

**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

**การใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อโคลนหาอินนาร์หัสในการสังเคราะห์โปรตีนชนิด
แอสพารายินิลเอ็นโดเปปติเดสหรือเล็ทกูเมนของพยาธิใบไม้ในตับชนิดฟาสซิโอลา
แอกติกาและศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวัคซีน
ป้องกันโรคฟาสซิโอลิซิสในปศุสัตว์**

นายภูมิ อุดศักดิ์วัฒนา

ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์)

สาขาวิชาหลักวิทยาศาสตร์ภูมิคุ้มกันและชีววิทยาระดับโมเลกุล

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

บทคัดย่อ

แอสพารายินิลเอ็นโดเปปติเดสหรือเล็ทกูเมนเป็นเอนไซม์ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ซีสเตอิน โปรติเอส จากการศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวน่าจะมีความสำคัญในการดำรงชีวิต การศึกษาเพื่อค้นหาอินนาร์หัสในการสังเคราะห์โปรตีนชนิดเล็ทกูเมนจากคลั่งคอมพลิเมนทาร์ติเอ็นของพยาธิใบไม้ในตับชนิดฟาสซิโอลาแอกติกาพบเล็ทกูเมนสองยีนซึ่งมีอนุমানลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกัน 47% และทั้งสองยีนคล้ายคลึงกับเล็ทกูเมนของพยาธิใบไม้ในตับวงศ์ไกล์ซีดชนิดฟาสซิโอลาเฮปาติกา 50% และ 42% ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบอนุমানลำดับกรดอะมิโนของเล็ทกูเมนในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดพบว่าเล็ทกูเมนทั้งสองชนิดของพยาธิฟาสซิโอลาแอกติกาประกอบไปด้วยลำดับกรดอะมิโนฮิสติดีนและซีสเตอินในบริเวณที่สำคัญในการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเอนไซม์ในวงศ์ C13 การศึกษาคุณลักษณะของกรดนิวคลีอิกพบว่าเล็ทกูเมนประกอบด้วยหลายยีนซึ่งนาร์หัสในการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่ใกล้เคียงกันและแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอสามารถพบได้ในทุกระยะของพัฒนาการตั้งแต่เมตาเซอรคาเรีย(ระยะติดเชื้อ)ไปถึงตัวเต็มวัยโดยจะสังเคราะห์เฉพาะในลำไส้เท่านั้น รีคอมบิแนนท์โปรตีนผลิตจากแบคทีเรียโดยเทคนิคการตัดต่อพันธุกรรมมีขนาดโมเลกุล 49 กิโลดาลตันและ 47 กิโลดาลตันและซีรัมจากกระต่ายซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์เล็ทกูเมนชนิดที่หนึ่งสามารถทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันกับโปรตีนจากพยาธิตัวเต็มวัยที่ขนาดโมเลกุล 40 กิโลดาลตันและซีรัมจากการกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์เล็ทกูเมนชนิดที่สองที่ขนาดโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน จากการศึกษาเล็ทกูเมนในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวอ่อนและตัวเต็มวัยพบว่าเอนไซม์เล็ทกูเมนผลิตในลำไส้ของพยาธิเท่านั้น ผลการศึกษาทางภูมิคุ้มกันวิทยาในสัตว์ที่ติดเชื้อให้ผลบวกกับรีคอมบิแนนท์เล็ทกูเมนทั้ง

สองชนิดซึ่งให้ผลตั้งแต่สี่สัปดาห์ขึ้นไป การศึกษาความสามารถในการทำงานของรีคอมบิแนนท์เล็ก
 ภูเมนพบว่าเล็กภูเมนกระตุ้นตัวเองได้ในสถานะที่เป็นกรดแต่ยับยั้งในสถานะที่เป็นกลาง อย่างไรก็ตาม
 ตามการทดสอบหน้าที่ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โดยการย่อยเปปไทด์ยับยั้งเซลล์ให้ผลลบในขณะที่
 โปรตีนที่สกัดจากพาริตัวเต็มวัยสามารถย่อยสลายยับยั้งเซลล์ที่จำเพาะต่อเล็กภูเมนและถูกยับยั้งด้วย
 สารยับยั้งซีสเทอีนโปรติเอส จากการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาแล้วนั้นทำให้เข้าใจถึงคุณลักษณะ
 คุณสมบัติและหน้าที่เบื้องต้นตลอดจนความสำคัญของเล็กภูเมนในพาริไบไม์ในดับชนิดฟาสซิโอ
 ลาไมแคนติกาซึ่งน่าจะเป็นแนวทางอันก่อให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกัน
 โรคฟาสซิโอโลซิสในปศุสัตว์ต่อไปในอนาคต