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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

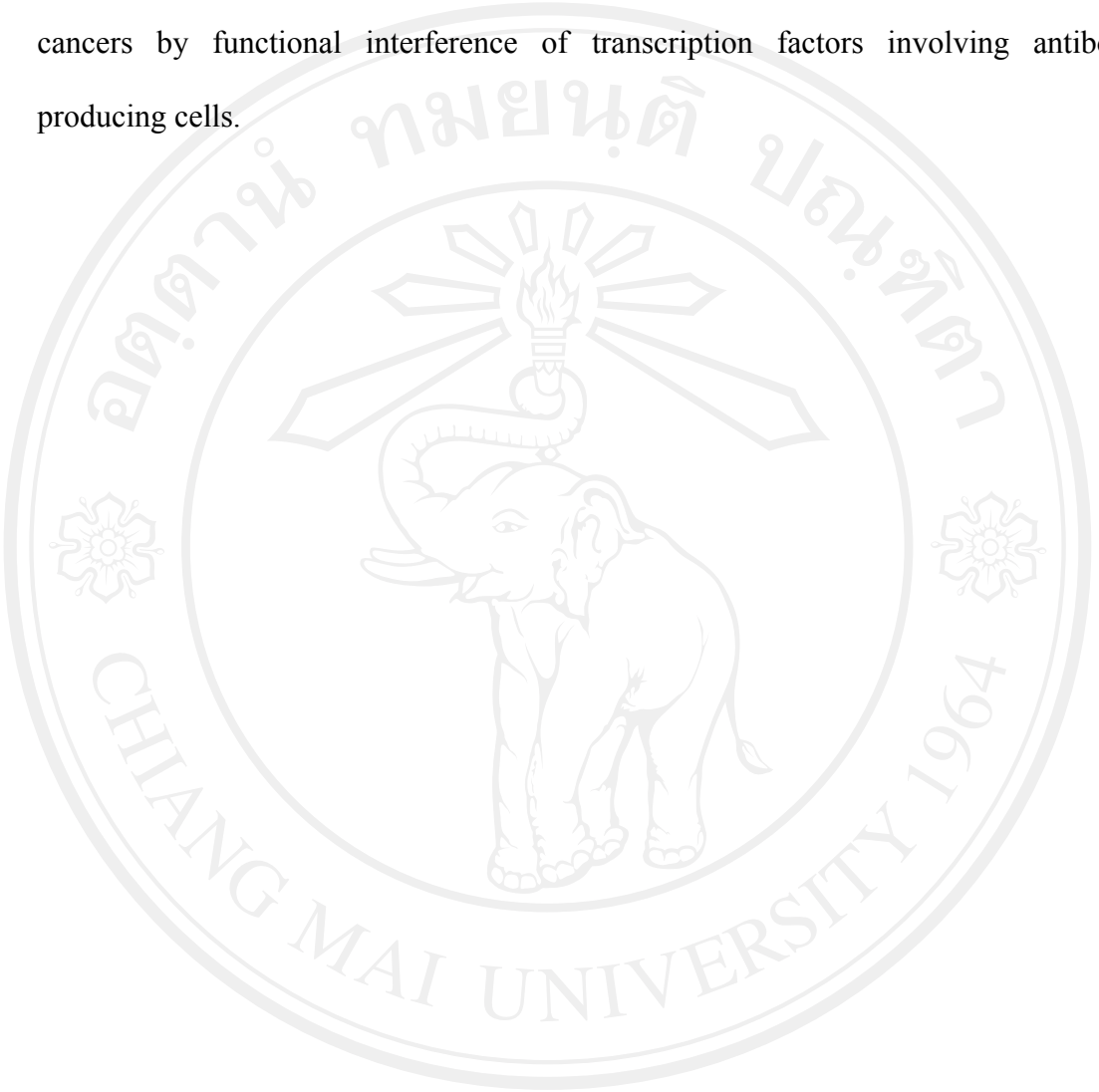
terminal B cell differentiation in a single cell type would be a better way to confirm the data.

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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแสดงออกทางจลนศาสตร์ของเดลตาเซเวนบลิมวัน ไอโซฟอร์มระหว่างการพัฒนาการของบีเซลล์ไปเป็นพลาสมาเซลล์

ผู้เขียน นายเจษฎา แก้วรากมุข

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. วิไลวรรณ เพชรโสภณสกุล

บทคัดย่อ

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved