บทคัดย่อรวม

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันโรคภูมิแพ้และภาวะความเจ็บป่วยจากโรคภูมิแพ้มีอุบัติการณ์ที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย การศึกษาในประเทศไทย พบว่า สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่ก่อให้เกิดการแพ้ในผู้ป่วยด้วยโรคภูมิแพ้มากที่สุด โดยมีไรฝุ่นบ้าน เป็นตัวผลิตสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดอาการของโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น

แนวคิดของแผนงานวิจัยนี้คือ การพัฒนากระบวนการวิจัยภายใต้กรอบของโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น ให้ครอบคลุมทั้งการอัตราชุกชุมและการกระจายตัวของไรฝุ่นในบ้านพักอาศัย โดยพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยเทคนิค PCR ศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นสายพันธุ์ที่ผู้ป่วยแพ้ รวมทั้งการรักษาด้วย fully human monoclonal antibodies เมื่อประสบความสำเร็จจะเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่นต่อไป

วัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยเทคนิค PCR มาใช้จำแนกชนิด (genus, species) และศึกษาหาอัตราชุกชุมและการกระจายตัวของไรฝุ่นในบ้านพักอาศัย ศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์ เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ผู้ป่วยแพ้ คัดเลือกสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่สำคัญนำมาทำการผลิตเพื่อใช้เป็นสารก่อภูมิแพ้มาตรฐานที่สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัย และรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น และพัฒนาแอนติบอดีต้นแบบสำหรับรักษาโรคภูมิแพ้ที่เกิดจากผลของโปรตีน TSLP

วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

การจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides farinae* (DF) และ *Blomia tropicalis* (BT) ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญทางด้านไรวิทยา จึงทำให้ข้อมูลเกี่ยวกับความชุกชุมและการแพร่กระจายของไรฝุ่นตามบ้านเรือนค่อนข้างจำกัด งานวิจัยนี้ได้ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับยีนชนิดต่างๆ ของไรฝุ่น 3 สายพันธุ์ที่พบบ่อยในประเทศไทย มาออกแบบและพัฒนาวิธีตรวจจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล คณะผู้วิจัยได้นำวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มาใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นจริงที่เก็บจากที่อยู่อาศัยจำนวน 100 หลังคาเรือน (ตัวอย่าง) โดยเปรียบเทียบกับการตรวจด้วยวิธีการลอยตัวควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์

ยีนที่นำมาพัฒนาวิธีการตรวจจำแนก ได้แก่ ยีน internal transcribe spacer 2 และยีน Cytochrome oxidase subunit I โดยออกแบบคู่ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จากยีนเหล่านี้ ผลการศึกษาพบว่า วิธี multiplex PCR ตรวจพบไรฝุ่นจำนวน 46 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37.10 สามารถจำแนกได้เป็นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* จำนวน 31 ตัวอย่าง สายพันธุ์ *D. farinae* จำนวน 29 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ *B. tropicalis* จำนวน 29 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี floatation+กล้องจุลทรรศน์สามารถพบไรฝุ่นในตัวอย่างจำนวน 24 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.49

ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 19, 10 และ 0 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำผลการตรวจสอบตัวอย่างฝุ่นมาจับคู่กันพบว่า ตัวอย่างฝุ่นที่มีข้อมูลตรงกันสำหรับการตรวจสอบทั้งสองวิธี มีจำนวน 65 ตัวอย่าง เป็นผลบวก (พบไรฝุ่น) จำนวน 14 ตัวอย่าง และเป็นผลลบ (ไม่พบไรฝุ่น) จำนวน 51 ตัวอย่าง คิดเป็นความไวของวิธีการตรวจ (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 54.17 ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 68.92 และความแม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 65.31 ตามลำดับ

การที่ค่าความไวและความจำเพาะของวิธี multiplex PCR ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้เนื่องจากวิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบไรฝุ่นได้มากกว่าโดยเฉพาะในตัวอย่างที่เป็นผลลบจากวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นการตรวจหาไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR จึงเหมาะสมสำหรับการตรวจตัวอย่างฝุ่นจำนวนมาก (screening) ในขณะที่วิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ เหมาะสำหรับการยืนยันสายพันธุ์ไรฝุ่นสำหรับจำนวนตัวอย่างฝุ่นที่ไม่มาก

วิธีตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นนี้เป็นประโยชน์ต่อการดูแลรักษาผู้ป่วยภูมิแพ้ได้เป็นอย่างดี เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก บุคลากรห้องปฏิบัติการตามโรงพยาบาลหรือตามห้องปฏิบัติการอื่นๆ สามารถดำเนินการตรวจได้ ใช้เวลาสั้น ออกผลได้เร็วกว่าการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างมาก

สารสกัดหยาบจากตัวไรฝุ่นถูกแยกแบบสองทิศทางด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ แล้วนำโปรตีนที่ผ่านการแยกที่อยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ไปทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทยที่ทำการศึกษา นำโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับไอจีอี (IgE) ในซีรัมของผู้ป่วยไปจำแนกชนิดโดยวิธีแมสสเปค-โตรเมตรี (mass spectrometry) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับแผนที่สายโปรตีน (peptide mass maps) ในแฟ้มข้อมูล พบว่า มีโปรตีนจากไรฝุ่น *D. pteronyssinus* ที่ทำปฏิกิริยากับไอจีอี 22 จุด ที่ส่งไปจำแนกชนิด โปรตีนส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของไรฝุ่นคือ Der p 1 ส่วนสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิดใหม่ที่ค้นพบ คือ myosin heavy chain และ Triosephosphate Isomerase

ในการศึกษาปีที่ 2 คณะผู้วิจัยได้เลือกที่จะผลิตสารก่อภูมิแพ้หลักชนิด Der p 1 และ Der p 2 โดยใช้เทคนิค affinity column chromatography ในการผลิตสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ (native allergen) ส่วนสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ (recombinant allergen) ผลิตด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมในแบคทีเรีย พบว่า สามารถผลิตได้ง่ายในปริมาณมากตามที่ต้องการและมีความบริสุทธิ์สูง ผลการตรวจสอบลักษณะรูปแบบของโปรตีนและ amino acid sequencing สรุปได้ว่า สารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ และสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ที่ผลิตได้เป็น Der p 1 และ Der p 2 จริง โดยมีขนาดโมเลกุลเป็น 24 และ 16 กิโลดัลตัน การศึกษาคุณสมบติความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของสารก่อภูมิแพ้ที่ผลิตขึ้นมาด้วยวิธี IgE-ELISA พบว่า สารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ Der p 1 และ Der p 2 และสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 2 ที่ผลิตได้เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก เนื่องจากมี IgE binding activity คิดเป็น 96.67%, 83.33% และ 73.33% ตามลำดับ แต่สารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 1 ที่ผลิตได้มี IgE binding activity เพียง 43.33% จึงเป็นสารก่อภูมิแพ้รอง

การศึกษานี้พบว่า การศึกษาสารก่อภูมิแพ้ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ร่วมกับอิมมูโนมิกส์นั้นสามารถแยกโปรตีนได้ดีกว่า และคณะผู้วิจัยสามารถผลิตสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น *D. pteronyssinus* ชนิด Der p 1 และ Der p 2 ได้ทั้งที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ และสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ และพบว่า สารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 2 ที่ผลิตได้เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก จึงน่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นน้ำยาวินิจฉัยภาวะแพ้ไรฝุ่น และเป็นวัคซีนรักษาโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น ส่วนสารก่อภูมิแพ้รีคอม

บิแนนท์ Der p 1 สามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานของชุดทดสอบเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นชนิด Der p 1 ในฝุ่นบ้านด้วยวิธี sandwich ELISA ได้

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) หรือ interleukin 50 (IL-50) เป็นโปรตีนที่หลั่งจาก epithelial cells บริเวณทางเดินหายใจที่มีการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เซลล์ในร่างกาย เช่น Dendritic cells (DCs), T cells, mast cells, NKT cells และ เซลล์อื่นๆ ให้หลั่ง T helper 2 (Th2) cytokines เช่น IL-5, IL-6, IL-10 และ IL-13 เป็นต้น รวมถึง mediators ต่างๆ มีผลการกระตุ้นให้เกิด airway hyper-responsiveness (AHR) มีการอักเสบ และ atopic dermatitis ในผู้ป่วย มีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของ TSLP ในหนูทดลองจะสามารถยับยั้งไม่ให้เซลล์อักเสบชนิดอีโอซิโนฟิลเข้าไปในทางเดินหายใจและสามารถป้องกันการเกิดการอักเสบในทางเดินหายใจได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเตรียม recombinant human TSLP เพื่อนำโปรตีนดังกล่าวมาใช้ในเป็นแอนติเจนเพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv ที่จับกับ TSLP จาก human antibody phage display library คณะผู้วิจัยได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจาก epithelial cell line ที่ถูกกระตุ้นสารก่อภูมิแพ้ แล้วทำการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ทำการเพิ่มจำนวนยีน TSLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน โดยพบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 489 bp แล้วโคลนยีนที่เป็นรหัสของ TSLP ของมนุษย์เข้าใน expression vector นำ recombinant vector เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ทำการ induce ให้ transformed *E. coli* ผลิต recombinant TSLP แล้วทำการ purify recombinant TSLP ออกจากโปรตีนอื่นๆของแบคทีเรียด้วย affinity column วิเคราะห์โปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ LC MS/MS พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 15 KDa ซึ่ง recombinant TSLP ที่ผลิตขึ้นสามารถเพิ่มการแสดงออกของ OX40L บนผิวของ Myeloid dendritic cells ได้ จากนั้นนำ TSLP ที่ผลิตขึ้นเป็นแอนติเจนเป้าหมายในการทำ Bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display human ScFv จากการคัดเลือก 192 โคลน พบว่า 49 โคลนมี *huScFv* gene และ 20 โคลนสามารถสร้าง HuScFv ได้ จากการทดสอบการจับของ HuScFv ดังกล่าว ต่อ human TSLP ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามี crude HuScFv จำนวน 10 clones คือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ให้ผลบวกใน indirect ELISA จากนั้นนำ human antibodies ทั้ง 10 โคลน ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ TSLP พบว่า มี 2 โคลนของ TSLP specific monoclonal antibodies คือ โคลนที่ 5 และ 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการการแสดงออกของ OX40L บนผิวของ TSLP treated-Myeloid dendritic cells ได้ ถือได้ว่าเป็นการศึกษาแรกที่สามารถผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวที่มีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับ TSLP และรบกวนการทำงานของ TSLP protein ได้ ซึ่งอาจจะยับยั้งการอักเสบในทางเดินหายใจได้ แต่ต้องทำการทดลองต่อไป

คำสำคัญ: โรคภูมิแพ้ ไรฝุ่นบ้าน ยีน การจำแนกชนิด สารก่อภูมิแพ้ โปรตีนชนิดรีคอมบิแนนท์เดอร์มาโต ฟากอยดีเทอร์โรนิสสินัส ไทมิก สโตรมอล ลิมโฟพอยอิติน ฟาจดิสเพลย์แอนบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาล, แอนติบอดีสายเดี่ยว การโคลนยีน พีซีอาร์

Summary

Background and Rationale: The prevalence of allergic diseases has substantially heightened all over the world, especially in developing countries including Thailand with continue to increase in severity and complexity. Moreover, allergy is one of the important chronic diseases among Thai population resulting in socio-economic burden and quality of life. The development of allergy requires a complex interaction between genetic predisposition and environmental basis. Among the environmental factors, exposure to indoor allergen is the most important risk. House dust mites (HDM), *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp*) and *D. farinae* (*Df*), have been accounted as the major sources of indoor allergens and considered to be the most important allergen in Thailand.

Objective: The conceptual framework of this project is to study in holistic approaches for house dust mite allergy by 1) develop the molecular-based assay for dust mite identification using for mite survey 2) study the allergenic components of *D pteronyssinus* allergens by the high-resolution 2-D technique combined with IgE immunodetection 3) produce the human monoclonal antibody by using phage display technology for treatment of house dust mite allergy.

Methodology & Results:

To develop the molecular-based assay for dust mite identification, 3 pairs of primer were designed for identifying common dust mite species; *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *D. farinae* (DF) and *Blomia tropicalis* (BT), from their genomic DNA by multiplex PCR technique. Total duration since the preparation of PCR reaction mix till the analysis by agarose gel electrophoresis was approximately 2 hours. Then, the assay was used to examine the species of dust mites in dust samples collected from 100 households, and compared to the combination method of flotation+microscopic examination.

Results showed that the examination by multiplex PCR gave positive results for 46 samples (37.10 %), of which could be identified as *D. pteronyssinus* in 31 samples, *D. farinae* in 29 samples and *B. tropicalis* in 29 samples, whereas the flotation+ microscopic examination gave positive results in 24 dust samples (24.49 %), which were 19, 10 and 0 samples, for each species respectively. The matched results from both methods were found in 65 samples, of which 14 samples were positive and 51 samples were negative. Levels of sensitivity, specificity and accuracy of the multiplex

PCR compared to the flotation+microscopy were 54.17 %, 68.92 % and 65.31 %, respectively.

Low levels of sensitivity, specificity and accuracy of the multiplex PCR were due to more positive results obtained from the multiplex PCR than those from the flotation+microscopy. Therefore, the multiplex PCR is suitable for screening the considerable number of dust specimens, whereas the flotation+microscopy is rather suitable for the confirmation of positive specimens obtained from the multiplex PCR. Moreover, the multiplex PCR is simple and can be carried out by most laboratory personnel with no special knowledge in dust mite identification.

Whole body extracts of 99% purity of *D. pteronyssinus* was subjected to a nonlinear pH 3-10 first dimensional electrophoresis followed by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel. 2DE-IgE immunoblotting was carried out using a pool of sera of *Dp* allergic Thai patients. The IgE-reactive proteins were excised from the 2DE-gel and analyzed by matching the peptide mass maps generated after mass spectrometry with the protein database. Twenty two IgE-binding protein spots of *D. pteronyssinus* were subjected to LC/MS for protein identification. Most protein spots were the major allergen namely Der p 1, and Der p 2 and established allergens such as Der p 3, Der p 11, Der p 14. The novel allergen discovered was myosin heavy chain and Triosephosphate Isomerase, which should be further study for IgE binding reactivity in allergic Thai patients. From the result of allergenomes of the *D. pteronyssinus*, therefore, the major allergen; Der p 1 and Der p 2 in the forms native and recombinant protein were selected to produced by affinity column chromatography and genetic engineering, respectively.

In the process of production of recombinant Der p 1 and Der p 2; pET 20b^{+} vector was used as protein expression vector. The recombinant product was detected in soluble part of bacterial lysate as expected. From protein profiles and amino acid sequencing indicated that the generated proteins were Der p 1 and Der p 2 having molecular weight of 24 and 16 kDa, respectively.

The allegenicities of native and recombinant of Der p 1 and Der p 2 were compared by IgE-ELISA. IgE binding activities of native Der p 1, Der p 2 and recombinant Der p 2 were 96.67%, 83.33% and 73.33% respectively. Thus, these produced allergens were major allergen. Recombinant Der p 1 could bind to IgE only 43.33% of atopic patients' sera tested; indicated that this recombinant Der p 1 was minor allergen.

The repertoire of *D. pteronyssinus* allergens was well defined by the high-resolution 2-D technique combined with IgE immunodetection as the 2-D map of *D. pteronyssinus*

allergens. We successfully produced native and recombinant of *D. pteronyssinus* allergens namely Der p 1 and Der p 2. Recombinant Der p 2 was major allergen which might be developed for using as diagnostic and therapeutic allergen. While the recombinant Der p 1 would be applied for standard allergen in a diagnostic kit for determination Der p 1 level in the house dust by sandwich ELISA.

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) or interleukin 50 (IL-50) is a secreted protein of the respiratory lining epithelial cells which response to the allergen. TSLP can induce several cells such as dendritic cells (DCs), T cells, mast cells, NKT cells and other to secret the T helper 2 (Th2) cytokines like IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13 etc. Cytokines releasing result in the airway hyper-responsiveness (AHR), inflammation and atopic dermatitis in patient. The inhibition of TSLP is successful to prevent the inflammation by inhibit the entry of eosinophil migrate into respiratory tract in mice. Therefore, this study aims to preparing the recombinant human TSLP. This protein will further use as antigen for produce the human monoclonal antibody by using phage display technology. The mRNA was extracted from the epithelial cell line which has challenge with an allergen and then converted to cDNA. Human TSLP gene was amplified by using specific primer. PCR product has 489 bp in size. The amplicon was clones into expression vector and infected into the expression E. coli. The transformed bacteria were grown under IPTG induction for production of the soluble recombinant human TSLP. The protein was purified by using an affinity column and characterized by SDS-PAGE and LC MS/MS. The recombinant human TSLP was shown the molecular weight as 15 kDa. The recombinant TSLP protein was successfully produced. This TSLP protein showed biological activity which could enhance OX40L expression on Myeloid dendritic cells. The purified TSLP was used in the phage biopanning process for specific HuScFv selection. From biopanning 149 clones were selected and 49 clones have *huScFv* gene. There were 20 HuScFv clones that could be produced. Ten HuScFvs clones *i.e.* clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 and 16 bound specifically to the TSLP as determined by indirect ELISA. They were expressed and purified. There were 2 of TSLP specific HuScFvs clones (Clone no. 5 and 7) could inhibit OX40L expression in TSLP treated-Myeloid dendritic cells. This is the first report on production of human ScFv that specifically bound to the TSLP protein and interfere it biofunctions.

Keyword: allergic diseases, house dust mite, gene, identification, allergen, recombinant protein, *Dermatophagoides pteronyssinus*, thymic stromal lymphopoietin, phage display, human monoclonal antibody, single chain antibody, gene cloning, PCR