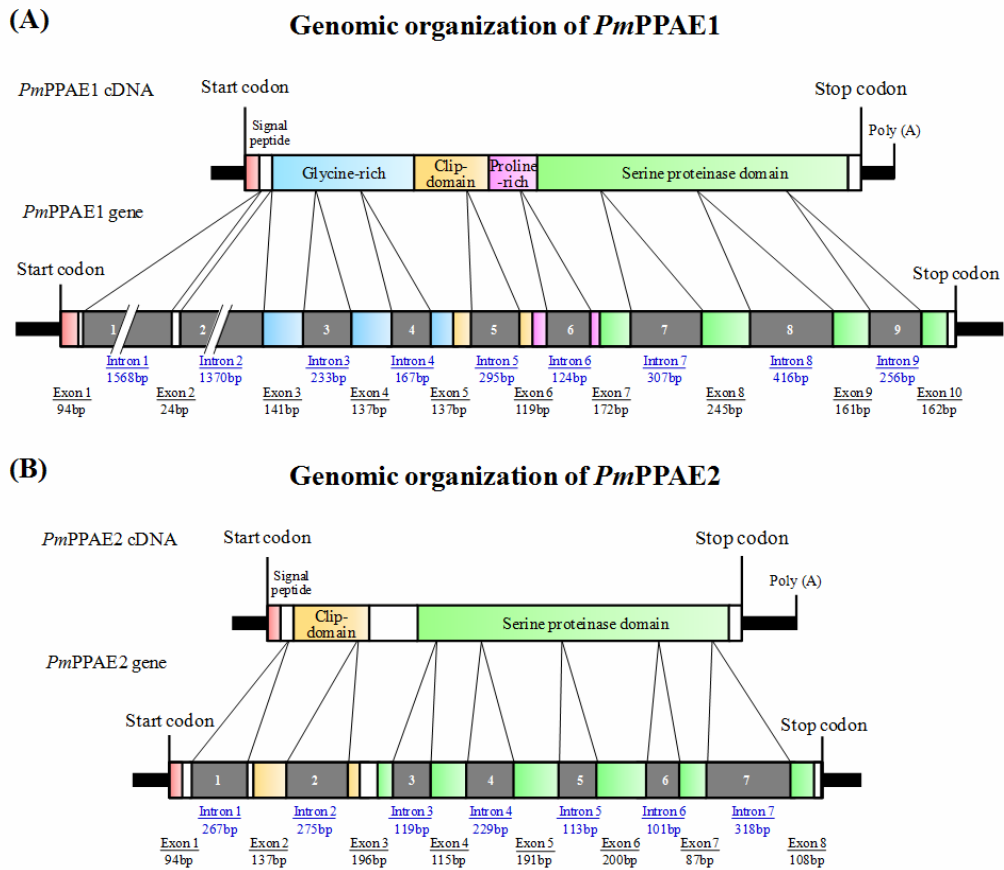
4.2.2 การศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ภายในจีโนมของกิ้งกูด้า

ได้ศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* โดยใช้เทคนิค PCR และ genome walking โดยออกแบบไพรเมอร์หลายคู่เพื่อเพิ่มจำนวนยีนโดยใช้ดีเอ็นเอจีโนมเป็นแม่แบบ นำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า สามารถหาบริเวณการจัดเรียงตัวของยีนทั้งสองยีน โดยการจัดเรียงตัวของยีน *PmPPAE1* ประกอบด้วย 10 exon และ 9 intron (รูปที่ 8A) ส่วนการจัดเรียงตัวของยีน *PmPPAE2* ประกอบด้วย 8 exon และ 7 intron (รูปที่ 8B) และพบว่ายีนทั้งสองมี boundary sequence ของ exon-intron เป็นไปตาม GT/AG rule

เมื่อวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีน *PmPPAE1* พบ intron 2 ตำแหน่งแทรกอยู่ระหว่าง signal peptide กับ Glycine rich region ในขณะที่ภายใน Glycine rich และ Proline-rich region มี intron แทรกอยู่ 2 และ 1 ตำแหน่งตามลำดับ และยังพบว่าภายในบริเวณ clip domain ของยีน *PmPPAE1* มี intron แทรกอยู่ 1 ตำแหน่งเหมือนกันกับยีน *PmPPAE2* ในขณะที่บริเวณ SP domain ของยีน *PmPPAE1* มี intron แทรกอยู่ 3 ตำแหน่ง ส่วนยีน *PmPPAE2* พบว่ามี intron แทรกอยู่ 5 ตำแหน่งในบริเวณ SP domain และ 1 ตำแหน่งแทรกอยู่ระหว่าง signal peptide กับ clip domain นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งสองยีนมีบริเวณของ microsatellite region อยู่ใน intron ในบริเวณ serine proteinase domain โดยยีน *PmPPAE1* พบ TG₍₅₆₎ และ CT₍₃₄₎ และยีน *PmPPAE2* พบ CA₍₄₀₎ แสดงให้เห็นว่ายีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* มีการจัดเรียงตัวของยีนคล้ายกัน แต่ก็พบว่ายังมีบางบริเวณของ intron ที่มี microsatellite ที่แตกต่างกัน

<i>PmPPAE2</i>	MHYRVPTISCAAATLLVLVTSGGAT-----
<i>MsPAP1</i>	MRNHIVFIVFAVYWTCVFSQ-----
<i>HdPPAFI</i>	MKQVHFF-ILWFFVLNLYSIKAQAG-----
<i>DmMP1</i>	MEPHFFFTVLWMLLMGTSSTYAQ-----
<i>PmPPAE1</i>	MKGVTTVVLWVCVVAWAAAVGD---EQLSRKKREPQQPNFNGPNSFRPSNNRPG---FTPAGQSDCTGN
<i>P1PPAE</i>	MKVVVVELLSLVTWAAVGVGVGVNVTQEEAHSRVKQFGFNRGRGGNPHRNNAPGHGHGGGFIPPGHQGG
<i>PmPPAE2</i>	-----RDRRQ
<i>MsPAP1</i>	-----
<i>HdPPAFI</i>	-----
<i>DmMP1</i>	-----EIF
<i>PmPPAE1</i>	RRNSRRCQNRPSGGQALGQGGGVSSAFQQIPWLSQLSRDQQLNLLIPNLPKTPSGGAQNRFFLLGTGKPDVPF
<i>P1PPAE</i>	NLHNIGRPGAGRPSAQTLLGQGHNLNNQLSWFNDVVSQTNNEITLKGLPRLPLRQAQNTFFQLGVGQPDVPF
Clip domain	
<i>PmPPAE2</i>	ARC---SAGAPVVLVDSPPVKALFLSPNAG--DKHRAQQLICGREGRRLLKVCSSNVT-----PTPR
<i>MsPAP1</i>	-SCTTPQGADSNCLSYECQQLSAFEQRPLSPVVNYLRKSQCQFDTYTPRVCCGGLPQQ-----ASRPQ
<i>HdPPAFI</i>	--CRTPNGENARCVPINNCKILYDSVLTSQP--EVIRFLRASQCGY-NGQPLVCCGSSAS-----YQPF
<i>DmMP1</i>	GYCRTPDENSGTCINLRECGYLFELLQSEEVTEQDRRLQASQCQYRNGQVLTCCANSRMNRNQPPQWGNHPQ
<i>PmPPAE1</i>	QQCVTPRFRERGHCRYLQHCIQPEFTN-----NFNVFLRYVCFIEGVYVGVCCPDFTFNNN-----NATPP
<i>P1PPAE</i>	QQCRTPKGERGQCRFLQYCILPEFAQ-----NFQAFLQYVCFIQGTYYGACCTTVNNV-----GVTAP
<i>PmPPAE2</i>	PIDVTPTSNPGGN-----GNGQLLPSNCGQTSNLN--KTFGGEATGVGEFPWMAVLGYN--SGSLD
<i>MsPAP1</i>	PTPAPVPTRAPPVNPGVDPTYDEDSAPARNQCGVDMNGD--RTYGGQITDLDFPWMALLGYLRTGTSTT
<i>HdPPAFI</i>	PTSASIRNRPP-----ELLPN--DCGYQVEAD--KILLNGDDTVFEEFPWTAMIGYKNSSNFEQ
<i>DmMP1</i>	PTQTTKPTKRSQT-----KLLPMAP-NGC-ENFGD--RVVGGNETTKREFPWMALIEYTKPGNVKG
<i>PmPPAE1</i>	PPPTTPKPTTPRP-----VTPPSQSRGCGLIARPPTRIVGGKDADPQEWPMMAALMRDGA-----S
<i>P1PPAE</i>	PPPPPTAPTPRP-----TTPKSEANGCGLVAKRPPTRIVGGKPADPREWPWVAALLRQGS----T
Serine proteinase domain	
<i>PmPPAE2</i>	WECGGALINDRYVLTAAHCGDPDFLFGS-ILTAIRLGEYDFSKSKDCNS---AADFC-LPFPVQDFTPEQVVL
<i>MsPAP1</i>	YQCGGLINQRYVLTAAHCTIGAVEREVGKLTIVRLGEYDTQNSVDCVD---DVC-ADFPQNIPIEAAYP
<i>HdPPAFI</i>	FACGGSLINNRYIVTAAHCVAGRVLRVVGALNKVRLGEWNTATDPDCYG--AVRVVVPDKPIDLGIEETIQ
<i>DmMP1</i>	HHCGGSLINHRYVLTAAHCVS--AIPSDWELTGVRLEWDASTNPDCYGVGKNGRRDC-NEFYVDYYPVEERIP
<i>PmPPAE1</i>	SYCGGLVLTDSHILTAAHCVDS---FDRNTITVRLGEYTLTLD-----LTDDTGHVDFKVADIRM
<i>P1PPAE</i>	QYCGGLVLTNQHVLTAAHCVRG---FDQTTITIRLGEYDFK-----QTS-TGAQTFGVLKIKE
<i>PmPPAE2</i>	HPSPFNKRAPES-DDIALIRLNRRVQLNAGVHPICLPAAGLNVGSFLNGRDAIVIGWGHTERG-TNTQVLQKV
<i>MsPAP1</i>	HSGYSDNNKNRKDDIALVRLTRRAQYTYVVKPICLA--HNNERLATGNDVFAVGWGTLSG-KSSPTIKLKL
<i>HdPPAFI</i>	HPDYVDGSKDRYHDIALIRLNRRVQLNAGVHPICLPAAGLNVGSFLNGRDAIVIGWGHTERG-TNTQVLQKV
<i>DmMP1</i>	HPQYPGNSRDQLNDIALLRRLDEYQYSDFILPVCLPTLASQHNHIFLGRKVVVAGWGTETN-FTSNIKLKA
<i>PmPPAE1</i>	HRSY--DTTTYVNDIAITIKLGSTNFNVDIWPVCLP---EGDESIEGRGTGTGTGWTIYYGGPVSSLTQEV
<i>P1PPAE</i>	HEAY--DTTTYVNDIALITLDKSTEFNADIWPICLP---DGDITYVDNRQGTVVGWGTIYYGGPVSSVLMEV
<i>PmPPAE2</i>	SLPFDLGTCKR--IHAGETLVNEQVCFGGRAQ-QDSCNGDSGGPLFNA-----VPGTILGIVSKGGA-CG
<i>MsPAP1</i>	GMPIFDKSDCASKYRNLAGELTDKQICAGGVFA-KDTCRGDSGGPLMQRR---PEGIWEVVGIVSFGNR-CG
<i>HdPPAFI</i>	AVPVVHAEQCAKTFGAAGVRVRSSQLCAGGEKA-KDSCGGDSGGPLLAER--ANQOFFLEGLVSFGAT-CG
<i>DmMP1</i>	ELDTVPTSECNQRYATQRRVTTKQMCAGGVEG-VDSRCRGDSGGPLLEDYSNGNSNYIAGVVSYPGPTCG
<i>PmPPAE1</i>	TVPIWTNKAQDD--AYEQNIIDKQLCAGATDGGKDSQGDSSGGPLLLQ--GSENRWAVVGVVSWGIR-CA
<i>P1PPAE</i>	SIPITWNACDA--AYEQDIIDKQLCAGDKAGGKDSQGDSSGGPLMLQ--GGANRWAVVGVVSWGIR-CA
<i>PmPPAE2</i>	SPGVPAIYTDVASYRGWIVQNLKP--- 371
<i>MsPAP1</i>	LDGWPGVYSSVAGYSDWILSTLRSTNV 383
<i>HdPPAFI</i>	TEGWPGIYTKVGKYRDWIEGNIRP--- 365
<i>DmMP1</i>	LKGWPGVYTRVEAYLNWIENNVR--- 390
<i>PmPPAE1</i>	EPGNPGVYTRVSKYVDWIKNNAV--- 463
<i>P1PPAE</i>	EAASPGVYTRISKYTDWIRANQ----- 468

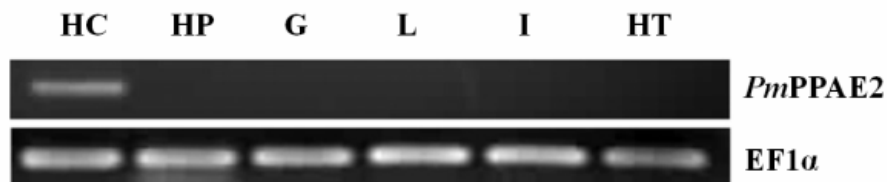
รูปที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *PmPPAE2* กับยีน PPAAE ใน arthropod อื่น ๆ ได้แก่ ยีน PAP-1 (*MsPAP1*: AF059728) จาก *M. sexta*, ยีน PPAF-I (*HdPPAFI*: AB013088) จาก *Holotrichia diomphalia*, ยีน MP1 (*DmMP1*: NM_141193) จากแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster*, ยีน PPAAE (*P1PPAE*: AJ007668) จาก crayfish *Pacifastacus leniusculus* และยีน *PmPPAE1* (*PmPPAE1*: FJ595215) จากกิ้งกูดาคำ ตัวอักษรสีเข้มที่ขีดเส้นใต้ คือ ส่วนของ signal peptide แถบสีเทา คือ บริเวณที่มีการอนุรักษ์ของกรดอะมิโน แถบสีชมพู คือ บริเวณที่มีการอนุรักษ์ของ cysteine เส้นโยงสีดำแสดงพันธะ disulfide ในขณะที่เส้นประสีฟ้าแสดงพันธะ disulfide ที่พบเฉพาะในยีน PPAAE ของแมลงและยีน *PmPPAE2* สัญลักษณ์รูปดาว คือ บริเวณ catalytic triad



รูปที่ 8 การจัดเรียงตัวของยีน (A) *PmPPAE1* และ (B) *PmPPAE2* ภายในจีโนมของกุ้งกุลาดำ บริเวณ intron แสดงด้วยตัวเลขในกล่องสี่เหลี่ยมพร้อมกับมีตัวอักษรระบุขนาดและตำแหน่งอยู่ด้านล่าง โดยแต่ละ intron จะขนาดข้างด้วยส่วน exon ซึ่งมีตัวอักษรระบุขนาดและตำแหน่งอยู่ด้านล่างเช่นกัน

4.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ในกุ้งกุลาดำ

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำปกติด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่ายีน *PmPPAE2* มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ และไม่พบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 9

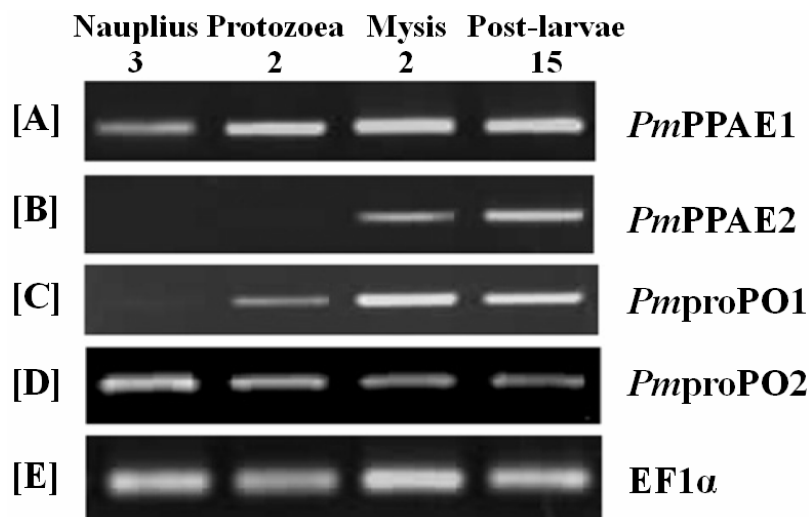


รูปที่ 9 การแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ เช่น Hemocyte (HC), Hepatopancreas (HP), Gill (G), Lymphoid organ (L), Intestine (I) และ Heart (HT) ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน *EF1α* เป็น internal control

4.2.4 การแสดงออกของยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ภายในตัวอ่อนระยะ

ต่างๆ ของกุ้งกุลาดำ

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ภายในตัวอ่อนระยะต่างๆ ของกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า mRNA transcript ของยีน *PmPPAE1* และ *PmproPO2* มีรูปแบบการแสดงออกคล้ายคลึงกัน กล่าวคือมีการแสดงออกในกุ้งตัวอ่อนทุกระยะ (นอเพลีส (N3), โพรโทซูเอีย (Z2), ไมซิส (M2) และโพสลาวา (PL15) (รูปที่ 10A และ D) อย่างไรก็ตาม ยีน *PmPPAE1* มีระดับการแสดงออกต่ำกว่ายีน *PmproPO2* ในตัวอ่อนระยะแรก (N3) และระดับการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* จะเพิ่มสูงขึ้นเพื่อกุ้งมีการเจริญมากขึ้น (รูปที่ 10A) ในขณะที่ยีน *PmproPO2* มีระดับการแสดงออกคงที่ในทุกระยะของการเจริญของลูกกุ้ง (รูปที่ 10D) นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ในตัวอ่อนของกุ้งมีความคล้ายคลึงกับยีน *PmproPO1* ซึ่งแตกต่างจากรูปแบบการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* และ *PmproPO2* กล่าวคือ *PmPPAE2* และ *PmproPO1* จะไม่แสดงออกในกุ้งระยะ N3 (รูปที่ 10B และ C) และไม่พบการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ในระยะ Z2 (รูปที่ 10B) อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อลูกกุ้งมีการเจริญเข้าสู่ระยะ M2 และ PL15 ตามลำดับ (รูปที่ 10B) ในขณะที่ยีน *PmproPO1* มีการแสดงออกในระดับต่ำที่ระยะ Z2 และมีการแสดงออกมากในระยะ M2 และ PL15 (รูปที่ 10C)

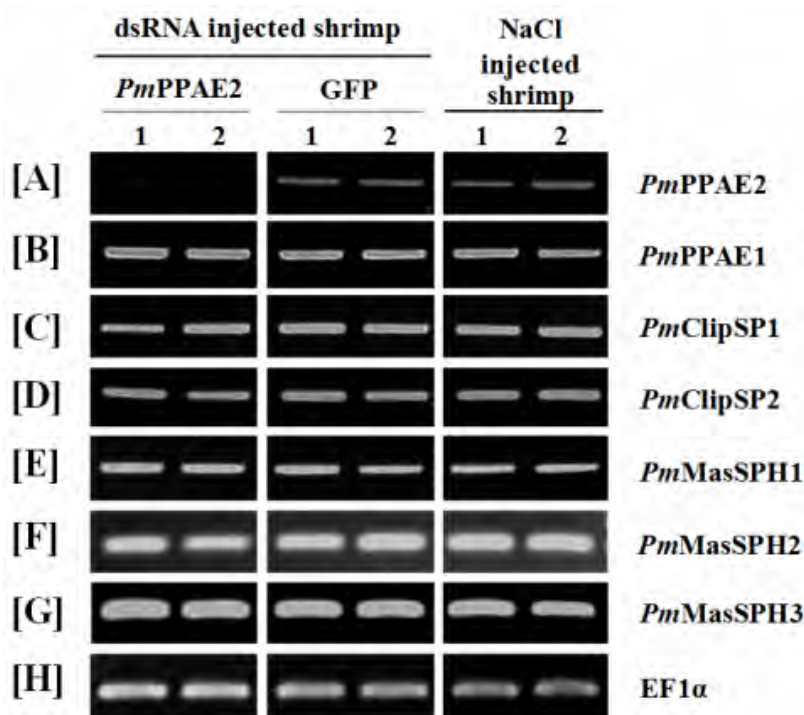


รูปที่ 10 การแสดงออกของยีน (A) *PmPPAE1*, (B) *PmPPAE2*, (C) *PmproPO1* และ (D) *PmproPO2* ในตัวอ่อนระยะต่างๆ ของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ นอเพลีส 3 (N3), โพรโทซูเอีย 2 (Z2), ไมซิส 2 (M2) และ โพสลาวา 15 (PL15) ตรวจสอบโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ (E) ยีน *EF-1α* เป็น internal control

4.2.5 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ด้วยเทคนิค RNA interference

จากการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *PmPPAE2* ก่อนหน้านี้พบว่ายีน *PmPPAE2* มีความเหมือนกับยีน PAP-1 (AF059728) ซึ่งเป็นยีน PPAE ของแมลง *M. sexta* (50% similarity) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO แมลง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษา ยีน *PmPPAE2* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) เพิ่มเติม

จากการทดลองฉีด dsRNA ของยีน *PmPPAE2* หรือ GFP (กลุ่มควบคุม) เข้าสู่ตัวกุ้งด้วยปริมาณ dsRNA 2 μ g ต่อ น้ำหนักกุ้ง 1 g หลังจาก 24 h ทำการฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับกระตุ้นด้วย LPS และ laminarin (β -glucan) เพื่อให้โปรตีนในระบบ proPO ถูกกระตุ้น ทำการเลี้ยงกุ้งต่ออีก 48 h จากนั้นเก็บเลือดมาสกัด RNA และสร้าง cDNA แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจการยับยั้งการแสดงออกของยีนซึ่งผลจากการตรวจสอบเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะพบว่า dsRNA ของยีน *PmPPAE2* สามารถลดการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* (รูปที่ 11A) ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (รูปที่ 11A) หรือ NaCl (รูปที่ 11A) นอกจากนั้นยังพบว่า dsRNA ของยีน *PmPPAE2* สามารถยับยั้งการแสดงออกได้นานอย่างน้อย 5 วันหลังจากการ knockdown



รูปที่ 11 การแสดงออกของยีน *PmPPAE2* (A) ในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกฉีดด้วย *PmPPAE2* dsRNA, GFP dsRNA (กลุ่มควบคุม) หรือ NaCl solution(กลุ่มควบคุม)โดยฉีดกุ้งขนาดประมาณ 2 g ด้วย dsRNA ในอัตราส่วน 2 μ g ต่อกุ้ง 1 g หลังจาก 24 h ฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับกระตุ้นด้วย LPS (20 μ g) และ laminarin (20 μ g)จากนั้น 48 h เก็บเลือดมาตรวจสอบด้วย RT-PCR โดยทำการทดลอง 2 ตัวอย่างต่อแต่ละกลุ่ม (B, C, D, E, F, G) แสดงระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม clip domain serine proteinase ที่พบในกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ยีน (B) *PmPPAE1*, (C) *PmClipSP1*, (D) *PmClipSP2*, (E) *PmMasSPH1*, (F) *PmMasSPH2* และ (G) *PmMasSPH3* โดย(H) แสดงระดับการแสดงออกของยีน EF-1 α (internal control)

4.2.6 การตรวจสอบความจำเพาะของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2*

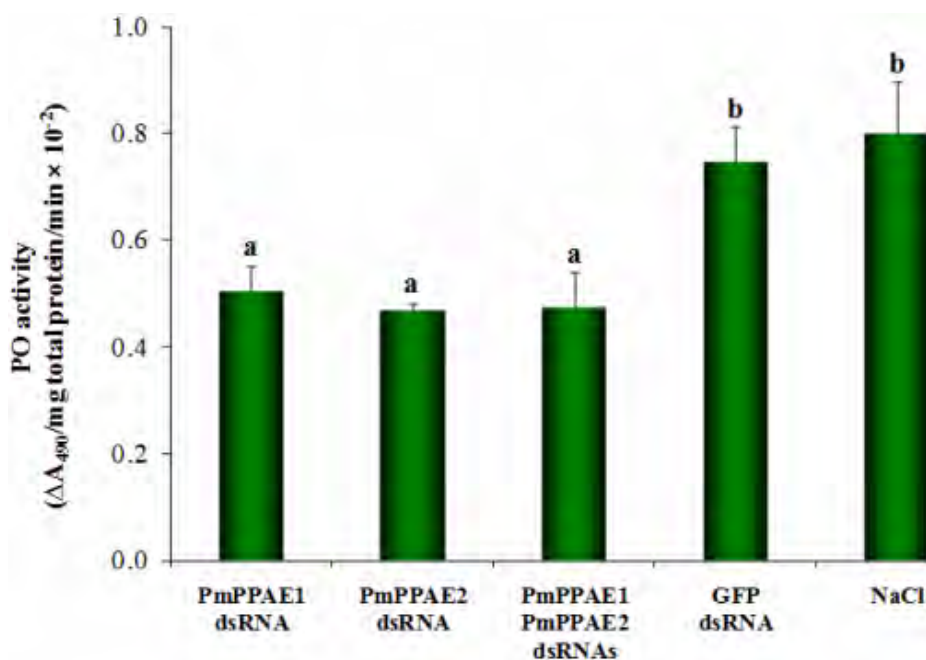
เมื่อทำการตรวจสอบผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ต่อการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกัน หรือยีนที่มีโครงสร้างคล้ายกัน พบว่า dsRNA ของยีน *PmPPAE2* ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม clip domain serine proteinase ที่พบในกุ้งกุลาดำทั้ง 6 ชนิดคือ ยีน *PmPPAE1* (FJ595215), *PmClipSP1*(FJ620688), *PmClipSP2* (FJ620687), *PmMasSPH1* (DQ455050), *PmMasSPH2* (FJ620686) และ *PmMasSPH3* (FJ620689) แสดงให้เห็นว่า dsRNA ที่

สังเคราะห์ขึ้นสามารถยับยั้งการแสดงออกของทั้งสามชิ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะ (รูปที่ 11B-G) ซึ่งสามารถนำมาศึกษาหน้าที่ของยีนในขั้นตอนต่อไปได้

4.2.7 การตรวจสอบ PO activity ในเลือดกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2*

จากการที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ได้อย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพ จึงได้ตรวจสอบ PO activity ของกุ้งที่ถูก knockdown ยีนทั้งสองชนิดเพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องของยีนเหล่านี้กับระบบ proPO ของกุ้ง ซึ่งพบว่า กุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* มีค่า PO activity ลดต่ำลง 37% และ 41% ตามลำดับ (รูปที่ 12) ในขณะที่ PO activity ของกลุ่มที่ฉีดด้วย GFP dsRNA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย NaCl ($P < 0.05$) สรุปได้ว่ายีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* มีความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกุ้งกุลาดำ

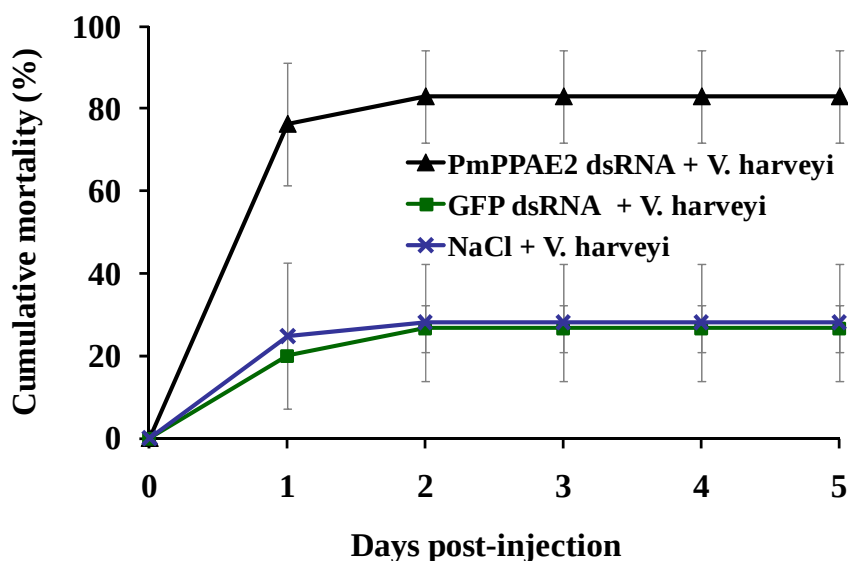
เมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* พร้อมกัน (co-silencing) พบว่า สามารถลด PO activity ได้ 41% อย่างไรก็ตาม พบว่า ผลต่อ PO activity จากการยับยั้งการแสดงออกของยีนเดี่ยวหรือพร้อมกันทั้งคู่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งที่ฉีดด้วย NaCl (รูปที่ 12) แต่ก็สามารถสรุปได้ว่า *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* มีหน้าที่ในระบบ proPO ของกุ้งกุลาดำ



รูปที่ 12 PO activity ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE1*, *PmPPAE2* หรือพร้อมกัน (co-silencing) ด้วยเทคนิค RNAi โดยฉีดกุ้งขนาดประมาณ 2 g ด้วย dsRNA ในอัตราส่วน dsRNA 2 μg ต่อกุ้ง 1 g จากนั้น 24 h ทำการฉีด dsRNA ซ้ำด้วยปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับกระตุ้นด้วย LPS (20 μg) และ laminarin (20 μg) หลังจากนั้น 48 h เก็บเลือดมาตรวจสอบ PO activity ในการทดลองได้แบ่งกุ้งออกเป็น 5กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวอย่าง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง กลุ่มที่ 1 ฉีดด้วย *PmPPAE1* dsRNA, กลุ่มที่ 2 ฉีดด้วย *PmPPAE2* dsRNA, กลุ่มที่ 3 ฉีดด้วย *PmPPAE1* dsRNA พร้อมกับ *PmPPAE2* dsRNA, กลุ่มที่ 4 ฉีดด้วย GFPdsRNA และกลุ่มที่ 5 ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)

4.2.8 อัตราการตายของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2*

เพื่อทดสอบความสำคัญของยีน *PmPPAE2* ต่อความอยู่รอดของกุ้งหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* 639 ได้ฉีดกุ้งด้วยอัตราส่วน 2 μg dsRNA ต่อกุ้งหนัก 1 g โดยได้แบ่งกุ้งออกเป็นกลุ่ม ๆ ละประมาณ 10 ตัวอย่าง และในแต่ละกลุ่มทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ผลจากการทดลองพบว่า กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE2* dsRNA มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นเป็น 82.96% ภายใน 2 วันหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อ (รูปที่ 13) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย GFP dsRNA และ NaCl ซึ่งมีอัตราการตาย 26.67% และ 28.15% ตามลำดับ (รูปที่ 13) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ยีน *PmPPAE2* มีความเกี่ยวข้องกับการต่อต้านเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ

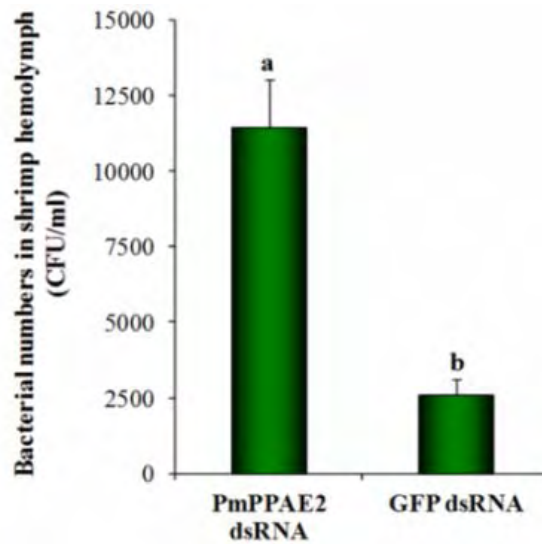


รูปที่ 13 อัตราการตายของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* และกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* 639 (2×10^5 CFU) ฉีดกุ้งขนาดประมาณ 10 g (อัตราส่วน 2 μg dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) โดยแบ่งกุ้งเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัวอย่าง และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กลุ่ม 1 (▲) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE2* dsRNA กลุ่ม 2 (■) กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) กลุ่ม 3 (×) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)

4.2.9 การตรวจสอบเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2*

เมื่อตรวจสอบเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* แล้วฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* และเก็บเลือดมานับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* โดย plate count method พบว่ากุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* มีจำนวนเชื้อมากขึ้นประมาณ 4 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มกุ้งควบคุมที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (รูปที่ 14) แสดงให้เห็นว่า กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* มีจำนวนเชื้อ *V. harveyi* มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองทั้งหมด สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ยีน *PmPPAE2* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO และเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็น pathogenic bacteria ในกุ้งกุลาดำ



รูปที่ 14 จำนวนของเชื้อ *V. harveyi* 639(CFU/ml) ในเลือดของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* (*PmPPAE2* dsRNA) ฉีดกุ้งขนาดประมาณ 3 g (อัตราส่วน 2 μ g dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) หลังจาก 24 h ฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิม พร้อมกับฉีดกระตุ้นด้วย *V. harveyi* 639 (2×10^5 CFU) จากนั้น 6 h เก็บเลือดมานับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* โดย plate count method โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กุ้งกลุ่มควบคุมฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA)

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

กลไกการสร้างเมลา닌โดยการกระตุ้นการทำงานของระบบโพรพีนอลออกซิเดส เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญต่อการทำลายเชื้อโรค งานวิจัยนี้ได้ศึกษาระบบโพรพีนอลออกซิเดสโดยเน้นการศึกษากลไกการกระตุ้นซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการหาแนวทางการเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กุ้งด้านโรค

5.1 หน้าที่ของ LGBP ในการเป็น PRP ในกุ้ง

PRP เป็นโมเลกุลสำคัญที่ทำหน้าที่ในการจดจำและกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อดำเนินการเชื้อจุลชีพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการกระตุ้นระบบ proPO ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด อย่างไรก็ตามในกุ้ง ยังไม่มีรายงานการพบ PRPs ที่ทำหน้าที่กระตุ้นระบบ proPO งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาสมบัติในการจับกันของ *PmLGBP* กับเชื้อจุลชีพ และพบว่า *PmLGBP* สามารถจับได้ทั้ง LPS และ β -1,3-glucan แต่ไม่จับกับ Lysine-type PGN แสดงให้เห็นว่าโปรตีน *PmLGBP* อาจทำหน้าที่เป็น PRP สำหรับ LPS และ β -1,3-glucan และเมื่อทำการวิเคราะห์ค่า K_d ของ *PmLGBP* กับ LPS ($K_d = 3.55 \pm 1.03 \times 10^{-7}$ M) พบว่ามีค่าต่ำกว่า β -1,3-glucan ประมาณ 2 เท่า ($K_d = 6.86 \pm 1.86 \times 10^{-7}$ M) นั่นคือ *rPmLGBP* สามารถจับกับ LPS ได้ดีกว่า β -1,3-glucan มากถึง 2 เท่า ซึ่งค่าที่ได้นี้สอดคล้องกับค่า K_d ของ PRP ที่มีรายงานความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบ proPO ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ได้แก่ ค่า K_d ของ β -1,3-glucan-recognition protein (GRP) ($K_d = 1.5 \times 10^{-6}$ M สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* และ 1.2×10^{-6} M สำหรับ *E. coli*) (Ma and Kanost, 2000) และ microbe-binding protein (MBP) ($K_d = 3.77 \pm 0.90 \times 10^{-8}$ M สำหรับ LPS) (Wang et al., 2011) ในแมลง *M. sexta*

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าสมบัติในการจับกันของ LGBP ในกุ้งมีความสอดคล้องกับ LGBPs ที่มีรายงานในครัสเตเชียนอื่น ๆ เช่น โปรตีน LGBP ในกุ้ง crayfish *P. leniusculus* ที่สามารถจับได้ทั้ง LPS และ β -1,3-glucans (laminarin และ curdlan) แต่ไม่จับกับ PGN (Lee et al., 2000) โปรตีน LGBP ในกุ้ง *F. chinensis* ซึ่งแสดงสมบัติในการจับกับแบคทีเรียแกรมลบ (*Klebsiella pneumoniae*) ได้ดีกว่า *E. coli* หรือแบคทีเรียแกรมบวก (*Micrococcus luteus* และ *Bacillus megaterium*) และยีสต์ (*Pichia pastoris*) (Du et al., 2007) และ LGBP ในหอยแครง *Chlamys farreri* ที่สามารถจับได้ดีกับ LPS และ β -1,3-glucan และจับได้ปานกลางกับ PGN (Yang et al., 2010) ซึ่งข้อมูลทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า LGBP ทำหน้าที่เป็น PRP ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และการจับกันของโปรตีนเหล่านี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับการจดจำเชื้อจุลชีพซึ่งจะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ รวมถึงระบบ proPO

เมื่อศึกษาความสามารถในการกระตุ้นระบบ proPO ของโปรตีน *PmLGBP* พบว่าการจับกันของโปรตีนกับ LPS หรือ β -1,3-glucan สามารถกระตุ้นระบบ proPO ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานในกุ้ง crayfish *P. leniusculus* ที่พบว่าโปรตีน *PLGBP* สามารถจับได้ทั้ง LPS และ β -1,3-glucan และกระตุ้นระบบ proPO (Lee et al., 2000) จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *PmLGBP* ของกุ้งกุลาดำและ *PLGBP* ของกุ้ง crayfish พบว่ามีโดเมนที่มีความอนุรักษ์ที่เชื่อว่าตอบสนองต่อการจับกับ LPS และ β -1,3-glucans ลำดับกรดอะมิโนส่วนนี้ประกอบด้วย polysaccharide binding motif, glucanase motif และ beta-glucan recognition motif (Lin et al., 2008) นอกจากนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* ส่งผลให้เกิดการลด PO activity อย่างมีนัยสำคัญ จากข้อมูลทั้งหมด สนับสนุนว่า *PmLGBP* ทำหน้าที่เป็น PRP ที่จดจำกับ LPS และ β -1,3-glucan และกระตุ้นระบบ proPO

ในแมลงหวี่ Gram-negative binding protein 1 (GNBP1) เป็น PRP ที่สำคัญต่อการกระตุ้น Toll ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อยับยั้งยีน GNBP1 พบว่ามีผลทำให้การแสดงออกของยีนเพปไทด์ต้านจุลชีพ *Drosomycin* มีการแสดงออกลดลง (Pili-Floury et al., 2004) การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmLGBP* พบว่าไม่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีน antimicrobial peptide (AMP) ยีนในระบบ proPO system และยีน Toll receptor แสดงให้เห็นว่าการควบคุมการแสดงออกของยีนในกลุ่ม AMP ไม่มีความเกี่ยวข้องกันกับยีน *PmLGBP* อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อลดการ

แสดงออกของยีน proPO พบว่ายีน AMP (penaeidin และ crustin-like peptide) และยีนในระบบ proPO (*PmLGBP* และ *PmPPAE2*) มีการแสดงออกลดลง ซึ่งคล้ายกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งพบว่าเมื่อยับยั้งยีน proPO ในกุ้ง *M. japonicus* ส่งผลให้การแสดงออกของยีนในกลุ่ม AMP (penaeidin, crustin and lysozyme) ลดลง (Fagutao et al., 2009) แสดงให้เห็นว่ายีน proPO มีความสำคัญทั้งในการควบคุมระบบ proPO และการสังเคราะห์ AMP ในกุ้ง

สรุปได้ว่า จากผลการทดลองทั้งแบบในตัวกุ้ง (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งให้เห็นว่า *PmLGBP* เป็น PRP ที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO ของกุ้ง และมีสมบัติในการจับกับ LPS และ β -1,3-glucan และสามารถกระตุ้นระบบ proPO ได้

5.2 หน้าที่ของ *PmPPAE2* ในการกระตุ้นระบบ proPO และความสำคัญต่อการทำลายเชื้อก่อโรควัย

Clip-domain serine proteinase มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบ proPO (Jiang and Kanost, 2000; Barillas-Mury, 2007; Jang et al., 2008) อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะสมบัติและหน้าที่ในระดับโมเลกุลของยีนในกลุ่ม clip-domain serine proteinase ต่อการกระตุ้นการทำงานของระบบ proPO และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งยังคงมีการศึกษาค้นคว้าน้อย

งานวิจัยนี้ได้ค้นพบยีน clip-SP เพิ่มขึ้นอีก 1 ชนิด คือ ยีน *PmPPAE2* โดยยีนมีความคล้ายกับยีนในกลุ่ม Clip-SP ที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO ที่พบในแมลง จากการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *PmPPAE2* พบว่าประกอบด้วย clip domain ที่ปลาย N และ serine proteinase domain ที่ปลาย C ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *PmPPAE2* อาจมีความสำคัญในระบบโปรตีนออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกยีน *PmPPAE2* มาศึกษาถึงความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO เพิ่มเติมโดยใช้เทคนิค RNAi

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ในเนื้อเยื่อต่างๆ พบว่ายีนมีการแสดงออกสูงในเม็ดเลือด ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษาพบว่ายีนในกลุ่ม clip-SP และ clip-SPH ของกุ้งกุลาดำมีการแสดงออกมากในเม็ดเลือดเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ (อวัยวะเหงือก เหงือก และลำไส้เล็ก) (Lin et al., 2006; Sriphajit et al., 2007)

เป็นที่ทราบกันว่า ยีนในกลุ่ม clip-SP ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Jiang and Kanost 2000; Jang et al., 2008) และบางยีนมีบทบาทสำคัญใน SP cascade ของระบบ proPO ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระบบด้วยเทคนิค RNA interference จะทำให้เกิดการลดลงของ PO activity หรือเป็นการลดความสามารถในกระบวนการการสังเคราะห์เมลานิน และเมื่อศึกษาหน้าที่ของยีน *PmPPAE2* โดยใช้เทคนิค RNAi พบว่า กุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmPPAE2* มี PO activity ลดลง 41% ขณะที่กุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmPPAE1* มี PO activity ลดลง 37% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกุ้งกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (GFP dsRNA และ NaCl) จึงสรุปได้ว่ายีน *PmPPAE2* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO เช่นเดียวกับยีน *PmPPAE1* และเมื่อทำ co-silencing ด้วย *PmPPAE1* dsRNA และ *PmPPAE2* dsRNA พร้อมกันพบว่า สามารถลด PO activity ได้ประมาณ 41% ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ การ silencing ยีนเดี่ยว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้ง *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* อาจจะเป็นยีนที่อยู่ใน cascade เดียวกันในระบบ proPO ของกุ้งกุลาดำ สมมติฐานได้ว่า ยีนทั้งสองอาจจะทำหน้าที่แบ่งได้เป็น 2 แบบ กล่าวคือ แบบ (1) *PmPPAE2* (หรือ *PmPPAE1*) อาจจะเป็น proteinase ที่อยู่ upstream ของ *PmPPAE1* (หรือ *PmPPAE2*) และแบบ (2) *PmPPAE1* (หรือ *PmPPAE2*) อาจจะเป็น proteinase ที่ทำหน้าที่ activate โปรตีน *PmproPO2* (หรือ *PmproPO1*) และ *PmPPAE2* (หรือ *PmPPAE1*) อาจจะเป็น proteinase ที่ทำหน้าที่ activate โปรตีน *PmproPO1* (หรือ *PmproPO2*) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้สามารถสรุปได้ว่ายีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO

การศึกษายีน PPAE ในแมลง *Maduca sexta* พบ PPAE ถึง 3 ชนิด (PAP1, PAP2 และ PAP3) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน inactive proPO ให้เป็น active PO (Jiang et al., 2003a; 2003b) โดยทำงานร่วมกับ cofactor (*M. sexta* SPH-1 และ SPH-2) (Jiang and Kanost, 2000) นอกจากนั้นการศึกษายีนในกลุ่ม clip domain serine proteinase เช่น ในแมลง *Holotrichia diomphalia* พบยีน clip domain serine proteinase 3 ยีน (PPAF-I, -II, and -III) (Lee et al., 1998a; 1998b; Kwon et al., 2000) และพบว่ากลไกในการกระตุ้น proPO (I และ II) ให้อยู่ในรูป active PO จะผ่านการทำหน้าที่ของยีน PPAF-I ร่วมกับ PPAF-II (ทำหน้าที่เป็น cofactor) โดยในกระบวนการนี้ยีน PPAF-III จะทำหน้าที่ตัด PPAF-II ให้อยู่ในรูป active form ซึ่งทำหน้าที่เป็น cofactor ของ PPAF-I ใน

สิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียนนั้นมีเพียงกุ้ง crayfish *P. leniusculus* ชนิดเดียวที่มีการพบและศึกษาหน้าที่ของยีน PPAE โดยพบว่าโปรตีนนี้สามารถกระตุ้น proPO ให้เป็น active PO ได้ (Cerenius and Söderhäll, 2004; Liu et al., 2007) สำหรับงานวิจัยนี้เราได้ค้นพบยีน PPAE ในกุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้นอีก 1 ชนิด ได้แก่ ยีน *PmPPAE2*

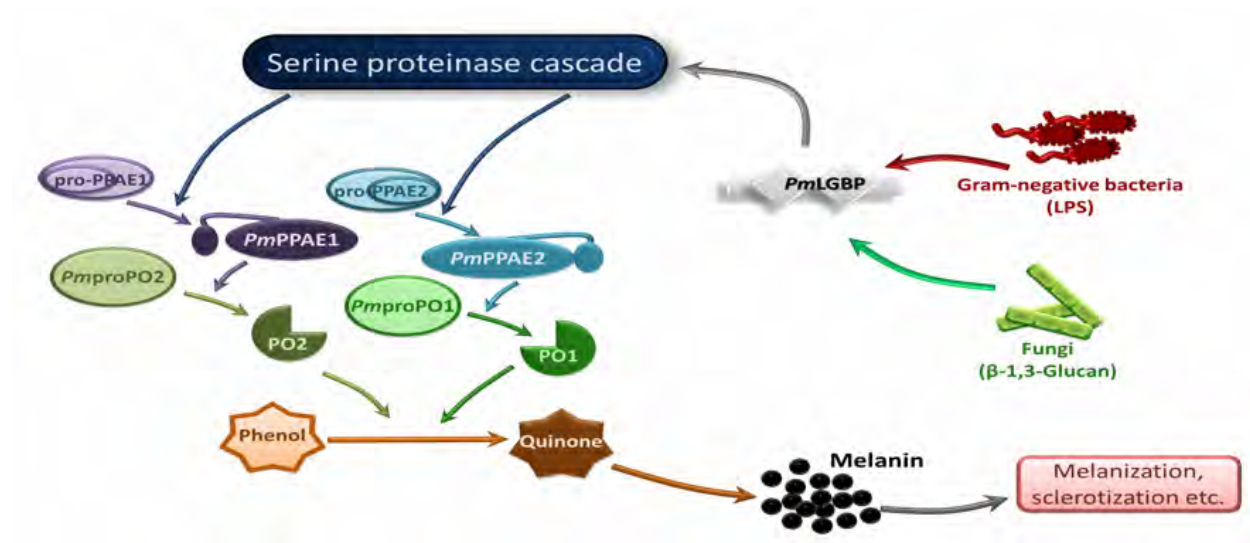
เมื่อทำการทดสอบความสำคัญของยีน *PmPPAE2* ต่อความอยู่รอดของกุ้งหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* 639 พบว่ากุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* ทำให้กุ้งมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อตรวจสอบจำนวนของเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* พบว่ามีจำนวนเชื้อมากขึ้นประมาณ 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มกุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA ผลจากการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *PmPPAE2* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO และระบบนี้เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639

การศึกษาค้นคว้านี้ได้ทำการศึกษารูปแบบการจัดเรียงตัวของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* เมื่อเปรียบเทียบการจัดเรียงตัวของยีนทั้งสองพบว่ามีความแตกต่างกัน โดยการจัดเรียงตัวของยีน *PmPPAE1* ประกอบด้วย 10 exon และ 9 intron โดยมี intron ตำแหน่งที่ 1 และ 2 แทรกอยู่ระหว่าง signal peptide กับ Glycine rich region intron ตำแหน่งที่ 3 และ 4 แทรกอยู่ใน Glycine rich region ส่วน intron ตำแหน่งที่ 5 และ 6 พบใน clip domain และ Proline-rich region ตามลำดับ ขณะที่ intron ที่เหลืออีก 3 ตำแหน่งพบว่าแทรกอยู่ที่บริเวณ SP domain ของยีน ส่วนยีน *PmPPAE2* ประกอบด้วย 8 exon และ 7 intron โดยพบ intron ตำแหน่งแรกแทรกอยู่ระหว่าง signal peptide กับ clip domain intron ตำแหน่งที่ 2 แทรกอยู่ใน clip domain และ intron อีก 5 ตำแหน่งที่เหลือแทรกอยู่ในบริเวณ SP domain จากรายงานการศึกษารูปแบบการจัดเรียงตัวของยีน PAP-1 (Zou et al., 2005), PAP-2 (Wang et al., 2006a) และ PAP-3 (Zou and Jiang, 2005) ในแมลง *M. sexta* พบว่ายีน PAP-1 ประกอบด้วย 7 exon และ 6 intron ส่วนยีน PAP-2 และ PAP-3 ประกอบด้วย 8 exon และ 7 intron เมื่อวิเคราะห์บริเวณ intron ที่ 1 ของยีน PAP-1, PAP-2 และ PAP-3 ในแมลง *M. sexta* พบว่า มีความยาวประมาณ 3.9, 1.4 และ 12 kb ตามลำดับ โดยบริเวณ intron ที่ 1 จะแทรกอยู่ระหว่าง signal peptide และ clip domain จากการเปรียบเทียบยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ของกุ้งกุลาดำกับยีน PAP-1, PAP-2 และ PAP-3 ของแมลง *M. sexta* เราพบว่าในบริเวณ clip domain ของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* มี intron แทรกอยู่ 1 ตำแหน่ง เหมือนกับยีน PAP-2 และ PAP-3 ของแมลง *M. sexta* ที่มี intron แทรกอยู่ 1 ตำแหน่งของทั้งสอง clip domain ในทั้งสองยีน ในขณะที่บริเวณดังกล่าวของยีน PAP-1 ของแมลง *M. sexta* ไม่มี intron แทรกอยู่ นอกจากนั้น พบว่าบริเวณ serine proteinase domain ของยีน *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* มี intron แทรกอยู่ 3 และ 5 ตำแหน่ง ตามลำดับ ส่วนยีน PAP-1, PAP-2 และ PAP-3 ในแมลง *M. sexta* มี intron แทรกอยู่ 4 ตำแหน่งในทั้ง 3 ยีน

จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmPPAE2* ในตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของลูกกุ้ง ยังพบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* มีความคล้ายคลึงกับยีน *PmproPO2* และรูปแบบการแสดงออกของยีน *PmPPAE2* มีความคล้ายคลึงกับยีน *PmproPO1* ซึ่งจากผลที่ได้สามารถวิเคราะห์ได้ว่า *PmPPAE1* อาจจะเป็น proteinase ที่ทำหน้าที่ตัดและกระตุ้นการทำงานของ *PmproPO2* ในขณะที่ *PmPPAE2* น่าจะเป็น proteinase ที่ทำหน้าที่ตัดและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ *PmproPO1* ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ PPAE และ proPO ในระบบ proPO ของกุ้งต่อไปได้

5.3 สรุปผลการศึกษาการกระตุ้นระบบโพรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำ

ผลจากงานวิจัยทั้งหมดจากโครงการนี้สามารถสรุปผลการศึกษาการกระตุ้นระบบโพรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำเมื่อมีเชื้อจุลินทรีย์บุกรุก โปรตีนจดจำในตัวกุ้ง ชื่อ *PmLGBP* ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น LPS จากแบคทีเรียแกรมลบ หรือ β -glucan จากเชื้อรา ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของกลูโธนินโปรตีนเอสที่ชื่อว่า proPO-activating enzyme (*PmPPAE1* และ *PmPPAE2*) ทำหน้าที่เปลี่ยน prophenoloxidase (*PmproPO1* และ *PmproPO2*) ให้เป็นเอนไซม์ phenoloxidase (PO) ทำหน้าที่สร้างเมลานิน (melanization) ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 กลไกการทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในกิ้งกุดำ *PmLGBP* (LPS and beta-glucan binding protein; *PmPPAE* (proPO-activating enzyme) และ *PmproPO* (prophenoloxidase)

เอกสารอ้างอิง

- Ahmed, A., Martin, D., Manetti, A.G., Han, S.J., Lee, W.J., Mathiopoulos, K.D., Müller, H.M., Kafatos, F.C., Raikhel, A., Brey, P.T., 1999. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14795–14800.
- Ai, H.S., Huang, Y.C., Li, S.D., Weng, S.P., Yu, X.Q., He, J.G., 2008. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 28–39.
- Amparyup, P., Kondo, H., Hirano, I., Aoki, T., Tassanakajon, A., 2008. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol. Immunol.* 45, 1085–1093.
- Asada, N., Yokoyama, G., Kawamoto, N., Norioka, S., Hatta, T., 2003. Prophenol oxidase A3 in *Drosophila melanogaster*: activation and the PCR based cDNA sequence. *Biochem. Genet.* 41, 151–163.
- Asano, T., Ashida, M., 2001a. Cuticular prophenoloxidase of the silk worm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 276, 11100–11112.
- Asano, T., Ashida, M., 2001b. Transepithelially transported pro-phenoloxidase in the cuticle of the silk worm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 276, 11113–11125.
- Aspán, A., Huang, T.S., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1995. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 939–943.
- Aspán, A., Söderhäll, K., 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem.* 21, 363–373.
- Barillas-Mury, C., 2007. CLIP proteases and *Plasmodium* melanization in *Anopheles gambiae*. *Trends Parasitol.* 23, 297–299.
- Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Palva, E.T., Iwanaga, S., and Söderhäll, K., 1994. Structure and biological activity of α 1,3- β -D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.* 269, 29462–29467.
- Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263–271.

- Cerenius, L., Babu, R., Söderhäll, K., Jiravanichpaisal, P., 2010. In vitro effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 21–23.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 116–126.
- Cheng, W., Liu, C.H., Tsai, C.H., Chen, J.C., 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 18, 297–310.
- Du, X.J., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2007. Molecular Cloning and characterization of a lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mol. Immunol.* 44, 1085–1094.
- Fagutao, F.F., Koyama, T., Kaizu, A., Saito-Taki, T., Kondo, H., Aoki, T., Hirono, I., 2009. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS J.* 276, 5298–5306.
- Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S., Ohnishi, E., 1995. Nucleotide sequence of the cDNA encoding pro-phenoloxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7769–7773.
- Gai, Y., Zhao, J., Song, L., Li, C., Zheng, P., Qiu, L., Ni, D., 2008. A prophenoloxidase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: Gene cloning, expression and activity analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 156–167.
- Gao, H., Li, F., Dong, B., Zhang, Q., Xiang, J., 2009. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase (ProPO) cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and its transcription injected by *Vibrio anguillarum*. *Mol. Biol. Rep.* 36, 1159–1166.
- Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M., Gueguen, Y., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1089–1097.
- Hall, M., Scott, T., Sugumaran, M., Söderhäll, K., Law, J.H., 1995. Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: Purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7764–7768.
- Hauton, C., Hammond, J.A., Smith, V.J., 2005. Real-time PCR quantification of the in vitro effects of crustacean immunostimulants on gene expression in lobster (*Homarus gammarus*) granular haemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 33–42.
- Huang, T.S., Wang, H., Lee, S.Y., Johansson, M.W., Söderhäll, K., Cerenius, L., 2000. A cell adhesion protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, a serine proteinase homologue similar to *Drosophila masquerade*. *J. Biol. Chem.* 275, 9996–10001.
- Iwanaga, S., Lee, B.L., 2005. Recent Advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 128–150.
- Janeway, C.A., Jr., Medzhitov R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216.
- Jang, I.H., Nam, H.J., Lee, W.J., 2008. CLIP-domain serine proteases in *Drosophila* innate immunity. *BMB Rep.* 41, 102–107.
- Jiang, H., Kanost, M.R., 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 95–105.
- Jiang, H., Wang, Y., Korochkina, S.E., Benes, H., Kanost, M.R., 1997. Molecular cloning of cDNAs for two pro-phenol oxidase subunits from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 693–699.
- Jiang, H., Wang, Y., Ma, C., Kanost, M.R., 1997. Subunit composition of pro-phenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO-P1. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 835–850.
- Jiang, H., Wang, Y., Yu, X.Q., Kanost, M.R., 2003a. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*: A bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. *J. Biol. Chem.* 278, 3552–3561.
- Jiang, H., Wang, Y., Yu, X.Q., Zhu, Y., Kanost, M.R., 2003b. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1049–1060.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211, 213–236.
- Johansson, M.W., 1999. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 303–315.
- Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.* 106, 1795–1803.
- Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1989. A peptide containing the cell adhesion sequence RGD can mediate degranulation and cell adhesion of crayfish granular haemocytes *in vitro*. *Insect Biochem.* 19, 573–579.
- Kanost, M.R., Gorman, M.J., 2008. Phenoloxidases in Insect Immunity, in: Beckage, N.E. (Eds.), *Insect Immunology*. Academic Press Inc., San Diego, pp. 69–96.

- Kawabata, T., Yasuhara, Y., Ochai, M., Matsuura, S., Ashida, M., 1995. Molecular cloning of insect pro-phenoloxidase: A copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7774–7778.
- Kim, M.S., Baek, M.J., Lee, M.H., Park, J.W., Lee, S.Y., Söderhäll, K., Lee, B.L., 2002. A new easter-type serine protease cleaves a Masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* Larvae. *J. Biol. Chem.* 277, 39999–40004.
- Ko, C.F., Chiou, T.T., Vaseeharan, B., Lu, J.K., Chen, J.C., 2007. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 12–22.
- Kwon, T.H., Kim, M.S., Choi, H.W., Joo, C.H., Cho, M.Y., Lee, B.L., 2000. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* 267, 6188–6196.
- Lai, C.Y., Cheng, W., Kuo, C.M., 2005. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 18, 417–430.
- Leclerc, V., Pelte, N., El Chamy, L., Martinelli, C., Ligoxygakis, P., Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M., 2006. Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *Embo Reports* 7, 231–235.
- Lee, S.Y., Kwon, T.H., Hyun, J.H., Choi, J.S., Kawabata, S.I., Iwanaga, S., Lee, B.L., 1998a. *In vitro* activation of pro-phenol-oxidase by two kinds of pro-phenol-oxidase-activating factors isolated from hemolymph of coleopteran, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* 254, 50–57.
- Lee, S.Y., Cho, M.Y., Hyun, J.H., Lee, K.M., Homma, K.I., Natori, S., Kawabata, S.I., Iwanaga, S., Lee, B.L., 1998b. Molecular cloning of cDNA for pro-phenol-oxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1,3- β -glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* 257, 615–621.
- Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2001. Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Immunol.* 166, 7319–7326.
- Lee, S.Y., Wang, R., Söderhäll, K., 2000. A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 275, 1337–1343.
- Lee, W.J., Ahmed, A., Torre, A.D., Kobayashi, A., Ashida, M., Brey, P.T., 1998c. Molecular cloning and chromosomal localization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 7, 41–50.
- Lin, C.Y., Hu, K.Y., Ho, S.H., Song, Y.L., 2006. Cloning and characterization of a shrimp clip domain serine protease homolog (c-SPH) as a cell adhesion molecule. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 1132–1144.
- Lin, Y.C., Vaseeharan, B., Chen, J.C., 2008. Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1260–1269.
- Liu, C.H., Tseng, S.Y., Lai, C.Y., Cheng, W., Kuo, C.M., 2006. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase cDNA from haemocytes of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its transcription in relation with the moult stage. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 60–69.
- Liu, F., Li, F., Dong, B., Wang, X., and Xiang, J., 2009. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition protein, lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Biol. Rep.* 36, 471–477.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2007. Phenoloxidase Is an Important Component of the Defense against *Aeromonas hydrophila* Infection in a Crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 282, 33593–33598.
- Lorenzini, D.M., da Silva, P.I., Fogaca, A.C., Bulet, P., Daffre, S., 2005. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 781–791.
- Lu, K.Y., Huang, Y.T., Lee, H.H., Sung, H.H., 2006. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated in vivo by CpG oligodeoxynucleotides. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 274–284.
- Ma, C., Kanost, M.R., 2000. A β -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *J. Biol. Chem.* 275, 7505–7514.
- Müller, H.M., Dimopoulos, G., Blass, C., Kafatos, F.C., 1999. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. *J. Biol. Chem.* 274, 11727–11735.
- Muta T., Iwanaga S., 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8:41–47

- Parkinson, N., Smith, I., Weaver, R., Edwards, J.P., 2001. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 57–63.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2004–2007.
- Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R., and Lemaitre, B., 2004. *In vivo* RNA interference analysis reveals an unexpected role for GNBPI in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J. Biol. Chem.* 279, 12848–12853.
- Romo-Figueroa, M.G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundo, R.R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciajara, I., Söderhäll, K., Yepiz-Plascencia, G., 2004. Molecular cloning of a beta-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 713–26.
- Satoh, D., Horii, A., Ochiai, M., Ashida, M., 1999. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, characterization, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 274, 7441–7453.
- Schnitger, A.K.D., Kafatos, F.C., Osta, M.A., 2007. The melanization reaction is not required for survival of *Anopheles gambiae* mosquitoes after bacterial infections. *J. Biol. Chem.* 282, 21884–21888.
- Sriphajit, T., Flegel, T.W., Senapin, S., 2007. Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 1145–1158.
- Sritunyalucksana, K., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 179–186.
- Sritunyalucksana, K., Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2002. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 237–245.
- Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53–69.
- Sritunyalucksana, K., Wongsuebsantati, K., Johansson, M.W., Söderhäll, K., 2001. Peroxinection, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 353–363.
- Tang, H., Kambris, Z., Lemaitre, B., Hashimoto, C., 2006. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 281, 28097–28104.
- Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Paunglarp, N., Rimphanitchayakit, V., Udomkit, A., Jitrapakdee, S., Sritunyalucksana, K., Phongdara, A., Pongsomboon, S., Supungul, P., Tang, S., Kuphanumart, K., Pichyangkura, R., Lursinsap, C., 2006. *Penaeus monodon* gene discovery project: The generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene* 384, 104–112.
- Terwilliger, N.B., Ryan, M.C., 2006. Functional and phylogenetic analyses of phenoloxidases from brachyuran (*Cancer magister*) and branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) crustaceans. *Biol. Bull.* 210, 38–50.
- Wang, R., Lee, S.Y., Cerenius, L., Söderhäll, K., 2001. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 268, 895–902.
- Wang, Y., Sumathipala, N., Rayaprolu, S., and Jiang, H., 2011. Recognition of microbial molecular patterns and stimulation of prophenoloxidase activation by a β -1,3-glucanase-related protein in *Manduca sexta* larval plasma. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 322–331.
- Wang, Y., Zou, Z., Jiang, H., 2006a. An expansion of the dual clip-domain serine proteinase family in *Manduca sexta*: Gene organization, expression, and evolution of prophenoloxidase-activating proteinase-2, hemolymph proteinase 12, and other related proteinases. *Genomics* 87, 399–409.
- Wang, Y.C., Chang, P.S., Chen, H.Y., 2006b. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 414–418.
- Waterhouse, R.M., Kriventseva, E.V., Meister, S., Xi, Z., Alvarez, K.S., Bartholomay, L.C., Barillas-Mury, C., Bian, G., Blandin, S., Christensen, B.M., Dong, Y., Jiang, H., Kanost, M.R., Koutsos, A.C., Levashina, E.A., Li, J., Ligoxygakis, P., Maccallum, R.M., Mayhew, G.F., Mendes, A., Michel, K., Osta, M.A., Paskewitz, S., Shin, S.W., Vlachou, D., Wang, L., Wei, W., Zheng, L., Zou, Z., Severson, D.W., Raikhel, A.S., Kafatos, F.C., Dimopoulos, G., Zdobnov, E.M., Christophides, G.K., 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science* 316, 1738–1743.

- Yang, J., Qiu, L., Wang, L., Wei, X., Zhang, H., Zhang, Y., Liu, L., and Song, L., 2010. CflGBP, a pattern recognition receptor in *Chlamys farreri* involved in the immune response against various bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 825–831.
- Yu, X.Q., Jiang, H., Wang, Y., Kanost, M.R., 2003. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 197–208.
- Zhao, P., Li, J., Wang, Y., Jiang, H., 2007. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 952–959.
- Zhao, P., Lu, Z., Strand, M.R., Jiang, H., 2011. Antiviral, anti-parasitic, and cytotoxic effects of 5,6-dihydroxyindole (DHI), a reactive compound generated by phenoloxidase during insect immune response. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 645–652.
- Zou, Z., Jiang, H., 2005. Gene structure and expression profile of *Manduca sexta* prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3), an immune protein containing two clip domains. *Insect Mol. Biol.* 14, 433–442.
- Zou, Z., Wang, Y., Jiang, H., 2005. *Manduca sexta* prophenoloxidase activating proteinase-1 (PAP-1) gene: organization, expression, and regulation by immune and hormonal signals. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 627–636.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- Amparyup, P.**, Sutthangkul, J., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A. (2012). Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and α -1,3-glucan and activates the shrimp prophenoloxidase system. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 10060–10069. (Impact factor 2010 = 5.328)
- Charoensapsri, W., **Amparyup, P.**, Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2011). PmPPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. *Developmental and Comparative Immunology* 35: 115-124. (Impact factor 2010 = 3.293)
- Amparyup, P.**, Charoensapsri, W., Tassanakajon, A. (2012). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish and Shellfish Immunology* (Review article) (Submitted) (Impact factor 2010 = 3.293)

การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับนานาชาติ

- Amparyup, P.**, Charoensapsri, W., Wiriyaekaradecha, K., Hirono, I., Aoki, T., and Tassanakajon, A. (2010). Application of RNA interference to study the gene function in shrimp prophenoloxidase system. The 7th National Symposium on Marine Shrimp. 7-8 Sep 2010. Nakhonsithammarat, Thailand.
- Amparyup, P.**, Sutthangkul, J., Tassanakajon, A. (2010). Involvement of shrimp lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein prophenoloxidase system. 9th International Marine Biotechnology Conference, 8-12 Oct 2010, Qingdao, China.
- Amparyup, P.** (2011). Molecular Biology of Shrimp: The study of function of genes and proteins involved in disease resistance. The 3rd Biochemistry and Molecular Biology International Conference, 6-8 Apr, 2011, Chiang Mai, Thailand.
- Jearaphunt, M., **Amparyup, P.**, and Tassanakajon, A. (2011). Gene silencing of a masquerade-like serine proteinase homologue 2 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. The 3rd Biochemistry and Molecular Biology International Conference, 6-8 Apr 2011, Chiang Mai, Thailand.
- Promrungreang, K., **Amparyup, P.**, and Tassanakajon, A. (2011). Functional characterization of clip domain serine proteinase (*PmClipSP2*) in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. The 3rd Biochemistry and Molecular Biology International Conference, 6-8 Apr 2011, Chiang Mai, Thailand.
- Charoensapsri, W., **Amparyup, P.**, Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. (2011). ProPO–system mediated innate response in shrimp immunity. Eighth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 21–25 Nov 2011, Milagres Complex, Mangalore, India.
- Jearaphunt, M., **Amparyup, P.**, Charoensapsri, W. and Tassanakajon, A. (2011). *PmMasSPH1*, a masquerade-like serine proteinase homologue plays a role in the proPO system and immunity of shrimp. Eighth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 21–25 Nov 2011, Milagres Complex, Mangalore, India.

การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับชาติ

- Jearaphunt, M., Amparyup, P., Tassanakajon, A. (2011). Masquerade-like serine proteinase homologue-1 and -2 play role in the shrimp prophenoloxidase system. The 37th Congress on Science and Technology of Thailand, 10-12 Oct 2011, Bangkok, Thailand.

รางวัลที่ได้รับ

หัวหน้าโครงการ

ดร. ปิติ อ่ำพ่าย ได้รับรางวัล "นักชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุลดาวรุ่ง/รุ่นเยาว์ (Young BMB Award) ประจำปี พ.ศ. 2554 จาก สาขาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์

นิสิตระดับปริญญาโท และเอกที่มีส่วนร่วมในโครงการ

1. ดร.วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี ได้รับรางวัลวิจัยดีเด่น ประเภทนิสิตชั้นดุษฎีบัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากผลงานเรื่อง “ลักษณะสมบัติและการวิเคราะห์หน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโปรตีนออกซิเดส จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*” รับรางวัลวันที่ 22 มีนาคม 2555
2. นางสาว กัญญ์พร พรหมรุ่งเรือง ได้รับรางวัล " Outstanding poster presentation Award " ในการเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการ The 3rd Biochemistry and Molecular Biology(BMB) Conference ระหว่างวันที่ 6-8 เมษายน 2554 เชียงใหม่ จากผลงานเรื่อง Functional study of clip domain serine proteinase PmClipSP2 from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. ได้รับรางวัล วันที่ 8 เมษายน 2554
3. ดร. วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี ได้รับรางวัล "Poster Award" ในการเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการ Eighth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture ระหว่างวันที่ 21-25 พฤศจิกายน 2554 จากผลงานเรื่อง "ProPO–system mediated innate response in shrimp immunity" ได้รับรางวัลวันที่ 24 พฤศจิกายน 2554
4. น.ส.วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี ได้รับรางวัล Outstanding oral presentation ในงานประชุมวิชาการ RGJ-Ph.D. Congress X จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ระหว่างวันที่ 3-5 เมษายน 2552 จากผลงานเรื่อง “RNAi-mediated functional characterization of two prophenoloxidases from black tiger shrimp *Penaeus monodon*” วันที่ได้รับรางวัล 5 เมษายน 2552
5. น.ส.มิตี เจียรพันธุ์ ได้รับรางวัล รองชนะเลิศ อันดับที่ 2 แบบโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการ (The Science Forum) ครั้งที่ 20 ประจำปี พ.ศ. 2555 ระหว่างวันที่ 19 - 20 เมษายน 2555 จากผลงานเรื่อง "PmMasSPH1, a masquerade-like serine proteinase homologue, plays a role in the proPO system and immunity of shrimp" ได้รับรางวัลวันที่ 20 เมษายน 2555

การเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาที่ทำการวิจัยทั้งในและต่างประเทศ

1. โครงการวิจัยนี้มีความร่วมมือกับ Professor Dr. Takashi Aoki ที่ Tokyo University of Marine Science and Technology ประเทศญี่ปุ่น ภายใต้โปรแกรม JSPS-NRCT

2. โครงการวิจัยนี้มีความร่วมมือกับ Professor Dr. Kenneth Söderhäll ที่ Department of Comparative Physiology, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University ประเทศสวีเดน

Pattern Recognition Protein Binds to Lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan and Activates Shrimp Prophenoloxidase System*

Received for publication, August 19, 2011, and in revised form, December 27, 2011. Published, JBC Papers in Press, January 10, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.294744

Piti Amparyup^{†§}, Jantiwan Sutthangkul^{†1}, Walaiporn Charoensapsri[‡], and Anchalee Tassanakajon^{†‡2}

From the [†]Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand and the [‡]National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

Background: LGBP is an important pattern recognition protein (PRP).

Results: *Pm*LGBP binds to β -1,3-glucan and LPS and could enhance the phenoloxidase (PO) activity. Knockdown shrimp showed decreased PO activity.

Conclusion: *Pm*LGBP functions as a PRP for LPS and β -1,3-glucan in the proPO system.

Significance: *Pm*LGBP is a PRP involved in the proPO system, exhibits LPS and β -1,3-glucan binding activity, and can activate the proPO system.

The prophenoloxidase (proPO) system is activated upon recognition of pathogens by pattern recognition proteins (PRPs), including a lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP). However, shrimp LGBPs that are involved in the proPO system have yet to be clarified. Here, we focus on characterizing the role of a *Penaeus monodon* LGBP (*Pm*LGBP) in the proPO system. We found that *Pm*LGBP transcripts are expressed primarily in the hemocytes and are increased at 24 h after pathogenic bacterium *Vibrio harveyi* challenge. The binding studies carried out using ELISA indicated that recombinant (r)*Pm*LGBP binds to β -1,3-glucan and LPS with a dissociation constant of 6.86×10^{-7} M and 3.55×10^{-7} M, respectively. Furthermore, we found that r*Pm*LGBP could enhance the phenoloxidase (PO) activity of hemocyte suspensions in the presence of LPS or β -1,3-glucan. Using dsRNA interference-mediated gene silencing assay, we further demonstrated that knockdown of *Pm*LGBP in shrimp *in vivo* significantly decreased the *Pm*LGBP transcript level but had no effect on the expression of the other immune genes tested, including shrimp antimicrobial peptides (AMPs). However, suppression of proPO expression down-regulated *Pm*LGBP, proPO-activating enzyme (*Pm*PPAE2), and AMPs (penaeidin and crustin). Such *Pm*LGBP down-regulated shrimp showed significantly decreased total PO activity. We conclude that *Pm*LGBP functions

as a pattern recognition protein for LPS and β -1,3-glucan in the shrimp proPO activating system.

The innate immune system is important to invertebrates (1), where cellular immune responses, such as phagocytosis, nodule formation, and encapsulation, are important in arthropods, whereas the prophenoloxidase (proPO)³ activation system, the clotting system, and synthesis of antimicrobial peptides are important humoral defense mechanisms (1–5). These immune responses are triggered by the specific recognition of microorganisms by host proteins referred to as pattern recognition proteins (PRPs), which are capable of binding to a variety of microbial cell wall components, referred to as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PAMPs include lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid, and peptidoglycan (PGN) from Gram-negative and Gram-positive bacteria and β -1,3-glucan from fungi (1, 6).

The melanization cascade is initiated by the activation of the proPO system and plays key roles in the host defense against microbial infections in invertebrates (5, 7–9). ProPO activation can be triggered by PAMPs after their recognition by specific PRPs, leading to activation of a serine proteinase cascade that results in the activation of proPO-activating enzymes (PPAEs) (5). Then, the activated PPAE(s) convert the zymogen proPO to the functionally active phenoloxidase (PO) by specific proteolytic cleavage. Subsequently, PO catalyzes the formation of quinone-reactive intermediates for melanin synthesis at the injury site or around invading microorganisms (10–12).

* This work was supported by a fellowship from the Thailand Research Fund (to P. A.) and grants from the Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), the Higher Education Research promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (FW 643A), and the National Research University Project of Commission for Higher Education, and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund. Research equipment was supported by the Thai Government Stimulus Package 2 TTK2555 under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products, and Agriculture.

¹ Recipient of student fellowship from the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, Thailand Research Fund, and the Young Scientist and Technologist Program, NSTDA SP52-BT3.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 66-2-218-5439; Fax: 66-2-218-5414; E-mail: anchalee.k@chula.ac.th.

³ The abbreviations used are: proPO, prophenoloxidase; bGBP, β -glucan-binding protein; L-DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; dsRNA, double-stranded RNA; HLS, hemocyte lysate supernatant; hpi, hours postinjection; LGBP, LPS- and β -1,3-glucan-binding protein; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PO, phenoloxidase; PPAE, proPO-activating enzyme; PRP, pattern recognition protein; r, recombinant; SSS, sodium saline solution.

Recognition of invasive pathogens by PRPs is an essential step for the activation of the proPO system. To date, various types of PRPs in the proPO system have been reported such as peptidoglycan recognition proteins (2, 13–20), C-type lectins (21, 22), β -glucan-binding proteins (bGBPs) (23, 24) and LPS- and β -1,3-glucan binding proteins (LGBPs) (25–27). In crustaceans, the binding of LGBP to LPS or β -1,3-glucan has been documented to activate the proPO system of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (27). In shrimp, several LGBPs have been cloned and characterized, such as in the blue shrimp *Penaeus stylirostris* (28), white shrimp *Litopenaeus vannamei* (29), Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* (30, 31) and kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (32). In the shrimp *Penaeus monodon*, a PRP was initially identified as a bGBP, based on its binding activity to β -glucan but not to LPS (33).

However, shrimp LGBPs that are involved in the proPO system have yet to be clarified. Previously, two proPOs (*PmproPO1* and *PmproPO2*) and two PPAEs (*PmPPAE1* and *PmPPAE2*) genes from *P. monodon* were functionally characterized and shown to both function in the proPO system and be important components in the *P. monodon* shrimp immune system (34–36). Therefore, in the present study, the molecular characterization of a PRP in the shrimp *P. monodon* proPO system is described. The transcript expression profiles in various tissues and in response to the pathogenic bacterium, *Vibrio harveyi*, were examined, as were the binding activity and the proPO activation of the recombinant (r) protein. The protein was named *PmLGBP* and its involvement in the proPO system was elucidated.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Shrimp and Sample Preparation—Healthy black tiger shrimp (*P. monodon*) with an average wet weight of 15 g were maintained in aerated seawater (20 ppt) for a week prior to the experiment. To determine the tissue expression pattern of *PmLGBP* transcripts, six different tissues (hemocytes, hepatopancreas, gill, lymphoid organ, intestine, and heart tissue) from three shrimp were separately collected as described previously (34). All samples were then stored at -80°C until used for RNA isolation. In the immune challenge experiments, shrimp were injected with a *V. harveyi* suspension of 10^6 colony-forming units (cfu) in 50 μl of sterile 0.85% (w/v) sodium saline solution (SSS) into the last abdominal segment of each shrimp. SSS-injected (same volume) shrimp were used as the control group. The experimental shrimp were reared in seawater tanks, and the hemocyte cell pellets (see above) of three individual shrimp at 0, 6, 12, 24, 48, and 72 h postinjection (hpi) were randomly collected for RNA extraction.

Total RNA Isolation and cDNA Synthesis—Total RNA was isolated from each of the various tissues of *P. monodon* using the TRI Reagent[®] (Molecular Research Center) according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA synthesis was carried out based on the ImProm-II[™] Reverse Transcriptase System kit (Promega) according to the manufacturer's instructions with 1.5 μg of the DNase I-treated total RNA and 0.5 μg of oligo(dT)₁₅ primer. The cDNAs were stored at -80°C until required for RT-PCR analysis.

Cloning of *PmLGBP*—Gene-specific primers were designed from nucleotide sequence of *PmLGBP* (accession number JN415536) to amplify the complete coding region by RT-PCR. PCR amplification of *PmLGBP* from the cDNA of hemocyte was carried out using the primer pair 5*PmLGBP*-F and 3*PmLGBP*-R for *PmLGBP* (Table 1) with *Pfu* DNA polymerase (Promega). The purified PCR products were cloned and direct sequenced in both directions to obtain the complete coding sequence.

***PmLGBP* Transcript Expression Analysis**—The expression profile of *PmLGBP* transcripts in different shrimp tissues was performed by semiquantitative RT-PCR using the gene-specific primers *PmLGBP*i-F/-R (Table 1). A partial fragment (149 bp) of the elongation factor 1 α (EF1 α) gene was also amplified using the EF1 α -F/-R primers (Table 1) to serve as an internal reference control for normalization. The amplification reaction and PCR temperature profiles were determined as described previously (37). The amplified products were then separated by agarose gel electrophoresis.

***PmLGBP* Transcript Expression Patterns in Response to *V. harveyi* Challenge**—Real-time RT-PCR was performed using an iCycler-iQ[™] system (Bio-Rad) with SYBR Green I dye detection (Bio-Rad). The PCR and thermal profile were then performed as described previously (38) using the *PmLGBP*-specific primers, *PmLGBP*-F2 and *PmLGBP*-R2 (Table 1) to amplify a product of 200 bp. The EF1 α was also amplified as an internal reference control. All real-time PCR analysis was performed in triplicate per sample. Dissociation curve analysis of the amplification products was performed at the end of each PCR to confirm that only one PCR product was amplified and detected. The Ct values of amplicons from *V. harveyi*-infected shrimp samples at each time point were normalized to those from the SSS-injected control shrimp using the mathematical model of Pfaffl (39) to determine the relative expression ratio.

Construction and Expression of Recombinant (r)*PmLGBP* Protein—A gene fragment encoding the mature peptide of *PmLGBP* was amplified using *Pfu* DNA polymerase with the specific primers *PmLGBP*exp-F/-R that contain 5'-flanking EcoRI and XhoI restriction enzyme sites, respectively (Table 1). The purified PCR product was digested with EcoRI and XhoI, ligated into the EcoRI/XhoI sites of the pET28b(+) expression vector (Novagen), and transformed into competent *Escherichia coli* JM109. The positive clones were confirmed by nucleotide sequencing. The selected recombinant plasmid (pET28b-*PmLGBP*) was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3)-pLysS cells (Novagen) for recombinant protein expression and then induced with 1 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside. At 6 h after induction, cells were harvested by centrifugation at 8,000 rpm for 15 min. The pellets were resuspended in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) and disrupted by an ultrasonic oscillator. The r*PmLGBP* protein was purified and refolded as described previously (40). The r*PmLGBP* protein preparation was evaluated for purity through SDS-PAGE. The concentration of the r*PmLGBP* protein was quantified by the Bradford assay. For Western blot analysis, the r*PmLGBP* protein sample was resolved on a SDS-polyacrylamide gel as above and then electroblotted onto a PVDF membrane (Amersham Biosciences). The membrane was blocked by incubation in Tris buffer solution (TBS: 137 mM

TABLE 1
Nucleotide sequences of the primers used

Primer	Sequence (5'–3')	GenBank accession number
Cloning and recombinant protein expression		
LGBP		
5PmLGBP-F	5' - TTCTTATCCACAGCAGGATG - 3'	JN415536
3PmLGBP-R	5' - TATTACAGTTT AGTGG AAGGATTTA - 3'	JN415536
PmLGBPexp-F	5' - CATGCCATGGCAGACATCGTGGAGCCCGA - 3'	JN415536
PmLGBPexp-R	5' - GCCTCGAGCTAATGATGATGATGATGATGC TGCTCGGTGCTCTCCATCT - 3'	JN415536
Real-time PCR and semiquantitative RT-PCR analysis		
LGBP		
PmLGBP-F2	5' - TCGACAACGATATCTGGGA - 3'	JN415536
PmLGBP-R2	5' - CCCGCGGCGTTTCATGCCCCAC - 3'	JN415536
Prophenoloxidase		
PO1RT-F	5' - GGTCTTCCCTCCCGCTTCG - 3'	AF099741
PO1RT-R	5' - GCCGCAAGTCCCTTGGCAGC - 3'	AF099741
PO2RT-F	5' - GCCAAGGGGAACGGGTGATG - 3'	FJ025814
PO2RT-R	5' - TCCTCATGGCGGTGAGGT - 3'	FJ025814
Prophenoloxidase-activating enzyme		
PmPPAE1-F	5' - ATGAAGGGCGTGACGGTGGTTCTATG - 3'	FJ595215
PmPPAE1-R	5' - CTCTTCTTCAAGCTCACCCTTCTATCT - 3'	FJ595215
PPAE2-F	5' - ATGCACCTACCGGTTCCACGATC - 3'	FJ620685
PPAE2-R	5' - CTAAGTTTGAGATTCTGCACG - 3'	FJ620685
Penaeidin		
PEN3-F	5' - GGTCTTCTGCGCTCCTTCG - 3'	FJ686016
PEN3t-R	5' - TTTGCATCACAAACGTCCTA - 3'	FJ686016
Crustin-like peptide		
Crus72-F	5' - CGGCAGGTGTCCACAGATTCG - 3'	EF654658
Crus72-R1	5' - AATTGATGAGTGAACATGCAAGGCTAT - 3'	EF654658
Single WAP domain-containing protein		
SWDPm2-F	5' - CGGCATCATCACACGTGCGAG - 3'	EU623980
SWDPm2-R	5' - TCAGTAACCTTCCAGGGAGAC - 3'	EU623980
Lysozyme		
PmLyzc-F	5' - GCGGCAGCGATTATGGCAAG - 3'	GQ478702
PmLyzc-R	5' - TTGAACACAGAGACCAGCACT - 3'	GQ478702
Toll receptor		
PmToll-F	5' - GAATGCTTCTCGGGTCTGC - 3'	EF117252
PmToll-R	5' - GCTCAGCCATGACGAGATTC - 3'	EF117252
EF1 α		
EF1 α -F	5' - GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC - 3'	
EF1 α -R	5' - CGTTCGGTGATCATGTTCTTGATG - 3'	
Gene silencing		
LGBP		
PmLGBPi-F	5' - AGGGCTTCGTAGCGTCGGTC - 3'	JN415536
PmLGBPi-R	5' - CGAAGGAACCTGTATTGCT - 3'	JN415536
T7PmLGBPi-F	5' - GGATCCTAATACGACTCACTATAGGA GGGCTTCGTAGCGTCGGTC - 3'	JN415536
T7PmLGBPi-R	5' - GGATCCTAATACGACTCACTATAGGC GAAGGAACCTGTATTGCT - 3'	JN415536
GFP		
GFP-F	5' - ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA - 3'	U55761
GFP-R	5' - TTACTTGTACAGCTCGTCCA - 3'	U55761
GFPT7-F	5' - TAATACGACTCACTATAGGATGGTG AGCAAGGGCGAGGA - 3'	U55761
GFPT7-R	5' - TAATACGACTCACTATAGGTTACTT GTACAGCTCGTCCA - 3'	U55761

NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.6)) containing 0.05% (v/v) Tween 20 (TBST) and 5% BSA and then probed with a 1:10,000 dilution of the mouse anti-His tag monoclonal antibody (GenScript) in TBS, washed twice in TBST, and probed in a 1:10,000 dilution of the alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma) secondary antibody in TBS. The alkaline phosphatase antibody-protein band complex was detected by incubation in bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium as the chromogenic substrate.

Binding Assay of rPmLGBP—The PAMPs binding assay was performed according to Yu *et al.* (22) with some modification. Briefly, 20 μ g of LPS from *E. coli* O127:B8 (Sigma, L4130), laminarin (β -1,3-glucan, L9634) from *Laminaria digitata* (Sigma) and soluble Lys-type PGN from *Staphylococcus aureus* (Invivo-Gen) in 100 μ l of TBS were used to coat each well of a 96-well microtiter plate (Costar) and air-dried overnight at 37 °C. The

plate was incubated at 60 °C for 1 h to fix the ligands, and the wells were then blocked with 200 μ l of 1 mg/ml BSA in TBS at 37 °C for 2 h. After washing (see below), 100 μ l of rPmLGBP (0–10 μ M in TBS) was added to each well and incubated for 3 h at room temperature. After washing (see below), the bound protein was detected immunochemically. First, 100 μ l of a 1:10,000 dilution of the mouse anti-His tag monoclonal antibody in TBS was added and incubated at 37 °C for 3 h, washed, and then incubated for 3 h with 100 μ l of alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (diluted 10,000-fold in TBS) as the second antibody. After each stage above the wells were washed four times with TBST (TBS with 0.1% (v/v) Tween 20) for 15 min and once with 0.5 mM MgCl₂/10 mM diethanolamine. Finally, after the last wash, 50 μ l of *p*-nitrophenyl phosphate (1.0 mg/ml in the diethanolamine buffer) was added to each well and incubated at room temperature for 30 min. The

reaction was stopped by the addition of 0.4 M NaOH (100 μ l), and the absorbance was measured with an ELISA reader at 405 nm. Wells with 0 μ M rPmLGBP protein (100 μ l of TBS) were used as the negative control (blank). The apparent dissociation constant (K_d) values were calculated using Prism 5.00 software (GraphPad software) with a one-site binding model and non-linear regression analysis, as $A = A_{\max}[L]/(K_d + [L])$, where A is the absorbance at 405 nm and $[L]$ is the concentration of the rPmLGBP protein.

ProPO Activation Assay of the rPmLGBP Protein—To investigate the potential involvement of PmLGBP in the shrimp proPO system, the PO activity was determined by measuring the oxidation of L-DOPA to dopachromes as described (34). HLS was prepared as described (35). For the PO activation assay, HLS (250 μ g) was added to a LPS (0.1 μ g/ml), β -1,3-glucan (laminarin) (0.1 μ g/ml), or PGN (0.1 μ g/ml) solution with or without rPmLGBP protein (4 μ M), and then incubated at room temperature for 30 min. Subsequently L-DOPA (3 mg/ml) was added to each reaction and incubated at room temperature for 30 min. The absorbance at 490 nm was then measured using a spectrophotometer.

In Vivo Gene Silencing and Semiquantitative RT-PCR Analysis—Double-stranded RNAs (dsRNAs) were generated and purified as described previously (34) using the T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA Production Systems (Promega) with the PmLGBP gene-specific primers T7PmLGBP1-F/-R and PmLGBP1-F/-R (Table 1). For dsRNA-mediated gene silencing, the dsRNAs solution of PmLGBP (5 μ g/g shrimp, wet body weight) in 25 μ l of SSS was intramuscularly injected into *P. monodon* shrimp (~3 g, fresh weight). For a sequence-independent dsRNA control, shrimp were injected with GFP dsRNA at the same concentration, whereas shrimp in the handling control group were injected with 25 μ l of SSS only. At 24 hpi, a second repeat injection of dsRNA (5 μ g/g) or SSS into the shrimp was repeated but together with 20 μ g of LPS (*E. coli* 0111:B4 (Sigma) and laminarin (β -1,3-glucan (Sigma)). Shrimp were reared for a further 48 h after the second dsRNA injection prior to RT-PCR analysis.

To determine the efficiency of the PmLGBP gene knockdown, the total RNA extraction from the hemocytes of the knockdown and control group shrimp was extracted and reverse transcribed into cDNA. The efficiency of PmLGBP gene silencing was then analyzed by semiquantitative RT-PCR using the gene-specific PmLGBP1-F/-R primer pair (Table 1). All PCRs and amplification steps were performed (see above), including the use of the EF1 α fragment as an internal control for cDNA template normalization. The PmLGBP protein level of knockdown shrimp was estimated by performing immunoblotting analysis with a crayfish LGBP antibody (27) (kindly provided by Prof. K. Söderhäll and Dr. K. Sritunyalucksana).

Hemolymph PO Activity of PmLGBP Knockdown Shrimp—To investigate the involvement of PmLGBP in the shrimp proPO system, hemolymph collected from the PmLGBP knockdown and the two control group shrimp (GFP dsRNA and SSS-injected) at 48 h after the second dsRNA or SSS injection was analyzed for its PO activity levels using L-DOPA as the substrate, as reported previously (34). The hemolymph PO activity was defined in terms of ΔA_{490} /mg total protein/min. All

experiments were performed in triplicate. Statistical analysis was performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test.

Effect of PmLGBP Gene Silencing on Expression of Other Immune Genes—The effect of the dsRNA-mediated PmLGBP gene silencing on the transcript expression level of other immune genes was checked by RT-PCR amplification with gene specific primers for the *P. monodon* shrimp antimicrobial peptides (penaeidin, PEN3 [FJ686016]; crustin-like peptide, Crus-likePm [EF654658]; single WAP domain-containing protein, SWDPm2 [EU623980]; and lysozyme, PmLyzc [GQ478702]); the shrimp proPO-associated genes (PmproPO1 [AF099741], PmproPO2 [FJ025814], PmPPAE1 [FJ595215], and PmPPAE2 [FJ620685]); and the Toll receptor (EF117252) (Table 1). Amplification of the EF1 α fragment served as the internal control for cDNA template normalization.

RESULTS

Sequence Characterization of PmLGBP cDNA—The ORF of PmLGBP, comprising a putative signal peptide of 17 amino acid residues and a mature peptide of 349 amino acid residues (accession number JN415536), the mature peptide having a calculated molecular mass and isoelectric point (pI) of 39.8 kDa and 4.28, respectively. Protein sequence characterization of PmLGBP by the SMART program revealed a conserved domain that could be classified as glycoside hydrolase family 16 at amino acid positions 79–290. This comprised a polysaccharide binding, glucanase, and β -glucan recognition motifs. In addition, two integrin recognition motifs (RGD) at positions 106 and 157 and two putative N-glycosylation sites (NRS; NLS) at positions 66 and 318, respectively, were also found. The BLASTX results showed that PmLGBP significantly matched with the bGBP cDNA from *P. monodon* (AF368168; 99% amino acid sequence identity), suggesting that PmLGBP is the same gene as that reported previously (33). However, PmLGBP displays the highest amino acid sequence similarity to the crustacean LGBPs (81–95% identities). Moreover, amino acid sequence comparison of PmLGBP with kuruma shrimp *M. japonicus* LGBP (32) indicated that PmLGBP contained the conserved motifs for a potential polysaccharide binding, glucanase, and β -glucan recognition motifs, and so PmLGBP likely belongs to the family of crustacean LGBPs.

PmLGBP Transcript Is Expressed in Hemocytes and Up-regulated in Response to Gram-negative Bacterium *V. harveyi*—Based on the semiquantitative RT-PCR results, using the EF1 α transcript as an internal control for normalizing the total RNA samples, the PmLGBP mRNA transcript is specifically expressed in shrimp hemocytes, with no detectable transcript expression in the other five shrimp tissues tested (Fig. 1A). SYBR Green-based real-time PCR was carried out to analyze the temporal expression after *V. harveyi* infection in hemocytes. After systemic *V. harveyi* infection, the mRNA expression of PmLGBP decreased slightly (0.33- and 0.34-fold) below the control level at 6 and 12 hpi, respectively, but at 24 hpi it dramatically increased to 4.77-fold higher than that at 0 hpi, before returning back to normal expression levels at 48 and 72 hpi (Fig. 1B). Thus, PmLGBP is expressed in the hemocytes (Fig.

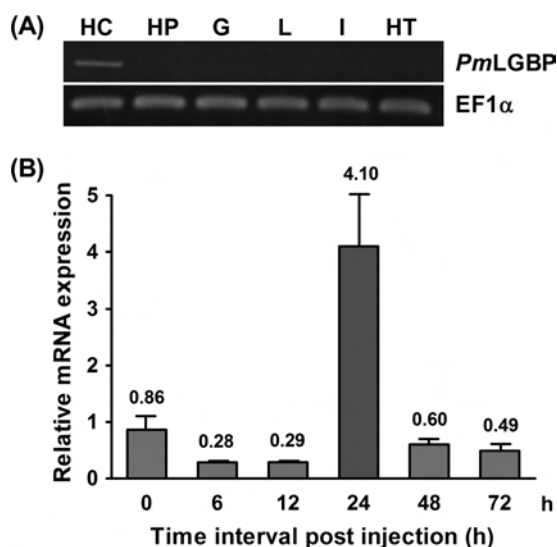


FIGURE 1. *PmLGBP* transcript is expressed in the hemocyte and increased post *V. harveyi* infection. A, tissue distribution analyses of *PmLGBP* transcripts by semiquantitative RT-PCR in the hemocytes (HC), hepatopancreas (HP), gills (G), lymphoid organs (L), intestines (I), and heart (HT). Gel images shown are representative of those seen from two independent replication samples and PCRs. B, relative expression of *PmLGBP* transcripts in the hemocytes of *V. harveyi*-injected shrimp as evaluated by SYBR Green real-time PCR at the indicated times. Relative expression levels of mRNA were calculated according to Pfaffl (39), using *EF1α* as the internal reference gene. The average relative expressions are representative of three independent repeats $\pm$ 1 S.D. (error bars).

1A), and its expression level in that tissue is transiently significantly up-regulated after *V. harveyi* infection (Fig. 1B).

Expression and Enrichment of rPmLGBP—The mature rPmLGBP protein was successfully expressed in *E. coli* cells. The rPmLGBP protein, after enrichment and refolding, appeared as a single band with an estimated molecular mass of ~ 40 kDa after SDS-PAGE resolution (data not shown). Western blotting with the anti-His antibody revealed a single band of the same apparent size (data not shown). Thus, the rPmLGBP was likely to have been enriched to apparent homogeneity.

PmLGBP Binds to Both LPS and β -1,3-Glucan (Laminarin), but Not Peptidoglycan—To determine whether *PmLGBP* possesses the properties of a PRP, the binding activity of the purifying rPmLGBP protein with three different types of PAMPs, namely LPS, β -1,3-glucan, and Lys-type PGN, was performed by ELISA. As shown in Fig. 2, the rPmLGBP bound to LPS and β -1,3-glucan (laminarin) directly in a concentration-dependent manner and with a saturable process. However, the rPmLGBP did not exhibit any detectable binding activity to the Lys-type PGN (data not shown). The apparent dissociation constant (K_d) of the rPmLGBP to LPS and β -1,3-glucan, calculated from the saturation curve fitting according to the one-site binding model, was $3.55 \pm 1.03 \times 10^{-7}$ M and $6.86 \pm 1.86 \times 10^{-7}$ M, respectively (Fig. 2). These data support that rPmLGBP is a PRP that can bind specifically to both LPS and β -1,3-glucan.

PmLGBP Enhanced Phenoloxidase Activity after β -1,3-Glucan or LPS Binding in Vitro—To understand the mechanisms of PAMP binding and proPO activation, incubation of HLS, which contains zymogen proteins involved in the proPO system, with rPmLGBP together with PAMP was investigated. In the pres-

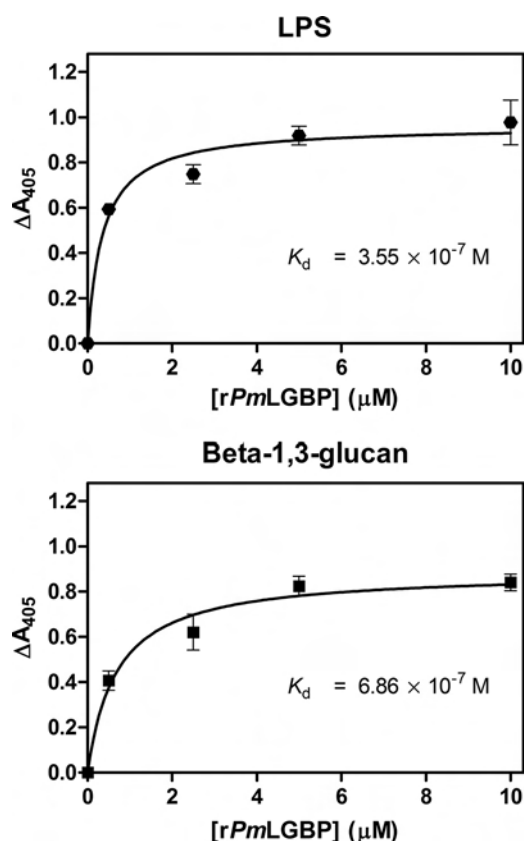


FIGURE 2. Binding of the rPmLGBP protein to the two microbial cell wall components, LPS and laminarin (β -1,3-glucan). Data show the quantitative binding of rPmLGBP (0–10 μ M) to immobilized LPS or β -1,3-glucan, as determined by ELISA. Data are shown as the mean $\pm$ 1 S.D. (error bars) of three individual experiments. The data were curve-fitted using a single-site binding model with $R^2 = 0.94$ for LPS ($K_d = 3.55 \pm 1.03 \times 10^{-7}$ M) and $R^2 = 0.94$ for β -1,3-glucan ($K_d = 6.86 \pm 1.86 \times 10^{-7}$ M).

ence of either laminarin (a β -1,3-glucan) or LPS, but not in the presence of PGN (Fig. 3D) or in their absence, rPmLGBP significantly enhanced the PO activity of HLS by 72% (Fig. 3B) and 88% (Fig. 3C), respectively, compared with the control groups (nonactivated HLS; Fig. 3A). On the other hand, incubation of HLS with either laminarin or LPS in the absence of rPmLGBP showed only a numerically slightly higher PO activity than the control group, which was not statistically significant ($p > 0.05$).

Effect of in Vivo Gene Silencing of PmLGBP and PmproPO on Expression of Shrimp Immune Genes—To investigate the involvement of *PmLGBP* in the shrimp proPO system, dsRNA-mediated gene knockdown of *PmLGBP* transcripts was performed. The semiquantitative RT-PCR analysis showed that the *PmLGBP* transcript level was specifically decreased in *PmLGBP*-silenced shrimp, whereas injection of the GFP dsRNA had no significant effect on the transcript levels of *PmLGBP* compared with the SSS-injected control shrimp (Fig. 4A). Immunoblotting results suggested *PmLGBP* dsRNA also could suppress *PmLGBP* at the protein level (Fig. 4B).

To examine the effect, if any, of *PmLGBP* transcript expression disruption on the expression of other immune genes, cDNA samples that exhibited a *PmLGBP* gene silencing were analyzed further by RT-PCR for the transcript expression levels of the other genes. Silencing of the *PmLGBP* gene had no significant effect on the transcript expression levels of any of the

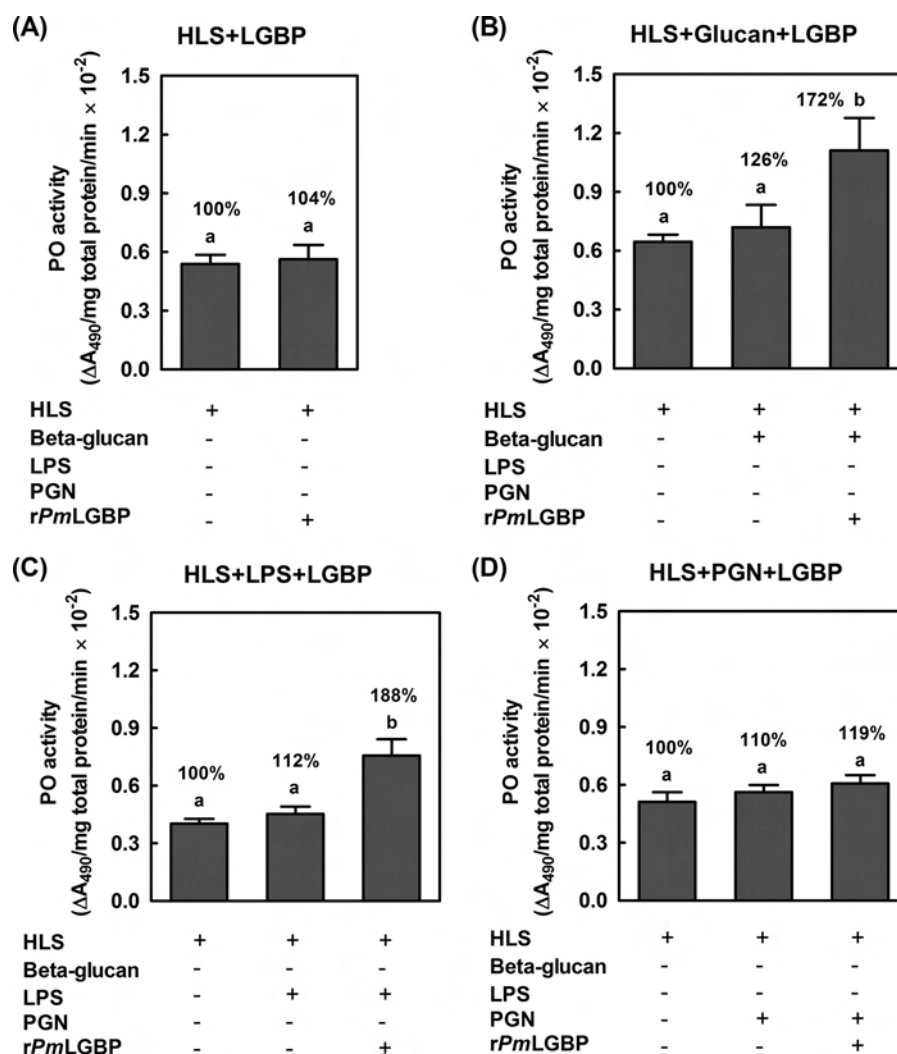


FIGURE 3. Enhancement of PO activity by laminarin or LPS in the presence of rPmLGBP. The proPO activation of shrimp HLS by rPmLGBP alone (A) or after preincubation *in vitro* with β -1,3-glucan (laminarin) (B), LPS (C), or PGN (D). PO activity was defined as ΔA_{490} /mg of total protein per min. The data are shown as the mean $\pm$ 1 S.D. (error bars) and are derived from three independently replicated experiments. Means with a different lowercase letter (above each bar) are significantly different at the $p < 0.05$ level.

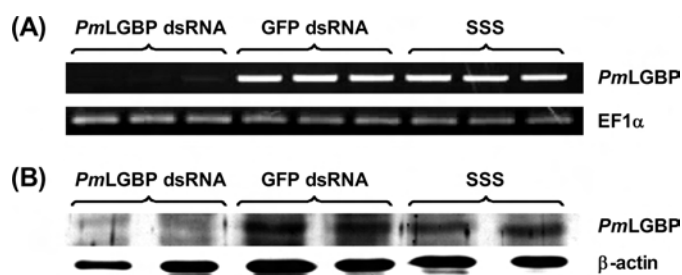


FIGURE 4. RNAi-mediated suppression of PmLGBP resulted in a reduction of PmLGBP transcript and protein levels of *P. monodon*. The efficiency of dsRNA-mediated gene silencing of PmLGBP transcripts (A) and proteins (B) after the dsRNA injection was examined using semiquantitative RT-PCR and Western blot analysis. Shrimp injected with GFP dsRNA in SSS or with SSS alone served as controls. EF1 α was used as the internal reference gene for RT-PCR whereas β -actin was used as a loading control for Western blot analysis. In the shown gel, the lanes for each condition represent the results from individual shrimp.

other tested *P. monodon* shrimp genes from the proPO system (PmpoPO1, PmpoPO2, PmPPAE1, and PmPPAE2), antimicrobial peptides (PEN3, Crus-likePm, SWDPm2, and lysozyme) or the Toll receptor (Fig. 5).

Furthermore, we performed the gene silencing of proPO genes (PmpoPO1 and PmpoPO2) (34) and also examined the effect of gene silencing on the gene expression levels of immune genes. We found that the knockdown of proPO genes significantly decreased the transcription of two genes in proPO system (PmLGBP and PmPPAE2) and two antimicrobial peptides (PEN3 and Crus-likePm) (Fig. 5). This result suggests that the proPOs not only contributes to control the expression of genes in proPO cascade but also AMPs in shrimp.

Double Strand RNAi-mediated Knockdown of PmLGBP Transcript Resulted in Reduction of Hemolymph Phenoloxidase Activity—To determine the importance of any role of PmLGBP in the shrimp proPO system, the hemolymph from PmLGBP knockdown shrimp was subjected to a PO activity assay. A significant reduction in the PO activity to 53% of that of the control (PAMP-stimulated shrimp) was observed in the PmLGBP knockdown shrimp, whereas no significant change in the PO activity (101%) was observed in the GFP dsRNA injected shrimp (Fig. 6). The results of basal PO activity in normal (PAMP-unstimulated) shrimp clearly showed no significant difference of PO activities of

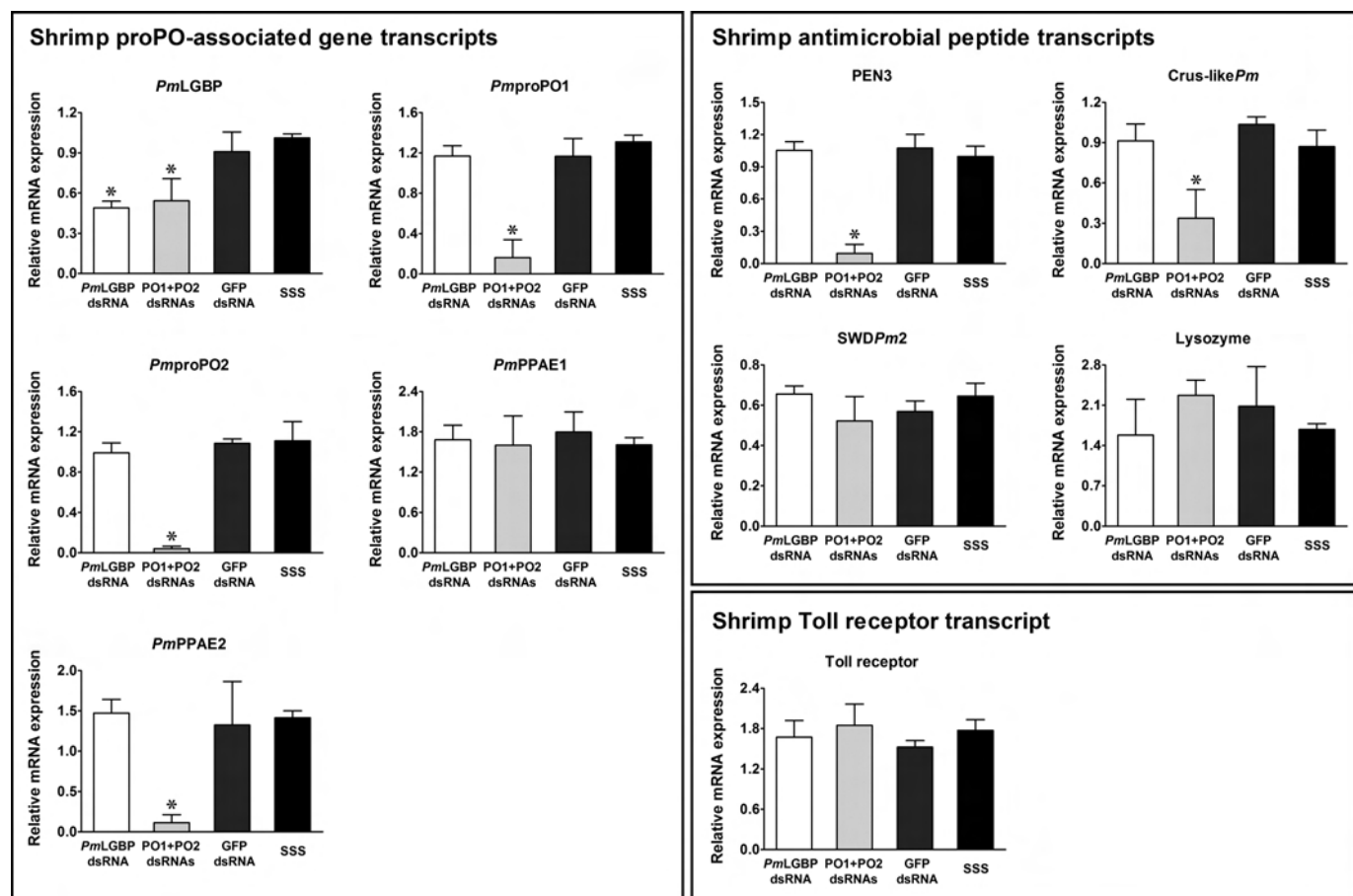


FIGURE 5. Effect of RNAi-mediated suppression of *PmLGBP* and *PmproPOs* on gene expression of the shrimp antimicrobial peptides, proPO-associated gene, and Toll receptor after. The effect of gene knockdown on the expression level of *P. monodon* shrimp antimicrobial peptide transcripts (PEN3, Crus-likePm, SWDPm2, and lysozyme), genes involved in the proPO system (*PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1*, and *PmPPAE2*), and the Toll receptor were evaluated by semiquantitative RT-PCR using the gene-specific primers for each gene (Table 1). EF1 α served as the internal reference gene to normalize the amount of cDNA template. The average relative expressions are representative of three independent repeats $\pm$ 1 S.D. (error bars). Significant difference compared with control is indicated by an asterisk ($p < 0.05$).

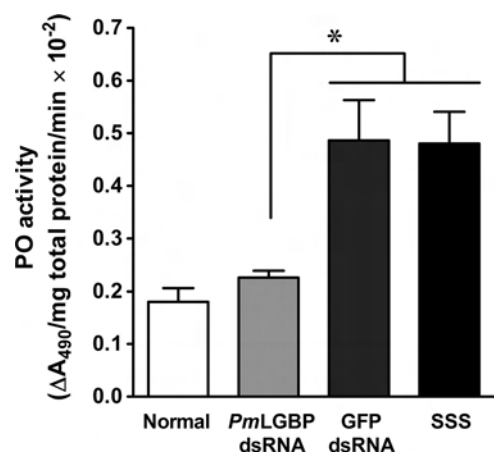


FIGURE 6. RNAi-mediated silencing of *PmLGBP* gene significantly decreased the hemolymph PO activity in shrimp. Hemolymph was collected at 48 h after the second dsRNA (or SSS) injection. The PO activity of normal shrimp hemolymph was used as the basal activity in PAMP-unstimulated shrimp. The total hemolymph PO activity was defined as $\Delta A_{490}/\text{mg}$ of total protein per min. The data are shown as the mean $\pm$ 1 S.D. (error bars) and are derived from three independently replicated experiments. Significant difference compared with control is indicated by an asterisk ($p < 0.05$).

both normal shrimp and *PmLGBP* knockdown shrimp (Fig. 6). Thus, *PmLGBP* is a PRP member that functions in the shrimp proPO system.

DISCUSSION

The proPO system is an important component of the immune reaction in the host defense against microbial or parasitic infections in many arthropods (5, 8, 9). The first process of the proPO system is to detect the PAMPs, such as LPS, lipoteichoic acid, β -1,3-glucan and PGN molecules of the pathogens. LGBP is an important PRP in crustaceans. In crayfish, LGBP has been demonstrated to be a required PRP for the activation of the proPO system (27). However, the role of shrimp LGBPs in the proPO activating system is still somewhat elusive and poorly elucidated.

In the black tiger shrimp, *P. monodon*, the first LGBP gene (previously named bGBP) was reported to be constitutively expressed in the hemocyte and to exhibit binding to β -1,3-glucan but not to LPS (33). In this study, we report on the further functional characterization of the LGBP from *P. monodon* (*PmLGBP*). After analysis, we found that the high nucleotide and deduced amino acid sequence identity (99%) of *PmLGBP* and the previously reported bGBP from *P. monodon* (33) suggest that they are allelic variants of the same gene.

In crustaceans, hemocytes play an important role in the immune response against pathogens. Several defense molecules in the shrimp proPO system are synthesized in hemo-

cytes, including the proPO genes (34) and PPAEs (35, 36). In the present study, semiquantitative RT-PCR analysis revealed that *PmLGBP* transcripts were only detected in hemocytes, consistent with that reported previously for bGBP in *P. monodon* (a likely allelic variant of *PmLGBP*) (33). In other crustacean species, where the tissue distribution of LGBP has been investigated, LGBP transcripts are expressed mainly in the hemocytes of crayfish (27) and shrimp (29–32). Moreover, in shrimp *F. chinensis* both LGBP mRNA and protein were reported to be synthesized mainly in the granular hemocytes and located on the hemocyte surface, respectively (30).

In the present study, the response of *PmLGBP* expression to systemic infection with the Gram-negative bacteria *V. harveyi* was investigated. The expression of *PmLGBP* mRNA did not significantly change at 6–12 hpi, but was increased significantly (4.77-fold) at 24 hpi and then dropped to near the initial level at 48–72 hpi. Similarly, the *P. monodon* LGBP (bGBP) showed no change in transcriptional levels within 12 h after heat-killed *V. harveyi* and curdlan (a β -1,3-glucan) injection (33). Moreover, in *M. japonicus*, LGBP mRNA was up-regulated in hemocytes at 12–48 h after LPS challenge (32). In contrast, in *L. vannamei*, LGBP transcript levels were significantly up-regulated in hemocytes at 3 and 6 hpi and then returned to the original level at 12–24 hpi with live *Vibrio alginolyticus* (29). In *F. chinensis*, *FcLGBP* was significantly up-regulated at 6 hpi but returned to the original level at 12–24 hpi with a mixture of heat-killed *V. anguillarum* and *S. aureus* (31). The differences in LGBP transcript expression could be due to variations between the response to live and dead pathogen cells or to different microorganisms and so cell wall components, in addition to differences between host species or strains.

PRP receptors are essential molecules that have an ability to recognize and initiate the host defense mechanism, especially in the activation of the proPO cascade in many invertebrate species. However, in shrimp, no PRPs that activate the proPO system have been described. LPS and PGN are the major cell wall components of Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, whereas β -1,3-glucan is a major component of fungal cell walls. In crustaceans, including shrimp and crayfish, the activation of the proPO system can be triggered upon recognition of LPS, PGN, and β -1,3-glucans (27, 41). To investigate the binding activity of *rPmLGBP* to these microbial elicitors, we examined the binding activity of *rPmLGBP* to LPS, PGN, and β -1,3-glucan and found a high affinity binding to both LPS and β -1,3-glucan, but not to the L-lysine-type PGN. Thus, *PmLGBP* may only serve as a PRP receptor for LPS and β -1,3-glucan. According to the assumption of a single-site binding model, the apparent K_d value of *rPmLGBP* for LPS ($K_d = 3.55 \pm 1.03 \times 10^{-7}$ M) is approximately 2-fold lower than that of β -1,3-glucan ($K_d = 6.86 \pm 1.86 \times 10^{-7}$ M), and so the binding of *rPmLGBP* to LPS is ~2-fold tighter than to β -1,3-glucan. These binding constants are in broad agreement with the K_d values obtained from other known PRPs that have previously been reported to be involved in the activation of the proPO system, including the K_d values obtained from the *Man-duca sexta* β -1,3-glucan-recognition protein ($K_d = 1.5 \times 10^{-6}$ M for *Saccharomyces cerevisiae* and 1.2×10^{-6} M for *E. coli*) (42)

and *M. sexta* microbe-binding protein ($K_d = 3.77 \pm 0.90 \times 10^{-8}$ M for LPS) (43).

In contrast, *P. monodon* LGBP (as bGBP) was reported to bind to β -1,3-glucan only and not LPS when using a pulldown assay (33). However, it is unclear whether this apparent different LPS binding activity is due to the different experimental assay systems used. In comparison, the results presented here correlate well with the binding data of the LGBPs from other crustacean species. In the crayfish *P. leniusculus*, a purified LGBP protein exhibited binding activity to both LPS and β -1,3-glucans (laminarin and curdlan) but could not bind to PGN (27). In *F. chinensis*, rLGBP exhibited a stronger binding activity to Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae*) than that of *E. coli*, or Gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus* and *Bacillus megaterium*) and yeast (*Pichia pastoris*) (30). In the scallop *Chlamys farreri*, rLGBP exhibited a strong binding to LPS and β -1,3-glucan and a moderate binding to PGN and also showed an agglutination activity toward the Gram-negative bacteria *E. coli*, the Gram-positive bacteria *B. subtilis*, and the fungus *P. pastoris* (44). Significantly, all of these data indicate that LGBP functions as a PRP in invertebrates and that the binding of these proteins is involved in the recognition of invading microorganisms to activate the host immune defense and the proPO-activating system.

To confirm that *rPmLGBP* could activate PO activity, the *rPmLGBP* protein was incubated with either LPS or β -1,3-glucan, where it was found to trigger the PO activity in HLS (cell-free hemolymph) in the presence of LPS or β -1,3-glucan. In accord, the LGBP protein from the crayfish *P. leniusculus* was reported to bind to both LPS and β -1,3-glucan and activates the proPO system (27). Sequence alignment of the shrimp *PmLGBP* and the crayfish *PiLGBP* indicated that the amino acid sequence of the domains that are believed to be responsible for LPS and β -1,3-glucan binding are highly conserved. These regions are composed of the polysaccharide binding motif, glucanase motif, and β -glucan recognition motif (32). Recently, two serine proteinase homologues (*PiSPH1* and *PiSPH2*) and *PiLGBP* from *P. leniusculus* have been reported to be involved in the PGN-induced proPO activation, and that *PiSPH1* may act as a PGN-binding protein and *PiSPH2* and *PiLGBP* probably function as cofactors in a PGN-binding complex (41). In the insect *M. sexta*, immunectin-2 specifically binds with LPS and is involved in stimulating the proPO activation system (45). Moreover, a β -1,3-glucan recognition protein and a β -1,3-glucan recognition protein-2 of *M. sexta* were found to bind and to aggregate the bacterial and fungal cell wall components and to stimulate the proPO pathway (42, 46). In addition, microbe-binding protein, a β -1,3-glucanase-related protein from *M. sexta*, specifically binds to lipoteichoic acid, LPS, and a diamino-pimelic acid-type PGN from *E. coli* and *B. subtilis*, and this binding is involved in triggering the insect proPO system (43). Consistent with this is that in this study reported here in *P. monodon*, the knockdown of *PmLGBP* transcript levels significantly decreased the enzymatic PO activity. Overall, our data support that *PmLGBP* functions as a PRP that can recognize LPS and β -1,3-glucan and activate the proPO system.

In *Drosophila*, the Gram-negative-binding protein1 (GNBP1), a PRP, is required for Toll activation in response to Gram-posi-

tive bacterial infection. Silencing of *GNBP1* reduces the induction of *Drosomycin*, an antifungal peptide, after Gram-positive bacteria infection but not after fungal infection (47). In the shrimp *L. vannamei*, knockdown of the Toll-like receptor did not significantly alter the transcript expression levels of a crustin antimicrobial peptide (48). In this study, RNAi treatment significantly repressed the mRNA expression of *PmLGBP*, but this had no apparent effect on the expression level of any of the immune defense genes (antimicrobial peptides, proPO system, and Toll receptor) tested in this study. These results suggest that the expression of these antimicrobial peptides is independent of *PmLGBP* signaling pathway or that these are redundant and that the expression of these genes is compensated through alternative signaling pathways of PRPs. Surprisingly, mRNA expressions of some genes in proPO cascade, and antimicrobial peptides were significantly decreased in proPO gene-silenced shrimp, which is consistent with the previous report (49), which demonstrated that silencing of kuruma shrimp proPO results in down-regulation of AMP transcripts (penaeidin, crustin, and lysozyme). The down-regulated expression of these genes in proPO-silenced shrimp illustrated that proPO are not only involved in expression of genes in proPO cascade but also in antimicrobial peptide.

In conclusion, our *in vitro* and *in vivo* results clearly demonstrate for the first time that *PmLGBP* is a PRP involved in the shrimp proPO system, exhibits LPS and β -1,3-glucan binding activity, and can activate the proPO system.

Acknowledgments—We thank Dr. Robert Douglas John Butcher at the Publication Counseling Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for English language corrections of this manuscript. We thank Prof. K. Söderhäll and Dr. K. Sritunyalucksana for providing LGBP antibody.

REFERENCES

- Iwanaga, S., and Lee, B. L. (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 128–150
- Kanost, M. R., Jiang, H., and Yu, X. Q. (2004) Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.* **198**, 97–105
- Imler, J. L., and Bulet, P. (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy* **86**, 1–21
- Hancock, R. E., and Sahl, H. G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1551–1557
- Cerenius, L., Lee, B. L., and Söderhäll, K. (2008) The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* **29**, 263–271
- Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216
- Sritunyalucksana, K., and Söderhäll, K. (2000) The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* **191**, 53–69
- Cerenius, L., and Söderhäll, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 116–126
- Kanost, M. R., and Gorman, M. J. (2008) *Phenoloxidase in insect immunity*. In *Insect Immunology* (Beckage, N. E., ed.) pp. 69–96, Academic Press, San Diego, CA
- Nappi, A. J., and Christensen, B. M. (2005) Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 443–459
- Zhao, P., Li, J., Wang, Y., and Jiang, H. (2007) Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**, 952–959
- Cerenius, L., Babu, R., Söderhäll, K., and Jiravanichpaisal, P. (2010) *In vitro* effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, 21–23
- Yoshida, H., Kinoshita, K., and Ashida, M. (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **271**, 13854–13860
- Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., and Kurata, S. (2002) Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 13705–13710
- Yu, X. Q., Zhu, Y. F., Ma, C., Fabrick, J. A., and Kanost, M. R. (2002) Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1287–1293
- Lee, M. H., Osaki, T., Lee, J. Y., Baek, M. J., Zhang, R., Park, J. W., Kawabata, S., Söderhäll, K., and Lee, B. L. (2004) Peptidoglycan recognition proteins involved in 1,3- β -D-glucan-dependent prophenoloxidase activation system of insect. *J. Biol. Chem.* **279**, 3218–3227
- Park, J. W., Je, B. R., Piao, S., Inamura, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Söderhäll, K., Ha, N. C., and Lee, B. L. (2006) A synthetic peptidoglycan fragment as a competitive inhibitor of the melanization cascade. *J. Biol. Chem.* **281**, 7747–7755
- Kan, H., Kim, C. H., Kwon, H. M., Park, J. W., Roh, K. B., Lee, H., Park, B. J., Zhang, R., Zhang, J., Söderhäll, K., Ha, N. C., and Lee, B. L. (2008) Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. *J. Biol. Chem.* **283**, 25316–25323
- Charroux, B., Rival, T., Narbonne-Reveau, K., and Royet, J. (2009) Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes Infect.* **11**, 631–636
- Sumathipala, N., and Jiang, H. (2010) Involvement of *Manduca sexta* peptidoglycan recognition protein-1 in the recognition of bacteria and activation of prophenoloxidase system. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 487–495
- Yu, X. Q., and Kanost, M. R. (2004) Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 891–900
- Yu, X. Q., Ling, E., Tracy, M. E., and Zhu, Y. (2006) Immulectin-4 from the tobacco hornworm *Manduca sexta* binds to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Insect Mol. Biol.* **15**, 119–128
- Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Palva, E. T., Iwanaga, S., and Söderhäll, K. (1994) Structure and biological activity of a 1,3- β -D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.* **269**, 29462–29467
- Romo-Figueroa, M. G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundo, R. R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Söderhäll, K., and Yepiz-Plascencia, G. (2004) Molecular cloning of a β -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 713–726
- Beschin, A., Bilej, M., Hanssens, F., Raymakers, J., Van Dyck, E., Revets, H., Brys, L., Gomez, J., De Baetselier, P., and Timmermans, M. (1998) Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J. Biol. Chem.* **273**, 24948–24954
- Kim, Y. S., Ryu, J. H., Han, S. J., Choi, K. H., Nam, K. B., Jang, I. H., Lemaitre, B., Brey, P. T., and Lee, W. J. (2000) Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and β -1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 32721–32727
- Lee, S. Y., Wang, R., and Söderhäll, K. (2000) A lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: purification, characterization, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* **275**, 1337–1343
- Roux, M. M., Pain, A., Klimpel, K. R., and Dhar, A. K. (2002) The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein gene is up-regulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J. Virol.* **76**,

- 7140–7149
29. Cheng, W., Liu, C. H., Tsai, C. H., and Chen, J. C. (2005) Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **18**, 297–310
30. Du, X. J., Zhao, X. F., and Wang, J. X. (2007) Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mol. Immunol.* **44**, 1085–1094
31. Liu, F., Li, F., Dong, B., Wang, X., and Xiang, J. (2009) Molecular cloning and characterization of a pattern recognition protein, lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Biol. Rep.* **36**, 471–477
32. Lin, Y. C., Vaseeharan, B., and Chen, J. C. (2008) Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 1260–1269
33. Sritunyalucksana, K., Lee, S. Y., and Söderhäll, K. (2002) A β -1,3-glucan-binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* **26**, 237–245
34. Amparyup, P., Charoensapsri, W., and Tassanakajon, A. (2009) Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 247–256
35. Charoensapsri, W., Amparyup, P., Hirono, I., Aoki, T., and Tassanakajon, A. (2009) Gene silencing of a prophenoloxidase-activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 811–820
36. Charoensapsri, W., Amparyup, P., Hirono, I., Aoki, T., and Tassanakajon, A. (2011) PmPPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 115–124
37. Amparyup, P., Wiriyaukaradecha, K., Charoensapsri, W., and Tassanakajon, A. (2010) A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 168–176
38. Amparyup, P., Jitvaropas, R., Pulsook, N., and Tassanakajon, A. (2007) Molecular cloning, characterization, and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* **22**, 535–546
39. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45
40. Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., and Tassanakajon, A. (2008) Molecular cloning, genomic organization, and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol. Immunol.* **45**, 1085–1093
41. Liu, H., Wu, C., Matsuda, Y., Kawabata, S., Lee, B. L., Söderhäll, K., and Söderhäll, I. (2011) Peptidoglycan activation of the proPO-system without a peptidoglycan receptor protein (PGRP)? *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 51–61
42. Ma, C., and Kanost, M. R. (2000) A β -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *J. Biol. Chem.* **275**, 7505–7514
43. Wang, Y., Sumathipala, N., Rayaprolu, S., and Jiang, H. (2011) Recognition of microbial molecular patterns and stimulation of prophenoloxidase activation by a β -1,3-glucanase-related protein in *Manduca sexta* larval plasma. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 322–331
44. Yang, J., Qiu, L., Wang, L., Wei, X., Zhang, H., Zhang, Y., Liu, L., and Song, L. (2010) CflGBP, a pattern recognition receptor in *Chlamys farreri* involved in the immune response against various bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* **29**, 825–831
45. Yu, X. Q., and Kanost, M. R. (2000) Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to Gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* **275**, 37373–37381
46. Jiang, H., Ma, C., Lu, Z. Q., and Kanost, M. R. (2004) β -1,3-Glucan recognition protein-2 (β GRP-2) from *Manduca sexta*: an acute-phase protein that binds β -1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 89–100
47. Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2004) *In vivo* RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J. Biol. Chem.* **279**, 12848–12853
48. Han-Ching Wang, K., Tseng, C. W., Lin, H. Y., Chen, I. T., Chen, Y. H., Chen, Y. M., Chen, T. Y., and Yang, H. L. (2010) RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 49–58
49. Fagutao, F. F., Koyama, T., Kaizu, A., Saito-Taki, T., Kondo, H., Aoki, T., and Hirono, I. (2009) Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS J.* **276**, 5298–5306



PmPPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation

Walaiporn Charoensapsri^a, Piti Amparyup^{a,b}, Ikuo Hirono^c, Takashi Aoki^c, Anchalee Tassanakajon^{a,*}

^a Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

^b National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

^c Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4-5-7, Minato-ku 108-8477, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2010

Received in revised form 2 September 2010

Accepted 2 September 2010

Available online 20 September 2010

Keywords:

Shrimp

Penaeus monodon

Prophenoloxidase activating enzyme

Clip-domain serine proteinase

ProPO system

ABSTRACT

The prophenoloxidase (proPO) activating system plays an important role in the defense against microbial invasion in invertebrates. In the present study, we report a second proPO-activating enzyme (designated *PmPPAE2*) from the hemocytes of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *PmPPAE2* contained the structural features of the clip domain serine proteinase family and exhibited 51% amino acid sequence similarity to the insect *Manduca sexta* PAP-1. Amino acid sequence alignment with the available arthropod PPAAE sequences demonstrated that *PmPPAE2* is a new class of crustacean PPAAE. Transcript expression analysis revealed that *PmPPAE2* transcripts were mainly expressed in hemocytes. Double-stranded RNA-mediated suppression of *PmPPAE2* transcript levels resulted in a significant decrease in the total hemolymph PO activity (41%) and also increased the shrimp's susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. Genomic organization analysis revealed that *PmPPAE1* and *PmPPAE2* are encoded by different genomic loci. The *PmPPAE1* gene consists of ten exons and nine introns, whilst *PmPPAE2* comprises of eight exons interrupted by seven introns. Analysis of the larval developmental stage expression of the four key genes in the shrimp proPO system (*PmPPAE1*, *PmPPAE2*, *PmproPO1* and *PmproPO2*) revealed that *PmPPAE1* and *PmproPO2* transcripts were expressed in all larval stages (nauplius, protozoa, mysis and post-larvae), whilst *PmPPAE2* and *PmproPO1* transcripts were mainly presented in the late larval developmental stages (mysis and post-larvae). These results suggest that the *PmPPAE2* functions as a shrimp PPAAE and possibly mediates the activation of *PmproPO1*.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The innate immune system, which is the first line of the host defense against microbial infections in many invertebrates, mainly consists of several defense mechanisms, such as phagocytosis, nodule formation, encapsulation, antimicrobial peptides, the clotting system and melanization by the activation of the prophenoloxidase (proPO) activating system (Jiravanichpaisal et al., 2006; Loker et al., 2004). The proPO activating system is considered to be an important innate defense mechanism in invertebrate immunity. Recognition of the certain microbial cell surface molecules, such as peptidoglycans or lipopolysaccharides from bacteria and β -1,3-glucans from fungi, triggers the proPO activation to form and deposit melanin at the infection site or around the invading microorganisms (Cerenius and Söderhäll, 2004; Kanost and Gorman, 2008; Labbé and Little, 2009; Rao et al., 2010;

Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000). Phenoloxidase (PO), a key enzyme in the melanization cascade, is usually synthesized and released into the hemolymph as the inactive zymogen prophenoloxidase (proPO). It is activated by the proteolytic cleavage into the active PO, which then PO catalyzes the initial step of the melanin biosynthesis pathway by hydroxylation of monophenols into *o*-diphenols and further oxidation *o*-diphenols into *o*-quinones, which can nonspecifically cross-link neighboring molecules to form the insoluble melanin (Cerenius and Söderhäll, 2004; Nappi and Christensen, 2005; Zhao et al., 2007). The highly toxic quinone substances and other reactive oxygen intermediates generated during the proPO activation could also directly kill and clear the invading microorganisms (Cerenius et al., 2010; Nappi and Christensen, 2005; Zhao et al., 2007).

The proteolytic cleavage of the inactive proPO into the active PO is a regulated event and is mediated by the limited proteolysis of a clip-domain serine proteinase (clip-SP) cascade of which the terminal clip-SP that carries out the proteolysis of the proPO precursor is the proPO-activating enzyme (PPAE) (Charoensapsri et al., 2009; Gupta et al., 2005; Jiang et al., 1998, 2003a,b; Jiang and

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 5439; fax: +66 2 218 5414.

E-mail address: anchalee.k@chula.ac.th (A. Tassanakajon).

Kanost, 2000; Lee et al., 1998a,b; Satoh et al., 1999; Wang et al., 2001). PPAEs are members of clip-SP family since they contain a regulatory clip domain at the N-terminus followed by a catalytic C-terminal trypsin-like domain (Piao et al., 2005). All PPAEs are produced and maintained as a zymogen and become proteolytically active in the presence of elicitors, such as microbial products and additional protein components of the proPO system (Cerenius et al., 2008; Cerenius and Söderhäll, 2004).

Several PPAE genes have been identified and characterized in many arthropod species, including the insects *Bombyx mori*, *Holotrichia diomphalia* and *Manduca sexta*, the crayfish *Pacifastacus leniusculus* and the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Charoensapsri et al., 2009; Gupta et al., 2005; Jiang et al., 1998, 2003a,b; Kim et al., 2002; Kwon et al., 2000; Lee et al., 1998a,b; Satoh et al., 1999; Tang et al., 2006; Wang et al., 2001; Wang and Jiang, 2004; Yu et al., 2003). Two or more PPAE genes are known to exist in many insect species (Cerenius and Söderhäll, 2004), but in most crustacean species, only a single PPAE gene has been reported (Charoensapsri et al., 2009; Wang et al., 2001).

Previously, a PPAE cDNA was cloned from the shrimp, *P. monodon*, and functional characterization suggested that this gene (*PmPPAE1*) functions in the shrimp proPO system and is likely to be an important component in the shrimp immune defense (Charoensapsri et al., 2009). In this study, a novel PPAE, designated *PmPPAE2*, was discovered. The involvement of *PmPPAE2* in the proPO system activation and shrimp immune response was investigated by using dsRNA-mediated gene silencing. The two *PmPPAE* genes were further characterized for their exon–intron organization to establish their genetic relatedness. The expression profile of the two PPAEs (*PmPPAE1* and *PmPPAE2*) and the two proPOs (*PmproPO1* and *PmproPO2*) during different larval developmental stages was also elucidated and compared.

2. Materials and methods

2.1. Animal and sample preparation

Healthy black tiger shrimps, *P. monodon*, of about 20 g weight were purchased from a local shrimp farm in Thailand and maintained in aerated seawater (20 ppt) for at least 7 days prior to the experiment. Shrimps were carefully dissected on ice and the hepatopancreas, gill, lymphoid organ, intestine and heart tissues were collected separately and the same tissues were pooled from three shrimps for subsequent total RNA extraction. The hemolymph was collected in an anticoagulant solution of 10% (w/v) trisodium citrate dihydrate (pH 4.6). Hemocytes were isolated from the freshly collected hemolymph by centrifugation at 800 × g for 10 min at 4 °C. To determine the gene expression in the different developmental stages, three individual shrimp larvae from each of four different larval developmental stages, that is the nauplius 3 (N3), protozoa 2 (Z2), mysis 2 (M2) and post-larvae 15 (PL15), were collected. All samples were snap-frozen in liquid nitrogen immediately and stored at –80 °C until used for RNA isolation.

2.2. Total RNA isolation and genomic DNA extraction

Total RNA samples were isolated from the various tissues of *P. monodon* using the TRI REAGENT® (Molecular Research Center, USA) according to the manufacturer's protocol. Remnants of any potentially contaminating genomic DNA were eliminated by RQ1 RNase-free DNase I (Promega, USA) treatment. First-strand cDNA syntheses were performed using the ImProm-II™ Reverse Transcriptase System kit (Promega, USA) according to the supplier's instructions with 1.5 µg of total RNA and 0.5 µg of oligo(dT)₁₅ primer. Genomic DNA was extracted from the pleopod of individual shrimp using a standard phenol/chloroform method.

Table 1
Nucleotide sequences of the primers used.

Primer	Sequence (5'–3')	GenBank accession number
<i>RT-PCR and RACE-PCR</i>		
PPAE-SP-F	5'-CGATACGTCYTGACSGCSGCNCAYTG-3'	–
PPAE-SP-R	5'-TGCATGTGCGGRCRCRCRGARTCNCC-3'	–
PPAE2-F1	5'-ATCCGTCTCGGCGAATACGACTTCTCCA-3'	FJ620685
PPAE2-F2	5'-CCTGAGCAAGTCGTCCTCCATC-3'	FJ620685
PPAE2-R1	5'-GCCCTCTCTGTATGTGTCGCCAGCCAATC-3'	FJ620685
PPAE2-R2	5'-GAAGGAGCCGACGTTTAAGCCA-3'	FJ620685
<i>RT-PCR and PCR</i>		
5PPAE2-F	5'-ACGCGGGAGGGAGCAGCTAC-3'	FJ620685
3PPAE2-R	5'-AGATAACTAGATAGGCTGATTACGA-3'	FJ620685
PPAE2-F	5'-ATGCACTACCGGTTCCACGATC-3'	FJ620685
PPAE2-R	5'-CTAAGGTTGAGATTCTGCACG-3'	FJ620685
PmPPAE1-F	5'-ATGAAGGCGGTGACGGTGGTTCTATG-3'	FJ595215
PmPPAE1-R	5'-CTCTTCTTCAAGCTCACCATTCTATCT-3'	FJ595215
PmSP1rt-F	5'-TGAGAGCACAAATAGTGGAGGGGTA-3'	FJ620688
PmSP1rt-R	5'-TGGAGGCAGGCACACAGGCAAC-3'	FJ620688
PmSP2rt-F	5'-GGCGTTGGTCTTCACTGCTCTC-3'	FJ620687
PmSP2rt-R	5'-CAGAAGTCCCTCCAGGATAG-3'	FJ620687
PmSPH1rt-F	5'-TACGTACTCATTGATATCAGGTTTGG-3'	DQ455050
PmSPH1rt-R	5'-GCCTCGTTATCTTGAATCCAGTGA-3'	DQ455050
PmSPH2rt-F	5'-CCGTGAACCAGCGATGCTCTTA-3'	FJ620686
PmSPH2rt-R	5'-GCCACACTCCGCTGCTCCG-3'	FJ620686
PmSPH3rt-F	5'-GCTCTTGGTGCTGCCGCTGTG-3'	FJ62068
PmSPH3rt-R	5'-CACCGTCCAGCAGGTAATA-3'	FJ62068
PO1RT-F	5'-GGTCTTCCCTCCGCTTCG-3'	AF099741
PO1RT-R	5'-GCCGAGGTCCTTTGGCAGC-3'	AF099741
PO2RT-F	5'-GCCAAGGGGAACGGGTGATG-3'	FJ025814
PO2RT-R	5'-TCCCTCATGGCGGTGAGGT-3'	FJ025814
EF1α-F	5'-GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC-3'	–
EF1α-R	5'-CGTCCGGTGATCATGTCTTGATG-3'	–
<i>RNAi</i>		
PmPPAE2i-F	5'-GCGGCGGTCACGCTCCTTGTC-3'	FJ620685
PmPPAE2i-R	5'-ACTCTCGGGGACGCTTGTTG-3'	FJ620685
T7PmPPAE2i-F	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCGGCGGTACGCTCCTTGTTG-3'	FJ620685
T7PmPPAE2i-R	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGACTCTCGGGGACGCTTGTTG-3'	FJ620685
PPAi-F	5'-CGTCTGCTTATTGAGGGAGTG-3'	FJ595215
PPAi-R	5'-GTAGTAGATGGTCCCCAGCT-3'	FJ595215
T7PPAi-F	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGTCTGCTTATTGAGGGAGTG-3'	FJ595215
T7PPAi-R	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTAGTAGATGGTCCCCAGCT-3'	FJ595215
GFP-F	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'	U55761
GFP-R	5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'	U55761
GFPT7-F	5'-TAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'	U55761
GFPT7-R	5'-TAATACGACTCACTATAGGTTACTGTACAGCTCGTCCA-3'	U55761

2.3. cDNA cloning and nucleotide sequencing of *PmPPAE2*

Total RNA and cDNA were prepared from the hemocytes of healthy shrimps as described above. The resulting hemocyte cDNA was used as a template for the PCR amplification of a *PmPPAE2* gene fragment using a pair of degenerate primers (PPAE-SP-F/-R) (Table 1), designed from the conserved amino acid sequence of the other known arthropod PPAE genes. The PCR amplification reaction and DNA fragment cloning were carried as described (Charoensapsri et al., 2009). Plasmid DNA was then prepared and commercially sequenced on both strands to obtain the consensus sequence (Macrogen Inc., Korea).

2.4. Rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR

RACE-PCR was performed to obtain the full-length cDNA sequence of *PmPPAE2*. Gene specific primers (PPAE2-F1/-R1 and PPAE2-F2/-R2 for first and second amplifications, respectively)

(Table 1) were designed according to the obtained *PmPPAE2* fragment sequence (Section 2.3). The 3' and 5' RACE analysis was carried out using the SMART™ RACE cDNA amplification kit (Clontech, USA) following the manufacturer's instructions and the PCR amplification was carried out as previously described (Amparyup et al., 2007). The PCR products were gel purified, cloned, and sequenced (as Section 2.3). The obtained cDNA sequence was used to design the gene specific primers (5PPAE2-F/3PPAE2-R) (Table 1) for amplification of the complete full-length *PmPPAE2* cDNA sequence using *Pfu* DNA polymerase (Promega, USA). The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 94 °C for 3 min followed by 25 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 3 min. The final extension step was performed at 72 °C for 10 min. The generated DNA fragments were purified, cloned and commercially sequenced (as Section 2.3).

2.5. Sequence analysis

The cDNA and deduced amino acid sequence of *PmPPAE2* were analyzed by the GENETYX 7.0 program (GENETYX corporation) and the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). The putative signal peptide cleavage site and the structural protein domains were predicted by SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and simple modular architecture research tool (SMART) the program (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), respectively. Multiple amino acid sequence alignment was carried out using the ClustalW2 program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).

2.6. Genomic organization

The genomic DNA sequence of *PmPPAE1* and *PmPPAE2* genes were obtained by amplification of *P. monodon* genomic DNA using the set of oligonucleotide primers (*PmPPAE1*-F/-R and *PPAE2*-F/-R for the *PmPPAE1* and *PmPPAE2* gene, respectively) designed from the *PmPPAE1* (accession no. FJ595215) and *PmPPAE2* (accession no. FJ620685) cDNA sequences of each gene (Table 1). The PCR amplifications were performed with the BD Advantage™ Genomic PCR Kit (Clontech, USA). The PCR products were gel purified and the expected DNA fragments were cloned and sequenced (as Section 2.3).

2.7. Tissue specific expression

The mRNA expression profile of *PmPPAE2* in different shrimp tissues was performed by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA extracted from the hemocytes, hepatopancreas, gills, lymphoid organs, intestines and hearts of *P. monodon* was converted to cDNA and then used as a template (Section 2.2) for PCR amplification of the *PmPPAE2* gene transcript using the gene specific primers *PmPPAE2i*-F/-R (Table 1). A partial fragment of the elongation factor 1- α (EF1- α) gene was amplified via primers EF1 α -F/-R (Table 1) and served as an internal control for normalization. One microlitre of the first-strand cDNA synthesized from 1.5 μ g of total RNA was used as the PCR template in a 25 μ l reaction volume containing 1 $\times$ Taq buffer with (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, 100 μ M of each dNTP, 0.2 μ M of each gene specific primer and 1 unit of Taq DNA polymerase (Fermentas, USA). The cycling condition consists of 94 °C for 1 min followed by 25 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, plus an additional final extension at 72 °C for 5 min. All amplified products were separated by electrophoresis through a 1.5% (w/v) agarose-TBE gel and visualized by UV-transillumination after ethidium bromide staining.

2.8. Analysis of gene expression at different larval developmental stages

The mRNA expression of *PmPPAE1*, *PmPPAE2*, *PmproPO1* (AF099741) and *PmproPO2* (FJ025814) in four different shrimp larval developmental stages, that is the nauplius 3 (N3), protozoea 2 (Z2), mysis 2 (M2) and post-larvae 15 (PL15) stages, were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA from various stages of whole shrimp was isolated using the TRI REAGENT® (Molecular Research Center, USA) according to the manufacturer's instructions. The transcript-specific primer sets for *PmPPAE1* (*PPAi*-F/-R), *PmPPAE2* (*PmPPAE2i*-F/-R), *PmproPO1* (*PO1RT*-F/-R) and *PmproPO2* (*PO2RT*-F/-R) (Table 1) were used to amplify the mRNA transcript in each larval stage, with the EF1- α gene being used as an internal control. One microlitre of the first-strand cDNA was used as a template in the second stage PCR in a 25 μ l reaction volume containing 1 $\times$ Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 μ M of each dNTP, 0.2 μ M of each gene specific primer and 1 unit of Taq DNA polymerase (Fermentas, USA). The PCR amplification and resolution/visualization of the PCR amplicons was performed as described in Section 2.7.

2.9. Preparation of double-stranded RNAs (dsRNAs) and in vivo gene silencing

Double-stranded RNAs (dsRNAs) were generated and purified as described previously (Amparyup et al., 2009) using gene specific primers (*T7PPAi*-F/-R, *T7PmPPAE2i*-F/-R, and *GFPT7*-F/-R) (Table 1). For dsRNA-mediated gene down-regulation (silencing), approximately 5 μ g of *PmPPAE1* or *PmPPAE2* dsRNA dissolved in 25 μ l of saline solution (150 mM NaCl) was intramuscularly injected into *P. monodon* shrimps (~2 g, fresh weight), whilst shrimps injected with an equal volume of saline solution containing 5 μ g of GFP dsRNA served as a sequence independent dsRNA control, and shrimps injected with saline solution only as a handling negative control. After 24 h, shrimps were injected again with 25 μ l of saline solution containing 5 μ g of each dsRNA, 20 μ g of lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* O111:B4 (Sigma) and 20 μ g of laminarin (β -1,3-glucan chain with some β -1,6-linked glucose units) (Sigma) and reared for 48 h after the second dsRNA injection prior to further analysis (Sections 2.10 and 2.11 below).

2.10. Semi-quantitative RT-PCR analysis of the silenced shrimps

Semi-quantitative RT-PCR analysis was performed to determine the efficiency and specificity of gene knockdown. Hemolymph samples were collected individually from the dsRNA-mediated knockdown shrimps at 48 h after the second dsRNA injection. Total RNA was extracted and reverse transcribed into cDNA. The efficiency of *PmPPAE2* gene silencing was checked by semi-quantitative RT-PCR analysis using the gene specific primer pair *PmPPAE2i*-F/-R (Table 1). The specificity of the gene knockdown was checked by the individual amplification with the set of gene specific primers for the other shrimp clip-SPs (*PmPPAE1*, *PmClipSP1* and *PmClipSP2*) (Table 1) and other shrimp clip-SPHs (*PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* and *PmMasSPH3*) (Table 1). Amplification of shrimp EF1- α fragment was served as the internal control for cDNA template normalization. All PCR reactions and amplification steps were performed as described above.

2.11. Hemolymph PO activity assay

To investigate the involvement of *PmPPAE2* in the shrimp proPO system, hemolymph collected from the silenced and control shrimps at 48 h after the second dsRNA injection (Section 2.10) were assayed for hemolymph PO activity using L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) as a substrate, according to

Amparyup et al. (2009). The hemolymph PO activity was defined as $\Delta A_{490}/\text{mg}$ total protein/min. All experiments were performed in triplicate. Statistical analysis was performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test.

2.12. Cumulative mortality assay of the dsRNA silenced shrimps after systemic *V. harveyi* infection

To examine the role of *PmPPAE2* on shrimp survival after bacterial challenge, shrimps (~3 g, fresh weight) were intramuscularly injected with 25 μl of saline solution containing 8 μg of *PmPPAE2* dsRNA. Shrimps injected with 8 μg of GFP dsRNA in saline, or sterile saline solution only were maintained as control groups. Twenty-four hours after injection, shrimps were injected again with the respective dsRNA, or control saline only, mixed with the highly pathogenic *V. harveyi* 639 (2×10^5 colony forming units (CFUs)) and the cumulative mortality was recorded daily for 5 days post infection. The experiment was done in triplicate and statistical analysis was performed using the one-way ANOVA followed by Duncan's test.

2.13. Total hemolymph viable bacterial levels in *PmPPAE2* dsRNA silenced shrimps

To test the involvement of the *PmPPAE2* in the bacterial clearance mechanism, hemolymph samples collected individually from shrimps at 6 h post *V. harveyi* 639 challenge (Section 2.12 above) were collected and serially diluted into sterilized phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). Each dilution of the hemolymph was then dotted onto the LB-agar plate (10 $\mu\text{l}/\text{dot}$) and further incubated at 30 °C overnight followed by counting of *V. harveyi* CFUs. All experimental tests were conducted in triplicate and statistical analysis was analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's test.

3. Results

3.1. Cloning and characterization of *PmPPAE2*

By using a degenerate primer pair whose design was based on the conserved cDNA sequences of the PPAEs reported in several arthropods, a 500 bp DNA fragment of a new putative PPAE (*PmPPAE2*), which exhibited sequence similarity to the arthropod PPAEs, was obtained from the hemocytes of the black tiger shrimp, *P. monodon*. The full-length cDNA sequence of the *PmPPAE2* (GenBank accession no. FJ620685) was then identified using 5' and 3' RACE and found to consist of 1557 bp containing a deduced open reading frame (ORF) of 1116 bp, flanked by a 29 bp of 5'-untranslated region (UTR) and 412 bp of 3'-UTR (not shown). The deduced 1116 ORF of *P. monodon PmPPAE2* encoded a predicted protein of 371 amino acid residues with a putative signal peptide of 25 amino acid residues (Fig. 1). The deduced mature peptide of *PmPPAE2* consisted of 346 amino acid residues with a calculated molecular mass and an estimated isoelectric point (pI) of 36.52 kDa and 7.49, respectively. The predicted protein domain of *PmPPAE2*, as identified by the SMART program, consists of an N-terminal clip domain and a C-terminal serine proteinase domain. A putative N-glycosylation site, NVT (aa. position 84), was also found in the N-terminal region of the polypeptide chain suggesting that it may be a glycoprotein.

Database searching using the BlastP algorithm revealed that this *P. monodon PmPPAE2* displays the highest amino acid sequence similarity (51%) to the *M. sexta* PAP-1 (AAX18636), and that the overall sequence is rather different from the few available crustacean PPAEs which contain two addition domains (glycine-rich and proline-rich regions) in the N-terminus (Charoensapsri et al., 2009; Wang et al., 2001). Multiple amino acid sequence alignment

of the *PmPPAE2* with the other arthropod PPAEs revealed that *PmPPAE2* has the common structural features of the clip domain serine proteinase (clip-SP) family with the highly conserved six cysteine residues in the amino-terminal disulfide knotted clip domain, the three conserved His-Asp-Ser catalytic triad sequences (H165, D227 and S323) located at the C-terminal trypsin-like serine proteinase domain, with a linking sequence connected between the two domains (Fig. 1). Whilst *PmPPAE2* has a broad similar domain structure to that reported in the PPAE's from many insect and crustacean species, due to the higher similarity of the *PmPPAE2* amino acid sequence to the insect PPAEs than to that of the few currently available crustacean PPAEs, we classified this *PmPPAE2* as a new crustacean PPAE.

3.2. Genomic organization

The genomic organization of the *PmPPAE1* and *PmPPAE2* genes was investigated by a PCR approach with amplification of the genomic DNA. The typical intron–exon splice sites (GT–AG rule) were found at the exon/intron boundaries. A comparison between the genomic and cDNA sequences revealed that the gene structure of *PmPPAE1* and *PmPPAE2* are completely different (Fig. 2). The genomic DNA sequence of the *PmPPAE1* gene (HQ008365) consisted of ten exons interrupted by nine introns (Fig. 2A), whereas that of the *PmPPAE2* gene (HQ008366) is composed of eight exons and seven introns (Fig. 2B).

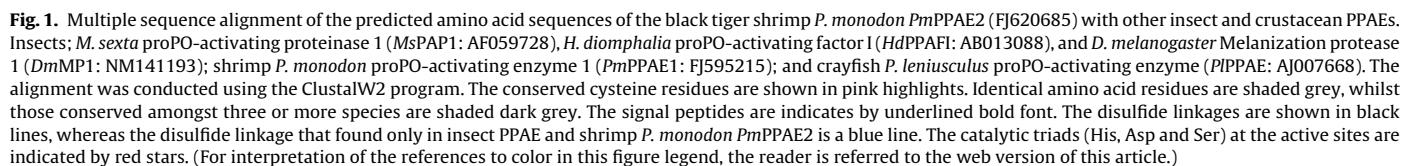
In the *PmPPAE1* gene, the 54 bp of the first exon encodes the signal peptide-coding region. The remaining 40 bp of exon 1 and all of exon 2 (24 bp) encodes for the mature peptide located between the signal peptide and the glycine-rich region. Exons 3–4 and the 5' end of exon 5 encode the glycine-rich region, whilst the remaining portion of exon 5 and the 5' of exon 6 code for a complete clip domain. The rest of exon 6 and the 5' coding region of exon 7 encode for the proline-rich region. The remaining portion of exon 7, all of exons 8 and 9 and the 5' coding region of exon 10 encode the SP catalytic domain (Fig. 2A).

In the *PmPPAE2* gene, exon 1 encodes the signal peptide coding region and the partially mature peptide. Exon 2 and the first nine nucleotides of exon 3 code for the clip domain. The rest of the nucleotides of exon 3 encompass the linker region as well as the first 22 amino acid residues of the serine proteinase domain. Exons 4–7 encode for the catalytic serine proteinase domain. The rest of the serine proteinase domain is encoded by exon 8 (Fig. 2B).

The ORF of *PmPPAE1* and *PmPPAE2* are 99% predicted amino acid sequence identical to the *PmPPAE1* and *PmPPAE2* cDNAs isolated from the hemocytes of shrimp *P. monodon*. The eight nucleotide base changes were found in the ORF of the *PmPPAE1*, which resulted in four amino acid changes within the mature polypeptide chain (R27G, T162A, L290F and T293A). In the *PmPPAE2* gene, three nucleotide differences and twelve nucleotide insertions were found within the ORF and four amino acid changes (N142K, S143A, T276 to R280 and N277 to D281) and four amino acid insertions (P₁₄₄ GSS₁₄₇) occurred in the mature protein. All of these sequence variations may be due to the allelic differences between each experimental shrimp.

3.3. Tissue distribution analysis of *PmPPAE2*

Semi-quantitative RT-PCR was employed to determine the expression level of *PmPPAE2* mRNA transcripts in different tissues of shrimps. The EF1- α gene was amplified as an internal control for normalizing the total RNA samples (Fig. 3A). The relative band intensities from the RT-PCR result indicated that the mRNA transcript of *PmPPAE2* was expressed at a moderate to low level in the shrimp hemocytes, whilst no signal was detected in the other shrimp tissues tested (hepatopancreas, gills, lymphoid



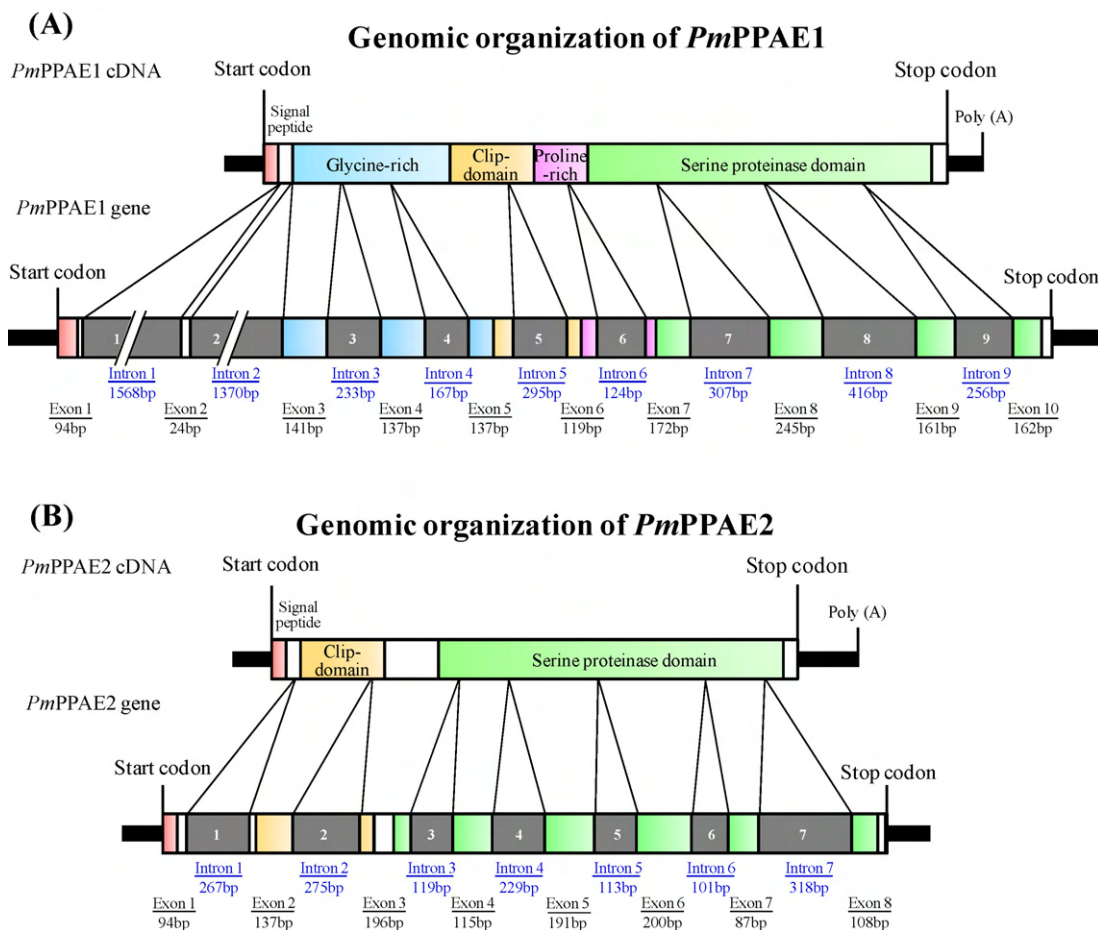


Fig. 2. Genomic organization of the *P. monodon* *PmPPAE1* (HQ008365) (A) and *PmPPAE2* (HQ008366) (B) genes. Red, orange and green boxed regions indicate the signal peptide, clip-domain and serine proteinase domain, respectively. Numbered dark grey boxes denote the introns. The size and position of both the exons and introns are listed below each region, except some of the large introns 1 and 2 in *PmPPAE1* are not shown. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

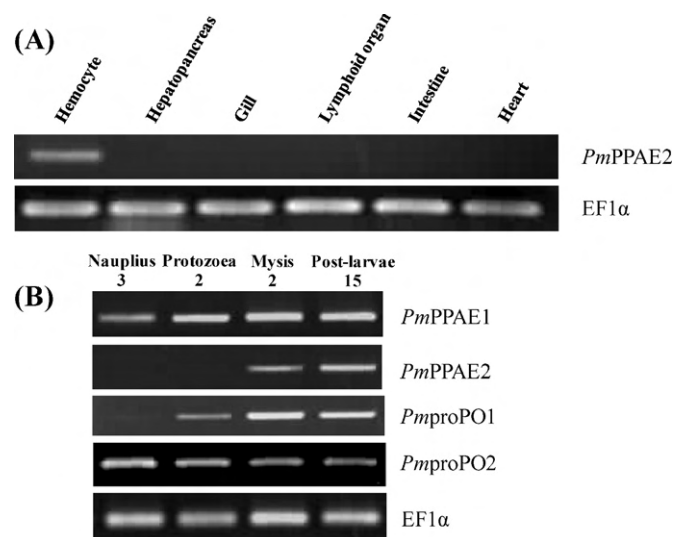


Fig. 3. Tissue distribution and developmental expression profile of *PmPPAE1*, *PmPPAE2*, *PmproPO1* and *PmproPO2* mRNA in *P. monodon*. (A) Tissue distribution analyses by semi-quantitative RT-PCR in the hemocytes, hepatopancreas, gills, lymphoid organs, intestines and heart. (B) Developmental expression profile by semi-quantitative RT-PCR analysis from the four shrimp larval stages; nauplius 3 (N3), protozoa 2 (Z2), mysis 2 (M2) and post-larvae 15 (PL15). The elongation factor 1- α (EF1- α) transcripts were used as a control housekeeping gene to standardize the amount of cDNA template in each RT-PCR reaction in all of these analyzes.

organs, intestines and hearts), suggesting a potential hemocyte tissue specific expression (Fig. 3A).

3.4. Gene expression during larval development

In order to understand the regulation of several gene transcripts involved in the shrimp *P. monodon* proPO system, the mRNA level of *PmPPAE1*, *PmPPAE2*, *PmproPO1* and *PmproPO2* during the four larval developmental stages of *P. monodon* was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from the larval stages of nauplius 3 (N3), protozoa 2 (Z2), mysis 2 (M2) and post-larvae 15 (PL15) and reverse transcribed into cDNAs. The RT-PCR result indicated that the mRNA expression of *PmPPAE1* and *PmproPO2* have a broadly similar expression pattern, in that they are detected at all four developmental stages of *P. monodon* larvae, although the expression levels of *PmPPAE1* tend to be low in N3 and high in the other three later developmental stages whilst *PmproPO2* remains the same medium expression level in all four developmental stages (Fig. 3B). In comparison, the transcripts of *PmproPO1*, which is a major proPO transcript, were not found at detectable levels in the N3 developmental stage and only at low levels in the Z2 stage, before being strongly expressed in the M2 and PL15 larval stages (Fig. 3B). The expression of *PmPPAE2* also showed a broadly similar transcript expression pattern to the *PmproPO1* in that its mRNA transcript was not found at the early N3 larval stage, but differed slightly in that the transcripts were also not present at the Z2 stage and at medium and expression levels at

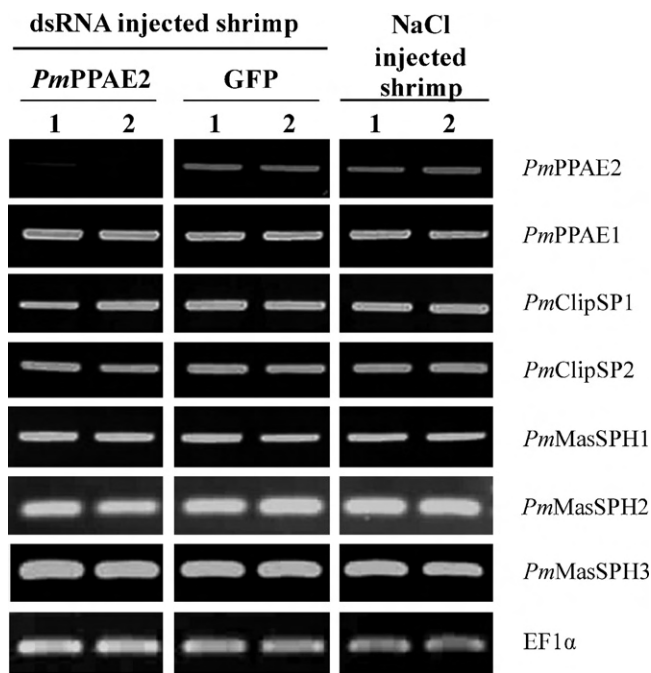


Fig. 4. Specific and effective gene silencing of the *PmPPAE2* transcripts in the hemocytes of *P. monodon*. The efficiency of dsRNA-mediated gene knockdown of *PmPPAE2* gene was examined by using semi-quantitative RT-PCR analysis. Shrimps injected with GFP dsRNA or saline solution served as controls. The effect of *PmPPAE2* dsRNA on other clip-SP (*PmPPAE1*, *PmClipSP1* and *PmClipSP2*) and clip-SPH (*PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* and *PmMasSPH3*) transcripts was further elucidated by semi-quantitative RT-PCR using the gene-specific primers for each gene (Table 1). *EF1α* served as the internal reference gene to normalize the amount of cDNA template. Each lane (1 and 2) represents the cDNA from each of two individual shrimps.

the later M2 and PL15 larval developmental stages, respectively (Fig. 3B).

3.5. In vivo gene silencing

To investigate the potential role of the *PmPPAE1* and *PmPPAE2* gene products in the shrimp immune defense, gene silencing of *PmPPAE2*, or co-silencing of both *PmPPAE1* and *PmPPAE2*, was performed by the dsRNA injection and the efficiency of the gene knockdown was determined by semi-quantitative RT-PCR analysis. The results revealed that the *PmPPAE2* transcript level was significantly decreased in the *PmPPAE2* dsRNA knockdown shrimps, whereas injection of GFP dsRNA had no effect on the *PmPPAE2* mRNA transcript level when compared to the saline injected control shrimps (Fig. 4). The specificity of gene knockdown by *PmPPAE2* dsRNA was eluded from the RT-PCR analysis of the other known clip-SP and clip-SPH genes, which demonstrated that *PmPPAE2* dsRNA injection did not suppress the transcript levels of any of the other clip-SPs (*PmPPAE1*, *PmClipSP1* and *PmClipSP2*) or clip-SPHs (*PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* and *PmMasSPH3*) genes (Fig. 4). In addition, the specificity and efficiency of gene knockdown by *PmPPAE1* dsRNA was carried out as described previously (Charoensapsri et al., 2009), and found to also be effective and specific (data not shown but see Charoensapsri et al. (2009)).

3.6. Hemolymph PO activity assay

To investigate the involvement of the *PmPPAE1* and *PmPPAE2* gene products in the shrimp proPO system, hemolymph was collected from the dsRNA knockdown shrimps at 48 h after the second dsRNA injection, and then subjected to a hemolymph PO activity assay using L-dopa as the substrate. A significant decrease

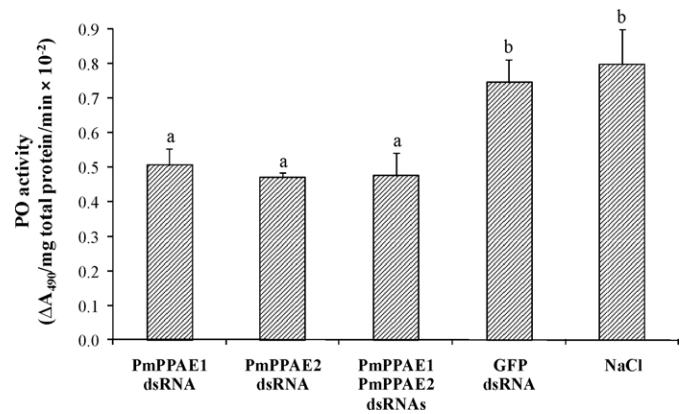


Fig. 5. Total hemolymph PO activity of the *PmPPAE* silenced shrimps. Hemolymph was collected from the single dsRNA knockdown (*PmPPAE1* or *PmPPAE2*) and the double knockdown (*PmPPAE1* and *PmPPAE2*) shrimps at 48 h after the second dsRNA injection. Shrimps injected with GFP dsRNA or saline solution were used as control groups. The total hemolymph PO activity was defined as $\Delta A_{490}/\text{mg total protein}/\text{min}$. The data are shown as the mean $\pm$ standard deviation (error bars) and are derived from three independently replicated experiments. Means with different lower case letters (above each bar) are significantly different at the $p < 0.05$ level.

in total hemolymph PO activity was observed in the *PmPPAE1* and *PmPPAE2* knockdown shrimps ($\sim 37\%$ and 41% , respectively), whilst dsRNA-mediated co-silencing of *PmPPAE1* and *PmPPAE2* together resulted in a non significantly different 41% reduction of hemolymph PO activity as compared to the control group injected with GFP dsRNA or saline solution (Fig. 5). Thus, both *PmPPAE1* and *PmPPAE2* are likely to be members of the proPO activation cascade and they might function in the same branched-pathway for the activation of the shrimp proPO system.

3.7. Cumulative mortality assay and bacterial count in the silenced shrimps

To elucidated the important role of *PmPPAE2* in the shrimp immune defense against *V. harveyi* infection, 2×10^5 CFUs of the highly pathogenic *V. harveyi* 639 isolate were intramuscularly injected in to the *PmPPAE2* dsRNA knockdown shrimps at 24 h after the first dsRNA injection, and the mortality was recorded for 5 days post infection. A 77 and 83% cumulative mortality was observed in the *PmPPAE2* dsRNA-mediated knockdown shrimps within day 1 and 2 post infection, respectively, and remaining at 83% thereafter, which was some three-fold greater than that seen in the GFP dsRNA (26%) or saline (28%) injected controls (Fig. 6A). In addition, a 4.4-fold increased number of viable bacterial CFUs were observed in the shrimp hemolymph from the *PmPPAE2* knockdown shrimps compared to that for the control shrimps injected with GFP dsRNA (Fig. 6B). Thus, *PmPPAE2* is involved in the shrimp proPO system and has an essential function in protecting shrimps from *V. harveyi* (bacterial) infection.

4. Discussion

Melanization through the activation of the proPO activating system is believed to be an important immune reaction in the host defense against microbial or parasitic infections in many arthropods (Cerenius et al., 2008; Cerenius and Söderhäll, 2004; Kanost and Gorman, 2008; Labbé and Little, 2009; Rao et al., 2010; Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000). Biochemical studies in insects have demonstrated that several members of the clip-domain serine proteinases (clip-SPs) are essential in the regulation of the proPO activating cascade (Barillas-Mury, 2007; Jang et al., 2008; Jiang and Kanost, 2000). However, knowledge on the activa-

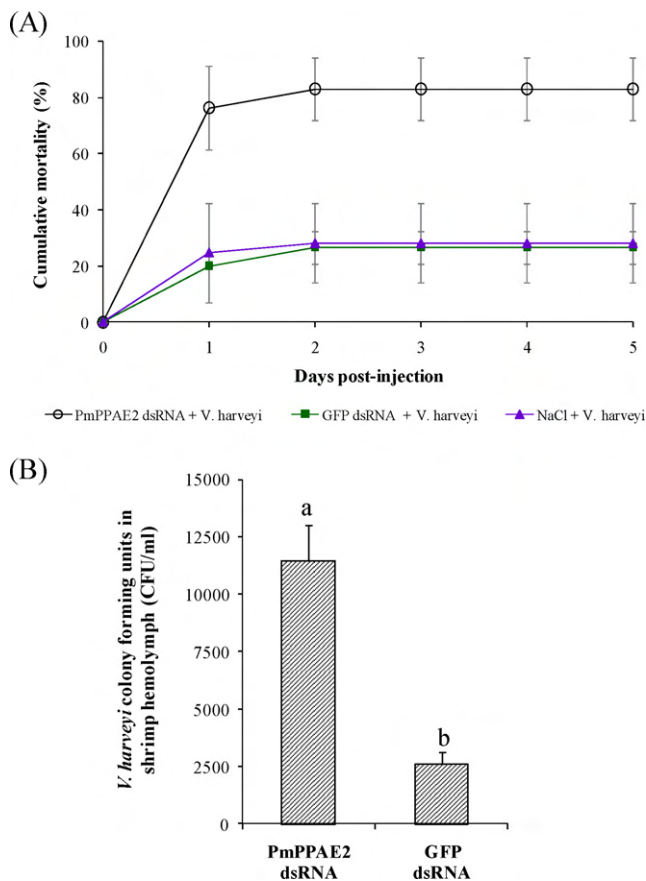


Fig. 6. The cumulative mortality (A) and the number of viable bacterial (CFUs) in the hemolymph (B) of *PmPPAE2* silenced shrimps after systemic *Vibrio harveyi* infection. Shrimps were challenged with *V. harveyi* 639 (2×10^5 CFUs) following the second injection of *PmPPAE2* dsRNA. Control shrimps were injected with GFP dsRNA or saline solution only. (A) The cumulative mortality was recorded twice each day until 5 days post infection. Percent mortality in each group (9–10 shrimps/group) is presented as the mean $\pm$ standard deviation (error bars) and are derived from triplicate independent experiments. (B) The bacterial colony forming units (CFUs) in the knockdown shrimp hemolymph were determined at 6 h after *V. harveyi* infection by a modified total plate count method and are shown as the mean $\pm$ standard deviation (error bars), derived from three independent experiments. Means with different lower case letters (above each bar) are significantly different at the $p < 0.05$ level.

tion and transcriptional regulation of the clip-SPs involved in the shrimp proPO activating system is still elusive and not yet well elucidated.

Previously, two clip-SP genes (*PmPPAE1* and *PmClipSP1*) from the hemocytes of the shrimp, *P. monodon*, have been cloned and functionally characterized (Amparyup et al., 2010; Charoensapsri et al., 2009). Using a reverse genetics approach, it was suggested that the *PmPPAE1* is a member of the shrimp proPO activation system (Charoensapsri et al., 2009), whereas *PmClipSP1* is not required for the shrimp proPO cascade but still plays a potential role in the antibacterial defense in the shrimp immune response (Amparyup et al., 2010).

In order to better understand the proPO activation pathway of *P. monodon*, we have attempted to identify clip-SPs that may function as PPAEs in the shrimp proPO system by initially using PCR amplification based upon degenerate primers designed from the conserved sequence of the known (reported in the GenBank database) arthropod PPAEs. Interestingly, as a result, the novel clip-SP, designated as *PmPPAE2*, from the hemocytes of *P. monodon* was found. *PmPPAE2* contains the structural features of the clip-SP family with a single clip domain at its amino terminus and a proteinase domain with a conserved catalytic triad (H165, D227 and S323) at

the carboxyl terminus. Amino acid sequence analysis revealed that *PmPPAE2* is more closely related to the insect PPAEs than that of the (few) other known crustacean PPAEs with a 51% amino acid sequence similarity to the lepidopteran insect tobacco hornworm *M. sexta* PAP-1, a terminal proPO-activating enzyme (PPAE) that functions on cleaving and activating the proPO precursors in the presence of clip-domain serine proteinase homologues (clip-SPs) (Jiang et al., 1998). Based on these observations, we suggest that *PmPPAE2* is a new member of the clip-SP family that possibly functions as a PPAE in the shrimp proPO activation pathway.

The genomic organization of several of the clip-SPs that function as PPAEs has been reported in insect species. In *M. sexta*, the genomic structures of the proPO-activating proteinases (PAP)-1, PAP-2 and PAP-3 have been evaluated (Wang et al., 2006; Zou et al., 2005; Zou and Jiang, 2005). The genomic sequence of PAP-1 contains nearly 13,000 nucleotides with seven exons (Zou et al., 2005), whilst PAP-2 and PAP-3 are composed of eight exons flanked by the entire intron sequence (Wang et al., 2006; Zou and Jiang, 2005). However, there is currently no information about the exon–intron organization of the PPAE genes reported in the crustaceans. Therefore, the genomic organization of both *PmPPAE1* and *PmPPAE2* in the black tiger shrimp, *P. monodon*, was evaluated and compared in this study. Comparison between the genomic DNA and cDNA sequences revealed that the structure of the *PmPPAE1* and *PmPPAE2* genes are totally different. *PmPPAE1* is comprised of ten exons disturbed by nine introns, whereas *PmPPAE2* contained only eight exons. Analysis of the genomic structure revealed that the clip domain of the *PmPPAE1* and *PmPPAE2* genes are encoded by two exons, whereas the compositions of exons in their proteinase domain are different. In the dipteran insect *Drosophila melanogaster*, the clip domain of the predicted PPAE genes, SP25 is encoded by two exons, whereas SP4, SP7 and SP10 are encoded by a single exon, as is the *M. sexta* PAP-1 gene (De Gregorio et al., 2001; Zou et al., 2005).

The tissue distribution of *PmPPAE1* transcripts in *P. monodon* has been reported to be restricted to only within the hemocytes (Charoensapsri et al., 2009), as also seen in this present study where *PmPPAE2* transcripts were only detected in shrimp hemocytes. This result is also in accord with the observation that in the crayfish, *P. leniusculus*, PPAE transcripts are only detected in the hemocytes (Wang et al., 2001).

Furthermore, the expression of *PmPPAE2* transcripts was not detected in the early stages of *P. monodon* larval development (N3 and Z2), but was detected at increasing levels in the later developmental stages (M2 and PL15). This contrasts to the expression of *PmPPAE1* transcripts that were present in all four larval developmental stages examined, albeit at low levels in the N3 larvae. In the crayfish, *P. leniusculus*, proPO and PPAE transcripts were absent and detected at a low level, respectively, during the middle phase of crayfish embryo development (Zhang et al., 2010).

Previously, *PmproPO1* and *PmproPO2* from the hemocytes of *P. monodon*, were functionally characterized and found to both play an important role in the shrimp proPO system and immune defenses (Amparyup et al., 2009). However, the expression profile of *PmproPO2* during larval development was not clear. Here, in this study we report the expression profile of *PmproPO1* and *PmproPO2* gene transcripts during four different stages of *P. monodon* larval development. For *PmproPO1*, its transcripts were found at very low to not detectable levels during the N3 developmental stage and gradually increased in level as the shrimp larval development progressed to low at the Z2 stage and high in the M2 and PL15 stages. This finding is similar to the expression of the *PmproPO1* transcript previously reported in *P. monodon* with extremely low levels from the N4 stage increasing with later developmental stages (Jiravanichpaisal et al., 2007). In contrast, the mRNA expression of *PmproPO2* was not significantly different at fairly high levels dur-

ing all four larval developmental stages examined. Thus, it is likely that the major proPO gene that functioned during the early stages of larval development is the *PmproPO2* gene, whereas the *PmproPO1* seems to be the essential component in the later developmental stages. The differential gene expression profile between the two PPAE and two proPO transcripts could suggest that *PmPPAE1* is likely to function as the (protease) activator of *PmproPO2* during the early stage of larval development, whilst *PmPPAE2* might act as the activating protease of the *PmproPO1* in the later stages of the *P. monodon* larval development.

Double stranded RNA (dsRNA)-mediated RNA interference is an efficient technique for investigating the function of genes and here was applied to evaluate the two *P. monodon* clip-SPs (*PmPPAE1* and *PmPPAE2*) that are implicated in the proPO pathway. In a similar manner, the RNAi approach in the dipteran insects *Anopheles gambiae* and *D. melanogaster* established the function of the three *Anopheles* clip-SPs, CLIPB4, CLIPB8 and CLIPB14, to be involved in the proPO pathway (Paskewitz et al., 2006; Volz et al., 2005; Volz et al., 2006), and the two drosophilid clip-SPs, MP1 and MP2/sp7, to be required for proPO activation (Castillejo-López and Häcker, 2005; Tang et al., 2006). Likewise, the function of the two clip-SP genes from *P. monodon* (*PmPPAE1* and *PmClipSP1*) was shown using dsRNA-mediated gene silencing to be different with *PmPPAE1* being a proteinase that participates in the shrimp proPO system and also plays an important role in the shrimp immunity (Charoensapsri et al., 2009), whilst *PmClipSP1* is not involved in proPO activation, but still plays a role in the shrimp defense against bacterial invasions (Amparyup et al., 2010). In this study, we report the functional characterization of the novel PPAE (*PmPPAE2*) using *in vivo* dsRNA-mediated gene knockdown of *PmPPAE2* transcript levels, which significantly decreased the total hemolymph PO activity, suggesting that *PmPPAE2* is a proteinase that is required for shrimp proPO activation. Furthermore, the cumulative mortality and bacterial number in *PmPPAE2* knockdown shrimps after systemic challenge with the highly pathogenic bacterium, *V. harveyi*, were both significantly increased when compared to the control shrimps. These observations are similar to those previously reported in the *PmPPAE1* knockdown *P. monodon* shrimps (Charoensapsri et al., 2009). We therefore suggest that *PmPPAE2* is required to activate the proPO pathway and also plays an important role in the shrimp's immune defense against *V. harveyi* infection. To further understand the relationship between the two PPAE genes, we downregulated the expression of both *PmPPAE1* and *PmPPAE2*, via dsRNA injection, and monitored the effect on the total hemolymph PO activity. Although the total hemolymph PO activity of the double knockdown shrimps was significantly decreased compared to the control shrimps, it was not significantly different from that observed in either the *PmPPAE1* or *PmPPAE2* single knockdown shrimps.

Previously, the co-silencing of two proPO genes (*PmproPO1* and *PmproPO2*) in *P. monodon* resulted in a more significant reduction in the total PO activity (88%) than when either gene alone was knocked down, suggesting that the two proPOs might cooperatively function in the proPO activating system (Amparyup et al., 2009). The data for *PmPPAE1* and *PmPPAE2* knockdown shrimps reported here might suggest that both of these PPAE genes function in activating the proPO cascade in the same pathway. However, whether *PmPPAE1* and *PmPPAE2* are functional and actually involved in direct activation of *PmproPO1* and/or *PmproPO2* remains to be resolved by further investigation.

In conclusion, we identified a novel clip-SP, named *PmPPAE2*, from the black tiger shrimp, *P. monodon*, and suggest its functional role in the activation of the shrimp proPO system as well as an important role in the shrimp immune defense against *V. harveyi* infection. However, further biochemical and genetic characterization is essential for a better understanding of the role of

this system in shrimp immunity. In addition, our data also provides the information of the genomic organization of both *PmPPAE1* and *PmPPAE2* genes and a brief outline of the expression of the *PmPPAE1*, *PmPPAE2*, *PmproPO1* and *PmproPO2* genes during several larval developmental stages of the shrimp *P. monodon*.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from (i) Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), (ii) a fellowship from Thailand Research Fund to Piti Amparyup and (iii) the National Research University Project of CHE and Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (FW 007B). We also acknowledge the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture. A Ph.D. student fellowship granted to Walaiporn Charoensapsri by the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, Thailand Research Fund, is acknowledged. Visiting Fellowship under the JSPS core-University Program is also acknowledged. The authors also thank Dr. Robert Douglas John Butcher at the Publication Counseling Unit (PCU), Faculty of Science, Chulalongkorn University for English language corrections of this manuscript.

References

- Amparyup, P., Jitvaropas, R., Pulsook, N., Tassanakajon, A., 2007. Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 535–546.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 247–256.
- Amparyup, P., Wiriyaakaradecha, K., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2010. A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 168–176.
- Barillas-Mury, C., 2007. CLIP proteases and *Plasmodium* melanization in *Anopheles gambiae*. *Trends Parasitol.* 23, 297–299.
- Castillejo-López, C., Häcker, U., 2005. The serine protease Sp7 is expressed in blood cells and regulates the melanization reaction in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1075–1082.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 116–126.
- Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263–271.
- Cerenius, L., Babu, R., Söderhäll, K., Jiravanichpaisal, P., 2010. *In vitro* effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 21–23.
- Charoensapsri, W., Amparyup, P., Hirano, I., Aoki, T., Tassanakajon, A., 2009. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 811–820.
- De Gregorio, E., Spellman, P.T., Rubin, G.M., Lemaitre, B., 2001. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12590–12595.
- Gupta, S., Wang, Y., Jiang, H., 2005. *Manduca sexta* prophenoloxidase (proPO) activation requires proPO-activating proteinase (PAP) and serine proteinase homologs (SPHs) simultaneously. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 241–248.
- Jiang, I.H., Nam, H.J., Lee, W.J., 2008. CLIP-domain serine proteases in *Drosophila* innate immunity. *BMB Rep.* 41, 102–107.
- Jiang, H., Kanost, M.R., 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 95–105.
- Jiang, H., Wang, Y., Kanost, M.R., 1998. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12220–12225.
- Jiang, H., Wang, Y., Yu, X.Q., Kanost, M.R., 2003a. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*: a bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. *J. Biol. Chem.* 278, 3552–3561.
- Jiang, H., Wang, Y., Yu, X.Q., Zhu, Y., Kanost, M.R., 2003b. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1049–1060.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211, 213–236.

- Jiravanichpaisal, P., Puanglarp, N., Petkon, S., Donnuea, S., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2007. Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 815–824.
- Kanost, M.R., Gorman, M.J., 2008. Phenoloxidases in insect immunity. In: Beckage, N.E. (Ed.), *Insect Immunology*. Academic Press Inc., San Diego, pp. 69–96.
- Kim, M.S., Baek, M.J., Lee, M.H., Park, J.W., Lee, S.Y., Söderhäll, K., Lee, B.L., 2002. A new easter-type serine protease cleaves a Masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. *J. Biol. Chem.* 277, 39999–40004.
- Kwon, T.H., Kim, M.S., Choi, H.W., Joo, C.H., Cho, M.Y., Lee, B.L., 2000. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* 267, 6188–6196.
- Labbé, P., Little, T.J., 2009. ProPhenolOxidase in *Daphnia magna*: cDNA sequencing and expression in relation to resistance to pathogens. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 674–680.
- Lee, S.Y., Kwon, T.H., Hyun, J.H., Choi, J.S., Kawabata, S.I., Iwanaga, S., Lee, B.L., 1998a. *In vitro* activation of pro-phenol-oxidase by two kinds of pro-phenol-oxidase-activating factors isolated from hemolymph of coleopteran *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* 254, 50–57.
- Lee, S.Y., Cho, M.Y., Hyun, J.H., Lee, K.M., Homma, K.I., Natori, S., Kawabata, S.I., Iwanaga, S., Lee, B.L., 1998b. Molecular cloning of cDNA for pro-phenol-oxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1,3- β -glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* 257, 615–621.
- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B., 2004. Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol. Rev.* 198, 10–24.
- Nappi, A.J., Christensen, B.M., 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 443–459.
- Paskewitz, S.M., Andreev, O., Shi, L., 2006. Gene silencing of serine proteases affects melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 701–711.
- Piao, S., Song, Y.L., Kim, J.H., Park, S.Y., Park, J.W., Lee, B.L., Oh, B.H., Ha, N.C., 2005. Crystal structure of a clip-domain serine protease and functional roles of the clip domains. *EMBO J.* 24, 4404–4414.
- Rao, X.J., Ling, E., Yu, X.Q., 2010. The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: an *in vitro* approach. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 264–271.
- Satoh, D., Horii, A., Ochiai, M., Ashida, M., 1999. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm *Bombyx mori*: purification, characterization, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 274, 7441–7453.
- Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53–69.
- Tang, H., Kambris, Z., Lemaitre, B., Hashimoto, C., 2006. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 281, 28097–28104.
- Volz, J., Osta, M.A., Kafatos, F.C., Müller, H.M., 2005. The roles of two clip domain serine proteases in innate immune responses of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 40161–40168.
- Volz, J., Müller, H.M., Zdanowicz, A., Kafatos, F.C., Osta, M.A., 2006. A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to *Plasmodium*. *Cell Microbiol.* 8, 1392–1405.
- Wang, R., Lee, S.Y., Cerenius, L., Söderhäll, K., 2001. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 268, 895–902.
- Wang, Y., Jiang, H., 2004. Prophenoloxidase (proPO) activation in *Manduca sexta*: an analysis of molecular interactions among proPO, proPO-activating proteinase-3, and a cofactor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 731–742.
- Wang, Y., Zou, Z., Jiang, H., 2006. An expansion of the dual clip-domain serine proteinase family in *Manduca sexta*: gene organization, expression, and evolution of prophenoloxidase-activating proteinase-2, hemolymph proteinase 12, and other related proteinases. *Genomics* 87, 399–409.
- Yu, X.Q., Jiang, H., Wang, Y., Kanost, M.R., 2003. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 197–208.
- Zhang, Y., Söderhäll, I., Söderhäll, K., Jiravanichpaisal, P., 2010. Expression of immune-related genes in one phase of embryonic development of freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 649–653.
- Zhao, P., Li, J., Wang, Y., Jiang, H., 2007. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 952–959.
- Zou, Z., Jiang, H., 2005. Gene structure and expression profile of *Manduca sexta* prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3), an immune protein containing two clip domains. *Insect Mol. Biol.* 14, 433–442.
- Zou, Z., Wang, Y., Jiang, H., 2005. *Manduca sexta* prophenoloxidase activating proteinase-1 (PAP-1) gene: organization, expression, and regulation by immune and hormonal signals. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 627–636.

Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens

Piti Amparyup^{a,b,*}, Walaiporn Charoensapsri^a, and Anchalee Tassanakajon^a

^a*Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

^b*National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand*

Keywords: Shrimp, *Penaeus*, prophenoloxidase, melanization, proPO system, innate immunity

*Corresponding author. Tel. +66 –2–218-5414; Fax +66 –2–218-5414.

E-mail address: piti.amp@biotec.or.th (P. Amparyup)

Abstract

The global shrimp industry still faces various serious disease related problems that are mainly caused by pathogenic bacteria and viruses. Understanding the host defense mechanisms is likely to be beneficial in designing and implementing effective strategies to solve the current and future pathogen-related problems. Melanization, which is performed by phenoloxidase (PO) and controlled by the prophenoloxidase (proPO) activation cascade, plays an important role in the invertebrate immune system in allowing a rapid response to pathogen infection. The activation of the proPO system, by the specific recognition of microorganisms by pattern recognition proteins (PRPs), triggers a serine proteinase cascade, eventually leading to the cleavage of the inactive proPO to the active PO that functions to produce the melanin and toxic reactive intermediates against invading pathogens. This review highlights the recent discoveries of the critical roles of the proPO system in the shrimp immune responses against major pathogens, and emphasizes the functional characterizations of four major groups of genes and proteins in the proPO cascade in penaeid shrimp, that is the PRPs, serine proteinases, proPO and inhibitors.

1. Introduction

Successful mass monoculture shrimp production, with its inherent high shrimp density rearing and relatively low genetic diversity, requires the use of effective disease prevention strategies, for which a good understanding of the basic immune functions is invaluable.

Invertebrates survive microbial infections in the absence of any pre-existing highly evolved adaptive immunity. Instead they initially rely on a fixed non-specific immune mechanism to prevent pathogen entry and spread that involves structural barriers to prevent pathogen entry, such as a hard cuticle, tegumental glands, branchial podocytes, epithelial immunity, autonomy and regeneration of appendages and rapid wound healing to prevent loss of hemolymph and seal the wound. However, should their mechanisms fail they mount an immediate multiple innate immune response to efficiently defend themselves against the onset of pathogens [1]. The mechanism of the innate immune system in response to the inevitable encounter with pathogens requires the recognition of the evolutionarily conserved microbe-specific molecules, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by a set of well defined receptors referred to as pattern- or pathogen-recognition receptors (PRPs) [1–4]. Recognition of the unique patterns of PAMPs eventually results in the widespread innate immune activation, including via the release of soluble molecules and the circulating hemocyte mediated humoral and cellular components [2,5].

The mobile non-specific immune system has two principal components, the humoral and cellular systems, which are both activated upon immune challenge and work together. The cellular component involves those mediated by hemocytes and the humoral components involve the cell free components of the hemolymph. However, note that as stated already they are not independent of each other but rather are interactive and interdependent and so function synergistically to protect the shrimp and eliminate foreign particles and pathogens.

Amongst the diverse array of the humoral immune responses (e.g. clotting cascade, anti-oxidant defense enzymes like superoxide dismutase, peroxidase, catalase and nitric oxide synthase, defensive enzymes like lysozyme, acid phosphatase and alkaline phosphates, reactive oxygen and nitrogen intermediates and antimicrobial peptides), one of the most effective immune mechanisms of invertebrates against intruder materials is the cellular melanotic encapsulation. The complex melanization cascade requires the combination of circulating hemocytes and several associated proteins of the prophenoloxidase (proPO)-activating system, and is one of the more potent humoral constituents in many invertebrates that is responsible for wound healing and parasite entrapment as well as for microbe killing [6–11].

The proPO activating system serves an important role as a non-self recognition system that participates in the innate immune responses through interaction with the cellular responses via hemocyte attraction and inducing phagocytosis, melanization, cytotoxic reactant production, directed cell adhesion, particle encapsulation, and the formation of nodules and capsules.

Melanin biosynthesis requires multiple steps, both enzymatic and non-enzymatic (spontaneous) reactions. The enzymatic reaction is catalyzed by the key enzyme phenoloxidase (PO) and this step is considered as the rate limiting step of melanin formation. During the proPO system activation, the subsequent reactive intermediates, such as quinone-like substances, reactive oxygen (ROI) or nitrogen (RNI) intermediates, which possess cytotoxic activity towards microorganisms, are produced and restrain the invasion of microbial pathogens into the host body cavity and assist in wound healing [8–9,12–14]. However, whilst any reductions in the activity of the proPO system might lead to the failure of phagocytosis, it is obvious that excess or prolonged levels (i.e. inappropriate levels) of these cytotoxic substances can also lead to host tissue damage and cell death [10]. Accordingly, it is not surprising that the activation of the melanization reaction is strictly regulated and takes place precisely at the site of injury or infection.

Activation of the proPO system is controlled by a multistep pathway. The recognition of microbial PAMPs (elicitors) by PRPs leads to the activation of a series (cascade) of serine proteinases (SPs) and eventually culminates in the proteolytic cleavage of the proPO zymogen to the active PO enzyme. The proPO cascade is triggered upon recognition of the microbial-derived PAMPs, including lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria, peptidoglycan (PGN) from Gram-positive bacteria and β -1,3-glucans from fungi. Activation of the SP cascade by the PAMPs-PRP interactions, with the final activation of PO, results in the production of the polymeric melanin and its deposition precisely at the site of infections or around the surface of foreign microorganisms (Fig. 1) [7].

Over the past decade, the proPO system has been fairly well studied and as a result its importance in invertebrate immune system has been confirmed. The biochemical pathway and several associated proteins involved in the proPO system activation are now relatively well characterized in many insects and to some extent in crustacean species. This review summarizes the current understanding of the molecular mechanisms and the regulation of the proPO system in penaeid shrimp (Decapoda: Penaeidae), emphasizing the important roles and discussing the current knowledge on the shrimp proPO system in response to the pathogenic microorganisms, including differences compared to the better known systems in insects.

2. Pattern recognition proteins (PRPs) in shrimp proPO system

Recognition of PAMPs, such as PGN, LPS and β -1,3-glucans by PRPs is an essential step for the activation of the proPO cascade. Several groups of invertebrate PRPs that bind to PAMPs and activate the proPO system have been reported [2,9,15–17], and these include the peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) [15,18–22], Gram-negative binding proteins (GNBPs) [9,17,23], β -glucan binding proteins (β GBPs) [24–27], LPS and β -1,3-glucan binding proteins (LGBPs) [23,28,29] and C-type lectins [30,31]. In shrimp, little is known about the PRPs involved in the proPO cascade. Nevertheless, a few PRPs in shrimp that are involved in the activation of the proPO system or melanization have been reported (Table 1) [32–34], and are outlined below.

2.1. β -glucan binding proteins (β GBPs and β GBP-HDLs)

The first group of β GBPs in crustaceans was characterized in the crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Decapoda: Astacoidea) [35]. The crayfish β GBP transcript is synthesized in the hepatopancreas where the encoded protein is released into the plasma and, after binding to β -1,3-glucan, enhances the activation of the proPO system and induces hemocyte degranulation and opsonization [24,35–38]. A group of similar proteins (named β GBP-HDL) to the crayfish β GBP were isolated from the shrimp *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis* [39–43], and have an approximately 70% amino acid sequence similarity to the crayfish β GBP. The β GBP/ β GBP-HDL family contains two glucanase-like motifs that have a high sequence similarity to the catalytic regions of microbial β -glucanases, but they lack glucanase activity and have the integrin recognition motif (RGD or RGE) as a putative cell adhesion site. Members of the β GBP/ β GBP-HDL family have been isolated and cloned from four penaeid shrimp species; *Penaeus californiensis* [32,39], *Litopenaeus stylirostris* [40], *L. vannamei* [39–42] and *F. chinensis* [43].

The β GBP-HDL of *L. vannamei* is expressed in the hepatopancreas, muscle, pleopods and gills, but not in the hemocytes [42]. Likewise, the β GBP-HDL of *F. chinensis* is expressed in the intestine, hepatopancreas, muscle and gill tissues, but it is also expressed in the hemocytes, and its expression profile is modified after white spot syndrome virus (WSSV) infection [43]. Although the mRNA transcripts of shrimp β GBP-HDL have been detected in several shrimp tissues, as mentioned above, the β GBP-HDL protein was only found to be present in the plasma [39,40]. In *P. californiensis*, purified β GBP protein can trigger PO activity in the presence of β -1,3-glucan and so this β GBP-HDL may be a shrimp PRP for the recognition of β -1,3-glucans in the proPO activation pathway [32].

2.2. LPS and β -1,3-glucan binding proteins (LGBPs)

LGBPs, initially isolated from the freshwater crayfish, *P. leniusculus*, show a significant homology with the insect GNBPs. In the crayfish, the binding of LGBP to LPS or β -1,3-glucan has been documented to activate the proPO system [29]. In penaeid shrimp, several LGBPs have been cloned and characterized, such as in *P. stylirostris* [44], *L. vannamei* [45], *F. chinensis* [46,47], *Marsupenaeus japonicus* [48] and *Penaeus monodon* [34,49]. Most of the characterized LGBP mature proteins have an average molecular mass of 39.8 –

40.2 kDa and contain a conserved domain of the glycoside hydrolase family 16 that is comprised of a polysaccharide binding, glucanase and β -glucan recognition motifs and two RGD motifs [34,48]. LGBP mRNA is mainly expressed in shrimp hemocytes and it appears to be an immune responsive gene since its transcript expression levels are up-regulated in the early-mid infection phase response to WSSV or Gram-negative bacteria or their associated LPS [34,44,45,47,48] and down-regulated in response to late infection with *Vibrio anguillarum* [46]. However, in *P. monodon* the only LGBP found so far (*PmLGBP*) acts as a PRP of the proPO cascade [34].

2.3. C-type lectins

C-type lectins are carbohydrate binding proteins that play essential roles in various biological processes across a wide range of vertebrates and invertebrates [50]. A link between lectin and the proPO system was first reported in the blattarid insect (cockroach) *Blaberus discoidalis* [51], where purified serum lectins were found to activate proPO in the cockroach hemolymph and to enhance the laminarin-stimulated proPO system activation. In the lepidopteran insect *Manduca sexta* (tobacco hornworm), two C-type lectins named immulectins-1 (IML-1) and IML-2 have been characterized as PRPs that are required for the proPO activation in the insect's hemolymph [52,53].

In crustaceans, the connection between C-type lectins and activation of the proPO system has recently been demonstrated in crayfish [54,55]. The C-type lectin *PcLec2* from the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, was characterized as a PRP that participated in the proPO activation [54], whilst in the freshwater crayfish, *P. leniusculus*, the C-type lectin (mannose-binding lectin; *Pl-MBL*), which was found to be synthesized in granular cells and exocytosed upon infection, functions as a regulator of the proPO system under high Ca^{2+} concentration in the crayfish hemocyte lysate supernatant [55]. In penaeid shrimp, several C-type lectins have been identified and biochemically characterized (reviewed in [56]), but the potential functions of C-type lectins in activation of the shrimp proPO system remain poorly understood. Nevertheless, a connection between C-type lectins and proPO was recently reported for the C-type lectin from the shrimp *L. vannamei* (*LvCTLD*) that was found to enhance the PO activity in the shrimp's hemolymph [33]. However, the molecular mechanism of shrimp proPO activation remains to be further elucidated.

3. Clip domain serine proteinase cascade and the proPO activating enzyme (PPAE) in the shrimp proPO activation

The activation of the proPO cascade requires the proteolytic steps of SPs. SPs constitute one of the families of proteolytic enzymes and are involved in mediating several physiological processes by the proteolytic cleavage of specific proteins. SPs are characterized by the presence of three catalytic residues (H, D and S) that form a catalytic triad. Clip domain SPs (Clip-SPs) belong to the SP family and have been implicated in the proPO activation cascade [57].

All Clip-SPs are synthesized as inactive zymogens consisting of an N-terminal clip domain and a C-terminal catalytic SP domain. The characteristic of clip domain, usually composed of between 37 – 55 amino acid residues, is interlinked by three strictly conserved disulfide bonds and is connected to the SP domain by a disulfide linkage after proteolytic activation [57]. Clip-SPs can be classified into catalytic SPs and non-catalytic SPs. The catalytic Clip-SPs, a group of proteolytic enzymes, and the non-catalytic SPs, referred to as Clip-SP homologues (Clip-SPHs), which are similar in amino acid sequence to SPs but the serine residue in the active catalytic triads is replaced by glycine. Clip-SPHs do not exhibit any proteolytic activity and are involved instead in protein interactions [57,58].

The terminal Clip-SPs of the proteolytic cascades of the proPO system that converts the proPOs to POs is termed the proPO-activating enzyme (PPAE) [57–71]. PPAEs have been characterized from several insects and crustaceans, including, within insects, *Bombyx mori* [59], *M. sexta* [57, 60–63], *Holotrichia diomphalia* [64–66] and *Tenebrio molitor* [67], and, within crustaceans, the crayfish *P. leniusculus* [68] and the shrimp *P. monodon* [69,70] and *L. vannamei* [71].

The penaeid shrimp PPAE was first cloned from *P. monodon* and named *PmPPAE1* [69]. Subsequently, a second PPAE (*PmPPAE2*) [70] and several clip-SPs have been identified and cloned from a variety of shrimp species, including *P. monodon* [72], *F. chinensis* [73], *Fenneropenaeus indicus* [74] and *L. vannamei* [71]. However, so far only three of these clip-SPs, two from *P. monodon* (*PmPPAE1* and *PmPPAE2*) [69,70] and one from *L. vannamei* (*LvPPAE1*) [71], have been reported to be involved in the proPO system (Table 1).

Both *PmPPAE* transcripts (*PmPPAE1* and *PmPPAE2*) are mainly expressed in shrimp hemocytes [69,70]. *PmPPAE1* appears to be an immune-responsive gene since its transcript expression level is up-regulated after *V. harveyi* infection. Immunoblotting analysis of the hemocyte and plasma using a polyclonal antibody against the SP domain of *PmPPAE1* indicates that the protein is localized in hemocytes [69]. In the shrimp *L. vannamei*, *LvPPAE1* mRNA levels were down-regulated in hemocytes and up-regulated in the gill after challenge with *V. harveyi* [71]. In contrast, in the crayfish *P. leniusculus* the PPAE1 transcript levels were not affected following *Aeromonas hydrophila* infection [75]. In insects, the *M. sexta* PPAE (PAP-1) is constitutively expressed at high levels in the integument and less abundantly in the fat body of naive larvae.

However, the transcript expression levels of PAP-1 and the two other PPAE transcripts (PAP-2 and PAP-3) are up-regulated following bacterial infection [60–62]. The differences in the expression levels of PPAEs among species can be explained as being due to the differences in the pathogenicity or virulence of the microorganisms in each species.

Arthropod clip-SPHs have been shown to be involved in various biological functions including immunity [57,69,70]. Clip-SPH proteins, which lack SP enzymatic activity, are regulators in the proPO system. In insects, the proPO-activating factor (PPAF)-II of the beetle, *H. diomphalia*, is a clip-SPH and functions as a protein cofactor for PPAF-I [76], whilst SPH1 and SPH2 of the lepidopteran *M. sexta* (tobacco hornworm) serve as protein cofactors for the two PPAEs (PAP-2 and PAP-3) in the proPO activation [60–62]. In crustaceans, two SPHs (*PISPH1* and *PISPH2*) from the crayfish *P. leniusculus* have been reported to be involved in the PGN-induced proPO activation and probably function as protein cofactors in the PGN-binding complex with LGBP [77].

In the shrimp *P. monodon*, the two known clip-SPHs (*PmMasSPH1* and *PmMasSPH2*) have a high amino acid sequence similarity (74% and 69%) to the crayfish *PISPH2* and *PISPH1*, respectively [78, Amparyup et al., unpublished data]. *PmMasSPH1* is a multifunctional immune molecule that contains extensive glycine-rich repeats (LGQGGG) and a clip domain at the N terminus and C-terminal SP domain. *PmMasSPH1* transcript levels are induced in response to infection with the shrimp pathogenic bacterium *V. harveyi* [78]. The N-terminal region of *PmMasSPH1* exhibits *in vitro* antibacterial activity against Gram-positive bacteria, the SP-like domain mediates the hemocyte adhesion and displays bacterial binding activity to *V. harveyi* and the LPS of *Escherichia coli* [79]. In accord, *PmMasSPH1* displays an *in vivo* opsonic activity against *V. harveyi*. In addition, *P. monodon* SPH516, an isoform of *PmMasSPH1*, specifically interacts with the metal ion-binding (MIB) domain of the yellow head virus (YHV), suggesting that it might play an important role in viral responses [80]. Moreover, dsRNA interference studies revealed significant decreases in the hemolymph PO activity of *PmMasSPH1* and *PmMasSPH2* knockdown shrimp, suggesting that both SPHs are involved in the shrimp proPO system (Amparyup et al., unpublished data). In two other shrimp (*M. japonicus* and *F. chinensis*), at least three clip-SPHs genes have been identified [73,81,82], yet none of these clip-SPHs have so far been implicated in the proPO system. However, data from molecular studies have revealed significant changes in the gene expression levels of these clip-SPH transcripts following microbial infection, suggesting that they may be involved in shrimp immunity and in the proPO system upon infection. Regardless, further studies are still required to elucidate the function of these proteins in the proPO system.

4. Prophenoloxidase (proPO): a key enzyme in the proPO system

PO, a crucial component of the arthropod proPO system and the key enzyme in the synthesis of melanin, is a bifunctional copper containing enzyme that belongs to the type 3 copper protein family and possesses both tyrosinase/monophenolase (EC 1.14.18.1) and catecholase/diphenolase (EC 1.10.3.1) activities that in turn convert a variety of monophenols and *o*-diphenols into *o*-quinone that ultimately act as precursors for melanin production [7,8]. Biochemical investigation in insects and some crustaceans indicated that PO is generally synthesized and maintained as the enzymatically inactive precursor proPO, with an approximate molecular mass of about 70–80 kDa, and is coordinated with two atoms of copper [6,10]. Activation of proPO is triggered by microbial elicitors (PAMPs), including LPS, PGN and β -1,3-glucan, and results in the limited proteolytic cleavage at the N-terminal by the specific PPAE proteinases [6,7,10]. Significantly, POs also share a homologous sequence with the oxygen carrier proteins (hemocyanins), and so it is not surprising that some PO-like activity was detected from hemocyanin under certain conditions [83–85].

Initially, the sequences of arthropod proPO genes were reported from four arthropods, comprised of three insect species, the two lepidopterans *M. sexta* and *B. mori* plus the dipteran *Drosophila melanogaster*, and one crustacean, the freshwater crayfish *P. leniusculus* [86–89]. However, various arthropod proPO sequences have subsequently been reported from an array of insect and crustacean species. In insects, the number of the proPO genes found in each species varies widely, ranging from ten and nine in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*, respectively, to three in the fruit fly *D. melanogaster*, two in the beetle *H. diomphalia*, the silkworm *B. mori* and the tobacco hornworm *M. sexta*, down to only a single proPO gene in the honeybee *Apis mellifera* (reviewed in [9–11]).

In shrimp, biochemical investigations of various aspects of proPO have been performed so far in six different shrimp species [90–99]. The first penaeid proPO was successfully purified from the hemocytes of *P. californiensis* in 1999 [90]. Thereafter, a number of proPO genes have been identified and cloned from various shrimp species, including one proPO gene in *Penaeus semisulcatus* [Genbank accession no: AF521949], two proPO genes in each of *P. monodon* [91,92], *M. japonicus* [93,94], *L. vannamei* [95–98] and *F. chinensis* [99] (Table 1).

In the insect species for which good genomic or other suitable genome coverage data are available, the presence of different proPO genes have been reported, as exemplified above. However, it has been suggested the proPO genes of the malaria vector *A. gambiae* are differentially expressed in different developmental stages, whilst some of them are induced after blood feeding [100–102]. Note that after blood feeding the insect is

potentially exposed to host animal-blood borne pathogens. In the shrimp *P. monodon*, it has been found that the two different proPO genes, *PmproPO1* and *PmproPO2*, were differentially expressed in different stages of larval development with *PmproPO2* and *PmproPO1* potentially being the major proPO gene in the early and late developmental stages, respectively [70,103].

Shrimp proPOs have been shown to be localized only in the hemocytes [95,98]. Accordingly, all the penaeid shrimp proPO mRNA transcripts, except for one from *M. japonicus* [94], are reported to be expressed exclusively in hemocytes [91,92,99]. This is in accord with previous studies in other crustaceans which have demonstrated that the enzymes of the proPO system are synthesized in hemocytes, localized in the granules of semigranular and granular hemocytes and released into the hemolymph by degranulation upon infection (reviewed in [9]). Nonetheless, a proPO gene identified from the plasma of the kuruma shrimp, *M. japonicus*, was recently reported to be mainly synthesized in the hepatopancreas and displayed a PO activity in the crustacean plasma [94].

All currently known shrimp proPOs exhibit the typical characteristic of arthropod proPOs, including having two functional copper-binding sites (copper binding sites A and B), a proteolytic activation site, and no hydrophobic signal peptide. As with other members of the type-3 copper protein family, shrimp proPOs contain a canonical type 3 bi-nuclear active site with six structurally conserved histidine residues within the two annotated copper-binding sites (A and B). Almost all currently available sequences of shrimp proPOs have been shown to belong to the penaeid shrimp proPO clade of the crustacean proPOs group, which contains the two sub-distinct groups of proPO1 and proPO2 [92]. The exception, however, is the novel proPO-like protein (proPOb) identified from *M. japonicus* hemolymph, which differed from the previously reported crustacean's proPO due to their cDNA and deduced amino acid sequences showed low sequence identity (approximately 30%) with the previously reported proPO sequences (proPO1 and proPO2) of penaeid shrimp [94].

5. Negative regulation of the proPO cascade

Melanization, induced by activation of the proPO system, is essential for the immune defense. However, the melanin reaction is tightly controlled at multiple levels, including by inhibition of the SP cascade by proteinase inhibitors, the PO activity by PO inhibitors, and the melanin reaction products by melanization-inhibiting protein (MIP). This tight control is required since excess melanin reaction products (highly reactive and toxic quinone intermediates) can cause damage and death to the host cells. Unfortunately, studies on the inhibitors that negatively regulate the proPO system or melanization in penaeid shrimp are not yet available. Rather, only the nucleotide sequence and transcript expression profiles of serpins [104,105] and MIP [106] homologues have been reported to date.

Various proteinase inhibitors, including members of the serpin and pacifastin superfamily, have been functionally characterized as negative regulators of the proPO activation cascade by inhibiting the SPs in different insect and crustacean species [9]. Serpin is a class of proteinase inhibitors that act as suicide-like substrates by binding covalently to their specific target proteinases. In insects, serpins from *D. melanogaster* (Serp-5, -27A, -28D and -77Ba) [107–111], *A. gambiae* (SRPN2) [112,113], *M. sexta* (Serp-1J, -3, -4, -5 and -6) [16,62,114–116] and *T. molitor* (SPN48) [117] have been identified as negative regulators of the melanization cascade. However, in crustaceans, so far only one SP inhibitor, pacifastin, from the crayfish *P. leniusculus* has been reported to be a specific inhibitor for PIPPAE1. This crayfish pacifastin has a molecular mass of 155 kDa and contains a light chain with nine likely proteinase inhibitor domains of the pacifastin family and a heavy chain containing three transferrin lobes [118]. In shrimp, only a few serpins have been reported, but their expression profiles suggest that they are likely to be involved in the shrimp immune response against bacterial and viral infections [104,105]. However, the function of these genes in the proPO system has not been investigated.

MIP was originally identified in the coleopteran insect *T. molitor*, and was found to decrease the melanization reaction by inhibiting the melanin synthesis from quinone compounds, but not to affect the PO activity [119]. In crustaceans, the MIP homologue from the crayfish, *P. leniusculus* (*PIMIP*) has an amino acid sequence similarity (approximately 55%) to ficolin, a lectin protein and shares an amino acid sequence similarity with the aspartic acid rich motif of the *T. molitor* MIP. The *PIMIP* functions in preventing the melanin-forming reactions from quinone and also the PPAE activity [120]. In shrimp, a homologue of MIP has been identified in *P. monodon* with an 80% amino acid sequence similarity to the crayfish *PIMIP* [106]. However, the function of the shrimp *PmMIP* has not been experimentally verified.

In the absence of any information on these inhibitors, the understanding of the molecular mechanisms by which inhibitors control the melanization cascades in penaeid shrimp remains incomplete.

6. POs are important in shrimp immunity

The importance of the proPO activation system/melanization in the host's defense against pathogen infections in shrimp and other crustaceans has been investigated recently using *in vivo* gene silencing. Although in some insects it has been reported that the proPO system is not essential for defense against microbial infections [121,122], in crayfish the suppression of the proPO gene using RNAi mediated gene knockdown of the *P. leniusculus* proPO gene suggested a potentially important role of proPO in crayfish immunity [75].

Likewise, in penaeid shrimp the proPO system was found to be essential for the shrimp's defense against pathogenic microorganisms as follows. In *F. chinensis*, proPO transcripts were up-regulated in response to *V. anguillarum* infection [99], whilst in *L. vannamei*, the expression levels of proPO1 and proPO2 were both down-regulated after WSSV infection [97,98] or following *V. alginolyticus* challenge as well as after ecdysone treatment [123]. In *P. monodon*, in which the significant role of proPOs was first clarified, dsRNA-mediated gene knockdown of the proPO system component (two proPO and two PPAE transcripts) significantly reduced the total PO activity in the shrimp hemolymph as well as enhancing the susceptibility of the shrimp to infection with a pathogenic isolate of *V. harveyi* [69,70,92]. In *M. japonicus*, dsRNA-mediated gene knockdown of the proPO gene resulted in a reduction in the hemocyte count, an increase in the bacterial load in the hemolymph even in the absence of a bacterial or viral challenge, and in an acute increase in the shrimp mortality [124]. In *L. vannamei*, PPAE gene (as *LvPPAE1*) knockdown reduces the survival of shrimp after *V. harveyi* infection, supporting an important role for shrimp PPAE in the defense against bacterial invasion [71]. Overall, these *in vivo* molecular investigations suggest that the proPO system is critical for the defense against pathogenic infections, especially in both *P. monodon* and *M. japonicus*, as well as in penaeid shrimp in general [69,70,92,124].

Significantly, silencing of proPO genes through dsRNA interference affected the expression levels of other immune gene transcripts in both penaeid shrimp examined [34,124]. Down-regulation of the *M. japonicus* proPO gene led to a reduced expression level of the antimicrobial peptide (AMP) genes, including lysozyme, crustin and penaeidin [124], whereas down-regulation of the two proPO dsRNA of *P. monodon* significantly decreased the transcription levels of two genes in the proPO system (*PmLGBP* and *PmPPAE2*), and two other AMP genes (*PEN3* and *Crus-likePm*) [34]. Obviously, the proPO system is somehow interrelated with other branches of the crustacean immune system, and there are several reports in the literature on insect immunity that suggest a correlation between the activation of the proPO system and AMP synthesis. In the insects *M. sexta* and *T. molitor*, it has been reported that some SPs in the proPO pathway have the ability to initiate the expression of AMPs via the Toll signaling pathway [125,126]. However, this important insight into the regulation of the proPO system and the molecular cross-talk between AMP production and the proPO system has not been evaluated let alone confirmed in shrimp immunity and so awaits further studies.

7. The proPO system in *P. monodon*

The shrimp proPO system has been investigated for more than 12 years. However, the immune cascade leading to activation of inactive proPO to active PO in arthropods is still largely undescribed in penaeid shrimp, with most available data being available instead from insect species. In this part, we review the research on the proPO system of the shrimp *P. monodon*. Using EST database searching (the complete annotated genome sequence of a penaeid shrimp is not yet available) and PCR-based approaches, 10 full-length cDNAs of two proPOs, four SPs, three SPs and one PRP have been identified in *P. monodon*. The molecular characteristics of these genes are shown in Table 2 and Fig. 2. RNAi-mediated gene silencing has been used to test the function of eight of these candidate genes in the proPO system in *P. monodon*, from which the knockdown in expression levels of seven of these genes (*PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1*, *PmPPAE2*, *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* and *PmLGBP*) significantly decreased the hemolymph PO activity, supporting that these proteins function in the proPO system of this shrimp [34,69,70,92, Amparyup et al., unpublished data]. In contrast, the knockdown of *PmClipSP1*, which has a 57% amino acid sequence similarity to the *A. gambiae* serine protease 14D, did not alter the hemolymph PO activity, but resulted in an increased number of bacteria in the hemolymph and in the mortality rate of shrimp infected with *V. harveyi* [72]. As to the remaining two uncharacterized proteins (*PmClipSP2* and *PmMasSPH3*), based on analysis of their amino acid sequences for homology, they may function in the proPO cascade. These are discussed with respect to their functional categories below.

7.1. The PRP of *P. monodon*

The *P. monodon* LGBP (*PmLGBP*) was recently reported to act as a PRP, binding to LPS or β -1,3-glucan and activating the proPO system [34]. This protein was initially identified as a β GBP in *P. monodon*, based on its binding activity to β -1,3-glucan but not to LPS [49]. However, recent investigations have identified a *PmLGBP* that binds bacterial LPS and β -1,3-glucan with a dissociation constant of 6.86×10^{-7} M and 3.55×10^{-7} M, respectively, and activates the proPO system in the presence of LPS or β -1,3-glucan [34]. Gene silencing of *PmLGBP* resulted in a significant decrease in the total PO activity, but no significant effect on the transcript expression levels of genes in the proPO system (*PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* and *PmPPAE2*), AMPs (*PEN3*, *Crus-likePm*, *SWDPm2* and lysozyme) or the Toll receptor. These results suggest that the expression of shrimp AMPs is independent of *PmLGBP* signaling pathway [34].

7.2. PPAEs of *P. monodon*

The role of PPAE in the proPO or melanization cascade is well documented in insects. Within penaeid shrimp and *P. monodon*, *PmPPAE1* and *PmPPAE2* were the first candidate genes to be tested for their role in the proPO system. *PmPPAE1* is more closely related to the crustacean PPAE (a crayfish PPAE), and is comprised of a long glycine-rich region, a clip domain, a short proline-rich region at the N-terminus and a C-terminal SP domain [69]. In contrast, *PmPPAE2* is very similar to that of insect PPAEs and contains only an N-

terminal clip domain and a C-terminal SP domain [70]. The characterization of their genomic organization also supports that *PmPPAE1* and *PmPPAE2* are structurally different. The *PmPPAE1* gene displays a ten-exon/nine-intron structure, whereas *PmPPAE2* consists of eight exons and seven introns, supporting that the two *PmPPAEs* are encoded from different genes and that they do not arise as a result of alternative exon splicing [70].

PPAE and SPH have been found to be important for the proPO system in shrimp. Gene knockdown of *PmPPAE1* and *PmPPAE2* showed a significant reduction (37% and 41%, respectively) in the PO activity, whereas co-silencing of both PPAEs together resulted in no further significant reduction (41%) in the hemolymph PO activity. This implies that both *PmPPAE1* and *PmPPAE2* are, at least in part, members of the proPO activation cascade and play a role in the same branched-proPO pathway. Moreover, the two SPHs, *PmMasSPH1* and *PmMasSPH2* were characterized in *P. monodon* by gene silencing and the results indicate that the hemolymph PO activity of *PmMasSPH1* and *PmMasSPH2* knockdown shrimp were significantly decreased after injection of their corresponded dsRNAs, supporting that both SPHs are likely to be involved in the shrimp proPO system (Amparyup et al., unpublished data). Although it is not yet clear whether these SPHs function as a protein cofactor of PPAEs, we suspect that they may act as cofactors in the proPO cascade.

7.3. ProPOs of *P. monodon* and their relationship to the PPAEs

The two proPO isoforms so far identified in *P. monodon*, *PmproPO1* and *PmproPO2*, are mainly expressed in hemocytes. *PmproPO1* and *PmproPO2* have similar predicted molecular masses of 78.7 kDa and 79.2 kDa, respectively, and do not contain a signal peptide. *PmproPO1* shows an amino acid sequence identity and similarity with *PmproPO2* of 67% and 81%, respectively. Although PO has long been considered as a key enzyme in the proPO system, direct evidence showing the exact roles of PO in shrimp immunity is not available. Within *P. monodon*, the suppression of *PmproPO1*, *PmproPO2* or both gene transcript levels by dsRNA-mediated RNAi was shown to efficiently and specifically reduce the endogenous expression of their respective transcripts, and to significantly decrease the PO activity by 75%, 73% and 88%, respectively, when using L-dopa as substrates [92]. This *in vivo* assay clearly shows that both *PmproPOs* are key enzymes contributing to the PO activity and are also essential components of the biochemical pathway required for the proPO system in the *P. monodon* hemolymph. The meaning of the slight synergy observed in the double-knock down is unresolved between two overlapping or convergent pathways from that of just an enhanced efficiency of two parallel (redundant) or tissue specific components in the same pathway.

The relationship of shrimp PPAE and proPO gene expressions in the larval developmental stages has been investigated [70]. *PmPPAE1* and *PmproPO2* transcripts were expressed in all larval stages (nauplius, protozoa, mysis and post-larvae), whereas *PmPPAE2* and *PmproPO1* transcripts were mainly expressed in the late larval developmental stages (mysis and post-larvae). This differential gene expression profile suggests that *PmPPAE1* is likely to function as the proteinase activator of *PmproPO2* during the early larval developmental stage, whilst *PmPPAE2* might act as the activating proteinase of the *PmproPO1* in the later stages of the larval development [70]. However, confirmation that *PmPPAEs* directly cleaves *PmproPOs* (or not) is yet to be established.

7.4. Model of the *P. monodon* proPO cascade

In this review, we propose a model of the proPO activation cascade in *P. monodon*, based on the data derived from gene knockdown and biochemical experiments. This model is shown schematically in Fig. 3. Initially, *PmLGBP* acts a functional PRP for LPS and β -1,3-glucan detection and so plays a role in the recognition of microbes and the activation of the proPO system. This PRP-PAMP complex then probably activates the clip-SP cascades that can convert the inactive shrimp PPAEs (*PmPPAE1* and *PmPPAE2*) to active PPAEs. Stimulation of *PmPPAE1* and *PmPPAE2* leads to the activation of the respective *PmproPO2* and *PmproPO1* (to PO1 and PO2), resulting in the production of melanin and reactive oxygen compounds. Interestingly, specific down-regulation of these two proPOs significantly decreased the gene expression levels of the two AMPs (PEN3 and Crus-like*Pm*) and two genes in the proPO system (*PmLGBP* and *PmPPAE2*), supporting a likely cross-talk between the proPO system and AMP gene synthesis in *P. monodon*.

8. Conclusions

Melanization is an important mechanism in the immune system of shrimp as with other arthropods. In recent years, an increasing number of functional-characterized genes (PRPs, Clip-SPs and proPOs) in the proPO system, somewhat comparable to those in insects or other invertebrate species, have been described from penaeid shrimp. By binding to specific pathogen molecules (PAMPs), the PRPs (i.e. LGBP, GBP and/or C-type lectin) detect pathogen infections and subsequently activate Clip-SPs, PPAE and proPOs to finally activate PO and generate the melanin and their reaction products (reactive oxygen compounds) that entrap and / or are toxic to pathogens. This review highlights the rationale that the proPO system is an important immune system for fighting against pathogens in penaeid shrimp. However, there is little research on the mechanism of the proPO system in shrimp. The study of the genes and proteins involved in this system should be further investigated to unveil the mechanism of shrimp proPO system.

Acknowledgments

The work on the proPO system in *P. monodon* was supported by grants from the Thailand Research Fund (to P.A.), Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), and the Higher Education Research promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (FW 643A).

References

- [1] Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313–8.
- [2] Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197–216.
- [3] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819–26.
- [4] Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 2008;3:352–63.
- [5] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 2007;25:697–743.
- [6] Sritunyaluksana K, Söderhäll K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 2000;191:53–69.
- [7] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:116–26.
- [8] Nappi AJ, Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 2005;35:443–59.
- [9] Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol* 2008;29:263–71.
- [10] Kanost MR, Gorman MJ. Phenoloxidases in insect immunity. In: Beckage NE, editors. *Insect Immunology*. San Diego: Academic Press Inc; 2008, p. 69–96.
- [11] Cerenius L, Kawabata S, Lee BL, Nonaka M, Söderhäll K. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem Sci* 2010;35:575–83.
- [12] Zhao P, Li J, Wang Y, Jiang H. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem Mol Biol* 2007;37:952–9.
- [13] Cerenius L, Babu R, Söderhäll K, Jiravanichpaisal P. In vitro effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *J Invertebr Pathol* 2010;103:21–3.
- [14] Zhao P, Lu Z, Strand MR, Jiang H. Antiviral, anti-parasitic, and cytotoxic effects of 5,6-dihydroxyindole (DHI), a reactive compound generated by phenoloxidase during insect immune response. *Insect Biochem Mol Biol* 2011;41:645–52.
- [15] Yu XQ, Zhu YF, Ma C, Fabrick JA, Kanost MR. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem Mol Biol* 2002;32:1287–93.
- [16] Kanost MR, Jiang H, Yu XQ. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev* 2004;198:97–105.
- [17] Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:128–50.
- [18] Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 1996;271:13854–60.
- [19] Takehana A, Katsuyama T, Yano T, Oshima Y, Takada H, Aigaki T, et al. Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13705–10.
- [20] Lee MH, Osaki T, Lee JY, Baek MJ, Zhang R, Park JW, et al. Peptidoglycan recognition proteins involved in 1,3- β -glucan-dependent prophenoloxidase activation system of insect. *J Biol Chem* 2004;279:3218–27.
- [21] Charroux B, Rival T, Narbonne-Reveau K, Royet J. Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes Infect* 2009;11:631–6.
- [22] Sumathipala N, Jiang H. Involvement of *Manduca sexta* peptidoglycan recognition protein-1 in the recognition of bacteria and activation of prophenoloxidase system. *Insect Biochem Mol Biol* 2010;40:487–95.
- [23] Kim YS, Ryu JH, Han SJ, Choi KH, Nam KB, Jang IH, et al. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and β -1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem* 2000;275:32721–7.
- [24] Cerenius L, Liang Z, Duvic B, Keyser P, Hellman U, Palva ET, et al. Structure and biological activity of a 1,3- β -D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J Biol Chem* 1994;269:29462–7.
- [25] Ma C, Kanost MR. A β 1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *J Biol Chem* 2000;275:7505–14.
- [26] Jiang H, Ma C, Lu ZQ, Kanost MR. β -1,3-Glucan recognition protein-2 (β GRP-2) from *Manduca sexta*: an acute-phase protein that binds β -1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. *Insect Biochem Mol Biol* 2004;34:89–100.
- [27] Wang Y, Sumathipala N, Rayaprolu S, Jiang H. Recognition of microbial molecular patterns and stimulation of prophenoloxidase activation by a β -1,3-glucanase-related protein in *Manduca sexta* larval plasma. *Insect Biochem Mol Biol* 2011;41:322–31.
- [28] Beschin A, Bilej M, Hanssens F, Raymakers J, Van Dyck E, Revets H, et al. Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J Biol Chem* 1998;273:24948–54.
- [29] Lee SY, Wang R, Söderhäll K. A lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem* 2000;275:1337–43.
- [30] Yu XQ, Kanost MR. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Comp Immunol* 2004;28:891–900.
- [31] Yu XQ, Ling E, Tracy ME, Zhu Y. Immulectin-4 from the tobacco hornworm *Manduca sexta* binds to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Insect Mol Biol* 2006;15:119–28.
- [32] Vargas-Albores F, Jiménez-Vega F, Söderhäll K. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Dev Comp Immunol* 1996;20:299–306.
- [33] Junkunlo K, Prachumwat A, Tangprasittipap A, Senapin S, Bavornphinyo S, Flegel TW, et al. A novel lectin domain-containing protein (LvCTLD) associated with response of the whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* to yellow head virus (YHV). *Dev Comp Immunol* 2012;doi:10.1016/j.dci.2011.12.010.
- [34] Amparyup P, Sutthangkul J, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and β -1,3-glucan and activates shrimp prophenoloxidase system. *J Biol Chem* 2012;287:10060–9.
- [35] Duvic B, Söderhäll K. Purification and characterization of a β -1,3-glucan binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 1990;265:9327–32.
- [36] Duvic B, Söderhäll K. Purification and partial characterization of a β -1,3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur J Biochem* 1992;207:223–8.

- [37] Duvic B, Söderhäll K. β -1,3-Glucan-binding proteins from plasma of the fresh-water crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. *J Crust Biol* 1993;13:403–8.
- [38] Thörnqvist PO, Johansson MW, Söderhäll K. Oposonic activity of cell adhesion proteins and β -1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. *Dev Comp Immunol* 1994;18:3–12.
- [39] Yepiz-Plascencia G, Vargas-Albores F, Jimenez-Vega F, Ruiz-Verdugo LM, Romo-Figueroa G. Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1998;121:309–14.
- [40] Vargas-Albores F, Jiménez-Vega F, Yepiz-Plascencia GM. Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1997;116:453–8.
- [41] Yepiz-Plascencia G, Galván TG, Vargas-Albores F, García-Bañuelos M. Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein β -glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. *Mar Biotechnol* (NY) 2000;2:485–92.
- [42] Romo-Figueroa MG, Vargas-Requena C, Sotelo-Mundo RR, Vargas-Albores F, Higuera-Ciajara I, Söderhäll K, et al. Molecular cloning of a β -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Dev Comp Immunol* 2004;28:713–26.
- [43] Lai X, Kong J, Wang Q, Wang W, Meng X. Cloning and characterization of a β -1,3-glucan-binding protein from shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Biol Rep* 2011;38:4527–35.
- [44] Roux MM, Pain A, Klimpel KR, Dhar AK. The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein gene is up-regulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J Virol* 2002;76:7140–9.
- [45] Cheng W, Liu CH, Tsai CH, Chen JC. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 2005;18:297–310.
- [46] Du XJ, Zhao XF, Wang JX. Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mol Immunol* 2007;44:1085–94.
- [47] Liu F, Li F, Dong B, Wang X, Xiang J. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition protein, lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Biol Rep* 2009;36: 471–7.
- [48] Lin YC, Vaseeharan B, Chen JC. Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Dev Comp Immunol* 2008;32:1260–9.
- [49] Sritunyalucksana K, Lee SY, Söderhäll K. A β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 2002;26:237–45.
- [50] Vasta GR, Ahmed H, Tasumi S, Odom EW, Saito K. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition. *Adv Exp Med Biol* 2007;598:389–406.
- [51] Chen C, Durrant HJ, Newton RP, Ratcliffe NA. A study of novel lectins and their involvement in the activation of the prophenoloxidase system in *Blaberus discoidalis*. *Biochem J* 1995;310:23–31.
- [52] Yu XQ, Gan H, Kanost MR. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem Mol Biol* 1999;29:585–97.
- [53] Yu XQ, Kanost MR. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to Gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 2000;275:37373–81.
- [54] Wang XW, Zhang HW, Li X, Zhao XF, Wang JX. Characterization of a C-type lectin (PcLec2) as an upstream detector in the prophenoloxidase activating system of red swamp crayfish. *Fish Shellfish Immunol* 2011;30:241–7.
- [55] Wu C, Charoensapsri W, Nakamura S, Tassanakajon A, Söderhäll I, Söderhäll, K. An MBL-like protein may interfere with the activation of the proPO-system, an important innate immune reaction in invertebrates. *Immunobiology* 2012;doi:10.1016/j.imbio.2012.02.011.
- [56] Wang XW, Wang JX. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Dev Comp Immunol* 2012;doi:10.1016/j.dci.2012.04.009.
- [57] Jiang H, Kanost MR. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 2000;30:95–105.
- [58] Ross J, Jiang H, Kanost MR, Wang Y. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene* 2003;304:117–31.
- [59] Satoh D, Horii A, Ochiai M, Ashida M. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*: purification, characterization and cDNA cloning. *J Biol Chem* 1999;274:7441–53.
- [60] Jiang H, Wang Y, Kanost MR. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12220–5.
- [61] Jiang H, Wang Y, Yu XQ, Kanost MR. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*: A bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. *J Biol Chem* 2003;278:3552–61.
- [62] Jiang H, Wang Y, Yu XQ, Zhu Y, Kanost MR. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33:1049–60.
- [63] Gupta S, Wang Y, Jiang H. *Manduca sexta* prophenoloxidase (proPO) activation requires proPO-activating proteinase (PAP) and serine proteinase homologs (SPHs) simultaneously. *Insect Biochem Mol Biol* 2005;35:241–8.
- [64] Lee SY, Kwon TH, Hyun JH, Choi JS, Kawabata SI, Iwanaga S, et al. *In vitro* activation of pro-phenol-oxidase by two kinds of prophenol-oxidase-activating factors isolated from hemolymph of coleopteran, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem* 1998;254:50–7.
- [65] Lee SY, Cho MY, Hyun JH, Lee KM, Homma KI, Natori S, et al. Molecular cloning of cDNA for pro-phenol-oxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1,3- β -glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem* 1998;257:615–21.
- [66] Kwon TH, Kim MS, Choi HW, Joo CH, Cho MY, Lee BL. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem* 2000;267:6188–96.
- [67] Lee KY, Zhang R, Kim MS, Park JW, Park HY, Kawabata S, Lee BL. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by Ca^{2+} in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. *Eur J Biochem* 2002;269:4375–83.
- [68] Wang R, Lee SY, Cerenius L, Söderhäll K. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Eur J Biochem* 2001;268:895–902.
- [69] Charoensapsri W, Amparyup P, Hirano I, Aoki T, Tassanakajon A. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Dev Comp Immunol* 2009;33:811–20.
- [70] Charoensapsri W, Amparyup P, Hirano I, Aoki T, Tassanakajon A. PmPPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. *Dev Comp Immunol* 2011;35:115–24.

- [71] Jang IK, Pang Z, Yu J, Kim SK, Seo HC, Cho YR. Selectively enhanced expression of prophenoloxidase activating enzyme 1 (PPAE1) at a bacteria clearance site in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. BMC Immunol 2011;12:70.
- [72] Amparyup P, Wiriyaakradacha K, Charoensapsri W, Tassanakajon A. A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. Dev Comp Immunol 2010;34:168–76.
- [73] Ren Q, Xu ZL, Wang XW, Zhao XF, Wang JX. Clip domain serine protease and its homolog respond to *Vibrio* challenge in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol 2009;26:787–98.
- [74] Vaseeharan B, Shanthi S, Prabhu NM. A novel clip domain serine proteinase (SPs) gene from the haemocytes of Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*: Molecular cloning, characterization and expression analysis. Fish Shellfish Immunol. 2011;30:980–5.
- [75] Liu H, Jiravanichpaisal P, Cerenius L, Lee BL, Söderhäll I, Söderhäll K. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. J Biol Chem 2007;282:33593–8.
- [76] Kim MS, Baek MJ, Lee MH, Park JW, Lee SY, Söderhäll K, et al. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. J Biol Chem 2002;277:39999–40004.
- [77] Liu H, Wu C, Matsuda Y, Kawabata S, Lee BL, Söderhäll K, et al. Peptidoglycan activation of the proPO-system without a peptidoglycan receptor protein (PGRP)? Dev Comp Immunol 2011;35:51–61.
- [78] Amparyup P, Jitvaropas R, Pulsook N, Tassanakajon A. Molecular cloning, characterization, and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol 2007;22:535–46.
- [79] Jitvaropas R, Amparyup P, Gross PS, Tassanakajon A. Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2009;153:236–43.
- [80] Sriphajit T, Flegel TW, Senapin S. Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus. Dev Comp Immunol 2007;31:1145–58.
- [81] Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, Takahashi Y, Aoki T. Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). Fish Shellfish Immunol 2005;18:39–48.
- [82] Ren Q, Zhao XF, Wang JX. Identification of three different types of serine proteases (one SP and two SPs) in Chinese white shrimp. Fish Shellfish Immunol 2011;30:456–66.
- [83] Adachi K, Hirata T, Nishioka T, Sakaguchi M. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2003;134:135–41.
- [84] Decker H, Jaenicke E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. Dev Comp Immunol 2004;28:673–87.
- [85] Lee SY, Lee BL, Söderhäll K. Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. Biochem Biophys Res Commun 2004;322:490–6.
- [86] Hall M, Scott T, Sugumaran M, Söderhäll K, Law JH. Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: Purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:7764–8.
- [87] Kawabata T, Yasuhara Y, Ochai M, Matsura S, Ashida M. Molecular cloning of insect pro-phenoloxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:7774–8.
- [88] Fujimoto K, Okino N, Kawabata S, Iwanaga S, Ohnishi E. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A₁ of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:7769–73.
- [89] Aspán A, Huang TS, Cerenius L, Söderhäll K. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:939–43.
- [90] Gollas-Galván T, Hernández-López J, Vargas-Albores F. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1999;122:77–82.
- [91] Sritunyalucksana K, Cerenius L, Söderhäll K. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 1999;23:179–86.
- [92] Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 2009;33:247–56.
- [93] Adachi K, Hirata T, Nagai K, Fujio A, Sakaguchi M. Hemocyanin-related reactions induce blackening of freeze-thawed prawn during storage. In: Sakaguchi M, editor. More efficient utilization of fish and fisheries products. Amsterdam: Elsevier; 2004. p. 317–30.
- [94] Masuda T, Otomo R, Kuyama H, Momoji K, Tonomoto M, Sakai S, et al. A novel type of prophenoloxidase from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* contributes to the melanization of plasma in crustaceans. Fish Shellfish Immunol 2012;32:61–8.
- [95] Lai CY, Cheng W, Kuo CM. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 2005;18:417–30.
- [96] Wang YC, Chang PS, Chen HY. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 2007;23:1161–77.
- [97] Ai HS, Huang YC, Li SD, Weng SP, Yu XQ, He JG. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol 2008;25:28–39.
- [98] Ai HS, Liao JX, Huang XD, Yin ZX, Weng SP, Zhao ZY, et al. A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. Dev Comp Immunol 2009;33:59–68.
- [99] Gao H, Li F, Dong B, Zhang Q, Xiang J. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase (ProPO) cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and its transcription injected by *Vibrio anguillarum*. Mol Biol Rep 2009;36:1159–66.
- [100] Lee WJ, Ahmed A, della Torre A, Kobayashi A, Ashida M, Brey PT. Molecular cloning and chromosomal localization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol 1998;7:41–50.
- [101] Müller HM, Dimopoulos G, Blass C, Kafatos FC. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. J Biol Chem 1999;274:11727–35.
- [102] Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. Science 2002;298:159–65.
- [103] Jiravanichpaisal P, Puanglarp N, Petkon S, Donnuea S, Söderhäll I, Söderhäll K. Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol 2007;23:815–24.
- [104] Liu Y, Li F, Wang B, Dong B, Zhang X, Xiang J. A serpin from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to bacteria and WSSV challenge. Fish Shellfish Immunol 2009;26:345–51.
- [105] Homvise T, Tassanakajon A, Somboonwiwat K. *Penaeus monodon* SERPIN, *PmSERPIN6*, is implicated in the shrimp innate immunity. Fish Shellfish Immunol 2010;29:890–8.
- [106] Anghong P, Watthanasurorot A, Klinbunga S, Ruangdej U, Söderhäll I, Jiravanichpaisal P. Cloning and characterization of a melanization inhibition protein (*PmMIP*) of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol 2010;29:464–8.
- [107] De Gregorio E, Han SJ, Lee WJ, Baek MJ, Osaki T, Kawabata S, et al. An immune-responsive serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. Dev Cell 2002; 3:581–92.

- [108] Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, et al. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. EMBO J 2002;21:6330–7.
- [109] Scherfer C, Tang H, Kambris Z, Lhocine N, Hashimoto C, Lemaitre B. *Drosophila* Serpin-28D regulates hemolymph phenoloxidase activity and adult pigmentation. Dev Biol 2008;323:189–96.
- [110] Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C. A serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of *Drosophila*. Dev Cell 2008;15:617–26.
- [111] Ahmad ST, Sweeney ST, Lee JA, Sweeney NT, Gao FB. Genetic screen identifies serpin5 as a regulator of the toll pathway and CHMP2B toxicity associated with frontotemporal dementia. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:12168–73.
- [112] Michel K, Budd A, Pinto S, Gibson TJ, Kafatos FC. *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. EMBO Rep 2005;6:891–7.
- [113] Michel K, Suwanchaichinda C, Morlais I, Lambrechts L, Cohuet A, Awono-Ambene PH, et al. Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:16858–63.
- [114] Zhu Y, Wang Y, Gorman MJ, Jiang H, Kanost MR. *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase activating proteinase. J Biol Chem 2003;278:46556–64.
- [115] Tong Y, Jiang H, Kanost MR. Identification of plasma proteases inhibited by *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 and their association with components of the prophenoloxidase activation pathway. J Biol Chem 2005;280:14341–8.
- [116] Zou Z, Jiang H. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8: cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. J Biol Chem 2005;280:14341–8.
- [117] Jiang R, Kim EH, Gong JH, Kwon HM, Kim CH, Ryu KH, et al. Three pairs of protease-serpin complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses. J Biol Chem 2009;284:35652–8.
- [118] Liang Z, Sottrup-Jensen L, Aspán A, Hall M, Söderhäll K. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferring chain. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:6682–7.
- [119] Zhao M, Söderhäll I, Park JW, Ma YG, Osaki T, Ha NC, et al. A novel 43-kDa protein as a negative regulatory component of phenoloxidase-induced melanin synthesis. J Biol Chem 2005;280:24744–51.
- [120] Söderhäll I, Wu C, Novotny M, Lee BL, Söderhäll K. A novel protein acts as a negative regulator of prophenoloxidase activation and melanization in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J Biol Chem 2009;284:6301–10.
- [121] Leclerc V, Pelte N, El Chamy L, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA, et al. Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. EMBO Rep 2006;7:231–5.
- [122] Schnitger AK, Kafatos FC, Osta MA. The melanization reaction is not required for survival of *Anopheles gambiae* mosquitoes after bacterial infections. J Biol Chem 2007;282:21884–8.
- [123] Yeh MS, Lai CY, Liu CH, Kuo CM, Cheng W. A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. Fish Shellfish Immunol 2009;26:49–55.
- [124] Fagutao FF, Koyama T, Kaizu A, Saito-Taki T, Kondo H, Aoki T, et al. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. FEBS J 2009;276:5298–306.
- [125] Kan H, Kim CH, Kwon HM, Park JW, Roh KB, Lee H, et al. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. J Biol Chem 2008;283:25316–23.
- [126] An C, Ishibashi J, Ragan EJ, Jiang H, Kanost MR. Functions of *Manduca sexta* hemolymph proteinases HP6 and HP8 in two innate immune pathways. J Biol Chem 2009;284:19716–26.

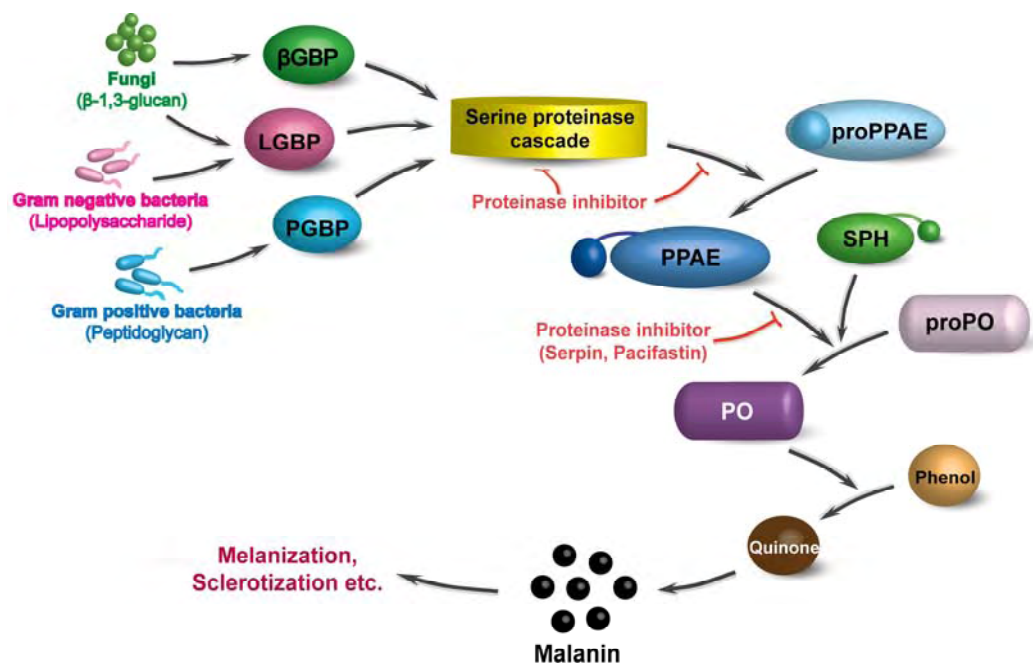


Figure 1. Schematic outline of the principle components in the prophenoloxidase (proPO)-activating system in arthropods. During microbial infection, non-self molecules that act as PAMPs (LPS, PGN and β -1,3-glucan) are recognized by the appropriate pattern recognition proteins (PRPs) (peptidoglycan binding protein (PGBP), LPS and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) and β -1,3-glucan binding protein (β GBP)). This event

triggers the activation cascade of several serine proteinase (SPs), leading to a final clip-domain serine proteinase (clip-SP) designated as a proPO-activating enzyme (PPAE). Subsequently, the inactive proPO zymogen is converted to active phenoloxidase (PO), by PPAE to produce the quinones, which can crosslink neighboring molecules to form melanin around invading microorganisms.

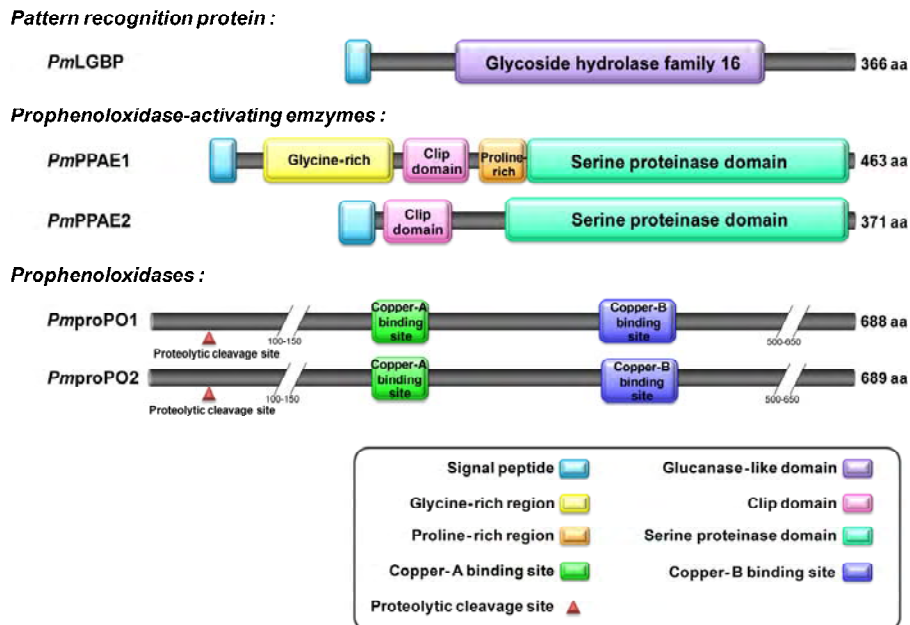


Figure 2. Schematic illustration of the primary structure of the genes in the proPO system of the penaeid shrimp *P. monodon*. LGBP: *PmLGBP* (Genbank accession no. JN415536). PPAEs: *PmPPAE1* (FJ595215) and *PmPPAE2* (FJ620685). proPOs: *PmproPO1* (AF099741) and *PmproPO2* (FJ025814).

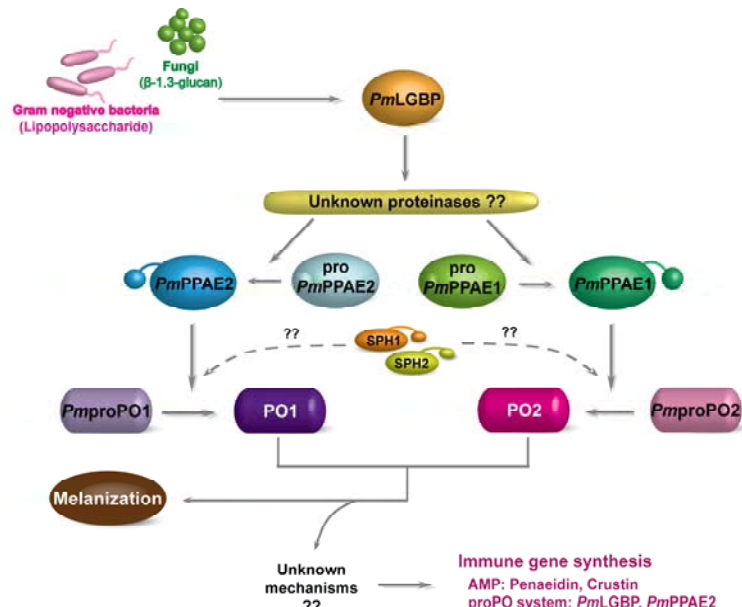


Figure 3. A proposed mechanism for the activation of the proPO cascade in the penaeid shrimp *P. monodon*. *PmLGBP* is a pattern recognition protein (PRP); *PmPPAE1* and *PmPPAE2* are prophenoloxidase activating enzymes (PPAEs); *PmMasSPH1* and *PmMasSPH2* are clip domain serine proteinase homologues (Clip-SPHs) and *PmproPO1* and *PmproPO2* are prophenoloxidases (proPOs).

Table 1. Genes in proPO system of penaeid shrimp.

Gene name	Scientific Name	Accession Number	Full-length cDNA (bp)	Coded amino acid	Signal peptide	Mature protein (amino acids/ MW)	Reference source
Pattern Recognition Proteins (PRPs)							
βGBP-HDL	<i>L. vannamei</i>	AY249858	6379	1454	-	1454 aa / 164.0 kDa	[42]
	<i>F. chinensis</i>	GU461662	6443	2021	-	2021 aa / 227.5 kDa	[43]
LGBP	<i>P. monodon</i>	JN415536	1140	366	17	349 aa / 39.9 kDa	[34]
		AF368168	1297	366	17	349 aa / 39.9 kDa	[49]
	<i>L. vannamei</i>	AY723297	1203	367	17	350 aa / 39.9 kDa	[96]
	<i>F. chinensis</i>	AY871267	1277	366	17	349 aa / 39.9 kDa	Liu et al. (Unpublished)
		DQ091256	1253	366	17	349 aa / 39.8 kDa	Du et al. (Unpublished)
	<i>L. stylirostris</i>	AF473579	1352	376	27	349 aa / 39.9 kDa	[44]
	<i>M. japonicus</i>	AB162766	1098	366	17	349 aa / 39.8 kDa	Aoki et al. (Unpublished)
		EU267001	1293	354	23	331 aa / 40.2 kDa	[48]
C-type lectin containing domain protein	<i>L. vannamei</i>	JF834160	1353	311	16	295 aa / 32.8 kDa	[33]
Clip-domain Serine Proteinases (Clip-SPs)							
PPAE1	<i>P. monodon</i>	FJ595215	1529	463	18	445 aa / 48.7 kDa	[69]
	<i>L. vannamei</i>		1557	462	18	444 aa / 48.5 kDa	[71]
PPAE2	<i>P. monodon</i>	FJ620685	1578	371	25	346 aa / 36.5 kDa	[70]
Clip-domain Serine Proteinase Homologues (Clip-SPHs)							
MasSPH1	<i>P. monodon</i>	DQ455050	1958	523	19	504 aa / 51.6 kDa	[78]
		DQ916148	1530	509	19	490 aa / 50.5 kDa	[80]
		DQ403191	1949	516	19	497 aa / 51.0 kDa	[80]
MasSPH2	<i>P. monodon</i>	FJ620686	1672	387	20	367 aa / 39.4 kDa	[69]
		EF128030	1740	386	19	367 aa / 39.4 kDa	Sriphaijit and Senapin (Unpublished)
Prophenoloxidases (proPOs)							
proPO1	<i>P. monodon</i>	AF099741	3002	688	-	688 aa/78.7 kDa	[91]
		AF521948	2061	686	-	686 aa/78.5 kDa	Ye et al. (Unpublished)
	<i>F. chinensis</i>	EU015060	2061	686	-	686 aa/78.2 kDa	[99]
		AB374531	3023	686	-	686 aa/78.1 kDa	Bae et al. (Unpublished)
	<i>P. semisulcatus</i>	AF521949	2055	684	-	684 aa/78.0 kDa	Ye et al. (Unpublished)

proPO2	<i>L. vannamei</i>	EU284136	2471	686	-	686 aa / 78.1 kDa	Lai et al. (Unpublished)
		EF115296	3232	686	-	686 aa / 78.1 kDa	[97]
	<i>M. japonicus</i>	AY723296	2061	686	-	686 aa / 78.1 kDa	[96]
		AB065371	2046	681	-	681 aa / 78.1 kDa	[93]
		AB073223	3047	688	-	688 aa / 80.0 kDa	Rojtinnakorn et al. (Unpublished)
	<i>P. monodon</i>	FJ025814	2536	689	-	689 aa / 79.2 kDa	[92]
		EU853256	2531	690	-	690 aa / 79.4 kDa	Ma and Chan (Unpublished)
	<i>L. vannamei</i>	EU373096	2504	691	-	691 aa / 78.8 kDa	[95]
proPOb	<i>F. chinensis</i>	EF565469	2514	691	-	691 aa / 78.8 kDa	[98]
		FJ594415	2312	687	-	687 aa / 78.8 kDa	Sun et al. (Unpublished)
	<i>M. japonicus</i>	AB617654	2453	708	18	690 aa / 79.1 kDa	[94]

Table 2. Molecular characteristics of the genes and their predicted protein products in the proPO system of the penaeid shrimp *P. monodon*.

Gene name	CDS / ORF	Closest gene (% amino acid similarity)	Putative N-glycosylation sites	Conserved domains	Biological functions/ Reference sources
Pattern Recognition Protein (PRP)					
<i>PmLGBP</i>	1101 bp/ 366 aa	<i>P. monodon</i> β GBP (99%)	NRS(66) and NLS(318)	Polysaccharide binding motif, glucanase and β -glucan recognition motifs and integrin recognition motifs (RGD)	Pattern recognition protein for LPS and β -1,3-glucan in the shrimp proPO system / [34]
Clip-domain Serine Proteinases (Clip-SPs)					
<i>PmPPAE1</i>	1392 bp/ 463 aa	<i>P. leniusculus</i> PPAE (70%)	NGS(42) and NAT(192)	Clip-domain and serine proteinase domain	PPAE in the shrimp proPO system that possibly mediates the activation of <i>PmproPO2</i> and important in shrimp immunity / [69]
<i>PmPPAE2</i>	1116 bp/ 371 aa	<i>M. sexta</i> PAP-1 (51%)	NVT(84)	Clip-domain and serine proteinase domain	PPAE in the shrimp proPO system that possibly mediates the activation of <i>PmproPO1</i> and important in shrimp immunity / [70]
<i>PmClipSP1</i>	1101 bp/ 366 aa	<i>A. gambiae</i> Serine protease 14D (57%)	NFS(219) and NKS(228)	Clip-domain and serine proteinase domain	Not required for shrimp proPO cascade but still plays a potential role in the antibacterial defense mechanism in shrimp immune response / [72]
<i>PmClipSP2</i>	1107 bp/ 369 aa	<i>D. melanogaster</i> melanization protease-1 (52%)	NPT(25), NTS(156), NGS(159) and NRT (184)	Clip-domain and serine proteinase domain	Not determined / (Amparyup et al., unpublished data)
Clip-domain Serine Proteinase Homologues (Clip-SPHs)					
<i>PmMasSPH1</i>	1572 bp/ 523 aa	<i>P. leniusculus</i> SP-like 2a (74%)	NDT(28) and NDT (203)	Clip-domain and serine proteinase-like domain	Multifunctional immune molecule and function in the shrimp proPO system / [78,80] (Amparyup et al., unpublished data)
<i>PmMasSPH2</i>	1164 bp/ 387 aa	<i>P. leniusculus</i> SP-like protein-1 (68%)	Not found	Clip-domain and serine proteinase-like domain	Function in shrimp proPO system / (Amparyup et al., unpublished data)
<i>PmMasSPH3</i>	1164 bp/ 387 aa	<i>P. monodon</i> MasSPH1 (57%)	NTT(12), NET(85), NCS(113), NTT(126) and NVT(246)	Clip-domain and serine proteinase-like domain	Not determined / (Amparyup et al., unpublished data)
Prophenoloxidasases (proPOs)					
<i>PmproPO1</i>	2067 bp/ 688 aa	<i>P. monodon</i> proPO1 (100%)	NET(117), NQT(170), NTS(571) and NTT(662)	Copper-binding sites A and B	Major component of proPO system and important in shrimp immunity / [92]
<i>PmproPO2</i>	2070 bp/ 689 aa	<i>P. monodon</i> proPO1 (81%)	NET(119), NET(172), NNS(275), NIS(357) and NLS(432)	Copper-binding sites A and B	Major component of proPO system and important in shrimp immunity / [92]