ศิริวรรณ วันศุกร์ : คุณลักษณะและหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จดจำได้โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (IDENTIFICATION AND FUNCTION OF LEUKOCYTE SURFACE MOLECULE RECOGNIZED BY A NEWLY GERNERATED MONOCLONAL ANTIBODY COS3A) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิดา ขันแก้วหล้า, 158 หน้า

ในการศึกษานี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชื่อ COS3A ถูกคัดเลือกมาหาคุณลักษณะและหน้าที่ของโมเลกุลที่จดจำได้โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ จากการวิเคราะห์โดยการย้อมเซลล์แบบอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์บ่งชี้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A จับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่มีการแสดงออกโดยเซลล์ COS7 ทั้งบนผิวเซลล์และภายในเซลล์ ที่น่าสนใจคือโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ยังจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลที่มีการแสดงออกบนผิวเซลล์เม็ดเลือดของมนุษย์และเซลล์ไลน์ในกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดของมนุษย์ แต่ไม่พบบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง จากการตกตะกอนโปรตีนโดยแอนติบอดีและวิเคราะห์ด้วย Westerm blotting บ่งบอกว่าแอนติเจนนี้มีขนาด 30-70 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาดจะลดเป็น 25 กิโลดาลตันเมื่อมีการนำเอาน้ำตาลที่เป็น N-linked glycan ออกโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ N-glycosidase F หรือการใช้สาร tunicamycin ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ต่อมาด้วยเทคนิค LC/MS และการตกตะกอนโปรตีนโดยแอนติบอดีแสดงให้ทราบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A จับแบบจำเพาะกับโมเลกุล CD63 ของมนุษย์

การศึกษาหน้าที่ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ต่อกระบวนการฟาโกไซโทซิส แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A มีผลทำให้การกิน *Escherichea coli* (*E.coli*) โดยแกลนูโลไซต์ด้วยกระบวนการฟาโกไซโทซิสลดลงอย่างชัดเจน นอกจากนี้ผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ต่อการแบ่งตัวของทีลิมโฟไซต์ได้มีการศึกษาและพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ในรูปสารละลายสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของทีลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นผ่าน CD3 เมื่อใช้ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) เป็นต้นแบบ โดยพบว่าผลของการยับยั้งนี้สอดคล้องกับการลดการสร้างสาร IL-2 การแสดงออกของตัวรับ IL-2 (CD25) และ IFN-γ ที่ผลิตโดยทีลิมโฟไซต์ แต่มีการเพิ่มการสร้าง IL-10 ที่ผลิตโดยโมโนไซต์อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวนี้ไม่เกิดขึ้นเมื่อใช้ทีลิมโฟไซต์เป็นเซลล์ต้นแบบ เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อมีการตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD3 โคลน OKT3 บนไมโครเวลเพลท สามารถกระตุ้นทีลิมโฟไซต์ได้มากขึ้น โดยเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์และการสร้างสาร IL-2, IL-10 และ IFN-γ เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ในการวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำให้มีการแบ่งตัวของเซลล์เกิดผ่านการกระตุ้นวัฏจักรของเซลล์จากระยะ G1 ไปเป็นระยะ S

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A จดจำโมเลกุล CD63 ของมนุษย์ซึ่งอาจจะมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนเริ่มต้นของการกิน *E.coli* โดยกระบวนการฟาโกไซโทซิสและการควบคุมการตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A จึงเหมาะสำหรับใช้ได้ทั้งในการศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีและหน้าที่ของ CD63 และอาจนำไปศึกษากลไกการทำงานของ CD63 ต่อกระบวนการฟาโกไซโทซิสและการกระตุ้นทีลิมโฟไซต์ต่อไป ซึ่งความรู้ใหม่ที่ได้นี้อาจนำไปสู่ความเข้าใจบทบาทของ CD63 ในระบบภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น รวมทั้งการนำไปสู่การใช้รักษาโรคได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

SIRIWAN WANSOOK : IDENTIFICATION AND FUNCTION OF LEUKOCYTE SURFACE MOLECULE RECOGNIZED BY A NEWLY GENERATED MONOCLONAL ANTIBODY COS3A. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PANIDA KHUNKAEWLA, Ph.D. 158 PP.

IDENTIFICATION AND FUNCTION OF LEUKOCYTE SURFACE MOLECULE RECOGNIZED BY A NEWLY GENERATED MONOCLONAL ANTIBODY COS3A

In this study, monoclonal antibody named COS3A was selected for identification and functional analysis of its recognizing molecule. Cellular distribution analysis by immunofluorescence staining indicated that the mAb COS3A bound specifically to a protein expressed by COS7 cell both on surface and intracellularly. Interestingly, the mAb COS3A bound specifically to a molecule expressed on the surface of various human hematopoietic cells and cell lines but not on red blood cells. Immunoprecipitation and Western blotting indicated that the antigen had molecular weight of 30-70 kDa, which was reduced to 25 kDa by elimination of N-linked glycan using either N-glycosidase F or tunicamycin. LC-MS data and immunoprecipitation indicated that the mAb COS3A bound specifically to the human CD63 molecule. Functional study on phagocytosis indicated that the mAb COS3A dramatically diminished granulocyte phagocytosis of *Escherichea coli* (*E.coli*). Furthermore, effect of the mAb COS3A on T cell proliferation was studied and found that the soluble mAb COS3A inhibited CD3-mediated T cell proliferation while peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used as model. The inhibitory effect was

corresponding to down regulation of IL-2, IL-2 receptor (CD25), and IFN-γ by T cells but, enhanced IL-10 production by monocytic cells. However, these effects were not observed when purified T cells were used as model. Fascinatingly, coimmobilization of the mAb COS3A and anti-CD3 mAb OKT3 strongly enhanced T cell proliferation, secretion of IL-2, IL-10, and IFN-γ by T cells. Furthermore, cell cycle analysis indicated that induction of cell proliferation was occurred through the activation of G1/S transition.

Taken together, the mAb COS3A recognized the human CD63 molecule, which may play a crucial role in the initial step of phagocytosis of *E.coli* and in regulation of T cell responses. Thus the mAb COS3A is suitable for both biochemical and functional studies of the CD63, and may be used for further study of the mechanism of the CD63 on phagocytosis and T cell activation. The obtained knowledges may lead to better understand of the CD63 function in regulation of the immune system and in therapeutic approaches.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biochemistry Student's signature _____

Academic Year 2015 Advisor's signature _____