Thesis Title Production and Epitope Characterization of Phage-displayed Leukocyte Surface Molecule CD147

Author Mr. Pramoon Aruncharus

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory committee

Assist. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk Member

ABSTRACT

CD147 is a glycoprotein of immunoglobulin superfamily which is broadly expressed on the surface of various cell types. It contains 269 amino acids of type 1 transmembrane protein. The extracellular domain of human CD147 (CD147Ex) gene was subcloned into the phagemid expressing vector, pComb3HSS, to produce phage-displayed CD147Ex. Two *Escherichia coli* strains, XL-1 Blue and TG-1, were used as a host for comparing their efficiency in producing the suitable fold of CD147Ex molecule on phage particle via gpIII. The sandwich ELISA was employed for evaluating the retained CD147Ex epitopes with six clones of CD147 mAbs. All CD147 mAbs used specifically reacted against CD147 on recombinant phage derived from TG-1, whereas, only four of them could recognize CD147 on recombinant phage generated from XL-1 Blue. To our best knowledge, this is the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

first description of the influence of *E. coli* host strain in phage display technique. The correct size of CD147Ex (20 kDa) plus truncated gpIII (18 kDa) fusion protein was confirmed by Western immunoblotting at molecular weight of 38 kDa.

In addition, the constructed phage was used for epitope mapping of mAbs directed against CD147 molecule using an economic but reliable technique, competitive inhibition ELISA. The map of CD147Ex epitopes obtained was interpreted together with the previous study in which the homotypic aggregation of U937 cell line was induced by certain mAbs but not the others. Allocating of CD147Ex epitopes provides important information for CD147 ligand tracing and cell signaling in further studies.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตและศึกษาลักษณะอิพิโทปของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด ซีดี 147 ที่แสดงโดยฟาจ
ผู้เขียน	นายประมูล อรุณจรัส
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา ประธานกรรมการ รศ.ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ กรรมการ

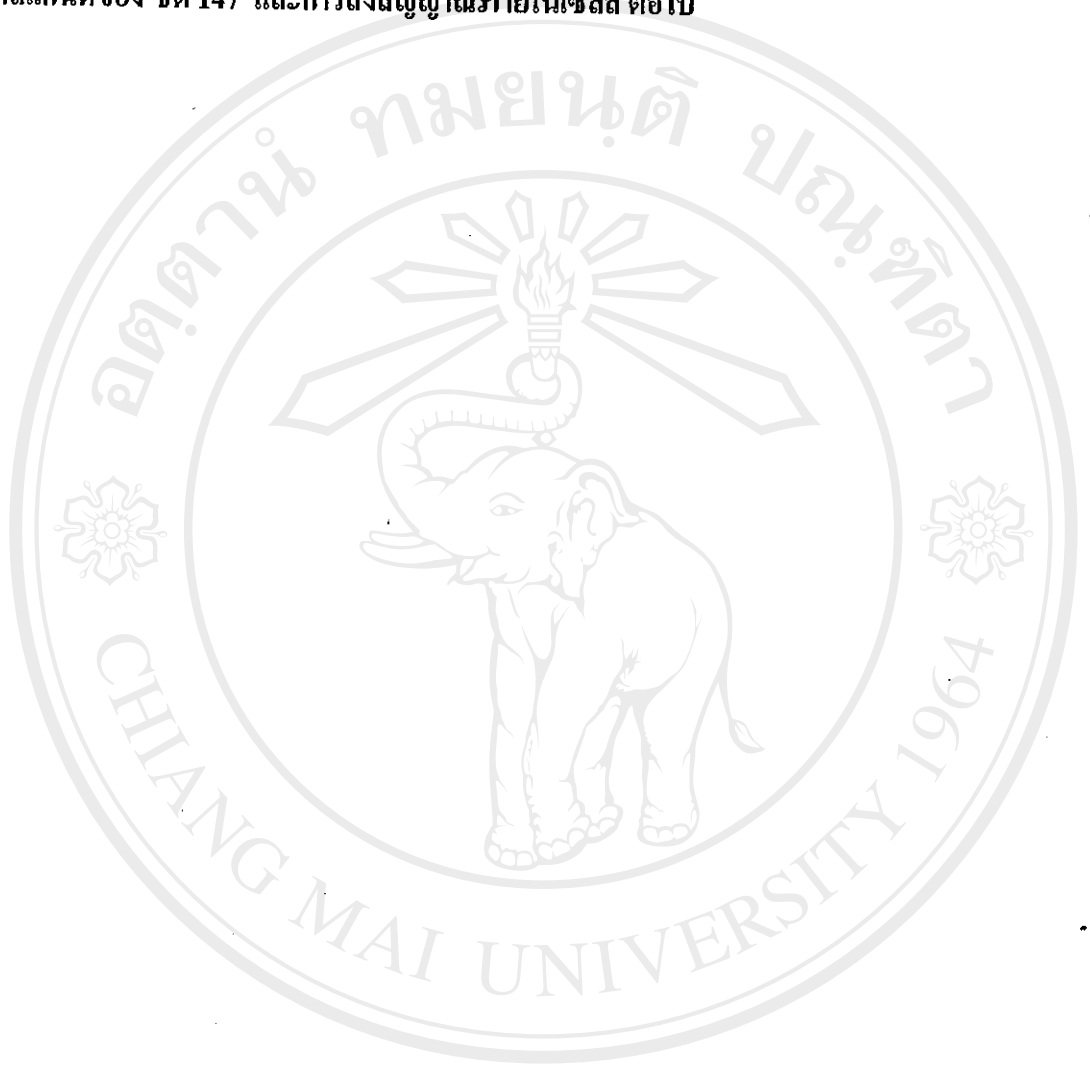
บทคัดย่อ

ซีดี 147 เป็นกลัยโคโปรตีนในกลุ่มของ immunoglobulin superfamily ที่แสดงออกบนผิวเซลล์หลากหลายชนิด โมเลกุลชนิดนี้จัดเป็น type 1 transmembrane protein ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 269 ชนิด ยีนของ ซีดี 147 ในส่วน extracellular domain (CD147Ex) ถูกแทรกเข้าไปในดีเอ็นเอของ phagemid expressing vector ชื่อ pComb3HSS เพื่อให้ CD147Ex ถูกแสดงออกบนผิวของฟาจโดยใช้เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* 2 สายพันธุ์ คือ XL-1 Blue และ TG-1 สำหรับเปรียบเทียบการพับทบอย่างเหมาะสมของ CD147Ex ที่เชื่อมกับ gpIII บนผิวของฟาจ ความคงอยู่ของ CD147Ex อิพิโทป ได้ถูกประเมินโดยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ ซีดี 147 ทั้ง 6 โคลน โดยวิธี sandwich ELISA พบว่า โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ ซีดี 147 ทั้ง 6 โคลน สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับ ซีดี 147 ที่อยู่บนผิวของฟาจที่เตรียมได้จาก TG-1 ขณะที่มีโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ ซีดี 147 เพียง 4 โคลนเท่านั้นที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับ ซีดี 147 ที่ปรากฏอยู่บนผิวของฟาจที่เตรียมได้จาก XL-1 Blue งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มีการกล่าวถึงอิทธิพลของสายพันธุ์ของ *E. coli* ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการทำ phage display technique ขนาดที่ถูกต้องของ CD147Ex ที่เชื่อมกับ gpIII ได้ถูกแสดงโดยวิธี Western immunoblotting พบว่ามีขนาด 38 kDa ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น CD147Ex 20 kDa และส่วนที่เป็น truncated gpIII 18 kDa

นอกจากนี้ฟาจที่สร้างขึ้นได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้หาความสัมพันธ์ของอิพิโทปที่จำเพาะโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ ซีดี 147 ด้วยวิธี competitive inhibition ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่ประหยัดและเชื่อถือได้ ตำแหน่งของอิพิโทปที่ได้ถูกนำไปแปลผลร่วมกับผลวิจัยที่มีก่อนหน้า ซึ่งพบว่ามีเพียงบาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคลนของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ ซีดี 147 เท่านั้นที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด homotypic aggregation ของ U937 cell line การจำแนกอิพิโทปของ CD147Ex จะให้ข้อมูลที่มีความสำคัญต่อการสืบหาลิแกนด์ของ ซีดี 147 และการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ต่อไป



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved