27 JUN 1990

CYTOCHEMICAL STUDY OF TEGUMENT SURFACE MEMBRANE IN *SCHISTOSOMA JAPONICUM* AND *SCHISTOSOMA MEKONGI* USING LECTIN STAINS

WILAIWAN MOTHONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(ANATOMY)

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1989

Copyright by Mahidol University

14663

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาทางไซโคเคมีของผิวพยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma japonicum* และ *Schistosoma mekongi* โดยการย้อมด้วยเลคติน

ผู้วิจัย วิไลวรรณ หม้อทอง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประเสริฐ โศภน, Ph.D.

ชัยทิพย์ วนิชานนท์, Ph.D.

สุชาติ อุปถัมภ์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 11 กันยายน 2532

บทคัดย่อ

เป็นที่ทราบกันแล้วว่า น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของกลัยโคโปรตีน (glycoprotein) บนผิวพยาธิใบไม้ในเลือดนั้น มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้ร่างกายผู้ถูกอาศัย (host) สร้างภูมิต้านทานขึ้น และจากการใช้สารเลคตินย้อมผิวพยาธิตัวแก่ พบว่าบนผิวพยาธิ *S. japonicum* และ *S. mekongi* มีโมเลกุลของน้ำตาล ที่มีความจำเพาะกับเลคติน ดังต่อไปนี้ concanavalin A (Con A) wheat germ agglutinin (WGA) *Ricinus communis* I (RCA I) peanut lectin (PNA) soybean agglutinin (SBA) และ *Ulex europaeus* I (UEA I) ซึ่งแสดงว่ากลัยโคโปรตีนบนผิวพยาธิทั้งสองสปีชีส์นี้ ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด คือ mannose และ/หรือ glucose, N-acetyl-D-glucosamine และ/หรือ sialic acid, galactose, N-acetyl-D-galactosamine และ fucose โดยทั่วไปลักษณะการติดสี และการกระจายของเลคตินทั้ง 6 ชนิด ดังกล่าวจะคล้ายๆกัน คือ จะติดสีเข้มมากทางด้านหลังและด้านข้างลำตัวของพยาธิ แต่ในร่องกัยนีโคพอรัลนั้นติดค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามการกระจายของเลคตินเหล่านี้จะแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย กล่าวคือ เลคติน Con A และ WGA จะจับและติดเข้มมากบริเวณคอร่อง ตลอดจนส่วนบนของร่อง และตลอด

Copyright by Mahidol University

แนวความยาวของสัน (ridges) และเลคตินทั้งสองนี้สามารถจับอย่างเจาะจงกับน้ำตาลที่เป็นแกนของสายโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น mannose, glucose และ N-acetyl-D-glucosamine ส่วนเลคตินที่เหลือ คือ RCA I, PNA, SBA และ UEA I ซึ่งสามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลส่วนปลายของสายโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น galactose, N-acetyl-D-galactosamine, และ fucose โดยเลคตินเหล่านี้จะจับและติดสีเข้มเฉพาะครึ่งบนของสัน

นอกจากนี้การศึกษาน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของกลัยโคโปรตีนในชั้นผิว (tegument glycoprotein) ซึ่งได้จากการสกัดด้วยวิธี Freeze-Thaw แล้วแยกโปรตีนแต่ละชนิดตามน้ำหนักโมเลกุลใน SDS-PAGE และ Electroblotting ลงบนกระดาษ nitrocellulose เมื่อย้อมด้วยเลคติน พบว่า เลคตินทั้งหมดที่กล่าวถึง สามารถจับกับกลัยโคโปรตีนในชั้นผิวของพยาธิได้ โดยที่การจับของเลคติน Con A, WGA, SBA และ UEA I ในพยาธิทั้งสามสปีชีส์ คือ *S. japonicum*, *S. mekongi* และ *S. mansoni* มีรูปแบบที่คล้ายๆกัน แต่จะแตกต่างกันบ้างในแง่ความเข้ม โดย Con A ติดเข้มที่สุด SBA และ UEA I ติดปานกลาง และ WGA ติดจางที่สุด ดังนั้นในแต่ละโมเลกุลของกลัยโคโปรตีนในชั้นผิวของพยาธิทั้งสามสปีชีส์ ประกอบด้วยน้ำตาลเหล่านี้คล้ายๆกัน คือ mannose, glucose, N-acetyl-D-glucosamine/sialic acid, N-acetyl-D-galactosamine และ fucose โดยที่น้ำตาล 2 ชนิดแรกอาจจะมีปริมาณมากที่สุด และN-acetyl-D-glucosamine มีปริมาณน้อยที่สุดในทุกสปีชีส์ของพยาธิ นอกจากนี้ ยังพบว่า มีความแตกต่างในการจับโดยเลคติน RCA I และ PNA บนผิวพยาธิทั้งสามสปีชีส์ กล่าวคือ *S. japonicum* จะติดเข้มมากกว่า *S. mekongi* และ *S. mansoni* ดังนั้นน่าจะสรุปได้ว่า *S. japonicum* มีน้ำตาล galactose และ N-acetyl-D-galactosamine เป็นองค์ประกอบของกลัยโคโปรตีนในชั้นผิวมากกว่าพยาธิสปีชีส์อื่นๆ

Copyright by Mahidol University

จากการศึกษาลักษณะแอนติเจนบนผิวของพยาธิใบไม้ในเลือดทั้ง 3 สปีชีส์ โดยวิธี Immunoblotting พบว่าพยาธิทั้งสามสปีชีส์มีแอนติเจนบนผิวที่เด่นๆ (major antigen) ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ ใน *S. japonicum*

มีแอนติเจนเด่นๆทั้งหมด 8 ชนิด โดยมีน้ำหนักโมเลกุลดังต่อไปนี้ 110,000, 98,000, 68,000, 47,000, 45,000, 28,000, 27,000, 26,000 และ พบว่ากลัยโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28,000, 27,000 และ 26,000 น่าจะเป็นแอนติเจนเฉพาะบนผิวของพยาธิสปีชีส์นี้ ส่วนใน *S. mekongi* มีแอนติเจนเด่นๆทั้งหมด 7 ชนิด คือ 98,000, 76,000, 68,000, 56,000, 52,000, 47,000, 42,000 และ *S. mansoni* มีแอนติเจนเด่นๆ ทั้งหมด 11 ชนิด โดยเรียงตามน้ำหนักโมเลกุลดังต่อไปนี้ 98,000, 90,000, 76,000, 68,000, 56,000, 52,000, 47,000, 45,000, 31,000 29,000, 28,000 และพบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 31,000, 29,000 และ 28,000 อาจจะเป็นแอนติเจนเฉพาะสำหรับ *S. mansoni* และเป็นที่น่าสังเกตว่า แอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 98,000 และ 68,000 พบว่าเด่นและ เข้มมากในพยาธิทุกสปีชีส์ ดังนั้น กลัยโคโปรตีนดังกล่าว อาจจะเป็นแอนติเจนร่วม (common antigen) สำหรับพยาธิใบไม้ในเลือด แต่แอนติเจนเหล่านี้อาจจะมีความแตกต่างกันบ้างในแง่ของส่วนประกอบในโมเลกุล ดังจะเห็นจาก แอนติเจนเหล่านี้ จะเด่นและเข้มมากเมื่อย้อมกับแอนติบอดีย์ที่สร้างต้านต่อพยาธิสปีชีส์เดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบแอนติเจนบนผิวพยาธิกับรูปแบบการจับของเลคตินกับกลัยโคโปรตีนในชั้นผิว พบว่า ในแต่ละโมเลกุลของแอนติเจน สามารถจับกับเลคตินอย่างน้อย 2 ชนิด นั่นแสดงว่าแอนติเจนบนผิวพยาธิใบไม้ในเลือดทั้งสามสปีชีส์ ส่วนใหญ่น่าจะเป็นกลัยโคโปรตีน นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกกลุ่มของแอนติเจนบนผิวออกเป็น 2 กลุ่ม กล่าวคือ แอนติเจนกลุ่มแรกจะจับกับเลคตินทุกชนิด ได้แก่ Con A, WGA, RCA I, PNA, SBA และ UEA I นั่นแสดงว่า ในแต่ละโมเลกุลของแอนติเจนกลุ่มนี้จะประกอบด้วยน้ำตาลที่เป็นแกน (mannose, glucose) และน้ำตาลที่ประกอบส่วนปลายของสายโอลิโกแซคคาไรด์ (galactose, N-acetyl-D-galactosamine, fucose) ส่วนกลุ่มที่ 2 แอนติเจนเหล่านี้จะจับกับเลคตินทุกตัว ยกเว้น Con A และ WGA นั่นคือ องค์ประกอบของน้ำตาลส่วนใหญ่ในโมเลกุล จะเป็นน้ำตาลส่วนปลาย และแอนติเจนเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นแอนติเจนที่เด่น (major antigen) โดย

Copyright by Mahidol University

เฉพาะแอนติเจนที่ 98,000 และ 68,000 จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าน้ำตาลส่วนปลายเหล่านี้จะปรากฏอยู่บนผิวครึ่งบนสุดของสันเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งบริเวณนี้อาจมีการลอกหลุด (turnover) ของเยื่อชั้นนอกได้เร็วที่สุด ดังนั้น น้ำตาลส่วนปลาย จึงน่าจะเป็นองค์ประกอบสำคัญของ releasing antigen ซึ่งพยาธิตัวแก่จะปล่อยออกสู่กระแสเลือดของ host ตลอดเวลา จึงสามารถกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีย์ในปริมาณมาก ฉะนั้นเมื่อย้อมกลัยโคโปรตีนในชั้นผิวด้วยแอนติบอดีย์นี้ จึงทำให้แอนติเจนดังกล่าวมีความเข้มและเด่นมากที่สุด ในทางตรงกันข้าม ในแอนติเจนกลุ่มแรกซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลที่เป็นแกน ซึ่งมักจะพบว่ามีการกระจายที่บริเวณส่วนบนของร่องและคอร่อง ซึ่งโอกาสที่จะหลุดลอกมีน้อย เพราะฉะนั้นเมื่อศึกษาด้วยวิธี Immunoblotting แอนติเจนกลุ่มนี้จึงไม่เข้ม หรือเด่นเท่ากับกลุ่มที่มีน้ำตาลส่วนปลายเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่

Copyright by Mahidol University

Thesis Title **CYTOCHEMICAL STUDY OF TEGUMENT SURFACE MEMBRANE IN *SCHISTOSOMA JAPONICUM* AND *SCHISTOSOMA MEKONGI* USING LECTIN STAINS**

Name Wilaiwan Mothong

Degree Master of Science (Anatomy)

Thesis Supervisory Committee

Prasert Sobhon, Ph.D.

Chaitip Wanichanon, Ph.D.

Suchart Upatham, Ph.D.

Date of Graduation 11 September B.E. 2532 (1989)

ABSTRACT

The carbohydrate moieties of glycoproteins and/or glycolipids have been proven to be the major epitopes of antigens on the schistosome tegument. In the present study, by using lectins as probes, both the carbohydrate moieties on the surface membrane and in the tegument glycoproteins were examined by LM, TEM and electroblotting techniques. By using Avidin-Biotin-Lectin labelling, it was revealed that there were binding sites for concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), *Ricinus communis* I (RCA I), peanut agglutinin (PNA), soybean agglutinin (SBA) and *Ulex europaeus* I (UEA I) on the surface membrane of adult Oriental schistosomes. At both LM and TEM levels, the binding patterns of these lectins were generally similar; that is, the binding was strong on the dorsal and lateral aspects of the parasites' surface membrane,while the membrane of the gynecophoral canal showed

Copyright by Mahidol University

only light binding. However, there was slight but significant difference in the distribution and staining intensity between Con A and WGA in one group versus RCA I, PNA, SBA and UEA I in another group. Con A and WGA intensely stained the membrane covering the upper part of pits and the whole ridges. In contrast, RCA I, PNA, SBA and UEA I stained only on the upper half of ridges' membrane. This, therefore, implied the presence of D-mannose/D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine/sialic acid, D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine, and L-fucose residues on the membrane of adult Oriental schistosomes, with the four former residues (detected by Con A and WGA) localized extensively on the pits' and ridges' membrane, while the latter three (detected by RCA I, PNA, SBA and UEA I) resided preferentially on the membrane covering the upper half of ridges. The binding of these lectins to the tegument glycoproteins separated in SDS-PAGE and electroblotted onto NC sheets indicated that there appeared to have similar compositions but probably different quantities of D-mannose/D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine/sialic acid, N-acetyl-D-galactosamine, L-fucose residues (detected by Con A, WGA, SBA, UEA I, respectively) in all three species of adult schistosomes, and totally there were 42, 36, 29 bands of tegument proteins in *S. japonicum*, *S.mekongi*, *S. mansoni* ranging in MW from $\geq$ 205,000 to 14,000. The tegument glycoproteins that contained D-galactose and D-galactose-N-acetyl-D-galactosamine residues (detected by RCA I and

Copyright by Mahidol University

PNA) probably have larger amount in adult *S. japonicum* (Chinese, Philippine) than in *S. mekongi* and *S. mansoni*.

The immunoblot patterns as revealed by the treatments with mouse antisera against *S. japonicum* (Chinese-ISCH : Philippine-ISPH), *S. mekongi* (ISME) and *S. mansoni* (ISMA) indicated that there were at least 8 common antigens in both strains of *S. japonicum* (Chinese, Philippine) at MW of 110,000, 98,000, 68,000, 47,000, 45,000, 28,000, 27,000, 26,000, and that the latter three bands might be specific antigens for this species. In *S. mekongi*, there were 7 major immunogenic bands at MW 98,000, 76,000, 68,000, 56,000, 52,000, 47,000, 42,000, and band 42,000 might be specific to *S. mekongi*. In *S. mansoni*, there were 11 major immunogenic bands at MW 98,000, 90,000, 76,000, 68,000, 56,000, 52,000, 47,000, 45,000, 31,000, 29,000 and 28,000; the bands at 31,000, 29,000 and 28,000 might be specific antigens for *S. mansoni*. When compared these immunogenic bands to lectin binding patterns, almost all immunogenic bands were labelled with at least two lectins and therefore they were all glycoproteins. Judging from the lectin binding patterns, these immunogenic bands appeared to be 2 groups: that is, the group of bands containing both internal (D-mannose/D-glucose and N-acetyl-D-glucosamine) and terminal sugar residues (D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine and L-fucose) in their molecules. Another group of bands, especially 98,000, 68,000, which were the most prominent antigens, might contain principally the

Copyright by Mahidol University

terminal sugar residues (D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine and L-fucose). These sugar residues were evenly distributed on the membrane covering the upper half of ridges where the membrane turnover occurred. Therefore, these glycoproteins might be the major portion of the released antigens which would stimulate intense host immune response.

Copyright by Mahidol University