Thesis Title Behavior of Transgenic Mouse Embryonic Fibroblasts Producing the Versican Which Lack of A Subdomain

Author Mr. Keittisak Suwan

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai Member

Prof. Dr. Hideto Watanabe Member

ABSTRACT

Versican/PG-M is a large chondroitin sulfate proteoglycan of the extracellular matrix, which interacts with hyaluronan at the N-terminal G1 domain composed of A, B, and B′ subdomains. Recently the knockin mice *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$, whose versican has not the A subdomain had been generated, thereby exhibiting reduced deposition of versican in the extracellular matrix. To obtain insight into the mechanisms underlying these abnormalities, the embryonic fibroblasts obtained from *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$ knockin mice had been characterized. Here, the result showed that the knockin fibroblasts within 20 passages proliferate more slowly than wild type fibroblast, followed by acquisition of immortality within additional 20 passages. Whereas the extracellular matrix of the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

wild type fibroblasts exhibited a network structure of hyaluronan and versican, that of the *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$ fibroblasts exhibited ~30% and ~85% deposition of versican and HA, without such a structure. The *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$ fibroblasts at early passages showed substantial increase of ERK1/2 phosphorylation and p53 expression. Hyaluronidase treatment and blocking the HA-CD44 interaction by an anti-CD44 antibody enhanced and inhibited ERK1/2 phosphorylation respectively, suggesting that the extracellular signal is mediated *via* HA-CD44 interaction. The immortal *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$ fibroblasts exhibited anchorage-independent growth, and formed fibrosarcoma when injected in nude mice. In these immortal cells, ERK1/2 phosphorylation and p53 expression were abrogated. Taken together, these results demonstrate pivotal roles of the extracellular matrix structure involving versican and hyaluronan in cellular behavior.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ พฤติกรรมของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอมบริโอหนูตัดต่อยีนซึ่งผลิตสารเวอร์ชิแคนที่ขาดส่วน เอ ซับโดเมน

ผู้เขียน นาย เกียรติศักดิ์ สุวรรณ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	กรรมการ
Prof. Dr. Hideto Watanabe	กรรมการ

บทคัดย่อ

เวอร์ชิแคน/พีจี-เอ็ม คือ สารคอนดรอยตินซัลเฟตโปรตีโอไกลแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบภายนอกเซลล์ ปลายเอ็นของโดเมนจีหนึ่งของสารนี้ประกอบด้วยโดเมนย่อย เอ บี และ บี′ สามารถทำปฏิกิริยากับสารไฮยาลูโรแนนได้ เมื่อไม่นานนี้ หนูน็อคอิน *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$ ซึ่งสร้างสารเวอร์ชิแคนที่ปราศจากส่วนโดเมนย่อยเอได้ถูกสร้างขึ้น พบว่าหนูมีการลดการสะสมสารเวอร์ชิแคนในองค์ประกอบภายนอกเซลล์ เพื่อศึกษาถึงกลไกที่ทำให้เกิดความผิดปกติเหล่านี้ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเอมบริโอหนูน็อคอิน *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$ ได้ถูกนำมาศึกษา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์น็อคอินไฟโบรบลาสต์ในช่วง 20 พาสเสจแรกเจริญช้ากว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติ จากนั้นเซลล์นี้สามารถเจริญได้ไม่สิ้นสุดในช่วง 20 พาสเสจต่อมา ขณะที่ไฟโบรบลาสต์ปกติมีโครงสร้างของไฮยาลูโรแนนและเวอร์ชิแคนเป็นแบบร่างแห แต่ไฟโบรบลาสต์ชนิด *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$ ไม่มีโครงสร้างดังที่กล่าวมา และมีการสะสมของเวอร์ชิแคนและไฮยาลูโรแนนประมาณ 30% และ 85% ของไฟโบรบลาสต์ปกติ ตามลำดับ ไฟโบรบลาสต์ชนิด *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$ ที่พาสเสจช่วงต้นมีการเพิ่มขึ้นของการเติมหมู่ฟอสเฟตของ ERK1/2 และมีการเพิ่มการแสดงออกของสาร p53 การเติมเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและการขัดขวางปฏิกิริยาของสารไฮยาลูโรแนนและสาร CD44 โดยแอนติบอดี้ต่อ CD44 มีผลส่งเสริมและยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟต ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สัญญาณจากภายนอกเซลล์สื่อสารผ่านปฏิกิริยาของไฮยาลูโรแนนและสาร CD44 ไฟโบรบลาสต์ *Cspg2*$^{\Delta 3/\Delta 3}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่เจริญไม่สิ้นสุดนี้มีคุณสมบัติในการเจริญได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้ที่ยึดเกาะ และเกิดเป็นเซลล์ไฟโบรซาโคมาเมื่อถูกฉีดเข้าไปในหนูนู้ด โดยเซลล์ที่เจริญได้ไม่สิ้นสุดเหล่านี้ การเติมหมู่ฟอสเฟตของ ERK1/2 และการแสดงออกของสาร p53 ได้หายไป ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของโครงสร้างภายนอกเซลล์ของ เวอร์ชิแคนและไฮยาลูโรแนนต่อพฤติกรรมของเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved