COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO FATTY ACID BINDING PROTEINS (FABPS) FROM *FASCIOLA GIGANTICA*

SUPATRA CHUNCHOB

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2010

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO FATTY ACID BINDING PROTEINS (FABPS) FROM *FASCIOLA GIGANTICA*

SUPATRA CHUNCHOB 4536204 SCBI/D

Ph.D. (BIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : SUKSIRI VICHASRI GRAMS, Ph.D. (Dr. rer. nat), HANS RUDI GRAMS, Ph. D. (Dr. rer. nat), VITHOON VIYANANT, Ph.D.

ABSTRACT

Fasciola gigantica, an infective parasite, is incapable of *de novo* synthesizing its own lipids and cholesterol. Fatty acid binding proteins (FABPs) are acquired to facilitate the uptake and transport of host-derived fatty acids. Nevertheless, knowledge about the functional differences of the various FABP isoforms in this parasite is still limited. The major objective of this study was to clone and comparatively characterize two different FABP isoforms of *F. gigantica* (FgFABP1 and FgFABP3) at the nucleic acid and protein levels. Consequently, a full-length FgFABP3 cDNA was isolated from the metacercarial stage of the cDNA library, and further characterized by Southern and Northern analyses. The stage specific expression of FgFABP1 and FgFABP3 were investigated by using an RT-PCR procedure. The recombinant proteins were produced in bacterial and yeast expression systems, then purified by Ni-NTA affinity chromatography and used for production of specific polyclonal antibodies. The immunogenic potential of recombinant proteins was determined by Western analyses. Distribution of native proteins in parasite tissues was demonstrated by immunohistochemistry. The presence of various FgFABP isoforms in parasite extracts was determined by 2D gel electrophoresis (2DE) and mass spectrometry. Moreover, the humoral immune responses were preliminarily evaluated in experimental mice using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

The FgFABP3 cDNA had a size of 544 base pairs and the FgFABP3 gene existed in a single copy in the parasite genome. The observed transcript size was 600 nucleotides. The deduced amino acid sequences of both FgFABPs shared a 67% identity and had different isoelectric points (pI 4.9 and pI 9.6). Reverse transcription PCR analysis demonstrated that both FgFABPs were present in juvenile and adult parasites whereas only FgFABP3 was found in their eggs. 14 kDa of FgFABPs were detected in an immunoblotted crude worm (CW), excretion/secretion (ES) product and soluble egg (SE) extract. Sera of an experimentally infected rabbit reacted earlier with FgFABP3 (week 6 after infection) than with FgFABP1 (week 12 after infection). Immunohistochemistry showed the presence of both FgFABPs in the parenchyma. However, differential tissue-specific distribution was found in digestive and reproductive organs. By using 2DE and mass spectrometry analysis, at least five FgFABP isoforms were detected in the CW extract. FgFABP1 and FgFABP3 were identified in the ES product whereas only FgFABP3 was identified in the SE extract. In addition, dominant IgG_1 and significant IgG_{2a} antibody responses in the immunized mice indicated that both FgFABP isoforms induced a mixed Th1/Th2 cell response. The results suggest different biological roles of the two isoforms during the parasite's life cycle and might be helpful to find a more effective vaccine candidate, diagnostic tool, and/or drug to target against fasciolosis.

KEY WORDS: *FASCIOLA GIGANTICA* / FATTY ACID BINDING PROTEIN / STAGE SPECIFIC EXPRESSION / TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION / 2DE

186 Pages

Copyright by Mahidol University

การศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบ FATTY ACID BINDING PROTEINS (FABPS) 2 รูปแบบของพยาธิใบไม้ตับชนิด *FASCIOLA GIGANTICA*

COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO FATTY ACID BINDING PROTEINS (FABPS) FROM *FASCIOLA GIGANTICA*

สุภัทรา ชื่นชอบ 4536204 SCBI/D

ปร. ด. (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : สุขศิริ วิชาศรี กรามส์, Ph.D. (Dr.rer.nat), Hans Rudi Grams, Ph. D. (Dr.rer.nat), วิฑูรย์ ไวยนันท์, Ph.D.

บทคัดย่อ

พยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola gigantica* ไม่สามารถสังเคราะห์ไขมัน และ คอเลสเตอรอลขึ้นได้เอง ดังนั้น Fatty acid binding proteins (FABPs) จึงมีความสำคัญต่อการดักจับและนำส่งกรดไขมันจากโฮสต์ แต่เนื่องจากความรู้เกี่ยวกับหน้าที่จำเพาะของ FABP แต่ละรูปแบบของพยาธินี้ยังมีจำกัด ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้คือ เพื่อโคลนและวิเคราะห์คุณลักษณะในเชิงเปรียบเทียบของ FABP 2 รูปแบบจาก *F. gigantica* (FgFABP1 และ FgFABP3) ทั้งในระดับกรดนิวคลีอิก และโปรตีน โดย cDNA ที่มีลำดับครบสมบูรณ์ของ FgFABP3 ถูกแยกได้จากห้องสมุด cDNA ของพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย จากนั้นหาจำนวนแต่ละรูปแบบของจีนในจีโนม และพิสูจน์ว่าลำดับเบสที่ได้มาจากจีโนมของพยาธิชนิดนี้ด้วย Southern analysis และศึกษาขนาดและปริมาณของ mRNA ด้วย Northern analysis ตรวจสอบการแสดงออกของจีน FgFABP1 และ FgFABP3 ในระยะการเจริญต่างๆ ของพยาธิด้วย RT-PCR ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยระบบการแสดงออกในแบคทีเรียและยีสต์ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA affinity chromatography และนำไปใช้ผลิตแอนติบอดีจำเพาะ เพื่อใช้ศึกษาความสามารถในการเป็นแอนติเจนโดย Western blot และการกระจายตัวของ FgFABP ในเนื้อเยื่อพยาธิ ตรวจสอบการแสดงออกของ FgFABP รูปแบบต่างในโปรตีนสกัดจากพยาธิด้วย 2D gel electrophoresis (2DE) และ Mass spectrometry รวมทั้งประเมินการตอบสนองทางวิทยาภูมิคุ้มกันในหนูทดลองด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

จีน FgFABP3 ที่แยกได้ประกอบด้วย 544 คู่เบส และปรากฏอย่างน้อยหนึ่งจีนโคพีในจีโนม ลำดับ mRNA มีความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับ FgFABP1 อยู่ 67% และพบว่ามีค่า isoelectric point ต่างกันคือ 4.9 และ 9.6 ตามลำดับ ผลจาก RT-PCR พบว่า FgFABP ทั้ง 2 รูปแบบมีการแสดงออกทั้งในตัวอ่อน และตัวเต็มวัย มีเพียง FgFABP3 เท่านั้นที่แสดงออกในไข่ ผลจากการศึกษา immunoblot พบโปรตีน FgFABP ขนาด 14 กิโลดาลตันในโปรตีนสกัดจากตัวพยาธิ (CW), สารขับหลั่ง(ES) และไข่ (SEA) ของพยาธิ และพบว่าแอนติซีรั่มจากกระต่ายที่ติดเชื้อทำปฏิกิริยากับ FgFABP3 ได้ก่อนกล่าวคือที่ 6 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ ในขณะที่ FgFABP1 จะพบที่ 12 สัปดาห์หลังการติดเชื้อเท่านั้น FgFABP ทั้ง 2 รูปแบบมีการกระจายตัวในเนื้อเยื่อ parenchyma และยังพบรูปแบบการกระจายตัวจำเพาะในอวัยวะของระบบย่อยอาหาร และระบบสืบพันธุ์ จากผลการศึกษาด้วยวิธี 2DE และ Mass spectrometry พบการแสดงออกของ FgFABP มีอย่างน้อย 5 รูปแบบในโปรตีนสกัดจากตัวพยาธิ (CW) และยังพบการแสดงออกของ FgFABP1 และ FgFABP3 ในสารขับหลั่ง(ES) ส่วนในโปรตีนจากไข่พบเพียง FgFABP3 เท่านั้น นอกจากนี้ทั้ง FgFABP ทั้ง 2 รูปแบบชักนำให้เกิดการตอบสนองผสมระหว่าง Th1/Th2 ซึ่งแปลผลได้จากการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญของ IgG_1 และ IgG_{2a} จากผลการศึกษาบ่งชี้ถึงความแตกต่างทางชีวภาพของ FgFABP 2 รูปแบบ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถไปประยุกต์ศึกษาบทบาทสำคัญของ FABP ตลอดวงชีวิตของพยาธิ และค้นหาโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อใช้พัฒนาวัคซีนตัวเลือก, วิธีวินิจฉัย หรือโมเลกุลเป้าหมายต่อยา เพื่อป้องกันโรคติดเชื้อพยาธิ (fasciolosis) ต่อไป

186 หน้า

Copyright by Mahidol University