**Thesis Title** Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein

**Author** Mr. Thanin Saenghong

**Degree** Master of Science (Medical Technology)

**Thesis Advisory Committee**

| | |
|---|---|
| Dr. Sawitree Chiampanichayakul | Chairperson |
| Prof. Dr. Watchara Kasinrerk | Member |
| Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana | Member |
| Asst. Prof. Dr. Yuttana Mundee | Member |

## ABSTRACT

Thalassemia is a group of hereditary disorders with defects in the synthesis of globin chains of hemoglobin. These defects lead to the absent or decreased synthesis of the affected globin chains. Thalassemia can be divided into two major types, α- and β-thalassemia. β-thalassemia is predominantly caused by point mutations in β-globin gene, leading to the decrease of β-globin chain synthesis. The most mutations are in functionally important regions of the β-globin. β-thalassemia occurs when there is a quantitative reduction of β-globin chains that are usually structurally normal. β-thalassemia is due to the impaired production of β-globin chains which leads to a

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

relative excess of α-globin chains. These excess α-globin chains are unstable and precipitate within the erythroid precursors, leading to damaging their membranes, accelerated apoptosis and premature destruction of the erythroid precursor in bone marrow caused severity of anemia. However, the variable severity of β-thalassemia is reflected with β-globin gene mutation, α thalassemic gene interaction or variation in the amount of HbF response. Recently, the newly discovered alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) has been suggested that an additional factor was related to clinical severity of β-thalassemia. The AHSP is an erythroid-specific protein that protects excess α-Hb from precipitation within cells. Moreover, it has been reported that the altered levels and function of AHSP may account for the clinical variability observed in β-thalassemia patients. Therefore, the detection of AHSP level for the evaluation of clinical severity in β-thalassemia patients is more interested. So far, the detection of AHSP level by immunodetection assay based on monoclonal antibody (mAb) against the AHSP has not been reported.

In this study, mAbs against human alpha hemoglobin stabilizing protein (hAHSP) were produced by standard hybridoma technique. The hAHSP was kindly obtained from Dr. Weiss M.J., while human alpha hemoglobin stabilizing protein-biotin carboxyl carrier protein (hAHSP-BCCP) was constructed in our laboratory. Both were used as an immunogen. To construct hAHSP-BCCP, hAHSP gene was amplified from pGET-2T-hAHSP by a pair of primers with *Eco*RI and *Nde*I sites. With gel electrophoresis, the amplified PCR product with 308 bp was corresponding to cDNA encoding hAHSP protein. Subsequently, the gene encoding hAHSP protein was genetically linked with pAK400CB plasmid vector that contains biotin carboxyl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

carrier protein (BCCP)-coding sequence. This sequence serves as a target for *in vivo* biotinylation. The resulted plasmid was called “pAK400CB-hAHSP”, which was confirmed by PCR assay of hAHSP fragment and restriction enzyme analysis. After pAK400CB-hAHSP transformation, biotinylated hAHSP-BCCP fusion proteins was expressed in *E. coli* Origami B and used as an immunogen to produce monoclonal antibody.

To immunize with biotinylated hAHSP-BCCP fusion proteins, hAHSP-BCCP proteins were separated from other bacterial proteins, using streptavidin-coated magnetic beads. The obtained biotinylated hAHSP-BCCP-beads were then used to immunize two BALB/c mice. From standard hybridoma technique, splenocytes obtained from immunized mouse with high titer of antibody were fused with myeloma cells using 50% polyethylene glycol. After screening with indirect ELISA, no hybridoma secreting mAb against hAHSP was obtained, while two hybridomas secreting mAb against hAHSP were obtained from BALB/c mouse immunized with hAHSP recombinant protein. The positive hybridoma clones were then propagated and named MT-hAHSP1 and MT-hAHSP2.

The generated hAHSP mAbs were characterized by indirect ELISA and Western blotting using hAHSP recombinant protein and hAHSP-BCCP generated from various *E. coli* strains such as Origami B, Nova Blue, TG1 and XL-1 Blue. By indirect ELISA, MT-hAHSP1 and MT-hAHSP2 mAbs were found to show reaction with hAHSP recombinant protein. However, both mAbs did not react to any strains producing hAHSP-BCCP. This implied that the prokaryotic expression system may alter the hAHSP structure. Furthermore, the mAbs might recognize AHSP epitope where was linked to BCCP. None of MT-hAHSP1 and MT-hAHSP2 could be reacted

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

with either hAHSP or hAHSP-BCCP from Western blotting under reducing condition, indicating that MT-hAHSP1 and MT-hAHSP2 might react to conformational epitope of AHSP.

In the present study, the mAbs against the hAHSP, MT-hAHSP1 and MT-hAHSP2 were produced. The characterizations of two generated mAbs could be implied that the mAbs could react to conformational epitope of AHSP. However, the reactivity of both MT-hAHSP1 and MT-hAHSP2 to native AHSP should be required for further characterization, in order to indicate the severity for β-thalassemia patients.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การผลิตและการวิเคราะห์คุณลักษณะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อแอลฟาฮีโมโกลบินสเตบิไลซิงโปรตีน

**ผู้เขียน** นายธานินทร์ แสงหงษ์

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

| | |
|---|---|
| ดร. สาวิตรี เจียมพานิชยกุล | ประธานกรรมการ |
| ศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ | กรรมการ |
| รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา | กรรมการ |
| ผศ. ดร. ยุทธนา หมั่นดี | กรรมการ |

## บทคัดย่อ

โรคธาลัสซีเมีย คือ กลุ่มโรคทางพันธุกรรมที่มีความบกพร่องในการสร้างสายโกลบินซึ่งเป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบิน โดยความบกพร่องดังกล่าวทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์สายโกลบินหรือการสังเคราะห์ได้ลดลง โรคธาลัสซีเมียสามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ อัลฟาธาลัสซีเมีย และ บีตาธาลัสซีเมีย สำหรับบีตาธาลัสซีเมียพบว่าสาเหตุที่สำคัญเกิดจากการกลายพันธุ์ในสายบีตาโกลบินยีนทำให้มีการสร้างสายบีตาโกลบินลดลง การกลายพันธุ์ที่สำคัญจะเกิดขึ้นในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของบีตาโกลบิน โรคบีตาธาลัสซีเมียมักเกิดขึ้นเมื่อมีการสร้างของสายบีตาที่ลดลงแต่โครงสร้างยังปกติอยู่ ซึ่งการสร้างสายบีตาโกลบินที่ผิดปกติจะก่อให้เกิดสายอัลฟาโกลบินส่วนเกินเกิดขึ้น และสายอัลฟาโกลบินส่วนเกินเหล่านี้จะไม่เสถียรและตกตะกอนอยู่ภายในเซลล์ตั้งต้นเม็ดเลือดแดงนำไปสู่การทำลายผนังเซลล์เม็ดเลือด เกิดการตายแบบอะพอบโทซิสเร็วขึ้นและเกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงตั้งแต่ยังเป็นตัวอ่อนภายในไขกระดูกซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดอาการซีดอย่างรุนแรง อย่างไรก็ตามความรุนแรงของบีตาธาลัสซีเมียที่หลากหลายเป็นผลมาจาก ชนิดของการกลายพันธุ์ของบีตาโกลบินยีน การมีปฏิสัมพันธ์กับอัลฟ่ายีนหรือปริมาณของฮีโมโกลบินเอฟ เมื่อเร็วๆนี้โปรตีนที่ค้นพบชนิดใหม่คืออัลฟาฮีโมโกลบินสเตบิไล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซิงโปรตีนได้ถูกเสนอแนะว่าน่าจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งเพิ่มเติมที่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของอาการทางคลินิกในบีตาธาลัสซีเมีย อัลฟาฮีโมโกลบินสเตบิไลซิง คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันอัลฟาฮีโมโกลบินส่วนเกินไม่ให้ตกตะกอนภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับอัลฟาฮีโมโกลบินสเตบิไลซิงโปรตีนน่าจะเกี่ยวข้องกับความหลากหลายของอาการทางคลินิกซึ่งสังเกตได้ในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย ดังนั้นการตรวจหาระดับอัลฟาฮีโมโกลบินสเตบิไลซิงโปรตีนเพื่อประเมินอาการทางคลินิกของบีตาธาลัสซีเมียจึงเป็นที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการตรวจหาระดับอัลฟาฮีโมโกลบินสเตบิไลซิงโปรตีนโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะ

การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการสร้าง โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ อัลฟาฮีโมโกลบินสเตบิไลซิงโปรตีนโดยวิธี hybridoma technique โดยใช้ immunogen สองชนิดคือโปรตีน hAHSP ที่ได้รับความอนุเคราะห์ จาก Dr. Weiss M.J. และ โปรตีน hAHSP-BCCP ที่สังเคราะห์ขึ้นเองภายในห้องปฏิบัติการ สำหรับการสังเคราะห์ hAHSP-BCCP นั้น ทำโดยการเพิ่มปริมาณยีน hAHSP จากพลาสมิดเวกเตอร์ pGET-2T-hAHSP โดยใช้ primer ที่ออกแบบมาให้สามารถถูกตัดด้วย เอนไซม์ *EcoR*I และ *Nde*I จากนั้นตรวจสอบ PCR product ที่ได้ซึ่งมีขนาด 308 bp ที่สัมพันธ์กับขนาดยีนที่กำหนดการสร้าง hAHSP โดยวิธี agarose gel electrophoresis และยีนดังกล่าวจะถูกนำมาต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์ pAK400CB ซึ่งมียีนที่กำหนดการสร้าง BCCP ซึ่งจะทำให้เกิดการ biotinylation ภายในเซลล์ *E.coli* ได้เป็นเวคเตอร์วงใหม่และตั้งชื่อว่า pAK400CB-hAHSP เพื่อยืนยันว่ายีน hAHSP ถูกใส่เข้าไปในพลาสมิดเวคเตอร์ดังกล่าว จึงทดสอบโดยวิธี PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นเวคเตอร์ pAK400CB-hAHSP จะถูกนำส่งเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ Origami B เพื่อทำการสังเคราะห์เป็นโปรตีน biotinylated hAHSP ขึ้นมาและนำไปใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การฉีดกระตุ้นหนูด้วยโปรตีน biotinylated hAHSP-BCCP นั้น โปรตีน biotinylated hAHS-BCCP จะถูกแยกออกจากโปรตีนตัวอื่นของแบคทีเรียโดยใช้ streptavidin-coated magnetic beads แล้วจึงนำไปฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c mice จำนวน 2 ตัว เซลล์ม้ามจากหนูที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อ AHSP จะถูกนำมาเชื่อมต่อกับ myeloma cells ด้วยวิธี hybridoma technique โดยใช้ 50% polyethylene glycol หลังจากการคัดเลือกโดยวิธี indirect ELISA พบว่า ไม่มี hybridoma ใดที่สร้างแอนติบอดีต่อ hAHSP เลย แต่ในทางตรงกันข้ามพบ hybridoma จำนวน 2 โคลนที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อ hAHSP จากการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยโปรตีน hAHSP จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน hybridomas ดังกล่าวและตั้งชื่อว่า MT-hAHSP1 และ MT-hAHSP2

เพื่อวิเคราะห์คุณลักษณะของโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อ hAHSP ทั้ง 2 โคลน ผู้วิจัยใช้วิธี indirect ELISA และ Western blotting โดยศึกษากับโปรตีน hAHSP และ โปรตีน hAHSP-BCCP ที่สร้างจากแบคทีเรีย *E.coli* ต่างสายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ Origami B, Nova Blue, TG1 และ XL-1 Blue โดยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี MT-hAHSP1 และ MT-hAHSP2 ทำปฏิกิริยากับโปรตีน hAHSP แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน hAHSP-BCCP จาก *E. coli* สายพันธุ์ใดๆเลย สันนิษฐานว่าระบบการสร้างโปรตีน hAHSP-BCCP ในแบคทีเรียอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุล hAHSP หรืออีกเหตุหนึ่งคือ โมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งสองชนิดอาจจะจับกับ hAHSP ตรงบริเวณที่เชื่อมต่อกับ BCCP นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี Western blotting ในสภาวะ reducing condition พบว่าทั้ง MT-hAHSP1 และ MT-hAHSP2 ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน hAHSP หรือ โปรตีน hAHSP-BCCP แสดงให้เห็นว่าทั้ง MT-hAHSP1 และ MT-hAHSP2 จับกับ conformational epitope ของโปรตีน AHSP

สรุปผลการศึกษา ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อ hAHSP ขึ้นมาได้จำนวนสองโคลน คือ MT-hAHSP1 และ MT-hAHSP2 ซึ่งสามารถจับได้กับ conformational epitope ของ โมเลกุล hAHSP อย่างไรก็ตามน่าจะมีการศึกษาต่อถึงการทำปฏิกิริยาของ MT-hAHSP1 และ MT-hAHSP2 กับ native AHSP เพื่อจะนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินความรุนแรงของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved