Thesis Title Expression and Function of CD4 Molecules on Lymphocyte and Monocyte Cell Surfaces

Author Miss Supaporn Khamchun

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Prof. Dr. Watchara Kasinrerk

ABSTRACT

CD4 is a leukocyte surface glycoprotein and classified as a typical feature of a type I integral membrane protein. This molecule is demonstrated to express on various cell types, including sub-population of T lymphocytes and monocytes. On T lymphocytes, CD4 molecule is best known for its role in binding and stabilizing T cell receptor interaction with peptide–MHC class II complexes on antigen presenting cells during the induction of adaptive immunity and mediating intracellular T cell signaling. However, little is known for the structures and functions of the CD4 expressed on monocytes. Recently, in Prof. Dr. Watchara Kasinrerk's laboratory, four anti-CD4 monoclonal antibodies (mAbs), namely MT4, MT4/2, MT4/3, and MT4/4, were generated. In this study, the produced anti-CD4 mAbs were employed for studying the expression and function of CD4 on lymphocytes and monocytes.

In this study, hybridomas producing MT4, MT4/2, MT4/3, and MT4/4 mAbs were propagated and the culture supernatants were confirmed for their anti-CD4 reactivity. By using the COS cell transfection system, mAbs MT4, MT4/2, and MT4/3, but not mAb MT4/4, reacted specifically to CD4 transfected COS cells. None

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

react to CD8 transfectants. The mAbs MT4, MT4/2, and MT4/3 were, therefore, selected for further studies. The three clones of anti-CD4 mAbs were then produced in large scale and purified by affinity chromatography. By using SDS-PAGE, COS cell transfection, and immunoprecipitation techniques, the purified MT4, MT4/2, and MT4/3 mAb were verified to direct against CD4 molecule. The eptiope recognized by the three mAbs were determined by cross blocking analysis. The results indicated that anti-CD4 mAb clones MT4 and MT4/2 reacted to the same or adjacent epitope of CD4 molecule. Whereas, the mAb clone MT4/3 reacted to an un-related epitope.

As the different structures of CD4 molecules expressed on lymphocytes and monocytes was reported, we then employed the mAbs MT4, MT4/2, and MT4/3 to study the expression and function of CD4 on lymphocytes and monocytes. Analysis by immunefluorescence staining using the saturated concentration of the produced anti-CD4 mAbs, the anti-CD4 mAbs reacted to CD4 on lymphocytes and monocytes in different manners. The mAb clone MT4 reacted to CD4 expressed on lymphocytes, but very weakly reacted to CD4 on monocytes. Whereas, mAb clone MT4/3 strongly reacted to CD4 expressed on both lymphocytes and monocytes. These results confirmed the previous reports and indicated that the expressions of CD4 molecules on lymphocyte and monocyte surfaces are different and this difference can be recognized by anti-CD4 mAb clone MT4.

The function of CD4 molecules was then evaluated. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and monocyte depleted lymphocytes were stimulated with anti-CD3 mAb or anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs, respectively, in the presence or absence of mAbs MT4, MT4/2, and MT4/3. It was found that mAb MT4/3, but not mAb MT4 or MT4/2, inhibited anti-CD3 induced PBMC (which contain lymphocytes

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and monocytes) proliferation. However, the mAb MT4/3 did not inhibit anti-CD3/CD28 induced monocyte-depleted lymphocyte (contain only lymphocytes) proliferation. This finding indicated that CD4 expressed on monocytes play a role in the suppression of lymphocyte activation. We further determined whether mAb MT4/3 could also activate other monocyte functions. Anti-CD4 mAbs MT4, MT4/2, and MT4/3 were tested for monocyte oxidative burst induction and found no such activity. In conclusion, in this study, we demonstrated for the first time that CD4 molecules expressed on monocytes play a role in the suppression of lymphocyte activation. Engagement of CD4 on monocytes with an anti-CD4 mAb, MT4/3, activated monocytes to negatively regulate lymphocytes responses. The details mechanism of CD4 molecule on monocytes in regulation of lymphocyte function, however, is still unknown and need further investigation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การแสดงออกและหน้าที่ของโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์
ผู้เขียน	นางสาว สุภาพร ขำจันทร์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์

บทคัดย่อ

CD4 จัดเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด type I integral membrane protein ที่สามารถพบได้บนผิวเซลล์หลายชนิด รวมทั้งบนประชากรย่อยของ ที ลิมโฟซัยต์และโมโนซัยต์ ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า โมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์ ที ลิมโฟไซต์ทำหน้าที่ในการจับกับโมเลกุล MHC class II ในปฏิกิริยาระหว่าง T cell receptor บน T lymphocytes กับ peptide-MHC class II บน antigen presenting cells ในกระบวนการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิด adaptive immunity โดยโมเลกุล CD4 จะทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ อย่างไรก็ตาม โครงสร้างและการทำหน้าที่ของโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์โมโนไซต์นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด เมื่อเร็วๆ นี้ ที่ห้องปฏิบัติการของ ศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ สามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD4 ได้จำนวน 4 โคลน ตั้งชื่อว่า MT4, MT4/2, MT4/3 และ MT4/4 ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD4 ที่ผลิตขึ้นมาศึกษาถึงการแสดงออกและการทำหน้าที่ของโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้นำ hybridoma cells ที่สร้างโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4, MT4/2, MT4/3 และ MT4/4 มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนและผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีในรูปแบบของ culture supernatants และนำ culture supernatants ที่ได้มาตรวจสอบยืนยันความจำเพาะต่อโมเลกุล CD4 ด้วยวิธี COS cell transfection ผลการศึกษาพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4, MT4/2 และ MT4/3 สามารถทำปฏิกิริยากับ CD4 transfected COS cells แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ CD8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

transfected COS cells ในขณะที่โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4/4 ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับทั้ง CD4 และ CD8 transfected COS cells ดังนั้น โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4, MT4/2 และ MT4/3 จึงถูกคัดเลือกและนำมาเตรียมให้มีปริมาณมากและบริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาในลำดับต่อไป จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เตรียมได้โดยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เตรียมได้โดยวิธี COS cell transfection และ immunoprecipitation พบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เตรียมบริสุทธิ์ได้ทั้งสามโคลนสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับโมเลกุล CD4 จากนั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาถึง epitope บนโมเลกุล CD4 ที่ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งสามโคลนโดยวิธี cross blocking analysis ผลการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4 และ MT4/2 ทำปฏิกิริยากับ epitope เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน ในขณะที่โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4/3 ทำปฏิกิริยากับ epitope บนโมเลกุล CD4 ที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการรายงานว่าโครงสร้างของโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์มีความแตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD4 ที่ผลิตได้ทั้งสามโคลนมาทำการศึกษาการแสดงออกและการทำหน้าที่ของโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ โดยวิธี immunefluorescence staining และใช้ saturated concentration ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งสามโคลนในการศึกษา พบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งสามโคลนทำปฏิกิริยากับโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ได้แตกต่างกัน โดยโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4 สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์ลิมโฟไซต์ แต่ทำปฏิกิริยาได้น้อยมากกับโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์โมโนไซต์ ในขณะที่โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4/3 สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุล CD4 ทั้งบนผิวเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ ผลการศึกษานี้ยืนยันผลการศึกษาที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์มีความแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างนี้สามารถมองเห็นได้ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4

ในการศึกษาการทำหน้าที่ของโมเลกุล CD4 ผู้วิจัยทำการศึกษาโดยนำ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) และเซลล์ monocyte-depleted lymphocytes มากระตุ้นด้วยโมโน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD3 และโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD3 ร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD28 ตามลำดับ ในสภาวะที่มีหรือไม่มีโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4, MT4/2 และ MT4/3 อยู่ด้วย ผลการศึกษาพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4/3 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs (ซึ่งประกอบเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์) ที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD3 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ monocyte-depleted lymphocytes (ซึ่งประกอบเซลล์ลิมโฟไซต์เพียงอย่างเดียว) ที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD3 ร่วมกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD28 ได้ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า โมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์โมโนไซต์ทำหน้าที่ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ได้ นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังทำการตรวจสอบผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD4 ในการกระตุ้นการทำหน้าที่อื่นของเซลล์โมโนไซต์ โดยทำการตรวจสอบโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD4 ทั้งสามโคลนในการกระตุ้นการเกิด oxidative burst ของเซลล์โมโนไซต์ และพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งสามโคลนไม่มีผลในการกระตุ้นการเกิด oxidative burst ของเซลล์โมโนไซต์ จากผลการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์โมโนไซต์ทำหน้าที่ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ การ cross-linking โมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์โมโนไซต์ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน MT4/3 จะทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์และไปกดการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์ อย่างไรก็ตาม กลไกในการควบคุมการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์โดยโมเลกุล CD4 บนผิวเซลล์โมโนไซต์นี้ยังไม่ทราบแน่ชัดและจะได้ทำการศึกษาในลำดับต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved