THREE-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION OF AMYLOID DEPOSITS FROM SERIAL ELECTRON MICROSCOPIC SECTIONS

PAWORN NUNTAGIJ

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(NEUROSCIENCES)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

THREE-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION OF AMYLOID DEPOSITS FROM SERIAL ELECTRON MICROSCOPIC SECTIONS

PAWORN NUNTAGIJ 4637306 STNS/D

Ph.D. (NEUROSCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: NAIPHINICH KOTCHABHAKDI, Ph.D., OLE PETTER OTTERSEN, M.D., Ph.D., REIDUN TORP, Ph.D., PIYARAT GOVITRAPONG, Ph.D., WIPAWAN THANGNIPON, Ph.D.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurodegenerative disease that affects more than 25 million people worldwide. It is characterized by two pathologic hallmarks: extracellular senile plaques and intracellular neurofibrillary tangles. Senile plaques are now known to be an aggregation of β-amyloid (Aβ), a cleavage product of amyloid precursor protein (APP). Amyloid plaques are thought to interfere with normal brain function and contribute to the impairment of learning and memory that is typical of AD. The data on how Aβ polymerizes and aggregates to become insoluble deposits are relatively scarce compared to recent breakthroughs in our understanding of the mechanisms that are responsible for Aβ production. Specifically, little is known about how Aβ is deposited in relation to the complex ultrastructure of brain neuropil. This study attempted to fill this void in knowledge by combining two powerful techniques: three-dimensional reconstruction of serial ultrathin section, and detection of amyloid fibrils by high resolution postembedding immunocytochemistry. The analysis was performed on hippocampal section obtained from mice with mutant presenilin-1, APP and tau transgenes, and on neocortical sections obtained from aged canines. Immunocytochemistry was used for identification of amyloid deposits by Aβ antibodies, and glutamine synthetase (GS; a marker for astrocytic processes). The study revealed that the organization of extracellular amyloid deposit is more complex than previously postulated from conventional single-section light and electron microscopic analysis. Aβ fibrillizes to form meshworks composed of bundles of fibrils of varying size that radiate from a high-density centre. The 3D reconstruction analysis in transgenic mice clearly showed that extracellular amyloid is deposited in close proximity to stem dendrites and somata of pyramidal cells. A strikingly similar pattern was observed in the aged dog model where Aβ deposits were associated almost exclusively with the plasma membrane of neuronal somata and major dendrites. Amyloid deposits showed no specific association with thin dendritic branches or spines, nor with presynaptic elements or astrocyte processes. The study shows that extracellular Aβ deposits are laid down on restricted membrane domains of pyramidal cells, indicating that Aβ fibrillization is promoted by specific molecular interactions between amyloid protofibrils and the neuronal plasma membrane.

KEY WORDS: ALZHEIMER'S DISEASE / AMYLOID DEPOSITS / TRIPLE-TRANSGENIC / AGED CANINE / 3D RECONSTRUCTION

152 pages

Copyright by Mahidol University

การศึกษาโครงสร้างสามมิติของอะมิลอยด์สะสมจากภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนต่อเนื่อง
THREE-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION OF AMYLOID DEPOSITS FROM SERIAL ELECTRON MICROSCOPIC SECTIONS

ปวร นันทกิจ 4637306 STNS/D

ปร.ด. (ประสาทวิทยาศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : นัยพินิจ คชภักดี, Ph.D., OLE P. OTTERSEN, M.D., Ph.D., REIDUN TORP, Ph.D., ปิยะรัตน โกวิทตรพงศ์, Ph.D., วิภาวรรณ ตั้งนิพนธ์, Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมของระบบประสาทที่มีอุบัติการณ์กว่า 26.6 ล้านคนทั่วโลก โรคอัลไซเมอร์จะมีความเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาสองลักษณะสำคัญคือ senile plaque ภายในเซลล์และ neurofibrillary tangle ภายนอกเซลล์ ปัจจุบันเราทราบว่า senile plaque เกิดจากการสะสมตัวของ β-amyloid (Aβ) ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของ amyloid precursor protein (APP) การสะสมตัวของ Aβ ทำให้มีการสูญเสียการทำงานในด้านการเรียนรู้และความจำไป องค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกในการเกิด polymerization และ aggregation ของ Aβ นั้นยังน้อยเมื่อเทียบกับกลไกในการควบคุมการผลิตของ Aβ นอกจากนี้โครงสร้างของการสะสม Aβ สัมพันธ์กับโครงสร้างต่างๆ ของเซลล์ประสาทยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เพื่อตอบคำถามจึงได้มีการนำวิธีสร้างโครงร่างสามมิติจากเซกชั่นต่อเนื่อง และ postembedding immunocytochemistry มาใช้ร่วมกัน การศึกษาใช้เนื้อเยื่อส่วน hippocampus ของหนูที่เป็นโมเดลของโรคอัลไซเมอร์อันประกอบด้วยการปรับปรุงพันธุกรรมของยีน presinilin-1, APP, และ tau ที่เรียกว่า triple-transgenic และเนื้อเยื่อส่วน neocortex ของสุนัขอายุมาก เทคนิคทาง immunocytochemistry นำมาใช้เพื่อบ่งบอก 1) โครงสร้างของ fibril ของ Aβ โดยใช้แอนติบอดีต่อ Aβ และ 2) ส่วนของ astrocyte โดยใช้แอนติบอดีต่อ glutamine synthetase การทดลองพบว่าโครงสร้างของการสะสมของ Aβ มีความซับซ้อนกว่าภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาหรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจากหนึ่งเซกชัน Aβ fibril จะจับตัวเป็นร่างแหที่มีขนาดและทิศทางที่แตกต่างกันและมีใจกลางที่หนาแน่น โครงสร้างของ Aβ ยังยื่นไปบริเวณช่องว่างนอกเซลล์ที่ชิดกับ dendrite หลัก และ soma ของ pyramidal cell ลักษณะคล้ายกันนี้ยังพบได้ในสมองของสุนัขอายุมากโดยที่การสะสมของ Aβ เกือบทั้งหมดพบบน dendrite หลัก และ soma ของเซลล์ การกระจายของ Aβ ไม่พบว่าสัมพันธ์กับแขนงของ dendrite และ dendritic spine แต่อย่างใด บริเวณของ synapse และส่วนของ astrocyte ก็ไม่สัมพันธ์กับการสะสมของ Aβ การศึกษานี้บ่งชี้ว่าลักษณะของการสะสมของ Aβ บน dendrosomatic compartment เป็นผลมาจากการที่มีการควบคุมการเกิด fibrillization ของ Aβ อันซับซ้อนบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษของเซลล์ประสาท

152 หน้า

Copyright by Mahidol University