

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี และหน้าที่ของโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จำเพาะ
ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A

Biochemical Characterization and Functional Analysis of Leukocytes Surface
Molecule Recognized by Monoclonal Antibody COS3A

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 1. ดร. พนิดา ชื่นแก้วหล้า | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี |
| 2. ศาสตราจารย์ ดร. วัชร กสิณฤกษ์ | มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การทำหน้าที่ของเซลล์ให้สมบูรณ์นั้น ในธรรมชาติได้สร้างให้เซลล์เหล่านี้มีการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดบนผิวของเซลล์เหล่านี้เรียกว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อให้เซลล์สามารถใช้ในการสื่อสารระหว่างเซลล์และเชื้อให้เซลล์เหล่านี้สามารถจัดการสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในร่างกายได้อย่างเป็นระบบ บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดต่างๆ มากมาย โมเลกุลบางชนิดถูกค้นพบและทราบหน้าที่ที่แน่ชัด แต่มีอีกหลายโมเลกุลที่ถูกค้นพบแต่ยังไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แท้จริง โดยยังคงมีการศึกษากันอยู่อย่างต่อเนื่อง จากการใช้เทคนิคไฮบริโดมาเราสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวได้หลายโคลน โดยโคลนที่เราสนใจคือ COS3A จากการย้อมโปรตีนบนผิวเซลล์ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดีชนิดนี้มีการแสดงออกบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทุกชนิดรวมทั้ง leukemia cell lines ที่นำมาทดสอบ แต่ไม่แสดงออกบนผิวของเม็ดเลือดแดง โดยบนผิวของทีลิมโฟไซด์จะพบบนผิวของ naïve ลิมโฟไซด์มากกว่าบน memory เซลล์ และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจึงจัดเป็น activated associated molecule นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ยังมีผลยับยั้งการแบ่งตัวของลิมโฟไซด์หลังการกระตุ้น peripheral blood cells (PBMCs) ผ่าน CD3/TCR โดยไปมีผลในการลดการหลั่งสาร interleukin-2 (IL-2) และ IL-4 ซึ่งการยับยั้งจะลดลงไปเมื่อแยกเอาโมโนไซด์และ natural killer cell (NK cells) ออกไป โดยแอนติบอดี COS3A ไม่มีผลในการเหนี่ยวนำให้ U937 และ K562 เกิดการตายแบบ apoptosis จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าโมเลกุลชนิดนี้เป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 35–70 kDa โดยน้ำหนักส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลของน้ำตาลที่จับอยู่กับสายเปปไทด์แบบ N-link เมื่อตัดน้ำตาลนี้ออกจะได้น้ำหนักโปรตีนอยู่ที่ประมาณ 20 kDa ผลการวิจัยที่ได้จึงเป็นข้อมูลสำคัญที่บ่งบอกถึงคุณสมบัติและหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ แอนติบอดี COS3A ต่อการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบอย่างไรก็ตามการยืนยันว่าโมเลกุลนี้คืออะไรโดยวิธีการโคลนนิ่งและการหาลำดับกรดอะมิโนยังต้องทำการพิสูจน์

คำสำคัญ: เซลล์เม็ดเลือดขาว, โมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว, โมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A, การแบ่งตัวของทีเซลล์, การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน, คุณสมบัติทางชีวเคมี

Abstract

Leukocytes are known as the cells which play a major role in the immune system. To execute their functions, nature design there surface to express abundant of proteins that the cells can use for cell–cell communication. Some of these molecules have been identified and characterized. Nevertheless, many of them still wait for discovering. Using hybridoma technique, several monoclonal antibodies (mAbs) to leukocytes surface molecules were generated. One among those mAbs named COS3A was of interest. Single and two colors cell surface staining and flow cytometry analysis showed that COSA recognizing molecule express on surface of all hematopoietic cell lines tested and all leukocytes surface. However, this molecule can not find on surface of red blood cells (RBCs). On T cell surface, expression of this molecule of surface of naïve T cells is higher than on memory T cells. Remarkably, high expression of this molecule was induced upon T cell activation. Thus this molecule is an activated associated molecule. Functional studies of this mAb on T cells proliferation reveal that the mAb COS3A can suppress CD3–mediated T cell proliferation while using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as target cells. Interestingly, this phenomenon was diminished while monocytes and NK cells were depleted. We found that reduction of IL–2 and IL–4 secretion may cause suppression of T cell proliferation. Biochemical characterization using Immunoprecipitation technique found a protein with molecular weight of about 70 kDa was precipitated with mAb CARA. These preliminary results reveal that the generated mAb CARA may recognize a new leukocyte surface molecule and this molecule can be used as marker to identify a novel T cell subpopulation. Induction of cell apoptotic was also observed using U937 and K562 as models. The results showed that mAb COS3A had no effect on induction of program cell death via apoptosis. Biochemical characterization COS3A recognizing molecule is a glycoprotein with molecular weight of about 35–70 kDa. N–glycosylation sugars were found as the highest moiety of this molecule. Removing of thiese sugar can reduce the molecular weight of this molecule to 20 kDa. These results are important information that explains the biochemical properties of this molecule and its biological function, especially role on cell–mediated immune response. Nonetheless, identification of the molecule using molecular cloning and amino acid sequencing are futher needed.

Keywords: leukocytes, leukocyte surface molecules, monoclonal antibody COS3A, T cell proliferation, immune response, biochemical properties.

หน้าสรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี และหน้าที่ของโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A

(ภาษาอังกฤษ) Biochemical Characterization and Functional Analysis of Leukocyte Surface Molecule Recognizing by Monoclonal Antibody COS3A

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี (16 มีนาคม 2552– 15 มีนาคม 2554)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : อาจารย์ ดร. พนิดา ชันแก้วหล้า

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. วังระ กสิณฤกษ์

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ระบบภูมิคุ้มกัน เป็นระบบที่มีความสำคัญระบบหนึ่งของร่างกายในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอม เซลล์มะเร็ง หรือเชื้อโรคเพื่อไม่ให้อันตรายต่อร่างกาย การทำงานในระบบภูมิคุ้มกันเกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์หลายชนิด เซลล์ที่ทำหน้าที่หลักในระบบภูมิคุ้มกัน ก็คือเซลล์เม็ดเลือดขาว กลไกที่เอื้อให้เซลล์เหล่านี้สามารถจัดการสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในร่างกายได้อย่างเป็นระบบนั้น คือการสื่อสารและส่งสัญญาณอย่างมีประสิทธิภาพระหว่างเซลล์ ธรรมชาติจึงได้กำหนดให้บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว มีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดต่างๆ มากมายโดยเรียกโมเลกุลเหล่านี้ว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อให้เซลล์ใช้โมเลกุลเหล่านี้เป็นเครื่องมือในการสื่อสารและรับส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ ดังนั้นการที่เราทราบถึงคุณสมบัติและบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการอธิบายกลไกควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โมเลกุลบางชนิดที่ได้ถูกค้นพบและทราบหน้าที่ที่แน่ชัดแล้ว อีกหลายโมเลกุลถูกค้นพบแล้วแต่ยังไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แท้จริง โดยยังคงมีการศึกษากันอยู่อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่ายังมีโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์อีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ถูกค้นพบ การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดใหม่ รวมถึงการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ทำให้เราเข้าใจบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลดังกล่าวต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น โดยจะมีผลเชื่อมโยงทำให้เราเข้าใจการกระบวนการทำงานต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น โดยองค์ความรู้ที่ได้นั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและวินิจฉัยการดำเนินไปของโรคต่างๆ และยังรวมถึงการหาวิธีการรักษาโรค ต่อไปในอนาคตได้ ดังนั้นผู้วิจัยจำนวนมากทั่วโลกจึงมีความตั้งใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาบทบาทและหน้าที่ของโมเลกุลชนิดเหล่านี้

อย่างลึกซึ้งเพื่อให้เกิดองค์ความรู้และอาจจะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้งานได้จริงในอนาคตข้างหน้าได้ และจากการศึกษาที่ผ่านมา โดยความร่วมมือกับ ศ. ดร. วัชร กสิณฤกษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody; mAb) ต่อ leukocyte surface molecule ได้หลายชนิด โดยมีโคลนที่ผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาอย่างละเอียดมีชื่อว่า COS3A จากการศึกษาในเบื้องต้นนั้น พบว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb COS3A มีการแสดงออกบน lymphocyte, monocyte และ granulocyte โดยพบว่าการแสดงออกของโมเลกุลนี้มีลักษณะเด่นคือ COS3A สามารถพบบนผิวของ T lymphocytes และในประชากรย่อยของ T lymphocytes (CD4+ และ CD8+ lymphocytes) นอกจากนี้ในการศึกษาเบื้องต้นเราพบว่า mAb COS3A สามารถไปลดการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ผ่าน CD3/TCR ได้ จึงถือได้ว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนี้เป็นโมเลกุลที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะทำการศึกษาต่อในรายละเอียด ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่าโมเลกุลชนิดนี้อาจจัดเป็นโมเลกุลชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการค้นพบ จึงมีความประสงค์ที่จะนำเอา mAb COS3A มาใช้ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะบนเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง รวมไปถึงคุณสมบัติทางชีวเคมี หน้าที่ของโมเลกุลชนิดนี้ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ตลอดจนการโคลนยีนของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb COS3A เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นโมเลกุลชนิดใด ซึ่งข้อมูลหรือองค์ความรู้ทั้งหมดที่ได้นั้นจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่จะทำให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น นอกจากนี้อาจนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยได้

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A บนเซลล์ชนิดต่างๆ
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A
3. เพื่อศึกษาหน้าที่ (Functional study) ทางชีวเคมีและ ทางภูมิคุ้มกันวิทยาของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A
4. เพื่อทำการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A

3. สรุปผลการวิจัย

- โมเลกุล COS3A มีการแสดงออกบนเซลล์ hematopoietic cells และ hematopoietic cell lines และจัดอยู่ในกลุ่มของ activated molecule คือมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น

- บนมผิวของ T cell subpopulation โมเลกุล COS3A นี้มีการแสดงออกบน $CD4^+$ T lymphocyte และ $CD8^+$ T lymphocyte เฉพาะบางเซลล์เท่านั้น และพบว่ามีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดนี้นับกลุ่มของ $CD4^+$ T lymphocyte น้อยกว่าบน $CD8^+$ T lymphocyte
- โมเลกุล COS3A มีการแสดงออกบน naïve T cell แต่ไม่ปรากฏหรือมีน้อยมากบน activated หรือ memory T cells
- แอนติบอดี COS3A มีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย CD3 mAb (OKT3) โดยคาดว่า โมเลกุล COS3A บนมผิวเซลล์โมโนไซต์มีความสำคัญต่อการยับยั้งในระยะยาว
- แอนติบอดี COS3A ที่เติมลงไปบนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย CD3 mAb (OKT3) จะไปมีผลต่อการหลั่งสาร cytokine หลังจากเลี้ยงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีการหลั่ง IL-2, IL-4 ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแบบไม่เติมแอนติบอดี COS3A ส่วน cytokine ชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ (IL-6, IL-10, TNF- α , และ INF- γ) ยังไม่เห็นผลแน่ชัด
- แอนติบอดี COS3A ไม่มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis เมื่อใช้ U937 และ K562 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล COS3A สูง เป็นแม่แบบในการศึกษา
- ลักษณะทางชีวเคมีของโมเลกุล COS3A เป็น glycoprotein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 35-70 kDa ในสภาวะ non-reduced แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในสภาวะ reduced แสดงว่าพันธะไดซัลไฟด์มีผลต่อแอนติบอดีในการเข้าจับโมเลกุล ซึ่งน้ำหนักที่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์นั้นอาจขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลที่เติมลงไปในแต่ละช่วงของการสร้างโปรตีนของเซลล์แต่ละชนิด โดยน้ำตาลส่วนใหญ่หรือทั้งหมดที่จับกับโปรตีนเป็นแบบ N-glycosylation

4. ผลงานที่ได้จากการวิจัย

- นำเสนอผลงานต่อที่ประชุมระดับชาติในรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุม Fifth Annual Symposium Protein Society of Thailand “Protein Research: From Basic Approaches to Modern Technologies” หัวข้อ Cellular expression and functional analysis of leukocyte surface molecule recognized by newly generated monoclonal antibody COS3A ระหว่างวันที่ 22-25 มิถุนายน 2553 ณ ห้องประชุมใหญ่ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ (Abstract ในภาคผนวก)

- นำเสนอผลงานต่อที่ประชุมระดับชาติในรูปแบบบรรยาย หัวข้อ Cellular expression and functional analysis of leukocyte surface molecule recognized by newly generated monoclonal antibody COS3A ครั้งที่ 10 ระหว่างวันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (Abstract ในภาคผนวก)
- Panida Khunkaewla, Watchara Kasinrer, Supansa Pata, Kodchakorn Mahasongkram and Nathapol Kruakhamlaw. Biochemical characterization and cellular expression of COS3A recognition molecule (2011). Tissue Antigens. (Manuscript in preparation)

5. ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

- เพิ่มความรู้ความเข้าใจในกลไกการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A คุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลดังกล่าว โดยพบว่าแอนติบอดีนี้สามารถทำหน้าที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยโมเลกุล COS3A ที่อยู่บนเซลล์โมโนไซต์น่าจะเป็นตัวหลักในการควบคุมการยับยั้ง หรือการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์
- เผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมระดับชาติรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุม Fifth Annual Symposium Protein Society of Thailand “Protein Research: From Basic Approaches to Modern Technologies” ระหว่างวันที่ 22-25 มิถุนายน 2553 ณ ห้องประชุมใหญ่ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ (Abstract ในภาคผนวก)
- เผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมระดับชาติรูปแบบบรรยายในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบนักวิจัยอาวุโสระหว่างวันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (Abstract ในภาคผนวก)
- คาดว่าผลงานการวิจัยนี้จะสามารถตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มีค่า impact factor ได้โดยขณะนี้อยู่ในช่วงของการเตรียม manuscript และรอผลการพิสูจน์ยืนยันโมเลกุล COS3A ว่าเป็นโมเลกุลอะไร

บทนำ

ระบบภูมิคุ้มกัน เป็นระบบที่มีความสำคัญระบบหนึ่งของร่างกายในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอม เซลล์มะเร็ง หรือเชื้อโรคเพื่อไม่ให้ทำอันตรายต่อร่างกาย การทำงานในระบบภูมิคุ้มกันเกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์หลายชนิด เซลล์ที่ทำหน้าที่หลักในระบบภูมิคุ้มกัน ก็คือเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยกลไกที่เอื้อให้เซลล์เหล่านี้สามารถจัดการสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในร่างกายได้อย่างเป็นระบบนั้น คือกระบวนการสื่อสารและส่งสัญญาณอย่างมีประสิทธิภาพระหว่างเซลล์ (1-5) ธรรมชาติจึงกำหนดให้บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของโมเลกุลชนิดต่างๆ มากมาย โดยเรียกโมเลกุลเหล่านี้ว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว (6) กลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสื่อสารระหว่างเซลล์โดยโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลไกหลักคือ cell-cell interaction และ ligand-receptor interaction โดยพบว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น Adhesion molecules และโมเลกุลจำนวนหนึ่งทำหน้าที่เป็น receptors สำหรับ cytokine หรือ chemokine การเข้าจับกันระหว่าง ligand-receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นจะก่อให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ และส่งผลให้มีการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ differentiation, maturation, proliferation, migration ตลอดจนกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis และสุดท้ายจะก่อให้เกิดการตอบสนองแบบต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน (1-7) ดังนั้นการที่เราทราบถึงคุณสมบัติและบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการอธิบายกลไกควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

ปัจจุบันมีโมเลกุลบนผิวเซลล์มากกว่า 339 ชนิดได้ถูกค้นพบและจัดให้อยู่ในระบบ ของ Cluster of differentiation (CD) จากการประชุม Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) ครั้งที่ 8 ที่เมือง Adelaide ประเทศออสเตรเลีย (8, 9) โดยโมเลกุลบางชนิดที่ถูกค้นพบทราบหน้าที่ที่แน่ชัดแล้ว และมีอีกหลายโมเลกุลถูกที่ถึงแม้จะถูกค้นพบแล้ว แต่ยังไม่ทราบคุณสมบัติและหน้าที่ที่แท้จริง โดยยังคงมีการศึกษากันอยู่อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่ายังมีโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์อีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ถูกค้นพบ การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดใหม่ การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโมเลกุลบนเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ จะสามารถทำให้เราเข้าใจบทบาทหน้าที่ของโมเลกุลดังกล่าวต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น โดยองค์ความรู้ที่ได้นั้นอาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกัน วินิจฉัยและรักษาโรค ต่อไปในอนาคตได้

ในการศึกษาคุณสมบัติ หรือหน้าที่ของโมเลกุลใดๆ บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยทั่วไปนั้น สามารถทำได้โดยการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะ และนำเอาโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุลชนิดนั้นๆ มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษา ซึ่งโมโนโคลนอล แอนติบอดีดังกล่าว สามารถผลิตขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Hybridoma technique ซึ่งได้ถูกพัฒนามาใช้โดย Kohler และ Milstein ในปี 1975 (2, 3,

10) โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นสามารถนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลนั้นๆ บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ (cellular distribution) การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนั้น เช่น การศึกษาหาขนาดของโมเลกุล (molecular weight) การศึกษาหาปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (glycosylation) หรือ อาจใช้ตรวจสอบการจับกับโมเลกุลอื่นๆบนผิวเซลล์เดียวกัน (protein interaction) เป็นต้น นอกจากนี้เรายังสามารถนำแอนติบอดีที่ได้มาทำการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะ โดยการนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้เข้ามาจับและสังเกตการตอบสนองต่างๆ ของเซลล์ที่เกิดขึ้น เช่น การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ การกระตุ้นหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) เป็นต้น และท้ายที่สุดเรายังสามารถนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เราผลิตได้นั้นมาโคลนยีน และหาลำดับของ nucleotide เพื่อที่จะบอกได้ว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิดนั้นๆ คือโมเลกุลใดได้ (11)

เพื่อศึกษาหาหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว ในช่วงระยะเวลากว่าสิบปีที่ผ่านมา กลุ่มวิจัยของ ศ. ดร. วัชร กสิณฤกษ์ (ซึ่งตัวผู้วิจัยเองก็ได้อยู่ในกลุ่มวิจัยนี้เช่นกัน) ได้ทำการผลิต polyclonal antibodies (pAbs) และ monoclonal antibodies (mAbs) ที่จำเพาะต่อโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวขึ้นมาเป็นจำนวนมาก และได้นำแอนติบอดีดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งชนิดที่ถูกค้นพบแล้วและที่ยังไม่มีการค้นพบ (11-30) โดยขอยกตัวอย่างหนึ่งตัวอย่างจากผลการศึกษาดังกล่าวคือเมื่อเร็วๆ นี้ คณะผู้วิจัยได้ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวขึ้นมาชนิดหนึ่ง ตั้งชื่อว่า mAb P-3E10 จากการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb P-3E10 (P-3E10 molecule) พบว่าโมเลกุลชนิดนี้พบได้ทั่วไปทั้งบนผิวของ hematopoietic และ non-hematopoietic cell lines ในส่วนของ peripheral blood cells สามารถพบ P-3E10 antigen ได้บนผิวเซลล์ lymphocytes, monocytes และ granulocytes แต่ไม่พบบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดง (11, 29) จากการโคลนยีนโดยวิธี retroviral cloning system ทำให้ทราบว่า โมเลกุล P-3E10 คือ Na,K-ATPase $\beta 3$ subunit จากการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลชนิดนี้ พบว่า mAb P-3E10 สามารถไปยับยั้งการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด T และ B lymphocytes ได้โดย mAb P-3E10 จะยับยั้งการหลั่งสาร cytokines ที่ชื่อ IFN- γ , IL-2, IL-4 และ IL-10 หลังจากทำการกระตุ้น T lymphocytes โดยแอนติบอดีต่อ CD3 ชื่อ mAb OKT3 (11) เมื่อนำ mAb P-3E10 มาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุล P-3E10 พบว่าโมเลกุลนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-55 kDa ประกอบด้วยพันธะ disulfide ภายในโมเลกุล และจากการทำ co-immunoprecipitation พบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 115 kDa co-precipitated ร่วมกับโมเลกุล P-3E10 โดยเราตั้งสมมุติฐานว่าโมเลกุลดังกล่าวคือ α subunit ของ Na,K-

ATPase (29) ศ. ดร. วัชร กสิณฤกษ์ ได้ส่ง mAb P-3E10 ไปยังคณะกรรมการการประชุม Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) Workshop ครั้งที่ 8 จัดขึ้นที่เมือง Adelaide ประเทศ Australia ในเดือนธันวาคมปี ค.ศ. 2004 โดยผลจากการประชุมครั้งนี้ ทำให้ mAb P-3E10 และโมเลกุลที่จำเพาะถูกตั้งชื่อเป็น CD molecule ชนิดใหม่ชื่อ CD298 (8, 9) ซึ่งถือได้ว่าเป็น CD โมเลกุลแรกที่ถูกค้นพบโดยกลุ่มนักวิจัยไทย

ในข้อเสนอโครงการฉบับนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดใหม่ โดยใช้ mAb อีกชนิดหนึ่งชื่อ COS3A ที่ผลิตขึ้นมาในห้องปฏิบัติการของ ศ. ดร. วัชร กสิณฤกษ์ เป็นเครื่องมือในการศึกษาจากการศึกษาเบื้องต้นโดยการย้อมผิวเซลล์แบบ indirect immunofluorescent สามารถพบโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb COS3A ได้บนผิวของเซลล์ lymphocyte, monocyte และ granulocyte อย่างไรก็ตามการแสดงออกของโมเลกุลนี้มีลักษณะเด่นคือ ใน T lymphocytes นั้นสามารถตรวจพบโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb COS3A ได้ทั้งบน CD4⁺ และ CD8⁺ T cells โดยพบได้มากในกลุ่มของ CD8⁺ T cells นอกจากนี้ในการศึกษาเบื้องต้น พบว่า mAb COS3A สามารถไปลดการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของ T lymphocytes ผ่าน CD3/TCR ได้ จึงถือได้ว่าโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิดนี้เป็นโมเลกุลที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะทำการศึกษาในลำดับต่อไป และโดยการใช้ mAb COS3A ทำให้สามารถแยกประชากรย่อยชนิดใหม่ของ T lymphocytes ที่ไม่ใช่ CD4⁺ และ CD8⁺ population ได้ กลุ่มเซลล์แบบใหม่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่าโมเลกุลชนิดนี้อาจจัดเป็นโมเลกุลชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการค้นพบ ผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะนำเอา mAb COS3A มาใช้ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะบนเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง รวมไปถึงคุณสมบัติทางชีวเคมี หน้าที่ของโมเลกุลชนิดนี้ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ตลอดจนการโคลนนิ่งที่กำหนดการสร้างโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb COS3A เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นโมเลกุลชนิดใด ซึ่งข้อมูลหรือองค์ความรู้ทั้งหมดที่ได้ นั้นจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ที่จะทำให้เราเข้าใจการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ อาจนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย และถ้าหาก mAb COSA3 สามารถไปมีผลในการกดการกระตุ้นเซลล์ได้จริงดังเช่นในการศึกษาในเบื้องต้น องค์ความรู้ที่ได้นี้อาจสามารถนำมาพัฒนายาที่ใช้กดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับ autoimmune diseases ต่างๆ ได้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A บนเซลล์ชนิดต่างๆ
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A
3. เพื่อศึกษาหน้าที่ (Functional study) ทางชีวเคมีและ ทางภูมิคุ้มกันวิทยาของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A
4. เพื่อทำการโคลนนิ่งที่กำหนดการสร้างโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A

วิธีการวิจัย

1. การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก

ทำการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก โดยการผลิต ascitic fluid ซึ่งเป็นของเหลวที่อยู่ในช่องท้องของหนูและมีแอนติบอดีจำนวนมาก ทำได้โดยการฉีดเซลล์ hybridoma ที่ผลิตแอนติบอดี COS3A จำนวน $1-2 \times 10^6$ เซลล์ เข้าสู่ช่องท้องของหนู Balb/C หลังจากการฉีดกระตุ้นหนูด้วยสาร pristane (Tetramethyl-pentadecane) ปริมาตร 0.5 ml เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นประมาณ 7-12 วันหลังการฉีดเซลล์ จะทำการเจาะเก็บ ascitic fluid จากหนูที่ได้รับการกระตุ้น และทำการทดสอบ activity ของแอนติบอดีที่อยู่ใน ascitic fluid ด้วยการย้อมแบบ indirect immunofluorescence และวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ ก่อนที่จะนำไปเตรียมเป็นแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ต่อไป

2. การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์จาก Ascetic fluid โดยวิธี affinity chromatography

นำ ascitic fluid ที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography โดยนำ ascitic fluid ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A มาเจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer และปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm 4°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ออกไป ตัดเฉพาะส่วนใสมาใช้ จากนั้นผ่าน ascitic fluid ที่เจือจางที่ได้ผ่านลงไป Protein A sepharose column เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์เป็นชนิด IgG และจะถูกยึดจับกับเม็ด sepharose โดย Protein G ส่วนแอนติบอดีที่ไม่ถูกจับกับเม็ด sepharose ใน column จะถูกล้างออกโดย phosphate buffer ก่อนเติม eluting buffer (0.1M citric acid buffer pH 3.0) เพื่อแยกแอนติบอดีที่ถูกจับออกจาก column ทำการปรับ pH ของสารที่แยกได้ให้เป็น 7.2 โดยการเติม neutralizing buffer (2M Tris-HCl pH 8.0) นำแอนติบอดีที่ได้

จากการทำให้บริสุทธิ์ไป dialyze ด้วย PBS และวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ก่อนเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3. การตรวจวัดความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

แอนติบอดีบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 8.2 จะนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้โดยวิธี SDS-PAGE ทำได้โดยนำแอนติบอดีที่แยกได้มาผสมกับ non-reducing buffer หรือ reducing buffer และต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที ทำการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE ที่มี 12.5% resolving gel จากนั้นทำการย้อมแผ่นเจลที่แยกแอนติบอดีที่สนใจด้วยสี coomassie brilliant blue ล้างสีส่วนเกินออกโดย destaining solution จนพื้นเจลส่วนที่ไม่มีแถบโปรตีนใสสะอาด โดยขนาดของแถบโปรตีนที่แยกได้จะเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ทำควบคู่กันในแผ่นเจลเดียวกัน

4. ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ

เซลล์ชนิดต่างๆ จะทำการเลี้ยงใน RPMI-1640 ที่มี 10% fetal calf serum (FCS) และสาร antibiotics ใน 5% CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C .

- ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb COS3A บนผิวของ cell lines ชนิดต่างๆ โดยวิธี indirect immunofluorescence staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

นำเซลล์มา pre-incubated กับ 10% human AB serum ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการย้อมเพื่อป้องกันการจับกันแบบไม่จำเพาะ ระหว่างโมโนโคลนอล แอนติบอดี กับ Fc receptor บนผิวเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ดังกล่าวปริมาณ $50\ \mu\text{l}$ (1×10^7 cell/ml) มาย้อมด้วยแอนติบอดี COS3A หรือ control mAbs ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 1% BSA-PBS- NaN_3 ก่อนการเติม FITC-conjugated sheep F(ab')_2 anti-mouse immunoglobulins antibodies ทำปฏิกิริยาที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ล้างเซลล์ด้วย 1% BSA-PBS- NaN_3 ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

- ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A บนผิวของ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

ทำการแยก PBMCs จาก heparinized whole blood จาก healthy donor โดยวิธี Ficoll–Hypaque density gradient centrifugation ส่วน neutrophils จะทำการแยกโดยวิธีการตกตะกอนด้วย 6% Dextran จากนั้น PBMCs และ neutrophils ที่แยกได้จะถูกนำมาย้อมด้วยแอนติบอดี COS3A หรือ control mAbs กรณีที่มีการแยกชนิดเซลล์เป็น B lymphocyte T lymphocyte และ NK cell จะใช้วิธีการแยกกลุ่มเซลล์โดยการย้อมเซลล์แบบ direct immunofluorescent staining ร่วมกับโดยวิธี indirect immunofluorescence staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออไรโดมิเตอร์

- **ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A บนผิวของ red blood cells (RBCs)**

นำเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 0.3% ในสารละลาย 1%BSA–PBS–0.02% NaN₃ ปริมาตร 50 µl นำมาย้อมด้วยแอนติบอดี COS3A หรือ control mAbs โดยวิธี indirect immunofluorescence staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออไรโดมิเตอร์

- **ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A บนผิวของ ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น (activated lymphocytes)**

ในการตรวจหาการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A บนผิวของเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นนั้น จะทำการกระตุ้นเซลล์ 2 วิธี โดยวิธีแรกเป็นการกระตุ้น PBMCs ด้วยสาร mitogens คือ phytohemagglutinin (PHA) ส่วนวิธีที่สองจะใช้แอนติบอดีต่อ CD3 กระตุ้น PBMCs ผ่าน TCR/CD3 complex แต่ละวิธีกระตุ้นด้วยเวลา 1 และ 2 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแล้วไปทำการย้อมด้วย แอนติบอดี COS3A หรือ control mAbs โดยวิธี indirect immunofluorescence และวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออไรโดมิเตอร์

5. การศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A

- **การศึกษามลของการกระตุ้นโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A ต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis**

นำ cell lines ชนิดต่างๆ ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล COS3A หรือ peripheral blood cells มาเลี้ยงด้วยจำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อหลุม เติมน้ำเลี้ยงที่ติดการศึกษา หรือ control mAb ทำการเลี้ยงเซลล์ใน 10%FCS–RPMI ที่ 37°C, 5%CO₂ incubator ที่เวลาต่างๆ เก็บเซลล์

มาเชื่อมกับ Annexin V-FITC ความเข้มข้น $1 \mu\text{g/mL}$ ปริมาตร $5 \mu\text{L}$ โดยเชื่อมที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ในที่มีด ครบเวลาปั่นล้างและเติม $10 \mu\text{g/mL}$ ของ propidium iodide (PI) ใน binding buffer วิเคราะห์การตายแบบ apoptosis โดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

- การศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation)

- การ purify T cells และ B cells โดยวิธี magnetic cell sorting แบบ negative selection

นำ PBMCs ที่แยกได้โดยวิธี Ficoll-Hypaque density gradient มาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย สารละลาย PBS จากนั้น resuspend เซลล์ใน 10% FCS-RPMI-1640 ให้ได้ความเข้มข้น สุดท้ายเป็น 2×10^6 cell/ml และ ถ่ายเซลล์ลงใน tissue culture dish และเลี้ยงเซลล์ใน CO_2 incubator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ monocytes เกาะ dish เมื่อครบเวลาดูดเอาส่วนที่เป็น lymphocytes ที่ไม่เกาะบน dish ไปปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS นำเซลล์ที่ได้ (1×10^7 cell/ml) ไปทำการ block ส่วนของ Fc receptor บนผิวเซลล์ด้วย 10% human AB serum ก่อนเติมโม โคลนอลแอนติบอดีปอดเชื้อที่จำเพาะต่อโมเลกุล CD19 ซึ่งเป็น B cell marker และ CD16A ,CD56 ใช้เป็นตัวดึง NK cell โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดีทั้งสองเป็น $10 \mu\text{g/ml}$ ปลอ่ยให้ทำปฏิกิริยาที่ 4°C เมื่อครบเวลา 30 นาที ทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย sterile 1% BSA-PBS 2 ครั้ง ก่อน resuspend cells ด้วย sterile 1%BSA-PBS โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ เซลล์เป็น 1×10^7 cell/ml จากนั้นเติม Dynalbeads- conjugated-Goat-anti-mouse-IgG ให้ได้ อัตราส่วนระหว่างจำนวน beads ต่อเซลล์ เป็น 1:4 จากนั้นนำไปหมุนที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดบรรจุเซลล์ไปวางไว้ติดกับ magnetic strand เป็นเวลา 2 นาที B cell และ NK cell จะถูกดึงไปติดอยู่ข้างหลอดด้านที่ติดกับแม่เหล็ก ส่วนเซลล์ที่ T cells จะ ยังคง ลอยอยู่ในส่วนของสารละลาย ดูดเอา T cell ที่ลอยอยู่ไปใส่หลอดใหม่ ทำการปั่นล้าง ด้วยสารละลาย PBS ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ในกรณีที่เราต้องการ B cell รวมอยู่ด้วย เราจะใช้แอนติบอดีต่อ NK cell เท่านั้นเพื่อไปดึง NK cell ออกไปจากระบบ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ที่แยกได้ โดยการย้อมเซลล์แบบ direct immunofluorescent staining โดยใช้ PE-conjugated-CD19 mAb เพื่อตรวจวัดหาปริมาณของ B cell หรือ PE-conjugated-CD56 mAb เพื่อตรวจวัดหาปริมาณของ NK cell หรือ FITC-conjugated-OKT3 เพื่อหาปริมาณ T cell โดยจะทำการย้อมเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการ sort cell โดย ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

- การติดสีเซลล์ ด้วย Carboxyfluorescein Succimidyl Ester (CFSE)

นำ PBMCs, T cell หรือ T/B cell ที่แยกได้โดยวิธี Ficoll-Hypaque density gradient และ magnetic cell sorting มาปั่นล้างด้วย PBS ก่อนปรับความเข้มข้นให้เป็น 1×10^7 cell/ml ด้วย PBS จากนั้นนำเซลล์ 1 ml ที่เตรียมไว้มาเติมด้วยสาร CFSE ที่ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้น เป็น 100 μM ใน PBS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 μM และ ผสมเซลล์เบาๆ โดยใช้ autopipette จากนั้นนำ หลอดที่มีเซลล์อยู่มาหุ้มกระดาษฟลอยด์ และนำไป บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C ใน water bath เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาการย้อมด้วยการเติม 10%FCS-RPMI-1640 ที่เย็น และปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย RPMI ที่ไม่มี FCS ที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เป็น 5×10^6 cell/ml ใน 10%FCS-RPMI-1640 เลี้ยงเซลล์ข้ามคืนใน CO_2 incubator ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

- ผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ แบบ CD3-mediated T cell activation โดยวิธีการติดตามด้วย CFSE labeling

เติม CD3 mAb OKT3 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml ปริมาตร 100 μl /well ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้แอนติบอดีติด plate แล้วล้าง plate 2 ครั้งด้วย sterile PBS ก่อน block plate ด้วย 1% BSA-PBS ล้าง plate อีกครั้งด้วย PBS จากนั้นเติมเซลล์ที่ถูกย้อม สีเขียวด้วย CFSE ลงไป 1×10^5 cell/well กรณีที่มีการศึกษาผลของแอนติบอดีที่เราสนใจต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์หลังถูกกระตุ้นด้วย OKT3 จะมีการเติมแอนติบอดีตัวนั้นๆ ลงไปให้ได้ ความเข้มข้นสุดท้าย 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{m}$ ส่วนเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นจะเติมเฉพาะเซลล์ลงใน หลุมที่ไม่ได้ coat OKT3 ไว้ โดยในแต่ละ condition นั้นจะทำด้วยกันทั้งหมด 3 หลุม ในกรณี ที่ทำการศึกษาโดยใช้ T cell ที่มีความบริสุทธิ์สูง หรือ T cell ร่วมกับ B cell (T/B) จะมีการเติม CD28 mAb ที่ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ลงไปกระตุ้นเซลล์ร่วมกับ OKT3 ด้วย จากนั้นทำการ เลี้ยงเซลล์ไว้ใน 5% CO_2 incubator เมื่อครบเวลา 3 วัน 5 วัน หรือ 7 วัน จะทำการเก็บเซลล์ ลงใน FACS tube โดยรวมเซลล์จาก 3 หลุมมาใส่ tube เดียวกันในแต่ละ condition นำเซลล์ที่ได้ไปวัดค่า Fluorescence intensity โดยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์ในช่วงการเรืองแสงเดียวกันกับ FITC เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัว ค่าของ fluorescence intensity จะลดลง

● ผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A ต่อการหลั่งสาร cytokines

ทำการกระตุ้น PBMCs (1×10^5 cells) ด้วย CD3 mAb ชื่อ OKT3 เทียบกับเซลล์ที่ไม่กระตุ้นด้วย OKT3 โดยมีการเติม mAb COS3A หรือ control mAbs ใน 96-well plate จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C ใน CO_2 incubator ครบเวลาทำการเก็บ culture supernatants และ centrifuge ที่ความเร็ว 550g เป็นเวลา 5 นาที นำ supernatant ที่เตรียมได้มาตรวจวัดหาปริมาณของ IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α และ IFN- γ ด้วยวิธี flow cytometry โดย CBA kit assay (Becton Dickinson) ตามวิธีการของชุด Kit

6. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A

- Western blot

นำเซลล์ที่ใช้ในการศึกษา (PBMCs, lymphocytes หรือ cell lines) มาทำการแตกเซลล์ด้วย lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.2, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.02% NaN_3) ที่มี 1% Triton x-100 เป็น detergent และมีส่วนผสมของ protease inhibitors (phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), iodoacetamide, aprotinin) โดยทำที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการแยกเก็บ cell lysates โดยวิธี centrifugation จากนั้นนำ cell lysate ที่เตรียมได้มาเติมด้วย non-reducing buffer หรือ reducing buffer และนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ก่อนแยกโดยวิธี SDS-PAGE จากนั้นถ่ายโปรตีนที่แยกได้ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยวิธี semi-dry electroblotting ทำการ block nitrocellulose membrane ด้วย 5% skimmed milk ใน PBS นำ membrane ที่ผ่านการ block แล้วมาข่มด้วย mAb COS3A หรือ control mAbs จากนั้นล้างแอนติบอดีที่จับแบบไม่จำเพาะออกด้วยสารละลาย 0.1% Tween 20 ใน PBS ก่อนที่จะข่มด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ Horse Radish Peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody ล้าง membrane ก่อนทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system เปรียบเทียบแถบของปฏิกิริยาบนฟิล์มกับ standard molecular weight marker ที่ทำควบคู่ไปด้วย การศึกษานี้จะทำให้ทราบว่าโมเลกุลที่จำเพาะกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A มีน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร

- Immunoprecipitation

ติดฉลากโปรตีนบนผิวเซลล์ PBMCs หรือ cell lines ที่นำมาศึกษาด้วยสาร Biotin Sulfo-NHS-LC-Biotin ที่ความเข้มข้น 5mM เป็นเวลา 1 hr ที่ 4°C จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการติด

ฉลากด้วยสารละลาย 1mM Glycine ใน PBS และล้าง 2 ครั้งด้วย PBS ที่เย็น จากนั้นทำการแตกเซลล์ที่ติดฉลากแล้ว ด้วย lysis buffer ปริมาตร 1ml ที่มีส่วนผสมของ Tris buffered saline ที่ประกอบด้วย 1% Triton X-100 และ protease inhibitors (iodoacetamide, PMSF, pepstatin A, aprotinin) โดยการแช่ในน้ำแข็ง และเก็บ cell lysate มาศึกษาต่อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง นำ cell lysate ที่เตรียมได้มาผสมด้วย protein G sepharose beads ที่ติดด้วย mAb COS3A หรือ control mAb และปั่นและหมุนด้วย rotator ไว้เป็นเวลาข้ามคืนที่ 4°C ดูดเอาส่วนของ cell lysate ออกก่อนล้างเม็ด beads 10 ครั้งด้วย lysis buffer แยกโปรตีนที่จับกับแอนติบอดีบน protein G Sepharose beads โดยการเติม 1x reducing sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% beta-mercaptoethanol, 2% Sodium dodecyl sulfate, 10% Glycerol and 0.01% Bromophenolblue) และต้มเป็นเวลา 5 นาที โปรตีนที่แยกออกมาได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อโดย วิธี SDS-PAGE ก่อนที่จะถูกถ่ายลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ทำการแช่แผ่น nitrocellulose membrane ที่มีโปรตีนที่สนใจใน blocking buffer (PBS containing 5% BSA) ก่อนย้อมแผ่น membrane ด้วย HRP-conjugated streptavidin เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างแอนติบอดีที่เกินมาด้วย PBS จากนั้นวิเคราะห์ด้วยแถบโปรตีนที่สนใจโดยการตรวจวัดด้วย chemiluminescence detection system เปรียบเทียบแถบของปฏิกิริยาบนฟิล์มกับ standard molecular weight marker ที่ทำควบคู่ไปด้วย การศึกษานี้จะทำให้ทราบว่าโมเลกุล ที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอล แอนติบอดี COS3A มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร และมีโมเลกุลชนิดใดบ้างที่จับอยู่กับโมเลกุลนี้ซึ่งจะถูก co-precipitate ออกมาด้วย

- N-glycosidase treatment

นำ cell lysates ของ U937 cell line มาทำ immunoprecipitation วิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวมาในการทำ immunoprecipitation แต่ในขั้นตอนสุดท้าย ทำการแยกเอาโปรตีนออกจากเม็ด beads โดยการเติม สารละลาย 1% SDS ใน phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 20 μ l ก่อนนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1% Triton x-100 in phosphate buffer pH 7.0 เป็นปริมาตร 60 μ l ก่อนเติมเอนไซม์ N-glycosidase F 4U จากนั้นบ่มหลอดทดลองที่ 37°C เป็นเวลา 18 เพื่อให้เอนไซม์ทำงาน นำตัวอย่างที่ได้ไปแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหลังการเติมเอนไซม์โดยวิธี immunoblot

ผลการวิจัย

1. การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ให้ได้ปริมาณมาก

ผู้วิจัยได้ทำการผลิตแอนติบอดี COS3A ให้ได้ปริมาณมากโดยการฉีด COS3A hybridoma cell เข้าช่องท้องของหนู Balb/C จากนั้นนำ ascetic fluid ที่เกิดขึ้นภายในช่องท้องของหนูมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Protein G sepharose beads affinity chromatography ซึ่งสามารถเตรียมแอนติบอดี COS3A ที่บริสุทธิ์ได้ทั้งหมดประมาณ 5 มิลลิกรัม แอนติบอดีที่เตรียมได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาหน้าที่และคุณสมบัติของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A ต่อไป

2. การแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อ mAb COS3A (ต่อไปจะเรียกว่าโมเลกุล COS3A)

จากการทดลองโดยการย้อมโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วยแอนติบอดี COS3A ที่เตรียมได้ ด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining ผู้วิจัยนำ human cell lines 11 ชนิด คือ Jurkat, Sup-T, Molt4 จัดเป็น human T cell line ส่วน U937, THP-1, KG1a, NB-4 เป็น monocytic cell line และ Daudi, Raji, Ramos เป็น B cell line ตามลำดับ และ K562 เป็น erythroid cell line มาศึกษา พบว่ามีการแสดงออกของโมเลกุล COS3A บนผิวเซลล์ของเซลล์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 1 โดย weak positive กับ SupT1

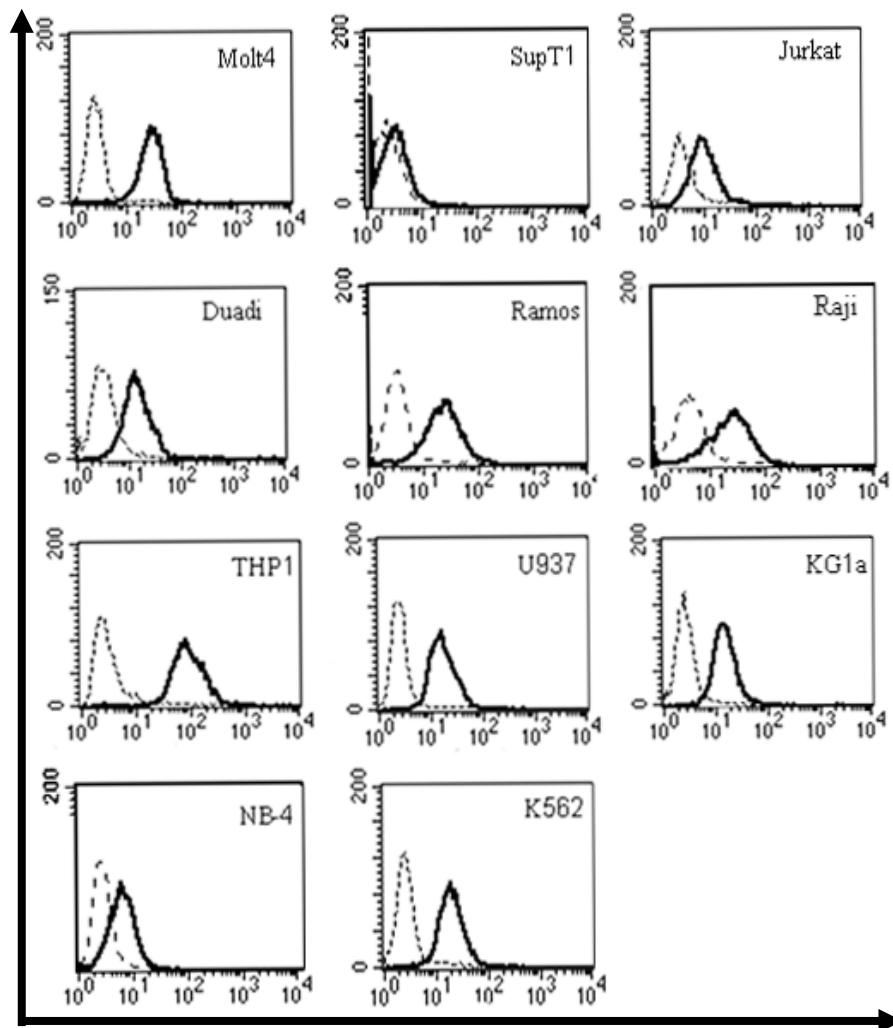
นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาดูการแสดงออกของโมเลกุลชนิดนี้บนกลุ่มของ peripheral blood cells ได้แก่ granulocytes, monocytes, lymphocytes และ red blood cells จากผลการทดลองพบว่า มีการแสดงออกของโมเลกุล COS3A บนผิวของเม็ดเลือดขาวทุกชนิดแต่ไม่พบบนเม็ดเลือดแดงดังแสดงในรูปที่ 2 และเนื่องจากในกลุ่มของ lymphocytes นั้นประกอบไปด้วย กลุ่มเซลล์ 3 ชนิด คือ natural killer cells (NK cell), B cells และ T cells ผู้วิจัยจึงตั้งโจทย์วิจัยใหม่ว่าโมเลกุล COS3A มีการแสดงออกบนเซลล์ชนิดใดในกลุ่มของ lymphocytes จึงได้ทำการทดลองโดยการย้อมเซลล์แบบสองสี โดยในการดูกลุ่มของ B เซลล์ และ NK โดยในขั้นตอนแรก ทำการย้อมเซลล์เซลล์ PBMCs ด้วยแอนติบอดี COS3A และติดตามด้วย FITC-conjugated sheep F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulin antibodies จากนั้นย้อมเซลล์ดังกล่าวด้วย Phycoerythrin (PE)-conjugated CD19 mAb หรือ PE-conjugated CD56 mAb สำหรับแยก B เซลล์ หรือ NK เซลล์ ตามลำดับ จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าโมเลกุล COS3A อยู่บนผิวของ B และ NK เซลล์ ส่วนแสดงออกของโมเลกุลนี้บนผิวของ T lymphocytes ได้จากการย้อมสองสี เพื่อแยกเอา กลุ่มของ T lymphocytes ออกมาวิเคราะห์ โดยในขั้นตอนแรกได้ย้อม PBMCs ด้วย แอนติบอดี COS3A และติดตามด้วย PE-conjugated goat F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulin G จากนั้นแยกกลุ่ม T lymphocytes ออกมาโดยวิเคราะห์ โดยการย้อมด้วย FITC-conjugated OKT3 (CD3 mAb) จากผลการ

ทดลองที่แสดงในรูปที่ 4 พบว่า มีกลุ่ม T cells ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล COS3A อยู่ประมาณ 37% ของ lymphocytes จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่า โมเลกุล COS3A นั้นมีการแสดงออกบนเซลล์ในกลุ่มของ B cell NK cell และ T lymphocytes ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่ามี T lymphocytes เพียง 37% เท่านั้นที่มีโมเลกุลชนิดนี้อยู่

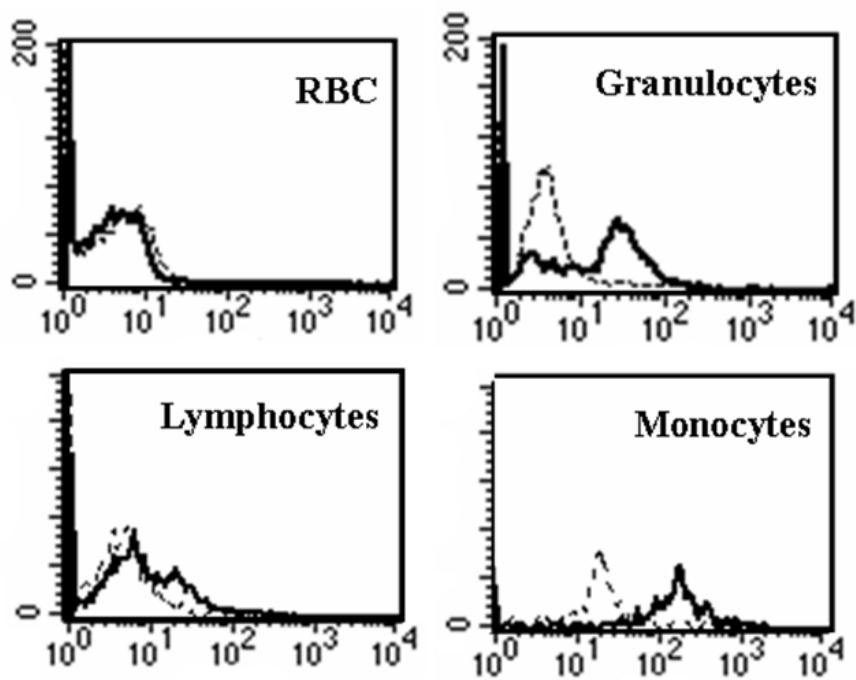
T lymphocytes สามารถแยกออกได้เป็น CD4 helper T cell และ CD8 cytotoxic T cell จึงได้ทำการศึกษาต่อเพื่อดูการแสดงออกของโมเลกุลดังกล่าวใน T cell subpopulation โดยในขั้นแรกได้ทำการย้อมเซลล์แบบสองสี เพื่อพิสูจน์ว่ากลุ่มของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล COS3A จัดอยู่ในกลุ่มของ CD4⁺ T lymphocyte หรือ CD8⁺ T lymphocyte และจากผลการทดลองในรูปที่ 5 พบว่าโมเลกุล COS3A นั้นไม่ได้มีการแสดงออกอย่างชัดเจนบนกลุ่มของเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยพบว่า โมเลกุล COS3A นี้มีการแสดงออกบน CD4⁺ T lymphocyte และ CD8⁺ T lymphocyte เฉพาะบางเซลล์เท่านั้น และพบว่าการแสดงออกของโมเลกุลชนิดนี้นับกลุ่มของ CD4⁺ T lymphocyte น้อยกว่าบน CD8⁺ T lymphocyte นอกจากการแบ่งกลุ่มของ T เซลล์ ออกเป็น CD4⁺ helper T cell และ CD8⁺ cytotoxic T cell แล้วนั้น T cell ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ โดยมีโปรตีน marker คือ CD45RA สำหรับ naïve T cell และ CD45RO สำหรับ activated และ memory T cell ส่วน CD45RB นั้นจะมีการแสดงออกมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับช่วงเวลาของการเปลี่ยนแปลงตัวเองของ T cell โดยจากการศึกษาในหนู mouse พบว่า peripheral naïve T cell จะมีการแสดงออกของ CD45RB มากหรือเรียกว่า CD45RB^{high} ส่วน primed/memory T cell จะมีระดับการแสดงออกของ CD45RB ต่ำ หรือ เรียกว่า CD45RB^{low} ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงได้ทำการย้อมเซลล์โดยวิธีสองสี เพื่อที่จะแยกเอาเซลล์ในแต่ละกลุ่มดังกล่าวข้างต้นมาดูการแสดงออกของโมเลกุล COS3A ซึ่งจากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล COS3A นั้นจะพบในกลุ่มเซลล์ที่ย้อมติดสีกับ FITC-conjugated-MEM-93 ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ CD45RA แต่ไม่พบว่ามีเซลล์ที่มีการติดสี FITC-conjugated-UCHL1 ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ CD45RO และพบว่าบนกลุ่มของ CD45RB cell จะมีการแสดงออกของโมเลกุล COS3A เป็นแบบ heterogeneous โดยที่จะพบบนเซลล์ที่มีระดับการแสดงออกของ CD45RB ต่ำ ซึ่งจากผลการทดลองนี้เราสามารถสรุปได้ว่า โมเลกุล COS3A มีการแสดงออกบน naïve T cell แต่ไม่ปรากฏหรือมีน้อยมากบน activated หรือ memory T cells

เซลล์เม็ดเลือดขาว ถือได้ว่าเป็นเซลล์ที่บทบาทสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การที่เซลล์แต่ละเซลล์จะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น เซลล์จะต้องมีการสื่อสารและส่งสัญญาณถึงกันโดยการสื่อสารของเซลล์แต่ละชนิดนั้นจะอาศัยโมเลกุลต่างๆ บนผิวเซลล์ ซึ่งมีอยู่มากมายหลายชนิดเป็นตัวรับส่งสัญญาณ และบอกให้เซลล์ทำงาน จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ามีโมเลกุลบางตัวที่สามารถพบได้ในภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นเท่านั้น หรือมีการแสดงออกมากขึ้นบนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น เช่น CD25, CD71 และ CD147 เป็นต้น โมเลกุลในกลุ่มนี้จะถูกเรียกว่า activated molecule ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อตรวจวิเคราะห์ว่าโมเลกุล COS3A จัดอยู่ในกลุ่มของ activated molecule ด้วยหรือไม่โดยนำ PBMCs มากระตุ้นด้วย CD3 mAb (OKT3) ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml หรือสาร phytohemagglutinin (PHA) ที่ความเข้มข้น 2

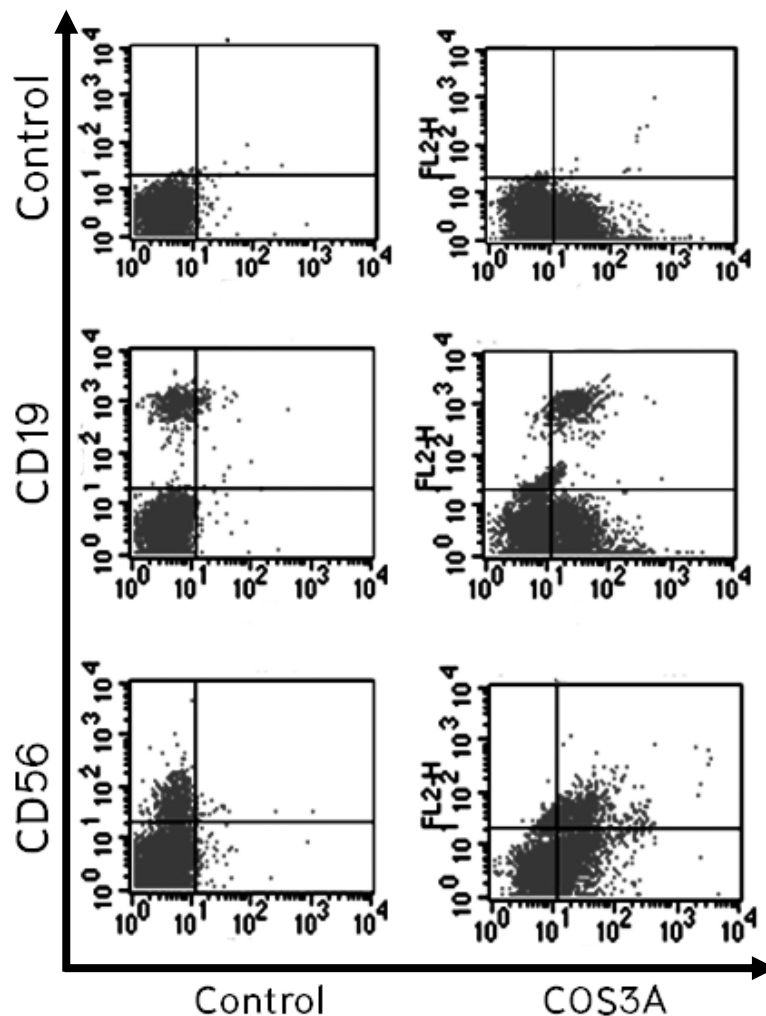
μg/ml เป็นเวลา 1 และ 2 วัน จากนั้นนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมาทำการย้อมดูการแสดงออกของโมเลกุล COS3A เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทำการกระตุ้น โดยได้ย้อมดูการแสดงออกของ CD25 ควบคู่ไปด้วย เพื่อเป็นตัวบอกว่าเซลล์ที่นำมาศึกษานั้นเป็นเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจริง เนื่องจาก CD25 จะมีการแสดงออกบน lymphocytes ที่ถูกกระตุ้นแล้วเท่านั้น จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8 พบว่า การแสดงออกของ COS3A จะเพิ่มขึ้นเมื่อ PBMCs ถูกกระตุ้นด้วย PHA แต่เพิ่มในปริมาณน้อยเมื่อกระตุ้นด้วย OKT3 แสดงว่า COS3A จัดอยู่ในกลุ่มของ activated molecule



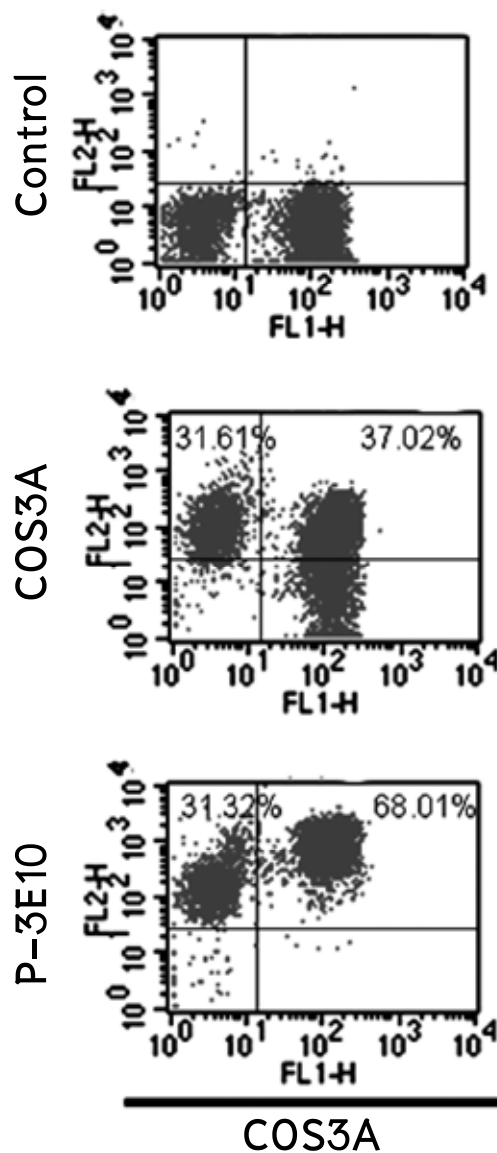
รูปที่ 1 FACS profiles ของการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A บนผิวของ human hematopoietic cell lines เส้นปะแสดงตำแหน่งของ isotype matched control monoclonal antibody เส้นหนาแสดงการแสดงออกของโมเลกุล COS3A บนผิวของ human T cell lines (Jurkat, Molt4 และ SupT1) B cell line (Duadi, Raji, Ramos) monocytic cell line (U937, THP-1, KG1a, NB-4) และ erythroid cell line (K562) โดยการติดตามด้วย FITC-conjugated sheep F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulin antibodies และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=3)



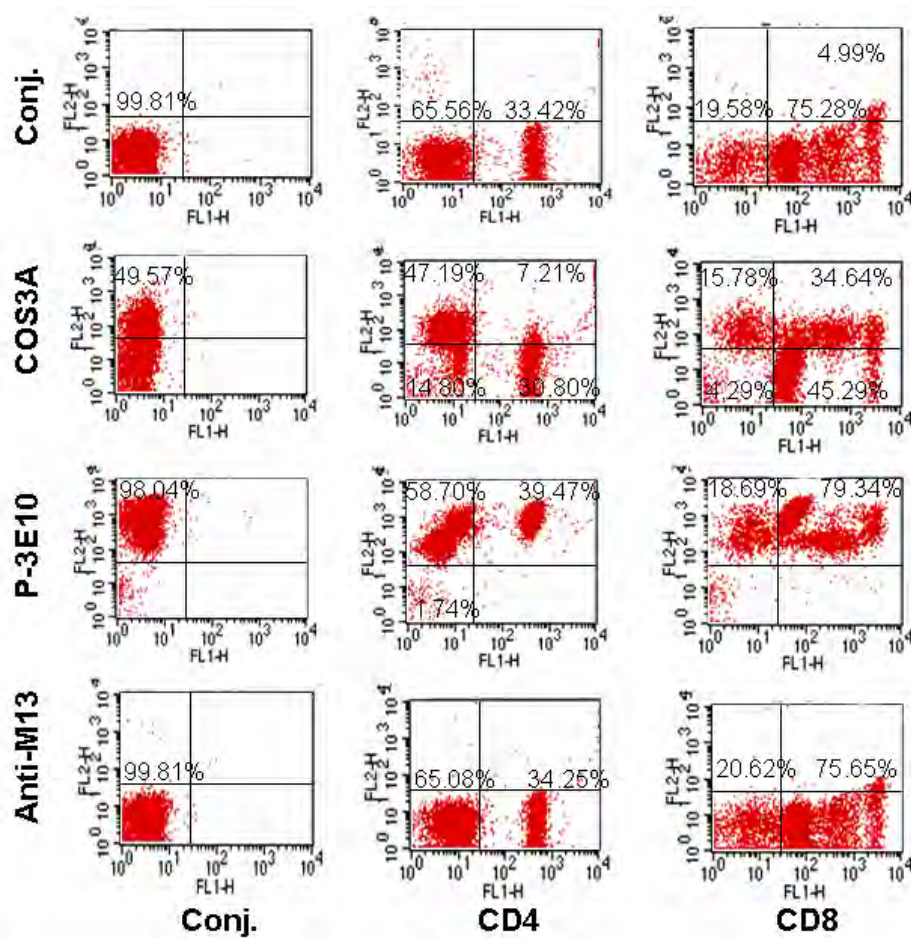
รูปที่ 2 FACS profiles ของการแสดงออกของ COS3A บนผิวของ peripheral blood cells เส้นปะแสดงตำแหน่งของ isotype matched control monoclonal antibody เส้นหนาแสดงการแสดงออกของโมเลกุล COS3A บนผิวของเซลล์แต่ละชนิดโดยการติดตามด้วย FITC-conjugated sheep F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulin antibodies และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=3)



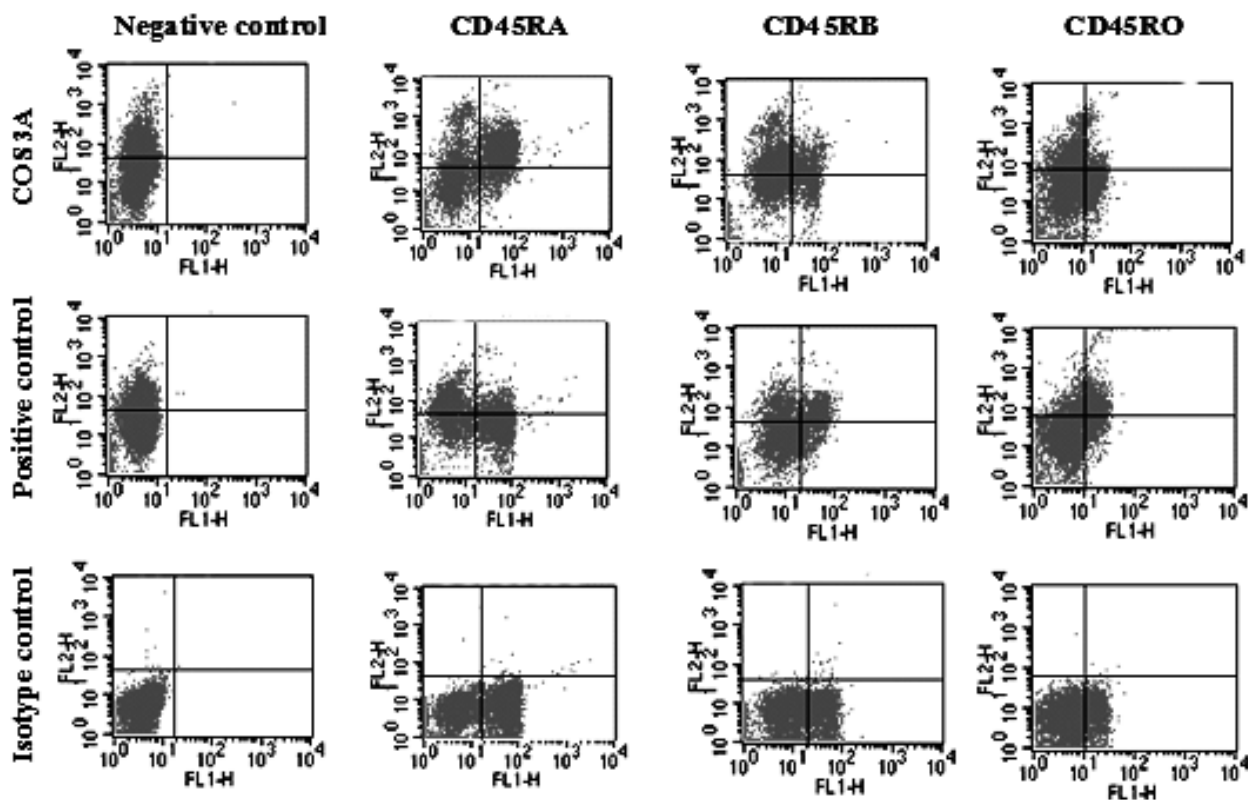
รูปที่ 3 FACS profiles การย้อมเซลล์ PBMC แบบสองสี เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล COA3A บนผิวของ B เซลล์ และ NK เซลล์ นำ PBMCs มาย้อมแบบ indirect immunofluorescent staining ด้วยแอนติบอดี COS3A หรือ ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดีใดๆเป็น conjugate control (Control) จากนั้นติดตามด้วย FITC-conjugated sheep F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulin antibodies สีที่สองย้อมด้วย PE-conjugated CD19 mAb สำหรับแยกกลุ่มของ B lymphocyte หรือ PE-conjugated CD56 mAb สำหรับแยกกลุ่มของ NK เซลล์ และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยเอาเฉพาะกลุ่มของ lymphocytes มาทำการศึกษา โดยผลที่นำมาแสดงเป็นการเลือกวิเคราะห์เซลล์ในกลุ่มของ lymphocytes เท่านั้น ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=3)



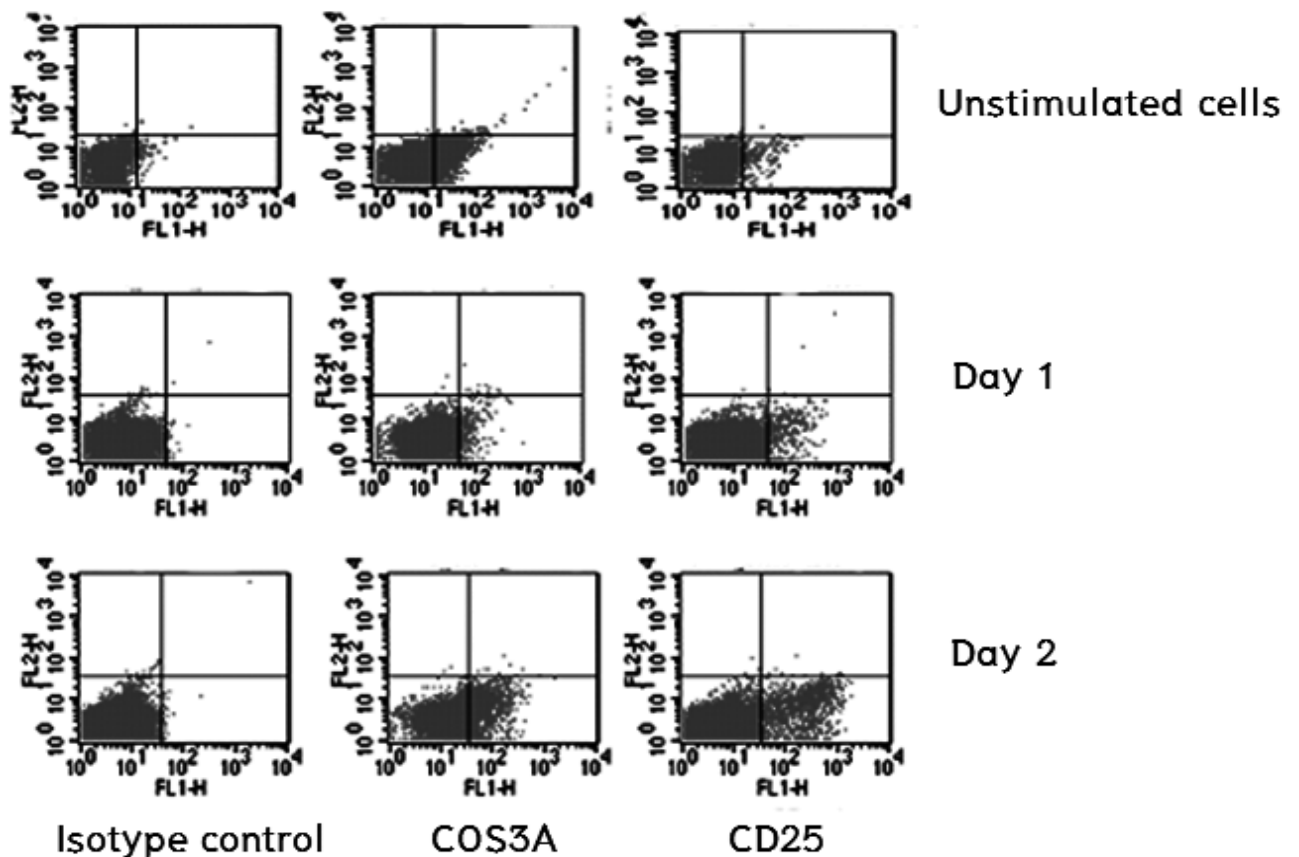
รูปที่ 4 FACS profiles การย้อมสองสี เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล COS3A บนผิวเซลล์ของ T lymphocytes นำ PBMCs มาย้อมแบบ indirect immunofluorescent staining ด้วย แอนติบอดี COS3A หรือ isotype negative control ติดตามด้วย PE-conjugated goat F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulin G สีที่สองย้อมด้วย FITC-conjugated OKT3 (CD3 mAb) สำหรับแยกกลุ่มของ T lymphocyte และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยผลที่นำมาแสดงเป็นการเลือกวิเคราะห์เซลล์ในกลุ่มของ lymphocytes เท่านั้นผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n= 3)



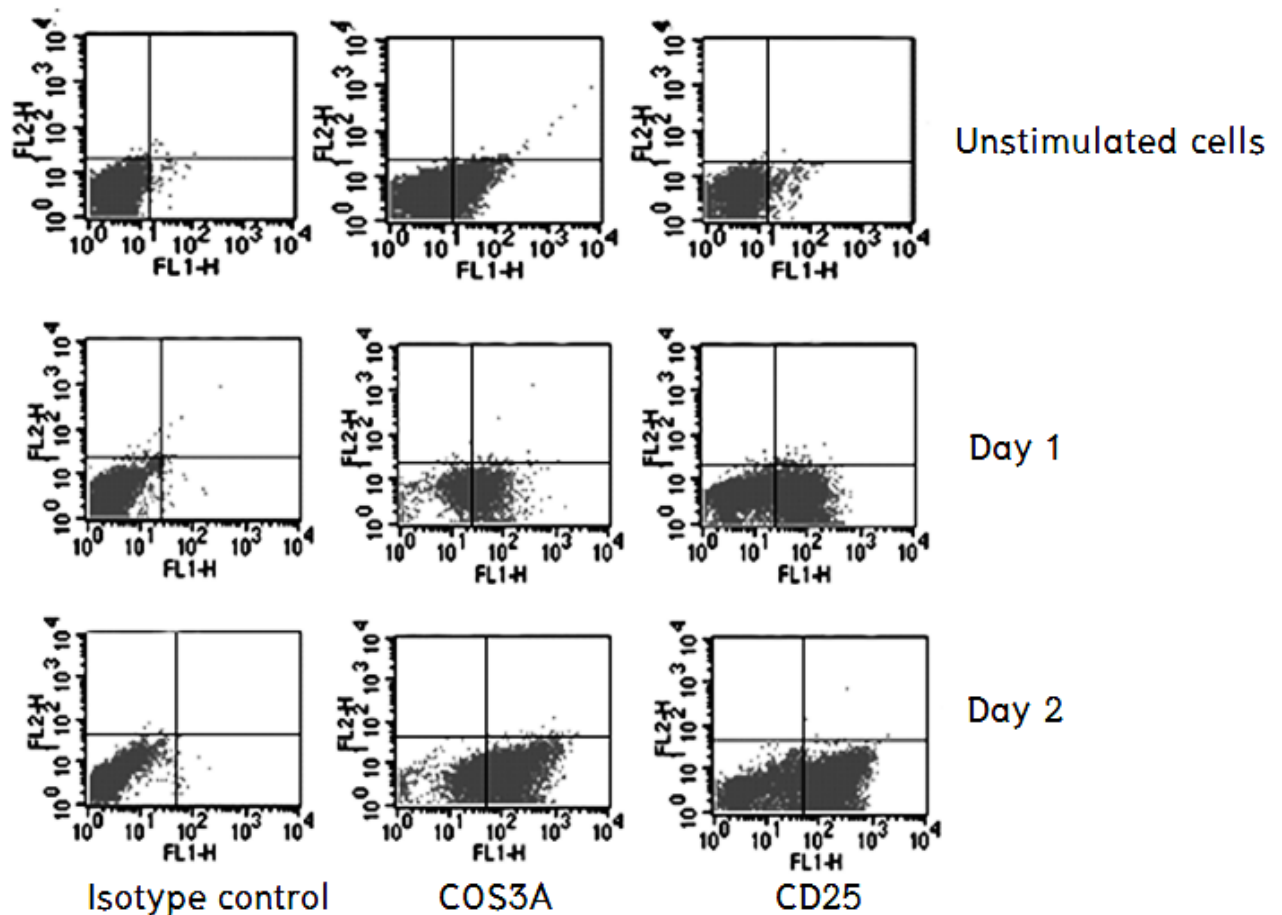
รูปที่ 5 FACS profiles การย้อมสองสี เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล COS3A บน subpopulation ของ T lymphocytes นำ PBMCs มาย้อมแบบ indirect immunofluorescent staining ด้วย แอนติบอดี COS3A หรือ Anti-M13ใช้เป็น isotype negative control หรือ ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดีใดๆเป็น conjugate control ติดตามด้วย PE-conjugated goat F(ab')₂ anti-mouse-IgG ย้อมสีที่สองด้วย CD4 mAb (MT4) หรือ CD8 mAb (MT8) สำหรับแยกกลุ่มของ CD4 helper T cell หรือ CD8 cytotoxic T cell ตามลำดับ หรือไม่ย้อมด้วยแอนติบอดีใดๆ เพื่อเป็น conjugate control จากนั้นติดตามด้วย FITC-conjugated goat F(ab')₂ anti-mouse IgM(μ -chain) และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยผลที่นำมาแสดงเป็นการเลือกวิเคราะห์เซลล์ในกลุ่มของ lymphocytes เท่านั้น ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=3)



รูปที่ 6 FACS profiles การย้อมสองสีเพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล COS3A บน CD45 subpopulation ของ lymphocytes ถูกนำมาย้อมแบบ indirect immunofluorescent staining ด้วย แอนติบอดี COS3A หรือ isotype negative control หรือ Positive control หรือไม่ย้อมด้วย แอนติบอดีใดๆเป็น conjugate control ติดตามด้วย PE-conjugated goat F(ab')₂ anti-mouse-IgG จากนั้นย้อมสีที่สองด้วย CD45RA mAb (MEM-93) หรือ CD45RB mAb (MEM-55) หรือ CD45RO (UCHL1) ที่ติดฉลากด้วยสาร FITC สำหรับแยกกลุ่มของ CD45RA cell, CD45RB cell หรือ CD45RO cell ตามลำดับ หรือไม่ย้อมด้วยแอนติบอดีใดๆ เพื่อใช้เป็น negative control จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยผลที่นำมาแสดงเป็นการเลือกวิเคราะห์เซลล์ในกลุ่มของ lymphocytes เท่านั้น ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน(n=3)



รูปที่ 7 FACS profiles แสดงผลการย้อมเพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล COS3A ในภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย mAb OKT3 นำ PBMCs ที่ไม่ถูกกระตุ้น หรือกระตุ้นด้วย CD3 mAb (OKT3) ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml เป็นเวลา 1 และ 2 วัน มาย้อมด้วย mAb COS3A isotype control จากนั้นติดตามด้วย FITC-conjugated- goat F(ab')₂ anti-mouse IgG ส่วน CD25 mAb (MEM-140; IgM isotype) ที่ใช้ย้อมเป็น marker ของเซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=3)



รูปที่ 8 FACS profiles การย้อมเพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล COS3A ในภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย Phytohemagglutinin (PHA) นำ PBMCs ที่ไม่ถูกกระตุ้น หรือกระตุ้นด้วย PHA ที่ความเข้มข้น $2 \mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 และ 2 วัน มาย้อมด้วย mAb COS3A isotype control จากนั้นติดตามด้วย FITC-conjugated- goat F(ab')₂ anti-mouse IgG ส่วน CD25 mAb (MEM-140; IgM isotype) ที่ใช้ย้อมเป็น marker ของเซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=3)

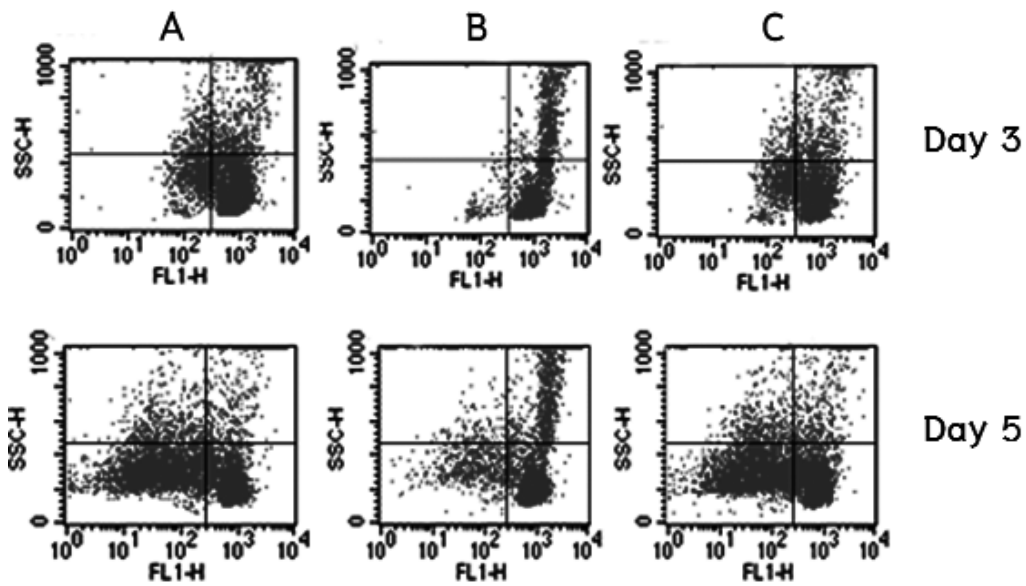
3. หน้าที่ทางชีวเคมีและภูมิคุ้มกันวิทยาของโมเลกุล COS3A

การศึกษาทบทวนและหน้าที่ของโมเลกุล COS3A ได้เริ่มต้นศึกษาผลของแอนติบอดี COS3A ที่มีอยู่ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย CD3 mAb (OKT3) ซึ่งเปรียบเสมือนเหตุการณ์จำลองในระบบภูมิคุ้มกัน คือเมื่อ T cell ได้รับแอนติเจนผ่าน CD3 T cell receptor (TCR) complex โดยการนำเสนอของ antigen presenting cells ก็จะทำให้เกิดกลไกการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้มีกระบวนการต่างๆ เกิดขึ้น เช่น การหลั่งสาร cytokine และเซลล์ก็มีการแบ่งตัว โดยในการทดลองนี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาว่าถ้า T cells ถูกกระตุ้นด้วย immobilized OKT3 ร่วมกับการใช้แอนติบอดี COS3A มาร่วมด้วย จะส่งผลให้กระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ เพิ่มขึ้น หรือลดลง โดยติดตามการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์โดยวิธี Intracellular Fluorescent dye Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE)-labeling technique โดยมีหลักการคร่าวๆ ดังนี้คือ สาร CFSE เมื่อถูกทำให้ละลายจะเป็นสารที่ไม่มีสี สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้แบบ passive diffusion เมื่อสารนี้เข้าสู่เซลล์ ส่วนที่เป็น acetate group จะถูกตัดออกด้วย เอนไซม์ Esterases ที่อยู่ภายในเซลล์ ทำให้มี Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester อิสระถูกปล่อยออกมาภายในเซลล์ สารอิสระนี้จะไปจับกับหมู่ amines ที่อยู่ในเซลล์ เกิดเป็น Fluorescent conjugate และมีคุณสมบัติทำให้เซลล์นั้นๆ มีการเรืองแสงซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยเครื่อง Flow cytometer ในช่วงความยาวคลื่นเดียวกับ Fluorescein Isothiocyanate (FITC) หรือ FLH-1 เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้นค่า Fluorescence intensity ก็จะลดลงมากเช่นกัน ผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยย้อมเซลล์ด้วย CFSE ก่อนที่จะนำเซลล์มาทำการกระตุ้นด้วย OKT3 ร่วมกับ แอนติบอดี COS3A ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งผลการทดลองพบว่าเมื่อเรกระตุ้นเซลล์ด้วย OKT3 ร่วมกับแอนติบอดี COS3A จะส่งผลไปยังยังกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย OKT3 อย่างเดียว หรือร่วมกับ isotype control ดังแสดงในรูปที่ 9 โดยการแบ่งตัวของเซลล์ที่กระตุ้นด้วย OKT3 และ mAb COS3A เป็นเวลา 3 จะลดลง 90.3% เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย OKT3 ส่วนในกรณีที่มีการเติม isotype control mAb จะมีผลยับยั้งการแบ่งตัวประมาณ 25.53% และการแบ่งตัวของเซลล์จะลดลง 75.9% ของเซลล์ที่มีการกระตุ้นแบบปกติ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ส่วนกรณีของการใช้ isotype control mAb ไม่มีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ จากผลการทดลองที่ได้นี้ สามารถสรุปได้ว่า mAb COS3A มีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย OKT3

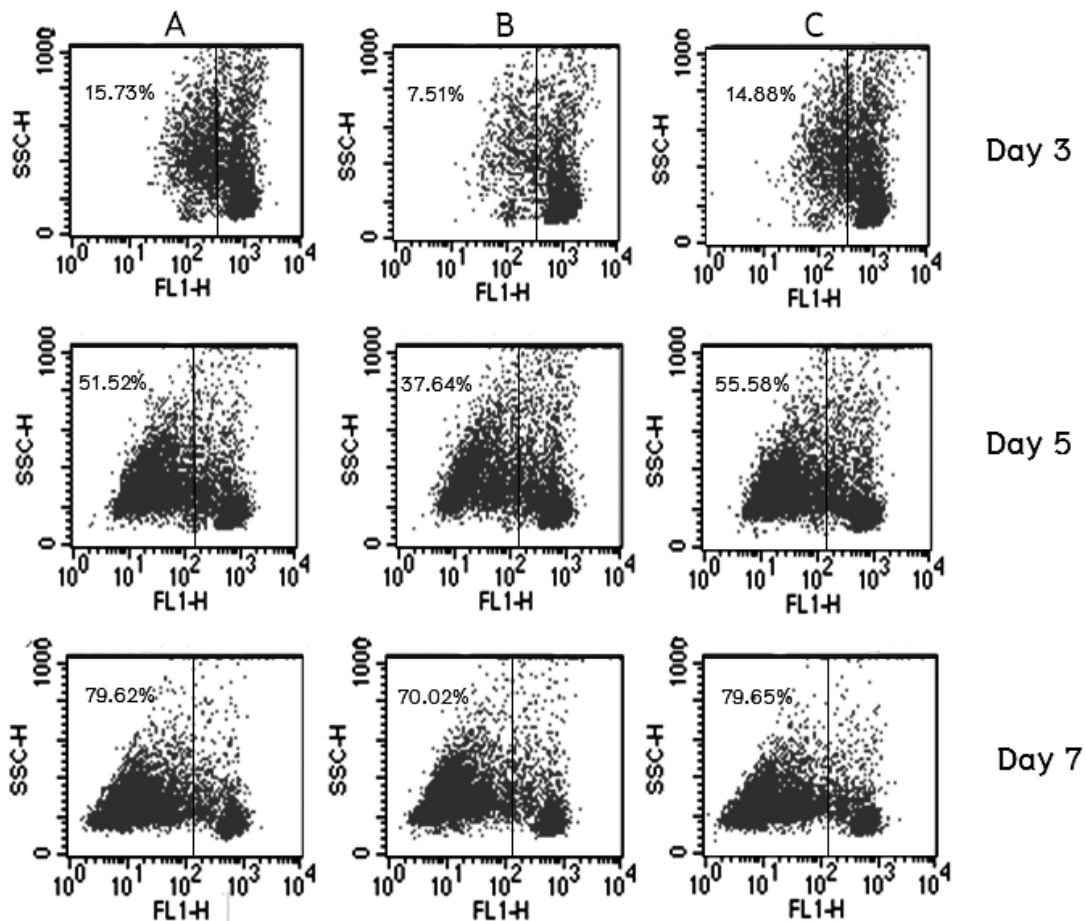
จากการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล COS3A พบว่าบนผิวของโมโนไซต์ มีการแสดงออกของเซลล์ชนิดนี้มากที่สุด จึงอาจเป็นไปได้ว่าโมเลกุลนี้มีความสำคัญในกลไกการแบ่งตัวของ lymphocytes เช่น ทำหน้าที่เป็น costimulatory molecule จึงได้ทำการทดลองศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์โดยแยกเอาโมโนไซต์ และ NK ออก โดยวิธี negative cell sorting และเหลือเฉพาะทีและบีลิมโฟไซต์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 10 ซึ่งพบว่าการแบ่งตัวของเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นร่วมกับ mAb COS3A เป็นเวลา 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน จะลดลงเป็น 52.26%, 27% และ 12% ตามลำดับ ในขณะที่ isotype control mAb ไม่มีผลต่อการแบ่งตัว

ของเซลล์ ซึ่งจากการทดลองนี้เราสามารถสรุปได้ว่า mAb COS3A มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของทีและบีลิมโฟไซต์ เฉพาะในช่วงแรก และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานานขึ้น แสดงว่าโมเลกุล COS3A บนผิวเซลล์โมโนไซต์น่าจะมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ โดยเฉพาะการยับยั้งแบบระยะยาว นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบผลของแอนติบอดี COS3A ต่อการหลั่ง cytokines โดยได้ทำการทดสอบหา cytokines ทั้งหมด 6 ชนิด จากผลการทดลองในรูปที่ 11 และ 12 เป็นผลจากการทดลองหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกัน โดยพบว่า แอนติบอดี COS3A มีผลในการลดระดับการหลั่งสารในกลุ่ม Lymphokines 2 ชนิด ที่มีบทบาทใน adaptive immune system คือ IL-2 และ IL-4 ซึ่งหลังจาก T lymphocytes เหมือนกันทั้ง 3 การทดลอง หน้าที่ของ IL-2 คือกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวของเซลล์ เมื่อมี IL-2 ลดลงจึงทำให้ การแบ่งตัวของเซลล์ลดลงไปด้วย และทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้ B cells สร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น ส่วน IL-4 มีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการสร้างแอนติบอดีของ B cells และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ isotype switching เพิ่มประสิทธิภาพการจดจำแอนติเจน (antigen recognition) และการแก่ตัวของ cytotoxic T cells ส่วน cytokines อื่นๆ ที่ติดตามการหลั่ง คือ IL-6, IL-10, TNF- α ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีบทบาทในกระบวนการ innate immunity สร้างจาก macrophages และ INF- γ ที่เป็น lymphokine พบว่าทั้งสามการทดลองให้ผลที่แตกต่างกันออกไปจึงสามารถสรุปได้ว่า cytokines ทั้ง 4 ชนิดหลังนี้จะมีการหลั่งที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างไร ซึ่งต้องทำการศึกษามนรายละเอียดเชิงลึกต่อไปในโครงการวิจัยอื่น

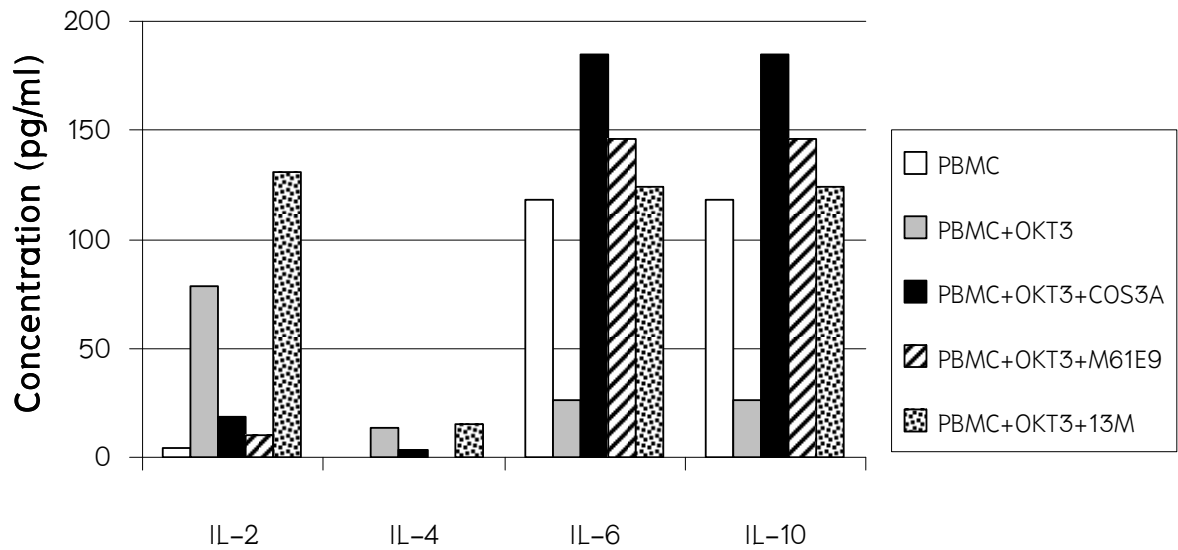
เมื่อพบว่าแอนติบอดี COS3A สามารถยับยั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของลิมโฟไซต์ โดยดูจากการแบ่งตัวของ PBMCs จึงเป็นที่น่าสนใจว่าแอนติบอดีนี้เมื่อยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์แล้วจะมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือไม่จึงได้ทำการทดลองโดยใช้เซลล์ U937 และ K562 ซึ่งมีการแสดงออกของโมเลกุลนี้สูงเป็นเซลล์แม่แบบ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับแอนติบอดี COS3A ที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนทำการย้อมเซลล์ด้วยน้ำยา Annexin V ที่ติดฉลากด้วย FITC เพื่อติดตามการเกิด apoptosis และย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide (PI) เพื่อเป็นตัวแยกเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ออกจาก apoptosis ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้นเราพบว่า แอนติบอดี COS3A ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ตามสมภาวะที่ทำการทดลองดังแสดงในรูปที่ 13 และ 14



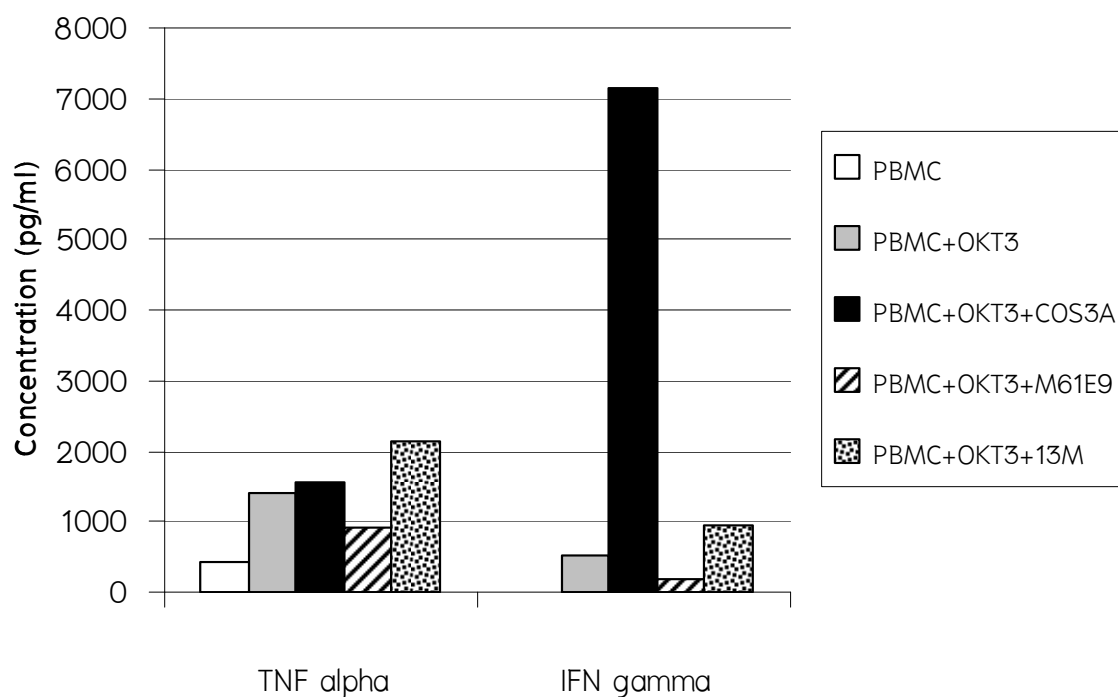
รูปที่ 9 FACS profiles แสดงผลการยับยั้ง CD3-mediated PBMCs proliferation ด้วย แอนติบอดี COS3A ที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ โดยวิธี CFSE labeling system PBMCs ถูก label ด้วย CFSE ก่อนนำมาทำการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ โดยการใช้เครื่อง flow cytometer เป็นตัววัดการลดลงของค่า fluorescence intensity ของเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นให้แบ่งตัวเป็นเวลา 3 วันและ 5 วัน ดังแสดงใน dot plot โดย A คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติบอดี OKT3 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml B และ C คือ PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติบอดี OKT3 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml ร่วมกับ แอนติบอดีต่อ COS3A หรือ isotype control ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 20 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=3)



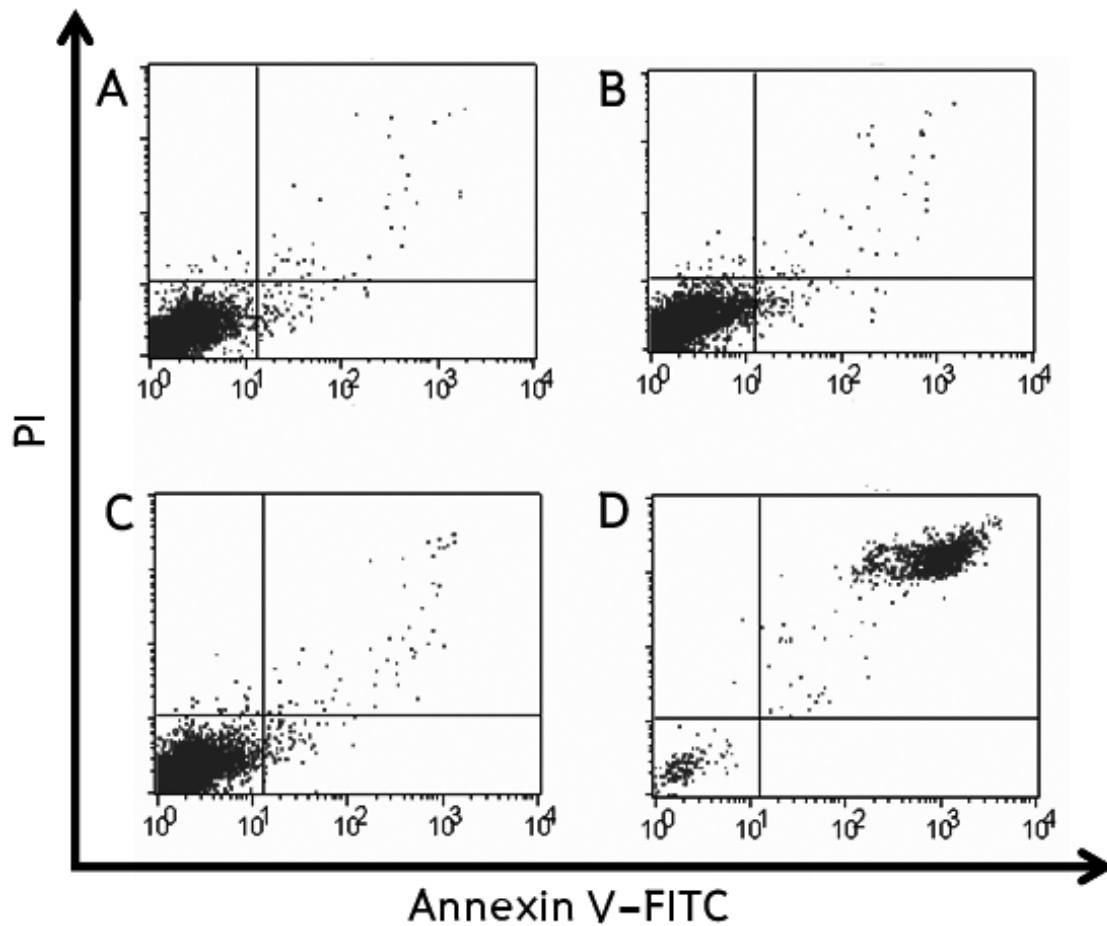
รูปที่ 10 FACS profiles แสดงผลการยับยั้ง CD3-mediated lymphocytes proliferation ด้วย แอนติบอดี COS3A ที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ โดยวิธี CFSE labeling system T cells และ B cells ถูก label ด้วย CFSE ก่อนนำมาทำการศึกษา cell proliferation โดยการใช้เครื่อง flow cytometer เป็นตัววัดการลดลงของค่า fluorescence intensity ของเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นให้แบ่งตัวเป็นเวลา 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ดังแสดงใน dot plot (A คือ T cell และ B cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติบอดี OKT3 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml และ CD28 mAb 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน B และ C คือ T cell และ B cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติบอดี OKT3 ที่ความเข้มข้น 60 ng/ml, CD28 mAb 0.5 ร่วมกับ แอนติบอดีต่อ COS3A หรือ isotype control ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 20 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสองการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=2)



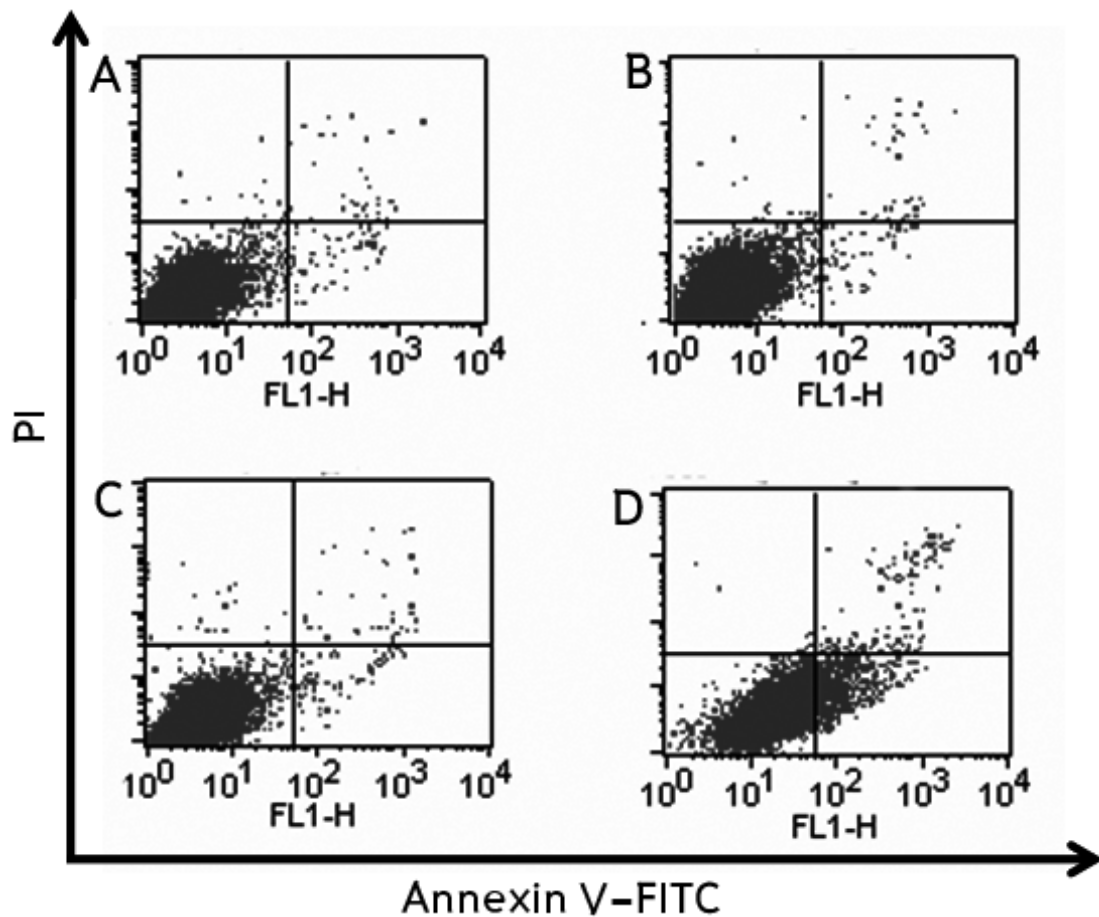
รูปที่ 11 กราฟแสดงผลการหลั่ง cytokines ของ PBMCs หลังเซลล์ถูกกระตุ้นโดยมีและไม่มีแอนติบอดี COS3A ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 μ M โดยใช้แอนติบอดี M6-1E9 ที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เป็น positive control และ anti-13M เป็น isotype control พบว่า mAb COS3A ลดการหลั่ง IL-2 และ IL-4 มากกว่า 50% ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองดำเนินไปในทิศทางเดียวกัน (n=4) ส่วน IL-6 และ IL-10 ไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากทั้งสามการทดลองให้ผลที่ไม่ตรงกัน



รูปที่ 12 กราฟแสดงผลการหลั่ง cytokines ของ PBMCs หลังเซลล์ถูกกระตุ้นโดยมีและไม่มีแอนติบอดี COS3A ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 μM โดยใช้แอนติบอดี M6-1E9 ที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เป็น positive control และ anti-13M เป็น isotype control การทดลองนี้แสดงว่า mAb COS3A ไม่มีผลต่อการหลั่ง TNF- α และมีผลเพิ่มการหลั่ง IFN- γ แต่ยังไม่สามารถสรุปยืนยันข้อมูลได้ เนื่องจากการทดลองให้ผลที่ไม่ตรงกันมากนัก (n=3)



รูปที่ 13 FACS profile แสดงผลการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ของ monocytic cell line (U937) นำเซลล์ U937 2.5×10^5 เซลล์ มาเลี้ยงเป็นเวลา 1 ชั่วโมงใน 5% CO_2 incubator ในสภาวะที่ไม่มีแอนติบอดี (A) หรือแอนติบอดีที่ใช้เป็น isotype control (B) หรือมีแอนติบอดี COS3A (C) หรือเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย $50 \mu\text{M}$ (D) เพื่อใช้เป็น positive control ของการเกิดกระบวนการ apoptosis ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในสี่การทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน ($n=4$)

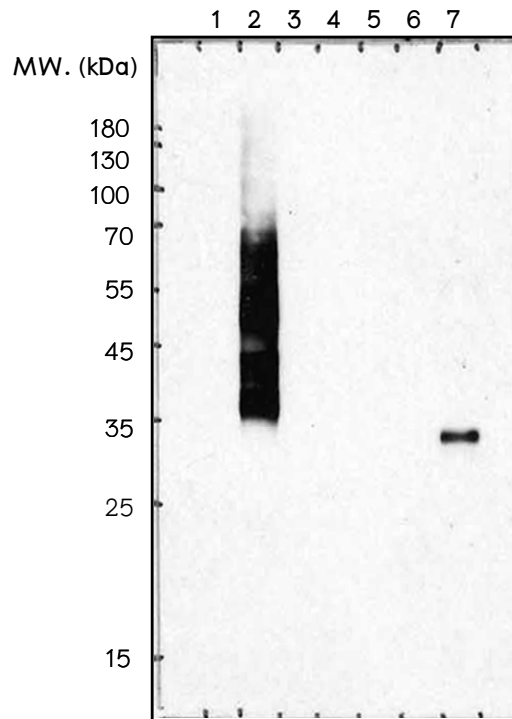


รูปที่ 14 FACS profile แสดงผลการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ของ erythroid cell line (K562) นำเซลล์ K562 2.5×10^5 เซลล์ มาเลี้ยงเป็นเวลา 1 ชั่วโมงใน 5%CO₂ incubator ในสภาวะที่ไม่มีแอนติบอดี (A) หรือ มีแอนติบอดีที่ใช้เป็น isotype control (B) หรือแอนติบอดี COS3A (C) หรือเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติม H₂O₂ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 μ M (D) เพื่อใช้เป็น positive control ของการเกิดกระบวนการ apoptosis ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=4)

4. คุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุล COS3A

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลนี้ เริ่มจากการทำ Western blotting โดยการเตรียม cell lysates จากเซลล์ U937 K562 หรือ PBMCs ผลการทดลองพบว่าแอนติบอดี COS3A สามารถจับได้กับโปรตีนจากเซลล์ทั้งสามชนิดที่มีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 35–70 kDa ในสภาวะ non reduce เท่านั้น โดยเซลล์แต่ละชนิดจะมีช่วงของขนาดของโมเลกุลที่แตกต่างกันออกไป ผลแสดงดังรูปที่ 15 ซึ่งเป็นการศึกษาโดยใช้ cell lysate จาก PBMCs และไม่เห็นแถบโปรตีนของโมเลกุลนี้เมื่อทดลองในสภาวะ reduced และเนื่องจากช่วงของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบมีช่วงกว้างมาก อาจเป็นไปได้ว่าโมเลกุลนี้อาจมีโมเลกุลของน้ำตาลมาเกาะอยู่ในปริมาณหนึ่ง จึงได้ทำการทดลองหาองค์ประกอบของน้ำตาลอยู่บนโมเลกุลนี้ว่าประกอบด้วยน้ำตาลคิดเป็นกี่เปอร์เซ็นต์และมีการจับกับเปปไทด์ชนิดใด โดยเลือกใช้เอนไซม์ N-glycosidase F มาแยกเอาน้ำตาลออก ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 16 พบว่าหลังจากตัดน้ำตาลออกไปจะได้โมเลกุลที่มีน้ำหนักประมาณ 20kDa แสดงว่าโมเลกุลนี้จัดเป็น glycoprotein ที่มี high N-glycosylation สูง โดยในขณะที่เราไม่ได้ตัดโมเลกุลของน้ำตาลออกนั้นจะเห็นแถบโปรตีนเป็นแถบยาว อาจเป็นไปได้ว่า โมเลกุลชนิดนี้มีปริมาณการเติมน้ำตาลแตกต่างกันในแต่ละช่วงของการสร้างโมเลกุล และโครงสร้างที่เป็นโปรตีนจริงๆ น่าจะมีขนาดอยู่ที่ ประมาณ 20 kDa หากไม่พบ O-glycosylation อีก

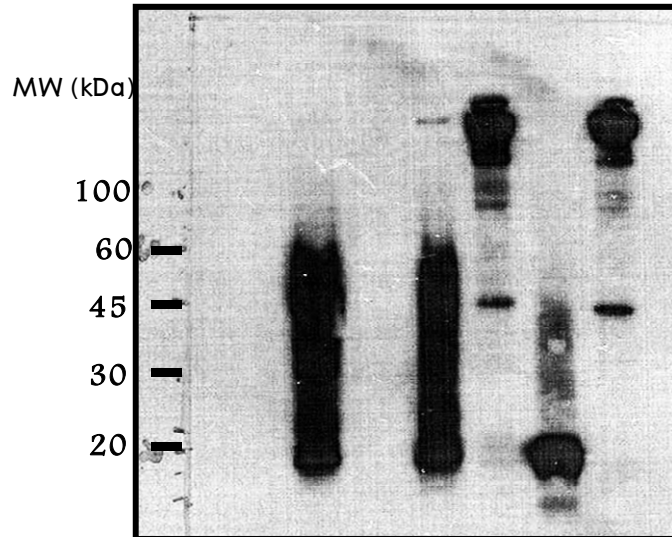
นอกจากนี้ผู้วิจัยได้พยายามทำการแยกยีนส์ที่กำหนดการสร้างโมเลกุล COS3A โดยวิธี retroviral expression system เพื่อดูว่าโมเลกุล COS3A นั้นจริงๆ คือโมเลกุลอะไร และมีองค์ประกอบที่เป็นกรดอะมิโนกี่ตัว แต่เนื่องจากผู้วิจัยพบปัญหาคือหลังจากทำการ infect host cell ด้วยไวรัสที่คาดว่าจะมียีนส์ที่กำหนดการสร้างโมเลกุล COS3A อยู่ด้วยนั้นอยู่หลายครั้ง ผู้วิจัยไม่สามารถแยกหรือพบเซลล์ที่มีการแสดงออกของ โมเลกุล COS3A เลย ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก ประการแรก cDNA library ที่ได้มาไม่มียีนส์ที่กำหนดการสร้างโมเลกุล COS3A เนื่องจากหายไปช่วงที่มีการเตรียม หรือประการที่สอง packaging cells ไม่ผลิตไวรัสหรือ ประการสุดท้ายเซลล์ผลิตไวรัสแต่ไม่มากพอหรือไม่เหมาะสมที่จะ infect host cell ได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลอง โดยพยายามแยกบริสุทธิ์โมเลกุล COS3A โดยวิธี immunoprecipitation และจะตัดน้ำตาลออกก่อนเพื่อให้ได้ โปรตีนแบนเดี่ยวที่สามารถนำไปทำ amino acid sequencing ควบคู่กับการโคลนยีนแบบ Retroviral expression system โดยหากผลการทดลองนี้ยืนยันได้ว่า โมเลกุล COS3A คืออะไรคาดว่าจะสามารถนำเสนองานในรูปแบบตีพิมพ์ได้ ภายในปีนี้



รูปที่ 15 Western blot แสดงขนาดของโมเลกุล COS3A ในภาวะ non reduce

Cell lysates จาก PBMCs ถูกนำมาแยกโดย 10%SDS-PAGE ในภาวะ non reducing โปรตีนที่แยกได้ ถูก transfer ลงบน nitrocellulose membrane และทำ immunoblot โดยย้อมด้วย แอนติบอดี COS3A (lane 2) จากนั้นตามด้วย HRP conjugated rabbit F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulin antibodies ดังแสดงในรูป โดย lane 1 ไม่ได้ย้อมด้วยแอนติบอดีใดๆ ใช้เป็น conjugate control และ MT99/3 (lane 7) เป็น positive control ส่วน lane 3-6 เป็นแอนติบอดีต่อโปรตีนอื่นที่นำมาทำ immunoblot ในการทดลองเดียวกันที่ให้ผล negative โดยโมเลกุลที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี COS3A จะมีขนาดอยู่ในช่วง 35-70 kDa ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นหนึ่งในห้าการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน (n=5)

U937 cell lysate	+	-	-	-	-
IP: COS3A	-	+	-	+	-
IP: WK-C4	-	-	+	-	+
N-Glycosidase F	-	-	-	+	+



รูปที่ 16 Immunoblot แสดงขนาดของโมเลกุล COS3A ทั้งก่อนและหลังการตัดหมู่น้ำตาลที่จับแบบ N-link ด้วย เอนไซม์ N-glycosidase F ทำ immunoprecipitation (IP) จาก U937 cell lysates โดยใช้ mAb COS3A หรือ WK-C4 ซึ่งใช้เป็น isotype matched control ติดบน CNBr-sepharose beads ทำการแยกโปรตีนที่ได้โดย 10% SDS-PAGE ที่สภาวะ non reduced เปรียบเทียบระหว่าง cell lysates, precipitants ทั้งก่อนและหลังการย่อยน้ำตาลด้วย N-glycosidase F ปริมาณ 4 U ถ่ายโปรตีนที่แยกได้บน PVDF membrane และ immunoblot ด้วย mAb COS3A ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในช่องที่เป็น cell lysates และ IP จาก COS3A coated beads มีความสัมพันธ์กันคือตั้งแต่ประมาณ 20-60 KDa ขณะที่หลังจากตัดน้ำตาล N-link ออก จะเหลือโมเลกุลน้ำหนักอยู่ที่ ประมาณ 20 kDa ส่วนในกรณีของ WK-C4 ซึ่งเป็น Isotype control ไม่มีความแตกต่าง ผลการทดลองนี้เป็นตัวแทนของ 3 ผลการทดลองที่ให้ผลในทำนองเดียวกัน (n=3)

เอกสารอ้างอิง

1. Abbas AK, Lichtman AH. Basic Immunology: Functions and Disorders of immune system. Philadelphia: Saunders, 2006.
2. Janeway CA, Pual T, Mark W, Mark S. Immunobiology. 5th edition, New York: Garland Publishing; 2001.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Jordan SP. Cellular and Molecular Immunology. 4th edition, Philadelphia: Saunders, 2000.
4. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet 2001; 357:1777–89.
5. Huston D. The biology of the immune system. JAMA 1997; 278:1804–1814.
6. Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA. The Leukocyte Antigen: Facts Book. London: Academic Press, 1997.
7. C. Wayne Smith. Adhesion Molecules and Receptors. J. Allergy Clin Immunol 2008; S375–S379.
8. Zola H, Swart B. The human leukocyte differentiation antigens (HLDA) workshops: the evolving role of antibodies in research, diagnosis and therapy. Cell Res 2005; 15: 691–4.
9. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. Blood 2005; 106:3123–6. Kasinrer W, Tokrasinwit N, Piluk Y. Production of Mouse anti-CD4 antibodies by DNA-Based Immunization. Asian Pacific J Allerg Immunol 1996; 14:99–105.
10. Kohler G MC. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495–497.
11. Chiampanichayakul S, Szekeres A, Khunkeawla P, Moonsom S, Leksa V, Drbal K, Zlabinger GJ, Stockinger H, Kasinrer W. Engagement of Na, K-ATPase $\beta 3$ subunit by a specific monoclonal antibody suppresses T and B lymphocyte activation. Int Immunol 2002; 14(12):1407–14.
12. Kasinrer W, Tokrasinwit N, Changtumrourng K. Production of anti-CD4 antibodies in rabbits by DNA Immunization. Asia Pacific J Mol Biol Biotech 1997; 5:123–9.
13. Kasinrer W, Tokrasinwit N, Phunpae P. CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. Immunology 1999;96: 184–92.
14. Kasinrer W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. Immunol letters 1999; 67: 237–42.

15. Kasinrer W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. CD99 monoclonal antibody induces homotypic cell aggregation of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathways. *Immunol letters* 2000; 71:33–41.
16. Moonsom S, Kasinrer W. Production of anti-CD14 monoclonal antibodies by using CD14 expressing COS cells as immunizing antigen. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2000; 18: 53–61.
17. Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrer W. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. *Immunol letters* 2001; 76, 25–31.
18. Khunkeawla P, Moonsom S, Kongtawelert P, Kasinrer W. Engagement of CD147 molecule induced cell aggregation through the activation of protein kinases and reorganization of the cytoskeleton. *Immunobiol* 2001; 203, 659–69.
19. Kasinrer W, Moonsom S, Chawansuntati K. Production of antibodies by single DNA immunization: Comparison of various immunization routes. *Hybridoma and Hybridomics* 2002; 21, 287–93.
20. Tayapiwatana C, Kasinrer W. Construction and characterization of phage-displayed leukocyte surface molecule, CD99. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 60:336–41.
21. Tayapiwatana C, Arooncharus P and Kasinrer W. Displaying and epitope mapping of CD147 on VCSM13 phages: influence of *Escherichia coli* strains. *J Immunol Methods* 2003; 281:177–85.
22. Intasaia N, Arooncharus P, Kasinrer W and Tayapiwatana C. Construction of high density display of CD147 ectodomain on VCSM13 phage via gpVIII: effects of temperature, IPTG and helper phage infection-period. *Prot Express Purification Prot Express Purification* 2003; 32:323–31.
23. Phiwan K, Pata S, Tayapiwatana C, Kasinrer W. Induction of antibodies to two different proteins simultaneously by DNA immunization. *Bull Chaing Mai Assoc Med Sci.* 2003; 36 (1):2–12.
24. Kritatanasak S, Chiampanichayakul S and Kasinrer W. Production of IgY anti-mouse IgG antibodies from chicken eggs. *Asian Pacific J Allergy Immunol* 2004; 22: 61–8.
25. Boonmuen S, Tayapiwatana C, Kasinrer W. Comparison of polyclonal anti-CD147 antibody production using DNA based and phage-displayed CD147 immunizations. *ScienceAsia* 2005; 31: 83–6.
26. Thammawonga P, Kasinrer W, Turner RC and Tayapiwatana C. Twin-arginine signal peptide attributes effective displaying of CD147 on filamentous phage. *Appl Microbiol Biotech* 2006; 69(6):697–703.

27. Chiampanichayakul S, Peng-in P, Khunkaewla P and Kasinrerak W. CD147 contains different bioactive epitopes involving the regulation of cell adhesion and lymphocyte activation. *Immunobiol* 2006; 211(3):167–78.
28. Intasai N, Mai S, Kasinrerak W and Tayapiwatana C. Binding of phage displaying multimeric CD147 on U937 cell conducts apoptotic signal. *Int J Immunol* 2006; 18: 1159–69.
29. Chiampanichayakul S, Khunkaewla P and Kasinrerak W. Na, K ATPase $\beta 3$ subunit (CD298): Association with α subunit and expression on peripheral blood cells. *Tissue Antigens* 2006; 68(6):509–17.
30. Khunkaewla P, Schiller H.B, Paster W, Leksa V, Andera L, Horejsi V and Stockinger H. LFA–1–mediated leukocyte adhesion regulated by interaction of CD43 with LFA–1 and CD147. *Mol Immunol*. 2008 Mar; 45(6):1703–11.
31. Khunkaewla P, Chiampanichayakul S, Yasamut U, Pata S and Kasinrerak W. Production, characterization and functional analysis of new mAbs to CD99. *Hybridoma* 2007; 26(4): 241–250.