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
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 IgG1 and significant IgG2a 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
การศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบ FATTY ACID BINDING PROTEINS (FABPS) 2 รูปแบบของพยาธิใบไม้ FASCiola GIGANTICA

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

สุภัทรา ชื่นชอบ 4536204 SCBD

ปร. ด. (ชีววิทยา)

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

บทคัดย่อ

พยาธิใบไม้ FASCiola GIGANTICA ไม่สามารถสังเคราะห์ไขมันและโคเลสเตอรอลขึ้นเองดังนั้น Fatty acid binding proteins (FABPS) จึงเป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญในการดักจับและนำส่งกรดไขมันจากโฮสต์ แต่เนื่องจากความรู้เกี่ยวกับหน้าที่จานเพาะของ FABP แต่ละรูปแบบของพยาธินี้ยังมีจำกัดดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อขับเคลื่อนและวิเคราะห์ความสามารถในเชิงเปรียบเทียบ FABP 2 รูปแบบจาก F. gigantica (FgFABP1 และ FgFABP3) ทั้งในระดับนิวคลีอิกและโปรตีนโดย cDNAที่มีลักษณะครบสมบูรณ์ของ FgFABP3 ถูกยกได้จากห้องสมุด cDNAของพยาธิระยะเมตาเซอร์เวิร์คจากนั้นหาจานเพาะรูปแบบของจีนในจีโนม และพิสูจน์ว่าจานเพาะที่ได้มีจานเพาะของพยาธินั้นด้วย Southern analysis และกีบานหน้าและปริมาณของmRNA ผ่าน Northern analysis ตรวจสอบการแสดงออกของจีน FgFABP1 และ FgFABP3 ในระยะการเจริญต่างๆของพยาธิโดย RT-PCR ผลลัพธ์นั้นเปรียบเทียบโดยกระบวนการทดสอบในแนวนิวคลีอิกและโปรตีนจากนั้นทำให้สุขศิริ วิชาศรี นั้นคิดว่าจะใช้วิธี Ni-NTA affinity chromatography และนำไปขับเคลื่อนดีที่สุด เพื่อใช้กีบานความประจำในการเปรียบเทียบโดย Western blot และการกระจายของ FgFABP ในเนื้อเยื่อพยาธิ ตรวจสอบการแสดงออกของ FgFABP รูปรูปแบบต่างในโปรตีนสกัดจากพยาธิด้วย 2D gel electrophoresis (2DE) และ Mass spectrometry รวมทั้งประเมินการตอบสนองทางวิทยาภูมิคุ้มกันในหนูทดลองด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ผลจากการศึกษาพบ FgFABP ทั้ง FgFABP1 และ FgFABP3 ที่มีจานเพาะต่อ 344 คู่เบส และปรากฏว่าจานเพาะนั้นจัดได้เป็นจานมีความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ มีลักษณะของเนื้อพาร์เชนยามมีความยาวของจาน FgFABP อยู่ที่ 67% และพบว่ามีค่า isoelectric point ต่างกันคือ 4.9 และ 9.6 ตามลำดับ ผลจากการ RT-PCR พบว่า FgFABP ทั้ง 2 รูปแบบมีการแสดงออกต่างกันในตัวอย่างและตัวเต็มวัย มีทั้ง FgFABP1 และ FgFABP3ที่มีการแสดงออกในตัวอ่อนและตัวเต็มวัย แต่ FgFABP3 มีการเพิ่มขึ้นที่สูงกว่า FgFABP1 ซึ่งชักนั้นการกระจายของ FgFABP1 และ FgFABP3 ของพยาธิต่างๆ พบว่า FgFABP3 ได้ยินกล้าต่อ 6 สิ่งสารหลักการติดเชื้อในขณะที่ FgFABP1 ที่มีค่าการเพิ่มของ FgFABP3 พบว่า FgFABP3 มีการกระจายของ FgFABP1 และ FgFABP3 ของพยาธินั้น FgFABP3 มีการกระจายในเปรียบแรกที่ parenchyma และมีการกระจายของ FgFABP1 ในหมู่นักกิน โดยผลการศึกษาด้วย 2DE และ Mass spectrometry พบการแสดงออกของ FgFABP 5 รูปรูปแบบในโปรตีนคลาสคลาสคลาสคลาสคลาส FgFABP ที่มีจานเพาะต่าง FgFABP3 ผ่านการขับเคลื่อนซึ่ง FgFABP3 จำนวนมากเป็นชั้นแรกที่เกี่ยวกับเรื่องของพยาธิ FgFABP ชักนั้นสามารถไปประยุกต์ใช้ในวิธีวินิจฉัยหรือเป็นเป้าหมายต้องการเพื่อป้องกันโรคดื้อ FASCiolosis ต่อไป