การศึกษาในเชิงลึกถึงกลไกของสารตุ้นหลั่งที่นำไปสู่การเสื่อมของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์

นางสาวนุชนาถ ไหมหร็อ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงถึงกลไกของธาตุเหล็กที่นำไปสู่การเสื่อมของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์

นางสาว นุชนาถ ไหมหรือ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

Thesis Title	MECHANISMS OF IRON INDUCE NEURODEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE : AN IN VITRO STUDY
By	Miss Nootchanat Mairuae
Field of Study	Biomedical Sciences
Thesis Advisor	Associate Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.

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

..... Chairman
(Professor Apiwat Mutirangura, MD., Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)

..... Examiner
(Associate Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.)

..... Examiner
(Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D.)

..... External Examiner
(Assistant Professor Pathama Leevanich, Ph.D.)

นุชนาถ ไหมหรือ : การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงถึงกลไกของธาตุเหล็กที่นำไปสู่การเสื่อมของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์ (MECHANISMS OF IRON INDUCE NEURO-DEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE : AN IN VITRO STUDY) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร, 128 หน้า.

ในสมองส่วนที่มีการตายของเซลล์ประสาทในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ พบว่ามีปริมาณการสะสมของธาตุเหล็กที่สูงผิดปกติ โดยในระดับเซลล์พบว่ามีการสะสมของธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ไมโครเกลียแต่นัยสำคัญนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด ถึงแม้ว่าปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าการสะสมของธาตุเหล็กในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะเป็นสาเหตุเริ่มแรกที่นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทหรืออาจเป็นผลที่ตามมาเกิดจากการดำเนินไปของโรค อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการกลายพันธุ์ของยีน HFE ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบการนำเข้าของธาตุเหล็กภายในเซลล์ นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กในสมองและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ จากรายงานนี้ได้มีการตั้งสมมติฐานว่า การสะสมของธาตุเหล็กในสมองอาจเป็นปัจจัยในระยะเริ่มแรกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ช่วยส่งเสริมการตายของเซลล์ประสาท ที่อาจนำไปสู่การเกิดโรคอัลไซเมอร์ การศึกษาในครั้งนี้ได้มีการเลียนแบบเหตุการณ์ที่พบในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งก็คือการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ไมโครเกลีย เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ของธาตุเหล็กต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ไมโครเกลีย โดยเฉพาะต่อการเปลี่ยนแปลง activity ของ glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการอักเสบ ผลจากการศึกษาพบว่าการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ไมโครเกลียขณะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพิ่ม activity ของ GSK-3β การเข้าสู่นิวเคลียสของ NF-κB การแสดงออกของยีนและโปรตีน MMP-9 ในเซลล์ไมโครเกลีย และยังเพิ่ม cytotoxic effect ของเซลล์ไมโครเกลียที่มีต่อเซลล์ประสาทเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่เซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นโดยไม่มีธาตุเหล็ก การยับยั้ง activity ของ GSK-3β ขณะที่เซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้นและมีธาตุเหล็กลด cytotoxic effect ของเซลล์ไมโครเกลียที่มีต่อเซลล์ประสาทซึ่งตรงกับการลด activity ของ GSK-3β การเข้าสู่นิวเคลียสของ NF-κB และการแสดงออกของยีนและโปรตีน MMP-9, IL-1β, TNF-α และ NO นอกจากนี้การใส่ยีนที่มีการกลายพันธุ์ของ H63D HFE เข้าไปในเซลล์ประสาท neuroblastoma cells line นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ การลดลงของ mitochondrial membrane potential และ cytochrome c oxidase activity ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ภาวะการทำหน้าที่ของไมโตคอนเดรีย นอกจากนี้ยังเพิ่ม activity ของ GSK-3β การเพิ่มขึ้นของโปรตีน Aβ ในไมโตคอนเดรีย และยังเพิ่มการตายแบบ apoptosis การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าธาตุเหล็กอาจเกี่ยวข้องกับ microglial activation ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ประสาท neur otoxicity โดยน่าจะเป็นผลจากการที่ธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง activity ของ GSK -3β ในเซลล์ไมโครเกลีย นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กในเซลล์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน HFE อาจเป็นปัจจัยที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทโดยการที่ธาตุเหล็กไปเพิ่มภาวะ oxidative stress เพิ่ม activity ของ GSK-3β ลดภาวะการทำหน้าที่ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งอาจนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทแบบ apoptosis

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

4789720720 : MAJOR BIOMEDICAL SCIENCES

KEYWORDS : ALZHEIMER'S DISEASE/APOPTOSIS/GLYCOGEN SYNTASE KINASE 3 BETA/IRON /MICROGLIAL TOXICITY/OXIDATIVE STRESS

NOOTCHANAT MAIRUAE : MECHANISMS OF IRON INDUCE NEURO-DEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE : AN IN VITRO STUDY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. POONLARP CHEEPSUNTHORN, Ph.D., 128 pp.

In degenerated brain regions of Alzheimer's disease (AD), abnormally high levels of iron have been reported. At cellular levels, progressive iron accumulation by activated microglia has also been observed, but its significance remains elusive. Although it has not yet known that iron accumulation in AD brain is an initial event that causes neurodegeneration or a consequence of the disease process, recent evidences have been reported that mutation in the gene involved in iron absorption, HFE, increased brain iron accumulation and also associated with AD. These reports have opened the possibility that increased brain iron accumulation may be an initial event that contributes to neurodegeneration in AD. However, the mechanisms have not yet known. In this study, iron supplemented and lipopolysaccharide (LPS)-activated cultures of BV2 microglia was developed to mimic progressive iron accumulation by activated microglia and used to address the functional relationship between iron and microglial activation, which demonstrated to be partially mediated by glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β). The results were shown that the presence of iron during microglial activation enhanced GSK-3β activity, the nuclear levels of NF-κB and subsequently increased the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). The presence of iron during microglial activation also significantly enhanced the cytotoxic effects of microglial culture medium to neuroblastoma (NA) cells, when compared to that of microglia activated by LPS alone. The inhibiting of GSK-3β during the activation of microglia even in the presence of iron protected NA cells from the cytotoxic effects of these cell culture media. These results were consistent with decreased GSK-3β activity and nuclear levels of NF-κB, MMP-9, IL-1β, TNF-α and NO in these cultures. Furthermore, increased cellular iron levels in neuroblastoma cells transfected with H63D HFE variant also increased reactive oxygen species, decreased mitochondrial membrane potential and cytochrome c oxidase activity, markers of mitochondrial damage, increased GSK-3β activity, mitochondrial Aβ and neuronal apoptosis. The results in these studies suggest that the presence of iron appears to modify microglial activation and its associated neurotoxicity, which were partly due to the regulatory role of iron on GSK-3β activity. Moreover, increased cellular iron levels in HFE mutation might be a one factor that triggers the onset of neurodegeneration at least in part by increasing oxidative stress, GSK-3β activity, mitochondrial damage and neuronal apoptosis.

Field of Study : Biomedical Sciences

Academic Year : 2009

Student's Signature Nootchanat Mairuae

Advisor's Signature Poonlarp Cheepsunthorn

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deep appreciation for my thesis advisor Associate Professor Dr. Poonlarp Cheepsunthorn for his invaluable suggestions, guidance, patience and strong encouragements throughout the study. I have learned so much from him. What I have learned will be benefit my future careers. My gratitude is also extended to Professor Dr. Apiwat Mutirangura, Associate Professor Dr. Wilai Anomasiri, Assistant Professor Dr. Wacharee Limpanasithikul and Assistant Professor Pathama Leevanich for serving as thesis committee.

I give special thanks to Professor Dr. James R Connor, for giving me the chance to work in his lab, Department of Neurosurgery, Hershey Medical Center. It had been an excellent opportunity and experience. I would also thank to his wife, Judy Connor, his son and his daughter who took care of me when I was there. Many thanks to all the members of his lab for making such a nice experience during the year I spent working there. Special thanks to Dr. Padmavathi Ponnuru, Ms. Xiaoli Liu, Ms. Wint Nandar. I would like to thank to a very good friends I have in Alzheimer's Research Lab and in Biomedical Science Program, special thanks to Ms. Voravasa Chaiworakul and Mr. Sivapong Sungpradit.

I wish to acknowledge The Thai Commission of Higher Education Fund, the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund, the Thai Government research budget and the budget from Alzheimer's research Laboratory in Department of Neurosurgery, Hershey Medical Center, Pennsylvania State University for sponsoring my dissertation and to Chulalongkorn Medical Research Center for supporting my research. I would like to express my deepest gratitude to all my teachers at all levels, my success would not be possible without them.

Finally, and most importantly, I would like to dedicate all the best of my thesis to my beloved, mother, father, elder brother and elder sister for their love, understanding and supporting throughout my life.

CONTENTS

CHAPTER

Page

CHAPTER **Page**

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

Page

LIST OF ABBREVIATIONS

AC	adenylyl cyclase
AD	alzheimer's dissease
AICD	APP intracellular domain
ANOVA	analysis of variance
APC	adenomatous polyposis coli
APPs	amyloid precursor proteins
APs	amyloid plaques
AP-1	activator protein-1
APAF-1	apoptotic protease activating factor-1
Aβ	amyloid beta
BBB	blood-brain barrier
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
°C	degree celsius
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cm	centimeter
CNS	central nervous system
COX	cytochrome c oxidase subunit
CREB	cyclic AMP response element binding protein
CSF	cerebrospinal fluid
CTF	C-terminal fragment
DAB	3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, anhydrous
DAG	diacylglycerol
DcytB	duodenal cytochrome B
dH_2O	distilled water

DOPA	dihydroxyphenylalanine
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMT1	divalent metal transporter 1
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
dvl	disheveled
ECE	endothelin-converting enzyme
eIF2B	eukaryotic initiation factor 2B
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAC	ferric ammonium citrate
FBS	fetal bovine serum
g	gram
GAPDH	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase
GPCRs	G-protein-coupled receptors
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GSK	glycogen synthase kinase
HH	hemochromatosis
hr	hour
HRP	horseradish peroxidase
IDE	insulin-degrading enzyme
IF	interstitial fluid
IL-1β	interlukin 1 beta
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP3	inositol trisphosphate
IRE	iron responsive element
IRPs	iron responsive element binding proteins
IRS	insulin receptor substrate
LDL	low-density lipoprotein

LiCl	lihium chloride
LIP	labile iron pool
LPS	lipopolysacharide
MAO	monoamine oxidase
MCI	mild cognitive impairment
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
MMPs	matrix metalloproteinases
MS	multiple sclerosis
MT-MMPs	membrane type matrix metalloproteinases
NF-IL6	nuclear factor of interleukin 6
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NFTs	neurofibrillary tangles
ng	nanogram
nm	nanometer
NO	nitrix oxide
NTBI	non Tf bound iron
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD	Parkinson's disease
PDK1	phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	protein kinase A
PKB	protein kinase B

PKC	protein kinase C
PLCβ	phospholipase-C beta
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNase	ribonuclease
RT	reverse transcription
sAPP	soluble amyloid precursor protein
SD	standard deviation
SDR	stromal cell-derived receptor
SDS	sodium dodecyl sulphate
SEM	standard errors of mean
TBE	tris borate
TBST	tris-buffered saline with Tween-20
TCF	T-cell factor
Tf	transferrin
TfR	transferrin receptor
TIMPs	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	tumor necrotic factor
TOM	translocase of the outer membrane
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
UTR	untranslated regions
UV	ultraviolet
VDAC	voltage dependent anion channels
WT	wild type
μg	microgram
μl	microlitre