บทบาทของสปาร์ค/ ออสติโอเนคตินต่อการกระตุ้นเอนไซม์เมทริกซ์เมแทโลโปรตีเนส 2 บริเวณพื้นผิวเซลล์

นางนิรดา ธเนศวร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-03-0738-8
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SPARC/ OSTEONECTIN REGULATION OF MMP-2 ACTIVATION ON THE CELL SURFACE

Mrs Nirada Dhanesuan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Oral Biology

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0738-8

Thesis Title	SPARC/ OSTEONECTIN REGULATION OF MMP-2 ACTIVATION ON THE CELL SURFACE
By	Nirada Dhanesuan
Field of Study	Oral Biology
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Prasit Pavasant
Thesis Co-advisor	Associate Professor Dr. Erik W. Thompson

Accepted by Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University in Partial Fulfullment of the Requirements for the Doctoral Degree

Surasit Kiatpongsan
.....Dean of Faculty of Dentistry
(Associate Professor Surasith Kiatpongsan)

Thesis Committee

Ratana Serinirach
..... Chairman
(Associate Professor Dr.Ratana Serinirach)

Prasit Pavasant
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Dr.Prasit Pavasant)

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Dr.Erik W.Thompson)

Wandee Apinhasmit
..... Member
(Associate Professor Dr.Wandee Apinhasmit)

Suconta Chareonvit
..... Member
(Dr.Suconta Chareonvit)

Vijittra Leardkamolkarn
..... Member
(Associate Professor Dr.Vijittra Leardkamolkarn)

นิรดา ธเนศวร: บทบาทของสปาร์ค/ ออสติโอเนคตินต่อการกระตุ้นเอนไซม์เมทริกซ์เมแทโลโปรตีเนส 2 บริเวณพื้นผิวเซลล์ (SPARC/ OSTEONECTIN REGULATION OF MMP-2 ACTIVATION ON THE CELL SURFACE) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ทพ.ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ASSOC. PROF. DR. ERIK W. THOMPSON, 133 หน้า. ISBN 974-03-0738-8

สปาร์ค (ออสติโอเนคตินหรือ BM-40) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในโรคมะเร็งหลายประเภท โดยจะเกี่ยวพันกับการเพิ่มความรุนแรงของโรค อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงบทบาทของสปาร์คต่อมะเร็งเต้านมนั้นยังมีอยู่จำกัด การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาถึงผลของสปาร์คต่อเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ BT-549 และ MDA-MB-231 การศึกษาในส่วนแรก เป็นการศึกษาผลของสปาร์คที่เตรียมมาจากมนุษย์ วัว และหนูเม้าส์ ต่อเซลล์ BT-549 สปาร์คทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถลดระดับของ TIMP-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แต่มีสปาร์คเพียงบางตัวเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกเมแทโลโปรตีเนส-2 (MMP-2) เมื่อแยกส่วนของสปาร์คของมนุษย์มาทำการศึกษา พบว่าเปปไทด์ 1.1 ซึ่งอยู่ทางด้านปลายอะมิโนเป็นตัวที่มีบทบาทต่อการลดระดับของ TIMP-2 และการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอ็มอาร์เอนเอของ TIMP-2 และ MT1-MMP และระดับของโปรตีน TIMP-2 บนผิวเซลล์ เมื่อยับยั้งการทำงานของ TIMP-2 โดยการใช้แอนติบอดี พบว่าแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่ำ สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ แต่เมื่อใช้แอนติบอดีความเข้มข้นสูง จะกลับมีผลยับยั้งการทำงานของ MMP-2 ผลการศึกษาในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่า สปาร์คสามารถลดระดับของ TIMP-2 ได้ แต่การลดลงของ TIMP-2 ไม่ได้เป็นผลตามจากการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 และจากการที่การเปลี่ยนแปลงของระดับของ TIMP-2 สามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของ MMP-2 แสดงให้เห็นถึงบทบาทที่ซับซ้อนของ TIMP-2 โดยเฉพาะความเข้มข้นเฉพาะที่ของ TIMP-2 ที่มีต่อการทำงานของ MMP-2 ผลการทดลองนี้ยังแสดงถึงบทบาทที่สำคัญของปลายอะมิโนของสปาร์คต่อกระบวนการดังกล่าวด้วย

การศึกษาในส่วนที่สอง เป็นการใส่ยีนสปาร์คเข้าไปในเซลล์ MDA-MB-231 โดยออกแบบให้เซลล์สามารถสร้างสปาร์คได้ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะดอคซีไซคลิน (Tet-On system) แต่เนื่องมาจากข้อจำกัดบางอย่างทำให้ข้าพเจ้าไม่สามารถศึกษาการลดระดับของ TIMP-2 และการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ เมื่อทำการศึกษารูปร่าง การยึดเกาะ และอัตราการเจริญของเซลล์ต้นแบบ เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ต้นแบบ และเซลล์ที่ได้รับยีนสปาร์ค พบการการใส่ยีนสปาร์คไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการยึดเกาะของเซลล์ แต่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้เมื่อทำการทดลองวัดการเจริญของเซลล์และการทดลองวัดการหายของแผลในห้องปฏิบัติการ จากการวิเคราะห์วงจรเซลล์พบว่าสปาร์คยับยั้งการเข้าสู่ระยะสร้างและสะสมสารพันธุกรรมของเซลล์ นอกจากนั้นยังพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในการเคลื่อนตัวของเซลล์หรือการเติบโตในเมทริเจล ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงบทบาทในด้านบวกของสปาร์คต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม

โดยสรุปแล้วการศึกษาครั้งนี้แสดงถึงบทบาทที่แตกต่างกัน 2 ด้านของสปาร์คต่อมะเร็งเต้านม การศึกษาในส่วนแรกแสดงให้เห็นว่าสปาร์คสามารถลดระดับของ TIMP-2 ซึ่งอาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และส่งผลต่อความสามารถของเซลล์ในการแพร่กระจายได้ ในส่วนที่สอง แสดงให้เห็นว่าสปาร์คมีผลในการลดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ ซึ่งแสดงถึงบทบาทของสปาร์คในด้านบวกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์แตกต่างไปจากเซลล์มะเร็งชนิดอื่น

ลายมือชื่อนิสิต.....นิรดา ธเนศวร.....

สาขาวิชา ชีววิทยาช่องปาก ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ประสิทธิ์ ภวสันต์.....

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##3972584732: MAJOR ORAL BIOLOGY
KEY WORDS: SPARC/ OSTEONECTIN/ BM40/ MMP-2
NIRADA DHANESUAN: SPARC/ OSTEONECTIN REGULATION OF MMP-2 ACTIVATION ON THE CELL SURFACE.
THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. PRASIT PAVASANT, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. ERIK W. THOMPSON, Ph.D. ISBN 974-03-0738-8

SPARC (secreted proteins acidic and rich in cysteines: osteonectin or BM40) is a matricellular protein which is known to play important roles in many cancers, and in most cases it is associated with an aggressive phenotype. However the study of SPARC in breast cancer is still limited. The present study reveals the role of SPARC on BT-549 and MDA-MB-231 breast cancer cell line. The first part was to study the effect of different preparations of SPARC from human, bovine and mouse on the BT-549 breast cancer cell line. All SPARC preparations tested were able to reduce TIMP-2 levels in the conditioned media. However, only some preparations could induce MMP-2 activation. A study using human deletion mutants showed that peptide 1.1, belonging to the amino terminal, was responsible for this effect. This process did not involve changes in TIMP-2 or MT1-MMP mRNA, nor did it involve cell-associated TIMP-2. Neutralizing of TIMP-2 using anti-TIMP-2 antibody affected MMP-2 activation in a biphasic manner, with activation when lower concentrations of the antibody were used, and inhibition with higher concentrations. I concluded that the SPARC effect on TIMP-2 reduction is not a consequence of the SPARC effect on MMP-2 activation. The discordance between SPARC effects on TIMP-2 reduction and MMP-2 activation could be due to the complex role of TIMP-2 on MMP-2 activation or local concentrations of TIMP-2. The data strongly implicate the amino-terminal domain of SPARC in this process.

The second part of the study is the transfection of SPARC into the MDA-MB-231 breast cancer cell line using an inducible Tet-On transfection system, in which SPARC would be expressed only in the presence of doxycyclin. Due to limitation in the amount produced, I was unable to study its effect on TIMP-2 reduction and MMP-2 activation, and went on to examine other biological effects of SPARC. By comparing cell morphology, adhesiveness and growth rate between the MDA-MB-231 parental and the transfected clones, it was shown that SPARC had no effect on cell morphology and adhesiveness. Instead SPARC inhibited proliferation in the transfected line by proliferation assay and monolayer wound healing assay. Cell cycle analysis revealed that SPARC inhibited progression of cells into S-phase. Furthermore, no effect on migration of cells and Matrigel outgrowth was detected. These data indicate a positive antiproliferative role of SPARC in breast cancer compared to a negative, pro-invasive role in melanoma and glioma.

In conclusion, these studies showed 2 different aspects of how SPARC may affect breast cancer. The first part of the study showed the effect of SPARC on TIMP-2 reduction, which might affect MMP-2 activation and also the ability of the cells to metastasize. The second part showed that SPARC was able to inhibit breast cancer cell proliferation. In contrast to other cancers, SPARC seems to inhibit breast cancer, and would be positive.

Field of study Oral Biology

Academic year 2001

Student's signature..... Nirada Dhanesuan

Advisor's signature..... Prasit Pav...

Co-advisor's signature.....

Acknowledgement

I would like to acknowledge the contributions of the numerous people who have made this thesis come true. These include my thesis advisor Associate Professor Dr.Prasit Pavasant who always gives generous advice and support, and my thesis co-advisor Associate Professor Dr.Erik W. Thompson who took the responsibility in part of my research component in Melbourne, Australia. Three years and a half in Rik's lab has been a precious time for me. Thank you Rik for being a great boss and a friend. Thank you for your kindness, understanding and patience throughout those times.

I greatly appreciate everyone in Invasion and Metastasis Unit, St.Vincent's Institute of Medical Research for their helping hands and smiling faces. A special thanks to Neeracha Ruangpanit, my best friend.

I am indepted to Srinakarinwiroj University, Thailand and the Victorian Breast Cancer Research Consortium, Australia for providing financial support.

Finally, I am greatful beyond measure to my family. I wish to thank my parents, Sumon and Narumol, who made it all possible; my husband and best friend, Kanit, and our loving daughter, Kanis, who have always been on my side and made it all worthwhile.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table of Contents

Title Page (Thai)....i
Title Page (English)....ii
Abstract (Thai)....iv
Abstract (English)....vi
Acknowledgements....vii
Table of Contents....viii
List of Illustrations....x
List of Tables....x
List of Abbreviations....xi

Chapter 1: Introduction....1

SPARC....1
SPARC structure and expression....1
SPARC expression in normal tissues....3
SPARC expression in neoplasia....4
SPARC-related protein family....5
SPARC and calcium....6
SPARC and the ECM....7
Biological functions of SPARC....9
SPARC and cancer....12
MMPs....14
MMP family, structures and regulation....14
Roles of MMPs....18
MMP-2....19
MMP-2 activation....20
TIMP-2....23
MT1-MMP....23
Breast cancer....25
Human breast cancer cell lines....26
In vitro study of breast cancer....28
MMPs & breast cancer....28

Problems and Hypothesis....30

Specific Aims....31

Chapter 2:The acidic domain I of SPARC/ BM40/ osteonectin down -regulates extracellular TIMP-2 independent of MMP-2 activation....32

Summary....32
Introduction....33
Experimental procedures....35

Results.....40
Discussion.....52

Chapter 3: Doxycyclin-inducible expression of SPARC/ Osteonectin BM40 in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in growth inhibition..... 57

Summary.....57
Introduction.....58
Experimental procedures.....60
Results.....66
Discussion.....75

Chapter 4: General discussions and future studies..... 79

SPARC.....79
Cell lines.....81
Effect of exogenous SPARC on BT-549.....82
Transfection of SPARC into MDA-MB-231 cells.....85
Concluding remarks.....89
Future studies.....90

References.....92

VITA.....123

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ILLUSTRATIONS

Figure 1.1: MMPs family and structure..... 15

Figure 1.2: MMP-2 activation on the cell surface.....21

Figure 2.1: Comparison of TIMP-2 levels and MMP-2 activation ability between BT-549 and MDA-MB-231.....41

Figure 2.2: SPARC and the deletion mutants.....43

Figure 2.3: Effects of different preparations of SPARC on MMP-2 activation and levels of TIMP-2 in conditioned media.....45

Figure 2.4: Effects of SPARC peptide and deletion mutants on MMP-2 activation and levels of TIMP-2 in conditioned media.....47

Figure 2.5: Effects of SPARC on cell-associated TIMP-2 levels.....50

Figure 2.6: Effects of anti-TIMP-2 antibody on MMP-2 activation.....51

Figure 3.1: Inducible expression of human SPARC in breast cancer cells and DOX concentration-dependent induction of SPARC expression in clone X5...67

Figure 3.2: DOX-induced SPARC expression has no effect on cell attachment to collagen I coated plates.....69

Figure 3.3: *In vitro* proliferation analysis of parental and transfected clones.....71

Figure 3.4: Cell cycle analysis of representative clones.....72

Figure 3.5: Cultured wound healing assay of clone X parental and clone X5.....74

LIST OF TABLES

Table 1: Real-time PCR results for MT1-MMP, TIMP-2 and L-32.....48

LIST OF ABBREVIATIONS

APMA	4-aminophenylmercuric acetate
BAE	bovine aortic endothelial
BM40	basement membrane 40
BSA	bovine serum albumin
Ca^{2+}	calcium ion
Con A	concanavalin A
CMV	cytomegalovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DOX	doxycyclin
EC	extracellular calcium binding
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetra acitic acid
ER	estrogen receptor
FCS	fetal calf serum
FRP	follistatin-related protein
FS	follistatin-like
HUMEC	human microvasculat endothelial cell
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
MMPs	matrix metalloproteinases
MT-MMPs	membrane-type matrix metalloproteinases
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	phenylmethylsulfonylpluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodium doducylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SFM	serum free medium
SPARC	secreted protein acidic and rich in cysteine
TCA	trichloroacetic acid
TIMP-2	tissue inhibitor of metalloproteinase-2
TN	tenascin
TPA	12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TSP	thrombospondin
VIM	vimentin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย