ความต้องการคอลลาเจนในขบวนการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ ที่พบบนพื้นผิวเซลล์ไฟโบรบลาสต์

นางสาว นีรชา เรืองพานิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543
ISBN 974-13-0454-4
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17926979 2546

COLLAGEN REQUIREMENTS OF CELL SURFACE ACTIVATION OF GELATINASE A BY FIBROBLASTS

Miss Neeracha Ruangpanit

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 2000

ISBN 974-13-0454-4

Thesis Title	COLLAGEN REQUIREMENTS OF CELL SURFACE ACTIVATION OF GELATINASE A BY FIBROBLASTS
By	Neeracha Ruangpanit
Field of Study	Oral Biology
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Prasit Pavasant
Thesis Co-advisor	Associate Professor Dr. Erik W. Thompson

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

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

Thesis Committee

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

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

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

..... Member
(Associate Professor Dr. Jeerasak Nopakun)

..... Member
(Associate Professor Dr. Em-On Benjavongkulchai)

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

นีรชา เรืองพานิช : ความต้องการคอลลาเจนในขบวนการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ ที่พบบนพื้นผิวเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (COLLAGEN REQUIREMENTS OF CELL SURFACE ACTIVATION OF GELATINASE A BY FIBROBLASTS) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ทพ.ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ASSOC. PROF. DR. ERIK W. THOMPSON, 168 หน้า. ISBN 974-13-0454-4

คอลลาเจนเป็นหนึ่งในสารเพียงไม่กี่ชนิดในร่างกายที่มีความสามารถในการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายทั้งในสภาวะปกติและพยาธิสภาพ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาถึงความจำเพาะของชนิดและโครงสร้างของคอลลาเจนต่อความสามารถในการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ โดยใช้การวิเคราะห์แบบไซโมกราฟีในการตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ คอลลาเจนในการทดลองนี้อยู่ในรูปของสารละลายแทนการใช้คอลลาเจนวุ้นเพื่อให้ง่ายต่อการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์และหลีกเลี่ยงการซึมซับโปรตีนต่างๆ จากอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งอาจส่งผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ การกระตุ้นไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากผิวหนังของมนุษย์ด้วยสารละลายคอลลาเจนชนิดต่างๆพบว่าคอลลาเจนชนิดที่มีความสามารถในการเกิดเส้นใยสามารถเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ แต่เมื่อลดการเกิดโครงสร้างเส้นใยของคอลลาเจนโดยการปล่อยคอลลาเจนให้แห้งในสภาวะกรดหรือการใช้คอลลาเจนที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับด่าง รวมทั้งการใช้เปปไตด์ที่มีความสามารถเฉพาะในการยับยั้งการเกิดโครงสร้างเส้นใยของคอลลาเจน จะยับยั้งการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าส่วนของคอลลาเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับเปอร์ไอโอเดต เช่น คาร์โบไฮเดรตบนคอลลาเจนโมเลกุลมีความจำเป็นในขบวนการเหนี่ยวนำนี้ในขณะที่ส่วนทีโลเปปไตด์ไม่มีผล การศึกษาเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากผิวหนังของมนุษย์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากหนูที่ยีนของเอนไซม์เอ็มทีวันเอ็มเอ็มพีถูกทำลายพบว่า ระดับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ ในการตอบสนองต่อสารละลายคอลลาเจนสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนของเอนไซม์เอ็มทีวันเอ็มเอ็มพี ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นจำเพาะของเอนไซม์เจลาติเนส เอ

บทบาทของคอลลาเจนในการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ ได้ถูกศึกษาเพิ่มเติมโดยการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากผิวหนังติดต่อกันเป็นระยะเวลานานในสภาวะที่มีวิตามินซี นำไปสู่การสะสมคอลลาเจนในลักษณะที่ใกล้เคียงกับในร่างกายมากกว่าการเติมคอลลาเจนให้กับเซลล์ คอลลาเจนที่เซลล์สร้างขึ้นนี้สามารถเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ เช่นเดียวกับการเติมสารละลายคอลลาเจน การเลี้ยงเซลล์ในลักษณะนี้ยังแสดงให้เห็นความแตกต่างของช่วงเวลาในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์เอ็มทีวันเอ็มเอ็มพีโดยคอลลาเจนทั้งในระดับการแสดงออกและระดับหลังการแสดงออกของยีน การยับยั้งการสร้างคอลลาเจนนำไปสู่การยับยั้งการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ แสดงให้เห็นโดยการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากผิวหนังร่วมกับการใช้สารยับยั้งเอนไซม์โปรริวโฟไฮดรอกซิเลส และการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากหนูสายพันธุ์โมฟ 13 อย่างไรก็ดีการใช้สารบีเอพีเอ็นเพื่อยับยั้งการเกิดโครงสร้างเกี่ยวสานของเส้นใยคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากผิวหนัง, การเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากหนูสายพันธุ์โมฟ 13-5 ซีเอ็ม ซึ่งสร้างคอลลาเจนที่ไม่สามารถเกิดโครงสร้างเส้นใย รวมทั้งการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากหนูที่ยีนของเอนไซม์เอ็มทีวันเอ็มเอ็มพีถูกทำลายยังพบมีการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความไม่จำเป็นของโครงสร้างเกี่ยวสาน และโครงสร้างเส้นใยของคอลลาเจนรวมทั้งความเป็นไปได้ของการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ ภายในเซลล์ ผลจากการศึกษานี้สนับสนุนบทบาทของคอลลาเจนที่เซลล์สร้างขึ้นในการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ โดยผ่านและไม่ผ่านการทำงานของเอนไซม์เอ็มทีวันเอ็มเอ็มพี รวมทั้งแสดงถึงความสามารถของคอลลาเจนโดยไม่จำเป็นต้องเกิดโครงสร้างเส้นใยในการเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส เอ

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

สาขาวิชา ชีววิทยาช่องปาก

ปีการศึกษา 2543

3970849732 : MAJOR ORAL BIOLOGY
KEY WORDS : MATRIX METALLOPROTEINASE-2 ACTIVATION / COLLAGEN / FIBRILS MEMBRANE-TYPE 1 MATRIXMETALLOPROTENASE
NEERACHA RUANGPANIT: COLLAGEN REQUIREMENTS OF CELL SURFACE ACTIVATION OF GELATINASE A BY FIBROBLASTS. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. PRASIT PAVASANT, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. ERIK W. THOMPSON, Ph.D. 168 pp. ISBN 974-13-0454-4

Type I collagen is one of a few physiological substances that can induce the activation of MMP-2, a tissue degrading enzyme involved in various physiological and pathological phenomena. In the present study, specificity for the types and structures of collagen capable of this induction has been studied. MMP-2 activation was monitored by zymography. Treatment of the cell cultures by addition of collagen in solution, instead of growing cells on collagen gels, was developed to avoid unknown effects of trapped serum proteins, and for ease in manipulating collagen concentrations. Addition of recombinant, purified, or partially purified collagens into the culture of normal human skin fibroblasts demonstrated the specificity of fibrillar-type collagen for induction of MMP-2 activation. Reduction of MMP-2 fibril formation by treatment of the cultures with dry monomeric or alkali-treated collagen, or a fibril-inhibitory collagen peptide, abrogated the MMP-2 activation. Moreover the periodate-sensitive features of collagen, such as the carbohydrate molecules, were required for the appropriate cellular response to collagen, whereas the presence or absence of telopeptide made little difference to induction of MMP-2 activation. Both mRNA and protein levels of the prominent MMP-2 activator, MT1-MMP, were consistently correlated with the amount of MMP-2 activation. The importance of MT1-MMP was supported by the relative lack of MMP-2 activation after collagen stimulation of MT1-MMP-/- mouse fibroblasts.

The role of collagen in this process was further assessed in ascorbate-treated fibroblast cultures, which secrete and deposit endogenous collagen, and better represent *in vivo* conditions. Endogenous collagen induced a similar profile of MMP-2 activation and MT1-MMP expression as exogenous collagen. Temporal resolution of transcriptional and non-transcriptional regulation of MT1-MMP by collagen was also observed in this culture system. The essential role of collagen for MMP-2 activation in this system was confirmed with prolyl-4-hydroxylase inhibitors, and with fibroblasts derived from the Mov-13 mouse, in which the collagen $\alpha 1$(I) gene is not expressed. Inhibition of the endogenous collagen cross-linking by BAPN had no effect on the activation of MMP-2. Surprisingly, pC-procollagen, produced by Mov13-5 CM mouse fibroblasts transfected with a defective α_1(I) chain, retained the ability to induce MMP-2 activation, despite their inability to form fibrils. This result suggested that a non-fibrillar collagen structure can induce MMP-2 activation. Furthermore, ascorbate-treated cultures of MT1-MMP -/- mouse fibroblasts showed considerable MMP-2 activation, which appears to be due to an intracellular activation. Collectively this study confirms an important role of type I collagen in both MT1-MMP-dependent and -independent activation of MMP-2, and the ability of non-fibrillar collagen structures to induce MMP-2 activation in *in vivo*-simulated cultures of fibroblasts.

