Thesis Title Cellular Distribution, Biochemical Characterization, Function and Molecular Cloning of Gene Encoding P-3E10 Molecule

Author Miss Sawitree Chiampanichayakul

Ph.D. Biochemistry

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Member
Assoc. Prof. Dr. Viboon Rattanapanone	Member
Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Member
Prof. Dr. Hannes Stockinger	Member

ABSTRACT

The immune system plays a major role in maintaining the homeostasis of health by protecting the body from pathogens and from mutated or oncogenic cells. Leukocytes are cells, which play a major role in the immune system. In recent years, several studies were performed to achieve a better understanding of leukocyte communications and have demonstrated that leukocyte surface molecules are responsible for cell-cell interactions.

In order to identify new surface molecules involved in regulation of T cell activation, a Balb/c mouse was immunized intraperitoneally three times at weekly intervals with human Molt4 T cell line. Various monoclonal antibodies (mAbs) were

generated using standard hybridoma technology. From among the mAbs generated, a mAb named P-3E10 was demonstrated to down-regulate the T cell proliferation induced by immobilized CD3 specific OKT3 mAb. For this reason, the P-3E10 mAb was selected for further characterization. In order to study the expression of molecule recognized by P-3E10 mAb, various cell types were stained with P-3E10 mAb by indirect immunofluorescence and analyzed by flow cytometry. It was found that the molecule recognized by P-3E10 mAb was broadly expressed on all hemopoietic as well as non-hemopoietic cell lines tested. Within peripheral blood leukocytes, the P-3E10 antigen was detected on lymphocytes, monocytes and granulocytes.

Functional studies of P-3E10 molecule indicated that engagement of P-3E10 molecule by P-3E10 mAb showed an inhibitory effect on anti-CD3 mAb induced T cell proliferation. P-3E10 mAb was also able to inhibit interferon-γ, IL-2, IL-4 and IL-10 production. Furthermore, P-3E10 mAb showed an inhibitory effect on anti-IgM-induced B cell proliferation. In contrast to lymphocytes, the P-3E10 mAb had no effect on spontaneous proliferation of immortalized cell lines SupT-1, Jurkat, Molt4 and U937. Moreover, P-3E10 mAb did not influence the induction of homotypic cell aggregation or apoptosis of various cell lines.

Biochemical characterization of the P-3E10 molecule was performed by immunoprecipitation. The lysate of surface biotin-labeled SupT1 cells was immunoprecipitated with P-3E10 mAb-coated protein A sepharose. The precipitated molecule was subjected to SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. The biochemical analysis revealed that P-3E10 mAb immunoprecipitated a protein with a molecular weight of 45-50 kDa under non-reducing and 50-55 kDa under reducing conditions. This finding indicated that the P-3E10 molecule contains intra-disulfide bond (s).

To clone the cDNA encoding the P-3E10 molecule, the retroviral expression cloning system was performed. Using this cloning system, a cDNA library from the

KG1a cell line was constructed in the retroviral vector pBMN-Z. The constructed KG1a cDNA library was then transfected into Phoenix packaging cells to produce ecotropic viruses. Then, cultured supernatant containing ectropic retroviruses were transduced into mouse thymoma BW5147 cells. BW5147 transductants expressing the P-3E10 molecules were stained with P-3E10 mAb and P-3E10 mAb binding cells were sorted by immunomagnetic bead sorting system. The sorted cells were subjected for cloning to single cell cultures by limiting dilution. To obtain cDNA encoding P-3E10 molecule, total RNA was extracted from BW5147 expressing P-3E10 and subjected to RT-PCR using primers flanking the multiple cloning site of the retroviral vector. The P-3E10 cDNA cloned was sequenced and compared to the database. Sequence analysis revealed that P-3E10 is identical to the Na^+ ,K^+-ATPase β3 subunit.

Overall, it can be concluded that the generated P-3E10 mAb recognize a cell surface molecule, Na^+ ,K^+-ATPase β3. Engagement of Na^+ ,K^+-ATPase β3 by P-3E10 mAb may block Na^+ ,K^+-ATPase activation leading to inhibited lymphocyte activation. These findings lead to a better understanding of immune regulation, which may provide new avenues for clinical intervention.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การกระจายตัวระดับเซลล์ ลักษณะเฉพาะทางชีวเคมี หน้าที่ และการโคลนระดับโมเลกุลของยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุล P-3E10

ชื่อผู้เขียน นางสาว สาวิตรี เจียมพานิชยกุล

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	กรรมการ
รศ. ดร. วิบูลย์ รัตนาปนนท์	กรรมการ
รศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล	กรรมการ
Prof. Dr. Hannes Stockinger	กรรมการ

บทคัดย่อ

ระบบภูมิคุ้มกันมีบทบาทสำคัญในการรักษาภาวะสมดุลย์ของร่างกาย โดยระบบดังกล่าวมีบทบาทในการป้องกันร่างกายจากเชื้อโรคต่างๆ และเซลล์มะเร็ง เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ปัจจุบันมีการศึกษาถึงการทำงานร่วมกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ และพบว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่สำคัญในการก่อให้เกิดการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์

เพื่อศึกษาหาโมเลกุลชนิดใหม่ที่ทำหน้าที่ควบคุมการกระตุ้นการทำงานของ T cell ในการศึกษานี้ได้ทำการฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ Balb/c ทางช่องท้องด้วยเซลล์มะเร็งชนิด Molt4 T cell line จำนวน 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งฉีดห่างกัน 1 สัปดาห์ โดยวิธี hybridoma technique ทำให้สามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และพบโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิดหนึ่งชื่อ P-3E10 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ T cell เมื่อถูกกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวโดย OKT3 ซึ่งเป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุล CD3 บน T cell ดังนั้น P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี จึงถูกคัดเลือกเพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติอื่นๆต่อไป เพื่อศึกษาการแสดงออกของ

โมเลกุลที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี ผู้วิจัยได้ทำการย้อมเซลล์ชนิดต่างๆด้วย P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี โดยวิธี indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์โดยวิธีโฟลไซโตเมตรี ผลการศึกษาพบว่า โมเลกุลที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี มีการแสดงออกบนเซลล์ทุกเซลล์ที่นำมาทดสอบ ทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและเซลล์มะเร็งชนิดอื่น และเมื่อศึกษาเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด พบโมเลกุล P-3E10 บนเซลล์ลิมโฟไซท์ โมโนไซท์ และ แกรนูโลไซท์ ได้อีกด้วย

จากการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุล P-3E10 พบว่าการจับกันของโมเลกุล P-3E10 กับ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของ T cell ที่ถูกกระตุ้นโดยโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อโมเลกุล CD3 นอกจากนี้ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี ยังสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตคายน์ชนิด interferon-γ, IL-2, IL-4 และ IL-10 อีกด้วย P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดียังสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ B cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติบอดีต่อ IgM ในทางตรงกันข้ามกับเซลล์ลิมโฟไซท์พบว่า P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด SupT-1, Jurkat, Molt4 และ U937 และไม่มีผลต่อการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเซลล์หรือ การกระตุ้นการตายแบบอะพอบโตซีสของเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุล P-3E10 โดยวิธี immunoprecipitation โดยนำ lysate ของเซลล์ SupT1 ที่ติดฉลากด้วยไบโอตินมาทำ immunoprecipitation ด้วย P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่ติดอยู่กับ protein A sepharose จากนั้นนำโมเลกุลที่ได้ไปทำ SDS-PAGE ในสภาวะ reducing และ non-reducing จากการวิเคราะห์พบว่า P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45-50 กิโลดาลตันในสภาวะ non-reducing และมีน้ำหนักโมเลกุล 50-55 กิโลดาลตันในสภาวะ reducing จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าภายในโมเลกุล P-3E10 ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์

เพื่อโคลน cDNA ที่กำหนดการสร้างโมเลกุล P-3E10 ผู้วิจัยได้นำวิธีการโคลนยีนโดยระบบรีโทรไวรัส (retroviral expression cloning system) มาใช้ศึกษา โดยเตรียม cDNA จาก KG1a cell lineแล้วนำ cDNA ที่ได้ใส่เข้าไปในรีโทรไวรัสเวคเตอร์ชนิด pBMN-Z จากนั้นนำ KG1a cDNA library เหนี่ยวนำเข้าไปใน Phoenix packaging cell เพื่อผลิต ecotropic viruses แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีรีโทรไวรัสไป transduce เข้าไปในเซลล์หนู BW5147 จากนั้นเซลล์ BW5147 ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล P-3E10 จะถูกคัดเลือกโดยการย้อมกับ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี เซลล์ที่ทำปฏิกิริยากับ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี จะถูกคัดเลือกโดย magnetic bead sorting system และนำเซลล์ที่คัดเลือกได้มาทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆโดยวิธี limiting dilution จากนั้นทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ BW5147 ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล P-3E10 และทำ RT-PCR โดยใช้

primers ที่จำเพาะต่อตำแหน่งการสอดใส่ของยีนบน retroviral vector เมื่อนำยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุล P-3E10 ที่ได้ไปหาลำดับของกรดอะมิโนและเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูล ผลการวิเคราะห์พบว่า โมเลกุล P-3E10 มีความเหมือนกับ Na^+ ,K^+-ATPase β3 subunit ทุกประการ

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโมเลกุลบนผิวเซลล์ชื่อ Na^+ ,K^+-ATPase β3 การจับกันของ Na^+ ,K^+-ATPase β3 กับ P-3E10 โมโนโคลนอล แอนติบอดี น่าจะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na^+ ,K^+-ATPase เป็นผลทำให้การทำงานของเซลล์ลิมโฟไซท์ลดลง จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เข้าใจถึงการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นและน่าจะเป็นแนวทางที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในทางคลินิกได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University