

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BRG5580006

ชื่อโครงการ : การใช้โปรตีนอะควอพอรินจากพยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrini* และ *Fasciola gigantica* สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีในโรคติดเชื้อพยาธิตัวแบน

หัวหน้าโครงการวิจัย : รศ. ดร. ฮานส์ รูดี กรามส์

นักวิจัยที่ร่วมมือชาวต่างชาติ :

1. Prof. Eric Beitz

หน่วยงาน Pharmazeutisches Institut มหาวิทยาลัย Christian-Albrechts-Universität เมือง Kiel ประเทศเยอรมนี

2. Prof. Andrea Yool

หน่วยงาน School of Medical Sciences มหาวิทยาลัย The University of Adelaide เมือง Adelaide ประเทศออสเตรเลีย

บทนำ อะควอพอรินเป็นโปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่ในการเป็นช่องทางผ่านของน้ำ กลีเซอรอล ยูเรีย และสารละลายอื่นๆ ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช สัตว์ และแบคทีเรีย ที่สำคัญไปกว่านั้นการยับยั้งอะควอพอรินในพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mansoni* เป็นสาเหตุที่ทำให้พยาธิดังกล่าวมีอัตราการตายที่สูงขึ้นจากการวิจัยพบว่าโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิใบไม้เลือดนี้เป็นช่องทางผ่านสำหรับของเสียชนิดแลคเตท ซึ่งเมื่อถูกยับยั้งทำให้เกิดสภาวะความกรดในร่างกายของพยาธิซึ่งเป็นสาเหตุการตายในที่สุด จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิใบไม้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น drug target สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อพยาธิ ในประเทศไทยพยาธิใบไม้ตับคน *Opisthorchis viverrini* เป็นพยาธิที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ด้วยอัตราการติดเชื้อที่สูงในเขตชนบท การติดเชื้อระยะยาวมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี โดยถูกกระตุ้นจากกระบวนการอักเสบของท่อน้ำดีอันเนื่องมาจากแอนติเจนที่ถูกปล่อยมาจากตัวพยาธิ อีกปัจจัยที่กระตุ้นการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีคือการใช้ยา Praziquantel ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับคน ในงานปศุสัตว์พยาธิใบไม้ตับอีกชนิดหนึ่ง *Fasciola gigantica* เป็นสาเหตุของการสูญเสียทางเศรษฐกิจของเกษตรกร และพบว่าพยาธิชนิดนี้ยังดื้อต่อยาที่ใช้รักษา Triclabendazole อีกด้วย โปรตีนอะควอพอรินของพยาธิจึงน่าสนใจที่จะทำการศึกษา เนื่องมาจากลำดับของกรดอะมิโนมีความอนุรักษ์ (conservation) ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับโปรตีนอะควอพอรินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในโครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาโปรตีนอะควอพอรินทั้งหมดในพยาธิใบไม้ตับทั้งสองชนิดนี้ เพื่อวิเคราะห์ถึงคุณสมบัติขั้นพื้นฐานทางชีวเคมี และหน้าที่ทางชีววิทยาในการเป็นเป้าหมายของยาที่จะใช้รักษาโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้

ระเบียบวิธีวิจัย ซีดีเอ็นเอของบริเวณที่ถอดรหัสไปเป็นโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิตัวตืด *Fasciola gigantica* และ *Opisthorchis viverrini* ถูกเพิ่มจำนวนและแยกออกมาด้วยวิธี RT-PCR จากอาร์เอ็นเอของพยาธิตัวตืดทั้งสองในระยะตัวเต็มวัย แล้วถูกเชื่อมต่อกับเวกเตอร์เพื่อนำไปตรวจสอบหาลำดับดีเอ็นเอที่ได้ เปปไทด์สังเคราะห์บริเวณ C-terminus ถูกเลือกเพื่อนำไปเป็นแอนติเจนสำหรับผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนอะควอพอรินที่ได้ในหนูทดลอง ซีรัมที่ได้ในหนูทดลองนำมาทดสอบกับโปรตีนสกัดของพยาธิตัวตืดและเนื้อเยื่อของพยาธิตัวตืดด้วยวิธี immunoblot และ immunohistochemistry ตามลำดับ การวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินถูกทดสอบโดย (1) การบวมของไข่ของ *Xenopus* หลังการฉีดเอ็มอาร์เอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการแปลรหัสไปเป็นโปรตีนอะควอพอริน (2) การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของยีสต์ด้วยพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสำหรับถอดรหัสไปเป็นโปรตีนอะควอพอริน นอกจากนี้ยังวิเคราะห์หาที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนอะควอพอริน โดยสารประกอบ AqB ที่มีผลยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะควอพอรินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถูกนำมาทดสอบกับโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิตัวตืดทั้งสองในไข่ของ *Xenopus*

ผลการทดลอง โปรตีนอะควอพอริน 2 ไอโซฟอร์มจากพยาธิตัวตืด *Fasciola gigantica* (FgAQP-3 และ FgAQP-4) และ 3 ไอโซฟอร์มจากพยาธิตัวตืด *Opisthorchis viverrini* (OvAQP-1, OvAQP-2, OvAQP-3) ถูกโคลนได้สำเร็จ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนอะควอพอรินทั้ง 5 ไอโซฟอร์ม ถูกผลิตและนำมาทดสอบกับโปรตีนอะควอพอรินที่อยู่ในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวตืดโดยพบว่าโปรตีนอะควอพอรินถูกสร้างในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวตืดอย่างจำเพาะ การทดสอบการบวมของไข่ของ *Xenopus* เพื่อทดสอบความสามารถในการเป็นช่องทางผ่านของน้ำ ยูเรีย และกลีเซอรอล พบว่าให้ผลเป็นลบในโปรตีนอะควอพอริน FgAQP-3 และ FgAQP-4 แต่ให้ผลเป็นบวกใน OvAQP-1, OvAQP-2, OvAQP-3 การทดสอบลักษณะของยีสต์เพื่อดูการเป็นช่องทางผ่านของแอมโมเนียและเมทิลลามีน พบว่าให้ผลเป็นบวกใน FgAQP-3 และ OvAQP1-3 แต่ให้ผลเป็นลบใน FgAQP-4 และจากการทดสอบการยับยั้งโปรตีนอะควอพอริน OvAQP1-3 ด้วยสารประกอบ AqB จำนวน 13 ชนิด พบว่า สารประกอบ AqB 011 มีความเป็นไปได้ที่จะยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะควอพอรินได้ โดย AqB จำนวน 12 ชนิดที่เหลือให้ผลการทดสอบเป็นลบ

สรุป โปรตีนอะควอพอรินทั้งหมดที่ทำการศึกษามีความสำคัญในการควบคุมการผ่านเข้าออกของน้ำในเซลล์ของพยาธิตัวตืด การกำจัดของเสียชนิดแลคเตทและอะซิเตทของพยาธิตัวตืดผ่านโปรตีนอะควอพอรินควรจะต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติดังกล่าว การขัดขวางช่องทางผ่านของโปรตีนอะควอพอรินประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดีดังที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้

ข้อจำกัด ด้วยการสร้างโปรตีนอะควอพอริน FgAQP-3 และ FgAQP-4 ในไข่ของ *Xenopus* อยู่ในระดับต่ำและไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ผลการทดลอง ซึ่งข้อจำกัดนี้เป็นที่ทราบกันดีเกี่ยวกับการสร้างโปรตีนที่เป็น heterologous อันเนื่องมาจากเซลล์เจ้าบ้านไม่สามารถผลิตสารตั้งต้นในการสร้างโปรตีนได้อย่างเพียงพอ อีกทั้งการทดลองนี้ต้องอาศัยทรัพยากรของนักวิจัยที่ร่วมมือชาวต่างชาติ ระยะเวลาที่สามารถดำเนินการทดสอบนี้ค่อนข้างน้อย (ได้รับทุนสนับสนุนจาก DAAD เพื่อทำวิจัยในเยอรมนี ระยะเวลา 3 เดือน, และทุนสนับสนุนจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เพื่อทำวิจัยในออสเตรเลีย ระยะเวลา 1 เดือน) ทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบซ้ำได้ในระยะเวลาอันจำกัดนี้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ไม่มีข้อมูลที่เพียงพอในการตีพิมพ์ผลงานวิจัยเพิ่มเติมได้

คำหลัก : พยาธิใบไม้, ฟาสซิโอลา ไจแกนติกา, โอพิสทโรคิส วิเวอรินี่, อะควอพอริน

Abstract

Project code: BRG5580006

Project title: Targeting AQPs in *Opisthorchis viverrini* and *Fasciola gigantica* for chemical intervention in food-borne trematodiasis

Principle investigator: Assoc. Prof. Dr. Hans Rudi Grams

Graduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

International collaborators:

1. Prof. Eric Beitz

Pharmazeutisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany

2. Prof. Andrea Yool

School of Medical Sciences, The University of Adelaide, Australia

Introduction: Aquaporins (AQPs) are pore-forming transmembrane proteins that conduct water, glycerol, urea and other solutes across cell membranes in plants animals and bacteria. Significantly, the inhibition of a single aquaglyceroporin in the blood fluke *Schistosoma mansoni* caused high parasite mortality. This *Schistosoma* protein was shown to passage the metabolite waste product lactate which, if not continuously excreted, would quickly lead to acidification and parasite death. As such trematode aquaporins have potential as drug targets for chemotherapy of trematodiasis. In Thailand, the human liver fluke *Opisthorchis viverrini* is a major parasite endemic in the north and northeast with high infection rates found in the rural population. Long lasting infections have been connected with the development of cholangiocarcinoma induced by chronic inflammation of biliary tracts due to antigens released by the parasite. A self-inflicted agent promoting tumor formation is Praziquantel, the drug of choice to destroy the parasite which too has been demonstrated to stimulate inflammation. In livestock, the tropical liver fluke *Fasciola gigantica* causes severe economic damage to farmers and resistance to the drug Triclabendazole, which is used to clear the infection, has been reported. Parasite aquaporins are interesting targets as they show low sequence conservation to their mammalian homologs and in this research we attempted to investigate the complete set of AQPs in the afore-mentioned liver fluke species for their basic biochemical properties, possible biological roles and as target for drug intervention in their respective trematodiasis.

Experimental Design: *Fasciola* and *Opisthorchis* AQP encoding cDNAs were isolated by RT-PCR from adult stage parasite RNA, cloned into standard vectors and had their molecular sequences determined. Synthetic peptides selected from the C-terminal intracellular regions of these AQPs were used to produce anti-AQP antisera in mice. Antisera were used for immunoblot and immunohistochemical detection of these AQPs in parasite antigen extracts and tissue sections, respectively. Functional AQP analyses were performed by using (1) *Xenopus* oocyte swelling assays with injected *in vitro*-synthesized AQP mRNA and (2) transformed mutant yeast cells carrying recombinant expression plasmids with the introduced AQP DNAs. Pharmaceutical intervention in the function of the trematode AQPs was tested with specific blocking compounds (AqBs) that had shown promising results with mammalian AQPs. The AqBs were tested in *Xenopus* oocyte swelling assays.

Results: Two *Fasciola* (FgAQP-3, FgAQP-4) and three *Opisthorchis* AQPs (OvAQP-1, OvAQP-2, OvAQP-3) were successfully molecular cloned. Specific antisera could be produced against all five AQPs. The antisera confirmed the tegumental location of the AQPs and revealed their tissue-specific localization. Oocyte swelling assays for water, urea and glycerol were negative for FgAQP-3 and FgAQP-4 but positive for all OvAQPs. Yeast-based assays for ammonia and methylamine were positive for FgAQP-3 and all OvAQPs while FgAQP-4 was negative. Blocking assays for OvAQP-1, OvAQP-2, OvAQP-3 in the *Xenopus* oocyte system with 13 AqBs showed promising results for compound AqB 011 while the remaining twelve AqBs were negative.

Conclusions: The investigated AQPs have important functions beyond regulation of water influx/efflux in parasite cells. Disposal of lactate/acetate waste through trematode AQPs will be an essential property that needs further investigation. Blocking of AQP channel is achievable as shown by limited blocking assays.

Limitations: It was not possible to express FgAQP-3 and FgAQP-4 in sufficiently large amounts in *Xenopus* oocytes to obtain results. This is a known limitation of heterologous expression which is not always working because the host does not provide full support for proper expression in each and every case. The major downside of this study was the very limited timeframe to do essential functional assays in the collaborating foreign laboratories. Funds received from DAAD, Germany allowed a three-month research visit to Germany and funds received from Thammasat University, Faculty of Allied Health Sciences allowed a one-month research visit to Australia. Both visits would each have needed a six-month period to conduct and repeat experiments to obtain enough data for additional publications.

Keywords: Trematoda, *Fasciola gigantica*, *Opisthorchis viverrini*, aquaporin