



17 SEP 1996

CHARACTERIZATION OF MOSQUITO SALIVARY GLAND
MEMBRANE PROTEINS FOR SUSCEPTIBILITY AND
REFRACTORINESS TO *PLASMODIUM KNOWLESI*

JETSUMON PRACHUMSRI

อธิบดีมหาวิทยาลัย

จาก

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1996

พ
J58 c
1996

26390

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนบนผนังต่อมน้ำลายของยุงที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อและต้านเชื้อ <u>Plasmodium knowlesi</u> ในยุง
ผู้วิจัย	เจตสุมน ประจักษ์ศรี
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)
คณะกรรมการคุมวิทยานิพนธ์	วิสุทธิ์ ใบไม้ Ph.D. ม.ร.ว. ชินุสรรร สวัสดิวัฒน์ Ph.D. สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D. ศุภาภรณ์ รัตนธรรม Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	7 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะต่อมน้ำลายของยุงก้นปล่องชนิดที่เป็นพาหะ (Anopheles dirus) และยุงก้นปล่องชนิดที่ไม่เป็นพาหะ (Anopheles freeborni) ของเชื้อมาเลเรียชนิด Plasmodium knowlesi พบว่าต่อมน้ำลายของยุงทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายกัน แต่การติดสีย้อม Haematoxylin และ eosin ของต่อมน้ำลายบริเวณ median lobe และ lateral lobe ของยุงทั้งสองชนิดแตกต่างกัน โดยที่ median lobe ของต่อมน้ำลายยุง An. dirus ติดสีที่เป็นกรด ส่วน lateral lobe ย้อมติดสีที่เป็นเบส แต่ในทางตรงกันข้าม median lobe ของยุง An. freeborni ติดสีที่เป็นเบส และ lateral lobe ติดสีที่เป็นกรด เมื่อใช้ lectin เพื่อตรวจคุณสมบัติของคาร์โบไฮเดรตบนผิวของต่อมน้ำลายยุงพบว่า ConA, WGA, LcH, DBA, PSA, VFA และ LOA สามารถจับกับโปรตีนบนต่อมน้ำลายของยุงทั้งสองชนิดได้ แสดงว่าคาร์โบไฮเดรตส่วนมากเป็นน้ำตาลในกลุ่ม mannose และ glucose ปริมาณหมู่คาร์โบไฮเดรตที่พบแตกต่างกันในยุงสองชนิด SBA และ ECA จับเฉพาะต่อมน้ำลายของยุง An. freeborni แสดงว่าบนผิวของต่อมน้ำลายมีน้ำตาลในกลุ่ม galactose ด้วย แต่ไม่พบน้ำตาลกลุ่มนี้ในยุง An. dirus การทดลองศึกษาโดยใช้ biotinylated lectin ย้อมโปรตีนที่ละลายโดย detergent พบว่า ConA, LcH, DBA และ SBA จับกับ Western blot โปรตีนของ An. dirus ได้ดีกว่าโปรตีนของ An. freeborni การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการละลายโดย detergent พบว่า An. dirus มีโปรตีน 18 ชนิด (ขนาด 14 ถึง 74 kDa) และ An. freeborni มีโปรตีนทั้งหมด 21 ชนิด (ขนาด 15 ถึง >200 kDa) เมื่อย้อมเพื่อตรวจหา glycoprotein พบว่าโปรตีนขนาดตั้งแต่ 28 kDa ขึ้นไป มี carbohydrate conjugate

ด้วยการย้อมโปรตีนโดยใช้ antibody ต่อต่อมน้ำลายของ An. dirus พบว่ามีโปรตีน 7 ชนิด ของต่อมน้ำลายของ An. dirus และ 5 ชนิดของ An. freeborni ที่ทำปฏิกิริยากับ antibody นี้

เมื่อนำโปรตีนจากต่อมน้ำลายของทั้งสองชนิดมาติดฉลาก ^{125}I หรือ ^{35}S -methionine-cysteine แล้วทำปฏิกิริยากับ sporozoites ของเชื้อมาลาเรีย P. knowlesi พบว่ามีโปรตีน 4 ชนิด (35, 28, 18 และ 14 kDa) ในต่อมน้ำลายของ An. dirus ที่สามารถจับกับเชื้อมาลาเรียดังกล่าวและโปรตีนเหล่านี้จับกับ sporozoites ที่เตรียมจาก mature oocysts เท่านั้น ในขณะที่โปรตีนจากต่อมน้ำลายของ An. freeborni ที่มีขนาด 29, 18 และ 15 kDa สามารถจับกับ sporozoites ที่เตรียมจาก mature oocysts ได้เช่นกัน โปรตีนจากต่อมน้ำลายของทั้งสองชนิดที่จับกับ sporozoites ได้นี้มีลักษณะต่างกันเนื่องจากโปรตีนจาก An. freeborni กลุ่มนี้ไม่ทำปฏิกิริยากับ antibody ที่เตรียมต่อโปรตีนจากต่อมน้ำลายของ An. dirus

การจับกันของโปรตีนจากต่อมน้ำลายของกับ sporozoites ที่เตรียมจาก oocysts (แต่ไม่จับกับ sporozoites ที่เตรียมจากต่อมน้ำลาย) อาจเกี่ยวข้องกับหน้าที่ sporozoites สามารถแทรกเข้าไปอยู่ในเซลล์ต่อมน้ำลายของที่เป็นพาหะ และไม่สามารถแทรกเข้าเซลล์ต่อมน้ำลายของที่ไม่เป็นพาหะ ทั้งนี้จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการทำงานของโปรตีนกลุ่มนี้ต่อไป

Thesis Title	Characterization of Mosquito Salivary Gland Membrane Proteins for Susceptibility and Refractoriness to <i>Plasmodium Knowlesi</i>
Name	Jetsumon Prachumsri
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)
Thesis Supervisory Committee	Visut Baimai, Ph.D. M.R. Jisnuson Svasti, Ph.D. Sakol Panyim, Ph.D. Supaporn Ratanatham, Ph.D.
Date of Graduation	7 May B.E. 2539 (1996)

Abstract

The salivary glands of a mosquito vector (*Anopheles dirus*) and non-vector (*Anopheles freeborni*) of *Plasmodium knowlesi* were characterized and compared. Salivary gland morphology of both species was similar. Haematoxylin and eosin staining revealed some differences in the median and lateral lobes between the two species of mosquitoes. The median lobe of *An. dirus* stained with acidic dye and the lateral lobes stained with basic dye. In contrast, the median lobe of *An. freeborni* stained with basic dye and the lateral lobes stained with acidic dye. Fluorescein lectin conjugates were used to characterize the sugar moieties on the surface of salivary glands. ConA, WGA, LcH, DBA, PSA, VFA and LOA bound to both species of mosquitoes but at different intensities. Lectin binding indicates that mannose and glucose are the major carbohydrates on mosquito salivary glands of both species but the amount of sugar moieties were different. SBA and ECA bound to *An. freeborni*

salivary gland only, indicating that there was galactose moiety on the surface of the salivary gland of this mosquito but not in that of *An. dirus*. Total protein staining of SDS-PAGE preparation shows 18 distinct protein bands (14 to 74 kDa) for *An. dirus* and 21 bands (15 to >200 kDa) for *An. freeborni*. Ten biotinylated lectins were used to assay binding to solubilized salivary gland proteins of both species of mosquitoes. ConA, LcH, DBA and SBA strongly bound to Western blotted protein bands of *An. dirus*, but bound to a lesser extent to the protein bands of *An. freeborni*. The proteins of both mosquito species with a molecular size ranging from 28 to >97 kDa were positively stained for glycoproteins. Immunostaining with anti *An. dirus* salivary gland antibody reacted with 7 protein bands from *An. dirus* and 5 bands from *An. freeborni*. Salivary gland proteins from both species of mosquitoes were radiolabelled by ^{125}I or metabolic labelling by ^{35}S -methionine-cysteine and then incubated with *P. knowlesi* sporozoites. Four sporozoite binding proteins (35, 28, 18 and 14 kDa) of *An. dirus* were identified. These proteins bound to sporozoites prepared from mature oocysts but not to the sporozoites from salivary gland preparation. Three proteins (29, 18 and 15 kDa) from *An. freeborni* also bound to *P. knowlesi* sporozoites prepared from mature oocyst only. The sporozoite binding proteins were different for each mosquito species although the molecular sizes were similar. *An. freeborni* sporozoite binding proteins did not react with *An. dirus* salivary gland antibody, whereas *An. dirus* proteins did react. The biological function of both groups of sporozoite binding proteins needs to be further investigated. A key question to be answered is whether binding between salivary gland proteins and malaria sporozoites involve in salivary gland invasion by the sporozoites.