

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E41056



CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS
OF CATHEPSIN B OF THE LIVER FLUKE,
OPISTHORCHIS VIVERRINI

MISS JITTIYAWADEE SRIPA

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY

2011

600255521

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



**CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS
OF CATHEPSIN B OF THE LIVER FLUKE,
*OPISTHORCHIS VIVERRINI***



MISS JITTIYAWADEE SRIPA

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

2011

**CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS
OF CATHEPSIN B OF THE LIVER FLUKE,
*OPISTHORCHIS VIVERRINI***

MISS JITTIYAWADEE SRIPA

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2011



**THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY**

Thesis Title: Characterization and functional analysis of cathepsin B of the liver fluke, *Opisthorchis viverrini*

Author: Miss Jittiyawadee Sripa

Thesis Examination Committee

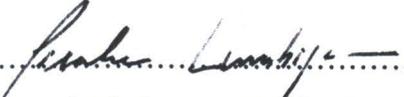
Assoc.Prof. Dr. Jitra Waikagul	Chairperson
Assoc.Prof. Dr. Thewarach Laha	Member
Assoc.Prof. Dr. Sasithorn Kaewkes	Member
Assoc.Prof. Dr. Paiboon Sithithaworn	Member

Thesis Advisors:


.....
(Assoc.Prof. Dr. Thewarach Laha) Advisor


.....
(Assoc.Prof. Dr. Sasithorn Kaewkes) Co-Advisor


.....
(Assoc.Prof. Dr. Lampang Manmart)
Dean, Graduate School


.....
(Prof. Pisake Lumbiganon)
Dean, Faculty of Medicine

จิตติยวดี ศรีภา. 2554. การศึกษาคุณลักษณะและการทำงานของยีนและเอนไซม์คาเทปซินบีของ พยาธิใบไม้ตับ ออพิสทอริคิส วิเวอรินิ วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ. ดร. เทวราช หล้าหา,
รศ. ดร. ศศิธร แก้วเกษ

บทคัดย่อ

E41056

โปรตีนเอสเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีน ซึ่งโปรตีนเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อหนอนพยาธิในการเจริญเติบโต พัฒนาการของตัวพยาธิเองและมีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันกับโฮสต์ คาเทปซินบีเป็นโปรตีนเอสในกลุ่ม Clan CA ซึ่งพบได้ทั้งในเซลล์และสารคัดหลั่งของหนอนพยาธิ คาเทปซินบีของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* พบมากในสารคัดหลั่ง โดยคาเทปซินบีมีบทบาทหน้าที่สำคัญในกระบวนการย่อยสารอาหารของพยาธิและเป็นโมเลกุลเป้าหมายสำหรับการพัฒนายากำจัดพยาธิและวัคซีนป้องกันโรคพยาธิ การศึกษาวิจัยนี้ทำการแยกและศึกษาคุณลักษณะของยีนคาเทปซินบีจาก *O. viverrini* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *O. viverrini* คาเทปซินบี-1 (*Ov-CB-1*) และ *O. viverrini* คาเทปซินบี-2 (*Ov-CB-2*) และผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากยีสต์ *Pichia pastoris* โดยใช้พลาสมิดชนิด pPIC ZQA เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในการเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ใช้เป็นแหล่งอาหารของพยาธิและการย่อยโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อโฮสต์ และใช้ RNA interference ในการตรวจสอบหน้าที่ของยีน รวมทั้ง พัฒนาเป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรค พัฒนาเป็นวัคซีน และศึกษาความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ยีน *Ov-CB-1* และ ยีน *Ov-CB-2* ถูกแยกสกัดจาก mRNA ด้วยวิธีโพลีเอเอสเซนรีเอกชันด้วยไพเมอร์จำเพาะ ยีน *Ov-CB-1* ประกอบด้วย 1,102 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 337 กรดอะมิโน ยีน *Ov-CB-2* ประกอบด้วย 1,053 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 313 กรดอะมิโน โดยลำดับกรดอะมิโนของ *Ov-CB-1* มี 16 กรดอะมิโนทางด้าน N-terminal เป็น signal peptide และมีตำแหน่ง N-link glycosylation 2 ตำแหน่งที่ กรดอะมิโนแอสปารากีนที่ 126 และ 226 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *Ov-CB-1* มีความคล้ายคลึงกับพยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* มากที่สุด และจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Ov-CB-1* ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีนในทุกระยะของพยาธิได้แก่ ระยะไข่ ระยะเมตาเซอร์คาเรีย พยาธิตัวอ่อนและตัวเต็มวัย

รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิด *Ov-CB-1* และ *Ov-CB-2* ถูกผลิตขึ้นโดยใช้พลาสมิดชนิด pPIC ZQA เข้าสู่ยีสต์ *Pichia pastoris* โดยมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 44 กิโลดาลตัน รีคอมบิแนนท์

E41056

โปรตีน *Ov*-CB-1 ถูกทดสอบหน้าที่ในการย่อยสารตั้งต้นสังเคราะห์และโปรตีนของโฮสต์ โดยสามารถย่อยสารตั้งต้นสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ได้ดีที่ pH 5.0 และรีคอมบิแนนท์โปรตีน *Ov*-CB-1 แสดงคุณสมบัติในการ trans-activating เอ็นไซม์คาเทปซินเอฟ (*Ov*-CF-1) ที่ pH 5.5 โดยการนำส่วน prosegment ของเอ็นไซม์ *Ov*-CF-1 ออกไป นอกจากนั้นพบว่า *Ov*-CB-1 ทำงานร่วมกับ *Ov*-CF-1 ในการย่อยโปรตีนของโฮสต์ ได้แก่ ฮีโมโกลบินที่ pH 5.0 ไฟโบรเนกติน และลามินิน ที่ pH 4.5 และ 6.5 *Ov*-CF-1 สามารถย่อยไฟโบรเนกตินและลามินินได้ดีกว่า *Ov*-CB-1 จึงสันนิษฐานว่า *Ov*-CB-1 ควบคุมการทำงานของ *Ov*-CF-1 และทั้งสองเอ็นไซม์ทำงานร่วมกันเพื่อย่อยเนื้อเยื่อของโฮสต์

ยีน *Ov*-CB-1 ถูกกวดการแสดงออกด้วยเทคนิค RNA interference โดยใช้วิธีเหนี่ยวนำ long double strand RNA ด้วยกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ตัวเต็มวัยของพยาธิ วิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงในการนำโมเลกุลขนาดเล็กเข้าไปในตัวพยาธิโดยการทดสอบการนำเข้าโมเลกุลของ Cy3-siRNA แล้วพบ signal ของ fluorescence ที่ทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์ของพยาธิ ยีน *Ov*-CB-1 ได้ถูกกวดการแสดงออกโดยใช้วิธีนี้เช่นกัน พบว่ามีการกวดการแสดงออกและการทำงานของยีนนี้ โดยมีการลดลงของ *Ov*-CB-1 activity เมื่อทดสอบกับ Z-Arg-Arg-AMC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะกับเอ็นไซม์คาเทปซินบี การค้นพบนี้ยืนยันการมี RNAi pathway ใน *O. viverrini* ในทางกลับกันสามารถใช้เทคนิคนี้ทดสอบการทำงานของยีนอื่นๆ ในพยาธิ *O. viverrini* ได้ด้วย

รีคอมบิแนนท์โปรตีน *Ov*-CB-1 ถูกทดสอบความสามารถในการเป็นแอนติเจนเพื่อใช้วินิจฉัยโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ในประชากรที่อาศัยอยู่ในแหล่งระบาด โดยใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) และโดยการวิเคราะห์แบบ ELISA และ immunoblot พบว่าซีรัมของผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีชนิด IgG ต่อ *Ov*-CB-1 ในปริมาณมาก โดยมีความไวของการตรวจวินิจฉัยเท่ากับ 67% และมีความจำเพาะเท่ากับ 81%

การทดสอบความสามารถของรีคอมบิแนนท์โปรตีน *Ov*-CB-1 เพื่อใช้เป็นวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ *O. viverrini* ในหนูแฮมสเตอร์โดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนังพบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน *Ov*-CB-1 สามารถกระตุ้นให้หนูแฮมสเตอร์สร้าง IgG ต่อ *O. viverrini* ได้ แต่ไม่มีคุณสมบัติในการสร้างภูมิต้านทานการติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ได้ โดยไม่สามารถลดจำนวนปรสิตที่ติดเชื้อและจำนวนไข่พยาธิหลังจากได้รับการกระตุ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีจำนวนปรสิตลดลง 18.08% อย่างไรก็ตาม รีคอมบิแนนท์โปรตีน *Ov*-CB-1 มีคุณสมบัติเป็น immunogen เนื่องจาก สามารถกระตุ้นให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นได้ตลอดระยะเวลาการติดเชื้อ นอกจากนั้นได้ทดสอบ รีคอมบิแนนท์โปรตีน *Ov*-CB-1 ว่ามีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในหลอดทดลองแต่ไม่พบว่ามีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ

Jittiyawadee Sripa. 2011. **Characterization and functional analysis of cathepsin B of the liver fluke, *Opisthorchis viverrini*.** Doctor of Philosophy Thesis in Parasitology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Thewarach Laha,
Assoc. Prof. Dr. Sasithorn Kaewkes

ABSTRACT

E41056

Proteases are the enzymes that have the ability to hydrolyze protein substrates, liberating peptide products. Proteases play essential roles in the developmental cycles of helminth parasites, including maintenance of the host-parasite relationship. Cathepsin B, a prototypical member of the Clan CA clade of cysteine proteases, is known to predominate in both extracts and secretions of many parasitic helminths. Cathepsin B has been characterized as a major participant in nutritional and digestion pathways in parasites, and moreover has been targeted for development of novel interventions against helminths including drugs and vaccines. In this study, cathepsin B of *Opisthorchis viverrini* was found to be present and indeed abundantly expressed in the excretory-secretory products released *in vitro* by *O. viverrini*. Two forms of the gene encoding cathepsin B of *O. viverrini* were isolated, characterized and designated *O. viverrini* cathepsin B1 (*Ov-CB-1*) and *O. viverrini* cathepsin B2 (*Ov-CB-2*). Recombinant forms of *O. viverrini* cathepsin B were produced in the yeast *Pichia pastoris* using the pPIC ZaA plasmid system. Recombinant cathepsin B of *O. viverrini* was investigated for enzyme activity and specificity using suitable host proteins as prospective substrates, and by RNA interference approaches. In addition, the potential application of recombinant *O. viverrini* cathepsin B in immunodiagnosis was evaluated. In addition, its potential as an experimental vaccine and in stimulation of bile duct cancer cells was investigated.

The full-length *Ov-CB-1* and *Ov-CB-2* transcripts were isolated from adult *O. viverrini* mRNA using the polymerase chain reaction with specific primers. *Ov-CB-1* comprised of 1,102 bp encoding 337 deduced amino acids and *Ov-CB-2* gene comprised of 1,053 bp encoding 313 deduced amino acids. The encoded protein of

E41056

Ov-CB-1 contained a 16-residue N-terminal signal peptide and two putative N-linked glycosylation sites at asparagine¹²⁶ and asparagine²²⁶. The amino acid sequence of *Ov*-CB-1 showed highest sequence identity with cathepsin B of closely related liver fluke species, *Clonorchis sinensis*. Investigation of transcription using RT-PCR revealed that *Ov*-CB-1 was expressed in all developmental stages of *O. viverrini* including egg, metacercaria, immature worm and adult.

Recombinant *Ov*-CB-1 and *Ov*-CB-2 were produced in *P. pastoris* transformed with recombinant pPIC ZaA vectors. Following isolation from the yeast fermentations by affinity chromatography, and analysis by denaturing SDS-PAGE, recombinant *Ov*-CB-1 and *Ov*-CB-2 both were found to migrate in gels as single major bands of ~44 kDa. Recombinant *Ov*-CB-1 (r*Ov*-CB-1) was examined their protease activity against synthetic substrates and host proteins. This r*Ov*-CB-1 can cleave substrates over a wide pH range with an optimum of pH 5.0. The r*Ov*-CB-1 also shows capability to trans-activating the *O. viverrini* cathepsin F (*Ov*-CF-1) by proteolytic removal of its prosegment at pH 5.5. Moreover, both *Ov*-CB-1 and *Ov*-CF-1 hydrolyzed human haemoglobin at pH 5.0, fibronectin and laminin at pH 4.5 and 6.5, respectively. However, *Ov*-CF-1 degraded fibronectin and laminin more effectively than *Ov*-CB-1. It is proposed that *Ov*-CB-1 regulates *Ov*-CF-1 activity and that both enzymes work together to degrade host tissues.

The expression of *Ov*-CB-1 gene was suppressed by using RNA interference with long double strand RNA introduced into the cultured liver flukes by square wave electroporation. This method shows high efficiency to introduce micromolecules of Cy3-siRNA, a fluorescently labeled small RNA probe, into worm; strong fluorescence was evident in the gut and reproductive organs of the Cy3-siRNA exposed parasites. RNAi also suppressed *Ov*-CB-1 activity, demonstrated by significant reduction in specific mRNA levels and a significant reduction of cathepsin B activity against the cathepsin B diagnostic peptide, Z-Arg-Arg-AMC. These findings confirmed the presence of an intact RNAi pathway in these parasites which, in turn, provides an opportunity to probe other gene functions in *O. viverrini*.

The r*Ov*-CB-1 was evaluated the performance as an antigen for immunodiagnosis of human opisthorchiasis using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) with human sera from an opisthorchiasis endemic area of Khon Kaen

E41056

province. Sera from egg-positive *O. viverrini* infections produced a strong IgG antibody response to rOv-CB-1 both in ELISA and immunoblot analysis. The sensitivity and specificity of the ELISA was 67% and 81%, respectively.

rOv-CB-1 was evaluated its ability as vaccine against *O. viverrini* infection in hamsters, using a subcutaneous vaccination. Vaccination elicited IgG antibody responses against *O. viverrini* infection but lack of protective ability against parasitic infection – there was a worm reduction of 18%, but this was not statistically significant. However, rOv-CB-1 was found to be highly immunogenicity in vaccinated hamsters, eliciting such strong humoral responses over the course of *O. viverrini* infection. Finally, the effect of rOv-CB-1 to stimulate mitosis and proliferation of a human biliary cancer cell line was investigated, but no significant of cell proliferation was observed.

Goodness portion of this thesis dedicated for my dear parents, sisters,
supervisor and entire teaching staffs for their encouragement and support.

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Thewarach Laha for his kindness in providing me a good opportunity to be his advisee. I am also grateful for valuable supervision, excellent planning, valuable suggestion, supporting, encouragement, guidance and entire criticism throughout the course of my study and thesis. I deepest appreciate the time he spared me during my work.

I would like to express my greatest appreciation and sincere gratitude to my co-advisor, Associate Professor Sasithorn Kaewkes for their encouragement, constructive comments, discussion and helpfulness throughout the course of study.

I would like to express my greatest appreciation and sincere gratitude to Associate Professor Banchob Sripa for his valuable suggestion, serving on the collection of specimens and permission to use the laboratory facilities.

I would like to express my greatest appreciation and sincere gratitude to my external examiners, Associate Professor Jitra Waikagul and Associate Professor Paiboon Sithithaworn for their useful comments and criticism for defenseless my thesis.

Appreciation are also express to all teaching staffs and the members of the Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand for their help and supporting this work.

Finally, I am very grateful to my dear parents and sisters for their love, pushing up, bring up, supporting, cheerfulness and encouragement not only in this study but also all of my life.

Jittiyawadee Sripa

TABLE OF THE CONTENTS

	Pages
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	vi
ACKNOWLEDGMENT	vii
TABLE OF CONTENTS	viii
LISTS OF TABLES	xii
LISTS OF FIGURES	xiii
LISTS OF ABBREVIATIONS	xvi
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Rational and background	1
1.2 Objectives of the study	4
CHAPTER II Isolation and characterization of cathepsin B of <i>Opisthorchis viverrini</i> , and its roles in food catabolism	
2.1 Introduction	5
2.2 Materials and methods	6
2.2.1 Materials	6
2.2.2 <i>O. viverrini</i> RNA extraction and RT-PCR	7
2.2.3 Expression and purification of recombinant <i>O. viverrini</i> peptidases in yeast	8
2.2.4 Autocatalytic processing and activation of <i>Ov</i> -CB-1 and <i>Ov</i> -CF-1	8
2.2.5 Enzyme assays with fluorogenic peptide substrates	10
2.2.6 Preparation of red blood cell lysates and Hb digestion assays	10
2.2.7 Analysis of Hb hydrolysis by nanoLC-ESI-MS/MS	11
2.2.8 Digestion of ECM proteins by <i>Ov</i> -CB-1 and <i>Ov</i> -CF-1	11

TABLE OF THE CONTENTS (Cont.)

	Pages	
2.3	Results	12
2.3.1	Autocatalytic activation of <i>Ov</i> -CF-1	12
2.3.2	Characterization and expression of the <i>Ov</i> -CB-1 and <i>Ov</i> -CB-2 transcripts	14
2.3.3	The unprocessed <i>Ov</i> -CB-1 zymogen exhibits full enzymatic activity	16
2.3.4	<i>Ov</i> -CF-1 is trans-processed and activated by <i>Ov</i> -CB-1	18
2.3.5	<i>Ov</i> -CF-1 and <i>Ov</i> -CB-1 can work in concert to hydrolyse Hb at low pH	21
2.3.6	<i>Ov</i> -CB-1 and <i>Ov</i> -CF-1 cleavage sites within Hb indicate different substrate specificities	23
2.3.7	Differential degradation of ECM proteins by <i>Ov</i> -CB-1 and <i>Ov</i> -CF-1	24
2.4	Discussion	25
CHAPTER III	Functional analysis of <i>Opisthorchis viverrini</i> cathepsin B using RNA interference	
3.1	Introduction	33
3.2	Materials and Methods	34
3.2.1	Adult of <i>O. viverrini</i> and cultivation	34
3.2.2	Synthesis of <i>O. viverrini</i> cathepsin B dsRNA	35
3.2.3	Electroporation of dsRNA and siRNA	35
3.2.4	RNA extraction and reverse-transcription PCR	36
3.2.5	Determination of cathepsin B activity	37
3.3	Results	38
3.3.1	Transduction of <i>Opisthorchis viverrini</i> with siRNA by square wave electroporation	38

TABLE OF THE CONTENTS (Cont.)

	Pages
3.3.2 Double stranded RNA suppresses transcription of <i>O. viverrini</i> cathepsin B	38
3.3.3 Robust knockdown of cathepsin B enzyme activity	42
3.4 Discussion	43
CHAPTER IV Evaluation of recombinant <i>Opisthorchis viverrini</i> cathepsin B-1 protease as a serodiagnostic antigen for human opisthorchiasis	
4.1 Introduction	46
4.2 Materials and methods	47
4.2.1 Source of serum samples	47
4.2.2 Production of recombinant <i>O. viverrini</i> cathepsin B1	48
4.2.3 SDS-PAGE and immunoblotting	48
4.2.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	49
4.2.5 Statistical analysis	49
4.3 Results	50
4.3.1 Sera from opisthorchiasis subjects recognized recombinant <i>Ov</i> -CB-1	50
4.3.2 Efficacy of r <i>Ov</i> -CB-1 as an immunodiagnostic tool	51
4.4 Discussion	54
CHAPTER V Evaluation of recombinant cathepsin B-1 as vaccine antigen against <i>Opisthorchis viverrini</i> infection and effect on human cancer cell proliferation	
5.1 Introduction	55
5.2 Materials and methods	57
5.2.1 Evaluation of recombinant <i>O. viverrini</i> cathepsin B as a vaccine against <i>O. viverrini</i> infection in hamster	57
5.2.1.1 Animals	57
5.2.1.2 Antigen preparation	57

TABLE OF THE CONTENTS (Cont.)

	Pages
5.2.1.3 Vaccination	57
5.2.1.4 Determination of egg counts and worm recoveries	58
5.2.1.5 Detection of hamster antibody response by ELISA	58
5.2.1.6 Statistic analysis	59
5.2.2 Human cancer cell lines and cell proliferation assay	59
5.3 Results	60
5.3.1 Evaluation of recombinant <i>O. viverrini</i> cathepsin B as a vaccine against <i>O. viverrini</i> infection in hamster	60
5.3.1.1 IgG levels against rOv-CB-1 and crude metacercarial extracts in hamster	60
5.3.1.2 Reduction of worm burden and egg production in vaccination hamster	61
5.3.2 Influence of liver fluke cathepsin B in proliferation of a human cholangiocarcinoma cell line	65
5.4 Discussion	67
CHAPTER VI General discussions	69
CHAPTER VII Conclusions	73
REFERENCES	74
APPENDICES	88
VITAE	103

LIST OF TABLES

	Pages
Table 4.1 Comparison of the <i>Ov</i> -CB-1 ELISA with fecal examination using formalin-ethyl acetate concentration technique (FECT) as the gold standard method for diagnosis of opisthorchosis in 145 human sera	53
Table 5.1 Details of vaccination and protection against <i>O. viverrini</i> in hamsters vaccinated with r <i>Ov</i> -CB-1, metacercarial extract and DI water	64

LIST OF FIGURES

		Pages
Figure 2.1	Auto-activation of <i>Ov</i> -CF-1 at pH 4.5	13
Figure 2.2	RT-PCR analysis of <i>Ov</i> -CB-1, <i>Ov</i> -CB-2 and <i>Ov</i> -CF-1 transcripts	15
Figure 2.3	<i>Ov</i> -CB-1 is expressed as an active zymogen	17
Figure 2.4	Activity of <i>Ov</i> -CB-1 and <i>Ov</i> -CF-1 against a panel of diagnostic fluorescent peptides	18
Figure 2.5	Exogenous activation of <i>Ov</i> -CF-1 by <i>Ov</i> -CB-1	20
Figure 2.6	Hydrolysis of human haemoglobin (Hb) by <i>Ov</i> -CB-1 and <i>Ov</i> -CF-1 and analysis of digests by nanoLC-ESI-MS/MS	22
Figure 2.7	P2 residues in peptides released from Hb following digestion by <i>Ov</i> -CB-1 and <i>Ov</i> -CF-1 were determined by nanoLC-ESI-MS/MS analysis of digest samples	24
Figure 2.8	Digestion of extracellular matrix proteins by <i>Ov</i> -CB-1 and <i>Ov</i> -CF-1	25
Figure 2.9	Proposal for a three-step mechanism of cathepsin F trans-activation in <i>O. viverrini</i>	30
Figure 3.1	<i>Opisthorchis viverrini</i> flukes transduced by square wave electroporation with fluorescent, control Cy3-Silencer siRNA	39
Figure 3.2	Specific silencing of expression of the cathepsin B1 gene, <i>Ov</i> -CB-1 of <i>Opisthorchis viverrini</i> by dsRNA	41
Figure 3.3	Suppression of cathepsin B activity in <i>Opisthorchis viverrini</i> flukes by treatment with dsRNA specific for <i>Ov</i> -CB-1	43
Figure 4.1	Human opisthorchiasis sera react with recombinant <i>Ov</i> -CB-1	50
Figure 4.2	Performance of recombinant <i>Ov</i> -CB-1 as a serodiagnostic antigen	52

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Pages	
Figure 5.1	IgG level against rOv-CB-1 (A) and metacercarial extract (B) in hamster after vaccination with different antigens	61
Figure 5.2	Quantitative fecal egg counts of feces from experimental hamsters that vaccination with rOv-CB-1, metacercarial and DI water	63
Figure 5.3	Effect of rOv-CB-1, <i>O. viverrini</i> crude somatic extract (OvSomatic) and excretory-secretory product (OvES) at 1, 5 and 10 ug/ml on KKU-M156 proliferation	66

LIST OF ABBREVIATIONS

λ	lambda
°C	degree Celcius
uM	micromolar
ug	microgram
ul	microlitre
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine serum albumin
bp	base pair
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidine
dsRNA	double strand ribonucleic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid
ESTs	Expressed sequence tags
EtBr	Ethidium bromide
FBS	Fetal bovine serum
Fwd	Forward
h	hour
IgG	Immunoglobulin G
IgE	Immunoglobulin E
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB agar	Luria-Bertani agar
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry
LC-MS-MS	Liquid chromatography mass spectrometry mass spectrometry
min	minute

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
ms	Millisecond
mM	millimolar
MW	Molecular Weight
N	Normal
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
nt	Nucleotide
nm	nanometer
OD	Optical density
ORFs	Open Reading Frames
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBST	Phosphate-Buffered Saline Tween
qRT-PCR	Quantitative Reversal Transcription-Polymerase Chain Reaction
Rev	Reverse
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis
sec	Second
siRNA	Small Inhibitory Ribonucleic Acid
TEMED	Tetramethylethylenediamine
U	Unit
V	Volt