Thesis Title Twin-arginine Signal Peptide Contributes Effective Folding of CD147 Displayed on Filamentous Phage

Author Miss. Phatchaneeya Thammawong

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee

Assist. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk Member

ABSTRACT

Sec signal peptide-encoding genes had been generally incorporated in phagemid used in phage displaying systems. Recently, a new *Escherichia coli* secretory system, twin-argine translocation (Tat), was reported superior above Sec pathway in translocating a recombinant protein across the membrane. A novel phagemid, pTat8, was constructed in this study to improve the quality of the displayed molecule on filamentous phage. Tat pathway was chosen for transporting and integrating CD147 molecules on phage particles *via* gpVIII. The parental vector, pComb8-CD147Ex, was modified by substituting the Sec signal sequence (PelB) with a twin-arginine signal sequence from trimethylamine N-oxide reductase (TorA). The characteristics of the CD147 displayed on phage particles were evaluated compared

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

with those displayed *via* Sec pathway by sandwich ELISA and Western immunoblotting. The Tat dependent leader was found to be superior over the Sec leader for phage display of CD147. This modified phagemid will be useful in phage display technique when the correctly folded structure is required, i.e., antibody libraries and ligand-receptor tracing. Our findings further supported the involvement of *E. coli* Tat translocase in mediating the integration of hydrophobic transmembrane protein into the inner membrane.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ทวินอาร์จินีนซิกแนลเปปไทด์มีส่วนช่วยให้มีการพับทบอย่างมีประสิทธิภาพของซีดี 147 บนตัวฟิลาเมนตัสฟาจ
ผู้เขียน	นางสาวพัชนียา ธรรมวงศ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา ประธานกรรมการ รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ยีนที่กำหนดการสร้าง signal peptide ของโปรตีนที่ถูกส่งผ่านเข้าสู่ periplsmโดย Sec pathway มักถูกแทรกอยู่ใน phagemid เพื่อนำไปใช้ในการแสดง recombinant protein บนตัวฟาจโดยเทคนิค phage display ไม่นานมานี้มีการค้นพบกลไกการส่งโปรตีนผ่านเมมเบรนของ *E. coli* ระบบใหม่คือ twin-arginine translocation (Tat) pathway ที่มีคุณสมบัติเหนือกว่า Sec pathway ในการส่งผ่าน recombinant protein ในการศึกษาครั้งนี้ฟาจมิดรูปแบบใหม่ชื่อ pTat8-CD147 ได้ถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของโมเลกุลที่แสดงออกบนตัวฟาจ โดยงานวิจัยนี้ Twin arginine translocation pathway ถูกนำมาใช้ในการส่งผ่านโมเลกุลซีดี 147 เพื่อให้แสดงออกบน gpVIII ของตัวฟาจโดยการแทนที่ PelB ซึ่งเป็น Sec signal sequence ที่มีอยู่ในฟาจมิดต้นแบบชื่อ pComb8-CD147Ex ด้วย Twin-arginine signal sequence ของ trimethylamine N-oxide reductase (TorA) โมเลกุลของซีดี 147 ที่เชื่อมกับ gpVIII ที่แสดงออกบนผิวของฟาจโดยการส่งผ่านทาง Tat pathway ได้ถูกประเมินและเปรียบเทียบกับโมเลกุลที่ส่งผ่านทาง Sec pathway โดยวิธี Sandwich ELISA และ western immunoblotting พบว่า Tat pathway เป็นระบบที่เหมาะสมกว่า Sec pathway ในการแสดงออกของซีดี 147 โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้เทคนิค phage display ดังนั้น phagemid รูปแบบใหม่จะเป็นประโยชน์ในการแสดงออกของโมเลกุลที่ต้องการความถูกต้องของโครงสร้างในการทำหน้าที่เช่น antibody libraries หรือการสร้างโมเลกุลเพื่อใช้ในการค้นหา receptor หรือ ligand นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้สนับสนุนข้อมูลที่แสดงความเกี่ยวข้องของ Tat pathway ในการส่งผ่าน hydrophobic transmembrane protein เข้าสู่ชั้น inner membrane.