Thesis Title Characterization and Functional Analysis of New Leukocyte Surface Molecules and New Lymphocyte Sub-population

Author Miss Kodchakorn Mahasongkram

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Prof. Dr. Watchara Kasinrerk

ABSTRACT

The immune system is an important system that protects body from pathogens and cancers. Lymphocytes are cells that play a major role in the immune response. Abundant surface molecules of lymphocytes have been discovered and requiring for controlling cell-to-cell interaction between lymphocytes and others leukocyte. Identification of novel undefined surface molecules on lymphocytes, hence, will lead to a better understanding of the immune function.

In order to identify new leukocyte surface molecules, certain monoclonal antibodies (mAbs) were produced in Prof. Watchara Kasinrerk's laboratory. Preliminary studies indicated that two mAbs, named MT3 and COSA2A, reacted with a sub-population of lymphocytes. These mAbs were, therefore, selected and further detail characterized.

Cellular distribution of the molecule recognized by mAbs MT3 and COSA2A were determined by using immunofluorescent staining and flow cytometry. It was

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

found that mAb MT3 specifically reacted with T cell lines, Molt4 and SupT1, and a T lymphocyte sub-population. Within T lymphocyte, we found that the MT3 molecules express on a subset of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes. Red blood cells also express MT3 molecules, but in quantitative polymorphic manner. While mAb COSA2A was reacted to a population of T, B and NK cells. This molecule broadly expresses on both $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes. On the other hand, both MT3 and COSA2A molecules express majority on $CD45RA^+$ and $CD45RB^+$ naïve T lymphocytes.

Biochemical characterization of COSA2A and MT3 molecules were performed by Western Immunoblotting and Immunoprecipitation. The results indicated that mAb COSA2A reacted with two major bands of proteins with the molecular weight of 55 kDa and 36 kDa under non-reducing condition, but did not react to any protein under reducing condition indicating disulfide bond(s) is involved in the binding of mAb COSA2A. COSA2A molecule, in its native form, may form homodimerization. Whereas, mAb MT3 precipitated a protein with the molecular weight more than 180 kDa under both reducing and non-reducing conditions. As the mAb MT3 did not react to any protein on Western immunoblotting experiment, it is suggested that the mAb MT3 react to a conformational epitope.

In functional studies, we found that the expression of MT3 and COSA2A molecules were decreased after PHA activation, indicated that the MT3 and COSA2A molecules are associated with T lymphocyte activation. However, both mAbs have no effect on anti-CD3 (OKT3) induced T lymphocyte proliferation.

In conclusion, in this study, two mAbs MT3 and COSA2A and its recognized molecules were characterized. By cellular distribution and biochemical

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

characterization studies, we demonstrated that these mAbs may react to novel leukocyte surface molecules. By using mAb MT3, a new T lymphocyte subpopulation was identified. Detail characterizations, including amino acid sequencing, of the molecules recognized by both mAbs will be carrying.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การหาลักษณะเฉพาะและการวิเคราะห์หน้าที่ของโมกุลชนิดใหม่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวและประชากรย่อยของลิมโฟไซต์ชนิดใหม่
ผู้เขียน	นางสาว กชกร มหาสงคราม
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: ไม่ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: ไม่ ตัวหนา

ถูกลบ: การวิเคราะห์คุณลักษณะและหน้าที่

ถูกลบ: ซัยต์

บทคัดย่อ

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบที่มีความสำคัญมากในการป้องกันร่างกายจากเชื้อโรคและมะเร็ง ลิมโฟซัยต์จัดเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อในการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน บนผิวเซลล์ของเซลล์ลิมโฟซัยต์ว่ามีโปรตีนอยู่เป็นจำนวนมากและพบว่าโมเลกุลเหล่านี้มีความจำเป็นต่อกระบวนการการทำงานร่วมกันระหว่างลิมโฟซัยต์และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ การศึกษาและค้นหาโมเลกุลบนผิวเซลล์ลิมโฟซัตย์ชนิดใหม่ๆ จะทำให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจถึงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น

เพื่อค้นหาโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดใหม่ โมโนโคลนอล แอนติบอดีจำนวนมากได้ถูกผลิตขึ้นภายในห้องปฏิบัติการของ ศ.ดร.วัชระ กสิณฤกษ์ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่ามีโมโนโคลนอล แอนติบอดี 2 ชนิด ได้แก่ MT3 และ COSA2A สามารถทำปฏิกิริยาได้กับประชากรย่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของลิมโฟซัยต์ ดังนั้น โมโนโคลนอล แอนติบอดี ทั้งสองชนิดจึงถูกเลือกมาเพื่อทำการศึกษาคุณลักษณะอื่นๆ ต่อไป

ในการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี MT3 และ COSA2A โดยวิธี immunofluorescent staining และ flow cytometry พบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี MT3 ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ T cell line ได้แก่ Molt4 และ SupT1 และกับประชากรย่อยของ T lymphocyte โดยพบว่าโมเลกุล MT3 มีการแสดงบนกลุ่มย่อยของ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T lymphocyte นอกจากนี้ยังพบว่าโมเลกุล MT3 มีการแสดงออกเซลล์เม็ดเลือดแดง แต่มีปริมาณการแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล ในขณะที่โมเลกุล COSA2A ทำปฏิกิริยาได้กับ T lymphocytes, B lymphocytes และ NK cells ซึ่งโมเลกุล COSA2A นี้มีการแสดงออกได้ทั้งบน $CD4^+$ และ $CD8^+$ T lymphocytes นอกจากนี้ยังพบว่าอีกทั้งโมเลกุล MT3 และ COSA2A มีการแสดงออกบน $CD45RA^+$ และ $CD45RB^+$ naïve T lymphocytes

ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุล COSA2A และ MT3 โดยวิธี Western immunoblotting และ Immunoprecipitation พบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี COSA2A ทำปฏิกิริยาได้กับโปรตีน 2 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55 และ 36 กิโลดาลตันในสภาวะ non-reducing แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนใดๆ ในสภาวะ reducing แสดงให้เห็นว่า พันธะไดซัลไฟด์เกี่ยวข้องกับการจับกันของโมโนโคลนอล แอนติบอดี COSA2A กับ epitope จำเพาะ และโครงสร้างโดยธรรมชาติของโมเลกุล COSA2A นี้อาจมีลักษณะเป็น homodimer ส่วนโมโนโคลนอล แอนติบอดี MT3 สามารถตกตะกอนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 180 กิโลดาลตันในสภาวะ non-reducing และ reducing แต่โมโนโคลนอล แอนติบอดี MT3 ไม่ทำปฏิกิริยากับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรตีนใดๆ ใน Western immunoblotting แสดงว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี MT3 ทำปฏิกิริยากับ conformational epitope

ในการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุล MT3 และ COSA2A พบว่าการแสดงออกของโมเลกุล MT3 และ COSA2A ลดลงหลังจากการการกระตุ้นลิมโฟซัยต์ด้วย PHA แสดงว่าโมเลกุลทั้ง 2 อาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของ T lymphocyte อย่างไรก็ตามในการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลทั้ง 2 พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของ T lymphocyte เมื่อกระตุ้นด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อโมเลกุล CD3

โดยสรุป ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของโมโนโคลนอล แอนติบอดี 2 ชนิด คือ MT3 และ COSA2A และโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี ทั้งสอง และพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีนี้ น่าจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน และโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี MT3 จะสามารถจำแนกกลุ่มย่อยชนิดใหม่ของ T lymphocyte ได้ โดยผู้วิจัยจะได้ศึกษาถึงโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีทั้งสองในรายละเอียดต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved