แคลโมดูลินในกุ้งกุลาดำ

ราตรี วงศ์ปัญญา

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
E-mail: fscirtw@ku.ac.th

รับบทความ: 15 พฤศจิกายน 2554 ยอมรับตีพิมพ์: 15 มีนาคม 2555

บทคัดย่อ

แคลโมดูลินเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่พบได้ในยูคาริโอตทั่วไป มีบริเวณที่สามารถจับกับแคลเซียมและโปรตีนอื่นๆ ได้ โดยแคลโมดูลินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต เช่น ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณ เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญ กระบวนการยืด-หดตัวของกล้ามเนื้อ รวมถึงกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้วย ในกุ้งกุลาดำพบว่าโปรตีนแคลโมดูลินมีขนาด 17 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 149 ตัว โดยลำดับกรดอะมิโนของแคลโมดูลินในกุ้งกุลาดำมีความอนุรักษ์กับแคลโมดูลินในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ จึงอาจกล่าวได้ว่าโปรตีนแคลโมดูลินอาจทำหน้าที่คล้ายกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จากการศึกษาการแสดงออกของยีนแคลโมดูลินในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียพบว่ามีค่ามากกว่าในกุ้งปกติ ดังนั้นแคลโมดูลินจึงอาจเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์เพื่อให้มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อดังกล่าว อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนแคลโมดูลินต่อไป รวมถึงศึกษาโปรตีนที่สามารถจับกับแคลโมดูลินซึ่งอาจเกี่ยวข้องและเป็นข้อมูลสำคัญที่ทำให้ความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำสมบูรณ์ขึ้น ความรู้ที่ได้อาจนำไปพัฒนาและส่งเสริมให้อุตสาหกรรมการผลิตกุ้งกุลาดำมีความยั่งยืนต่อไป

คำสำคัญ: แคลโมดูลิน กุ้งกุลาดำ ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส

Calmodulin in the Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*

Ratree Wongpanya

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
E-mail: fscirtw@ku.ac.th

Abstract

Calmodulin (CaM) is a small Ca^{2+}-binding protein that found in a wide variety of eukaryotes. It is involved in binding several cellular proteins and regulating many biological activities and processes such as signal transduction, metabolism, muscle contraction and immune response. In the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, a molecular mass of the CaM is about 17 kDa containing 149 amino acids. It was found that expression of CaM gene in hemocyte of an infected shrimp was higher than that of normal shrimp. This finding indicated that CaM maybe involved in cell signaling in shrimp defense mechanism. However, functional analysis of the calmodulin including calmodulin-binding proteins still needs to be elucidated for further understanding of the shrimp immune system. Knowledge of immune response mechanism might be useful for sustainable development in the shrimp industry.

Keywords: Calmodulin, the black tiger shrimp, immunity, prophenoloxidase system

บทนำ:

การส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction) เป็นกระบวนสำคัญที่ทำให้เกิดการสื่อสารและตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งกระตุ้นแบบต่างๆ อย่างเหมาะสม การตอบสนองดังกล่าวอาจเกิดขึ้นผ่านหลายเส้นทางขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้น และเมื่อสัญญาณจากภายนอกเซลล์ส่งผ่านเข้ามายังภายในเซลล์แล้ว ตัวรับสัญญาณอันดับสอง (second messenger) ที่สำคัญ ได้แก่ ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) เป็นตัวการสำคัญที่ช่วยส่งสัญญาณต่อภายในเซลล์ โดยอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ การปลดปล่อยสารบางชนิด การส่งกระแสประสาท การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การยืด-หดตัวของกล้ามเนื้อ และเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์จึงมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ (Albert, 2008) ไอออนแคลเซียมอาจควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ได้โดยการจับกับโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องโดยตรง หรืออาศัยโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับแคลเซียมได้ดี ผลของการจับกับแคลเซียมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ส่งผลให้ทำให้สมบัติของโปรตีนเปลี่ยนแปลง โดยมีผลต่อเนื่องถึงหน้าที่ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องเป็นลำดับอีกด้วย โปรตีนที่มีบทบาทสำคัญดังกล่าวได้แก่ โปรตีนแคลโมดูลิน (calmodulin หรือ CaM) ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็กพบได้ในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตทุกชนิด แคลโมดูลินเป็นตัวกลางในการตอบสนองต่อปริมาณของแคลเซียมที่เปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ โครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของแคลโมดูลินมีความเหมาะสมต่อการจับกับไอออนแคลเซียม ภายหลังจากการจับกับไอออนดังกล่าว โปรตีนแคลโมดูลินสามารถจับกับโปรตีนอื่น ๆ (CaM-binding proteins) (Clapham, 1995; Sanabria et al., 2008) เช่น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึม ทรานคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factor) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งไอออนบนเมมเบรน เอนไซม์ไคเนสหรือฟอสฟาเทสต่าง ๆ รวมถึงโปรตีนโครงร่างของเซลล์ โปรตีนเหล่านี้จึงถูกควบคุมโดยรับสัญญาณต่อจากโปรตีนแคลโมดูลิน ดังนั้นแคลโมดูลินจึงเป็นตัวกลางสำคัญที่ทำให้ข้อมูลจากภายนอกเซลล์ส่งมายังภายในเซลล์ทำให้เซลล์ตอบสนองต่อสัญญาณจากภายนอกได้อย่างเหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ที่ถูกบุกรุกโดยเชื้อโรค หากเซลล์ไม่สามารถส่งสัญญาณและตอบสนองอย่างเหมาะสมแล้ว เซลล์นั้นอาจถูกทำลายไปได้

กุ้งกุลาดำเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ปริมาณการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบันทำให้อุตสาหกรรมดังกล่าวประสบกับปัญหาการติดเชื้อโรคทั้งไวรัสและแบคทีเรีย ส่งผลให้มีผลผลิตลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพ ความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อการรักษาและป้องกันการติดเชื้อก่อโรคต่าง ๆ โดยกุ้งกุลาดำมีระบบภูมิคุ้มกันคล้ายกับในครัสเตเชียนชนิดอื่นๆ ซึ่งอาศัยระบบภูมิคุ้มกันที่ติดตัวมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยด่านแรกมีเปลือกที่หนาทำหน้าที่ป้องกันเชื้อโรค นอกจากนี้ยังอาศัยเซลล์และสารน้ำต่าง ๆ ที่อยู่ในระบบไหลเวียนเลือด (ระบบเปิด) ช่วยทำให้เกิดการดักจับและกำจัดเชื้อโรคต่าง ๆ ได้ อย่างไรก็ตาม ส่วนที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุด ได้แก่ น้ำเลือด (haemolymph) ซึ่งประกอบด้วยเม็ดเลือด (haemocytes) ทำหน้าที่ในการผลิตโปรตีนและเอนไซม์ที่สำคัญต่างๆ เพื่อทำลายเชื้อโรค โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase, proPO cascade) ที่มีส่วนทำให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินเพื่อทำลายเชื้อโรคทั้งไวรัสและแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามความรู้ที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้นให้ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสทำงานยังมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างอย่างยิ่งการส่งสัญญาณจากการบุกรุกของไวรัสและแบคทีเรียต่อการตอบสนองในการทำงานของระบบดังกล่าว โปรตีนแคลโมดูลินเป็นโปรตีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณต่าง ๆ ภายในเซลล์ ดังนั้นหากมีความรู้และเข้าใจเกี่ยวกับสมบัติของโปรตีนแคลโมดูลินในกุ้งกุลาดำอาจนำไปสู่ความเข้าใจต่อการกำจัดเชื้อก่อโรคดังกล่าวได้

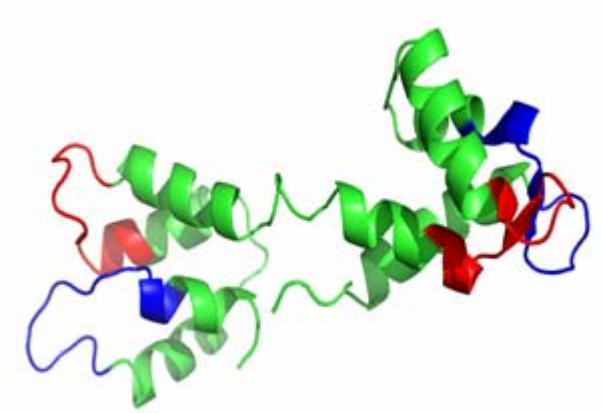
โครงสร้างและบทบาทของโปรตีนแคลโมดูลิน

แคลโมดูลินเป็นโปรตีนขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 140 กรดอะมิโน มีขนาดประมาณ 17 กิโลดาลตัน พบอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ แคลโมดูลินเป็นโปรตีนที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง มีความสามารถในการจับกับไอออนแคลเซียมได้ดี และเมื่อจับเป็นโปรตีนเชิงซ้อนกับแคลเซียมจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการส่งสัญญาณและควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ จากการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนแคลโมดูลินด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) และ X-ray crystallography ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น คน วัว และหนู (Bertini et al., 2009; Izumi et al., 2008; Rupp et al., 1996; Wall et al., 1997) พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของแคลโมดูลินมีความอนุรักษ์สูง โปรตีนดังกล่าวจึงอาจทำหน้าที่คล้ายกันในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยแคลโมดูลินมีโครงสร้างคล้ายลูกตุ้มน้ำหนัก (dumbbell structure) ที่ประกอบด้วยโปรตีนก้อนกลม (globular domain) 2 ก้อนเชื่อมต่อกันด้วยสายฮีลิกขนาด 28 กรดอะมิโน (Babu et al., 1988; Chattopadhyaya et al., 1992) โดยแต่ละโปรตีนก้อนกลมประกอบด้วยโครงสร้างที่เรียกว่า EF-hand ซึ่งมีลักษณะเป็น helix-loop-helix ที่สามารถจับกับไอออนแคลเซียมได้ ภายหลังจากการจับกับแคลเซียม โครงสร้างโดยรวมของโปรตีนแคลโมดูลินจะมีการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของโปรตีนแคลโมดูลินแสดงดังภาพที่ 1

เมื่อปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง เช่น มีความเข้นข้นเพิ่มมากขึ้น (จากการถูกกระตุ้น) โปรตีนแคลโมดูลินสามารถจับกับไอออนแคลเซียมได้ การจับกันดังกล่าวส่งผลให้แคลโมดูลินมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และสามารถจับกับโปรตีนเป้าหมาย (target proteins) ต่าง ๆ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แคลโมดูลินทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณภายในเซลล์ ส่วนโดเมนสำคัญในการจับกับแคลเซียมของโปรตีนแคลโมดูลิน คือส่วนที่เรียกว่า EF-hand จำนวน 4 โดเมน ซึ่งมีลักษณะดังภาพที่ 1 โดยโดเมนดังกล่าวมีความอนุรักษ์สูงมากในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ทั้ง คน หนูและกระต่าย (Sherbany et al., 1987) บริเวณสำคัญนี้มีลำดับกรดอะมิโนที่ดังแสดงในตาราง 1

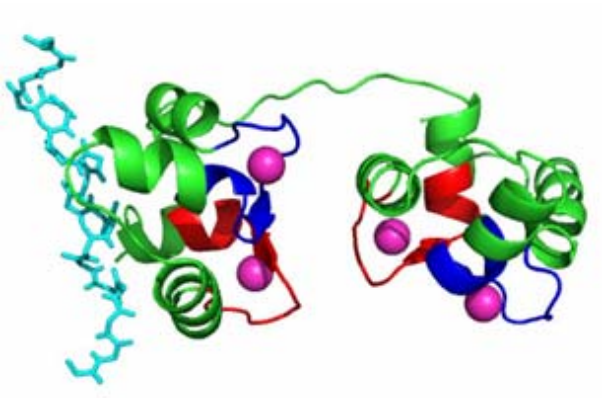
จากตาราง 1 โดเมนที่ช่วยในการจับกับไอออนแคลเซียมมีกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นหมู่คาร์บอกซิล ทำให้มีสภาพเหมาะสมต่อการจับกับแคลซียมซึ่งมีประจุบวก ผลของการจับกันดังกล่าวทำให้บริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) ของแคลโมดูลินถูกเปิดออก ทำให้โครงสร้างโดยรวมยืดยาวขึ้น จึงสามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายที่มีลักษณะเหมาะสม ซึ่งอาจจับโดยผิวหน้าของโครงสร้างหรือถูกโอบล้อมด้วยแคลโมดูลินขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิด โปรตีนในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ไคเนส เอนไซม์ฟอสฟาเทส โปรตีนในระบบการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โปรตีนโครงร่าง และโปรตีนในกล้ามเนื้อ แคลโมดูลินในสัตว์เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนบางชนิดผ่านการทำงานของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ เช่น CREB ERK JNK และ NFAT โดยทรานสคริปชันแฟคเตอร์เหล่านี้ถูกกระตุ้นให้ทำงานจากการเติมหรือกำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ไคเนสหรือฟอสฟาเทสที่เป็น

ก)



ข)

ค)



ภาพที่ 1 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนแคลโมดูลิน โดเมนสีแดงและสีน้ำเงินแสดงบริเวณจับกับไอออนแคลเซียม (สีชมพู)

ก. แคลโมดูลินก่อนจับแคลเซียม (1CFD)

ข. แคลโมดูลินจับกับแคลเซียม (1CLL)

ค. แคลโมดูลิน-แคลเซียมจับกับเพปไทด์เป้าหมาย (สีฟ้า) (1CFF)

ตาราง 1 บริเวณอนุรักษ์ของ EF-hand ที่จับกับแคลเซียมในแคลโมดูลินของคน

โดเมน	ตำแหน่ง	ลำดับกรดอะมิโน
1	21-33	DKDGDGTITTKEL
2	57-69	DADGNGTIDFPEF
3	94-106	DKDGNGFISAAEL
4	130-142	DIDGDGQVNYEEF

เป้าหมายของโปรตีนแคลโมดูลิน จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมายที่สามารถจับกับแคลโมดูลิน พบว่าบริเวณที่เหมาะสมจะมีกรดอะมิโนจำพวกไม่ชอบน้ำ เช่น ทริปโตเฟน อะลานิน วาลินหรือลิวซีน (Nils and Brian, 1996) เช่น ลำดับกรดอะมิโน

+W-OλR WRAAV หรือ WRXXAAAL

โดย + คือ กรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างประจุบวก

- คือ กรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างประจุลบ

O คือ กรดอะมิโนกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ

λ คือ กรดอะมิโนลิวซีนหรือวาลีน

X คือ กรดอะมิโนใดๆ

การศึกษาบทบาท หน้าที่ และโปรตีนที่จับกับแคลโมดูลินในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จึงมีการค้นคว้าอย่างแพร่หลาย เนื่องจากความรู้และเข้าใจต่อการทำงานและส่งสัญญาณโดยแคลโมดูลินจะนำไปสู่ความเข้าใจต่อการกลไกการตอบสนองของสิ่งกระตุ้นต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อโรคต่าง ๆ เพื่อพัฒนาและส่งเสริมศักยภาพในการรักษาและป้องกันต่อไป

บทบาทของโปรตีนแคลโมดูลินในกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำอาศัยระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด ดังนั้น ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันนี้จึงมีความสำคัญ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาและป้องกันการติดเชื้อก่อโรคต่าง ๆ การศึกษายีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบโปรฟีนอลออกซิเดสและเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ป้องเชื้อโรค (Charoensapsri et al., 2011; Tassanakajon et al., 2011; Woramongkolchai et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามความเข้าใจเกี่ยวกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์เพื่อกระตุ้นในระบบสำคัญเหล่านั้นทำหน้าที่ได้อย่างเหมาะสมยังคงมีการศึกษาค่อนข้างน้อย หากมีความรู้เกี่ยวกับ

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์จะทำให้เข้าใจถึงระบบภูมิคุ้มกันโดยรวมได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษาบทบาทของแคลโมดูลินในสิ่งมีชีวิตพวกครัสเตเชียนและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลจึงเป็นที่สนใจ ซึ่งพบว่าในระยะ 10 ปีนี้ มีการศึกษาสมบัติของแคลโมดูลินทั้งในหอยแมลงภู่และหอยนางรม (Li et al., 2003; Roger and Thomas 2001; Zhang et al., 2003) ส่วนในกุ้งพบว่าบทบาทและหน้าที่ของแคลโมดูลินคล้ายคลึงกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ (Michael et al., 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าแคลโมดูลินเกี่ยวข้องกับการลอกคราบในกุ้ง (Gao et al., 2009) และการเปลี่ยนสีของหอยเป๋าฮื้ออีกด้วย (Wang et al., 2008; Nikapitiya and Lee, 2009) ในกุ้งขาวพบว่าการแสดงออกของแคลโมดูลินทั้งระดับยีนและโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อกุ้งถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* หรือไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) (Ji et al., 2011) จากรายงานดังกล่าวแคลโมดูลินจึงอาจมีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม โครงสร้างและหน้าที่ของแคลโมดูลินต่อการตอบสนองของการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำยังคงต้องมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง

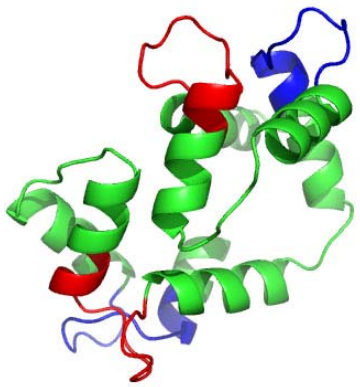
จากการศึกษาจีโนมของกุ้งกุลาดำโดยหน่วยวิจัยอณูชีววิทยาและจีโนมกุ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่ายีนแคลโมดูลินซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid) คล้ายกับแคลโมดูลินในของคน วัวและหนู ถึง 98 เปอร์เซนต์ โดยยีนมีขนาด 447 นิวคลีโอไทด์ หรือ 149 กรดอะมิโน (ภาพที่ 2)

ด้วยลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกันจึงอาจกล่าวได้ว่าแคลโมดูลินอาจทำหน้าที่คล้ายกันในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยโครงสร้าง 3 มิติของแคลโมดูลินในกุ้งกุลาดำสามารถทำนายได้จากลำดับกรดอะมิโนโดยใช้เทคนิค homology modeling ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL และใช้โปรแกรม PyMOL ในการแสดงรูปโครงสร้าง (ภาพที่ 3ก) ซึ่งจะเห็นว่าแคลโมดูลินในกุ้งกุลาดำมีบริเวณอนุรักษ์ที่จับกับไอออนแคลเซียมได้ (EF-hand motif) คล้ายกับที่พบสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ นอกจากนี้เมื่อนำโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนแคลโมดูลินของกุ้งกุลาดำและของโปรตีนต้นแบบมาเทียบเคียง (alignment) ก็พบว่ามีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันมาก (ภาพที่ 3ข)

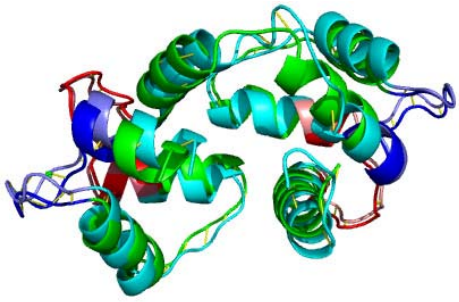
```
Pmo     MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG 60
Pat     MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG 60
Mes     MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG 60
Hsa     MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG 60
Bot     MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG 60
Rno     MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADG 60
        ************************************************************

Pmo     NGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDE 120
Pat     DGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGDGFISAAELRHVMTNLGEKLTDE 120
Mes     NGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDE 120
Hsa     NGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDE 120
Bot     NGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDE 120
Rno     NGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDE 120
        :************************************:*:********************

Pmo     EVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVTMMTSK 149
Pat     EVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVTMMTSK 149
Mes     EVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVKMMTSK 149
Hsa     EVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK 149
Bot     EVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK 149
Rno     EVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK 149
        ********************** ***:*
```

ภาพที่ 2 ผลการเทียบเคียง (alignment) กรดอะมิโนของแคลโมดูลินในกุ้งกุลาดำกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ Pmo (กุ้งกุลาดำ *P. monodon*) Pat (หอยเซลล์ *Patinopecten sp.*) Mes (ดอกไม้ทะเล *Metridium senile*) Hsa (คน *Homo sapiens*) Bot (วัว *Bos taurus*) Rno (หนู *Rattus norvegicus*)

ก)



ข)

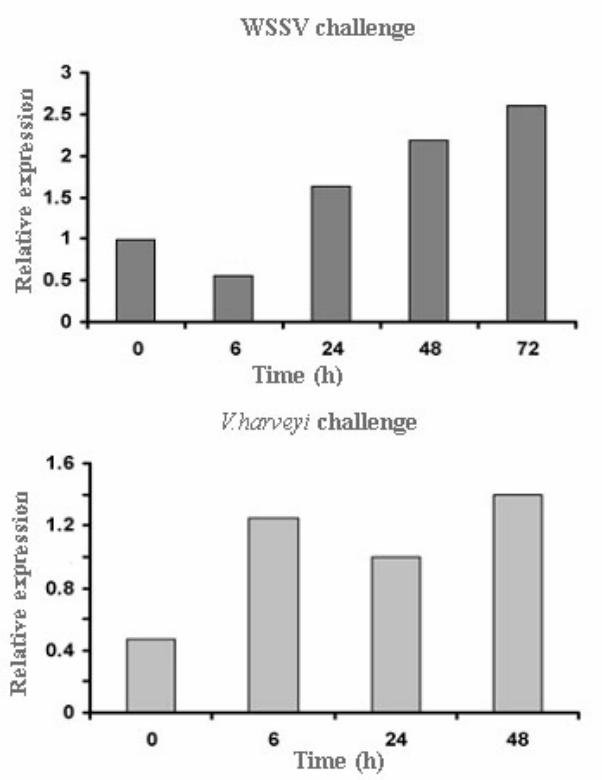


ภาพที่ 3 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนแคลโมดูลิน

(ก) โครงสร้างโปรตีนแคลโมดูลินของกุ้งกุลาดำโดเมนสีแดงและน้ำเงินแสดงบริเวณที่จับกับไอออนแคลเซียม

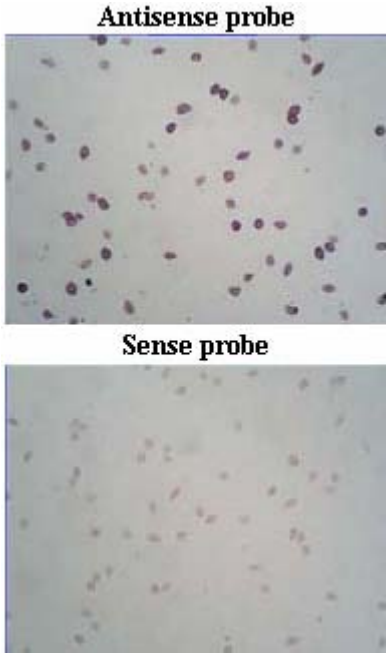
(ข) ผลการเทียบเคียงโครงสร้าง 3 มิติระหว่างแคลโมดูลินของกุ้งกุลาดำ (สีเขียว) กับแคลโมดูลินต้นแบบ (1mxe สีฟ้า)

การศึกษาการแสดงออกของยีนแคลโมดูลินในเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค cDNA microarray ภายหลังจากกุ้งถูกกระตุ้นเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ พบว่ายีนแคลโมดูลินมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นถึง 20 และ 5 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับกุ้งปรกติ และเมื่อใช้เทคนิค Real time RT-PCR ในการศึกษาการแสดงออกของยีน พบว่า หลังจากกุ้งถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว การแสดงออกของยีนมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้น และการแสดงออกของยีนดังกล่าวหลังจากกุ้งถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียวิบริโอก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4) นอกจากนี้เมื่อทดสอบหาการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องและน่าจะเป็นโปรตีนเป้าหมายของแคลโมดูลิน เช่น แคลซินูลิน ซีดีซี-ไลค์ไคเนส และฟอสฟาเทส พบว่า สร้างขึ้นในปริมาณที่แตกต่างกันหลังจากกระตุ้นกุ้งด้วยเชื้อก่อโรคด้วยเช่นกัน (Wongpanay et.al, 2007) จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าแคลโมดูลินอาจมีบทบาทสำคัญต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำเมื่อมีการติดเชื้อ



ภาพที่ 4 ระดับการแสดงออกของยีนแคลโมดูลินเทียบกับยีน elongation factor

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนแคลโมดูลินในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค *In situ* hybridization โดยใช้ antisense probe และ sense probe ติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) และใช้แอนติบอดีต่อ DIG ที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ซึ่งจะใช้ nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate *p*-toluidine salt (BCIP) เป็นสับสเตรต พบว่า จำนวนเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของยีนแคลโมดูลินมีเพิ่มมากขึ้นหลังจากกุ้งถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหรือเชื้อแบคทีเรียวิบริโอฮาวิอาย ทั้งนี้ใช้ sense probe เป็นตัวควบคุม (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่มีการแสดงออกของยีนแคลโมดูลินมีสีม่วงหลังตรวจสอบด้วยสับสเตรท nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate *p*-toluidine salt (BCIP)

นอกจากนี้การตรวจสอบปริมาณโปรตีนแคลโมดูลินในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำบริเวณ cepharothorax ด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยใช้แอนติบอดี้ต่อโปรตีนแคลโมดูลิน และใช้แอนติบอดี้ระดับสอง (secondary antibody) ที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสเพื่อตรวจสอบสีที่เกิดขึ้นจากสับสเตรท NBT และ BCIP พบว่า สามารถตรวจพบโปรตีนแคลโมดูลินมากขึ้นในอวัยวะต่างๆ เช่น เหงือก ลิมฟอยด์ ตับ และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissue) ของกุ้งกุลาดำที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียวิบริโอฮาวิอาย โดยบริเวณที่มีพบว่า มีโปรตีนแคลโมดูลินปริมาณมาก ได้แก่ เม็ดเลือดที่แทรกอยู่ในอวัยวะต่าง ๆ รวมถึงเม็ดเลือดที่สมบูรณ์

ในอวัยวะสร้างเม็ดเลือด จากข้อมูลข้างต้นอาจกล่าวได้ว่าเมื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อแบคทีเรีย เม็ดเลือดซึ่งมีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (Supungul et al., 2002.) มีการสร้างโปรตีนแคลโมดูลินมากขึ้น ซึ่งแคลโมดูลินอาจเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ โดยอาจเป็นตัวกลางในการรับสัญญาณจากภายนอกเซลล์ และส่งสัญญาณต่อไปยังโปรตีนที่เกี่ยวข้องเช่นเอนไซม์ในกลุ่มเซอรีนโปรตีเอส (serine pretease) หรือเอนไซม์ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส โดยสัญญาณที่รับอาจเกี่ยวข้องกับระดับของไอออนแคลเซียมที่เปลี่ยนแปลงภายในเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นจากภายนอก ในปี ค.ศ.1990 Ashida และคณะ พบว่าไอออนแคลเซียมมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในยุง และในปี ค.ศ.1998 Sung และคณะ พบว่า ไอออนแคลเซียมเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกราม แต่กลไกในการกระตุ้นและโปรตีนที่เกี่ยวข้องยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป ซึ่งการแสดงออกของแคลโมดูลินทั้งในระดับยีนและโปรตีนหลังจากกุ้งถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรค ทำให้ทราบว่า โปรตีนแคลโมดูลินอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตามบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนแคลโมดูลินในกุ้งกุลาดำยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป เช่น ศึกษาโปรตีนที่จับกับแคลโมดูลินและเป็นตัวกลางในการระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลดำ ซึ่งอาจใช้เทคนิค pull down ในการหาโปรตีนที่จับกับแคลโมดูลิน หากทราบชนิดของโปรตีนที่สามารถจับกับโปรตีนแคลโมดูลิน อาจนำไปสู่ความรู้เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำในการตอบสนองและป้องกันการติดเชื้อก่อโรคได้ ความรู้และเข้าใจดังกล่าวอาจนำไปสู่การพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ยั่งยืนต่อไป

บทสรุป

แคลโมดูลินเป็นโปรตีนหนึ่งในตัวกลางสำคัญของระบบการส่งสัญญาณภายในเซลล์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงระดับของไอออนแคลเซียม โดยโปรตีนแคลโมดูลินมีความอนุรักษ์สูงในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ และมีความสามารถในการจับกับไอออนแคลเซียมได้ดี และเมื่ออยู่ในภาวะจับกับไอออน โปรตีนแคลโมดูลินจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 3 มิติ ส่งผลให้สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมาย และถ่ายทอดสัญญาณให้มีการตอบสนองที่เหมาะสมของเซลล์ต่อสิ่งกระตุ้น ในกุ้งกุลาดำพบว่า โปรตีนแคลโมดูลินประกอบด้วยกรดอะมิโน 149 ตัว และมีโดเมนที่สามารถจับกับแคลเซียมได้ 4 ไอออน โดยกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียมีการแสดงออกของยีนแคลโมดูลินสูงขึ้นในเม็ดเลือด รวมถึงมีการแสดงออกของโปรตีนแคลโมดูลินมากขึ้นในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วย อาจกล่าวได้ว่าโปรตีนแคลโมดูลินมีส่วนเกี่ยวข้องต่อกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ เพื่อให้เกิดการตอบสนองการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนแคลโมดูลินและโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกุ้งกุลาดำยังต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อให้เกิดความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Rafi M., Roberts K., and Walter P. (2008). **Molecular Biology of the Cell**. 5th ed. New York: Taylor & Francis.

Ashida, M., Kinoshita, K., and Brey, P.T. (1990). Studies on prophenoloxidase activation in the mosquito *Aedes aegypti* L. **Eur. J. Biochem.** 188(3): 507-15.

Babu Y.S., Bugg C. E., Cook W.J. (1988) Structure of calmodulin refines at 2.2: A resolution. **J. Mol. Biol.** 204(1): 191-204.

Bertini I., Kursula P., Luchinat C., Parigi G., Vahokoski J., Wilmanns, M., and Yuan J. (2009). Accurate solution structures of proteins from X-ray data and a minimal set of NMR data: calmodulin-peptide complexes as examples. **J. Am. Chem. Soc.** 131(14): 5134-5144.

Chattopadhyaya, R., Meador, W. E., Means A. R., and Quiocho, F.A. (1992) Calmodulin structure refined at 1.7: A resolution. **J. Mol. Biol.** 228(4): 1177-1192.

Clapham, D. E. (1995) Calcium signaling. **Cell** 80: 259-268.

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. **Devel. Comp. Immunol.** 35(1): 115-124.

Gao, Y., Gillen, C. M., and Wheatly, M. G. (2009). Cloning and characterization of a calmodulin gene (CaM) in crayfish *Procambarus clarkia* and expression during molting. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 152 (3): 216-226.

Izumi, Y., Watanabe, H., Aoyama, A., Jinbo, Y., and Hayashi, N. (2008). Solution X-ray scattering reveals a novel structure of calmodulin complexed with a binding domain peptide from the HIV-1 matrix protein p17. **Biochem.** 47(27): 7158-7166.

Ji, P. F., Yao, C. L., and Wang, Z. Y. (2011). Two types of calmodulin play different roles in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) defenses against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. **Fish Shellfish Immunol.** 31: 260-268.

Li, S., Xie, L., Ma, Z., and Zhang, R. (2005). cDNA cloning and characterization of a novel calmodulin-like protein from pearl oyster *Pinctada fucata*. **FEBS.** 272: 4899-4910.

Michael, R. H., Pipkorn, R., Willig, A., and Jaros, P. P. (1992). Isolation and purification of calmodulin from the shrimp, *Crangon crangon*. **Life Sci.** 51(24): 1881-1889.

Nikapitiya, C., Lee, J. (2009). Characterization and expression analysis of bacteria challenged calmodulin homologue in disk abalone. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** 154 (1, Supple1): S5-6.

Nils, B. A., and Brian, K. K. (1996). Identification of calmodulin-binding peptide consensus sequences from a phage-displayed random peptide library. **Gene** 169: 133-134.

Pei-Feng, J., Cui-Luan, Y., and Zhi-Yong, W. (2011). Two types of calmodulin play different roles in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) defenses against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. **Fish Shellfish Immunol.** 31: 260-268.

Rogers, C. L., and Thomas, M. B. (2001). Calcification in the planula and polyp of the dydroid *Hydractinia symbiolongicarpas* (Cnidaria, Hydrozoa). **J. Exper. Biol.** 204: 2657-2666.

Rupp, B., Marshak, D. R., and Parkin S. (1996). Crystallization and preliminary X-ray analysis of two new crystal forms of calmodulin. **Acta Cryst. D Biol. Cryst.** 52(Pt 2): 411-413.

Sanabria, H., Digman, M. A., Gratton, E., and Waxham, M. N. (2008) Spatial Diffusivity and availability of Intracellular calmodulin. **Biophys. J.** 95(12): 6002-6015.

Sherbany, A. A., Parent, A. S., and Brosius, J. (1987). Rat calmodulin cDNA. **DNA** 6(3): 267-272.

Sung, H. H., Chang, H. J., Her, C. H., Chang, J. C., and Song, Y. L. (1998). Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Inver. Pathol.** 71: 26–33.

Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Jitrapaldee, S., Hirono, I., Aoki, T., and Tassanakajon A. (2002). Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine Biotechnol.** 4: 487-494.

Tassanakajon, A., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., and Supungul, P. (2011). Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid. **Shrimp Marine Biotechnol.** 13(4): 639-657.

Wang, K. J., Ren, H. L., Xu, D. D., Cai, L., Yang, M. (2008). Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor*) challenged with bacteria. **Devel. Comp. Immunol.** 32(11): 1326-1347.

Wall, M. E., Clarage, J. B., and Phillips, G.N. (1997). Motions of calmodulin characterized using both Bragg and diffuse X-ray scattering. **Structure** 5(12): 1599-1612.

Wongpanya, R., Aoki, T., Hirono, I., Yasuike, M., and Tassanakajon A. (2007) Analysis of gene expression in haemocytes of shrimp *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus by cDNA microarray. **ScienceAsia** 33: 165-174.

Woramongkolchai, N., Supungul, P., and Tassanakajon, A. (2011). The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infection. **Devel. Comp. Immunol.** 35(5): 530-536.

Zhang, L., Feng, X., and McDonald, J. M. (2003). The role of calmodulin in the regulation of osteoclastogenesis. **Endocrinol.** 144: 4536-4543.