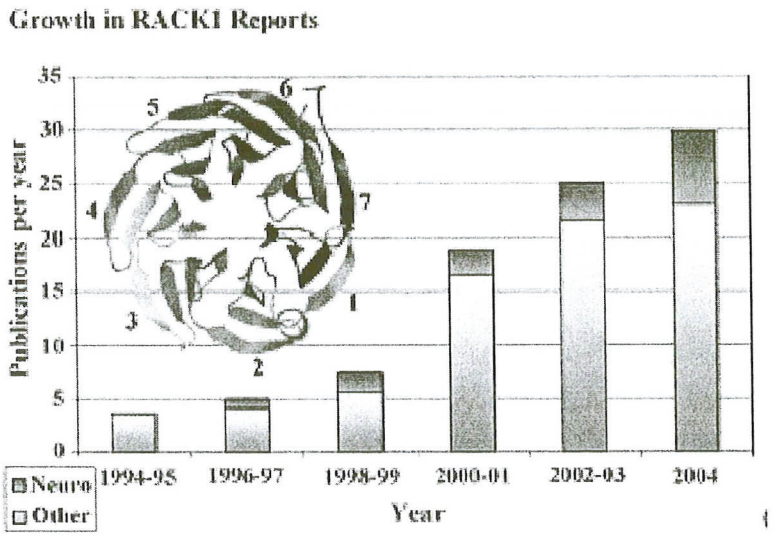
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

RACK1 ถูกค้นพบครั้งแรกใน cDNA library ของตับไก่และเซลล์ B-lymphoblastoid ของคนภายใต้ชื่อ C12.3 และ H12.3 ตามลำดับ (Guillemot et al., 1989) ต่อมา Mochly-Rosen และคณะได้ตั้งชื่อว่า Receptor for activated protein kinase C1 (RACK1) เพราะพบว่า RACK1 ทำหน้าที่เป็นตัวรับของเอนไซม์ Activated Protein kinase C (PKCs) และช่วยในการเคลื่อนย้ายเอนไซม์ภายในเซลล์ไปทำหน้าที่ในส่วนอื่นและอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมในการเติมฟอสเฟตให้แก่สับเตรท (Mochly-Rosen et al., 1991) ต่อจากนั้นเป็นต้นมา RACK1 จึงได้รับความสนใจมากขึ้นเป็นลำดับ ดังจะเห็นได้จากจำนวนของวารสารตีพิมพ์ที่รายงานการศึกษาเพิ่มขึ้นในแต่ละปี (รูปที่ 1) RACK1 เป็นโมเลกุลที่มีมีปฏิสัมพันธ์หรือจับกับโมเลกุลสำคัญอื่นๆในเซลล์ที่หลากหลาย บทบาทและหน้าที่ของ RACK1 จึงขึ้นอยู่กับ RACK1 interacting proteins (Mellor and Parker, 1998; Chou et al., 1999;)

การที่พบยีน *RACK1* ในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย ทั้งพืช (*Toxoplasma gondii*) รา (*Paracoccidioides brasiliensis*) ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) แมลง (*Drosophila melanogaster*, *Heliothis virescens*) สัตว์มีกระดูกสันหลัง (*Gallus gallus*, *Brachydanio rerio*) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (*Bos Taurus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*) แสดงว่า RACK1 น่าจะทำหน้าที่พื้นฐานที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตทั้งปวง (Neer et al., 1994) นอกจากนั้นยังพบว่า RACK1 มีการแสดงออกของแบบต่อเนื่องกระจายในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์เลี้ยวลูกด้วยนมเช่น สมอง ตับ และ ม้าม เป็นต้น (Chou et al., 1999)

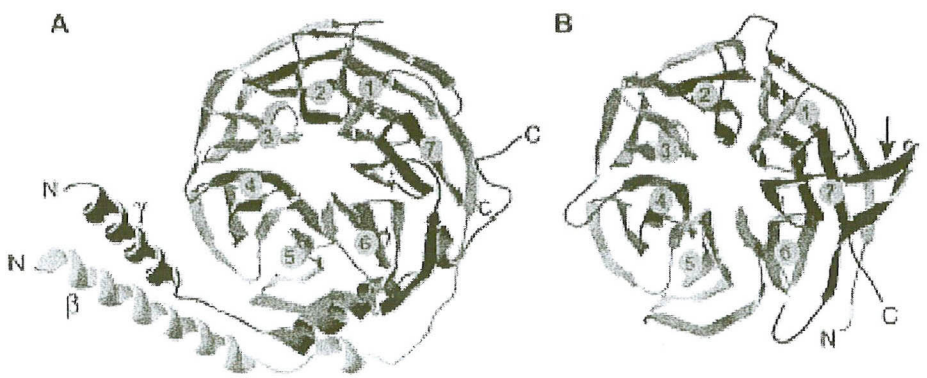
โดยทั่วไป RACK1 มีขนาดประมาณ 36 kDa ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า WD domain (W= Tryptophan, D=Aspatic acid) ทั้งหมด 7 โดเมน ซึ่งเป็นส่วนที่มีปฏิสัมพันธ์กันโปรตีนอื่นโดยทำหน้าที่เปรียบเสมือน adaptor protein ลักษณะสำคัญที่ใช้แยกโปรตีนในกลุ่ม WD domain protein family คือ กรดอะมิโนเริ่มต้นของโดเมนได้แก่ GH (G= Glycine, H= Histidine) และลงท้ายด้วยกรดอะมิโน WD ขนาดความสั้นยาวของ WD domain จะแตกต่างกัน ในการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนในกลุ่ม WD domain นั้น มีเฉพาะโปรตีนจี (Gβ1,Gγ1) เท่านั้น ที่ได้มีการทำ crystal structure ออกมา โปรตีนจีจะประกอบด้วย WD domain ทั้งหมด 7 โดเมน พบว่า WD domain มีโครงสร้างโปรตีนแบบ anti-parallel ß sheet 4 เส้นเชื่อมต่อกัน เมื่อดูโครงสร้างโดยรวมของโปรตีนจีที่มี WD domain ทั้งหมด 7 โดเมน จะเห็นว่าโครงสร้างโปรตีนจะคล้ายรูปใบพัด (propeller like-structure) และมีโครงสร้างโปรตีนแบบ double helix ที่ปลาย N terminal (รูปที่ 2A) ส่วน RACK1 ถึงแม้มีกรดอะมิโนที่เหมือนกับโปรตีนจี Gβ1 เพียง 57% แต่จากการทำนายก็พบว่า RACK1 มีโครงสร้างที่คล้ายกับโปรตีนจี Gβ1 ต่างกันที่ไม่มีส่วนโครงสร้างแบบ double helix ที่ปลาย N terminal เท่านั้น(รูปที่ 2B) (Chen et al., 2004) จากการศึกษาพบว่า RACK1 สามารถจับกันเองโดย WD domain ได้เป็น Homo-dimers และเป็น Hetero-dimers เมื่อจับกับโปรตีนที่มี WD domain ชนิดอื่น เช่น WD40 ของโปรตีนจี Gβ1 ดังแสดงในรูปที่ 3 นอกจาก WD domain แล้ว RACK1สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่นที่ domain ต่างๆ เช่น C2 domain ของ Protein kinase C (PKC), Src-homology 2(SH2) domain ของ Fyn kinase , Pleckstrin-

homology (PH) domain ของ Dynamin และ Naturally unfolded (NUF) domain ของ Acetylcholinaseterase (Ache-R) เป็นต้น (McCahill et al., 2002; Sklan et al., 2006) และในแต่ละส่วนของ WD domain ของ RACK1 ก็จะสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์หรือจับกับโปรตีนอื่นๆในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 4 (McCahill et al., 2002)



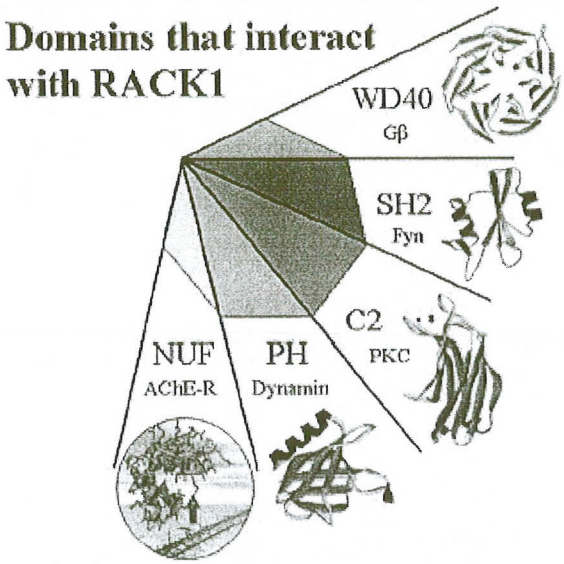
รูปที่ 1 กราฟแสดงจำนวนวารสารตีพิมพ์ของ RACK1 จาก PUBMED

ที่มา: Sklan et al., 2006



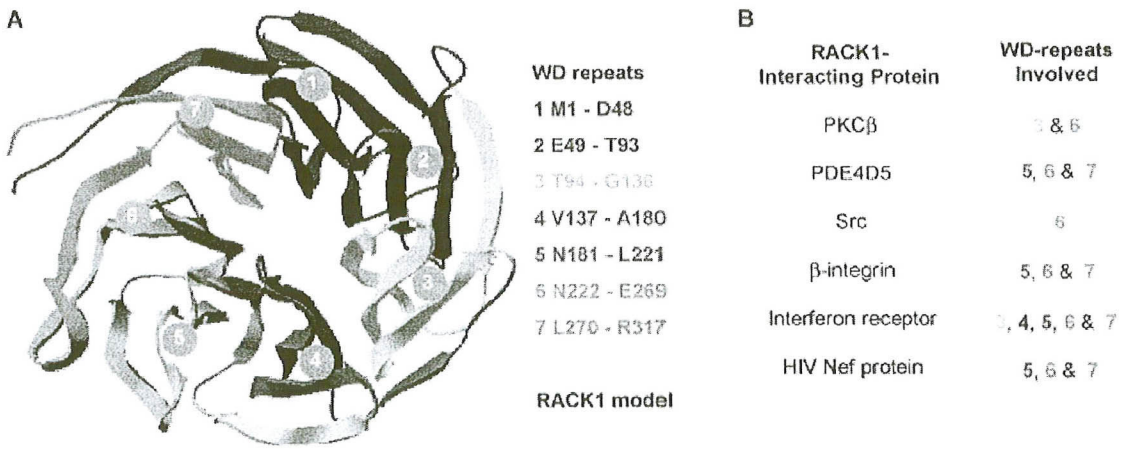
รูปที่ 2 ภาพแสดงโครงสร้างของ G-protein (A) และ RACK1 (B) ประกอบด้วย 7 WD domains

ที่มา: Chen et al., 2004



รูปที่ 3 ภาพแสดงตัวอย่างโดเมนของโปรตีนอื่นที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ RACK1 ได้

ที่มา: Sklan et al., 2006



รูปที่ 4 ภาพแสดงตัวอย่าง WD domain ส่วนที่ 1-7 ของ RACK1 ที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่น

ที่มา : McCahill et al., 2002

RACK1 interacting proteins

ปัจจุบันได้มีคันพบ RACK1 interacting proteins มากมายนอกจาก PKC ทำให้บทบาทหน้าที่ของ RACK1 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีความหลากหลาย ขึ้นอยู่กับ RACK1 interacting protein(s) ตัวอย่างโปรตีนที่ RACK1 มีปฏิสัมพันธ์ด้วยและเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ได้แก่

1. โปรตีนที่ส่งสัญญาณในเซลล์ (Cell signaling)

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในเซลล์ที่มีการศึกษาพบว่าสามารถจับกับ RACK1 ก็มีอยู่หลายตัวที่สำคัญ เช่น PKC โดย RACK1 จะช่วยให้ PKC ทำหน้าที่ได้ดีขึ้น โดยการนำพา PKC ไปที่ตำแหน่งที่เหมาะสมเพื่อทำหน้าที่ในการเติมฟอสเฟตให้โปรตีนต่างๆ (Mochly-Rosen et al., 1991) p63α เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม p53 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการการถอดรหัสของยีน (transcription activator)และทำหน้าที่เป็นโปรตีนยับยั้งการเกิดเนื้องอก (tumor suppressor protein) พบว่าเมื่อ RACK1 จับกับ p63α แล้วให้โปรตีน p63α ถูกย่อยสลายโดยกระบวนการ Proteasome degradation (Fomenkov et al., 2004) และ Rous sarcoma virus (Src) tyrosine kinase ถูกรายงานว่า ทำหน้าควบคุมการเจริญของเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ (Cell diffentiation) เมื่อ RACK1 จับกับ Src และยับยั้ง Src activity ส่งผลต่อการลดลงของการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (NIH-3T3) เป็นต้น (Chang et al. ,1998; 2001)

2. โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน (Gene expression)

จากการศึกษาพบว่า RACK1 จับกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน ได้แก่ Type I Interferon receptor β long subunit (IFNαRβL) ซึ่งเป็นตัวรับของ Interferon และ cytokines ต่างๆ โดยจะมีการส่งสัญญาณต่อไปสู่ Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family เมื่อมีการเติมฟอสเฟตแล้วทำให้เกิดเป็น STAT dimers ถูกเคลื่อนย้ายไปยังนิวเคลียสและ ควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวกับกระต้านไวรัส จากการศึกษาพบว่า RACK1 จะจับกับ IFNαRβL และควบคุมการเติมฟอสเฟตของ STAT1 แต่จะกระตุ้น STAT2 แสดงให้เห็นว่า RACK1 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน (Usacheva et al., 2001) Messenger ribonucleoprotein (mRNP) complexes โดย RACK1 เป็นองค์ประกอบหนึ่งของ mRNP complexes ซึ่งจะทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในการสังเคราะห์โปรตีนจากสายอาร์เอ็นเอ (Angenstein et al., 2002) และ eIF6 translation initiation factor ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนผ่านการจับกับ ribosome 60S ไม่ให้รวมกับ ribosome 40S แต่เมื่อ RACK1 ซึ่งนำพา activated PKC มาจับกับ eIF6 และมีการเติมฟอสเฟตให้กับ

eIF6 ทำให้โปรตีนเปลี่ยนรูปร่างและปล่อย 60S ออก ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนเป็นไปอย่างปกติ (Ceci et al., 2003)

3. โปรตีนในการเกาะติดของเซลล์ (Cell adhesion)

RACK1 จับกับโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ cell adhesion เช่น Integrin, Insulin-like growth factor I (IGF-IR), Plectin (Cytoskeleton linker protein) ทำให้มีการเพิ่มของ stress fiber และ cell adhesion ผ่านการควบคุมโดยการเติมฟอสเฟตให้กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องโดย PKC (Buensuceso et al., 2001; Hermanto et al., 2002; Osmanagic-Myers and Wiche ,2004)

4. โปรตีนตัวรับและโปรตีนที่เกี่ยวข้อง (Receptor and related protein)

จากการศึกษา พบว่า RACK1 จับกับโปรตีนที่เป็นตัวรับและโปรตีนที่เกี่ยวข้อง เพื่อเป็นตัวกลางในการเติมฟอสเฟตของโปรตีนตัวรับ และการส่งสัญญาณภายในเซลล์ เช่น Angiotensin II receptor-associated protein (Agtrap) ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสมดุลของน้ำและเกลือในระบบ cardiovascular ของคน เมื่อจับกับ RACK1 จะมีผลต่อการรวมตัวของ signaling complexes ทำให้การส่งสัญญาณในการรักษาสมดุลดีขึ้น (Wang et al., 2002) และ Dopamine transporter (DAT) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมความคงทนของ dopamine receptor ในการ reuptake ของ dopamine ในเซลล์ ก่อนเกิดการส่งสัญญาณของเซลล์สมอง พบว่า RACK1 จับกับ DAT และเติมฟอสเฟตให้กับ DAT โดย PKC ทำให้มีผลต่อการ reuptake ของ dopamine ในเซลล์ และการส่งสัญญาณของเซลล์สมอง (Lee et al., 2004) เป็นต้น

5. โปรตีนของไวรัส

นอกจาก RACK1 จะจับกับโปรตีนภายในเซลล์แล้วยังมีรายงานว่า RACK1 สามารถจับกับโปรตีนของไวรัสที่บุกรุกเซลล์และก่อให้เกิดโรคได้หลายชนิด โดยส่วนใหญ่ RACK1 จะจับกับโปรตีนจากไวรัสและเอื้ออำนวยต่อการ infection ของไวรัส ซึ่งข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการผลิตสารต้านไวรัสในอนาคต ตัวอย่างโปรตีนของไวรัสที่จับกับ RACK1 เช่น

- Influenza M1 เป็นโปรตีนของไวรัสที่ทำหน้าที่ควบคุมการเกิด infection และเป็นตัวกลางในการขนส่ง viral nucleoproteins ภายในเซลล์ของเจ้าบ้าน หน้าที่ของ RACK1-M1 interaction นั้นคือการช่วยส่งเสริมการเติมหมู่ฟอสเฟตแก่ M1 ก่อนที่จะทำหน้าที่ในเซลล์ การค้นพบนี้เป็นแนวทางในการศึกษาแนวทางกลไกของไวรัสที่มีต่อเซลล์ และจะนำไปสู่การสร้างสารต้านไวรัสที่รบกวนการจับของ RACK1-M1 (Reinhardt et al., 2000)

- Adenoviral E1A protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไวรัสที่ถูกสร้างขึ้นในระยะแรกเพื่อเป็นการปรับสภาพของเซลล์เจ้าบ้านให้เหมาะสมกับการ infection และการ replication นอกจากนี้แล้วยังพบว่า E1A

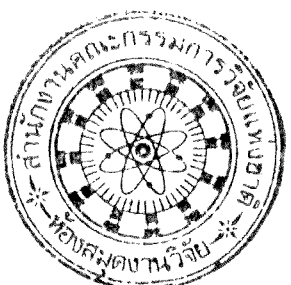
สามารถกระตุ้นการเกิด Apoptosis ของเซลล์เจ้าบ้านซึ่งเป็นกระบวนการป้องกันของเซลล์เพื่อจะกำจัดเซลล์ที่ถูก infection ด้วยไวรัส ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของ p53 (Tumor suppressor protein) และเมื่อ p53 มีปริมาณมากขึ้น ส่งผลให้เกิด apoptosis ของเซลล์ โดยทั่วไป Adenoviral gene structure ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เป็น gene therapy แต่ต้องมีการ modify ส่วนของยีนที่มีการแสดงออกของ E1A ออกเพราะจะชักนำทำให้เซลล์ตาย จึงได้มีนักวิจัยสนใจศึกษาหาโปรตีนที่ต่อต้าน E1A ขึ้น จากการทดลองในยีสต์พบว่า E1A ยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ แต่เมื่อมีการ expression ของ RACK1 ในยีสต์ที่มี E1A จะพบว่า RACK1 จับกับ E1A และทำให้เซลล์ยีสต์สามารถที่เจริญได้ตามปกติ อีกทั้งเมื่อทำการ overexpression ของ RACK1 ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (HeLa cell) ที่มีการแสดงออกของ E1A พบว่าก็ได้ผลเช่นเดียวกันคือ RACK1 จะช่วยยับยั้งการเกิด apoptosis ของ HeLa cell ได้ ช่วยให้เซลล์เจ้าบ้านที่มี E1A อยู่รอดได้ (Sang et al., 2001)

- HIV-1 Nef เป็นโปรตีนจากไวรัสที่สามารถจับกับ RACK1 ในเซลล์ของคนได้ โดยปกติแล้ว Nef จะเป็นโปรตีนที่ไวรัสสร้างขึ้นมาตั้งแต่ตอนเริ่มต้นของ infection มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส (replication) โดย RACK1 ทำหน้าที่ช่วยให้ PKC เติมฟอสเฟตให้กับ Nef และช่วยเคลื่อนย้ายโปรตีน Nef ภายในเซลล์เจ้าบ้านเพื่อเอื้อต่อกระบวนการ infection ของไวรัส จากผลดังกล่าวนักวิจัยได้คาดว่าจะน่าจะนำสารประกอบบางตัวที่จะยับยั้ง RACK1 มาใช้โดยทำหน้าที่เสมือนยาต้านไวรัส (anti-Nef drug) (Gallina et al., 2001)

6. โปรตีนของแบคทีเรีย

นอกจากนี้แล้วพบว่า RACK1 ยังจับกับโปรตีน VacA cytotoxin ซึ่งเป็น virulence factor และถูกปล่อยมาจากเชื้อจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Helicobacter pylori* ที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร จากการศึกษาพบว่า RACK1 น่าจะเกี่ยวข้องกับ signaling transduction pathway เป็นตัวที่สำคัญในขั้นตอนการก่อโรคของเชื้อตัวนี้ แต่ยังไม่ทราบหน้าที่จำเพาะ (Hennig et al., 2001

นอกจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีผลการศึกษาเพิ่มเติมที่พบว่า RACK1 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรอดชีวิตของเซลล์ จากรายงานพบว่าการแสดงออกของยีน *RACK1* ในหนูถูกควบคุมโดย Nuclear factor-ΚB (NF-ΚB) ทั้งนี้ NF-ΚB เองถูกกระตุ้นด้วย Nerve growth factor (NGF) เมื่อนำเซลล์เพาะเลี้ยงของหนู (PC-12) มาเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซีรั่มแต่มี NGF จะเกิดการกระตุ้นการแสดงออกของ RACK1 จะทำให้เซลล์มีชีวิตรอดอยู่ได้ โดยเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีทั้งซีรั่มและ NGF ก็จะทำให้เซลล์ตาย ผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าการแสดงออกของ RACK1 มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ PC-12 ของหนู และเมื่อทำการ over-expression ของ RACK1 ในเซลล์ PC-12 และเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีทั้งซีรั่มและ NGF ผลปรากฏว่าเซลล์รอดชีวิตได้ ทำให้ยืนยันได้ว่า RACK1 เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิต



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 11 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 243156

ของเซลล์ PC-12 ของหนูจริง (Choi et al., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า over-expression ของ RACK1 ใน T-cell จะสามารถยับยั้งการเกิด apoptosis เมื่อมีการกระตุ้น T-cell ด้วยสารเคมีและรังสี UV ในการกลับกันเมื่อมีการทำลดปริมาณของ RACK1 ในเซลล์โดย RNA silencing (siRNA) พบว่าจะทำให้เซลล์เกิด apoptosis ได้ (Mourtada-Maarabouni, et al., 2005)

ได้มีการศึกษา RACK1 interacting proteins และบทบาทหน้าที่ของ RACK1 เมื่อทำงานร่วมกับ RACK1 interacting proteins ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทำให้ทราบว่า RACK1 มีหน้าที่ที่หลากหลายและเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆภายในเซลล์ แต่ที่เราให้ความสนใจในที่นี้ คือ ความเกี่ยวข้องของ RACK1 และ RACK1 interacting proteins กับกระบวนการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียของเซลล์ (Sklan et al., 2006) ดังนั้นหากเราสามารถใช้ *Pm-RACK1* ของกุ้งนำไปสู่การค้นหา RACK1 interacting protein(s) ซึ่งอาจมีมากกว่าหนึ่งชนิด โดยจะใช้เทคนิค yeast two-hybrid system ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ค้นหาและศึกษา protein-protein interaction แล้วศึกษาว่าโปรตีนนั้นมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อหรือไม่ และเป็นตัวช่วยหรือยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาว ก็จะสามารถนำไปสู่การแก้ไขปัญหาการแพร่ระบาดของโรคกุ้ง สามารถป้องกัน และยับยั้งการเกิดโรคในกุ้งได้โดยตรง

Pm-RACK1

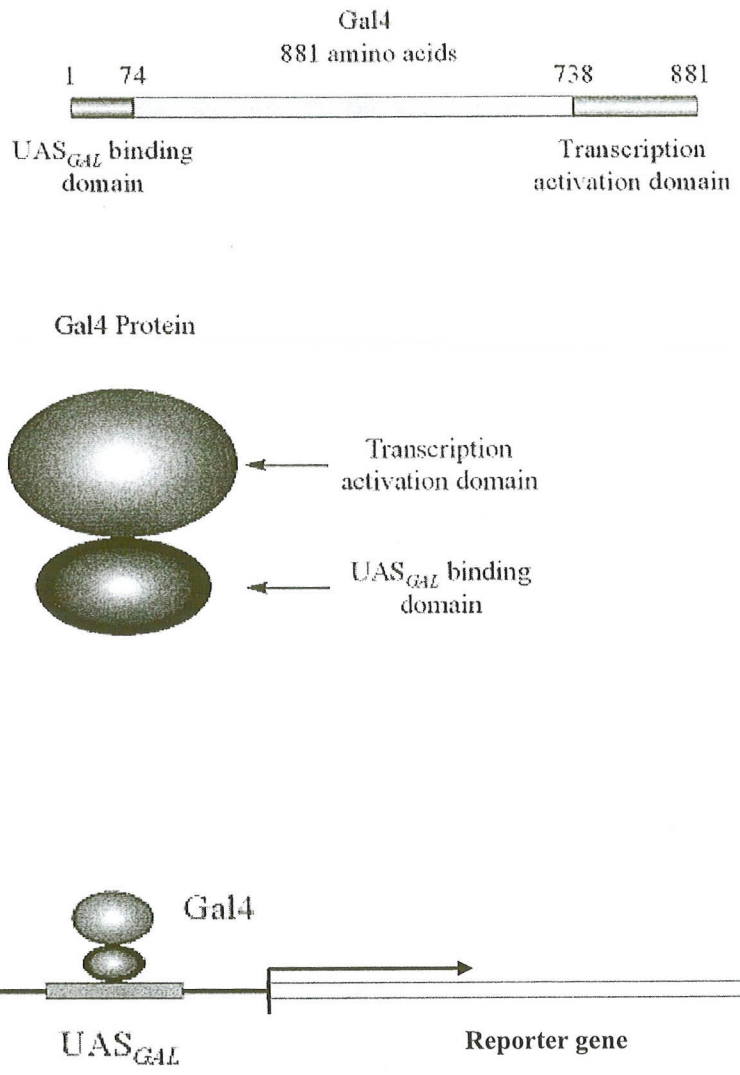
RACK1 เป็นยีนที่ได้จากคลังยีน Expressed sequence tag library (EST) ของเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว มีขนาด 957 นิวคลีโอไทด์ เมื่อแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 318 ลำดับกรดอะมิโน เมื่อนำกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของธนาคารยีน (GenBank) พบว่ายีน *Pm-RACK1* มีความเหมือนกับ *RACK1* ของแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) 80% ผึ้ง (*Apis mellifera*) 83% หนอน (*Bombyx mori*) 82% ปลา (*Danio rerio*) 79% หนู (*Mus musculus*) 78% และคน (*Homo sapiens*) 78% การศึกษายีน *Pm-RACK1* ของกุ้งเพื่อค้นหา RACK1 interacting protein(s) ซึ่งอาจจะรวมถึงโปรตีนจากไวรัสหรือแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง และอาจนำไปสู่การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้กับการเกิดโรคของกุ้งต่อไป

Yeast Two-Hybrid System

Yeast two-hybrid เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้ค้นหาและตรวจการจับกันของโปรตีนเป้าหมายที่สนใจ ใช้ในการระบุตำแหน่งการจับกันระหว่างโปรตีนสองชนิด Yeast two-hybrid ประยุกต์มาจากการทำงานของ Transcription factors Gal4 ซึ่งประกอบโดเมนหลัก 2 โดเมน คือ DNA-binding domain (DNA-BD) และ Transcription activating domain (AD) ดังแสดงในรูปที่ 5 เมื่อทั้งสองโดเมนอยู่ใกล้กัน จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนรายงาน (Reporter gene) การทำ Yeast two-hybrid

เริ่มต้นโดยการนำยีนของโปรตีนที่สนใจซึ่งจะใช้เป็นตัวล่อ (Bait) ไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะที่มี Gal4-DNA binding domain (DNA-BD-bait) ขณะเดียวกันก็สร้างห้องสมุดซีดีเอ็นเอ (cDNA library) และนำไปเชื่อมกับ Gal4-transcription activating domain (AD-cDNA) แล้วถ่ายฝากดีเอ็นเอลูกผสมทั้งสองชนิด (co-transformation) เข้าสู่เซลล์ยีสต์ หากเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง BD-bait และโปรตีนตัวใดตัวหนึ่งจาก AD-cDNA ก็จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนรายงาน (reporter gene) ดังรูปที่ 6 โดยสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนรายงานได้ โดยยีสต์สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกที่ขาดกรดอะมิโนบางชนิด และทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ β-galactosidase (Fields and Song, 1989)

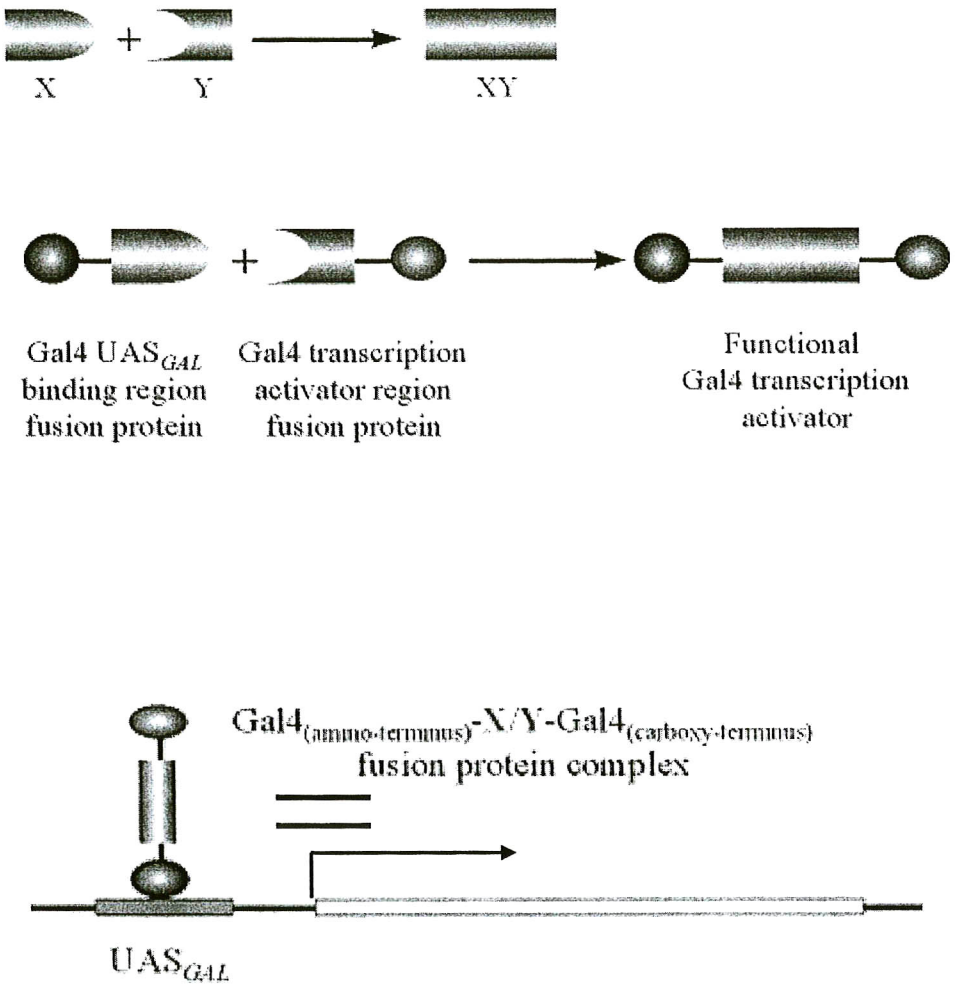
เทคนิค Yeast two-hybrid ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการค้นหา protein-protein interaction ของโปรตีนสำคัญในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* : Pm) เช่น ในปี 2004 Lu และ Kwang ศึกษาสมบัติของ latency-related ORF427 ของ WSSV โดยใช้ Yeast two-hybrid ค้นหาโปรตีนที่จับได้กับ ORF427 จาก cDNA library ของกุ้ง *Litopenaeus vannamei* และพบว่าจับกับ protein phosphatase ชนิดใหม่ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรชีวิตของไวรัส Tonganunt และคณะ (2005) ค้นพบโปรตีนที่จับกับ syntenin จาก cDNA library ของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ alpha-2-macroglobulin (α_2M) ในปี 2006 Senapin และ Phongdara ได้ใช้ Yeast two-hybrid ศึกษาโปรตีนที่สามารถจับกับ Taura syndrome viral capsid proteins (VP1, VP2 และ VP3) จาก cDNA library ของกุ้งกุลาดำ เป็นต้น พบว่า VP1 สามารถจับกับ β-actin, elongation factor 1-α (EF1α), lysozyme และ laminin receptor ได้ ส่วน VP2 จะจับได้เฉพาะกับ β-actin และ EF1α ในขณะที่ VP3 จะจับกับโปรตีนเช่นเดียวกับ VP1 ยกเว้นไม่สามารถจับกับ laminin receptor ผลของการศึกษาทำให้นักวิจัยสามารถใช้เป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันการติดเชื้อไวรัส



รูปที่ 5 ภาพแสดงโปรตีน GaL4

โปรตีน Gal4 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิด Transcription ของยีนโดยประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ DNA-binding domain (DNA-BD) และ Transcription activating domain (AD) ดังแสดงในรูปเมื่อทั้งสองส่วนถูกแสดงออกอยู่บนโปรตีนเดียวกันและส่วน DNA-binding domain (DNA-BD) จับกับ Upstream activator sequences (UAS_{GAL}) จะสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนรายงานผล (Reporter gene)

ที่มา: Fields and Song, 1989



รูปที่ 6 ภาพแสดงหลักการของ Yeast two-hybrid system

ในการศึกษาการจับกันของโปรตีน X และ Y โดยเมื่อ X ถูกเชื่อมกับโปรตีน GAL4-DNA binding protein และ Y ถูกเชื่อมอยู่กับ GAL4 activating domain และเมื่อ X จับกับ Y ในเซลล์ยีสต์ ก็จะสามารถให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนรายงานผลได้ (*ADE2*: Adenine; *HIS3*: Histidine; *LacZ*: β-galactosidase; *MEL1*: α-galactosidase)

ที่มา: Fields and Song, 1989