การศึกษาโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิโรคเท้าช้าง บรูเกีย มาลาไย ที่สัมพันธ์กับการชักนำให้เกิดการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ

นางสาว จันทิมา พฤกษากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-3485-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF PROTEINS DERIVED FROM *WOLBACHIA* OF *BRUGIA MALAYI* ASSOCIATED WITH PROINFLAMMATORY RESPONSES IN MACROPHAGE CELL LINE

Miss Chantima Porksakorn

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Medical Microbiology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

ISBN 974-14-3485-5

Copyright of Chulalongkorn University

492201

Thesis Title	CHARACTERIZATION OF PROTEINS DERIVED FROM *WOLBACHIA* OF *BRUGIA MALAYI* ASSOCIATED WITH PROINFLAMMATORY RESPONSES IN MACROPHAGE CELL LINE
By	Miss Chantima Porksakorn
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Surang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Nattiya Hirankarn, M.D., Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. med. Vet.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Surang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Nattiya Hirankarn, M.D., Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Pattamaporn Kittiyapong, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Kanitha Patarakul, M.D., Ph.D.)

จันทิมา พฤกษากร : การศึกษาโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิโรคเท้าช้าง บรูเกีย มาลาไย ที่สัมพันธ์กับการชักนำให้เกิดการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ (CHARACTERIZATION OF PROTEINS DERIVED FROM *WOLBACHIA* OF *BRUGIA MALAYI* ASSOCIATED WITH PROINFLAMMATORY RESPONSES IN MACROPHAGE CELL LINE) อ. ที่ปรึกษา : รศ. พญ. ดร. สุรางค์ นุชประยูร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. พญ. ดร. ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์, 192 หน้า. ISBN 974-14-3485-5.

แบคทีเรียโวลบาเชียมีความสำคัญต่อการพัฒนาการ และการสืบพันธุ์ของพยาธิฟิลาเรีย ความสำคัญนี้ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคในคนที่เกิดจากพยาธิฟิลาเรีย ซึ่งรวมถึงโรคเท้าช้างด้วย โดยมีเป้าหมายการรักษาที่แบคทีเรียโวลบาเชีย นอกจากนี้แบคทีเรียโวลบาเชียสัมพันธ์กับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และทำให้เกิดอาการอักเสบในคนไข้ การศึกษาโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเชียจะเป็นข้อมูลที่สำคัญ ช่วยให้เข้าใจถึงชีววิทยาของแบคทีเรีย รวมทั้งช่วยในการประเมิน และการเลือกโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเชีย ที่เป็นสาเหตุในการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ การศึกษานี้ทำให้ได้วิธีสกัดแบคทีเรียโวลบาเชียจากพยาธิฟิลาเรีย ที่ทำให้เกิดโรคพยาธิหัวใจในสุนัข *Dirofilaria immitis* และพยาธิฟิลาเรียที่ทำให้เกิดโรคเท้าช้าง *Brugia malayi* และทำการศึกษาโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเชียด้วยวิธี two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) และ matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบ recombinant *Wolbachia* surface protein (rWSP) ของแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิ *B. malayi* ในการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจของหนู RAW 264.7 ให้หลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

การพัฒนาวิธีการสกัดแบคทีเรียโวลบาเชียจากพยาธิฟิลาเรีย โดยการใช้ non-ionic detergent nonidet P-40 (NP-40) ที่ความเข้มข้น 0.04% พบว่าเหมาะสมสำหรับการศึกษาโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเชีย การพิสูจน์หาโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิฟิลาเรียด้วยวิธี Western blot กับ anti-*Wolbachia* antibodies และการวิเคราะห์อย่างจำเพาะ พบแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิ *B. malayi* ซึ่งมีขนาด 83, 48, 36, 26 (WSP), 20 และ 17 kDa นอกจากนี้โปรตีน WSP, 20-kDa และ 17-kDa เป็นแอนติเจนที่พบด้วยในแบคทีเรียโวลบาเชียของพยาธิ *D. immitis* สำหรับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี 2D-PAGE และ Western blot ด้วย anti-*Wolbachia* antibodies พบจุดแอนติเจน 24 จุดที่จำเพาะต่อแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิ *B. malayi* ซึ่งสามารถพิสูจน์บนเจล 2D-PAGE ของแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิ *B. malayi* ที่ย้อมด้วย Coomassie blue ได้จุดโปรตีน WSP 6 จุด (26 kDa, pI 4.7-5.5) และจุดโปรตีนอื่นของแบคทีเรียอีก 11 จุด (20-62 kDa, pI 4.7-7.3) จุดโปรตีน WSP ที่มีค่า pI แตกต่างกันนั้น แสดงถึงการดัดแปรที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของ WSP จากการตรวจพบจุดโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิ *B. malayi* บนเจล 2D-PAGE จะมีประโยชน์ต่อการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนนั้นต่อไป ซึ่งแสดงถึงความสำคัญของโปรตีนต่อหน้าที่ทางชีววิทยาของแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิ *B. malayi* รวมทั้งความสำคัญต่อการพัฒนาการและการสืบพันธุ์ของพยาธิฟิลาเรีย

การกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจของหนู RAW 264.7 ด้วยโปรตีน rWSP ของแบคทีเรีย *B. malayi Wolbachia* และตรวจวัดการสร้าง mRNA ของ proinflammatory cytokines (interleukin (IL)-1β, IL-6 และ tumor necrosis factor (TNF)-α) ด้วยวิธี real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) พบการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์ IL-1β, IL-6 และ TNF-α จากเซลล์แมคโครฟาจของหนูเป็นไปตามความเข้มข้นของโปรตีน rWSP ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจของหนูด้วยโปรตีน rWSP ที่ความเข้มข้น 9.0 μg/ml พบการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์ IL-1β, IL-6 และ TNF-α ที่เพิ่มขึ้น และมีปริมาณใกล้เคียงกับการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ของ *Escherichia coli* ที่ความเข้มข้น 0.1 μg/ml ทั้งนี้การกระตุ้นด้วยโปรตีน rWSP ให้มีการสร้าง mRNA ของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจของหนูนั้น ถูกยับยั้งด้วยการย่อยของเอนไซม์ proteinase K ในสารละลายโปรตีน rWSP จากผลการทดลองจึงแสดงว่าโปรตีน WSP ของแบคทีเรีย *B. malayi Wolbachia* สามารถกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจของหนู RAW 264.7.

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

428 99817 20 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : *BRUGIA MALAYI* / *WOLBACHIA* / WSP / 2D-PAGE / PROINFLAMMATORY RESPONSES

CHANTIMA PORKSAKORN : CHARACTERIZATION OF PROTEINS DERIVED FROM *WOLBACHIA* OF *BRUGIA MALAYI* ASSOCIATED WITH PROINFLAMMATORY RESPONSES IN MACROPHAGE CELL LINE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURANG NUCHPRAYOON, M.D., Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. NATTIYA HIRANKARN, M.D., Ph.D., 192 pp. ISBN 974-14-3485-5.

Wolbachia are required for normal larval development and reproduction of filarial nematodes. The biological roles of *Wolbachia* have been promoted applied researches to use them as novel drug targets for treatment of human filarial diseases, including lymphatic filariasis. Moreover, *Wolbachia* may contribute to the inflammatory immune response in lymphatic filariasis patients. Analysis of proteins expressed by filarial nematode *Wolbachia* will provide important information on the biology of this endosymbiont, and will help validate candidate proinflammatory proteins of *Wolbachia*. In this study, we developed a *Wolbachia* isolation method from filarial nematodes, the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) and lymphatic filarial parasite (*Brugia malayi*), and characterized proteins derived from *Wolbachia* of *B. malayi* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) coupled with matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). In addition, the role of recombinant *Wolbachia* surface protein (rWSP) of *B. malayi Wolbachia* in proinflammatory cytokine responses by the murine macrophages RAW 264.7 cell line was examined.

The isolation protocol for the filarial nematode *Wolbachia* with the use of NP-40 at 0.04% was found to facilitate the protein analysis. Proteins of *Wolbachia* purified from *D. immitis* and *B. malayi* were defined specifically by Western blot analysis with anti-*Wolbachia* antibodies. Based on the immunoblot analysis, the 83-kDa, 48-kDa, 36-kDa, 26-kDa (WSP), 20-kDa and 17-kDa antigenic bands of *B. malayi Wolbachia* were detected. Moreover, the common antigens, WSP, 20-kDa, and 17-kDa, to both *Wolbachia* of *D. immitis*, and *B. malayi* were identified. The analysis of 2D-PAGE blots revealed 24 reactive spots specific for *Wolbachia* of *B. malayi*. The 6 WSP spots (26 kDa, pI 4.7-5.5), and additional 11 specific spots (20-62 kDa, pI 4.7-7.3) were identified on the Coomassie blue-stained gels. The WSP occurred in several spots different in pI values representing differently modified protein species that could be of biological relevance. The mapped *B. malayi Wolbachia* proteins will be useful for further structural and functional studies, which indicate their importance in biological functions of the *Wolbachia*, as well as in development and reproduction of filarial nematodes.

The expression of proinflammatory cytokine mRNA in murine macrophage RAW 264.7 cells incubated with the rWSP of *B. malayi Wolbachia* was evaluated by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). Interleukin (IL)-1β, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)-α mRNA from the murine macrophages were upregulated by the rWSP stimulation in a dose-dependant manner. When 9.0 μg/ml rWSP was supplemented to the cell cultures, highly enhanced production of IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA was detected, and comparable to *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) (0.1 μg/ml) induction. The induction of all cytokines was abolished by proteinase-K treatment of the rWSP. Our results indicated that the WSP represented proinflammatory activity that was capable of directly stimulating the transcription of the murine macrophage cell line RAW 264.7.

Field of Study : Medical Microbiolgy

Academic Year : 2006

Student's Signature..... Chantima Porksakorn

Advisor's Signature..... Surang Nuchprayoon

Co-advisor's Signature..... N. Hirankarn

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Surang Nuchprayoon for her competent supervision, guidance, encouragement, patience, and criticism which have inspired me to accomplish my study.

I am very grateful to my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Nattiya Hirankarn for her valuable suggestion, and encouragement for the completeness of this thesis. My grateful appreciation is extended to Associate Professor Dr. Somatat Wongsawang, Associate Professor Dr. Pattamaporn Kittiyapong, and Assistant Professor Dr. Kanitha Patarakul, my thesis committees, for their valuable suggestions and criticisms.

My sincere appreciation is also expressed to Professor Dr. Alan L Scott for his proficient supervision, valuable advice, excellent ideas, encouragement, and support during my stay in USA. I would like to deeply thank Mrs. Kiwon Park, and the various people at the Johns Hopkins Malaria Research Institute, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University for their technical instructions, and sincere helpful.

I am particularly indebted to the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, and the Thailand-Tropical Diseases Research Fund for supporting this study. Special appreciation must be extended to Johns Hopkins Malaria Research Institute, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University; Lymphatic Filariasis Research Unit, Chulalongkorn Medical Research Center, Department of Microbiology, and Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for supporting equipments and other utilities.

I would like to thank Professor Yong Poovorawan, Professor Dr. Apiwat Mutirangura, Dr. Taweesak Tirawatanapong, Associate Professor Dr. Ariya Chindamporn, Assistant Professor Dr. Padet Siriyasatien, and Associate Professor Dr. Chintana Chirathaworn for their valuable advice and suggestion. I am also indebted to all members in Lymphatic Filariasis Research Unit, and Snake Venom Unit for their encouragement, sincerity, and friendship.

Finally, much appreciation is special expressed to my parents, and my family for their loves, kindness, cheerfulness, and moral support throughout this study.

CONTENTS

Page

Abstract (Thai)....iv

Abstract (English)....v

Acknowledgement....vi

Contents....vii

List of Tables....viii

List of Figures....ix

List of Abbreviations....xii

Chapter

I. Introduction....1

II. Review of Related Literatures....10

III. Materials and Methods....40

IV. Results....62

V. Discussion and Conclusion....137

References....155

Appendices....182

Appendix A....183

Appendix B....186

Biography....192

LIST OF TABLES

Table **Page**

1 Major pathogenic filarial parasites of human..... 12

2 Detection of *Wolbachia* in the genera of filarial nematodes.....32

3 Distribution of *Wolbachia* in filarial nematodes..... 33

4 PCR primer sequences for *wsp* gene, and murine IL-1β, IL-6, TNF-α, and β-actin genes..... 45

5 Major protein spots identified on the silver stained 2-DE gel of *Wolbachia* of *Dirofilaria immitis* with their observed MW and pI..... 85

6 Identification of *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia* proteins by MALDI-TOF-MS and peptide mass fingerprint searching.....87

7 Peptide mass data of *Wolbachia* surface protein (WSP) of *Dirofilaria immitis Wolbachia*..... 89

8 Protein identification of spots specific for *Wolbachia* of *Brugia malayi* by MALDI-TOF-MS and peptide mass fingerprint searching.....106

9 Peptide mass data of *Wolbachia* surface protein (WSP) isoforms of *Brugia malayi Wolbachia*..... 109

10 Predicted characteristics of WSP of *Brugia malayi Wolbachia*..... 114

11 Predicted characteristics of the rWSP fusion protein derived from *Brugia malayi Wolbachia*..... 117

12 Identification of four rWSP spots of *Brugia malayi Wolbachia* by MALDI-TOF-MS and peptide mass fingerprint searching 127

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1 Taxonomy of the family Onchocercidae.....11

2 Life cycle of lymphatic filarial parasites.....15

3 Taxonomy of the bacteria *Wolbachia*.....24

4 Phylogeny of *Wolbachia* based on 16S rDNA gene sequences.....26

5 Electron micrographs of *Wolbachia* of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*.....30

6 Principle of MALDI-TOF-MS.....38

7 Map of the expression vector pET100/D-TOPO® for cloning and expression of recombinant *Wolbachia* surface protein (rWSP) derived from *Brugia malayi Wolbachia*.....43

8 Wet-mount preparation of the enriched *Wolbachia* cells from *Dirofilaria immitis*.....64

9 Immunofluorescence of *Wolbachia* purified from *Dirofilaria immitis* by using anti-rWSP antibodies..... 65

10 Diagram of *Wolbachia* isolation procedure from *Dirofilaria immitis*..... 67

11 SDS-PAGE and Western blot analysis of *Wolbachia* purified from *Dirofilaria immitis*, by using anti-rWSP antibodies.....69

12 Diagram of *Wolbachia* isolation procedure from *Dirofilaria immitis*.....71

13 Western blot analysis of *Wolbachia* purified from *Dirofilaria immitis,* by using anti-rWSP antibodies and anti-*Onchocerca volvulus* antibodies.....74

14 SDS-PAGE and Western blot analysis of *Wolbachia* purified from *Brugia malayi*, by using anti-rWSP antibodies.....76

15 Effect of the centrifugation force at 6000 *g* in *Wolbachia* isolation from *Brugia malayi*, by analysis of Western blot with anti-rWSP antibodies.....78

16 Effect of the centrifugation force at 16,000 *g* in *Wolbachia* isolation from *Brugia malayi*, by analysis of Western blot with anti-rWSP antibodies.....80

17 Western blot analysis of *Wolbachia* purified from *Brugia malayi* adult alive worms, by using anti-rWSP antibodies.....82

18 2-DE gel of *Wolbachia* extracts from *Dirofilaria immitis*.....84

19 MALDI-TOF-MS spectra of *Wolbachia* surface protein (WSP) of *Dirofilaria immitis Wolbachia*.....89

20 2D-blot analysis of *Wolbachia* extracts from *Dirofilaria immitis* by using anti-rWSP antibodies.....91

21 Optimization of Western blot analysis of *Dirofilaria immitis* and *Brugia malayi Wolbachia*, by using anti-*Wolbachia* antibodies.....92

22 Optimization of Western blot analysis of *Dirofilaria immitis Wolbachia*, by using anti-*Wolbachia* antibodies 94

23 Western blot analysis of *Wolbachia* of *Brugia malayi*, by using anti-*Wolbachia* antibodies.....97

24 Western blot analysis and 2D-PAGE of *Wolbachia* of *Brugia malayi* (IPG range 4-7).....101

25 Identification of high antigenic spots as WSP from 2D-blots of *Brugia malayi Wolbachia*, by using anti-rWSP antibodies.....103

26 Western blot analysis and 2D-PAGE of *Wolbachia* of *Brugia malayi* (IPG range 6-11).....106

27 MALDI-TOF spectra of *Wolbachia* surface protein (WSP) isoforms of *Brugia malayi Wolbachia*.....108

28 Western blot analysis of *Brugia malayi Wolbachia* by anti-phosphorylated protein antibodies.....111

29 Effect of calf intestinal alkaline phosphatase treatment on pI shift of WSP from *Brugia malayi Wolbachia*.....112

30 Predicted antigenic peptides of the WSP of *Brugia malayi Wolbachia*.....116

31 PCR amplification of *wsp* gene derived from *Brugia malayi Wolbachia*.....118

32 Analysis of the rWSP pET 100/D-TOPO expression vector by PCR.....119

33 SDS-PAGE profile of rWSP derived from *Brugia malayi Wolbachia* expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells.....121

34 SDS-PAGE of purification of inclusion bodies enriched with rWSP of *Brugia malayi Wolbachia*.....122

35 SDS-PAGE and Western blot analysis by INDIA HisProbe-HRP of purification of the rWSP derived from *Brugia malayi Wolbachia* by affinity chromatography with Ni-NTA resin.....124

36 SDS-PAGE and Western blot analysis of the refolded rWSP of *Brugia malayi Wolbachia*.....125

37 2-DE analysis of rWSP of Brugia *malayi Wolbachia* 126

38 MALDI-TOF-MS analysis of intact purified rWSP of *Brugia malayi Wolbachia*.....128

39 Dose responses of IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA production in the RAW 264.7 macrophage cell line to rWSP of *Brugia malayi Wolbachia*.....130

40 Time-course analysis of IL-1β, IL-6, and TNFα mRNA induction in the RAW 264.7 macrophage cell line induced with rWSP of *Brugia malayi Wolbachia*.....133

41 Proinflammatory cytokine responses to rWSP of *Brugia malayi Wolbachia*, but not to *Escherichia coli* LPS in the RAW 264.7 macrophage cell line.....136

LIST OF ABBREVIATIONS

ABI	=	Applied Biosystems
AFL	=	acute filarial lymphangitis
ATCC	=	American Type Culture Collection
BCA	=	bicinchoninic acid
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	=	bovine serum albumin
°C	=	degree Celsius
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
CHCA	=	α-cyano-4-hydroxycinnamic acid
CH_3CN	=	acetonitrile
CIP	=	calf intestinal alkaline phosphatase
cm	=	centimeter
CO_2	=	carbon dioxide
DALYs	=	disability-adjusted life years
dbEST	=	database of Expressed Sequence Tags
2-DE	=	two-dimensional gel electrophoresis
DEC	=	diethylcarbamazine
2D-PAGE	=	two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
DHB	=	2, 5-dihydroxybenzoic acid
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
EMBL	=	European Molecular Biology Labor

FBS	=	fetal bovine serum
FITC	=	fluorescein isothiocyanate
g	=	gram (s)
g	=	gravitational constant
HGE	=	human granulocytic ehrlichiosis
HSP	=	heat shock protein
IDT	=	Integrated DNA Technologies
IEF	=	isoelectric focusing
IgG	=	immunoglobulin G
IL	=	interleukin
IPG	=	immobilized pH gradient
IPTG	=	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kDa	=	kilodalton
LAL	=	limulus amebocyte lysate
LB	=	Luria-Bertani media
LBP	=	lipopolysaccharide-binding protein
LPS	=	lipopolysaccharide
M	=	molar
MALDI-TOF-MS	=	matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry
mg	=	milligram
mM	=	millimolar
mRNA	=	messenger RNA
MW	=	molecular weight
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
ng	=	nanogram
NH_4HCO_3	=	ammonium bicarbonate

Ni-NTA	=	Ni^{2+}- nitrilotriacetic acid
NO	=	nitric oxide
NP-40	=	nonidet P40
OD	=	optical density
ORF	=	open reading frame
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cells
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	polymerase chain reaction
PDB	=	Protein Data Bank
PMF	=	peptide mass fingerprinting
ppm	=	part per million
PVDF	=	polyvinylidene difluoride
rDNA	=	ribosomal deoxyribonucleic acid
RNA	=	ribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
RPMI	=	Roswell Park Memorial Institute
RT	=	reverse transcriptase
rWSP	=	recombinant *Wolbachia* surface protein
WHO	=	World Health Organization
WSP	=	*Wolbachia* surface protein
SCID	=	severe combined immunodeficiency
SD	=	standard deviation
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sTNF-R	=	soluble tumor necrosis factor-receptor
TBP	=	tributyl phosphine
TBS	=	tris buffered saline
TCA	=	trichloroacetic acid

TDR	=	Tropical Disease Research
TFA	=	trifluoroacetic acid
TNF-α	=	tumor necrosis factor alpha
Tris-HCl	=	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
µg	=	microgram
µl	=	microliter
UV	=	ultraviolet
V	=	volt
V·h	=	volt per hour