



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้โปรตีนอะควอพอรินจากพยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrini* และ *Fasciola gigantica* สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีในโรคติดต่อพยาธิตัวแบน

Targeting AQP_s in *Opisthorchis viverrini* and *Fasciola gigantica* for chemical intervention in food-borne trematodiasis

โดย รศ. ดร. ฮานส์ รุดี กรามส์ และคณะ
[คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์]

มิถุนายน 2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้โปรตีนอะควอพอรินจากพยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrini* และ *Fasciola gigantica* สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีในโรคติดต่อพยาธิตัวแบน

Targeting AQP_s in *Opisthorchis viverrini* and *Fasciola gigantica* for chemical intervention in food-borne trematodiasis

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. ฮานส์ รูดี กรามส์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
2. ผศ. ดร. อมรรัตน์ เกิดแก้ว เคริ่นซ์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

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

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

OBJECTIVES

- 1) Production of antisera against the putative aquaglyceroporins FgAQP-3 and FgAQP-4 of *Fasciola gigantica*.
- 2) Application of these antisera for immunodetection of FgAQP-3 and FgAQP-4 in parasite protein extracts and tissue sections.
- 3) Determination of temporal expression of FgAQP-3 and FgAQP-4 by reverse transcription PCR.
- 4) Expression of AQP-3 and AQP-4 of *Fasciola gigantica* in *Xenopus* oocytes and swelling assays for water, urea, and glycerol.
- 5) Expression of FgAQPs and OvaAQPs in yeast and growth assays testing for ammonia, methylamine permeability.
- 6) Oocyte swelling assay for measurement of acetate permeability of *Opisthorchis viverrini* AQPs 1–3.
- 7) Western blot analyses of heterologous expression of FgAQPs and OvaAQPs in *Xenopus* oocytes and yeast
- 8) Preliminary analysis of potential aquaporin blockers (AqB) for their activity on OvaAQP-1, OvaAQP-2, OvaAQP-3 by *Xenopus* swelling assays.

EXPERIMENTAL DESIGN

AQPs are transmembrane proteins and their short N- and C-terminal intracellular tails are the most promising targets for antibody production if later on the native protein must be detected. Therefore, antisera were raised against synthetic peptides comprising these terminal amino acid sequences. To stimulate a stronger immune response the peptides were conjugated to the carrier protein keyhole limpet hemocyanin (KLH). The obtained antisera were affinity purified to remove antibodies against KLH and the specificity of the purified antisera was tested by ELISA against the specific peptides.

The *Xenopus* oocyte swelling assay is the standard technique to analyze the functional properties of heterologously expressed AQPs as it allows to investigate the function of a single AQP in isolation from any other AQPs. This is due to the absence of endogenous AQP activity in *Xenopus* oocytes and their inherent water impermeability. The results will therefore directly reveal properties of the investigated AQP. Trematodes use anaerobic energy metabolism

pathways in their mammalian hosts and generate waste products, e.g. lactate, acetate. Accumulation of these waste products would be toxic to the parasite and it has been demonstrated in other organisms that a few AQPs can be used to facilitate removal of such molecules. Again, oocytes can be used to analyze the transport of these compounds in their charged and uncharged forms. Functional assays of heterologous expressed AQPs in yeast make use of mutant yeast strains lacking distinct transporters of ammonia which will inhibit the growth of the mutant yeast in the presence of ammonia. AQPs conducting ammonia will allow growth and proliferation of these strains. Western blot analyses of *Xenopus* oocyte protein and yeast microsomal extracts are required to confirm heterologous expression of the trematode AQPs.

Aquaporins are essential for cellular water homeostasis and also have roles in excretion of small metabolic waste products like acetate. Thus they are interesting targets for pharmaceutical intervention and compounds that have shown potential in blocking of mammalian aquaporins (AqB) were tested in oocyte swelling assays against OvAQP1, OvAQP-2, OvAQP-3. Due to the absence of endogenous AQP activity in *Xenopus* oocytes and their inherent water impermeability they will only show swelling if the expressed OvAQPs allow water to pass. The swelling rate of the oocytes will be recorded before and after the addition of the selected AqB. Comparison of the swelling rates will show if any specific AqB prevents or slows oocyte swelling.

RESULTS

- 1) ELISA showed that the generated and purified antisera contained a sufficiently high amount of peptide-specific antibodies.
- 2) Immunoblot analyses demonstrated that the antisera reacted with single antigens in transmembrane protein extracts of adult *F. gigantica*. Specificity of these signals was verified by controls in which the specific antibodies were depleted by immunoprecipitation against the specific peptides.
- 3) RT-PCR demonstrated that FgAQP-3 is an adult-stage specific protein while FgAQP-4 is present in metacercariae, newly excysted juveniles, 2, 4, 6 week-old juveniles and adults.
- 4) Immunolocalization in the tissue of adult parasites showed that FgAQP-3 is present only in the male reproductive system, i.e., testis lobes and seminal vesicle while FgAQP-4 is ubiquitously distributed.
- 5) Oocyte swelling assays of FgAQP-3, FgAQP-4 for water, urea, and glycerol showed negative results

- 6) Yeast growth experiments demonstrated that FgAQP-3 can conduct ammonia and methylamine while FgAQP-4 was negative. OvAQP-1, OvAQP-2, OvAQP-3 can conduct ammonia and methylamine
- 7) Oocyte swelling assays of *Opisthorchis* AQPs for acetate showed that OvAQP-1 abundantly conducted uncharged acetate while OvAQP-2 and OvAQP-3 caused the flow of both charged and uncharged acetate but at low levels
- 8) Western analyses of oocyte protein extracts showed that the *Fasciola* AQPs were present at very low levels only while the *Opisthorchis* AQPs were abundant. In the yeast microsomal fractions FgAQP-3 was clearly detected while FgAQP-4 was not detected. All *Opisthorchis* AQPs were detected in the yeast microsomal fractions.
- 9) Thirteen different potential aquaporin blockers (AqB) were tested with OvAQP-1, OvAQP-2, OvAQP-3 in *Xenopus* oocyte swelling assays. AqB 011 showed promising results. It caused reduction of the swelling rate in oocytes expressing OvAQP-1 and OvAQP-2 but not for OvAQP-3.

CONCLUSIONS

Specific antisera against FgAQP-3 and FgAQP-4 terminal peptides were produced in mice and affinity-purified. RT-PCR, immunoblot detection and immunohistochemical localization of FgAQP-3 and FgAQP-4 RNA and protein yielded novel results which already allow us to speculate about the functions of these aquaglyceroporins:

- 1) FgAQP-3 is an adult-stage specific protein functional in the male reproductive system which could possibly affect spermatogenesis and, thereby, fertility.
- 2) FgAQP-4 acts as a 'house-keeping' protein, active at all times in all tissue-types. Pharmaceutical intervention should focus on FgAQP-4 as functional inhibition of FgAQP-3 might not kill the parasite but only cause temporary reduction in fecundity.
- 3) Unexpectedly, the activity measurements of the *Fasciola* AQPs in oocytes were negative and the subsequent western analysis showed that they were only expressed at very low levels in the oocytes. Similarly, in the yeast only FgAQP-3 was found expressed and showed that it has an effect on ammonia and methylamine while FgAQP-4 was again negative. All clones had been DNA-sequenced prior to their use in the experiments. In vitro transcription and production of capped RNA showed no differences in the product quality/quantity between *Fasciola* and *Opisthorchis* AQP transcripts and the experiments were repeated at different times with the same results. It is at present not known whether there are systemic problems at the

translational/posttranslational level that affect the *Fasciola* AQPs in *Xenopus* oocytes or undetected technical shortcomings.

4) The *Opisthorchis* AQPs were found to be expressed in both, *Xenopus* oocytes and in yeast and conducted ammonia and methylamine in the latter. Due to the negative results for the FgAQPs we did not test them for acetate in oocytes but used only the OvAQPs in these assays. Remarkably, OvAQP-1 was found to be highly active in conducting uncharged acetate. Even more remarkably in respect to acetate is the result for OvAQP-3 because it demonstrates the flux of charged acetate through this AQP which is a property rarely observed in these channels. Given the negative results for the *Fasciola* AQPs we have decided to focus our future work on the analysis of the *Opisthorchis* AQPs and to further analyze their possible biological role in the excretion of acetate which if left in the parasite would lead to cellular acidification and certain subsequent death.

5) Preliminary analysis of AqBs showed that it is possible to find compounds that reduce the flow of water across OvAQPs. Due to limited time available for this analysis (one month) only 13 AqBs could be tested. These analyses were performed in the laboratory of Prof. A. Yool, Adelaide, Australia. Prof. Yool has a large collection of compounds with potential to block aquaporins. An extended research visit would be necessary to obtain sound data, ready for publication.

6) Unexpected negative results for the expression of FgAQP-3, FgAQP-4 in *Xenopus* oocytes with limited time (three months research visit in the laboratory of Prof. E. Beitz, Kiel, Germany) to solve this problem and to conduct more experiments in mutant yeast as an alternative did not allow us to get publishable results for this part of the study.

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. ศึกษาการแสดงออกของอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ทั้งในระดับ RNA และโปรตีน จาก พยาธิ *F. gigantea* (To characterize the temporal and spatial expression profiles of two *F. gigantea* aquaporins)
2. ศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิ *F. gigantea* ในไข่กับ *Xenopus laevis* ในการเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของน้ำ ยูเรีย และกลีเซอรอล (To functionally characterize *F. gigantea* aquaporins in *Xenopus laevis* oocytes for water, urea, glycerol permeability)
3. ศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิ *F. gigantea* และ *O. viverrini* ในยีสต์ สำหรับการเป็นช่องทางผ่านสำหรับแอมโมเนีย (To functionally characterize *F. gigantea* and *O. viverrini* aquaporins in yeast for ammonia permeability)
4. ศึกษาความสำคัญของโปรตีนอะควอพอรินเพื่อความอยู่รอดของพยาธิ *F. gigantea* และ *O. viverrini* ในระยะ **newly excysted juvenile** (To characterize the importance of *F. gigantea* and *O. viverrini* aquaporins for parasite survival *in vivo* in cultured newly excysted juveniles)
5. ศึกษาความสามารถของโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิ *F. gigantea* และ *O. viverrini* ในการขนส่งยาจำพวก metalloids เป็นต้น (To investigate the use of *F. gigantea* and *O. viverrini* aquaporins for targeted drug delivery using metalloids as examples)
6. การศึกษาขั้นต้นในการยับยั้งโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิ *F. gigantea* และ *O. viverrini* ด้วย ยาขับปัสสาวะและยาชนิดอื่นๆ (PRELIMINARY: To investigate the inhibition of *F. gigantea* and *O. viverrini* aquaporins by diuretic and other pharmaceuticals)

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การดำรงชีวิตของพยาธิ *F. gigantea* ในหอยตัวกลาง *Austropeplea viridis*

- การเพาะเลี้ยงหอยตัวกลางสายพันธุ์ *A. viridis*

นำหอยสายพันธุ์ *A. viridis* ซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิ *F. gigantea* จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ที่มีขนาดโตเต็มวัย (ประมาณ 10-12 มิลลิเมตร) ใส่ในอ่างพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 ซม. สูงประมาณ 9 เซนติเมตร ใส่ก้อนหินเพื่อเป็นที่วางไข่ ใส่ น้ำประมาณครึ่งอ่าง ให้ออกซิเจน โดยใช้เครื่องพ่นอากาศลงในอ่างน้ำตลอดเวลา ให้แสงสว่าง โดยใช้ไฟนีออน 8-10 ชั่วโมงต่อวัน ให้อาหารหลักคือ ผักกาดหอม ส่วนไดอะตอมและสาหร่ายเกลียวทองให้เป็นอาหารเสริม อาทิตย์ละครั้ง หอยที่เจริญเต็มวัยจะวางไข่เป็นแพ เอ็มบริโอจะพัฒนาภายในไข่ ประมาณ 1 สัปดาห์ และจะฝักออกมาเป็นตัวอ่อน และใช้เวลาประมาณ 8-10 สัปดาห์ในการพัฒนาและเติบโตเป็นตัวเต็มวัย

- การติดเชื้อหอยตัวกลางในห้องปฏิบัติการ

นำไข่ของพยาธิ *F. gigantea* ที่เก็บจากถุงน้ำดีของสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ (โค กระบือ) มาล้างเอาน้ำดีออก นำไข่ของพยาธิที่ล้างแล้วใส่น้ำที่ปราศจากคลอรีนในภาชนะพลาสติก ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25-27 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมจะเจริญและออกมาจากไข่ ไมราซิเดียมจะมีชีวิตอยู่ในน้ำได้ประมาณ 24 ชั่วโมง ถ้าไม่สามารถไขหอยที่เป็นโฮสต์ตัวกลางได้ ไมราซิเดียมจะตายในที่สุด นำหอยที่เป็นโฮสต์ตัวกลางจำนวน 1 ตัวใส่ในภาชนะ (ภาชนะพลาสติกขนาด 24 หลุม) ดูดไมราซิเดียมจำนวน 1 ตัวต่อหอย 1 ตัว หลังจากนั้นประมาณ 6 ชั่วโมง นำเอาหอยที่ได้ทำการติดเชื้อแล้วไปใส่ในภาชนะที่ใช้เลี้ยงหอยตามปกติ และทำการตรวจสอบอัตราการติดเชื้อ 6-8 สัปดาห์ต่อมา โดยการนำแผ่นพลาสติกขนาดประมาณ 5x5 เซนติเมตร ลอยบนน้ำที่ใช้เลี้ยงหอยที่ติดเชื้อแล้ว หอยที่ติดเชื้อจะปล่อยเมตาคาร์เคเรีย (metacercariae, ระยะติดเชื้อของพยาธิ *F. gigantea*) ออกมา แล้วเกาะอยู่บนแผ่นพลาสติกที่ลอยอยู่เหนือน้ำ

2. การเตรียมพยาธิ *F. gigantea* ระยะต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย

- การเตรียมพยาธิ *F. gigantea* ระยะ newly excysted juveniles

นำเมตาคาร์เคเรีย จำนวน 500-1,000 เม็ด ใส่ในสารละลาย solution I (1% Pepsin, 0.4% HCl) วางไว้ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเก็บเมตาคาร์เคเรีย แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 3 ครั้ง ใส่สารละลาย solution II (0.02 M sodium dithionite, 0.2% taurocholic, 1% NaHCO₃, 0.8% NaCl และ 0.6% HCl) วางที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปั่นเก็บเมตาคาร์เคเรีย แล้วล้างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 จำนวน 3 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 ที่มี 10 µg/ml gentamicin และ fetal bovine serum วางที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง แล้วเก็บ newly excysted juveniles ที่ได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

- การเตรียมพยาธิ *F. gigantea* ระยะ 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์

ติดเชื้อหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR ด้วยเมตาคาร์เคเรียของพยาธิ *F. gigantea* ด้วยการให้หนูเมาส์กินเมตาคาร์เคเรีย จำนวน 20 เม็ดต่อหนูหนึ่งตัว จากนั้นทำการการุณฆาตรหนูที่ระยะ 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์

หลังการติดเชื้อ เก็บตัวอ่อนของพยาธิระยะต่างๆ ที่บริเวณตับและถุงน้ำดีของหนู ล้างตัวอ่อนของพยาธิด้วยสารละลาย PBS, pH 7.2 เก็บพยาธิตัวอ่อนระยะต่างๆ ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

- การเตรียมพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย

เก็บพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัยในตับและท่อน้ำดีของสัตว์ที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติ (โค กระบือ) ณ โรงฆ่าสัตว์ ในจังหวัดปทุมธานี จากนั้นล้างพยาธิตัวเต็มวัยที่ได้ด้วยสารละลาย PBS, pH 7.2 เพื่อล้างน้ำดีและเลือดออกให้หมด เก็บพยาธิไว้ใน liquid N₂ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมพยาธิ *Opisthorchis viverrini* ระยะ metacercaria และ newly excysted juveniles

เก็บปลาน้ำจืดที่เป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิ *O. viverrini* จากแหล่งน้ำที่มีการระบาด ในเขตภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย แล้วนำปลาไปย่อยเพื่อหา metacercaria ของพยาธิ *O. viverrini* ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขั้นตอนคือ นำปลามาสับและย่อยให้ละเอียดด้วยเอนไซม์ trypsin จากนั้นนำมาผ่านตาแกรงถี่ และเลือก metacercaria ของพยาธิ *O. viverrini* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ สำหรับการเตรียมตัวอ่อนพยาธิระยะ newly excysted juvenile นำตัวอ่อนพยาธิระยะ metacercaria มาย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin 1% แล้วนำไปแช่ช้าๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที จากนั้นแยกพยาธิระยะ newly excysted juveniles ออกมาล้างในสารละลาย PBS, pH 7.2 แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 1 ปลาน้ำจืด cyprinid โฮสต์ตัวกลางของพยาธิของพยาธิ *O. viverrini* ที่เก็บได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

4. การเตรียม total RNA จากพยาธิ *F. gigantica* ระยะต่างๆ

การสกัด total RNA ของพยาธิ *F. gigantica* ระยะ newly excysted juvenile, 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์, 6 สัปดาห์ และระยะตัวเต็มวัย โดยนำพยาธิมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer (Ultra-Turrax T25 tissue homogenizer, IKA, Germany) ในสารละลาย TRIzol (GIBco BRL Life-Technologies, USA) แล้วเติมคลอโรฟอร์มลงไป จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนบนแล้วเติม isopropyl alcohol นำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้ง นำตะกอน total RNA ที่ได้ มาล้างด้วย 70% เอทานอล จากนั้นตากตะกอน total RNA ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 20-30 นาที แล้วละลายตะกอน total RNA ด้วย DEPC-treated water วัดความเข้มข้นของ total RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร นำสารละลาย total RNA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5. การเตรียมสารสกัดโปรตีนชนิด insoluble protein extracts (IPE), soluble protein extracts (SPE) และ transmembrane extracts (TME) จากพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย

นำพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer ในสารละลาย 10 mM PBS, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1x proteinase inhibitor cocktails (M221, AMRESCO,

USA) และ 1 mM EDTA จากนั้น นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกตะกอน (pellet I) และส่วนใส (supernatant I)

นำตะกอน (pellet I) ไปละลายด้วยสารละลาย 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 และ 3% SDS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใส (*insoluble protein extracts*) ไปวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

นำส่วนใส (supernatant I) มาปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (Ultracentrifuge, TH-641 rotor, SORVALL Discovery 100SE) ที่ความเร็ว 200,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกตะกอน (pellet II) และส่วนใส (supernatant II) นำตะกอนที่ได้ (pellet II) มาละลายใน 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 และ 3% SDS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใส (*transmembrane extracts*) ไปวัดความเข้มข้นโปรตีนที่ได้ ด้วยวิธี Bradford แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

นำส่วนใส (supernatant II หรือ *soluble protein extracts*) ไปวัดความเข้มข้นโปรตีนที่ได้ ด้วยวิธี Bradford แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

6. การโคลน cDNA ที่เข้ารหัสสำหรับโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ของพยาธิตัวแบน *F. gigantica*

จากข้อมูลใน Expressed Sequence Tag (EST database) ของพยาธิตัวแบน *F. gigantica* คณะผู้วิจัยจึงได้สังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ cDNA ของ aquaporin homologs (FgAQP3; Fw: 5'GGATCCATGGAGTCCCACTGGGT3' Rv: 5'CTCGAGTCATTCCAAAGCCTCTCCT3' และ FgAQP4; Fw: 5'GGATCCATGAGTTTAGTCTCCTAT3' Rv: 5'CTCGAGTTATTGCCAACTGTTTC3') แล้วทำการโคลน cDNAs ด้วยเทคนิค reverse transcriptase PCR (RT-PCR) โดยนำ total RNA ของพยาธิตัวแบน *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย มาทำ reverse transcription ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (RevertAid Reverse Transcriptase, ThermoScientific) โดยใช้ reverse gene specific primers แล้วเพิ่มจำนวน cDNAs ที่ได้ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ aquaporin homologs นำ PCR products ที่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) จากนั้นตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอของโคลน cDNAs (FgAQP3 และ FgAQP4) ที่ได้โดย DNA sequencing

7. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน FgAQP3 และ FgAQP4 ในระดับ RNA ของพยาธิตัวแบน *F. gigantica* โดยวิธี reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR) เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ในระดับ RNA ได้ ข้อดีของเทคนิค RT-PCR คือต้องการปริมาณของ RNA ในจำนวนน้อยมาก (ระดับนาโนกรัม) ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ขั้นตอนคือนำ total RNA ระยะ newly excysted juvenile, 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์, 6 สัปดาห์ และระยะตัวเต็มวัยที่เตรียมไว้ (ดังอธิบายในข้อหัวที่ 3) มาสร้าง first strand cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (RevertAid Reverse Transcriptase, ThermoScientific) โดยใช้ reverse gene specific

primers (Rv; 5'-TCGGAACCCAAAAGTGGTAG-3' สำหรับ FgAQP3 และ Rv; 5'-GAGTGAACGCTTGTGTCCA-3' สำหรับ FgAQP4) แล้วเพิ่มจำนวน first stand cDNA ที่ได้ในแต่ละระยะ ด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่ออะควอพอรินทั้งสองไอโซฟอร์ม (Fw; 5'-GGTCGAGTACCGTGGATACG-3' Rv; 5'-TCGGAACCCAAAAGTGGTAG-3' สำหรับ FgAQP3 และ Fw; 5'-GTTGATTAATCCGGCAATGG-3' Rv; 5'-GAGTGAACGCTTGTGTCCA-3' สำหรับ FgAQP4) โดยใช้ annealing temperature ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ PCR products ที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis ในการทดลองนี้คณะผู้วิจัยได้ใช้ยีน FgTubulin เป็นยีนควบคุมภายใน (internal control gene) เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนควบคุม รวมถึงปริมาณและคุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้ในระยะต่างๆ ของพยาธิ *F. gigantica*

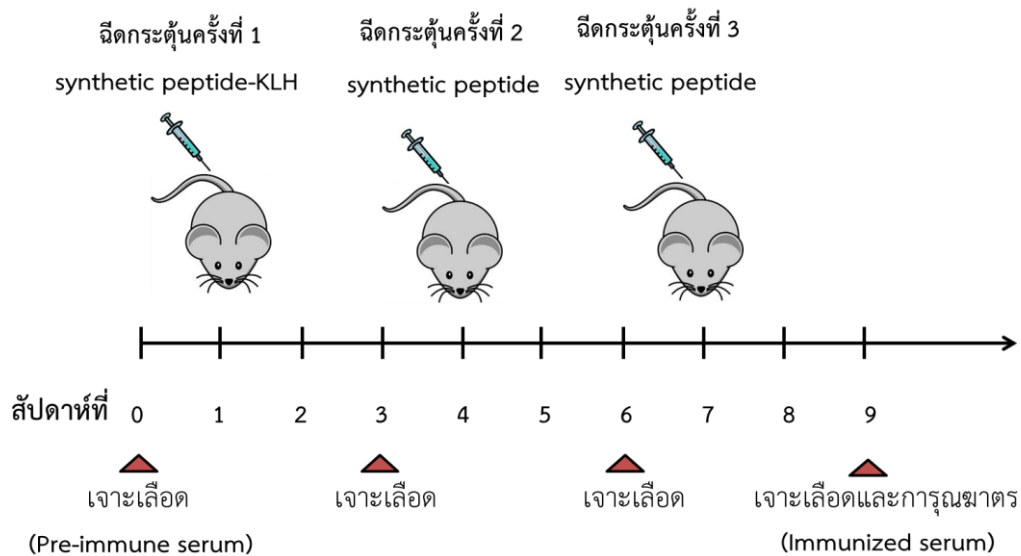
8. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนประเภท transmembrane proteins นั้นมีขีดจำกัด โดยเฉพาะในขั้นตอนการเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นสัตว์ทดลอง เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ส่วนใหญ่ผลิตในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ไม่สามารถผลิตโปรตีนประเภท transmembrane proteins ได้ทั้งโมเลกุล ดังนั้นการเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อผลิตแอนติบอดีสำหรับ transmembrane proteins จะต้องเลือกเฉพาะส่วนที่เป็น intracellular หรือ extracellular parts ของ transmembrane proteins นั้นๆ

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีขนาดเล็กนั้น ทำได้ยากและใช้เวลานาน โดยเฉพาะในขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ คณะผู้วิจัยจึงได้สั่งผลิต synthetic peptides (MIMOTOPES, Australia) เพื่อลดขั้นตอนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน สำหรับการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 นั้น คณะผู้วิจัยได้เลือกส่วนที่เป็น N-terminal intracellular part (H-KKVDKIRLTSKNLTKC-OH, 19 อะมิโนแอซิด) ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ C-terminal intracellular part (H-CDELGNSEKMRQFSDRNSWQ-OH, 19 อะมิโนแอซิด) ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP4 เป็นแอนติเจนสำหรับการกระตุ้นหนูทดลองเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ขั้นตอนการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ทำได้โดยนำ synthetic peptides มาเชื่อมกับโปรตีน keyhole limpet hemocyanin (KLH) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น immunostimulator/adjuvant เพื่อช่วยให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสามารถตอบสนองและสร้างแอนติบอดีต่อ synthetic peptides ได้ดีขึ้น จากนั้นนำ synthetic peptide-KLH ฉีดกระตุ้นในหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR จำนวน 2 กลุ่มทดลอง (กลุ่ม FgAQP3 และ FgAQP4) กลุ่มละ 3 ตัว ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อหนูหนึ่งตัว สำหรับการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3 ฉีดกระตุ้นด้วย synthetic peptide เพียงอย่างเดียว ปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อหนูหนึ่งตัว โดยการฉีดกระตุ้นแต่ละครั้งเว้นระยะห่าง 3 สัปดาห์ โดยทำการเจาะเลือดบริเวณหางหนูก่อนการกระตุ้นด้วยแอนติเจนและในสัปดาห์ที่ 2 หลังการฉีดกระตุ้น โดยการฉีดกระตุ้นหนูครั้งแรกทำการผสมแอนติเจนด้วย Complete Freund's Adjuvant สำหรับการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3 ผสมแอนติเจนด้วย Incomplete Freund's Adjuvant (ดังแสดงในรูปที่ 1) จากนั้น pool ซีรัมของหนูที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (แบ่งออกเป็น

preimmune serum และ immunized serum) แล้วนำไปทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้ต่อ synthetic peptide ที่ใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นหนูทดลองด้วยวิธี ELISA หลังจากนั้นนำซีรัมบางส่วนไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกำจัดแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน KLH ด้วย KLH agarose column (USBiological, USA) แล้วเปรียบเทียบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ synthetic peptide และโปรตีน KLH ทั้งก่อนและหลัง purification ด้วยวิธี ELISA ต่อไป



รูปที่ 2 แสดงระยะเวลาของการกระตุ้นหนูทดลองเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ synthetic peptides ของโปรตีน FgAQP3 และ FgAQP4

9. การทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อ synthetic peptides ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ OvAQP4 โดยวิธี ELISA

นำ synthetic peptides (ที่ใช้เป็นแอนติเจนสำหรับกระตุ้นหนูทดลอง) ของโปรตีน FgAQP3 และ FgAQP4 มาเคลือบบนหลุมของ ELISA plate ปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อหลุม วางที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นล้างโปรตีนที่ไม่เกาะกับหลุมออกด้วยด้วยบัฟเฟอร์ PBST (10 mM PBS, pH 7.2, 0.05% Tween 20) แล้ว block ด้วย 0.25% BSA ในบัฟเฟอร์ PBST เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างหลุม ELISA ด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นใส่ pooled-preimmune serum, pooled-immunized serum (ก่อนการทำบริสุทธิ์) หรือ pooled-immunized serum (ก่อนการทำบริสุทธิ์) ที่ dilution 1:1,000-1:2,048,000 แบบ 2-fold dilution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างหลุม ELISA ด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำแอนติบอดีตัวที่สอง (HRP-Goat anti mouse IgG (H+L), invitrogen) ที่ dilution 1:4000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างหลุม ELISA ด้วย PBST แล้วใส่ substrate (OPD, Sigma) เป็นเวลา 30 นาที

ในห้องมืด จากนั้นหยุดการเกิดปฏิกิริยาด้วย 3N H₂SO₄ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

การเปรียบเทียบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 2 ชนิด (anti FgAQP3 antibody และ anti FgAQP4 antibody) ต่อ synthetic peptide และ KLH เพื่อวิเคราะห์อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสง (OD₄₉₂ ต่อ synthetic peptide / OD₄₉₂ ต่อ KLH) และเปรียบเทียบโพลีโคลนอลแอนติบอดีทั้งก่อนและหลังการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ด้วย KLH agarose column โดยการเคลือบโปรตีน KLH และ synthetic peptide บนหลุม ELISA แล้วดำเนินการเช่นเดียวกับที่ได้อธิบายไว้ด้านบน จากนั้นคำนวณอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการเกิดปฏิกิริยากับ synthetic peptide และ KLH แล้วนำมา plot บนกราฟ

10. การตรวจหาโปรตีน FgAQP3 และ FgAQP4 จากสารสกัดโปรตีนที่เตรียมจากพยาธิ *F. gigantica* โดยวิธี Western blot analysis

นำสารสกัดโปรตีนที่เตรียมจากพยาธิ *F. gigantica* ชนิด soluble protein extracts (SPE), insoluble protein extracts (IPE) และ transmembrane extracts (TME) ปริมาณ 70 ไมโครกรัม มาแยกขนาดของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ใน 16% acrylamide gel และย้ายโปรตีนมายังแผ่น nitrocellulose membrane โดยวิธี semi-dry blotting จากนั้นนำ nitrocellulose membrane มา block nonspecific ด้วย 5% skim milk ในบัฟเฟอร์ TBS, pH 7.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง ใส่ pooled-purified polyclonal antibody ต่อ synthetic peptide ของ FgAQP3 หรือ FgAQP4 หรือ pooled-preimmune serum ของหนู ก่อนการกระตุ้นด้วยแอนติเจน ที่ dilution 1:500 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย washing buffer (TBS, 0.05% Tween 20) ใส่แอนติบอดีตัวที่สอง (AP-goat anti mouse IgG (whole molecule), Sigma) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง membrane ด้วย washing buffer ใส่ substrate (BCIP/NBT, Amersco, USA) วางในที่มืด ห้ามเขย่า รอจนเกิดแถบสีม่วงหรือจนกว่าจะเห็น background จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างน้ำ 2-3 ครั้ง

11. การหาตำแหน่งของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ในเนื้อเยื่อของพยาธิ *F. gigantica* โดยวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry)

- การเตรียม paraffin-embedded tissue ของพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย

นำพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย ที่เพิ่งเก็บจากตับหรือท่อน้ำดีของสัตว์ที่ติดเชื้อ (โค กระบือ) มาล้างให้สะอาดด้วยสารละลาย PBS, pH 7.2 จากนั้นนำพยาธิที่ตัดแบ่งออกไปเป็น 3 ส่วน (ส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนท้าย) ไปแช่ในสารละลาย 4% paraformaldehyde (fixative buffer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เทสารละลาย fixative ทิ้ง แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS, pH 7.2 จากนั้นกำจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อของพยาธิ (dehydration) โดยแช่ในสารละลายเอทานอล 50%, 70%, 80%, 95% และ 100% เป็นเวลาอย่างละ 20 นาที เทสารละลายเอทานอลแล้วเติมสารละลาย xylene ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 รอบ รอบละ 10 นาที จากนั้นนำ xylene ผสมกับสารละลาย paraplast ในอัตราส่วน 1:1 นำชิ้นส่วนของพยาธิใส่ในสารละลายดังกล่าว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 55-58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 รอบ จากนั้นเทสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลาย paraplast บริสุทธิ์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 55-58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 รอบ นำ

ชิ้นส่วนของพยาธิวางลงในกล่องกระดาษขนาด ประมาณ 3x5 เซนติเมตร ใส่สารละลาย paraplast บริสุทธิ์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้เพื่อให้สารละลาย paraplast แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นส่วนของพยาธิที่ฝังอยู่ใน paraplast ไปตัดด้วยเครื่อง microtome (RM2235 Leica, Germany) ที่ความหนา 8 ไมโครเมตร แล้ววางบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วย gelatin ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 คืนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นำสไลด์ไปเก็บไว้ในกล่องที่ปราศจากความชื้น ฝุ่น และแสง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

- การตรวจหาโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 บนเนื้อเยื่อของพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็ม ด้วยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry)

นำเนื้อเยื่อของพยาธิที่วางอยู่บนสไลด์ (ดังที่ได้อธิบายข้างต้น) มาแช่ใน xylene, absolute ethanol, 95%, 90%, 80%, and 70% ethanol ตามลำดับ นำสไลด์ไปแช่ในสารละลาย 10 mM sodium citrate, pH 6.0 และ 0.05% Tween 20 เพื่อเป็นการดึงแอนติเจนที่อยู่บนเนื้อเยื่อของพยาธิออกมา จากนั้น block เนื้อเยื่อของพยาธิด้วยสารละลาย glycine และ 4% BSA ตามลำดับ แล้วตรวจจับโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ที่ dilution 1:200 เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น block เนื้อเยื่อของพยาธิด้วยสารละลาย 1 mM laevamisole แล้วใส่ 2nd antibody (goat anti-mouse antibody conjugated alkaline phosphatase, dilution 1:200) แล้วเติม substrate ของเอนไซม์ alkaline phosphatase ด้วย BCIP/NBT นำสไลด์ไปวางไว้ในที่มืด แล้วสังเกตสีม่วงที่เกิดขึ้นบนเนื้อเยื่อของพยาธิ หยุดปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยการล้างในน้ำประมาณ 2-3 ครั้ง ปิดด้วย coverslip แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วถ่ายรูปของสีม่วงที่เกิดขึ้นบนเนื้อเยื่อของพยาธิ (OLYMPUS รุ่น BX51)

12. การโคลน cDNA บริเวณ coding sequences ของ FgAQP3 และ FgAQP4 เข้าสู่เวกเตอร์เพื่อทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินในไข่กบ *Xenopus laevis* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

- การโคลน cDNA ของ FgAQP3 และ FgAQP4 เข้าสู่เวกเตอร์ pHA426MET25 เพื่อทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินในยีสต์ *S. cerevisiae*

ออกแบบ forward และ reverse ไพริเมอร์ ที่มี restriction sites ของ restriction enzymes สำหรับการตัดต่อเข้าสู่เวกเตอร์ ดังแสดงในตารางด้านล่าง

โคลน	ลำดับดีเอ็นเอของไพริเมอร์	Restriction enzymes
FgAQP3	Fw: 5' <u>GAC GTC</u> ATG GAG TCC CAC TGG GT3'	Aat II
	Rv: 5' <u>CTC GAG</u> TCA TTC CAA AGC CTC TCC T3'	Xho I
FgAQP4	Fw: 5' <u>GGA TCC</u> ATG AGT TTA GTC TCC TAT3'	BamH I
	Rv: 5' <u>CTC GAG</u> TTA TTG CCA ACT GTT TC3'	Xho I

เพิ่มจำนวน cDNA ของ FgAQP3 และ FgAQP4 ด้วยไพริเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าว (ดังแสดงในตารางด้านบน) จากนั้นเชื่อมต่อ PCR product ที่ได้กับเวกเตอร์ pGEM-T easy (Promega, USA) แล้วนำไปเพิ่มจำนวนในเซลล์

แบคทีเรีย สายพันธุ์ XL1-Blue นำโคลนของ pGEM-T easy/FgAQP3 (including Aat II and Xho I sites) และ pGEM-T easy/FgAQP4 (including BamH I and Xho I sites) ตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอที่ได้ (DNA sequencing) จากนั้นทำการตัดโคลนของ FgAQP3 และ FgAQP4 ที่ได้ ด้วยเอนไซม์ดังกล่าว (ดังตารางด้านบน) จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pHA426MET25 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรีย สายพันธุ์ XL1-Blue สกัดดีเอ็นเอของ pHA426MET25/FgAQP3 และ pHA426MET25/FgAQP4 ที่ได้ แล้วนำไปใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ในยีสต์ *S. cerevisiae* ต่อไป

- การโคลน cDNA ของ FgAQP3 และ FgAQP4 เข้าสู่เวกเตอร์ pOG2 เพื่อทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินในไขวก *X. laevis*

นำโคลนของ pHA426MET25/FgAQP3 และ pHA426MET25/FgAQP4 มาเพิ่มจำนวนและสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นตัดดีพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ด้วย restriction enzymes ชนิด Xba I และ Xho I (ประกอบไปด้วยลำดับดีเอ็นเอของโปรตีนอะควอพอริน และโปรตีน hemagglutinin (HA tag) ซึ่งจะนำไปในการตรวจหาการสร้างโปรตีนด้วย anti-HA antibody ในลำดับต่อไป) แล้วนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pOG2 เพื่อให้ได้โคลนของ pOG2/FgAQP3 และ pOG2/FgAQP4 สำหรับการทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ในไขวก *X. laevis* ต่อไป

13. การโคลน cDNA บริเวณ coding sequences ของ *O. viverrini* aquaporins (OvAQP1, 2 และ 3) เข้าสู่เวกเตอร์เพื่อทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

นำโคลนของ pGEMT-Easy/OvAQP1, pGEMT-Easy/OvAQP2 และ pGEMT-Easy/OvAQP3 ที่ผ่านการตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอแล้ว (จากโครงการวิจัยเรื่อง “การโคลนยีนและการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่เป็นช่องทางผ่านของน้ำ (อะควอพอริน, OvAQP1-3) จากพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*” สัญญาเลขที่ MRG5580189) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Xho I เพื่อย้าย DNA fragment ของ OvAQP1, OvAQP2 และ OvAQP3 ไปยังเวกเตอร์ pHA426MET25 จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) อีกครั้ง เวกเตอร์ pHA425/MET25 มีลำดับดีเอ็นเอของโปรตีน hemagglutinin (HA tag) ซึ่งมีประโยชน์ในการตรวจหาโปรตีนโดยใช้แอนติบอดีต่อ HA tag

14. การทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ในไขวก *Xenopus laevis*

การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินในไขวก *Xenopus laevis* เป็นการทดสอบความสามารถในการเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของน้ำ กลีเซอรอล และยูเรีย โดยอาศัยหลักการแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนของไขวกหลังฉีดด้วย cRNA ของอะควอพอริน แล้ววัดขนาดของไขวกที่เพิ่มขึ้นหลังวางในสารละลายที่ต้องการทดสอบ ขั้นตอนการทดลองคือ นำโคลนของ pOG2/FgAQP3 และ pOG2/FgAQP4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Not I ได้เป็น linear DNA template จากนั้นจึงผลิต cRNA ของ FgAQP3 และ FgAQP4 โดยใช้ชุดผลิต mMESSAGE mMACHINE transcription kit (Ambion) จากนั้นนำไขวก *Xenopus laevis* (ซึ่งได้จากการผ่าช่องท้องของกบ *X. laevis* เพศเมีย ตามหลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของ University of Kiel, Germany) มาล้างและย่อยด้วยเอนไซม์ collagenase A (Roche) เป็นเวลา 10-20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วคัดเลือกไขวกระยะ V-VI และมีคุณภาพดี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ จากนั้นฉีด cRNA ของ FgAQP3 หรือ FgAQP4

จำนวน 5 นาโนกรัมในปริมาตร 50 นาโนลิตร ต่อไข่กบหนึ่งฟอง โดยใช้ไข่กบประมาณ 10-15 ฟองต่อหนึ่งกลุ่มทดลอง หรือฉีดไข่กบ *X. laevis* ด้วย sterile water สำหรับกลุ่มควบคุมผลลบ จากนั้นนำไข่กบที่ฉีดแล้วมาใส่ในสารละลาย ND96 buffer (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) วางในตู้ที่มีอุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการเป็นช่องทางผ่านของโปรตีนอะควอพอรินต่อไป

การทดสอบความสามารถของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ในการเป็นช่องทางผ่านของน้ำ โดยนำไข่กบทั้ง 3 กลุ่ม มาใส่ในบัฟเฟอร์ ND96 เจือจาง (1:3 ND96 buffer) แล้ววัดขนาดของไข่กบทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 1 นาที โดยกล้องวิดีโอ แล้วคำนวณความสามารถในการเป็นช่องทางผ่านของน้ำ (osmotic water permeability, P_f) ด้วยสมการ $P_f = V_0 \times d(V/V_0)/dt / [S \times V_w \times (osm_{in} - osm_{out})]$ โดย V_0 = ปริมาตรเริ่มต้นของไข่กบ ($9 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$), V = ปริมาตรของไข่กบหลังจากผ่านไปทุกๆ 15 วินาที, V_w = ปริมาตรของโมเลกุลน้ำ ($18 \text{ cm}^3/\text{mol}$), S = พื้นที่ผิวของไข่กบ (0.045 cm^2), $osm_{in} - osm_{out}$ = ความแตกต่างความเข้มข้นของสารละลาย (osmotic gradient, 140 mOsm) โดยมีไข่กบที่ฉีดด้วย cRNA ของ rat AQP1 เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก

การทดสอบความสามารถของโปรตีนอะควอพอรินในการเป็นช่องทางผ่านของยูเรีย หรือกลีเซอรอล โดยนำไข่กบทั้ง 3 กลุ่ม มาใส่ในบัฟเฟอร์ ND31+Urea (31 mM NaCl, 130 mM Urea, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) หรือ ND31+Glycerol (31 mM NaCl, 130 mM Glycerol, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) แล้ววัดขนาดของไข่กบทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 1 นาที โดยกล้องวิดีโอ แล้วคำนวณความสามารถในการเป็นช่องทางผ่านของสารละลาย (solute permeability, P_{sol}) ด้วยสมการ $P_{sol} = Sol_{tot} \times V_0 \times d(V/V_0)/dt / [S \times (Sol_{out} - Sol_{in})]$ โดย $Sol_{out} - Sol_{in}$ คือ ความแตกต่างความเข้มข้นของสารละลาย (130 mM) โดยมีไข่กบที่ฉีดด้วย cRNA ของ *Plasmodium falciparum* AQP เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก

15. การทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน OvAQP1-3 ในไข่กบ *Xenopus laevis* เพื่อทดสอบการเป็นช่องทางผ่านสำหรับกรดอะมิโนหรืออะซิเตท

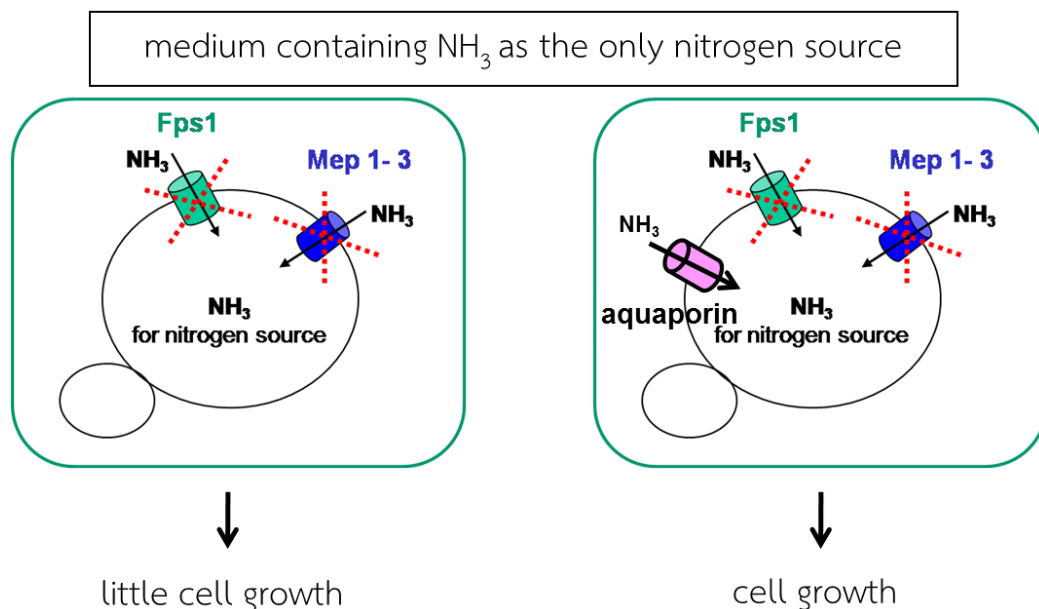
กรดอะมิโนหรืออะซิเตทเป็นของเสีย (waste products) ที่สำคัญชนิดหนึ่งหลังกระบวนการเมตาบอลิซึมของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* การคั่งของเสียดังกล่าวอาจมีผลต่อการดำรงชีวิตของพยาธิที่เกิดจากค่า pH ภายในลำตัวของพยาธิลดลง ผลจากการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนอะควอพอรินในพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mansoni* ทำให้พยาธิดังกล่าวไม่สามารถขับกรดแลคติกซึ่งเป็นของเสียของพยาธิได้ (Skelly et al., 2010)

การทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน OvAQP1-3 ในการเป็นช่องทางผ่านของกรดอะมิโน สามารถทำได้ในระบบของไข่กบดังที่ได้อธิบายแล้วในหัวข้อข้างต้น คือ นำโคลนของ pOG2/OvAQP1, pOG2/OvAQP2 และ pOG2/OvAQP3 (จากโครงการวิจัยเรื่อง “การโคลนยีนและการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่เป็นช่องทางผ่านของน้ำ (อะควอพอริน, OvAQP1-3) จากพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*” สัญญาเลขที่ MRG5580189) มาผลิต cRNA ของ OvAQP1, OvAQP2 และ OvAQP3 ตามลำดับ จากนั้นนำ cRNA ฉีดเข้าไข่กบ *X. laevis* (ดังอธิบายในหัวข้อที่ 14) หลังบ่มในบัฟเฟอร์ ND96 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้น นำไข่กบทั้ง 4 กลุ่ม (กลุ่มควบคุมผลลบ

คือกลุ่มที่ฉีดด้วย sterile water) มาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ ND 86 (86 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM citric acid, pH 4.75) เป็นเวลา 10-20 นาที ก่อนนำไปวัดในสารละลายอะซิติก pH 4.75 (86 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM citric acid, pH 4.75) หรือในสารละลายอะซิติก pH 7.44 (86 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7.44) ที่มีค่า osmolarity เท่ากัน จากนั้นวัดขนาดของไข่กบทุกๆ 60 วินาที เป็นเวลา 4 นาที โดยกล้องวิดีโอ แล้วคำนวณความสามารถในการเป็นทางผ่านของกรดอะซิติก โดยคำนวณอัตราการเปลี่ยนแปลงของไข่กบจากสมการ $\text{relative volume change} = d(V/V_0)/dt$ โดย V_0 = ปริมาตรเริ่มต้นของไข่กบ ($9 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$), V = ปริมาตรของไข่กบหลังจากผ่านไปทุกๆ 60 วินาที

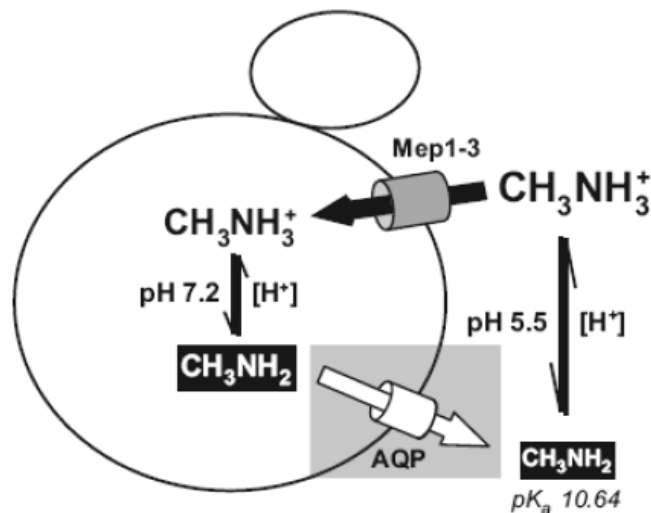
16. การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3, FgAQP4 และ OvAQP1-3 ในยีสต์ *S. cerevisiae* โดยวิธี phenotypic yeast assay

การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินในยีสต์โดยวิธี phenotypic yeast assay เป็นการทดสอบความสามารถของโปรตีนอะควอพอรินในการเป็นช่องทางผ่านสำหรับแอมโมเนีย (ammonia) และเมทิลลามีน (methylamine) โดยอาศัยหลักการเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* หลังกระบวนการ transformation ด้วยพลาสมิดลูกผสมของ pHA426MET25/FgAQP3, pHA426MET25/FgAQP4, pHA426MET25/OvAQP1, pHA426MET25/OvAQP2 หรือ pHA426MET25/OvAQP3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนีย หรือเมทิลลามีนเป็นส่วนประกอบ ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 3 แสดงหลักการของ Ammonia assay, ยีสต์สายพันธุ์ 31019b Δ fps1 (MATa, ura3, mep1 Δ , mep2::LEU2, mep3::kanMX2, yll043w Δ) เป็นยีสต์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม ส่งผลให้ไม่มี endogenous ammonia transporter อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ดังกล่าว เมื่อยีสต์สายพันธุ์ 31019b Δ fps1 ถูก

transformed ด้วยพลาสมิดลูกผสม pHA426MET/AQP และอะควอพอรินดังกล่าวสามารถเป็นช่องทางผ่านของแอมโมเนียได้ จะทำให้ยีสต์นั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่ออยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพียงแอมโมเนียเป็นส่วนประกอบหลักของอาหาร ในขณะที่ยีสต์ที่ถูก transformed ด้วยพลาสมิดเพียงอย่างเดียว หรือพลาสมิดลูกผสมที่มี AQP และอะควอพอรินดังกล่าวไม่สามารถเป็นช่องทางผ่านสำหรับแอมโมเนีย จึงทำให้ยีสต์นั้นสามารถเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยหรือไม่สามารถเจริญเติบโตได้เลยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Amornrat Geadkaew, Ph.D. Thesis 2011)



รูปที่ 4 แสดงหลักการของ Methylamine efflux assay และการขนส่ง methylamine/methylammonium แบบ pH-dependent ในยีสต์สายพันธุ์ BY4742Δfps1 (MAΔhis3-1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, yll043w::KanMX) ซึ่งมีโปรตีน Mep1-3 อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์และทำหน้าที่ในการขนส่ง methylammonium ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เป็น 5.5 และ methylammonium จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ methylamine ในสถานะที่เป็นกลางภายในเซลล์ยีสต์ ซึ่ง methylamine นี้เป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ ถ้าโปรตีนอะควอพอรินที่สามารถเป็นช่องทางผ่านนำ methylamine ออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกได้จะทำให้เซลล์ยีสต์นั้นเจริญเติบโตต่อไปได้ แต่ถ้าหากว่าอะควอพอรินดังกล่าวไม่สามารถเป็นช่องทางผ่านของโมเลกุลดังกล่าวได้ ก็จะทำให้เซลล์ยีสต์นั้นตายบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี methylamine เป็นส่วนประกอบ (Wu *et al.*, 2007).

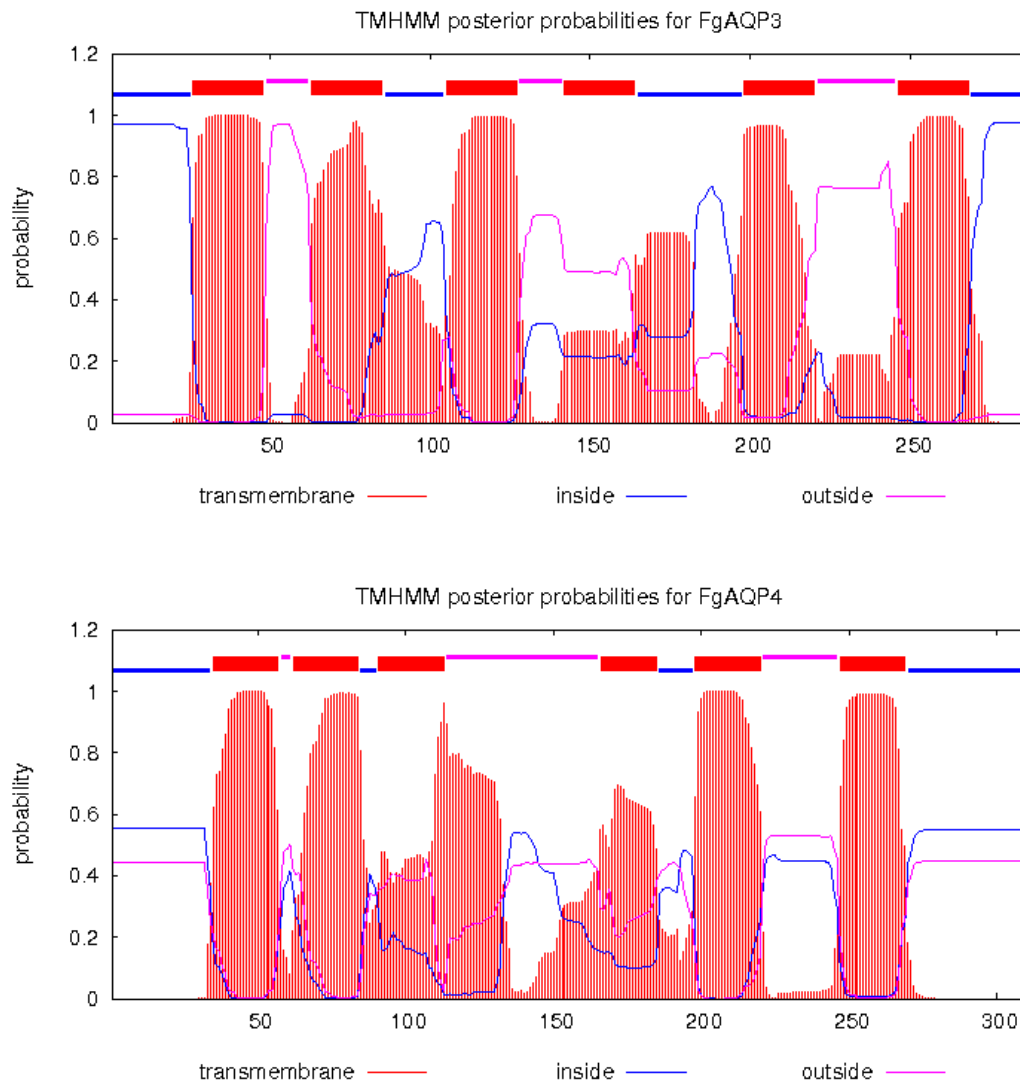
- การศึกษาสารประกอบที่สามารถยับยั้งการทำหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน OvaAQP1-3 ในไข่กบ *Xenopus laevis* (Preliminary blocking assays of OvaAQP1, OvaAQP2, OvaAQP3 (Laboratory Prof. A. Yool, Adelaide, SA, Australia, April 2015))

Cell swelling assays were performed using the standard *Xenopus* oocyte system. Confidential aquaporin blockers (AqB) available in the laboratory of Prof. Yool were used. These 13 AqBs were coded as 001, 006, 007, 011, 026, 028, 029, 044, 045, 047, 050, dimer, trimer. Experiments started by recording oocyte swelling first in the absence of AqB and then in the presence of AqB. Swelling rates in absence and presence of AqB were compared to conclude the effect of AqB on water permeability of OvAQP1, OvAQP2, OvAQP3.

ผลงานวิจัยที่ได้รับ

1. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนแอสิดของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ที่โคลนได้จาก พยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย

จากผลการวิเคราะห์ลำดับ cDNAs ด้วยวิธี DNA sequencing พบว่า cDNAs ของ FgAQP3 และ FgAQP4 มีขนาดเท่ากับ 861 และ 933 bps ตามลำดับ ประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสิด จำนวน 286 และ 310 อะมิโนแอสิดตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ลักษณะของ transmembrane proteins ด้วยโปรแกรม TMHMM v. 2.0 พบว่าโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 แสดง transmembrane region จำนวน 6 บริเวณ ซึ่งประกอบไปด้วย intracellular และ extracellular regions โดยมีปลายทางด้าน N-terminus และ C-terminus อยู่ภายในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 5) ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP1 (Geadkaew A. *et al*, 2011), FgAQP2 (Geadkaew A. *et al*, 2011), FgAQP3 และ FgAQP4 ด้วยโปรแกรม EMBOSS Pepstats และ ClustalW2 พบว่า โปรตีนอะควอพอรินทั้ง 4 ไอโซฟอร์ม ประกอบด้วย NPA motifs จำนวน 2 ตำแหน่งด้วยกัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโปรตีนอะควอพอริน บริเวณ NPA motifs ดังกล่าวนี้นี้มีความสำคัญในการทำหน้าที่เป็น filter สำหรับการคัดเลือกโมเลกุลของสารที่ไม่มีขั้วขณะผ่านเข้าออกทางช่องของโปรตีนอะควอพอริน จากตารางที่ 1 พบว่า โปรตีน FgAQP3 และ FgAQP4 มี NPA motifs เป็น asparagine (N), proline (P) และ alanine (A) ทั้ง 2 ตำแหน่ง ขณะที่ FgAQP1 และ FgAQP2 นั้น มี 1st NPA motif เป็น threonine (T), alanine (A) และ alanine (A) และมี 2nd NPA motif เป็น asparagine (N), proline (P) และ alanine (A) ซึ่งจากรายงานของ Geadkaew A. *et al* พบว่า FgAQP1 และ FgAQP2 นั้น มีค่า water permeability ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับ rat AQP1 และไม่สามารถเป็นช่องทางผ่านสำหรับสารละลายไม่มีขั้วชนิดอื่น (เช่น ยูเรีย กลีเซอรอล) ได้ ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากลำดับของกรดอะมิโนแอสิดที่อยู่ในบริเวณ NPA motifs ดังกล่าว ดังนั้นจึงทำให้โปรตีนอะควอพอรินแต่ละไอโซฟอร์มมีความสามารถในการทำหน้าที่ในการเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของน้ำ หรือ สารละลายไม่มีขั้วชนิดอื่นๆ ได้แตกต่างกัน

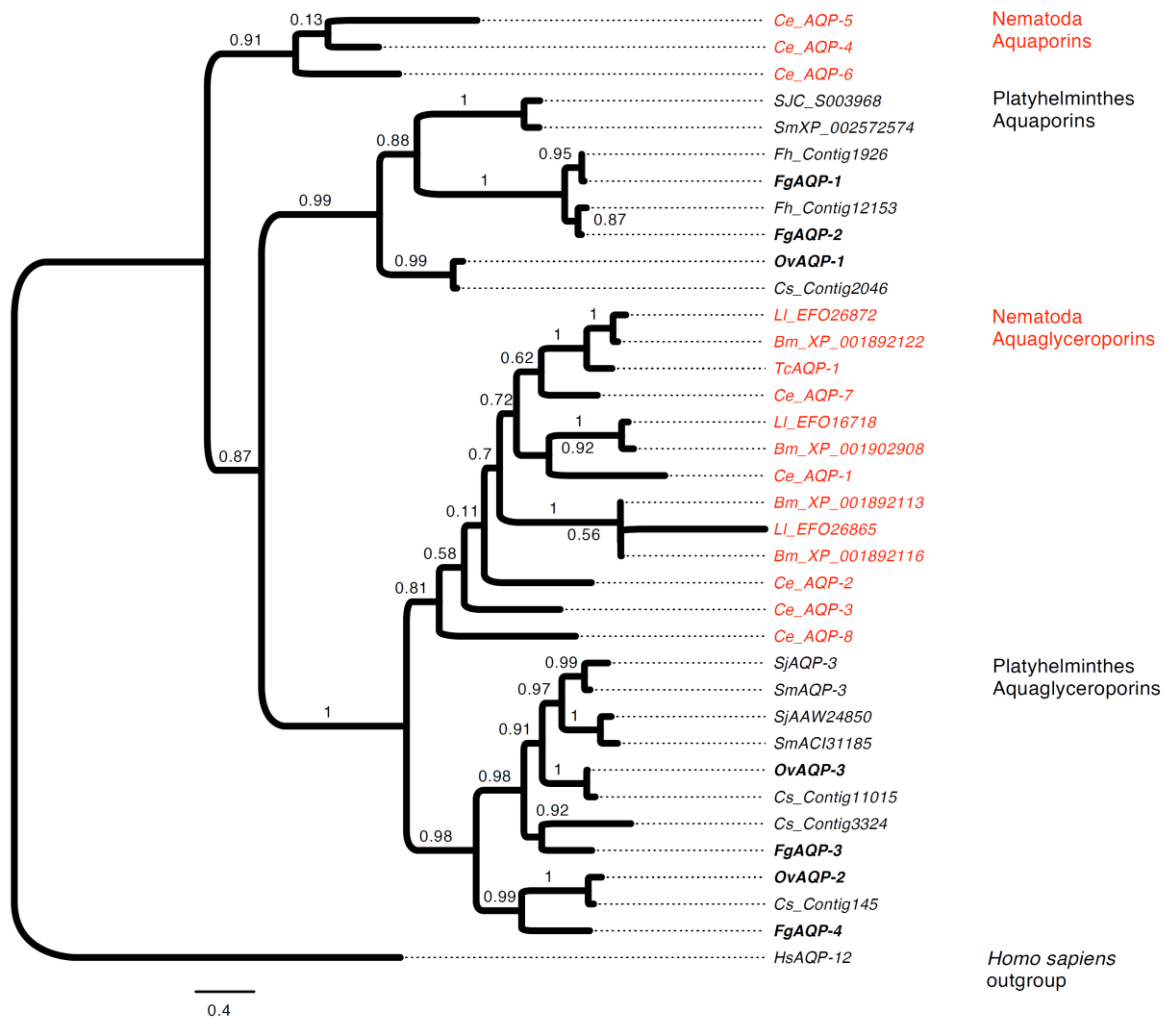


รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ลักษณะของ transmembrane regions ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ของพยาธิใบไม้ *F. gigantica* ด้วยโปรแกรม TMHMM v. 2.0

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP1, FgAQP2, FgAQP3 และ FgAQP4 ของพยาธิ *F. gigantica* (วิเคราะห์จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ EMBOSS Pepstats และ ClustalW2)

Isoforms	Residues (amino acids)	Calculated MW (kDa)	1 st NPA motif	2 nd NPA motif	References
FgAQP1	299	32.7	TAA	NPA	Geadkaew A. <i>et al</i> , 2011
FgAQP2	295	32.4	TAA	NPA	Geadkaew A. <i>et al</i> , 2011
FgAQP3	286	30.6	NPA	NPA	unpublished data
FgAQP4	310	33.8	NPA	NPA	unpublished data

ผลการวิเคราะห์วิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนแอสิด (Phylogenetic tree) ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP1, FgAQP2, FgAQP3 และ FgAQP4 กับลำดับกรดอะมิโนแอสิดของ aquaporin homologs จากพยาธิชนิด Nematodes (*Brugia malayi*, *Caenorhabditis elegans*, *Loa loa*, *Taenia crassiceps*) และ Platyhelminthes (*Clonorchis sinensis*, *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica*, *Opisthorchis viverrini*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*) และ human AQP12 (ดังแสดงในรูปที่ 6) พบว่าโปรตีนอะควอพอริน FgAQP1 และ FgAQP2 มีความใกล้เคียงกับโปรตีนอะควอพอรินในกลุ่ม classical aquaporins (เป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของน้ำเพียงอย่างเดียว) ส่วน FgAQP3 และ FgAQP4 มีความใกล้เคียงกับโปรตีนอะควอพอรินในกลุ่มของ aquaglyceroporin (เป็นทางผ่านของน้ำและโมเลกุลขนาดเล็กไม่มีขั้วอื่นๆ เช่น แอมโมเนีย และกลีเซอรอล) ค่า distance tree ระหว่าง parasite aquaporins และ human AQP12 นั้นไม่มีความใกล้เคียงกัน โดย human AQP12 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มอะควอพอรินที่มีความแตกต่างกันโดยสิ้นเชิงของลำดับกรดอะมิโนแอสิด (out group) กับ parasite aquaporins



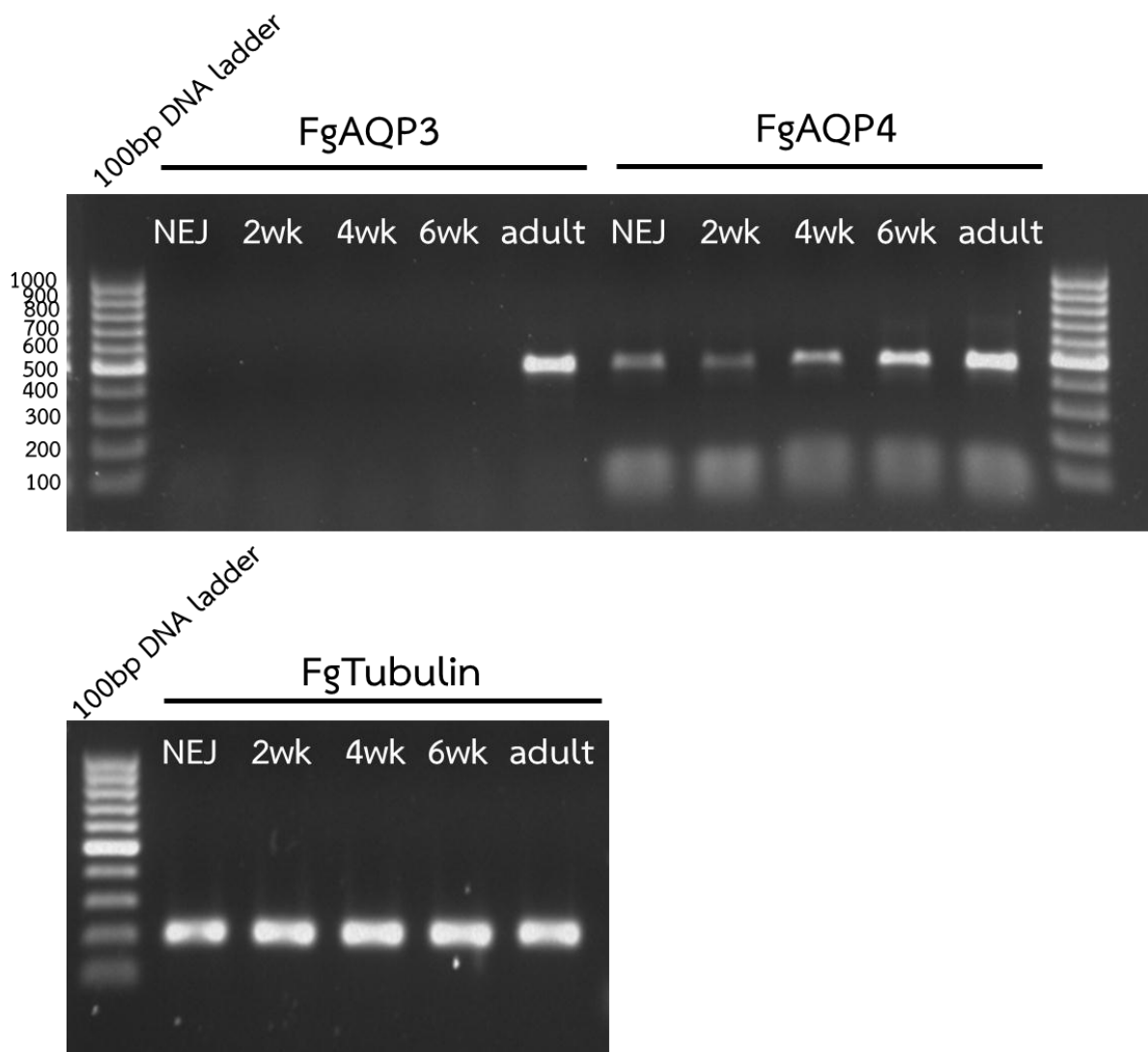
รูปที่ 6 วิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนแอซิด (Phylogenetic tree) ของโปรตีนอะควาพอริน FgAQP1, FgAQP2, FgAQP3 และ FgAQP4 กับโปรตีนอะควาพอรินของพยาธิชนิด Nematodes (round worms) และ Platyhelminthes (flat worms) โดยโปรแกรม PhyML

Bm; *Brugia malayi*, Ce; *Caenorhabditis elegans*, Cs; *Clonorchis sinensis*, Fg; *Fasciola gigantica*, Fh; *Fasciola hepatica*, Hs; *Homo sapiens*, Ll; *Loa loa*, Ov; *Opisthorchis viverrini*, Sj; *Schistosoma japonicum*, Sm; *Schistosoma mansoni*, Tc; *Taenia crassiceps*

2. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ของพยาธิ *F. gigantica*

ในระหว่างการเจริญเติบโตในโฮสต์สุดท้าย ด้วยเทคนิค reverse transcriptase PCR

จากผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ในพยาธิ *F. gigantica* ในระดับ RNA ของช่วงที่มีการเจริญเติบโตในโฮสต์สุดท้าย (final host) คือ ระยะ newly excysted juvenile (NEJ), 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์, 6 สัปดาห์ และระยะตัวเต็มวัย โดยมียีน Tubulin ของพยาธิ *F. gigantica* (FgTubulin) เป็นยีนควบคุมภายใน (internal control) จากผลการทดลอง (รูปที่ 7) พบว่ายีน อะควอพอริน FgAQP3 ถูกแสดงออกในระดับ RNA ในพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัยเพียงระยะเดียว ส่วนยีนอะควอพอริน FgAQP4 ถูกแสดงออกในระดับ RNA ในพยาธิ *F. gigantica* ทุกระยะของการเจริญเติบโต (ตั้งแต่ NEJ จนถึงระยะตัวเต็มวัย) โดยมีการแสดงออกของยีนในปริมาณมากที่สุดในระยะตัวเต็มวัย สำหรับยีนควบคุมภายใน FgTubulin มีการแสดงออกของยีนที่เท่ากันในทุกระยะในพยาธิ *F. gigantica* (ตั้งแต่ระยะ NEJ จนถึงระยะตัวเต็มวัย) ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองแบบ multiplex PCR ของยีนอะควอพอรินแต่ละไอโซฟอร์มและยีนควบคุมภายใน FgTubulin ในหลอดทดลองเดียวกัน แต่ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนั้นไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างจำเพาะ

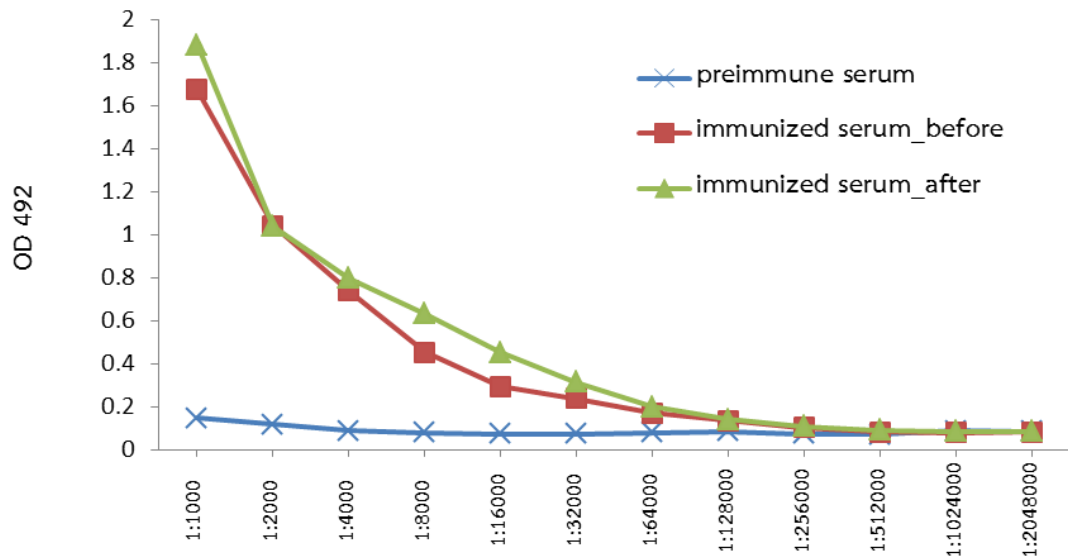


รูปที่ 7 Reverse transcriptase PCR เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอะควอพอริน FgAQP3, FgAQP4 และ FgTubulin ในพยาธิ *F. gigantica* ระยะต่างๆ ที่เจริญเติบโตในโฮสต์สุดท้าย (final host) คือ ระยะ newly excysted juvenile (NEJ), 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์, 6 สัปดาห์ และระยะตัวเต็มวัย ด้านซ้าย คือ 100 bp DNA Ladder (ThermoScientific, USA)

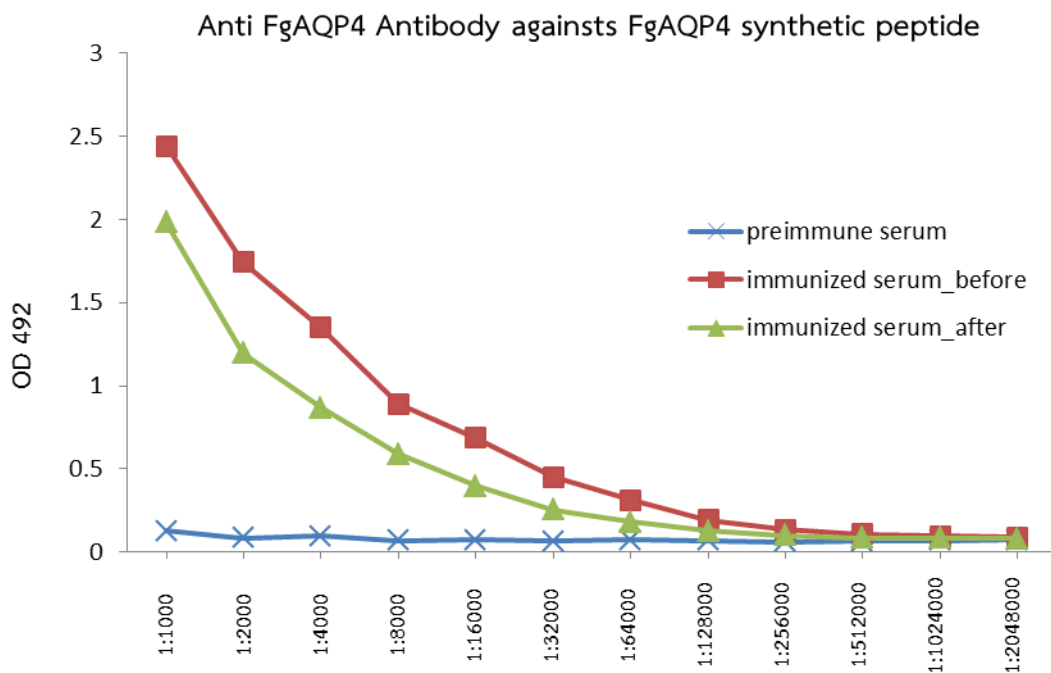
3. การทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อ synthetic peptides ของโปรตีน อะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 โดยวิธี ELISA

หลังจากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วย synthetic peptides ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 แล้ว จึงนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด (โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3 synthetic peptide และโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP4 synthetic peptide) มาทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้ต่อ synthetic peptide ที่ใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นหนูทดลอง โดยวิธี ELISA ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า ซีรัมของหนูก่อนการกระตุ้นด้วย synthetic peptides (preimmune serum) ไม่สามารถจับกับ synthetic peptide หรือจับได้น้อยมาก (OD_{492} ประมาณ 0.08-0.15) เมื่อเทียบกับซีรัมของหนูหลังการกระตุ้นด้วย synthetic peptides (immunized serum_before, OD_{492} ประมาณ 0.08-1.7) และเมื่อนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไปกำจัด anti KLH antibody ออก ด้วย KLH agarose column พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ (immunized serum_after) ยังสามารถจับกับ synthetic peptide ที่ใช้เป็นแอนติเจนได้หรืออาจน้อยกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์ เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 8 และ 9

Anti FgAQP3 Antibody againsts FgAQP3 synthetic peptide



รูปที่ 8 การทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดี (anti FgAQP3 antibody) ต่อ FgAQP3 synthetic peptide โดยเปรียบเทียบกับซีรัมของหนูก่อนการฉีดกระตุ้น (preimmune serum), ซีรัมของหนูหลังฉีดกระตุ้น (immunized serum_before, ก่อนการทำให้บริสุทธิ์) และซีรัมของหนูหลังฉีดกระตุ้น (immunized serum_after, หลังการทำให้บริสุทธิ์)



รูปที่ 9 การทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดี (anti FgAQP4 antibody) ต่อ FgAQP4 synthetic peptide โดยเปรียบเทียบกับซีรัมของหนูก่อนการฉีดกระตุ้น (preimmune serum), ซีรัมของหนูหลังฉีดกระตุ้น (immunized serum_before, ก่อนการทำให้บริสุทธิ์) และซีรัมของหนูหลังฉีดกระตุ้น (immunized serum_after, หลังการทำให้บริสุทธิ์)

4. การเปรียบเทียบอัตราส่วนในการทำปฏิกิริยาต่อ synthetic peptide และโปรตีน KLH ที่ใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นหนูทดลอง ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (anti FgAQP3 antibody และ anti FgAQP4 antibody) โดยวิธี ELISA

เนื่องจากในขั้นตอนการผลิตแอนติบอดีนั้น ได้มีการเชื่อม synthetic peptide กับโปรตีน KLH (ทำหน้าที่เป็น immunostimulator/adjuvant) เพื่อเป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นหนูทดลอง ซึ่งอาจจะทำให้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นมี anti KLH antibody รวมอยู่ด้วย ซึ่งถ้าหากมีแอนติบอดีดังกล่าวในอัตราส่วนที่สูงอาจจะมีการทดสอบเมื่อนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ไปผ่าน KLH agarose column (USBiological, USA) เพื่อกำจัด anti KLH antibody ผลการทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด (anti FgAQP3 antibody และ FgAQP4 antibody) ต่อ synthetic peptide และ KLH ที่ใช้เป็นแอนติเจน โดยนำอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงมาเปรียบเทียบกัน (OD_{492} synthetic peptide/ OD_{492} KLH) ทั้งก่อนและหลังการนำไปผ่าน KLH agarose

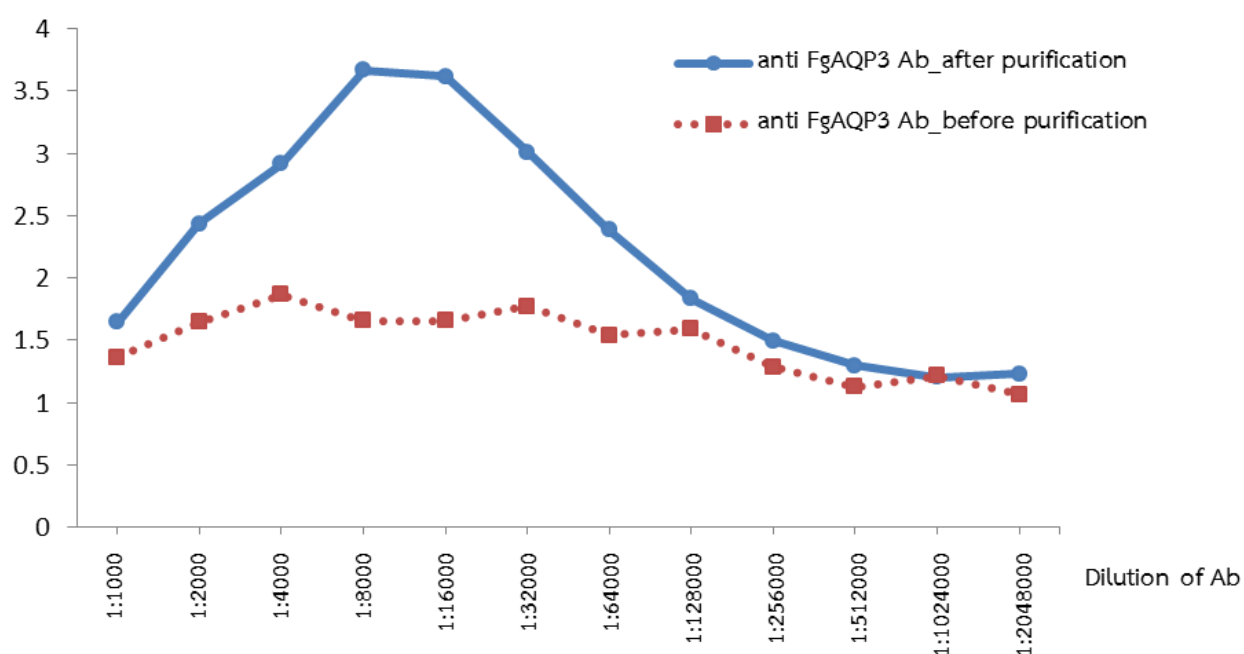
column (immunized serum_after purification และ immunized serum_after purification) จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่า ทั้งโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3 และ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP4 นั้นสามารถจับกับ synthetic peptide ได้ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกับโปรตีน KLH (ratio of OD₄₉₂ synthetic peptide/OD₄₉₂ KLH = 1.0-1.7) สำหรับโพลีโคลนอลแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (immunized serum_before purification) และเมื่อนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย agarose KLH column แล้ว (immunized serum_after purification) พบว่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงนั้น มีค่าสูงขึ้น (ratio of OD₄₉₂ synthetic peptide/OD₄₉₂ KLH = 1.3-3.6 สำหรับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3 และ ratio of OD₄₉₂ synthetic peptide/OD₄₉₂ KLH = 1.3-2.3 สำหรับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3) ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 และรูปที่ 10 และ 11

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า คณะผู้วิจัยสามารถกำจัด anti KLH antibody ออกจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3 และ FgAQP4 ได้บางส่วน และให้ผลเป็นที่น่าพอใจเมื่อเปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์ โดยคณะผู้วิจัยจะนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ไปใช้สำหรับการทดลองต่อไป (สำหรับเทคนิค Western blot detection และ Immunohistochemistry)

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของ anti FgAQP3 antibody ต่อแอนติเจน FgAQP3 synthetic peptide และโปรตีน KLH

Dilution of anti FgAQP3 antibody	Anti FgAQP3 antibody (before purification)			Anti FgAQP3 antibody (after purification)		
	OD ₄₉₂ of FgAQP3 synthetic peptide (average)	OD ₄₉₂ of KLH (average)	Ratio of OD synthetic peptide/OD KLH	OD ₄₉₂ of FgAQP3 synthetic peptide (average)	OD ₄₉₂ of KLH (average)	Ratio of OD synthetic peptide/OD KLH
1:1000	1.674	1.229	1.362	1.884	1.143	1.648
1:2000	1.042	0.633	1.647	1.039	0.427	2.433
1:4000	0.740	0.396	1.869	0.799	0.274	2.914
1:8000	0.454	0.274	1.657	0.632	0.172	3.664
1:16000	0.295	0.178	1.657	0.454	0.125	3.614
1:32000	0.240	0.136	1.771	0.315	0.104	3.010
1:64000	0.173	0.113	1.538	0.202	0.084	2.385
1:128000	0.135	0.085	1.588	0.142	0.077	1.832

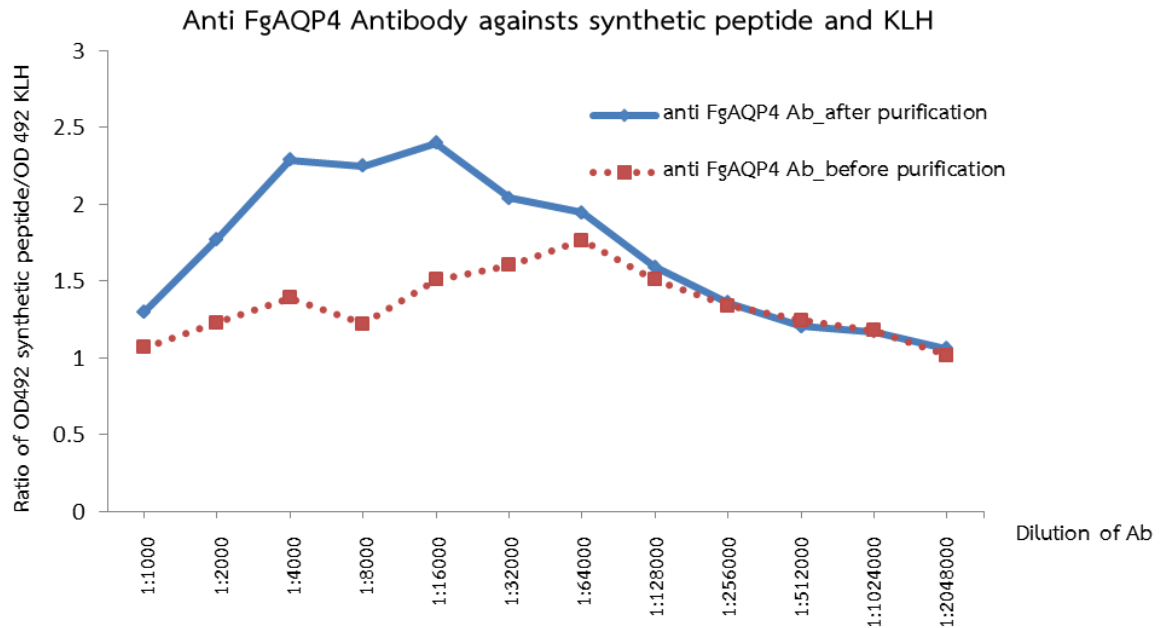
1:256000	0.104	0.081	1.286	0.110	0.073	1.497
1:512000	0.084	0.074	1.128	0.092	0.070	1.298
1:1024000	0.082	0.067	1.216	0.086	0.071	1.204
1:2048000	0.083	0.078	1.065	0.086	0.069	1.230



รูปที่ 10 แสดงค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสง (Ratio of OD synthetic peptide/OD KLH) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของ anti FgAQP3 antibody (ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์) ต่อแอนติเจน FgAQP3 synthetic peptide และโปรตีน KLH

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของ anti FgAQP4 antibody ต่อแอนติเจน FgAQP4 synthetic peptide และโปรตีน KLH

Dilution of anti FgAQP4 antibody	Anti FgAQP4 antibody (before purification)			Anti FgAQP4 antibody (after purification)		
	OD ₄₉₂ of FgAQP4 synthetic peptide (average)	OD ₄₉₂ of KLH (average)	Ratio of OD synthetic peptide/OD KLH	OD ₄₉₂ of FgAQP4 synthetic peptide (average)	OD ₄₉₂ of KLH (average)	Ratio of OD synthetic peptide/OD KLH
1:1000	2.442	2.286	1.068	1.982	1.524	1.301
1:2000	1.744	1.420	1.228	1.195	0.675	1.770
1:4000	1.351	0.971	1.391	0.868	0.379	2.289
1:8000	0.890	0.728	1.222	0.590	0.263	2.248
1:16000	0.686	0.455	1.509	0.397	0.166	2.399
1:32000	0.449	0.281	1.601	0.255	0.125	2.040
1:64000	0.312	0.177	1.765	0.179	0.092	1.946
1:128000	0.193	0.128	1.508	0.126	0.079	1.589
1:256000	0.134	0.100	1.340	0.101	0.074	1.358
1:512000	0.108	0.087	1.243	0.083	0.069	1.203
1:1024000	0.096	0.082	1.178	0.083	0.071	1.169
1:2048000	0.090	0.089	1.017	0.082	0.077	1.058



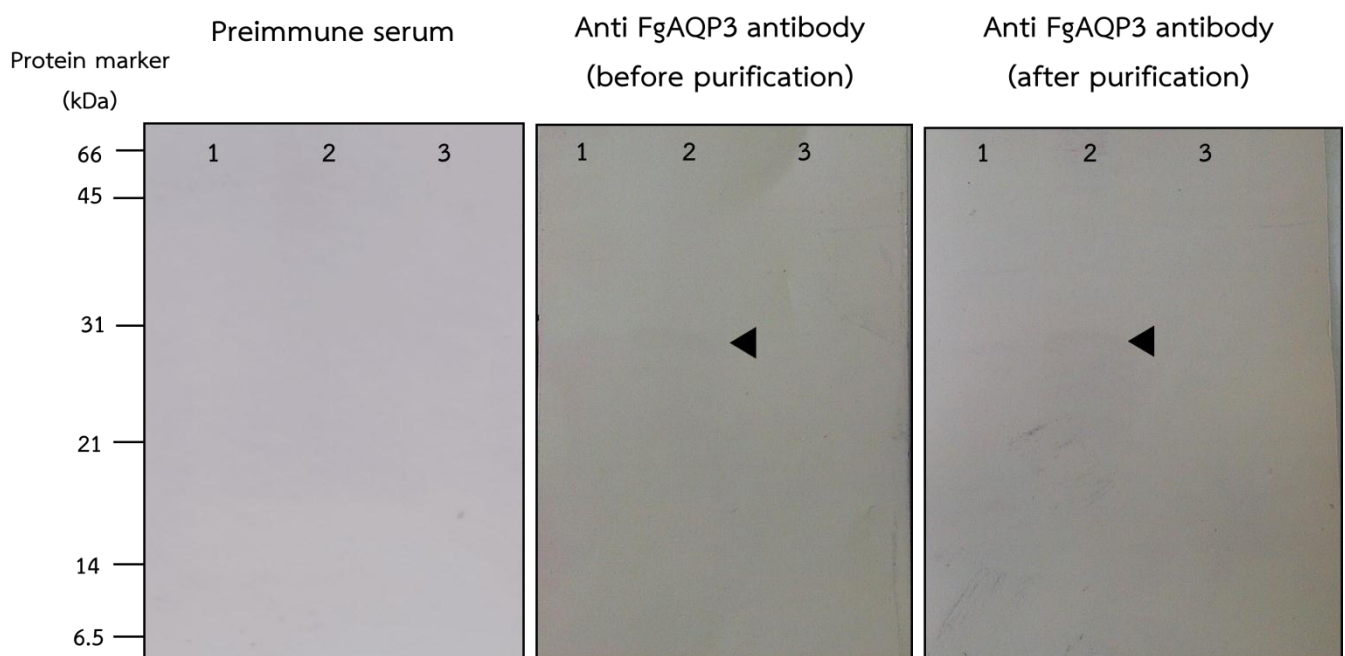
รูปที่ 11 แสดงค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสง (Ratio of OD synthetic peptide/OD KLH) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของ anti FgAQP4 antibody (ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์) ต่อแอนติเจน FgAQP4 synthetic peptide และโปรตีน KLH

5. การตรวจหาโปรตีน FgAQP3 และ FgAQP4 จากสารสกัดโปรตีนชนิด insoluble protein extracts (IPE), soluble protein extracts (SPE) และ transmembrane extracts (TME) ของพยาธิ *F. gigantea* ระยะตัวเต็มวัย โดยวิธี Western blot analysis

จากการทดสอบเพื่อตรวจหาโปรตีน FgAQP3 และ FgAQP4 ในสารสกัดโปรตีนชนิด IPE (insoluble protein extracts), SPE (soluble protein extracts) และ TME (transmembrane extracts) โดยใช้โพลีโคลนอล แอนติบอดีต่อ FgAQP3 และ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP4 ด้วยวิธี Western blot analysis จากผลการทดสอบพบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3 สามารถจับกับโปรตีนขนาดประมาณ 31 กิโลดาลตัน ในสารสกัดโปรตีนชนิด TME ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 ที่คำนวณได้จากลำดับกรดอะมิโนแอสิด (30.6 กิโลดาลตัน จากตารางที่ 1) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3 สามารถจับกับโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 ในสารสกัดโปรตีนชนิด TME (transmembrane extracts) ซึ่งอยู่ในรูป native form ได้ โดยให้สัญญาณค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 ที่อยู่ในพยาธิใบไม้ *F. gigantea* มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสัดส่วนของโปรตีนทั้งหมด โดยโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3 ทั้งก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ แสดงความเข้มของสัญญาณได้ไม่แตกต่างกัน และซีรัมของหนูก่อนการถูกกระตุ้นด้วย FgAQP3 synthetic peptide ไม่แสดงความเข้มของสัญญาณใดๆ หรือไม่สามารถจับโปรตีนจากสารสกัดของพยาธิ *F. gigantea* ได้เลย ดังแสดงในรูปที่ 12

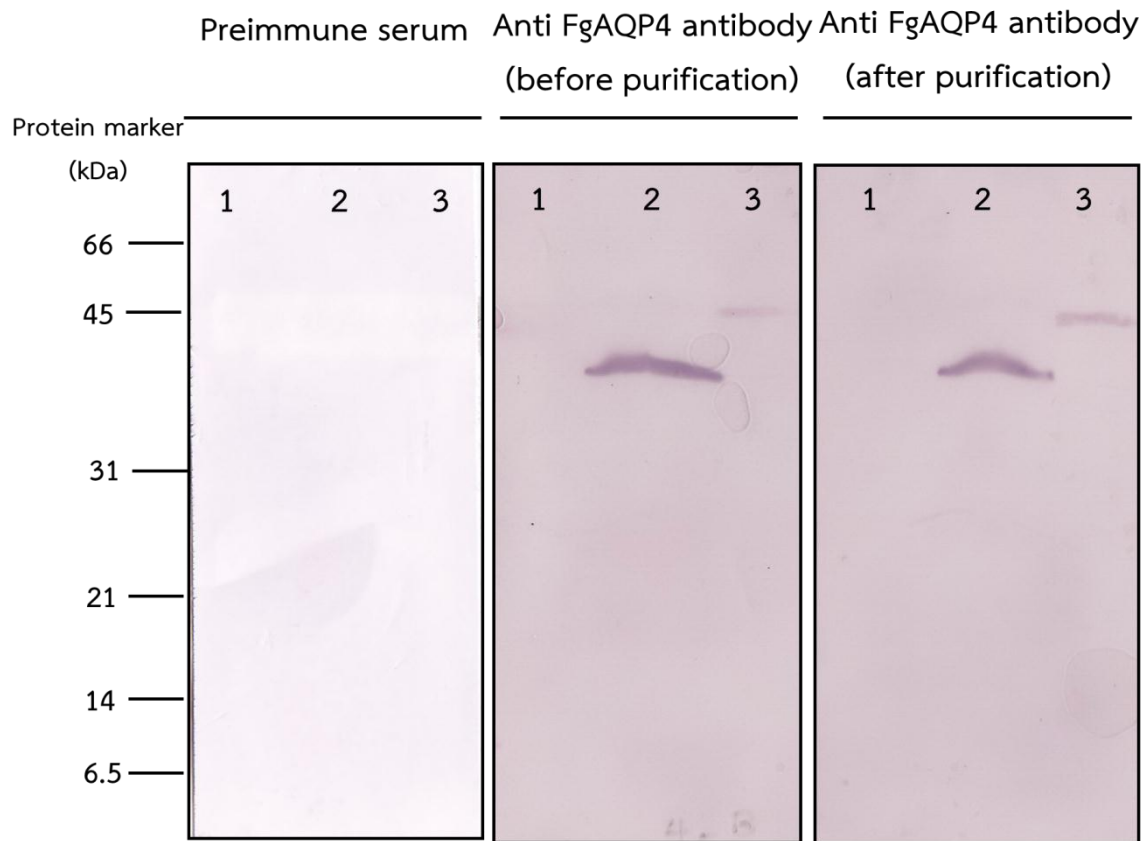
สำหรับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP4 นั้น สามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาด 35-40 กิโลดาลตัน (ให้สัญญาณที่เข้มมาก) ในสารสกัดโปรตีนชนิด TME และยังพบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งมีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (ให้สัญญาณที่เข้มน้อยกว่า) ในสารสกัดโปรตีนชนิด SPE ซึ่งคาดว่าเกิดจากยังมีโปรตีนอะควอพอรินบางส่วนอยู่ สารสกัดโปรตีนชนิด SPE และขนาดที่พบมีขนาดใหญ่กว่าเนื่องจากสารละลายที่ใช้เตรียมโปรตีนชนิด SPE นั้นไม่สามารถ denature โปรตีนอะควอพอรินได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้ขนาดของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 ที่พบนั้นมีขนาดใหญ่กว่าที่พบใน TME ซึ่งเตรียมจากสารละลายที่มีส่วนประกอบของ detergent (3% SDS) ที่สามารถ denature โปรตีนอะควอพอรินได้อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้ยังพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP4 ทั้งก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ แสดงความเข้มของสัญญาณได้ไม่แตกต่างกัน และซีรัมของหนูก่อนการถูกกระตุ้นด้วย FgAQP4 synthetic peptide ไม่แสดงความเข้มของสัญญาณใดๆ หรือ ไม่สามารถจับโปรตีนจากสารสกัดของพยาธิ *F. gigantica* ได้เลย ดังแสดงในรูปที่ 13

จากการวิเคราะห์ความเข้มของสัญญาณที่เกิดขึ้นของการตรวจหาโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 โดยวิธี Western blot analysis นั้น คาดการณ์ได้ว่าปริมาณของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP4 ในพยาธิ *F. gigantica* นั้นน่าจะมีปริมาณมากกว่าโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 ถึงแม้ว่าแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองนั้นแตกต่างกัน แต่จากผลการทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด โดยวิธี ELISA นั้น พบว่าแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด แสดงค่าความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นหนูทดลอง (synthetic peptides) ได้ใกล้เคียงกัน (ดังแสดงในรูปที่ 8 และรูปที่ 9)



รูปที่ 12 Western blot analysis เพื่อตรวจหา native form ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 ในสารสกัดโปรตีนของพยาธิ *F. gigantica* ชนิด insoluble protein extracts (ช่องที่ 1), transmembrane extracts (ช่อง

ที่ 2) และ soluble protein extracts ด้วย preimmune serum, anti FgAQP3 antibody (before purification) และ anti FgAQP3 antibody (after purification)



รูปที่ 13 Western blot analysis เพื่อตรวจหา native form ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP4 ในสารสกัดโปรตีนของพยาธิ *F. gigantica* ชนิด insoluble protein extracts (ช่องที่ 1), transmembrane extracts (ช่องที่ 2) และ soluble protein extracts ด้วย preimmune serum, anti FgAQP4 antibody (before purification) และ anti FgAQP4 antibody (after purification)

6. การหาตำแหน่งการสร้างโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ในเนื้อเยื่อของพยาธิ *F.*

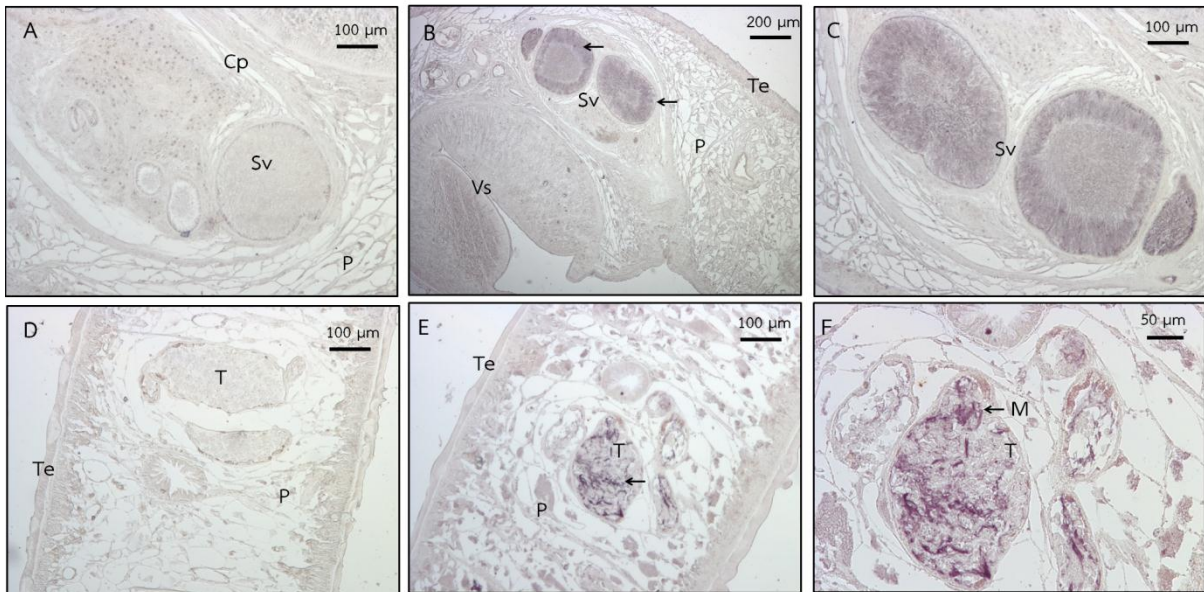
gigantica ระยะตัวเต็มวัย ด้วยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry)

จากผลการศึกษาตำแหน่งการกระจายตัวของโปรตีน FgAQP3 และ FgAQP4 ในเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantica* ด้วยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3 และ FgAQP4 พบว่า โปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 มีการกระจายตัวอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ เช่น testis และ seminal vesicle (ถุงบรรจุ mature sperm) โดยพบโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 ในสเปิร์มที่เจริญเต็มที่แล้ว จากบริเวณที่พบโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 อาจสรุปได้ว่าโปรตีนดังกล่าวมีความสำคัญต่อการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) หรือการเจริญเติบโตของสเปิร์ม (maturation) ของพยาธิใบไม้ *F. gigantica* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ RT-PCR (รูปที่ 7) เพื่อการแสดงออกของยีน FgAQP3 ในระยะต่างๆ ของพยาธิ *F. gigantica* ที่พบการแสดงออกของยีน FgAQP3 ในระยะตัวเต็มวัยเพียงระยะเดียว ซึ่งเป็นระยะที่พยาธิมีระบบสืบพันธุ์เจริญเต็มที่แล้วนั่นเอง ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบกับ preimmune serum ซึ่งไม่สามารถจับกับโปรตีนใดๆ ได้ในเนื้อเยื่อของพยาธิ *F. gigantica* ดังแสดงในรูปที่ 14

สำหรับโปรตีนอะควอพอริน FgAQP4 นั้น พบว่ามีการกระจายตัวของโปรตีนดังกล่าวอยู่โดยทั่วไปในเนื้อเยื่อของพยาธิ *F. gigantica* เช่น เนื้อเยื่อ parenchyma และ tegument ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ RT-PCR (รูปที่ 7) ที่พบว่ายีนอะควอพอริน FgAQP4 นั้นมีการแสดงออกตั้งแต่ระยะ newly excysted juvenile จนถึงระยะตัวเต็มวัย โดยได้เปรียบเทียบกับ การทดสอบ ด้วย preimmune serum ซึ่งไม่สามารถจับกับโปรตีนใดๆ ได้ในเนื้อเยื่อของพยาธิ ดังแสดงในรูปที่ 15 จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าโปรตีนอะควอพอริน FgAQP4 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการขนส่งน้ำในระหว่างเนื้อเยื่อของ parenchyma และระหว่างลำตัวของพยาธิและสิ่งแวดล้อมภายนอก

Preimmune serum (1:200)

Anti FgAQP3 antibody (1:200)



รูปที่ 14 การกระจายตัวของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 ในเนื้อเยื่อของพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) โดยการตรวจจับด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP3 (1:200) และ anti-mouse antibody conjugated alkaline phosphatase เปรียบเทียบกับซีรัมของหนูก่อนการทดลอง preimmune serum (1:200) โดยพบโปรตีนดังกล่าว (บริเวณสีม่วง) ในถุงบรรจุ mature sperm (seminal vesicle) และ ถุงอันทะ (testis)

Ca: caecum

Cs: cirrus pouch

M: mature sperm

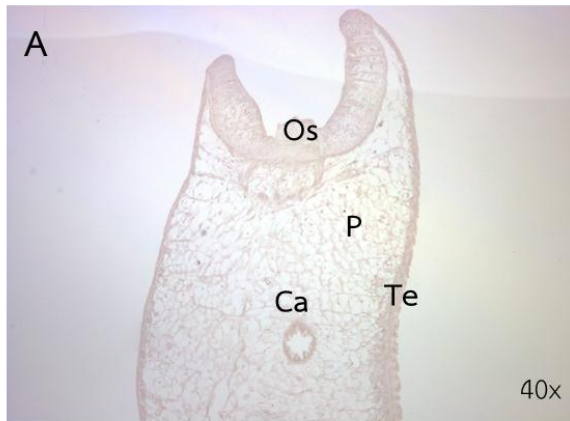
P: parenchyma

T: testis

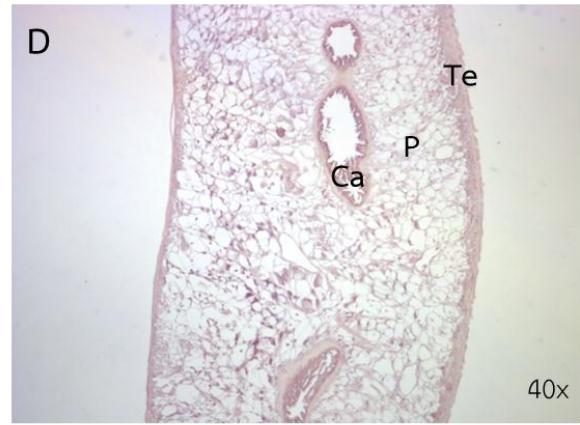
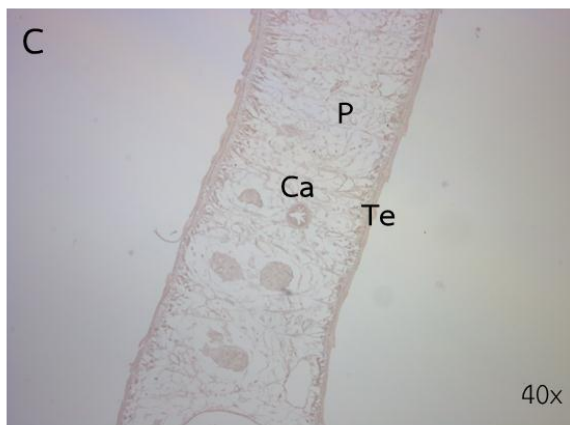
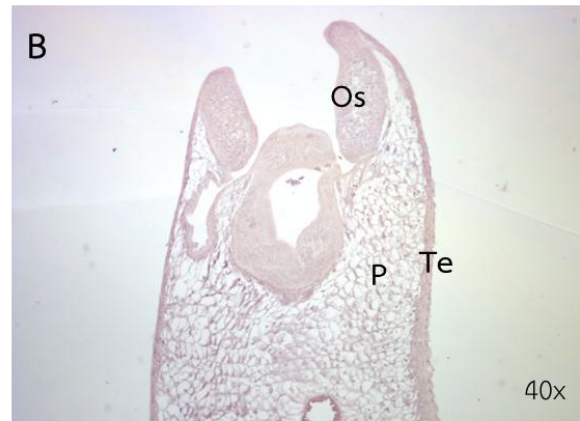
Te: tegument

Vs: ventral sucker

Preimmune serum (1:200)



Anti FgAQP4 antibody (1:200)



รูปที่ 15 การกระจายตัวของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP4 ในเนื้อเยื่อของพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) โดยการตรวจจับด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ FgAQP4 (1:200) (A และ C) และ anti-mouse antibody conjugated alkaline phosphatase เปรียบเทียบกับซีรัมของหนูก่อนการทดลอง preimmune serum (1:200) (B และ D) โดยพบโปรตีนดังกล่าว (บริเวณสีม่วง) ในเนื้อเยื่อ parenchyma และ tegument

Ca: caecum

Os: oral sucker

P: parenchyma

Te: tegument

7. การโคลน cDNAs บริเวณ coding sequences ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3, FgAQP4 และ OvAQP1-3 เข้าสู่เวกเตอร์ pOG2 และ pHA426MET25 เพื่อทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินในไข่กบ *Xenopus laevis* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ตามลำดับ

โคลนพลาสมิดถูกผสมที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินสำหรับโครงการวิจัยนี้ สามารถสรุปรายละเอียดได้ดังตารางที่ 4 นี้

ตารางที่ 4 โคลนของ FgAQP3, FgAQP4 และ OvAQP1-3 ในเวกเตอร์ pOG2 และ pHA426MET25 สำหรับการทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน

Clones	Restriction enzymes for cloning	Experimental functional analysis	HA tag for antibody detection
pOG2/FgAQP3	Xba I + Xho I	- <i>Xenopus</i> oocyte swelling assay (water, urea, glycerol)	Yes
pOG2/FgAQP4	Xba I + Xho I	- <i>Xenopus</i> oocyte swelling assay (water, urea, glycerol)	Yes
pOG2/OvAQP1	Xba I + Xho I	- <i>Xenopus</i> oocyte swelling assay (acetate)	Yes
pOG2/OvAQP2	Xba I + Xho I	- <i>Xenopus</i> oocyte swelling assay (acetate)	Yes
pOG2/OvAQP3	Xba I + Xho I	- <i>Xenopus</i> oocyte swelling assay (acetate)	Yes
pHA426MET25/FgAQP3	Aat II + Xho I	Yeast growth assay (ammonia and methylamine)	Yes
pHA426MET25/FgAQP4	BamH I + Xho I	Yeast growth assay (ammonia and methylamine)	Yes
pHA426MET25/OvAQP1	BamH I + Xho I	Yeast growth assay (ammonia and methylamine)	Yes
pHA426MET25/OvAQP2	BamH I + Xho I	Yeast growth assay (ammonia and methylamine)	Yes
pHA426MET25/OvAQP3	BamH I + Xho I	Yeast growth assay (ammonia and methylamine)	Yes

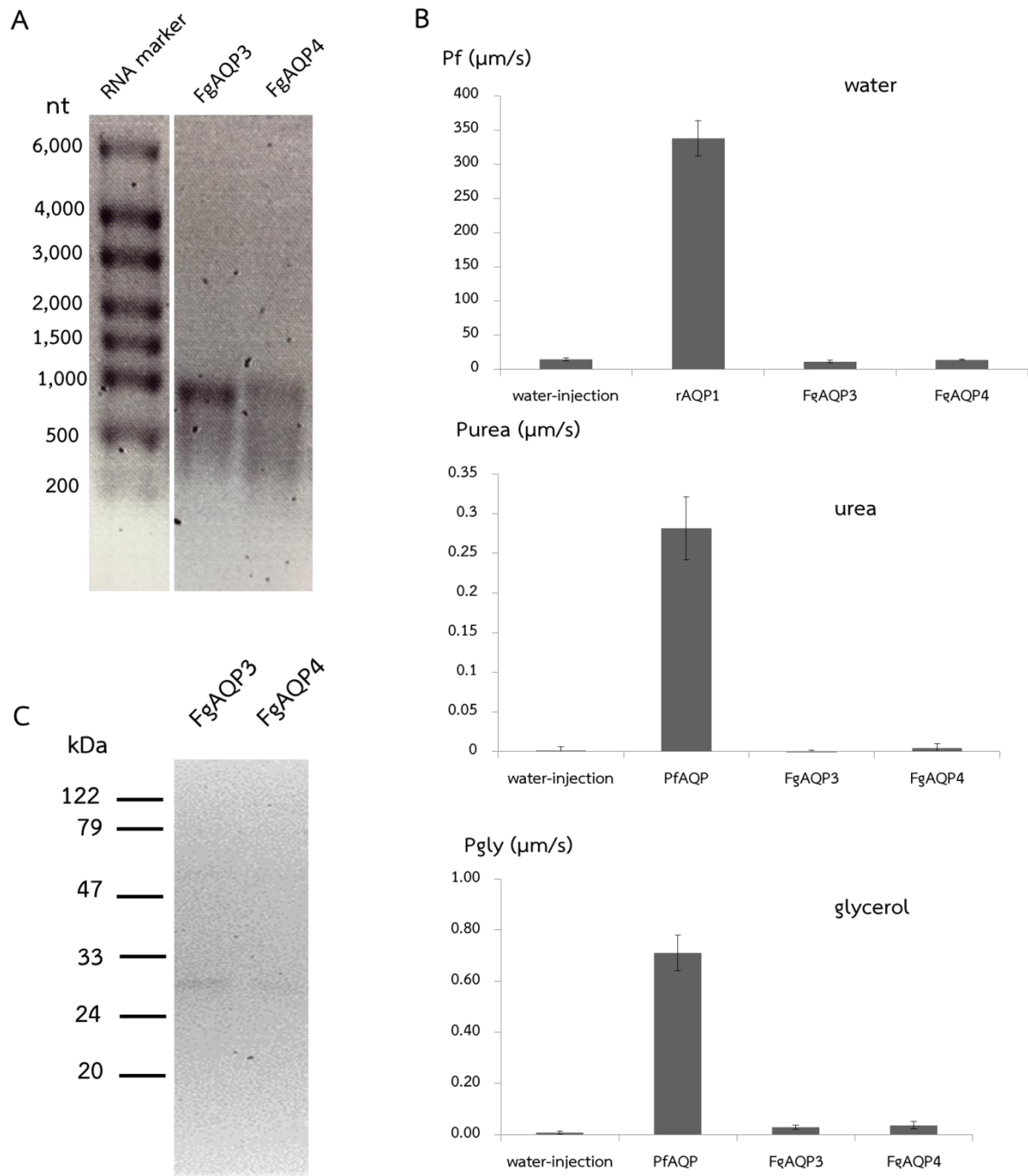
8. การทดสอบการเป็นช่องทางผ่านของน้ำ ยูเรีย และกลีเซอรอล ในไข่มุกของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4

cRNA ของ FgAQP3 และ FgAQP4 ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากชุด mMESSAGE mMACHINE transcription kit (Ambion) จากนั้นนำ cRNA มาแยกขนาดบน 1% RNA gel (ดังแสดงในรูปที่ 16A) cRNA ของ FgAQP3 และ FgAQP4 มีขนาดประมาณ 800-900 nt ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของ cDNA ของ FgAQP3 และ FgAQP4

จากผลการทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 (ดังแสดงในรูปที่ 16B) พบว่าไข่มุกที่ฉีดด้วย sterile water แสดงค่า permeability ของ น้ำ, ยูเรีย และ กลีเซอรอล ที่ 17 $\mu\text{m/s}$, 0 $\mu\text{m/s}$ และ 0 $\mu\text{m/s}$ ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงค่า base line ของไข่มุกที่สามารถเป็นช่องทางผ่านสารดังกล่าว และเมื่อฉีด cRNA ของ rat AQP1 (กลุ่มควบคุมผลบวกต่อ water permeability) หรือ PfAQP (กลุ่มควบคุมผลบวกต่อ urea and glycerol permeability) พบว่าแสดงค่า permeability ของน้ำ, ยูเรีย และ กลีเซอรอล ที่ 337 $\mu\text{m/s}$, 0.27 $\mu\text{m/s}$ และ 0.7 $\mu\text{m/s}$ ตามลำดับ

สำหรับไข่มุกที่ฉีดด้วย cRNA ของ FgAQP3 และ FgAQP4 แสดงค่า permeability ของน้ำ ที่ 11, 14 $\mu\text{m/s}$, ค่า permeability ของยูเรีย ที่ 0, 0 $\mu\text{m/s}$ และ ค่า permeability ของกลีเซอรอล ที่ 0.02, 0.03 $\mu\text{m/s}$ ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวไม่แตกต่างจากค่า base line ของไข่มุก ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า โปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ไม่สามารถเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของน้ำ, ยูเรีย และกลีเซอรอล ได้

ผลการทดลองเพื่อทดสอบการแสดงออกของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ในไข่มุก โดยเทคนิค Western blot analysis พบว่า โปรตีนทั้งสองชนิดถูกสร้างขึ้นในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ ที่ขนาดประมาณ 30 kDa ดังแสดงในรูปที่ 16C



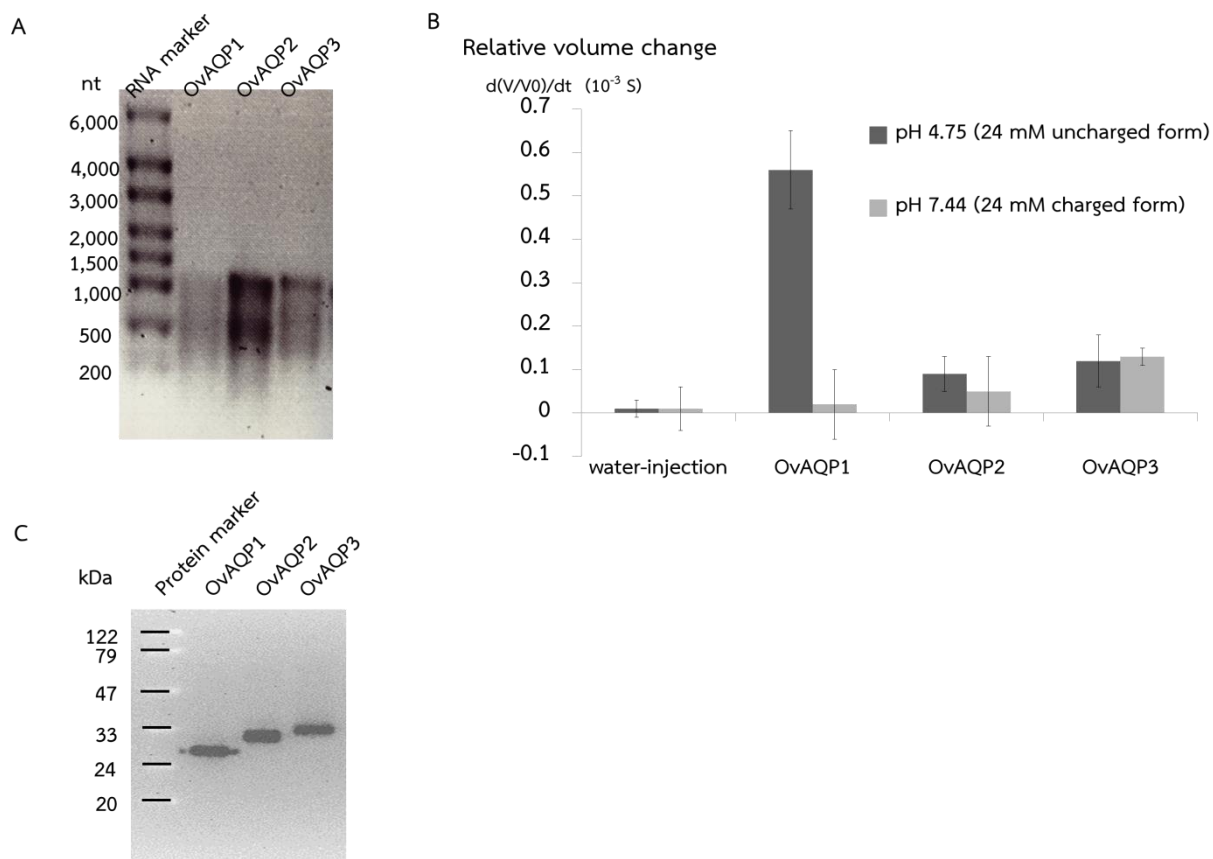
รูปที่ 16A แสดงคุณภาพและขนาดของ cRNA ของ FgAQP3 และ FgAQP4 บน RNA gel, 1% ด้านซ้ายแสดง RNA marker (Thermo Scientific), 16B แสดงค่า permeability ของน้ำ, ยูเรีย และกลีเซอรอล ของไข่กบที่ถูกฉีดด้วย cRNA หรือน้ำ ทั้ง 5 กลุ่ม (water-injection, rAQP1, PfAQP, FgAQP3 และ FgAQP4) กลุ่มละ 8-10 oocytes โดยแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละกลุ่มที่ด้านบนของกราฟแท่ง, 16C แสดงผล Western blot analysis ของ total membrane protein (1 oocyte/1 well) ที่สกัดได้จากไข่กบที่ถูกฉีดด้วย cRNA ของ FgAQP3 หรือ FgAQP4 และตรวจจับด้วย anti HA antibody (1:1,000, Roche) พบว่าโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 ถูกสร้างในไข่กบในระดับที่ค่อนข้างต่ำ

จากผลการทดสอบในการเป็นช่องทางผ่านสำหรับน้ำ ยูเรีย และกลีเซอรอล ของโปรตีน FgAQP3 และ FgAQP4 ที่ให้เป็นผลลบ ทำให้คณะผู้วิจัยไม่ได้ดำเนินการต่อเพื่อศึกษาการเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของ lactate และ glucose (ดังที่ได้เสนอไว้กับสกว.) เนื่องจากโมเลกุลของสารทั้งสองนั้นมีขนาดใหญ่กว่าโมเลกุลของน้ำ อีกทั้งโดยทั่วไปแล้วโปรตีนอะควอพอรินจะต้องทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านสำหรับน้ำ ซึ่งเป็นหน้าที่พื้นฐานของโปรตีนอะควอพอริน แต่สำหรับโปรตีน FgAQP3 และ FgAQP4 นี้ ยังไม่สามารถทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของน้ำได้ คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าโปรตีนอะควอพอรินดังกล่าว ก็ไม่น่าจะเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลอื่นๆ ได้อีก ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงมุ่งตรงและให้ความสำคัญต่อโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิ *O. viverrini* สำหรับการศึกษาต่อไป ซึ่งจะเป็นการศึกษาต่อยอดจากโครงการวิจัยเรื่องอะควอพอริน, OvAQP1-3) จากพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*” สัญญาเลขที่ MRG5580189

9. การทดสอบการเป็นช่องทางผ่านของกรดอะซิติกหรืออะซิเตทของโปรตีนอะควอพอริน

OvAQP1, OvAQP2 และ OvAQP3

จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า กรดอะซิติกหรืออะซิเตทเป็นของเสียที่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ขับออกมาเพื่อเป็นลดความเป็นกรดภายในลำตัวของพยาธิ และจากการทดสอบการเป็นช่องทางผ่านของกรดอะซิติกของโปรตีนอะควอพอริน OvAQP1-3 ในไข่กบ (ดังแสดงในรูปที่ 17B) พบว่า โปรตีนอะควอพอริน OvAQP1 สามารถเป็นช่องทางผ่านสำหรับกรดอะซิติกได้ดีกว่าโปรตีนอะควอพอริน OvAQP2 และ OvAQP3 ในขณะที่กลุ่ม oocyte ที่ฉีดด้วย sterile water เป็นกลุ่มควบคุมผลลบ โปรตีนอะควอพอริน OvAQP1 สามารถ conduct กรดอะซิติกที่อยู่ในรูปของ uncharged form เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่โปรตีนอะควอพอริน OvAQP2 และ OvAQP3 สามารถ conduct กรดอะซิติกทั้งที่อยู่ในรูป uncharged และ charged แต่อยู่ในสัดส่วนที่น้อยกว่า OvAQP1 ซึ่งคุณสมบัติการเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลที่มีขั้ว เป็นคุณสมบัติที่พบน้อยมากของโปรตีนอะควอพอรินที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไป



รูปที่ 17A แสดงคุณภาพและขนาดของ cRNA ของ OvAQP1-3 บน RNA gel, 1% ด้านซ้ายแสดง RNA marker (Thermo Scientific), 17B แสดงค่า relative volume change ของไข่บดหลังถูกฉีดด้วย cRNA หรือน้ำ ทั้ง 4 กลุ่ม (water-injection, OvAQP1, OvAQP2 และ OvAQP3) แต่ละกลุ่มประกอบไปด้วย oocyte ที่ใช้ในการทดลองจำนวน 8-10 ฟอง โดยแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละกลุ่มที่ด้านบนของกราฟแท่ง, 17C แสดงผล Western blot analysis ของ total membrane protein (1 oocyte/1 well) ที่สกัดได้จากไข่บดที่ถูกฉีดด้วย cRNA ของ OvAQP1 หรือ OvAQP2 หรือ OvAQP3 และตรวจจับด้วย anti HA antibody (1:1,000, Roche) พบว่าโปรตีนอะควอพอรินทั้งสามไอโซฟอร์มถูกสร้างในไข่บดในระดับที่ค่อนข้างสูง และมีขนาดของโปรตีนถูกต้อง

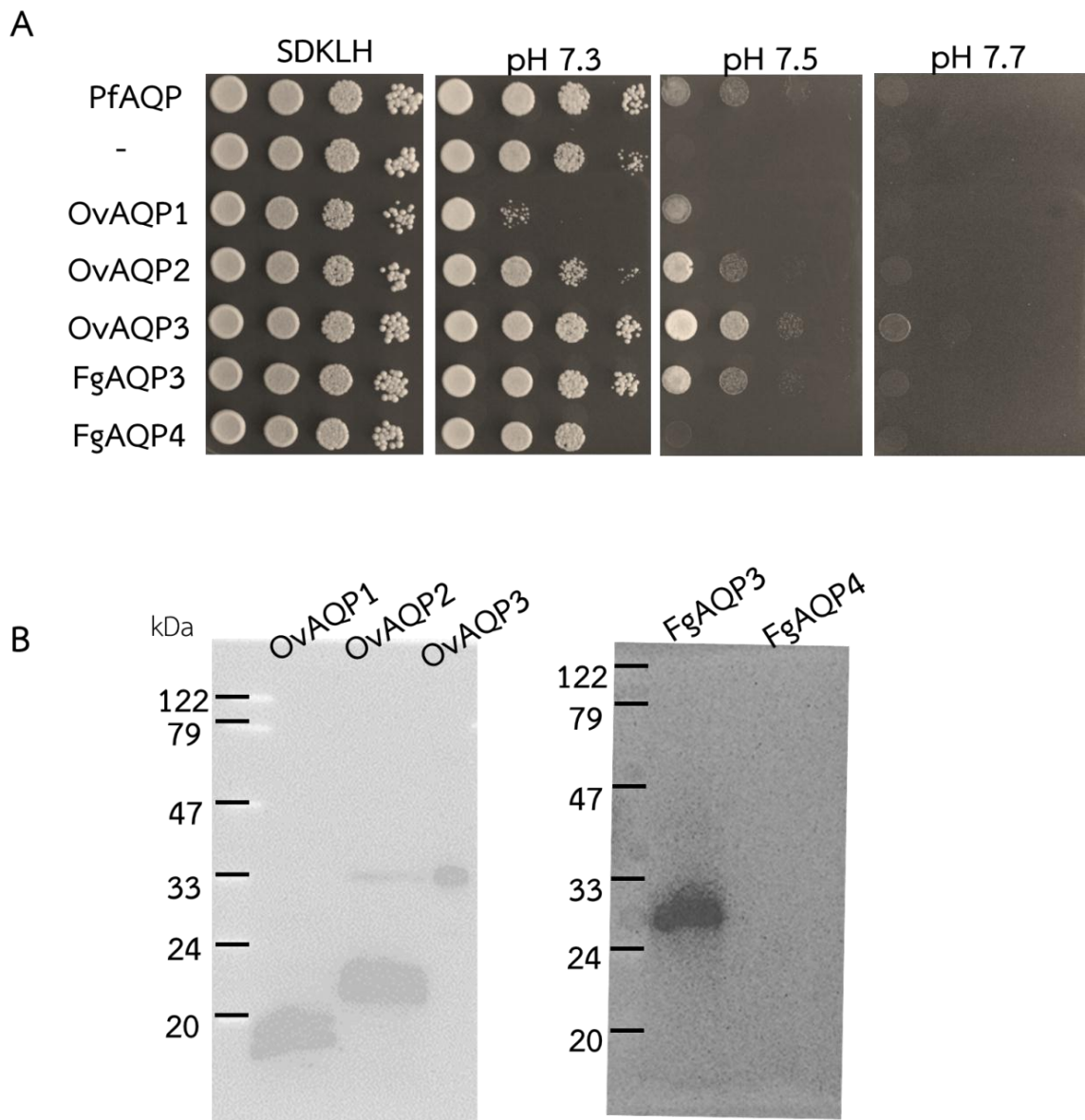
10. การทดสอบการเป็นช่องทางผ่านของแอมโมเนียของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3, FgAQP4 และ OvAQP1-3 โดยวิธี Phenotypic yeast assay

การทดสอบหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน นอกจากจะทำการทดลองในไข่มุกแล้วยังสามารถทำการทดลองในยีสต์ได้อีกด้วย การทดสอบความสามารถของโปรตีนอะควอพอรินในการเป็นช่องทางผ่านสำหรับแอมโมเนียและเมทิลลามีนนั้นต้องทำการทดสอบในยีสต์ เนื่องจากสารดังกล่าวนี้มีความเป็นพิษต่อไข่มุก การทดสอบในยีสต์นั้นอาศัยการเจริญเติบโตของยีสต์ที่มีการดัดแปลงสายพันธุ์และถูก transformed ด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มีสารพันธุกรรมของอะควอพอรินอยู่ จากนั้นนำยีสต์ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียหรือเมทิลลามีนเป็นส่วนประกอบ

จากรูปที่ 18A ยีสต์สายพันธุ์ 31019bΔfps1 ที่ถูก transformed ด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มีสารพันธุกรรมสำหรับโปรตีนอะควอพอริน PfAQP (กลุ่มควบคุมผลบวก), OvAQP1, OvAQP2, OvAQP3, FgAQP3 และ FgAQP4 หรือกลุ่มควบคุมผลลบ (pHA426MET25, -) สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDKLH (control) ได้ดีเท่าๆ กัน แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนีย (5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) เป็นสารประกอบหลักนั้น พบว่า ที่ pH 7.5 ยีสต์ที่ถูก transformed ด้วย PfAQP, OvAQP1, OvAQP2, OvAQP3 และ FgAQP3 สามารถเจริญเติบโตได้ โดย OvAQP3 และ FgAQP3 สามารถเจริญเติบโตได้ถึง dilution 10^{-3} ส่วน FgAQP4 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เลย

จากรูปที่ 18B ผลการทดลอง Western blot analysis ของ microsomal fraction ของยีสต์ที่ถูก transformed ด้วยสารพันธุกรรมของโปรตีน OvAQP1-3, FgAQP3 และ FgAQP4 แล้วตรวจจับด้วย anti HA antibody พบว่า OvAQP1-3 และ FgAQP3 ถูกสร้างขึ้นในยีสต์สายพันธุ์ 31019bΔfps1 ส่วน FgAQP4 ไม่ถูกสร้างขึ้นในยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าว

จากผลการทดลองดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่า OvAQP1-3 และ FgAQP3 สามารถเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของแอมโมเนียได้ ส่วน FgAQP4 ไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้ เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวไม่ได้ถูกสร้างขึ้นในยีสต์สายพันธุ์ 31019bΔfps1



รูปที่ 18A แสดง Ammonia yeast assay อาหารเลี้ยงเชื้อ SDKLH เป็นอาหารกลุ่มควบคุมที่มีสารอาหารครบถ้วน ยีสต์ทั้ง 7 transformants สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยเริ่มวาง dilution ของยีสต์แต่ละ transformant จาก $OD_{600} = 1$ ถึง 10^{-3} (จากซ้ายไปขวา) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียเป็นสารอาหารหลัก ที่ pH 7.3, 7.5 และ 7.7, 18B Western blot analysis ของ microsome fraction ของยีสต์แต่ละ transformants ที่ความเข้มข้นโปรตีน 40 μg /หลุม แล้วตรวจจับด้วย anti HA antibody (1:1,000, Roche)

- การทดสอบการเป็นช่องทางผ่านของเมทิลลามีของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3, FgAQP4 และ OvAQP1-3 โดยวิธี Phenotypic yeast assay

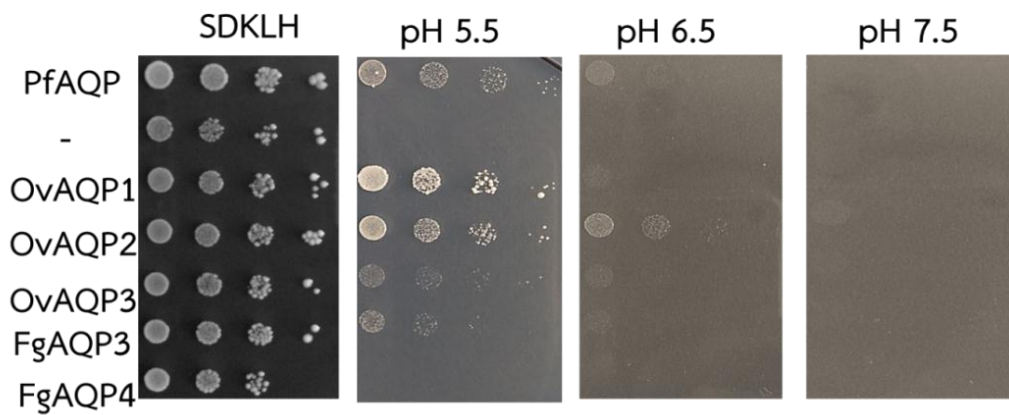
การทดสอบหน้าที่การเป็นช่องทางผ่านของเมทิลลามี้น สามารถทดสอบได้ในยีสต์สายพันธุ์ BY4742Δfps1 ซึ่งมี endogenous protein Mep1-3 และสามารถ conduct โมเลกุลของเมทิลลามี้นที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่เซลล์ของยีสต์ได้ หลังจากนั้น exogenous aquaporins ที่ถูกสร้างในยีสต์หลังกระบวนการ transformation และสามารถเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของเมทิลลามี้น จะนำเมทิลลามี้นออกจากเซลล์ของยีสต์ ทำให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้

จากรูปที่ 19A ยีสต์สายพันธุ์ BY4742Δfps1 ที่ถูก transformed ด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มีสารพันธุกรรมสำหรับโปรตีนอะควอพอริน PfAQP (กลุ่มควบคุมผลบวก), OvAQP1, OvAQP2, OvAQP3, FgAQP3, FgAQP4 หรือกลุ่มควบคุมผลลบ (pHA426MET25, -) สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDKLH (control) ได้ดีเท่าๆ กัน แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทิลลามี้น (50 mM, Methylamine) เป็นส่วนประกอบ ที่ pH 5.5 พบว่ายีสต์ที่ถูก transformed ด้วย PfAQP, OvAQP1, OvAQP2, OvAQP3 และ FgAQP3 สามารถเจริญเติบโตได้ โดย OvAQP1 และ OvAQP2 สามารถเจริญเติบโตได้ถึง dilution 10^{-3} ส่วน FgAQP4 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เลย

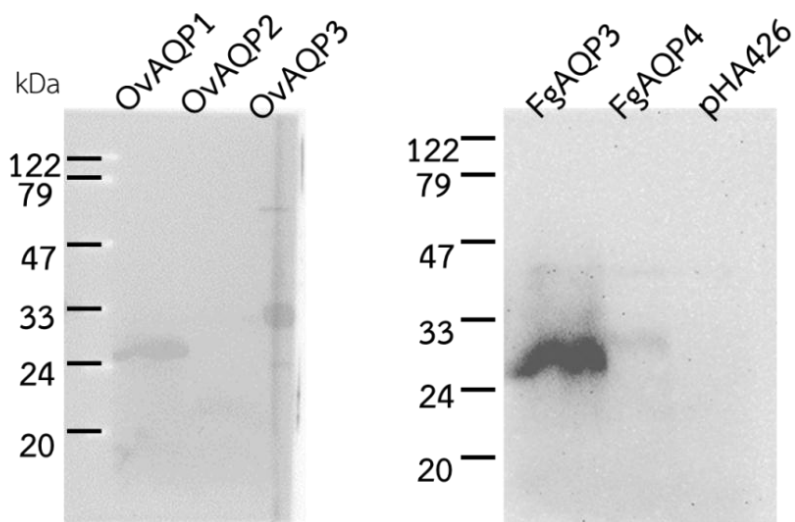
จากรูปที่ 19B ผลการทดลอง Western blot analysis ของ microsomal fraction ของยีสต์ที่ถูก transformed ด้วยสารพันธุกรรมของโปรตีน OvAQP1-3, FgAQP3 และ FgAQP4 แล้วตรวจจับด้วย anti HA antibody พบว่า OvAQP1-3, FgAQP3 และ FgAQP4 ถูกสร้างขึ้นในยีสต์สายพันธุ์ BY4742Δfps1 โดย OvAQP2 และ FgAQP4 ถูกสร้างขึ้นในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้นยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าว

จากผลการทดลองดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่า OvAQP1-3 และ FgAQP3 สามารถเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของเมทิลลามี้นได้ ส่วน FgAQP4 ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านสำหรับเมทิลลามี้น

A



B



รูปที่ 19A แสดง Methylamine efflux assay อาหารเลี้ยงเชื้อ SDKLH เป็นอาหารกลุ่มควบคุมที่มีสารอาหารครบถ้วน ยีสต์ทั้ง 7 transformants สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยเริ่มวาง dilution ของยีสต์แต่ละ transformant จาก $OD_{600} = 1$ ถึง 10^{-3} (จากซ้ายไปขวา) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเมทิลลามีน (50 mM methylamine) เป็นส่วนประกอบ ที่ pH 5.5, 6.5 และ 7.5, 19B Western blot analysis ของ microsome fraction ของยีสต์แต่ละ transformants ที่ความเข้มข้นโปรตีน 40 μg /หลุม แล้วตรวจจับด้วย anti HA antibody (1:1,000, Roche)

12. การยับยั้งการแสดงออกของยีนอะควอพอรินของพยาธิตัวตืด *O. viverrini* โดยเทคนิค Lentiviral delivery shRNA จากผลการทดลองขั้นต้นที่พบว่าโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิตัวตืด *O. viverrini* สามารถเป็นช่องทางผ่านสำหรับการขับของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม อย่างเช่น กรดอะซิติก ของพยาธิตัวตืดดังกล่าวได้ คณะผู้วิจัยจึงได้คิดค้นระบบที่จะยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิตัวตืด *O. viverrini* แล้วสังเกตการณ์ผลกระทบต่อพยาธิตัวตืด เช่น อัตราการมีชีวิตอยู่รอดของพยาธิตัวตืดหรือปริมาณของกรดอะซิติกที่ขับออกมาจากตัวพยาธิตัวตืด โดยใช้เทคนิค Lentiviral delivery shRNA (short hairpin RNA) ซึ่งในขณะนี้คณะผู้วิจัยได้เริ่มการโคลน nucleotide targets เข้าสู่เวกเตอร์ pLVX vector system และจะนำไปผลิต virus ที่สามารถขนส่ง shRNA เข้าสู่พยาธิตัวตืด *O. viverrini* แล้วศึกษาผลกระทบต่อพยาธิตัวตืดต่อไป

13. การศึกษาขั้นต้นเพื่อทดสอบการยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะควอพอริน OvAQP1-3 ด้วยยาขับปัสสาวะ

ในขณะนี้ คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกยาขับปัสสาวะที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะควอพอรินได้ เช่น sulfamyl, potassium-sparing และ thiazide ซึ่งจะนำมาศึกษาใน *Xenopus oocyte* ที่ถูกกระตุ้นให้สร้าง heterozygous aquaporin และในการศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีนอะควอพอรินโดยเทคนิค shRNA โดยในขั้นตอนแรกจะต้องทำการศึกษาถึงผลของยาขับปัสสาวะใน *Xenopus oocyte* ก่อนที่จะเริ่มนำยาขับปัสสาวะที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะควอพอรินมาทดลองในการทดสอบกับพยาธิตัวตืด *O. viverrini* โดยคณะผู้วิจัยจะทำการทดสอบยาขับปัสสาวะใน *Xenopus oocyte* system ณ ห้องปฏิบัติการ ของ Prof. Dr. Andrea Yool, University of Adelaide, Australia หลังจากนั้นจึงนำยาขับปัสสาวะมาทดสอบกับพยาธิตัวตืด *O. viverrini* ต่อไป

Preliminary blocking assays of OvAQP1, OvAQP2, OvAQP3 (Laboratory Prof. A. Yool, Adelaide, SA, Australia, April 2015). Cell swelling assays were performed using the standard *Xenopus oocyte* system. Confidential aquaporin blockers (AqB) available in the laboratory of Prof. Yool were used. These 13 AqBs were coded as 001, 006, 007, 011, 026, 028, 029, 044, 045, 047, 050, dimer, trimer. Experiments started by recording oocyte swelling first in the absence of AqB and then in the presence of AqB. Swelling rates in absence and presence of AqB were compared to conclude the effect of AqB on water permeability of OvAQP1, OvAQP2, OvAQP3.

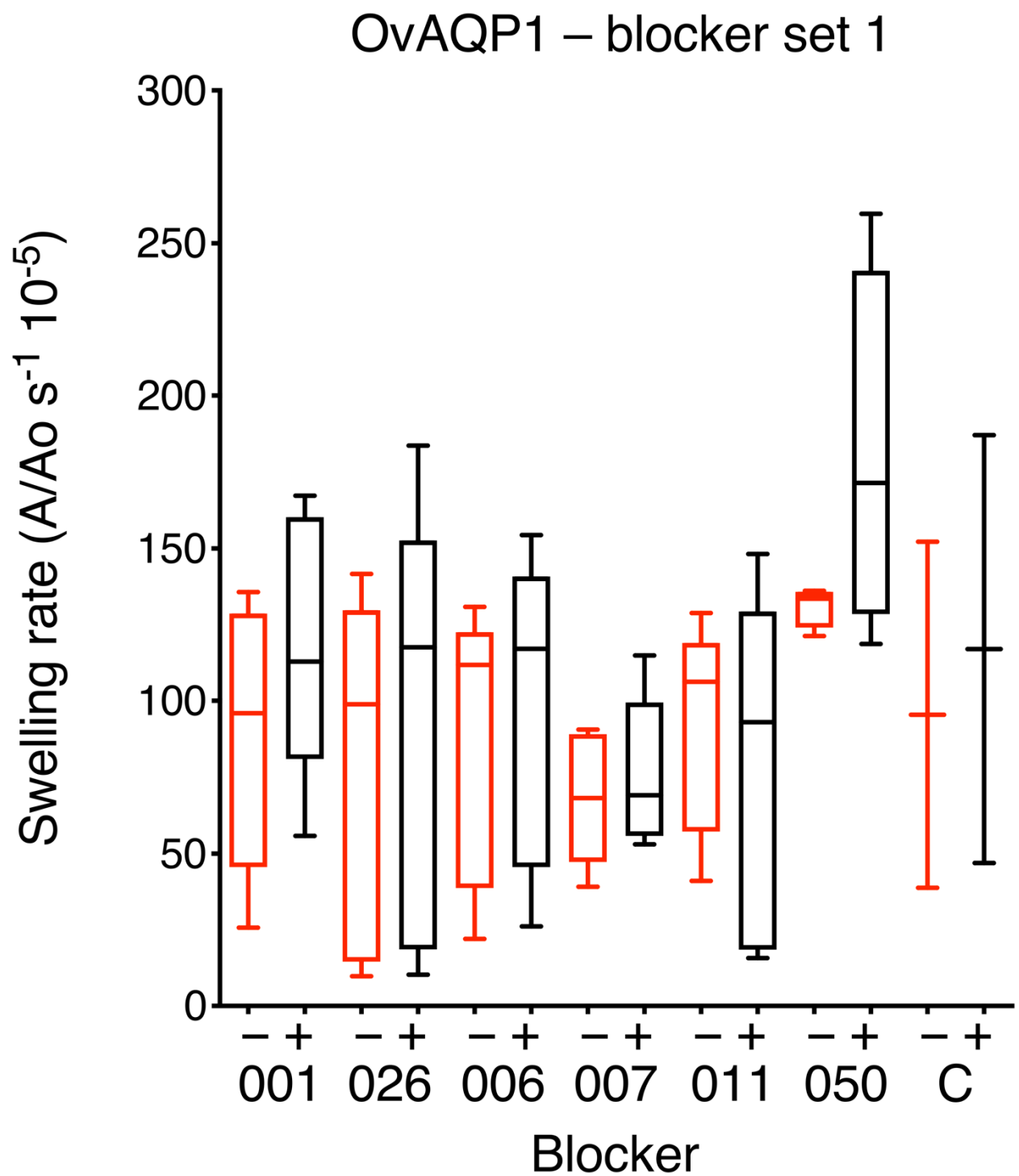


Figure 20. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP1 in absence (-) and presence (+) of the indicated AqBs 001, 026, 006, 007, 011, 050. DMSO was used as negative control (C). For details on the number of used oocytes see Table 5.

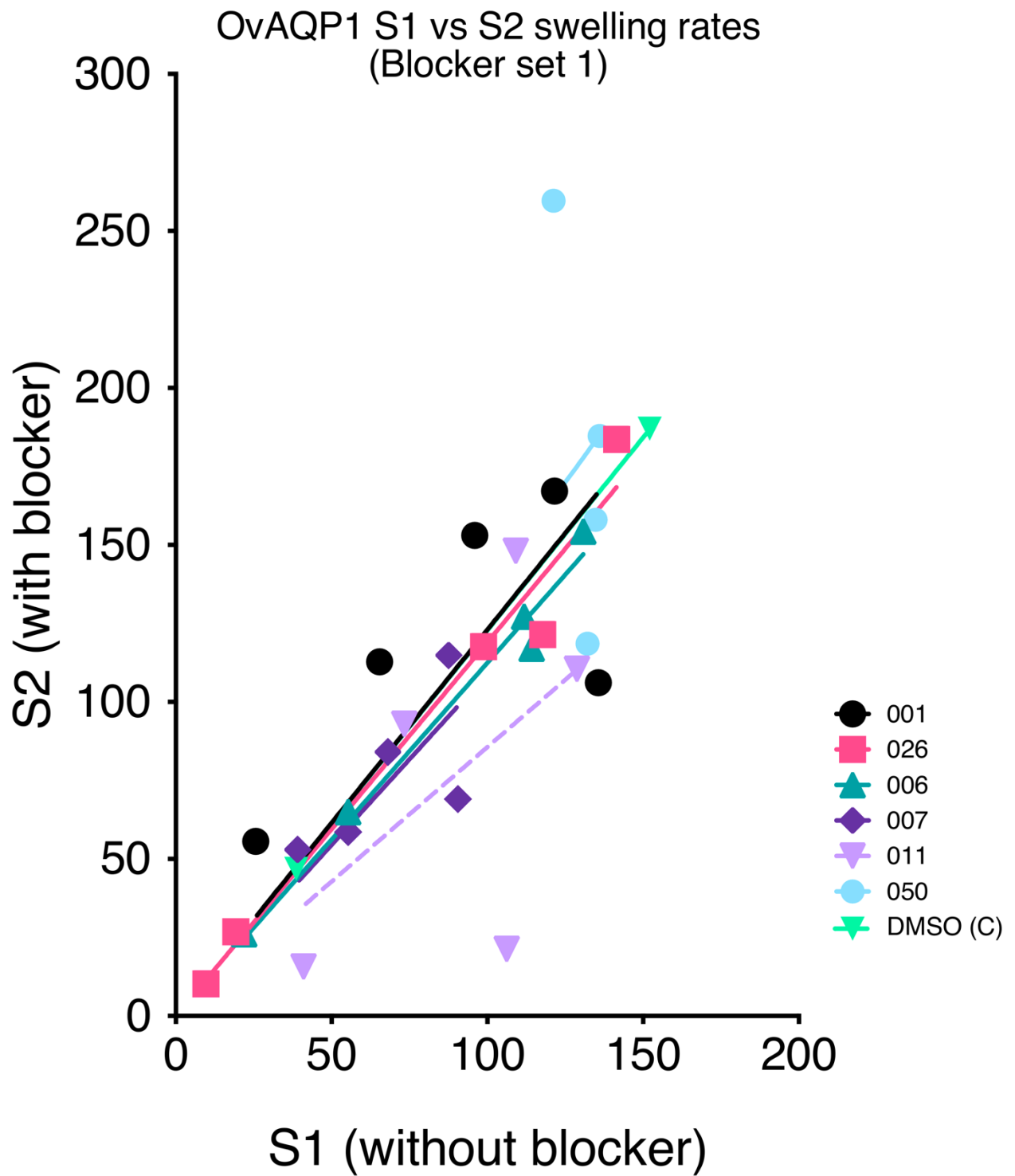


Figure 21. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP1 in absence (S1) and presence (S2) of the indicated AqPs with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 5.

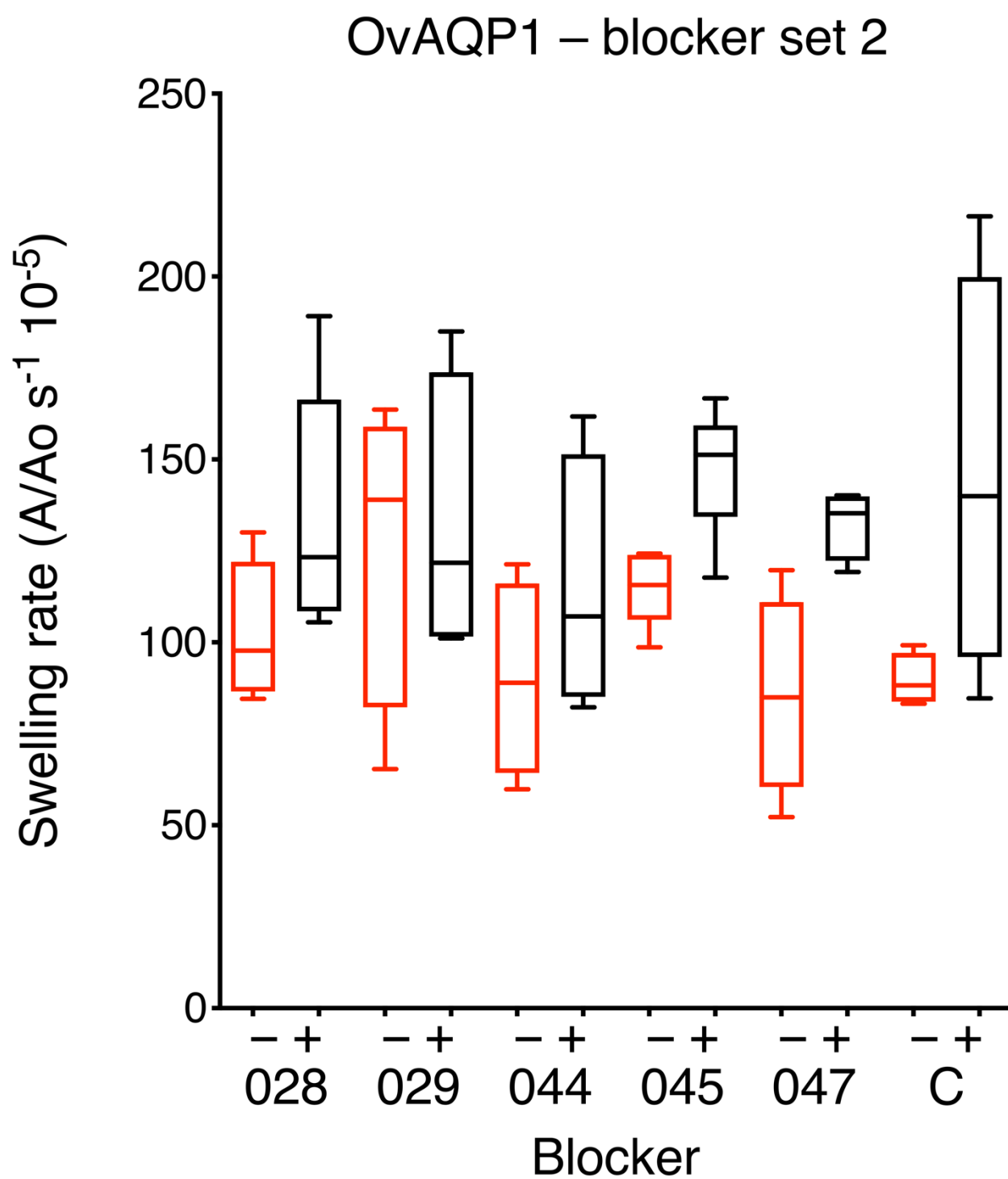


Figure 22. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP1 in absence (-) and presence (+) of the indicated AqBs 028, 029, 044, 045, 047. DMSO was used as negative control (C). For details on the number of used oocytes see Table 6.

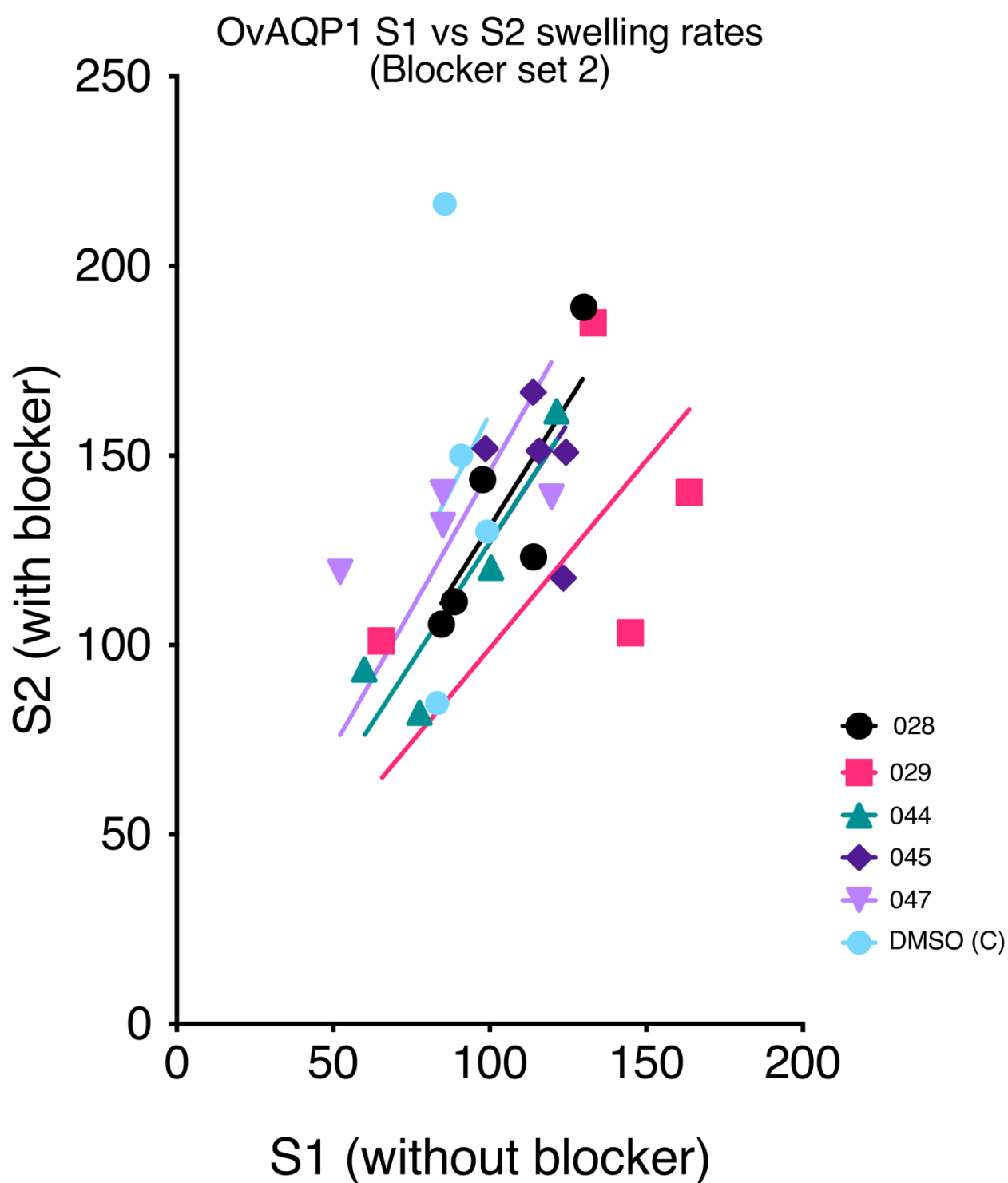


Figure 23. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP1 in absence (S1) and presence (S2) of the indicated AqPs with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 6.

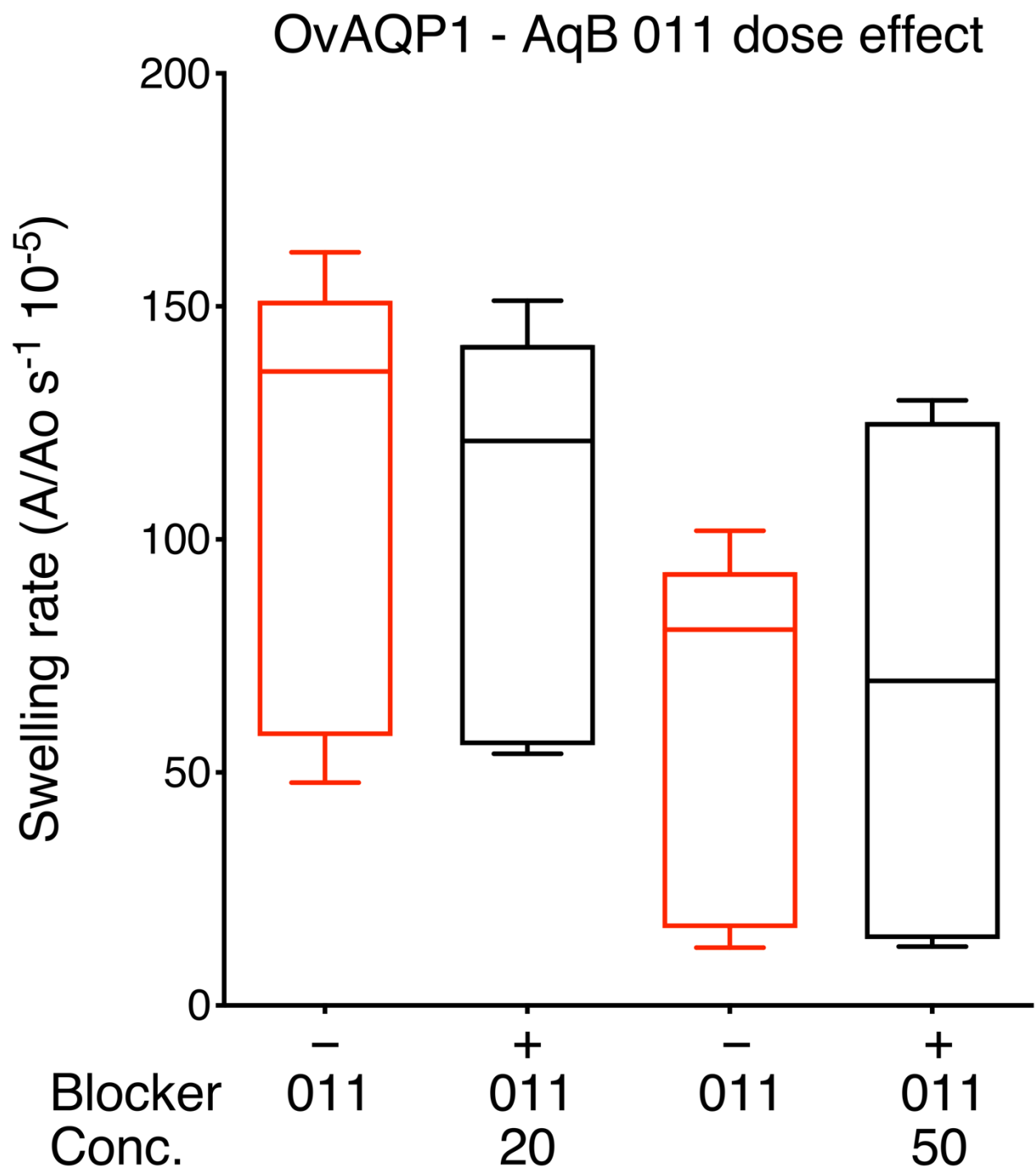


Figure 24. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP1 in absence (-) and presence (+) of AqB 011 at 20 and 50 μM concentration. For details on the number of used oocytes see Table 7.

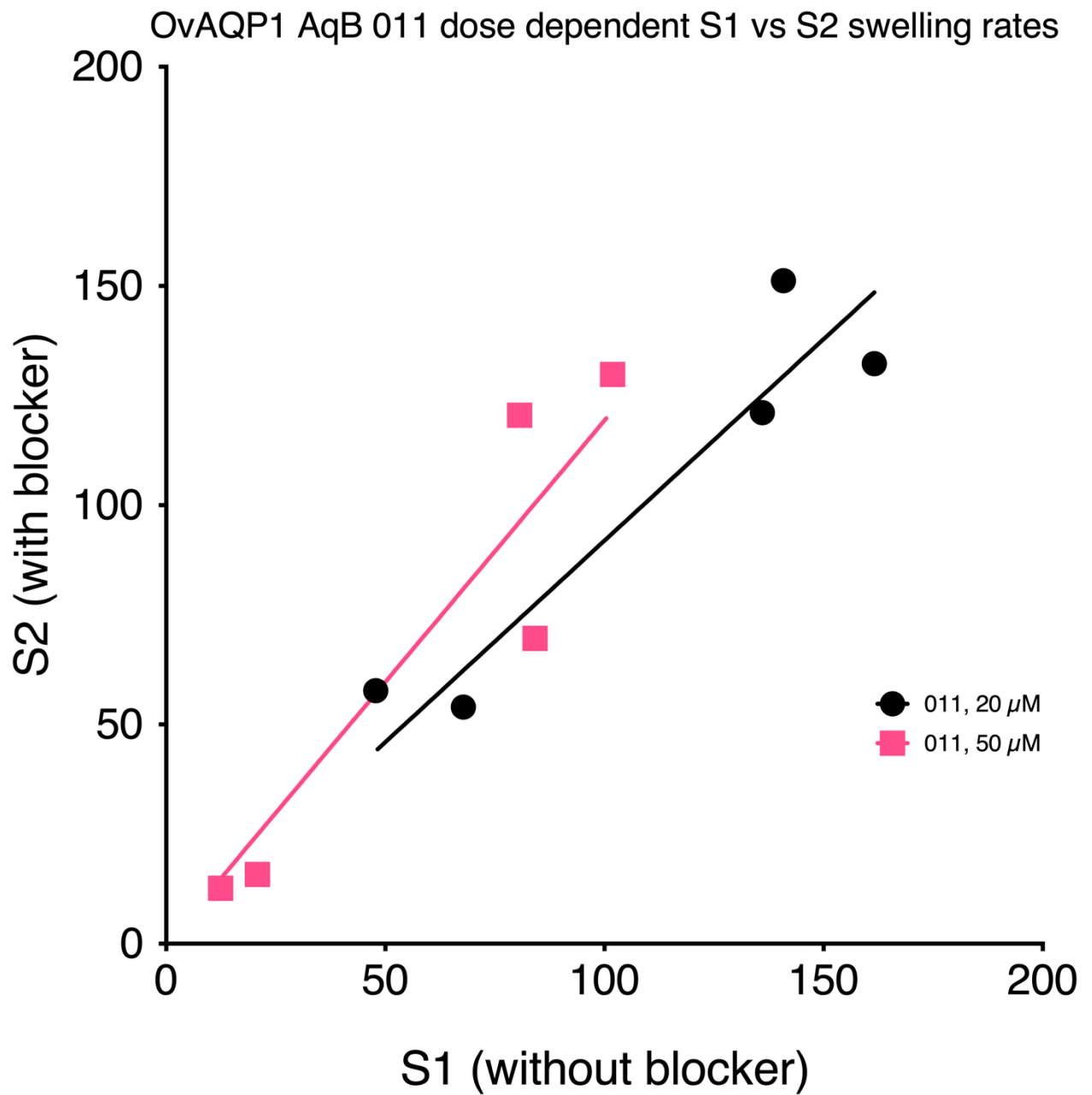


Figure 25. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP1 in absence (S1) and presence (S2) of AqP 011 at 20 and 50 μM concentration with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 7.

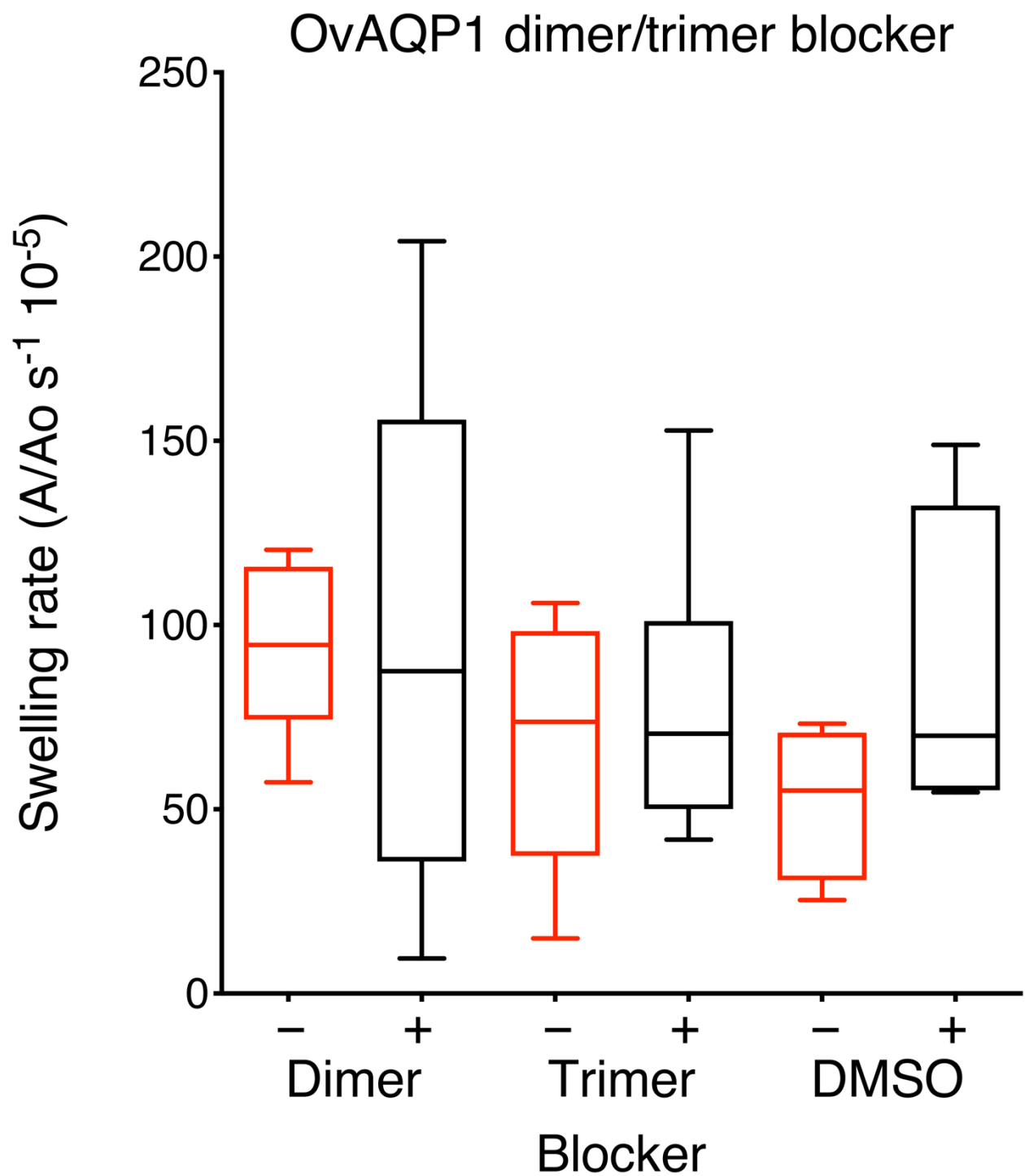


Figure 26. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP1 in absence (-) and presence (+) of the indicated AqBs dimer and trimer. DMSO was used as negative control (C). For details on the number of used oocytes see Table 8.

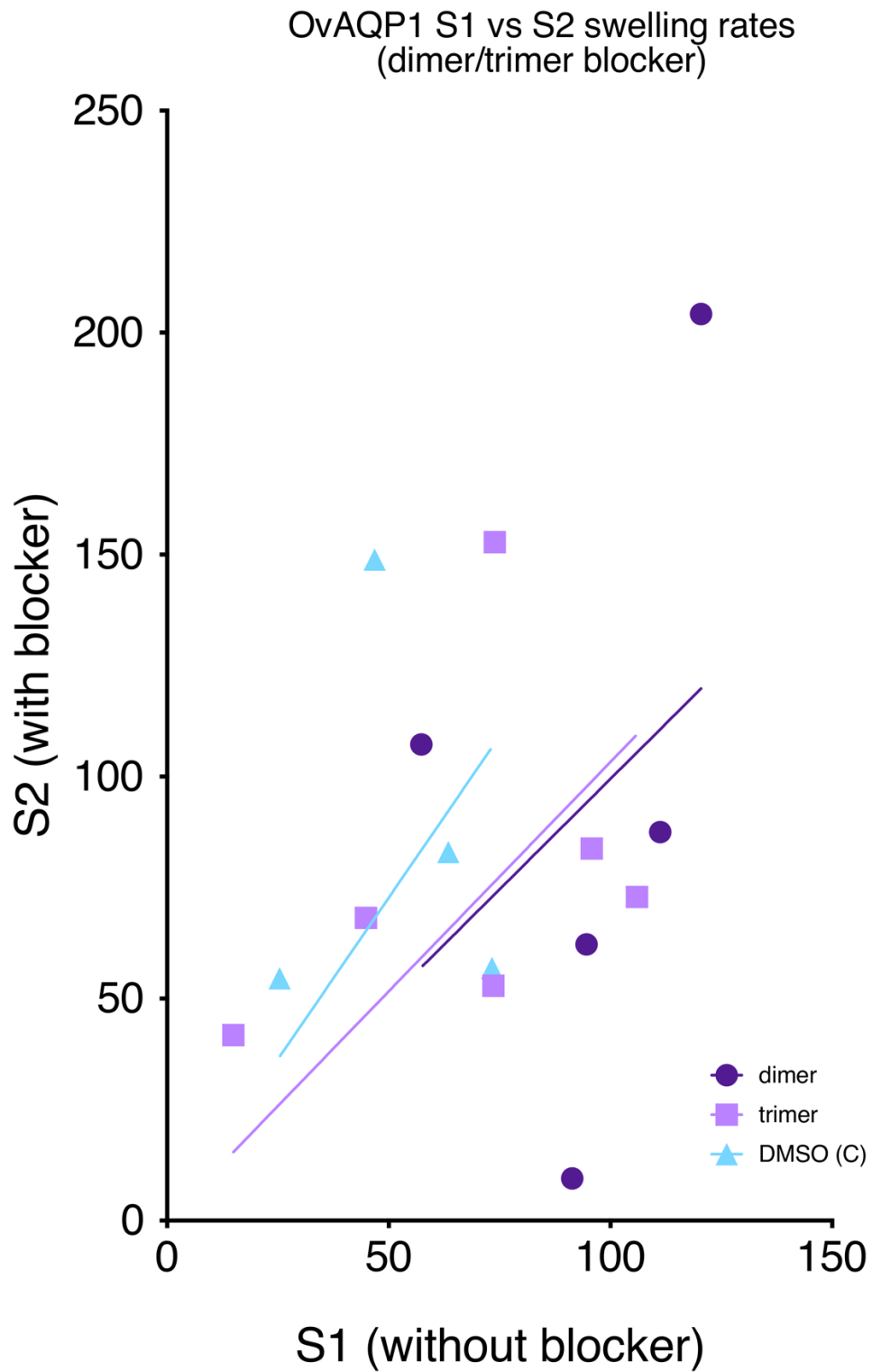


Figure 27. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP1 in absence (S1) and presence (S2) of the indicated AqPs with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 8.

Table 5: Set 1 blockers OvAQP1 oocyte swelling rates

Blocker	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
001	1.230	0.1901	$Y = 1.230 * X$	5
026	1.190	0.05812	$Y = 1.190 * X$	5
006	1.124	0.03249	$Y = 1.124 * X$	5
007	1.090	0.1208	$Y = 1.090 * X$	5
011	0.8564	0.2207	$Y = 0.8564 * X$	5
050	1.359	0.2542	$Y = 1.359 * X$	4
DMSO	1.228	0.004219	$Y = 1.228 * X$	2

Table 6: Set 2 blockers OvAQP1 oocyte swelling rates

Blocker	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
028	1.312	0.07790	$Y = 1.312 * X$	5
029	0.9910	0.1730	$Y = 0.9910 * X$	4
044	1.271	0.08110	$Y = 1.271 * X$	4
045	1.269	0.1025	$Y = 1.269 * X$	5
047	1.459	0.1907	$Y = 1.459 * X$	4
DMSO	1.610	0.3130	$Y = 1.610 * X$	4

Table 7: AqB 011 dose dependent OvAQP1 oocyte swelling rates

AqB 011 [μ M]	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
20	0.9191	0.05960	$Y = 0.9191 \cdot X$	5
50	1.193	0.1314	$Y = 1.193 \cdot X$	5

Table 8: Dimer and trimer blockers OvAQP1 oocyte swelling rates

Blocker	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
Dimer	0.9948	0.3064	$Y = 0.9948 \cdot X$	5
Trimer	1.033	0.2333	$Y = 1.033 \cdot X$	6
DMSO	1.455	0.5062	$Y = 1.455 \cdot X$	4

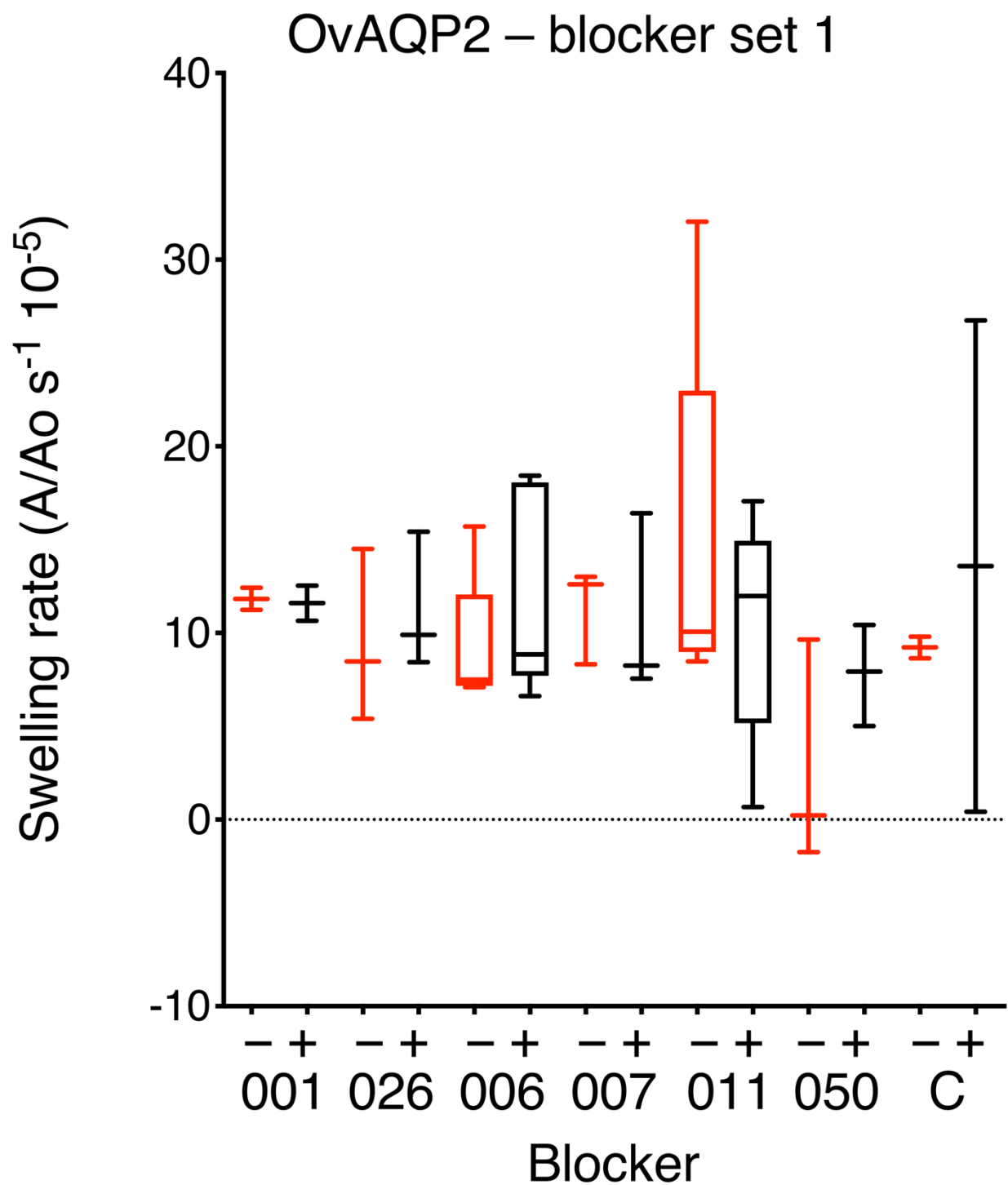


Figure 28. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP2 in absence (-) and presence (+) of the indicated AqBs 001, 026, 006, 007, 011, 050. DMSO was used as negative control (C). For details on the number of used oocytes see Table 7.

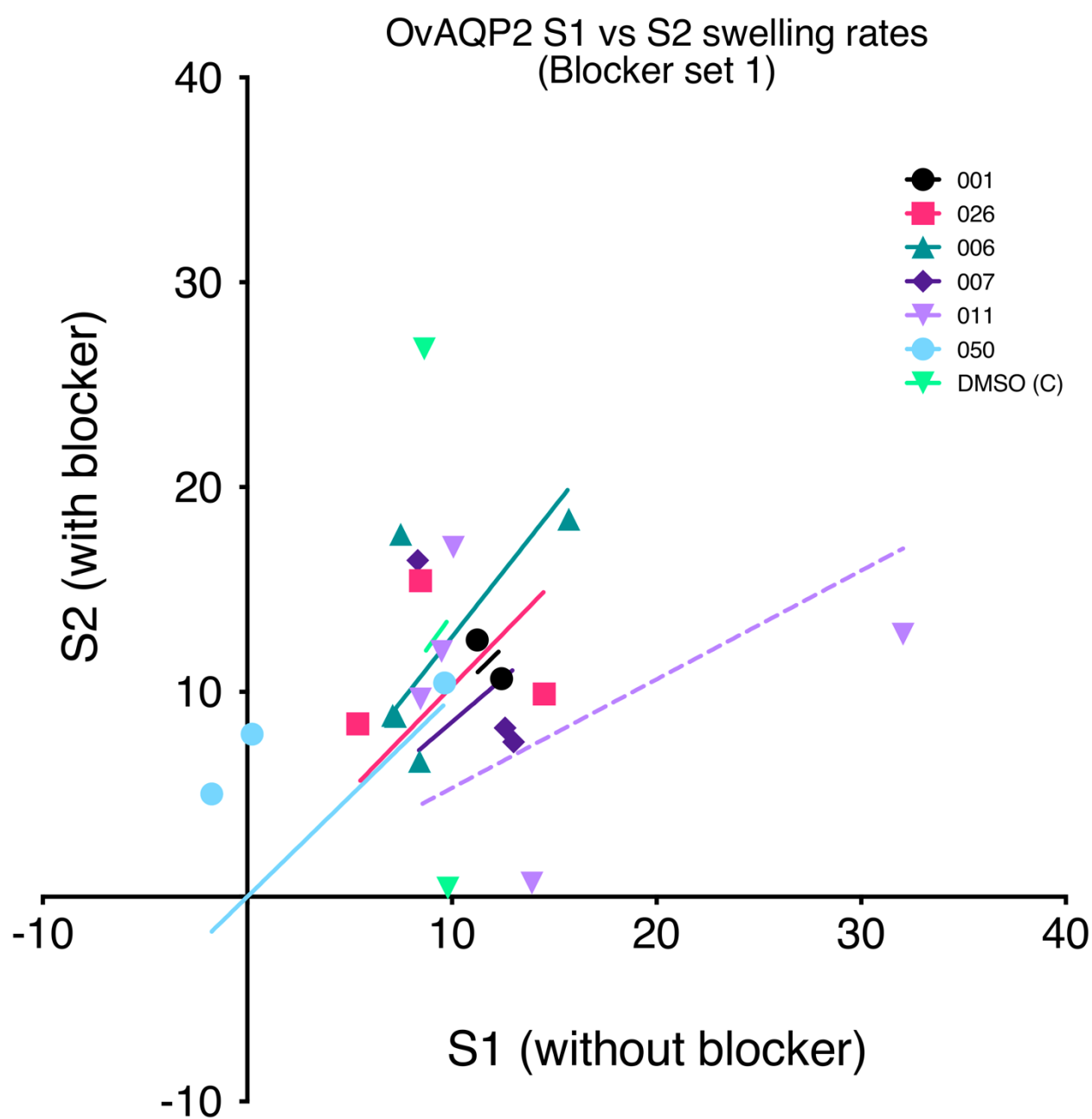


Figure 29. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP2 in absence (S1) and presence (S2) of the indicated AqPs with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 7.

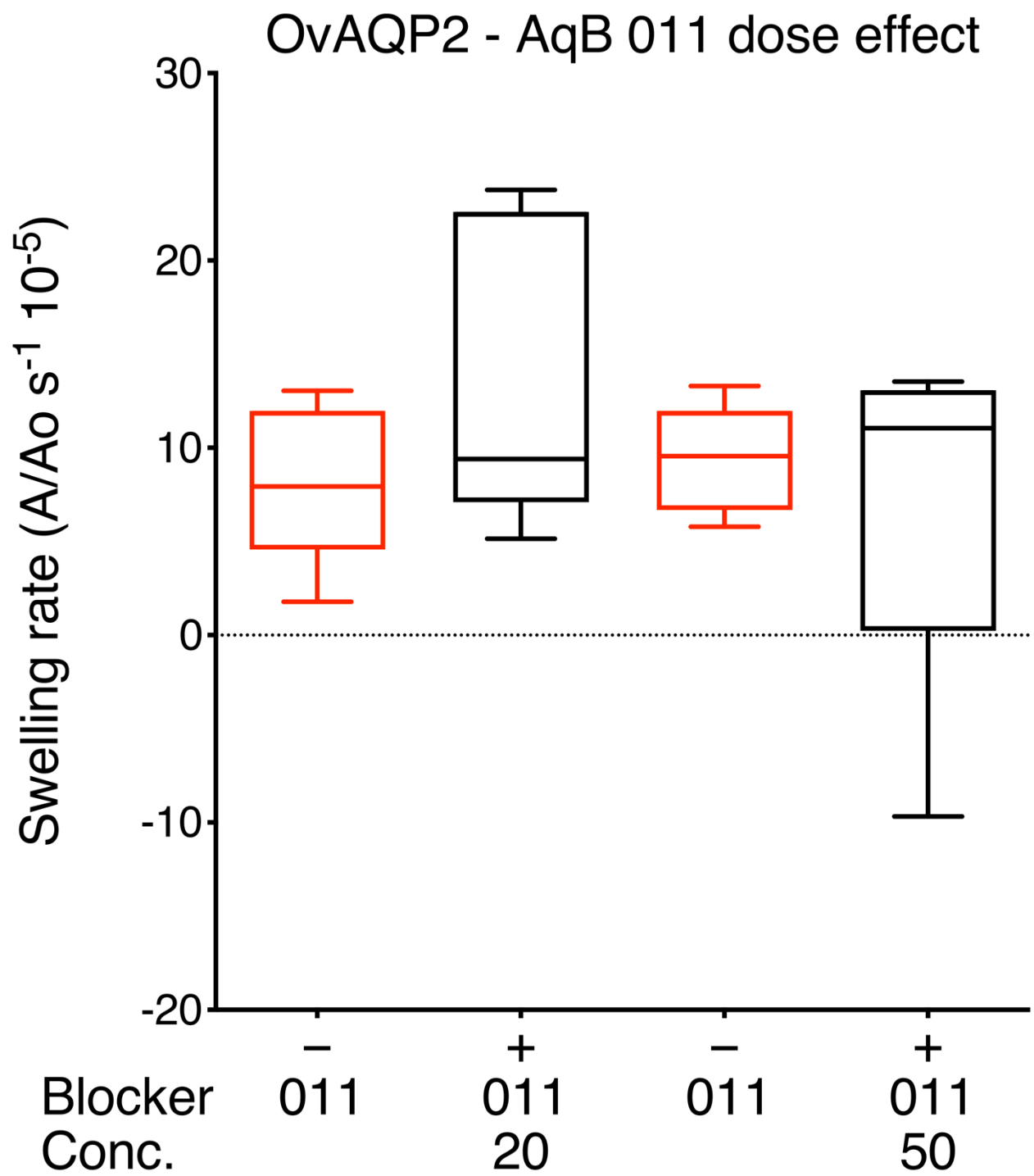


Figure 30. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP2 in absence (–) and presence (+) of AqB 011 at 20 and 50 μM concentration. For details on the number of used oocytes see Table 8.

OvAQP2 AqB 011 dose dependent S1 vs S2 swelling rates

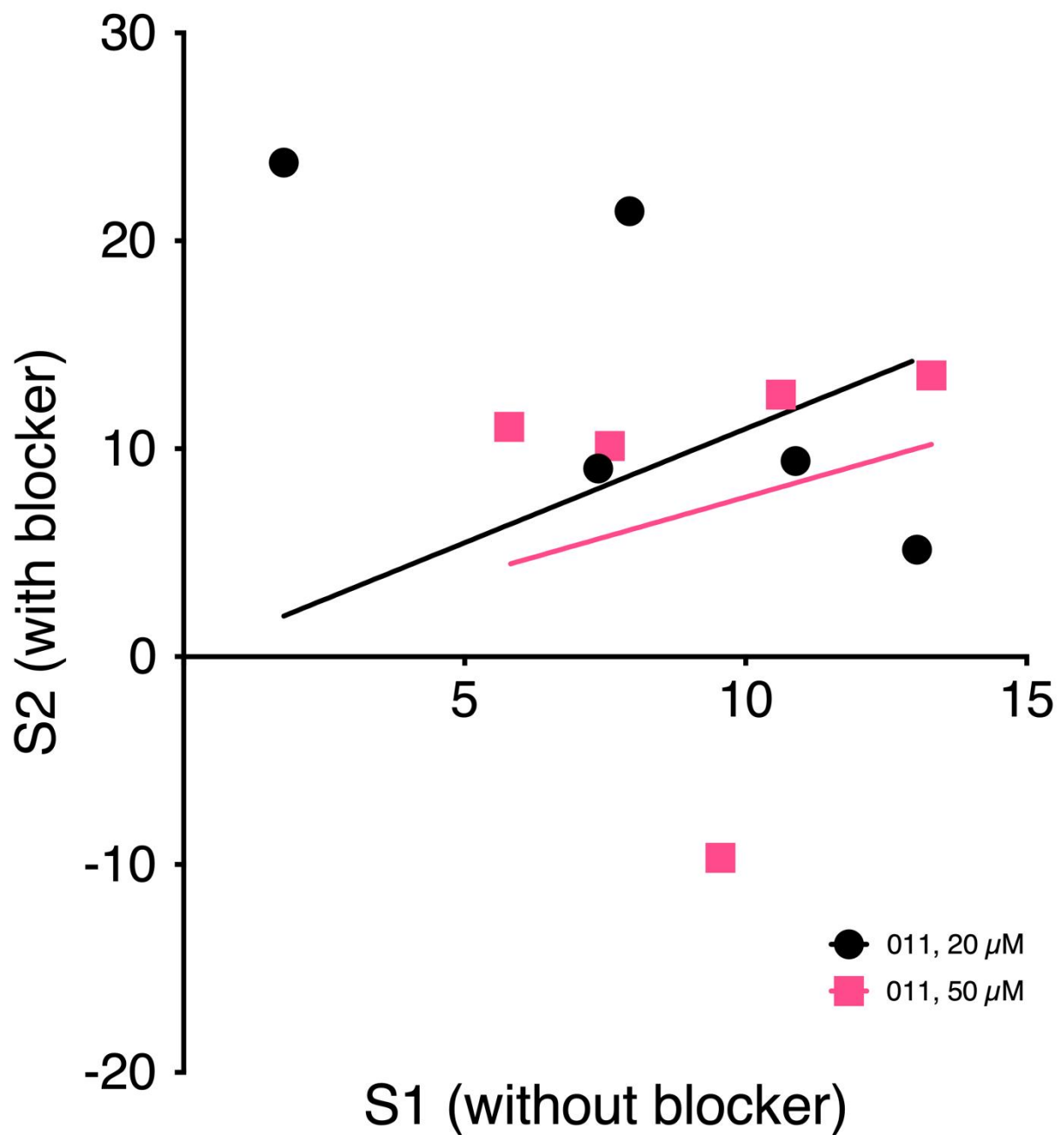


Figure 31. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP2 in absence (S1) and presence (S2) of AqP 011 at 20 and 50 μM concentration with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 8.

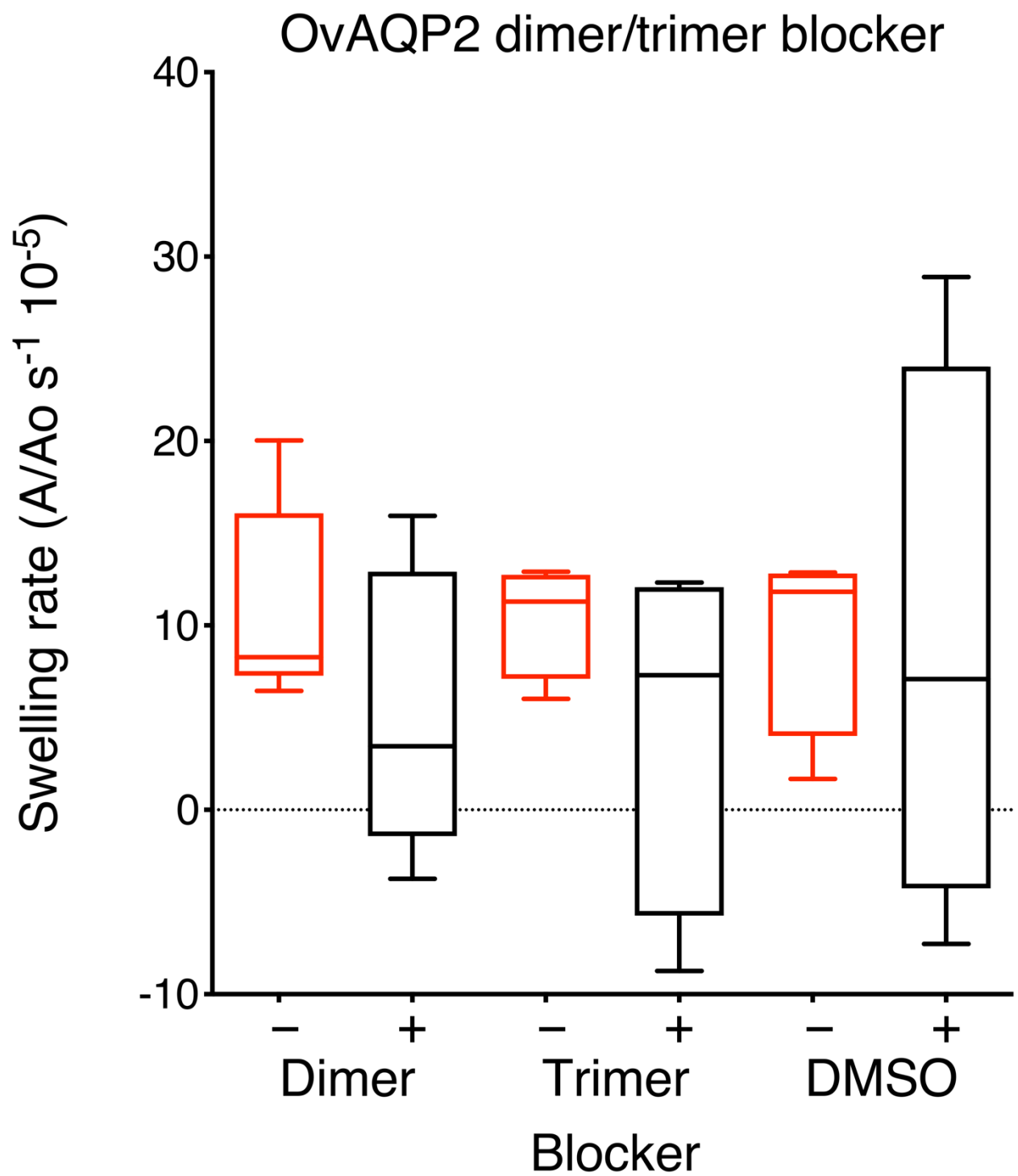


Figure 32. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP2 in absence (-) and presence (+) of the indicated AqBs dimer and trimer. DMSO was used as negative control (C). For details on the number of used oocytes see Table 9.

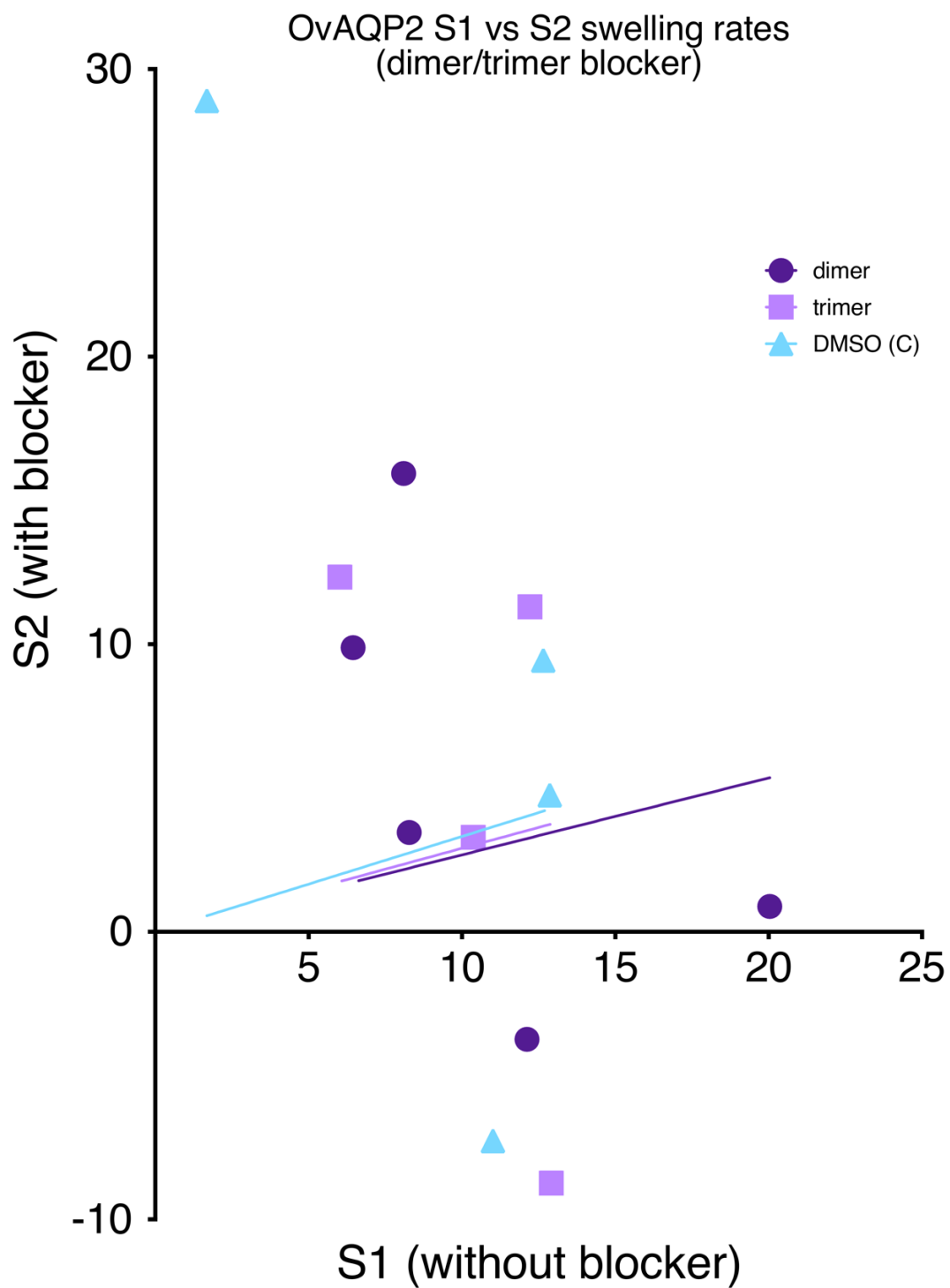


Figure 33. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP1 in absence (S1) and presence (S2) of the indicated AqPs with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 9.

Table 7: Set 1 blockers OvAQP2 oocyte swelling rates

Blocker	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
001	0.9741	0.1288	$Y = 0.9741 \cdot X$	2
026	1.027	0.3554	$Y = 1.027 \cdot X$	3
006	1.268	0.2126	$Y = 1.268 \cdot X$	5
007	0.8529	0.3646	$Y = 0.8529 \cdot X$	3
011	0.5307	0.2151	$Y = 0.5307 \cdot X$	5
050	0.9753	0.7410	$Y = 0.9753 \cdot X$	3
DMSO	1.377	1.514	$Y = 1.377 \cdot X$	2

Table 8: AqB 011 dose dependent OvAQP2 oocyte swelling rates

AqB 011 [μ M]	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
20	1.096	0.6671	$Y = 1.096 \cdot X$	5
50	0.7676	0.4498	$Y = 0.7676 \cdot X$	5

Table 9: Dimer and trimer blockers OvAQP2 oocyte swelling rates

Blocker	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
Dimer	0.2676	0.3357	$Y = 0.2676 \cdot X$	5
Trimer	0.2905	0.4878	$Y = 0.2905 \cdot X$	4
DMSO	0.3317	0.8395	$Y = 0.3317 \cdot X$	4

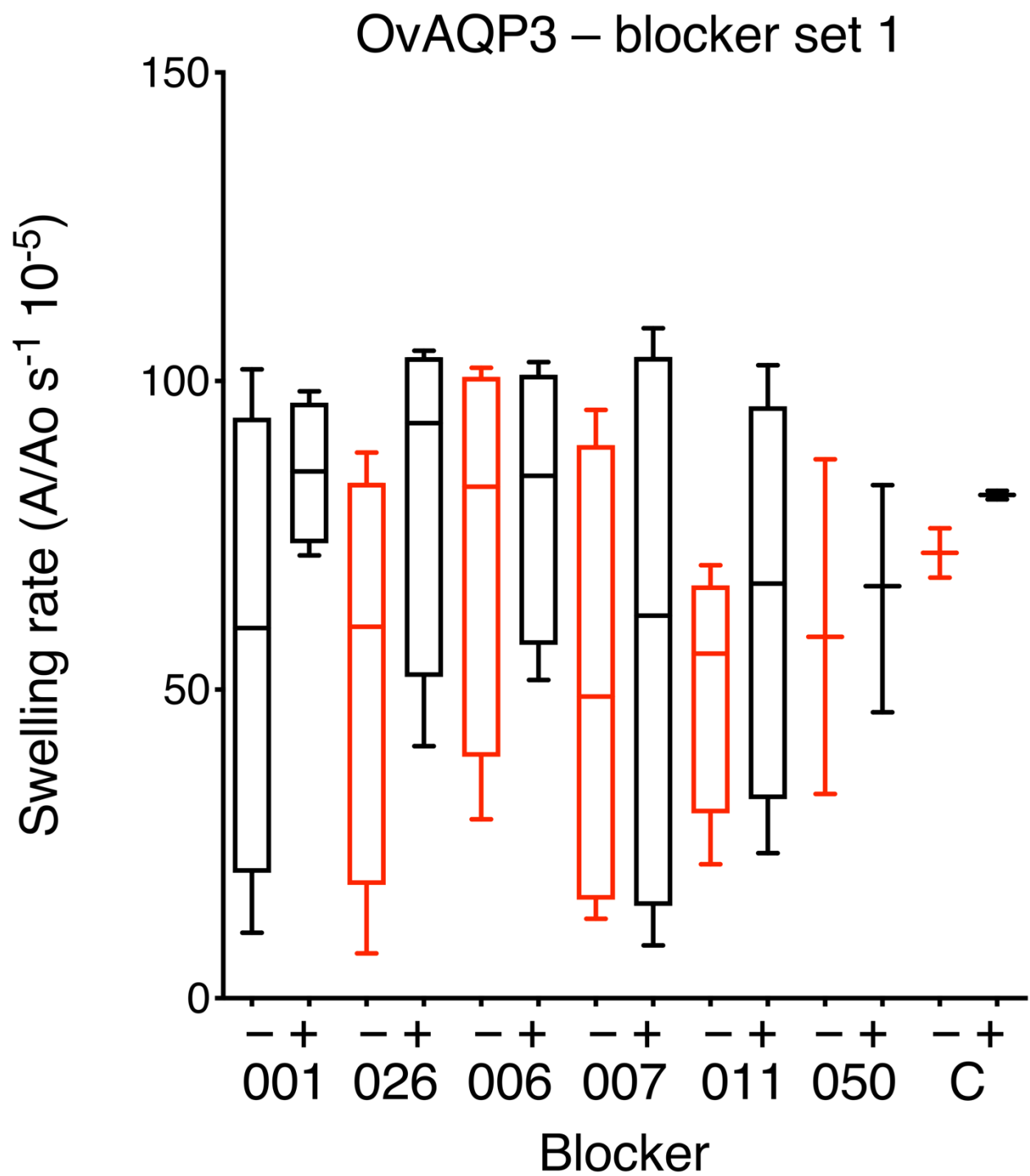


Figure 34. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP3 in absence (-) and presence (+) of the indicated AqBs 001, 026, 006, 007, 011, 050. DMSO was used as negative control (C). For details on the number of used oocytes see Table 10.

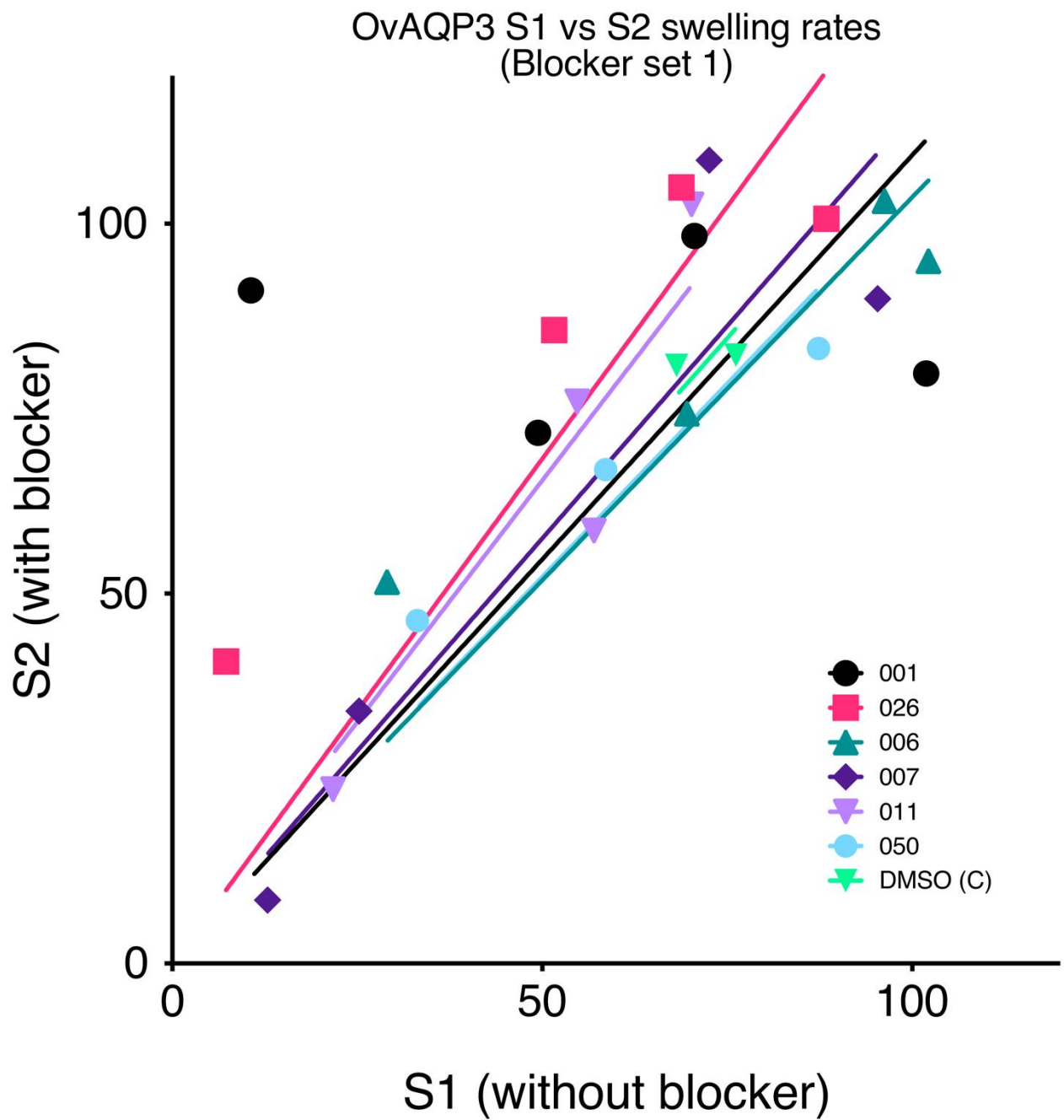


Figure 35. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP3 in absence (S1) and presence (S2) of the indicated AqPs with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 10.

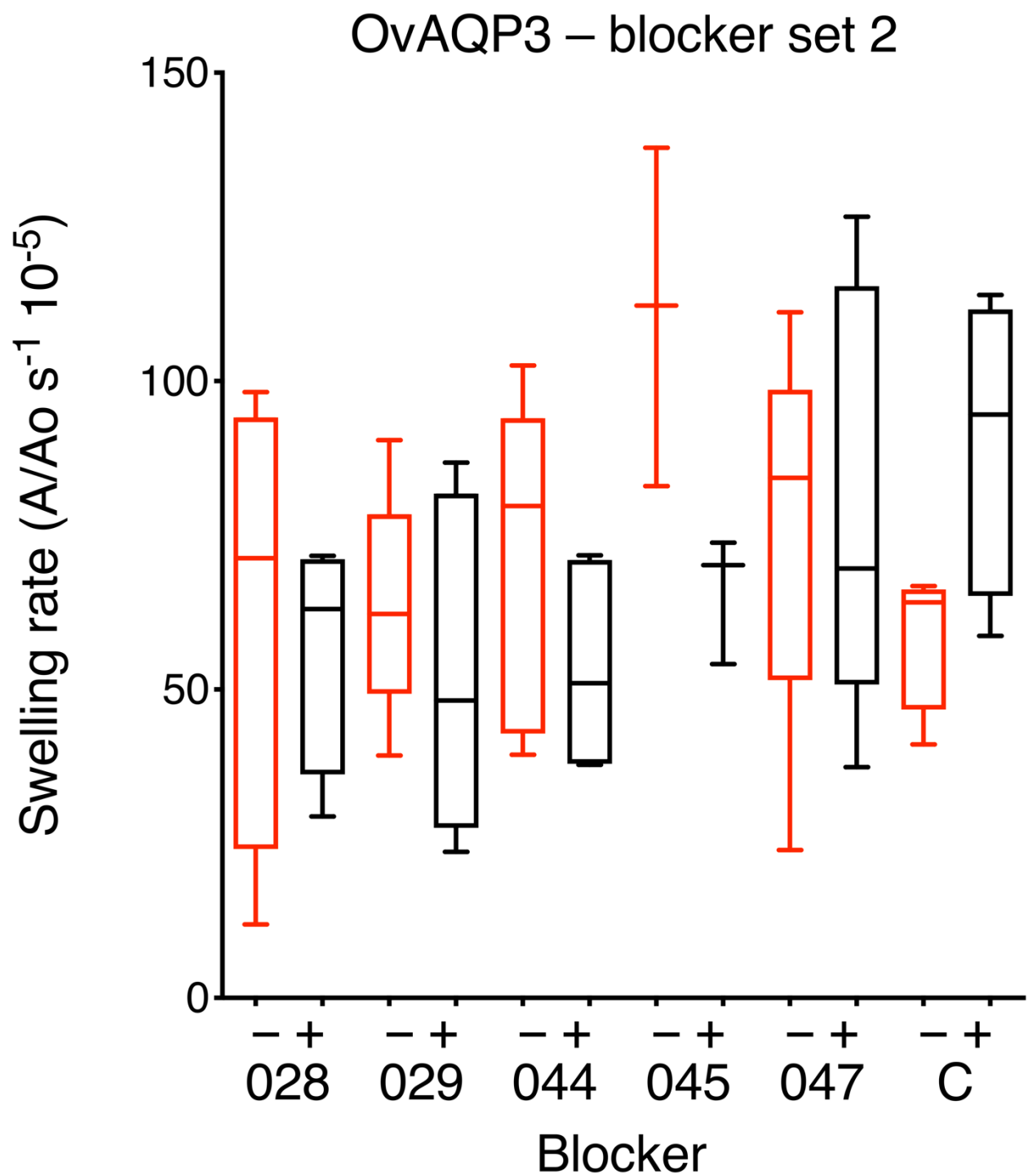


Figure 36. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP3 in absence (-) and presence (+) of the indicated AqBs 028, 029, 044, 045, 047. DMSO was used as negative control (C). For details on the number of used oocytes see Table 11.

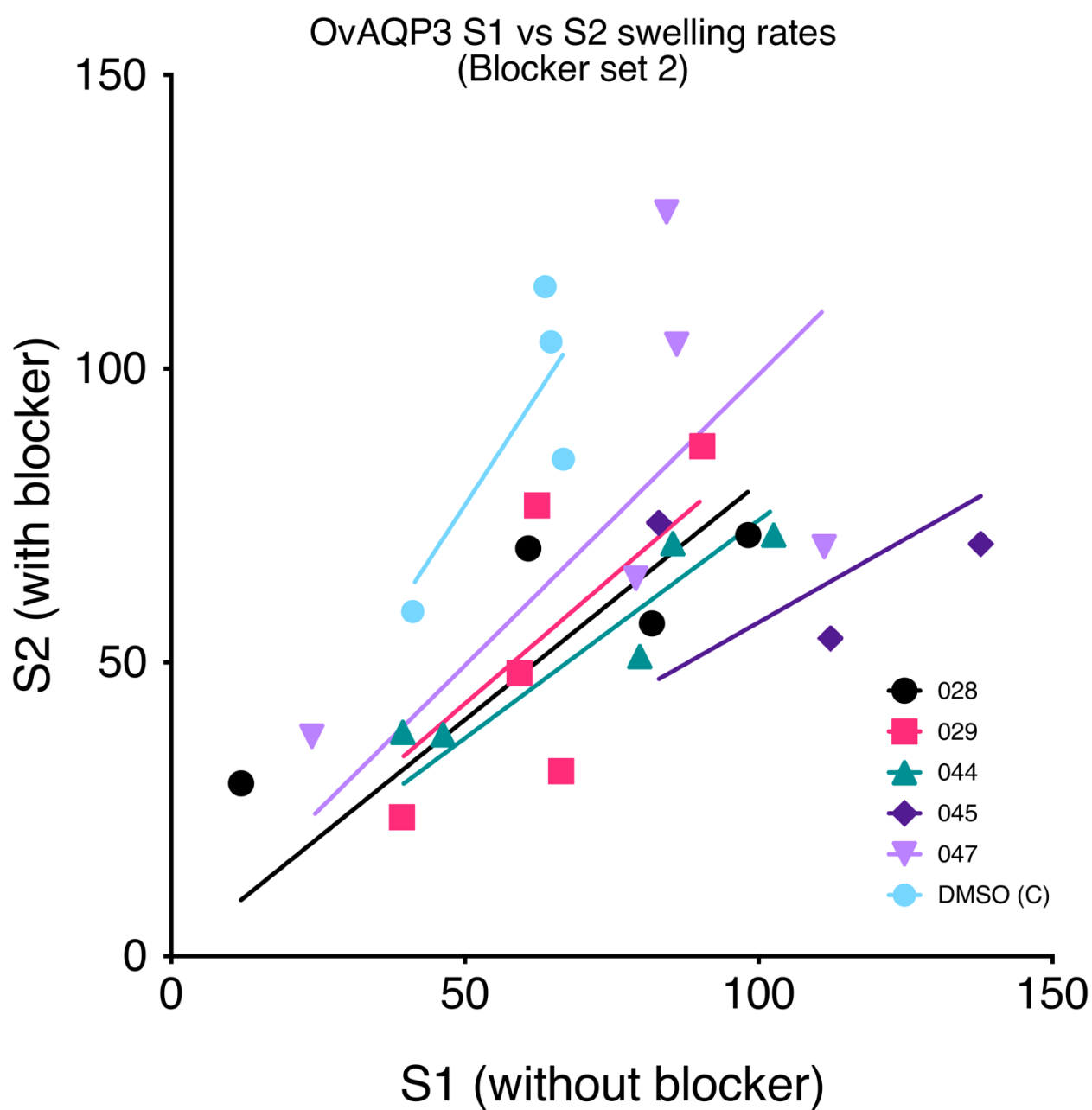


Figure 37. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP3 in absence (S1) and presence (S2) of the indicated AqPs with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 11.

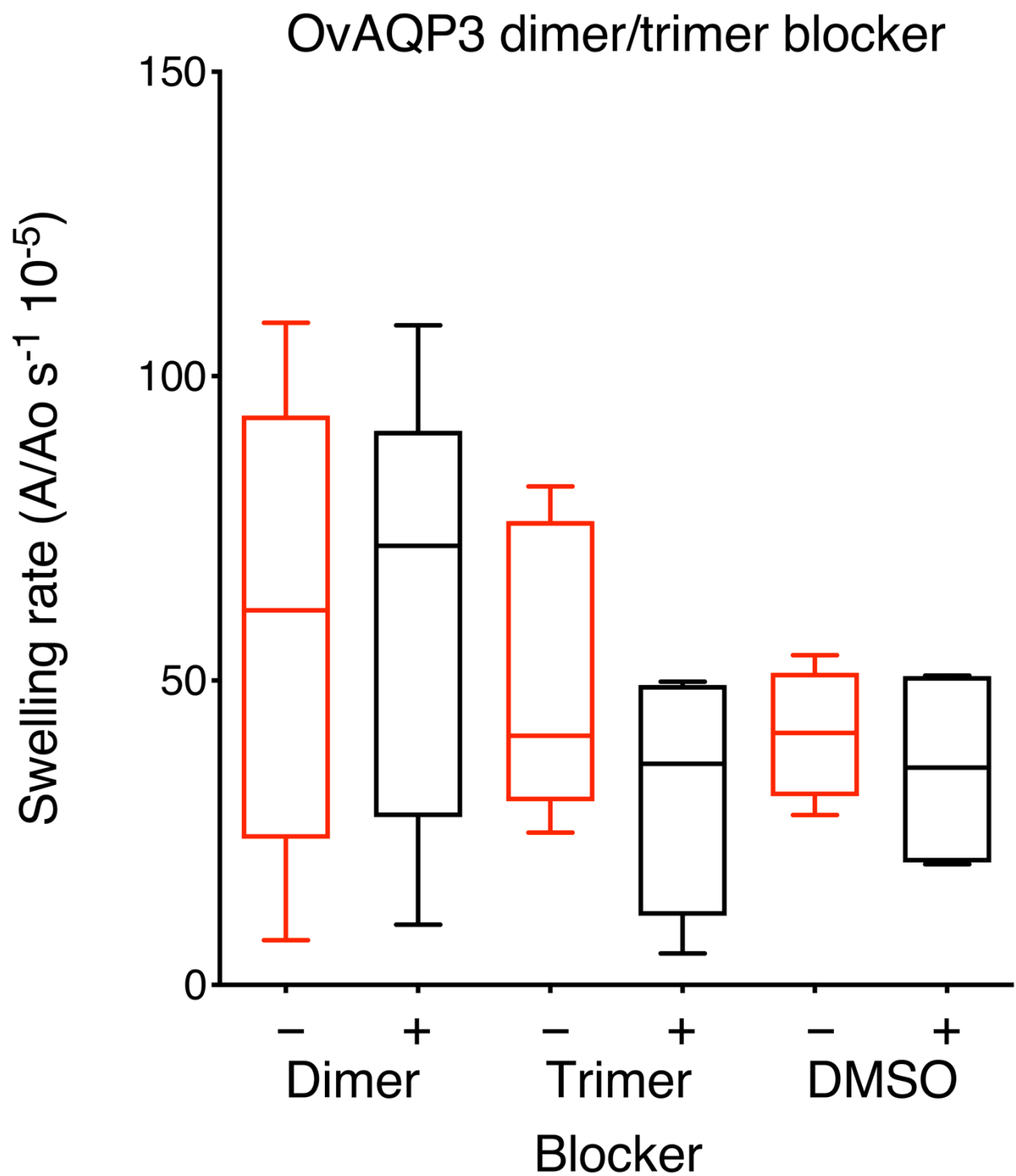


Figure 38. Box and whisker plot (min to max with mean indicated) of oocyte swelling rates for OvAQP3 in absence (–) and presence (+) of the indicated AqBs dimer and trimer. DMSO was used as negative control (C). For details on the number of used oocytes see Table 12.

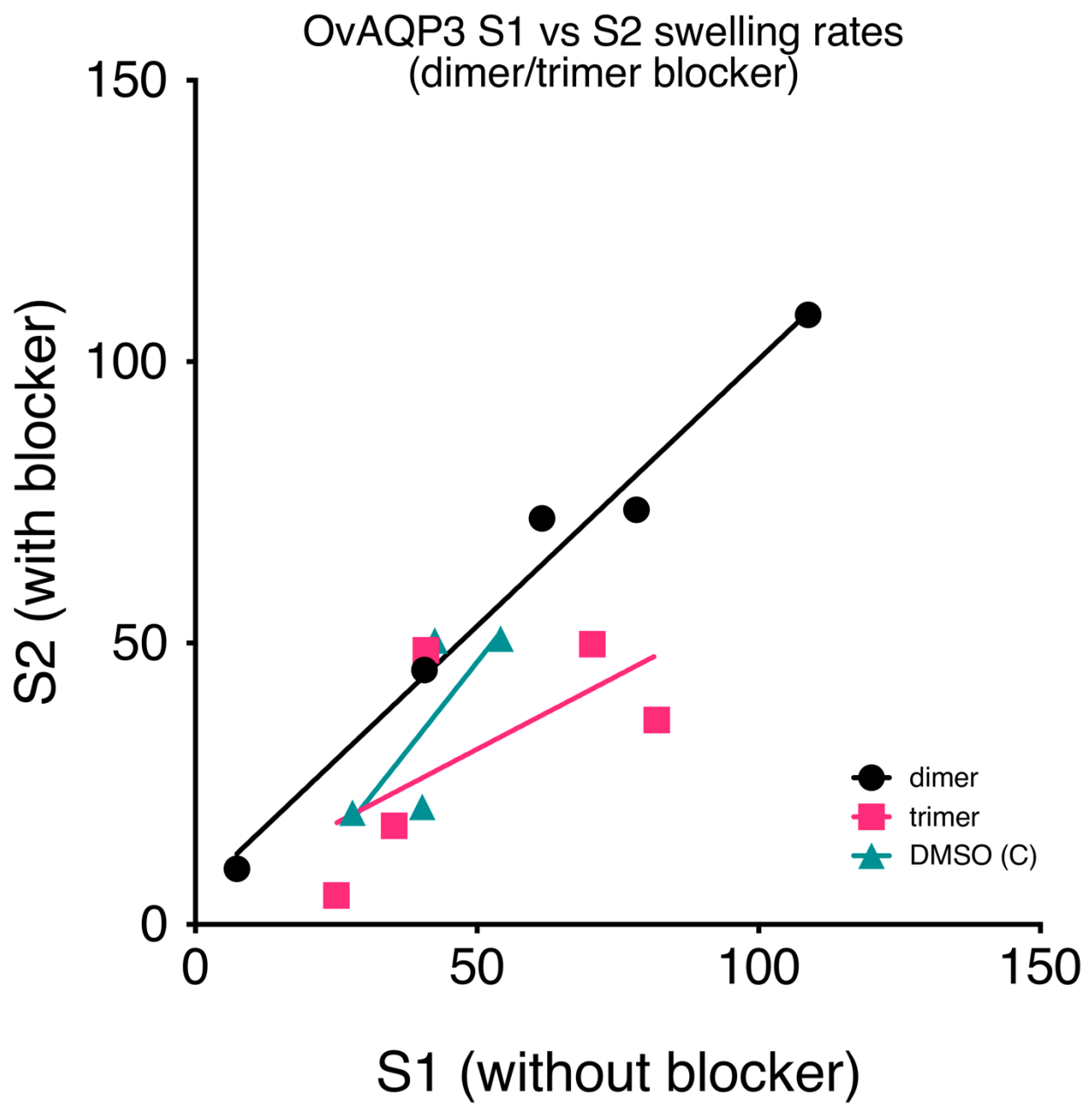


Figure 20. Scatter plot of oocyte swelling rates ($S = A/A_0 \text{ s}^{-1} 10^{-5}$) for OvAQP3 in absence (S1) and presence (S2) of the indicated AqPs with best linear fit lines shown. The numerical details of the results are shown in Table 12.

Table 10: Set 1 blockers OvAQP3 oocyte swelling rates

Blocker	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
001	1.093	0.3873	$Y = 1.093 * X$	4
026	1.364	0.1930	$Y = 1.364 * X$	4
006	1.036	0.08866	$Y = 1.036 * X$	4
007	1.149	0.1546	$Y = 1.149 * X$	4
011	1.306	0.1093	$Y = 1.306 * X$	4
050	1.045	0.09819	$Y = 1.045 * X$	3
DMSO	1.127	0.05276	$Y = 1.127 * X$	2

Table 11: Set 2 blockers OvAQP3 oocyte swelling rates

Blocker	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
028	0.8050	0.1254	$Y = 0.8050 * X$	4
029	0.8600	0.1269	$Y = 0.8600 * X$	5
044	0.7422	0.04481	$Y = 0.7422 * X$	5
045	0.5684	0.1063	$Y = 0.5684 * X$	3
047	0.9899	0.1773	$Y = 0.9899 * X$	5
DMSO	1.536	0.1211	$Y = 1.536 * X$	4

Table 12: Dimer and trimer blockers OvAQP3 oocyte swelling rates

Blocker	Slope	Std. Error	Equation	Number of oocytes
Dimer	1.019	0.04035	$Y = 1.019 * X$	5
Trimer	0.6064	0.1226	$Y = 0.6064 * X$	5
DMSO	0.8811	0.1389	$Y = 0.8811 * X$	4

Output ที่ได้จากโครงการวิจัย

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- Bi-functionality of *Opisthorchis viverrini* aquaporins. 2015. Biochimie, 108: 149-159.
- Human Parasitic Aquaporins: New Anti-Parasitic Drug Targets. 2014. J Med Tech Assoc Thailand, 42: 4883-4893.

2. การนำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า

- The 2nd Joint Symposium of BK21-PLUS of CUK and Thammasat University, Pathumthani, 21-23 January 2015. Targeting AQPs in *Opisthorchis viverrini* and *Fasciola gigantica* for chemical intervention in food-borne trematodiasis.
- Asian Leadership for Health Science and Precision Medicine, Seoul, South of Korea, 2-4 June 2017. Functional analysis of *Opisthorchis viverrini* aquaporins.

3. การนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์

- International Conference on Medical Innovation for Health, Bangkok, Thailand, 4-6 November 2014. Molecular Cloning and Characterization of Three Water Channel Proteins (Aquaporins, OvAQP1-3) from *Opisthorchis viverrini*.



Research paper

Bi-functionality of *Opisthorchis viverrini* aquaporins


Amornrat Geadkaew^a, Julia von Bülow^b, Eric Beitz^b, Smarn Tesana^c,
Suksiri Vichasri Grams^d, Rudi Grams^{a,*}

^a Graduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani 12121, Thailand

^b Pharmazeutisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel 24118, Germany

^c Food-borne Parasite Research Group, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^d Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2014

Accepted 17 November 2014

Available online 22 November 2014

Keywords:

Platyhelminthes

Opisthorchis viverrini

Aquaporin

Comparative functional assays

ABSTRACT

Aquaporins (AQP) are essential mediators of water regulation in all living organisms and members of the major intrinsic protein (MIP) superfamily of integral membrane proteins. They are potential vehicles or targets for chemotherapy, e.g. in *Trypanosoma brucei* melarsoprol and pentamidine uptake is facilitated by TbAQP-2. Transcriptome data suggests that there are at least three active aquaporins in the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, OvAQP-1, 2 and 3, and crude RNA silencing of OvAQP-1 and 2 has recently been shown to affect parasite swelling in distilled water. In the present work we demonstrate that OvAQP-3 is a major water-conducting channel of the parasite, that it can be detected from the newly excysted juvenile to the adult stage and that it is present in major tissues of the parasite. Furthermore, a comparative functional characterization of the three parasite AQPs was performed by using *Xenopus* oocyte swelling and yeast phenotypic assays. OvAQP-1, OvAQP-2, and OvAQP-3 were found to conduct water and glycerol while only the latter two were also able to conduct urea. In addition, all OvAQPs were found to transport ammonia and methylamine. Our findings demonstrate that the sequence-based classification into orthodox aquaporins and glycerol-conducting aquaglyceroporins is not functionally conserved in the parasite and implicate a broader range of functions for these channels.

© 2014 Elsevier B.V. and Société française de biochimie et biologie Moléculaire (SFBM). All rights reserved.

1. Introduction

Parasitic helminths are a major threat to human and animal health worldwide. Among the two phyla, Nematoda and Platyhelminthes, species of the latter are of greater concern in Thailand. Especially members of the class Trematoda that infect liver, biliary system and the gastrointestinal tract have an impact and the human liver (bile duct) fluke species *Opisthorchis viverrini* is of particular concern. In long-lasting chronic infections the released antigens of the parasite promote the development of cholangiocarcinoma, a specific cancer of the biliary system that is

notably hard to treat and has a high mortality rate [1–3]. It is therefore reasonable to identify and investigate parasite antigens that are involved in host/parasite interaction and that can be applied to terminate the infection. Among the activities that allow the parasites to survive in the host are the steady uptake of nutrients and release of metabolite waste products. This includes water and small solutes that can pass aquaporins and aquaglyceroporins, membrane-spanning channel proteins found in all realms of life and that are essential for maintenance of water homeostasis [4]. Surprisingly, almost nothing is known about water homeostasis or permeability of the tegument for solutes in *O. viverrini* and the closely related *Clonorchis sinensis*. A basic experiment, incubating *O. viverrini* in distilled water, has recently shown that the parasite reacts by swelling similar to other trematodes [5–8]. RNA interference was then used to deplete the products of two putative aquaglyceroporin encoding genes of the parasite, OvAQP-1 and OvAQP-2, and, as anticipated, the treated worms showed reduced swelling in distilled water. In *Schistosoma mansoni* an aquaglyceroporin has been thoroughly analyzed for its function within

Abbreviations: AQP, aquaporin, aquaglyceroporin; ar/R constriction, aromatic/Arginine constriction; KLH, keyhole limpet hemocyanin; NEJ, newly excysted juvenile.

* Corresponding author. Graduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Phaholyothin Road, Klong Luang, Pathumthani 12121, Thailand. Tel.: +66 2 986 9213x7241; fax: +66 2 516 5379.

E-mail address: rgrams@tu.ac.th (R. Grams).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.11.013>

0300-9084/© 2014 Elsevier B.V. and Société française de biochimie et biologie Moléculaire (SFBM). All rights reserved.

the parasite and also for its permeability properties in *Xenopus* oocyte assays. The two outstanding results of this research were severe mortality in parasites following siRNA-based knock down of the gene and the excretion of lactate facilitated by the protein [7,9]. In our analysis of two *Fasciola gigantica* AQP3s with an unusual NPA motif (TAA) we noticed a significantly reduced water permeability of the channels caused by this motif suggesting that the proteins have acquired different functionality [10]. The roles of aquaporins as drug targets or for uptake of drugs have been studied for a number of years and require thorough examination of the permeability properties and structure of each specific aquaporin (for reviews see Refs. [11–13]). Direct inhibition of specific aquaporins by antiepileptic and diuretic drugs has been reported [14–16]. The development of drugs that directly interfere with specific AQP3s is an active field of research and it involves the discovery of binding sites through mutagenesis, the analysis of existing pharmaceuticals for their effects on AQP3s and the design of novel drugs by structural analysis. Related to parasites, *Trypanosoma brucei* AQP-2 has been recently identified as the major channel for uptake of the drugs melarsoprol and pentamidine used in chemotherapy of sleeping sickness and mutations in the gene cause resistance to the drugs [17–19]. In conclusion, investigation of parasite aquaporins for their roles in drug uptake or as target in chemotherapy is a worthwhile undertaking (reviewed in Ref. [20]) and will certainly lead to novel applications of these essential proteins. In the following we describe three *O. viverrini* AQP3s and our data demonstrate that these proteins have bi-functional properties spanning the border between orthodox (strict) aquaporins and glycerol-conducting aquaglyceroporins. It can be inferred that they have been evolutionary adapted to the unique habitat of the parasite which must sustain its life under anaerobic conditions in and from the content of the bile and the bile duct epithelium.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

Metacercariae of *O. viverrini* were obtained from naturally infected cyprinoid fish in northeast Thailand. To prepare newly excysted juveniles (NEJ), approximately 500 metacercariae containing active juveniles were selected under a stereomicroscope and excysted in 1% trypsin solution. To obtain 2 and 4-week-old juveniles and 8-week-old adult worms, 50 metacercariae each were drawn into a syringe and used to infect 8-week-old Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*, source: Laboratory Animal Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University) by gastric intubation. Infected hamsters were sacrificed using CO₂ inhalation 2, 4 and 8 weeks postinfection and the worms were collected from the liver and bile ducts. The parasites were washed in normal saline and kept frozen in liquid nitrogen until used in further experiments. The

use of experimental animals in this study was approved by the Thammasat University Animals Ethics Committee (17 January 2012, Project No. 005/2554).

2.2. Molecular cloning and sequence analysis

We had recently identified EST contigs 10299, 1681, and 8064 as putative aquaporin-encoding cDNAs in a transcriptome database of *O. viverrini* created by Young et al. [10,21]. PCR primers introducing terminal *Bam*HI and *Xho*I restriction sites were designed (Table 1) to amplify the full length coding sequences of these putative AQP3s using adult stage total RNA of the parasite extracted in TRIzol (Invitrogen) as template for reverse transcriptase PCR (RevertAid reverse transcription kit, Fermentas Life Sciences). A second *OvAQP-3* reverse primer (CGTACCAGATTAGTTGACT) was used to extend the *OvAQP-3* cDNA downstream to a false positive predicted splice site and to verify the position of the stop codon. The RT-PCR products were directly cloned into pGEM-T Easy (Promega) and sequenced (First Base Laboratories, Malaysia). Standard sequence analyses and editing were performed using EMBOSS version 6.6 [22]. The prediction of transmembrane regions was done using the TMHMM Server v 2.0 at <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>. The sequences of mammalian and parasite AQP3s were retrieved from the NCBI protein database. Clustal Omega [23] and TEXshade [24] were used to calculate and format alignments of AQP3 amino acid sequences. SWISS-MODEL [25] was used to calculate a model of *OvAQP-3* based on human AQP-1 (PDB: 1H6I, [26]) and of *OvAQP-1* and *OvAQP-2* based on *Escherichia coli* GlpF (PDB: 1FX8, [27]).

2.3. Reverse transcriptase PCR analysis

Total RNA of NEJ, 2 and 4-week-old juveniles and adult *O. viverrini* was extracted in TRIzol (Invitrogen) and contaminating DNA was digested with DNase I (Promega). 500 ng of each RNA sample was reverse transcribed (RevertAid reverse transcription kit, Fermentas Life Sciences) using an oligo(dT)₁₈ primer. The RT products were used as template for standard PCR with *Taq* polymerase (Fermentas Life Sciences) and gene-specific primers (Table 1). The PCR products were resolved on a 1% agarose gel.

2.4. Production of anti-C-terminal *OvAQP-3* peptide antisera

The C-terminal 18 amino acid residues of *OvAQP-3* (D254–N271; DRARDYRVPDGNLSNLSN) were selected as antigen for antibody production. The *OvAQP-3* peptide was synthesized at MIMOTOPES (Australia) and a cysteine residue was added at the N-terminus for conjugation with Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). Conjugation was done using an Imm-Link™ KLH immunogen kit (Innova Biosciences, UK) following the supplied protocol. Three ICR mice were used for antibody production and each mouse was firstly

Table 1
PCR primers used for molecular cloning and RT-PCR analysis of the *O. viverrini* AQP3s.

cDNA	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)
A Primers used for molecular cloning of the complete coding sequences of the <i>OvAQP3s</i>			
<i>OvAQP-1</i> , c10299	ggatccATGGCTGGTAGCTTTTCA	ctcgagTCAATAATCATCGTAATC	894
<i>OvAQP-2</i> , c1681	ggatccATGAGTTTGGAATGCGAA	ctcgagTCAGGCAAGCAGTTTCAGT	933
<i>OvAQP-3</i> , c8064	ggatccATGCCAGTCAAAAGGTGTT	ctcgagTTAGTTGACTAAATTGAG	828
B Primers used for detection of the <i>OvAQP3s</i> in different developmental stages by RT-PCR			
<i>OvAQP-1</i>	AATACGAGAGCACAATACAC	CAGGATCTAAAAGTTGAATG	387
<i>OvAQP-2</i>	CATACAACATGCTTTATTGA	CATCCTTCTAGTATCGTTG	403
<i>OvAQP-3</i>	AATATTACTGTTGGACAAGC	CATCAGGTACAGGATAATCT	400
<i>OvActin</i>	TCGAGAGAAGATGACACAGA	GATATCACGCACGATTCTC	320

*Bam*HI and *Xho*I restriction sites are indicated in lower case lettering, stop codons in bold lettering.

injected intraperitoneally with 50 µg KLH-peptide conjugate mixed with complete Freund's adjuvant. Two and 4 weeks later each mouse was injected with 20 µg of the OvAQP-3 peptide mixed with incomplete Freund's adjuvant. Serum samples were collected prior to immunization and between immunizations. The final immune sera were pooled and anti-KLH antibodies were removed by immunoaffinity chromatography over KLH-agarose (USBiological, USA) following the supplied protocol. The purified anti-cOvAQP-3 antiserum was kept at –20 °C and used in further experiments.

2.5. Preparation of crude worm (CW) and transmembrane (TM) extracts from adult *O. viverrini*

CW and TM extracts were prepared as previously described [10,28]. Protein concentrations of the extracts were determined by a Bradford assay (Bio-Rad Protein Assay) and the extracts were kept at –20 °C for further analysis.

2.6. SDS-PAGE and western analysis of parasite antigen extracts

CW and TM extracts (40 µg each) were size-separated by 16% SDS-PAGE and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, UK) by semi-dry blotting using a Fastblot B33 instrument (Whatman, Biometra, Germany) at 60 mA for 60 min. Mouse anti-cOvAQP-3 antiserum and pre-immune serum (1:500) were used to probe the membrane-bound proteins. Alkaline phosphatase rabbit anti-mouse immunoglobulin conjugate (DAKO, Denmark) was used as secondary antibody (1:1000). Rabbit anti-KLH antiserum (1:10000, Agrisera, Sweden) was used as control to demonstrate specificity of the generated anti-cOvAQP-3 antiserum. Alkaline phosphatase goat anti-rabbit immunoglobulin conjugate (DAKO, Denmark) was used as secondary antibody (1:1000). The immunological complex was enzymatically detected using the chromogenic substrates BCIP/NBT (Ameresco, USA).

2.7. Immunohistochemical detection of OvAQP-3

Adult *O. viverrini* freshly collected from liver and bile ducts of hamsters 8 weeks postinfection were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections were cut at 8 µm and mounted on gelatin-coated slides. The tissue sections were deparaffinized and rehydrated in an ethanol series and epitope retrieval was performed in 10 mM citrate buffer, pH 6.0 as previously described [29]. Non-specific binding sites were blocked with 0.1% glycine, 4% BSA in PBS at room temperature for 30 min. Afterward, the sections were probed with mouse preimmune serum (1:200), anti-cOvAQP-3 antiserum (1:200), or rabbit anti-KLH antiserum (1:1000, Agrisera, Sweden) in PBS, pH 7.2, 1% BSA, at 37 °C for 2 h. Endogenous peroxidase was inactivated by incubation with 3% H₂O₂ at room temperature for 10 min. Biotinylated rabbit anti-mouse antibody and biotinylated goat anti-rabbit antibody (DAKO), respectively were used as secondary antibody (1:1000) at room temperature for 30 min. After washing steps, the sections were incubated with avidin–biotin peroxidase (ABCComplex Kit, DAKO) at room temperature for 30 min and washed again. Colorimetric detection was performed using aminoethyl carbazole (AEC) substrate (Vector Laboratories) following the supplied instructions.

2.8. Subcloning of OvAQPs into pHA426MET25 and pOG2 for functional analysis

The pGEM-T Easy cDNA inserts encoding OvAQP-1, -2, -3 were released from the vector using the introduced *Bam*H I and *Xho* I restriction endonuclease sites (Section 2.2) and subcloned into the

yeast expression vector pHA-RS426MET25 [30]. Following identification of positive recombinant pHA-RS426MET25 clones, *Xba* I and *Xho* I restriction endonucleases were used to release the OvAQP inserts including the 5' HA-tag encoding sequence. These DNA fragments were then subcloned into the *Xenopus laevis* expression vector pOG-2 [31]. The final constructs were verified by DNA sequencing.

2.9. Expression of *O. viverrini* AQPs in *Xenopus* oocytes

The cRNAs of the three parasite AQP cDNA fragments inserted in pOG-2 were synthesized as previously described [10]. Comparable to vector pOG-1, pOG-2 carries the 5' and 3' untranslated regions of the β-globulin gene of *X. laevis*. They flank the inserted FgAQP sequences and enhance stability and translatability in the oocytes. Stage V or VI of *Xenopus* oocytes (kindly provided by the Institute of Physiology, Kiel University, Germany) were defolliculated by collagenase A treatment (Roche) and microinjected (Nanoliter 2000, World Precision Instruments) with 5 ng cRNA in 50 nl RNase-free water. Control oocytes were microinjected with 50 nl water. Subsequently, the injected oocytes were incubated in ND96 buffer (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) at 16 °C for 3 d.

2.10. *Xenopus* oocyte swelling assay

The injected oocytes were transferred into 1:3 diluted ND96 buffer to measure osmotic water permeability (*P_f*). HgCl₂ and phloretin inhibition of water permeability was tested by incubating the injected oocytes in 300 µM HgCl₂ or 100 µM phloretin for at least 15 min before putting them in diluted ND96 buffer. To measure urea and glycerol permeability (*P_s*), the oocytes were transferred into isosmotic ND96 buffer in which 65 mM NaCl was replaced by 130 mM urea or glycerol, respectively. Recording of oocyte swelling and calculation of oocyte permeabilities for water, urea and glycerol were done as previously reported [10].

2.11. Expression in yeast and growth assays

The knockout yeast strains BY4742Δ*fps1* (MAΔ*his3-1*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0*, *ura3Δ0*, *yll043w::KanMX*) [32] and 31019Δ*bmp1-3* [31] were used in the methylamine efflux and ammonia assays, respectively. The transformant yeast cells carrying the *O. viverrini* AQP constructs in pHA-RS426MET25 were grown in yeast nitrogen base (YNB) + glucose-ura + his + leu + lys liquid medium to an OD₆₀₀ of 1.5–2. The media for the methylamine efflux assay were prepared containing 50 mM methylamine and contained 0.1% L-proline as the sole nitrogen source, buffered with 20 M MES (for pH 5.5 and 6.5) or MOPS (for pH 7.5). In the ammonia assay, the media containing 5 mM (NH₄)₂SO₄ were buffered with 40 mM MOPS at three medium pH values (pH 7.3, 7.5, 7.7). Each cell suspension was diluted in sterile water to a final OD₆₀₀ of 1 and serial 10-fold dilutions of the cell suspensions were then dotted on the plates. The agar plates were allowed to dry for 20 min and were then incubated at 28 °C for 4 days, and cell growth was recorded as previously described [32].

2.12. Immunoblot analysis of oocyte total membrane protein and microsomal yeast fraction

To prepare total membrane protein of *Xenopus* oocytes, the injected oocytes were lysed in cold hypotonic phosphate buffer (7.5 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.5) using 100 µl buffer per oocyte. Cell debris was removed by centrifugation at 500× *g*, 4 °C for 5 min. Total membrane protein was collected by centrifugation at 16,000×

g, 4 °C for 30 min. For preparation of the microsomal yeast fraction the culture was grown to an OD₆₀₀ of 0.8–1.0 and the yeast cells were then pelleted by centrifugation. The cells were lysed in cold extraction buffer (25 mM Tris–HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA) containing a protease inhibitor mix (Roche) and broken with glass beads by vortexing. Cell debris was removed by centrifugation at 1000× g, 4 °C for 5 min. The microsomal fraction was collected at 33,000× g (50.2 Ti rotor, Optima XL-80K, Beckman Coulter), 4 °C for 40 min. Total membrane protein corresponding to one oocyte and 10 µg microsomal fraction each were loaded to the wells of a gel, separated by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Amersham Biosciences). The membrane-bound proteins were probed with mouse anti-cOvAQP-3 antiserum (1:500) or mouse anti-hemagglutinin (HA) antibody (1:1000, Roche) and detected with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antiserum (Dianova) at a dilution of 1:10,000 following the ECL Plus system (Amersham Biosciences).

3. Results

3.1. Molecular cloning and sequence analysis

Distinct cDNA fragments comprising the complete coding sequences of three putative members of the aquaporin family in the

human liver fluke *O. viverrini* were isolated by RT-PCR from adult stage total RNA of the parasite using sequence-specific primers designed on the sequences of previously identified ESTs [10]. The deduced amino acid sequences of two of these proteins, namely OvAQP-1 (GenBank: AIA98696) and OvAQP-2 (GenBank: AIA98697) were recently published and will not be detailed here except for the conflicting C-terminus of OvAQP-1 below [8]. Due to the inconsiderate naming of these *O. viverrini* AQPs based on date of description and not sequence conservation the here newly described OvAQP-3 (GenBank: KM359766) is actually closer related to AQP-1 in other species. OvAQP-2 is orthologous to the yet undescribed *Schistosoma mansoni* AQP-3 (GenBank: CCD75893, 63.4% identity, 74.5% similarity) and the previously described closely related aquaglyceroporin SmAQP (GenBank: ACI31185, 57.8% identity, 72.2% similarity, [7]). The third protein, OvAQP-1 is an evolutionary more diverged aquaglyceroporin (SmAQP-3, 38.6% identity, 51.2% similarity, SmACI31185, 40.6% identity, 54.8% similarity).

The permeability properties of the three OvAQPs which are here reported for the first time are detailed in Sections 3.6 and 3.7. As we had shown OvAQP-1 (EST contig 10299 [21]) and OvAQP-2 (EST contig 1681 [21]) were clustered with other helminth aquaglyceroporins in phylogenetic analyses based on their sequence conservation while OvAQP-3 (EST contig 8064 [21]) was clustered with helminth orthodox aquaporins including the reported *Fasciola*

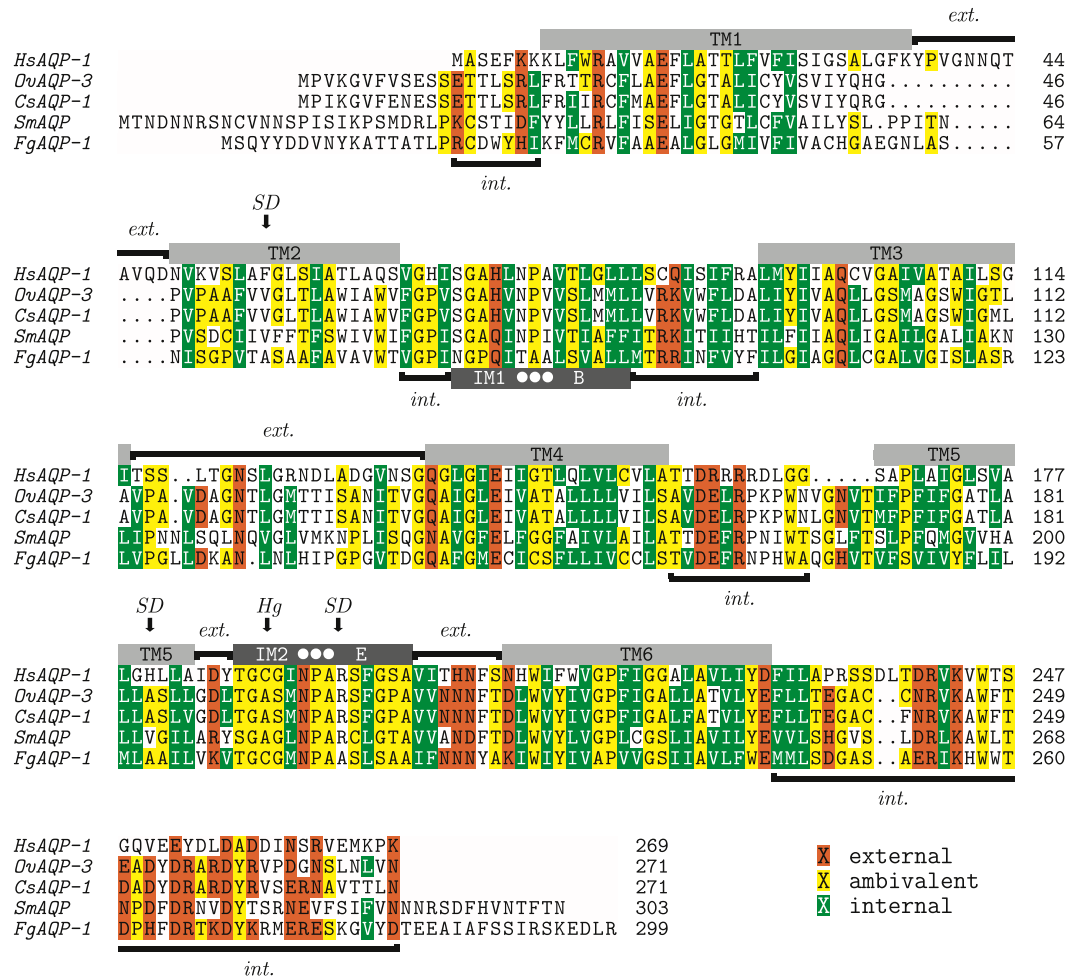


Fig. 1. Multiple amino acid sequence alignment of human AQP-1 (GenBank: NP_932766), *O. viverrini* AQP-3, predicted *Clonorchis sinensis* AQP-1 (GenBank: GAA33659), a predicted *Schistosoma mansoni* AQP (GenBank: CCD77873), and *F. gigantica* AQP-1 (GenBank: ADO32835). The six transmembrane segments (TM), internal termini (int.), internal/external (int./ext.) loops A–E of human AQP-1 are indicated. The locations of the two NPA motifs are indicated by three consecutive white dots. The substrate discrimination sites (SD) and Hg²⁺ sensitive cysteine in human AQP-1 are indicated. Residue shading is by structural properties of the amino acid residues as indicated at the bottom right.

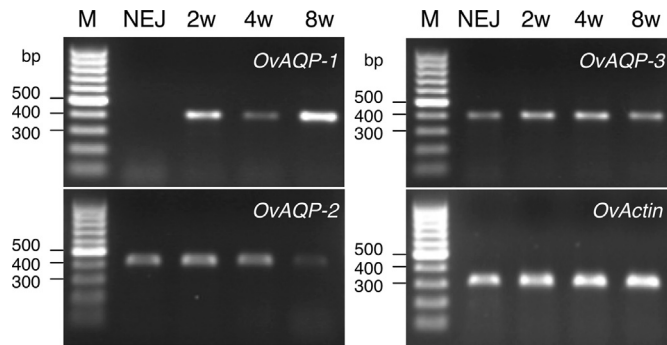


Fig. 2. Reverse transcriptase PCR analysis of total RNA from newly excysted juveniles (NEJ) 2-week-old (2w) and 4-week-old (4w) juveniles and 8-week-old (8w) adult *O. viverrini* with *OvAQP*-specific primers (Table 1). The sizes in base pairs (bp) of the standards (M, 100 bp ladder) are indicated at the left sites. The sizes of the PCR products including for *OvActin* are detailed in Table 1.

gigantica AQP-1 and AQP-2 [10] (Fig. 2 therein). Hypothetical amino acid sequences of the three *O. viverrini* AQPs deduced from assembled genomic DNA shotgun sequences have recently been deposited in UniProt under accession numbers A0A074ZB82 (*OvAQP*-1), A0A075AA01 (*OvAQP*-2), A0A074ZPF0 (*OvAQP*-3). The sequence of *OvAQP*-1 as reported by Thanasuwan and coworkers (GenBank: AIA98696, [8]) is truncated terminating in QKKN while the sequences of EST contig 10299 and our *OvAQP*-1 cDNA terminate in QKKLKDYDDY which is also in agreement with the highly conserved sequence of *C. sinensis* aquaporin-3 deduced from its genomic DNA and RNA sequences (QKKLKDSDDY, GenBank: GAA31414, EST contig 145 [21]). Hypothetical protein A0A074ZB82 terminating at residue H273 is already noted as incomplete in its database entry. Obviously, Thanasuwan and coworkers failed to verify that EST EL618688 used in their research contained the full and correct coding sequence of *OvAQP*-1 [8]. As such the corrected protein comprises 293 aa with a calculated molecular weight of 31.5 kDa. The reported *OvAQP*-2 sequences differ only in position 196 with serine observed in A0A075AA01 and our *OvAQP*-2 sequence and arginine in contig 1681 and AIA98697, therefore *OvAQP*-2 is a protein of 306 aa with a calculated molecular weight

of 33.1 kDa. The here newly reported *OvAQP*-3 sequence is identical to EST contig 8064 while the hypothetical protein A0A074ZPF0 predicted from genomic DNA sequences carries an extended C-terminal tail (slnlVN* versus slnIPSRNTAVIQTKRREHFLITVQKFDVFILSDHLPRRLVSKKSENSLLFYLLTELANTSVVSYT*). This is due to a false positive 5' splice site at position 1184727 predicted in the assembled genomic shotgun sequence GenBank: KL596681 as we have confirmed by RT-PCR with a reverse primer that extended the cDNA downstream to the invalid splice site. Furthermore, the splice site is not supported by genomic DNA and transcript sequences of the highly conserved (91.9% identity/95.9% similarity) orthologous *C. sinensis* aquaporin-1 (GenBank: GAA33659, EST contig 2046 [21]). Therefore, *OvAQP*-3 is a protein of 271 aa and calculated molecular weight of 29.1 kDa. Interestingly, sequence conservation between *O. viverrini* AQP-3 and the previously reported *F. gigantica* AQP-1 [10], a putative orthologous *S. mansoni* AQP (GenBank: CCD77873), and human AQP-1 (GenBank: NP_932766) is considerable lower at less than 30% identity and 50% similarity. Considering the structural properties of the *OvAQP*-3 amino acid residues it is evident that the distribution of external, internal, and ambivalent residues has been much better conserved (Fig. 1) and that the protein will fold similar to mammalian AQP-1. As can be inferred from the multiple alignment with homologous trematode AQPs and the structure-resolved human AQP-1 (PDB 1H6I, [26]) *O. viverrini* AQP-3 will exhibit the typical membrane topology of aquaporins with cytoplasmic termini, six transmembrane domains, five loop regions, and the aquaporin-characteristic NPA motifs located in loops B and E. This general membrane topology of *OvAQP*-3 has also been predicted by TMHMM (data not shown). The first NPA motif is slightly changed into NPV, which is also found in the orthologous *CsAQP*-1. In *SmaAQP* CCD77873 the motif is changed to NPI and in the previously reported *FgAQP*-1 to TAA. The first two of the three substrate discrimination (SD) sites reported for mammalian AQP-1 F56, H180, R195 are replaced in *OvAQP*-3 by V54 (F56), A184 (H180) while the third R199 (R195) is preserved. Valine is also present in the first site in *CsAQP*-1 and *SmaAQP* CCD77873 while *FgAQP*-1 carries an alanine residue. In the second site alanine is also found in *CsAQP*-1 and *FgAQP*-1 while *SmaAQP* CCD77873 carries a valine. The arginine in the third site is preserved in all but *FgAQP*-1 which carries an alanine. The Hg^{2+}

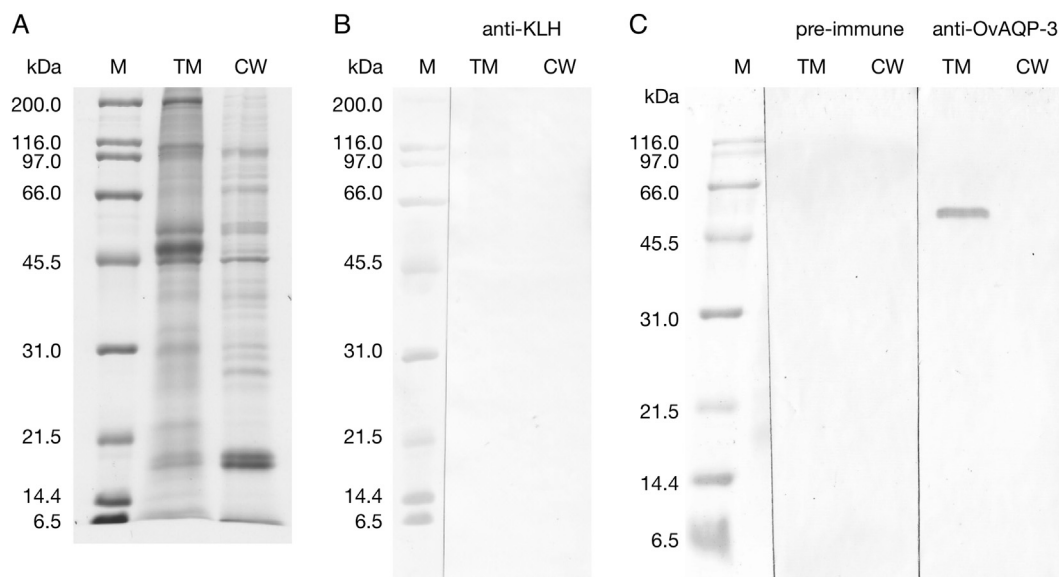


Fig. 3. SDS-PAGE and western blot analysis of adult *O. viverrini* crude worm (CW) and transmembrane (TM) extracts. Molecular weights of the protein standards (M) are indicated at the left sites. **A**, 16% SDS-PAGE of TM and CW extracts (10 μ g each). **B**, membrane-bound TM and CW extracts (40 μ g each) probed with rabbit anti-KLH antiserum. **C**, membrane-bound TM and CW extracts (40 μ g each) probed with mouse preimmune or anti-cOvAQP-3 antiserum, respectively.

sensitive cysteine residue at position 189 is not conserved in OvAQP-3. The conservation of these sites in OvAQP-1, OvAQP-2 and their possible effects on the function of these proteins are detailed in Sections 3.6 and 3.7 and the Discussion. Noteworthy is the high C-terminal sequence conservation of the mentioned AQPs with a substantial number of charged residues present.

3.2. RT-PCR analysis of total RNA from juvenile and adult *O. viverrini*

Reverse transcription PCR showed that the RNA products of OvAQP-1, OvAQP-2, and OvAQP-3 were present in newly excysted juveniles, 2-, and 4-week-old juveniles and adult parasites with the exception of OvAQP-1 that could not be detected in NEJ (Fig. 2).

3.3. Preparation of an OvAQP-3-specific peptide antiserum

Due to the short cytoplasmic termini of OvAQP-3 that are available for antibody production we prepared an antiserum against a synthetic peptide comprising the 18 C-terminal residues

D254–N271. There is no sequence conservation present between the three *O. viverrini* AQPs in this region and to boost immunogenicity the peptide was conjugated to the carrier protein keyhole limpet hemocyanin (KLH) through an introduced N-terminal cysteine residue. The conjugate was injected in the first immunization while only the peptide was injected in the 2nd and 3rd immunizations. Three mice were immunized and the final sera were pooled and depleted of anti-KLH antibodies by immunoaffinity chromatography. Prior to antibody generation we had tested that parasite antigens in immunoblots and in tissue sections were not reactive with a commercial anti-KLH antiserum (see Sections 3.4, 3.5).

3.4. Immunoblot detection of OvAQP-3 in parasite extracts

The mouse preimmune serum, anti-cOvAQP-3 antiserum, and rabbit anti-KLH antiserum were used to probe immunoblotted *O. viverrini* crude worm and transmembrane extracts (Fig. 3). Mouse preimmune serum and rabbit anti-KLH antiserum were not reactive

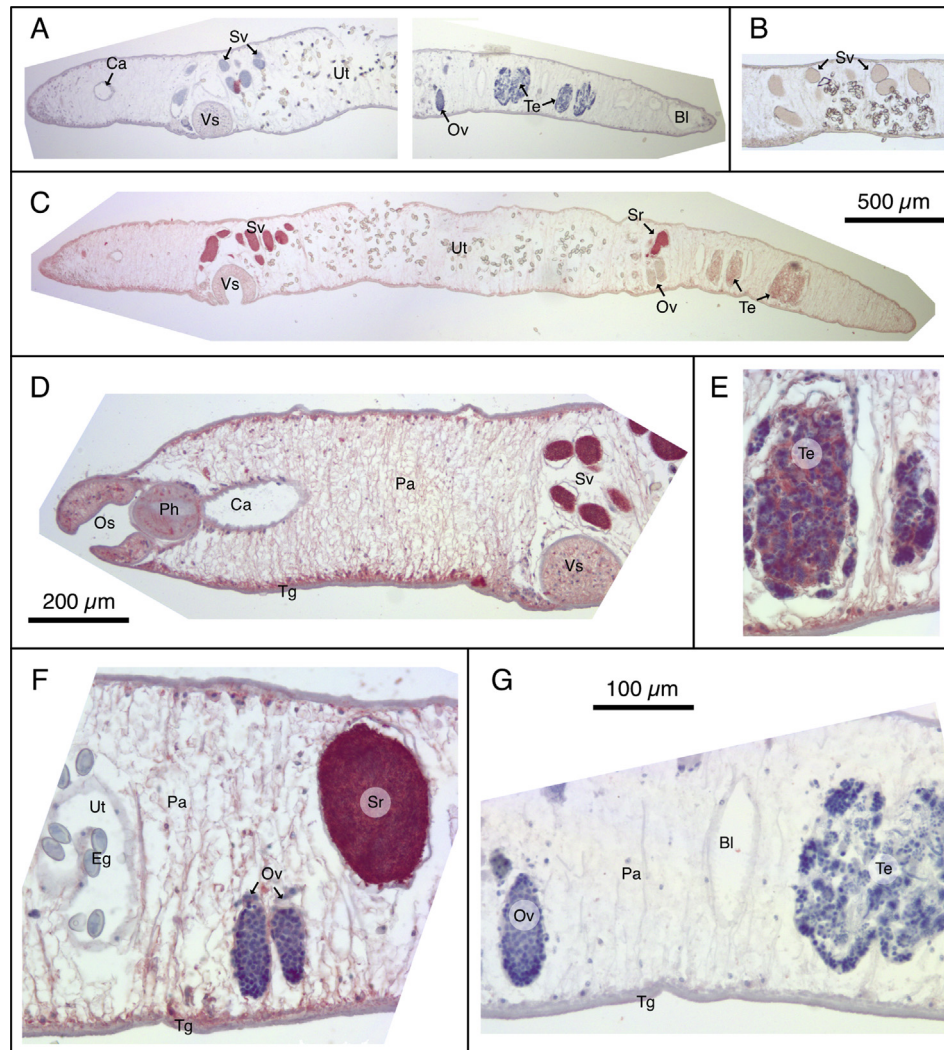


Fig. 4. Immunohistochemical detection of OvAQP-3 in adult *O. viverrini* with anti-cOvAQP-3 antiserum (C–F). **A**, negative control probed with mouse preimmune serum; **B**, control probed with rabbit anti-KLH antibody; **C**, overview at low magnification, positive staining (red) is visible in seminal receptacle and vesicle, less intense in testis, ovary, parenchyma, tegument type tissue; **D**, positive staining is visible in the tegument type tissue, oral sucker, pharynx, caecum before bifurcation, ventral sucker, parenchyma, seminal vesicle; **E**, high magnification of testis lobes showing positive staining; **F**, high magnification showing strong staining in the seminal receptacle, staining in the ovary, parenchyma, tegument-type tissue; **G**, high magnification of negative control probed with mouse preimmune serum. Bl: bladder, Ca: caecum, Eg: egg, Os: oral sucker, Ov: ovary, Pa: parenchyma, Ph: pharynx, Sr: seminal receptacle, Sv: seminal vesicle, Te: testis, Tg: tegument, Ut: uterus, Vs: ventral sucker. Hematoxylin (blue) was used for counterstaining in A, D–G. Size bars: 500 µm in A–C, 200 µm in D, 100 µm in E–G. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

while mouse anti-cOvAQP-3 antiserum was reactive with a single antigen migrating at approximately 60 kDa in the transmembrane extract.

3.5. Immunolocalization of OvAQP-3 in adult *O. viverrini*

The same set of antisera was used to probe the tissues of adult *O. viverrini* and again only mouse anti-cOvAQP-3 antiserum was reactive (Fig. 4). At higher magnification it is evident that the staining shows a characteristic membrane-bound distribution. Immunostaining was observed throughout the parenchyma, tegumental cells, their cytoplasmic processes, the basal plasma membrane of the tegument, oral sucker and pharynx, at the common caecum before its bifurcation and ventral sucker, ovary and testes. Intense staining associated with mature sperm was observed in seminal receptacle and seminal vesicle. Staining was not observed in intact eggs, and the epithelia of uterus, the two caeca, excretory system.

3.6. Permeability of *O. viverrini* AQPs to water, urea and glycerol in *Xenopus* oocytes

Standard *Xenopus* oocyte swelling assays were used to measure permeability of the three OvAQPs for water, glycerol and urea, and their inhibition by Hg^{2+} and phloretin (Fig. 5). Rat AQP-1 (RnAQP-1) was used as a positive control in the water permeability assays and aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* (PfAQP) was used as positive control in glycerol and urea permeability assays. The expression of the proteins was verified in immunoblots of total oocyte membrane protein using an anti-HA antibody. The control, RnAQP-1 showed the highest permeability for water followed by OvAQP-3 and OvAQP-2 whereas OvAQP-1 showed significant lesser permeability (Fig. 5A). The addition of $HgCl_2$ to the medium significantly inhibited the water permeability of RnAQP-1 and OvAQP-2. Residue C189 is responsible for this Hg^{2+} sensitivity in mammalian AQP-1 [33,34] and only OvAQP-2 carries a cysteine residue in the corresponding position (C220) while OvAQP-1 and OvAQP-3 carry alanine residues (Fig. 5C). We also tested inhibition of the OvAQPs by phloretin as has been observed for *S. mansoni* aquaglyceroporin AC131185 [9] but did not observed any decrease in their water permeability.

In the urea and glycerol assays the aquaglyceroporin control, PfAQP showed the highest permeability for urea and glycerol (Fig. 5B). From the two putative *O. viverrini* aquaglyceroporins only OvAQP-2 showed comparable permeability properties while OvAQP-1 showed a significant lesser permeability for glycerol and no permeability for urea. Surprisingly, OvAQP-3, which by its sequence is classified as an orthodox aquaporin was found to be quite permeable for urea (80 nm s^{-1}) and glycerol (90 nm s^{-1}). Sites that have been shown to affect substrate determination in RnAQP-1 [31] and that are possibly important for the observed behavior of OvAQP-3 are indicated in Fig. 5C.

3.7. Permeability of *O. viverrini* AQPs to ammonia and methylamine in yeast

The permeability of the *O. viverrini* AQPs for ammonia and methylamine was determined in comparison to PfAQP as positive control by phenotypic assays in yeast strains lacking in the first case all endogenous ammonia transporters and in the second case the endogenous aquaglyceroporin Fps1 (Fig. 6). Survival of yeast in medium containing 10 mM NH_4^+ was higher if complemented with OvAQP-1 and OvAQP-2 than PfAQP while OvAQP-3 showed a lesser but still positive effect compared to the negative control (Fig. 6A). For methylamine OvAQP-1 and OvAQP-3 were comparable to

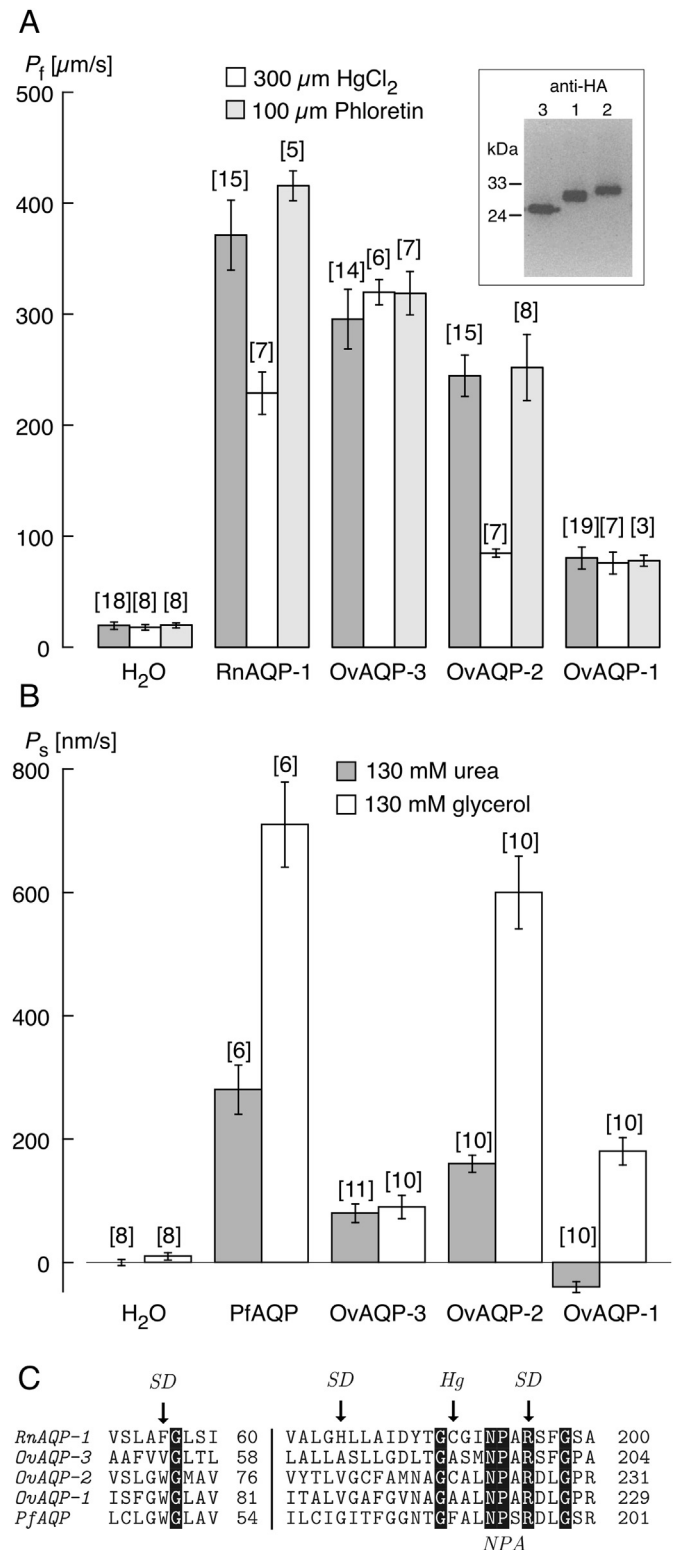


Fig. 5. Graphs of the water and solute permeability of *Xenopus* oocytes expressing the indicated OvAQPs and rat AQP-1 (RnAQP-1). Water-injected oocytes were used as negative control. The number of oocytes per test group is shown in parentheses. **A**, Mean ($\pm$ SEM) osmotic water permeability in ND96 medium with and without $HgCl_2$ and phloretin. The inset shows the expression of OvAQPs in the oocytes detected with an anti-HA antibody. **B**, Mean ($\pm$ SEM) osmotic urea and glycerol permeability. **C**, Multiple alignment of the sequence regions containing established substrate discrimination sites (SD) and the Hg^{2+} sensitive cysteine in mammalian AQP-1 [31]. Shading indicates fully conserved residues. *Rattus norvegicus* AQP-1 (RnAQP-1, GenBank: NP_036910), *Plasmodium falciparum* aquaglyceroporin (PfAQP, PDB: 3C02).

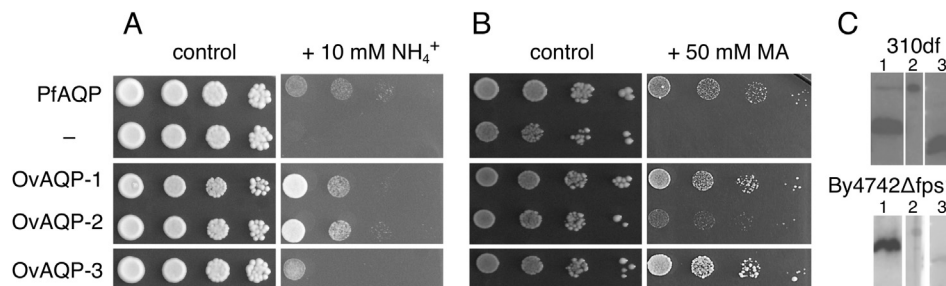


Fig. 6. Yeast growth complementation assays. **A**, Yeast 310df lacking NH₄⁺ transporters expressing either PfAQP or the indicated OvAQP was grown at four 10-fold dilution steps (left to right) on plates without (control) and with NH₄⁺ at pH 7.5. Shown is the cell growth after 4 days which is indicative of NH₃ uptake. **B**, Yeast By4742Δfps1 lacking the endogenous aquaglyceroporin Fps1 expressing either PfAQP or the indicated OvAQP was grown as described above on plates without (control) and with methylamine at pH 5.5. Cell growth after 4 days indicates permeability of the respective AQP for methylamine. Negative control (–), yeast transfected with empty pHA-RS426MET25. **C**, Western blot expression control of OvAQPs in transfected yeast detected with an anti-HA antibody. Transfection of yeast and the following growth assays were done in duplicate.

PfAQP in their effect on the growth of yeast while OvAQP-2 was significantly less effective but again positive compared to the negative control (Fig. 6B). The expression of all OvAQPs in the used yeast strains was tested by immunoblots of microsomal yeast protein with a specific HA-antibody (Fig. 6C).

4. Discussion

In this study we have isolated and functionally characterized three aquaporins from the human liver fluke *O. viverrini* that we had preliminarily classified as two aquaglyceroporins and an orthodox aquaporin based on sequence conservation to these two aquaporin families [10]. The results of the presented permeability assays demonstrate that this discrimination cannot be upheld and that they have bi-functional properties. The apparently 'orthodox' OvAQP-3 does not only conduct water but also urea, glycerol and ammonia at substantial rates while the 'aquaglyceroporin' OvAQP-2 is a robust water-conducting channel at the magnitude of mammalian AQP-1 and an excellent glycerol facilitator similar to PfAQP (Figs. 5 and 6). The second aquaglyceroporin, OvAQP-1 shows mixed results with lower permeability for glycerol than OvAQP-2 and no permeability for urea while the passage of ammonia is unrestricted. The water permeability of OvAQP-1 is comparable to the bacterial glycerol facilitator *E. coli* GlpF which itself has a six-fold lower water permeability than *E. coli* AQPZ [35]. In case of OvAQP-3, while its functional versatility is at first surprising it can be explained by the substitution of two amino acid residues that have been previously shown to change permeability properties of the orthodox mammalian AQP-1. Substitution F56A and H180A in rat AQP-1 maintained water permeability and added permeability for urea, glycerol, and ammonia [31]. The corresponding residues in OvAQP-3 are V54 and A184. The substitution of the bulky phenyl-alanine and histidine residues which together with R195 form the aromatic/arginine (ar/R) constriction located in the outer hemipore on top of the second NPA motif by the much smaller valine and alanine residues results in a larger and more hydrophobic pore as can be seen in the structure model of OvAQP-3 built on human AQP-1 (Fig. 7). It can be inferred that the uncharacterized schistosome AQP CCD77873 will have comparable functionality to OvAQP-3, as it too carries small hydrophobic residues in place of F56A and H180A in rat AQP-1 (V72, V203, Fig. 1). Likewise, the composition of the ar/R constriction of OvAQP-2 could contribute to its high water permeability, i.e. presence of the polar C220 instead of the hydrophobic A218 in OvAQP-1 or F200 in GlpF. In *E. coli* GlpF substitutions W48F and F200T caused an increased flow of water due to the changed pore size and polarity [36]. Not in every case are the permeability properties easily explained by the residues in the ar/R constriction, for example the aquaglyceroporin PfAQP which we

have here used as control for urea/glycerol and ammonia permeability conducts water at a rate comparable to mammalian AQP-1 but carries the identical set of residues as the much less water permeable GlpF in the ar/R constriction [37]. In addition, PfAQP carries the diverged NPA motifs NLA and NPS but mutation analysis demonstrated that these did not affect water permeability [37]. This is very contrasting to the effect of the diverged first NPA motif in *F. gigantica* AQP-1 and -2 formed by the residues TAA and for which we had demonstrated that substitution of the threonine residue with an asparagine partially restored water permeability [10]. Consequently, PfAQP and OvAQP-2 are two interesting examples of bi-functional aquaglyceroporins with high water permeability apparently based on different structural adaptations. Determination of their structures is required to conclude which residues are involved in their remarkable permeability properties. Mercurial inhibition was only observed for OvAQP-2 and is most likely due to C220 as observed in mammalian AQP-1 [33,34] and we had noted the importance of this residue for water permeability in mutant analysis of *F. gigantica* AQP-1 [10]. Interestingly, the diuretic compound phloretin had no effect on water permeability of any OvAQP which is different from what has been reported for the aquaglyceroporin ACI31185 in *S. mansoni* [9]. Indeed, like OvAQP-2 the orthologous SmACI31185 showed high water permeability, in addition it was highly permeable for lactate and at lesser rates for mannitol, fructose and L-alanine but not glucose in oocyte assays [9] and the researchers demonstrated lactate excretion through SmACI31185 in the parasite, an important protective function to prevent internal acidification.

What are the implications of the observed bi-functional properties of the OvAQPs? In case of PfAQP it is obvious as it is the only aquaporin in *P. falciparum* and high permeability for water and glycerol will be essential to the parasite. In contrast, recently published genome data implies the presence of possibly five aquaporins in *O. viverrini*, three of which by their sequence are members of the aquaglyceroporin family including OvAQP-1 and OvAQP-2. Yet, OvAQP-3 the sole aquaporin of evident orthodox family lineage evolved to gain additional functionality of aquaglyceroporins while OvAQP-2 gained increased water permeability. It can be reasoned that the parasite does not require strict aquaporins or aquaglyceroporins and that the passage of an increased range of compounds by the same channel has been evolutionary beneficial. Given the overlapping permeability properties of the OvAQPs it must be asked whether this redundancy is reflected in their biological roles for the parasite. Gene-specific OvAQP null mutants would be required to conclude from their phenotype whether or not the abolished activity interferes with parasite development in specific ways starting from embryogenesis. Currently, such genetics analysis is hardly achievable in trematodes

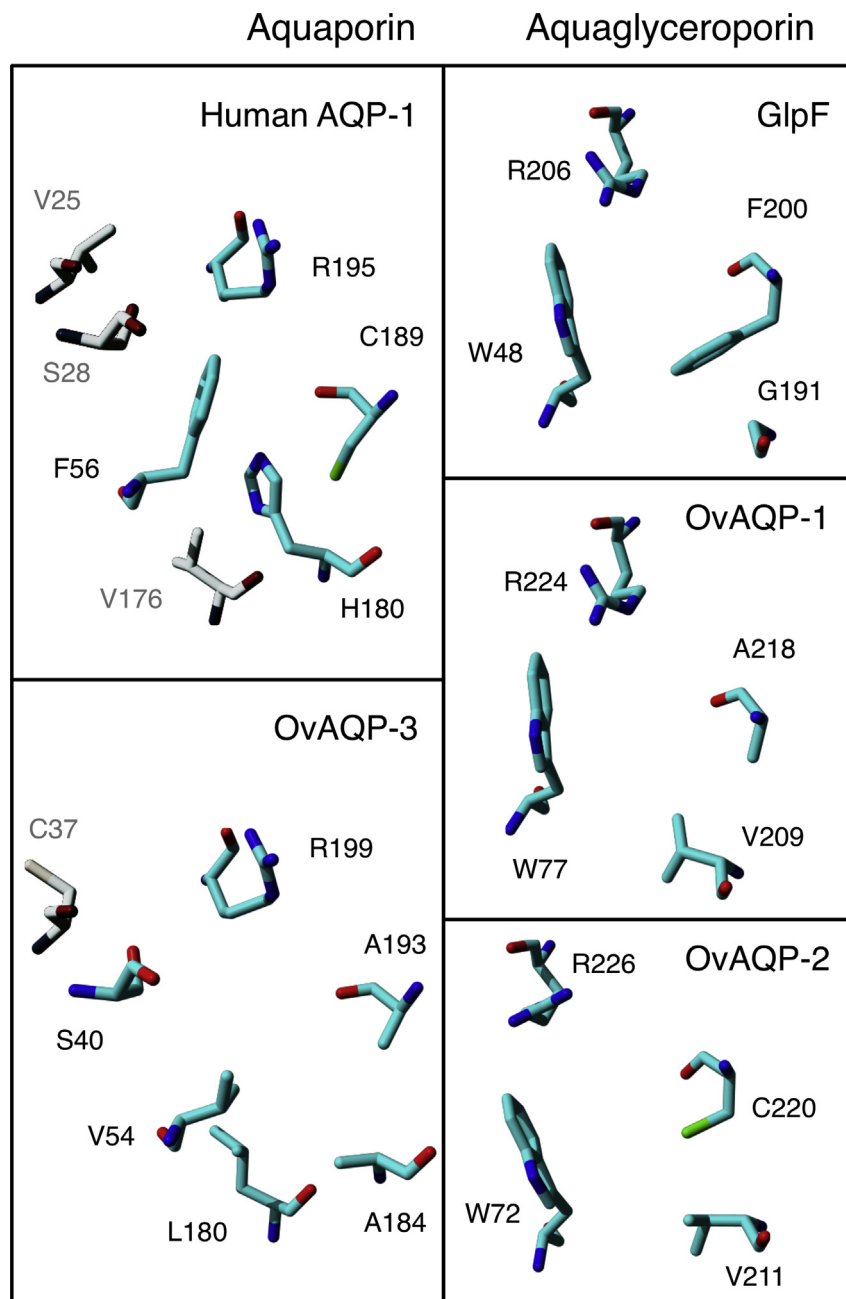


Fig. 7. Molecular modelling of the ar/R constriction of the OvAQPs. SWISS-MODEL was used to create structure models of OvAQP-3 based on human AQP-1 (PDB 1H6I, [26]) and OvAQP-1 and OvAQP-2 based on *E. coli* GlpF (PDB: 1FX8, [27]). Amino acid residues that do not directly contribute to the constriction are drawn in faded color and labelled in gray. Substitution of the bulky amino acid residues F56 and H180 in mammalian AQP-1 by V54 and A184 in OvAQP-3 leads to a wider pore which presumably allows urea, glycerol, and ammonia to pass as observed in the relevant assays and previously shown for mutants of rat AQP-1 [31]. In OvAQP-1 the hydrophobic A218 and in OvAQP-2 the polar C220 are in place of GlpF F200. Molecular graphics created with YASARA (www.yasara.org) and POVray (www.povray.org).

and alternative, second best, approaches are required. Firstly, permeability properties of all parasite aquaporins must be assessed by a larger set of molecules to conclude full or partial functional redundancy. Secondly, tissue- and developmental expression patterns must be determined to conclude possible unique functions of distinct OvAQPs. Thirdly, temporal depletion of gene products would allow to gain insight to which magnitude each OvAQP contributes to the flux of recorded compounds if at the same time up/down regulation of the remaining AQPs is observed. Of course one would also have to consider secondary, AQP-independent pathways that could lead to the uptake or release of the analyzed compounds and which are the reason to analyze AQPs and other

channels in easier controlled systems, e.g. liposomes, frog oocytes or mutant yeast. In case of OvAQP-3 we have demonstrated its presence at the RNA level from the NEJ to adult parasite and at the protein level in adult parasites as a 60 kDa transmembrane protein that is located in the parenchyma, tegumental type tissues and mature sperm in testis lobes, seminal receptacle and vesicle. Concerning its presence in mature sperm it can be reasoned that OvAQP-3 protects sperm from swelling and thereby maintains their motility and finally fertilization (for reviews discussing mammalian AQPs in sperms see Refs. [38,39]). Furthermore, it will participate in fluid and solute exchange within the parenchyma and between parenchyma and tegument. OvAQP-3 is therefore wider distributed

than FgAQP-1 which was found located in tegumental type tissue and in the epithelial linings of testis lobes and ovary [10]. Given the very low water permeability of FgAQP-1 and the related FgAQP-2 and absence of glycerol/urea/ammonia permeability these AQPs will be involved in higher specialized functions than OvAQP-3. Remarkably, SmACI31185 with its wide permeability properties has been described as a tegument-specific AQP in two excellent publications [7,9] and siRNA treatment to knock down this AQP decreased viability of cultured schistosomula to below 40% at day 21 while the size of surviving parasites was found significantly reduced. In a rather limited study of OvAQP-1 and OvAQP-2 in *O. viverrini* which is hampered by grave shortcomings it has been shown that the knock down of these AQPs by RNA interference expectedly reduces swelling of adult parasites in distilled water and that the RNA products are found in eggs (of unspecified developmental state), cercariae, metacercariae and adult parasites at different amounts [8].

Finally, of interest are not only the permeability properties and biological roles of parasite aquaporins but equally important their application as tools for drug delivery or as drug target (for a recent review see Ref. [20]). Due to their limiting pore size and permeability properties the kind of drugs that can be delivered through AQPs is restricted. Antimonial drug delivery has been reported for LmAQP1 an aquaglyceroporin from *Leishmania major* [40] and later for SmACI31185 [7]. Recently, AQP2 of trypanosomes, an aquaglyceroporin has been shown to facilitate efficient uptake of melarsoprol and pentamidine and mutations of the AQP2 gene cause resistance to these drugs [17–19]. Concerning the direct inhibition of AQPs, it has been demonstrated that certain derivatives of the diuretic drug Bumetanide are able to bind and block activity of mammalian AQP-1 and AQP-4 [15]. These are promising findings that support application of parasite AQPs for new intervention strategies in parasite infections and we are actively investigating the described *O. viverrini* AQPs for such approaches.

Note

Nucleotide sequence data reported in this paper is available in the EMBL, GenBank and DDBJ databases under the accession number KM359766.

Acknowledgment

The work of AG and RG was supported by grants from the Thailand Research Fund (Contract No. MRG5580189 and BRG5580006), Thammasat University, Thailand, the Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand, and a DAAD (German Academic Exchange) postdoctoral fellowship to AG. We thank the Laboratory Animal Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University for the provision of hamsters.

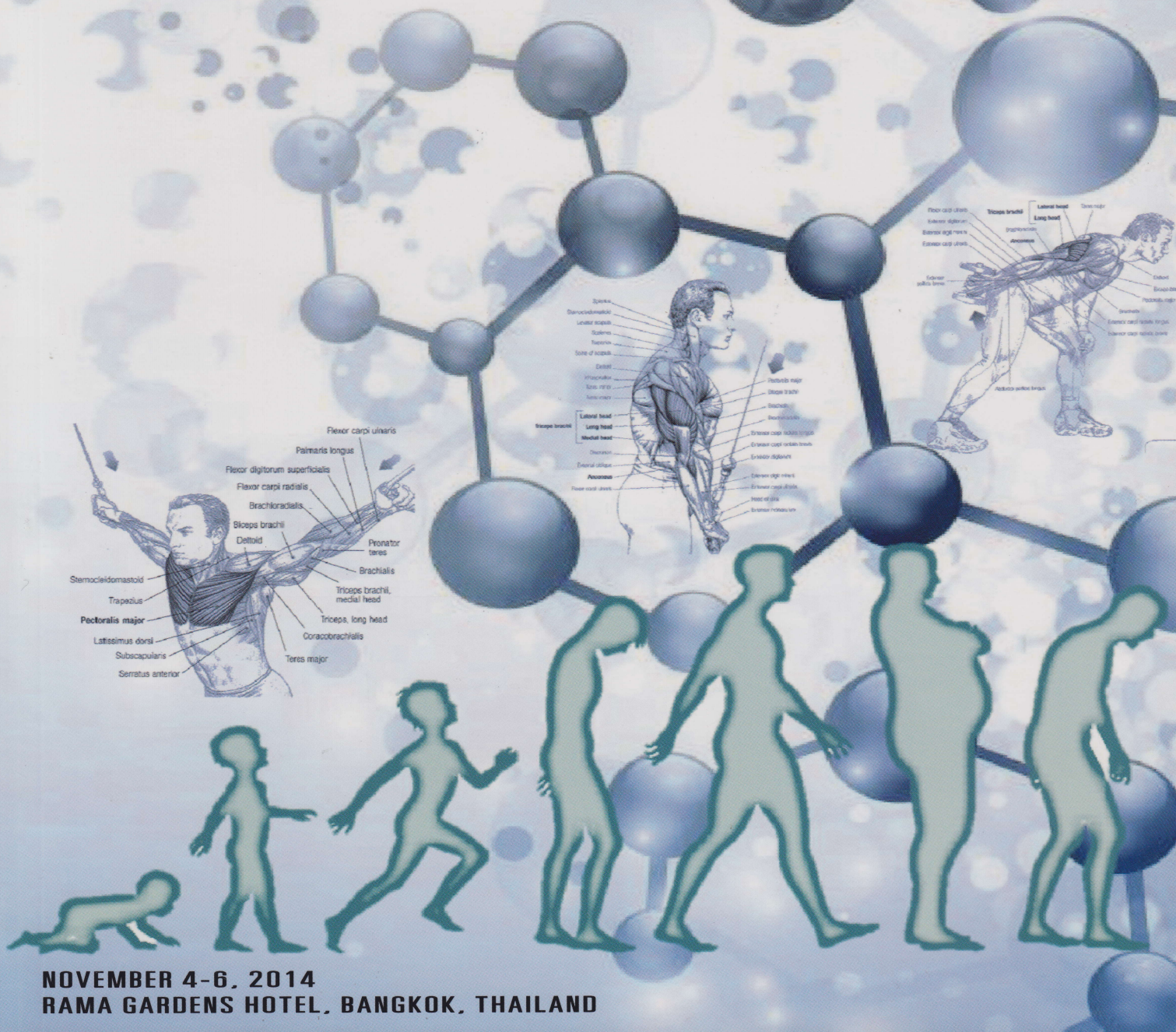
References

- [1] B. Sripa, S. Kaewkes, P. Sithithaworn, E. Mairiang, T. Laha, M. Smout, C. Pairojikul, V. Bhudhisawasdi, S. Tesana, B. Thinkamrop, J.M. Bethony, A. Loukas, P.J. Brindley, Liver fluke induces cholangiocarcinoma, *PLoS Med.* 4 (2007) e201, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0040201>.
- [2] B. Sripa, C. Pairojikul, Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24 (3) (2008) 349–356, <http://dx.doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282fb9b3>.
- [3] N. Kaewpitoon, S.J. Kaewpitoon, P. Pengsaa, B. Sripa, *Opisthorchis viverrini*: The carcinogenic human liver fluke, *World J. Gastroenterol.* 14 (5) (2008) 666–674, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.666>.
- [4] P. Agre, Nobel lecture. Aquaporin water channels, *Biosci. Rep.* 24 (3) (2004) 127–163, <http://dx.doi.org/10.1007/s10540-005-2577-2>.
- [5] B.E. Knox, E.M. Pantelouris, Osmotic behaviour of *Fasciola hepatica* L in modified Hedon-Fleig media, *Comp. Biochem. Physiol.* 18 (1966) 609–625, [http://dx.doi.org/10.1016/0010-406X\(66\)90244-1](http://dx.doi.org/10.1016/0010-406X(66)90244-1).
- [6] A.H. Siddiqi, P.L. Lutz, Osmotic and ionic regulation in *Fasciola gigantica* (Trematoda: Digenea), *Exp. Parasitol.* 19 (1966) 348–357, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894\(66\)90086-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(66)90086-5).
- [7] Z. Faghiri, P.J. Skelly, The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake, *FASEB J.* 23 (2009) 2780–2789, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-130757>.
- [8] S. Thanasuwan, S. Piratae, P.J. Brindley, A. Loukas, S. Kaewkes, T. Laha, Suppression of aquaporin, a mediator of water channel control in the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, *Parasites Vectors* 7 (2014) 224, <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-224>.
- [9] Z. Faghiri, S.M. Camargo, K. Huggel, I.C. Forster, D. Ndegwa, F. Verrey, P.J. Skelly, The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter, *PLoS ONE* 5 (2010) e10451, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010451>.
- [10] A. Geadkaew, J. von Bulow, E. Beitz, S.V. Grams, V. Viyanant, R. Grams, Functional analysis of novel aquaporins from *Fasciola gigantica*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 175 (2011) 144–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.10.010>.
- [11] A.J. Yool, Functional domains of aquaporin-1: keys to physiology, and targets for drug discovery, *Curr. Pharm. Des.* 13 (31) (2007) 3212–3221, <http://dx.doi.org/10.2174/138161207782341349>.
- [12] R. Haddoub, M. Rutzler, A. Robin, S.L. Flitsch, Design, synthesis and assaying of potential aquaporin inhibitors, *Handb. Exp. Pharmacol.* 190 (2009) 385–402, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_19.
- [13] R. Mukhopadhyay, E. Beitz, Metalloid transport by aquaglyceroporins: consequences in the treatment of human diseases, *Adv. Exp. Med. Biol.* 679 (2010) 57–69, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-6315-4_5.
- [14] V.J. Huber, M. Tsujita, I.L. Kwee, T. Nakada, Inhibition of aquaporin 4 by antiepileptic drugs, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 418–424, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.12.038>.
- [15] E. Migliati, N. Meurice, P. DuBois, J.S. Fang, S. Somasekharan, E. Beckett, G. Flynn, A.J. Yool, Inhibition of aquaporin-1 and aquaporin-4 water permeability by a derivative of the loop diuretic bumetanide acting at an internal pore-occluding binding site, *Mol. Pharmacol.* 76 (2009) 105–112, <http://dx.doi.org/10.1124/mol.108.053744>.
- [16] M. Ozu, R.A. Dorr, M. Teresa Politi, M. Parisi, R. Toriano, Water flux through human aquaporin 1: inhibition by intracellular furosemide and maximal response with high osmotic gradients, *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 737–746, <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-011-0687-2>.
- [17] N. Baker, L. Glover, J.C. Munday, D. Aguinaga Andres, M.P. Barrett, H.P. de Koning, D. Horn, Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 10996–11001, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1202885109>.
- [18] F.E. Graf, P. Ludin, T. Wenzler, M. Kaiser, R. Brun, P.P. Pyana, P. Buscher, H.P. de Koning, D. Horn, P. Maser, Aquaporin 2 mutations in *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates correlate with decreased susceptibility to pentamidine and melarsoprol, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e2475, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002475>.
- [19] J.C. Munday, A.A. Eze, N. Baker, L. Glover, C. Clucas, D. Aguinaga Andres, M.J. Natto, I.A. Tekka, J. McDonald, R.S. Lee, F.E. Graf, P. Ludin, R.J. Burchmore, C.M. Turner, A. Tait, A. MacLeod, P. Maser, M.P. Barrett, D. Horn, H.P. de Koning, *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs, *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (2014) 651–663, <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt442>.
- [20] J. Song, E. Mak, B. Wu, E. Beitz, Parasite aquaporins: current developments in drug facilitation and resistance, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (5) (2014) 1566–1573, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.014>.
- [21] N.D. Young, B.E. Campbell, R.S. Hall, A.R. Jex, C. Cantacessi, T. Laha, W.M. Sohn, B. Sripa, A. Loukas, P.J. Brindley, R.B. Gasser, Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010) e719, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000719>.
- [22] P. Rice, I. Longden, A. Bleasby, EMBOSS: the European molecular biology open software suite, *Trends Genet.* 16 (2000) 276–277, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)00204-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(00)00204-2).
- [23] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J.D. Thompson, D.G. Higgins, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011) 539, <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- [24] E. Beitz, TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon, *Bioinformatics* 16 (2000) 135–139, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/16.2.135>.
- [25] L. Bordoli, F. Kiefer, K. Arnold, P. Benkert, J. Battey, T. Schwede, Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.197>.
- [26] B.L. de Groot, A. Engel, H. Grubmüller, A refined structure of human aquaporin-1, *FEBS Lett.* 504 (2001) 206–211, [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02743-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02743-0).
- [27] D. Fu, A. Libson, I.J. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski, R.M. Stroud, Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity, *Science* 290 (2000) 481–486, <http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5491.481>.

- [28] V. Eursitthichai, V. Viyanant, S. Tesana, P. Sithithaworn, N. Kosa, R. Grams, *Opisthorchis viverrini*: evaluation of 28kDa glutathione S-transferase as diagnostic tool in human opisthorchiasis, *Acta Trop.* 114 (2010) 76–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.007>.
- [29] S. Chunchob, R. Grams, V. Viyanant, P.M. Smooker, S. Vichasri-Grams, Comparative analysis of two fatty acid binding proteins from *Fasciola gigantica*, *Parasitology* 137 (2010) 1805–1817, <http://dx.doi.org/10.1017/S003118201000079X>.
- [30] B. Wu, C. Steinbronn, M. Alsterfjord, T. Zeuthen, E. Beitz, Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel, *EMBO J.* 28 (2009) 2188–2194, <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.182>.
- [31] E. Beitz, B. Wu, L.M. Holm, J.E. Schultz, T. Zeuthen, Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 269–274, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507225103>.
- [32] B. Wu, K. Altmann, I. Barzel, S. Krehan, E. Beitz, A yeast-based phenotypic screen for aquaporin inhibitors, *Pflugers Arch.* 456 (2008) 717–720, <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-007-0383-3>.
- [33] G.M. Preston, J.S. Jung, W.B. Guggino, P. Agre, The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 17–20.
- [34] R. Zhang, A.N. van Hoek, J. Biwersi, A.S. Verkman, A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k, *Biochemistry* 32 (1993) 2938–2941.
- [35] M.J. Borgnia, P. Agre, Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 2888–2893, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.051628098>.
- [36] E. Tajkhorshid, P. Nollert, M.O. Jensen, L.J. Miercke, J. O'Connell, R.M. Stroud, K. Schulten, Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning, *Science* 296 (2002) 525–530, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067778>.
- [37] M. Hansen, J.F. Kun, J.E. Schultz, E. Beitz, A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4874–4882, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110683200>.
- [38] C.H. Yeung, Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role, *Asian J. Androl.* 12 (4) (2010) 490–499, <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2010.40>.
- [39] Q. Chen, E.K. Duan, Aquaporins in sperm osmoadaptation: an emerging role for volume regulation, *Acta Pharmacol. Sin.* 32 (6) (2011) 721–724, <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2011.35>.
- [40] B. Gourbal, N. Sonuc, H. Bhattacharjee, D. Legare, S. Sundar, M. Ouellette, B.P. Rosen, R. Mukhopadhyay, Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 31010–31017, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M403959200>.

The 1st International Allied Health Sciences Conference 2014
on the Occasion of the 80th Anniversary of Thammasat University

INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEDICAL INNOVATION FOR HEALTH



NOVEMBER 4-6, 2014
RAMA GARDENS HOTEL, BANGKOK, THAILAND

Molecular Cloning and Characterization of Three Water Channel Proteins (Aquaporins, OvAQP1-3) from *Opisthorchis viverrini*

Geadkaew A.^{1*}, von Bülow J.², Beitz E.², Vichasri-Grams S.³, Grams R.¹

¹ Graduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

²Pharmazeutisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany

³Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Introduction: Aquaporins (AQP) are essential mediators of water regulation in all living organisms. They are members of the major intrinsic protein (MIP) superfamily of integral membrane proteins. Aquaporins are potential vehicles or targets for chemotherapy. Two examples of toxic molecules that can pass through protozoan aquaporins are hydroxyurea and the hydroxide of trivalent antimony, which kill protozoan parasites. It is interesting that an expressed sequence tag (EST) and genomic databases of the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, showed three aquaporin homologues that have not been characterized yet. *O. viverrini* is an important liver fluke in Thailand which causes opisthorchiasis and is associated with cholangiocarcinoma.

Objective: Cloning and functional characterization of three aquaporin (OvAQP1, 2 and 3) from the liver fluke *O. viverrini*.

Materials & Methods: We have isolated three aquaporin homologues (OvAQP-1, 2 and 3) by reverse transcriptase PCR from total RNA of adult *O. viverrini* using specific primers designed from ESTs. Transcription in different stages (newly excysted-, 2-, 4-week juveniles and adult) was determined by reverse transcriptase PCR. Immunohistochemical analysis was done to demonstrate the protein distribution on the tissue sections. Functional characterization was performed by *Xenopus* oocyte swelling and yeast phenotypic assays.

Results: Amino acid sequences of three OvAQP1-3 aquaporins contain highly conserved NPA motifs (asparagine-proline-alanine). OvAQP-1 transcripts were detected in 2-week-old juveniles and later stages, while OvAQP-2 and OvAQP-3 transcripts were detected in newly excysted juveniles and later stages. Immunohistochemical analysis demonstrated that the three OvAQPs are located in tegument, parenchyma and spermatozoa of the parasite. Functional characterization showed OvAQP-1, OvAQP-2, and OvAQP-3 can conduct water, urea and glycerol albeit at different rates. In addition, all OvAQPs can transport ammonia and methylamine.

Conclusion: Three *O. viverrini* aquaporins (OvAQP1-3) can conduct water and other solutes, i.e. ammonia, methylamine, urea and glycerol. In further studies we will investigate RNAi knockout and specific inhibition of these parasite AQPs by distinct pharmaceuticals.

Keywords: aquaporin, major intrinsic protein, liver fluke, *Opisthorchis viverrini*



가톨릭대학교
THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA

Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University and BK21-PLUS,
The Catholic University of Korea Collaboration

The 2nd Joint Symposium of BK21-PLUS of CUK and Thammasat University

January 21st - 23rd, 2015

Sathaporn Kawithanon Convention Hall
3rd Floor, Service Building

Hosted by

Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Thailand



Targeting AQP_s in *Opisthorchis viverrini* and *Fasciola gigantica* for chemical intervention in food-borne trematodiasis

Rudi Grams^{1*}, Amornrat Geadkaew¹, J. von Bülow², E. Beitz²,
Suksiri Vichasri-Grams³

¹Graduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani, Thailand, ²Pharmazeutisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany, ³Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Aquaporins (AQP_s) 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 AQP 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 are investigating the complete set of AQP_s 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.

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

2017

The Joint Symposium of The Catholic University of Korea, Thammasat University(Thailand), National Defense Medical Center(Taiwan), and Human Genome Organization(HUGO)

Asian Leadership for Health Science and Precision Medicine

(Day 1)

June 2(Fri.), 2017

Room 1003, 1F, Institute of Biomedical Industry,
The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

15:30 – 16:00 Registration		
16:00 – 16:20 Opening Speech by guest and Welcome address		
Prof. Kampol Ruchiwit (Dean, Faculty of Allied Health Sciences Thammasat Univ Thailand) Prof. Sui-Lung Su (National Defense Medical Center, Taiwan) Prof. Yeun-Jun Chung (The Catholic University of Korea)		
16:20-18:00 Plenary Lecture		Chair: Yeun-Jun Chung (The Catholic University of Korea)
16:20-16:50	Wiki annotation of direct to consumer and clinical genomes	Michael Cariaso (River Road Bio LLC, CTO, USA)
16:50-17:10	Candidate gene association study in osteoarthritis and chronic kidney disease	Prof. Sui-Lung Su (National Defense Medical Center, Taiwan)
17:10-17:30	Dendritic Cell and Vγ9Vδ2 T Cell Development in the Presence of Antimicrobial Peptides	Prof. SAWANG PETVISES (Thammasat University, Thailand)
17:30-17:50	A Systems Approach to Inflammatory Arthritis	Prof. Wan-Uk Kim (The Catholic University of Korea)
17:50-18:00 Closing Remark		
18:00 ~ Dinner & Discussion		

2017

The Joint Symposium of The Catholic University of Korea, Thammasat University(Thailand), National Defense Medical Center(Taiwan), and Human Genome Organization(HUGO)

Asian Leadership for Health Science and Precision Medicine

(Day 2)

June 3(Sat.), 2017

Room 1003, 1F, Institute of Biomedical Industry,
The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Oral Session I		Chair: Seong Yun Kim (The Catholic University of Korea)
9:00-9:20	Epigenetic silencing of development-related transcription factors contributes to human carcinogenesis	Prof. Ya-Wen Lin (National Defense Medical Center, Taiwan)
9:20-9:40	Roles of CXCR4/CXCL12 chemokine receptor/ligand axis in anoikis resistance of breast cancer cells	Prof. Chareeporn Akekawatchai (Thammasat University, Thailand)
9:40-10:00	Precision medicine in Catholic University of Korea : Beyond research	Prof. Yeun-Jun Chung (The Catholic University of Korea)
10:00-10:20	Investigate the biochemical change in the microenvironment of diabetic foot ulcer	Prof. Jehng-Kang Wang (National Defense Medical Center, Taiwan)
10:20-10:40	Coffee Break	
10:40-11:00	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and hemoglobinopathies among malaria patients in a malaria-endemic area along Thai-Myanmar border	Prof. Jiraporn Kuesap (Thammasat University, Thailand)
11:00-11:20	Clinical application of induced pluripotent stem cell	Prof. Ji Hyeon Ju (The Catholic University of Korea)
11:20-11:40	The molecular mechanism of CD164 in tumorigenesis	Prof. James Yi-Hsin Chan (National Defense Medical Center, Taiwan)
11:40-12:00	Preconditioning of human mesenchymal stem cells enhances their immunoregulatory potential for cellular therapy in arthritis	Prof. Mi-La Cho (The Catholic University of Korea)
12:00-13:00	Lunch	
Oral Session II		Chair: Sug Hyung Lee (The Catholic University of Korea)
13:00-13:20	HSP70 and HO-1 are involved in the protective effect of 17-DMAG on multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxemia in rats	Prof. Yen-Mei Lee (National Defense Medical Center, Taiwan)
13:20-13:40	Functional analysis of <i>Opisthorchis viverrini</i> aquaporins	Prof. Amornrat Geadkaew-Krenc (Thammasat University, Thailand)
13:40-14:00	Harnessing adult neurogenesis for preventing epilepsy	Prof. Kyung-Ok Cho (The Catholic University of Korea)
Poster Session (9:00-14:00) All post-graduate students		
17:40-17:50	Closing Remark	
18:00 ~	Dinner & Discussion	

2017

The Joint Symposium of The Catholic University of Korea, Thammasat University(Thailand),
National Defense Medical Center(Taiwan), and Human Genome Organization(HUGO)

Asian Leadership for Health Science and Precision Medicine (Day 3)

June 4(Sun.), 2017

Room 1003, 1F, Institute of Biomedical Industry,
The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Songeu Campus tour

9:00-11:00 Lab tour

- Medical College of The Catholic University of Korea
- Institute of Biomedical Industry
- BK21 PLUS Convergence HealthCare Science Program
- Precision Medicine Research Center
- Medical Research Center

13:00-17:00 Hospital tour

- Seoul St Mary's Hospital



The Catholic University of Korea, College of Medicine
222 Banpo-daero, Seoch-gu, Seoul 06591, Korea
Tel: +82-2-2258-7343 Fax: +82-2-596-8969

March 30, 2017

Invitation Letter

Dear Professor Amornrat Geadkaew-Krenc,

It is our great honor to invite you as a distinguished speaker in 'The Joint Symposium of The Catholic University of Korea, Thammasat University (Thailand), National Defense Medical Center (Taiwan), and Human Genome Organization (HUGO)' on June 2-3, 2017, to be held at The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea. The title of the joint symposium is 'Asian Leadership for Health Science and Precision Medicine'.

We believe that your work would be of interest to the participants of the symposium. Therefore, we would like to invite you to give a talk on the subject of your choice. We will inform you the program details soon.

If you have any questions, feel free to contact Ms. JE Choi (Office: +82-2-2258-7902/ Mobile: +82-10-9206-2521; Email: marcbyj@catholic.ac.kr).

Thank you and we look forward to seeing you in Seoul !

Sincerely,

Yeun-Jun Chung M.D., Ph.D.

Professor, Director
Catholic Precision Medicine Research Center
Integrated Research Center for Genome Polymorphism
The Catholic University of Korea, College of Medicine
Seoul, Korea
Tel: +82-2-2258-7343
Email: yejun@catholic.ac.kr

Human Parasitic Aquaporins: New Anti-Parasitic Drug Targets

Amornrat Geadkaew*

*Graduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani*

Abstract

Aquaporins (AQPs) are transmembrane proteins which are essential for the maintenance of homeostasis in all organisms. Mammalian aquaporins have been extensively studied in their structures, functions, pathology and biomolecules. At nucleic acid and protein levels, aquaporins can be classified into two major groups; orthodox aquaporins and aquaglyceroporins. Most parasite aquaporins are aquaglyceroporins, which are permeable to water and other uncharged solutes. Parasite aquaporins also act as channels for nutrients from the environment or waste products from the parasite bodies, including some substances that repress proliferation of parasites. Therefore, aquaporins are feasible target proteins for developing novel anti-parasitic drugs or drug facilitators for parasitic infection treatment in the future.

Keywords: Aquaporin, Transmembrane protein, Parasite, Drug target

*Corresponding author E-mail address: gamornra@tu.ac.th

อะควอพอรินของปรสิตก่อโรคในคน: เป้าหมายใหม่ของการรักษาโรคปรสิต

อมรรัตน์ เกิดแก้ว*

บัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี

บทคัดย่อ

อะควอพอริน (เอคิวพี) เป็นโปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีความสำคัญต่อการรักษาสมดุลในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีการศึกษาอะควอพอรินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างกว้างขวาง ทั้งด้านโครงสร้างหน้าที่ พยาธิวิทยา และชีวโมเลกุล การศึกษาในระดับยีนและโปรตีนทำให้สามารถแบ่งอะควอพอรินเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ orthodox aquaporins และ aquaglyceroporins และเมื่อศึกษาอะควอพอรินของปรสิตพบว่าส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม aquaglyceroporins ซึ่งยอมให้น้ำและโมเลกุลที่ไม่มีขั้วผ่าน นอกจากนี้อะควอพอรินของปรสิตยังทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านสำหรับการขนส่งสารอาหาร และการขับของเสีย รวมถึงเป็นทางผ่านสำหรับโมเลกุลที่สามารถยับยั้งการดำรงชีวิตของปรสิตได้อีกด้วย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้โปรตีนอะควอพอรินเป็นเป้าหมายของยาในการพัฒนายาต้านเชื้อปรสิตชนิดใหม่ หรือใช้เป็นช่องทางผ่านของยา ซึ่งจะนำมารักษาโรคติดเชื้อปรสิตต่อไปในอนาคต

คำรหัส: อะควอพอริน โปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ปรสิต เป้าหมายของยา

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: gamornra@tu.ac.th

บทนำ

โรคติดเชื้อจากปรสิต (parasitic diseases) นับเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากในประเทศแถบร้อนชื้นจนถึงแถบอบอุ่น การติดเชื้อจากปรสิตส่วนใหญ่เกิดจากระบบสาธารณสุขที่ไม่ได้มาตรฐาน รวมถึงพฤติกรรมและวัฒนธรรมในการใช้ชีวิตของประชาชนในพื้นที่ จากรายงานขององค์การอนามัยโลก พบว่า ในปี 2012 มีประชากรเสียชีวิตจากการติดเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium* spp.) ประมาณ 627,000 คน โดยส่วนใหญ่เป็นเด็กที่อาศัยอยู่ในทวีปแอฟริกา⁽¹⁾ ปัจจุบันยังไม่มีการผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพื่อป้องกันการติดเชื้อจากปรสิต รวมถึงมีการดื้อยาของเชื้อปรสิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อมาลาเรีย⁽²⁾ ซึ่งปัจจัยการดื้อยาอาจมาจากตัวเชื้อปรสิตเองหรือจากการบริหารยาอย่างไม่เหมาะสม การผลิตวัคซีนเพื่อให้ได้มาตรฐานและเกิดประสิทธิภาพสูงสุดต้องใช้ระยะเวลานาน รวมถึงต้องใช้งบประมาณค่อนข้างสูง ดังนั้นการวิจัยเพื่อศึกษาโมเลกุลของปรสิตที่สามารถพัฒนาเป็นเป้าหมายของยา (drug target) จึงเป็นสิ่งที่ต้องเร่งดำเนินการ โปรตีนอะควอพอรินซึ่งพบได้บริเวณผิวหรือโครงสร้างภายนอกของปรสิต เป็นสารชีวเคมีที่สำคัญต่อการนำไปพัฒนาเป็นเป้าหมายของยา เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีการสัมผัสกับสภาวะภายนอกและมีลักษณะจำเพาะ ดังเช่นการศึกษาในพยาธิซึ่งพบว่าผิวของพยาธิตัวแบน (tegument) และผิวของพยาธิตัวกลม (cuticle) มีโครงสร้างที่ซับซ้อนแตกต่างกัน⁽³⁾ ซึ่งจุดนี้น่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งของปัญหาในการผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสูงได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาอะควอพอรินที่อยู่บริเวณผิวของปรสิตอย่างละเอียด เนื่องจากมีความสำคัญต่อการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งการดำรงชีวิตหรือทำลายปรสิตได้⁽⁴⁾

โปรตีนอะควอพอรินพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ ปรสิต พืช และคน⁽⁵⁾ โปรตีนอะควอพอรินในคนมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคหลายชนิด เช่น โรคไขมันในตับ โรคเกี่ยวกับสมอง และโรคไต⁽⁶⁾ บทความนี้จะเน้นที่โปรตีนอะควอพอรินของปรสิตที่ก่อโรคในคน ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ อะควอพอรินของกลุ่มโปรโตซัว (protozoan aquaporins) และอะควอพอรินของกลุ่มพยาธิตัวแบน (platyhelminthes aquaporins) ซึ่งมีสองพวกใหญ่ที่ก่อโรคในคนคือ พยาธิตืดและพยาธิใบไม้ โดยจะนำเสนอโครงสร้างและหน้าที่ทางสรีรวิทยา รวมถึงโอกาสการประยุกต์ใช้โปรตีนอะควอพอรินในการพัฒนาเป็นเป้าหมายของยาหรือช่องทางผ่านของยารักษาโรคติดเชื้อปรสิตต่อไปในอนาคต

1. โครงสร้างของโปรตีนอะควอพอริน

อะควอพอริน เป็นโปรตีนชนิดที่โมเลกุลประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (monomer) เหมือน ๆ กัน อยู่ร่วมกันเป็น homotetramer ที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane protein) แต่ละหน่วยย่อยทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านสำหรับน้ำและโมเลกุลขนาดเล็ก โปรตีนอะควอพอรินแต่ละหน่วยย่อย (Fig. 1) ประกอบด้วยส่วนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ 6 ส่วน (1-6) เชื่อมต่อกันด้วยห่วง 5 เส้น (A-E) จัดตัวในลักษณะที่ทำให้เกิดเป็นช่องว่างขนาดเล็กข้างเป็นช่องทางเชื่อมต่อระหว่างด้านใน (intracellular) และด้านนอก (extracellular) ของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่บริเวณตอนกลางของช่อง มีกรดอะมิโนที่สำคัญและทำหน้าที่ในการควบคุมการผ่านเข้าออกของน้ำและโมเลกุลอื่นๆ เรียกว่า asparagine-proline-alanine motifs (NPA motifs) ซึ่งมีกลุ่มกรดอะมิโนนี้อยู่ 2 ตำแหน่ง เนื่องจากกรดอะมิโนแอสพาราจีน มีประจุบวก จึงทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้โมเลกุลของสารที่มีประจุบวกผ่านเข้าออกได้⁽⁷⁾

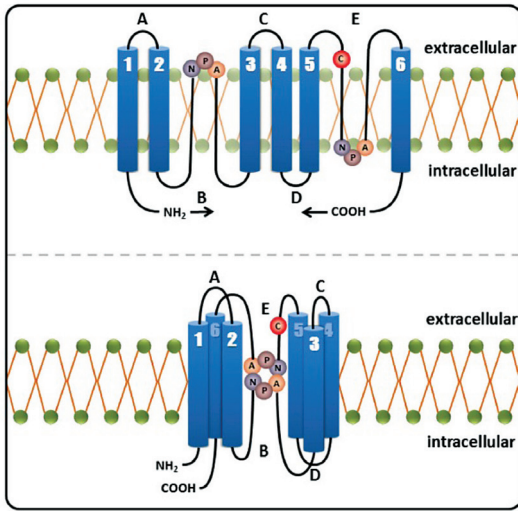


Fig. 1 Representation of the aquaporin (AQP) structure. An aquaporin monomer consists of six transmembrane regions (1-6) connected by five loops (A-E). The two NPA motifs interact with each other at the central region of the channel forming a narrow portion⁽³¹⁾.

2. หน้าที่ทางสรีรวิทยาของโปรตีนอะควาพอริน

อะควาพอริน ทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านเข้าออกของน้ำระหว่างเซลล์ นอกจากนี้โมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ ที่ไม่มีขั้ว เช่น แอมโมเนีย ยูเรีย และกลีเซอรอล ยังสามารถผ่านเข้าออกได้อีกด้วย จากหน้าที่ดังกล่าวสามารถแบ่งอะควาพอรินเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เรียกว่า orthodox aquaporins ทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของน้ำเพียงอย่างเดียว ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเรียกว่า aquaglyceroporins เป็นช่องทางผ่านสำหรับน้ำและโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ ที่ไม่มีขั้ว โดยส่วนใหญ่โมเลกุลของน้ำสามารถผ่านเข้าออกระหว่างเซลล์ทางโปรตีนอะควาพอรินโดยการแพร่แบบ simple diffusion แต่ในเซลล์บางชนิด ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) แคลเซียม และฮอร์โมน สามารถ

ควบคุมการปิด-เปิดของโปรตีนอะควาพอรินได้อีกด้วย⁽⁸⁾

3. อะควาพอรินที่พบในปรสิตก่อโรคในคน

ปัจจุบันอะควาพอรินที่พบในปรสิตก่อโรคในคน สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ อะควาพอรินของโปรโตซัว (Protozoan aquaporins) และอะควาพอรินของพยาธิตัวแบน (Platyhelminthes aquaporins) ดังสรุปใน Table 1 ซึ่งแสดงข้อมูลของอะควาพอรินที่พบในโปรโตซัวและพยาธิตัวแบนต่างๆ ที่ก่อโรคในคน

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโปรตีนอะควาพอรินในปรสิตก่อโรคในคน (Fig. 2) แสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอะควาพอรินในโปรโตซัวและพยาธิตัวแบนที่ก่อโรคในคน โดยมีอะควาพอรินของคน (HsAQP12) เป็นตัวเปรียบเทียบ จากข้อมูลอะควาพอรินของโปรโตซัวและพยาธิตัวแบนใน Table 1 และการวิเคราะห์ความใกล้เคียงของลำดับกรดอะมิโนใน Fig. 2 พบว่าสามารถแบ่งอะควาพอรินเป็น 2 กลุ่ม ตามหน้าที่ทางสรีรวิทยาดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น คือ กลุ่ม orthodox aquaporins ได้แก่ TgAQP, TcAQP1-2, FgAQP1-2, OvAQP1 และ SmAQP2 และกลุ่ม aquaglyceroporins ได้แก่ PfAQP, TbAQP1-3, LmAQP1, OvAQP2-3, FgAQP3-4 และ SmAQP1^(9, 10)

จากการทบทวนวรรณกรรมล่าสุด พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอะควาพอริน TcAQP2⁽¹¹⁾ และ SmAQP2⁽¹²⁾ เป็นเพียงลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในจีโนมของปรสิต *Trypanosoma cruzi* และ *Schistosoma mansoni* เท่านั้น จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับนักวิจัยในการศึกษาหน้าที่ทางสรีรวิทยาของโปรตีนอะควาพอรินดังกล่าวในอนาคต

Table 1 Aquaporins found in human protozoa and platyhelminthes

	Human parasites	Number of aquaporin genes in genome	Number of characterized aquaporins	Accession number	References
Protozoa	<i>Plasmodium falciparum</i>	1	1 (PfAQP)	3C02_A	(30)
	<i>Toxoplasma gondii</i>	1	1 (TgAQP)	CAE46485	(4)
	<i>Trypanosoma brucei</i>	3	3 (TbAQP1)	AJ697889	(19)
			(TbAQP2)	AJ697890	(19)
			(TbAQP3)	AJ697891	(19)
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	4	1 (TcAQP1)	AAM76680	(21)
Platyhelminthes	<i>Leishmania major</i>	5	1 (LmAQP1)	AAS73184	(28)
	<i>Fasciola gigantica</i>	No data available	4 (FgAQP1)	ADO32835	(9)
			(FgAQP2)	ADO32834	(9)
	<i>Opisthorchis viverrini</i>	No data available	(FgAQP3)	-	Amornrat Geadkaew (not published data)
			(FgAQP4)	-	
			3 (OvAQP1)	-	
			(OvAQP2)	-	
			(OvAQP3)	-	
	<i>Schistosoma mansoni</i>	2	1 (SmAQP1)	ACI31185	(24)

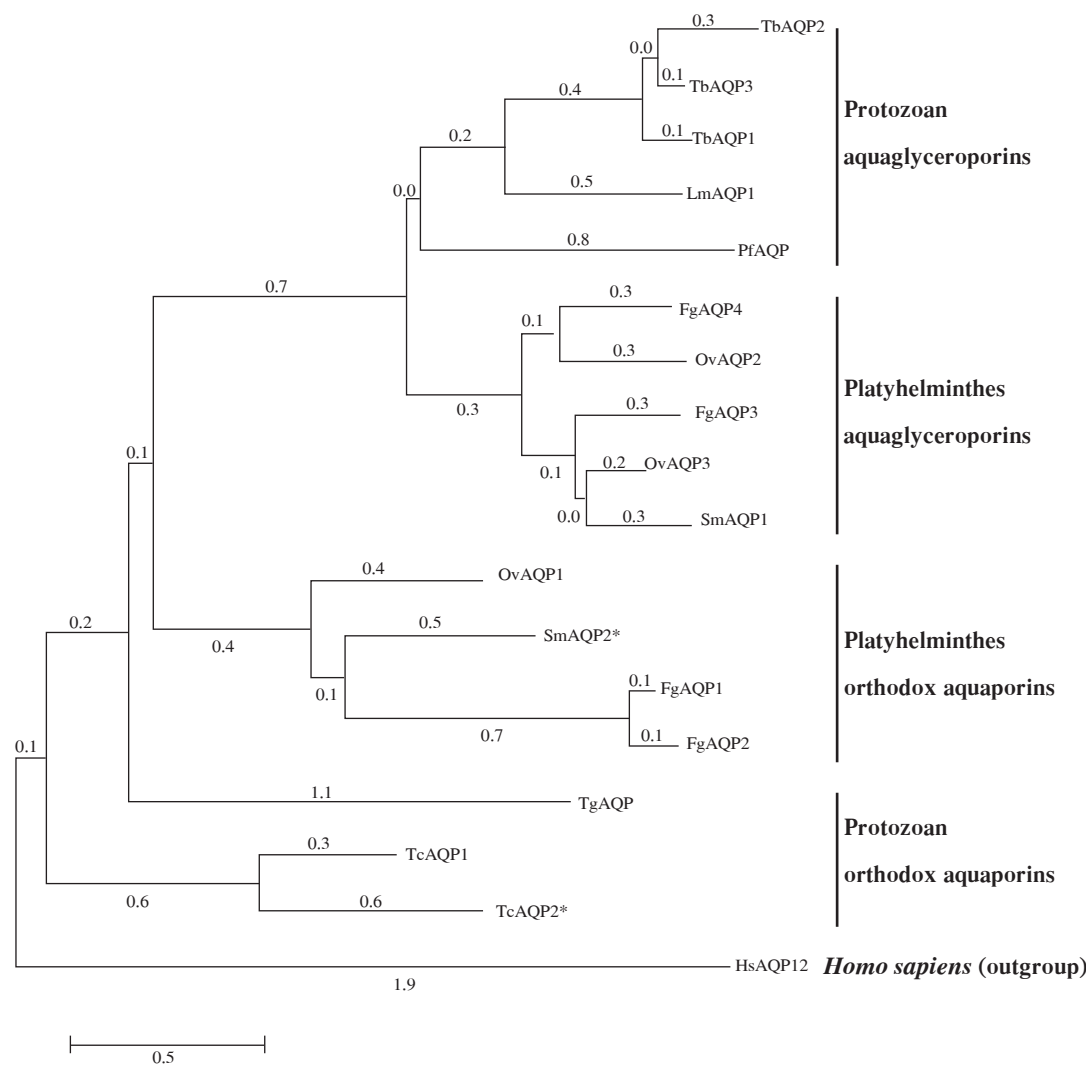


Fig. 2 Evolutionary relationship of human parasite aquaporins.

The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method⁽³²⁾. The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method⁽³³⁾ and were in the units of the number of amino acid substitutions per site. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6⁽³⁴⁾.

* Not functionally characterized

3.1 อะควอพอรินในโปรโตซัว *Plasmodium* (*Plasmodium* aquaporins)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของเชื้อมาลาเรีย สายพันธุ์ต่างๆ (*P. falciparum*, *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi*, *P. knowlesi*) พบว่าเชื้อมาลาเรียแต่ละสายพันธุ์ มียีนอะควอพอรินอยู่ 1 ยีนในจีโนม⁽¹³⁾ ปัจจุบันมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน PfAQP (*P. falciparum* aquaporin) อย่างแพร่หลาย PfAQP สามารถเป็นช่องทางผ่านของ น้ำ กลีเซอรอล ยูเรีย แอมโมเนีย และโพลีออล (polyols)⁽¹⁴⁾ โดยเชื้อมาลาเรียจะมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในระยะ blood stage ส่งผลให้มีการสร้างโมเลกุลของไขมันเพิ่มขึ้นเพื่อนำไปสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ กระบวนการดังกล่าวต้องการกลีเซอรอลที่อยู่ในซีรัมของโฮสต์เพื่อเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ PfAQP ยังทำหน้าที่ในการกำจัดของเสียต่างๆ เช่น เมทิลไกลโดซอกซอล (methylglyoxal) ยูเรีย และแอมโมเนีย ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* อีกด้วย⁽¹⁵⁾

3.2 อะควอพอรินในโปรโตซัว *Toxoplasma* (*Toxoplasma* aquaporins)

โปรโตซัว *Toxoplasma gondii* ทำให้เกิดโรค toxoplasmosis และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมมียีนอะควอพอรินอยู่ 1 ยีน⁽⁴⁾ จากการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอริน TgAQP สามารถสรุปได้ว่า TgAQP เป็นช่องทางผ่านสำหรับน้ำ กลีเซอรอล โพลีออล และยูเรีย รวมถึงสารเมตาบอไลต์ของไนโตรเจน⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้ที่บริเวณ vacuole ของปรสิตซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ endosomal/lysosomal pathway ยังสามารถสังเคราะห์โปรตีนอะควอพอริน TgAQP ได้อีกด้วย⁽¹⁶⁾ จึงคาดว่าโปรตีนอะควอพอริน TgAQP มีบทบาทในการควบคุมสารออสโมไลต์ (osmolytes) เพื่อช่วยให้โปรโตซัว *T. gondii*

สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จากผลการศึกษาหน้าที่ทางสรีรวิทยาดังกล่าว โปรตีนอะควอพอริน TgAQP จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่ม aquaglyceroporins^(15, 16) แต่จากการวิเคราะห์วิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโน TgAQP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม orthodox aquaporins (Fig. 2) รวมถึงรายงานของ Pavlovic-Djuranovic และคณะที่พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ TgAQP มีความใกล้เคียงอย่างมากกับลำดับกรดอะมิโนของอะควอพอรินที่พบในพืช⁽⁴⁾ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าความใกล้เคียงของลำดับกรดอะมิโนไม่สามารถบ่งบอกหน้าที่ทางสรีรวิทยาของโปรตีนอะควอพอรินได้อย่างแม่นยำ ต้องอาศัยผลการศึกษาหน้าที่ทางสรีรวิทยาในห้องปฏิบัติการด้วย

3.3 อะควอพอรินในโปรโตซัว *Trypanosoma* (*Trypanosoma* aquaporins)

โปรโตซัวในจิ้นัส *Trypanosoma* ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ที่สำคัญ คือ *T. brucei* และ *T. cruzi* ซึ่งก่อให้เกิดโรค Trypanosomiasis และ Chagas ตามลำดับ^(17, 18)

จากการศึกษาวิจัยในปัจจุบัน พบว่าโปรตีนอะควอพอรินของ *T. brucei* มี 3 ไอโซฟอร์ม คือ TbAQP1, TbAQP2 และ TbAQP3⁽¹⁹⁾ ทั้งหมดอยู่ในกลุ่มของ aquaglyceroporins ซึ่งเป็นช่องทางผ่านสำหรับน้ำและกลีเซอรอลได้ และพบว่า *T. brucei* สร้างโปรตีนอะควอพอรินเหล่านี้ขึ้นมาจากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแฟลกเจลลา จึงคาดว่า TbAQP1-3 น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมระบบสมดุลของน้ำภายในเซลล์ของโปรโตซัวขณะที่อาศัยอยู่ในโฮสต์ตัวกลาง (แมลง) และโฮสต์สุดท้าย (สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) ภายใต้ภาวะขาดออกซิเจน *T. brucei* จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นสารไพรูเวต (pyruvate) และกลีเซอรอลฟอสเฟต (glycerol phosphate) เพื่อสร้างพลังงานให้กับปรสิตเอง⁽²⁰⁾ จึงคาดว่าโปรตีน

อะควอพอริน TbAQP1-3 น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการผลิตกลีเซอรอลเพื่อชดเชยให้กับ *T. brucei* ขณะที่อยู่ในภาวะขาดออกซิเจนเป็นเวลานาน

จากข้อมูลด้านจีโนมของ *T. cruzi* พบว่ามียีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนคล้ายอะควอพอริน (genes encoding AQP-like proteins) อยู่ 4 ยีน⁽²¹⁾ แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาในระดับโปรตีนเพียง 1 ไอโซฟอร์ม คือ อะควอพอริน TcAQP1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลของน้ำเพียงอย่างเดียว โดยทำให้น้ำมีอัตราการไหลผ่านค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้าง TcAQP1 ที่บริเวณ acidocalcisomes และ contractile vacuole ของ *T. cruzi* ซึ่งมีรายงานว่า acidocalcisomes มีหน้าที่ในการกักเก็บแคลเซียมและฟอสเฟต ควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่าง รวมถึงควบคุมระบบสมดุลของน้ำภายในเซลล์ของโปรโตซวนี้อีกด้วย⁽²²⁾

3.4 อะควอพอรินในโปรโตซัว *Leishmania* (*Leishmania* aquaporins)

Leishmania เป็นโปรโตซัวที่มีมากกว่า 20 สายพันธุ์ แต่มีการศึกษาโปรตีนอะควอพอรินอย่างจริงจังในสายพันธุ์ *L. major* เท่านั้น เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการก่อโรคมามากกว่า สายพันธุ์อื่นๆ จากข้อมูลในระดับจีโนมของ *L. major* พบว่ามียีนอะควอพอรินอยู่ 5 ยีน แต่มีการศึกษาในระดับโปรตีนเพียงไอโซฟอร์มเดียว คือ LmAQP1 ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวพบว่าการสร้าง LmAQP1 บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแฟลกเจลลาและ contractile vacuole ของเชื้อในระยะ amastigote โดยทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านสำหรับน้ำ และโมเลกุลอื่นๆ เช่น กลีเซอรอล และ เมทิลไกลิโคซอล คาดว่า LmAQP1 น่าจะมีความสำคัญต่อการควบคุมปริมาณน้ำภายในเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนที่แบบ osmotaxis และสารเมทิลไกลิโคซอล มีความสามารถในการยับยั้งการดำรงชีวิตของโปรโตซวนี้นี้ได้⁽²³⁾

3.5 อะควอพอรินในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* (*Fasciola* aquaporins)

กลุ่มพยาธิตัวแบนชนิดพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* และ *F. hepatica* ก่อโรค fascioliasis ในสัตว์แทะกินและคน วงจรชีวิตของพยาธิ *Fasciola* spp. ค่อนข้างซับซ้อนและต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติกตลอดวงจรชีวิต ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลด้านจีโนมทั้งหมดของพยาธิตัวแบน *F. gigantica* แต่จากข้อมูลล่าสุดพบว่ามีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิตัวแบน *F. gigantica* ซึ่งมีอยู่ 4 ไอโซฟอร์ม คือ FgAQP1, FgAQP2, FgAQP3 และ FgAQP4 โดยพบว่า FgAQP1 และ FgAQP2 เป็นช่องทางผ่านสำหรับน้ำเท่านั้น ส่วนโมเลกุลอื่นๆ เช่น กลีเซอรอล ยูเรีย และเมทิลกลามีน ไม่สามารถผ่านเข้าออกได้ โดยมีการสร้าง FgAQP1 และ FgAQP2 ตรงบริเวณผิว (tegument) ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย ซึ่งเป็นบริเวณที่สัมผัสสิ่งแวดล้อมภายในโฮสต์สุดท้าย นอกจากนี้ยังพบ FgAQP1 และ FgAQP2 ได้ในบริเวณเนื้อเยื่อรอบๆ อวัยวะและรังไข่ ซึ่งคาดว่า FgAQP1 และ FgAQP2 น่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมปริมาณน้ำภายในร่างกาย รวมถึงกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* อีกด้วย⁽⁹⁾

สำหรับหน้าที่ทางสรีรวิทยาของโปรตีนอะควอพอริน FgAQP3 และ FgAQP4 กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาโดย อมรรัตน์ เกิดแก้ว และคณะ

3.6 อะควอพอรินในพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis* (*Opisthorchis* aquaporins)

พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* เป็นพยาธิที่ก่อโรค opisthorchiasis และยังเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ปัจจุบันยัง

ไม่มีข้อมูลจีโนมทั้งหมดของพยาธิ *O. viverrini* เช่นเดียวกับพยาธิ *Fasciola* spp. แต่จากงานวิจัยล่าสุดมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิ *O. viverrini* โดย อมรรัตน์ เกิดแก้ว และคณะพบว่าอะควอพอรินของพยาธิ *O. viverrini* มี 3 ไอโซฟอร์ม คือ OvAQP1, OvAQP2 และ OvAQP3 (อมรรัตน์ เกิดแก้ว และคณะ อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์เผยแพร่) และจากผลการวิเคราะห์วิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนพบว่า OvAQP2 และ OvAQP3 มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับกลุ่ม aquaglyceroporins ส่วน OvAQP1 จัดอยู่ในกลุ่ม orthodox aquaporins จากข้อมูลดังกล่าวจึงมีโอกาที่โปรตีนอะควอพอรินของพยาธิ *O. viverrini* จะเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลอื่นๆ ได้ และอาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นเป้าหมายของยาสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อจากพยาธิ *O. viverrini* ได้ในอนาคต

3.7 อะควอพอรินในพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* (*Schistosoma* aquaporins)

พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. ก่อให้เกิดโรค schistosomiasis ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรัง ที่พบได้มากในทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้ และมีรายงานอยู่ในบางส่วนของเอเชีย รวมถึงประเทศไทยที่มีรายงานน้อยมาก ส่วนวงจรชีวิตของ *Schistosoma* spp. จะคล้ายกับวงจรชีวิตส่วนใหญ่ของพยาธิตัวแบนอื่นๆ คือ ต้องอาศัยโฮสต์ตัวกลางและโฮสต์สุดท้ายเนื่องจากมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนเช่นเดียวกับพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* ทำให้พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. ต้องมีการปรับสภาพสมดุภายในลำตัวตลอดวงจรชีวิต ในปัจจุบันพบว่า มีการสร้างโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิ *S. mansoni* (SmAQP1) ที่บริเวณผิว และสร้างมากที่สุดในช่วงที่อาศัยอยู่ในหลอดเลือดของโฮสต์สุดท้าย (คน) โปรตีนอะควอพอริน SmAQP1 ทำหน้าที่เป็นช่องทาง

ผ่านของน้ำ รวมทั้งโมเลกุลอื่นๆ เช่น แมนิทอล ฟรุกโตส อะลานีน และแลคเตท เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน SmAQP1 โดยเทคนิค siRNA (small interfering RNA) พบว่าพยาธิ *S. mansoni* ไม่สามารถควบคุมปริมาณน้ำภายในลำตัวได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก ของสถานะแวดล้อม⁽²⁴⁾ ซึ่งจะส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของพยาธิดังกล่าว นอกจากนี้ SmAQP1 ยังเป็นช่องทางสำหรับการลำเลียงสารอาหารเข้าสู่พยาธิ รวมถึงเป็นช่องทางสำหรับขับของเสียของพยาธิ เช่น แลคเตท อีกด้วย⁽²⁵⁾

4. การประยุกต์ใช้โปรตีนอะควอพอรินของปรสิตก่อโรคในคนสำหรับพัฒนาไปเป็นเป้าหมายของยาหรือช่องทางผ่านของยาสำหรับรักษาโรคติดเชื้อปรสิต

ปัจจุบันมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนอะควอพอรินในปรสิตก่อโรคในคนมากขึ้น จุดประสงค์เพื่อนำไปใช้สำหรับพัฒนาเป็นเป้าหมายของยา (drug target)⁽²⁶⁾ จากการศึกษาโครงสร้างของอะควอพอรินพบว่าอะควอพอรินในกลุ่ม aquaglyceroporins มีเส้นผ่าศูนย์กลางของช่องใหญ่กว่าอะควอพอรินในกลุ่ม orthodox aquaporins⁽²⁷⁾ อีกทั้งอะควอพอรินในกลุ่ม aquaglyceroporins ยังสามารถเป็นช่องทางผ่านสำหรับโมเลกุลอื่นๆ ได้ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นอะควอพอรินในกลุ่ม aquaglyceroporins จึงมีความน่าสนใจสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป ตัวอย่างโมเลกุลที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านทางช่องอะควอพอรินและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของปรสิตในกลุ่มโปรโตซัว (*T. gondii*, *L. major* และ *P. falciparum*) ได้ เช่น ไฮดรอกซียูเรีย (hydroxyurea) ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (dihydroxyacetone) เมททิลไกลโอซอล แอนติโมนัส (antimonous) และอาร์เซนัสแอซิด (arsenous acid)^(4, 16, 28) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าโปรตีนอะควอพอรินมีหน้าที่

สำคัญในการเป็นช่องทางผ่านสำหรับยาที่มีสารออกฤทธิ์ข้างต้นเป็นส่วนประกอบ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการดำรงชีวิตของปรสิตโดยเฉพาะ และเนื่องจากโปรโตซัวเป็นปรสิตขนาดเล็กและมีโครงสร้างที่ซับซ้อนน้อยกว่าพยาธิ ทำให้การออกฤทธิ์ของยาดังกล่าวเป็นไปได้ง่ายกว่า สำหรับอะควอพอรินในกลุ่มของพยาธิยังไม่มีรายงานของสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการดำรงชีวิตของพยาธิได้ แต่พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนอะควอพอริน SmAQP1 สามารถยับยั้งการจับของเสียและการรักษาสมดุลของพยาธิ ซึ่งส่งผลต่อการดำรงชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ได้^(24, 25) นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนของเมอร์คิวรี (Hg^{2+}) สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะควอพอรินของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ได้อีกด้วย (อมรรัตน์ เกิดแก้ว และคณะ อยู่ระหว่างส่งตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ) ซึ่งการยับยั้งดังกล่าวเกิดจากไอออนของเมอร์คิวรีเข้าจับกับกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ของโปรตีนอะควอพอรินส่งผลยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะควอพอริน⁽²⁹⁾ อย่างไรก็ตามเมอร์คิวรีเป็นสารที่มีอันตรายต่อคนและสิ่งแวดล้อมจึงไม่สามารถนำมาเป็นส่วนประกอบของยาสำหรับยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะควอพอรินได้

ทฤษฎีการออกแบบยาที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีนอะควอพอรินได้นั้น โมเลกุลของสารดังกล่าวจะต้องสามารถจับกับโดเมนของโปรตีนอะควอพอรินที่อยู่บริเวณด้านนอกเซลล์ (extracellular site) ได้ เพื่อยับยั้งการผ่านเข้าออกของสารละลาย และรบกวนการผ่านเข้าออกของสารที่จำเป็นต่อปรสิต เช่น น้ำ หรือ สารอาหาร หรือรบกวนการขับของเสียของปรสิต เช่น แอมโมเนีย หรือแลคเตท ออกสู่ภายนอก นอกจากนี้ตัวยับยั้งอะควอพอรินควรจะแพร่ผ่านชั้นไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ได้อีกด้วย เนื่องจากอะควอพอรินบาง

ไอโซฟอร์มไม่ได้ผลิตที่บริเวณผิวของปรสิตเท่านั้น แต่ยังพบอยู่ในเนื้อเยื่อปรสิต เช่น บริเวณถุงอวัยวะหรือรังไข่ อีกทั้งตัวยับยั้งควรจะมีความสามารถในการจับกับโปรตีนอะควอพอรินได้แน่นกว่าโมเลกุลของน้ำหรือสารอื่นๆ ที่สามารถผ่านช่องของโปรตีนอะควอพอรินได้ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยาที่มีสมบัติเป็นตัวยับยั้งโปรตีนอะควอพอรินยังไม่มีการพัฒนาหรือผลิตขึ้นมาเพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อปรสิตในคนอย่างเป็นรูปธรรม ดังนั้นการทบทวนวรรณกรรมในครั้งนี้จึงเป็นการรวบรวมนำเสนอความรู้พื้นฐานของโปรตีนอะควอพอรินในปรสิตก่อโรคในคนที่สามารถนำไปต่อยอดเพื่อการศึกษาวิจัย และพัฒนาเป็นยาเพื่อรักษาโรคปรสิตในคนได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

บทสรุป

อะควอพอรินเป็นโปรตีนชนิดที่แทรกทะลุผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane protein) ทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านของน้ำและโมเลกุลไม่มีขั้วอื่นๆ เช่น แอมโมเนีย ยูเรีย กลีเซอรอล เป็นต้น สามารถพบกลุ่มโปรตีนอะควอพอรินในปรสิตหลายชนิดที่ก่อโรคในคน เช่น โปรโตซัวและพยาธิตัวแบน และนอกจากเป็นช่องทางผ่านของน้ำแล้ว อะควอพอรินยังเป็นทางผ่านสำหรับลำเลียงสารอาหารหรือขับของเสียออกนอกตัวปรสิตได้อีกด้วย ดังนั้นอะควอพอรินจึงเป็นโปรตีนที่สามารถพัฒนาไปเป็นเป้าหมายของยา (drug target) หรือช่องทางผ่านของยา (drug facilitator) เพื่อรักษาโรคติดเชื้อจากปรสิตในอนาคต หลักการในการออกแบบยาโดยใช้โปรตีนอะควอพอรินเป็นเป้าหมายสามารถทำได้โดยอาศัยโมเลกุลที่สามารถจับกับโปรตีนอะควอพอรินที่บริเวณด้านนอกของเซลล์ (extracellular site) เพื่อขัดขวางการลำเลียงสารอาหารหรือการขับของเสียของปรสิต

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปริทัศน์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เรื่องการโคลนยีนและการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่เป็นช่องทางผ่านของน้ำ (อะควอพอริน, OvaQP1-3) ประเภททุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2555 ขอขอบพระคุณ ดร.เรวดี วิเศษพานิชกิจ และ Dr. Dawid Krenc ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

- World Health Organization. Geneva, Switzerland. Media centre; [cited 2014 May 27]. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
- Abdul-Ghani R, Farag HF, Allam AF, Azazy AA. Measuring resistant-genotype transmission of malaria parasites: challenges and prospects. *Parasitol Res* 2014; 113: 1481-7.
- Alvarez LI, Mottier ML, Lanusse CE. Drug transfer into target helminth parasites. *Trends Parasitol* 2007; 23: 97-104.
- Pavlovic-Djuranovic S, Schultz JE, Beitz E. A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins. *FEBS Lett* 2003; 555: 500-4.
- Abascal F, Irisarri I, Zardoya R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 1468-81.
- Day RE, Kitchen P, Owen DS, *et al.* Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 1492-1506.
- Wistow GJ, Pisano MM, Chepelinsky AB. Tandem sequence repeats in transmembrane channel proteins. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 170-1.
- Nemeth-Cahalan KL, Kalman K, Hall JE. Molecular basis of pH and Ca^{2+} regulation of aquaporin water permeability. *J Gen Physiol* 2004; 123: 573-80.
- Geadkaew A, von Bulow J, Beitz E, Grams SV, Viyanant V, Grams R. Functional analysis of novel aquaporins from *Fasciola gigantica*. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 175: 144-53.
- Beitz E. Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy. *Biol Cell* 2005; 97: 373-83.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005; 309: 409-15.
- NCBI. nlm.nih.gov. BethesdaMD. Basic Local Alignment Search Tool; [cited 2014 May 21]. Available from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/353231455?report=genbank&log\\$=protalign&blast_rank=1&RID=RSTH41E2014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/353231455?report=genbank&log$=protalign&blast_rank=1&RID=RSTH41E2014).

13. Hansen M, Kun JF, Schultz JE, Beitz E. A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Biol Chem* 2002; 277: 4874-82.
14. Pavlovic-Djuranovic S, Kun JF, Schultz JE, Beitz E. Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the *Plasmodium* aquaglyceroporin inhibit parasite proliferation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1012-7.
15. Zeuthen T, Wu B, Pavlovic-Djuranovic S, *et al.* Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 2006; 61: 1598-608.
16. Miranda K, Pace DA, Cintron R, *et al.* Characterization of a novel organelle in *Toxoplasma gondii* with similar composition and function to the plant vacuole. *Mol Microbiol* 2010; 76: 1358-75.
17. World Health Organization. Geneva, Switzerland. Media centre; cited 2014 May 27. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>
18. Perez C, Lymbery A, Thompson A. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? *Trends Parasitol* 2014; 30: 176-82.
19. Uzcategui NL, Szallies A, Pavlovic-Djuranovic S, *et al.* Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 2004; 279: 42669-76.
20. Steinborn K, Szallies A, Mecke D, Duszenko M. Cloning, heterologous expression and kinetic analysis of glycerol kinase (TbGLK1) from *Trypanosoma brucei*. *Biol Chem* 2000; 381: 1071-77.
21. Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 2004; 279: 38673-82.
22. Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 2004; 279: 52270-81.
23. Figarella K, Uzcategui NL, Zhou Y, *et al.* Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. *Mol Microbiol* 2007; 65: 1006-17.
24. Faghiri Z, Skelly PJ. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. *FASEB J* 2009; 23: 2780-9.
25. Faghiri Z, Camargo SM, Huggel K, *et al.* The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter. *PLoS One* 2010; 5: e10451.

26. E. Beitz. Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy. *Biol Cell* 2005; 97: 373-83.
27. de Groot BL, Grubmuller H. The dynamics and energetics of water permeation and proton exclusion in aquaporins. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15: 176-83.
28. Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, *et al.* Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 2004; 279: 31010-17.
29. Hirano Y, Okimoto N, Kadohira I, Sue-matsu M, Yasuoka K, Yasui M. Molecular mechanisms of how mercury inhibits water permeation through aquaporin-1: understanding by molecular dynamics simulation. *Biophys J* 2010; 98: 1512-9.
30. Newby ZE, O'Connell J, Robles-Colmenares Y, Khademi S, Miercke LJ, Stroud RM. Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 619-25.
31. Sales AD, Lobo CH, Carvalho AA, Moura AA, Rodrigues AP. Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Genet Mol Res* 2013; 12: 6718-32.
32. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-25.
33. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 1992; 8: 275-82.
34. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30: 2725-9.