MIMOTOPE IDENTIFICATION FROM MONOCLONAL ANTIBODIES OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* USING RANDOM PEPTIDE PHAGE LIBRARIES AND THE IMMUNE RESPONSES OF THE SELECTED PHAGOTOPES

NARISORN NA-NGAM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFLLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การคัดเลือกมิโมโทปจากเปปไทด์ฟาจไลบรารี่แบบสุ่มที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* และทดสอบการสร้างภูมิคุ้มกันของ PHAGOTOPES ที่คัดเลือกไว้ (MIMOTOPE IDENTIFICATION FROM MONOCLONAL ANTIBODIES OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* USING RANDOM PEPTIDE PHAGE LIBRARIES AND THE IMMUNE RESPONSES OF THE SELECTED PHAGOTOPES)

นริศร นางาม 4437516 TMTM/D
ปร.ด. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พงศ์ราม รามสูต, D.V.M., Ph.D., ธารีรัตน์ กะลัมพะเหติ, Ph.D., ปัทมา เอกโพธิ์, Ph.D., มนัส จงสงวน, B.Sc., M.P.H., Ph.D.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการใช้ เปปไทด์ไลบรารี่แบบสุ่มที่แสดงผลบนผิวของแบคเทอริโอฟาจ T7 และ M13 เพื่อหาลำดับอะมิโนแอซิดของมิโมโทปจากโมโนโคลนอล แอนติบอดี 4 ตัวอย่าง ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ฟาจแต่ละตัวที่จับกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีนี้จะถูกคัดเลือกมาทดสอบ binding specificity ด้วยวิธี ELISA แล้วฟาจที่ให้ผล ELISA บวก จะถูกนำไปเพิ่มจำนวน ทำให้บริสุทธ์ ตรวจหาลำดับอะมิโนแอซิดของฟาจ เปปไทด์ โดยวิธี PCR และ DNA sequencing พบว่าฟาจ 75 ตัวจาก 90 ตัว (83.3%) ให้ผล ELISA บวก และพบว่าลำดับเป็บไตด์ของทั้ง 75 มิโมโทป (100%) ตรงกับลำดับโปรตีนของ *Burkholderia* spp. จาก GenBank มิโมโทปที่พบมากที่สุดคือ TPxGRTRVT (13.3%), ตามด้วย LTPCGRTxD (8%), AREVTLL (6.7%), NxVxKVVSR (5.3%), PCAPRSS (4%), LGRVLAN (4%), RNPKKA (2.7%) และ CPYPR (2.7%) ตามลำดับ และพบว่า GenBank matched proteins ชื่อ hypothetical protein BPSL2046 of *B. pseudomallei* K96243 (ตรงกับ CGRTxD), hypothetical protein BpseP_02000035 (ตรงกับ LGRVLAN), hypothetical protein BPSS0784 of *B. pseudomallei* K96243 (ตรงกับ CPYPR), hypothetical protein BURPS1710b_1104 of *B. pseudomallei* 1710b (ตรงกับ CARQY), TonB-dependent siderophore receptor of *B. cenocepacia* H12424 (ตรงกับ CVRxxLTPC and TPCRxRT) อยู่ในส่วนของ outer membrane โปรตีนของ *Burkholderia* spp. ภูมิคุ้มกันที่สร้างจาก Phagotopes ที่คัดเลือกไว้มีระดับที่สูงกว่าของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และทำปฏิกิริยากับ *B. pseudomallei* LPS จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าสามารถใช้ ฟาจ ดิสเพลย์ แรนดอม เปปไตด์ ไลบราลี่ ในการวิเคราะห์หามิโมโทปที่จับกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีของ *B. pseudomallei* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนในระยะต่อไป
155 หน้า

MIMOTOPE IDENTIFICATION FROM MONOCLONAL ANTIBODIES OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* USING RANDOM PEPTIDE PHAGE LIBRARIES AND THE IMMUNE RESPONSES OF THE SELECTED PHAGOTOPES

NARISORN NA-NGAM 4437516 TMTM/D

Ph.D. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: PONGRAMA RAMASOOTA, D. V. M., Ph.D., THAREERAT KALAMBAHETI, Ph.D., PATTAMA EKPO, Ph.D., MANAS CHONGSA-NGUAN, B.Sc., M. P. H., Ph.D.

ABSTRACT

This study aimed to use random peptide libraries, displayed by bacteriophage T7 and M13, to identify mimotopes from 4 monoclonal antibodies (MAbs) specific to *B. pseudomallei*. Bound phages, selected from fourth-round panning with each MAb, were tested for binding specificity with each MAb using ELISA, before being further amplified and checked for phage peptide sequence using PCR and DNA sequencing. 75 of 90 phages (83.3%) were ELISA-positive with each MAb. Mimotopes from all 75 phages (100%) were found to match protein sequences of *Burkholderia* spp. from GenBank. The predominant mimotopes were mimotope TP-GRTRVT found in 13.3%, followed by LTPCGRTxD (8%), AREVTLL (6.7%), NxVxKVVSR (5.3%), PCAPRSS (4%), LGRVLAN (4%), RNPKKA (2.7%), and CPYPR (2.7%). The GenBank-matched proteins, i.e. hypothetical protein BPSL2046 of *B. pseudomallei* K96243 (matched with mimotope CGRTxD)**,** hypothetical protein BpseP_02000035 (matched with LGRVLAN), hypothetical protein BPSS0784 of *B. pseudomallei* K96243 (matched with CPYPR), hypothetical protein BURPS1710b_1104 of *B. pseudomallei* 1710b (matched with CARQY), TonB-dependent siderophore receptor of *B. cenocepacia* H12424 (matched with CVRxxLTPC and TPCRxRT), were found to locate at the outer membrane of *Burkholderia* spp. The immune responses from all selected phagotopes were significantly higher than those of the control groups, and could react with native antigen of *B. pseudomallei* LPS. The study demonstrated the feasibility of identifying important mimotopes for vaccine development through screening of phage-displayed random peptide libraries with *B. pseudomallei* MAbs.

KEYWORDS: MIMOTOPE /RANDOM PEPTIDE LIBRARIES/ MAB/ MELIOIDOSIS

155 pp.