PATTAMON MUANGCHAN : EFFECT OF AUTOPHAGY MODULATION DURING NEURAL DIFFERENTIATION OF HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS INDUCED BY DAPT AND 5-AZACYTIDINE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PARINYA NOISA, PH. D., 96 PP.

HUMAN DENTAL PULP TISSUE-DERIVED STEM CELLS/AUTOPHAGY/ NEURAL DIFFERENTIATION/NOTCH SIGNALING PATHWAY/ DNA DEMETHYLATING AGENT

The limitations in utilizing human embryonic stem cells (ESCs) resulted in promoting the promise of mesenchymal stem cells (MSCs) in regenerative medicine. MSCs, especially from dental pulp tissues and called dental pulp-derived stem cells (DPSCs), serve as a potential source for cell therapy because of their high accessibility, minimal invasive collection, and the least ethical concern.

The primary aim of this study was to explore the effects of the Notch signaling inhibitor GSI-IX, LY-374973, N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) and the DNA demethylating agent (5-Azacytidine, 5-aza) on neural differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs) and investigate the role of autophagy during neural differentiation. It was found that after the isolation of hDPSCs, the cells could be expanded, and exhibited typical MSC property. The isolated hDPSCs were positive for CD73, CD90 and CD105. Additionally, hDPSCs were multipotent, as they were able to differentiate toward osteocytes, chondrocytes, and adipocytes.

To optimize the DAPT concentration, hDPSCs were treated under different DAPT concentrations (0, 5, 10 and 20 μM). The results showed that after 7 days of the induction, the differentiated hDPSCs with 10 and 20 μM DAPT significantly upregulated neural-specific genes *Nestin*, *Sox2* and *βIII-tubulin* ($p<0.01$). Moreover, autophagy-related genes (*LC3I/II* and *Beclin-1*) were highly upregulated during cell differentiation consistent with the neural gene expression. Gene expression analysis revealed that the addition of DAPT, together with 5-azacytidine, contributed to the highest expression level of neural-specific genes, including *βIII-tubulin*, *Nestin* and *GAD1*. Interestingly, this combined treatment of DAPT and 5-aza significantly promoted the expression of *LC3I/II* and *Beclin-1* ($p<0.01$). The significance of autophagy during neural differentiation was further confirmed by supplementing either Valproic acid (VPA; autophagy activator) or chloroquine (Cq; autophagy inhibitor). The results demonstrated that after the treatment of VPA, βIII-tubulin and LC3I/II genes and proteins were significantly upregulated, while the treatment of Cq led to the downregulation of βIII-tubulin.

Altogether, this study concluded that the inhibition of Notch signaling and DNA methylation could promote the differentiation of hDPSCs toward neural cells, and autophagy was modulated during this process. Hence, this study paved the way for an effective way to differentiate hDPSCs, and would be beneficial for clinical applications in the future.

School of Biotechnology Student's Signature Pattaramon

Academic Year 2016 Advisor's Signature Parinya Noisa

พัทธมน เมืองจันทร์ : ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงออโตฟาจีระหว่างการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันมนุษย์ไปเป็นเซลล์ประสาทด้วยสาร DAPT และ 5-AZACYTIDINE (EFFECTS OF AUTOPHAGY MODULATION DURING NEURAL DIFFERENTIATION OF HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS INDUCED BY DAPT AND 5-AZACYTIDINE) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริญญา น้อยสา, 96 หน้า

อันเนื่องมาจากข้อจำกัดของการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (EMBRYONIC STEM CELLS, ESCS) มาใช้ในการรักษาส่งผลให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (MESENCHYMAL STEM CELLS, MSCS) เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพและเป็นความหวังสำหรับแพทย์ทางเลือกโดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมในระบบประสาท เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์โดยเฉพาะจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (DENTAL PULP-DERIVED STEM CELLS, DPSCS) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพในการรักษาด้วยเซลล์บำบัด ด้วยเหตุผลในเรื่องขั้นตอนการเก็บที่ไม่ยุ่งยากและมีการบาดเจ็บไม่มาก อีกทั้งประเด็นปัญหาทางด้านจริยธรรมที่น้อย นอกจากนี้แล้วเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้หลากหลายประเภท โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ในระบบประสาทเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะการเหนี่ยวนำที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อวิจัยหาผลของสารยับยั้งการส่งสัญญาณ Notch ด้วย GSI-IX, LY-374973, N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) ร่วมกับการเติมสารยับยั้งการเติมหมู่เมททิล (methyl) ลงบนสาย DNA (5-Azacytidine, 5-aza) ต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันของมนุษย์ (human DENTAL PULP-DERIVED STEM CELLS, hDPSCs)ไปเป็นเซลล์ประสาทและตรวจสอบบทบาทของกระบวนการออโตฟาจี (autophagy) ในระหว่างการเหนี่ยวนำ จากผลการทดลองพบว่าหลังจากทำการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันของมนุษย์ เซลล์เหล่านี้มีการแสดงออกต่อโปรตีน CD-73 CD90 และ CD105 นอกจากนั้นเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันมนุษย์ยังสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันของมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วยสาร DAPT ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท ผลการศึกษาพบว่าภายหลัง 7 วันหลังทำการเหนี่ยวนำ กลุ่มที่เติม DAPT ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ มีระดับของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาท Nestin, Sox2 และ βIII-tubulin สูงกว่ากลุ่มควบคุม

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของ LC3I/II and Beclin-1 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการออโตฟาจีสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันของมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วยสาร DAPT ร่วมกับการเติมสารยับยั้งการเติมหมู่ methyl ลงบนสาย DNA คือ 5-Azacytidine (5-aza) พบว่าภายหลังจากการเติม 5-aza ยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ประสาท เช่น βIII-tubulin, Nestin และGAD1 มีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เติม 5-aza อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เช่นเดียวกับการแสดงออกที่สูงขึ้นของยีนในกระบวนการออโตฟาจี คือ LC3I/II และ Beclin-1 นอกจากนี้ผลการย้อมโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ประสาทคือโปรตีน βIII-tubulin รวมทั้ง LC3I/II, Beclin-1 ที่เป็นโปรตีนจำเพาะต่อการเกิดกระบวนการออโตฟาจี พบว่าเซลล์ประสาทที่ได้มาจากกลุ่มที่มีการเติมทั้ง 10 ไมโครโมลาร์ DAPT และ 5-aza มีการแสดงออกของโปรตีน βIII-tubulin ร่วมกับ LC3I/II และ βIII-tubulin และ Beclin-1 ร่วมกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นเซลล์ประสาทที่มีการกระตุ้นกระบวนการออโตฟาจีเกิดขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงทำการยืนยันถึงความสำคัญของกระบวนการ ออโตฟาจีต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากโพรงประสาทฟันมนุษย์ไปเป็นเซลล์ประสาทโดยการเติม Valproic acid (VPA) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นกระบวนการออโตฟาจีและ Chloroquine (Cq) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการออโตฟาจีลงในน้ำยาเหนี่ยวนำที่มี DAPT และ 5-aza โดยผลการทดลอง พบว่าในกลุ่มที่มีการเติม VPA มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนของ βIII-tubulin และ LC3I/II สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมและกลุ่มที่มีการเติม Cq

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันมนุษย์ที่ถูกยับยั้งการส่งสัญญาณ Notch และลดการเติมหมู่ methyl บนสาย DNA สามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ประสาทได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเกิดการกระตุ้นกระบวนการออโตฟาจีในระหว่างกระบวนการเหนี่ยวนำ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของกระบวนการออโตฟาจีต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันมนุษย์ไปเป็นเซลล์ประสาท จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงแนวทาง และโอกาสในการรักษาผู้ป่วยอันเนื่องมาจากความเสื่อมของเซลล์ประสาทต่อไปได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____