ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของ Transcription Factors ชนิด Blimp-1 IRF4 และ XBP-1 ใน B Cells ของคนและ Mononuclear Cells จากไขกระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งต่อมน้ำเหลือง

ผู้เขียน นางสาวลัดดาวัลย์ เหล่ามานิต

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. วิไลวรรณ เพชรโสภณสกุล

บทคัดย่อ

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำที่มีประสิทธิภาพ เกิดจากการกระตุ้น B cells ด้วยแอนติเจนที่จำเพาะทำให้มีการพัฒนาไปเป็น memory cells หรือ plasma cells ปัจจุบัน transcription factors ที่มีผลต่อพัฒนาการของ B cells ไปเป็น plasma cells ที่พบคือ B lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp-1), Interferon regulatory factor 4 (IRF4) และ X box binding protein-1 (XBP-1) โดย Blimp-1 เป็นตัวควบคุมหลักในพัฒนาการของ plasma cells สำหรับ IRF4 นั้นจำเป็นต่อการทำงานของ T และ B cells ซึ่งพบว่าหนูที่ขาด IRF4 จะไม่สามารถสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อแอนติเจนที่ได้รับ ในขณะที่ XBP-1 จำเป็นต่อพัฒนาการของ plasma cells และต่อกระบวนการ unfolded protein response (UPR) พบว่า B cells ของหนูที่ขาด XBP-1 จะไม่สามารถพัฒนาไปเป็น plasma cells และสามารถสร้างแอนติบอดีได้เพียงเล็กน้อย

ในการศึกษาครั้งนี้จะวัดการแสดงออกของ transcription factors 3 ตัวดังกล่าว จาก B cells ของคน ได้แก่ B cells ปกติที่แยกได้จากเลือดก่อนและหลังถูกกระตุ้น ใน B cell lines (Nalm6: B cells ระยะต้น, Raji และ Ramos: B cells ระยะโตเต็มที่) และใน mononuclear cells จากตัวอย่างไขกระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งต่อมน้ำเหลืองจำนวน 23 ราย การแยก B cells จากเลือดในครั้งนี้ได้ใช้วิธี negative selection ซึ่ง B cells ที่แยกได้จากเลือดนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะมีความบริสุทธิ์อยู่ร้อยละ 87 วิเคราะห์โดยวิธี Flow cytometry เมื่อถูกกระตุ้นด้วย anti-μ ร่วมกับ IL-2 และ anti-CD40 ร่วมกับ IL-2 จะพบจำนวน B cells ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ CD25 เป็น activation marker เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 57.89 และร้อยละ 32.99 ตามลำดับ สำหรับ mononuclear cells ของผู้ป่วยจะแยกออกจากเซลล์ไขกระดูกโดยวิธี Ficoll Hypaque density centrifugation หลังจากนั้น RNA ของเซลล์ทุกกลุ่มจะถูกสกัดและแยกโดยใช้ RNeasy mini spin column การแสดงออกของ Blimp-1, IRF4, XBP-1 และ GAPDH mRNA จะวัดโดยใช้วิธี One-Step RT-PCR และวิเคราะห์ความเข้มของ PCR products โดยใช้โปรแกรม molecular analysis version 1.4 ซึ่งความเข้มของ band แต่ละยีนจะแสดงเป็นสัดส่วนโดยเปรียบเทียบกับ GAPDH ซึ่งเป็น Housekeeping gene

พบว่าอัตราส่วนความเข้มของ band ของ Blimp-1, XBP-1 และ IRF4 ใน B cells ที่ไม่ถูกกระตุ้นเทียบกับ GAPDH คือ 1.03, 1.25 และ 1.06 ตามลำดับ การแสดงออกของ Blimp-1 และ IRF4 มีการลดลงหลังจากที่ B cells ถูกกระตุ้นด้วย anti-CD40 ร่วมกับ IL-2 (0.59, 1.35 และ 0.94) และ anti-μ ร่วมกับ IL-2 (0.27, 1.06 และ 0.60) การแสดงออกของ transcription factors ทั้ง 3 ตัวนี้ในเซลล์ Raji และ Ramos ซึ่งเป็น mature B cell lines มีค่าเท่ากับ 0.80, 1.00, 0.91 และ 0.94, 1.12, 1.01 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าของ B cells ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น อย่างไรก็ตามพบว่ามีการแสดงออกของ Blimp-1 ใน Nalm6 ซึ่งเป็น B cells ในระยะต้นของพัฒนาการจะน้อยกว่าใน B cells ปกติที่โตเต็มที่ ในขณะที่การแสดงออกของ IRF4 และ XBP-1 มีค่าใกล้เคียงกันกับ B cells ปกติ (0.68, 1.08 และ 1.02) ค่าเฉลี่ยของความเข้ม band ของ Blimp-1, XBP-1 และ IRF4 เทียบกับ GAPDH ของผู้ป่วยทั้งหมด 23 ราย คือ 0.79 ± 0.22, 0.97 ± 0.17 และ 0.89 ± 0.21 ตามลำดับ พบว่ามีผู้ป่วยสองราย ให้ผลการแสดงออกของ Blimp-1 และ IRF4 แตกต่างจากผู้ป่วยรายอื่นๆ รายแรกเป็น classical Hodgkin lymphoma (CHL) มีการแสดงออกของ Blimp-1 และ IRF4 ต่ำมากเมื่อเทียบกับตัวอย่างรายอื่น ส่วนผู้ป่วยอีกรายที่เป็น acute lymphoblastic leukemia (ALL) จะให้ PCR products ของ Blimp-1 และ IRF4 หลาย bands ที่มีขนาดแตกต่างกันซึ่งอาจจะเป็นการแสดงออกของหลายๆ isoforms การศึกษาที่น่าจะทำต่อไปในอนาคตคือหาความผิดปกติของตัวที่ควบคุมการแสดงออกของ Blimp-1, IRF4 และ XBP-1 หรือความผิดปกติของยีนที่ถูกควบคุมโดย Blimp-1, IRF4 และ XBP-1 ในผู้ป่วยทั้งสองรายนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Expression of Transcription Factors, Blimp-1, IRF4 and XBP-1 in Human B Cells and Bone Marrow Mononuclear Cells from Patients with Leukemia and Lymphoma

Author Ms. Laddawan Laomanit

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisor Dr. Wilaiwan Petsophonsakul

ABSTRACT

Effective humoral responses involve the activation of antigen specific B cells and their subsequent differentiation into memory or plasma cells. Current transcription factors, which are known to drive B cell differentiation into plasma cells, are B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1), Interferon regulatory factor 4 (IRF4), and X box binding protein-1 (XBP-1). Blimp-1 has been postulated as a major regulator of terminal B cell differentiation. IRF4 plays an important role in the function of mature T and B cells, as mice lacking in the IRF4 gene were unable to produce the antibody. XBP-1 is essential for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. XBP-1 deficient B cells are not able to differentiate into plasma cells and exhibit a pronounced severe antibody deficiency.

In this study, the expression of these transcription factors was determined in various types of human B cells: primary resting B cells, activated B cells, B cell lines (Nalm6: pre B cell line, Raji and Ramos: mature B cell lines), as well as bone marrow mononuclear cells of 23 samples from patient with leukemia and lymphoma. Peripheral blood B cells were isolated by negative selection and the purity was 87% when using flow cytometry. The percentage of activated B cells after co-stimulations with anti-μ+IL-2 and anti-CD40+IL-2, when using CD25 as an activation marker,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

was 57.89% and 32.99%, respectively. Mononuclear cells from bone marrow of the patients were isolated by Ficoll Hypaque gradient centrifugation. RNAs from these cells were isolated by RNeasy mini spin column. The expression levels of Blimp-1, IRF4, XBP-1, and GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNAs were performed using one step RT-PCR. The intensity of the PCR products in comparison to GAPDH, a house keeping gene, was measured by the program, molecular analysis version 1.4.

The ratio of the intensity of Blimp-1, XBP-1, and IRF4 expression to the intensity of GAPDH in resting B cells was 1.03, 1.25, and 1.06, respectively. There was a decrease in Blimp-1 and IRF4 when stimulated with either anti-CD40+IL-2 (0.59, 1.35, 0.94) or anti-μ+IL-2 (0.27, 1.06, 0.60). The expression of these transcription factors in 2 mature B cell lines, Raji and Ramos, was 0.80, 1.00, 0.91 and 0.94, 1.12, 1.01, respectively, which was similar to those of normal B cells. However, the pre B cell line, Nalm6 expressed a lower level of Blimp-1, whereas IRF4 and XBP-1 were expressed at a comparable level (0.68, 1.08, 1.02) to those of resting B cells. The mean $\pm$ SD ratio of Blimp-1, XBP-1, and IRF4 expression to the GAPDH of all 23 patients was 0.79 ± 0.22, 0.97 ± 0.17 and 0.89 ± 0.21, respectively. Abnormal or low expression of Blimp-1 and IRF4 was observed in two patients with classical Hodgkin lymphoma (CHL) and acute lymphoblastic leukemia (ALL). In one Hodgkin lymphoma patient, the expression of Blimp-1 and IRF4 was very low compared to that in the same patient group. In one patient with ALL, the PCR products of Blimp-1 and IRF4 showed multiple bands that might indicate multiple isoforms. Further analyses to determine the abnormalities existing in the upstream regulators of Blimp-1, XBP-1 and IRF4 and their effect in the downstream in these two patients would be of interest.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved