THE EFFECT OF IRON ON MATRIX METALLOPROTEINASE EXPRESSIONS IN CULTURED MICROGLIAL CELLS

Miss Nootchanat Mairuae

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-4583-4

Thesis Title	The effect of iron on matrix metalloproteinase expressions in cultured microglial cells
By	Miss Nootchanat Mairuae
Field of study	Medical Science
Thesis Advisor	Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D
Thesis Co-advisor	Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D.
	Associate Professor Prasit Pavasant, DDS., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Assistant Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Prasit Pavasant, DDS., Ph.D.)

..... Member

(Supin Chompoopong, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นุชนาถ ไหมหรือ : ผลของธาตุเหล็กต่อการแสดงออกของแมททริกซ์เมททอลโลโปรติเนสในเซลล์เพาะเลี้ยงไมโครเกลีย (THE EFFECT OF IRON ON MATRIX METALLOPROTEINASE EXPRESSIONS IN CULTURED MICROGLIAL CELLS) อ. ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร, อ. ที่ปรึกษา (ร่วม) : รศ.พญ.ดร. วิไล ชินธเนศ, รศ.ทพ.ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์, 80 หน้า. ISBN 974-17-4583-4.

อาการของโรค Alzheimer หรือโรคสมองเสื่อมที่พบในผู้สูงอายุเป็นผลมาจากการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับความจำและการเรียนรู้ ส่วนสาเหตุที่นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับการสะสมของ amyloid beta peptide หรือ Aβ ใน senile plaques ที่พบอยู่เป็นจำนวนมากในเนื้อสมองของคนที่เป็นโรค Alzheimer จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า Aβ สามารถกระตุ้นเซลล์ชนิดหนึ่งในระบบประสาทที่เรียกว่า microglia ให้ผลิตสารที่มีพิษต่อเซลล์ประสาท เนื่องจาก microglia เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ macrophages ของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น microglia น่าจะมีบทบาทในการลดปริมาณ Aβ ที่สะสมอยู่ในเนื้อสมองของผู้ป่วยที่เป็นโรค Alzheimer แต่ในความเป็นจริงพบว่าการสะสมของ Aβ จะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านไป และสอดคล้องกับอาการสมองเสื่อมที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาถึงปัจจัยที่อาจมีผลต่อการทำงานของ microglia ในการกำจัด Aβ ในสมองของผู้ป่วยโรค Alzheimer จึงมีความสำคัญต่อการชะลอหรือยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทในโรค Azheimer การดำเนินไปของโรค Alzheimer ซึ่งธาตุเหล็กที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ microglia ที่ล้อมรอบ Aβ plaques น่าจะเป็นปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งที่มีผลต่อการทำหน้าที่ของ microglia ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผลของธาตุเหล็กต่อการทำงานของ microglia เช่นการ phagocytosis และความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ matrix metalloproteinases หรือ MMPs ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของ Aβ และ maturation ของ cytokines ในระบบประสาทได้ถูกตรวจสอบโดยใช้ HAPI cells ซึ่งเป็น model ที่ใช้ในการศึกษา microglia ผลจากการศึกษาพบว่าธาตุเหล็กมีผลเพิ่มการหลั่งของ MMP-9 และ MMP-1 แต่ลด mRNA ของ MMP-10 และขบวนการ phagocytosis ใน microglia นอกจากนี้ธาตุเหล็กยังมีผลลดการหลั่งของ MMP-2 ซึ่งสามารถสร้างและหลั่งได้โดยเซลล์ในระบบประสาท ดังนั้นการเสียสมดุลของธาตุเหล็กในสมองร่วมไปกับผลของธาตุต่อการทำงานของ microglia น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการสะสมของ Aβ และขบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในสมองของผู้ป่วยที่เป็นโรค Alzheimer

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

447 52293 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS : ALZHEIMER'S DISEASE / IRON / MICROGLIA / MATRIX METALLOPROTEINASE / PHAGOCYTOSIS

NOOTCHANAT MAIRUAE : THE EFFECT OF IRON ON MATRIX METALLOPROTEINASE EXPRESSIONS IN CULTUED MICROGLIAL CELLS. THESIS ADVISOR : POONLARP CHEEPSUNTORN, PH.D. THESI COADVISOR : ASSOC. PROF. VILAI CHENTANEZ, M.D., PH.D., ASSOC. PROF. PRASIT PAVASANT, DDS., PH.D., 80 pp. ISBN 974-17-4583-4.

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly characterized by progressive loss of nerve cells in the brain areas associated with learning and memory. A key feature of this disease is the presence of numerous senile plaques composed mainly of an insoluble Aβ core surrounded by iron-rich activated microglia. It is believed that progressive cerebral accumulation of Aβ is an early and perhaps necessary feature of the disease. These complex processes are thought to mediate by microglia which function as the converter of diffuse plaques to dense core plaques in addition to a key inflammatory mediator in the CNS. Moreover, Aβ-induced neurotoxicity may also occur through these activated glia. In AD brains, activated microglia viewed histologically as plaque-attacking scavengers would not appear to remove deposited Aβ as they did *in vitro*. Therefore, understanding why microglia ineffectively remove plaques in AD brains is crucial for molecular targeting of this disease. Recently, cellular iron status has been shown to modulate microglial inflammatory responses as well as a set of functional genes identified by microarray analysis (Cheepsunthorn *et al*., 2001a, b). In this thesis works, the effect of iron on microglial functions as brain phagocytes was investigated using an *in vitro* model of iron loading in a rat microglial cell line HAPI. The results are shown for the first time that iron loading in activated microglia increases the the secretion of MMP-9 and MMP-1, but decreases mRNA expression of MMP-10 and the secretion of MMP-2. Interestingly, it is found that condition of an intracellular iron loading impairs phagocytic activity of activated microglia. These findings indicate that elevated levels of MMP-9, MMP-1, Aβ deposition, and other pathological features in the brains of patients with Alzheimer's disease may be a consequence of the disruption of brain iron metabolism and the activation of microglia.

Field of study Medical Science

Academic year 2001

Student's signature Nootchanat Mairuae

Advisor's signature Poonlarp Cheepsuntorn

Co-advisor's signature Vilai Chentanez

Co-advisor's signature Prasit Pavasant

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and profound appreciation to Dr. Poonlarp Cheepsuntorn my advisor for his valuable advice, guidance, helpfulness, understanding and intelligential motivation throughout my study and during the preparation of this study. I also would like to express my gratefulness to my co-advisors, Associate Professor Dr. Vilai Chentanez and Associate Professor Dr. Prasit Pavasant for their valuable suggestions and encouragement. My grateful appreciation is extended to Assistant Professor Dr. Wilai Anomasiri and Dr. Supin Chompoopong, my thesis committees, for their valuable discussion and suggestions.

I feel profoundly indebted to Associate Professor Tada Sueblinvong at the Department of Biochemistry, Faculty of medicine, Chulalongkorn University for allowing me to use her laboratory equipments includings tissue culture facilities during the time I did my thesis. I am really thankful to Miss. Siriluck Tiranathanagulul at the Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for showing me how to do zymogram assay, to Miss Chompoonuch Bunarkart at the Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacology, Chulalongkorn University for her technical assistance during my phagocytosis experiments, and to the Department of Radiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Specials thanks to Jim, Noi, Mix, Aom, Oil, Kratare and my freinds who work on the the 10th floor of Chula MRC for their help, sincerity and friendship.

Finally, I will not forget to give special thanks to my parents and every members in my family for support during my graduate study and their kindness, understanding all the time; thank you very much.

This work was supported by Ratchadapiseksompoch, Faculty of Chulalongkorn University and by Government research budget to Dr. Poonlarp Cheepsuntorn.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

TABLE OF CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I INTRODUCTION

- Background and Rationale.....1
- Research Questions.....3
- Objectives of the Study.....3
- Hypothesis.....3
- Key Words.....4
- Expected Benefits and Applications.....4

II REVIEW LITERATURE.....5

III MATERIALS AND METHODS

- Cultures and treatment of microglial cells.....23
- RNA Isolation.....23
- Revers transcription.....24
- Polymerase Chain Reaction.....25

TABLE OF CONTENTS (continued)

Page

- Western blot....26
- Zymogram....28
- Phagocytosis....28

IV RESULTS

- Cellular activation of microglia....30
- Cellular iron-loading in microglia....30
- Iron enhances MMP-9 secretion from activated microglia....31
- Iron has differential effects on the expression of MMP-10 and MMP-1 in activated microglia....32
- Iron enhances the secretion of MMP-1 in activated microglia....33
- Intracellular iron loading impairs phagocytic activity of activated microglia....33

V DISCUSSION AND CONCLUSION....41

REFERENCES....47

APPENDICES....62

BIOGRAPHY....80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Nomenclature, chromosomal location, and substrate specificity of individual MMPs....14
2. Properties of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)....17
3. Potential consequences of matrix metalloproteinase (MMP) expression in the mature nervous system....21
4. Specific primer for iNOS, TNF-α, IL-1β, MMP-1 MMP-10 and GAPDH....25
5. Preparation of the reaction mix for cDNA synthesis....62
6. Preparation of the reaction mix for PCR....63
7. Preparation of the solutions for Tris/Glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for western blot....68
9. Preparing the solutions for Tris/Glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for zymogram....74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Neurofibrillary tangles.....6
2. The detail of the peptide shows the sites of α-, β-, and γ-secretase cleavages.....8
3. In the normal brain, microglia constitue approximately 20% of all glial cells.....9
4. Modular domain structures of the matrix metalloproteinase (MMPs).....13
5. Cascade of matrix metalloproteinase (MMP) activation at the cell surface.....16
6. LPS induces the gene expression of iNOS, IL-1β and TNF-α in rat microglia cells.....35
7. Exposure of microglia to iron increases the expression of intracellulariron storage protein ferritin.....36
8. Treatment with iron increase gelatinase activity of MMP-9 in activated microglia, whereas it decrease gelatinase activity of MMP-2 in fibroblasts.....37
9. Iron loading in activated microglia decreased mRNA expression of MMP-10, whereas it did not change the expression of MMP-1 mRNA..... 8
10. Iron loading in activated microglia enhances MMP-1 expression The secretion of MMP-1 into the medium.....39
11. Intracellular iron loading decreases phagocytic activity of activated microglia.....40

LIST OF ABBREVIATIONS

AD	Alzheimer's dissease
ANOVA	analysis of variance
APPs	amyloid precursor proteins
APs	amyloid plaques
Aβ	amyloid beta peptides
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
^{o}C	degree celsius
cm	centimeter
CNS	central nervous system
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DAB	3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, anhydrous
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dH_2O	distilled water
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
EAE	encephalomyelitis
ECM	extracellular matrix
FAC	ferric ammonium citrate
FBS	fetal bovine serum
g	gram
h	hour
HRP	horseradish peroxidase
IL-1β	interlukin 1 beta
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LPS	lipopolysacharide

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
MMPs	matrix metalloproteinases
MS	multiple sclerosis
MT-MMPs	membrane type matrix metalloproteinases
NFTs	neurofibrillary tangles
ng	nanogram
nm	nanometer
NO	nitrix oxide
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNase	ribonuclease
RT	reverse transcription
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulphate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard errors of mean
TBE	tris borate
TIMPs	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	tumor necrotic factor
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
UV	ultraviolet
µg	microgram
µl	microlitre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย