

**MIMOTOPE IDENTIFICATION FROM
MONOCLONAL ANTIBODIES
SPECIFIC TO HOUSE DUST MITE,
USING PHAGE DISPLAYED RANDOM PEPTIDE LIBRARIES**

NIPAPORN TEWAWONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006**

**ISBN
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาค้นหา MIMOTOPE จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อไรฝุ่นโดยอาศัยห้องสมุดเปปไทด์แบบสุ่ม (MIMOTOPE IDENTIFICATION FROM MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO HOUSE DUST MITE, USING PHAGE DISPLAYED RANDOM PEPTIDE LIBRARIES)

นิภาพร เทาวงศ์ 4737007 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พงศ์ราม งามสุด, D. V. M., Ph.D., ชาริรัตน์ กะลัมพะเหติ, Ph.D., สุวสิทธิ์ วรคุณพิเศษ, Ph.D.

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีการแสดงออกของเปปไทด์บนผิวไวรัสเป็นวิธีการที่มีประโยชน์มาก สามารถนำมาใช้ในการค้นหาเปปไทด์หรือโปรตีนที่เรารู้สึกสนใจโดยอาศัยคุณสมบัติการจับกันอย่างเหมาะสมระหว่างโมเลกุลคู่หนึ่ง ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ห้องสมุดเปปไทด์แบบสุ่ม T7 และ M13 ในการค้นหาโมโตปจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี 6 ตัวอย่างซึ่งจำเพาะต่อไรฝุ่น ห้องสมุดเปปไทด์แบบสุ่ม T7 และ M13 ซึ่งจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีอย่างจำเพาะจะถูกคัดเลือกและเพิ่มจำนวนโดยวิธี biopanning ฟาจที่ถูกคัดเลือกทั้ง 10 ตัวอย่างจะถูกทดสอบการจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับไรฝุ่นโดยวิธี ELISA และ Western blot หลังจากนั้นฟาจที่ได้รับคัดเลือกจะถูกเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และทำการวิเคราะห์เปปไทด์โดยการหาลำดับเบส ฟาจที่ได้จาก T7/B4 ให้ผลบวกกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับไรฝุ่นด้วยวิธี Western blot ซึ่ง band ที่เกิดขึ้นน้ำหนักโมเลกุล 42.6 kDa จากการหาลำดับเบสของฟาจพบว่ามิโมโทปจากฟาจ M13/B6 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโน AERWGPWGVHSW มีความคล้ายคลึงกับเปปไทด์ที่จับกับจานพลาสติก ELISA และเมื่อนำมิโมโทปที่ได้ทั้ง 47 ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับเปปไทด์ของสารก่อภูมิแพ้ในฐานข้อมูลของ SDAP พบว่ามิโมโทปจากฟาจส่วนใหญ่มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของสารก่อภูมิแพ้ Der f 15 (17.4%) Eur m 14 (13.04%) และ Per a 3.0202 (10.87%) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนของสารก่อภูมิแพ้ Der f 15 พบมิโมโทปจำนวน 5 ตัวอย่างมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 411-429 และ 480-503 และลำดับกรดอะมิโนของมิโมโทปที่ได้จากฟาจ T7/B3 (3 มิโมโทป) และ T7/B2 (1 มิโมโทป) มีการเรียงตัวในรูปแบบเดียวกัน คือ SXTPXXTXYXD มิโมโทปจากฟาจ T7/B2 ที่มีลำดับกรดอะมิโน (Asn66-Leu67, Ser71-Leu72, Glu74-Phe75) (2 มิโมโทป) และ Thr41-Pro42, Gln46-Gly48 (1 มิโมโทป) และมิโมโทปจากฟาจ T7/B1 ที่มีลำดับกรดอะมิโน Asn63, Lys65, Ala67 (1 มิโมโทป) มีตำแหน่งอยู่บนผิวโครงสร้างโปรตีนของสารก่อภูมิแพ้ Der p 1 และ Der f 2 ตามลำดับ จากการใช้โปรแกรม BLASTP พบว่ามิโมโทป LTPCDP และ CLPYE มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน CG33196-PB (8.5%) และ LD38710p (6.3%) ของแมลงหวี่ ตามลำดับ และจากโปรแกรม PSORT II ที่ใช้สำหรับทำนายจุดกำเนิดและตำแหน่งของโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์พบว่ามิโมโทป PCCP ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีนตั้งต้นของพิษแมงมุม มิโมโทป TPCNNLKKR, CPCYPKK และ GEMEGL ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีนของน้ำลายหีบ และมิโมโทป LTPCDP ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน CG33196-PB ของแมลงหวี่ โปรตีนเหล่านี้หลั่งมาจากภายนอกเซลล์คิดเป็น 66.7, 55.6, 44.4, 43.5 and 26.1% ตามลำดับ จากการวิจัยครั้งนี้เป็นการแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงออกของเปปไทด์บนผิวไวรัสเพื่อค้นหามิโมโทปจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไรฝุ่น

114 หน้า ISBN 974-04-7731-3

MIMOTOPE IDENTIFICATION FROM MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO HOUSE DUST MITE, USING PHAGE DISPLAYED RANDOM PEPTIDE LIBRARIES.

NIPAPORN TEWAWONG 4737007 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: PONGRAMA RAMASOOTA, D. V. M., Ph.D., THAREERAT KALAMBAHETI, Ph.D., SUWALEE WORAKHUNPISET, Ph.D.

ABSTRACT

Phage display is a powerful technique for identifying peptides or interesting proteins that have desirable binding properties. In this study, random heptapeptide T7 with cysteine flanking library, and random 12mer M13 phage library, were used to identify mimotopes that bind to six monoclonal antibodies (MAbs) specific to the house dust mite, respectively. T7 and M13 phage that bind to MAbs were selected and amplified by biopanning process. The select bound phages were tested for binding specificity against MAbs by indirect ELISA and Western blot. The DNA of the selecting bound phages was amplified and sequenced by PCR and DNA sequencing. Selected bound phages T7/B4 were Western blot positive with MAb specific to the house dust mite and with positive band for molecular weight 42.6 kDa. Altogether, 47 mimotopes were aligned with the similar peptide allergen, using the Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP). Eight mimotopes (17.4%) that partially matched Der f 15 allergen predominated followed by Eur m 14 allergen (13.04%) and Per a 3.0202 allergen (10.87%). Various mimotopes matched with Der f 15; Eur m 14 and Per a 3.0202 were aligned. Especially Der f 15 allergen, the amino acid regions 411-429 and 480-503, correlated with overlapping mimotopes and seemed to be the main epitope clusters of the Der f 15 allergen peptide. The alignment of the sequences obtained from T7/B3 (3 mimotopes) and T7/B2 (1 mimotope) revealed a common motif **SXTPXXTXYXD**. The two sequences (Asn66-Leu67, Ser71-Leu72, Glu74-Phe75), one sequence (Thr41-Pro42, Gln46-Gly48) from MAb B2 and (Asn63, Lys65, Ala67) from MAb B1 were located on the surface protein structures of Der p 1 and Der f 2, respectively. Using BLASTP software, the predominant mimotopes were **LTPCDP**, which matched with dumpy CG33196-PB protein of *D. melanogaster*, found in 4 phages (8.5%), followed by the **CLPYE** match with the LD38710p protein of *D. melanogaster*, found in 3 phages (6.3%). The mimotope **PCCP** matched peptide toxin 4 precursor protein of *M. gigas*, mimotopes **TPC>NNLKKR**, **CPCYPKK**, and **GEMEGL**, matched putative salivary secreted protein of *I. scapularis*, and mimotope **LTPCDP** matched with dumpy CG33196-PB protein of *D. melanogaster*, located extracellular at 66.7, 55.6, 44.4, 43.5 and 26.1% of these mimotopes, respectively. Using phage display technique, mimotope from MAbs specific to the house dust mite could be successfully identified.

KEYWORDS: PHAGE DISPLAY / RANDOM PEPTIDE LIBRARY / MIMOTOPE / MONOCLONAL ANTIBODY / HOUSE DUST MITE

114 pp. ISBN 974-04-7731-3