รหัสโครงการ SUT1-102-53-12-24

รายงานการวิจัย

การโคลนและศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA

(Molecular cloning and Functional Analysis of Leukocyte Surface Molecule Recognizing by Monoclonal Antibody CARA)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-102-53-12-24

รายงานการวิจัย

การโคลนและศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA

(Molecular cloning and Functional Analysis of Leukocyte Surface Molecule Recognizing by Monoclonal Antibody CARA)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิดา ขันแก้วหล้า

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วัชระ กสิณฤกษ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สาวิตรี เจียมพาณิชยกุล และ อาจารย์ ดร.สุพรรษา ปาต๊ะ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในฐานะผู้ร่วมผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งเป็นผู้ให้คำปรึกษา แนะนำ เพื่อให้การดำเนินการวิจัยดำเนินไปด้วยดี ขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเหลือดำเนินความสะดวกในด้านต่างๆ ทั้งการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และ การจัดทำเอกสาร โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประเภททุนนักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2553

พนิดา ขันแก้วหล้า

กรกฎาคม 2558

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การทำหน้าที่ของเซลล์ให้สมบูรณ์นั้น เกิดจากการทำงานร่วมกันของโปรตีนหลายชนิดบนผิวของเซลล์เหล่านี้ เรียกว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อใช้สื่อสารระหว่างเซลล์และเอื้อให้เซลล์เหล่านี้จัดการสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในร่างกายได้อย่างเป็นระบบ บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของโมเลกุลหลายชนิด บางชนิดถูกค้นพบและทราบหน้าที่แน่ชัด หลายโมเลกุลถูกค้นพบแต่ไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แท้จริง และยังคงมีการศึกษาอยู่อย่างต่อเนื่อง จากการใช้เทคนิคไฮบริโดรมา กลุ่มผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวได้หลายโคลน โดยโคลนที่ผู้วิจัยสนใจคือ CARA ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA สามารถจับกับโมเลกุลที่ มีการแสดงออกบนเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีบางเซลล์เท่านั้น โดยพบการแสดงออกของโมเลกุลนี้บนกลุ่มของ $CD4^+$ ลิมโฟไซต์ มากกว่าบน $CD8^+$ ลิมโฟไซต์ และไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มของ $CD25^+$ ลิมโฟไซต์ชนิดควบคุม จึงสันนิษฐานว่าโมเลกุลนี้สามารถใช้แบ่งกลุ่มใหม่ของลิมโฟไซต์ชนิดที ที่มีความสำคัญในการทำงานของเซลล์ชนิดนี้ ในการทดลองนี้พบว่ามี Molt4 20% ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CARA หลังการคัดเลือกเซลล์โดย magnetic cell sorting สามารถได้เซลล์ที่มี CARA โมเลกุลบนผิวเซลล์คิดเป็น 91% จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้เซลล์ $CARA^+$ Molt4 พบว่าโมเลกุล CARA เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 75 kDa จากการศึกษาหน้าที่ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA พบว่าสามารถยับยั้งการกระตุ้นการแบ่งตัวของ T cells ผ่าน CD3-mediated T cell stimulation แบบ dose dependent แต่ไม่มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์ Molt4 เกิดการตายแบบ apoptosis เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุล CARA เพื่อยืนยันว่าโมเลกุลนี้คืออะไร ดังนั้นจะต้องมีการศึกษาต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Leukocytes are known as the cells which play a major role in the immune system. To fulfil their functions, nature design there surface to express abundant of molecules that the cells can use for cell-cell communication, and finally fight against pathogens. Some of these molecules have been identified and characterized. Nevertheless, many of them still wait for discovering. Using hybridoma technique, several monoclonal antibodies (mAbs) to leukocytes surface molecules were generated.

One among those, mAb named CARA was of interest. Cell surface staining and flow cytometry analysis showed that CARA recognizing molecule expresses only on surface of some T lymphocytes. Expression of this molecule on surface of $CD4^+$ T lymphocytes is higher than those on surface of $CD8^+$ T lymphocyte, which could classified to neither $CD4^+$ nor $CD8^+$ T cell subpopulation. Additionally, this molecule was not characterized as a $CD25^+$ regulatory T lymphocytes. Therefore we assume that the CARA may classify a new unknown T cell subpopulation and may play a vital role in T cell responses.

This study we found that 20% of Molt4 population expressed CARA molecule. Cellular population of Molt4 expressing CARA molecule was enriched by magnetic cell sorting system. By this system 91% of Molt4 expressing CARA molecule was obtained and called $CARA^+$ Molt4. Biochemical study indicated that the CARA molecule is a 75 kDa protein. Functional study revealed that mAb CARA suppressed CD3-mediated T cell response in a dose dependent but had no effect on induction of cell apoptosis. Since gene cloning of this molecule did not succeed in this study, further identification of the molecule and functional role of this molecule in adaptive immune response are needed.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ..... **ก**

บทคัดย่อภาษาไทย ..... **ข**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... **ค**

สารบัญ ..... **ง**

สารบัญภาพ ..... **ฉ**

บทที่ 1 บทนำ **1**

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

1.2 การทบทวนวรรรกรรม (LITERATURE REVIEWS) 3

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 6

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น 6

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย 7

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 7

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย **8**

2.1 การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก 8

2.2 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี **AFFINITY CHROMATOGRAPHY** 8

2.3 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้ด้วยวการแยกโปรตีนนด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS หรือ SDS-PAGE) 8

2.4 การตรวจสอบการจับ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับโมเลกุล **CARA** ที่พบบนผิวของเซลล์ MOLT4 ด้วยวิธี **INDIRECT IMMUNOFLUORESCENT STAINING** 9

2.5 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี **CARA** 10

2.6 วิธีการศึกษากลไกการยับยั้ง **CD3-MEDIATED T CELL ACTIVATION** โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี **CARA** 11

2.7 การตรวจวิเคราะห์หาการตายของเซลล์แบบ **APOPTOSIS** 12

บทที่ 3 ผลการวิจัย **13**

3.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี **CARA** ให้ได้ปริมาณมาก 13
3.2 การแสดงออกของโมเลกุล **CARA** บนผิวเซล์ล์ **MOLT4** 14
3.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุล **CARA** 16
3.4 การโคลนยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุล **CARA** 16
3.5 การศึกษาผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี **CARA** ต่อการกระตุ้น **T CELLS** ผ่าน **CD3-MEDIATED T CELL STIMULATION** 17
3.6 การศึกษาผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี **CARA** ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ **APOPTOSIS** 21

บทที่ 4 บทสรุป **23**

บรรณานุกรม **25**

ภาคผนวก **28**

ประวัติผู้วิจัย **29**

บทคัดย่อการนำเสนอผลงานทางวิชาการ **30**

เอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์ **31**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA 13
รูปที่ 2 การแสดงออกของโมเลกุล CARA บนผิวของเซลล์ Molt4 15
รูปที่ 3 การแสดงออกของโมเลกุล CARA บนผิวของ Molt4 หลังการคัดแยกเซลล์ด้วย MAC sort 15
รูปที่ 4 แสดงขนาดของโมเลกุล CARA 17
รูปที่ 5 FACS profiles แสดงผลการยั้บยั้ง CD3-mediated PBMCs proliferation โดยแอนติบอดี CARA ที่ความเข้มข้น 20 μg/ml 19
รูปที่ 6 FACS profiles แสดงผลการยั้บยั้ง CD3-mediated PBMCs proliferation ด้วย แอนติบอดี CARA ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml 20
รูปที่ 7 FACS profile แสดงผลของแอนติบอดี CARA ต่อการการตายของเซลล์แบบ apoptosis 22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบที่มีความสำคัญระบบหนึ่งของร่างกายในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอม เซลล์มะเร็ง หรือเชื้อโรคเพื่อไม่ให้ทำอันตรายต่อร่างกาย การทำงานในระบบภูมิคุ้มกันเกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์หลายชนิด เซลล์ที่ทำหน้าที่หลักในระบบภูมิคุ้มกันคือเซลล์เม็ดเลือดขาว กลไกที่เอื้อให้เซลล์เหล่านี้สามารถจัดการสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในร่างกายได้อย่างเป็นระบบนั้นคือการสื่อสารและส่งสัญญาณอย่างมีประสิทธิภาพระหว่าง (Huston 1997, Abbas and Lichtman 2000, Janeway C., Travers J. et al. 2001, Parkin and Cohen 2001, Abbas, Lichtman et al. 2011) ธรรมชาติจึงได้กำหนดให้บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดต่างๆ มากมาย โดยเรียกโมเลกุลเหล่านี้ว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว (Barclay, Brown et al. 1997) เพื่อที่เซลล์จะได้ใช้โมเลกุลเหล่านี้เป็นเครื่องมือในการสื่อสารและรับส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ กลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสื่อสารระหว่างเซลล์โดยโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลไกหลักคือ cell-cell interaction และ ligand-receptor interaction โดยพบว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น Adhesion molecules และโมเลกุลจำนวนหนึ่งทำหน้าที่เป็น receptors สำหรับ cytokine หรือ chemokine การเข้าจับกันระหว่าง ligand-receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว จะก่อให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ จากนั้นจะส่งผลให้มีการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ differentiation, maturation, proliferation, migration ตลอดจนการตายของเซลล์แบบ apoptosis และสุดท้ายจะก่อให้เกิดการตอบสนองแบบต่างๆในระบบภูมิคุ้มกัน (Barclay, Brown et al. 1997, Huston 1997, Abbas and Lichtman 2000, Janeway C., Travers J. et al. 2001, Parkin and Cohen 2001, Smith 2008, Abbas, Lichtman et al. 2011) ดังนั้นการที่เราทราบถึงคุณสมบัติและบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการอธิบายกลไกควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน จากอดีตสู่ปัจจุบันมีโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมากได้ถูกค้นพบขึ้น และถูกจัดเข้าสู่ระบบ Cluster of differentiation (CD) antigen (Zola and Swart 2005) การตั้งชื่อโดยระบบ CD นี้เกิดขึ้นจากการดำเนินการของ The Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) workshops ซึ่งจัดทำขึ้นโดยนักภูมิคุ้มกันวิทยาทั่วโลก โดยการที่จะตั้งชื่อโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวให้อยู่ในระบบ cluster of differentiation (CD) นั้นจะมีการส่งแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากห้องปฏิบัติการต่างๆทั่วโลกมาที่ HLDA workshop committee จากนั้นแอนติบอดีทั้งหลายนี้จะได้มีการวิเคราะห์ศึกษา โดยขั้นตอนการศึกษาของ The

international HLDA workshop นั้นจะศึกษาดูการแสดงออกของโมเลกุลในเซลล์ชนิดต่างๆ (cellular reaction patterns) น้ำหนักโมเลกุล และหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb ชนิดนั้นๆ โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดใดที่มีความจำเพาะเช่นเดียวกันจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันและให้ชื่อเป็น CD number โดยชื่อ CD number นี้เป็นตัวบ่งบอกโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่นำไปจัดกลุ่ม จากการประชุม HLDA workshop ครั้งที่ 9 ที่เมือง Bacelona ประเทศสเปน เมื่อเดือนมีนาคมปี พ.ศ. 2553 พบว่ามีโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 350 ชนิดที่ถูกจัดอยู่ในระบบ CD คือ CD1-CD363 (HLDA_Workshop 2013) โมเลกุลบางชนิดที่ได้ถูกค้นพบและทราบหน้าที่ที่แน่ชัดแล้ว อีกหลายโมเลกุลถูกค้นพบแล้วแต่ยังไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แท้จริง โดยยังคงมีการศึกษากันอยู่อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่ายังมีโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์อีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ถูกค้นพบ การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดใหม่ รวมถึงการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโมเลกุลบนเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ทำให้เราเข้าใจบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลดังกล่าวต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยจะมีผลเชื่อมโยงทำให้เราเข้าใจการกระบวนการทำงานต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น โดยองค์ความรู้ที่ได้นั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและวินิจฉัยการดำเนินไปของโรคต่างๆ และยังรวมไปถึงการหาวิธีรักษาโรค ต่อไปในอนาคตได้

ในการศึกษาคุณสมบัติ หรือหน้าที่ของโมเลกุลใดๆ บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยทั่วไปนั้น ส่วนใหญ่สามารถทำได้โดยการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะ และนำเอาโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุลชนิดนั้นๆ มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษา ซึ่งโมโนโคลนอล แอนติบอดีดังกล่าว สามารถผลิตขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Hybridroma technique ซึ่งได้ถูกพัฒนามาใช้โดย Kohler และ Milstein ในปี 1975 (Kohler and Milstein 1975, Abbas and Lichtman 2000, Janeway C., Travers J. et al. 2001) โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นสามารถนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลนั้นๆ บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ (cellular distribution) การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคนอล แอนติบอดีชนิดนั้น เช่น การศึกษาหาขนาดของโมเลกุล (molecular weight) การศึกษาหาปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (glycosylation) หรือ อาจใช้ตรวจสอบการจับกับโมเลกุลอื่นๆบนผิวเซลล์เดียวกัน (protein interaction) เป็นต้น นอกจากนี้เรายังสามารถนำแอนติบอดีที่ได้มาทำการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะ โดยการนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้เข้ามาจับและสังเกตการตอบสนองต่างๆ ของเซลล์ที่เกิดขึ้น เช่น การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ การกระตุ้นหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) เป็นต้น และท้ายที่สุดเรายังสามารถนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เราผลิตได้นั้นมาโคลนยีน และหาลำดับของ nucleotide เพื่อที่จะบอกได้ว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิดนั้นๆ คือโมเลกุลใดได้

จากความสำคัญในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวดังได้กล่าวมาข้างต้นนี้แล้ว ทำให้ผู้วิจัยจำนวนมากทั่วโลกมีความตั้งใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาบทบาทและหน้าที่ของโมเลกุลชนิดใหม่อย่างลึกซึ้งเพื่อให้เกิดองค์ความรู้และอาจจะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้งานได้จริงในอนาคตข้างหน้าได้ ในช่วงระยะเวลาสิบกว่าปีที่ผ่าน ในการวิจัยร่วมกับ ศาสตราจารย์ ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัยได้ทำการผลิต polyclonal antibodies (pAbs) และ monoclonal antibodies (mAbs) ที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวขึ้นมาเป็นจำนวนมาก และได้นำแอนติบอดีดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโมกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งชนิดที่ถูกค้นพบแล้วและที่ยังไม่มีการค้นพบ

โดยในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจโมโนโคลนอลที่ผลิตขึ้นมาใหม่ชื่อ CARA จาก ผลการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดี CARA (ต่อไปเรียกโมเลกุล CARA) มีการแสดงออกบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes โดยพบว่ามีการแสดงออกบน $CD4^+$ T lymphocyte มากกว่าบน $CD8^+$ T lymphocyte และพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CARA ไม่จัดอยู่ในกลุ่มของ $CD25^+$ regulatory T cell ดังนั้นโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA นี้อาจจะเป็นตัวบ่งชี้ ที่สำคัญตัวหนึ่งที่อาจจะสามารถจัด subpopulation ใหม่ในกลุ่มของ T lymphocytes ที่ยังไม่มีใครค้นพบ และอาจมีบทบาทที่สำคัญต่อการทำงานของ T lymphocytes ผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะนำเอาแอนติบอดี CARA มาใช้เป็นเครื่องมือศึกษาและจะทำการโคลนยีนของโมเลกุลนี้ เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นโมเลกุลชนิดใดโดยใช้ T cell line ชื่อ Molt4 ซึ่งพบว่าเป็น cell line ชนิดเดียวที่พบการแสดงออกของโมเลกุลนี้ รวมทั้งศึกษาบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลชนิดนี้ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยข้อมูลหรือองค์ความรู้ที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่จะทำให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น

1.2 **การทบทวนวรรรกรรม** (Literature reviews)

ระบบภูมิคุ้มกัน เป็นระบบที่มีความสำคัญระบบหนึ่งของร่างกายในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอม เซลล์มะเร็ง หรือเชื้อโรคเพื่อไม่ให้ทำอันตรายต่อร่างกาย การทำงานในระบบภูมิคุ้มกันเกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์หลายชนิด เซลล์ที่ทำหน้าที่หลักในระบบภูมิคุ้มกัน ก็คือเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยกลไกที่เอื้อให้เซลล์เหล่านี้สามารถจัดการสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในร่างกายได้อย่างเป็นระบบนั้น คือกระบวนการสื่อสารและส่งสัญญาณอย่างมีประสิทธิภาพระหว่าง ธรรมชาติจึงกำหนดให้บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดต่างๆ มากมาย โดยเรียกโมเลกุลเหล่านี้ว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว (Barclay, Brown et al. 1997) กลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสื่อสารระหว่างเซลล์โดยโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลไกหลัก คือ cell-cell interaction และ ligand-receptor interaction โดย

พบว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น Adhesion molecules และโมเลกุลจำนวนหนึ่งทำหน้าที่เป็น receptors สำหรับ cytokine หรือ chemokine การเข้าจับกันระหว่าง ligand-receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นจะก่อให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ และส่งผลให้มีการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ differentiation, maturation, proliferation, migration ตลอดจนกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis และสุดท้ายจะก่อให้เกิดการตอบสนองแบบต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน(Barclay, Brown et al. 1997, Huston 1997, Abbas and Lichtman 2000, Janeway C., Travers J. et al. 2001, Parkin and Cohen 2001, Smith 2008, Abbas, Lichtman et al. 2011) ดังนั้นการที่เราทราบถึงคุณสมบัติและบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการอธิบายกลไกควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

ปัจจุบันมีโมเลกุลบนผิวเซลล์มากกว่า 339 ชนิดได้ถูกค้นพบและจัดให้อยู่ในระบบ ของ Cluster of differentiation (CD) จากการประชุม Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) ครั้งที่ 8 ที่เมือง Adeliade ประเทศออสเตรียเลีย (Zola and Swart 2005, Zola, Swart et al. 2005) โดยโมเลกุลบางชนิดที่ถูกค้นพบทราบหน้าที่ที่แน่ชัดแล้ว และมีอีกหลายโมเลกุลถูกที่ถึงแม้จะถูกค้นพบแล้ว แต่ยังไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แท้จริง โดยยังคงมีการศึกษากันอยู่อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่ายังมีโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์อีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ถูกค้นพบ การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดใหม่ การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโมเลกุลบนเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ จะสามารถทำให้เราเข้าใจบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลดังกล่าวต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น โดยองค์ความรู้ที่ได้นั้นอาจสามารถนำมาประยุคใช้ในการป้องกัน วินิจฉัยและรักษาโรค ต่อไปในอนาคตได้

ในการศึกษาคุณสมบัติ หรือหน้าที่ของโมเลกุลใดๆ บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยทั่วไปนั้น สามารถทำได้โดยการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะ และนำเอาโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุลชนิดนั้นๆ มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษา ซึ่งโมโนโคลนอล แอนติบอดีดังกล่าว สามารถผลิตขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Hybridroma technique ซึ่งได้ถูกพัฒนามาใช้โดย Kohler และ Milstein ในปี 1975 (Kohler and Milstein 1975, Abbas and Lichtman 2000, Janeway C., Travers J. et al. 2001) โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นสามารถนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลนั้นๆ บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ (cellular distribution) การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคนอล แอนติบอดีชนิดนั้น เช่น การศึกษาหาขนาดของโมเลกุล (molecular weight) การศึกษาหาปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (glycosylation) หรือ อาจใช้ตรวจสอบการจับกับโมเลกุลอื่นๆบนผิวเซลล์เดียวกัน (protein interaction) เป็นต้น นอกจากนี้เรายังสามารถนำแอนติบอดีที่ได้มาทำการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะ โดยการนำโม

โนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้เข้ามาจับและสังเกตการตอบสนองต่างๆ ของเซลล์ที่เกิดขึ้น เช่น การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ การกระตุ้นหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) เป็นต้น และท้ายที่สุดเรายังสามารถนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เราผลิตได้นั้นมาโคลนยีนและหาลำดับของ nucleotide เพื่อที่จะบอกได้ว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิดนั้นๆ คือโมเลกุลใดได้ (Chiampanichayakul, Szekeres et al. 2002)

เพื่อศึกษาหาหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว ในช่วงระยะเวลากว่าสิบปีที่ผ่าน กลุ่มวิจัยของ ศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ (ซึ่งตัวผู้วิจัยเองก็ได้อยู่ในกลุ่มวิจัยนี้เช่นกัน) ได้ทำการผลิต polyclonal antibodies (pAbs) และ monoclonal antibodies (mAbs) ที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวขึ้นมาเป็นจำนวนมาก และได้นำแอนติบอดีดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งชนิดที่ถูกค้นพบแล้วและที่ยังไม่มีการค้นพบ (Kasinrerk and Tokrasinwit 1999, Kasinrerk, Tokrasinwit et al. 1999, Kasinrerk, Tokrasinwit et al. 2000, Moonsom and Kasinrerk 2000, Khunkeawla, Moonsom et al. 2001, Moonsom, Khunkeawla et al. 2001, Chiampanichayakul, Szekeres et al. 2002, Kasinrerk, Moonsom et al. 2002, Tayapiwatana and Kasinrerk 2002, Intasai, Arooncharus et al. 2003, Tayapiwatana, Arooncharus et al. 2003, Kritratanasak, Chiampanichayakul et al. 2004, Chiampanichayakul, Khunkaewla et al. 2006, Chiampanichayakul, Peng-in et al. 2006, Intasai, Mai et al. 2006, Thammawong, Kasinrerk et al. 2006, Khunkaewla, Schiller et al. 2008) โดยขอยกตัวอย่างหนึ่งตัวอย่างจากผลการศึกษาดังกล่าวคือ คณะผู้วิจัยได้ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวขึ้นมาชนิดหนึ่ง ตั้งชื่อว่า mAb P-3E10 จากการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb P-3E10 (P-3E10 molecule) พบว่าโมเลกุลชนิดนี้พบได้ทั่วไปทั้งบนผิวของ hematopoietic และ non-hematopoietic cell lines ในส่วนของ peripheral blood cells สามารถพบ P-3E10 antigen ได้บนผิวเซลล์ lymphocytes, monocytes และ granulocytes แต่ไม่พบบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Chiampanichayakul, Szekeres et al. 2002, Chiampanichayakul, Khunkaewla et al. 2006) จากการโคลนยีนโดยวิธี retroviral cloning system ทำให้ทราบว่า โมเลกุล P-3E10 คือ Na,K-ATPase β3 subunit จากทำการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลชนิดนี้ พบว่า mAb P-3E10 สามารถไปยับยั้งการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด T และ B lymphocytes ได้โดย mAb P-3E10 จะยับยั้งการหลั่งสาร cytokines ที่ชื่อ IFN-γ, IL-2, IL-4 และ IL-10 หลังจากทำการกระตุ้น T lymphocytes โดยแอนติบอดีต่อ CD3 ชื่อ mAb OKT3 (Chiampanichayakul, Szekeres et al. 2002) เมื่อนำ mAb P-3E10 มาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุล P-3E10 พบว่าโมเลกุลนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-55 kDa ประกอบด้วยพันธะ disulfide ภายในโมเลกุล และจากการทำ co-immunoprecipitation พบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 115 kDa co-precipitated ร่วมกับโมเลกุล P-3E10 โมเลกุลดังกล่าวคือ α subunit ของ Na,K-ATPase (Chiampanichayakul, Khunkaewla et al. 2006)

