



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย
วิธี DNA immunization

วัชระ กลิณฤกษ์

ธันวาคม 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย
วิธี DNA immunization

วัชระ กสิณฤกษ์

ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA40-8-0016

ชื่อโครงการ: การศึกษาปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

ชื่อนักวิจัย: รศ. ดร. วาเชระ กลิ่นฤกษ์

E-mail address: watchara@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 ธันวาคม 2540-1 ธันวาคม 2543

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี โดยวิธี DNA immunization จากการศึกษาวิจัยตามระยะเวลาโครงการ ได้ผลการศึกษาโดยมีรายละเอียดและผลการทดลองดังนี้

การศึกษานี้เริ่มต้นด้วยการศึกษาวิธีการแยก plasmid DNA ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในวิธี DNA immunization และพบว่าวิธีการแยก plasmid DNA โดยวิธี Qiagen plasmid mega kit กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีจำเพาะได้ดีกว่าวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิด membrane protein และ secreted protein ในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ผู้วิจัยพบว่า plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง protein ชนิด membrane และ secreted protein กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีจำเพาะได้ไม่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาถึงการนำวิธี DNA immunization มาผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีนชนิดต่างๆ ผู้วิจัยได้นำ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง leukocyte surface proteins ชนิดต่างๆ รวมทั้ง plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง HBs antigen ฉีดหนูทางกล้ามเนื้อ พบว่าหนูสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อ encoded protein ได้เกือบทุกชนิด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี DNA immunization สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีจำเป็นต้องฉีด plasmid DNA 3-5 ครั้ง โดยพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี DNA immunization นี้เป็นชนิด IgG ไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM เลย เนื่องจากวิธี DNA immunization จำเป็นต้อง insert DNA เข้าไปใน eukaryotic expression vector ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาถึง eukaryotic expression vector ที่สามารถใช้ในงาน DNA immunization ได้จากการศึกษานี้พบว่า eukaryotic expression vectors หลายชนิดสามารถนำมาใช้ได้ เพื่อศึกษาถึงสารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ผู้วิจัยได้นำสาร DEAE Dextran, chloroquine และ PHA มาศึกษา และพบว่าการฉีด plasmid DNA ร่วมกับ DEAE Dextran, chloroquine และ PHA ไม่ได้ช่วยให้การสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ DEAE Dextran และ chloroquine กลับกดการสร้างแอนติบอดี

เนื่องจากการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยการฉีด plasmid DNA ทางกล้ามเนื้อนั้นต้องมีการฉีด plasmid DNA 3-5 ครั้งจึงกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ ผู้วิจัยจึงได้นำวิธี intrasplenic immunization (คือฉีด plasmid DNA เข้าไปในม้ามโดยตรง) มาใช้ และผลการทดลองพบว่าวิธี

intrasplenic immunization สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ด้วยการฉีด plasmid DNA เพียงครั้งเดียว

นอกจากในหนู ผู้วิจัยยังพบว่าวิธี DNA immunization สามารถนำมาผลิตแอนติบอดีได้ในกระต่าย ผู้วิจัยได้ทำการฉีด cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD4 protein เข้าไปในกระต่าย 3 ตัวทางกล้ามเนื้อ และพบว่ากระต่ายทุกตัวสามารถสร้าง polyclonal antibodies ที่จำเพาะต่อ CD4 protein ในระดับที่สูง เมื่อนำ anti-CD4 antibodies ที่ผลิตได้มาศึกษาหน้าที่ของ CD4 protein พบว่าแอนติบอดีนี้สามารถยับยั้ง PHA induced cell proliferation ได้

จากนั้นผู้วิจัยได้นำวิธี DNA immunization มาประยุกต์ใช้ในการผลิต monoclonal antibody โดยนำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD54 และ insert อยู่ใน pCDM8 vector ฉีดหนูทาง intrasplenic จากนั้นนำ spleen cells ของหนูมา fuse กับ myeloma cells และผลิต monoclonal antibody โดย hybridoma technique ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิต anti-CD54 monoclonal antibody ได้ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าวิธี DNA immunization สามารถนำมาผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีได้ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการนำวิธีนี้ไปผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจโดยที่ไม่จำเป็นต้องมี protein antigen

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังศึกษาถึงการผลิต monoclonal antibody โดยใช้ COS cell expression system มาใช้ในการเตรียม immunizing antigen ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยนำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD14 และ CD99 ที่ insert ใน eukaryotic expression vector ไป transfect เข้าไปใน COS cells จากนั้นนำ transfected COS cells ฉีดหนู นำ spleen cells ของหนูมา fuse กับ myeloma cells และผลิต monoclonal antibody ตามวิธี hybridoma technique ผลการทดลองพบว่า โดยวิธีนี้ผู้วิจัยสามารถผลิต anti-CD14 monoclonal antibodies ได้ทั้งหมด 5 clones และ anti-CD99 monoclonal antibodies ได้ทั้งหมด 3 clones แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ศึกษา cellular distribution, คุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโปรตีนจำเพาะได้

ผลงานที่ได้จากการศึกษาตามโครงการวิจัยนี้ ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติแล้ว จำนวน 4 เรื่อง

คำหลัก : DNA immunization, eukaryotic expression vector, polyclonal antibody, monoclonal antibodies, leukocyte surface molecule

Abstract

Project Code: RSA40-8-0016

Project Title: Study of factors affecting the enhancement of antibody production by DNA immunization

Investigator: Associate Professor Dr. Watchara Kasinrerak

E-mail Address: watchara@chiangmai.ac.th

Project Period: 1 December 1997- 1 December 2000

The objectives of this study are to study factors that involved in antibody production by using DNA immunization strategy. The outputs of this study are summarized as follows:

In our study, the plasmid DNA isolation methods were firstly evaluated. We found that plasmid DNA isolated by Qiagen plasmid mega kit induced antibody responses better than those isolated by cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation method. For induction of antibody responses, plasmid DNA encoding membrane protein and secreted protein were compared. Both type of plasmid DNA could induced antibody response in the same level. In order to study the use of DNA immunization for production of polyclonal antibody to various proteins, mice were intramuscular immunized with DNA encoding various leukocyte surface molecules and HBs antigen. We found that by this strategy, specific antibodies could be induced in mice sera. These results indicate that DNA immunization can be used to produce polyclonal antibodies against several type of proteins. However, to induce antibody responses, 3-5 plasmid DNA inoculations were required and the antibodies induced by DNA immunization were IgG isotype. As eukaryotic expression vector is always needed in DNA immunization technique, we therefore evaluated several eukaryotic expression vectors for induction of antibody production. It was found that several eukaryotic expression vectors can be used for this purpose. In order to enhance antibody production, several reagents including DEAE Dextran, chloroquine and phytohemagglutinin (PHA) were mix with plasmid DNA before mouse immunization. All reagents used, however, have no enhancing effect on antibody production. In contrast, DEAE Dextran and chloroquine suppressed antibody production.

As we found that 3-5 plasmid DNA intramuscular immunizations were needed for induction of antibody response, intrasplenic immunization was then studies for using as inoculation route. In contrast to intramuscular immunization, only a single DNA intrasplenic injection resulted in the production of serum antibodies.

In addition to the production of antibody in mice, we also found that DNA immunization could be used to produce antibody in rabbits. cDNA encoding CD4 protein were immunized into 3 rabbits and high titer of anti-CD4 antibodies were generated in all immunized rabbits. The generated CD4 antibodies could be used for functional characterization of CD4 protein, i.e., it strongly suppressed PHA induced cell proliferation.

The DNA immunization was then applied for monoclonal antibody production. In our studies, CD54-DNA in pCDM8 vector were intrasplenic immunized into Balb/c mouse. The spleen cells of the immunized mouse were fused with myeloma cells using conventional hybridoma technique. A hybridoma producing anti-CD54 monoclonal antibody was generated. This study indicates that DNA immunization technique can be applied for the production of monoclonal antibody. This finding is very useful for production of antibodies to molecules where the protein antigen is not available or difficult to prepare, but cDNA encoding the corresponding protein is available.

Furthermore, we study the production of monoclonal antibody by using COS cell expression system to produce immunizing antigen. In this study, cDNA encoding CD14 and CD99 inserted in eukaryotic expression vector were transfected into COS cells. The transfected COS cells were then immunized into mice and the spleen cells were fused with myeloma cells using conventional hybridoma technique. By this technique, 5 clones of anti-CD14 monoclonal antibodies and 3 clones of anti-CD99 monoclonal antibodies were produced. The generated antibodies could be used for cellular distribution analysis, biochemical characterization and functional study of the corresponding proteins.

Taken together, from this research project, 4 papers were published.

Keywords: DNA immunization, eukaryotic expression vector, polyclonal antibody, monoclonal antibody, leukocyte surface molecule

บทนำ

ในช่วง 5-6 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยหลายกลุ่มได้ศึกษาถึงการนำเอา DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนของเชื้อโรคชนิดต่างๆฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลองเพื่อให้สัตว์ทดลองเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ encoded protein ขึ้น โดยหวังว่าจะสามารถนำเอาวิธี DNA immunization นี้ไปพัฒนาเป็นวิธีการให้วัคซีนป้องกันโรคแทนวิธีการให้วัคซีนที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จากการศึกษาดังกล่าวนักวิจัยเหล่านั้นพบว่า การฉีด plasmid DNA ที่มียีนที่กำหนดการสร้าง antigenic protein และ insert อยู่ใน expression vector ที่เหมาะสม สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral immunity และ cellular immunity ต่อ encoded protein ขึ้นได้¹⁻⁴

กลไกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยวิธี DNA immunization นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อกันว่าจะเกิดจากการที่ยีนที่เชื่อมต่อกับ plasmid vector นั้นเกิดการแสดงออกโดยสร้าง encoded protein ออกมาในร่างกายของผู้รับ plasmid DNA นั้น และถ้า encoded protein นั้นๆ มีคุณสมบัติเป็น antigenic protein ก็จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและทำให้ร่างกายเกิดภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อโปรตีนนั้นๆได้^{1,4-6} จากหลักการดังกล่าวนี้ นักวิจัยหลายกลุ่มสามารถนำเอาวิธี DNA immunization มาประยุกต์ใช้เพื่อการป้องกันรักษาโรคและประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้งานได้^{7,8} อย่างไรก็ตามก็ยังมีนักวิจัยอีกจำนวนไม่น้อยที่ไม่ประสบผลสำเร็จจากการนำเอาวิธีนี้มาใช้ จากประสบการณ์ของผู้วิจัยเองและจากการแลกเปลี่ยนความรู้และผลงานวิจัยกับนักวิจัยทั้งในและต่างประเทศพบว่าวิธีนี้สามารถใช้ได้ผลดีมากกับบาง DNA ขณะที่ใช้ไม่ได้ผลกับบาง DNA นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนบางชนิดโดยตัวของมันเองไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ แต่เมื่อเชื่อมกับ DNA อื่น กลับสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ เช่น cDNA ที่กำหนดการสร้าง hepatitis C virus nucleocapsid ซึ่งโดยตัวของมันเองไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด anti-HCV antibody ได้ แต่เมื่อนำ cDNA ดังกล่าวมาเชื่อมต่อกับ cDNA ที่กำหนดการสร้าง hepatitis B surface antigen แล้วพบว่า chimeric vector สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ hepatitis C virus nucleocapsid ได้⁹ หรือการ co-immunization ระหว่าง DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจกับ DNA ที่กำหนดการสร้าง cytokine บางชนิด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนที่สนใจได้ดียิ่งขึ้น^{10,11}

เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาดังกล่าวเหล่านี้เข้าด้วยกัน ทำให้เชื่อว่าน่าจะมีปัจจัยต่างๆ หลายอย่างที่ทำให้วิธี DNA immunization ประสบผลสำเร็จหรือล้มเหลว เช่น อาจขึ้นกับ plasmid vector ที่ใช้ขึ้นกับ nucleotide sequences ของยีนที่สนใจ ขึ้นกับคุณสมบัติหรือลักษณะของ encoded proteins เช่นการเป็น membrane protien หรือการเป็น secreted protein หรือขึ้นกับโครงสร้างของ encoded protein ตลอดถึงขึ้นกับ route และ dose ของ DNA ที่ให้ นอกจากนี้ยังอาจขึ้นกับวิธีการหรือสารที่จะมาเพิ่มประสิทธิภาพในการนำ (uptake) DNA เข้าสู่เซลล์ของผู้รับ และสารยับยั้งการทำลาย DNA ภายหลังการเข้าเซลล์

ปัจจุบันในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยมี cDNA ที่กำหนดการสร้าง human leukocyte surface antigens หลายชนิด ได้แก่ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD1a, CD4, CD8, CD14, CD45, CD54, CD99, และ CD147 โปรตีน โดย cDNA เหล่านี้ insert อยู่ใน eukaryotic expression vector ชนิด pTH3M หรือ pCDM8 และยังมี cDNA ที่กำหนดการสร้าง hepatitis B surface antigen (small หรือ S protein) ที่ insert อยู่ใน pRc/CMV vector นอกจากนี้ยังมี cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 ที่ได้ตัดส่วน transmembrane ออกและต่อเข้ากับ DNA ที่กำหนดการสร้าง constant domain ของ human IgG1 ทำให้ได้เป็น fusion DNA ที่สร้าง secreted CD147 protein (โดยที่ native form ของ CD147 protein เป็น membrane protein) เมื่อพิจารณาถึง cDNA ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยเหล่านี้ จะเห็นว่าประกอบด้วย cDNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่มีลักษณะต่างๆ ทั้งที่เป็น membrane proteins และเป็น secreted proteins บางชนิดกำหนดการสร้างโปรตีนที่จัดเป็น immunoglobulin superfamily บางชนิดกำหนดการสร้างโปรตีนที่เป็น adhesion protein นอกจากนี้ยังมี cDNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดเดียวกันทั้งที่เป็น membrane และ secreted form จากความหลากหลายของ DNA ที่มีอยู่ ทำให้น่าจะมีประโยชน์อย่างมากในการที่จะนำเอามาศึกษาถึง conditions และ factors ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องหรือมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของวิธี DNA immunization ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงหลักการของวิธี DNA immunization ผู้วิจัยเชื่อว่าวิธี DNA immunization นี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อโปรตีนที่สนใจได้ โดยเฉพาะในกรณีที่โปรตีนที่สนใจนั้นเตรียมยาก หรือไม่มี

ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ จึงมีความคิดที่จะศึกษาถึง conditions และ factors ต่างๆ ที่เหมาะสมเพื่อนำเอาวิธี DNA immunization มาใช้ในการผลิตแอนติบอดี และการนำวิธี DNA immunization ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจ โดยจะทำการศึกษาในข้อหัวต่างๆ ดังนี้คือ

1) ศึกษาถึงคุณสมบัติหรือลักษณะของ encoded protein ที่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีสำหรับวิธี DNA immunization

2) ศึกษาถึง plasmid vector ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในงาน DNA immunization โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง eukaryotic expression vector ชนิดต่างๆ

3) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

4) ศึกษาเปรียบเทียบ routes และ doses ของการให้ plasmid DNA

5) ศึกษาถึงการนำเอาวิธี DNA immunization มาประยุกต์เพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี

ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้รู้และเข้าใจถึงกลไกการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ได้ดียิ่งขึ้น ความรู้พื้นฐานที่ได้จากการศึกษานี้น่าจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการที่จะนำเอาวิธีนี้มาใช้ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดต่างๆ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียม plasmid DNA

1.1 การเตรียม competent bacteria

1. Streak เชื้อ *E. coli* strain ที่เหมาะสม ลงบน LB agar plate เลี้ยงที่ 37°C ข้ามคืน
2. เลือก single colony จาก plate ในข้อ 1 แล้ว inoculate ลงใน LB broth 5 ml (ซึ่งอยู่ในหลอดทดลองขนาด 50 ml) นำไป incubate ใน shaking incubator ที่ 37°C โดย shake ไปด้วยที่ 250 rpm จนความขุ่นของแบคทีเรีย มีค่า OD. ที่ 600 nm เท่ากับ 0.3
3. Inoculate เชื้อที่ได้ในข้อ 2 จำนวน 2 ml ลงใน pre-warmed LB broth 50 ml ซึ่งอยู่ใน flask ขนาด 500 ml นำไปเลี้ยงที่ 37°C shake 275 rpm จนความขุ่นของแบคทีเรีย มีค่า OD. ที่ 600 nm เท่ากับ 0.2 จากนั้นนำ flask ที่เลี้ยงแบคทีเรียไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง
4. ถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml แช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 3000 rpm 15 นาที ที่ 4°C แล้วเทส่วนใส (supernatant) ออกจนหมด
5. กระจายเซลล์ที่ได้ใน Tfb I solution 20 ml แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นอีกที่ 3000 rpm 15 นาที ที่ 4°C แล้วเทส่วนใส (supernatant) ออกจนหมด
6. กระจายเซลล์ที่ได้ใน Tfb II solution 2 ml แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นแบ่งแบคทีเรียใส่ใน pre-chilled vial ละ 500 µl เก็บที่ -70°C

1.2 การ transform plasmid DNA เข้าไปใน competent bacteria

1. นำ stock competent bacteria จาก -70°C มาละลายในน้ำแข็ง
2. คูด 100 µl competent bacteria ใส่ลงใน pre-chilled tube
3. เติม plasmid vector ที่มี DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจลงไปเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน
4. แช่ในอ่างน้ำแข็ง 40 นาที
5. นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 42°C นาน 45 วินาที
6. แช่ในอ่างน้ำแข็งอีก 2 นาที
7. เติม SOC medium 1 ml แล้วนำไปเลี้ยงใน shaking incubator (37°C shake 250 rpm) นาน 1 ชั่วโมง
8. คูด 100 µl ของ transformed bacteria แล้ว spread บน LB agar plate ที่มี antibiotic อยู่ นำ plate ไป incubate ที่ 37°C ข้ามคืน

1.3 การเตรียม plasmid DNA จาก transformed bacteria

1. Inoculate transformed *E. coli* ที่มี DNA ที่ต้องการ ลงใน 5 ml ของ TB-antibiotic broth แล้วนำไปเลี้ยงใน shaker ที่ 37°C ประมาณ 3-5 ชั่วโมง
2. ถ่ายแบคทีเรียที่ได้ไปใน TB-antibiotic broth หรือ LB antibiotic broth 250 ml ซึ่งอยู่ใน flask ขนาด 500 ml จำนวน 4 flasks นำไปเลี้ยงใน shaker ที่ 37°C ประมาณ 15-18 ชั่วโมง
3. ถ่ายแบคทีเรียที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml แล้วนำไปปั่นที่ 3200 rpm 30 นาที เท supernatantทิ้งให้หมด
4. แยก bacteria โดยใช้ lysozyme solution, 0.2 M NaOH-1%SDS และ potassium acetate solution
5. นำไปปั่นเก็บ supernatant แล้วนำไปเทผ่านผ้า gauze หลายๆ ชั้น
6. นำ supernatant ไปแยก plasmid DNA โดยใช้วิธี 2 วิธีคือ วิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี commercial Qiagen plasmid mega kit
7. นำ DNA pellet ไปทำให้แห้ง โดยการอบที่ 37°C นาน 30 นาที
8. ละลายตะกอนที่ได้ด้วย PBS แล้วนำไปวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ plasmid DNA โดยการวัด OD ที่ 260 และ 280 nm

2. การพิสูจน์ plasmid DNA ที่เตรียมได้

2.1 การตัดด้วย restriction enzyme และการศึกษาขนาดของ DNA fragment ด้วย agarose gel electrophoresis

1. นำ plasmid DNA ที่แยกได้ มาตัดด้วย restriction enzyme ใน buffer ที่เหมาะสม ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
2. จากนั้นนำ plasmid DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme แล้วนี้ ไปทำ agarose gel electrophoresis นำแผ่น agarose ไปย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide solution ดัง Ethidium bromide ออกจาก gel โดยแช่น้ำ 15 นาที
3. นำแผ่น agarose ไปส่องดู DNA ด้วย UV transilluminator แล้วถ่ายภาพเก็บไว้

2.2 การศึกษาการ express protein ที่ ถูกกำหนดการสร้างโดย plasmid DNA ที่แยกได้โดย COS cell expression system

2.2.1. การทำ COS cell transfection โดยวิธี DEAE-Dextran transfection

1. เพาะเลี้ยง COS cells ความเข้มข้น 1×10^6 cells/4 ml (ใน 10%FCS-MEM) ใน tissue culture dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 cm ที่ 37°C ใน 5%CO₂ incubator ข้ามคืน
2. เตรียม transfection solution ดังนี้
 - MEM medium 2 ml
 - DEAE-Dextran solution (stock conc. 10 mg/ml) 50 μl
 - Chloroquine solution (stock conc. 10 mM) 80 μl
 - Plasmid DNA (100 $\mu\text{g/ml}$) 10 μlผสมให้เข้ากันอย่างดี
3. ดูด medium ออกจาก COS cells dish ในข้อ 1 แล้วเติม transfection solution (ในข้อ 2) ลงไป แล้วนำไป incubate ที่ 37°C ใน 5%CO₂ incubator 3 ชั่วโมง
4. ครบเวลา ดูด transfection solution ที่เติม 2 ml ของ 10%DMSO ใน PBS ลงไป ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วดูด 10%DMSO solution ที่ทิ้ง dish 1 ครั้งด้วย MEM medium แล้วเลี้ยง COS cells ใน 10%FCS-MEM นาน 72 ชั่วโมง

2.2.2. การทดสอบการสร้างโปรตีนบนผิวเซลล์โดยวิธี indirect immunofluorescent

1. นำ transfected COS cells ความเข้มข้น 1×10^7 cells/ml มา 50 μl ผสมกับ monoclonal antibody ที่จำเพาะกับแอนติเจนที่สนใจ (ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$) incubate ที่ 4°C 30 นาที
2. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 1%BSA-PBS 0.02% azide แล้วเติม rabbit anti-mouse immunoglobulin-FITC incubate ที่ 4°C อีก 30 นาที
3. ล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย 1%BSA-PBS 0.02% azide แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้อง fluorescent หรือตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

3. การฉีด plasmid DNA เข้าไปในหนู Balb/C และกระต่าย

1. ฉีด plasmid DNA 100 μg เข้าบริเวณกล้ามเนื้อขาหลังของหนูทั้ง 2 ข้างโดยฉีดทุกๆ 2 สัปดาห์ สำหรับกระต่าย ฉีด plasmid DNA 500 μg ต่อ dose เข้าทางกล้ามเนื้อขาหลัง ทุก 2 สัปดาห์
2. เจาะเก็บเลือดทุกครั้งก่อนฉีด แยกซีรัม เก็บที่ -20°C

4. ศึกษาถึงคุณสมบัติหรือลักษณะของ encoded protein ที่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีสำหรับวิธี DNA immunization

1. นี๊ด plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ insert อยู่ใน eukaryotic expression vector pCDM8 ตามวิธีในข้อ 3
2. เจาะเลือดจากสัตว์ทดลองก่อนฉีดทุกครั้ง
3. ตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัมของสัตว์ทดลองโดยวิธี indirect immunofluorescent หรือโดยวิธี ELISA เปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีของ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง encoded protein ที่มีคุณสมบัติหรือลักษณะต่างๆ

5. การศึกษาสารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

1. นำ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนต่างๆ ผสมกับสาร DEAE Dextran, chloroquine หรือ phytohemagglutinin (PHA) จากนั้นนำไปฉีดหนูตามวิธีข้อ 3
2. ศึกษาเปรียบเทียบการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเมื่อมีและไม่มีสาร DEAE Dextran, chloroquine หรือ phytohemagglutinin (PHA) โดยวิธี immunofluorescence

6. การผลิต monoclonal antibody โดยใช้ transfected COS cells เป็น immunizing antigen

1. นำ plasmid DNA 2 μ g transfect เข้าไปใน COS cells โดยวิธี DEAE-Dextran transfection
2. หลังจากนั้น 3 วันตรวจสอบการสร้าง encoded protein บนผิว COS cells โดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยกล้อง fluorescent microscope
3. นำ transfected COS cells ฉีดหนูทาง intraperitoneal ทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง และฉีด intravenous
4. จากนั้น 3 วัน นำ spleen cells มา fuse กับ myeloma cells ตามวิธี hybridoma มาตรฐาน ตรวจสอบ hybridoma ที่สร้างแอนติบอดีที่สนใจโดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยเครื่อง flow cytometer
5. นำ hybridoma ที่สร้างแอนติบอดีที่สนใจมาทำ limiting dilution 2 รอบ แล้วนำไปผลิตแอนติบอดีทั้งในรูป culture supernatant และ ascites

7. การศึกษา cellular distribution, biochemical characterization และหน้าที่ของ CD4, CD14 และ CD99 molecule

1. นำแอนติบอดีต่อ CD4, CD14 และ CD99 มาศึกษา cellular distribution บนเซลล์ชนิดต่างๆ โดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

2. ศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลของโปรตีนจำเพาะ โดยวิธี immunoprecipitation ร่วมกับ chemiluminescence detection system
3. ศึกษาหน้าที่ของ CD4 protein โดยดูการยับยั้ง PHA induced cell proliferation ศึกษาหน้าที่ของ CD14 โดยดูการยับยั้ง LPS binding ศึกษาหน้าที่ของ CD99 โดยศึกษาการกระตุ้น Jurkat cell aggregation และศึกษา signal transduction ผ่าน CD99 molecule โดยใช้ protein tyrosine kinase และ protein kinase C inhibitors คุรยละเอียดใน reprints ที่แนบมาด้วยในภาคผนวก

ผลการทดลองและวิจารณ์

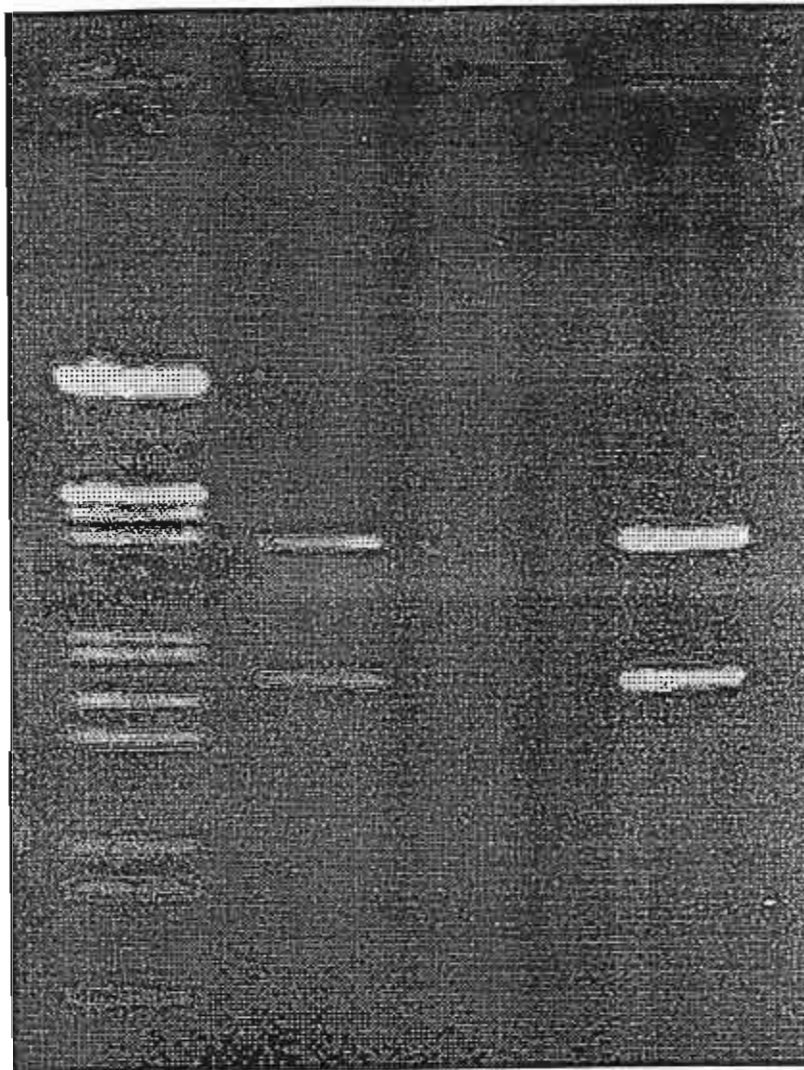
1. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีเตรียม plasmid DNA เพื่อใช้ในวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษาวิธีที่ดีที่สุดเพื่อใช้ในการเตรียม plasmid DNA เพื่อใช้ในวิธี DNA immunization จึงทำการแยก plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 membrane protein โดยวิธี 2 วิธี คือ วิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี commercial Qiagen plasmid mega kit ที่ใช้หลักการ anion exchange chromatography แล้วนำ plasmid DNA ที่เตรียมได้มาศึกษาการกระตุ้นการสร้าง anti-CD147 antibodies ในหนู

ผลการทดลองพบว่าทั้งวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี commercial Qiagen plasmid mega kit สามารถใช้เตรียม CD147-DNA ได้ดี คือเมื่อนำ plasmid DNA ที่เตรียมได้มาทำ restriction enzyme fragment analysis พบว่า plasmid DNA ที่เตรียมได้โดยวิธีทั้งสองให้ผลเหมือนกันคือเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ XbaI จะทำให้ plasmid DNA แยกออกเป็นส่วนของ vector และส่วนของ insert (รูปที่ 1) และโดยวิธี COS cell expression system พบว่า plasmid DNA ที่เตรียมได้จากวิธีทั้ง 2 สามารถ express เป็น CD147 protein ใน eukaryotic COS cells ในหลอดทดลองได้ (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า plasmid CD147-DNA ที่เตรียมได้จากทั้ง 2 วิธีสามารถสร้าง encoded protein ใน eukaryotic cells ได้

แต่เมื่อนำ plasmid CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธีทั้งสองไปฉีดหนูกทาง intramuscular immunization พบว่า plasmid CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Qiagen kit ให้ผลในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่า กล่าวคือ จากการฉีดหนูทั้งหมด 5 ตัวด้วย CD147-DNA ที่เตรียมได้โดย Qiagen plasmid mega kit พบว่าหนูทุกตัวสร้าง anti-CD147 antibody (คิดเป็น 100%) ขณะที่หนูที่ฉีดด้วย CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation นั้นมีหนู 3 ใน 5 ที่สร้างแอนติบอดี คิดเป็น 60% ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า plasmid DNA ที่เตรียมได้โดยใช้ Qiagen kit นี้มีความเหมาะสมกับงาน DNA immunization มากกว่าการเตรียม plasmid DNA โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation ซึ่งในการทดลองต่อไป ผู้วิจัยได้ใช้ Qiagen mega kit มาใช้ในการเตรียม plasmid DNA

STD
marker **1** **2**



รูปที่ 1 แสดงผลการตัด plasmid CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี Qiagen plasmid Mega kit ด้วย XbaI enzyme

เลนที่ 1 เป็น CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation

เลนที่ 2 เป็น CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Qiagen plasmid Mega kit

ตารางที่ 1 แสดงผลการย้อม COS cells ที่ transfect ด้วย CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี Qiagen plasmid Mega kit ด้วย anti-CD147 monoclonal antibody และ myeloma negative control antibody

Plasmid DNA isolation method	Monoclonal antibody	
	CD147 mAb	Myeloma control
Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation	+	-
Qiagen plasmid mega kit	+	-

นำ COS cells มา transfect ด้วย CD147-DNA ที่เตรียมได้โดยวิธี Cesium chloride-ethidium bromide gradient ultracentrifugation และวิธี Qiagen plasmid Mega kit โดยวิธี DEAE-Dextran transfection แล้วนำ transfected COS cells มาย้อมด้วย anti-CD147 monoclonal antibody และ myeloma negative control antibody โดยวิธี indirect immunofluorescent ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย Fluorescent microscope

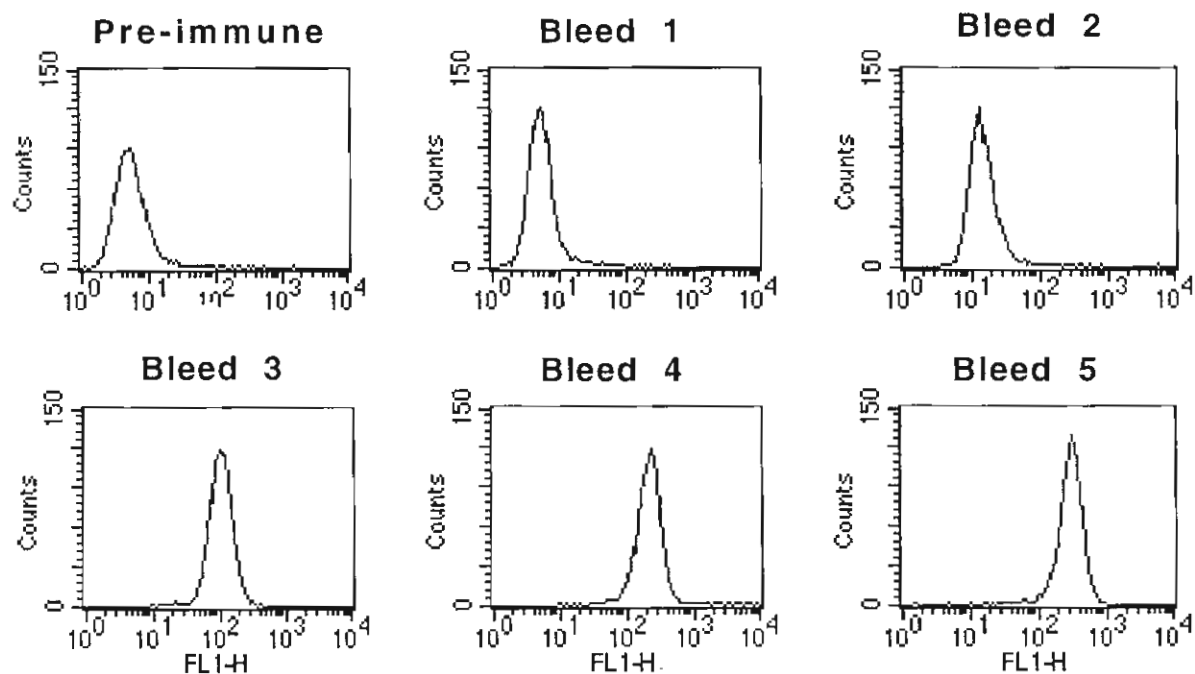
2. การเปรียบเทียบ encoded protein ชนิด membrane protein และ secreted protein ในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ encoded protein ที่เป็น membrane protein และ secreted protein โดยวิธี DNA immunization ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 เป็น model โดยความร่วมมือของ Prof. Dr. Hannes Stockinger จาก Institute of Immunology, University of Vienna ประเทศออสเตรีย ซึ่งนำ CD147-DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 protein ชนิด membrane form (clone H34 ซึ่งผู้วิจัยเป็นผู้โคลน) มาตัดส่วนที่กำหนดการสร้าง transmembrane region ออก แล้วต่อเชื่อมกับ constant Fc region ของ human IgG แล้ว insert กลับเข้าไปใน eukaryotic expression vector ทำให้ได้ plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 ชนิด secreted form จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการเตรียม plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 membrane form และ secreted form ให้ได้ปริมาณมากโดยวิธี Qiagen kit ซึ่ง plasmid DNA ทั้ง 2 ชนิดที่เตรียมได้เมื่อนำมาศึกษาก่อนนำไปฉีดหนู พบว่ามีส่วนของ CD147 DNA insert อยู่ และ plasmid DNA ทั้ง 2 ชนิด สามารถ express เป็น CD147 protein ใน COS cells ในหลอดทดลองได้

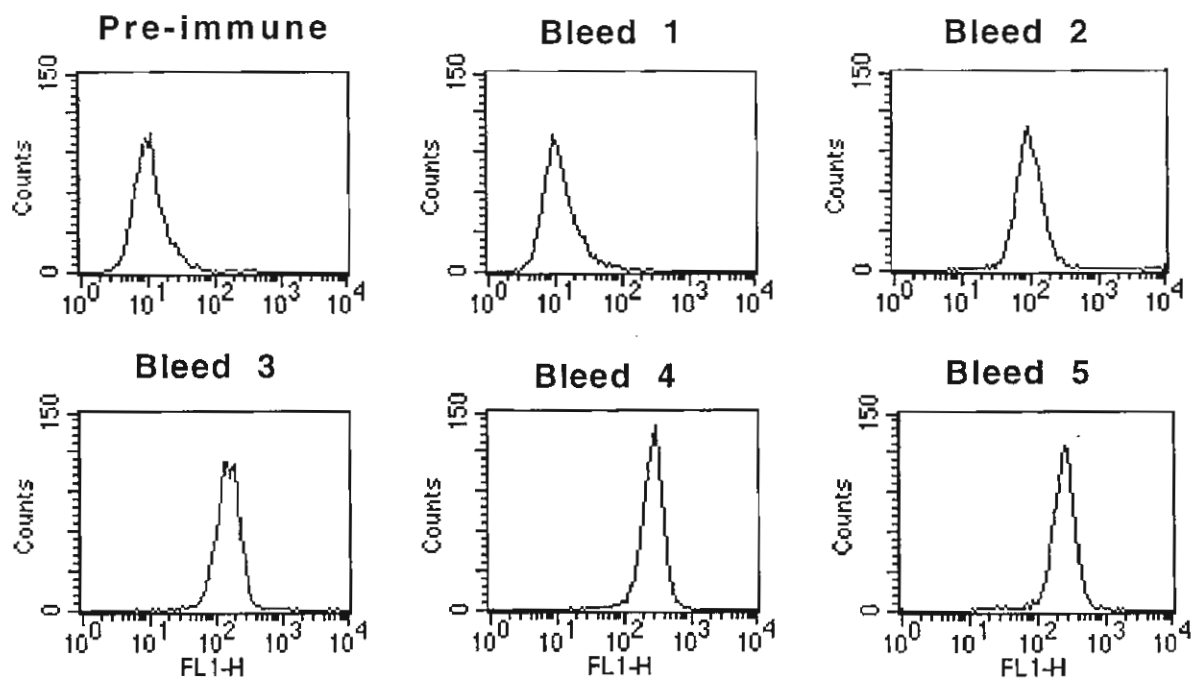
เพื่อศึกษาการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนู จึงนำ CD147-DNA (membrane form) และ CD147-DNA (secreted form) ฉีดเข้าไปในหนูอย่างละ 5 ตัว จำนวน 5 ครั้ง ทาง intramuscular immunization เก็บเลือดตรวจหาระดับ anti-CD147 antibody โดยวิธี indirect immunofluorescent โดยใช้ CD147 expressing cell line U937 เป็นแอนติเจนและตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer ผลการทดลองพบว่า CD147-DNA ทั้ง 2 forms สามารถกระตุ้นการสร้าง anti-CD147 antibody ได้ (ดูรูปที่ 2) โดยสามารถตรวจพบแอนติบอดีหลังการฉีด DNA ตั้งแต่ 1-4 ครั้ง (ดูตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี (โดยเปรียบเทียบค่า mean fluorescence intensity ที่ได้จากเครื่อง flow cytometer) พบว่า CD147-DNA ทั้ง 2 forms กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ได้ไม่แตกต่างกัน

ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าวิธี DNA immunization สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีพอๆ กัน ไม่ว่า encoded protein จะเป็น secreted protein หรือ membrane bound protein

CD147 membrane form



CD147 secreted form



รูปที่ 2 แสดง FACS profile ของ anti-CD147 antibody หลังการฉีดด้วย CD147-DNA membrane form และ CD147-DNA secreted form รูปที่แสดงเป็นผลการทดลองของหนู 1 ตัวจากทั้งหมด 5 ตัว

ตารางที่ 2 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย CD147-DNA membrane form และ CD147-DNA secreted form ในหนู 5 ตัว

Dose	CD147-DNA membrane form***					CD147-DNA secreted form***				
	Mouse number					Mouse number				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Pre-immune*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dose 1**	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dose 2	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Dose 3	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
Dose 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dose 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Pre immune = ซ้ำก่อนฉีด CD147-DNA

** Dose 1-5 = ซ้ำหลังฉีด CD147-DNA ครั้งที่ 1-5 ตามลำดับ

*** CD147-DNA membrane form, CD147-DNA secreted form = cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 โปรตีน แบบ membrane bound form และ แบบ secreted form ตามลำดับ

3. การศึกษาการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ encoded protein ชนิดต่างๆ โดยวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษาการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ต่อ encoded protein ที่มีคุณสมบัติและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน จึงทำการศึกษาโดยเตรียม plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง human leukocyte surface protein ชนิดต่างๆ ได้แก่ CD1a, CD4, CD14, CD45, CD54 และ CD147 โปรตีน ด้วย Qiagen plasmid kit เมื่อนำ plasmid DNA ที่เตรียมได้มาทำ restriction enzyme fragment analysis พบว่า plasmid DNA ที่เตรียมได้ทั้งหมดประกอบด้วยส่วนของ vector และ insert และโดยวิธี COS cell expression system พบว่า plasmid DNA ทุกชนิด สามารถ express เป็น encoded protein ใน COS cells ในหลอดทดลองได้

เมื่อนำ plasmid DNA ที่เตรียมได้ฉีดหนูทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 5 ครั้ง ทาง intramuscular immunization นำซีรัมของหนูตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะโดยวิธี indirect immunofluorescent พบว่า หนูที่ฉีดด้วย CD4-DNA, CD14-DNA, CD45-DNA, CD54-DNA และ CD147-DNA มีแอนติบอดีจำเพาะเกิดขึ้นภายหลังการฉีด 1-4 ครั้ง ขณะที่หนูที่ฉีดด้วย CD1a-DNA ไม่มีแอนติบอดีจำเพาะเกิดขึ้น (ดูตารางที่ 3) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิธี DNA immunization เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติบอดีต่อ membrane protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันกันได้ ยกเว้น CD1a การที่ไม่สามารถผลิต CD1a antibody ได้ ผู้วิจัยคิดว่าน่าจะเป็นไปได้ที่ CD1a protein ของคนและของหนูอาจมีส่วนที่คล้ายคลึงกัน ทำให้ human CD1a protein ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์กล้ามเนื้อของหนูภายหลังฉีด CD1a-DNA กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูได้ไม่ดี

นอกจากสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ leukocyte membrane protein ได้แล้ว ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงการนำเอาวิธี DNA immunization มากระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ virus protein โดยทำการฉีด plasmid DNA ที่กำหนดการสร้าง hepatitis B surface (HBs) antigen เข้าไปในหนู 2 ตัวทาง intramuscular immunization และพบว่าหนูทั้ง 2 สามารถสร้าง anti-HBs antibody ได้ในซีรัมในระดับสูง (ตารางที่ 4)

ผลการศึกษาชี้แสดงว่าวิธี DNA immunization เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนหลากหลายชนิดได้ และเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ผลิต polyclonal antibody โดยไม่ต้องฉีดโปรตีนแอนติเจน

ตารางที่ 3 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ โดยวิธี DNA immunization

DNA	Dose of immunization**					
	Pre-immune	1	2	3	4	5
CD4-DNA						
#1*	-	-	-	+	+	+
#2	-	-	+	+	+	+
#3	-	-	+/-	+	+	+
#4	-	-	+	+	+	+
CD14-DNA						
#1	-	-	+	+	+	+
#2	-	-	-	-	-	+
CD45-DNA						
#1	-	-	+/-	+	+	+
#2	-	-	+	+	+	+
CD54-DNA						
#1	-	+	+	+	+	+
#2	-	+	+	+	+	+
#3	-	-	+/-	+	+	+
#4	-	-	+	+	+	+
CD147-DNA						
#1	-	+/-	+	+	+	+
#2	-	-	-	+	+	+
#3	-	-	-	-	+	+
#4	-	-	-	-	+	+
#5	-	-	+	+	+	+
CD1a-DNA						
#1	-	-	-	-	-	-
#2	-	-	-	-	-	-
#3	-	-	-	-	-	-

* # แสดงจำนวนหนูที่ใช้ศึกษา

** Pre immune = รับประทาน plasmid DNA

**Dose 1-5 = รับประทาน plasmid DNA ครั้งที่ 1-5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงการกระตุ้นการสร้าง anti-HBs antibody โดยวิธี DNA immunization

Dose	Anti-HBs antibody (mIU/ml)*	
	Mouse no. 1	Mouse no. 2
Pre immune**	0	0
Dose 1***	0	0
Dose 2	100	0
Dose 3	608	0
Dose 4	1562	238
Dose 5	3312	370

* ตรวจวัดระดับ anti-HBs antibody ด้วยเครื่อง Imx analyzer (Abbott)

**Pre immune = ซ้ำก่อนฉีด plasmid DNA

***Dose 1-5 = ซ้ำหลังฉีด plasmid DNA ครั้งที่ 1-5 ตามลำดับ

4. การศึกษาการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดด้วย plasmid DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 1 ครั้ง (single immunization) และจำนวน 5 ครั้ง (multiple immunization)

จากการศึกษาที่ผ่านมาผู้วิจัยพบว่าการฉีด plasmid DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 3-5 ครั้งสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ ผู้วิจัยจึงศึกษาถึงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยการฉีด plasmid DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 1 ครั้ง

ผู้วิจัยทำการฉีด CD54-DNA และ CD147-DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 5 ครั้ง (multiple immunization) เปรียบเทียบกับการฉีด 1 ครั้ง (single immunization) ผลการทดลองพบว่าการฉีด plasmid DNA 1 ครั้งไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้เลย (ตารางที่ 5 และ 6) ซึ่งแสดงให้เห็นการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization จำเป็นต้องมีการกระตุ้นซ้ำเช่นเดียวกับการฉีดโปรตีนแอนติเจน

5. การศึกษา isotype ของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษา isotype ของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี DNA immunization ผู้วิจัยได้นำเอาซีรัมที่ให้ผลบวกกับแอนติเจนชนิดต่างๆ โดยวิธี DNA immunization มาหา isotype ของแอนติบอดีจำเพาะเหล่านั้นโดยวิธี indirect immunofluorescent โดยใช้ anti-mouse IgG-FITC และ anti-mouse IgM-FITC เป็น conjugate ผลการศึกษาพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยการฉีดด้วย plasmid DNA ทุกชนิดเป็นชนิด IgG โดยไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM เลย ดังแสดงในรูปที่ 3 เป็นตัวอย่างของการตรวจหาระดับ anti-CD4 antibody ชนิด IgG และ IgM ในซีรัมของหนูที่ฉีดด้วย CD4-DNA

ตารางที่ 5 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดด้วย CD54-DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 5 ครั้ง และจำนวน 1 ครั้ง

ฉีด plasmid DNA จำนวน 5 ครั้ง

Days	Anti-CD54 antibodies		
	M1*	M2	M3
0	-	-	-
14	-	-	-
28	+	-	+
42	+	-	+
56	+	+	+
70	+	+	+
100	+	+	+
130	+	+	+
160	+	+	+

*M1-M3 = หนูที่ฉีดด้วย CD54-DNA แบบ multiple immunization

ฉีด plasmid DNA จำนวน 1 ครั้ง

Days	Anti-CD54 antibodies	
	S1*	S2
0	-	-
14	-	-
28	-	-
42	-	-
56	-	-
70	+/-	-
100	-	-
130	-	-
160	-	-

*S1-S3 = หนูที่ฉีดด้วย plasmid DNA แบบ single immunization

ตารางที่ 6 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดด้วย CD147-DNA ทาง intramuscular immunization จำนวน 5 ครั้ง และจำนวน 1 ครั้ง

ฉีด plasmid DNA จำนวน 5 ครั้ง

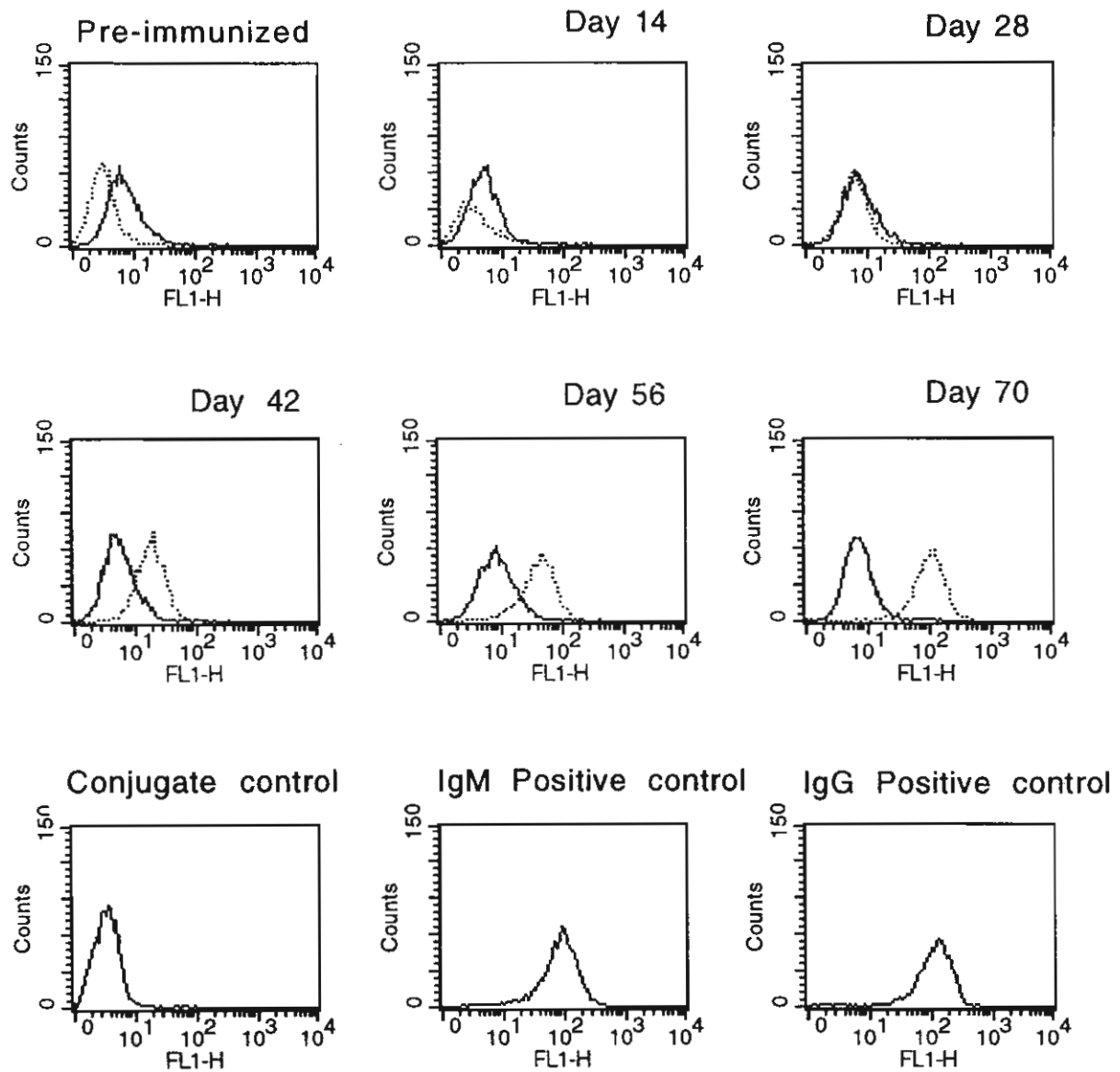
Days	Anti-CD147 antibodies					
	M1*	M2	M3	M4	M5	M6
0	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
28	+	-	-	+/-	+	+
42	+	-	+/-	+	+	+
56	+	+	+	+	+	+
70	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+
130	+	+	+	+	ND	+
160	+	+	+	+	ND	+

*M1-M6=หนูที่ฉีดด้วย CD147-DNA แบบ multiple immunization

ฉีด plasmid DNA จำนวน 1 ครั้ง

Days	Anti-CD147 antibodies		
	S1*	S2	S3
0	-	-	-
14	-	-	-
28	-	-	-
42	-	-	-
56	-	-	-
70	-	-	-
100	-	-	-
130	-	-	-
160	-	-	-

*S1-S3=หนูที่ฉีดด้วย CD147-DNA แบบ single immunization



รูปที่ 3 แสดง isotype ของ anti-CD4 antibody ในซีรัมของหนูที่ฉีดด้วย CD4-DNA

เส้นทึบ แสดงแอนติบอดีชนิด IgM และ เส้นประ แสดงแอนติบอดีชนิด IgG

6. การผลิต polyclonal anti-CD4 antibodies ในกระต่าย

นอกจากจะศึกษาการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization ในหนูแล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาถึงการนำวิธี DNA immunization มาใช้ผลิตแอนติบอดีในกระต่าย ซึ่งจะทำได้แอนติบอดีเพื่อใช้งานในปริมาณที่มากกว่า ผู้วิจัยทำการทดลองโดยฉีด cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD4 protein และ insert ใน eukaryotic expression vector (เรียกว่า CD4-DNA) เข้าไปในกระต่าย 3 ตัว ทาง intramuscular immunization ผลการทดลองพบว่ากระต่ายทั้ง 3 สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ CD4 protein ในระดับสูงในซีรัม (ตารางที่ 7) โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถยับยั้ง (inhibit) standard CD4 monoclonal antibody (คือ Leu3a และ 13B8.2) ในการจับกับ CD4 molecule บน CD4 positive cells ได้ แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อ CD4 protein. Polyclonal anti-CD4 antibody ที่ผลิตได้นี้ทำปฏิกิริยาได้กับทั้ง recombinant และ native CD4 protein และมี titer ถึง 1:800 ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์แล้วใน Kasinrerk W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. Immunol letters 1999; 67: 237-242 รายละเอียดวิธีการวิจัยและผลการวิจัยดังแสดงใน reprint ซึ่งได้แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก

7. การศึกษาหน้าที่ของ CD4 protein โดย polyclonal anti-CD4 antibody ที่ผลิตได้โดยวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษาหน้าที่ของ CD4 molecule ผู้วิจัยได้นำ rabbit polyclonal anti-CD4 antibody มาศึกษาหน้าที่ของ CD4 protein โดยนำ anti-CD4 antibodies มา inhibit การกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวโดย Phytohemagglutinin (PHA) ผลการทดลองพบว่า polyclonal anti-CD4 antibody สามารถยับยั้ง PHA induced cell proliferation ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CD4 protein จำเป็นในกระบวนการกระตุ้นเซลล์ให้แบ่งตัวโดย PHA การยับยั้ง PHA induced cell proliferation นี้ อาจเกิดจากการที่ polyclonal anti-CD4 antibody ไปรบกวน CD4-TCR/CD3 association หรือรบกวนการจับของ IL-16 กับ CD4 molecule (ดูรายละเอียดผลการศึกษาเหล่านี้ได้ใน Kasinrerk W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. Immunol. Letters 1999;67: 237-242; reprint ได้แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก)

ตารางที่ 7 แสดงการกระตุ้นการสร้าง anti-CD4 antibody ในกระต่ายโดยวิธี DNA immunization

Rabbit No.	Serum	Immunofluorescent reactivity*	
		CD4-COS	CD8-COS
1	Pre-immune	-	-
	Dose 1	-	-
	Dose 2	-	-
	Dose 3	-	-
	Dose 4	1+	-
	Dose 5	3+	-
	Dose 6	3+	-
2	Pre-immune	-	-
	Dose 1	1+	-
	Dose 2	2+	-
	Dose 3	3+	-
	Dose 4	4+	-
	Dose 5	4+	-
	Dose 6	4+	-
3	Pre-immune	-	-
	Dose 1	-	-
	Dose 2	1+	-
	Dose 3	3+	-
	Dose 4	4+	-
	Dose 5	4+	-
	Dose 6	4+	-

* ตรวจหาระดับ anti-CD4 antibody โดยวิธี indirect immunofluorescent โดยใช้ CD4-DNA transfected COS และ CD8-DNA transfected COS cells เป็น antigen

8. การศึกษา eukaryotic expression vector ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในงาน DNA immunization

เพื่อศึกษา plasmid vector ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการงาน DNA immunization ผู้วิจัยได้นำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD45, CD54, CD147 และ Hepatitis B surface (HBs) antigen ซึ่ง insert อยู่ใน eukaryotic expression vectors pTH3M, pCDM8, pSP65 และ pRc/CMV ตามลำดับ โดยแต่ละ plasmid vector มี eukaryotic promoter ดังนี้คือ pTH3M, pCDM8 และ pRc/CMV มี CMV promoter ส่วน pSP65 มี SR α promoter นำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง human leukocyte surface molecules หรือ hepatitis B surface antigen ที่ insert อยู่ใน eukaryotic vector ชนิดต่างๆ ดังกล่าวฉีดเข้าไปในหนู พบว่า หนูที่ฉีดด้วย plasmid DNA ทุกชนิดสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ encoded protein ในซีรัมได้ (ตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่า eukaryotic expression vector และ eukaryotic promoter หลายชนิดสามารถนำมาใช้ในการงาน DNA immunization ได้

ตารางที่ 8 แสดงการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย plasmid DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ ซึ่ง insert ใน eukaryotic expression vector ชนิดต่างๆ โดยวิธี DNA immunization

DNA	Dose of immunization					
	Pre-immune	1	2	3	4	5
CD45-DNA						
#1*	-	-	+/-	+	+	+
#2	-	-	+	+	+	+
CD54-DNA						
#1	-	+	+	+	+	+
#2	-	+	+	+	+	+
#3	-	-	+/-	+	+	+
#4	-	-	+	+	+	+
CD147-DNA						
#1	-	+/-	+	+	+	+
#2	-	-	-	+	+	+
#3	-	-	-	-	+	+
#4	-	-	-	-	+	+
#5	-	-	+	+	+	+
HBs-DNA						
#1	-	-	+	+	+	+
#2	-	-	-	-	+	+

* = จำนวนหนูที่ใช้ศึกษา

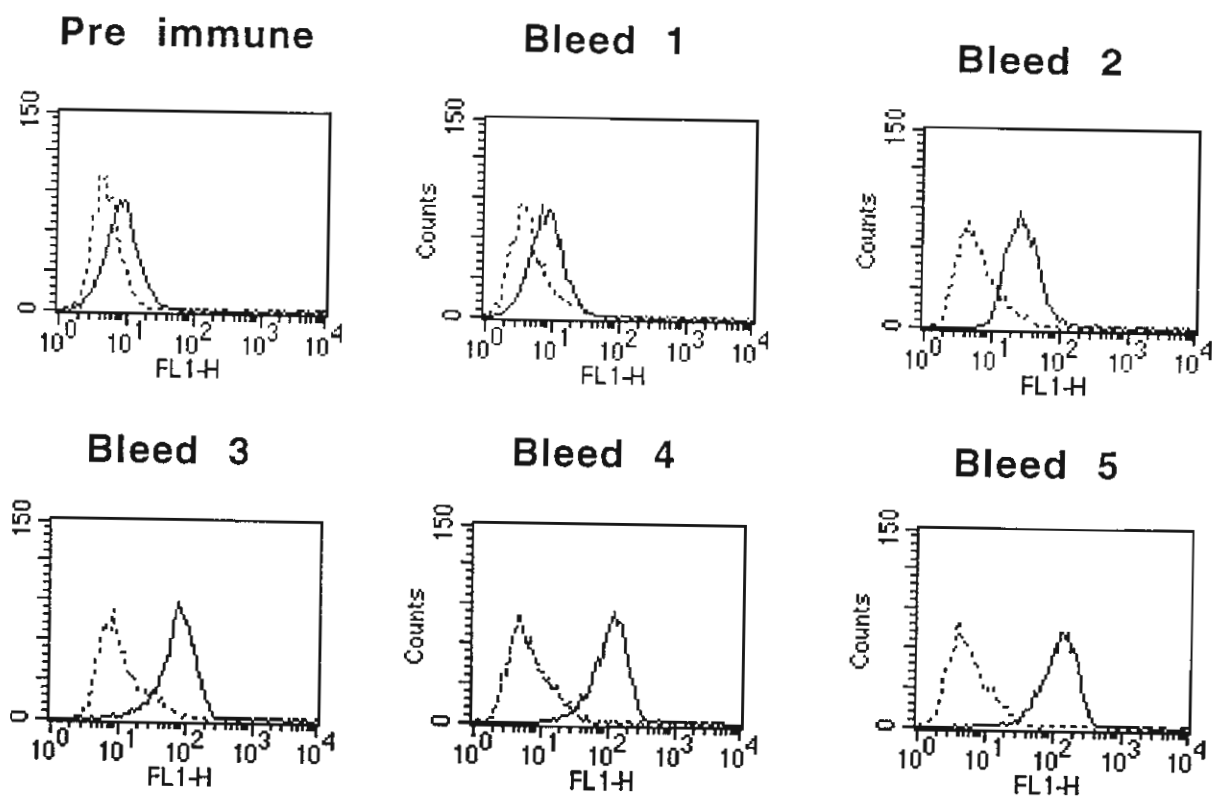
9. การศึกษาถึงสารที่ช่วยเพิ่มการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

9.1 การศึกษาผลของ DEAE Dextran ต่อการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

วิธี DNA immunization เป็นการฉีด DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจ เข้าไปในกล้ามเนื้อของหนู จากนั้น DNA จะถูก uptake เข้าไป และสร้างเป็น encoded protein โดยเซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่ง encoded protein ที่สร้างออกมาจะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อพิจารณาถึงตรงนี้ การเพิ่มการ uptake DNA เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อจะทำให้การสร้าง encoded protein มากขึ้น และจะทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ดังนั้นผู้วิจัย จึงนำสาร DEAE Dextran ซึ่งเป็นสารที่ช่วยเพิ่มการนำ DNA เข้าสู่ eukaryotic cells ในหลอดทดลอง มาใช้เพิ่มการนำ DNA เข้าเซลล์กล้ามเนื้อในหนู โดยนำสาร DEAE Dextran มาให้ร่วมกับ CD4-DNA จากนั้นตรวจหาระดับ CD4 antibodies ในหนูที่ให้ CD4-DNA และ CD4-DNA ร่วมกับสาร DEAE Dextran ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4 โดยพบว่าจากการศึกษาในหนู จำนวน 4 ตัว สาร DEAE Dextran นอกจากจะไม่ช่วยเพิ่มการสร้างแอนติบอดีแล้ว ยังกีดการสร้างแอนติบอดีอีกด้วย ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเป็นเพราะว่าสาร DEAE Dextran เมื่อผสมกับ DNA จะได้เป็น DEAE dextran-DNA complex ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งทำให้ muscle cells ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้หรือนำเข้าสู่เซลล์ได้น้อย เมื่อเทียบกับ DNA ที่ไม่จับกับ DEAE Dextran

9.2 การศึกษาผลของ chloroquine ต่อการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

Chloroquine เป็นสารที่สามารถลดการทำงานของ lysosomal enzymes ภายในเซลล์ ผู้วิจัยจึงนำสาร chloroquine มาผสมกับ DNA ที่กำหนดการสร้าง CD147 protein แล้วนำไปฉีดหนู เพื่อหวังว่าสาร chloroquine จะสามารถลดการทำลาย DNA ภายในเซลล์ได้ ซึ่งน่าจะช่วยเพิ่มการสร้าง encoded protein และเพิ่มการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในที่สุด จากการศึกษานี้ในหนูทั้งหมดจำนวน 10 ตัว ผลการทดลองพบว่าสาร chloroquine ไม่ได้ช่วยเพิ่มการสร้างแอนติบอดีได้เลย แต่กลับกีดการสร้างแอนติบอดี (ตารางที่ 9)



รูปที่ 4 แสดงระดับ anti-CD4 antibodies ในหนูหลังการฉีดด้วย CD4-DNA และ CD4-DNA ร่วมกับ DEAE Dextran

FACS profile นี้แสดงผลการทดลองจากหนู 2 ตัวจากการทดลองในหนูทั้งหมด 4 ตัว

เส้นทึบแสดงระดับแอนติบอดีในหนูที่ให้ CD4-DNA อย่างเดียว

เส้นประแสดงระดับแอนติบอดีในหนูที่ให้ CD4-DNA ร่วมกับ DEAE Dextran

ตารางที่ 9 การศึกษาผลของสาร chloroquine ต่อการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดกระตุ้นหนูด้วย plasmid

DNA

Experiment 1

Condition	Serum (days)									
	Pre-immune	14	28	42	56	70	100	130	160	190
CD147-DNA + Chloq. 400 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + Chloq. 200 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + Chloq. 100 μ M	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD147-DNA + Chloq. 50 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + Chloq. 0 μ M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Experiment 2

Condition	Serum									
	Pre-immune	14	28	42	56	70	100	130	160	190
CD147-DNA + Chloq. 100 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
CD147-DNA + Chloq. 50 μ M	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CD147-DNA + Chloq. 50 μ M	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CD147-DNA + Chloq. 25 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + Chloq. 12.5 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ฉีดหนูด้วย CD147-DNA หรือ CD147-DNA ร่วมกับ chloroquine ที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ครั้ง ห่างกันทุก 2 สัปดาห์

9.3 การศึกษาผลของ Phytohemagglutination (PHA) ต่อการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization

สาร PHA เป็น mitogen ที่สามารถกระตุ้นให้ lymphocytes แบ่งตัวและสร้าง lymphokines ชนิดต่างๆ ในการศึกษาที่ผู้วิจัยมีแนวคิดว่าจะผสม PHA กับ DNA แล้วนำไปฉีดหนู PHA ที่ให้เข้าไปจะไป activate lymphocytes ขณะที่ DNA จะสร้าง encoded protein ออกมา ซึ่งผลลัพธ์สุดท้ายน่าจะทำให้การสร้างแอนติบอดีต่อ encoded protein เพิ่มขึ้น จากแนวคิดนี้ ผู้วิจัยได้นำ PHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับ plasmid DNA ฉีดหนู จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบการสร้างแอนติบอดีกับหนูที่ฉีด plasmid DNA เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่า PHA ไม่กระตุ้นหรือลดการสร้างแอนติบอดี เมื่อฉีดหนู 5 ครั้ง และการให้ DNA พร้อมกับ PHA แล้วฉีดหนู 1 ครั้งไม่สามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีได้ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 การศึกษาผลของสาร Phytohemagglutinin ต่อการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดกระตุ้นหนูด้วย plasmid DNA จำนวน 5 ครั้ง

Condition	Serum (Days)									
	Pre-immune	14	28	42	56	70	100	130	160	190
CD54-DNA + PHA. 24 µg	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CD54-DNA + PHA 24 µg	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-
CD54-DNA + PHA 12 µg	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CD54-DNA + PHA 6 µg	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
CD54-DNA + PHA 0 µg	-	-	+	+	+	+	+	+	+	ND

ฉีดหนูด้วย CD54-DNA หรือ CD54-DNA ร่วมกับ PHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ครั้ง ห่างกันทุก 2 สัปดาห์

ตารางที่ 11 การศึกษาผลของสาร Phytohemagglutinin ต่อการสร้างแอนติบอดีเมื่อฉีดกระตุ้นหนูด้วย plasmid DNA จำนวน 1 ครั้ง

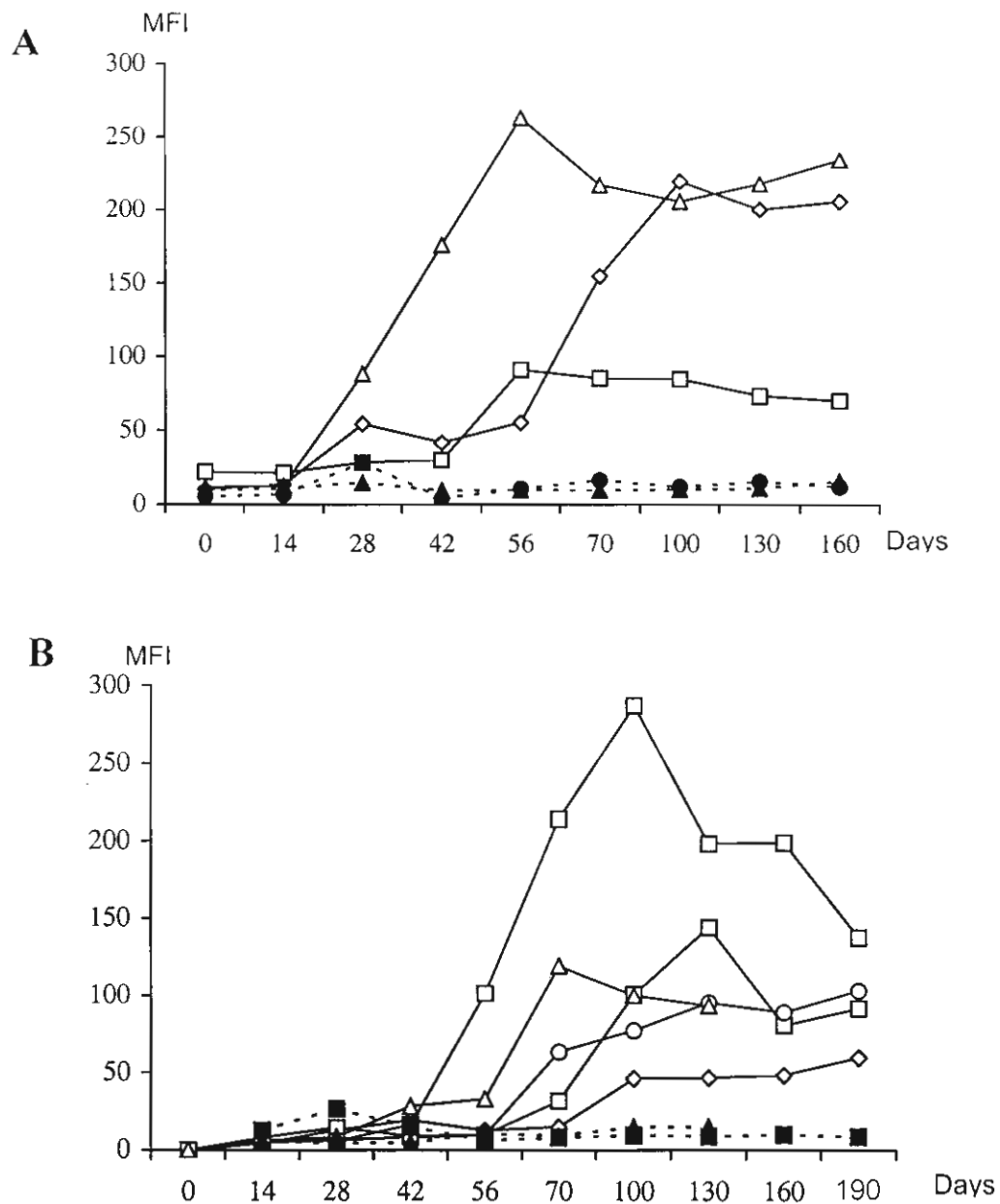
Condition	Serum (Days)									
	Pre-immune	14	28	42	56	70	100	130	160	190
CD1a-DNA + PHA 2 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD1a-DNA + PHA 0 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD147-DNA + PHA 4 µg	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-
CD147-DNA + PHA 0 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ฉีดหนูด้วย CD1a-DNA หรือ CD147-DNA ร่วมกับ PHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 ครั้ง

10. การเปรียบเทียบการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี DNA immunization โดยการฉีด plasmid DNA ทาง intramuscular immunization และทาง intrasplenic immunization

จากศึกษาที่ผ่านมา ผู้วิจัยพบว่าการฉีด plasmid DNA ทาง intramuscular immunization สามารถกระตุ้นการสร้าง polyclonal antibodies ต่อแอนติเจนที่สนใจได้ แต่ต้องมีการฉีดกระตุ้น 3-5 ครั้ง การฉีด plasmid DNA เพียง 1 ครั้ง (single immunization) ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาถึงการนำเอาวิธี intrasplenic immunization คือ ฉีด plasmid DNA โดยตรงเข้าไปในม้ามของหนู มาใช้ในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี

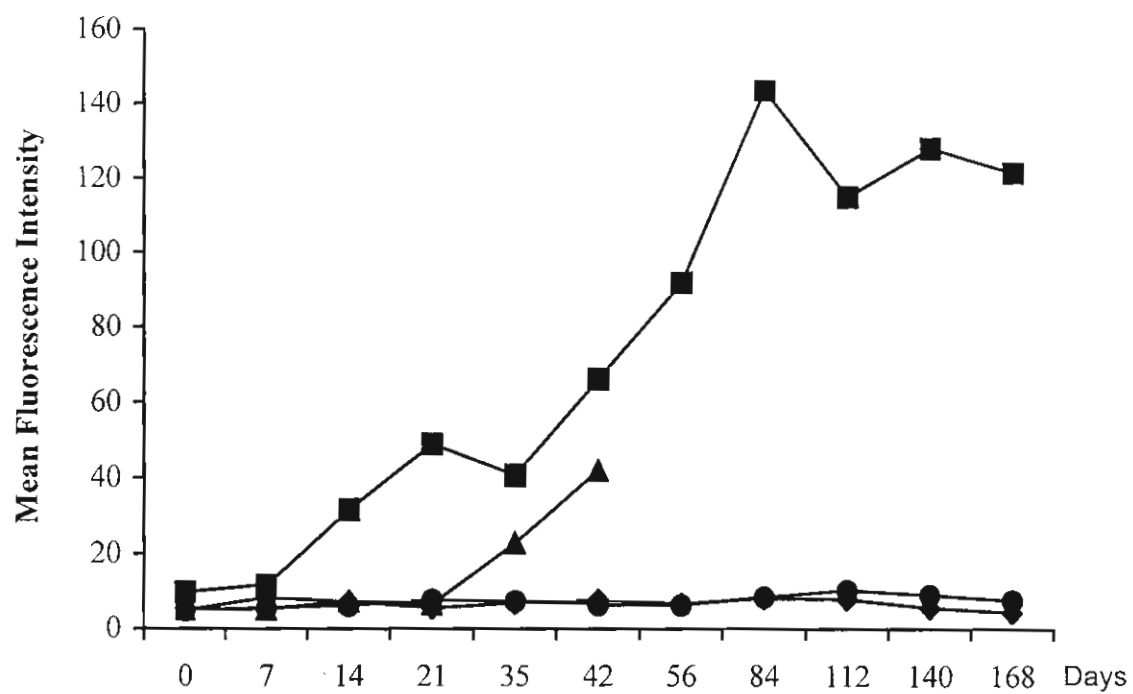
ผลการทดลองพบว่า เมื่อฉีดหนูทั้งหมด 3 และ 5 ตัวด้วย CD54-DNA และ CD147-DNA ตามลำดับ จำนวน 5 ครั้งทุก 2 สัปดาห์ พบว่าหนูทุกตัวมีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะขึ้นในซีรัม (รูปที่ 5) ขณะที่หนูที่ฉีด plasmid DNA 1 ครั้งไม่มีการสร้างแอนติบอดีเลย (รูปที่ 5) ในขณะที่การฉีด CD54-DNA ทาง intrasplenic immunization เพียง 1 ครั้ง สามารถกระตุ้นให้หนู 2 ใน 4 ตัวสร้างแอนติบอดีได้ (รูปที่ 6) โดยแอนติบอดีที่เกิดขึ้นยังคงสามารถตรวจพบได้อย่างน้อย 6 เดือนหลังการฉีด plasmid DNA (รูปที่ 7)



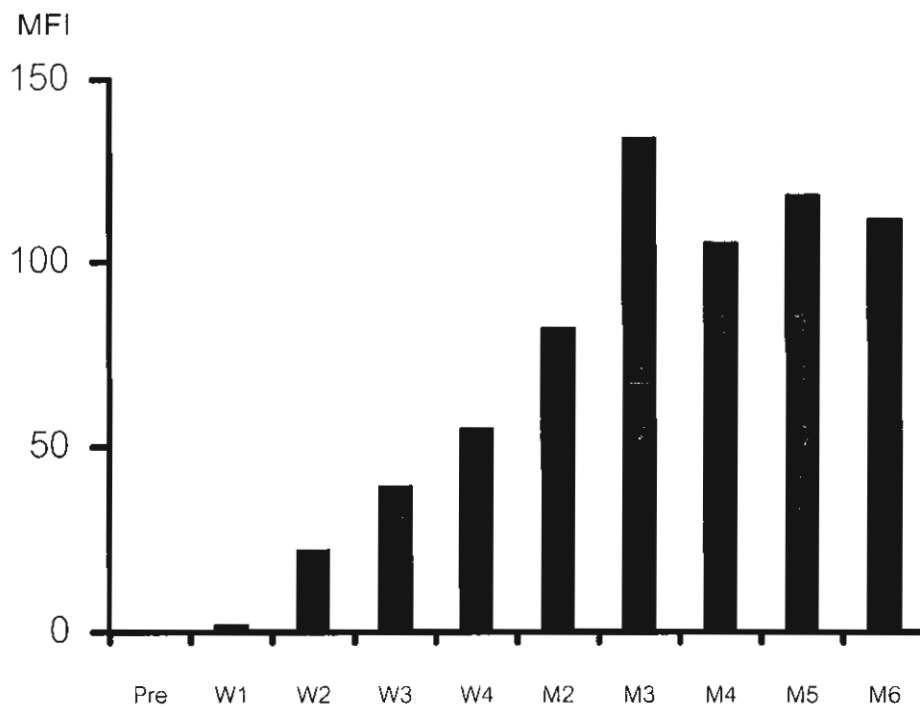
รูปที่ 5 แสดงการสร้างแอนติบอดีในซีรัมหนูหลังการฉีด CD54-DNA (รูป A) และ CD147-DNA (รูป B) ทาง intramuscular immunization

เส้นทึบ แสดงผลจากการฉีด plasmid DNA 5 ครั้ง

เส้นประ แสดงผลจากการฉีด plasmid DNA 1 ครั้ง



รูปที่ 6 แสดงการสร้างแอนติบอดีในซีรัมหนูหลังการฉีด CD54-DNA ทาง intrasplenic immunization จำนวน 1 ครั้ง



รูปที่ 7 แสดงการสร้าง anti-CD54 antibody ในซีรัมหนูหลังการฉีด CD54-DNA ทาง intrasplenic immunization

Pre = pre-immune serum; W1 - W4 = serum หลังฉีด plasmid DNA 1 - 4 สัปดาห์; M2 - M6 = serum หลังฉีด plasmid DNA 2 - 6 เดือน

11. การผลิต monoclonal antibody โดยวิธี DNA immunization

เพื่อศึกษาถึงวิธีการนำวิธี DNA immunization มาผลิต monoclonal antibody ผู้วิจัยได้ทำการฉีดหนู CD54-DNA ทาง intrasplenic immunization จากนั้นจึงนำ spleen cells ของหนูมา fuse กับ myeloma cells โดย hybridoma technique ตรวจหา hybridoma ที่สร้าง anti-CD54 monoclonal antibody โดยวิธี indirect immunofluorescent ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิต hybridoma ที่สร้าง anti-CD54 monoclonal antibody ได้ จำนวน 1 clone แอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง native และ recombinant CD54 protein ผลงานวิจัยนี้ได้รับการตอบรับเพื่อตีพิมพ์แล้วใน Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrer W. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. Immunol letters 2000 (in press) รายละเอียดวิธีการวิจัยและผลการวิจัยดังแสดงใน manuscript ซึ่งได้แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก

12. การผลิต monoclonal antibody โดยอาศัย COS cell expression system มาใช้ในการเตรียม immunizing antigen

เพื่อศึกษาถึงวิธีการผลิต monoclonal antibody ต่อโปรตีนที่สนใจ เมื่อผู้วิจัยมี DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนนั้นๆ แต่ไม่มีโปรตีนที่สนใจอยู่ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้นำ cDNA ที่กำหนดการสร้าง CD14 และ CD99 ซึ่ง insert ใน eukaryotic expression vector pCDM8 ไป transfect เข้าไปใน COS cells เพื่อ generate COS cells ที่ express โปรตีนที่สนใจบนผิวเซลล์ จากนั้นนำ transfected COS cells ไปใช้เป็น immunizing antigen ในการฉีดหนู นำ spleen cells ของหนูมาเชื่อมกับ myeloma cells ตามวิธี hybridoma technique มาตรฐาน ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยสามารถผลิต anti-CD14 monoclonal antibodies ได้ทั้งหมด 5 clones และ anti-CD99 monoclonal antibodies ได้ทั้งหมด 3 clones ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า COS cell expression system สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติเจนที่ดีมากสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Anti-CD14 monoclonal antibodies ที่ผลิตได้สามารถใช้ศึกษา cellular distribution ของ CD14 molecule บนเซลล์ชนิดต่าง และสามารถนำมาใช้ตรวจนับจำนวน monocytes ใน peripheral blood ได้นอกจากนี้ anti-CD14 monoclonal antibody ที่ผลิตได้ สามารถยับยั้งการจับของ lipopolysaccharide (LPS) กับ CD14 molecule ได้ ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์แล้วใน Moonsom S, Kasinrer W. Production of anti-CD14 monoclonal antibodies by using CD14 expressing COS cells as immunizing antigen. Asian Pac J Allergy Immunol 2000; 18: 53-61 รายละเอียดวิธีการวิจัยและผลการวิจัยดังแสดงใน reprint ซึ่งได้แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก

สำหรับ Anti-CD99 monoclonal antibodies ที่ผลิตได้ สามารถนำมาใช้ศึกษา cellular distribution ของ CD99 molecule บน hemopoietic cell lines และ peripheral blood cells ชนิดต่างๆ, นำมาใช้ศึกษา น้ำหนักโมเลกุลของ CD99 protein และศึกษาหน้าที่ของ CD99 molecules นอกจากนี้ยังใช้ศึกษา signal transduction pathways ผ่าน CD99 protein ผลการวิจัยนี้ได้รับตีพิมพ์เผยแพร่แล้วใน Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. CD99 monoclonal antibody induces homotypic cell aggregation of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathways. Immunol Letters 2000; 71:33-41. รายละเอียดของวิธีการทดลองและผลการทดลอง ดูได้ใน reprint ที่แนบมาด้วยแล้วในภาคผนวก

เอกสารอ้างอิง

1. Davis, H.L. and R.G. Whalen. 1995. DNA-based immunization. In, *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*. (Ed. G. Dickson), Chapman and Hall, London.
2. Ertl, H.C.J. and Z. Xiang. 1996. Novel Vaccine Approaches. *J. Immunol.* 156:3579-3582.
3. Fynan, E.F., R.G. Webster, D.H. Fuller, J.R. Haynes, J.C. Santoro and H.L. Robinson. 1995. DNA vaccines: a novel approach to immunization. *Int. J. Immunopharmacol.* 17:79-83.
4. McDonnell W.M. and F.K. Askari. 1996. DNA Vaccines. *New Eng. J. Med.* 334:42-45.
5. Corr, M., D.J. Lee, D.A. Carso and H. Tighe. 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.* 184:1555-1560.
6. Neefjes, J.J. and H.L. Ploegh. 1992. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol. Today.* 13:179-184.
7. Kasinrerk, W, Tokrasinwit, N. and Y Piluk. 1996. Production of Mouse anti-CD4 antibodies by DNA-Based Immunization. *Asian Pacific J. Allerg. Immun.* 14:99-105.
8. Kasinrerk, W, Tokrasinwit N and K. Changtumrourng. 1997. Production of anti-CD4 antibodies in rabbits by DNA Immunization. *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 5:123-129.
9. Major, M., L. Vitvitski, M.A. Mink, M. Schleef, R.G. Whalen, C. Trepo and G. Inchauspe. 1995. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of immune responses against the Hepatitis C virus nucleocapsid. *J. Virol.* 69: 5798-5805.
10. Geisser, M., A. Gesien, K. Tokushige and J.R. Wands. 1997. Enhancement of cellular and humoral immune responses to Hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J. Immunol.* 158: 1231-1237.
11. Kim, J.J., V. Ayyavoo, M.L. Bagarazzi, M.A. Chattergoon, K. Dang, B. Wang, J.D. Boyer and D.B. Weiner. 1997. In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J. Immunol.* 158: 816-826.

Output ที่ได้จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 4 เรื่อง

- (1) Kasinrerker W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. Immunol Letters 1999; 67:237-242
- (2) Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. CD99 monoclonal antibody induces homotypic cell aggregation of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathways. Immunol letters 2000; 71: 33-41.
- (3) Moonsom S, Kasinrerker W. Production of anti-CD14 monoclonal antibodies by using CD14 expressing COS cells as immunizing antigen. Asian Pac J All Immunol 2000; 18: 53-61.
- (4) Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrerker W. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. 2000 (in press).

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

(1) ในเชิงพาณิชย์

ไม่มี

(2) ในเชิงนโยบาย

ไม่มี

(3) ในเชิงสาธารณะ

ผู้วิจัยได้รับเชิญไปเป็นวิทยากรเพื่อเผยแพร่ความรู้ที่ได้จากโครงการนี้หลายครั้ง ได้แก่

1. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Preparation of antigens for immunization and cell line selection ในการประชุมวิชาการเรื่อง Monoclonal antibody workshop: Production and application วันที่ 22-24 มิถุนายน 2541 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ
2. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Large scale production of monoclonal antibody ในการประชุมวิชาการเรื่อง Monoclonal antibody workshop: Production and application วันที่ 22-24 มิถุนายน 2541 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ
3. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Characterization and functional analysis of leukocyte surface molecule ในการประชุมวิชาการเรื่อง Monoclonal antibody workshop: Production and application วันที่ 22-24 มิถุนายน 2541 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ

4. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Expression of protein in mammalian cells ในการประชุมวิชาการเรื่อง การผลิตโปรตีนโดยใช้ระบบสังเคราะห์ในเซลล์เจ้าบ้านแบบต่างๆ วันที่ 17-21 สิงหาคม 2541 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ
5. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง DNA Vaccine ในการประชุมวิชาการเรื่อง The First National Seminar on Pharmaceutical Biotechnology วันที่ 23-25 มิถุนายน 2542 โรงแรมอมิตีกรีนฮิลล์ เชียงใหม่
6. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง Production of polyclonal and monoclonal antibodies to human leukocyte surface molecules and their use for immunophenotyping and functional analysis ในการประชุมวิชาการ The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 วันที่ 15-18 พฤศจิกายน 2542 โรงแรม ภูเก็ตคาเดย์ ภูเก็ต
7. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง DNA Vaccines ในการประชุมวิชาการเรื่อง New Drug and Novel Concepts วันที่ 22-26 พฤศจิกายน 2542 โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว เชียงใหม่

(4) ในเชิงวิชาการ

ทุนวิจัยนี้ทำให้เกิดการพัฒนาการเรียนการสอนในภาควิชาฯ โดยผลงานวิจัยส่วนหนึ่งได้นำมาใช้ในการเรียนการสอนทั้งระดับปริญญาตรีและโท มีนักศึกษาปริญญาตรีจำนวน 5 คนทำภาคนิพนธ์และนักศึกษาปริญญาโท 1 คนทำวิทยานิพนธ์ โดยอาศัยโครงการวิจัยนี้

นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังมีส่วนร่วมในสร้างนักวิจัยใหม่ โดยโครงการวิจัยนี้มีผู้ช่วยนักวิจัยมาร่วมงานตั้งแต่เริ่มโครงการวิจัยจนถึงปัจจุบัน จำนวน 2 คน ซึ่งผู้ช่วยนักวิจัยได้มีความรู้ ความคิดอย่างมากทางด้านงานวิจัย ซึ่งเชื่อว่าผู้ช่วยนักวิจัยเหล่านี้จะสามารถเป็นนักวิจัยที่ดีในอนาคต

ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ ทำให้ผู้วิจัยสามารถนำเอาเทคนิค DNA immunization หรือ DNA vaccination มาใช้ในการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดต่างๆ โดยสามารถนำมาผลิตได้ทั้ง polyclonal antibody และ monoclonal antibody ความรู้นี้ได้นำไปประยุกต์ใช้กับการผลิต monoclonal antibody ต่อ Dengue virus protein อยู่ในขณะนี้

3. อื่น ๆ

3.1 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ จำนวน 6 ครั้ง

- (1) แสงเดือน มูลสม, นิรมล โตกระสินธุ์, วัชร กสิณฤกษ์. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CD14 โปรตีน. การประชุมวิชาการโพลไซโตเมทรีประจำปี ครั้งที่ 6, ยะลา, 22-26 มีนาคม 2542.
- (2) Moonsom S, Tokrasinwit N, Kasinrerk W. Generation of CD14 expressing COS cells by eukaryotic expression system and production of monoclonal antibody against CD14 protein for identification of monocytes. 17th Annual Health Sciences Meeting, Chiang Mai, 20 July 1999.

- (3) Kasinrer W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. International Conference on Development and Clinical Progress of DNA Vaccines. Langen, Germany, 6-8 October 1999.
- (4) Kasinrer W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. CD99 monoclonal antibody induces homotypic cell aggregation of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathways. 2nd FIMSA Congress. Bangkok, Thailand, 23-27 January 2000.
- (5) แสงเดือน มูลสม, พรทิพย์ ไพจิตจินดา, วัชร กสิณฤกษ์. การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD45 โมเลกุลและการติดฉลาก FITC เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดขาว. การประชุมวิชาการโพลไซโตเมทรีประจำปี ครั้งที่ 7, ขอนแก่น, 20-23 มีนาคม 2543.
- (6) Moonsom S, Knunkeawla P, Kasinrer W. Production of monoclonal antibody to CD54 protein by DNA immunization. The 18th Annual Health Sciences Meeting. Chiang Mai, Thailand, 8 June 2000.

3.2 รางวัลผลงานวิจัย

ได้รับรางวัล The 1999 Taguchi Prize for Outstanding Research Achievements by Young Scientist in the Field of Biotechnology

ภาคผนวก

Reprint / Manuscript จำนวน 4 เรื่อง:

- (1) Kasinrerk W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. Immunol Letters 1999; 67:237-242
- (2) Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrerk W. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. 2000 (in press).
- (3) Moonsom S, Kasinrerk W. Production of anti-CD14 monoclonal antibodies by using CD14 expressing COS cells as immunizing antigen. Asian Pac J All Immunol 2000; 18: 53-61.
- (4) Kasinrerk W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. CD99 monoclonal antibody induces homotypic cell aggregation of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathways. Immunol letters 2000; 71: 33-41.

**Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by
intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein**

Watchara Kasinrerk, Seangdeun Moonsom^a, Panida Khunkeawla^a

*Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

^a S. Moonsom and P. Khunkeawla are researchers supported by The Thailand Research Fund (TRF) and The National Science and Technology Development Agency of Thailand (NSTDA), respectively.

Corresponding author: Dr. Watchara Kasinrerk, Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand. Tel. : (..6653)946043; Fax: (..6653)946043

E-mail: watchara@chiangmai.ac.th

Keywords: CD54; DNA immunization, intrasplenic immunization, monoclonal antibody

Abstract

DNA immunization, in theory, is of great interest as a source of specific antibodies against different antigens. In an attempt to produce polyclonal and monoclonal antibodies against cell surface molecules by using the DNA immunization strategy, intramuscular and intrasplenic routes of DNA injection were compared. Two to Five, but not a single, intramuscular DNA immunizations induced anti-CD54 and anti-CD147 antibody production. In contrast, a single intrasplenic immunization of CD54-encoding DNA could induce anti-CD54 antibody production. To produce monoclonal antibody (mAb), spleen cells obtained from an intrasplenic CD54-encoding DNA immunized mouse were fused with myeloma cells using the standard hybridoma technique. A hybridoma secreting specific mAb to CD54 was established. The generated mAb reacted to CD54 protein expressed on transfected COS cells and various cell types, the same as using standard CD54 mAb MEM-111. Our results demonstrated that direct immunization of antigen-encoding DNA into spleen is an effective route for production of both polyclonal and monoclonal antibodies to cell surface molecules. This finding is very useful for the production of antibodies to cell surface molecules where the protein antigen is not available or difficult to prepare, but cDNA encoding the corresponding protein is available.

1. Introduction

Immunization with plasmid vectors encoding protein antigens derived from pathogens or tumor cells, termed DNA immunization or DNA vaccine, has been reported to induce protective immunity in several animal models [1-3]. The theoretical advantages of DNA immunization over conventional vaccines including: [1] the induction of both antibody and cell-mediated immune responses, [2] the relative ease of production and [3] the ability to express proteins intracellularly for the induction of cytotoxic T cell (CTL) responses. In addition, the DNA immunization strategy has been used as a tool for production of the hyperimmune globulin products [4-7].

Monoclonal antibodies directed against leukocyte surface molecules are powerful reagents for biochemical and functional characterizations of the corresponding proteins. To generate a mAb to a molecule where the protein antigen is not available or difficult to prepare, but cDNA encoding the corresponding protein is available, DNA immunization is therefore very useful. Few reports have demonstrated the use of this strategy for production of mAbs to molecules of interest [8-9]. However, in our attempts to produce mAbs to leukocyte surface proteins by intramuscularly immunization of antigen-encoding DNA, unsuccessful experiments were obtained (unpublished observations). Direct immunization of protein antigen into spleen (i.e., intrasplenic immunization) has been reported as an effective method for the production of polyclonal and monoclonal antibodies [10-20]. Direct immunization of plasmid DNA into spleen may, therefore, be a possible alternative route for production of both polyclonal and monoclonal antibody.

In the present report, we compared 2 plasmid DNA immunization routes, intramuscular and intrasplenic, for the production of polyclonal antibodies to cell

surface molecules. It was demonstrated that a single DNA immunization by intrasplenic route could induce antibody production, whereas, a single-dose intramuscular immunization could not. Furthermore, by using intrasplenic immunization, an anti-CD54 mAb could be generated by DNA immunization.

2. Materials and Methods

2.1. Cells and antibodies

Human monocytic cell line, U937 cells, were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY), 40 µg/ml gentamicin and 2.5 µg/ml amphotericin B in a humidified atmosphere of 5%CO₂ at 37°C. COS7 cells were cultured in MEM (Gibco) containing 10% FBS and antibiotics. Purified CD54 mAb MEM-111 (IgG2a)[21] were kindly provided by Dr. Vaclav Horejsi (Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic). FITC-conjugated rabbit F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulin antibodies was purchased from Dako (Glostrup, Denmark).

2.2 Preparation of plasmid DNA

cDNA encoding CD54 protein inserted into an eukaryotic expression vector pCDM8 (designated CD54-DNA) was a kind gift from Dr. Hannes Stockinger, University of Vienna, Vienna, Austria. cDNA encoding CD147 protein, named CD147-DNA, was generated in our Department [22]. For large scale preparation, the plasmid DNA were transformed into *E. coli* MC1061/p3. The plasmid DNA were then isolated from transformed *E. coli* by Qiagen chromatography columns (Qiagen, Hilden, Germany). The plasmid DNA obtained were subsequently resuspended in PBS. The concentration and purity of DNA preparation were determined by OD_{260/280} reading. DNA were stored at -20°C, until injected into mice,.

The isolated plasmid DNA were proved for expression of the corresponding proteins by using the COS cell expression system and indirect immunofluorescent staining of the transfected COS cells with specific mAbs.

2.3 DNA immunization

For intramuscular immunization, BALB/c mice were injected one or five times at 2-week intervals by intramuscular route at the hind legs (100 µg of DNA/dose). For intrasplenic immunization, mice were anesthetized with diethylether. The skin and peritoneum on the left side of the body was open to expose the spleen. Fifty microliters (100 µg) of plasmid DNA were injected into the spleen. The peritoneum and skin were then closed by fine sutures. Blood samples were collected from the immunized mice by tail bleeding at 2-week intervals. Sera were separated and stored at -20°C.

2.4. Hybridoma production

Spleen cells were collected from CD54-DNA intrasplenic immunized mouse and fused with P3-X63Ag8.653 myeloma cells by the standard hybridoma technique using 50% polyethylene glycol. After HAT medium selection, culture supernatants were firstly analyzed for antibody reactivity against CD54 expressing U937 cells using indirect immunofluorescent assay. The positive supernatants were then differentially screened for CD54 specificity using CD54 transfected COS cells. The positive hybridomas were subcloned by limiting dilution. The isotype of antibodies was determined by using the isotyping enzyme-linked immunosorbent assay kit (Sigma, St. Louis, MO).

2.5. Immunofluorescence analysis

To determine antibodies in the sera, indirect immunofluorescence was carried out. To block nonspecific Fc-receptor-mediated binding of antibody, U937 cells were pre-incubated for 30 min at 4°C with 10% human AB serum before staining. Blocked cells were then incubated for 30 min at 4°C with tested sera. After washing, cells were

incubated with FITC-conjugate for 30 min. Membrane fluorescence was analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) flow cytometer.

The reactivity of anti-CD54 mAb with peripheral blood cells was assessed by indirect immunofluorescence using the lysed whole blood staining method. EDTA-blood was incubated with tested mAb for 30 min at 4°C. After washing, cells were incubated with FITC-conjugate for another 30 min at 4°C. RBCs were lysed by using RBC lysing solution (Becton Dickinson). Membrane fluorescence was then analyzed by using a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson). For flow cytometry analysis, individual populations of blood cells were gated according to their forward and side scatter characteristics.

2.6 DEAE-dextran transfection of COS cells

Plasmid DNA were transfected into COS cells by the DEAE-dextran transfection method. Briefly, 1×10^6 COS cells were transferred to 6 cm tissue culture dishes (NUNC, Roskilde, Denmark) on the day before transfection. Cells were incubated with 2 ml of MEM containing 250 µg/ml DEAE-dextran (Sigma), 400 µM chloroquine diphosphate (Sigma) and 2 µg DNA for 3 h at 37°C. Supernatant was removed and cells were treated with 10% DMSO in PBS for 2 min at room temperature. Cells were then cultured in MEM containing 10% FBS overnight, washed once, and re-cultured with the same medium for another 2 days to allow expression of the corresponding proteins.

3. Results

3.1. Production of polyclonal antibodies by immunization of plasmid DNA encoding CD54 and CD147 protein

In order to produce antibodies to human leukocyte surface molecules by injection of antigen-encoding plasmid DNA, intramuscular immunization and direct immunization of plasmid DNA into spleen were used as inoculation routes. In this study, plasmid DNA encoding CD54 and CD147 protein, termed CD54-DNA and CD147-DNA respectively, were prepared by using Qiagen chromatography column. The plasmid DNA obtained were able to express the corresponding proteins on transfected COS cell surfaces (data not shown). Mice were intramuscularly immunized with CD54-DNA or CD147-DNA 5 times at two-week intervals or with a single injection. In some mice, CD54-DNA were inoculated by single intrasplenic immunization. Sera collected at two-week intervals from each mouse were firstly screened for the presence of anti-CD54 or anti-CD147 antibodies by staining U937 cells. As shown in figure 1, sera from all 5-doses intramuscularly immunized mice (8/8) reacted to U937 cells. In contrast, none of the sera from single-dose intramuscularly immunized mice (0/4) reacted to U937 cells. Interestingly, sera obtained from 2 out of 4 single-dose intrasplenic immunized mice showed positive reactivity (Fig. 2).

To confirm that the generated antibodies after plasmid DNA immunization were specific for CD54 and CD147 protein, CD54-DNA and CD147-DNA transfected COS cells were stained with the positive sera. As predicted, sera obtained from CD54-DNA immunized mice reacted to CD54 transfectants, but did not react to mock transfectants (data not shown). Sera obtained from CD147-DNA immunized mice bound CD147 transfectants, but did not react to mock transfectants (data not shown).

Pre-immune sera of each mouse did not react to any transfectants. These results indicated that DNA immunization can be used to produce polyclonal antibodies to cell surface proteins. Direct immunization of plasmid DNA into spleen can induce antibody response after only a single DNA immunization.

3.2. Production of monoclonal antibodies to CD54 protein by intrasplenic immunization of plasmid DNA

To produce monoclonal antibody to CD54 protein, spleen cells from a CD54-DNA intrasplenic immunized mouse, which produced anti-CD54 antibodies, were fused with myeloma cells using the conventional hybridoma technique. Hybrids that produced anti-CD54 mAb were determined by indirect immunofluorescence using CD54 transfected COS cells as antigen. By this screening, an anti-CD54 mAb, designated MT54 (IgG2a isotype), which strongly bound to CD54 transfectants, but not to mock transfectants, was obtained. To confirm that MT54 is an anti-CD54 mAb, the reactivity of this mAb to various cell lines and peripheral blood leukocytes was studied and compared to standard anti-CD54 mAb, MEM-111 [21]. All cell lines tested including the human monocytic cell line U937, the erythroid/myeloid cell line K562, the B cell line Daudi and the T cell lines Molt4, Jurkat and Sup T1 were positive with MT54 (Fig. 3). With peripheral blood leukocytes, the mAb MT54 bound to lymphocytes and monocytes and reacted weakly to neutrophils (n=5)(Fig. 4). All of these staining patterns were similar to those obtained by using mAb MEM-111 (Fig. 3 and 4). Data obtained from the COS cell transfectant experiments together with the cellular distribution patterns, indicated that the generated mAb MT54 is an anti-CD54 mAb. Our results demonstrated that direct immunization of plasmid DNA into spleen is a possible alternative route for the production of both polyclonal and monoclonal antibodies to cell surface molecules.

4. Discussion

Production of monoclonal antibodies to leukocyte surface molecules by DNA immunization is very useful for producing specific antibody where the protein antigen is absent but antigen-encoding DNA is available. In our previous experiments, intramuscular immunization of plasmid DNA encoding various human leukocyte surface molecules, including CD4, CD14, CD45, CD54 and CD147, induced antibody responses [5-7 and unpublished observations]. In theory, spleen cells from antibody-producing mice can be used in the hybridoma technique. However, in our previous fusion experiments, no hybrid produced specific antibody was generated from the DNA intramuscularly immunized mice. Instead of intramuscular immunization, an optimal DNA immunization route must be taken into consideration for the generation of hybrid produced monoclonal antibody of interest.

Injection of protein antigen directly into lymphoid organs such as lymph node or spleen offers some strong theoretical advantages over other injection routes [13, 23]. In this type of immunization, the immunogen is concentrated in one region that is specialized in dealing with it. Intrasplenic immunization was introduced by Nilsson [13] as an extremely efficient procedure, especially useful for low amounts of antigen. This immunization route has been further used for polyclonal and monoclonal antibody production purposes [10-20]. In the present study, intrasplenic and intramuscular routes were, therefore, compared for the production of antibodies to cell surface proteins after antigen-encoding DNA immunization.

In this study, mice immunized with plasmid DNA encoding CD54 and CD147, generated specific antibodies after two to five DNA inoculations (Fig. 1). In contrast, no mice that obtained a single dose intramuscular immunization generated an antibody. Intramuscular injection of plasmid DNA has been widely used with DNA

vaccines. In most cases of DNA intramuscular immunization, high titers of antibodies have been found against the expressed protein. Some investigators demonstrated that a single intramuscular immunization of plasmid DNA induced antibody responses [24-26], however, booster(s) was required in several reports including this one [27-30]. These differences appear to be due to the nature of the particular antigen, the expression vector used and may be due to the skill of the individual administering the DNA [29,31]. In contrast to intramuscular immunization, only a single DNA intrasplenic injection resulted in the production of serum antibodies (Fig. 2). These results indicate the possibility of using intrasplenic immunization for the induction of antibody responses by DNA immunization. Enhancement of antibody responses by intrasplenic immunization is likely to be related to that the injected plasmid DNA are directly transfected splenocytes, including antigen presenting cells. The antigens are then expressed and concentrated in the spleen, where the immune responses are initiated. Antigen presenting cells are thought to play at least three distinct roles in DNA immunization: (1) MHC class II-restricted presentation of antigens secreted by neighboring, transfected cells, (2) MHC class I-restricted "cross" presentation of antigens released by neighboring, transfected cells, and (3) direct presentation of antigens by transfected antigen presenting cells themselves [32]. Therefore, immunization of DNA into spleen allows direct delivery of antigens to the spleen and the induction of antibody responses is occurred. In protein immunization, it was clearly easier to obtain an antibody response using minute amounts of antigen by intrasplenic route than by the intraperitoneal or intravenous route [33]. Spitz et al, reported the production of antibody after a single intrasplenic injection of either soluble antigen or of allogeneic cells [10]. In agreement with protein immunization, this study demonstrated that injection of CD54-encoding DNA into spleen induced

antibody response better than that intramuscular route, as the antibodies could be detected after a single intrasplenic immunization. While this manuscript was in preparation, the use of intrasplenic immunization of plasmid encoding carcinoembryonic antigen (pCEA) for induction of immune responses was reported by White et al [34]. Intrasplenic administration of pCEA could induce specific antibody responses and partial immunoprotection against tumor challenge [34]. This and our findings support future investigations of DNA vaccination strategies that specifically promote the uptake of plasmid by splenocytes.

Spleen cells from a CD54-DNA intrasplenic immunized mouse were fused with myeloma for generation of monoclonal antibody. A hybridoma cell line stably secreting specific mAb to CD54 was established. The generated mAb reacted to CD54 protein expressed on transfected COS cells and various cell types as well as using a standard CD54 mAb MEM-111. Our results show that, rather than polyclonal antibody production, intrasplenic immunization can be used to produce monoclonal antibody by DNA immunization.

Intrasplenic immunization of protein antigens has been demonstrated to be an efficient procedure for the induction of antibodies [13]. Antibody responses were also obtained when the immunogen was immobilized on nitrocellulose or Sepharose beads [11,32]. As described here, the intrasplenic route was used for production of both polyclonal and monoclonal antibodies using plasmid DNA as immunizing agent. Intrasplenic immunization seems to be an appropriate route for raising polyclonal and monoclonal antibodies against cell surface proteins by DNA immunization. However, many constraints have limited the use of this immunization route. Intrasplenic immunization is not easy to perform, especially in small animals such as mice, since major surgical procedures are required and animal mortality and morbidity can not be

underestimated. This immunization route should be carried out only under the guidance of a trained animal worker or veterinarian.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Vaclav Horejsi and Dr. Hannes Stockinger for providing mAbs to CD54 protein and CD54-encoding DNA, respectively. This work was supported by the National Science and Technology Development Agency of Thailand and the Thailand Research Fund.

References

- [1] J.B. Ulmer, J.J. Donney, S.E. Parker, et al., *Science* 259 (1993) 1745-1749.
- [2] J.J. Donney, J.B. Ulmer, J.W. Shiver, M.A. Lui, *Ann. Rev. Immunol.* 15 (1997) 617-648.
- [3] E. Manickan, K.L. Karem, B.T. Rouse, *Critical Rev. Immunol.* 17 (1997) 139-154.
- [4] W.H. Robinson, S.S. Prohaska, J.C. Santoro, et al., *J. Immunol.* 155 (1995) 4739-4748.
- [5] W. Kasinrer, N. Tokarsinwit, Y. Piluk, *Asian Pacific J. Allerg. Immunol.* 14 (1996) 99-105.
- [6] W. Kasinrer, N. Tokarsinwit, K. Changtumroung, *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 5 (1997) 123-129.
- [7] W. Kasinrer, N. Tokarsinwit, *Immunol. Lett.* 67 (1999) 237-242.
- [8] M.A. Barry, M.E. Barry, S.A. Johnston, *Biotechniques* 16 (1994) 616-620.
- [9] C. Ulivieri, D. Burrioni, J.L. Telford, C.T. Baldari, *J. Biotechnol.* 51 (1996) 191-194.
- [10] L. Spitz, M. Spitz, R. Thorpe, E. Eugui, *J. Immunol. Methods* 70 (1984) 39-43.
- [11] B.O. Nilsson, P.C. Svalander, A. Larsson, *J. Immunol. Methods* 99 (1987) 67-75.
- [12] A.J. Gearing, R. Thorpe, L. Spitz, M. Spitz, *J. Immunol. Methods* 27 (1988) 305-343.
- [13] B.O. Nilsson, A. Larsson, *Immunol. Today* 11 (1990) 10-12.
- [14] M. Jin, L. Johansson, P. Sundstrom, B.O. Nilsson, *Mol. Reprod. Devel.* 37 (1994) 446-451.

- [15] E.M. Fusi, A.M. Gasparri, M. Pelagi, et al., *Amer. J. Reprod. Immunol.* 33 (1995) 122-130.
- [16] M. Jin, A. Larsson, B.O. Nilson, *Mol. Reprod. Dev.* 43 (1996) 47-54.
- [17] N. Tumosa, J.R. Baker, *Vis. Neuosci.* 13 (1996) 671-682.
- [18] NR, Gidlund Damasceno, J.A. Lindoso, D.S. Abdalla, H. Goto, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 (1996) 1625-1628.
- [19] S.P. Schrimpf, U. Hellman, L. Carlsson, et al., *Prostate* 38 (1999) 35-39.
- [20] T.S. Hu, Y.C. Qian, Y.G. Yang, Y.L. Hu, X.M. Qu, S.L. Yang, *Hybridoma* 19 (2000) 95-99.
- [21] K. Imai, M. Tsujisaki, T. Hareyama, Y. Hinoda, in: T. Kishimoto, H. Kikutani, A.E.G.Kr.v.d. Borne, et al. (Eds.) *Leukocyte typing VI*, Garland Publishing, 1997, pp. 409.
- [22] W. Kasinrerker, E. Fiebingner, I Stefanova, et al., *J. Immunol.* 149 (1992) 847-854.
- [23] M.B. Sigal, Y.N. Sinha, W.P. VanderLaan, *Methods Enzymol.* 93 (1983) 3-12.
- [24] M. Major, L. Vitvitski, M.A. Mink, et. al., *J. virology* 69 (1995) 5798-5805.
- [25] W. Bohm, A. Kuhrober, T. Paier, et al, *J. Immunol. Methods* 193 (1996) 29-40.
- [26] A. Noll, N. Bucheler, E. Bohn, et al., *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 986-996.
- [27] D. Gray, H. Skervall, *Nature* 336 (1988) 70-73.
- [28] B. Wang, J Boyer, V. Srikantan, et el., *DNA Cell Biol.* 12 (1993) 799-805.
- [29] H.L. Davis, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 (1997) 635-646.
- [30] J. Hinkula, C. Svanholm, S. Schwartz, et al., *J Virol.* 71 (1997) 5528-5539.
- [31] Y. Nishimura, A. Kamei, S. Uno-Furuta, et al., *Vaccine* 18 (1999) 675-680.
- [32] A. Takashima, A. Morita, *J. Leukoc. Biol.* 66 (1999) 350-356.
- [33] A. Larsson, B.O. Milsson, *Scan. J. Immunol.* 27 (1988) 305-309.

- [34] S.A. White, A.F. LoBuglio, R.B. Arani, et al., *J. Gene Med.* 2 (2000) 135-140.

Figure Legends

Figure 1. Antibody response in mice intramuscularly immunized with CD54-encoding DNA (A) or CD147-encoding DNA (B). Groups of mice were immunized on days 0, 14, 28, 42 and 56 (solid lines) or single immunization at day 0 (dashed lines). Sera from blood drawn periodically were analyzed by indirect immunofluorescence and flow cytometry using CD54 and CD147 expressing U937 cells as antigens.

Figure 2. Antibody response in mice intrasplenic immunized with CD54-encoding DNA. Mice were single immunized on days 0 and sera from blood drawn periodically were analyzed by indirect immunofluorescence and flow cytometry using CD54 expressing U937 cells as antigens.

Figure 3. Immunofluorescence analysis of the reactivity of mAb MT54 with U937 (A), K562 (B), Daudi (C), Molt4 (D), Jurkat (E) and Sup T1 (F). Solid lines represent the immunofluorescence profiles of cells stained with indicated mAb and dashed lines represent background fluorescence of the negative control mAb.

Figure 4. Immunofluorescence analysis of the reactivity of mAb MT54 with lymphocytes (A), monocytes (B) and neutrophils (C). Solid lines represent the immunofluorescence profiles of cells stained with indicated mAb and dashed lines represent background fluorescence of the negative control mAb.

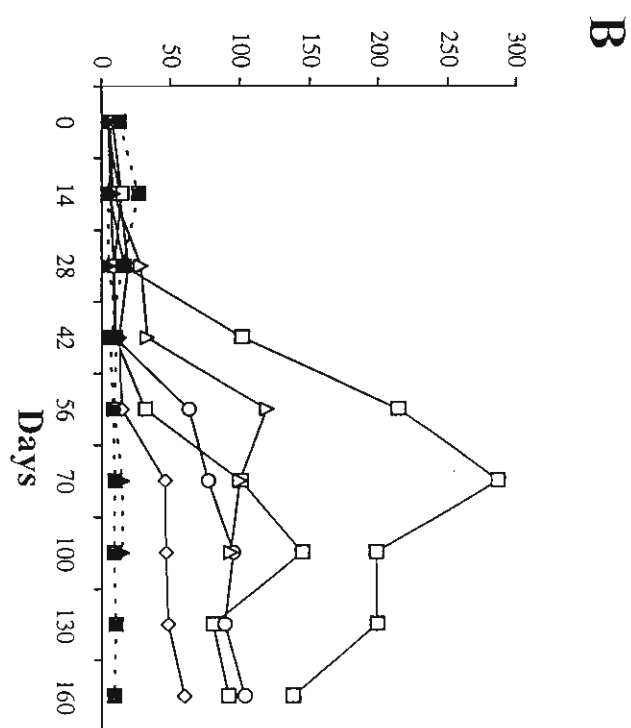
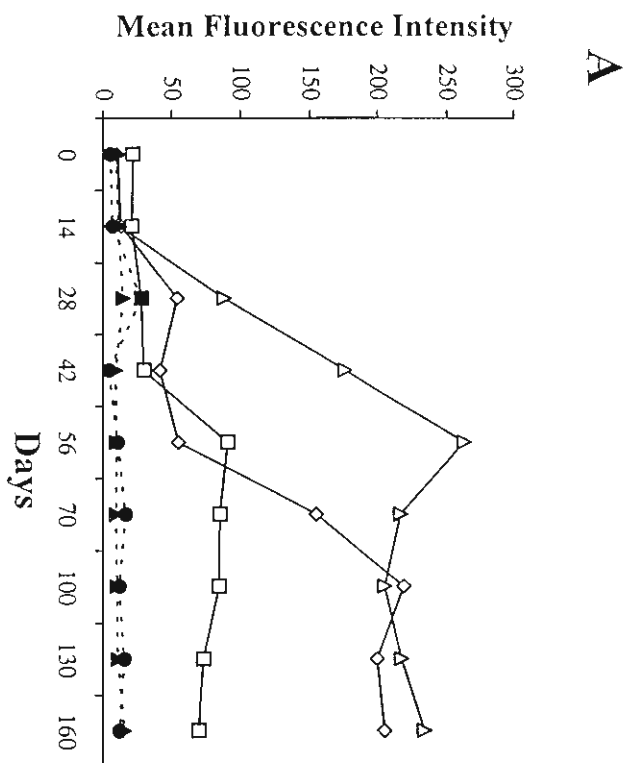


Fig. 1

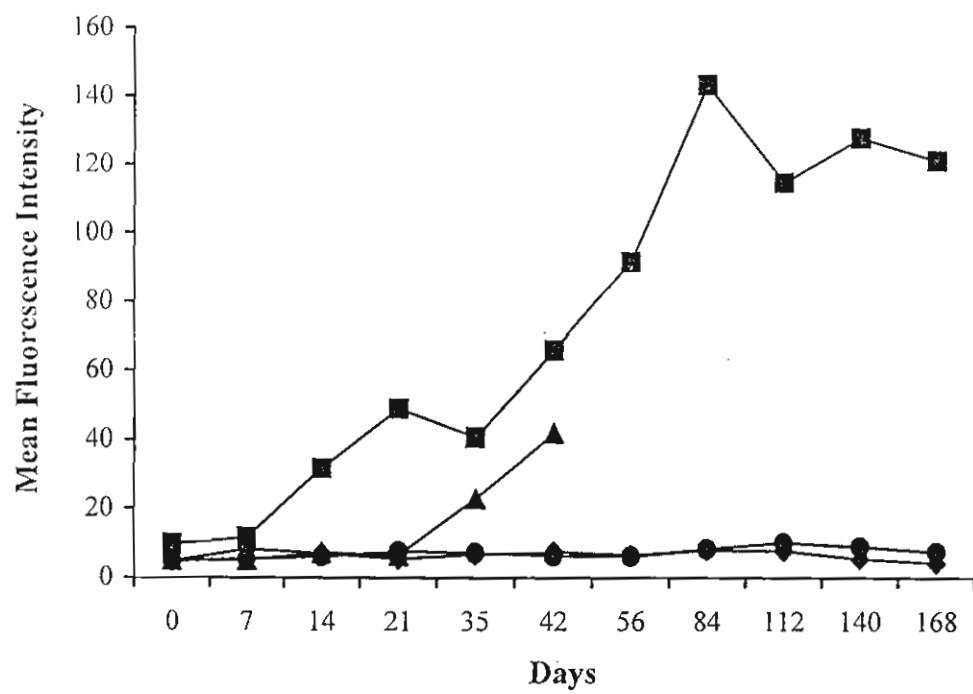


Fig. 2

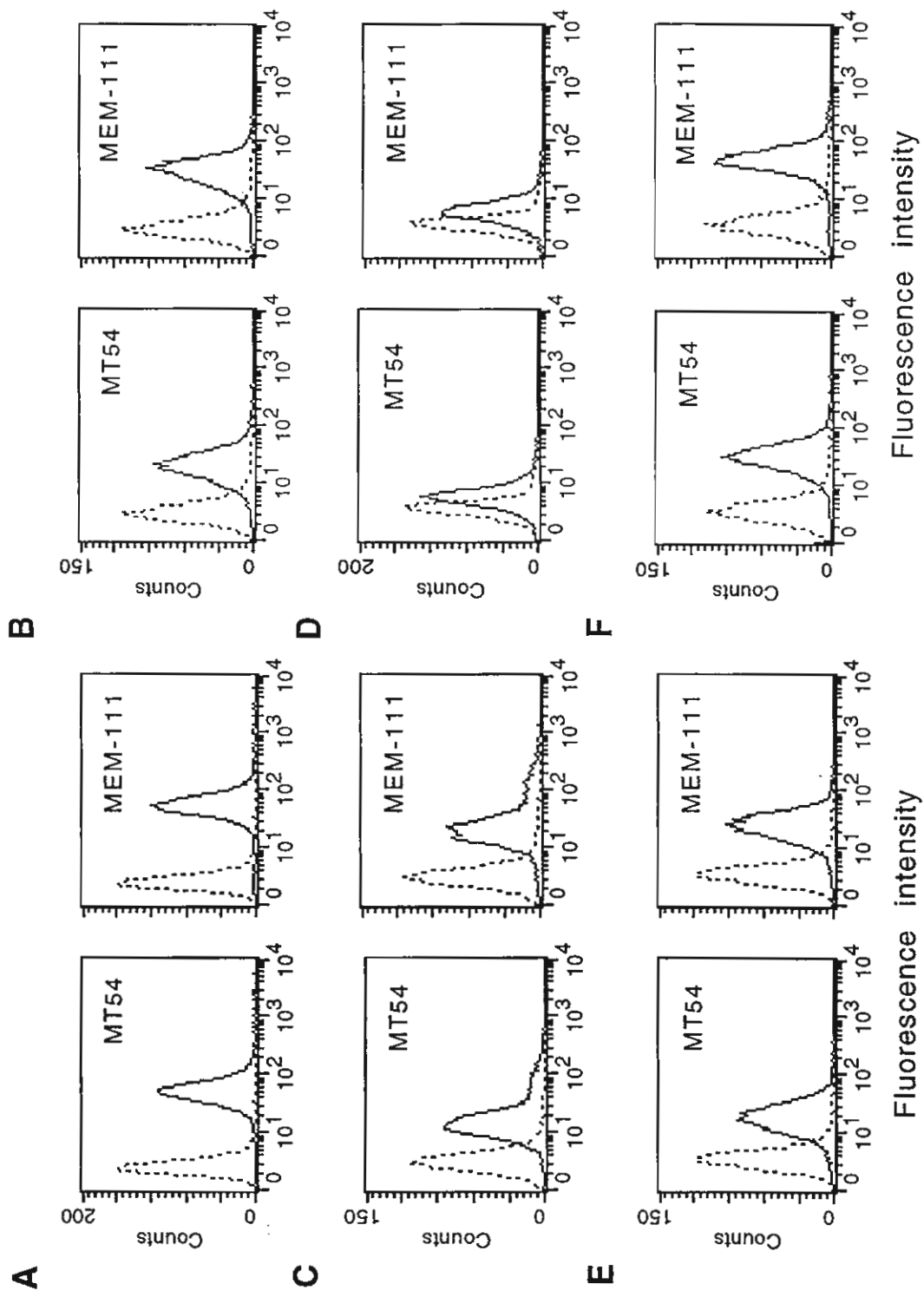


Fig. 3

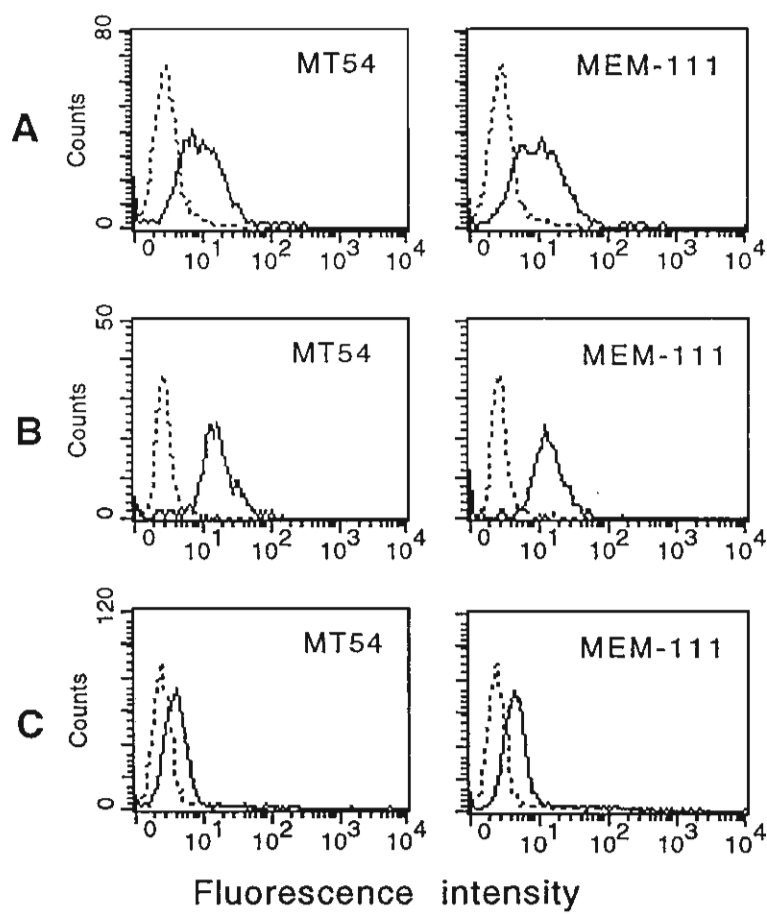


Fig.4

Production of Anti-CD14 Monoclonal Antibodies Using CD14 Expressing COS Cells as Immunizing Antigen

Seangduen Moonsom and Watchara Kasinrerak

Monocytes belong to the mononuclear phagocytic system, which is a cell lineage that originates in bone marrow and eventually transforms into tissue macrophages. The stages of development are: committed stem cell, monoblast, promonocyte, monocyte and macrophage.¹ Differentiation which gives rise to monocytes takes place in the bone marrow. The newly formed monocytes leave the bone marrow within 24 hours. They remain in the blood for about 36-104 hours and then leave the circulation to become tissue macrophages which may live for many months.² Monocytes and macrophages play an important role in both natural immunity and acquired immunity.^{3,4,5} They perform many of their functions in host defense prior to the development of specific immunity, including phagocytosis and cytokine production. These cells also function as both accessory and effector cells in acquired immune responses. They display foreign antigens on their

SUMMARY CD14 is a leukocyte surface molecule expressed on monocytes but not on lymphocytes. Recently, CD14 molecule was demonstrated to function as a receptor for endotoxin. CD14 specific monoclonal antibody (MAb), therefore, can be used to identify monocytes and study the host defense mechanism to bacterial endotoxin. To produce MAb against CD14 protein, in this study cDNA encoding CD14 protein and COS cell expression systems were used to prepare CD14 expressing COS cells. The CD14 transfectants were then used as antigen for mouse immunization. The spleen cells of the immunized mouse were then fused with myeloma cells by conventional hybridoma technique. By using this strategy, 5 hybridoma clones secreting antibody specific for CD14 molecule were generated within one fusion. The generated CD14 MAbs were strongly positive with monocytes, weakly positive with neutrophils but negative with lymphocytes. In addition, the generated CD14 MAb blocked the binding of lipopolysaccharide (LPS) to the CD14 molecules. These CD14 MAbs could be used to enumerate peripheral blood monocytes as well as using referent CD14 MAb. We, therefore, introduce an alternative method for preparation of antigen for production of monoclonal antibody. This type of antigen is a very effective antigen for the production of monoclonal antibodies against cell surface molecules.

surface in a form that can be recognized by antigen-specific T lymphocytes and express proteins and secrete various cytokines that promote T cell activation. Thus, monocytes/macrophages function as accessory cells in lymphocyte activation. After T lymphocyte activation, antigen-stimulated T lymphocytes secrete lymphokines that activate monocytes/macrophages.

Such activated mononuclear phagocytes are more efficient at performing phagocytic, degradative and cytotoxic functions than unstimulated cells, and are thus better able to destroy phagocytosed anti-

From the Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
Correspondence: Watchara Kasinrerak

gens. In the humoral immune responses, foreign antigens, such as microbes, become coated, or opsonized by antibody molecules and complement proteins. Monocytes and macrophages bind and phagocytose opsonized particles much more avidly than uncoated particles. Thus, mononuclear phagocytes also participate in the elimination of foreign antigens by humoral immune responses.

To identify monocytes, simple staining of cells with Giemsa or Romanovsky stains was used in routine laboratory work. However, small monocytes may be difficult to distinguish from lymphocytes. Monocytes also can be identified by using cytochemical methods. The most widely used cytochemical methods for identifying monocytes are reactions for non-specific esterases, NSE.^{6,7} However, NSE is present not only in all cells of the mononuclear phagocytic lineage but also in many other cell types including some T lymphocytes.⁶ In recent years, various monoclonal antibodies specific to monocytes have been generated.^{8,9} These monoclonal antibodies were used to stain peripheral blood cells by immunofluorescent technique and the stained cells were analyzed by flow cytometry. According to both size and granularity and the reactivity of the stained monoclonal antibody, monocytes present in the blood sample were easily identified by flow cytometer.¹⁰

The CD14 antigen is a glycosyl-phosphatidylinositol-linked single chain surface membrane glycoprotein with the molecular weight of 53-55 kDa.¹¹ It is strongly expressed on monocytes, macrophages, and weakly on neutro-

phils.¹¹ However, it is absent from T cells, null cells, red blood cells and platelets. Therefore, antibody to CD14 antigen was routinely used for identification of monocytes by flow cytometry.^{10,12} Recently, the CD14 molecule was demonstrated to function as a receptor for endotoxin (lipopolysaccharide; LPS).^{13,14} LPS binds to a serum protein, LBP (LPS-binding protein) which facilitates the binding of LPS to the CD14 molecule.^{13,14,15} When LPS binds to CD14 expressed by monocytes or neutrophils, the cells become activated and release cytokines such as TNF, IL-6 and IL-8^{13,15,16,17,18,19} and up-regulate cell surface molecules, including adhesion molecules.^{14,20} CD14 specific MABs, therefore, can be used to identify monocytes and study the host defense mechanism to bacterial endotoxin.

To produce monoclonal antibody against CD14 protein, in general, CD14 expressing cell lines or freshly isolated monocytes were used as antigen for mouse immunization and the spleen cells of immunized mouse were fused with myeloma for the generation of specific monoclonal antibody.^{16,21,22,23} Alternatively, in the present study, we used the COS expression system²⁴ to generate CD14 expressing COS cells. The CD14-COS cells were used as immunizing antigen for a generation of CD14 MABs. By this technique, 5 hybridomas producing CD14 MABs were generated within one fusion. The produced CD14 MABs strongly react with human monocytes, weakly react with granulocytes, but do not react with lymphocytes. These CD14 MABs can be used to enumerate monocytes as

well as referent CD14 MAB.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid DNA and antibodies

cDNA encoding CD14 protein, which was constructed into an eukaryotic expression vector, pCDM8 (designated CD14-DNA), was kindly donated by Dr. H. Stockinger, University of Vienna, Vienna, Austria. cDNA encoding CD147 protein, designated M6-DNA, was cloned in our laboratory.²⁵ Referent CD14 MAB, MEM18, was kindly provided by Dr. Horejsi, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Praha, Czech Republic. PE-labeled CD14 (Leu-M3) MAB and FITC-labeled CD45 (HLe-1) MAB were purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA). FITC-conjugated sheep F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulins antibodies were purchased from Immunotech (Immunotech/Coulter Corporation, Miami, FL).

DNA preparations

For large scale preparation of CD14-DNA, the plasmid DNA were transformed into competent *E. coli* MC1061/p3 and the resulting bacteria were grown with vigorous shaking in 250 ml LB broth per 1-liter flask. After overnight cultivation, cells were harvested and lysed by the alkaline lysis procedure according to the QIAGEN protocol (QIAGEN, Hilden, Germany). DNA were then purified by QIAGEN ion exchange column (QIAGEN). The concentration and purity of DNA preparation was determined by OD260/280 reading.

Expression of CD14 protein on COS cells

To express the CD14 protein on COS cells, the CD14-DNA was transfected into COS cells using the modified DEAE-Dextran transfection method.²⁵ Briefly, 1×10^6 COS cells were transferred to 6 cm tissue culture dishes (NUNC, Roskilde, Denmark) on the day before transfection. Cells were transfected in 2 ml of MEM containing 250 μ g/ml DEAE-Dextran, 400 μ M chloroquine diphosphate and 2 μ g DNA. After 3 hours at 37°C, the transfection mixture was removed and the cells were treated with 10% DMSO in PBS for 2 minutes at room temperature. COS cells were then cultured overnight in MEM containing 10% FCS, washed once, and re-cultured with the same medium for another 2 days to allow expression of the encoded proteins.

Production of monoclonal antibody to CD14 protein

A BALB/c mouse was intraperitoneally immunized three times at two-week intervals with 1×10^7 CD14-DNA transfected COS cells. A booster immunization was followed two-weeks after the third immunization by intravenous injection of 1×10^6 CD14-DNA transfected COS cells. The animal was sacrificed 3 days after the booster and the spleen was removed. Spleen cells were then fused with myeloma cells X63-Ag8.653 using 50% PEG. After that, cells were resuspended with HAT medium containing 10% BM combined medium (Boehringer Mannheim, Germany) and distributed into 96 wells of 96 well-plates. Two weeks later, hybridomas were identified

by an inverted microscope. Cell culture supernatants from hybridoma-containing wells were screened for antibody against CD14 protein. The positive clone was re-cloned two rounds by limiting dilution.

Screening for CD14 specific monoclonal antibody

Hybridoma cell culture supernatants were firstly analyzed by indirect immunofluorescence using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as antigens. The stained cells were analyzed by flow cytometry. The supernatants which had shown positive reactivity with monocytes but negative or weakly positive with lymphocytes were screened further for antibody specific to CD14 protein by the same technique but using CD14-DNA transfected COS cells as antigens and analyzed by a fluorescent microscope. In all experiments, COS cells transfected with cDNA encoding unrelated protein (CD147) were used as negative control.

Indirect immunofluorescence analysis

The specificity of antibody against CD14 protein was assessed by indirect immunofluorescence using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated sheep anti-mouse immunoglobulin antibodies (Immunotech). PBMCs were firstly isolated from heparinized blood of healthy donors by density gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque solution (Sigma, St. Louis, MO). PBMCs were then washed 3 times with PBS and adjusted to 1×10^7 cells/ml with 1% BSA-PBS-0.02% sodium azide. To block the non-specific Fc receptor mediated binding of the antibodies, cells

were incubated for 30 minutes at 4°C with 10% human AB serum before staining. Fifty microliters of blocked cells were then incubated for 30 minutes at 4°C with hybridoma culture supernatants or MAb. After washing twice, cells were incubated with the FITC-conjugate for another 30 minutes. Membrane fluorescence was analyzed by a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA). Individual populations of blood cells were gated according to their forward and side scatter characteristics.

Determination of isotypes of monoclonal antibody

The isotypes of MAbs were determined by capture ELISA (Sigma) in accordance with the recommended protocol. Goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA and IgM were used as capture antibodies, and peroxidase conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (Dako, Glostrup, Denmark) were as used as conjugate. The reactivity was visualized by using 3',3',5',5'-tetramethylbenzidine (TMB) as substrate.

Inhibition of referent CD14 monoclonal antibody binding by generated CD14 monoclonal antibodies

PBMCs were pre-incubated with supernatant containing CD14 MAbs or irrelevant MAb for 30 minutes on ice. PE-labeled CD14 MAb Leu-M3 (Becton Dickinson) or FITC-labeled CD45 MAb HLe-1 (Becton Dickinson) was then added to the pre-stained cells, and incubated for another 30 minutes. Membrane fluorescence was analyzed by a flow cytometer.

The percent inhibition of fluorescence intensity was calculated from the mean fluorescence intensity (MFI) of the sample in the presence and absence of the first unlabeled MAb.

Inhibition of LPS binding to CD14 molecule by generated CD14 monoclonal antibody

CD14 MAb, MT14/3, was purified from ascites by using anti-mouse IgG coated sepharose column (Zymed Laboratory Inc., San Francisco, CA) in accordance with the recommended protocol.

To study the effect of generated CD14 MAb on LPS binding, PBMCs were incubated with 50% autologous plasma for 30 minutes at 4°C. PBMCs were then pre-incubated with purified MT14/3 MAb or OKT3 (anti-CD3 MAb; Ortho Diagnostic System Inc., Raritan, NJ) for 30 minutes on ice. FITC-labeled LPS (Sigma) was then added, and incubated for another 60 minutes. The membrane fluorescence of monocytes was analyzed by a flow cytometer.

RESULTS

Preparation of plasmid DNA encoding CD14 protein and expression of CD14 on COS cell membrane

Plasmid DNA encoding CD14 protein, named CD14-DNA, were transformed into *E. coli* MC 1061/p3. The plasmid DNA were then isolated from the transformed bacteria by QIAGEN ion exchange chromatography and the DNA yields were determined by the OD 260/280 reading after completion of all the purification steps. The

OD 260/280 ratios of isolated plasmid DNA was 1.82, indicating the purity of the isolated DNA.²⁶ The yield of isolated CD14-DNA was 2.8 mg/liter of starting bacteria.

To verify whether the isolated CD14-DNA can be expressed to the encoded protein in eukaryotic cells, the isolated DNA was transfected into COS cells and analyzed for CD14 protein expression by indirect immunofluorescence using referent CD14 MAbs, MEM-18 and Leu-M3. As shown in Table 1, COS cells which were transfected with CD14-DNA showed a very strong positive reaction with both MEM-18 and Leu-

M3, but negative with an irrelevant CD147 MAb.²⁷ The percentage of CD14 expressing COS cells obtained from this CD14-DNA transfection was approximately 60-70%. These results indicated that the CD14-DNA and the transfection method used effectively induced CD14 protein expression on COS cell membrane.

Production of monoclonal antibodies to CD14 protein using CD14 expressing COS cells as antigen

To generate hybridoma producing CD14 MAb, we first prepared CD14 expressing COS

Table 1 Expression of CD14 protein on CD14-DNA transfected COS cells

COS transfectants	Immunofluorescent reactivity		
	Anti-CD14 MAb		Anti-CD147 MAb
	MEM-18	Leu-M3	M6-1D4
CD14 COS	+	+	-
M6 COS	-	-	+

COS cells were transfected with CD14-DNA or M6-DNA by DEAE-Dextran transfection technique. The transfected cells were stained with CD14 MAbs, MEM-18 and Leu-M3 or CD147 MAb, M6-1D4. Immunofluorescent reactivity was analyzed by a fluorescence microscope.

Table 2 Flow cytometric immunophenotyping of monocyte population, comparison of results between MT14/1, MT14/2, MT14/3, MT14/4 and referent anti-CD14 MAb MEM-18

Donor no.	Monoclonal antibody				
	MT14/1	MT14/2	MT14/3	MT14/4	MEM-18
1	95	95	95	95	96
2	95	95	97	94	97
3	92	95	97	97	98
4	94	94	92	96	96
5	91	94	96	92	94

cells by transfection of COS cells with CD14-DNA. After 3 days, approximately 70% of the transfected COS cells were strongly positive with CD14 MAb, MEM-18. These CD14-expressing COS cells were then used as antigen for mouse immunization. Spleen cells of an immunized mouse were fused with myeloma cells as per the conventional hybridoma technique. A total of 612 hybridoma clones was identified from 960 wells. By indirect immunofluorescent technique, cell culture supernatants from 12 of 612 wells contained antibodies which reacted to monocytes, but did not, or reacted weakly to lymphocytes. To screen further for hybridomas that produced CD14 specific antibody, all 12 positive supernatants were tested again by the same technique, but CD14-DNA transfected COS cells

were used as the antigen. Five out of 12 culture supernatants reacted with CD14 expressing COS cells, but not with mock CD147 transfectants. The hybridomas in these positive wells were then re-cloned two rounds by limiting dilution. The final clones which gave positive reactivity with CD14 expressing transfectants but negative to mock transfectants were propagated and re-named MT14/1, MT14/2, MT14/3, MT14/4 and MT14/5, respectively. MT14/1, MT14/2, MT14/3, MT14/4 and MT14/5 MAb were IgG1, IgG2b, IgG1, IgG1 and IgM isotypes, respectively.

After single cell cloning, all generated hybridoma clones were grown at a high density and the culture supernatants were collected for further studies. However,

a hybridoma clone, MT14/5, stopped producing antibody. Therefore, this MT14/5 clone was discarded.

Characterization of the specificity of generated CD14 MAb

To confirm the specificity of generated MAb, all MT14 MAb were used to stained monocytes, granulocytes and lymphocytes isolated from 5 healthy donors by indirect immunofluorescence, and analyzed by flow cytometry. As predicted, all generated MT14 MAb strongly reacted to monocytes, weakly reacted to granulocytes and were negative with lymphocytes. The reaction patterns were absolutely identical to those obtained by using reference CD14 MAb, MEM-18. The typical FASC profiles of MT14 and MEM-18

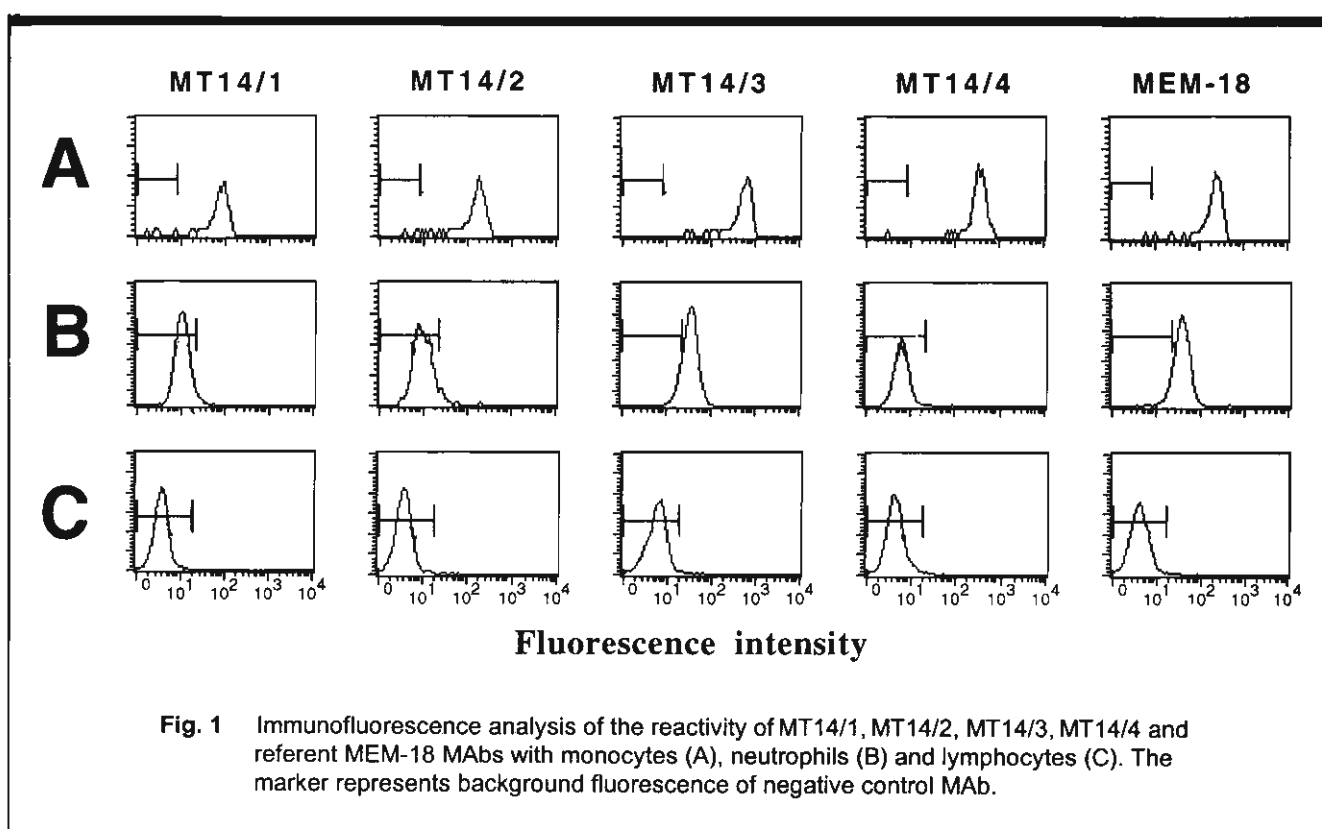


Fig. 1 Immunofluorescence analysis of the reactivity of MT14/1, MT14/2, MT14/3, MT14/4 and referent MEM-18 MAb with monocytes (A), neutrophils (B) and lymphocytes (C). The marker represents background fluorescence of negative control MAb.

CD14 transfectants were then used to immunize mouse and spleen cells were then fused with myeloma by conventional hybridoma technique. After fusion, the hybridoma culture supernatants were screened using CD14 transfectant COS cells and mock transfectant cells as antigens. By this screening procedure, supernatants from 5 hybridoma clones showed positive reactivity with CD14 transfectants but not to mock transfectants. With peripheral blood cells, these five antibodies strongly reacted to monocytes, weakly reacted to neutrophils, but did not react to lymphocytes. The staining patterns, together with the transfectant experiments, indicated that the generated MAb is specific to CD14 protein. Obtaining 5 hybridoma clones produced antibodies to a surface molecule within one fusion is unusual. Our experiment, therefore, demonstrated that the high efficiency COS cell expression system can be used to produce very good antigen for production of monoclonal antibody. In addition to CD14 MAb, using the same strategy, 3 clones of anti-CD99 MAb were also produced in our laboratory (data not shown).

After 2 rounds of single cell cloning, however, a hybridoma clone termed MT14/5 stopped producing antibody. The cessation of antibody producing by hybridomas due to their having an unstable assortment of chromosomes has been described.³⁰ The epitope recognized by the generated CD14 MAb was analyzed using the inhibition test. One of the generated MAb, named MT14/3, completely inhibited the binding of referent CD14 MAb Leu-M3.^{22,23} This result indicated that MT14/3

MAb may react to CD14 molecule at the same or at a very close epitope of that recognized by referent CD14, Leu-M3, MAb. Leu-M3 was an anti-CD14 MAb derived from the hybridization of mouse Sp2/0 myeloma cells with spleen cells of BALB/c mice immunized with peripheral blood monocytes from a patient with rheumatoid arthritis.²² This MAb was now used as a LeukoGate reagent in SIMULTEST reagent kit developed by Becton Dickinson. In contrast to MT14/3, MT14/4 MAb enhanced the binding of Leu-M3 MAb with an unknown mechanism. This enhancement effect was also observed in the CD147 system.³¹

A series of studies was performed to analyze the function of the CD14 molecule and indicated that CD14 functioned as a receptor for LPS.^{13,14,15} LPS was shown to bind to CD14, a process mediated by the plasma protein LBP, and blockade of the CD14 molecule with some anti-CD14 MAb prevented LPS induced TNF release by monocytes.^{13,15} We therefore raised the question whether our generated CD14 MAb bind to the epitope which is involved in LPS binding. To address this question, monocytes were incubated with autologous plasma, which used as a source of LBP, in the presence of CD14 MAb and FITC-labeled LPS. It was found that the generated CD14 MAb, MT14/3, inhibited LPS binding. In the same experiment, the isotype matched control showed no effect on LPS binding. These results indicated that MT14/3 MAb recognizes an epitope on CD14 which is involved in LPS binding.

In conclusion, in the present study, we introduce an alternative method for preparation of antigen for immunizing mice in the production of monoclonal antibody. We used the high-efficiency COS cell expression system to induce the over expression of the protein of interest on COS cell surface. This type of antigen was shown to be a very effective antigen for the production of monoclonal antibody against cell surface molecules. Using this type of antigen, we could produce 5 MAb directed against CD14 protein within one fusion. This strategy is, therefore, very efficient in production of monoclonal antibody against any cell surface protein when cDNA clone is available.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Thailand Research Fund, the National Science and Technology Development Agency of Thailand and by the Ministry of University Affairs. S. Moonsom is a research assistant supported by The National Science and Technology Development Agency of Thailand (NSTDA). The authors would like to thank Dr. H. Stockinger for providing the cDNA encoding CD14 protein.

REFERENCES

1. Lasser A. The mononuclear phagocytic system. *Human Pathol* 1983; 14: 108-26.
2. van Furth R. Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology. Oxford: Blackwell Scientific, 1975.
3. Johnston RB. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 1988; 318: 747-52.
4. Zembala M, Asherson GL. Human monocytes. London: Academic Press Limited, 1989.

5. Tizard IR. Immunology. 4th ed. New York: Saunderson College Publishing, 1995.
6. Stachura J. Cytochemistry of monocytes and macrophage. In: Zembala M, Asherson GL, eds, Human monocytes. London: Academic Press Limited, 1989; p. 27-36.
7. Koski IR, Poplack DG, Blaese RM. A non-specific esterase stain for the identification of monocytes and macrophages. In: Bloom BR, David JR, eds, *In vitro* methods in cell-mediated and tumor immunity. New York: Academic Press, 1976; p. 359-62.
8. Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGK. Leukocyte typing IV. Oxford: Oxford University Press, 1989.
9. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein RL, Springer TA, Tedder TF, Todd RF. Leukocyte typing V. New York: Oxford University Press, 1994.
10. Montaner LJ, Collin M, Herbein G. Human monocytes: Isolation, cultivation, and applications. In: Herzenberg LA, Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, eds, Weir's handbook of experimental immunology. Volume IV: The integrated immune system. 5th ed. Oxford: Blackwell Science, 1996; 155: 1-11.
11. Gadd S. Cluster report: CD14. In: Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGK, eds, Leukocyte typing IV. Oxford: Oxford University Press, 1989; p. 787-9.
12. Kasinrerk W, Baumruker T, Majdic O, Knapp W, Stockinger H. CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1993; 150: 579-84.
13. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-3.
14. Hailman E, Lichensrein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994; 179: 269-77.
15. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249: 1429-31.
16. Goyert SM, Haziot A, Jiao D, Katz IR, Kruger C, Ross J, Schitt C. CD14 cluster workshop report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein RL, Springer TA, Tedder TF, Todd RF, eds, *Leukocyte typing V*. New York: Oxford University Press, 1994, p. 778-90.
17. Baggiolini M, Dewald B, Walz A. Interleukin-8 and related cytokines. In: Gallin JI, Goldstein IM, Synderman R, eds, *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1992, p. 247-63.
18. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *Immunol Today* 1990; 11: 443-9.
19. Koj A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biophys Acta* 1996; 1317: 84-94.
20. Pohlman TH, Harlan JM. Endotoxin-endothelial cell interaction. In: Morrison DC, Ryan JR, eds, *Bacterial endotoxic lipopolysaccharide*. Vol 1: Molecular biochemistry and cellular biology. Boca Raton: CRC Press, 1992, p. 347-71.
21. Goyert S, Tesio L, Ashman L, Ball E, Basil V, Garrido F, Hogg N, Horejsi V, Howell A, Jayaram Y, Look AT, Ruiz-Caballo F, Schmitt D, Schneider M, van der Schoot CE. Report on CD14 cluster Workshop. In: Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGK, eds, *Leukocyte typing IV*. Oxford: Oxford University Press, 1989, p. 789-94.
22. Dimitriu-Bona A, Burmester G, Waters S, Winchester R. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983; 130: 145-52.
23. Herrmann F, Komischke B, Odenwald E, Ludwig WD. Use of monoclonal antibodies as a diagnostic tool in human leukemia. I. Acute myeloid leukemia and acute phase of chronic myeloid leukemia. *Blut* 1983; 47: 157-63.
24. Aruffo A, Seed B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 8573-7.
25. Kasinrerk W, Fiebinger E, Stefanova I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the immunoglobulin superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin and chicken HT7 molecule. *J Immunol* 1992; 149: 847-54.
26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
27. Kasinrerk W, Tokrasinwit N, Phunpae P. CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. *Immunol* 1999; 96: 184-92.
28. Seed B. An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* 1987; 329: 840-42.
29. Kasinrerk W. Transfection of gene into eukaryotic cells by DEAE-Dextran transfection. *J Med Tech Assoc Thailand* 1990; 18: 105-8.
30. Harlow E, Lane D. Monoclonal antibodies. In: Harlow E, Lane D, eds, *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, p. 139-242.
31. Stockinger H, Ebel T, Hansmann C, Koch C, Majdic O, Prager E, Patel DD, Fox DA, Horejsi V, Sagawa K, Shen DC. CD147 (neurothelin/basigin) workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Borne AEGK, Goyert SM, Mason D, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer T, Sugamura K, Zola H, eds, *Leukocyte typing VI*. New York: Garland Publishing, 1997, p. 76-9.

XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology

Sydney Australia • 15-20 October 2000

**Registration
and call for papers**

**Now available on the web
www.allergy.org.au**

Abstract deadline March 31, 2000



To request printed copies contact
ICACI Congress Secretariat
Fax +61 2 9290 2444
Email icaci@icms.com.au

In conjunction with
the Asian Pacific Association of
Allergology and Clinical
Immunology and the West Pacific
Allergy Symposium

CD99 monoclonal antibody induce homotypic adhesion of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathway

Watchara Kasinrerks^{a,*}, Niramons Tokrasinwits^{a,1}, Seangdeun Moonsoms^{1 a},
Hannes Stockinger^b

^a Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^b Institute of Immunology, Vienna International Research Cooperation Center at NFI, University of Vienna, Brunner Strasse 59, 1235 Vienna, Austria

Received 21 September 1999; accepted 26 October 1999

Abstract

CD99 is a 32 kDa cell surface glycoprotein which is involved in cell adhesion. Engagement of the CD99 molecule by CD99 monoclonal antibodies has been shown to induce homotypic aggregation of various cell types. By using a newly established CD99 monoclonal antibody, MT99/3, we show here that LFA-1/ICAM-1 independent cell adhesion pathways are activated via CD99. Engagement of the CD99 molecule by MT99/3 induced homotypic cell aggregation of Jurkat T-cells within 30 min reaching its maximal level within 4 h. The Jurkat cell aggregation was not blocked by addition of CD11a (LFA-1) and CD54 (ICAM-1) mAbs. Furthermore, MT99/3 treatment did not alter the expression of LFA-1 and ICAM-1 molecules. Induction of Jurkat homotypic aggregation by MT99/3 was, however blocked by the protein kinase C inhibitor, sphingosine, the protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, and by actin filament polymerization blocking agent, cytochalasin B. Thus, these observations suggest that CD99 can mediate β 2-integrin independent cell adhesion that depends on activation of protein kinases and reorganization of the cytoskeleton. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: CD99; Cell adhesion; Protein kinase C; Protein tyrosine kinase

1. Introduction

Lymphocyte adhesion is one of the critical steps in the regulation of immune processes involving cellular localization, effector recognition, and activation phenomena. Engagement of various cell surface molecules with natural ligands or specific antibodies, such as CD147, CD99, CD43, CD14, CD9 or CD4, has been demonstrated to induce leukocyte homotypic aggregation [1–7]. Some of these adhesion events seem to be mediated by the LFA-1/ICAM-1 pathway [1,3–5,7] as

the LFA-1 or ICAM-1 monoclonal antibodies (mAbs) block homotypic cell aggregation triggered via these molecules. The current hypothesis is that the engagement of these molecules would induce an ‘inside-out’ signal that increases the affinity and/or level of leukocyte integrins for their ligand(s) [8].

The CD99 (E2 or MIC2) molecule is a leukocyte surface protein with a molecular weight of 32 kDa encoded by the MIC2 gene [9]. Sequence analysis of the cDNA indicates that CD99 is a cell membrane glycoprotein that does not belong to any known family of proteins [10–12]. The extracellular domain is glycosylated with O-linked sugars followed by a putative transmembrane domain and a short cytoplasmic domain [12]. Although the function of the CD99 molecule is still unclear, it has been implicated in two processes: cell adhesion and cell death. In T-cell adhesion events, CD99 mAbs blocked spontaneous T-cell rosette forma-

* Corresponding author. Tel.: +66-53-945080; fax: +66-53-221890.

E-mail address: watchara@chiangmai.ac.th (W. Kasinrerks).

¹ N. Tokrasinwits and S. Moonsoms are researchers supported by The Thailand Research Fund (TRF) and The National Science and Technology Development Agency of Thailand (NSTDA), respectively.

tion [13,14]. Furthermore, CD99 mAbs were shown to induce homotypic aggregation of double positive (CD4 + CD8 +) thymocytes [2], T-cell lines [2] and B-cell line [3]. Recently, a truncated form of the CD99 molecule, named CD99 type II, was described [3]. Overexpression of the truncated form of CD99 inhibited cell adhesion. Apoptosis induced via the CD99 molecule has also been demonstrated [15]. This apoptosis induction is not followed by detectable DNA fragmentation, and does not belong to the Fas/CD95 pathway. Because of these cellular events induced via CD99, the molecule was proposed to be important for developmental processes such as hematopoietic cell differentiation [15,16].

In the present study, we analyzed the molecular mechanism underlying CD99 mediated cell adhesion. A newly established unique CD99 mAb, MT99/3, induced homotypic cell aggregation of Jurkat cells via a LFA-1/ICAM-1 independent pathway. The Jurkat cell aggregation induced by the CD99 mAb was inhibited by the protein kinase C (PKC) inhibitor, sphingosine, the protein tyrosine kinase (PTK) inhibitor, genistein, and the actin filament polymerization blocking agent cytochalasin B.

2. Materials and methods

2.1. Cells and cell lines

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized whole blood from healthy donors by density gradient centrifugation over Ficoll–Hypaque solution (Sigma, St. Louis, MO). Neutrophils were isolated by centrifugation through Ficoll–Hypaque density gradients followed by dextran sedimentation. Cells were washed three times with PBS and used for immunophenotyping. Human T-cell lines (Jurkat, Molt4 and Sup T1), a monocytic cell line (U937), and an erythroid–myeloid cell line (K562) were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY), 40 µg/ml gentamicin and 2.5 µg/ml amphotericin B in a humidified atmosphere of 5%CO₂ at 37°C. COS7 cells were cultured in MEM (Gibco) containing 10% FBS and antibiotics.

2.2. Reagents and antibodies

Cytochalasin B, genistein and sphingosine were purchased from Sigma. All reagents were dissolved in DMSO (Sigma). CD4 mAb MT4 (IgM isotype) [17] as well as isotype matched mAb P-3E10 (IgG2a) recognizing an un-defined cell surface molecule were generated in our Department. CD11a mAb MEM-25 (IgG1) and CD54 mAb MEM-111 (IgG2a) were kindly provided

by Dr Vaclav Horejši (Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic). CD11a mAb H1111 (IgG1) and CD54 mAb HA58 (IgG1) are phycoerythrin (PE) conjugates kindly provided by Becton Dickinson (Thailand). PE conjugated X40, an anti-Keyhole limpet hemocyanin (KLH) mAb, from Becton Dickinson, was used as isotype matched negative staining control.

For purification of the mAbs, affinity chromatography was used. IgM isotype mAbs were purified from ascites by using an anti-mouse IgM coated sepharose column (Zymed Laboratory, San Francisco, CA) according to the method described elsewhere [18]. IgG isotype mAbs were purified by using a protein A coated sepharose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

2.3. Isolation of the cDNA coding for the CD99 molecule

The cDNA encoding the CD99 molecule was isolated essentially by using 'Brian Seed's eukaryotic expression cloning system' [19] and a one round panning technique described previously [20]. Briefly, thirty dishes of COS cells were transfected with a cDNA expression library prepared from the human T-cell line HPB-ALL by the DEAE-dextran transfection method. Three days after transfection, cells were panned with CD99 mAbs on dishes coated with sheep F(ab')₂ anti-mouse Ig antibodies. Episomal DNA was collected from the adherent cells by the Hirt procedure and transformed into *E. coli*. Seventy bacteria colonies were separately grown in a 5-ml liquid culture overnight. Then 1.5 ml of ten bacterial suspensions were pooled and one-third of the isolated plasmid DNA was transfected into COS cells. After 2 days, COS cells were stained with CD99 mAb by the indirect immunofluorescence technique and analyzed by microscopy. Plasmid DNA of the individual colonies of the CD99 positive pools were again transfected into COS cells and re-analyzed.

For nucleotide sequencing, the cDNA insert was subcloned into pBS(+/–) phagemid (Stratagene, La Jolla, CA). Double-stranded DNA was sequenced according to the dideoxynucleotide chain-termination method, using T7, T3 and internal oligonucleotide primers.

2.4. Hybridoma production

A female BALB/c mouse was intraperitoneally immunized three times at a 2-week interval with 1×10^7 CD99 transfected COS cells. After three immunizations, mice were intravenously boosted with 1×10^6 transfectants. Splenocytes were collected and fused with P3-X63Ag8.653 myeloma cells by a standard hybridoma technique using 50% polyethylene glycol. After HAT medium selection, culture supernatants were

firstly analyzed for antibody reactivity against U937 cells using indirect immunofluorescence assay. The positive supernatants were then differentially screened for CD99 specificity using CD99 transfected COS cells. By this procedure, CD99 mAb MT99/3, which is of the IgG2a isotype, was obtained.

2.5. Immunofluorescence analysis

Cells were analyzed by indirect immunofluorescence using FITC-conjugated sheep F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulin antibodies (Immunotech/Coulter Corporation, Miami, FL). To block nonspecific Fe-receptor-mediated binding of mAbs, cells were pre-incubated for 30 min at 4°C with 10% human AB serum before staining. Membrane fluorescence was analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) flow cytometer. Individual populations of blood cells were gated according to their forward and side scatter characteristics.

2.6. Labeling of cell surface proteins and immunoprecipitation

For surface labeling, cells were biotinylated by using Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, Rockford, IL) (5 mM) for 1 h at 4°C. The reaction was quenched by washing the cells once with 1 mM glycine in PBS and then twice with PBS. Cells (5×10^7) were solubilized in 1 ml lysis buffer (1% NP-40, 50 mM Tris-HCl pH 8.2, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM iodoacetamide, 1 mM PMFS, and 10 µg/ml aprotinin). Cell lysates were pre-cleared with protein A-sepharose beads coated with mouse immunoglobulins. Pre-cleared lysates were then mixed with purified mAb coated protein A-sepharose beads for 24 h at 4°C. After immunoprecipitation and SDS-PAGE, biotinylated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with 5% skimmed milk in PBS for 1 h at room temperature. The blocked membrane was incubated for 1 h at room temperature with avidin-peroxidase (Dako, Glostrup, Denmark), and the biotinylated proteins were visualized by the chemiluminescence detection system (Pierce).

2.7. Homotypic cell aggregation assay

Jurkat cells were washed three times with RPMI-1640 medium and resuspended to a concentration of 2.5×10^6 cells/ml with RPMI-1640 supplemented with 10% FBS and antibiotics. One hundred microliters of cell suspension was then distributed into 96 well flat-bottomed microplates (NUNC). mAbs were added to each well to a final concentration of 2.5 µg/ml to obtain the total volume of 200 µl. Plates were incubated in a CO₂ incubator and examined for homotypic cell aggregation

under a phase-contrast inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at various time points. The degrees of cell aggregation were scored as follows: 0, no aggregation (>90% of cells were unaggregated); 1+, the majority of cells were un-aggregated, but a few small clusters of <20 cells were observed (this level of adhesion is typical of the spontaneous adhesion exhibited by many lymphoblastoid cell lines including Jurkat); 2+, 50% of cells were in medium-sized aggregates (20–50 cells), with the remainder as single cells; 3+, nearly all cells were in medium-sized to large aggregates (>50 cells) with only a few (<20%) unaggregated cells; and 4+, >90% of the cells were in large aggregates. Photographs were taken with an Olympus camera under an inverted microscope.

In order to study the effect of LFA-1 and ICAM-1 antibodies on CD99 mediated cell aggregation, purified mAbs to CD11a (MEM-25) and CD54 (MEM-111) were added into wells containing Jurkat and CD99 mAb MT99/3. Cell aggregation was then determined and scored as described above.

To study the effect of cytochalasin B or genistein on CD99 mAb induced cell aggregation, Jurkat cells were cultured with purified MT99/3 (2.5 µg/ml) in the presence or absence of cytochalasin B or genistein for 4 h. To study the effect of sphingosine, Jurkat cells were pre-incubated with sphingosine at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 15 min. Cells were washed twice and re-cultured with purified MT99/3 mAb.

2.8. LFA-1 and ICAM-1 expression on CD99 mAb treated Jurkat

Jurkat cells were incubated with or without 2.5 µg/ml of CD99 mAb MT99/3 for 30 min, 1, 2 and 4 h in a CO₂ incubator at 37°C. Cells were then washed once and stained with PE-labeled mAbs HI111(CD11a), HA58 (CD54) and X40 (isotype matched control). Stained cells were analyzed by a flow cytometer.

3. Results

3.1. Isolation of a CD99 cDNA clone and production of a CD99 mAb

To isolate the cDNA encoding the CD99 protein, a high-efficiency COS cell expression system was employed [19]. By using this technique, a cDNA clone, termed H11, was isolated from a HPB-ALL library. The nucleotide sequence of the insert was partially determined and compared with the EMBL nucleotide database. This comparison indicated that the H11 cDNA insert was identical to the cDNA of CD99.

To generate new CD99 mAbs, a mouse was immunized with H11 plasmid transfected COS cells and

spleen cells from the immunized mouse were fused with myeloma cells using the standard hybridoma technique. The specificity of the antibodies secreted by the hybridomas was determined by indirect immunofluorescence using CD99 transfected COS cells. By this screening, a CD99 mAb, designated MT99/3 (IgG2a isotype), which strongly bound to CD99 transfectants but not bound to mock or any other transfectants was obtained. To confirm that MT99/3 is a CD99 mAb, the reactivity of this mAb to various cell lines and peripheral blood cells was studied and compared with reported reactivity of established CD99 mAbs. All cell lines tested including the human monocytic cell line U937, the erythroid/myeloid cell line K562 and the T-cell lines Jurkat, Sup T1 and Molt4 were positive with MT99/3 (Fig. 1). With peripheral blood mononuclear cells, the MT99/3 mAb bound to lymphocytes and monocytes but not to neutrophils ($n = 7$) (Fig. 2A–C). Red blood cells of seven healthy donors were also studied for staining by MT99/3. Red blood cells from five donors were positive (Fig. 2D), and these from two donors were negative (Fig. 2E). All of these staining patterns were similar to those found in previous studies using CD99 mAbs [12

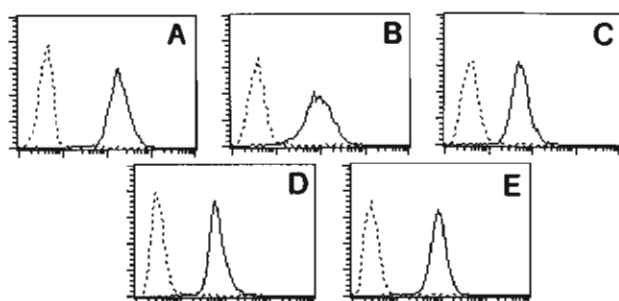


Fig. 1. Immunofluorescence analysis of the reactivity of mAb MT99/3 with U937 (A), K562 (B), Jurkat (C), SupT1 (D) and Molt4 (E) cells. Solid lines represent the immunofluorescence profiles of cells stained with MT99/3 mAb and dashed lines represent background fluorescence of the negative control mAb.

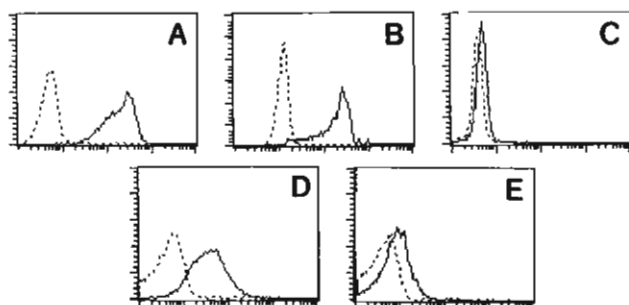


Fig. 2. Immunofluorescence analysis of the reactivity of mAb MT99/3 with peripheral blood lymphocytes (A), monocytes (B) neutrophils (C), red blood cells which show positive (D) and negative (E) reactivity, respectively. Solid lines represent the immunofluorescence profiles of cells stained with MT99/3 mAb and dashed lines represent background fluorescence of the negative control mAb.

14,21–23]. Together with the transfectant experiments, these results indicate that MT99/3 is a CD99 mAb.

These data were confirmed by biochemical characterization of the cell surface antigen recognized by MT99/3. mAb MT99/3 precipitated a broad protein band of ≈ 27 –34 kDa from lysates of surface-biotinylated Jurkat cells (Fig. 3). This broad zone contained a major protein band of 32 kDa and a minor protein band of 28 kDa. A similar precipitation pattern was described for other CD99 mAbs [3,12,14,21–24]. P-3E10, an IgG2a isotype matched control mAb, which recognizes an un-clustered leukocyte surface antigen, precipitated a protein band of 55 kDa, and MT4, an irrelevant mAb, did not precipitate any protein band (Fig. 3).

3.2. MT99/3 induces homotypic cell aggregation of Jurkat cells via a LFA-1/ICAM-1 independent pathway

As CD99 mAbs were reported to induce homotypic aggregation of several lymphoid cells [2,3], we investigated this phenomenon by using our new generated CD99 mAb. Purified mAb MT99/3 induced homotypic cell aggregation in Jurkat cells (Table 1 and Fig. 4) but not in U937 and K562 cells (data not shown). mAb MT99/3 induced Jurkat cell aggregation was dose-dependent. Some smaller cell aggregates were already observed with 1 $\mu\text{g/ml}$ of purified MT99/3 and maximal aggregation was seen when 2.5 $\mu\text{g/ml}$ or higher concentrations of the mAb were applied (data not shown). We also studied the kinetic of MT99/3 induced cell aggregation; after 30 min small aggregates were visible which gradually increased and reached their maximal size (4+) at 4 h (Table 1).

Homotypic aggregation induced by CD99 mAbs has been shown to be both LFA1 dependent [3] and LFA-1 independent [2]. We, therefore, examined the effect of LFA1 and ICAM-1 mAbs on MT99/3 mediated Jurkat cell aggregation. In our studies, Jurkat cells were cultured in the presence of MT99/3, MT99/3 + MEM-25 (a CD11a mAb), or MEM-25 only. We found that MEM-25 (50 $\mu\text{g/ml}$) by itself slightly induced Jurkat aggregation after 1 and 2 h incubation, however, in the presence of MT99/3 or MT99/3 + MEM-25 the degree of aggregation was increased (Table 2). These results indicated that mAb MEM-25 had no effect on MT99/3 mediated cell aggregation. Also MEM-111, an ICAM-1 mAb, did not block MT99/3 induced cell aggregation (Table 2). Furthermore, we studied the level of LFA-1 and ICAM-1 expression on Jurkat cells after engagement of CD99 by MT99/3. As determined by PE-labeled HI111 (CDT1a) and HA58 (CD54) mAbs the expression of LFA-1 and ICAM-1 molecules did not change upon MT99/3 treatment (Table 3). These results indicate that homotypic aggregation of Jurkat cells induced by CD99 mAb is LFA-1/ICAM-1 independent.

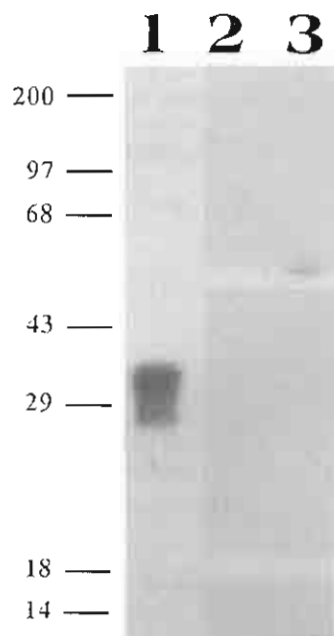


Fig. 3. Biochemical characterization of the cell surface antigen recognized by mAb MT99/3. SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates obtained from lysates of biotin labeled Jurkat cells using MT99/3 (lane 1), MT4 control mAb (lane 2) and P-3E10 control mAb (lane 3). Electrophoresis was performed under reducing conditions. The positions of molecular weight markers are indicated on the left in kDa.

3.3. Sphingosine, genistein and cytochalasin B block cell aggregation induced by mAb MT99/3

To analyze whether intracellular signaling is required for mAb MT99/3 induced Jurkat cell aggregation, we analyzed the effect of various inhibitors of protein kinases and cytoskeleton reorganization. Table 4 and Fig. 4 show that the PKC inhibitor sphingosine and the PTK inhibitor genistein blocked mAb MT99/3 induced Jurkat cell aggregation in a dose-dependent manner. Cytochalasin B, an actin filament polymerization blocking agent, also blocked completely mAb MT99/3 induced cell aggregation, which indicates a requirement for an intact cytoskeleton (Table 4 and Fig. 4). In all experiments, DMSO diluent controls had no effect on cell aggregation (data not shown). Cell viability for all inhibitors at all concentrations used was analyzed and found to be greater than 95%.

4. Discussion

In this report, we have isolated a cDNA encoding the CD99 molecule and used this cDNA to generate CD99 transfectants for immunization to produce new CD99 mAbs. One CD99 mAb, named MT99/3, was estab-

lished and found to induce homotypic cell aggregation of Jurkat cells. This CD99 mAb mediated cellular effect involves PKC and PTK-dependent intracellular signaling pathways but is independent of the integrin LFA-1 and its counterreceptor ICAM-1.

The CD99 molecule is a 32 kDa transmembrane glycoprotein which was assigned at the Fifth International Workshops on Human Leukocyte Differentiation Antigens [25]. The CD99 molecule has been demonstrated previously to be involved in cell adhesion [2,3,13–15,26] and apoptosis [15]. To further investigate the role of CD99 in cellular adhesion, we established new CD99 mAbs. For this purpose, we isolated the CD99 cDNA and used it to transfect COS cells for immunization and mAb screening. One mAb specific for the CD99 molecule, named MT99/3, was obtained. MT99/3 mAb precipitated a major protein band of ≈ 32 kDa which is the same as that described for the CD99 molecule [12,14,22,24,25]. A 28 kDa minor protein band was also precipitated by MT99/3. This 28 kDa polypeptide presumably represents the unsialylated, fully glycosylated CD99 molecule as suggested by previous biochemical studies [12,14] or a truncated form of the CD99 molecule which was recently described [3]. The epitope recognized by MT99/3 was broadly expressed on hematopoietic cell lines, human lymphocytes and monocytes, but not on neutrophils. This staining pattern is in agreement with that described for other CD99 mAbs [12,13,21–23]. On red blood cells, we found that the epitope recognized by mAb MT99/3 is heterogeneously expressed as erythrocytes from five out of seven donors reacted with mAb MT99/3. This is probably due to the quantitative polymorphism of CD99 expression on human erythrocytes, involving the blood group Xg phenotype [12,21,23]. Together, the biochemical data and the staining pattern confirmed that mAb MT99/3 is directed to the CD99 molecule.

Table 1
Homotypic cell aggregation of Jurkat cells induced by mAb MT99/3^a

MAb	Homotypic cell aggregation			
	Incubation time (h)			
	0.5	1	2	4
MT99/3	1 ^b	2	3	4
P-3E10	0	1	1	1
MT4	0	1	1	1
–	0	1	1	1

^a Jurkat cells were cultured for 30 min. 1, 2 and 4 h in the presence or absence of mAb MT99/3 (2.5 μ g/ml). Homotypic cell aggregation was determined under an inverted microscope.

^b Degree of cell aggregation was graded as described in Section 2. Results are representative of ten separate experiments.

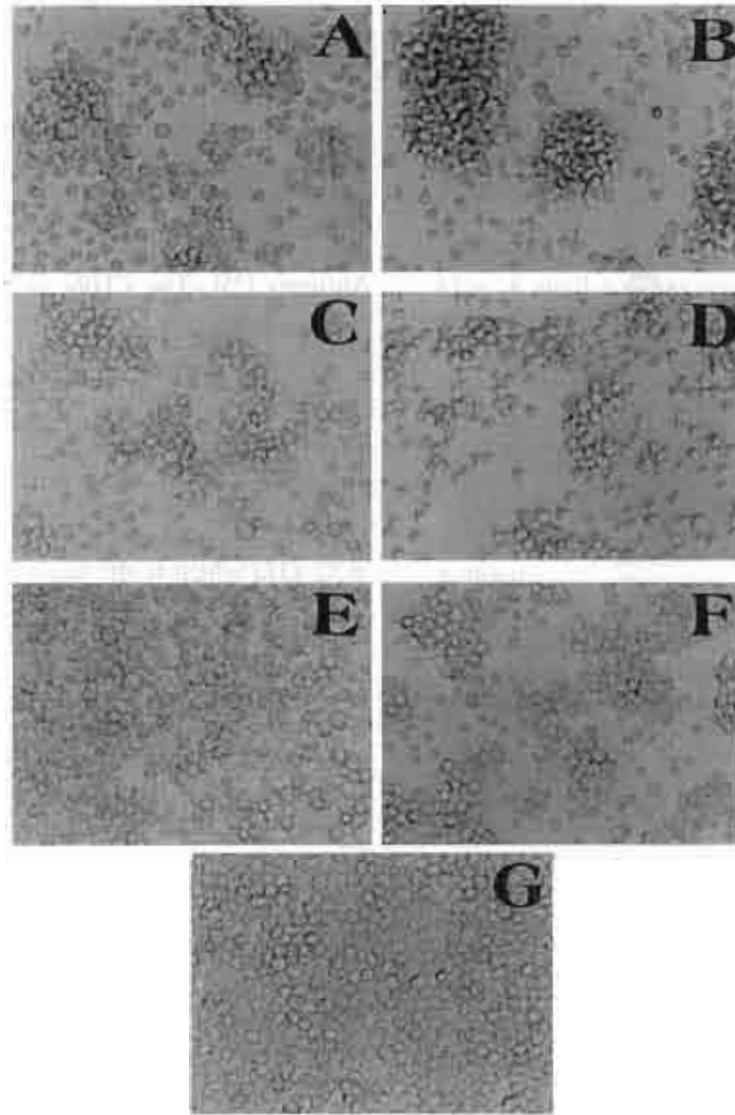


Fig. 4. Photomicrographs ($\times 100$) of homotypic cell aggregation induced by mAb MT99/3. Jurkat cells were incubated for 4 h with medium (A), 2.5 $\mu\text{g/ml}$ MT99/3 mAb (B), MT4 control mAb (C) and P-3E10 control mAb (D). Jurkat cells were pretreated with sphingosine (20 μM) and subsequently cultured in the presence of MT99/3 (E). Jurkat cells were culture with mAb MT99/3 in the presence of genistein (25 $\mu\text{g/ml}$) (F) or cytohalasin B (50 μM) (G).

Table 2
Effect of LFA-1 and ICAM-1 mAbs on Jurkat cell aggregation induced by mAb MT99/3^a

Conditions	Homotypic cell aggregation				
	Incubation time (h)				
	0.5	1	2	3	4
Jurkat alone	0 ^b	1+	1+	1+	1+
Jurkat+MT99/3	1+	2+	3+	4+	4+
Jurkat+MT99/3+MEM-25 (50 $\mu\text{g/ml}$)	1+	2+	3+	4+	4+
Jurkat+MT99/3+MEM-111 (50 $\mu\text{g/ml}$)	1+	2+	3+	4+	4+
Jurkat+MT99/3+MEM-111 (100 $\mu\text{g/ml}$)	1+	2+	3+	4+	4+
Jurkat+MEM-25 (50 $\mu\text{g/ml}$)	0	1+	2+	4+	4+
Jurkat+MEM-111 (50 $\mu\text{g/ml}$)	0	1+	1+	1+	1+
Jurkat+MEM-111 (100 $\mu\text{g/ml}$)	0	1+	1+	1+	1+

^a Jurkat cells were cultured for 30 min, 1, 2, 3 and 4 h with or without mAb MT99/3 in the presence or absence of purified MEM-25 (CD11a mAb) or MEM-111 (CD54 mAb). Homotypic cell aggregation was determined under an inverted microscope.

^b Degree of cell aggregation was graded as described in Section 2.

Table 3
Expression of LFA-1 and ICAM-1 molecules on mAb MT99.3 treated Jurkat cells^a

Treatment time	Mean fluorescence intensity					
	X40-PE ^b		HI111-PE ^b		HA58-PE ^b	
	Untreated	MT99.3-treated	Untreated	MT99.3-treated	Untreated	MT99.3-treated
30 min	3.4	3.5	27.8	36.7	23.4	31.7
1 h	3.5	3.6	34.8	36.2	29.2	33.9
2 h	3.5	3.5	34.3	37.7	28.9	32.3
4 h	3.8	3.4	44.6	41.4	35.1	32.1

^a Jurkat cells were incubate for 30 min, 1, 2, and 4 h at 37°C with or without mAb MT99.3. Cells were washed and stained with indicated mAbs and analyzed by a flow cytometer.

^b X40-PE, negative control antibody; HI111-PE, anti-CD11a mAb; HA58-PE, anti-CD54 (ICAM-1) mAb. Results are the mean of the mean fluorescence intensity of two separate experiments.

Table 4
Effect of various inhibitors on Jurkat cell aggregation induced by mAb MT99.3^a

Culture conditions	Concentration of inhibitors	Target of inhibitors	Degree of aggregation
Jurkat alone	–	–	1
Jurkat + MT99.3	–	–	4
Jurkat + MT99.3 + sphingosine	20 µM	PKC	1
Jurkat + MT99.3 + sphingosine	10 µM	PKC	3
Jurkat + MT99.3 + sphingosine	5 µM	PKC	4
Jurkat + MT99.3 + genistein	25 µg/ml	PTK	1
Jurkat + MT99.3 + genistein	12.5 µg/ml	PTK	3
Jurkat + MT99.3 + genistein	6.5 µg/ml	PTK	4
Jurkat + MT99.3 + Cytochalasin B	50 µM	Actin filament	1
Jurkat + MT99.3 + Cytochalasin B	25 µM	Actin filament	1
Jurkat + MT99.3 + Cytochalasin B	12.5 µM	Actin filament	1

^a Jurkat cells were incubated for 4 h with medium or 2.5 µg/ml MT99.3 mAb, or pretreated with sphingosine followed by culturing in the presence of mAb MT99.3. For genistein or cytochalasin B, Jurkat cells were culture with mAb MT99.3 in the presence of genistein or cytochalasin B. Results are representative of two separate experiments.

Intercellular adhesive events are one of the critical steps in the regulation of immune processes. Engagement of various cell surface molecules with specific ligands or mAbs generate proadhesive signals that induce cell adhesion [1–7,27]. In the present study we demonstrate that the CD99-specific mAb MT99.3 can induce homotypic aggregation of Jurkat cells. However, U937 and K562, which also express CD99 molecules, did not show cell aggregation in response to MT99.3. Thus, our results indicate that MT99.3 specifically induce homotypic aggregation of a T-cell line but not of myeloid cell lines.

Interaction of LFA-1 with ICAM-1 is important in a variety of adhesion-dependent interactions of immune cells [8,28,29], and engagement of various cell surface molecules with specific ligands or mAbs activates LFA-1 at the cell surface [1,3,27,30]. In this report, we found that the Jurkat cell aggregation induced by MT99.3 was not inhibited by LFA-1 and ICAM-1 mAbs, even when high concentrations (100 µg/ml) of the blocking antibodies were used. The blocking capacity of these

LFA-1 (MEM-25) and ICAM-1 (MEM-111) mAbs was demonstrated previously: they could inhibit cell aggregation of U937 cells induced by mAb M6-1D4, a CD147 mAb [1]. Therefore, these results indicate that engagement of the CD99 molecule by CD99 mAb MT99.3 induces aggregation of Jurkat cells which is independent of LFA-1/ICAM-1 pathways. This finding is in agreement with that shown in thymocytes by Bernard et al. [2]. However, it is in contrast to the CD99-induced aggregation of IM-9 cells reported to be LFA-1 dependent [3]. At the moment, we do not have any explanation for this discrepancy. One possibility could be that CD99 is involved in regulation of different cell adhesion events in T-cells (Jurkat) versus B-cells (IM-9). Alternatively, the difference between CD99 mediated induction of LFA-1 dependent and independent cell adhesion mechanisms could be a result of the methods used: cross-linking of the CD99 mAb with anti-mouse IgG was performed to induce IM-9 aggregation [3] while we and Bernard et al. [2] could induce cell aggregation with soluble CD99 mAbs.

Up-regulation of LFA-1 expression on the surface of IM-9 and Jurkat cells by CD99 mAb has been described [3]. Our results, however, demonstrate that engagement of CD99 by our newly established mAb MT99/3 did not increase expression of CD11a (LFA-1 α_L chain) and CD54 (ICAM-1) molecules on Jurkat cells. This observation together with the finding that LFA-1 and ICAM-1 mAbs cannot block MT99/3 induced cell aggregation indicate the independence of the CD99 adhesion pathway described here from LFA-1/ICAM-1. As aggregation of thymocytes induced by CD99 mAbs could also not be blocked by mAbs to $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 3$ integrins, Bernard et al. [2] postulated that an unidentified integrin or a peculiar epitope of a known integrin is involved in CD99-mediated cell aggregation.

Signal transduction, the process of transmission of an extracellular message to the interior of the cell, requires the activation of specific cell membrane receptors and downstream intracellular signaling cascades. Several specific ligands or antibodies against cell surface receptors have been reported to induce intracellular signal transduction resulting in a physiological response of the cell. Homotypic aggregations of monocytic and lymphoid cells are mediated by PKC and/or PTK-dependent intracellular signaling pathway after engagement of cell surface molecules [5,30–33]. We, therefore, asked whether PKC and/or PTK-dependent intracellular signaling pathways are involved in CD99 mAb mediated cell aggregation. Our results show that the PKC inhibitor sphingosine and the PTK inhibitor genistein significantly blocked cell aggregation induced by MT99/3. This finding indicates that CD99 mediated cell adhesion of Jurkat cells is an active process involving both PKC and PTK dependent intracellular signaling pathways. While this manuscript was in preparation, Wingett et al. [34] reported that ligation of CD99 resulted in pronounced tyrosine phosphorylation of an ≈ 29 kDa protein and suggested that a specific CD99 linked signal transduction pathway may exist.

Cell adhesion mediated by several adhesion molecules requires an intact cytoskeleton for establishment and maintenance of stable cell conjugates. In this report, paralysis of the cytoskeleton by cytochalasin B completely abrogated adhesion induced by mAb MT99/3, implying that Jurkat aggregation induced via CD99 mAb is strongly associated with cytoskeletal reorganization.

In conclusion, we provide evidence here that engagement of the CD99 molecule by a specific CD99 mAb newly generated by us activates intracellular signaling pathways in Jurkat cells resulting in LFA-1/ICAM-1 independent cell adhesion. We suggest that our CD99 mAb mimics a natural ligand of CD99, the identification and characterization of which will uncover the function of the CD99 system and its involvement in cell adhesion events of the immune system.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Vaclav Horejsi for providing mAbs to LFA-1 and ICAM-1. This work was supported by the National Science and Technology Development Agency of Thailand, The Thailand Research Fund, and by SFB005 of the Austrian Science Fund.

References

- [1] W. Kasinrerk, N. Tokrasinwit, P. Phunpae, *Immunology* 96 (1999) 184–192.
- [2] G. Bernard, D. Zoccola, M. Deckert, J.P. Breittmayer, C. Aussel, A. Bernard, *J. Immunol.* 154 (1995) 26–32.
- [3] J.H. Hahn, M.K. Kim, E.Y. Choi, et al., *J. Immunol.* 159 (1997) 2250–2258.
- [4] Y.H. Nong, E. Remold-O'Donnell, T.W. LeBien, *J. Exp. Med.* 170 (1989) 259–267.
- [5] R.P. Lauener, R.S. Geha, D. Vercelli, *J. Immunol.* 145 (1990) 1390–1394.
- [6] A. Masellis-Smith, G.S. Jensen, J.G. Sechafer, J.R. Slupsky, A.R.E. Shaw, *J. Immunol.* 144 (1990) 1607–1613.
- [7] G.S. Kansas, J.C. Cambier, T.F. Tedder, *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 147–1527.
- [8] R.O. Hynes, *Cell* 69 (1992) 11–25.
- [9] R. Levy, J. Dille, R.I. Fox, R. Warnk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 6552–6556.
- [10] S.M. Darling, P.J. Goodfellow, B. Pym, G.S. Banting, C. Prinched, P.N. Goodfellow, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51 (1986) 205–212.
- [11] G.S. Banting, B. Pym, S.M. Darling, P.N. Goodfellow, *Mol. Immunol.* 26 (1989) 181–188.
- [12] C. Gelin, F. Aubrit, A. Phalipon, B. Raynal, S. Cole, M. Kaczorek, A. Bernard, *EMBO J.* 8 (1989) 3253–3259.
- [13] A. Bernard, F. Aubrit, B. Raynal, D. Pham, L. Boumsell, *J. Immunol.* 140 (1988) 1802–1827.
- [14] F. Aubrit, C. Gelin, D. Pham, B. Raynal, A. Bernard, *Eur. J. Immunol.* 19 (1989) 1431–1436.
- [15] G. Bernard, J.P. Breittmayer, M. de Matteis, P. Trampont, P. Hofman, A. Bernard, *J. Immunol.* 158 (1997) 2543–2550.
- [16] E.Y. Choi, W.S. Park, K.C. Jung, S.H. Kim, Y.Y. Kim, W.J. Lee, S.H. Park, *J. Immunol.* 161 (1998) 749–754.
- [17] W. Kasinrerk, N. Tokrasinwit, P. Naveewongpanit, *J. Med. Assoc. Thai.* 81 (1998) 879–892.
- [18] E. Harlow, D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988.
- [19] B. Seed, A. Aruffo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 3365–3369.
- [20] W. Kasinrerk, E. Fiebigler, I. Stefanova, T. Brumruker, W. Knapp, H. Stockinger, *J. Immunol.* 149 (1992) 847–854.
- [21] P.N. Goodfellow, P. Tippet, *Nature* 289 (1981) 404–405.
- [22] A. Bernard, V. Gay-Bellile, M. Amiot, B. Caillou, P. Charbord, L. Boumsell, *J. Immunol.* 132 (1984) 2338–2344.
- [23] F. Latron, D. Blanchard, J.P. Cartron, *Biochem. J.* 247 (1987) 757–764.
- [24] A.C. Petty, P. Tippet, *Vox Sang* 69 (1995) 231–235.
- [25] S. Schlossman, L. Boumsell, W. Gilks, et al., *Leukocyte Typing V*, Oxford University Press, Oxford, 1994.
- [26] C. Aussel, G. Bernard, J.P. Breittmayer, C. Pelassy, D. Zoccola, A. Bernard, *Biochemistry* 32 (1993) 10096–100101.
- [27] R. Pardi, L. Inverardi, J.R. Bender, *Immunol. Today* 13 (1992) 224–230.

- [28] T.A. Springer, Nature 346 (1990) 425–434.
- [29] E.C. Butcher, L.J. Picker, Science 272 (1996) 60–66.
- [30] G.S. Kansas, T.F. Tedder, J. Immunol. 147 (1991) 4094–4102.
- [31] W. Mourad, R.S. Geha, T. Chatila, J. Exp. Med. 172 (1990) 1513–1516.
- [32] N. Odum, H. Yoshizumi, Y. Okamoto, N. Kamikawaji, A. Kimura, Y. Nishimura, T. Sasazuki, Human Immunol. 35 (1992) 71–84.
- [33] H.M. Lorenz, T. Harrer, A.S. Lagoo, A. Baur, G. Eger, J.R. Kalden, Cell Immunol. 147 (1993) 110–128.
- [34] D. Wingett, K. Forcier, C.P. Nielson, Cell Immunol. 193 (1999) 7–23.