

## บทคัดย่อ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนูโคลน LPF1 (mAbLPF1) ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนลิปแอลสามสิบสองที่มีคุณสมบัติล้างการแตกของเม็ดเลือดแดงจากเชื้อเลปโตสไปราในหลอดทดลอง และให้ผลรักษาหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปราได้ถูกผลิตในห้องปฏิบัติการ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกและศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนลิปแอลสามสิบสองเอพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน LPF1 ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนโลยี การจำแนกพหุมีโมโทป LPF1 ด้วยการทำให้ multiple mimotope alignments และการวิเคราะห์สายเปปไทด์ที่มีเอพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน LPF1 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติ และหน้าที่ ตลอดจนจำแนกสายเปปไทด์ของโปรตีนลิปแอลสามสิบสองที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์และจำแนกหน้าที่ของเปปไทด์ของโปรตีนลิปแอลสามสิบสองแบ่งเป็นสามส่วน ได้แก่ เปปไทด์ส่วนต้นเป็น integral membrane (ลำดับกรดอะมิโน 1 ถึง 90) เปปไทด์ช่วงกลางกลุ่ม flavin utilizing monooxygenase (ลำดับกรดอะมิโนที่ 91 ถึง 170) และ เปปไทด์ด้านปลาย (ลำดับกรดอะมิโนที่ 171-272) เป็น periplasmic binding protein ทำการผลิตโปรตีนลิปแอลสามสิบสองก่อนสิ้นลูกผสม คือ โปรตีนก่อนสิ้น LipL32Δ1-90 (ตัดกรดอะมิโนลำดับที่ 1 ถึง 90) และ LipL32Δ1-170 (ตัดกรดอะมิโนลำดับที่ 1 ถึง 170) และถูกนำไปใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน LPF1 กรดอะมิโนของเอพิโทปแอนติบอดีโคลน LPF1 ประกอบด้วย P243, L244, I245, H246, L252, และ Q253 บนโครงสร้าง β13-turn และ amphipathic α6 helix ที่ปลายด้าน C-terminus ของโปรตีนลิปแอลสามสิบสองซึ่งประกอบด้วย hydrophobic patch ที่มีคุณสมบัติในการเกาะติดกับ phospholipid และไฮสทีเซลล์ และคุณสมบัติในการสอดเข้าไปในผนังเซลล์ อีกด้านหนึ่งของเอพิโทปแอนติบอดี LPF1 ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด hydrophilic acidic และ basic เอพิโทปนี้เป็นอนุรักษเอพิโทปในเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคและกลุ่ม intermediate และไม่พบเอพิโทปแอนติบอดี LPF1 ในโปรตีนกลุ่มลิปแอลสามสิบสองของจุลชีพอื่น

ผู้วิจัยทำการศึกษาความสามารถของโปรตีนลิปแอลสามสิบสองในการทำให้เม็ดเลือดแดงของมนุษย์แตก (hemolytic activity) โดยในหลอดทดลอง พบว่าโปรตีนลูกผสมลิปแอลสามสิบสองชนิดเต็มเส้น และโปรตีนก่อนสิ้น LipL32Δ1-90 ให้ผลฮีโมไลซิสต่อเม็ดเลือดแดงมนุษย์ และปฏิกิริยาลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบโดยโปรตีนก่อนสิ้น LipL32Δ1-170 และไม่เกิดปฏิกิริยาฮีโมไลซิสโดยโปรตีน LipL32Δ166-245 ดังนั้น เปปไทด์ลิปแอลสามสิบสองโปรตีนที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 166 ถึง 245 เป็นเปปไทด์ยาวน้อยสุดที่ก่อให้เกิดฮีโมไลซิส งานวิจัยนี้เป็นการค้นหา และจำแนกคุณลักษณะของเอพิโทปที่มีความสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโปรตีนลิปแอลสามสิบสองและจำแนกเปปไทด์ของโปรตีนลิปแอลสามสิบสองที่ก่อให้เกิดฮีโมไลซิสในระหว่างการติดเชื้อเลปโตสไปรา

## Abstract

LipL32-specific mouse monoclonal antibody clone LPF1 (mAbLPF1) which neutralized *Leptospira*-mediated hemolysis *in vitro* and rescued hamsters from lethal *Leptospira* infection was previously produced (Maneewatch *et al.*, 2008). This research was carried out in order to identify and characterize LipL32 epitope bound by therapeutic mAbLPF1 antibody by immunoassay and phage consensus mimotope identification and multiple alignments, and determining peptide epitopes locations, 3D structures and their functions and to identify LipL32 peptides responsible for hemolytic activity. Three functionally LipL32 domains, namely integral membrane domain (approximately residues 1 to 90), flavin utilizing monooxygenase superfamily (91-170) and periplasmic binding domain (171-272) from *lipL32* sequence, respectively were assigned. LipL32 N-terminally deleted LipL32 (LipL32 $\Delta$ 1-90, deleting aa. 1-90), LipL32 $\Delta$ 1-170 (containing C-terminus of LipL32, deleting aa. 1-170) protein truncations were produced and tested for antigenic specificity

The mAbLPF1 epitope consisted of P243, L244, I245, H246, L252, and Q253 on non-continuous  $\beta$ 13-turn and C-terminal amphipathic  $\alpha$ 6 helix of LipL32 structure; containing hydrophobic patch, contributing to phospholipid/host cell adhesion and membrane insertion on one side, and hydrophilic, acidic and basic amino acid residues on another side. Epitope is highly conserved among the pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* spp. and are absent from the LipL32 superfamily proteins of other microorganisms.

Hemolytic activity of recombinant LipL32 proteins to human erythrocytes was examined *in vitro*. Hemolytic activity mediated by full-length LipL32 and LipL32 $\Delta$ 1-90 proteins to human erythrocyte was investigated while the activity was abolished in LipL32 $\Delta$ 1-170 and in LipL32 $\Delta$ 166-245. The minimum peptide essential for hemolytic activity was found to be amino acids 166-245 of LipL32. The experiments demonstrate not only protective epitope of LipL32 but also LipL32 peptides that mediate hemolysis during *Leptospira* infection.

**Keywords:** *Leptospira* spp., LipL32, mAbLPF1, therapeutic epitope, epitope mapping, sphingomyelinase H (SphH), hemolytic activity