การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดซีดีสี่–ที่ลิมโฟไซท์ ภายหลังได้รับการนำเสนอ สแตฟไฟโลคอคคัสเอนเทอโรทอกซินชนิดบีด้วยเซลล์ชนิดนาอีฟบีลิมโฟไซท์เทียบกับการที่ได้รับ การนำเสนอด้วยเซลล์ประเภทเดนไดรติคที่พัฒนาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซท์



นายกาจ โชคชัยอุสาหะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2554 ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



CHARACTERISTICS OF NAÏVE CD4[†]T CELLS RECOGNIZED STAPHYLOCOCAL ENTEROTOXIN B SUPERANTIGEN PRESENTED BY NAÏVE B CELLS VERSUS MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS

Mr. Kaj Chokeshai-u-saha

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences (Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

540253

Thesis Title CHARACTERISTICS OF NAÏVE CD4 T CELLS RECOGNIZED STAPHYLOCOCAL **ENTEROTOXIN** В **SUPERANTIGEN** PRESENTED BY NAÏVE B CELLS VERSUS MONOCYTE-DERIVED **DENDRITIC CELLS** Mr. Kaj Chokeshai-u-saha Ву Field of Study **Biomedical Sciences** Professor Kiat Ruxrungtham Thesis Advisor Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree Dean of the Graduate School (Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.) THESIS COMMITTEE (Professor Apiwat Mutirangura, MD) (Professor Kiat Ruxrungtham, MD) Examiner (Associate Professor Chintana Chirathaworn, Ph.D.) (Associate Professor Nattiya Hirankarn, MD, Ph.D.) External Examiner

(Ponpan Matangkasombut Choopong, MD, Ph.D.)

กาจ โชคชัยอุสาหะ : การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดซีดีสี่ -ที่ลิมโฟไซท์ ภายหลัง ได้รับการนำเสนอสแตฟไฟโลคอคคัสเอนเทอโรทอกซินชนิดบีด้วยเซลล์ชนิดนาอีฟบีลิมโฟไซท์เทียบ กับการที่ได้รับการนำเสนอด้วยเซลล์ประเภทเดนไดรติคที่พัฒนาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซท์ (CHARACTERISTICS OF NAÏVE CD4[†]T CELLS RECOGNIZED STAPHYLOCOCAL ENTEROTOXIN B SUPERANTIGEN PRESENTED BY NAÏVE B CELLS VERSUS MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS) อ. ที่ ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, 132 หน้า.

เพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติในการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์เม็ดเลือดขาวนาอีฟบีลิมโฟไซท์ใน มนุษย์ เราปรับปรุ่งกระบวนการแยกนาอีฟบีลิมโฟไซท์โดยเพิ่มขั้นตอนโรเซตติงก่อนขั้นตอนการแยกด้วยแมก เนติคบีดตามปกติ กระบวนการแยกเซลล์ดังกล่าว สามารถใช้กับตัวอย่างเลือดเพียง 10 มิลลิลิตร และให้เซลล์ที่ มีความบริสุทธิ์ของบีลิมโฟไซท์และนาอีฟบีลิมโฟไซท์สูงถึง 99%(±0.5) และ 97% (±1.0) ตามลำดับ กระบวนการดังกล่าวนอกจากไม่กระตุ้นเซลล์แล้ว นาอีฟบีลิมโฟไซท์ที่แยกได้ยังสามารถนำมาใช้ศึกษาการ นำเสนอสแตฟไฟโลคอคคัสเอนเทอโรทอกซินซนิดบีต่อไปได้

ผลการวิเคราะห์โมเลกุลบนผิวเซลล์พบว่านาอีฟบีลิมโฟไซท์ที่ได้มีคุณสมบัติไม่เหมาะสมต่อการ นำเสนอแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดังเช่นที่ตรวจพบบนเซลล์เดไดรติก ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการกระตุ้นที่ลิมโฟไซท์ผ่านการนำเสนอสแตฟไฟโลคอคคัสบีผ่านนาอีฟบีลิมโฟไซท์ เนื่องจากที่ลิมโฟไซท์ที่ ได้รับการกระตุ้นปรากฏลักษณะบางประการของเซลล์อ่อน ร่วมกับการผลิตไซโตไคน์กลุ่มเอฟเฟคเตอร์ในระดับ ต่ำ อย่างไรก็ตามเซลล์ดังกล่าวไม่แสดงคุณสมบัติยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในหลอดทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การนำเสนอสแตฟไฟโลคอคคัสเอนเทอโรทอกซินซนิดบีผ่านนาอีฟบีลิมโฟไซท์ไม่สามารถกระตุ้นให้นาอีฟทีลิมโฟ ไซท์พัฒนาไปเป็นเรกกูราทอรีทีลิมโฟไซท์ได้ เพื่อศึกษาความแตกต่างด้านคุณสมบัติของนาอีฟบีลิมโฟไซท์ที่แยก จากเลือดหรืออวัยวะในระบบน้ำเหลืองที่แตกต่างคุณสมบัติการนำเสนอแอนติเจนของเซลล์แตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร จึงได้ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างในการแสดงออกของยีนล์และพบว่ามีเซลล์มีสภาวะการถูกกระตุ้นที่ แตกต่างระหว่างนาอีฟบีลิมโฟไซท์ที่แยกจากอวัยวะในระบบน้ำเหลือง อันได้แก่ ต่อมน้ำเหลือง ม้ามและจาก กระแสโลหิต ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการกระบวนเหนี่ยวนำการพัฒนาเรกกูราทอรีทีลิมโฟไซท์โดย อาศัยนาอีฟบีลิมโฟไซท์ต้องอาศัยบีจจัยที่เหมาะสมหลายประการและจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

สาขาวิชา: ชีวเวชศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต 🗥 🗥	ไชล ชีวเกล้าแร
	 ลายมือซื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพ	

5187757320 : BIOMEDICAL SCIENCES

KEYWORDS: NAÏVE B CELL / STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B / ANTIGEN PRESENTATION / MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELL / GENE EXPRESSION

META-ANALYSIS

KAJ CHOKESHAIUSAHA: CHARACTERISTICS OF NAÏVE CD4*T CELLS RECOGNIZED STAPHYLOCOCAL **ENTEROTOXIN SUPERANTIGEN** PRESENTED BY NAÏVE B CELLS VERSUS MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS. ADVISOR: PROF. KIAT RUXRUNGTHAM, MD, 132 pp.

This study aims to determine role of human naïve B cell in antigen presentation and stimulation to naïve CD4 T cell. To improve the yield and purity of human naïve B cell sepration, we have shown that inclduing B cell enrichment rosetting step prior to magnetic cell sorting, the puriy of the obtained naïve B cell purity was from 90±2.2% to 97±1.0% even when starting from a small blood voulume of 10 ml. The acquired naïve B cells were at the resting state and considered as poor antigen presenting cells as judged by their CD69(-)CD80(lo)CD86(lo) phenotypes.

These naïve B cellls could activate naïve CD4 T cells by SEB presentation to acquire CD4(+)CD25(+)CD62L(hi)CD95(lo) phenotypes with limited IL-2 and IL-4 production. However, the SEB-primed CD4 T cells had no suppressive function on allo CD4 T cells' proliferation. Thus the SEB-pulsed naïve B cell system could not induce regulatory T cell differentiation. To determine whether naïve B cell from various sources may have different characteristics, we compared differential gene expression among peripheral, splenic and tonsilar naïve B cell using available data from literatures. The result revealed increased cell activation of lymphoid when compared with peripheral naïve B cell which might also affect their antigen presentation property. However, further warrant in this issue and other contributors were needed to understand the role of naïve B cell in human regulatory T cell differentiation.

Field of Study: Biomedical Sciences Student's Signature Koj Choheshai-u-saha

Academic Year: 2011 Advisor's Signature Kill Room

ACKNOWLEDGEMENTS

The current study was carried out at Division of Allergy and Clinical immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand and Inserm U928, TAGC, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France. The study was financially supported by Ph.D. student grant through Chulalongkorn University; the Thai Research Fund Senior Research Scholar (TRF) award; the Research-team Strengthening Grant, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) Thailand; The National Research University Project of CHE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (HR1161A); National Science and Technology Development Agency (NSTDA, BIOTEC Grant P-09-00324), the National Research university Project of CHE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (HR1164A) and the CU-Cluster-Emerging H-8-68-53.

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Prof. Kiat Ruxrungtham, for his support and giving me the opportunity to perform a study in basic immunology. This makes me realize the importance of basic immunology and how hard to acquire such knowledge. I'm really appreciated for his advocate during my PhD study including teaching me to become a good researcher. I would like to deeply thank my main co-advisor, Dr. Catherine Nguyen, for her accompany on my work, for giving me the great opportunity to learn advance technologies in bioinformatic analysis and always taking care of me during practicing in France. I'm really grateful for Dr. Supranee Buranapraditkun for teaching and helping me setting up the immunology laboratory, including her encouragement. Many thanks to Assoc. Prof. Alain Jacquet, Cyrille Lepoivre, Luca Grieco and other staff from TAGC, INSERM, Marseille for their great supports and kindness. I also wish to express my appreciation for all the members of committee for valuable comments and advices.

Finally, I would like to thank my family for their support and love. They are the most important part of my life and my accomplishment. Without their encouragement and support, this achievement would have not been happened.

CONTENTS

ABSTRACT IN THAI
ABSTRACT IN ENGLISH
ACKNOWLEDGEMENTS
CONTENTS
LIST OF TABLES
LIST OF FIGURES
LIST OF ABBREVATIONS
CHAPTER I INTRODUCTION AND LITERATURE REVIEW
1.1 INTRODUCTION
1.2 LITERATURE REVIEW
1.2.1 ROLE OF B CELL IN CONTROLLING T CELL MEDIATED IMMUNE
RESPONSE
1.2.2 ANTIGEN PRESENTATION BY DENDRITIC CELLS AND B CELLS
1.2.3 ROLE OF NAÏVE B CELLS IN T-CELL TOLERANCE INDUCTION
1.2.4 NAÏVE B CELL ISOLATION METHODS
1.2.5 THE REPRESENTATION OF IGD CD27 B CELL AS HUMAN NAÏVE E
CELL POPULATION
1.2.6 HUMAN NAÏVE B CELL SUBSETS AND THEIR POSSIBLE
DIFFERENCES IN PHENOTYPES AND IMMUNOPROPERTIES
1.2.7 LIMITATION OF HUMAN NAÏVE B CELLS' ANTIGEN
PRESENTATION STUDIES

	Page
1.2.8 SUPERANTIGEN TOLERANCE INDUCTION AND ROLE OF NAÏVE B	
CELL	24
1.3 QUESTIONS	30
1.4 HYPOTHESES	30
1.5 OBJECTIVES	30
1.6 CONCEPTUAL FRAMEWORK	31
1.7 METHODOLOGY	31
CHAPTER II DETERMINATION TWO-STEP NAÏVE B CELL ISOLATION METHOD	
AND SEB PULSATION SYSTEM	33
2.1 QUESTION	33
2.2 HYPOTHESIS	33
2.3 OBJECTIVES	33
2.4 MATERIAL AND METHODS	33
2.4.1 ANTIBODIES AND REAGENTS	33
2.4.2 HUMAN BLOOD SAMPLE	34
2.4.3 ISOLATION AND CULTURE OF PERIPHERAL NAÏVE B CELLS	34
2.4.3.1 ONE-STEP METHOD	34
2.4.3.2 TWO-STEP METHOD	35
2.4.4 PREPARATION OF MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS	36
2.4.5 ISOLATION AND CULTURE OF PERIPHERAL NAÏVE CD4 T CELLS	36
2.4.6 STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B (SEB) PULSATION AND	
ACTIVATION OF NAÏVE CD4 T CELL	36
2.4.7 TROGOCYTOSIS ASSAY	37
2.4.8 FLOW CYTOMETRY	38
2.4.9 STATISTICAL ANALYSIS	38

2.5 RESULTS	
2.5.1 THE PURITY OF NAÏVE B CELLS IS IMPROVED BY A TWO-ST	ΈP
ISOLATION METHOD REPRODUCIBLY	
2.5.2 NAÏVE B CELLS AND MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CEL	.LS
(MODCS) DIFFERENTIALLY EXPRESS CO-STIMULATORY	
MOLECULES	
2.5.3 SEB PULSATION ENHANCED NAÏVE CD4 T CELL'S INTERAC	CTION
WITH NAÏVE B CELLS, AND INCREASED CONSEQUENT	
ACTIVATION-INDUCED T- CELL PROLIFERATION	
2.5.4 NAÏVE B CELLS UPREGULATED CD25 EXPRESSION ON CD4	4 [⁺] T
CELLS DURING STAPHYLOCCOCUS ENTEROTOXIN B (SEB))
PRESENTATION	
2.6 DISCUSSION	
2.7 SUPPLEMENTARY FIGURES	
2.8 SUPPLEMENTARY TABLES	
CHAPTER III CHARACTERIZATION OF ACTIVATED CD4 T CELLS PRIME	D BY
SEB PULSED NAÏVE B CELLS IN COMPARISON OF OTHER APC CONTR	OL,
3.1 QUESTION	
3.2 HYPOTHESIS	
3.3 OBJECTIVES	
3.4 MATERIAL AND METHODS	
3.4.1 ANTIBODIES AND REAGENTS	
3.4.2 HUMAN BLOOD SAMPLE	
3.4.3 ISOLATION OF PERIPHERAL NAÏVE B CELLS	
3.4.4 PREPARATION OF MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS	,
(MODCS)	

	Page
3.4.5 PREPARATION OF CPG OLIGODEOXYNUCLEOTIDE ACTIVATED B	
CELLS AND POLYINOSINE-POLYCYTIDYLIC ACID (POLY I:C)	
STIMULATED MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS (MODCS)	57
3.4.6 ISOLATION AND CULTURE OF PERIPHERAL NAÏVE CD4 T CELLS	58
3.4.7 STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B (SEB) PULSATION AND	
ACTIVATION OF NAÏVE CD4 T CELL	58
3.4.8 ISOLATION AND STIMULATION OF NATURAL REGULATORY T	
CELL	58
3.4.9 SUPPRESSIVE FUNCTION TEST ON ALLO CD4 ⁺ T CELL'S	
PROLIFERATION	59
3.4.10 FLOW CYTOMETRY	60
3.4.11 STATISTICAL ANALYSIS	60
3.5 RESULTS	60
3.5.1 NAÏVE B CELLS EXPRESSED LOWEST CD80 AND CD86 WHEN	
COMPARED WITH OTHER ANTIGEN PRESENTING CELL	
CONTROLS	60
3.5.2 NAÏVE AND CPG ACTIVATED B CELLS PRIMED CD4 T CELL	
ACTIVATION TO ACQUIRE CD25(+)CD62L(hi)CD95(lo)	
PHENOTYPES DURING STAPHYLOCCOCUS ENTEROTOXIN B	
(SEB) PRESENTATION	62
3.5.3 NAÏVE B CELLS POORLY PRIMED NAÏVE CD4 T CELL ACTIVATION	
TO PRODUCE TH1 AND TH2 ASSOCIATED CYTOKINES WHEN	
COMPARED WITH THOSE OF OTHER ANTIGEN PRESENTING	
CELLS	64
3.5.4 ACTIVATED CD4 T CELLS PRIMED BY BOTH SEB-PRESENTED	
NAÏVE B CELLS AND CpG ACTIVATED B CELLS ILLUSTRATED NO	
SIGNIFICANT SUPPRESSIVE FUNCTION ON ALLO-CD4 T CELL	
PROLIFERATION	67

3.6 DISCUSSION
CHAPTER IV DETERMINATION OF IMMUNOLOGICAL PROPERTIES AMONG
HUMAN NAÏVE B CELL SUBSETS
4.1 QUESTION
4.2 HYPOTHESIS
4.3 OBJECTIVES
4.4 MATERIAL AND METHODS
4.4.1 B CELL EXPRESSION DATA
4.4.2 AFFYMETRIX GENE CHIP COMPARISON
4.4.3 GENE CATEGORIZATION AND GENE-ANNOTATION ENRICHME
ANALYSIS
4.5 EXPERIMENTAL DESIGNS
4.5.1 EXPERIMENT 1 EXPRESSION COMPARISON AMONG HUMAN
NAÏVE B CELL SUBSETS
4.5.2 EXPERIMENT 2 EXPRESSION COMPARISON BETWEEN HUMAN
NAÏVE AND MEMORY B CELLS
4.6 RESULTS
4.6.1 PERIPHERAL NAÏVE B CELLS WERE CLUSTERED SEPARATELY
FROM OTHER NAÏVE B CELL SUBSETS BASED ON OVERALL
DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES
4.6.2 EXPRESSION PROFILE OF PERIPHERAL NAÏVE B CELL SUBSET
WAS DIFFERENT FROM THOSE OF LYMPHOID NAÏVE B CELL
SUBSETS
4.6.3 THE ANALYSIS VALIDATION WAS CONFIRMED BY DIFFERENTIA
GENE EXPRESSION BETWEEN NAÏVE AND MEMORY B CELLS
WITH THEIR WELL-ESTABLISHED PHENOTYPES AND
IMMUNOPROPERTIES

4.7 DISUCSSION
4.7.1 DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION AMONG NAIVE B CELL
SUBSETS
4.7.2 DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION BETWEEN NAÏVE AND
MEMORY B CELLS
4.8 SUPPLEMENTARY FIGURES
4.9 SUPPLEMENTARY TABLES
CHAPTER V OVERALL DISCUSSION AND CONCLUSION
CHARTED VILDECOMMENDATIONS AND FURTHER INVESTIGATION
CHAPTER VI RECOMMENDATIONS AND FURTHER INVESTIGATION
REFERENCES
APPENDICES
APPENDIX A: REAGENTS, ANTIBODIES, MATERIALS AND
INSTRUMENTS
APPENDIX B: ENGINES AND R-PACKAGE
VITAE

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Comparisons among naïve B cell purification method	50
2	Naïve B cell's yield of the two-step isolation method	54
3	B cell purity acquired among studies applying Naïve B cell Isolation Kit II (Miltenyi)	54
4	Categorization of differential gene expression among naïve B cell subsets	80
5	Categories of differential gene expression between naïve and memory B cells	81
6	GO terms associated with differences in gene expressions between naïve and memory B cells	82
7	Changes in gene expressions which indicated higher stimulating state of Lymphoid than Peripheral naïve B cells	84
8	Differentially expressed probes/genes between peripheral and splenic naive B cells	89
9	Differentially expressed probes/genes between peripheral and tonsilar naive B cells	90
10	Differentially expressed probes/genes between splenic and tonsilar naive B cells	100
11	Differentially expressed probes/genes between naïve and memory B cells	101

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Effector and regulatory B cell's mode of actions	2
2	Differences in immunological synapse (IS) formed by mature dendritic	
	cells (DCs) and naïve B cells	3
3	Schematic figure representing the control of adaptive immune	
	response by DC and B cell	14
4	Review of tolerance induction mechanisms	27
5	Purities of total B cells and naïve B cells acquired from one-step Naïve	
	B cell Isolation kit II (Miltenyi) and Two-step isolation method	39
6	B7 co-stimulatory molecule and HLA class II expressions on naïve B	
	cell and monocyte derived dendritic cells (MoDCs)	41
7	Trogocytosis-based assay of SEB presentation by naïve B cell	44
8	Determination of T cell activation after 68 hours of culture	45
9	A representative co-culture of SEB pulsed naïve B cells and	
	autologous naïve CD4 T cells at ½ and 68 hours with determination of	
	complexes between B and T cells	53
10	A representative sample of total B cell purity acquired after rosetting	
	enrichment step	53
11	B7 co-stimulatory molecule and HLA class II expressions on naïve B	
	cells, CpG activated B cells, MoDCs and Poly I:C stimulated MoDCs	61
12	Determination of T cell activation and phenotypes after 68 hours of	
	culture	63
13	Cytokine production profile and Foxp3 expression of activated T cells	
	primed by various SEB pulsed APCs	66

Figure		Page
14	Allo-CD4 ⁺ T cell proliferation suppression's determination of total	
	CD4 ⁺ T cells primed by SEB presented B cells	68
15	Hierarchical clustering (HCL) of B cell samples	78
16	Differential gene expressions among naïve B cell subsets	79
17	Differential gene expression between naïve and memory B cells	81
18	Hierarchical clustering of B cell samples based on overall platform	
	probes/genes	88

LIST OF ABBREVATIONS

Ag Antigen

APCs Antigen presenting cells

CD62L CD62 ligand

CpG CpG oligodeoxynucleotides

DCs Dendritic cells

Fas FAS receptor

FasL FAS ligand

FBS Fetal bovine serum

MoDCs Monocyte-derived dendritic cells

Poly I:C Polyinosinic:polycytidylic acid

SAg Superantigen

SEB Staphylococcal enterotoxin B