

**MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF TWO NOVEL
GENES ENCODING ASPARAGINYL ENDOPEPTIDASE (LEGUMAIN) IN
*FASCIOLA GIGANTICA***

POOM ADISAKWATTANA

Ph.D. (BIOMEDICAL SCIENCES)

MAJOR IN MOLECULAR IMMUNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

THESIS ADVISOR: VITHOON VIYANANT, Ph.D., HANS RUDI GRAMS,
DR.RER.NAT., WANPEN CHAICUMPA, D.V.M. (Hons.), Ph.D., SUKSIRI VICHASRI-GRAMS,
DR.RER.NAT., ANNEMARIE HOFMANN, DR.RER.NAT.

ABSTRACT

Asparaginyl endopeptidases or legumains have been described from plants, mammals, and also the trematodes *Schistosoma* and *Fasciola*. Several studies including vaccine trials, inhibition assay and trans-activation assay implicate that the legumains may be involved in the evasion of host immunity, nutrition uptake and are essential for parasite survival. In this study, the full-length cDNAs encoding the *F. gigantica* legumain 1 (FgLGMN-1) and legumain 2 (FgLGMN-2) were cloned from an adult stage cDNA library of *F. gigantica*. The deduced amino acid sequences of FgLGMN-1 and FgLGMN-2 showed 50% and 42% identity to the described *F. hepatica* legumain (FhLGMN) sequence, respectively. The two legumains showed 47% identity and a multiple alignment of orthologs exhibited that specific active residues are in the order His, Cys in the protein sequences that is a specific character of the C13 family (LGMN, GPI-transamidase). Southern analysis confirmed that LGMN-1 and LGMN-2 encoded by a genes family in the genome of *F. gigantica*. Northern analysis and stage-specific RT-PCR of total RNA showed that FgLGMN-1 and FgLGMN-2 transcriptional products are present in all of the analyzed developmental stages (metacercariae, juveniles and adults). RNA *in situ* hybridization revealed that FgLGMN-1 and FgLGMN-2 are specifically expressed in the gastrodermal epithelium of juveniles and adults. Recombinant FgLGMN-1 and -2 were expressed in *E. coli* at molecular sizes of 49 and 47 kDa, respectively and

purified by Ni-NTA affinity chromatography. Rabbit anti-rFgLGMN polyclonal sera detected native proteins in crude worm extract but not in excretory-secretory products at molecular sizes of 40 kDa for FgLGMN-1 and 30 kDa for FgLGMN-2 and showed no N-glycosylation. Western analysis determined the presence of specific antibodies 4 weeks after infection. The immunolocalization of 4-week juvenile and adult parasites showed that FgLGMN-1 and -2 proteins were localized in the gastrodermal epithelial cells which was consistent with RNA-*in situ* hybridization. The rFgLGMNs showed autocatalytic processing in acidic conditions and were inhibited at neutral pH but enzyme activity could not be detected. However, legumain activity could be detected in crude worm extracts which confirmed the presence of legumains in *F. gigantica* and the activity of legumain was inhibited by a cysteine protease inhibitor. These studies elucidate the molecular characteristics and biological functions of LGMNs in *F. gigantica* and may provide useful information on their use as vaccines against fasciolosis in domestic livestock.

KEY WORDS: *Fasciola gigantica*, legumains, Southern analysis, Northern analysis, *in situ* hybridization, immunolocalization, stage-specific expression, autocatalytic processing

การใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อโคลนหายีนนำรหัสในการสังเคราะห์โปรตีนชนิด
แอสพารายินิลเอ็นโดเปปติเดสหรือเล็กกูเมนของพยาธิใบไม้ในตับชนิดฟาซิโอลา
แอกติกาและศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวัคซีน
ป้องกันโรคฟาซิโอลิซิสในปศุสัตว์

นายภูมิ อุดศักดิ์วัฒนา

ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์)

สาขาวิชาหลักวิทยาศาสตร์ภูมิคุ้มกันและชีววิทยาระดับโมเลกุล

คณะกรรมการควบคุมสารนิพนธ์: ศ.ดร.วิฑูรย์ ไวยนันท์, ดร.ฮานส์ รูดี้ กรามส์,
ศ.ดร.วันเพ็ญ ชัยคำพา, ผศ.ดร.สุขศิริ วิชาศิริ กรามส์, ดร.แอนนิมารี ฮอฟแมนน์

บทคัดย่อ

แอสพารายินิลเอ็นโดเปปติเดสหรือเล็กกูเมนเป็นเอ็นไซม์ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ซีสเตอิน โปรติเอส จากการศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดพบว่าเอ็นไซม์ดังกล่าวน่าจะมีความสำคัญในการดำรงชีวิต การศึกษาเพื่อค้นหายีนนำรหัสในการสังเคราะห์โปรตีนชนิดเล็กกูเมนจากคลังคอมพลิเมนทารีดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้ในตับชนิดฟาซิโอลาแอกติกาพบเล็กกูเมนสองยีนซึ่งมีอนุমানลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกัน 47% และทั้งสองยีนคล้ายคลึงกับเล็กกูเมนของพยาธิใบไม้ในตับวงศ์ไกล์ซิเดชันฟาซิโอลาฮปาติกา 50% และ 42% ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบอนุমানลำดับกรดอะมิโนของเล็กกูเมนในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดพบว่าเล็กกูเมนทั้งสองชนิดของพยาธิฟาซิโอลาแอกติกาประกอบไปด้วยลำดับกรดอะมิโนฮิสติดีนและซีสเตอินในบริเวณที่สำคัญในการย่อยสลายโปรตีนของเอ็นไซม์ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเอ็นไซม์ในวงศ์ C13 การศึกษาคุณลักษณะของกรดนิวคลีอิกพบว่าเล็กกูเมนประกอบด้วยหลายยีนซึ่งนำรหัสในการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่ใกล้เคียงกันและแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอสามารถพบได้ในทุกระยะของพัฒนาการตั้งแต่เมตาเซอร์คาเรีย(ระยะติดเชื้อ) ไปถึงตัวเต็มวัยโดยจะสังเคราะห์เฉพาะในลำไส้เท่านั้น ริคอมบิแนนท์โปรตีนผลิตจากแบคทีเรียโดยเทคนิคการตัดต่อพันธุกรรมมีขนาดโมเลกุล 49 กิโลดาลตันและ 47 กิโลดาลตันและซีรัมจากกระต่ายซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วยริคอมบิแนนท์เล็กกูเมนชนิดที่หนึ่งสามารถทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันกับโปรตีนจากพยาธิตัวเต็มวัยที่ขนาดโมเลกุล 40 กิโลดาลตันและซีรัมจากการกระตุ้นด้วยริคอมบิแนนท์เล็กกูเมนชนิดที่สองที่ขนาดโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน จากการศึกษาเล็กกูเมนในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวอ่อนและตัวเต็มวัยพบว่าเอ็นไซม์เล็กกูเมนผลิตในลำไส้ของพยาธิเท่านั้น ผลการศึกษาทางภูมิคุ้มกันวิทยาในสัตว์ที่ติดเชื้อให้ผลบวกกับริคอมบิแนนท์เล็กกูเมนทั้ง

สองชนิดซึ่งให้ผลตั้งแต่สี่สัปดาห์ขึ้นไป การศึกษาความสามารถในการทำงานของรีคอมบิแนนท์เล็ก
กูเมนพบว่าเล็กกูเมนกระตุ้นตัวเองได้ในสถานะที่เป็นกรดแต่ยับยั้งในสถานะที่เป็นกลาง อย่างไรก็ตาม
ตามการทดสอบหน้าที่ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โดยการย่อยเปปไทด์ยับยั้งเสตรทให้ผลลบในขณะที่
โปรตีนที่สกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยสามารถย่อยสลายยับยั้งเสตรทที่จำเพาะต่อเล็กกูเมนและถูกยับยั้งด้วย
สารยับยั้งซีสเทอีนโปรติเอส จากการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาแล้วนั้นทำให้เข้าใจถึงคุณลักษณะ
คุณสมบัติและหน้าที่เบื้องต้นตลอดจนความสำคัญของเล็กกูเมนในพยาธิใบไม้ในตับชนิดฟาซซิโ
โรคฟาซซิโโลซิสีในปลุสัตว์ต่อไปในอนาคต