Thesis Title Production of Monoclonal Antibodies Against a Leukocyte Surface Molecule M6 and Their Use for Characterization of M6 Molecule

Author Mr. Ponrut Phunpae

M.S. Medical Technology

Examining Committee :

Associate Professor Dr. Watchara Kasinrerk Chairman
Professor Dr. Sanit Makonkawkeyoon Member
Associate Professor Dr. Niwat Maneekarn Member
Assistant Professor Warunee Kunachiwa Member

ABSTRACT

M6 molecule is a leukocyte surface antigen. Preliminary studies indicated that it is a member of the immunoglobulin superfamily. This molecule is broadly expressed on haematopoietic cell lines and is a lymphocyte activation associated molecule. In the transmembrane region contains a glutamic acid interrupted between hydrophobic stretch. This feature is usually found in membrane proteins which always associate to other proteins and function as a signal transducing protein. Therefore, it is interesting to study the function of the M6 molecule. In this study, monoclonal antibodies against M6 molecule were generated. These monoclonal antibodies were then used for the study of cellular expression of M6 molecule on haematopoietic cell lines, peripheral blood leukocytes and activated lymphocytes, and the functional analysis of M6 molecule involving cell proliferation.

For the production of monoclonal antibodies against M6 molecule, the erythroid/myeloid cell line K-562 was injected into a Balb/c mouse. Then, spleen cells from the immunized mouse and mouse myeloma were fused by the conventional hybridoma method. After that, hybrids which produced anti-M6 antibody were screened by M6 transfected COS cells. Two hybridoma clones, 1B9 and 2G11, produced anti-M6 monoclonal antibodies were obtained. These monoclonal antibodies were then used for the expression study of M6 molecule on haematopoietic cell lines

including myeloid cell line U-937, T cell lines Sup-T1 and Molt-4, B cell lines Daudi and erythroid/myeloid cell lines K-562, by using the indirect immunofluorescence technique. It was found that all tested cells express M6 molecule on their cell surface. A cellular expression study of M6 molecule on peripheral blood leukocytes containing monocytes and lymphocytes isolated from 9 healthy donors, and granulocytes isolated from 4 healthy donors were tested by the same method. It was found that monocytes expressed a high quantity of M6 molecule, but lymphocytes and granulocytes barely expressed M6 molecule.

PBMC isolated from 3 healthy donors were activated with PHA (2.0 μg/ml). In addition, PBMC isolated from 2 PPD positive donors were activated with PPD (30 μg/ml). These activated PBMC were then studied for the expression of M6 molecule. It was found that PHA and PPD activated lymphocytes showed an increased M6 expression compared to non-activated cells. The expression of M6 molecule on activated cells was time dependent manner.

PBMC isolated from 3 healthy donors were cultured with PHA in the presence or absence of anti-M6 monoclonal antibodies. After 3 days activation, [^{3}H]thymidine incorporation was determined. It was found that both anti-M6 mAb 1B9 and 2G11 inhibited the proliferation of PHA activated PBMC significantly ($p < 0.05$). By the same method as PBMC, but using K-562 and Molt-4 cell lines, both anti-M6 mAb, 1B9 and 2G11, clearly have the inhibitory effect on the proliferation of both cell lines.

In conclusion, this study demonstrated that, the M6 molecule is a leukocyte surface molecule found on all tested haematopoietic cell lines and activated lymphocytes. Anti-M6 monoclonal antibodies inhibit proliferation of PHA activated lymphocytes and cell lines. M6 molecule might function as a signal transducing molecule, or might be an unclassified growth factor receptor with a function involving in cell proliferation.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ M6 โมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวและใช้ศึกษาคุณสมบัติของ M6 โมเลกุล

ชื่อผู้เขียน นายพลรัตน์ พันธุ์แพ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	ประธานกรรมการ
ศ. ดร. สนิท มกรแก้วเกยูร	กรรมการ
รศ. ดร. นิวัตน์ มณีกาญจน์	กรรมการ
ผศ. วารุณี คุณาชีวะ	กรรมการ

บทคัดย่อ

M6 โมเลกุล เป็น leukocyte surface antigen ชนิดหนึ่ง จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า M6 โมเลกุลจัดอยู่ใน immunoglobulin superfamily ที่พบได้บน haematopoietic cell lines หลายชนิด และจัดเป็น lymphocyte activation associated molecule ชนิดหนึ่ง บริเวณ transmembrane region มี glutamic acid แทรกอยู่ระหว่าง hydrophobic amino acid ลักษณะดังกล่าวนี้มักพบในโปรตีนที่จับอยู่กับโปรตีนอื่นๆ และทำหน้าที่เป็น signal transducing protein ดังนั้นจึงเป็นเรื่องน่าสนใจที่จะศึกษาหน้าที่ที่แท้จริงของ M6 โมเลกุล โดยการศึกษานี้เริ่มต้นด้วยการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ M6 โมเลกุล แล้วนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาศึกษาถึงการแสดงออกของ M6 โมเลกุลบน haematopoietic cell lines ชนิดต่างๆ เซลล์เม็ดเลือดขาวและบน activated lymphocytes และศึกษาหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์

ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ M6 โมเลกุล เริ่มต้นด้วยการ ฉีด erythroid/myeloid cell line K-562 เข้าไปในหนูถีบจักรชนิด Balb/c แล้วทำการเชื่อม

spleen cells กับ mouse myeloma ด้วยวิธีมาตรฐาน hybridoma แล้วทำการตรวจหา hybrid ที่สร้างแอนติบอดีต่อ M6 โปรตีนโดยใช้ M6 transfected COS cells เป็นแอนติเจน จากการทดลองพบว่า สามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ M6 โปรตีนได้ 2 โคลน คือ 1B9 และ 2G11 และเมื่อนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้มาศึกษาการแสดงออกของ M6 โมเลกุลบนผิว haematopoietic cell lines ได้แก่ myeloid cell line U-937, B cell line Daudi, T cell lines Sup-T1 และ Molt-4 และ erythroid/myeloid cell line K-562 โดยการย้อมเซลล์ดังกล่าวด้วยวิธี indirect immunofluorescence พบว่าเซลล์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบมี M6 โมเลกุลบนผิวเซลล์ เมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆประกอบด้วย monocytes, lymphocytes ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติ จำนวน 9 ราย และ granulocytes ที่แยกได้จากเลือดคนปกติจำนวน 4 ราย มาทำการทดสอบด้วยวิธีเดียวกันพบว่า บนผิวของ monocytes มี M6 โมเลกุล ปรากฏอยู่ปริมาณมาก ในขณะที่บนผิวของ lymphocytes และ granulocytes มี M6 โมเลกุลปรากฏอยู่ปริมาณน้อยกว่า

เมื่อนำ PBMC ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติ จำนวน 3 ราย มากระตุ้นด้วย PHA (2 μg/ml) และนำ PBMC ที่แยกได้จากเลือดของคน PPD positive จำนวน 2 รายมากระตุ้นด้วย PPD (30 μg/ml) แล้วนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแล้วมาตรวจหา M6 โมเลกุล พบว่า lymphocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA หรือ PPD จะมี M6 โมเลกุลเพิ่มมากขึ้นกว่า lymphocytes ที่ไม่ถูกกระตุ้น การเพิ่มขึ้นของ M6 โมเลกุล บน activated lymphocytes มีลักษณะเป็นการเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามเวลา

ได้นำ PBMC มาทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับ PHA เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะที่มีและไม่มีโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ M6 โมเลกุลแล้วตรวจวัดการนำ [^{3}H]thymidine เข้าเซลล์ ผลการทดลองพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ M6 โปรตีนทั้ง 1B9 และ 2G11 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และจากการทดลองทำนองเดียวกันแต่ศึกษาในเซลล์ K-562 และ Molt-4 พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ M6 โมเลกุล 1B9 และ 2G11 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ cell line K-562 และ Molt-4 ได้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า M6 โมเลกุลเป็น leukocyte surface molecule ชนิดหนึ่งที่พบได้บนผิวของ cell lines ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ และ activated lymphocytes โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ M6 โมเลกุลสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ PHA activated lymphocytes และ cell lines ได้ ดังนั้น M6 โมเลกุลน่าจะทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ หรืออาจเป็น growth factor receptor ชนิดหนึ่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University