

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E42191

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FUNCTIONAL
PARTNER OF THE CD99 MOLECULE

SUPANSA PATA

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOMEDICAL SCIENCE

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
SEPTEMBER 2011

600256980



ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E42191

**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FUNCTIONAL
PARTNER OF THE CD99 MOLECULE**

SUPANSA PATA

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOMEDICAL SCIENCE**

**THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY**


SEPTEMBER 2011

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FUNCTIONAL
PARTNER OF THE CD99 MOLECULE

SUPANSA PATA

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOMEDICAL SCIENCE

EXAMINING COMMITTEE


.....CHAIRPERSON

Assoc. Prof. Dr. Surasakdi Wongratanchewin


..... MEMBER

Prof. Dr. Watchara Kasinrerk


..... MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwattana


..... MEMBER

Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul


..... MEMBER

Dr. Pavel Otahal, M.D.

THESIS ADVISORY COMMITTEE


.....ADVISOR

Prof. Dr. Watchara Kasinrerk


.....CO-ADVISOR

Prof. Dr. Vaclav Horejsi


.....CO-ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwattana


.....CO-ADVISOR

Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul

12 September 2011

©Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express sincere gratitude and appreciation to Prof. Dr. Watchara Kasinrerker, thesis advisor, for his excellent guidance, continuous discussion and infinite knowledge. Without his support and encouragement, this thesis could not be accomplished.

My sincerest thanks particularly go to Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwattana and Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul, my thesis co-advisors for their special efforts, unforgettable support, and encouragement.

I would like to offer my special thanks to my co-advisor Prof. Dr. Vaclav Horejsi and Dr. Pavel Otahal for their valuable supervisions, assistance, excellent discussion and encouragements during my stay and doing research in the Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.

I wish to express my deepest gratitude and appreciation to Dr. Tomas Brdicka and Dr. Panida Khunkaewla for guidance and interest in solving many problems throughout my works. I also wish to express my great appreciation to all staff members of Prof. Dr. Watchara Kasinrerker's and Prof. Dr. Vaclav Horejsi's laboratory for their kind help, friendship and co-operation, especially Miss Kodchakorn Mahasongkram and Miss Witida Laopajon. I would like to give special thanks to Mr. Matous Hrdinka and Peter Draber for his greatest experimental training and kindness. Many thanks are also extended to all of my friends for their help and warm friendship.

I also wish to express my great appreciation to Assoc. Prof. Dr. Surasakdi Wonggratanacheewin and all examining committees for their kindness suggestions and valuable advice.

I would like to thank the Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand and the Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic for providing instruments and a place for the study.

I would like to gratefully acknowledge the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program and the National Science and Technology Development Agency and the National Research University Project under Thailand's Office of the Higher Education Commission for their financial support.

Finally, I would like to express my great gratitude to my parents and my relatives for their love and encouragement throughout this study.

Supansa Pata

Thesis Title Identification and Characterization of Functional Partner of the CD99 Molecule

Author Miss Supansa Pata

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee:

Prof. Dr. Watchara Kasinrerak	Advisor
Prof. Dr. Vaclav Horejsi	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul	Co-advisor

ABSTRACT

E42191

CD99, a leukocyte surface glycoprotein, is broadly expressed in many cell types. On the cell surface, CD99 is expressed as two distinct isoforms, a long form (32 kDa) and a short form (28 kDa). CD99 has been demonstrated to play a key role in several biological processes, including the regulation of T cell activation. However, the molecular mechanisms by which CD99 participates in such processes are unclear. As CD99 contains a short cytoplasmic tail, it is unlikely that CD99 itself takes part in its multi-functions. Association of CD99 with other membrane proteins has been suggested to be necessary for exerting its functions. In order to better understand CD99 function, we aspired to investigate the association of CD99 with other cell surface molecules and characterize the CD99 associated molecules. The molecular mechanism by which CD99 participates in the T cell activation was also determined.

In this study, by employing COS cell transfection system, three monoclonal antibodies (mAbs) against CD99 molecules were generated. The generated anti-CD99 mAbs were then used to identify the CD99 associated molecules by coimmunoprecipitation method. Several membrane proteins were demonstrated to be associated with CD99 molecules in various cell types. By using our recently developed immunoprecipitated bead immunization strategy, mAbs against CD99 associated molecules were produced. The produced mAbs were then used as a tool for identification of CD99 associated molecules and CD99 functional study. Using coimmunoprecipitation and Western blotting, we observed the association of MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81 with CD99 molecules on the cell surface. The colocalization of CD99 with its partners was confirmed, by indirect immunofluorescence staining and confocal microscopic analysis, both in cell line and peripheral blood mononuclear cells. These results indicate that association of CD99 with MHC and CD81 is physically occurs in peripheral blood cells. Additionally, the association of CD99 with its partners was observed for both isoforms.

In the functional study of the CD99 involving T cell activation, we demonstrated that CD99 is a lipid raft-associated membrane protein. Upon T cell activation, recruitment of CD99 into the immunologic synapse was demonstrated as was observed with its associated molecules. Inhibition of anti-CD3 induced T cell proliferation by an anti-CD99 mAb was also revealed. These results suggest that CD99 is associated with MHC class I, MHC class II and CD81 on the cell surface and plays a regulatory role in T cell activation. Upon T cell activation, the MHC-tetraspanins complexes were demonstrated to be involved in T cell signaling. We hypothesize that CD99 may play a role in cell signaling. To explore the intracellular

signaling by CD99 molecule, induction of protein phosphorylation upon CD99 engagement was examined. The results indicate that CD99 is one of the T cell signaling molecules, as activation of CD99 molecule by agonistic antibody significantly elevated tyrosine and serine phosphorylation.

Collectively, we provide evidence that CD99 directly interacts and forms the complex with the MHC class I and II, and tetraspanin CD81, and is functionally linked to the formation of the immunologic synapse and signal transduction. Upon T cell activation, CD99 engagement can inhibit T cell proliferation. We speculate that the CD99-MHC-CD81 complexes may play an important role in the regulation of T cell activation.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การระบุและการหาลักษณะเฉพาะของโมเลกุลที่ทำงานร่วมกับโมเลกุล CD99

ผู้เขียน นางสาว สุพรรณา ปาณะ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. วัชรระ กสิณฤกษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Prof. Dr. Vaclav Horejsi	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. ศาวิตรี เจียมพานิชกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E 42191

โมเลกุล CD99 เป็นไกลโคโปรตีนที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์หลากหลายชนิด บนผิวเซลล์โมเลกุล CD99 จะมีการแสดงออกเป็น 2 ไอโซฟอร์ม คือ แบบยาว (ขนาด 32 กิโลดาลตัน) และแบบสั้น (ขนาด 28 กิโลดาลตัน) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่าโมเลกุล CD99 เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์หลายประการรวมทั้งการทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการกระตุ้นเซลล์ทีลิมโฟไซต์ อย่างไรก็ตาม กลไกการทำงานของโมเลกุล CD99 นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากโมเลกุล CD99 มีส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ขนาดสั้นจึงไม่น่าจะเป็นไปได้ที่โมเลกุล CD99 จะทำหน้าที่ต่างๆ โดยลำพัง และเพื่อสนับสนุนการทำหน้าที่หลากหลายของโมเลกุล CD99 นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าโมเลกุล CD99 น่าจะจับและทำงานร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นบนผิวเซลล์ และเพื่อความเข้าใจถึงการทำหน้าที่ที่แท้จริงของโมเลกุล CD99 ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะค้นหาและศึกษาลักษณะเฉพาะของโมเลกุลที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 และศึกษากลไกการทำงานของโมเลกุล CD99 ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ทีลิมโฟไซต์

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้นำระบบ COS cell transfection มาเตรียมแอนติเจนสำหรับการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธีการนี้ ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD99 ได้จำนวน 3 โคลน แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการค้นหาโปรตีนที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 ด้วยวิธี coimmunoprecipitation จากการศึกษาในเซลล์

หลากหลายชนิด ผู้วิจัยพบว่า มีโปรตีนบนผิวเซลล์หลายชนิดที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 และโดยวิธี immunoprecipitated bead immunization ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้น ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีนที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 ได้สำเร็จ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างๆ ที่ผลิตขึ้นนี้ ได้ถูกนำไปใช้ในการค้นหาโปรตีนที่จับอยู่กับโมเลกุล CD99 และการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุล CD99 จากการศึกษาโดยวิธี coimmunoprecipitation ร่วมกับวิธี Western blotting ผู้วิจัยได้ค้นพบการจับกันระหว่างโมเลกุล CD99 กับ MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มของ tetraspanin ผลการทดลองนี้ ได้ถูกพิสูจน์ยืนยัน โดยวิธี indirect immunofluorescence staining และการตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal laser scanner โดยสามารถตรวจพบการจับกันของโมเลกุล CD99, MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 บนผิวเซลล์ทั้งเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงและเซลล์เม็ดเลือดขาว การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่าการจับกันระหว่างโมเลกุล CD99 กับ MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 เกิดขึ้นได้จริงบนเซลล์เม็ดเลือด นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้พบว่าการจับกันระหว่างโมเลกุล CD99 กับ MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 นี้เกิดขึ้นได้กับโมเลกุล CD99 ทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม

จากการศึกษาหน้าที่ของโมเลกุล CD99 ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นทีลิมโฟไซต์ ผู้วิจัยพบว่าโมเลกุล CD99 เป็นโปรตีนที่พบได้ใน lipid raft และในระหว่างการกระตุ้นทีลิมโฟไซต์ โมเลกุล CD99 นี้ถูกนำส่งเข้าสู่ immunological synapse นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD99 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของทีลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD3 ได้ จากผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าโมเลกุล CD99 จับอยู่กับโมเลกุล MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 บนผิวเซลล์และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการกระตุ้นทีลิมโฟไซต์ และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในขณะที่เกิดการกระตุ้นทีลิมโฟไซต์ คอมเพล็กซ์ MHC-tetraspanins มีบทบาทในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าโมเลกุล CD99 น่าจะทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ด้วยเช่นกัน เพื่อศึกษากระบวนการส่งสัญญาณโดยโมเลกุล CD99 ผู้วิจัยจึงได้ศึกษากระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนต่างๆ เมื่อกระตุ้นโมเลกุล CD99 ด้วยแอนติบอดีจำเพาะ ผลการศึกษาพบว่า การกระตุ้นโมเลกุล CD99 ดังกล่าว ทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนในตำแหน่งของ tyrosine และ serine ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโมเลกุล CD99 ทำหน้าที่เป็น T cell signaling molecules ชนิดหนึ่ง

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้น ผู้วิจัยได้นำเสนอการค้นพบว่าโมเลกุล CD99 จับเป็นคอมเพล็กซ์กับ MHC class I, MHC class II และโมเลกุล CD81 และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิด immunologic synapse ตลอดถึงการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ และพบอีกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD99 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของทีลิมโฟไซต์ได้ ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าการจับกัน

เป็นคอมเพล็กซ์ของ CD99-MHC-CD81 นี้มีบทบาทหน้าที่ในกระบวนการควบคุมการกระตุ้นการ
ทำงานของทีลิมโฟไซต์

เป็นคอมเพล็กซ์ของ CD99-MHC-CD81 นี้มีบทบาทหน้าที่ในกระบวนการควบคุมการกระตุ้นการ
ทำงานของทีลิมโฟไซต์

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENTS	iii
ABSTRACT IN ENGLISH	v
ABSTRACT IN THAI	viii
TABLE OF CONTENTS	xi
LIST OF TABLES	xvi
LIST OF FIGURES	xvii
ABBREVIATIONS	xxi
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Statement of problems	1
1.2 Literature reviews	4
1.2.1 Immune system	4
1.2.1.1 Innate immunity	6
1.2.1.2 Adaptive immunity	7
1.2.1.2.1 Humoral mediated immunity (HMI)	9
1.2.1.2.2 Cell-mediated immunity (CMI)	11
1.3 Lymphocytes	14
1.3.1 T lymphocytes	14
1.3.2 B lymphocytes	16
1.3.3 NK cells	20

1.4 Immunological synapse (IS)	20
1.5 Lipid rafts	22
1.6 Tetraspanins	26
1.7 Leukocyte surface molecules	31
1.7.1 General structure of cell surface proteins	32
1.7.2 Integral membrane proteins	32
1.7.3 Lipid-anchored membrane proteins	33
1.7.4 Peripheral membrane proteins	34
1.8 CD99	36
1.9 Objectives	39

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS

2.2 Production of anti-CD99 monoclonal antibodies	40
2.2.1 Production of CD99 expressing COS7 cells	40
2.2.2 Hybridoma production	41
2.2.3 Indirect immunofluorescence staining of COS7 cells	42
2.2.4 Limiting dilution	42
2.3 Western blotting of cell lysates	43
2.4 Immunoprecipitation and Western immunoblotting of cell surface molecules	44
2.5 Indirect immunofluorescence staining of cell surface molecules	44
2.6 Coimmunoprecipitation of biotinylated cell surface proteins	45
2.7 Coimmunoprecipitation and amino acid sequencing	46

2.8 Production of mAbs against CD99 associated molecules	46
2.8.1 Dot blot assay	47
2.9 Immunomagnetic cell sorting	48
2.10 Plasmid DNA construction and transformation	48
2.10.1 Amplification of gene encoding DDI2, CD99 short form and CD99 long form	48
2.10.2 Plasmid DNA preparation and transformation	49
2.11 Transfection	50
2.12 Transduction and selection of stable clones	51
2.13 Colocalization analysis	51
2.14 Immunological synapse and confocal microscopic analysis	52
2.15 Determination of CD99 in lipid rafts	52
2.16 Proliferation assay	53
2.17 Apoptosis assay	53
2.18 Analysis of protein phosphorylation	54
CHAPTER III RESULTS	
3.1 Production of monoclonal antibodies against CD99 molecules	55
3.1.1 Hybridoma technique for production of anti-CD99 mAbs	55
3.1.2 Western blotting and immunoprecipitation experiments using the generated anti-CD99 mAbs	61
3.2 Characterizations of CD99 molecules	62
3.2.1 Expression of CD99 molecules on various hematopoietic cell lines	62

3.2.2 Biochemical characterization of CD99 molecules on peripheral blood cells and cell lines	62
3.3 Identification of CD99 associated molecules	68
3.3.1 Association of CD99 molecules with various membrane proteins	68
3.3.2 Investigation of the interaction between CD99 and GAPDH	75
3.3.3 Investigation of the interaction between CD99 and DDI2	77
3.3.3.1 Generation of plasmid DNA encoding DDI2 Myc tag fusion protein	77
3.3.3.2 Verification of DDI2-Myc protein expression	78
3.3.3.3 Generation of CD99 expressing and CD99 non-expressing cells	78
3.3.3.4 Verification of the interaction between CD99 and DDI2	82
3.3.4 Production of mAbs to CD99 interacting molecules	84
3.3.4.1 Specificity of the generated mAbs	87
3.3.4.2 Isolation of CD99 associated molecules using the generated mAbs	89
3.3.5 Association of CD99 with MHC class I and MHC class II and tetraspanin CD81	91
3.3.5.1 Association of CD99 with MHC class I and MHC class II	91
3.3.6 Association of CD99-MHC complexes with tetraspanin CD81	94
3.3.7 Colocalization of CD99 with MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81	97
3.4 Investigation of the association of CD99 short and long forms with MHC class I, MHC class II and CD81	98

3.5 Functional study of the CD99 molecules involving T cell activation	104
3.5.1 Recruitment of CD99 into the immunological synapse (IS)	104
3.5.2 Investigation the association between CD99 and lipid raft microdomain	104
3.5.3 Engagement of CD99 molecules inhibits T cell proliferation	105
3.5.4 Engagement of CD99 molecule induces cell apoptosis	105
3.5.5 Analysis of CD99 mediated signaling pathway	110
CHAPTER IV DISCUSSION AND CONCLUSION	114
REFERENCES	124
APPENDIX	134
CURRICULUM VITAE	152

LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 Size and genomics of human tetraspanins	30
3.1 Reactivity of the generated mAbs with CD99 transfected and un-transfected COS cells	57
3.2 Summary of generated mAbs against CD99 associated molecules	85

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Innate and adaptive immunity	5
1.2 Types of adaptive immunity	8
1.3 The functions of antibodies in elimination of the invaders	10
1.4 The initiation and effector phases of cell-mediated immunity	13
1.5 TCR activation signaling pathway	18
1.6 Model for activation of BCRs signaling	19
1.7 Architecture of the conventional immunological synapse	24
1.8 The central event of T cell activation occurs in lipid rafts of the conjugation of T cell and APC	25
1.9 Structure of a typical tetraspanin	28
1.10 Dual role for CD81 in the antigen-presenting cell–T-cell immune synapse	29
1.11 Diagram of integration of proteins associate with the lipid bilayer	35
3.1 Immunofluorescence analysis of reactivity of mAb MT99/1 and MT99/2 with CD99-DNA transfected COS cells	58
3.2 Immunofluorescence analysis of the reactivity of mAbs MT99/1, MT99/2 and MT99/3 with peripheral blood leukocytes	59

3.3 Reactivity of mAbs MT99/1, MT99/2 and MT99/3 with red blood cells	60
3.4 Western blotting analysis of cell surface antigen recognized by mAbs MT99/1, MT99/2 and MT99/3	64
3.5 Immunoprecipitation analysis of cell surface antigen recognized by mAbs MT99/1, MT99/2 and MT99/3	65
3.6 Distribution of the CD99 molecule on various hematopoietic cell lines	66
3.7 Expression of CD99 isoforms on peripheral blood cells (A) and hematopoietic cell lines (B)	67
3.8 Coimmunoprecipitation of CD99 with other membrane proteins.	70
3.9 Coimmunoprecipitation of CD99 with other membrane proteins using cell lysates of various cell types	71
3.10 Coimmunoprecipitation of CD99 with other membrane proteins using raft-disrupting detergent 1% laurylmaltoside and mild detergent 1% Brij-58	72
3.11 Silver stained gel of CD99 immunoprecipitates	74
3.12 Investigation of the interaction between CD99 and GAPDH	76
3.13 Agarose gel electrophoresis of amplified PCR product and restriction fragment analysis of pMSCV-DDI2Myc	79
3.14 Western blot analysis of pMSCV-DDI2Myc transfected HEK293	80
3.15 Immunofluorescence analysis of CD99 expression on Ramos wild type and CD99 sorted cells	81

3.16 Verification of the interaction between CD99 and DDI2 protein	83
3.17 Reactivity of the generated mAbs with the CD99 precipitated proteins	86
3.18 Verification of the interaction between the proteins recognized by the generated mAb and CD99 molecules	88
3.19 Silver stained gel of immunoprecipitated protein using the generated mAbs against CD99 associated molecules	90
3.20 Interaction between CD99 and MHC class I and MHC class II	93
3.21 Association of CD99-MHC class II complexes with CD81	96
3.22 Colocalization of CD99 and MHC class I, MHC class II and CD81	100
3.23 Verification of pMSCV-CD99SF and pMSCV-CD99LF	101
3.24 Flow cytometric analysis of CD99 expression of Ramos expressing CD99 short and long forms	102
3.25 Interaction between CD99 isoforms with MHC class I, MHC class II and CD81	103
3.26 CD99 is recruited into the IS	106
3.27 The association between CD99 and lipid raft microdomain	107
3.28 Engagement of CD99 inhibits T cell proliferation	108
3.29 mAbs MT99/1 and MT99/3 induced cell apoptosis of Jurkat cells	109
3.30 Analysis of protein tyrosine phosphorylation upon CD99 engagement	111

3.31 Analysis of protein serine phosphorylation upon CD99 engagement	112
3.32 Analysis of protein threonine phosphorylation upon CD99 engagement	113

ABBREVIATIONS

%	Percentage
α	Alpha
β	Beta
°C	Degree Celsius
μ Ci	Microcurie
μ g	Microgram
μ l	Microlitre
μ M	Micromolar
APC	Antigen-presenting cell
APS	Ammonium persulfate
BCR	B cell receptor
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester
CMI	Cell mediated immunity
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid

FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gram
HIV	Human immunodeficiency virus
HLDA	Human leukocyte differentiation antigens workshops
HMI	Humoral mediated immunity
HRP	Horseradish peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
Igs	Immunoglobulins
IL	Interleukin
IS	Immunological synapse
ITAM	Immunoreceptor tyrosinebased activation motif
kDa	Kilodalton
L	Liter
LAT	Linker for activation of T cells
LB	Luria Bertani

LM	laurylmaltoside or n-dodecyl-b-D-maltoside
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molarity
mAb	Monoclonal antibody
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEM	Minimum essential medium
mg	Milligram
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
NaCl	Sodium chloride
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate
ng	Nanogram
NK cells	Natural killer cells
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylene glycol
pH	Power of hydrogen
PHA	Phytohaemagglutinin
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protein kinase C

PLC γ 2	Phospholipase C γ 2
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRRs	Pattern recognition receptor
RBC	Red blood cell
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SD	Standard deviation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
SMAC	Supramolecular activation cluster
T-bet	T-box expressed in T cells transcription factor
TCR	T cell receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
ZAP-70	Zeta-associated protein of 70 kDa