ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46245

KINETIC EXPRESSION OF Δ7 BLIMP-1 ISOFORM DURING THE DIFFERENTIATION OF B CELLS TO PLASMA CELLS

JEDSADA KAEWRAKMUK

MASTER OF SCIENCE
IN MICROBIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
MARCH 2011

b00256734

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46245

KINETIC EXPRESSION OF Δ7 BLIMP-1 ISOFORM DURING THE DIFFERENTIATION OF B CELLS TO PLASMA CELLS

JEDSADA KAEWRAKMUK

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MICROBIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL

CHIANG MAI UNIVERSITY

MARCH 2011

KINETIC EXPRESSION OF Δ7 BLIMP-1 ISOFORM DURING THE DIFFERENTIATION OF B CELLS TO PLASMA CELLS

JEDSADA KAEWRAKMUK

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MICROBIOLOGY

EXAMINING COMMITTEE

Wilaiwan Petsophonsakul ..... CHAIRPERSON
Dr. Wilaiwan Petsophonsakul

C. Sakonwasun ..... MEMBER
Assist. Prof. Choompone Sakonwasun

Hathairat Thananchai ..... MEMBER
Dr. Hathairat Thananchai

G. Lertmemongkolchai ..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Ganjana Lertmemongkolchai

THESIS ADVISOR

Wilaiwan Petsophonsakul
Dr. Wilaiwan Petsophonsakul

24 March 2011

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to extend my deepest and most sincere gratitude to my supervisor, Dr. Wilaiwan Petsophonsakul for her extraordinary support, valuable advice, wise guidance, understanding, great encouragement and endurance throughout my thesis work.

I am also very grateful to Associate Professor Dr. Ganjana Lertmemongkolchai, Assist. Prof. Choompone Sakonwasun and Dr. Hathairat Thananchai, the examining committee, for their invaluable suggestions and comments that improved my thesis considerably.

My deep gratitude is extended to Miss Methavee Burana, Dr. Rungtawan Sriburi, and Dr. Aksarakorn Kummasook for their continued encouragement and assistance in so many different ways.

Lastly, and most importantly, I wish to thank my family for their understanding, endless patience, care and love.

Jedsada Kaewrakmuk

Thesis Title	Kinetic Expression of Δ7 Blimp-1 Isoform During the Differentiation of B Cells to Plasma Cells
Author	Mr. Jedsada Kaewrakmuk
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Advisor	Dr. Wilaiwan Petsophonsakul

ABSTRACT

246245

Blimp-1 is a transcriptional repressor that has been recognized as a master regulator of terminal B cell differentiation. Expression of the Blimp-1 is sufficient to drive B cells to differentiate into plasma cells. Blimp-1 is a Zinc finger-containing protein encoded by *prdm1*. In mouse, the five zinc finger domains critical for DNA binding are encoded in exon 6 and 7. Several Blimp-1 mRNA isoforms have been found in mouse plasmacytoma cells. RT-PCR revealed a minor isoform that resulted from differential splicing of exon7 (Δ7 isoform). Thus, the protein encoded by this Δ7 isoform is unable to bind DNA.

In previous study, several human B and non B cell lineages showed an unexpectedly different ratio of full length more than Δ7 isoform with the highest ratio was in plasma cell. As the study of Blimp-1 isoform expression was compared in different cell types, monitoring the kinetic expression of Blimp-1 isoforms during the

E46245

terminal B cell differentiation in a single cell type would be a better way to confirm the data.

Raji cells, a mature B cell line, were used in this study. LP-1, a plasma cell line, secreting IgM antibody was used as a positive control for the experiments. Raji cells were stimulated with 2.5 μg/ml of pokeweed mitogen in combination with 20 unit/ml of IL-2. The cells and supernatants were harvested on day 0, 3, 6 and 9 for the following studies; 1) expression of CD138, a plasma cell marker using flow cytometry 2) antibody secretion by using sandwich ELISA, and 3) kinetic expression of a) Blimp-1 mRNA isoforms by RT-PCR and b) intracellular Blimp-1 protein by flow cytometry.

Stimulation of Raji B cells was fulfilled, as the cells showed differentiation to plasma cells, which was proved by the expression of CD138 and antibody secretion. The kinetic expression ratios of full length and Δ7 mRNA isoforms were monitored by RT-PCR. The primers were designed to bind between the exon 6 and exon 8 so that both full length and Δ7 mRNA could be detected. The unstimulated B cells showed little increase in the ratio of full length and Δ7 mRNA on day 3, with no further change, while stimulated Raji cells increased rapidly from an average 1.8 on day 0 to the highest ratio of an average 14 .5 on day 9. When Blimp-1 protein was investigated, both unstimulated and stimulated Raji B cells expressed intracellular Blimp-1 at the basal level and slightly higher expression after stimulation. This result correlated with the expression of Blimp-1 at the mRNA level, which indicated how the 2 isoforms related to the function. Thus, it was considered that expression of full length Blimp-1 over Δ7 isoforms was insufficient in fulfilling its function and a very high ratio is needed to drive B cells into plasma cells.

E46245

Understanding the mechanism that controls the differentiation of B cells to plasma cells may be applied as alternative treatment of autoimmune diseases and cancers by functional interference of transcription factors involving antibody producing cells.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การแสดงออกทางจลนศาสตร์ของเคลตาเซเวนบลิมวัน ไอโซฟอร์มระหว่างการพัฒนาการของบีเซลล์ไปเป็น พลาสมาเซลล์
ผู้เขียน	นายเจษฎา แก้วรากมุข
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. วิไลวรรณ เพชรโสภณสกุล

บทคัดย่อ

E46245

Blimp-1 เป็น transcription factor หลักในการควบคุมพัฒนาการระยะสุดท้ายของ B cell การแสดงออกของ Blimp-1 ใน B cell เพียงพอที่จะกระตุ้นให้ B cell เปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell ได้ Blimp-1 เป็น Zinc finger-containing protein ซึ่งถูกกำหนดสร้างจากยีน *prdm1* จากการศึกษาในหนูพบว่า Blimp-1 มี zinc finger domain อยู่ 5 บริเวณ ซึ่งมีความสำคัญต่อการจับกับ DNA และถูกกำหนดโดย exon 6-8 จากการศึกษา plasmacytoma cell ของหนู พบว่า Blimp-1 mRNA มี isoform หลายชนิด โดยใช้วิธี RT-PCR พบ isoform หนึ่งซึ่งมีอยู่ในปริมาณน้อย isoform นี้มีการขาดหายไปของส่วน exon7 (Δ7 isoform) ดังนั้นโปรตีนที่ถูกกำหนดการสร้างโดย Δ7 isoform จึงไม่สามารถที่จะจับได้กับ DNA

จากการศึกษาใน cell line ของคนทั้งชนิด B cell และไม่ใช่ B cell กลับพบว่ามีการแสดงออกของ full length มากกว่า Δ7 isoform และพบสัดส่วนสูงสุดใน plasma cell เนื่องจากการศึกษาถึงการแสดงออกของ Blimp-1 isoform นั้นเป็นการเปรียบเทียบในระหว่างเซลล์ชนิดต่างๆ การติดตามการแสดงออกของ Blimp-1 isoforms ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงของ B cell ไปเป็น plasma cell ในเซลล์ชนิดเดียว จึงจะช่วยยืนยันผลการทดลองได้ดีกว่า

ในการศึกษานี้ได้ใช้ Raji cell ซึ่งเป็น mature B cell line และใช้ LP-1 cell ซึ่งเป็น plasma cell line ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างและหลั่ง IgM antibody นำมาเป็น positive control ในการทดลองจะทำการกระตุ้น Raji cells ด้วย 2.5 μg/ml pokeweed mitogen ร่วมกับ IL-2 20 unit/ml ทำการเก็บเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 0, 3, 6 และ 9 และนำมาศึกษา 1) การ

E46245

แสดงออกของ CD138 ซึ่งเป็น plasma cell marker โดยวิธี flow cytometry 2) การหลั่ง antibody โดยวิธี sandwich ELISA และ 3) การแสดงออกทางจลนศาสตร์ของ Blimp-1 mRNA isoforms โดยวิธี RT-PCR และโปรตีน Blimp-1เซลล์โดยวิธี flow cytometry

สภาวะที่ใช้ทดลองสามารถกระตุ้นให้ Raji cell ให้พัฒนาไปเป็น plasma cell ซึ่งพิสูจน์โดยพบการแสดงออกของ CD138 และมีการหลั่ง antibody จากนั้นจึงได้ศึกษาถึงการแสดงออกของ full length และ Δ7 mRNA isoforms โดยวิธี RT-PCR โดยออกแบบ primer ให้จับระหว่าง exon 6 และ 8 พบว่ามีการแสดงออกทั้ง full length และ Δ7 mRNA ในเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นจะมีการเพิ่มสัดส่วนของ full length ต่อ Δ7 mRNA เล็กน้อยในวันที่ 3 หลังจากนั้นก็ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่เซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนจาก 1.8 ในวันที่ 0 ไปเป็นสัดส่วนถึง 14.5 ในวันที่ 9 และจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Blimp-1 ทั้งในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นจะมีอยู่แล้วในระดับหนึ่งและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากที่เซลล์ถูกกระตุ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการแสดงออกของ Blimp-1 ในระดับ mRNA แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของทั้งสอง isoform กับหน้าที่ ด้วยเหตุนี้การแสดงออกของ Blimp-1 ชนิด full length ที่มากกว่า Δ7 isoform ไม่เพียงพอต่อการทำหน้าที่ จะต้องใช้สัดส่วนที่สูงมากในการกระตุ้นให้ B cell กลายไปเป็น plasma cell ได้

ความเข้าใจในกลไกการควบคุมการพัฒนาการของ B cell ไปเป็น plasma cell อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยในกลุ่ม autoimmune diseases หรือมะเร็งโดยการรบกวนหน้าที่ของ transcription factors ซึ่งเกี่ยวข้องในเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENTS	iii
ABSTRACT (in English)	iv
ABSTRACT (in Thai)	vii
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	6
CHAPTER III OBJECTIVE	12
CHAPTER IV MATERIALS AND METHODS	13
4.1 Cell culture	13
4.2 B cell stimulation	14
4.3 Isolation of RNA	14
4.4 RT-PCR	15
4.4.1 Synthesis of first strand cDNA for PCR amplification	15
4.4.2 PCR reaction	16
4.4.3 One step RT-PCR	17
4.5 Agarose gel electrophoresis	18
4.6 Analysis of the band intensity	18

4.7 Staining of CD138 and Blimp-1 protein on Raji and LP-1 cells 19

4.7.1 Titration of anti-CD138 and conjugated antibody for staining 19

4.7.2 Determination of the CD138 expression in PWM stimulated Raji cells 19

4.7.3 Determination of different permeabilization agents for intra cellular protein staining 19

4.7.4 Titration of anti-CD 138 and conjugated antibody for staining 20

4.7.5 Determination of Blimp-1 expression in PWM stimulated Raji cells 20

4.8 Detection of antibody production by ELISA 21

4.8.1 Titration of goat IgG-IgM concentration coating to the plate 21

4.8.2 Detection of antibody production in cell culture supernatants by ELISA 21

CHAPTER V RESULTS 23

5.1 Determination of sandwich ELISA optimal conditions used for the detection of antibody in cell supernatants 23

5.2 Detection of antibody production in cell culture supernatants by ELISA 26

5.3 Staining of CD138 in PWN stimulate Raji cells 30

5.4 Determination the optimal condition used to staining of Blimp-1 protein 32

5.5 Quality control in determination of Blimp-1 expression by using GAPDH gene control 36

5.6 Determination of Blimp-1 mRNA isoform expression in PWM stimulated Raji B cells 38

5.7 Determination of Blimp-1 protein expression in PWM stimulated Raji cells 41

CHAPTER VI DISCUSSION 44

CHAPTER VII SUMMARY 50

REFERENCES 53

APPENDIX 59

CURRICULUM VITAE 76

LIST OF TABLES

Table	Page
1 Block titration of anti human IgG+IgM (H+L) coated plate	24
2 Titration of peroxidase conjugated anti human IgG-IgM.	25
3 Antibody standard in the concentration of 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.12 were determined by using ELISA	26
4 Antibody secretion from PWM stimulated Raji B cells at different time points	29
5 Kinetic expression of the full length and Δ7 Blimp-1 mRNa isoforms in PWN stimulated Raji cell	40

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Blimp-1 controls plasma cell differentiation	2
2 Model for the role of Blimp-1 in repressing B cell fate and Inducing plasma cell fate	7
3 Murine Blimp-1 mRNA and the human Blimp-1, *prdm1* gene	8
4 RT-PCR analysis of mouse Blimp-1 mRNA	9
5 Antibody secretion from PWM stimulated Raji B cells at Different time points	28
6 Expression of CD138 on Raji cells by flow cytometry	30
7 Comparison of permeability reagents used for intracellular protein staining	32
8 Comparison of FITC conjugated anti goat IgM used for Blimp-1 staining	35
9 Kinetic expression of the full length and Δ7 Blimp-1 mRNA isoforms in PWM stimulated Raji B cells	37
10 Kinetic expression of the full length and Δ7 Blimp-1 mRNA isoforms in PWM stimulated Raji B cells	39
11 Blimp-1 protein expression in PWM stimulated Raji cells	41

ABBREVIATIONS

Ab	Antibody
Ag	Antigen
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein 1
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CD	cluster of differentiation
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
FITC	fluorescein isothiocyanate
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
HRP	horseradish peroxidase enzyme
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
mRNA	messenger ribonucleic acid
OD	optical density
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PWM	pokeweed mitogen
RNA	ribonucleic acid

rpm	revolution per minute
RT	room temperature
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SD	standard deviation
Std	standard