จากนั้น mAb P-3E10 ได้ถูกส่ง ไปยังคณะกรรมการการประชุม Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) Workshop ครั้ง 8 จัดขึ้นที่เมือง Adelaide ประเทศ Australia ในเดือนธันวาคมปี ค.ศ. 2004 โดยผลจากการประชุมครั้งนี้ ทำให้ mAb P-3E10 และโมเลกุลที่จำเพาะถูกตั้งชื่อเป็น CD molecule ชนิดใหม่ชื่อ CD298 (Zola and Swart 2005, Zola, Swart et al. 2005) ซึ่งถือได้ว่าเป็น CD โมเลกุลแรกที่ถูกค้นพบโดยกลุ่มนักวิจัยไทย

ในข้อเสนอโครงการฉบับนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ mAb CARA ที่ผลิตได้มาเป็นเครื่องมือในการศึกษา จากการศึกษาเบื้องต้นโดยการย้อมผิวเซลล์แบบ indirect immunofluorescent สามารถพบโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb CARA พบว่าโมเลกุล CARA มีการแสดงออกบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes โดยพบบน $CD4^+$ T lymphocyte และ $CD8^+$ T lymphocyte เฉพาะบางเซลล์เท่านั้น และพบว่ามีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดนี้บนกลุ่มของ $CD4^+$ T lymphocyte มากกว่าบน $CD8^+$ T lymphocyte นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CARA ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มของ $CD25^+$ regulatory T cell ดังนั้นโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA อาจจะเป็น marker ที่สำคัญตัวหนึ่งที่สามารถจัด subpopulation ใหม่ในกลุ่มของ T lymphocytes ที่ยังไม่มีใครค้นพบ และอาจมีบทบาทที่สำคัญต่อการทำงานของ T cells ผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะนำเอา mAb CARA มาทำการโคลนยีนของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb CARA เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นโมเลกุลชนิดใด รวมทั้งศึกษาบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลชนิดนี้ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน องค์ความรู้ที่ได้นั้นจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่จะทำให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น

1.3 **วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1. เพื่อศึกษาหน้าที่ทางชีวเคมีและ ทางภูมิคุ้มกันวิทยาของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี CARA
2. เพื่อทำการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี CARA

1.4 **ข้อตกลงเบื้องต้น**

การตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor อย่างน้อย 1 เรื่อง หรือ การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ 1 ครั้ง

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยมีขอบเขตเริ่มต้นด้วยการผลิตแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมากจากนั้นทำการโคลนยีนของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA โดยวิธี retroviral expression system โดยเริ่มจากแอนติบอดีที่มีอยู่ในการติดตามโมเลกุลดังกล่าวมาแยกสกัดยีนเพื่อนำไปหาลำดับดีเอ็นเอ ในส่วนของการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลนี้ในระบบภูมิคุ้มกัน จะศึกษาดูผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ต่อการแบ่งตัวของเซลล์โดยการกระตุ้นผ่าน CD3 T cell receptor และผลของแอนติบอดีชนิดนี้ต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยพื้นฐาน ซึ่งเมื่อทราบว่าโมเลกุลที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA คืออะไร มีบทบาทหน้าที่อย่างไร โดยเฉพาะกับการทำงานของลิมโฟไซต์ชนิด T cell จะทำให้ได้รับองค์ความรู้ใหม่ที่มีคุณค่าทางด้านวิทยาศาสตร์ และการแพทย์ สามารถเข้าใจการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุมกันได้ดียิ่งขึ้น การนำไปใช้ประโยชน์จริงในปัจจุบันอาจยังไม่สามารถนำแอนติบอดีมาใช้งานเป็นรูปธรรมได้ แต่จากผลการทดลองเบื้องต้นที่ทราบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถกดการกระตุ้นของ T cell ได้ จากองค์ความรู้ที่ได้ และแอนติบอดีที่นำมาศึกษาหากมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง อาจสามารถพัฒนาไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการหาทางรักษาผู้ป่วยโรค Autoimmune ได้ โดยหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้คือ นักวิทยาศาสตร์ หรือสถาบันวิจัยทางการแพทย์ทั้งในและต่างประเทศ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก

ทำการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก โดยการเลี้ยงเซลล์ลูกผสม (hybridoma) ที่ผลิตแอนติบอดี CARA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ serum free medium เพื่อให้เซลล์ผลิตแอนติบอดีมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดสอบ activity ของแอนติบอดีที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ก่อนที่จะนำไปเตรียมเป็นแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ต่อไป

2.2 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี CARA ที่มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography โดยเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm 4°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ออกไป ดูดเฉพาะส่วนของเหลวมาผ่านใน Protein A sepharose column เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์เป็นชนิด IgG3 ซึ่งสามารถถูกยึดจับกับ Protein G ที่อยู่บนเม็ด sepharose ส่วนโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่จับกับเม็ด sepharose ใน column จะถูกล้างออกโดย phosphate buffer ก่อนเติม eluting buffer (0.1M citric acid buffer pH 3.0) เพื่อแยกแอนติบอดีที่ถูกจับออกจาก column ทำการปรับ pH ของสารที่แยกได้ให้เป็น 7.2 โดยการเติม neutralizing buffer (2M Tris-HCl pH 8.0) นำแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ไป dialyze ด้วย PBS และวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ก่อนเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้ด้วยวการแยกโปรตีนนด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis **หรือ** SDS-PAGE)

นำแอนติบอดีบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 2 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE ทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่แยกได้มาผสมกับ non-reducing buffer หรือ reducing buffer และต้มที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ทำการวิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE ที่มี 12.5% resolving gel จากนั้นทำการย้อมแผ่นเจลที่แยกแอนติบอดีที่สนใจด้วยสี Coomassie Brilliant blue ล้างสีส่วนเกินออกโดย destaining solution จนพื้นเจลส่วนที่ไม่มีแถบโปรตีนใสสะอาด เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนที่แยกได้กับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ทำควบคู่กันในแผ่นเจลเดียวกัน

2.4 การตรวจสอบการจับ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับโมเลกุล CARA ที่พบบนผิวของเซลล์ Molt4 **ด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining**

เลี้ยง Molt4 ใน RPMI-1640 ที่มี 10% fetal calf serum (FCS) และสาร antibiotics ใน 5% CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C

2.4.1 การแยกเซลล์ Molt4 ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CARA จากเซลล์ที่ไม่มีโมเลกุล CARA บนผิวเซลล์โดยใช้ magnetics beads sorting system

นำเซลล์ Molt4 $2x10^7$ เซลล์มาปั่นล้าง 2 ครั้งด้วยความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เป็น $1x10^7$ cell/ml ในสารละลาย phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS) ที่มี 1 % bovine serum albumin (1%BSA-PBS) เติม human IgG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 µg/ml ผสมให้เข้ากันเบาๆ และแช่ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที เติมแอนติบอดี CARA ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ชนิด serum free media ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากันอย่างดี และแช่ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS ที่มี BSA ปริมาณ 0.5% และ 2 mM EDTA (0.5%BSA-PBS-EDTA) เติม 0.5%BSA-PBS-EDTA ลงไปในเซลล์ที่ถูกย้อมแล้ว 160 µl ต่อเซลล์ $2x10^7$ เซลล์ ผสมให้เข้ากันก่อนเติม goat-anti-mouse IgG ที่ต่อกับ micro magnetic ปริมาตร 40 µl ผสมให้เข้ากันและแช่ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ครบเวลา ปั่นล้าง 1 ครั้งด้วย 0.5%BSA-PBS-EDTA ละลายตะกอนของเซลล์ด้วย 0.5%BSA-PBS-EDTA 1 ml ที่ผ่านการแช่เย็น เพื่อนำไปผ่าน MS column magnetic bead sorting system โดยการนำ Column มาติดกับ Magnetic adaptor และติดเข้าไปกับแท่งแม่เหล็ก นำเซลล์ที่ผ่านการย้อมมาผ่าน column โดยเซลล์ที่ไม่ถูกย้อมจะหลุดออกจาก column ส่วนเซลล์ที่มีการถูกย้อมด้วยแอนติบอดี CARA จะติดอยู่ใน column ล้าง column ด้วย 0.5%BSA-PBS-EDTA ที่เย็น ครั้งละ 500 µl จำนวน 3 ครั้งเพื่อกำจัด เซลล์ที่ไม่จับกับแอนติบอดี CARA ก่อนนำ column ออกจากแท่งแม่เหล็ก และเติม 0.5%BSA-PBS-EDTA 1 ml ลงไปใน column เซลล์ที่ติดใน column จะหลุดออกมา เก็บเซลล์ดังกล่าวมาปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย PBS และนำไปเลี้ยงใน 10%FCS-RPMI เป็นเวลา 2 วันก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

2.4.2. การตรวจสอบการแสดงออกของโมเลกุล CARA บนผิวเซลล์ Mol4 ทั้งก่อนและหลังการแยกโดยวิธี magnetic bead soting system โดยวิธี indirect immunofluorescent staining

นำเซลล์ Molt4 ทั้งก่อนและหลังผ่านการแยกด้วย magnetic bead sorting system มาปั่นล้าง 2 ครั้งด้วยความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นปรับความเข้มข้นให้เป็น $1x10^7$ cell/ml ใน 1%BSA-PBS-Azide นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ชนิด serum free media ลงไปหลอดทดลอง 50 µl เติมลงใน cell suspension ปริมาตร 50 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่ 4°C เป็นเวลา 30

นาที เมื่อครบเวลาปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 1%BSA-PBS-Azide ก่อนการติดตามด้วย Alexa Fluor® 488 conjugated F(ab')2 fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) และ แช่ที่ 4°C เมื่อครบเวลา 30 นาทีปั่นล้างเซลล์ด้วย 1%BSA-PBS-Azide เติมสารละลาย 1% paraformaldehyde ใน PBS ปริมาตร 350 µl ก่อนการตรวจวิเคราะห์ ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

2.5 **การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี CARA**

2.5.1 Immunoprecipitation

ทำการติดฉลากโปรตีนบนผิวเซลล์ของ human T cell line Molt4 ด้วย Biotin จากนั้นนำเซลล์ที่ทำการติดฉลากด้วย Biotin มาทำการย้อมด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA หรือ M6-1B9 หรือ PPV02 ซึ่งใช้เป็น positive และ negative control ตามลำดับ จากนั้นทำการ cross-link ด้วย Rab-anti-mouse-Igs ก่อนทำการแตกเซลล์โดยใช้ lysis buffer ที่มีส่วนผสมของ protease inhibitors และใช้ 1%NP-40 เป็น detergent สำหรับการแตกเซลล์ จากนั้นนำ 0.5 ml ของ cell lysate ที่ได้จากการปั่นแยกที่ 14,000 rpm 4°C เป็นเวลา 30 นาที มาเติมด้วย Protein G sepharose beads 50 µl ซึ่งมี anti-mouse-immunoglobulins ติดอยู่และนำไป rotate ข้ามคืนที่ 4°C วันต่อมาทำการล้าง protein G sepharose beads ที่ถูกติดด้วย antigen-antibody complexes 5 ครั้ง ด้วย lysis buffer ที่มีส่วนผสมของ detergent ที่ใช้สำหรับแตกเซลล์ และอีก 5 ครั้งด้วย lysis buffer ที่ไม่มี detergent โดยในการปั่นล้างครั้งสุดท้ายจะดูด solution ออกหมด และทำการแยกเอา precipitated proteins ออกมาโดยการเติม 60 µl 1X reducing sample buffer ลงไป resuspend เม็ด beads จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปปั่นแยกที่ 13,000 rpm ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที ดูดแยกส่วนที่เป็น solution ไปทำการแยกวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ต่อไป

2.5.2. Western Blotting

หลังจากทำการแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE แล้ว โปรตีนทั้งหมดจะถูก transfer ลงบน แผ่น nitrocellulose membrane จากนั้นทำการ block แผ่น nitrocellulose membrane ด้วย 5% BSA ใน PBS ก่อนที่จะทำการย้อมแผ่น membrane นี้ด้วย Streptavidin ที่ติดฉลากด้วย เอ็นไซม์ Horse radish peroxidase (Streptavidin-HRP) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากโปรตีนที่เราสนใจถูกติดฉลากด้วย Biotin จากนั้นทำการล้างแผ่น membrane 3 ครั้งด้วย washing buffer ที่ประกอบด้วย 0.5% Tween 20 ในสารละลาย PBS และ 2 ครั้งด้วย สารละลาย PBS ก่อนที่จะนำไปตรวจสอบหา protein bands โดยวิธี chemiluminescence detection system ส่วนโปรตีน ไม่ได้ถูกติดฉลากโปรตีนด้วย Biotin นั้น จะทำการย้อมแผ่น membrane ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่

อุณหภูมิห้อง แล้วล้าง 5 ครั้งด้วย washing buffer ก่อนการย้อมด้วย secondary antibody คือ rabit-anti-mouse immunoglobulins-HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้างแผ่น membrane และ ตรวจหา protein bands เช่นเดียวกับในกรณีการย้อม membrane ด้วย Streptavidin-HRP

2.6 วิธีการศึกษากลไกการยับยั้ง CD3-mediated T cell activation โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA

2.6.1. การเตรียม peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) โดยวิธี Ficoll-Hypague density gradient centrifugation

นำเลือดจาก Buffy coat มาทำการเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:2 จากนั้นนำเลือดที่ผ่านการเจือจาง 40 ml ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 ml ใช้เข็มยาวเบอร์ 18 ดูดสารละลาย Ficoll-Hypague ปริมาตร 10 ml และปล่อยค่อยๆ ปล่อยจากก้น tube ใต้ชั้นของเลือด โดยต้องระวังไม่ให้เลือดและสารละลาย Ficoll-hypauge นั้นผสมกัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยตั้งค่า decelerate ให้เท่ากับศูนย์ และตั้งเป็น break off นำ centrifuge tube ออกมา ดูดเอาส่วนที่เป็นซีรั่มทิ้งไป ใช้ pasture pipette ดูดเอาส่วนวงแหวนของ PBMCs ออกมาใส่ 50 ml tube ใหม่ โดยเลี่ยงการดูด Ficoll-Hypague ที่อยู่ด้านล่างปนขึ้นมาด้วย นำเซลล์ที่ได้ไปปั่นล้างด้วย PBS 3 ครั้งที่ความเร็ว 1,500 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที โดยในการปั่นล้างครั้งที่ 2 ทำการแตกเม็ดเลือดแดงที่ปนมาโดยการ resuspend PMBCs ด้วย 1X PBS ปริมาตร 5 ml จากนั้น เติมน้ำลง 36 ml กลับหลอดใส่เซลล์ 1 ครั้ง แล้วตามด้วย 10X PBS ปริมาตร 4 ml ทันที กลับหลอดไปมาอีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้สารละลาย กลายเป็น 1X PBS จากนั้นนำไปปั่นล้างด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม เมื่อปั่นล้างครบ 3 ครั้ง จะ resuspend เซลล์ที่แยกมาได้ด้วย 1XPBS หรือ RPMI-1640 medium ใช้ในการทดลองต่อไป

2.6.2. การติดสี PBMCs ด้วย Carboxyfluorescein Succimidyl Ester (CFSE)

นำ PBMCs ที่แยกได้โดยวิธี Ficoll-Hypague density gradient มาปั่นล้างด้วย 1xPBS ก่อนปรับความเข้มข้นให้เป็น $1x10^7$ cell/ml ด้วย 1xPBS จากนั้นนำเซลล์ที่เตรียมไว้ 1 ml มาเติมด้วยสาร CFSE ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 μM ผสมเบาๆ โดยใช้ autopipette จากนั้นนำหลอดที่บรรจุเซลล์อยู่มาหุ้มกระดาษฟลอยด์ และนำไป rotate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาการย้อมด้วยการเติม 10%FCS RPMI-1640 ที่เย็น และ แช่เซลล์ที่ย้อมไว้ในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาทีก่อนนำไปปั่นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 10%FCS

RPMI-1640 ที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เป็น $5x10^6$ cell/ml ใน 10%FCS-RPMI และเลี้ยงข้ามคืนใน CO_2 incubator ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.6.3. การศึกษา cell proliferation โดยวิธีการติดตามด้วยสาร CFSE

Coat 96 well culture plate ด้วย CD3 mAb OKT3 100 μl/ml ด้วยความเข้มข้น 60 ng/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้าง plate 2 ครั้งด้วย sterile 1xPBS ก่อนทำการ block plate 1 ชั่วโมง ด้วย 1% BSA-PBS ล้าง plate อีกครั้งด้วย 1XPBS จากนั้นเติมเซลล์ที่ถูกย้อมสีเขียวด้วย CFSE ลงไป $1x10^5$ cell/well ส่วนในกรณีที่มีการศึกษาผลของแอนติบอดีที่เราสนใจต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์หลังถูกกระตุ้นด้วย OKT3 จะมีการเติมแอนติบอดีตัวนั้นๆ ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20 μg/ml หรือ 50 μg/m เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นจะเติมเฉพาะเซลล์ลงใน หลุมที่ไม่ได้ coat OKT3 ไว้ โดยในแต่ละ condition นั้นจะทำด้วยกันทั้งหมด 3 หลุม จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ไว้ใน 5% CO_2 incubator เมื่อครบเวลา 3 วัน 5 วัน หรือ 7 วัน จะทำการเก็บเซลล์ลงใน FACs tube โดยรวมเซลล์จาก 3 หลุมมาใส่ tube เดียวกัน ในแต่ละ condition นำเซลล์ที่ได้ไปวัดค่า Fluorescence intensity โดยเครื่อง Flow cytometer ในช่วงการเรืองแสงเดียวกันกับ FITC หากเซลล์มีการแบ่งตัว ค่าของ fluorescence intensity จะลดลง

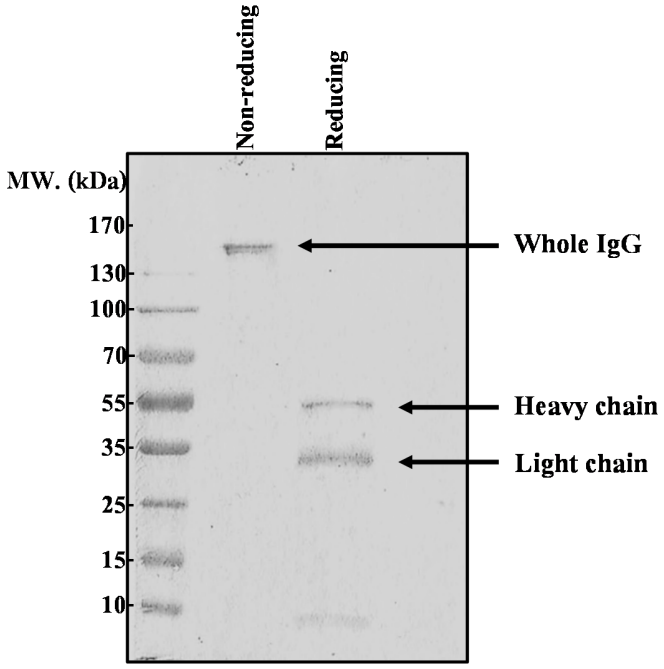
2.7 **การตรวจวิเคราะห์หาการตายของเซลล์แบบ apoptosis**

ปั่นล้างเซลล์ Molt4 2 ครั้งด้วยความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เป็น $2.5x10^6$ cell/ml ใน 10% FCS-RPMI เติมเซลล์ที่ปรับความเข้มข้นแล้วปริมาตร 100 µl ลงในเพลตชนิด 24 หลุม เติมแอนติบอดี CARA หรือ แอนติบอดีควบคุม ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 µg/ml โดยมีหลุมที่เติม H_2O_2 เป็น positive control เติม 10% FCS-RPMI ให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 1 ml ต่อหลุม เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปั่นเก็บเซลล์แต่ละหลุม จากนั้น resuspend เซลล์ด้วย 1x binding buffer (10 mM HEPES NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$) ปริมาตร 100 µl เติม Annexin V-FITC ที่ละลายใน binding buffer ปริมาตร 5 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเติม propidium iodide (PI) ความเข้มข้น10 µg/ml และตรวจวิเคราะห์ ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ให้ได้ปริมาณมาก

ผู้วิจัยได้ทำการผลิตแอนติบอดี CARA ให้ได้ปริมาณมากโดยการเลี้ยง CARA hybridoma cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่ม (serum free medium) จากนั้นปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี CARA ซึ่งมี isotype เป็น IgG3 มาแยกบริสุทธิ์โดยวิธี Protein G sepharose beads affinity chromatography ซึ่งสามารถเตรียมแอนติบอดี CARA ที่บริสุทธิ์ได้น้อย โดยมีปริมาณ ไม่ถึง 300 ug จากปริมาตรของสารตั้งต้นก่อนแยกบริสุทธิ์ 50 มิลลิลิตร จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ในสภาวะ reduce และ non reduce และตรวจหาแถบโปรตีนโดยการย้อมด้วยสี Coommassie Brillant Blue



รูปที่ 1 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA หลังการแยกบริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography โดยการแยกด้วย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reducing และภาวะ non reducing และทำการย้อมสีโปรตีนด้วย Coommassie Brillant blue ลูกศรแสดงตำแหน่งของโมเลกุลแอนติบอดีทั้งหมด (whole IgG) Heavy chain และ Light chain ของ IgG ตามลำดับ

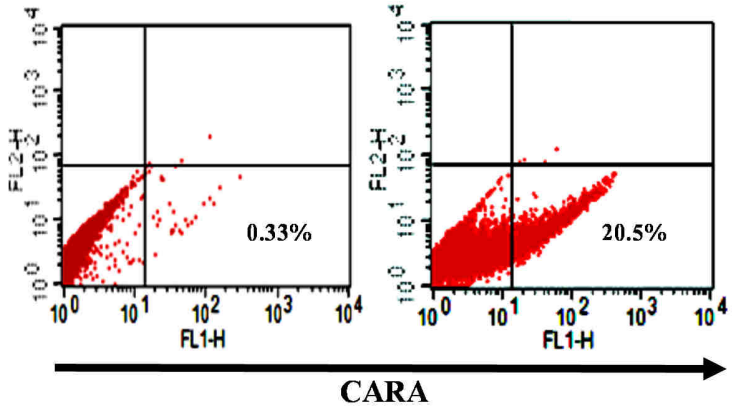
จากผลการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 1 พบว่า ในสภาวะ reducing จะพบแถบโปรตีน 2 แถบที่ขนาดประมาณ 30 kDa และ 55 kDa ซึ่งเป็นสายของ light chain และ heavy chain ของแอนติบอดีตามลำดับ ในสภาวะ non reducing พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่ด้านบนของแผ่นเจลซึ่งเป็นแอนติบอดีทั้งโมเลกุล ผลดังกล่าวแสดงว่า แอนติบอดี CARA ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาหน้าที่และคุณลักษณะของโมเลกุล CARA ต่อไป

3.2 **การแสดงออกของโมเลกุล CARA บนผิวเซล์ล์ Molt4**

จากการศึกษาเบื้องต้นก่อนหน้านี้ทราบว่าโมเลกุล CARA พบว่ามีการแสดงออกของโมเลกุล CARA เฉพาะบนผิวเซลล์ของ Molt4 แบบ heterogeneous pattern ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มี Molt4 เพียงบางเซลล์เท่านั้นที่มีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดนี้ และการศึกษาก่อนหน้านี้ก็พบว่าโมเลกุลชนิดนี้มีการแสดงออกบนผิวของ T lymphocytes บางชนิด ซึ่งพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของ T lymphocytes ได้เป็นสองกลุ่ม โดยมีกลุ่มที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CARA อยู่ประมาณ 20% ของ T lymphocytes โดยมีการแสดงออกบนผิวของ $CD4^+$ T cell มากกว่า $CD8^+$ T cells จึงสามารถสรุปได้ว่า โมเลกุล CARA นั้นมีการแสดงออกบนเซลล์ในกลุ่มของ T lymphocytes ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่ามี T lymphocytes เพียง 20% เท่านั้นที่มีโมเลกุลชนิดนี้อยู่

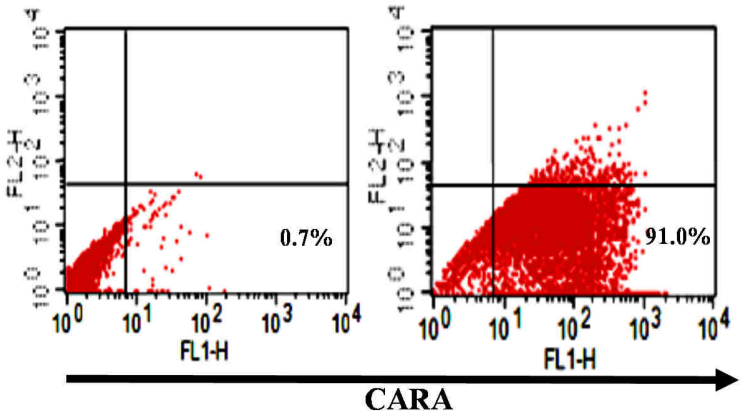
ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยจึงได้ย้อมโมเลกุลบนผิวเซลล์ Molt4 ด้วยแอนติบอดี CARA ที่เตรียมได้ ด้วยวิธี indirect immunoflurescent staining มาตรวจสอบการแสดงออกของโมเลกุล CARA ซึ่งพบว่ามีเพียง 20% ของ T cell line Molt4 เท่านั้นที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CARA ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ใน peripheral bloods

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงต้องการใช้เซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CARA เท่านั้นที่จะนำมาศึกษาต่อ จึงได้คัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CARA โดยวิธี magnetic cell sorting ซึ่งหลังจากการคัดเลือกเซลล์ ผู้วิจัยได้ Molt4 ที่มีการแสดงออกของ CARA คิดเป็น 91% ของประชากรเซลล์ทั้งหมดที่นำมาศึกษาดังแสดงในรูปที่ 3 และเรียกเซลล์กลุ่มนี้ว่า $CARA^+$ Molt4 เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์กลุ่มนี้ต่อพบว่าเซลล์กลุ่มนี้ยังมีการแสดงออกของ CARA ในระดับคงที่ ดังนั้นเซลล์นี้จึงถูกนำไปใช้ในการศึกษา ขนาดและคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป



รูปที่ 2 การแสดงออกของโมเลกุล CARA บนผิวของเซลล์ Molt4

FACS profiles การแสดงออกของโมเลกุล CARA บนผิวของ T cell lines, Molt4 โดยการติดตามด้วย FITC-conjugated sheep $F(ab')_2$ anti-mouse immunoglobulin antibodies และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยแกน X แสดงค่า fluorescent intensity ของเซลล์ที่มีการย้อมติดด้วยแอนติบอดี CARA (ขวา) เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดี CARA (ซ้าย) แกน Y แสดงค่า fluorescent intensity ของสีแดงใช้สำหรับปรับค่า compensation ของการวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตมิเตอร์ (n=3)



รูปที่ 3 การแสดงออกของโมเลกุล CARA บนผิวของ Molt4 หลังการคัดแยกเซลล์ด้วย MAC sort

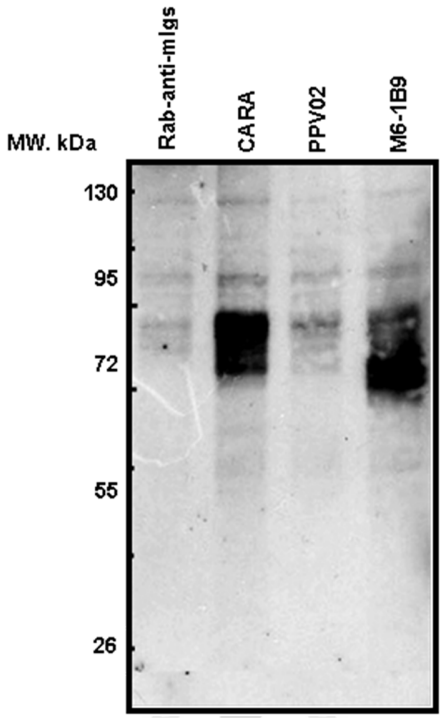
FACS profiles การแสดงออกของโมเลกุล CARA บนผิวของ $CARA^+$ Molt4 หลังคัดเก็บเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CARA ด้วย MAC sort และติดตามด้วย FITC-conjugated sheep $F(ab')_2$ anti-mouse immunoglobulin antibodies และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer แกน X แสดงค่า fluorescent intensity ของเซลล์ที่มีการย้อมติดด้วยแอนติบอดี CARA ส่วนแกน Y แสดงจำนวนเซลล์ (n=3)

3.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุล CARA

จากการศึกษาด้วยวิธี Western blotting กับโปรตีนจาก cell lysates จากเซลล์ $CARA^+$ Molt4 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกโมเลกุลที่จำเพาะกับแอนติบอดี CARA บนผิวเซลล์ พบว่าแอนติบอดี CARA ไม่สามารถจับโปรตีนบนแผ่น membrane ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าแอนติบอดีชนิดนี้อาจจับกับโปรตีนจำเพาะที่บริเวณ conformational epitope จึงไม่สามารถตรวจวัดแถบโปรตีนที่มีอยู่ในรูปของ linear epitope โดยวิธี Western blot ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์หาขนาดของโมเลกุล CARA โดยใช้วิธีการติดฉลากโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วย biotin ก่อนการเตรียม cell lysates และตามด้วยการแยกโปรตีนที่จำเพาะต่อแอนติบอดี CARA ด้วยวิธี immunoprecipitation แยกโปรตีนที่ได้ด้วย SDS-PAGE ในภาวะ reducing ถ่ายโปรตีนลงบนแผ่น PVDF membrane และวิเคราะห์หาแถบโปรตีนด้วย HRP conjugated-streptavidin และ chemiluminescence detection system พบว่าโมเลกุล CARA มีขนาดประมาณ 75 kDa ดังแสดงในรูปที่ 4

3.4 การโคลนยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุล CARA

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้พยายามทำการแยกยีนส์ที่กำหนดการสร้างโมเลกุล CARA โดยวิธี retroviral expression system (Chiampanichayakul, Szekeres et al. 2002) เพื่อดูว่าโมเลกุล CARA นั้นจริงๆ คือโมเลกุลอะไร และมีองค์ประกอบที่เป็นกรดอะมิโนกี่ตัว แต่เนื่องจากผู้วิจัยพบปัญหาคือหลังจากทำการ infect host cell ด้วยไวรัสที่คาดว่าจะมียีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุล CARA อยู่ด้วยนั้นอยู่หลายครั้ง ผู้วิจัยไม่สามารถแยกหรือพบเซลล์ที่มีการแสดงออกของ โมเลกุล CARA ได้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก ประการแรก cDNA library ที่ได้มาไม่มียีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุล CARA เนื่องจากหายไปช่วงที่มีการเตรียม หรือประการที่สอง packaging cells ไม่ผลิตไวรัสหรือ ประการสุดท้ายเซลล์ผลิตไวรัสแต่ไม่มากพอหรือไม่เหมาะสมที่จะ infect host cell ได้ ผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนการทดลอง โดยพยายามแยกโมเลกุล CARA ให้บริสุทธิ์โดยวิธี immunoprecipitation และนำโปรตีนดังกล่าวไปทำการจำแนกชนิดของโปรตีนโดยวิธี LC-MS ซึ่งผลจากการวิเคราะห์จาก LC-MS คาดว่าจะสามารถระบุได้ว่าโมเลกุล CARA เป็นโมเลกุลอะไร และสามารถคาดเดาหน้าที่และบทบาทของโมเลกุลนี้ต่อการทำงานของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดนี้ และน่าจะได้ผลงานเพียงพอที่จะตีพิมพ์ได้



