

<b>Thesis Title</b>	Construction of Adenovirus Expression Systems for Comparison of Single Chain Fv Productions in Cytoplasmic Compartment and Endoplasmic Reticulum and as a Secreting Molecule
<b>Author</b>	Mr. Prakitnavin Pingmuang
<b>Degree</b>	Master of Science (Medical Technology)
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana    Chairperson Dr. Nutjeera Intasai    Member

## ABSTRACT

The molecular engineering has contributed immensely to modify the antibody structure to decrease the size for using inside the cells, called intracellular antibody or intrabody. The single chain Fv fragments (scFv) represent the recombinant minimal antigen-binding fragments of antibody. ScFv, most commonly used format for intrabody, function by specific interfering or neutralizing the function of a target protein in the specific cellular compartment. Thus, the gene delivery systems to destine the expression of scFv in the cellular compartment have been identified as critical for the study.

Adenoviruses are attractive tool for many gene delivery applications. Certain advantages including, the ability to infect a wide variety of cell types, infection of dividing and non-dividing cells and high efficiency of gene transfer, could be critical to the successful use in molecular genetic experiments. Here, three different forms of scFv-M61B9 gene encoding the scFv reacted specifically to the CD147 were designed for production in cytoplasmic compartment, ER compartment and secretory system, subsequently cloned into adenoviral plasmid and expressed in the HeLa cell compartments using the AdEasy system. The recombinant adenoviral plasmids pAdE-scFv-M61B9cyt and pAdE-scFv-M61B9sec were successfully constructed and identified by polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis. After transfecting into 293A cells for 7 days, the recombinant adenoviruses were obtained and transduced into HeLa cells. The scFv-M61B9 produced in HeLa cells was significantly secreted by using the secretory system. In addition, it can be retained in the ER compartment through the use of the ER retention signal (KDEL). The correct folding of these scFv was indicated by using indirect ELISA and western immunoblotting. The result show that the functional scFv-M61B9 can specifically bind to the CD147-BCCP fusion protein.

In conclusion, the adenovirus expression systems for production of a scFv in various mammalian cell compartment were established. This approach provides the promising method to further apply for the production of scFv in mammalian cells and the further studies of gene therapy in near future.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การสร้างระบบแสดงออกโดยอะดีโนไวรัสเพื่อเปรียบเทียบการ

สร้างซิงเกิลเซนเอฟวีภายในไซโตพลาสซึม ภายในเอนโด

พลาสมิกเรติคูลัม และ โมเลกุลที่หลั่งออกสู่นอกเซลล์

ผู้เขียน

นายประกฤษเนวิน ปิงเมือง

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภีวัฒนา

ประธานกรรมการ

ดร. ณัฐจิรา อินตะใส

กรรมการ

บทคัดย่อ

วิศวกรรมชีวโมเลกุลได้มีบทบาทในการปรับแต่งโครงสร้างของแอนติบอดีเพื่อลดขนาดของโมเลกุลให้เหมาะสมต่อการสร้างภายในเซลล์ แอนติบอดีขนาดเล็กที่ถูกสร้างภายในเซลล์ดังกล่าวนั้นถูกเรียกว่าอินทราเซลล์ลาร์ แอนติบอดี หรือ อินทราบอดี โดยรูปแบบของแอนติบอดีที่นิยมนำมาใช้เป็นอินทราบอดีอย่างแพร่หลายนั้นได้แก่ ซิงเกิลเซนวาริเอเบิล แฟรกเม้นหรือ ซิงเกิลเซนเอฟวีซึ่งมีความสามารถในการรบกวนหรือยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่เป็นเป้าหมายใน ส่วนต่างๆ ของเซลล์ได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นระบบที่ใช้ในการขนส่งยีนที่จะสร้างซิงเกิลเซนเอฟวีใน ส่วนต่างๆ ของเซลล์ได้อย่างถูกต้องเหมาะสมจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษา

อะดีโนไวรัสเป็นหนึ่งในระบบการขนส่งยีนเข้าสู่แมมาเลียนเซลล์ที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้อย่างกว้างขวางเนื่องจากข้อดีอันเกี่ยวข้องกับความสามารถในการขนส่งเข้าสู่เซลล์ หลากหลายชนิด โดยไม่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับระยะเวลาแบ่งตัวของเซลล์และประสิทธิภาพในการขนส่งยีน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบยีนที่ควบคุมการสร้างซิงเกิลเซนเอฟวีที่จำเพาะต่อโมเลกุลของ CD147 ให้สร้างใน ภายในไซโตพลาสซึม ภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และสร้างใน secretory system เพื่อให้หลั่งออกสู่นอกเซลล์โดยยีนดังกล่าวจะถูกตัดต่อเข้าสู่อะดีโนไวรัสพลาสมิดและแสดงออกใน HeLa cell โดยอาศัย AdEasy system อะดีโนไวรัสพลาสมิด

pAdE-scFv-M61B9cyt และ pAdE-scFv-M61B9sec ได้ถูกสร้างขึ้นและพิสูจน์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นพลาสมิดนี้จะถูกนำไปสร้างเป็น recombinant adenoviruses ในเซลล์ 293A เป็นเวลา 7 วัน ไวรัสดังกล่าวสามารถสร้าง scFv-M61B9 ในระบบ secretory system ให้หลั่งออกมาสู่เซลล์ได้ และยังสามารถเก็บกัก scFv-M61B9 ให้อยู่ใน ER compartment ด้วยการใส่ ER retention signal นอกจากนี้เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA และ western immunoblotting ยังแสดงให้เห็นว่า scFv-M61B9 ที่สร้างได้นั้นมีการพับที่ถูกต้อง และสามารถทำงานโดยจับกับโปรตีนซึ่งเป็นเป้าหมายอันได้แก่ CD147-BCCP ได้อย่างจำเพาะอีกด้วย

การศึกษารุ่นนี้ได้สร้างระบบการแสดงออกของยีนสำหรับผลิตซิงเกิลเชนเอพพิในส่วนต่างๆ ของเซลล์แมมมาเลีย ซึ่งความรู้ดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตซิงเกิลเชนเอพพิเพื่อต่อไปและเป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านยีนบำบัดในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved