Thesis Title Identification and Characterization of Functional Partner of the CD99 Molecule

Author Miss Supansa Pata

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee:

Prof. Dr. Watchara Kasinrerk	Advisor
Prof. Dr. Vaclav Horejsi	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul	Co-advisor

ABSTRACT

CD99, a leukocyte surface glycoprotein, is broadly expressed in many cell types. On the cell surface, CD99 is expressed as two distinct isoforms, a long form (32 kDa) and a short form (28 kDa). CD99 has been demonstrated to play a key role in several biological processes, including the regulation of T cell activation. However, the molecular mechanisms by which CD99 participates in such processes are unclear. As CD99 contains a short cytoplasmic tail, it is unlikely that CD99 itself takes part in its multi-functions. Association of CD99 with other membrane proteins has been suggested to be necessary for exerting its functions. In order to better understand CD99 function, we aspired to investigate the association of CD99 with other cell surface molecules and characterize the CD99 associated molecules. The molecular mechanism by which CD99 participates in the T cell activation was also determined.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In this study, by employing COS cell transfection system, three monoclonal antibodies (mAbs) against CD99 molecules were generated. The generated anti-CD99 mAbs were then used to identify the CD99 associated molecules by coimmunoprecipitation method. Several membrane proteins were demonstrated to be associated with CD99 molecules in various cell types. By using our recently developed immunoprecipitated bead immunization strategy, mAbs against CD99 associated molecules were produced. The produced mAbs were then used as a tool for identification of CD99 associated molecules and CD99 functional study. Using coimmunoprecipitation and Western blotting, we observed the association of MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81 with CD99 molecules on the cell surface. The colocalization of CD99 with its partners was confirmed, by indirect immunofluorescence staining and confocal microscopic analysis, both in cell line and peripheral blood mononuclear cells. These results indicate that association of CD99 with MHC and CD81 is physically occurs in peripheral blood cells. Additionally, the association of CD99 with its partners was observed for both isoforms.

In the functional study of the CD99 involving T cell activation, we demonstrated that CD99 is a lipid raft-associated membrane protein. Upon T cell activation, recruitment of CD99 into the immunologic synapse was demonstrated as was observed with its associated molecules. Inhibition of anti-CD3 induced T cell proliferation by an anti-CD99 mAb was also revealed. These results suggest that CD99 is associated with MHC class I, MHC class II and CD81 on the cell surface and plays a regulatory role in T cell activation. Upon T cell activation, the MHC-tetraspanins complexes were demonstrated to be involved in T cell signaling. We hypothesize that CD99 may play a role in cell signaling. To explore the intracellular

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

signaling by CD99 molecule, induction of protein phosphorylation upon CD99 engagement was examined. The results indicate that CD99 is one of the T cell signaling molecules, as activation of CD99 molecule by agonistic antibody significantly elevated tyrosine and serine phosphorylation.

Collectively, we provide evidence that CD99 directly interacts and forms the complex with the MHC class I and II, and tetraspanin CD81, and is functionally linked to the formation of the immunologic synapse and signal transduction. Upon T cell activation, CD99 engagement can inhibit T cell proliferation. We speculate that the CD99-MHC-CD81 complexes may play an important role in the regulation of T cell activation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การระบุและการหาลักษณะเฉพาะของโมเลกุลที่ทำงานร่วมกับโมเลกุล CD99

ผู้เขียน นางสาว สุพรรษา ปาต๊ะ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Prof. Dr. Vaclav Horejsi	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. สาวิตรี เจียมพานิชยกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โมเลกุล CD99 เป็นไกลโคโปรตีนที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์หลากหลายชนิด บนผิวเซลล์โมเลกุล CD99 จะมีการแสดงออกเป็น 2 ไอโซฟอร์ม คือ แบบยาว (ขนาด 32 กิโลดาลตัน) และแบบสั้น (ขนาด 28 กิโลดาลตัน) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่าโมเลกุล CD99 เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์หลายประการรวมทั้งการทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการกระตุ้นเซลล์ทีลิมโฟซัยต์ อย่างไรก็ตาม กลไกการทำงานของโมเลกุล CD99 นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากโมเลกุล CD99 มีส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ขนาดสั้นจึงไม่น่าจะเป็นไปได้ที่โมเลกุล CD99 จะทำหน้าที่ต่างๆ โดยลำพัง และเพื่อสนับสนุนการทำหน้าที่หลากหลายของโมเลกุล CD99 นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าโมเลกุล CD99 น่าจะจับและทำงานร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นบนผิวเซลล์ และเพื่อความเข้าใจถึงการทำหน้าที่ที่แท้จริงของโมเลกุล CD99 ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะค้นหาและศึกษาลักษณะเฉพาะของโมเลกุลที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 และศึกษากลไกการทำงานของโมเลกุล CD99 ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ทีลิมโฟซัยต์

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้นำระบบ COS cell transfection มาเตรียมแอนติเจนสำหรับการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธีการนี้ ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD99 ได้จำนวน 3 โคลน แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการค้นหาโปรตีนที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 ด้วยวิธี coimmunoprecipitation จากการศึกษาในเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลากหลายชนิด ผู้วิจัยพบว่ามีโปรตีนบนผิวเซลล์หลายชนิดที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 และโดยวิธี immunoprecipitated bead immunization ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้น ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 ได้สำเร็จ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างๆ ที่ผลิตขึ้นนี้ ได้ถูกนำไปใช้ในการค้นหาโปรตีนที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 และการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุล CD99 จากการศึกษาโดยวิธี coimmunoprecipitation ร่วมกับวิธี Western blotting ผู้วิจัยได้ค้นพบการจับกันระหว่างโมเลกุล CD99 กับ MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มของ tetraspanin ผลการทดลองนี้ได้ถูกพิสูจน์ยืนยันโดยวิธี indirect immunofluorescence staining และการตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal laser scanner โดยสามารถตรวจพบการจับกันของโมเลกุล CD99, MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 บนผิวเซลล์ทั้งเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงและเซลล์เม็ดเลือดขาว การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่าการจับกันระหว่างโมเลกุล CD99 กับ MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 เกิดขึ้นได้จริงบนเซลล์เม็ดเลือด นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้พบว่าการจับกันระหว่างโมเลกุล CD99 กับ MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 นี้เกิดขึ้นได้กับโมเลกุล CD99 ทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม

จากการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุล CD99 ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นทีลิมโฟซัยต์ ผู้วิจัยพบว่าโมเลกุล CD99 เป็นโปรตีนที่พบได้ใน lipid raft และในระหว่างการกระตุ้นทีลิมโฟซัยต์ โมเลกุล CD99 นี้ถูกนำส่งเข้าสู่ immunological synapse นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD99 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของทีลิมโฟซัยต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD3 ได้ จากผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าโมเลกุล CD99 จับอยู่กับโมเลกุล MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 บนผิวเซลล์และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการกระตุ้นทีลิมโฟซัยต์ และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในขณะที่เกิดการกระตุ้นทีลิมโฟซัยต์ คอมเพล็กซ์ MHC-tetraspanins มีบทบาทในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าโมเลกุล CD99 น่าจะทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ด้วยเช่นกัน เพื่อศึกษากระบวนการส่งสัญญาณโดยโมเลกุล CD99 ผู้วิจัยจึงได้ศึกษากระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนต่างๆ เมื่อกระตุ้นโมเลกุล CD99 ด้วยแอนติบอดีจำเพาะ ผลการศึกษาพบว่าการกระตุ้นโมเลกุล CD99 ดังกล่าว ทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนในตำแหน่งของ tyrosine และ serine ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโมเลกุล CD99 ทำหน้าที่เป็น T cell signaling molecules ชนิดหนึ่ง

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้น ผู้วิจัยได้นำเสนอการค้นพบว่าโมเลกุล CD99 จับเป็นคอมเพล็กซ์กับ MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิด immunologic synapse ตลอดถึงการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ และพบอีกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD99 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของทีลิมโฟซัยต์ได้ ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าการจับกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นคอมเพล็กซ์ของ CD99-MHC-CD81 นี้มีบทบาทหน้าที่ในกระบวนการควบคุมการกระตุ้นการทำงานของทีลิมโฟซัยต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved