

Applicazione di un protocollo di immuno-stimolazione su individui di *Pracambarus clarkii* mirato alla produzione di peptidi con attività biologica.

I.A.M.C-CNR di Capo Granitola



Applicazione di un protocollo di immuno-stimolazione su individui di *Pracambarus clarkii* mirato alla produzione di peptidi con attività biologica.

Masullo T.^a, Bennici C.^a, Salamone M.^a, Tagliavia M.^a, Nicosia A.^a, Falco F.^a, Colombo P.^b, Bonura A.^b, Cuttitta A.^a, Mazzola S.^c

a - Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

b - National Research Council, Institute of Biomedicine and Molecular Immunology (IBIM), Via Ugo La Malfa, 153, 90146, Palermo, Italy.

c - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

Sommario

1. Introduzione.....	3
2. Selezione e stabulazione.....	4
3. Identificazione dei protocolli di processamento e prelievo del tessuto di interesse da individui non stimolati.....	7
3.1 Analisi del pattern proteico.....	8
3.2 Preliminare purificazione delle componenti a basso peso molecolare	10
3.3 Saggio microbiologico e ricerca di sostanze inibenti sulle frazioni solubili da individui non stimolati.....	12
4. Esperimenti di stimolazione immunitaria.....	13
4.1 Valutazione microbiologica degli estratti isolati.....	14
5. Ringraziamenti.....	15
6. Bibliografia.....	15

1. Introduzione

Uno dei principali problemi inerenti l'identificazione e l'analisi di nuovi peptidi naturali di origine marina è la disponibilità in termini quantitativi del materiale bioattivo (Cragg et al., 1997). Infatti, le concentrazioni di tali peptidi negli invertebrati marini sono spesso meno del 10^{-6} % del peso umido, ed il loro rendimento a seguito delle procedure di estrazione tradizionali risulta ancora più basso. Tuttavia, sono molteplici i fattori che possono influenzare l'esito della identificazione degli Anti Microbial Peptides (AMP), come le variazioni geografiche e stagionali (sito di campionamento), le diverse fasi della vita (specie pelagiche o bentoniche), l'età, il sesso e lo stato fisiologico (malattia, allevamento, muta).

A causa della difficoltà nell'ottenere quantità sufficienti di composti bioattivi, potrebbe essere più produttivo dissezionare in diversi tessuti/organi gli invertebrati selezionati per poi estrarre il materiale da saggiare (Haug et al., 2002a, 2002b, 2004) ciò al fine di separare i peptidi di interesse da migliaia di sostanze inattive. Dividere gli organismi in parti differenti selezionando ciascun tessuto potrebbe anche fornire l'indicazione se l'animale produce da sé il principio attivo o se esso proviene dalla dieta o ancora è associato a parassiti o microrganismi.

La maggior parte degli AMP marini sono stati di fatto isolati dal compartimento sangue, sia dall'emolinfa/fluido celomatico (sangue intero) o dagli emociti/celomociti (cellule del sangue). Alcuni peptidi tuttavia sono stati scoperti e isolati da altri tessuti, ma essendo questi circondati (negli invertebrati marini) dagli emociti/celomociti, è possibile che provengano da questi ultimi.

Inoltre tutte le variabili analitiche hanno una potenziale influenza sul risultato sia in termini quantitativi che qualitativi oltre che per la stabilità del campione anche per la riproducibilità del protocollo. Tra queste variabili ricadono le condizioni di conservazione del campione (tempo trascorso dall'estrazione, la temperatura prima dell'estrazione ed alla separazione, il congelamento e la liofilizzazione), la tipologia del campione ed il metodo di prelievo, la separazione delle cellule dal sangue (velocità di centrifugazione, durata e temperatura), l'uso del tampone (tipo, pH, forza ionica e temperatura), l'uso e il tipo di anticoagulanti e cocktail inibitori della proteasi.

Inoltre, dati bibliografici riportano come la stimolazione immunitaria determini un aumento sia quantitativamente che qualitativamente della produzione di peptidi antimicrobici.

Per tale motivo si è proceduto ad effettuare un esperimento pilota per valutare se in tali condizioni fosse superiore la quantità di piccoli peptidi sintetizzati rispetto ad individui non stimolati e se nei differenti tempi di stimolazione selezionati, emergesse una differenziazione a carico dei peptidi prodotti in relazione ad una possibile attività di natura antibatterica.

2. Selezione e stabulazione

Procambarus clarkii (Girard, 1852) è un gambero d'acqua dolce originario delle aree palustri e fluviali degli Stati Uniti centro-meridionali e del Messico nord-orientale (Fig. 1). In grado di raggiungere i 12,5 cm di lunghezza, gli individui adulti assumono una caratteristica colorazione bruno-rossa (durante la loro fase sessualmente attiva) mentre nella fase giovanile hanno una colorazione grigio verdastra che, ad una superficiale osservazione, li rende piuttosto simili al gambero di fiume italiano (*Austropotamobius italicus* e *Austropotamobius pallipes*). Importato inizialmente a scopo ornamentale si è poi largamente diffuso dopo esser sfuggito al controllo degli allevamenti di chi lo aveva importato, fino a divenire un potenziale fattore di rischio per la tutela della biodiversità. Grazie infatti, alla sua notevole capacità di adattarsi a svariati tipi di habitat acquatici, spesso notevolmente inquinati e a regimi di temperatura molto elevati (40-50 °C), il gambero rosso della Louisiana è considerato un notevole danno per l'equilibrio di questi habitat. In Italia ed in Europa rappresenta una gravissima minaccia per i gamberi endemici in quanto, oltre a competere dal punto di vista ecologico, è portatore sano di alcune gravi malattie, tra cui la famigerata "peste del gambero" (*Aphanomyces astaci*).



Fig. 1. *Procambarus clarkii*

La cattura avviene in corsi d'acqua e bacini ove presente, tramite nasse e bilance con esca o reti da posta. Pochi sono i pescatori professionisti che si dedicano esclusivamente ed in modo specializzato a questa pesca, considerando sia il basso valore in termini economici di questa specie che l'abbondanza in natura e la conseguente facilità di reperimento.

Gli animali una volta acquistati, sono stati mantenuti in una vasca in vetro resina rettangolare (4x1x1 metri rispettivamente lunghezza, larghezza e altezza) (figura 2) effettuando cambi d'acqua con cadenza settimanale, ed alimentati giornalmente con mangimi specifici alternati a cibo fresco di natura vegetale ed animale. Il cibo è stato somministrato in abbondanza la sera, e al mattino gli eccessi di quello non consumato venivano asportati tramite retino da un operatore, tutto questo per assecondare le abitudini comportamentali crepuscolare e notturne tipiche di questa specie.

Nella stessa è stata inserita acqua proveniente dalla rete idrica comunale per una altezza totale di 25 cm per un volume complessivo di 1 m³. L'acqua è stata trattata con biocondizionatore ad uso acquariologico allo scopo di renderla dal punto di vista chimico-biologico adatta alla vita degli ospiti, le dosi utilizzate sono quelle consigliate dall'azienda fornitrice. E' stato allestito un adeguato sistema di areazione composto da una pompa soffiante a membrane, due tubi in silicone da 5 mm di diametro e due pietre porose cilindriche da 1 cm di diametro per 10 cm di lunghezza. A distanza di una settimana sono stati analizzati i principali parametri chimico fisici al fine di definire se l'acqua nello stato delle cose si trovasse nelle condizioni ideali ad ospitare i *P. clarkii*.

La tabella 1 di seguito riporta i parametri controllati con i rispettivi valori riscontrati.



Fig. 2. Vasca di comunità

Applicazione di un protocollo di immuno-stimolazione su individui di *Pracambarus clarkii* mirato alla produzione di peptidi con attività biologica.

NO ₂	NO ₃	O ₂	PH	dGH	KH	C°
0.2 mg/l	21 mg/l	7 mg/l	7.8	8	6	22

Tabella 1 – Valori chimico fisici dell’acqua di stabulazione.

Si è valutato che le condizioni chimico fisiche fossero più che soddisfacenti per ospitare una popolazione di 100 esemplari adulti di *P. clarkii*, i quali avrebbero avuto una densità di 1 esemplare per 10 litri d’acqua o 1 esemplare per 40 cm² considerando che la specie vive a stretto contatto con il fondale e si distacca da esso solo per rari e rapidi spostamenti (Bennici *et al.*, 2014) Nella vasca sono state inserite delle tegole in terracotta e dei pezzi di tubo in PVC, utilizzati dagli animali come ricoveri diurni (Fig. 3).

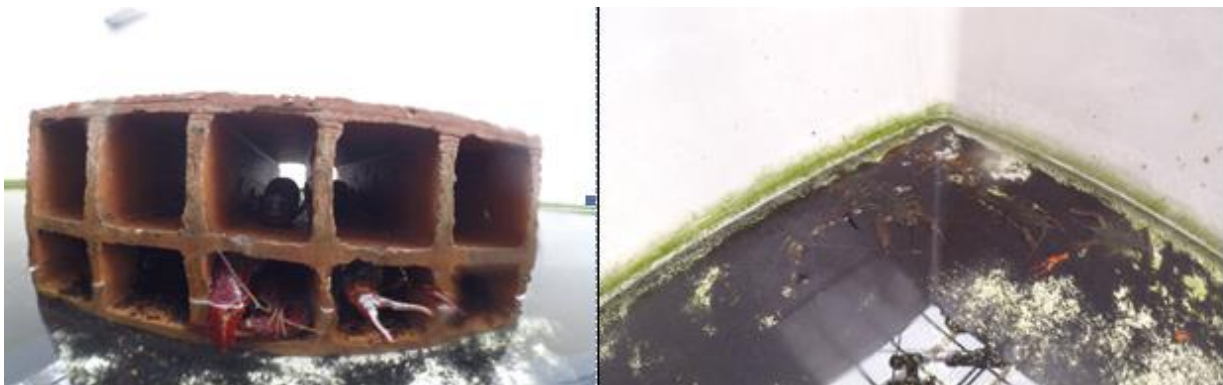


Fig. 3. Tegole di terracotta contenenti gli individui.

3. Identificazione dei protocolli di processamento e prelievo del tessuto di interesse da individui non stimolati

In prima analisi, si è condotta una ricerca bibliografica al fine di identificare il tessuto su cui investigare relativamente all'estrazione dei peptidi di interesse. Nella maggior parte dei lavori pubblicati, particolare rilevanza viene data all'emolinfa come fonte di peptidi antimicrobici (Kwok & Tobe, 2006; Wu *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2012; Jiravanichpaisal *et al.*, 2007; Scherbaum *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2009). L'emolinfa, distribuita nell'emocele dei crostacei rappresenta il fluido che veicola in tutto il corpo i nutrienti, l'ossigeno, gli ormoni e le cellule. Essa contiene l'emocianina, una proteina che lega il rame e che se ossigenata vira al blu. In particolare, studi condotti sulle risposte immunitarie degli invertebrati hanno focalizzato l'attenzione sui meccanismi di difesa e sul pathway biochimico attivato durante l'infezione oltre che sulla caratterizzazione delle cellule dell'emolinfa e sui fattori cellulari coinvolti nella eliminazione dei patogeni, nella regolazione e nei meccanismi di riparazione delle strutture danneggiate.

Seguendo quanto riportato in letteratura (Kwok & Tobe, 2006; Chen *et al.*, 2009), si è proceduto alla messa a punto di un protocollo riproducibile per l'estrazione del suddetto fluido dall'organismo, al fine di individuare le migliori condizioni, tali da evitare il fenomeno del *clotting*, ampiamente discusso in letteratura. La coagulazione dell'emolinfa (processo particolarmente rapido nei crostacei), infatti, rappresenta un ostacolo così come l'attacco proteolitico di determinate proteasi, al processo di estrazione dei peptidi ed alla relativa resa in termini quantitativi (Kwok & Tobe, 2006).

Oltre che valutare quale mezzo di estrazione consentisse una migliore resa in termini quantitativi si è anche valutata l'eventuale differenza a carico del pattern proteico derivante dall'emolinfa prelevata separatamente da entrambi i sessi.

In tutti gli organismi il prelievo (1.5 mL) è stato effettuato a ridosso dell'arteria addominale ventrale con una siringa sterile con ago avente diametro di 28G.

Il rapporto emolinfa/anticoagulante è stato fissato a 1:1. Le diverse soluzioni di anticoagulante usate sono riportate di seguito in elenco:

- a) 0.11 M sodio citrato, 0.1 M NaCl (Kwok & Tobe, 2006)
- b) 0.11 M sodio citrato, 0.1 M NaCl, metanolo acidificato aggiunto dopo 20min a RT dal prelievo (Kwok & Tobe, 2006)
- c) Metanolo acidificato*, 8mM EDTA (Chen *et al.*, 2009)
- d) Metanolo acidificato*, 8mM EDTA, 0.11 M sodio citrato, 0.1 M NaCl

I campioni di emolinfa, mantenuti in ghiaccio sono stati osservati al microscopio al fine di verificare l'integrità cellulare (Fig. 4A). Si è quindi sottoposto ciascun campione ad omogenizzazione e verificata al microscopio l'avvenuta lisi cellulare tramite colorazione con Trypan blue (Fig. 4B). L'omogenato è stato centrifugato a 10.000 rpm per 15 min a 4 °C, prelevato il sovrantante e analizzato mediante SDS-PAGE.

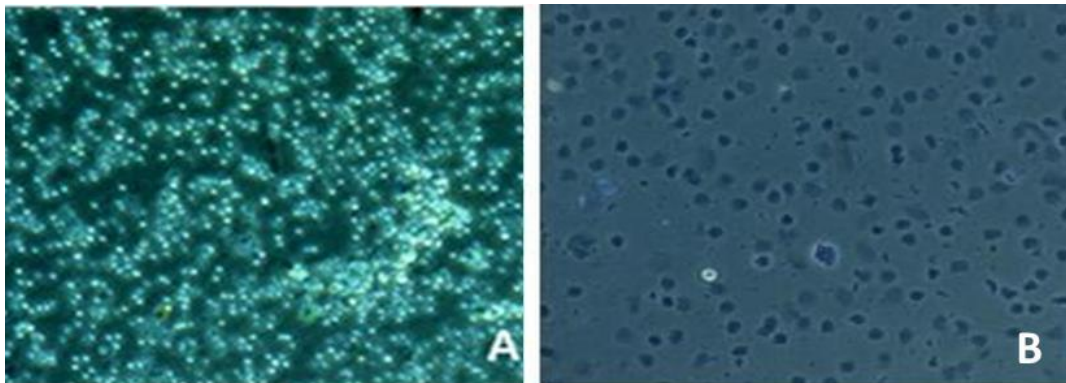


Fig. 4. Osservazione delle cellule al microscopio: A) cellule al momento del prelievo (10X); B) cellule dopo (20X) colorazione con Trypan Blue.

3.1 Analisi del pattern proteico

L'analisi tramite SDS-PAGE in condizioni riducenti della frazione solubile è mostrata in figura 5. Com'è possibile osservare, non si evidenziano differenze a carico delle bande proteiche tra individui di sesso maschile e femminile. Tra le differenti bande ad alto peso molecolare la più rappresentativa (circa il 90% delle proteine totali) risulta quella di circa 80KDa, identificata in letteratura come emocianina (Scherbaum *et al.*, 2010). La frazione insolubile ottenuta in seguito a

centrifugazione è stato risospesa in PBS, sottoposta a sonicazione per rilasciare eventuali componenti proteiche rimaste intrappolate ed analizzata tramite SDS-PAGE (Fig. 6). Dalla figura 6 si denota come sia ridotta la presenza di proteine a carico della frazione insolubile. L'analisi proteica condotta attraverso il Metodo di Bredford, non ha messo in evidenza grandi differenze in termini di concentrazione per i differenti mezzi di estrazione usati (concentrazioni dell'ordine dei mg/ml).

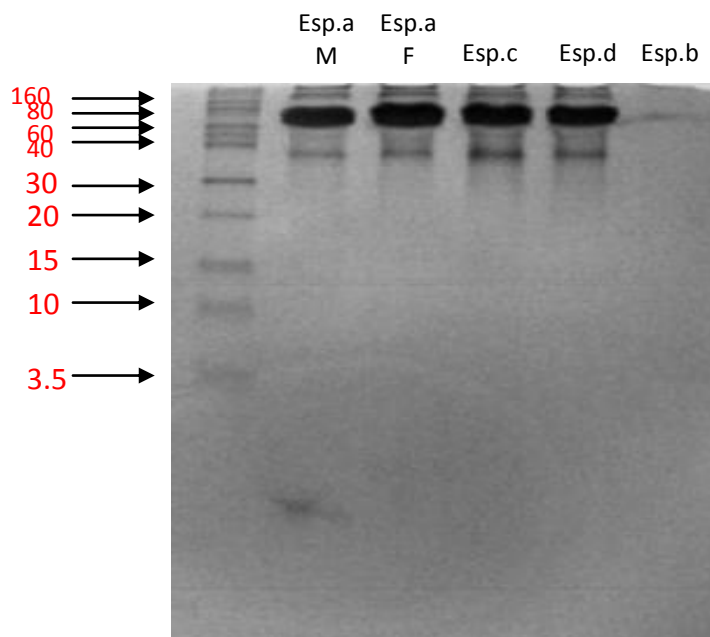


Fig. 5. SDS-PAGE al 10% della frazione solubile (50 μ g): line 1) Molecular Weight Marker, line 2) emolinfa in 0.11 M sodio citrato e 0.1 M NaCl prelevata da individui di sesso maschile; line 3) emolinfa in 0.11 M sodio citrato e 0.1 M NaCl prelevata da individui di sesso femminile; line 4) emolinfa in Metanolo acidificato, 8mM EDTA; line 5) emolinfa in Metanolo acidificato, 8mM EDTA, 0.11 M sodio citrato, 0.1 M NaCl; line 6) emolinfa in 0.11 M sodio citrato, 0.1 M NaCl, metanolo acidificato aggiunto dopo 20min a RT dal prelievo.

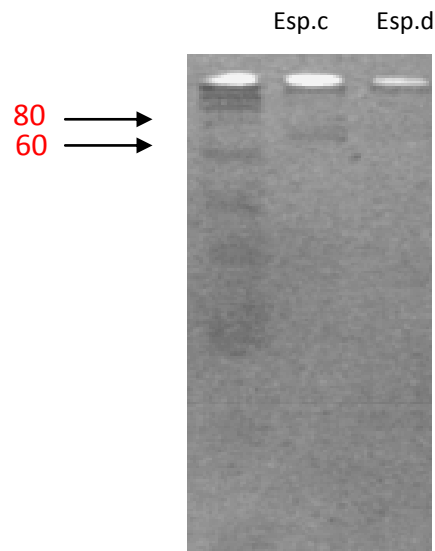


Fig. 6. SDS-PAGE al 10% della frazione insolubile (1 μ g): line 1) Molecular Weight Marker, line 2) pellet derivante dal trattamento con Metanolo acidificato, 8mM EDTA; line 3) pellet derivante dal trattamento con Metanolo acidificato, 8mM EDTA, 0.11 M sodio citrato, 0.1 M NaCl.

3.2 Preliminare purificazione delle componenti a basso peso molecolare

Prendendo in considerazione quanto riportato in letteratura si è proceduto come indicato da Know & Tobe (2006) mettendo a punto un esperimento pilota di purificazione. Dapprima il campione è stato filtrato con filtri sterili da 5 μ m (Sartorius). Quindi, il filtrato (200 mg) è stato caricato su una colonna C18 Sep-Pack (Waters), preliminarmente equilibrata con metanolo (8 mL), H₂O (8 mL) e 0.1% di acido trifluoroacetico (TFA) (8 mL) e sottoposta all'azione di una pompa da vuoto. Il campione è stato caricato per 3 volte consecutive sulla colonna e la frazione esclusa (flow through o non legato) conservata a -20 °C per le successive analisi. Di seguito si sono effettuati due lavaggi con 0.1% TFA (3 mL) e raccolte le due frazioni escluse (Wash 1 e 2). L'eluizione è avvenuta mediante una soluzione di metanolo e 0.1% TFA (4 mL). Queste ultime sono state successivamente essiccate per evaporazione sotto vuoto al fine di allontanare l'eccesso di solventi e quindi risospese in 1ml di 0.05% di acido trifluoroacetico. Un'aliquota di tale campione è stata sottoposta ad analisi mediante HPLC mentre la frazione rimanente è stata liofilizzata e analizzata tramite SDS-PAGE (Fig. 7). Dall'analisi del pattern elettroforetico è possibile evidenziare un arricchimento della componente a basso peso molecolare ed in particolare compresa tra 15 KDa e 3KDa.

Applicazione di un protocollo di immuno-stimolazione su individui di *Pracambarus clarkii* mirato alla produzione di peptidi con attività biologica.

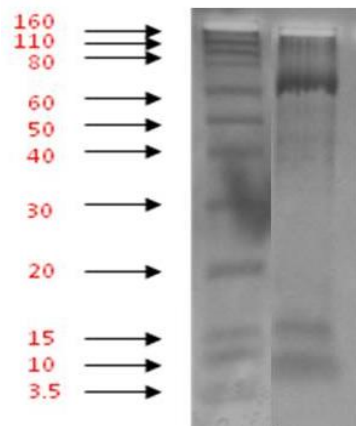


Fig. 7. SDS-PAGE al 10% della frazione liofilizzata: line 1) Molecular Weight Marker, line 2) campione liofilizzato (1 μ g) risospeso in PBS.

Relativamente all'analisi HPLC, il campione risospeso in 0,05% TFA è stato caricato su colonna RPC18 2.1x150 mm (5 μ m silica particles size) (Waters) ed eluito tramite un gradiente di aceto nitrile ad una concentrazione massima del 60% (aumento del 10% della concentrazione ogni 10 min) in presenza di acqua e 0.05% TFA. La velocità di flusso è stata settata a 0.3 ml/min e usando come detector il PDA si sono registrati i valori di assorbimento alle seguenti lunghezze d'onda: 280 nm, 210 nm e 254 nm. Il cromatogramma riportato in Fig. 8 mostra la complessità della frazione a basso peso molecolare.

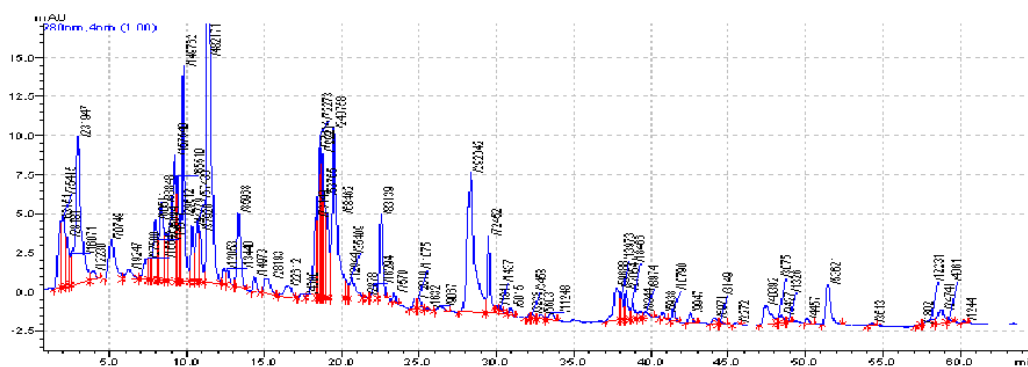


Fig. 8. Cromatogramma del campione in 0.05% TFA (ABS 280nm, scala di riferimento 220 mAU).

3.3 Saggio microbiologico e ricerca di sostanze inibenti sulle frazioni solubili da individui non stimolati

Il saggio è stato eseguito applicando un metodo microbiologico secondo i documenti di riferimento Decreto 10 Marzo 1997 Allegato IX; GURI N. 103 - Serie generale – 6 Maggio 1997; AFSSA- Star Protocol-Screening test for antibiotic residues- LMV/UCM/PO5/11.AN-9/2002 (Ricerca Sostanze Inibenti (Metodo: POS AOAM/28 IZS SI)).

Tale metodo di screening, si basa sulla capacità che hanno determinate sostanze di diffondere nell'agar inibendo la crescita dei microrganismi. In particolare i campioni vengono testati su terreni di coltura agarizzati, preventivamente inoculati con microrganismi test a concentrazione nota. Sono ritenuti positivi quei campioni che presentano un alone di inibizione di crescita > 2 mm. Per quanto attiene ai microrganismi utilizzati il metodo prevede l'utilizzo di *Bacillus cereus* K250, *Bacillus cereus* BCR50, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*. Ricerche sperimentali condotte hanno dimostrato l'elevata sensibilità di questi microrganismi alla più ampia gamma di antibiotici e principi attivi e fra questi *Bacillus subtilis* rappresenta verosimilmente il microrganismo più sensibile. In particolare *B. subtilis* mostra sensibilità sia ai sulfamidici che ad aminoglicosidi, *B. cereus* K250 e *B.cereus* BCR 50 mostrano sensibilità e resistenza nei confronti delle tetracicline, *M. luteus*, soprattutto è utilizzato per evidenziare macrolidi e betalattamici.

Inoltre, nell'ambito dello studio sono stati testati anche *Escherichia coli* e *Pseudomonas spp.*, essendo tra i più frequenti responsabili di processi alterativi di diversi alimenti. Inoltre per *Escherichia coli* è documentata la sensibilità verso i chinolonici.

L'attività inibente dei campioni, oggetto di studio, è stata effettuata quindi verso i microrganismi sopra elencati che in generale possiamo classificare come appartenenti a: batteri Gram positivi (Bacilli e Micrococchi) e batteri Gram negativi (*Escherichia* e *Pseudomonas*).

I risultati ottenuti non hanno però evidenziato alcuna presenza di attività antimicrobica dell'estratto di emolinfa totale.

4. Esperimenti di stimolazione immunitaria

Poichè non era stata rilevata attività antimicrobica in assenza di immuno-stimolazione, si è proceduto con l'inoculo, a ridosso dell'arteria addominale dorsale, di una soluzione (100 µl) contenente una mix inattivata di batteri Gram +/- (OD 0.7/ml). Il recovery è stato effettuato rispettivamente a 12h, 24h e 48h. Sono stati così selezionati 10 individui per ciascun tempo di stimolazione. Quindi si è prelevata l'emolinfa a ridosso dell'arteria addominale ventrale in presenza di anticoagulante (sodio citrato 0,11 M e NaCl 0.1M) in un rapporto pari ad 1:1 (volume di emolinfa: anticoagulante). Le operazioni di inoculo e prelievo sono state effettuate immobilizzando gli animali su un supporto in poliuretano appositamente modellato e due spinette in acciaio, così da ridurre al minimo i tempi di stress degli animali ed evitando ferite da manipolazione per gli animali e per il personale tecnico (Fig. 9).

A seguito di centrifugazione (800g per 10 minuti) gli emociti sono stati risospesi in Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 10 mM, ed omogenati mediante cicli di freeze thaw e risospensione con ago da 30G. L'analisi proteica ha evidenziato una netta e superiore concentrazione a carico dell'estratto emocitario.



Fig. 9. *Procambarus* allestiti per gli esperimenti di stimolazione.

4.1 Valutazione microbiologica degli estratti isolati

L'estratto emocitario in tutti i tempi di recovery prestabiliti, è stato analizzato tramite SDS-PAGE e testato per la potenziale attività antibatterica su ceppi di *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus* (Fig. 10) alla concentrazione di 3µg. Secondo il protocollo descritto nella attività 3.3, i risultati evidenziavano solo per gli emociti prelevati a 12 e 24 ore dalla stimolazione, attività antibatterica verso entrambi i ceppi saggiati a confermare quanto presente in letteratura, ovvero la produzione di molecole bioattive sotto condizioni di immuno-stimolazione.

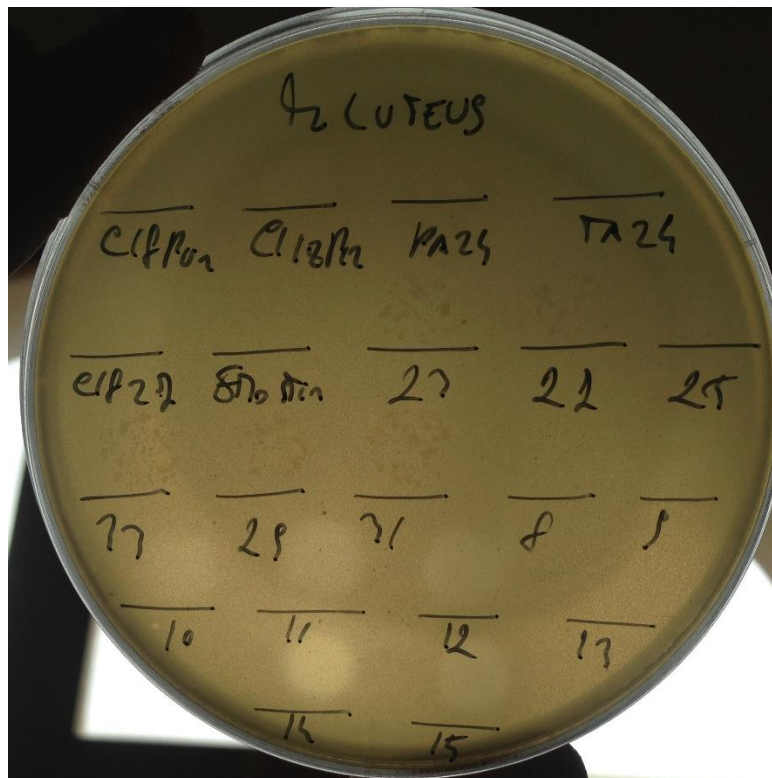


Fig. 10. Alone di inibizione dei campioni di emociti a differente concentrazione, su ceppi di *M. luteus*.

5. Ringraziamenti

Progetto: “Tecnologie e processi per il miglioramento della shelf-life dei prodotti del comparto agroalimentare attraverso l’uso di film edibili innovativi a base pectinica” (“PON FILM-EDIBILI”, Cod. PON01_02286) - CUP: B68F12000360007

6. Bibliografia

Bennici C., Cuttitta A., Nicosia A., Musco M., Torri M., Biondo G., Patti C., Di Natale M.V., De Luca B., Di Maria A., Mazzola S. (2014) *Procambarus Clarkii* Rapporto tecnico scientifico sulla riproduzione in ambiente controllato e acquisizione dei dati biometrici. Protocollo n.4878TR2014-CNRSOLAR.

Chen R., Ma M., Hui L., Zhang J., Li L. (2009) Measurement of Neuropeptides in Crustacean Hemolymph via MALDI Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.*, 20(4): 708–718.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. (1997) Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.*, 60:52–60.

Haug T, Kjuul AK, Stensvåg K, Sandsdalen E, Styrvold OB. (2002a) Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish Shellfish Immunol.*, 12:371–85.

Haug T, Kjuul AK, Styrvold OB, Sandsdalen E, Olsen OM, Stensvåg K. (2002b) Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J Invertebr Pathol.*, 81:94–102.

Haug T, Stensvåg K, Olsen OM, Sandsdalen E, Styrvold OB. (2004) Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *J Invertebr Pathol.*, 85:112–9.

Jiravanichpaisal P., Lee S.Y., Kim Y.A., Andren T., Soderhall I. (2007) Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. *Developmental and Comparative Immunology* 31:441–455.

Kwok R., Tobe S.S. (2006) Hemolymph clotting in crustaceans: Implications for neuropeptide extraction from invertebrate hemolymph. *Peptides*, 27:590 – 596

Liu W., Cui Z., Li X., Song C., Li Q., Wang S. (2012) Molecular cloning, expression pattern and antimicrobial activity of a new isoform of anti-lipopolysaccharide factor from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fish & Shellfish Immunology* 33: 85-91

Rodriguez J., Boulo V., Mialhe E., Bachere E. (1995) Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science* 108:1043-1050

Scherbaum S., Ertas B., Gebauer W., Burmester T. (2010) Characterization of hemocyanin from the peacock mantis shrimp *Odontodactylus scyllarus* (Malacostraca:Hoplocarida). *J Comp Physiol B*, 180:1235–1245

Wu S.H., Chen Y.J., Huang S.Y., Tsai W.S., Wu H.J., Hsu T.T., Lee C.Y. (2012) Demonstration of expression of a neuropeptide-encoding gene in crustacean hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 161:463–468