

Original Research Article

Vpliv simptomatske bakterijske okužbe na izražanje genov, povezanih z imunostjo v hemocitih kopenskega raka *Porcellio scaber*

Andraž Dolar^{1*}, Jernej Ogorevc², Anita Jemec Kokalj¹

Izvleček

Kopenski enakonožci vrste *Porcellio scaber* so v naravnem okolju izpostavljeni številnim patogenom in parazitom, ki lahko pri gostitelju povzročijo poškodbe tkiv ter vplivajo na imunokompetenco in fitness organizma. Bakterijska okužba povzroči aktivacijo mehanizmov prirojene imunosti, kot so fagocitoza, tvorba reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti, aktivnost antioksidativnih encimov, nodulacija ter proces melanizacije. Molekularni vzorci patogenov oziroma mikrobov ter s patogenezo povezane poškodbe pri gostitelju sprožijo prepisovanje genov v celicah hemolimfe, tj. hemocitih, ki opravljajo pomembno funkcijo mediatorjev imunskega odgovora. V aktualni raziskavi smo preučevali spremembe v izražanju genov ob simptomatski bakterijski okužbi z *Rhodocholella porcellionis* ter jih primerjali z asimptomatskimi oziroma zdravimi *P. scaber*. Iz hemolimfe (hemocitov) asimptomatskih in simptomatskih živali smo izolirali celokupno RNA, jo prepisali v cDNA ter z metodo RT-qPCR določili relativno izražanje izbranih genov, povezanih z imunostjo (*Toll4*, *Dscam*, *MyD88*, *Cat*, *MnSod*, *CypG*, *A2m*, *Atg5* in *Nos*). Ugotovili smo značilne spremembe v izražanju izbranih genov, kar kaže na njihovo vlogo v imunskem odgovoru *P. scaber* v primeru bakterijske okužbe, dodatno pa smo z biokemijskimi metodami dokazali povečano aktivnost encima alfa-2-makroglobulin ter mejno značilno povišanje encima katalaza. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da preučevani geni predstavljajo molekularne označevalce za imunski odziv, ki jih je moč uporabiti v različnih okoljskih raziskavah.

Ključne besede

bakterijska okužba, imunski odziv, izražanje genov, kopenski enakonožec *Porcellio scaber*, *Rhodocholella porcellionis*

1 Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

2 Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

* Corresponding author:

E-mail address: andraz.dolar@bf.uni-lj.si

Citation: Dolar, A., Ogorevc, J., Kokalj, A. J. (2023). Vpliv simptomatske bakterijske okužbe na izražanje genov, povezanih z imunostjo v hemocitih kopenskega raka *Porcellio scaber*. Acta Biologica Slovenica 66 (2)

<https://doi.org/10.14720/abs.66.2.14428>

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY SA) license

Effect of symptomatic bacterial infection on the expression of immune-related genes in haemocytes of the terrestrial crustacean *Porcellio scaber*

Abstract

Terrestrial isopods *Porcellio scaber* are exposed to many pathogens and parasites in their natural environment, which can cause tissue damage in the host and affect the immunocompetence and fitness of the organism. Bacterial infection leads to activation of innate immunity mechanisms, such as phagocytosis, formation of reactive oxygen and nitrogen species, activity of antioxidant enzymes, nodule formation, and the process of melanization. Molecular patterns of pathogens or microbes and pathogenesis-induced injury in the host trigger the transcription of genes in haemolymph cells, i.e., haemocytes, which have an important function as mediators of the immune response. In the current study, we examined changes in gene expression during symptomatic bacterial infection with *Rhabdochlamydia porcellionis* and compared them with asymptomatic or healthy *P. scaber*. We isolated total RNA from the haemolymph (haemocytes) of asymptomatic and symptomatic animals, transcribed it into cDNA, and determined the relative expression of selected immune-related genes (*Toll4*, *Dscam*, *MyD88*, *Ppae2a*, *Cat*, *MnSod*, *CypG*, *A2m*, *Atg5*, and *Nos*). We found characteristic changes in the expression of selected genes confirming their role in the immune response of *P. scaber* in case of bacterial infection, and, in addition, biochemical methods showed increased activity of the enzyme alpha-2-macroglobulin and a borderline characteristic increase in the enzyme catalase. Based on the results, we can conclude that the studied genes represent molecular markers of immune response that can be used in various environmental studies.

Keywords

bacterial infection, gene expression, immune response, terrestrial isopod *Porcellio scaber*, *Rhabdochlamydia porcellionis*

Uvod

Navadni prašiček *Porcellio scaber* (Latreille, 1804) je predstavnik enakonožnih rakov, ki poseljujejo naravne habitate centralne in zahodne Evrope, hkrati pa so izrazito sinantropna vrsta, kar pomeni, da so tesno povezani s človeškimi bivališči in njegovo dejavnostjo. Znotraj skupine rakov so enakonožci najuspešnejši kolonizatorji kopenskega okolja, ki so tekom prilagajanja na kopensko življenje razvili številne vedenjske, fiziološke in strukturne lastnosti (Hornung, 2011). V ekosistemu opravljajo pomembno vlogo razkrojevalcev odmrlega organskega materiala, s čimer prispevajo h kroženju snovi v naravi in so tako nepogrešljiv člen talnega ekosistema (Hornung in sod., 1998; van Gestel in sod., 2018). V okolju so kopenski enakonožci, podobno kot tudi ostali organizmi, podvrženi različnim nevarnostim, kot so patogeni in paraziti. Znano je, da virusne in bakterijske okužbe pogosto prizadenejo naravne populacije višjih rakov (Wang, 2011). V naravni populaciji kopenskih rakov *P. scaber* pogosto zaznamo Iridovirusno IIV-31

okužbo, ki je izražena pri 15-20 % osebkov naravne populacije (Cole in Morris, 1980), medtem ko je prevalenca okužbe z bakterijo *Rhabdochlamydia porcellionis* še višja, in sicer dosega 27 % (Kostanjšek in Pirc Marolt, 2015). Bakterijo *R. porcellionis* (družina Rabdoklamidij) uvrščamo v skupino patogenih, obligatno znotrajceličnih bakterij, imenovanih klamidije, s širokim naborom gostiteljev, tako med vretenčarskimi kot tudi nevretenčarskimi organizmi (Kostanjšek in sod., 2004; Halter in sod., 2022). Pri *P. scaber* je okužba z *R. porcellionis* primarno omejena na celice prebavne žleze hepatopankreas, na površini katere v simptomatski fazi okužbe opazimo bele lise, od tod pa se okužba lahko razširi tudi na druga tkiva, med drugim tudi v hematopoetsko tkivo in pa celice hemolimfe, tj. hemocite (Kostanjšek in Pirc Marolt, 2015). V hemolimfi *P. scaber* s simptomatsko *R. porcellionis* okužbo pride do oblikovanja izrazitega imunskega odgovora, kar se kaže v drastični spremembi vrednosti imunskih parametrov hemolimfe, v primerjavi z asimptomatskimi živalmi (Kostanjšek in Pirc Marolt, 2015; Dolari in sod., 2020). Gostiteljski organizmi se

na vdor patogenov, parazitov in na poškodbo odzovejo z aktivacijo nabora mehanizmov prirojene imunosti, katerih glavni namen je ponovna vzpostavitev stabilnega notranjega ravnovesja (tj. homeostaza) ter preprečitev nadaljnjih poškodb oziroma smrti organizma (Wang in Wang, 2013; Mengal in sod., 2023). V tem pogledu simptomatska bakterijska okužba, ki je prisotna v naravni populaciji *P. scaber* predstavlja dostopen in enostaven model za študije posameznih komponent in mehanizmov prirojene imunosti v luči odkrivanja novih bioloških označevalcev, ki jih je moč prenesti v okoljske raziskave z namenom ocene stanja organizma po izpostavitvi različnim okoljskim onesnažilom, kot so recimo kemikalije in umetnimi delci, npr. nano- in mikroplastika (Dolar in sod., 2021, 2022b,c; Jemec Kokalj in sod., 2021, 2022).

Prirojen imunski sistem kopenskega enakonožca *P. scaber* je odgovoren za prepoznavanje in odzivanje na raznovrstne zunanje in notranje »izzivalce« (npr. patogene, parazite, poškodbe, okoljske spremembe), ki lahko resno ogrozijo zdravje in v skrajnem primeru povzročijo tudi smrt organizma (Dolar in sod., 2020, 2022a,b,c). Imunski odgovor gostitelja na mikrobnno okužbo temelji na evolucijsko ohranjenih efektorskih mehanizmih celične in humoralne komponente prirojene imunosti, kot so fagocitoza, nodulacija in enkapsulacija, proces melanizacije in produkcija ter sproščanje drugih humoralnih molekul, npr. reaktivnih kisikovih (ROS) in dušikovih spojin (RNS) ter antimikrobnih peptidov (Jiravanichpaisal in sod., 2006; Söderhäll, 2016). V hemolimfi *P. scaber* so prisotni trije glavni tipi celic hemolimfe oziroma hemociti, tj. semigranularni, granularni in hialini, ki opravljajo specifične naloge tekom imunskega odgovora, pri čemer so hialinociti v splošnem odgovorni za fagocitozo, delno tudi semigranulociti, medtem ko pa so semigranulociti in večinsko granulociti odgovorni za produkcijo in sekrecijo različnih humoralnih molekul v hemolimfo in oblikovanje humoralnega imunskega odgovora (Tassanakajon in sod., 2013, 2018). Bakterijska okužba pri rakih izzove značilne spremembe v celokupnem (angl. total haemocyte count) kot tudi diferencialnem številu (angl. differential haemocyte count) hemocitov (Dolar in sod., 2020). Hkrati lahko bakterijski toksini, kot je endotoksin lipopolisaharid, poškodujejo hemocite in povzročijo njihov propad, kar se odrazi v zmanjšani viabilnosti hemocitov (Dolar in sod., 2022a). Slednji pojav je povezan tudi s povečano fagocitotsko aktivnostjo hemocitov (hialinih in semigranularnih) in tvorbo ROS ter RNS (npr. dušikov oksid; NO) z namenom

razgradnje fagocitiranih tujkov (Raman in sod., 2008; Sánchez-Salgado in sod., 2019). Povečana proizvodnja reaktivnih spojin v primeru mikrobne okužbe v hemolimfi rakov posledično izzove tudi povečano aktivnost encimov superoksid dismutaze in katalaze, ki sta odgovorna za odstranjevanje presežka reaktivnih spojin (Gopalakrishnan in sod., 2011; Liu in sod., 2013). Histopatološke poškodbe, ki jih povzročajo patogene bakterije, lahko prizadenejo tudi ostala tkiva in organe gostitelja, med drugim tudi eksoskelet, kar še dodatno poveča tveganje za vdor novih patogenov v organizem (Esteve in Herrera, 2000; Chevalier in sod., 2011; Wang, 2011; Kostanjšek in Pirc Marolt, 2015). Poškodba tkiva sproži aktivacijo sistema profenoloksidaze (proPO), kaskado dogodkov in komponent, med katerimi ima terminalno vlogo encim fenoloksidaza (PO), ki katalizira proces sinteze rdeče-rjavega pigmenta melanina, ki skupaj s hemociti fizično omeji tujke v telesu gostitelja (t. i., nodulacija ali enkapsulacija), medtem ko stranski produkti melanizacije (kinoni, ROS, RNS) delujejo toksično in povzročijo lizo mikrobnih celic (Amparyup in sod., 2013). Pomembna komponenta proPO sistema je tudi serinski proteinazni inhibitor alfa-2 makroglobulin, ki se aktivira ob prisotnosti mikroorganizmov ter regulira fenoloksidazno aktivnost, poleg tega pa je vpleten tudi v proces strjevanja hemolimfe ter fagocitoze (Ponprateep in sod., 2017).

Vdor patogena v telo oziroma poškodba gostitelja v prvi vrsti povzroči aktivacijo receptorskih molekul, ki se nahajajo v plazmi hemolimfe oziroma na površini hemocitov, sledi signalna transdukcija, tj. kaskada dogodkov, ki privede do sprememb v profilu izražanja genov, ki so posredno ali neposredno povezani z imunostjo in drugimi procesi, odgovornimi za uravnavanje homeostaze (Sánchez-Salgado in sod., 2021; Liu in sod., 2022). V fizioloških in funkcionalnih raziskavah genov in molekul, ki so odgovorni za imunske mehanizme v primeru mikrobne okužbe gostitelja se uporablja napredne omske metode, te metode pa v okoljskih raziskavah odpirajo povsem novo ero v raziskovanju vplivov različnih onesnažil in okoljskih sprememb na poskusne organizme (Lou in sod., 2022; Sun in sod., 2022; Mengal in sod., 2023).

Namen študije je bil preučiti izražanje izbranih genov, povezanih z imunostjo, v hemocitih *P. scaber* s simptomatsko okužbo z *Rhabdochlamydia porcellionis*. Izražanje genov smo primerjali z asimptomatskimi osebki *P. scaber*. Poleg tega nas je zanimala tudi razlika v aktivnosti encimov alfa-2-makroglobulin ter katalaza v primeru simptomatskih in asimptomatskih živali.

Material in metode

Poskusni organizem

Poskusni organizmi *P. scaber* so bili izbrani iz laboratorijske kulture, ki smo jo gojili v steklenih terarijih pri konstantnih pogojih, tj. temperaturi 20 ± 2 °C, visoki vlažnosti in dnevno nočnem režimu (16/8 ur : svetloba/tema). Stekleni terarij je bil napolnjen z ne-kontaminirano zemljo in debelo plastjo posušenih listov navadne leske (*Corylus avellana*), ki so bili predhodno sterilizirani. Za analizo izražanja genov so bili odbrani poskusni organizmi z izraženimi simptomatskimi belimi lisami na prebavnih žlezah, ki jih je mogoče opazovati neposredno skozi ventralno stran telesa, kot je opisano v Kostanjšek in Pirc Marolt (2015) ter Dolar in sod. (2020). Odbrane živali so imele prisotne značilne simptome bakterijske okužbe z *Rhabdochlamydia porcellionis* (Sl. 1). Živali brez izraženih simptomov okužbe z *R. porcellionis* (asimptomatske živali) smo uporabili kot kontrolo, kot je opisano v Dolar in sod. (2020).

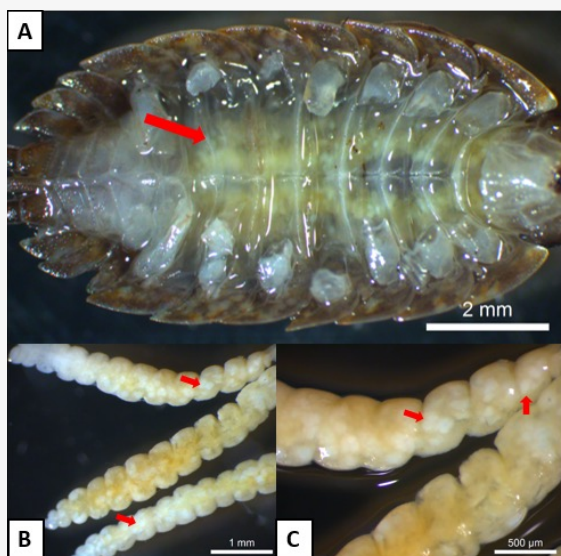
Izolacija hemolimfe

Hemolimfo smo izolirali iz posameznih *P. scaber* v skladu s protokolom opisanim v Dolar in sod. (2020). Na kratko, s sterilno siringo smo prebodli integument med 5. in 6. dorzalnimi segmentom *P. scaber* in z rahlim stiskanjem živali pridobili kapljico hemolimfe, ki smo jo posesali s stekleno

mikrokapilarno pipeto (Brand). Hemolimfo za meritev aktivnosti encimov katalaze in alfa-2-makroglobulina smo pridobili iz posamezne živali in jo nemudoma razredčili v fosfatnem pufru Dulbecco (DPBS; pH 7,1-7,5), medtem ko smo vzorec hemolimfe za izolacijo RNA pridobili z združevanjem hemolimfe iz 30 živali na skupino, tj. asimptomatskih in simptomatskih *P. scaber*. Vzorce hemolimfe smo do analize hranili na ledu.

Aktivnost encima katalaza

Aktivnost encima katalaza (CAT) smo v hemolimfi *P. scaber* določili fotometrično z meritvijo razgradnje vodikovega peroksida (H_2O_2). Izolirano hemolimfo (5 μ L) smo nemudoma razredčili v 65 μ L 50 mM kalij-fosfatnega pufru (KP, pH= 7) z dodano 5 mM EDTA. Za meritev smo uporabili UV mikrotiterske plošče s 96 vdolbinicami. V vdolbinico na plošči smo odpipetirali 20 μ L redčene hemolimfe, 30 μ L KP pufru s 5 mM EDTA in nemudoma pred meritvijo dodali še 100 μ L 15,18 mM H_2O_2 , pripravljenega v 50 mM KP pufru (pH = 7) z dodano 5 mM EDTA. Reakcijski volumen smo pred meritvijo 5-krat premešali s pipeto. Absorbanco smo merili pri 240 nm in 25 °C, 3 minute s 30-sekundnim intervalom med zaporednimi meritvami, na mikročitalcu Cytation 3 imaging reader (Biotek, ZDA). Kot negativno kontrolo smo uporabili 50 mM KP pufer (pH= 7) s 5 mM EDTA. Aktivnost CAT smo izračunali kot spremembo absorbanco, merjene pri 240 nm na minuto na mg proteinov ($\Delta A_{240nm} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteinov}^{-1}$).



Slika 1. (A) Simptomatska bakterijska okužba z *R. porcellionis* v prebavni žlezi *P. scaber*, razvidna z ventralne strani skozi sternite organizma. (B, C) Simptomi okužbe, tj. značilne drobne bele pike (rdeča puščica) v celicah prebavne žleze hepatopankreas.

Figure 1. (A) Symptomatic bacterial *R. porcellionis* infection in the digestive gland of *P. scaber* seen from the ventral side through the sternite of the organism. (B, C) Symptoms of infection, i.e., characteristic small white dots (red arrow) in the cells of the digestive gland hepatopankreas.

Aktivnost encima alfa-2-makroglobulin

Aktivnost encima alfa-2-makroglobulin (A2M) smo v vzorcih hemolimfe *P. scaber* določili fotometrično z meritvijo absorbanca pri 405 nm. Izolirano hemolimfo (5 μ L) smo redčili v razmerju 1 : 15 (v/v) s pufrom DPBS (pH 7,1–7,5), dobro premešali in do uporabe shranili na ledu. K 50 μ L razredčenega vzorca hemolimfe smo dodali 50 μ L tripsina (1 mg/mL DPBS, Sigma) in inkubiral 10 min pri 37 °C na toplotnem mešalu Thermomixer compact (Eppendorf). K reakcijski mešanici smo dodali 20 μ L sojinlega tripsinskega inhibitorja (2 mg/mL DPBS, Sigma) in znova inkubirali 15 min pri 37 °C. Nato smo dodali še 250 μ L N-benzoil-DL-arginin-pnitroanilida (BAPNA; 0,5 mg/L DPBS, Sigma), ki smo ga pripravili s 100-kratnim redčenjem založne raztopine BAPNA (50 mg/mL dimetil sulfokida; DMSO) v pufru DPBS. Sto μ L reakcijske mešanice smo v treh ponovitvah prenesli na mikrotitersko ploščo s 96 vdolbinicami in 30 min merili absorbanco z mikročitalcem Cytation 3 imaging reader (Biotek, ZDA) pri 405 nm in 37 °C. Aktivnost A2M v vzorcu hemolimfe smo merili posredno preko detekcije aktivnosti tripsina. Aktivnost A2M smo izrazili kot spremembo absorbanca pri 405 nm na minuto na mg proteinov ($\Delta A_{405nm} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteinov}^{-1}$).

Koncentracija proteinov v hemolimfi

Vsebnost proteinov v hemolimfi smo določili z uporabo komercialnega kita BCA™ (Pierce, Rockford, IL, ZDA). Reagenta A in B smo pripravili v razmerju 50 : 1 (v/v) in 190 μ L odpipetirali k 10 μ L vzorca hemolimfe, kar je povzročilo barvno reakcijo, sorazmerno količini proteinov v vzorcu. Reakcijsko mešanico smo v treh ponovitvah prenesli na mikrotitersko ploščo s 96 vdolbinicami, inkubirali 30 min pri 37 °C, nato pa absorbanco pri 562 nm z mikročitalcem Cytation 3 imaging reader (Biotek, USA). Koncentracijo proteinov v vzorcu smo izračunali glede na umeritveno krivuljo za goveji serumski albumin (BSA; 25–2000 μ M). Za negativno kontrolo smo uporabili pufer DPBS (pH= 7,1–7,5).

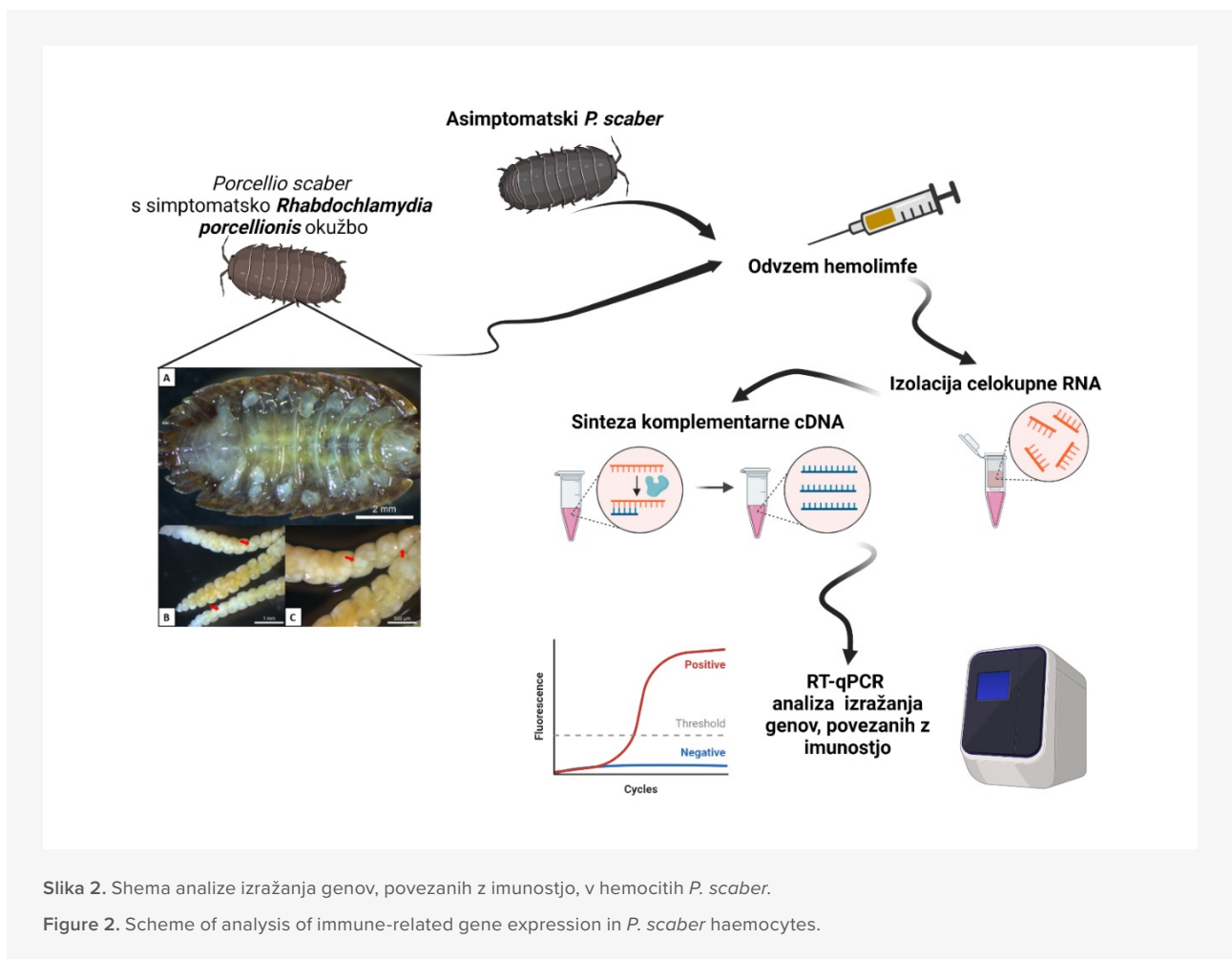
Izolacija RNA in prepis v cDNA

Celokupno RNA smo izolirali iz hemocitov v skladu z modificiranim protokolom z uporabo kita RNeasy Plus Micro (Qiagen, Nemčija). Za simptomatsko in asimptomatsko

skupino smo izolirali skupno 3 neodvisne vzorce RNA, pri čemer je vsak vzorec predstavljal biološko ponovitev. Združeni vzorec hemolimfe smo homogenizirali v 600 μ L pufru RTL Plus in 30 sekund močno stresali, nato pa ga prenesli na gDNA odstranjevalno kolono, ki smo jo postavili v 2 mL zbiralno plastično epruveto, in centrifugirali 15 sekund pri 12.000 obratih na minuto (Eppendorf Minispin centrifuga). Eluatu smo dodali enak volumen 70 % etilnega alkohola (EtOH) in vse skupaj prenesli v RNeasy MinElute kolono, nameščeno v 2 mL zbiralno plastično epruveto, ter centrifugirali 15 sekund pri 12.000 obratih na minuto. Vsi nadaljnji koraki centrifugiranja, vključno s prejšnjimi, so bili izvedeni pri sobni temperaturi (20–25 °C) in pri 12.000 obratih na minuto. Eluat smo zavrgli in nadaljevali s čiščenjem vzorca z dodajanjem pufov RW1 in RPE ter 15 sekundnim centrifugiranjem, oziroma dodatkom 80-odstotnega EtOH in 2 minutnim centrifugiranjem. V nadaljevanju smo zbiralno plastično epruveto zamenjali z novo in kolono ponovno centrifugirali, tokrat 5 minut. Celokupno RNA smo izolirali iz RNeasy MinElute kolone z dodajanjem 14 μ L vode brez RNaz in centrifugiranjem 1 minuto v novo sterilno mikrocentrifugirko. Izolirano RNA smo do uporabe hranili (na hladnem) pri -70 °C. Količino in kakovost izolirane RNA smo preverili s fluorometrom Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) z uporabo kita RNA HS Assay (Qiagen, Nemčija) in Tape Station 4100 (Agilent technologies, ZDA). Iz 35 ng izolirane RNA smo pripravili komplementarno cDNA z uporabo kompleta reagentov za reverzno transkripcijo (A3500; Promega, Wisconsin, ZDA), v skladu z navodili proizvajalca (Sl. 2). Skupni reakcijski volumen sintetizirane cDNA je bil 20 μ L. Do uporabe smo cDNA hranili (na hladnem) pri -20 °C.

Izbor kandidatnih genov, povezanih z imunostjo ter oblikovanje začetnih oligonukleotidov

Kandidatni geni, ki igrajo vlogo v imunskem sistemu rakov (*Cat*, katalaza; *MnSod*, mangan superoksid dismutaza; *Nos*, sintaza dušikovega oksida; *CypG*, ciklofilin G; *Dscam*, celična adhezijska molekula Downovega sindroma; *Toll4*, toll-u podobni receptor 4; *MyD88*, mieloidni diferenciacijski faktor 88; *Ppae2a*, profenoloksidaza aktivacijski encim 2a; *A2m*, alpha-2-makroglobulin; *Atg5*, avtofagni protein 5) so bili izbrani zaradi njihove nepogrešljive vloge pri delovanju prirojenega imunskega sistema rakov oziroma drugih nevretenčarjev in so pogosto preučevani



in diferencialno izraženi v primeru izpostavitve različnim stresorjem (Chevalier in sod., 2012; Tassanakajon in sod., 2013; Clark in Greenwood, 2016; Sun in sod., 2020). Poleg genov povezanih z imunostjo smo uporabili tudi dva referenčna gena, tj. faktor raztezka 2; *Ef2* in beta aktin; β -Act. Zaporedja genov (kandidatnih in referenčnih) smo pridobili iz podatkovne zbirke NCBI za druge skupine rakov. Z uporabo orodja BLAST (Discontiguous Megablast in BLAST; E-vrednost $< 1e-5$) za prepoznavanje podobnih zaporedij smo jih primerjali s transkriptomom *P. scaber*. V ta namen smo uporabili transkriptom kopenskega raka *P. scaber* (Dolar in sod., 2022d), kot tudi dodatni transkriptom, ki je prosto dostopen v podatkovni zbirki NCBI (referenčna številka: SRX2600493; Becking in sod., 2017). Zaporedja začetnih oligonukleotidov za referenčne gene in gene, povezane z imunostjo, so bila zasnovana s programsko opremo Geneious Prime 2022.0.1 (Biomatters, Nova Zelandija) in sintetizirana pri komercialnem ponudniku IDT (Coralville, ZDA) (Tab. 1).

Analiza izražanja genov

Reakcija RT-qPCR je bila izvedena v volumnu 10 μ L z uporabo GoTaq qPCR Master Mix (Promega, ZDA). V reakcijski volumnu smo dodali 5 μ L reagenta GoTaq® qPCR Master Mix, 1,25 μ L F začetnega oligonukleotida (5 μ M) in 1,25 μ L R začetnega oligonukleotida (5 μ M) in 2,5 μ L vzorca cDNA (5-krat razredčenega v vodi brez nukleaz). Reakcije RT-qPCR so bile izvedene na plošči s 384 vdolbinicami (MicroAmp™ Optical 384-Well Reaction Plate, Applied Biosystems™), z uporabo sistema PCR v realnem času ViiA 7 (Applied Biosystems, ZDA) z naslednjim profilom cikla: 3 minute pri 95 °C in 40 ciklov (15 s pri 95 °C, 25 s pri 60 °C in 35 s pri 72 °C), čemur je sledila določitev (talilne) krivulje. Vse reakcije kot tudi negativna kontrola brez dodane matrice (cDNA) so bile izvedene v treh tehničnih ponovitvah. Izražanje genov smo normalizirali z uporabo dveh referenčnih genov, tj. *Ef2* in β -Act, ki imata stabilno izražanje in sta bila uporabljena v podobnih

Tabela 1. Podatki o začetnih oligonukleotidih, ki smo jih uporabili v analizi RT-qPCR.

Table 1. Data on primers used in RT-qPCR analysis.

Gen	Oligonukleotidni začetnik (5' → 3')	Velikost produkta (bp)	Referenčna št.
<i>β-Act</i>	F: CGGACGTACCACTGGTATCG R: GAGGAGGCTGCAGTTGTCAT	264	KY780298.1
<i>Ef2</i>	F: CGACAAAGGAAGGTGTTCTC R: ACCACCTCCACGATGAATA	101	FQ896398
<i>Cat</i>	F: ATT GGA GAG CGA GGT CCT CT R: TGT TCC CGA CCA AAT CCC AG	316	KC668411.1
<i>MnSod</i>	F: TCACCCAATGGTGGAGAA R: TGATCCTTGAACAGCAACAG	117	MF289344.1
<i>Nos</i>	F: CCGTCAGCACTAGGTTTATC R: GGTCCACCTACTGCATTT	102	GQ865598
<i>CypG</i>	F: GAGATGGTACTGGAGGAAGA R: CAGCATTAGCCATTGAAAGC	102	EU216759.1
<i>Dscam</i>	F: GTCCTTGCCTTCACTTCT R: GTTGGAGCCTCTGGAATATC	86	JX679085
<i>Toll4</i>	F: GAGATCCGAAGTATAGTTATGC R: AGTCTCCTGCTGTTGT	101	MF124331
<i>MyD88</i>	F: TGATTCTCTTCGCTGACAAA R: CTCAGACCACCAACCATATC	115	FQ906745.1
<i>Ppae2a</i>	F: ACTACCCTAAGCCAGTGAA R: CTCCAAATTGAGTCTGTGTTATG	114	FJ620685.1
<i>A2m</i>	F: AAATGACGAATCGGGATCTAC R: CAACCATTCCCTCGTTATGT	115	KJ540280
<i>Atg5</i>	F: AGC TTT GGA CAG GCT TGT GT R: ACG GTG GTT CAA TGC CTT GA	261	KP317125.1

študijah pri drugih rakih (Chevalier in sod., 2012; Xu in sod., 2020). Učinkovitost pomnoževanja začetnih oligonukleotidov kandidatnih genov smo določili s pripravo redčitvene vrste cDNA in validacijske krivulje. Relativno izražanje kandidatnih genov je bilo izračunano po metodi $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ki temelji na qPCR učinkovitosti za izbrane začetne oligonukleotide, ki je znašala med 90 % in 110 % (Pfaffl, 2001). Rezultati, ki prikazujejo stopnjo izražanja genov, povezanih z imunostjo, v asimptomatski in simptomatski skupini so podani kot relativne vrednosti.

Statistična analiza

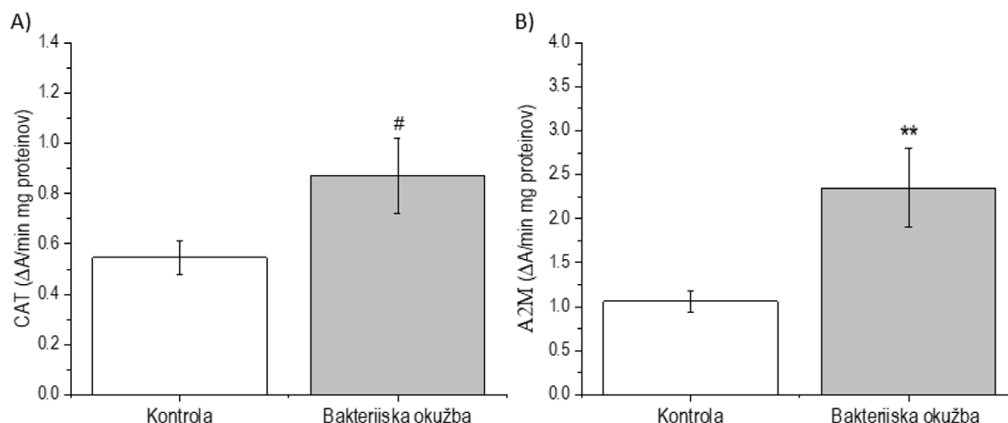
Statistično obdelavo in prikaz podatkov smo izvedli v programu OriginPro 2022v (Origin Lab). Porazdelitev podatkov smo preverili s Kolmogorov-Smirnovim testom. V primeru simetrične porazdelitve podatkov smo uporabili T-test za neodvisne vzorce, pred tem pa preverili enakost varianc. V primeru asimetrične porazdelitve ali neenakosti

varianc podatkov smo aplicirali Mann-Whitney test. Z zvezdicami nad stolpci na grafu smo označili statistično značilne razlike med testiranimi skupinami (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$), medtem ko lojtra (#) označuje mejno značilne spremembe ($0,05 < p < 0,1$).

Rezultati

Spremembe aktivnosti encimov katalaza in alfa-2-makrogobulin v hemolimfi *P. scaber* z bakterijsko okužbo

V hemolimfi *P. scaber* s simptomatsko bakterijsko okužbo smo opazili mejno značilno povečanje aktivnosti encima katalaza (Sl. 3A), v primerjavi s kontrolo. Nasprotno pa je bila aktivnost encima alfa-2-makroglobulin značilno povečana ($p < 0,01$; Sl. 3B), v primerjavi z asimptomatskimi organizmi.



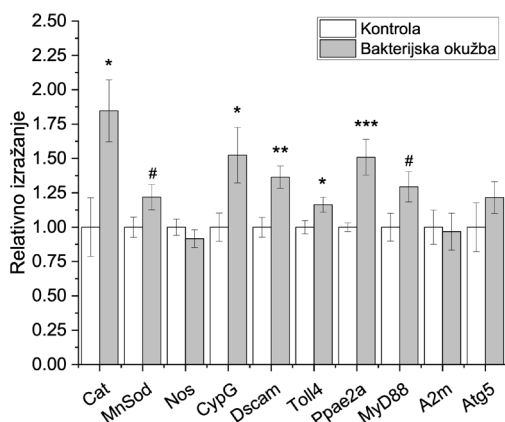
Slika 3. Aktivnost encimov (A) katalaza (CAT) in (B) alfa-2-makroglobulin (A2M) v hemolimfi asimptomatskih *P. scaber* in osebkih s simptomatsko okužbo z *R. porcellionis*. Zvezdica nad stolpci na grafu prikazuje statistično značilno razliko v primerjavi z asimptomatskimi (kontrolnimi) živalimi (**; $p < 0,01$), medtem ko lojtra (#) označuje mejno značilne razlike ($0,05 < p < 0,1$).

Figure 3. Activity of the enzymes (A) catalase (CAT) and (B) alpha-2-macroglobulin (A2M) in the haemolymph of asymptomatic *P. scaber* and individuals with symptomatic *R. porcellionis* infection. An asterisk above the graph bars indicates a statistically significant difference compared to asymptomatic (control) animals (**, $p < 0.01$), while a hash mark (#) indicates a borderline significant difference ($0.05 < p < 0.1$).

Spremembe v izražanju genov povezanih z imunostjo pri *P. scaber* s simptomatsko bakterijsko okužbo

Okužba *P. scaber* z bakterijo *Rhabdochlamydia porcellionis* je izzvala spremenjeno izražanje genov, povezanih z imunostjo, v primerjavi z asimptomatskimi, tj. zdravimi

organizmi (Sl. 4). V hemocitih okuženih živali smo opazili statistično značilno povečano izražanje genov *Cat* ($p < 0,05$), *CypG* ($p < 0,05$), *Dscam* ($p < 0,01$), *Toll4* ($p < 0,05$) in pa *Ppae2a* ($p < 0,001$), medtem ko za gene *Nos*, *A2m* in *Atg5* nismo zaznali sprememb v izražanju. V primeru genov *MnSod* ($p = 0,082$) in *MyD88* ($p = 0,067$) pa smo opazili mejno značilno povečano izražanje.



Slika 4. Izražanje genov povezanih z imunostjo v hemocitih *P. scaber* s simptomatsko bakterijsko (*R. porcellionis*) okužbo. Kontrolo predstavljajo asimptomatske živali, tj. živali brez znakov okužbe. Podatki so predstavljeni kot relativna sprememba v izražanju genov v primerjavi s kontrolno, povprečna vrednost \pm standardna napaka je izračunana iz treh neodvisnih vzorcev RNA. Zvezdica nad stolpci na grafu prikazuje statistično značilno razliko v primerjavi z asimptomatskimi (kontrolnimi) živalimi (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$), medtem ko lojtra (#) označuje mejno značilne razlike ($0,05 < p < 0,1$).

Figure 4. Expression of immune-related genes in haemocytes of *P. scaber* with symptomatic bacterial (*R. porcellionis*) infection. Control is represented by asymptomatic animals, i.e., animals without signs of infection. Data are presented as relative expression change compared with control, mean \pm standard error calculated from three independent RNA samples. An asterisk above the bars in the graph indicates a statistically significant difference compared to asymptomatic (control) animals (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), while a number sign (#) indicates a marginally significant difference ($0.05 < p < 0.1$).

Diskusija

V raziskavi smo določili spremembe v izražanju genov, povezanih z imunostjo, v hemocitih kopenskih rakov *P. scaber* z izraženo (tj. simptomatsko) bakterijsko okužbo z *R. porcellionis*. V primerjavi z asimptomatskimi *P. scaber* smo v okuženih živalih opazili statistično značilne spremembe v izražanju imunskih genov *Toll4*, *Dscam*, *Ppae2a*, *CypG* in *Cat*, medtem ko je bilo izražanje genov *MnSod* in *MyD88* zgolj mejno značilno spremenjeno ($0,05 < p < 0,1$). Ti rezultati pomembno prispevajo k razumevanju dogajanja na nivoju transkriptoma v primeru mikrobne okužbe kopenskega enakonožca *P. scaber*.

V okuženih živalih je bilo izražanje genov *Toll4* in *Dscam* pričakovano značilno povečano. Gena namreč kodirata evolucijsko ohranjena receptorska proteina (tj. imunski receptor; PRR), odgovorna za prepoznavo molekularnih vzorcev patogenov oziroma mikroorganizmov (P/MAMP) (Tran in sod., 2020; Sánchez-Salgado in sod., 2021). O podobnem povečanem izražanju *Toll* in *Dscam* genov poročajo tudi Li in sod. (2019) v hemocitih rakov *Eriocheir sinensis*, okuženih z bakterijo *Staphylococcus aureus* in pa Pan in sod. (2019), v primeru bakterijske *Vibrio sp.* okužbe raka *Macrobrachium nipponense*. Znano je, da aktivacija Toll-u podobnih receptorjev sproži prepisovanje genov, ki sodelujejo v protibakterijski obrambi rakov, tj. sintezi anti-mikrobnih peptidov (Pan in sod., 2019), nasprotno pa aktivacija gena *Dscam* promovira fagocitozo bakterij, medtem ko novejša raziskava dokazuje udeležbo produktov gena *Dscam* tudi v regulaciji signalne poti Toll (Li in sod., 2019). Poleg povečanega izražanja omenjenih genov smo opazili tudi mejno značilno povečanje izražanja *MyD88*, ki predstavlja pomemben adaptorski protein udeležen v signalni kaskadi Toll (Habib in Zhang, 2020; Gao in sod., 2021), kar sovpada s povečanim izražanjem *Toll4*. Vezava P/MAMP na plazemske oziroma PRR, vezane v membrano hemocitov, sproži evolucijsko ohranjen proces fagocitoze, tj. požiranje tujih delcev, npr. bakterij, ki so znotraj hemocitov uničeni in razgrajeni s strani ROS in RNS (Raman in sod., 2008; Rodríguez-Ramos in sod., 2010). Povečano produkcijo RNS v hemolimfi enakonožcev v primeru mikrobne okužbe smo dokazali že v raziskavi Dolar in sod. (2020), v kateri poročamo o značilno povečani koncentraciji dušikovega oksida (NO) v hemolimfi *P. scaber* s simptomatsko *R. porcellionis* okužbo. Nasprotno pa v aktualni raziskavi v okuženih *P. scaber* nismo zaznali sprememb v izražanju gena *Nos*, ki kodira encim sintaza dušikovega

oksida, odgovornega za produkcijo NO. Koncentracija reaktivnih zvrsti (ROS in RNS) mora biti v celicah in tkivih strogo regulirana, saj lahko povečane koncentracije trajno poškodujejo celice gostitelja. Za uravnavanje nivoja ROS in RNS so odgovorni antioksidativni encimi (npr. CAT in SOD), ki predstavljajo pomembno komponento prirojene imunosti rakov (Gopalakrishnan in sod., 2011; Liu in sod., 2013). V povezavi s tem smo v hemolimfi bakterijsko okuženih *P. scaber* opazili značilno povečano izražanje gena *Cat*, medtem ko je bilo izražanje gena *MnSod* zgolj mejno značilno spremenjeno. Za primerjavo, v raziskavi Dolar in sod. (2020) smo v hemolimfi bakterijsko okuženih *P. scaber* izmerili značilno povečano aktivnost encima SOD, v primerjavi z asimptomatskimi živalmi, medtem ko smo v aktualni raziskavi dodatno analizirali tudi aktivnost encima katalaza in dokazali mejno značilno povečanje, kar sovpada z rezultati izražanja gena *Cat* v hemocitih *P. scaber*.

Simptomatska *R. porcellionis* okužba pri *P. scaber* izzove aktivacijo celične komponente prirojene imunosti, kar je jasno razvidno iz zmanjšane deleža semi-granularnih (SGC) in povečanega deleža granularnih hemocitov (GC) v hemolimfi okuženih *P. scaber* (Dolar in sod., 2020). Spremenjen delež SGC lahko razložimo z migracijo le-teh na mesto okužbe in tvorbe nodulov, o čemer poročata že Kostanjšek in Pirc Marolt (2015), medtem ko je razlog za neznačilno povečanje deleža GC moč iskati v proizvodnji ključnih humoralnih molekul, vključno s komponentami sistema proPO (Herbinière in sod., 2005; Tassanakajon in sod., 2018). To sovpada z opaženim značilno povečanim izražanjem gena *CypG*, ki kodira regulatorni protein, za katerega se domneva, da v granularnih hemocitih sodeluje pri ohranjanju konformacijske celovitosti shranjenih granularnih beljakovin, s čimer je pomembno udeležen v regulacijo sekrecije vsebine citoplazemskih granul, tj. humoralnih molekul (Takaki in sod., 1997; Herbinière in sod., 2008). Domnevamo, da aktivacija signalne poti Toll vodi v prepisovanje protibakterijskih genov in sintezo humoralnih obrambnih molekul v granularnih in semigranularnih hemocitih. Dodatno smo v simptomatskih *P. scaber* opazili tudi značilno povečano izražanje gena *Ppae2a*, odgovornega za aktivacijo proPO sistema oziroma procesa melanizacije (Charoensapsri in sod., 2011). Proces je namreč aktivno udeležen pri tvorbi nodulov in se aktivira ob prisotnosti P/MAMP oziroma molekularnih vzorcev poškodovanih celic in tkiv (t.j. DAMP) (Cerenius in Söderhöl, 2021). Opažena sprememba

v izražanju gena *Ppae2a* je lahko neposredno povezana s poškodbo organizma, zaradi vdora bakterij, ali pa gre za posledico aktivacije Toll signalne poti, s katero si proPO sistem deli skupne regulatorne proteine (Cerenius in Söderhäll, 2021). S tem rezultatom sovпада tudi zaznana povečana aktivnost encima alfa-2-makroglobulin, ki predstavlja pomembno serinsko proteazo, odgovorno za regulacijo proPO sistema in procesa melanizacije (Ponprateep in sod., 2017).

Zaključki

Na podlagi rezultatov lahko nedvomno zaključimo, da simptomatska bakterijska okužba *P. scaber* z *R. porcel-*

lionis izzove značilne spremembe v izražanju izbranih kandidatnih genov. Rezultati potrjujejo pomembno vlogo analiziranih genov v imunskem odgovoru v primeru mikrobne okužbe. Hkrati pa preučevani geni, povezani z imunostjo, predstavljajo potencialne biološke označevalce v okoljskih raziskavah.

Zahvala

Raziskovalno delo predstavljeno v prispevku je bilo financirano s strani javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS), v okviru raziskovalnega programa Integrativna zoologija in speleobiologija (P1-0184), projekta (J1-2482) in pogodbe sklenjene z Univerzo v Ljubljani, Biotehniško fakulteto, za usposabljanje mladega raziskovalca (Andraž Dolar).

Viri

- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34 (4), 990-1001. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.019>
- Becking, T., Giraud, I., Raimond, M., Moumen, B., Chandler, C., Cordaux, R., Gilbert, C., 2017. Diversity and evolution of sex determination systems in terrestrial isopods. *Scientific Reports*, 7 (1), 1084. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01195-4>
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2021. Immune properties of invertebrate phenoloxidases. *Developmental & Comparative Immunology*, 122, 104098. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104098>
- 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 & Comparative Immunology*, 35 (1), 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.09.002>
- Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Bertaux, J., Raimond, M., Morel, F., Bouchon, ..., Braquart-Varnier, C., 2011. The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*: meeting with their invaders, Wolbachia. *PLoS One*, 6 (4), e18531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018531>
- Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Charif, D., Mitta, G., Gavory, F., Wincker, P., ..., Bouchon, D., 2012. Feminizing Wolbachia: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *BMC microbiology*, 12, 1-18. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S1>
- Clark, K.F., Greenwood, S. J., 2016. Next-generation sequencing and the crustacean immune system: the need for alternatives in immune gene annotation. *Integrative and comparative biology*, 56 (6), 1113-1130. <https://doi.org/10.1093/icb/icw023>
- Cole, A., Morris, J., 1980. A new iridovirus of two species of terrestrial isopods, *Armadillidium vulgare* and *Porcellio scaber*. *Intervirology*, 14 (1), 21-30. <https://doi.org/10.1159/000149158>
- Dolar, A., Mayall, C., Drobne, D., Kokalj, A. J., 2020. Modulations of immune parameters caused by bacterial and viral infections in the terrestrial crustacean *Porcellio scaber*: Implications for potential markers in environmental research. *Developmental & Comparative Immunology*, 113, 103789. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103789>
- Dolar, A., Selonen, S., van Gestel, C. A., Perc, V., Drobne, D., Jemec Kokalj, A., 2021. Microplastics, chlorpyrifos and their mixtures modulate immune processes in the terrestrial crustacean *Porcellio scaber*. *Science of the Total Environment*, 772, 144900. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144900>
- Dolar, A., Jemec Kokalj, A., Drobne, D., 2022a. Time-course of the innate immune response of the terrestrial crustacean *Porcellio scaber* after injection of a single dose of lipopolysaccharide. *Frontiers in Immunology*, 13, 867077. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867077>
- Dolar, A., Drobne, D., Dolenc, M., Marinšek, M., Jemec Kokalj, A., 2022b. Time-dependent immune response in *Porcellio scaber* following exposure to microplastics and natural particles. *Science of The Total Environment*, 818, 151816. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151816>
- Dolar, A., Drobne, D., Narat, M., Jemec Kokalj, A., 2022c. Tire microplastics exposure in soil induces changes in expression profile of immune-related genes in terrestrial crustacean *Porcellio scaber*. *Environmental Pollution*, 314, 120233. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120233>
- Dolar, A., Močivnik, L., Manzano, M. A., Hrga, N., Zakšek, V., Jemec Kokalj, A., ... Kostanjšek, R., 2022d. RNA-Seq data of common woodlice *Porcellio scaber*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6673325>

- Esteve, M., Herrera, F. C., 2000. Hepatopancreatic alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. *Journal of invertebrate pathology*, 76 (1), 1-5. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4951>
- Gao, Q., Tang, Q., Xia, Z., Yi, S., Cai, M., Du, H., ... Yang, G., 2021. Molecular identification and functional analysis of MyD88 in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and expression changes in response to bacterial challenge. *International Journal of Biological Macromolecules*, 178, 492-503. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.177>
- Gopalakrishnan, S., Chen, F. Y., Thilagam, H., Qiao, K., Xu, W. F., Wang, K. J., 2011. Modulation and interaction of immune-associated parameters with antioxidant in the immunocytes of crab *Scylla paramamosain* challenged with lipopolysaccharides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 824962. <https://doi.org/10.1155/2011/824962>
- Habib, Y. J., Zhang, Z., 2020. The involvement of crustaceans toll-like receptors in pathogen recognition. *Fish & shellfish immunology*, 102, 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.035>
- Halter, T., Köstlbacher, S., Collingro, A., Sixt, B. S., Tönshoff, E. R., Hendrickx, F., ... Horn, M., 2022. Ecology and evolution of chlamydial symbionts of arthropods. *ISME Communications*, 2 (1), 45. <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00124-5>
- Herbinière, J., Braquart-Varnier, C., Grève, P., Strub, J. M., Frère, J., Van Dorsselaer, A., Martin, G., 2005. Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Developmental & Comparative Immunology*, 29 (6), 489-499. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.11.001>
- Herbinière, J., Grève, P., Strub, J. M., Thiersé, D., Raimond, M., van Dorsselaer, A., ... Braquart-Varnier, C., 2008. Protein profiling of hemocytes from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32 (8), 875-882. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.01.007>
- Hornung, E., Farkas, S., Fischer, E., 1998. Tests on the isopod *Porcellio scaber*. In: Løkke H., van Gestel C.A.M. (eds.) *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*, John Wiley & Sons Ltd, 207-226.
- Hornung, E., 2011. Evolutionary adaptation of oniscidean isopods to terrestrial life: structure, physiology and behavior. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 4 (2), 95-130.
- Jemec Kokalj, A., Dolar, A., Titova, J., Visnapuu, M., Škrlep, L., Drobne, D., ... Heinlaan, M., 2021. Long term exposure to virgin and recycled LDPE microplastics induced minor effects in the freshwater and terrestrial Crustaceans *Daphnia magna* and *Porcellio scaber*. *Polymers*, 13 (5), 771. <https://doi.org/10.3390/polym13050771>
- Jemec Kokalj, A., Dolar, A., Drobne, D., Škrlep, L., Škapin, A.S., Marolt, G., ... van Gestel C.A., 2022. Effects of microplastics from disposable medical masks on terrestrial invertebrates. *Journal of hazardous materials*, 438, 129440. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129440>
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211 (4), 213-236. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>
- Kostanjšek, R., Štrus, J., Drobne, D., Avguštin, G., 2004. 'Candidatus *Rhabdochlamydia porcellionis*', an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54 (2), 543-549. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02802-0>
- Kostanjšek, R., Marolt, T. P., 2015. Pathogenesis, tissue distribution and host response to *Rhabdochlamydia porcellionis* infection in rough woodlouse *Porcellio scaber*. *Journal of invertebrate pathology*, 125, 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.01.001>
- Li, D., Wan, Z., Li, X., Duan, M., Yang, L., Ruan, Z., ... Li, W., 2019. Alternatively spliced down syndrome cell adhesion molecule (Dscam) controls innate immunity in crab. *Journal of Biological Chemistry*, 294 (44), 16440-16450. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010247>
- Liu, Y. T., Chang, C. I., Hseu, J. R., Liu, K. F., Tsai, J. M., 2013. Immune responses of prophenoloxidase and cytosolic manganese superoxide dismutase in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* against a virus and bacterium. *Molecular Immunology*, 56 (1-2), 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.03.023>
- Liu, Q. N., Tang, Y. Y., Zhang, S. P., Li, Y. T., Wang, G., Zhang, D. Z., Jiang, S-H., Yang, H., Tang, B-P., Dai, L. S., 2022. Characterization and expression analysis of differentially expressed genes in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in response to *Vibrio cholerae* challenge. *Aquaculture*, 547, 737435. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737435>
- Lou, F., Wang, Y., Han, Z., Shui, B., 2022. Comparative transcriptome reveals the molecular regulation mechanism of *Charybdis japonica* to high-and low-temperature stresses. *Frontiers in Marine Science*, 9, 849485. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.849485>
- Mengal, K., Kor, G., Kozák, P., Niksirat, H., 2022. Effects of environmental factors on the cellular and molecular parameters of the immune system in decapods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 276, 111332. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111332>
- Pan, L., Zhang, X., Yang, L., Pan, S., 2019. Effects of *Vibrio harveyi* and *Staphylococcus aureus* infection on hemocyanin synthesis and innate immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 659-668. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.016>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29 (9), e45-e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Ponprateep, S., Vatanavicharn, T., Lo, C. F., Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., 2017. Alpha-2-macroglobulin is a modulator of prophenoloxidase system in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 62, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.028>
- Raman, T., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 2008. Agglutinin-mediated phagocytosis-associated generation of superoxide anion and nitric oxide by the hemocytes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 24 (3), 337-345. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.12.005>
- Rodríguez-Ramos, T., Carpio, Y., Bolívar, J., Espinosa, G., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., ... Estrada, M. P., 2010. An inducible nitric oxide synthase (NOS) is expressed in hemocytes of the spiny lobster *Panulirus argus*: cloning, characterization and expression analysis. *Fish & shellfish immunology*, 29 (3), 469-479. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.05.013>

- Sánchez-Salgado, J. L., Pereyra, M. A., Agundis, C., Calzada-Ruiz, M., Kantun-Briceño, E., Zenteno, E., 2019. In vivo administration of LPS and β -glucan generates the expression of a serum lectin and its cellular receptor in *Cherax quadricarinatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 94, 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.061>
- Sánchez-Salgado, J. L., Pereyra, M. A., Alpuche-Osorno, J. J., Zenteno, E., 2021. Pattern recognition receptors in the crustacean immune response against bacterial infections. *Aquaculture*, 532, 735998. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735998>
- Söderhäll, I., 2016. Crustacean hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 129-141. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.009>
- Sun, M., Li, S., Zhang, X., Xiang, J., Li, F., 2020. Isolation and transcriptome analysis of three subpopulations of shrimp hemocytes reveals the underlying mechanism of their immune functions. *Developmental & Comparative Immunology*, 108, 103689. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103689>
- Sun, Y., Zhang, X., Wang, Y., Zhang, Z., 2022. Long-read RNA sequencing of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* reveals innate immune system responses to environmental stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 122, 131-145. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.01.042>
- Takaki, Y., Muta, T., Iwanaga, S., 1997. A peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase (cyclophilin G) in regulated secretory granules. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (45), 28615-28621. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28615>
- Tassanakajon, A., Somboonwivat, K., Supungul, P., Tang, S., 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & shellfish immunology*, 34 (4), 954-967. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwivat, K., Charoensapsri, W., Tang, S., 2018. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 81-93. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009>
- Tran, N. T., Kong, T., Zhang, M., Li, S., 2020. Pattern recognition receptors and their roles on the innate immune system of mud crab (*Scylla paramamosain*). *Developmental & Comparative Immunology*, 102, 103469. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103469>
- Van Gestel, C.A., Loureiro, S., Zidar, P., 2018. Terrestrial isopods as model organisms in soil ecotoxicology: a review. *ZooKeys*, 801, 127-162. <https://doi.org/10.3897/zookeys.801.21970>
- Wang, W., 2011. Bacterial diseases of crabs: a review. *Journal of invertebrate pathology*, 106 (1), 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.018>
- Wang, X. W., Wang, J. X., 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish & shellfish immunology*, 34 (4), 981-989. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.008>
- Xu, Z., Liu, A., Li, S., Wang, G., Ye, H., 2020. Hepatopancreas immune response during molt cycle in the mud crab, *Scylla paramamosain*. *Scientific Reports*, 10 (1), 13102. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70139-2>