

Alix (ALG-2-interacting protein X) เกี่ยวข้องกับการตายจากการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งกุลาดำ  
(*Penaeus monodon*)

Alix (ALG-2-interacting protein X) Involving with death by WSSV Infection in Tiger Shrimp  
(*Penaeus monodon*)

จิราพร ไชยรัตน์<sup>1</sup>, ภคกุล สังข์สุริย<sup>2</sup>, แสงจันทร์ เสนาปิ่น<sup>2</sup> และ ทีมโมที ดับบลิว ฟลีเกล<sup>2</sup>

<sup>1</sup>คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ. เชียงใหม่ ๕๐๒๙๐

<sup>2</sup>หน่วยความเป็นเลิศกุ้ง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถ. พระราม 6 กรุงเทพฯ ๑๐๔๐๐

### บทคัดย่อ

Alix เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ programmed cell death (PCD) โดยทำปฏิกิริยากับโปรตีน ALG-2 (apoptosis-linked-gene-2) ซึ่งเป็นโปรตีนจับประจุแคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) และกระตุ้นให้เกิดกลไกการตาย จากการศึกษโปรตีนนี้ในระดับอณูชีวภาพ โดยทำการโคลนยีน Alix/AIP1 ของกุ้งกุลาดำ (*Pm-Alix*) ด้วยเทคนิค one step RT-PCR gene fishing, library hybridization และ RACE-PCR พบว่า *Pm-Alix* cDNA มีตำแหน่งอนุรักษ์ BRO1 domain ที่ N-terminus และ proline-rich ที่ C-terminus จากการตรวจติดตามความสัมพันธ์ของยีนนี้กับการติดเชื้อไวรัส WSSV ซึ่งทำให้เกิดการตายสูงในกุ้งกุลาดำ ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ผลการทดลองพบว่า ยีน *Pm-Alix* มีการแสดงออกในทุอวัยวะทดสอบ และการแสดงออกในเซลล์เลือดเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส WSSV อย่างชัดเจน รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่พบยีนชนิดนี้ในกลุ่มกุ้งและครัสเตเชีย

### Abstract

Alix/AIP1 involves in apoptosis or programmed cell death (PCD). It interacts with ALG-2 (apoptosis-linked-gene-2), a  $Ca^{2+}$ -binding protein, and then activates apoptotic mechanism. Black tiger shrimp Alix (*Pm-Alix*) was study in molecular level; gene fishing by on step RT-PCR, gene cloning by RACE and library hybridization techniques, expression in WSSV infection by semi-quantitative RT-PCR. It is resulted that *Pm-Alix* cDNA composed of conserved site; BRO1 domain at N-terminus and proline-rich region at C-terminus. Expression of *Pm-Alix* is ubiquitous and obviously involved in the WSSV infections. Furthermore, this is the first report of Alix not only in shrimp but also in crustacean.

## คำนำ

กลไกการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ programmed cell death (PCD) เป็นกลไกจำเพาะที่สำคัญ ตอบสนองโดยขบวนการกระตุ้นของโปรตีนยีนที่เกี่ยวข้อง การตายแบบ apoptosis เกี่ยวข้องในขบวนการทางชีวภาพหลายระบบ ได้แก่ พัฒนาการของตัวอ่อน ระบบภูมิคุ้มกัน และการเสริมสร้างเนื้อเยื่อ (tissue homeostasis) (Wyllie *et al.*, 1980) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่เกี่ยวข้องอย่างสำคัญกับระบบภูมิคุ้มกันแบบพื้นฐาน (innate immunity) ต่อการติดเชื้อไวรัส (Miller and White, 1998; Everett and MaFadden, 1999) เมื่อเซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะอย่างรวดเร็ว กล่าวคือ ขนาดเล็กลง โครมาตินรวมตัวกัน โครงสร้างของผนังเซลล์หลวม และดีเอ็นเอขาดเป็นชิ้นส่วน สุดท้ายเซลล์หมดสภาพจะถูกจับกินโดยมาโครฟาจ หรือเซลล์ข้างเคียงอื่น การตายของเซลล์แบบ apoptosis ไม่มีการอักเสบเกิดขึ้น (Griffin *et al.*, 1997)

กลไกการตายแบบ apoptosis เกี่ยวข้องกับโปรตีนยีนหลายตัว เช่น Caspases (cysteinyI aspartate-specific proteases) ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์กระตุ้นกลไกสำคัญ DNase (DNA nuclease) ทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอสายยาวให้เป็นชิ้น ส่วน IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) (White, 1996) TCTP (translationally controlled tumor protein) (Zhang and Fujise, 2001) ALG2 (apoptosis-linked-gene-2) และ Alix (ALG-2-interacting protein X or ALG-2-interacting protein 1, AIP1) (Missotten *et al.*, 1999; Vito *et al.*, 1999) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกลไกนี้

โปรตีน Alix/AIP1 ทำปฏิกิริยากับโปรตีน ALG-2 (apoptosis-linked-gene-2) ซึ่งเป็นโปรตีนจับประจุแคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) และมีรายงานพบความเกี่ยวข้องให้เกิดกลไกการตาย apoptosis (Sadoul, 2006) มีรายงานว่า Alix/AIP1 ในคน นอกจากเกี่ยวข้องใน apoptosis ยังเกี่ยวข้องกับกลไกหลายระบบ เช่น การเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) การส่งผ่านสารเข้าสู่เซลล์ (endocytic membrane trafficking) (Krebs and Klemenz, 2000) การเพิ่มจำนวนไวรัส (Strack *et al.*, 2003; von Schwedler *et al.*, 2003) human Alix จึงมีชื่อเรียกอื่น ได้แก่ PCD6IP AIP1 KIAA1375 MGC17003 Hp95 และ Alix/AIP1

การติดเชื้อไวรัส เช่น white spot syndrome virus (WSSV) และ yellow head virus (YHV) ในกุ้งกุลาดำ ทำให้กุ้งตายจำนวนมาก ก่อให้เกิดความเสียหายใหญ่หลวงต่อผลผลิตกุ้งกุลาดำ ได้มีรายงานหลายฉบับระบุว่า การตายจากการติดเชื้อไวรัสในกุ้งเกี่ยวข้องกับกลไกการตายแบบ apoptosis ทั้งชนิด DNA virus (Anggraeni and Owens, 2000; Sahtout, 2001; Wongprasert *et al.*, 2003; Granja *et al.*, 2003) RNA virus (Khanobdee *et al.*, 2002) อวัยวะติดเชื้อต่างๆ ได้แก่ เซลล์เลือด เหงือก หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง แสดงลักษณะของ apoptosis เช่น มีการรวมตัวของโครมาติน (Sahtout, 2001; Khanobdee *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis มีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส เช่น TCTP ในกุ้งครุมาติดเชื้อ WSSV (Rojtinnakom *et al.*, 2002) และในกุ้งกุลาดำติดเชื้อ WSSV (Bangrak *et al.*, 2004)

Caspase-3 ในกุ้งแชบ๊วยติดเชื้อ WSSV (Phongdara *et al.*, 2006) ดังนั้นเป็นที่แน่ชัดว่า กลไกการตายแบบ apoptosis มีความสำคัญต่อการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง

ในงานวิจัยนี้ได้แยกและศึกษาคุณลักษณะของยีน Alix/AIP1 ในกุ้งกุลาดำ (GenBank accession no. of DQ787160) และศึกษาความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสสำคัญ คือ WSSV

## วิธีดำเนินการ

### กุ้งตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

ใช้กุ้งกุลาดำขนาด 20-25 g เลี้ยงในน้ำเค็ม 10 ppt เก็บเลือดโดยใช้ anticoagulant AC1 solution (Soderhall, K. and Smith, 1983) และปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์เลือดด้วย 800 x g นาน 10 min ที่ 4°C และผ่าตัดเก็บตัวอย่างอวัยวะต่าง ได้แก่ หัวใจ ต่อมมน้ำเหลือง ก้านตา ลำไส้ กล้ามเนื้อ ขาวว่ายน้ำ แซ่เซลล์และเนื้อเยื่อใน Trizol™ [Invitrogen] 500 µl และเก็บที่ -80°C

### การสกัดแยก total RNA

แยก total RNA โดยใช้รีเอเจนต์ Trizol™ [Invitrogen]

### ยีนโคลนนิ่งและการวิเคราะห์

ออกแบบ primers Pj-Alix-F 5'-TTCCTCAATGCGCTGGCTCAG-3' และ Pj-Alix-R 5'-GTGGGCCTCC TGGATGTTCTG-3' จาก *Marsupenaeus japonicus* EST clone (GenBank accession no. AU176101) (Rojtin nakorn *et al.*, 2002) ทำ one step RT-PCR โดยใช้ SuperScript™ III Reverse Transcriptase kit [Invitrogen] นำแถบที่ได้ไปทำการหาลำดับเบส เปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) เมื่อได้ชิ้นส่วนของ *Pm-Alix* (*P. monodon* Alix/AIP1) นำไปทำ library hybridization screening เลือก positive clones ไปโคลนเข้า pDrive cloning vector [QIAGEN] ทำการหาลำดับเบสโดย Macrogen Co. Ltd. (South Korea)

ทำการหาลำดับเบสสมบูรณ์โดยใช้เทคนิค 5'RACE (rapid amplification of cDNA ends) –PCR ใช้ Marathon™ cDNA Amplification kit [Clontech] ใช้ specific primers คือ Alix\_Race1 5'-CATGTCAACCGTTGCACTCTTCAGCTC-3' และ Alix\_Race3 5'-TGGGCTTGCCAGGGCCGCTTTGC CGA-3' แล้วทำ nested PCR ด้วย primers Alix\_Race2 5'-GTTGAGCCTTGAGTGTCTCCACGTCCT C-3' และ Alix\_Race4 (5'-ACCG CGCCTGCGCTGCCTTGAACATCT-3' นำชิ้นยีนที่ได้ไปทำการหาลำดับเบส และทำ alignment ให้ได้ลำดับเบสสมบูรณ์โดยใช้ EXPASY (<http://au.expasy.org/>)

และวิเคราะห์ส่วนอนุรักษ์ (conserve domain) โดยใช้โปรแกรม RPSBLAST (NCBI) และเปรียบเทียบลำดับอามิโนแอซิดและสร้าง phylogenic tree โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.es.fsbnet.org/Doc/phylogendron/clustal-form.html>)

### ศึกษาการแสดงออกของ *Pm-Alix* ที่เนื้อเยื่อต่างๆ

ศึกษาการแสดงออกของยีน *Pm-Alix* ที่เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ก้านตา เหงือก หัวใจ เซลล์เลือด ตับ-ตับอ่อน ลำไส้ ต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ ขาวายน้ำ ใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยทำ one step RT-PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ *Pm-AlixF* 5'-TCCCGTCTCGGTACAGCAGGCCCT-3' และ *Pm-AlixR* 5'-GTTTCAGCCTTGAG TGTCTCCACGTCTC-3' ได้ขึ้นยีนขนาด 617 bp ซึ่งออกแบบจากยีนสมบูรณ์ของ *Pm-Alix* ที่ตำแหน่ง 1,083 ถึง 1,699 และใช้ PCR reaction ที่ 50°C 30 min ตามด้วยการ denaturation ที่ 94°C 2 นาที และทำ PCR 25 cycles ที่ denaturing 94°C 15 วินาที annealing at 60°C 1 นาที และ extension at 68°C for 1 นาที

ใช้  $\beta$ -actin เป็นยีนอ้างอิง โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ *actinF* 5'-TGACGGCCAGGTGATCACCA-3' และ *actinR* 5'-GAAGCACTTCCTGTGAACGA-3'

### ศึกษาการแสดงออกของยีน *Pm-Alix* ต่อการเชื้อไวรัสในกิ้ง

เตรียมเชื้อไวรัสโดยใช้ลำไส้กิ้งติดเชื้อมาบดใน LHB buffer 1:1 นำมากรองเพื่อเอาเศษเซลล์ออก และใช้เป็น virus stock ก่อนฉีดนำ stock มาเจือจางด้วย LHB buffer 1:100 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 100  $\mu$ l ต่อตัว ทำการเก็บเซลล์เลือดกิ้งที่เวลาต่างๆ หลังการฉีด และในกิ้งตายด้วย นำตัวอย่างทั้งหมดมาทำ semi-quantitative RT-PCR เช่นเดียวกับข้างต้น

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### การวิเคราะห์ *Pm-Alix*

จากชิ้นส่วนขนาด 150 bp ของ *Pm-Alix* cDNA และจากการทำ library hybridization ได้ 2 positive clones ซึ่งเมื่อหาลำดับเบส พบว่าได้ส่วน 3' end ที่มี poly A tail และพบ inhibitory element 3 ตำแหน่ง คือ AATAAA, ATTATTTT และ ATTA AAA นำชิ้นส่วนนี้ไปใช้ในการหาลำดับเบสสมบูรณ์ต่อไป

เมื่อทำ 5' RACE และทำ alignment จึงได้ลำดับเบสสมบูรณ์ของ *Pm-Alix* ขนาด 3,645 bp ประกอบด้วย open reading frame 2,583 bp ซึ่งสามารถแปลรหัสได้ 860 amino acids ดังภาพที่ 1 และสามารถทำนายได้ molecular weight ขนาด 94.6 kDa และมี isoelectric point = 5.59

จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดย BLAST พบว่า *Pm-Alix* มีเหมือนกับ PCD1IP AIP1 Alix ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยแสดงค่า identity สูง (E = 0.0 ถึง 5e-63) และที่สำคัญรายงานนี้เป็นรายงานแรกที่ระบุว่ามียีน Alix ในกลุ่มกิ้งและครัสเตเชีย

การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของ *Pm-Alix* พบว่าประกอบด้วย 860 อะมิโนแอซิด โดยมี BRO1 domain ที่ตำแหน่ง 160 อะมิโนแอซิดแรก (N-terminus) มี proline-rich region (PRR) ที่ตำแหน่ง 140 อะมิโนแอซิดท้าย (C-terminus) และมี tyrosine phosphorylation consensus site (KDNDFIY) ที่ตำแหน่ง 315-321 ซึ่งเป็นตำแหน่งจับกับ Src kinase ในขบวนการ phosphorylation (Schmidt *et al.*, 2005) BRO1 -



อักษรขีดเส้นใต้สองเส้น คือ putative translation inhibitory elements

a.

Hs	---MATFISVQLKKTSEVDLAKPLVKFIQQTYPSS-GGEEQAQYCRAAEELSKLRRAAVGR	56
Mm	---MASFIWQLKKTSEVDLAKPLVKFIQQTYPSS-GGEEQAQYCRAAEELSKLRRAALGR	56
Pm	MSATLETFGVPQKKASDIEILKPLNLTSTRYQ---TAEQDSYIGAINELAKLRNTAVAK	57
Am	---MAELIAVPLKKPSVDVVIKPLTNVIKSTYN-----NQKDYEAIAADF SKLRNNALWR	52
Tc	---MAELLSVPLKKPSEVDIVTPLKLNLIQSTRYS---TADKPEDCNEAISELAKLRNTAIWK	55
Dp	---MSKFLSVPLKKPSEVDIVKPLNLIQSTYNGASEEEKAKYLEAVNEFAKQRNTAIWK	57
Dm	---MSKFLSVPLKKPSEVDIVKPLNLIQSTYNGASEEEKAKYLEAVNEFAKQRNTAIWK	57
Aa	---MSDLLSVFVKKPTDVIDTRPLNLIKSSYSNLGSEKIVEISESVNKFNQQRNSAVWK	57
Ag	---MG-LLSVPMKKPSEVDFAKPLKTLVQSNYRNLEPDQLNVINEAIAELNLTLRNTAVWK	56
	: * ** . : : : . * * . : . * : : : : * * : :	
Hs	PLDKHEGALETLLRYDQICSI EPKFPFSENQICLFTTWKDAFDKGS LFGGSVKLALASL	116
Mm	PLDKHEGALETLLRYDQICSI EPKFPFSENQICLFTTWKDAFDKGS LFGGSVKLALASL	116
Pm	NLECHESLDVYRYDQIVALESKI PPSE--IQIPFKWKDAFDKGSIFGGRISLTVSSL	115
Am	AFEKYESSLEVIYSYYDQLCALEGKI PAHE--LQIPFKWKDAFDR-TIFGGKLSLTISTL	109
Tc	AFEKYESSLEIIYGYDQLVSLETKI PAQE--LQVFPKWDAFDKGSIFGNRISLTIPLS	113
Dp	FFEKYEASLEVIYAYDQICALETKI SVSE--LQIPFKWKDAFDKGSIFGKISLTHSTL	115
Dm	FFEKYEASLEVIYAYDQICALETKI SVSE--LQIPFKWKDAFDKGSIFGKISLTHSTL	115
Aa	AFEKFESSLEIYGYDQLSALETKI VVQD--FQVFPKWDAFDKGSIFGGRMSLTLTSL	115
Ag	VFDKQESGLEVNRYDQLSALESKI PVQE--LQVFPKWDAFDKGSIFGGRISLTLTSL	114
	: : * . * : * * * : : * * : : : : . * . * * * * : : * * . : . * : :	
Hs	GYEKSCVLFNCAALASQIAAEQNLDNDEGLKIAAKHYQFASGAF-----	160
Mm	GYEKSCVLFNCAALASQIAAEQNLDNDEGLKIAAKHYQFASGAF-----	160
Pm	SYEKVCVLFNIAAMQSQA AAKSADSEEMKLSAKLFQSAGIFS-----	160
Am	SYEKVCVLFNIAALQS SVAASQLESDEGLKLAALKLQQSAGIFNYLKANV	160
Tc	GYEKVCVLFNIAALQS SVAASQLESDEGLKLAALKLQQSAGIFNHL----	160
Dp	LYEKVCVLFNIAALQS SIAASQGLDNDEGLKMAIKLLQQSAGIFQ-----	160
Dm	LYEKVCVLFNIAALQS SIAANQSLSDDGLKLTIKLLQQSAGIFQ-----	160
Aa	SYEKVCVLFNIAALQS SVAASQGLDNDEGLKLAALKLQQSAGIFN-----	160
Ag	AYERTCVLFNLAALQS SVAASQSSTDTDEGLKQAALFQQSASITFTF-----	160
	: * . * * * * * : * * : : : : : * * * * * * : * * . : . * : :	

b.

Hs	SSPAGGHAPTPTPAPRTMP--PTKEQP <b>PARPPPP</b> -VLPANRAPSATAP-SPVGAGTA	54
Mm	---AGHAAPPTPAPRTMPVSTPAKEQP <b>PARPPPP</b> -VLPANRVPPASAAAAFAGVGTGTA	54
Pm	-----P <b>NP</b> FAHQS <b>ESAG</b> ---QAKS- <b>PPRPPPP</b> AVNPTQGAP <b>QMPQAPP</b> AQ <b>PPGQ</b>	47
	: * * : : : * . * . * * * * * * : : * . . . . .	
Hs	APAPSPQTPGS-APPQ <b>AQGP</b> EPYPTYPGYPGY <b>CQMP</b> MPMGYNPYAYGQYN--MPY <b>PEVY</b>	109
Mm	SAAP <b>PQ</b> TPGS-APPQ <b>AQGP</b> EPYPTYPGYPGY <b>CQMP</b> MPMGYNPYAYGQYN--MPY <b>PEVY</b>	109
Pm	API <b>PGAP</b> FAAGAVPPPYGAP <b>QNL</b> PY <b>PMNP</b> --TGMPT <b>QGYV</b> SSYPVYTP <b>MPQGYN</b> PFY	104
	: . * . * . : * * * . * :	
Hs	HQSP--GQAPY <b>PGPQQPSY</b> PFPP--QPPQ <b>SYYPQQ</b>	140
Mm	HQSP--GQAPY <b>PGPQQPT</b> YPFPP--QPPQ <b>SYYPQQ</b>	140
Pm	Q <b>Q</b> Q <b>PGYGTAPY</b> P <b>Q</b> Q <b>PTAV</b> PF <b>FP</b> Q <b>Q</b> FP <b>Q</b> Q <b>WPPQ</b>	140
	: * . * * * * * : : * :	

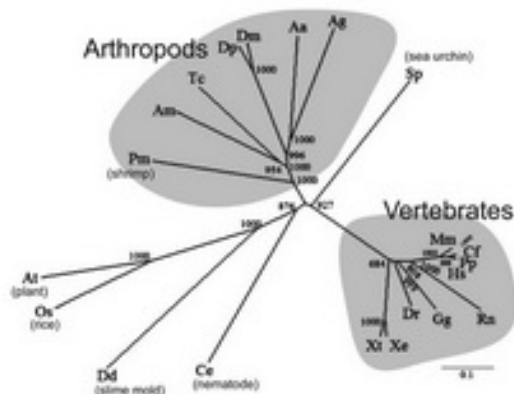
ภาพที่ 2 เปรียบเทียบส่วน (a) BRO1 domain และ (b) PRR region ของAlix

Hs : *Homo sapiens* (NP\_037506); Mm : *Mus musculus* (AAH51123); Pm : *P. monodon* (DQ787160); Am : *Apis mellifera* (XP\_396117); Tc : *Tribolium castaneum* (XP\_973055); Dp : Dm : *Drosophila melanogaster* (NP\_651582); Aa : *Aedes aegypti* (EAT36654); Ag : *Anopheles gambiae* (EAA11853)

domain เป็นตำแหน่งจับกับกลุ่มโปรตีน ESCRT-III (endosomal sorting complex required for transport processes (Kato *et al.*, 2003; Odorizzi *et al.*, 2003) พบว่า Pm-Alix BRO1 มีความเหมือนกับ BRO1 ของ arthropod คนและหนูมาก ถึง 40-60% (ภาพที่ 2(a))

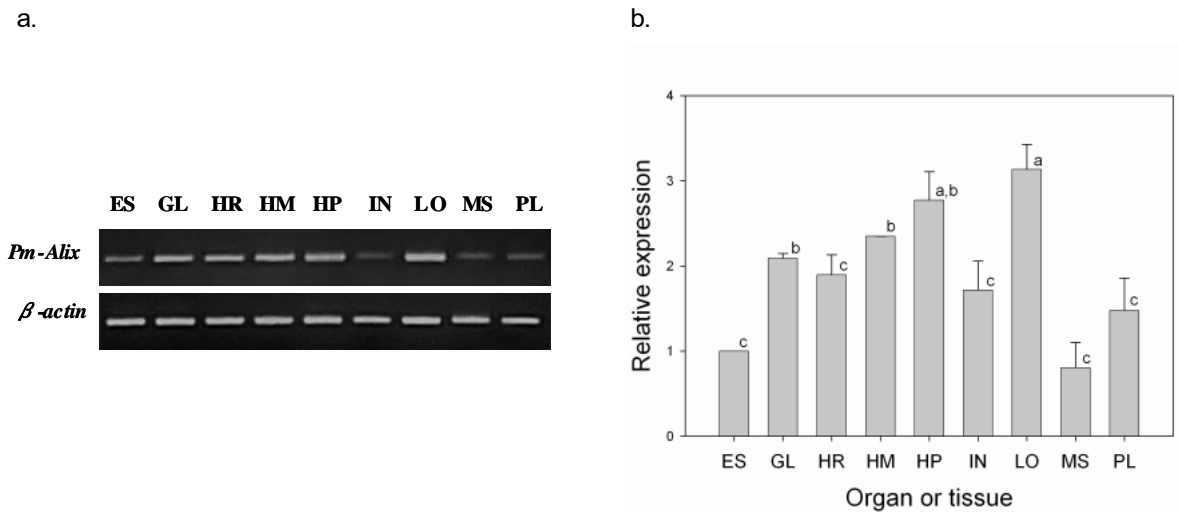
เมื่อเปรียบเทียบลำดับอะมิโนแอซิดที่ Pm-Alix PRR region พบว่ามีความเหมือนกับ PRR ของคนและหนู 33% และ 35% ตามลำดับ และประกอบด้วย SH3 motif (PXXP) endophilin binding site (PXRPPPP) เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2(b)) แต่ไม่พบตำแหน่งจับกับ ALG-2 ซึ่งมีรูปแบบเป็น PXY repeat 4 ชุด ได้ทำการทดสอบการจับกันของ Pm-Alix ALG-2 จาก EST clone (<http://pmonodon.biotech.or.th/>) โดยเทคนิค yeast 2-hybrid พบว่ามีการจับกันของโปรตีนทั้งสอง ดังนั้นเป็นไปได้ว่ารูปแบบตำแหน่งจับ ALG-2 ของ Pm-Alix น่าจะมีความแตกต่างจากกลุ่มแมลง และสัตว์อื่นๆ

เลือกโปรตีน Aix ของสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งให้ค่า E-values ระหว่าง 0.0 ถึง  $5e-63$  จาก BLASTX ทำการเปรียบเทียบโปรตีนโดยใช้ ClustalW พบว่า Pm-Alix อยู่กลุ่มเดียวกับ arthropod เช่น ผึ้ง แมลงเต่าทอง ยุง แมลงวัน เป็นต้น ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 phylogenetic tree ของ Alix proteins โดย bootstrap คำนวณจาก 1,000 random replicates

Am, *Apis mellifera* (XP\_396117); Tc, *Tribolium castaneum* (XP\_973055); Dp, *Drosophila pseudoobscura* (EAL27037); Dm, *Drosophila melanogaster* (NP\_651582); Aa, *Aedes aegypti* (EAT36654); Ag, *Anopheles gambiae* (EAA11853); Sp, *Strongylocentrotus purpuratus* (XP\_784906); Mm, *Mus musculus* (AAH51123); Cf, *Canis familiaris* (XP\_534215); Hs, *Homo sapiens* (NP\_037506); Pp, *Pongo pygmaeus* (CAH91045); Gg, *Gallus gallus* (NP\_001026164); Xi, *Xenopus laevis* (AAH43849); Xt, *Xenopus tropicalis* (NP\_001011064); Ce, *Caenorhabditis elegans* (CAA82667); Rn, *Rattus norvegicus* (XP\_343495); Dr, *Danio rerio* (AAH55177); Dd, *Dictyostelium discoideum* (XP\_643566); Os, *Oryza sativa* (NP\_922139); At, *Arabidopsis thaliana* (AAN12917)



ภาพที่ 4 การแสดงออกของยีน Pm-Alix ที่เนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง

a) DNA gel eletrophorsis จากเทคนิค RT-PCR b) ค่าปรับเทียบสัดส่วนความเข้มของแถบ PCR product

ES, eye stalk; GL, gill; HR, heart; HM, hemocytes; HP, hepatopancreas; IN, intestine; LO, lymphoid organ; MS, muscle; PL, pleopods

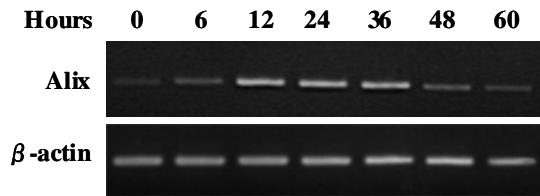
#### การแสดงออกของ Pm-Alix

จากการศึกษาด้วย one step RT-PCR (ภาพที่ 4) พบว่ายีน Pm-Alix มีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อของทุกอวัยวะทดสอบ ได้แก่ ก้านตา เหงือก หัวใจ เซลล์เลือด ตับ-ตับอ่อน ลำไส้ ต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ ขาวว่ายน้ำน้ำ ซึ่งผลสอดคล้องกับที่รายงานในหนู (Missotten *et al.*, 1999; Vito *et al.*, 1999) จากการทดลองนี้ยังพบว่า มีระดับการแสดงออกที่ต่างกันในแต่ละอวัยวะ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) พบว่า Pm-Alix แสดงออกต่ำใน ลำไส้ ก้านตา หัวใจ กล้ามเนื้อ และขาวว่ายน้ำน้ำ แสดงออกในระดับสูงในเหงือก เซลล์เลือด ตับ-ตับอ่อน และต่อมน้ำเหลือง สังเกตได้ว่าอวัยวะสำคัญในการต่อต้านเชื้อไวรัสจะมีการแสดงออกของ Pm-Alix สูงด้วย การแสดงออกในตับ-ตับอ่อนสูง อาจเนื่องจาก Alix ทำงานเกี่ยวข้องกับขบวนการ endocytosis ซึ่งเป็นขบวนการเก็บอาหารเข้าเซลล์ตับ โดยการควบคุมของ CIN85 และ endophilin (Al-Mohanna and Nott, 1986)

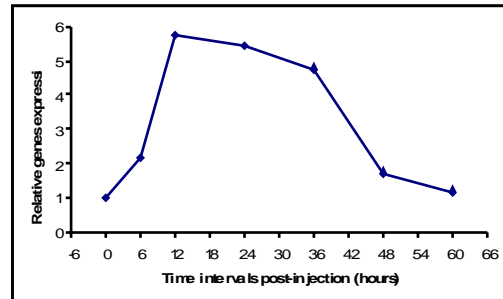
ศึกษาความสัมพันธ์ของ Pm-Alix ต่อการติดเชื้อ WSSV ซึ่งเป็นไวรัสสำคัญที่ก่อให้เกิดการตายสูงในกุ้ง โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR (ภาพที่ 5(a)) พบว่า ระดับการแสดงออกของ Pm-Alix สูงขึ้น 5 เท่า จากระดับตั้งต้น และลดต่ำลงกลับลดลงจนถึงระดับตั้งต้นเมื่อกุ้งใกล้ตายในช่วงเวลาที่ 60 (ภาพที่ 5(b)) ดังนั้น Pm-Alix น่า จะมีความเกี่ยวข้องกับการตายของกุ้งจากการติดเชื้อ WSSV



a.



b.



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ของ Pm-Alix และการติดเชื้อ WSSV

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัย พัฒนา และวิศวกรรม รหัสโครงการ BT-B-01-SG-23-4806 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และทุนวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

### เอกสารอ้างอิง

- Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A. 1986. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea:Decapoda). J Mar Biol Ass UK 66:403-14.
- Anggraeni, M.S., Owens, L. 2000. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org 40:85-92.
- Bangrak, P., Graidist, P., Chotigeat, W., Phongdara, A. 2004. Molecular cloning and expression of a mammalian homologue of a translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from *Penaeus monodon* shrimp. J Biotechnol 108: 219-26.
- Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M., Sadoul, R. Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. J Biol Chem 2002;277:29108-15.
- Everett, H., MaFadden, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. Trends Microbiol 1999;7:160-65.
- Granja, C.B., Aranguren, L.F., Vidal, O.M., Aragon, L., Salazar, M. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? Dis Aquat Org 2003;54:73-78.
- Griffin, D.E., Hardwick, J.M. Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection. Ann Rev Microbiol 1997;51:565-92.
- Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., et al. The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting J Biol Chem 2003;278: 39104-13.

- Khanobdee, K., Soowannayan, C., Flegel, T.W., Ubol, S., Withyachumnarnkul, B. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Dis Aquat Org* 2002;48:79-90.
- Krebs J. and Lemenz R. 2000. The ALG-2/AIP-colpex, a modulator at the interface between cell proliferation and cell death? A hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1498(2000) 153-161.
- Li, F., Zhang, D., Fujise, K. Characterization of Fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem* 2001;276:47542-49.
- Miller, L.K., White, E. Introduction apoptosis in virus infection. *Seminars in Virology* 1998;8: 443-44.
- Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K., Sadoul, R. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ* 1999;6:124-29.
- Odorizzi, G., Katzmann, D.J., Babst, M., Audhya, A., Emr, S.D. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 2003;116:1893-903.
- Phongdara, A., Wanna, W., Chotigeat, W. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*. *Aquaculture* 2006; 252:114-20.
- Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Itami, T., Takahashi, Y., Aoki, T. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol* 2002;13:69-83.
- Sadoul, R. Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse? *Biol Cell* 2006;98: 69-77.
- Sahtout, A.H., Hassan, M.D., Shariff, M. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 2001;44:155-59.
- Schmidt, M.H.H., Dikic, I., Bogler, O. Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *J Biol Chem* 2005;280: 3414-25.
- Shibata, H., Yamada, K., Mizuno, T., Yorikawa, C., Takahashi, H., Satoh, H., et al. The penta-EF-hand protein ALG-2 interacts with a region containing PxY repeats in Alix/AIP1, which is required for the subcellular punctate distribution of the amino-terminal truncation form of Alix/AIP1. *J Biochem (Tokyo)* 2004; 135: 117-28.
- Soderhall, K. and Smith, V.J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol* 1983;7(2):229-39.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., Gottlinger, H.G. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell (Cambridge, Mass)* 2003;114:689-99.
- Trioulier, Y., Torch, S., Blot, B., Cristina, N., Chatellard-Causse, C., Verna, J.M., et al. Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem* 2004;279:2046-52.
- Vito, P., Pellegrini, L., Guet, C., D'Adamio, L. Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca<sup>2+</sup>-dependent reaction. *J Biol Chem* 1999;274:1533-40.
- von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., et al. The protein network of HIV budding. *Cell* 2003;114:701-13.
- White, E. Life, death, and the pursuit of apoptosis *Genes Dev* 1996;10:1-15.
- Wongprasert, K., Khanobdee, K., Glunukarn, S.S., Meeratana, P., Withyachumnarnkul, B. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Dis Aquat Org* 2003;55:3-10.
- Wyllie, A.H., Kerr, J., Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-305.