Thesis title Characterization of a Monoclonal Antibody 1B2, Recognizing a Surface Antigen of Continuous Cell Lines

Author Mrs. Preeyanat Tanvisut

M.Sc. Medical Technology

Examining Committee :

Assist. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk	Chairman
Prof. Dr. Sanit Makonkawkeyoon	Member
Assoc. Prof. Dr. Niwat Maneekarn	Member
Assist. Prof. Dr. Kriengsak Praputpittaya	Member

ABSTRACT

1B2 is a monoclonal antibody obtained from hybridomas that derived from BALB/c mice spleen cells after immunized with a myeloid cell line, U-937. Preliminary studies suggested that, 1B2 mAb reacted with an antigen expressed on several haematopoietic cell lines. Therefore, it was of interest to evaluate the distribution of 1B2 mAb-recognized molecules on other cell lines, resting and activated peripheral blood cells, and also in haematopoietic malignancies. The function and molecular weight of 1B2 molecule were also interesting. In this study, human haematopoietic cell lines including: T cell lines HPB-ALL and SupT-1; B cell line JY; myeloid cell lines U-937, HL-60 and KG-1, erythro/myeloid cell line K-562, and non-haematopoietic cell lines including Hep-2, PC9 and PC14 were firstly, stained with 1B2 mAb by an indirect immunofluorescent technique. All cells tested were positive with 1B2 mAb. PBMC from 15 healthy donors were isolated and stained with 1B2 mAb. All blood cells including: lymphocytes, monocytes and granulocytes were negative. To study the expression of 1B2 molecules on activated cells, PBMC from 5 healthy PPD-positive donors were activated with PHA (2 μg/ml), ConA (40 μg/ml), PPD (30 μg/ml), rTNFα (40 ng/ml) and rGM-CSF (100 ng/ml), and stained with 1B2 mAb. All

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

activated cells showed negative results. When leukemic blood cells from three untreated patients with AML and three untreated patients with ALL, were stained with 1B2 mAb, only one of AML was positive.

To study the function of 1B2 molecules on the proliferation of cells, U-937 and K-562 were used. The cell cultivation was performed in two different cell concentrations ($1x10^5$ and $1x10^6$ cells/ml), in the presence or absence of different concentrations of 1B2 mAb, or control mAb, and in the presence of [^{3}H]thymidine, for 3 and 5 hrs. It was found that, 1B2 mAb inhibited the proliferation of both cell lines significantly ($p<0.05$) in a dose dependent manner. The percentage of inhibitory effect of 1B2 mAb was significantly higher than that of all control mAb ($p<0.05$).

Determination of the molecular weight of the molecules recognized by 1B2 mAb was performed on U-937. The U-937 lysate was subjected for SDS-PAGE, blotted, and the immunoblotting was then visuallized by an enhanced chemiluminescent technique. The results indicated that 1B2 mAb recognized a molecule with a molecular mass of 23 kDa.

In conclusion, this study demonstrated that, 1B2 molecule is a cell surface antigen, which expresses on continuous growing cell lines. Its molecular weight is about 23 kDa. This molecule may be a novel growth factor receptor, since 1B2 mAb could inhibit cell proliferation. Further investigation for more details, may lead to a development of a serological test for leukemic diagnosis, and a strategy of how to control the growth of such malignancies.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอล แอนติบอดี 1B2 ที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวของ Continuous Cell Lines
ผู้เขียน	นางปรียานาถ ตันวิสุทธิ์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	สาขาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	ประธานกรรมการ
ศ. ดร. สนิท มกรแก้วเกยูร	กรรมการ
รศ. ดร. นิวัตน์ มณีกาญจน์	กรรมการ
ผศ. ดร. เกรียงศักดิ์ ประพุทธิ์พิทยา	กรรมการ

บทคัดย่อ

1B2 เป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิดหนึ่งที่ได้จากการฉีด myeloid cell lines U-937 เข้าไปในหนูถีบจักรชนิด BALB/c แล้วทำ cell hybridization กับ mouse myeloma จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า 1B2 mAb สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติเจนบนผิว haematopoietic cell lines หลายชนิด ดังนั้นจึงเป็นเรื่องน่าสนใจที่จะนำ 1B2 mAb มาศึกษาและเปรียบเทียบการกระจายตัวของแอนติเจนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้น และเซลล์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ตลอดถึงการศึกษาหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ และศึกษาถึงน้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนดังกล่าว ในการศึกษาเบื้องต้นได้เพาะเลี้ยง cell lines หลายชนิดทั้งที่เป็น haematopoietic cell lines ประกอบด้วย T cell lines ได้แก่ HPB-ALL และ SupT-1 B cell lines ได้แก่ JY myeloid cell lines ได้แก่ U-937, KG-1 และ HL-60 และ erythro/myeloid cell lines ได้แก่ K-562 และ non-haematopoietic cell lines ได้แก่ HEp-2, PC9 และ PC14 เมื่อทำการย้อม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ดังกล่าวด้วย 1B2 mAb โดยวิธี indirect immunofluorescence พบว่าเซลล์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบให้ผลบวกกับ 1B2 mAb เมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆประกอบด้วย lymphocytes, monocytes และ granulocytes ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติจำนวน 15 รายมาทำการทดสอบวิธีเดียวกันพบว่าไม่มีเซลล์ชนิดใดให้ผลบวกกับ 1B2 mAb เลย และเมื่อนำ PBMC ที่แยกจากเลือดของคนปกติจำนวน 5 รายมากระตุ้นด้วย PHA (2 μg/ml), ConA (40 μg/ml), PPD (30 μg/ml), rTNF-α (40 ng/ml) หรือ rGM-CSF (100 ng/ml) แล้วนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นเหล่านั้นมาย้อมด้วย 1B2 mAb พบว่าเซลล์ทุกชนิดยังคงให้ผลลบกับ 1B2 mAb การศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยเด็กอายุตั้งแต่ 6-10 ปี ที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด AML จำนวน 3 ราย และ ALL จำนวน 3 ราย ผู้ป่วยทุกรายยังไม่ได้รับการรักษา พบว่าเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย AML เพียงหนึ่งรายเท่านั้นที่ให้ผลบวกกับ 1B2 mAb

เพื่อศึกษาผลของ 1B2 molecule ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ ได้นำเซลล์ U-937 และ K-562 มาทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มี 1B2 mAb หรือ control mAb ในความเข้มข้นต่างๆ และมี $[^3H]$thymidine ร่วมด้วยเป็นเวลา 3 และ 5 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ขนาด $1\text{x}10^5$ และ $1\text{x}10^6$ cells/ml ผลการทดลองพบว่า 1B2 mAb สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ความสามารถดังกล่าวขึ้นกับความเข้มข้นของ 1B2 mAb ที่ใช้ โดยที่ความเข้มข้นสูงจะสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ได้มากกว่าความเข้มข้นต่ำ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ในการยับยั้งการแบ่งตัว ซึ่งเป็นผลจาก 1B2 mAb กับ control mAb พบว่าการแบ่งตัวของเซลล์ถูกยับยั้งโดย 1B2 mAb มากกว่า control mAb อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ในการศึกษาถึงน้ำหนักโมเลกุลของ 1B2 molecule ด้วยการนำโปรตีนจากผิวเซลล์ U-937 มาแยกโดยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting และ ตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและ 1B2 mAb โดยอาศัยวิธี enhanced chemiluminescence พบว่า 1B2 molecules มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23 kDa

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า 1B2 เป็นโมเลกุลชนิดหนึ่งที่พบได้บนผิวของ cell lines ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ และพบได้บนเซลล์เม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยลูคิเมีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บางราย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23 kDa และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ 1B2 molecule อาจเป็น growth factor receptor ชนิดหนึ่งที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน การศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงธรรมชาติและคุณสมบัติ ตลอดถึงหน้าที่ของ 1B2 molecule อย่างละเอียด อาจนำไปสู่แนวทางในการช่วยวินิจฉัยมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาว และยังอาจนำไปสู่การศึกษาหาแนวทางในการใช้ 1B2 mAb เพื่อช่วยควบคุมการแบ่งตัวและการรักษาโรคมะเร็งได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved