

วราพรรณ พันธุ์ชัย : การศึกษาหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์ทีลิมโฟไซต์ ที่ถูกจดจำโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA (FUNCTIONAL STUDY OF T LYMPHOCYTE SURFACE MOLECULE RECOGNIZING BY MONOCLONAL ANTIBODY CARA). อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.พนิดา ชันแก้วหล้า, 113 หน้า.

คำสำคัญ: โมโนโคลนอลแอนติบอดี, โปรตีนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว, การกระตุ้นทีเซลล์ ไฮโดรโค่น, ฟอสโฟไทโรซีน

เม็ดเลือดขาวมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน ทำหน้าที่ป้องกันและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมผ่านกลไกการสื่อสารระหว่างเซลล์ โดยอาศัยโมเลกุลบนผิวเซลล์เป็นสื่อกลาง โมเลกุลดังกล่าวบางชนิดได้รับการระบุและศึกษาแล้ว แต่มีโมเลกุลอีกหลายชนิดที่ยังคงไม่ทราบลักษณะและหน้าที่อย่างชัดเจน ตั้งแต่มีการพัฒนาเทคนิคไฮบริโดมา ทำให้สามารถผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนหรือเรียกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี เป็นเครื่องมือสำคัญในการระบุและศึกษาคุณลักษณะของโมเลกุลต่าง ๆ บนผิวเซลล์ งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดหนึ่งที่ผลิตขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน CARA ที่จำเพาะต่อโมเลกุลหนึ่งบนผิวทีเซลล์ของมนุษย์ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ผลการทดลองเบื้องต้นที่ยังไม่ตีพิมพ์ชี้ให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA สามารถจำแนกประชากรย่อยของทีเซลล์ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนและไม่อยู่ในกลุ่ม $CD4^+$, $CD8^+$ หรือทีเซลล์ชนิดควบคุม (regulatory T cell) นอกจากนี้ ของเหลวส่วนที่เป็นของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA แสดงผลการยับยั้งการกระตุ้นทีเซลล์ผ่าน CD3 ทั้งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการควบคุมการทำงานของทีเซลล์ อย่างไรก็ตาม ผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ต่อการกระตุ้นทีเซลล์ยังไม่เคยมีการศึกษา งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเป้าหมายโมเลกุลที่จำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA และศึกษาผลของแอนติบอดีดังกล่าวต่อการกระตุ้นและการทำงานของทีเซลล์ โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ในเลือดส่วนปลายของมนุษย์ (PBMCs) เป็นแบบจำลองในการศึกษาทางหน้าที่ และใช้ทีเซลล์สายพันธุ์ Molt4 เป็นแบบจำลองในการศึกษาเชิงโมเลกุล ผลการวิเคราะห์ชนิดของไอโซไทป์ด้วยวิธี Capture ELISA และ RT-PCR พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA มีองค์ประกอบของหน่วยย่อยโพลีเปปไทด์สายหนักชนิดแกมมา 3 ($\gamma 3$) และสายเบาชนิดแคปปา (K) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA สามารถผลิตและทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีโดยใช้โปรตีน L โดยแอนติบอดียังคงความสามารถในการจับจำเพาะต่อแอนติเจนไว้ได้และถูกนำมาใช้ตลอดการศึกษา ในการศึกษาผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ต่อการเพิ่มจำนวนของทีเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย anti-CD3 ใช้การย้อมสีด้วย CFSE

ร่วมกับการวิเคราะห์โฟลไซโตเมตรีและประเมินผลการผลิตไซโตไคน์โดยวิธี sandwich ELISA รวมถึงการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์และไซโตไคน์ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีการย้อมฟลูออเรสเซนต์ โฟลไซโตเมตรีและกล้องจุลทรรศน์แบบสแกนด้วยเลเซอร์ สำหรับการศึกษาสัญญาณภายในเซลล์ วิธี เวสเทิร์นบลอตถูกใช้ในการตรวจสอบการฟอสโฟริเลตของโปรตีนไทโรซีน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า โมเลกุลที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA จับ มีการแสดงออกแบบไม่สม่ำเสมอในเซลล์ Molt4 โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ CARA^{neg} CARA^{low+} และ CARA^{high+} ทั้งยังไม่พบการแสดงออกร่วมของโมเลกุลที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA จับได้ กับ CD3 ในเซลล์ Molt4 และที่เซลล์ที่ถูกกระตุ้น นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของทีเซลล์ที่ถูกกระตุ้นผ่าน CD3 อย่างมีนัยสำคัญในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 และ 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับแอนติบอดีควบคุมที่มีไอโซไทป์เดียวกัน ผลดังกล่าวยืนยันด้วยการแสดงออกที่ลดลงของ CD69 และ CD25 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การกระตุ้นทีเซลล์ในระยะต้นและปลายตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ยังลดการผลิตไซโตไคน์ ได้แก่ IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, IFN- γ และ TNF- α อย่างมีนัยสำคัญหลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม การย้อมภายในเซลล์แสดงให้เห็นว่ามีเพียง IL-2 เท่านั้นที่มีการผลิตลดลง สุดท้ายผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ต่อสัญญาณการส่งผ่านของทีเซลล์ผ่าน CD3 ถูกตรวจสอบด้วยเวสเทิร์นบลอตโดยพบสัญญาณฟอสโฟไทโรซีนที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 63–65 kDa ซึ่งสอดคล้องกับ ZAP-70 ซึ่งเป็นโมเลกุลสำคัญในการส่งสัญญาณผ่าน TCR บ่งชี้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA อาจมีบทบาทในการควบคุมการส่งสัญญาณภายในเซลล์ในระยะต้น อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อยืนยันความจำเพาะของโมเลกุลที่ส่งสัญญาณ จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA มีศักยภาพในการยับยั้งการกระตุ้นและการผลิตไซโตไคน์ของทีเซลล์ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย CD3 ซึ่งอาจเกิดจากกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านการฟอสโฟริเลตของโปรตีนไทโรซีน แม้ว่าโมเลกุลเป้าหมายของโมโนโคลนอลแอนติบอดี CARA ยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน แต่คุณสมบัติในการควบคุมการกระตุ้นของทีเซลล์และลดการผลิตไซโตไคน์สำคัญ เช่น IL-2 บ่งชี้ถึงศักยภาพในการประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะในภาวะที่มีการกระตุ้นทีเซลล์มากเกินไป เช่น โรคภูมิคุ้มกันตนเอง หรือโรคภูมิคุ้มกันต่อต้านร่างกายผู้รับการปลูกถ่าย (GVHD)

สาขาวิชาเคมี

ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา

วราพรรณ

พันธ์ชัย

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา



WARAPAN PANCHAI : FUNCTIONAL STUDY OF T LYMPHOCYTE SURFACE MOLECULE RECOGNIZING BY MONOCLONAL ANTIBODY CARA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PANIDA KHUNKAEWLA, Ph.D. 113 PP.

Keyword: monoclonal antibody, leukocyte surface molecule, T cell activation, cytokine, phosphotyrosine

Leukocytes are a crucial role in the immune system through their surface molecules that mediate cell-cell communication. However, some of these molecules remain unidentified. Since the hybridoma technique was invented, monoclonal antibodies (mAbs) have been produced and have become essential tools for identifying and characterizing molecules over the years. This study focused on an in-house mAb clone CARA, which targets an unidentified molecule exclusively expressed on human T cells. Preliminary unpublished findings suggest that mAb CARA can classify a previously unknown T cell subpopulation, distinct from CD4⁺, CD8⁺ nor regulatory T cells. Furthermore, culture supernatant containing mAb CARA from hybridoma cell cultivation exhibited suppressive effect on CD3-mediated T cell stimulation, indicating potential immunomodulatory effects on T cell biology. Nonetheless, the effect of purified mAb CARA on T cell stimulation remains unexplored. Therefore, this study aims to identify the molecular target of mAb CARA and investigated its immunological functions in T cell stimulation. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were for functional analysis, while the Molt4 T cell line for molecular characterization. Isotyping via capture ELISA and RT-PCR indicated that mAb CARA contains gamma3 (γ 3) heavy chains and kappa (κ) light chains. A high yield of purified mAb CARA, retaining its reactivity, was successfully obtained using protein L affinity chromatography and utilized throughout the study. The effect of mAb CARA to the proliferation on CD3-mediated T cell was assessed using a proliferation assay based on carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and flow cytometry analysis while, total cytokine was evaluated using sandwich ELISA. Immunofluorescent staining, the expression of cell surface molecules and cytokines were analyzed using flow

cytometry and a laser scanning microscope. The intracellular signalling was studied through phosphotyrosine Western blotting. The cellular expression study revealed that the mAb CARA-recognizing molecule is heterogeneously expression among the population of Molt4 cells, which could be classified these cells into three subpopulations, including CARA^{neg}, CARA^{low+}, CARA^{high+}. Additionally, this molecule does not colocalize with the CD3 molecule on both in Molt4 and activated T cells. The effect of the mAb CARA to activation of T cell was investigated and demonstrated that mAb CARA significantly hinders proliferation of CD3-mediated T cell in a dose-dependent manner after 3 and 5 days of cultivation compared to the matched isotype control mAb. This effect was confirmed by the decreased expression of CD69, an early activation marker, and CD25, a marker of late T cell activation, and cytokines, including IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A were significantly reduced, accepted IFN- γ and TNF- α after 24 h of cultivation compared to the matched isotype control mAb. Nonetheless, cytokine staining showed a marked decrease in IL-2 only. Finally, Western blotting revealed altered tyrosine phosphorylation patterns. Remarkably, the most prominently enhanced signal was observed in a protein with a molecular weight of approximately 63-65 kDa in the presence of mAb CARA, consistent with phosphorylated ZAP-70, a key molecule in TCR signaling. These findings suggested that mAb CARA modulates early TCR signaling events. However, further investigation is necessary to confirm its specificity. In conclusion, mAb CARA effectively suppresses T cell activation and cytokine production in response to anti-CD3 stimulation, likely through intracellular signaling via tyrosine phosphorylation cascades. Although the specific molecular target of mAb CARA remains unidentified, its ability to selectively target activated T cells and reduce key cytokine production, such as IL-2, indicates therapeutic potential in T cell-driven conditions such as autoimmune diseases or graft-versus-host disease (GVHD).

School of Chemistry
Academic Year 2024

Student's Signature Warapan Panchai
Advisor's Signature 