Thesis Title Role of CD147 Molecule on Regulation of Cell Proliferation and Apoptosis

Author Mr. Pakorn Pengin

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk

ABSTRACT

CD147 is a 50-60 kDa leukocyte surface glycoprotein which is belong to type I integral membrane protein in the immunoglobulin superfamily. It is broadly expressed on various cell types and is a lymphocyte activation associated molecule. Previous studies showed that this molecule might be an essential molecule in the immune system. However, the molecular function of CD147 molecule in regulation of T cell function is not clearly understood.

In order to study the function of CD147 molecule in the regulation of T cell activation, six anti-CD147 mAbs including M6-2F9, M6-2B1, M6-1F3, M6-1D4, M6-1B9 and M6-1E9 were used. Purification of the mAbs was firstly performed by affinity chromatography. Then, the binding activity and specificity of the purified anti-CD147 mAbs were verified by staining with U937 cells and CD147 expressing COS cells. All purified anti-CD147 mAbs reacted to U937 and CD147 expressing COS cells but they did not react to mock transfectant controls, indicating the purified mAbs specifically react to CD147 molecule and could be used in further studies.

The cross-blocking analysis was further performed to study the epitope of CD147 molecule recognized by each mAbs. According to mAb binding capability, the studied anti-CD147 mAbs could be clustered into 4 epitopes: 1; M6-2F9, 2; M6-2B1 and M6-1F3,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3; M6-1D4, and 4; M6-1B9 and M6-1E9. By employing COS cells transfected with domain 1 and domain 2 of CD147 cDNA, it was demonstrated that mAbs M6-2F9, M6-2B1, M6-1D4, M6-1B9 and M6-1E9 reacted to epitopes located on the domain 1 of CD147 molecule. Surprisingly, mAb M6-1F3 did not react to either epitope on domain 1 or 2 of CD147 molecule.

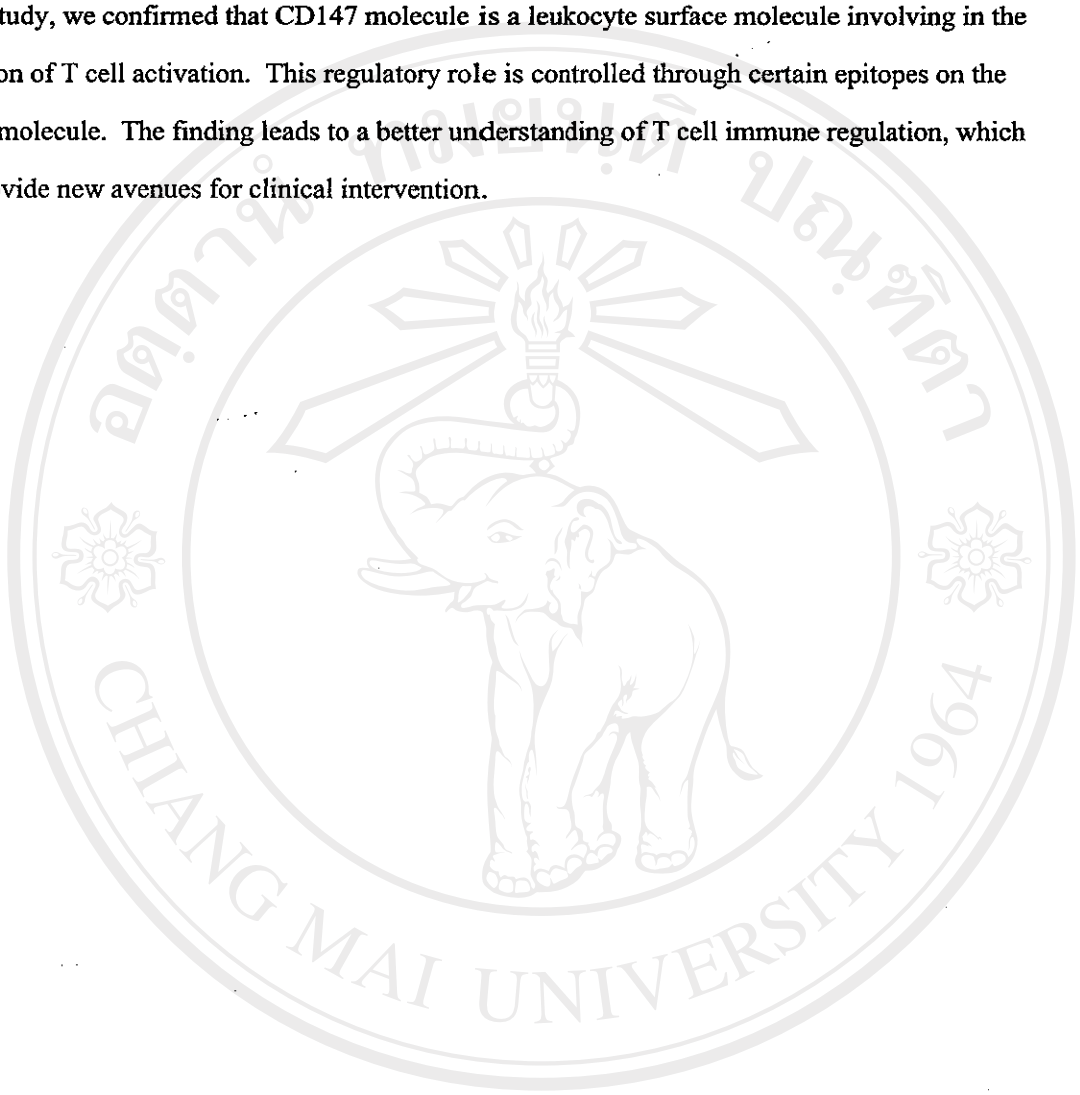
Western blotting and immunoprecipitation were also carried out for characterization of the anti-CD147 mAbs. By western blotting technique, under non-reducing condition, mAbs M6-2F9, M6-1D4, M6-1B9 and M6-1E9 reacted to a protein band with the molecular weight of approximately 50 kDa while M6-2B1 recognized several non-specific bands. No reaction to any protein band was observed when M6-1F3 was used. Under reducing condition, M6-1D4, M6-1B9 and M6-1E9, but not M6-2F9, M6-2B1 and M6-1F3, reacted to a protein band of approximately 53.5 kDa. The results indicating mAbs M6-2F9, M6-1D4, M6-1B9 and M6-1E9 reacted to linear epitopes, whereas, mAb M6-2B1 and M6-1F3 reacted to conformational epitopes on CD147 molecule. MAb M6-2F9, on the other hand, was demonstrated to react epitope that effect by treatment with 2ME. By immunoprecipitation technique, mAb M6-1D4, M6-1B9 and M6-1E9 precipitated a broad protein band at the molecular weight of 50-66 kDa under reducing conditions and 45.5-61.7 kDa under non-reducing conditions. MAb M6-2F9, M6-2B1 and M6-1F3 did not precipitate any protein under either non-reducing or reducing conditions. No co-precipitated protein was observed with this immunoprecipitation condition. From epitope mapping, western blotting and immunoprecipitation results, the position of epitope recognized by these mAbs was predicted. MAbs M6-2F9, M6-2B1, M6-1F3 and M6-1D4 react to the different epitopes on the CD147 molecule while mAbs M6-1B9 and M6-1E9 seem to recognize to the same epitope or overlapping epitopes.

The characterized mAbs were then used in functional analysis of the CD147 molecule. Two functional studies namely, induction of apoptosis and regulation of T cell activation, were carried out. None of the mAbs used demonstrated the ability to induce apoptosis of U937, KG1a and Sup-T1 cell lines. To study the effect of anti-CD147 mAbs on T cell activation, PBMC were activated with OKT3 or PHA and cultured in the absence or presence of various concentrations of anti-CD147 mAbs. It was found that mAbs M6-1B9 and M6-1E9 could inhibit OKT3-induced T cell proliferation whereas other anti-CD147 mAbs did not show any inhibitory effect. In the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

case of PHA-induced T cells proliferation, every anti-CD147 mAbs employed did not inhibit the cell proliferation.

In this study, we confirmed that CD147 molecule is a leukocyte surface molecule involving in the regulation of T cell activation. This regulatory role is controlled through certain epitopes on the CD147 molecule. The finding leads to a better understanding of T cell immune regulation, which may provide new avenues for clinical intervention.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ บทบาทของโมเลกุล ซีดี147 ในการควบคุมการแบ่งตัวและการกำหนดการตายแบบมีโปรแกรมของเซลล์

ผู้เขียน นาย ปกรณ์ เพ็งอินทร์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์

บทคัดย่อ

CD147 เป็นกลัยโคโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาด 50-60 kDa จัดเป็น type I integral membrane protein ที่อยู่ในกลุ่มของ immunoglobulin superfamily โมเลกุลนี้สามารถพบได้บนผิวเซลล์หลายชนิดและยังจัดเป็น lymphocyte activation associated molecule ชนิดหนึ่ง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโมเลกุลนี้น่าจะมีความสำคัญต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน แต่อย่างไรก็ตามหน้าที่ของโมเลกุล CD147 ในด้านที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ ที เซลล์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

เพื่อศึกษาหน้าที่ของโมเลกุล CD147 ในการควบคุมการกระตุ้นการทำงานของ ที เซลล์ จึงได้นำโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD147 ทั้งหมด 6 โคลนอันประกอบด้วย M6-2F9, M6-2B1, M6-1F3, M6-1D4, M6-1B9 และ M6-1E9 มาใช้ในการศึกษา โดยได้ทำการเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography จากนั้นจึงทำการตรวจสอบความสามารถในการจับและความจำเพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีดังกล่าว โดยการนำไปย้อมกับเซลล์ชนิด U937 และ COS เซลล์ที่มีโมเลกุล CD147 อยู่บนผิวเซลล์ และพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ที่เตรียมให้บริสุทธิ์ทั้งหมดนั้นสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ U937 และ COS เซลล์ที่มี CD147 อยู่บนผิวเซลล์แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD147 ที่เตรียมได้นี้มีความจำเพาะต่อโมเลกุล CD147 และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปได้

ด้วยการตรวจวิเคราะห์แบบ cross-blocking เพื่อศึกษาถึงเอพิโทปบนโมเลกุล CD147 ที่โมโนโคลนอล แอนติบอดีแต่ละโคลนนั้นทำปฏิกิริยา โดยอาศัยความสอดคล้องในการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนอล แอนติบอดี ทำให้สามารถจำแนกโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ที่ใช้ในการศึกษานี้ออกเป็นสี่เอพิโทป เอพิโทปที่หนึ่งคือ M6-2F9 เอพิโทปที่สองคือ M6-2B1 และ M6-1F3 เอพิโทปที่สามคือ M6-1D4 และเอพิโทปที่สี่คือ M6-1B9 กับ M6-1E9 และด้วยการใช้ COS เซลล์ถูก transfect ด้วย cDNA ที่กำหนดการสร้าง domain ที่ 1 หรือ domain ที่ 2 ของ CD147 พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-2F9, M6-2B1, M6-1D4, M6-1B9 และ M6-1E9 นั้นทำปฏิกิริยากับเอพิโทปที่อยู่บน domain ที่ 1 ของโมเลกุล CD147 และเป็นที่น่าประหลาดใจว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1F3 นั้นไม่ได้จับกับเอพิโทปที่อยู่ทั้งบน domain ที่1 หรือ 2 ของโมเลกุล CD 147

เพื่อศึกษาถึงคุณลักษณะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD147 จึงได้นำเทคนิค western blotting และ immunoprecipitation มาใช้ในการศึกษา โดยวิธี western blotting พบว่าในสภาวะ non-reducing โมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-2F9, M6-1D4, M6-1B9 และ M6-1E9 สามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 50 kDa ส่วน M6-2B1 นั้นพบการจับกับโปรตีนหลากหลายแบบไม่จำเพาะ และไม่พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1F3 จับกับโปรตีนใดๆเลย ส่วนในสภาวะ reducing นั้นพบว่ามีแต่โมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1D4, M6-1B9 และ M6-1E9 ที่สามารถจับกับโปรตีนขนาดประมาณ 53.5 kDa ได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุล CD147 โคลน M6-2F9, M6-1D4, M6-1B9 และ M6-1E9 นั้นจับกับเอพิโทปที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ส่วนโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-2B1 และ M6-1F3 นั้นจับกับเอพิโทปที่มีลักษณะม้วนพับ นอกจากนั้นยังพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-2F9 นั้นจับกับเอพิโทปที่ได้รับผลกระทบจากสภาวะทดลองที่มี 2ME และโดยเทคนิค immunoprecipitation นั้นพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1D4, M6-1B9 และ M6-1E9 สามารถตกตะกอนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 50-60 kDa ในสภาวะ reducing และ 45.5-61.7 kDa ในสภาวะ non-reducing ส่วนโมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-2F9, M6-2B1 และ M6-1F3 นั้นไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนใดๆได้เลยทั้งในสภาวะ reducing และ non- reducing จึงสรุปได้ว่าโมเลกุล CD147 นั้นไม่ได้จับกับโปรตีนชนิดอื่นบนผิวเซลล์ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทำ immunoprecipitation นี้ และด้วยการอาศัยข้อมูลที่ได้จากการทำแผนที่เอพิโทป western blotting และ immunoprecipitation ทำให้สามารถทำนายตำแหน่งของเอพิโทปที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ใช้ศึกษา โดยพบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-2F9, M6-2B1, M6-1F3 และ M6-1D4 มีตำแหน่งของเอพิโทปจำเพาะที่แตกต่างกัน ขณะที่โมโนโคลนอล แอนติบอดี ชนิด M6-1B9 และ M6-1E9 ทำปฏิกิริยากับเอพิโทปจำเพาะเดียวกันหรือจับอยู่กับเอพิโทปที่อยู่ใกล้กันมาก

เมื่อทำการศึกษาหน้าที่ของ CD147 โมเลกุลโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ทั้ง 6 ชนิด โดยแบ่งการศึกษาหน้าที่นี้ออกเป็น 2 แบบ คือการศึกษาหน้าที่ในด้านการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis และการศึกษาหน้าที่ในด้านการควบคุมการกระตุ้น ที เซลล์ ผลการทดลองพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่สามารถแสดงการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ใน cell line ชนิด U937, KG1a และ Sup-T1 เลย และในการศึกษาถึงผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ที่มีต่อการควบคุมการกระตุ้น ที เซลล์นั้น ได้ทำการกระตุ้น PBMC ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดี OKT3 หรือ PHA และเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีหรือมีโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ที่หลากหลายความเข้มข้น ซึ่งผลการทดลองพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี M6-1B9 และ M6-1E9 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ ที เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย OKT3 ได้ ในขณะที่โมโนโคลนอล แอนติบอดีอื่นๆ ไม่แสดงการยับยั้งดังกล่าว ในส่วนของการกระตุ้น ที เซลล์ด้วย PHA นั้นพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้ ไม่สามารถแสดงการยับยั้งการแบ่งตัวของของ ที เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นดังกล่าวได้เลย

ในการศึกษาครั้งนี้ ผลทดลองสามารถยืนยันได้ว่า โมเลกุล CD147 เป็นโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการกระตุ้นการทำงานของ ที เซลล์ โดยการควบคุมนี้อาศัยการทำงานผ่านทางเอพิโทปที่จำเพาะบนโมเลกุล การค้นพบนี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันผ่านทาง ที เซลล์ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในทางคลินิกได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved