

การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงถึงกลไกของธาตุเหล็กที่นำไปสู่การเสื่อมของเซลล์ประสาท  
ในโรคอัลไซเมอร์



นางสาว นุชนาด ไหมหรือ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2552  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 7 8 9 7 2 0 7 2 0

MECHANISMS OF IRON INDUCE NEURODEGENERATION IN ALZHEIMER'S  
DISEASE : AN IN VITRO STUDY

Miss Nootchanat Mairuae

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522112



ขนาด ไหมหรือ : การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงถึงกลไกของธาตุเหล็กที่นำไปสู่การเสื่อม  
ของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์ (MECHANISMS OF IRON INDUCE NEURO-  
DEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE : AN IN VITRO STUDY) อ. ที่  
ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร, 128 หน้า.

ในสมองส่วนที่มีการตายของเซลล์ประสาทในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ พบว่ามีปริมาณการสะสมของธาตุ  
เหล็กที่สูงผิดปกติ โดยในระดับเซลล์พบว่าการสะสมของธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ไมโครเกลียแต่นัยสำคัญ  
นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด ถึงแม้ว่าปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าการสะสมของธาตุเหล็กในสมองของผู้ป่วยโรคอัล  
ไซเมอร์จะเป็นสาเหตุเริ่มแรกที่นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทหรืออาจเป็นผลที่ตามมาเกิดจากการดำเนินไป  
ของโรค อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า การกลายพันธุ์ของยีน HFE ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการนำเข้า  
ของธาตุเหล็กภายในเซลล์ นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กในสมองและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซ  
เมอร์ จากรายงานนี้ได้มีการตั้งสมมติฐานว่า การสะสมของธาตุเหล็กในสมองอาจเป็นปัจจัยในระยะเริ่มแรกที่มี  
ส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ช่วยส่งเสริมการตายของเซลล์ประสาท ที่อาจนำไปสู่การเกิดโรคอัลไซเมอร์  
การศึกษาในครั้งนี้ได้มีการเขียนแบบเหตุการณ์ที่พบในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งก็คือการสะสมของ  
ธาตุเหล็กในเซลล์ไมโครเกลีย เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ของธาตุเหล็กต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ไมโครเกลีย  
โดยเฉพาะต่อการเปลี่ยนแปลง activity ของ glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีรายงาน  
ว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการอักเสบ ผลจากการศึกษาพบว่า การสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ไมโครเกลีย  
ขณะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพิ่ม activity ของ GSK-3 $\beta$  การเข้าสู่นิวเคลียสของ NF- $\kappa$ B การแสดงออกของยีนและ  
โปรตีน MMP-9 ในเซลล์ไมโครเกลีย และยังเพิ่ม cytotoxic effect ของเซลล์ไมโครเกลียที่มีต่อเซลล์ประสาทเมื่อ  
เปรียบเทียบกับภาวะที่เซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นโดยไม่มีธาตุเหล็ก การยับยั้ง activity ของ GSK-3 $\beta$  ขณะที่  
เซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้นและมีธาตุเหล็กลด cytotoxic effect ของเซลล์ไมโครเกลียที่มีต่อเซลล์ประสาทซึ่งตรง  
กับการลด activity ของ GSK-3 $\beta$  การเข้าสู่นิวเคลียสของ NF- $\kappa$ B และการแสดงออกของยีนและโปรตีน MMP-9,  
IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  และ NO นอกจากนี้การใส่ยีนที่มีการกลายพันธุ์ของ H63D HFE เข้าไปในเซลล์ประสาท  
neuroblastoma cells line นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ การลดลงของ mitochondrial membrane  
potential และ cytochrome c oxidase activity ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ภาวะการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ยัง  
เพิ่ม activity ของ GSK-3 $\beta$  การเพิ่มขึ้นของโปรตีน A $\beta$  ในไมโทคอนเดรีย และยังเพิ่มการตายแบบ apoptosis  
การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าธาตุเหล็กอาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น microglial activation ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการตายของ  
เซลล์ประสาท neuro toxicity โดยน่าจะเป็นผลจากการที่ธาตุเหล็กไปเปลี่ยนแปลง activity ของ GSK-3 $\beta$  ใน  
เซลล์ไมโครเกลีย นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กในเซลล์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน HFE อาจเป็นปัจจัย  
ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทโดยการที่ธาตุเหล็กไปเพิ่มภาวะ oxidative stress เพิ่ม activity ของ  
GSK-3 $\beta$  ลดภาวะการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งอาจนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทแบบ apoptosis

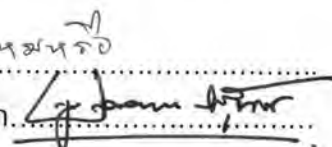
สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก

พ.ช.พ.ภ. ไหมหรือ



# # 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-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). The results were shown that the presence of iron during microglial activation enhanced GSK-3 $\beta$  activity, the nuclear levels of NF- $\kappa$ B 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-3 $\beta$  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-3 $\beta$  activity and nuclear levels of NF- $\kappa$ B, MMP-9, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  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-3 $\beta$  activity, mitochondrial A $\beta$  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-3 $\beta$  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-3 $\beta$  activity, mitochondrial damage and neuronal apoptosis.

Field of Study : Biomedical Sciences  
Academic Year : 2009

Student's Signature..

Advisor's Signature..

*Nootchanat Mairuae*  
*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 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 90<sup>th</sup> 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

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
1.1 Background and Rationale.....	1
1.2 Objectives.....	4
1.3 Hypotheses.....	4
1.4 Keywords.....	5
1.5 Expected Benefits and Applications.....	5
II LITERATURE REVIEW	
2.1 Iron.....	6
2.2 Alzheimer's disease.....	18
2.3 Microglia.....	24
2.4 Glycogen synthase kinase 3.....	30
III MATERIALS AND METHODS	
3.1 The functional relationship between iron, glycogen synthase kinase-3 $\beta$ and microglial activation.....	41
3.1.1 Reagents.....	41
3.1.2 Cell culture.....	41
3.1.3 Western blotting analysis.....	41

CHAPTER	Page
3.1.4 Measurement of NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation.....	42
3.1.5 Measurement of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NO and MMP-9 levels in culture supernatants.....	43
3.1.6 RNA Isolation.....	45
3.1.7 Reverse transcription.....	46
3.1.8 Polymerase Chain Reaction.....	46
3.1.9 Neurotoxicity assay.....	48
3.2 The effect of H63D mutation no oxidative stress, mitochondrial function, glycogen synthase kinase-3 $\beta$ activity, apoptosis and A $\beta$ production.....	49
3.2.1 Chemicals and antibodies.....	49
3.2.2 Cell transfection and cell culture model.....	50
3.2.3 Measurement of ROS Generation.....	50
3.2.4 Measurement of Cytochrome c oxidase Activity.....	51
3.2.5 Determination of mitochondrial membrane potential.....	51
3.2.6 A $\beta$ <sub>1-42</sub> Measurements.....	51
3.2.7 Cell viability assay.....	52
3.2.8 Preparation of cell lysates.....	52
3.2.9 Western blot analysis.....	53
3.2.10 Cytofluorometric determination of apoptotic cells by Annexin V/PI Staining.....	53
3.2.11 Caspase-3 activity assay.....	54
3.2.12 Statistical analysis.....	54
 IV RESULTS	
4.1 The functional relationship between iron, glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , microglial activation and its neurotoxicity.....	55



CHAPTER	Page
4.1.1 Effects of iron and LiCl on the inhibitory phosphorylation of GSK-3 $\beta$ during microglial activation.....	55
4.1.2 Effects of iron and LiCl on NF- $\kappa$ B nuclear translocation..	56
4.1.3 Effects of iron and LiCl on the production of inflammatory mediators, markers of microglial activation.....	57
4.1.4 Effects of iron and LiCl on the transcription levels of inflammatory mediators, markers of microglial activation.....	57
4.1.5 Effects of iron and LiCl on LPS-induced microglial neurotoxicity.....	58
4.2 The effect of H63D mutation on oxidative stress, mitochondrial function, GSK-3 $\beta$ activity, A $\beta$ production and neuronal apoptosis.	59
4.2.1 Confirmation of cell transfection.....	60
4.2.2 Increased reactive oxygen species in H63D cells.....	61
4.2.3 Decreased the mitochondrial membrane potential in the H63D cells.....	61
4.2.4 Reduced cytochrome c oxidase activity in the H63D cells	61
4.2.5 The levels of GSK-3 $\beta$ activity in HFE expressing cells....	62
4.2.6 Effect of A $\beta$ <sub>25-35</sub> fragment on cells expressing H63D HFE compared to cells expressing WT HFE.....	63
4.2.7 Increased intrinsic apoptotic pathway in H63D cells compared to WT cells.....	64
4.2.8 Increased mitochondrial A $\beta$ <sub>1-42</sub> in cells expressing H63D..	66
V CONCLUSION AND DISCUSSION.....	81
REFERENCES.....	89
APPENDIX.....	108
BIOGRAPHY.....	128

## LIST OF TABLES

Tables	Page
1	Iron levels in patients with Alzheimer's disease compared with healthy individuals..... 14
2	Pro-inflammatory cytokines, chemokines and neurotrophic factors with microglial synthesis..... 27
3	Specific primer for iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-9, and GAPDH..... 47
4	Make culture media for BV2 cell lines..... 112
5	Make culture media for BV2 cell lines (powder media, pH 7.2)..... 112
6	Make culture media for HFE-transfected SH-SY5Y cell lines..... 113
7	Preparation of the reaction mix for cDNA synthesis..... 115
8	Preparation of the reaction mix for PCR..... 116
9	Preparation of the solutions for Tris/Glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for western blot..... 121
10	Preparing the solutions for Tris/Glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for zymogram..... 128

## LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	A hypothetical scheme for the possible mechanism by which iron transport across BBB.....	8
2.2	IRE-IRP regulations of iron concentrations .....	10
2.3	A hypothetical scheme for the possible mechanism by which iron uptake by the brain cells. ....	12
2.4	Structure of HFE, the candidate protein for HH .....	16
2.5	Neurofibrillary tangles .....	20
2.6	Proteolytic processing of APP by $\alpha$ -, $\beta$ -, and $\gamma$ -secretase .....	23
2.7	Morphology of microglial cells.....	26
2.8	Activated microglia and activated astrocytes accumulate A $\beta$ 42-positive material .....	28
2.9	Regulation of GSK-3 activity by phosphorylation .....	33
2.10	The mechanism by which Wnt prevent the GSK-3-catalysed phosphorylation of axin, APC and $\beta$ -catenin.....	34
2.11	The molecular mechanism by which phosphorylation inhibits GSK-3 .....	35
4.1	Effects of iron on inhibitory phosphorylation of GSK-3 $\beta$ (Ser9) in LPS-treated cultures of BV2 microglia.....	68
4.2	Effects of iron and LiCl on NF- $\kappa$ B nuclear translocation in LPS-treated cultures of BV2 microglia.....	69
4.3	Effects of LiCl and iron on the levels of MMP-9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and NO in LPS-treated cultures of BV2 microglia.....	70
4.4	Effects of LiCl and iron on the mRNA expression of MMP-9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and NO in LPS-treated cultures of BV2 microglia.....	72
4.5	Effects of iron and LiCl on LPS-induced microglial neurotoxicity.....	74

	<b>Page</b>
4.6	Effect of HFE variants on the oxidative stress and mitochondrial function..... 75
4.7	The level of phospho-Ser9 of GSK-3 $\beta$ in HFE expressing cells..... 76
4.8	Effect of A $\beta$ fragment (A $\beta_{25-35}$ and A $\beta_{1-42}$ ) on the cells transfected with H63D allelic variants compared to the cells transfected with WT HFE..... 77
4.9	H63D cells influence basal and A $\beta_{25-35}$ induced apoptosis..... 78
4.10	Effect of A $\beta_{25-35}$ on caspases in H63D cells..... 79
4.11	Increased levels of mitochondrial A $\beta_{1-42}$ in the H63D cells compared to WT cells..... 80

**LIST OF ABBREVIATIONS**

AC	adenylyl cyclase
AD	alzheimer's disease
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
A $\beta$	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 <sub>2</sub> O	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-1 $\beta$	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	lithium chloride
LIP	labile iron pool
LPS	lipopolysaccharide
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- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NFTs	neurofibrillary tangles
ng	nanogram
nm	nanometer
NO	nitric 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
PLC $\beta$	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
$\mu$ g	microgram
$\mu$ l	microlitre