Thesis Title	Induction of Signal Transduction *via* Activated CD147 Molecule on U937 Cell Line by CD147 Antibody
Author	Miss Panida Khunkeawla
M. S.	Biochemistry

Examining Committee:

Assistant Professor Dr. Prachya Kongtawelert	Chairman
Associate Professor Dr. Watchara Kasinrerk	Member
Associate Professor Dr. Maitree Suttajit	Member
Associate Professor Dr. Sansanee Chaiyaroj	Member

Abstract

CD147 is a 50-60 kDa glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, broadly expressed on hematopoietic cell lines and peripheral blood cells. Engagement of CD147 by CD147 monoclonal antibodies (mAb) has been shown to induce homotypic aggregation of U937 cells. However, intracellular signal transduction pathway after CD147 engagement is still unknown.

To study the intracellular signaling *via* CD147, a mAb to CD147, termed M6-1D4, was firstly purified by affinity chromatography using anti-mouse IgM Sepharose column. The binding activity of the purified M6-1D4 after completion of purification processes was determined by staining CD147 expressing COS cells using indirect immunofluorescent method. The results showed that the purified M6-1D4 strongly reacted to CD147 expressing COS cells but did not react to mock transfectants. The expression of CD147 on various hematopoietic cell lines including, U937, Duadi, Sup-T1, Molt4 and K562 was analyzed by using purified M6-1D4. All tested cell lines were positive with mAb M6-1D4. Staining of freshly isolated PBMC and PHA activated PBMC with M6-1D4 indicated that CD147 is a lymphocyte activated antigen.

The purified M6-1D4 (10μg/ml) was then used to activate U937 cell lines. Homotypic cell aggregation of U937 cells was observed in 2 hours after activation and

reached to the maximal at 24 hours. This cell aggregation was inhibited by 40 μg/ml of anti-leukocyte function associated antigen-1 (LFA-1) mAb or anti-intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mAb. Whereas 0.78-1,000 μg/ml of various polysulfated polysaccharides including heparin, dextran sulfate (M.W. 500,000, 40,000, and 8,000), pentosan polysulfate, polyolpolysulfate, chondroitin sulfate C and chondroitin sulfate D have no effect on cell aggregation. This result indicated that LFA-1 and ICAM-1 but not polysulfated polysaccharides are involved in U937 cell aggregation induced by mAb against CD147.

To study the effect of protein synthesis inhibitors on M6-1D4 induced cell aggregation, U937 cells were cultured with M6-1D4 in the presence of protein synthesis inhibitors, mitomycin C or cyclohexamide. It was found that these agents have no effect on cell aggregation. However, cell aggregation was completely inhibited by actin filament polymerization blocking agent, cytochalasin B and cytochalasin D, implying that U937 cell aggregation induced by mAb to CD147 is strongly associated with cytoskeleton reorganization.

To study the signal transduction *via* CD147, protein kinase C inhibitors, 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) and sphingosine, and protein tyrosine kinase inhibitors, genistein, were used to inhibit M6-1D4 induced cell aggregation. Both protein kinase C inhibitors, H-7 and sphingosine, inhibited M6-1D4 induced cell aggregation in a dose dependent manner. In contrast to protein kinase C, protein tyrosine kinase, genistein, enhanced cell aggregation. Other clones of mAb against CD147, M6-1E9 and M6-2B1, which slightly induced homotypic cell aggregation, were used to induce homotypic cell aggregation of U937 cells in the presence of genistein. The results showed that in the presence of genistein, M6-1E9 and M6-2B1 could induce maximum (4+) cell aggregation. It was postulated that, engagement of CD147 with mAb to CD147 induced signal transduction through protein kinase C and protein tyrosine kinase pathways. However, protein tyrosine kinase may functions as an inhibitory signal.

The special characteristic of CD147 is that there is a charge residue, glutamic acid located in its transmembrane region. This phenomenon is usually found in the molecule that always associated with the other proteins. Immunoprecipitation technique was used to find out whether CD147 is associated with the other protein in the membrane. It was found that purified M6-1D4 precipitated a broad protein band 45-65 kDa. This result suggested that there are no any proteins associated with CD147 on U937 cell surface. On

the other hand, some proteins may be associated with CD147, but the associated protein may have the molecular mass with in the same range of CD147.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเหนี่ยวนำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ผ่าน CD147 โมเลกุลบนเซลล์ U937 ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติบอดีต่อ CD147

ชื่อผู้เขียน นางสาวพนิดา ขันแก้วหล้า

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	กรรมการ
รศ. ดร. ไมตรี สุทธจิตต์	กรรมการ
รศ. ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

CD147 เป็นกลัยโคโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50-60 kDa จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการกระตุ้น CD147 ด้วย CD147 โมโนโคลนอล แอนติบอดี สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ U937 เกาะกลุ่มกันได้ แต่กระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่าน CD147 หลังการกระตุ้นด้วยแอนติบอดีต่อ CD147 ยังไม่ทราบแน่ชัด

เพื่อศึกษากระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่าน CD147 ในการศึกษานี้เริ่มต้นด้วยการเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ CD147 ชนิดหนึ่ง ชื่อ M6-1D4 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography โดยใช้ anti-mouse IgM Sepharose column เป็นตัวแยก จากนั้นทดสอบคุณสมบัติของแอนติบอดี ที่แยกได้ โดยการย้อม CD147 expressing COS cells ด้วยวิธี indirect immunofluorescent ผลการทดลองพบว่า M6-1D4 ที่บริสุทธิ์ ทำปฏิกิริยาได้กับ CD147 expressing COS cells แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ mock transfectants จากนั้นได้นำ M6-1D4 ที่บริสุทธิ์ ที่เตรียมได้ มาศึกษาการแสดงออกของCD147 บนผิว hematopoietic cell lines หลายชนิดได้แก่ U937, Duadi, Sup-T1, Molt4 และ K562 และพบว่า hematopoietic cell lines ทุกชนิดที่ทำการทดสอบให้ผลบวกกับ M6-1D4 และเมื่อนำ PBMC ที่แยกได้จากเลือดคนปกติ ที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย PHA มาย้อมด้วย M6-1D4 พบว่า CD147 จัดเป็น lymphocyte activated antigen ชนิดหนึ่ง

จากนั้นผู้วิจัยได้นำ M6-1D4 ที่บริสุทธิ์ (10 μg/ml) มากระตุ้น U937 cell lines พบว่าเซลล์ U937 เริ่มเกิดการเกาะกลุ่มให้เห็นได้ในชั่วโมงที่ 2 หลังการกระตุ้น และเกาะกลุ่มสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง การเกาะกลุ่มของเซลล์ U937 นี้สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยแอนติบอดีต่อ leukocyte function associated-1 (LFA-1) หรือ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ที่ 40 μg/ml ในขณะที่สารในกลุ่ม polysulfated polysaccharides อันได้แก่ heparin, dextran sulfate M.W. 500,000, dextran sulfate M.W. 40,000, dextran sulfate M.W. 8,000, pentosan polysulfate, polyolpolysulfate, chondroitin sulfate C และ chondroitin sulfate D ที่ความเข้มข้น 0.78-1,000 μg/ml ไม่มีผลยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเซลล์ U937 โดย แอนติบอดีต่อCD147 นี้ อาศัย LFA-1 และ ICAM-1 และไม่มีความเกี่ยวข้องกับสาร polysulfated polysaccharides

เพื่อศึกษาผลของตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์ U937 โดย M6-1D4 จึงทำการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย M6-1D4 ในภาวะที่มีสารยับยั้งการสร้างโปรตีน คือ mitomycin C และ cyclohexamide ผลการทดลองพบว่าสารเหล่านี้ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มของเซลล์เลย ในขณะที่การเกาะกลุ่มของเซลล์ถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อใช้สารยับยั้ง actin filament polymerization ซึ่งได้แก่ cytochalasin B และ cytochalasin D ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเซลล์ U937 โดย แอนติบอดีต่อ CD147 ต้องอาศัยกลไก cytoskeleton reorganization

เพื่อศึกษาการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่าน CD147 จึงนำสารยับยั้งการทำงานของ protein kinase C คือ 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7)และ sphingosine และ protein tyrosine kinase คือ genistein มาศึกษาผลการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเซลล์ U937 โดยแอนติบอดี M6-1D4 ผลการศึกษาพบว่า สารยับยั้ง protein kinase C ทั้ง H-7 และ sphingosine สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์ U937 ในขณะที่ genistein กลับกระตุ้นให้การเกาะกลุ่มของเซลล์เกิดมากขึ้น ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ CD147 โคลนอื่นๆ ได้แก่ M6-1E9 และ M6-2B1 ซึ่งปกติจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์ U937 ได้เล็กน้อย มากระตุ้นเซลล์ U937 ในภาวะที่มี genistein อยู่ด้วย ผลการทดลองพบว่า ในสภาวะที่มี genistein แอนติบอดี M6-1E9 และ M6-2B1 สามารถกระตุ้น U937 ให้เกิดการเกาะกลุ่มได้ถึงระดับสูงสุด (4+) ดังนั้น อาจทำนายผลการทดลองได้ว่า การกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเซลล์ U937 ด้วย M6-1D4 สามารถเหนี่ยวนำให้มีการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ผ่าน protein kinase C และ protein tyrosine kinase ซึ่ง protein tyrosine kinase น่าจะทำหน้าที่ส่ง inhibitory signal

จากการที่ CD147 มีกรดอะมิโนที่มีประจุ คือ glutamic acid อยู่ในส่วนของ transmembrane ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้มักพบในโปรตีนที่มักจะจับกับโปรตีนชนิดอื่น เพื่อศึกษาว่า CD147 จับกับโปรตีนชนิดอื่นบนผิวเซลล์ U937 หรือไม่ จึงนำวิธี immunoprecipitation มาศึกษา ผลการศึกษา พบว่า M6-1D4 ที่บริสุทธิ์ สามารถตกตะกอนโปรตีนหนึ่งแถบที่น้ำหนักโมเลกุล 45-65 kDa ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า

CD147 ไม่ได้จับโปรตีนชนิดอื่นบนผิวเซลล์ หรือ CD147 อาจจับกับโปรตีนอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงเดียวกับ CD147 โปรตีน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University