รูปที่ 4 แสดงขนาดของโมเลกุล CARA

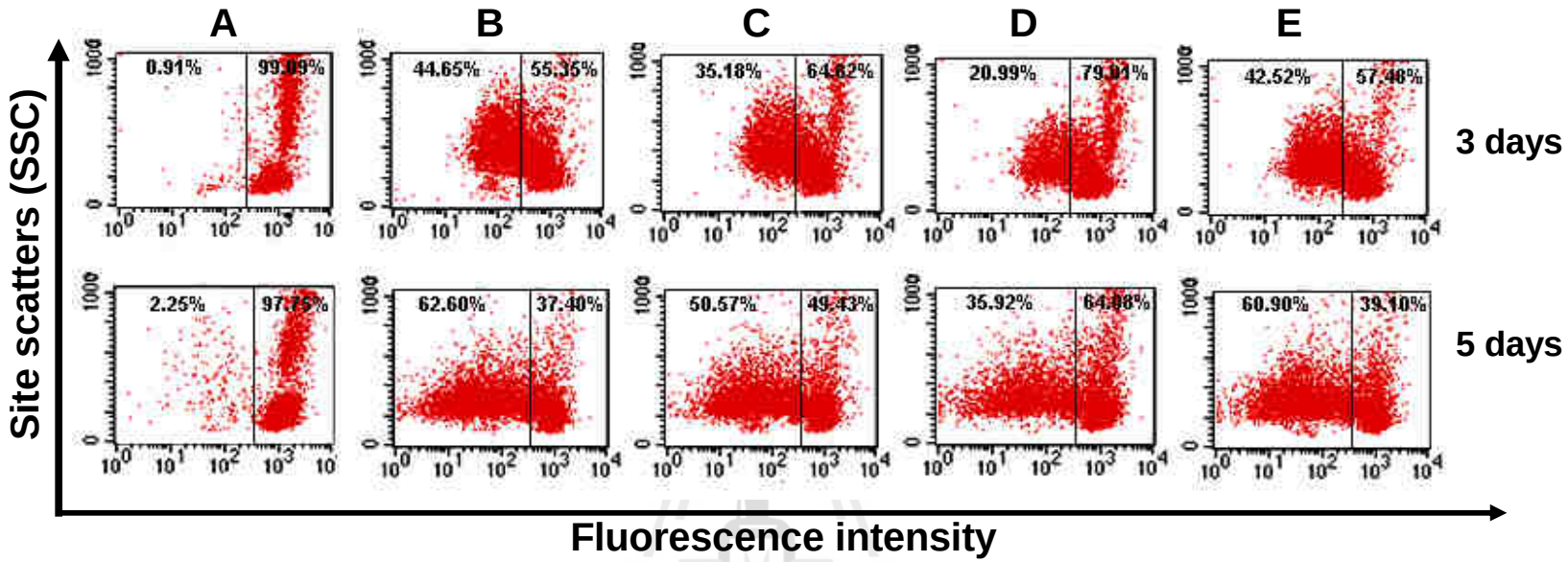
Cell lysates จาก biotinylated Molt4 cells ถูกนำมาทำ immunoprecipitation โดย mAb CARA โดยใช้ mAb PPV02 เป็น isotype control และ Rab-anti-mIgs เป็น negative control ส่วน M6-1B9 เป็น positive control จากนั้น precipitated proteins ถูกนำมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reducing โปรตีนที่แยกได้ถูก transfer ลงบน nitrocellulose membrane และทำการ Western blot โดยใช้ HRP-conjugated Streptavidin ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสี่การทดลองที่ให้ผลเหมือนกัน

3.5 การศึกษาผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ต่อการกระตุ้น T cells ผ่าน CD3-mediated T cell stimulation

การศึกษาผลของแอนติบอดี CARA ที่มีอยู่ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย CD3 mAb (OKT3) ซึ่งเปรียบเสมือนเหตุการณ์จำลองในระบบภูมิคุ้มกัน คือเมื่อ T cell ได้รับแอนติเจนผ่าน CD3 T cell receptor (TCR) complex โดยการนำเสนอของ antigen presenting cells ก็จะเกิดกลไกการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้มีกระบวนการต่างๆ เกิดขึ้น เช่น การหลั่งสาร cytokine และเซลล์ก็มีการแบ่งตัว(Janeway C., Travers J. et al. 2001, Abbas, Lichtman et al. 2011) โดยในการทดลองนี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาว่าถ้า T cells ถูกกระตุ้นด้วย immobilized OKT3 ร่วมกับการใช้แอนติบอดี CARA มาร่วมด้วย จะส่งผลให้กระบวนการแบ่งตัว

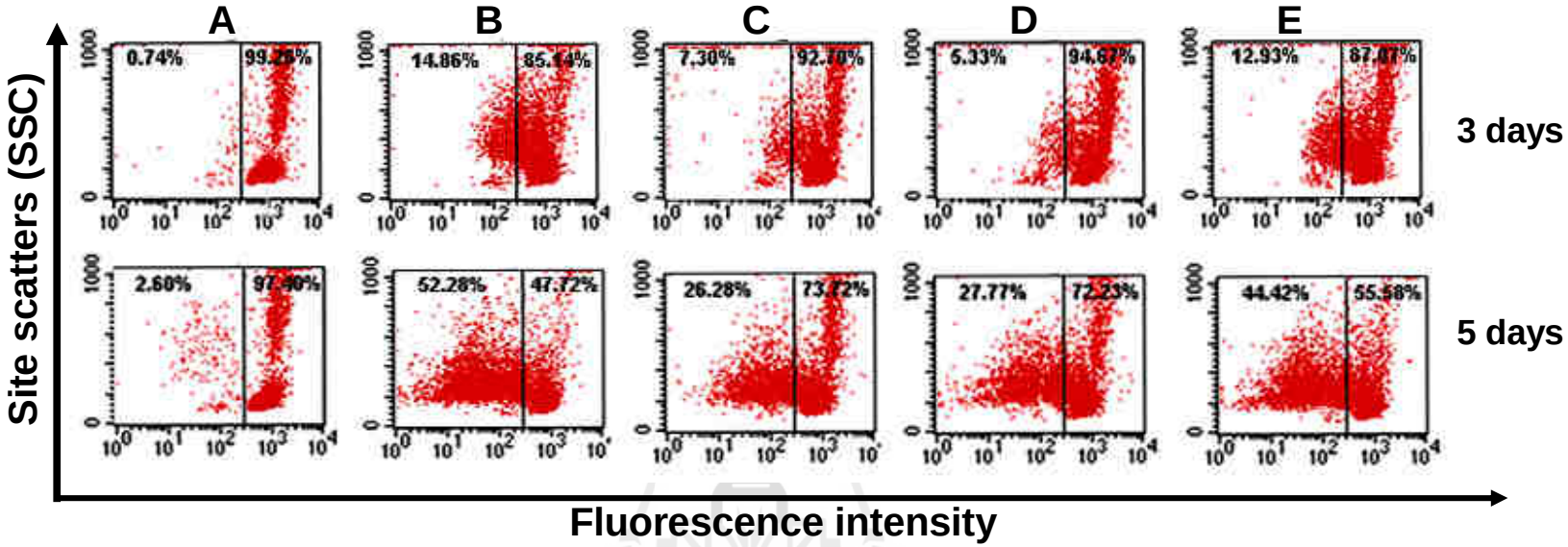
ของเซลล์ เพิ่มขึ้น หรือลดลง (Chiampanichayakul, Szekeres et al. 2002) โดยติดตามการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์โดยวิธี Intracellular Fluorescent dye Carboxyfluorescein Diacetate Succimidyl Ester (CFSE)-labeling โดยมีหลักการคือ สาร CFSE เมื่อถูกทำให้ละลายจะเป็นสารที่ไม่มีสี สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้ แบบ passive diffusion เมื่อเข้าสู่เซลล์แล้วส่วนที่เป็น acetate group จะถูกตัดออกด้วย เอนไซม์ Esterases ที่อยู่ภายในเซลล์ ทำให้มี Carboxyfluorescein Succimidyl Ester อิสระถูกปล่อยออกมาภายในเซลล์ สารอิสระเหล่านี้จะไปจับกับ Amines group ที่อยู่ในเซลล์ เกิดเป็น Fluorescent conjugate และมีคุณสมบัติทำให้เซลล์นั้นๆ มีการเรืองแสง ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดย เครื่องโฟไซโตมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่นของเดียวกับ Fluorescein Isothiocyanate (FITC) หรือ FLH-1 เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้นค่า fluorescent intensity ก็จะลดลงมากเช่นกัน

ผู้ทำการวิจัยได้ทำการย้อมเซลล์ด้วย CFSE ก่อนที่จะนำเซลล์มาทำการกระตุ้นด้วย OKT3 ร่วมกับแอนติบอดี CARA ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 μg/ml หรือ 50 μg/ml ซึ่งพบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย OKT3 ร่วมกับแอนติบอดี CARA จะทำให้กระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ลดลง โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดี CARA เป็น 20 μg/ml พบว่าการแบ่งตัวของเซลล์จะลดลงประมาณ 21% เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย OKT3 อย่างเดียว หรือร่วมกับ isotype control คือ แอนติบอดี E3.1 ดังแสดงในรูปที่ **5** ส่วนแอนติบอดี M6-1B9 เป็นแอนติบอดีต่อ CD147 ที่ทราบว่าสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย OKT3 ได้ถูกนำมาใช้เป็น control สำหรับระบบ (Chiampanichayakul, Peng-in et al. 2006) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CARA เป็น 50 μg/ml การแบ่งตัวของเซลล์จะลดลงไปอีก 50% เทียบกับ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย OKT3 อย่างเดียว หรือร่วมกับ isotype control ดังแสดงในรูปที่ **6** โดยสัดส่วนในการลดลงของการแบ่งตัวไม่ต่างกัน ไม่ว่าจะกระตุ้นเป็นเวลา 3 หรือ 5 วัน จากผลการดลองที่ได้นี้ สามารถสรุปได้ว่า แอนติบอดี CARA มีผลในการลดการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย OKT3 และเป็นแบบ dose dependent ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเลกุล CARA อาจมีบทบาทในการควบคุมกลไกการทำงานของทีลิมโฟไซต์ เนื่องจากเมื่อมีการจับกันระหว่าง โมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA และโมเลกุลที่จับเพาะต่อแอนติบอดีชนิดนี้ จะไปยับยั้งการกระตุ้น T cell ผ่าน T cell receptor ในการศึกษาก่อนหน้านี้ก็มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD147 โคลน M6-1E9 M6-1B9 และ แอนติบอดีต่อ Na/KATPase β_3 subunit โคลน P-3E10 ที่ให้ผลเช่นเดียวกัน แต่กลไกในการควบคุมนั้นแตกต่างกันตามชนิดของโมเลกุลนั้นๆ (Chiampanichayakul, Szekeres et al. 2002, Chiampanichayakul, Peng-in et al. 2006)



รูปที่ 5 FACS profiles แสดงผลการยั้บยั้ง CD3-mediated PBMCs proliferation โดยแอนติบอดี CARA ที่ความเข้มข้น 20 μg/ml

PBMCs ถูก label ด้วย CFSE ก่อนนำมาทำการศึกษา cell proliferation โดยการใช้เครื่อง flow cytometer เป็นตัววัดการลดลงของค่า fluorescence intensity ของเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นให้แบ่งตัวเป็นเวลา 3 วันและ 5 วัน ดังแสดงใน histogram plot นั้น **A** คือ PBMCs ที่ไม่ถูกกระตุ้น และ **B** คือ PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติบอดี OKT3 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml ส่วน **C, D** และ **E** เป็น PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติบอดี OKT3 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml ร่วมกับ แอนติบอดีต่อ CARA, M6-1B9 (positive control for suppression of T cell activation) และ E3.1 (isotype matched control) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 20 μg/ml ผลการทดลองนี้เป็นตัวแทนของสามการทดลองที่ได้ทำแยกกันจาก PBMCs ของอาสาสมัครต่างกัน ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกัน

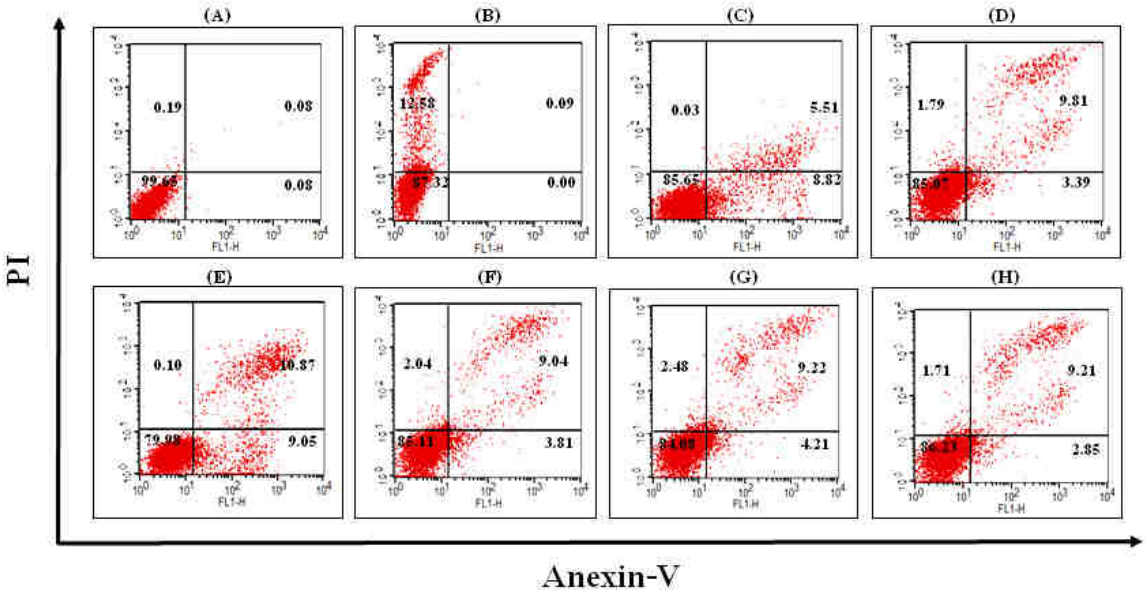


รูปที่ 6 FACS profiles แสดงผลการยั้บยั้ง CD3-mediated PBMCs proliferation ด้วย แอนติบอดี CARA ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml

PBMCs ถูก label ด้วย CFSE ก่อนนำมาทำการศึกษา cell proliferation โดยการใช้เครื่อง flow cytometer เป็นตัววัดการลดลงของค่า fluorescence intensity ของเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นให้แบ่งตัวเป็นเวลา 3 วันและ 5 วัน ดังแสดงใน histogram plot นั้น **A** คือ PBMCs ที่ไม่ถูกกระตุ้น และ **B คือ** PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติบอดี OKT3 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml ส่วน **C, D** และ **E** เป็น PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติบอดี OKT3 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml ร่วมกับ แอนติบอดีต่อ CARA, M6-1B9 (positive control for suppression of T cell activation) และ E3.1 (isotype matched control) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 50 μg/ml ผลการทดลองนี้เป็นตัวแทนของสามการทดลองที่ได้ทำแยกกันจาก PBMCs ของอาสาสมัครต่างกัน ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกัน

3.6 การศึกษาผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis

การกระตุ้นเซลล์ผ่าน T cell receptor (TCR) ส่งผลให้ peripheral T cells เข้าสู่การเปลี่ยนแปลงผ่านระบบ cell cycle และมีการสร้างสาร interleukin 2 (IL-2) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถลดจำนวนของ T cells ผ่านกระบวนการ apoptosis ซึ่งเรียกว่า “activation-induced cell death” (AICD) (Karas, Zaks et al. 1999) จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ ที่แอนติบอดี CARA สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ T cells นั้นเป็นอาจเป็นไปได้หรือไม่ว่าเป็นผลจากการส่งสัญญาณผ่านกระบวนการ AICD ทำให้เซลล์มีการจายแบบ apoptosis ขึ้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจสอบ โดยการใช้เซลล์ Molt4 เป็นต้นแบบในการทดลอง โดยใช้วิธีการย้อมเซลล์ด้วยสาร Anexin V ที่ติดกับ FITC เซลล์ใดที่เกิดการตายแบบ apoptosis ช่วงแรกเริ่มจะมีกระบวนการหัน (flip-flop) เอาสารฟอสโฟลิปิด phosphatidylserine (PS) ออกสู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสามารถจับกับ anexinV ได้ ดังนั้นเมื่อเราย้อมเซลล์ด้วย anexinV ที่ติดกับ FITC จะส่งผลให้เซลล์ที่เริ่มจะเกิด apoptosis ถูกย้อมด้วยสีดังกล่าวและสามารถตรวจสอบได้ด้วยเครื่องโฟไซโตมิเตอร์ในช่วงสีเขียว (FLH-1) ส่วนเซลล์ที่เกิดการตายแบบ necrosis จะติดตามด้วยสาร propidiumiodide (PI) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟไซโตมิเตอร์ในช่วงแสงสีส้ม (FLH-3) เซลล์ใดที่ย้อมติดทั้งสองสีแสดงว่าอยู่ในช่วงของ late apoptosis คือเยื่อหุ้มเซลล์เริ่มถูกทำลายและสาร PI สามารถเข้าสู่เซลล์เพื่อไปย้อมติดดีเอ็นเอของเซลล์ได้ จากผลการทดลองโดยการย้อมเซลล์ Molt4 ด้วยสาร AnexinV-FITC และ PI หลังจากการเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในแอนติบอดี CARA, M6-1B3, และ PrM4.1 ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 20μg/ml เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้มีการเติมแอนติบอดีใดๆ ในขณะที่เซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ด้วย H_2O_2 ซึ่งใช้เป็น positive control ของระบบ มีปริมาณของเซลล์ที่อยู่ในช่วง eraly apoptosis และ late apoptosis เพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งจากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าแอนติบอดี CARA ไม่มีผลเหนี่ยวนำให้ Molt4 cell เกิดการตายแบบ apoptosis



รูปที่ 7 FACS profile แสดงผลของแอนติบอดี CARA ต่อการการตายของเซลล์แบบ apoptosis

Molt4 ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในภาวะที่ไม่มีหรือมีแอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 20 μg/ml หรือ H_2O_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนย้อมด้วยสาร FITC-conjuagted Anexin-V และ PI และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (A) conjugate control, (B) Mol4 ย้อมด้วยสาร PI, (C) Molt4 ย้อมด้วย FITC-Anexin-V, (D) Mol4 ย้อมด้วย PI และ Anexin-V, (E) Molt4 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี H_2O_2 และย้อมด้วย PI และ Anexin-V, (F) Molt4 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี mAb CARA และย้อมด้วย PI และ Anexin-V, (G) Molt4 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี mAb M6-1B9 และย้อมด้วย PI และ Anexin-V, (H) Molt4 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี mAb Prm4.1 และย้อมด้วย PI และ Anexin-V ผลการทดลองนี้เป็นผลการทดลองจากหนึ่งในสามการทดลองที่มีผลไปในทิศทางเดียวกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่4
บทสรุป

จากผลการวิจัยทั้งหมดเกี่ยวกับการศึกษาคุณลักษณะและหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะกับแอนติบอดี CARA ซึ่งผู้วิจัยเรียกว่าโมเลกุล CARA สามารถสรุปได้ดังนี้

1. โมเลกุล CARA มีการแสดงออกบนผิวของ T lymphocytes ในบางเซลล์ และพบว่า บน $CD4^+$ T cell มีการแสดงออกมากกว่าบน $CD8^+$ T cell
2. โมเลกุล CARA มีการแสดงออกบนผิวเซลล์ของ Molt4 บางเซลล์ คิดเป็นประมาณ 20 % ของประชากรเซลล์ทั้งหมดที่นำมาศึกษา
3. จากการแยกกลุ่มเซลล์ Molt4 ที่มีการแสดงออกของ CARA โดยวิธี magnetic cell sorting พบว่าสามารถคัดเลือกได้ เซลล์ที่มี CARA โมเลกุลบนผิวเซลล์คิดเป็น 91% ซึ่งเซลล์นี้ถูกนำไปใช้สำหรับการทำ immunoprecipitation และ การเตรียม cDNA สำหรับการโคลนยีนต่อไป
4. จากการทดลองโดยการทำ immunoprecipitation พบว่าโมเลกุล CARA เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 75 kDa ภายใต้ภาวะ non-reducing
5. โมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA สามารถยับยั้งการกระตุ้นการแบ่งตัวของ T cells ผ่าน CD3-mediated T cell stimulation แบบ dose dependent
6. โมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ไม่มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์ Molt4 เกิดการตายแบบ apoptosis

จากการทดลองนี้ผู้วิจัยยังไม่สามารถระบุได้ว่าโมเลกุล CARA คือโมเลกุลชนิดใดด้วยวิธี cloning เนื่องจากการทำงานเกี่ยวกับเซลล์มีความซับซ้อน และด้วยข้อจำกัดของระยะเวลาในการศึกษาวิจัยภายใน 1 ปีทำให้ไม่สามารถศึกษาโมเลกุล CARA ได้ครบถ้วนและเพียงพอสำหรับการตีพิมพ์ในวารสารที่มีค่าดัชนี แต่ผู้วิจัยได้นำข้อมูลบางส่วน ที่ได้จากการศึกษาโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นเข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมระดับนานาชาติแบบโปสเตอร์ 1 ครั้ง และในรูปแบบบรรยายดังนี้

1. **Khunkaewla P.,** Pata S., Mahasongkram K., Kasinrerk W. Cellular expression and functional analysis of leukocyte surface molecule recognized by newly generated monoclonal antibody COS3A. The 10th Thailand Research Fund Meeting, Holiday Inn Resort Regent Beach Hotel, Chaam, Petchaburee, Thailand. 2010. O-BIO-B08. *Oral presentation.*

2. **Khunkaewla P.,** Chiampanichayakul S., Kasinrerk W. Identification of novel T cell subpopulation using a newly generated monoclonal antibody CARA. 14th International Congress of Immunology, Kobe International Exhibition Hall, Kobe, Japan, August 22nd-27th, 2010. PP-058-37, Poster presentation.

สำเนาบทคัดย่อแสดงในภาคผนวก

บรรณานุกรม

Abbas, K. A. and H. A. Lichtman (2000). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, Elsevier Saunders.

Abbas, K. A., H. A. Lichtman and S. Pillai (2011). Cellular and Molecular Immunology updated : The Immune System. Pennsylvania, Elsevier Saunders.

Barclay, A. N., M. H. Brown, L. S. K. A., A. J. McKnight, M. G. Tomlinson and P. A. van der Merwe (1997). The Leucocytes Antigen: Facts Book, Academic Press.

Chiampanichayakul, S., P. Khunkaewla, S. Pata and W. Kasinrerk (2006). "Na, K ATPase beta3 subunit (CD298): association with alpha subunit and expression on peripheral blood cells." Tissue Antigens 68(6): 509-517.

Chiampanichayakul, S., P. Peng-in, P. Khunkaewla, H. Stockinger and W. Kasinrerk (2006). "CD147 contains different bioactive epitopes involving the regulation of cell adhesion and lymphocyte activation." Immunobiology 211(3): 167-178.

Chiampanichayakul, S., A. Szekeres, P. Khunkaewla, S. Moonsom, V. Leksa, K. Drbal, G. J. Zlabinger, R. Hofer-Warbinek, H. Stockinger and W. Kasinrerk (2002). "Engagement of Na,K-ATPase beta3 subunit by a specific mAb suppresses T and B lymphocyte activation." Int Immunol 14(12): 1407-1414.

HLDA_Workshop. (2013). from http://www.hcdm.org/.

Huston, D. P. (1997). "The biology of the immune system." JAMA 278(22): 1804-1814.

Intasai, N., P. Arooncharus, W. Kasinrerk and C. Tayapiwatana (2003). "Construction of high-density display of CD147 ectodomain on VCSM13 phage via gpVIII: effects of temperature, IPTG, and helper phage infection-period." Protein Expr Purif 32(2): 323-331.

Intasai, N., S. Mai, W. Kasinrerk and C. Tayapiwatana (2006). "Binding of multivalent CD147 phage induces apoptosis of U937 cells." Int Immunol 18(7): 1159-1169.

Janeway C., Travers J., Walport M. and Shlomochil M. (2001). Immunology: The Immune System in Health and Disease. New York, Garland science.

Karas, M., T. Z. Zaks, J. L. Liu and D. LeRoith (1999). "T cell receptor-induced activation and apoptosis in cycling human T cells occur throughout the cell cycle." Mol Biol Cell 10(12): 4441-4450.

Kasinrerk, W., S. Moonsom and K. Chawansuntati (2002). "Production of antibodies by single DNA immunization: comparison of various immunization routes." Hybrid Hybridomics 21(4): 287-293.

Kasinrerk, W. and N. Tokrasinwit (1999). "Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization." Immunol Lett 67(3): 237-242.

Kasinrerk, W., N. Tokrasinwit, S. Moonsom and H. Stockinger (2000). "CD99 monoclonal antibody induce homotypic adhesion of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathway." Immunol Lett 71(1): 33-41.

Kasinrerk, W., N. Tokrasinwit and P. Phunpae (1999). "CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway." Immunology 96(2): 184-192.

Khunkaewla, P., H. B. Schiller, W. Paster, V. Leksa, L. Cermak, L. Andera, V. Horejsi and H. Stockinger (2008). "LFA-1-mediated leukocyte adhesion regulated by interaction of CD43 with LFA-1 and CD147." Mol Immunol 45(6): 1703-1711.

Khunkeawla, P., S. Moonsom, G. Staffler, P. Kongtawelert and W. Kasinrerk (2001). "Engagement of CD147 molecule-induced cell aggregation through the activation of protein kinases and reorganization of the cytoskeleton." Immunobiology 203(4): 659-669.

Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature 256: 495-497.

Kritratanasak, S., S. Chiampanichayakul and W. Kasinrerk (2004). "Production of IgY anti-mouse IgG antibodies from chicken eggs." Asian Pac J Allergy Immunol 22(1): 61-68.

Moonsom, S. and W. Kasinrerk (2000). "Production of anti-CD14 monoclonal antibodies using CD14 expressing COS cells as immunizing antigen." Asian Pac J Allergy Immunol 18(1): 53-61.

Moonsom, S., P. Khunkeawla and W. Kasinrerk (2001). "Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein." Immunol Lett 76(1): 25-30.

Parkin, J. and B. Cohen (2001). "An overview of the immune system." Lancet 357(9270): 1777-1789.

Smith, C. W. (2008). "3. Adhesion molecules and receptors." J Allergy Clin Immunol 121(2 Suppl): S375-379; quiz S414.

Tayapiwatana, C., P. Arooncharus and W. Kasinrerk (2003). "Displaying and epitope mapping of CD147 on VCSM13 phages: influence of Escherichia coli strains." J Immunol Methods 281(1-2): 177-185.

Tayapiwatana, C. and W. Kasinrerk (2002). "Construction and characterization of phage-displayed leukocyte surface molecule CD99." Appl Microbiol Biotechnol 60(3): 336-341.

Thammawong, P., W. Kasinrerk, R. J. Turner and C. Tayapiwatana (2006). "Twin-arginine signal peptide attributes effective display of CD147 to filamentous phage." Appl Microbiol Biotechnol 69(6): 697-703.

Zola, H. and B. Swart (2005). "The human leucocyte differentiation antigens (HLDA) workshops: the evolving role of antibodies in research, diagnosis and therapy." Cell Res 15(9): 691-694.

Zola, H., B. Swart, I. Nicholson, B. Aasted, A. Bensussan, L. Boumsell, C. Buckley, G. Clark, K. Drbal, P. Engel, D. Hart, V. Horejsi, C. Isacke, P. Macardle, F. Malavasi, D. Mason, D. Olive, A. Saalmueller, S. F. Schlossman, R. Schwartz-Albiez, P. Simmons, T. F. Tedder, M. Uguccioni and H. Warren (2005). "CD molecules 2005: human cell differentiation molecules." Blood 106(9): 3123-3126.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ผศ.ดร. พนิดา ขันแก้วหล้า เกิดเมื่อวันที่ 15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2518 จบการศึกษาระดับปริญญาวิทยศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีวเคมี และชีวเคมีเทคโนโลยี ในปี 2540 จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาชีวเคมี ในปี 2543 จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และระดับปริญญาวิทยศาสตรดุษฎีบัณฑิต (Dr. Scient. Med.) สาขาภูมิคุ้มกันวิทยาในปี 2548 จาก Medical University of Vienna ประเทศสาธารณรัฐออสเตรีย โดยมีความสนใจและเชี่ยวชาญเกี่ยวกับการศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีและหน้าที่ทางภูมิคุ้มกันวิทยาของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือด การผลิตแอนติบอดี และการนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ ปัจจุบันดำรงตำแหน่งเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 044-223968 โทรสาร 044-224185 อีเมล์ kpanida@sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อการนำเสนอผลงานทางวิชาการ

Print this Page

Presentation Abstract

Title: PP-058-37 - Identification of novel T cell subpopulation using a newly generated monoclonal antibody CARA

Keywords: T cell subpopulation; monoclonal antibody

Authors: **P. Khunkaewla**[1], S. Chiampanichayakul[2], W. Kasinrerk[2,3];
[1]Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, [2]Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, [3]Biomedical Technology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency at the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

Abstract Body: Leukocytes are known as the cells which play a major role in the immune system. To execute their functions, nature design there surface to express abundant of proteins that the cells can use for cell-cell communication. Some of these molecules have been identified and characterized. Nevertheless, many of them still wait for discovering. Using hybridoma technique, several monoclonal antibodies (mAbs) to leukocytes surface molecules were generated. One among those mAbs named CARA was of interest. Two colors cell surface staining and flow cytometry analysis showed that there was no expression of the CARA recognition molecule on either B cells or natural killer cell (NK). Nonetheless, it showed positive reactivity with some of T cells, which could classify to neither CD4+/CD8+ T cell subpopulation system nor CD25+ regulatory T cells subpopulation. Interestingly, its expression was diminished upon T cell activation. Biochemical characterization using Immunoprecipitation technique found a protein with molecular weight of about 70 kDa was precipitated with mAb CARA. These preliminary results reveal that the generated mAb CARA may recognize a new leukocyte surface molecule and this molecule can be used as marker to identify a novel T cell subpopulation.

The 14th International Congress of Immunology 2010

บทคัดย่อการเสนอผลงานแบบบรรยาย

"นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว." ครั้งที่ 10

Physical Sciences / Biological Sciences / Engineering Sciences

วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553
ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
The Thailand Research Fund

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
Commission on Higher Education

Cellular Expression and Functional Analysis of Leukocyte Surface Molecule Recognized by Newly Generated Monoclonal Antibody COS3A

Khunkaewla, P.[1*], Pata, S.[2], Mahasongkram, K.[2], Kasinrerk, W.[2,3]

[1]*Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand*
[2]*Division of Clinical Immunology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*
[3]*Biomedical Technology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency at the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*

BIO : Biological Sciences

Abstract

To confront with invading pathogens, numerous of leukocytes are found to be recruited to the site of infection. To execute their functions, the cells need to communicate to each other. Therefore their surface is designed to express plentiful of molecules which used for cell-cell communication. Although some of these molecules have been identified, there remain molecules that need to be studied. By using hybridoma technique, several monoclonal antibodies against leukocytes surface molecules have been generated in our laboratory. Among those generated clones, a monoclonal antibody (mAb) named COS3A was of interest. The mAb recognizes a molecule expressed on surface of tested hematopoietic cell lines, B cells, monocytes, natural killer cells (NK), and some of T cells but not red blood cells. Remarkably, high expression of this molecule was induced upon T cell activation. Functional studies of this mAb on T cells proliferation revealed that the mAb can suppress CD3-mediated T cell proliferation while using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as target cells. Interestingly, this phenomenon was diminished while monocytes and NK cells were depleted. No suppression effect had been observed while only T cells were used. These results spot out an important role of the COS3A recognizing molecule on cell-mediate immune responses. Further investigations, molecular cloning, and biochemical identification of this molecule are underway.

Keywords: leukocytes surface molecules, monoclonal antibody, hematopoietic cells, peripheral blood mononuclear cells, T cells proliferation

*Corresponding author.
Tel.: 0-4422-3968; Fax: 0-4422-4185
E-mail: kpanida@sut.ac.th

เอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์

เอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
ขอรับรองว่า

โครงการ การศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดใหม่

โครงการเลขที่ของผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ --

ชื่อหัวหน้าโครงการ อาจารย์ ดร. พนิดา ขันแก้วหล้า

สังกัด สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

โครงการได้มาตรฐานทางวิชาการ ไม่ขัดต่อหลักจริยธรรมสากล และเป็นไปตามคำประกาศเฮลซิงกิ

จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยในขอบข่ายของโครงการที่เสนอได้ ณ วันที่ 3 ต.ค. 2556

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ ทองระอา)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ใบรับรองมีระยะเวลา 1 ปีหลังจากวันที่อนุมัติ

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
สำนักงาน : สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
โทรศัพท์ 0-4422-4757
โทรสาร 0-4422-4750

คำเตือน การขอขยายเวลาการรับรองโครงการวิจัยต้องดำเนินการล่วงหน้าไม่น้อยกว่า 30 วัน ก่อนวันหมดอายุตามที่กำหนดไว้ในใบรับรอง