Student's signature Neeracha Ruangpanit

Field of study Oral Biology — Advisor's signature Prasit Pavasant

Academic year 2000 — Co-advisor's signature

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere appreciation to my thesis advisor Assistant Professor Dr. Prasit Pavasant for his advice and consistent support.

I would also like to express my deepest gratitude to my thesis co-advisor Associate Professor Dr. Erik W. Thompson, who took on the responsibility in part of the research component of my dissertation work at the Invasion and Metastasis unit, St. Vincent's Institute of Medical Research, Melbourne, Australia. He is an excellent boss, supervisor and friend. He deserves my deepest appreciation for his advice, guidance, suggestions, never endless ideas, generosity, patience and the precious time and energy he spent on my work throughout the last three and a half years.

I would like to thank the rest of my thesis committee: Associate Professor Dr. Jeerasak Nopakun, Associate Professor Dr. Em-on Benjavongkulchai and Associate Professor Dr. Vijittra Leardkamolkarn for reviewing my work and their valuable comments.

I greatly appreciate Professor Dr. T.J. Martin, the director of St. Vincent's Institute of Medical Research, for providing the research facilities and the precious comments on my work. Thank you to Professor Dr. John F. Bateman, Dr. Danny Chan and their colleagues at the Orthopedic Department at the Royal Children Hospital, Melbourne for their invaluable advice, suggestions, generosity, help and for providing their research facilities during the early period of my research.

I would like to extend my gratitude to Dr. John T. Price, Dr. Angus Tester, Dr. Julie A. Sharp and Dr. Mark Waltham for their valuable advice and comments.

I would also like to sincerely thank the people at St. Vincent's Institute of Medical Research, especially my colleagues at the Invasion and Metastasis Unit for their generosity, hospitality and help.

Special appreciation must be expressed to Nirada Dhanesuan and her family for their invaluable friendship.

I am greatly indebted to the Ministry of University Affairs, Thailand and the Victorian Breast Cancer Research Consortium, Australia for providing financial support for the research component of my study.

Finally, I wish to thank my parents: Professor Dr. Niwat and Riab Ruangpanit, my grandmother: Hoon, my brothers: Nakarin and Narin and my sister: Naree for their love, encouragement and continual support. I would like to dedicate this work to my father, Professor Dr. Niwat Ruangpanit, who has been a source of inspiration to me in conducting this doctorate degree. Last, but not least, I would like to thank Chatchapol Sanchavanakit for his encouragement, patience and understanding.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai)..... iv
Abstract (English)..... v
Acknowledgement vi
Table of Contents..... vii
List of Illustrations..... ix
List of Tables..... x
List of Abbreviations.....xi

CHAPTER 1: INTRODUCTION.....1

Cell-Matrix Interaction 1
Proteolytic Enzyme Superfamilies..... 2
Matrix Metalloproteinases (MMPs)..... 2
General Structure of MMPs 4
MMPs and Malignancy 8
MMP-2 and Malignancy.....9
Regulation of MMP-2..... 11
1. Transcriptional Regulation 11
2. Inhibition Regulation.....12
3. Activational Regulation.....13
3.1 Concept of Activation (Artificial or Physiological Activation)..... 13
3.2 Membrane Type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs).....15
3.3 Cell Surface Activation of MMP-2.....18
3.4 Active MMP-2 and Matrix Degradation.....22

Collagens..... 23
Basic Structure.....23
Collagen Superfamilies.....24
Fibrillar and Network Forming Collagens *in vivo*.....24
Ascorbic Acid Requirement in Biosynthesis of Collagen both *in vitro* and *in vivo*..... 26
Post-Translational Modifications of Collagen.....27
Procollagen Assembly and Secretion 29
Extracellular Processing.....31
Collagen Fibrillogenesis..... 32
Cross-Linking..... 33
Assembly of Extracted Type I Collagen into Fibrils..... 33
Evidence of Collagen Over-Production in Invasive Tumours..... 35
Collagen and MMP-2 activation..... 36

Problems and Hypothesis..... 40

Specific Aims.....41

Page

CHAPTER 2:

GELATINASE A (MMP-2) ACTIVATION BY SKIN FIBROBLASTS: DEPENDENCE ON MT1-MMP EXPRESSION AND FIBRILLAR COLLAGEN FORM..... 42

Summary..... 42
Introduction..... 44
Experimental Procedures..... 46
Results..... 53
Discussions..... 75

CHAPTER 3:

MT1-MMP-DEPENDENT AND INDEPENDENT REGULATION OF GELATINASE A ACTIVATION IN LONG-TERM ASCORBATE-TREATED FIBROBLAST CULTURES: REGULATION BY FIBRILLAR COLLAGEN 81

Summary..... 81
Introduction..... 83
Experimental Procedures..... 85
Results..... 90
Discussions.....113

CHAPTER 4: GENERAL DISCUSSIONS AND FUTURE STUDIES.....118

REFERENCES.....132

VITA.....168

LIST OF ILLUSTRATIONS

Page

Figure 1.1 Domain arrangement of matrix metalloproteinases..... 6

Figure 1.2 Activation of pro-MMP-2 on the cell surface.....21

Figure 1.3 The structure of type I procollagen 25

Figure 1.4 Biosynthesis of fibrillar collagen.....30

Figure 1.5 Model of collagen regulation of MT1-MMP.....39

Figure 2.1 The activation of endogenous MMP-2 by human skin fibroblasts in response to various types of collagen 56

Figure 2.2 Effect of various collagen preparations on expression of MT1-MMP protein in normal human skin fibroblasts 58

Figure 2.3 Collagen solution induces MMP-2 activation in dose dependent manner 60

Figure 2.4 Collagen type-specificity of MMP-2 activation and role of MT1-MMP.63

Figure 2.5 Inhibition of fibril formation by specific peptide inhibitor.....66

Figure 2.6 Alkali treated collagen loses the ability to induce MMP-2 activation ...70

Figure 2.7 Periodate modified collagen abrogates MMP-2 activation 72

Figure 2.8 The important role of MT1-MMP in collagen-stimulated MMP-2 activation demonstrates in MT1-MMP knock out mouse fibroblasts 74

Figure 3.1 Collagen deposition and MMP-2-activation in ascorbate-treated fibroblast cultures.....93

Figure 3.2 Activation of MMP-2 by ascorbate-treated fibroblasts requires collagen..... 96

Figure 3.3 Collagen α1(I) gene inactivation abrogates MMP-2 activation by ascorbate-treated fibroblasts..... 99

Figure 3.4 Cross-linking of collagen molecules by ascorbate-treated fibroblasts is not required for MMP-2 activation..... 102

Figure 3.5 C-proteinase-resistant collagen induces MMP-2 activation by fibroblasts.....106

Page

Figure 3.6 MT1-MMP only partially mediates MMP-2 activation by ascorbate cultured fibroblasts.....109

Figure3.7 Inability to inhibit MT1-MMP-independent activation of MMP-2 with various proteinase inhibitors 112

LIST OF TABLES

Table 1 Vertebrate members of MMP family..... 7

LIST OF ABBREVIATIONS

AA	ascorbic acid
ADAM-TS	a disintegrin and metalloproteinase thrombospondins
AP-1	activated protein 1
APMA	aminophenylmercuric acid
BAPN	beta-aminoproprionitrile
BCA	bicinchoninic acid
BMP-1	bone morphogenic protein-1
Con A	concanavalin A
CMV	cytomegalovirus
DDRs	discoidin domain-containing receptor-like tyrosine kinases
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxane
DCTP	deoxycysteine triphosphate
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetra acetic acid
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GP	glycoprotein
HPLC	high performance liquid chromatography
IGF-1	insulin-like growth factor type 1
IL-1	interleukin-1
ITS	insulin transferrin selenium
MMPs	matrix metalloproteinases
MT-MMPs	membrane-type matrix metalloproteinases
NEM	N-ethylmaleimide
^{33}P	phosphorus isotope 33
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
pC-procollagen	procollagen with carboxy-terminal prodomain
pN-procollagen	procollagen with amino-terminal prodomain
RIPA	radioimmunoprecipitation
SDS-PAGE	sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SFM	serum free medium
SLS	segment-long-spacing
SPARC	secreted protein acidic rich in cysteine
TEM	transmission electron microscopy
TGF-β	transforming growth factor- beta
TIE	TGF-β inhibitory element
TIMP-2	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2
TNF-α	tumour necrosis factor- alpha
TPA	12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRE	TPA responsive element
Vg	Vitrogen
Zn^{2+}	zinc ion