การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกเมทัลโลโปรติเนส-2 (เอ็มเอ็มพี-ทู) โดยสารหลั่งจากแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์

นางสาว เกษรา ปัทมพันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2762-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20920441

ACTIVATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) BY SUPERNATANT OF ANAEROBIC BACTERIA CULTIVATED FROM PERIODONTAL POCKETS

Miss Kassara Pattamapun

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 2002

ISBN 974-17-2762-3

Thesis Title	ACTIVATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) BY SUPERNATANT OF ANAEROBIC BACTERIA CULTIVATED FROM PERIODONTAL POCKETS
By	Kassara Pattamapun
Field of study	Oral Biology
Thesis Adviser	Associated Professor Prasit Pavasant, Ph.D
Thesis Co-adviser	Associated Professor Jintakorn Kuvatanasuchati

---

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

.....Dean of Faculty of dentistry

(Associated Professor Surasith Kiatpongsan)

Thesis Committee

.....Chairman

(Associate Professor Ratana Serinirach, Ph.D)

.....Thesis Adviser

(Associate Professor Prasit Pavasant, Ph.D)

.....Thesis Co-adviser

(Associate Professor Jintakorn Kuvatanasuchati)

.....Member

(Associate Professor Jeerasak Nopakun, Ph.D)

.....Member

(Associate Professor Anak Iamaroon, Ph.D)

.....Member

(Neeracha Sanchavanakit, Ph.D)

เกษรา ปัทมพันธุ์ : การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกเมทัลโลโปรติเนส-2 (เอ็มเอ็มพี-ทู) โดยสารหลั่งจากแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์. (ACTIVATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) BY SUPERNATANT OF ANAEROBIC BACTERIA CULTIVATED FROM PERIODONTAL POCKETS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภาสันต์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ทพ. จินตกร คูวัฒนสุชาติ จำนวนหน้า 166 หน้า. ISBN 974-17-2762-3

เป็นที่ยอมรับกันว่าเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกเมทัลโลโปรติเนส (matrix metalloproteinases: MMPs) ที่สร้างและหลั่งโดยเซลล์ในเนื้อเยื่อปริทันต์มีบทบาทที่สำคัญต่อกระบวนการทำลายเนื้อเยื่อในโรคปริทันต์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารหลั่งจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดรวมหลายสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตโดยเพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ และสารหลั่งจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)* รวมถึงผลของไลโพโพลีแซคคาไลด์ (lipopolysaccharide, LPS) ที่สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. gingivalis* ต่อการสร้างและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือก (HGF) และเอ็นยึดปริทันต์ (HPDL) ของมนุษย์ เซลล์ HGF และ HPDL ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีและไม่มีสารหลั่งจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดรวมหลายสายพันธุ์หรือสารหลั่งจาก *P. gingivalis* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอนำรหัส (mRNA) ด้วยเทคนิค RT-PCR และ การสร้างโปรตีนชนิด MMP-2 ด้วยการวิเคราะห์ทางเวสเทิร์น (Western analysis) และศึกษาผลการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ด้วยเทคนิคไซโมกราฟี (Zymography) ผลการศึกษาพบว่าสารหลั่งจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดรวมหลายสายพันธุ์และสารหลั่งจาก *P. gingivalis* สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 โดยการกระตุ้นนี้ไม่มีผลต่อการการเปลี่ยนแปลงของอาร์เอ็นเอนำรหัสและระดับของโปรตีน MMP-2 กลไกการกระตุ้นนี้สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารยับยั้งการทำงานของนิวเคลียร์แฟคเตอร์-แคบปาบี (NF-kB) และสารคีเลต (EDTA, phenanthroline) ในขณะที่ตัวยับยั้งการทำงานเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรตีเอส (aprotinin, PMSF) ไม่มีผลยับยั้งการกระตุ้นดังกล่าว ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ HGF และ HPDL สามารถตอบสนองต่อสารหลั่งจากแบคทีเรียได้โดยตรงและทำให้ระดับ MMP-2 ที่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำงานเพิ่มสูงขึ้น ในการทดลองถัดมาเป็นการศึกษาผลของ LPS ที่สกัดจาก *P. gingivalis* ที่มีต่อเซลล์ HGF และ HPDL พบว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ได้โดยใช้กลไกที่แตกต่างจากการกระตุ้นโดยสารหลั่งจากแบคทีเรีย เนื่องจากกลไกการกระตุ้นเอนไซม์ MMP-2 ด้วย LPS นั้น ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วยสารคีเลต ส่วนสารยับยั้ง NF-kB จะสามารถยับยั้งการกระตุ้นเอนไซม์ MMP-2 ได้เพียงบางส่วน นอกจากนี้ผลของ LPS ที่สกัดจาก *P. gingivalis* สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ได้โดยตรงและกลไกนี้ถูกยับยั้งได้โดย aprotinin และ PMSF แสดงให้เห็นว่า LPS ที่สกัดจาก *P. gingivalis* สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ได้ 2 ทาง คือผ่านการทำงานของ NF-kB และผ่านการกระตุ้นโดยตรงด้วย serine protease activity ของ LPS ผลของการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทที่สำคัญของสารหลั่งจากแบคทีเรียแกรมลบชนิดรวมหลายสายพันธุ์และสารหลั่งจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. gingivalis* รวมทั้ง LPS ของ *P. gingivalis* ที่มีผลโดยตรงต่อเซลล์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยสามารถเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ที่สร้างและหลั่งจากเซลล์สร้างเส้นใย HGF และ HPDL นำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่ออย่างเรื้อรังในโรคปริทันต์

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ชีววิทยาช่องปาก ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4276451232: MAJOR ORAL BIOLOGY
KEY WORDS: MATRIX METALLOPROTENASE-2 ACTIVATION / ANAEROBIC BACTERIA / SUPEERNATANT / PORPHYROMONAS GINGIVALIS
KASSARA PATTAMAPUN: ACTIVATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) BY SUPERNATANT OF ANAEROBIC BACTERIA CULTIVATED FROM PERIODONTAL POCKETS
THESIS ADVISOR: ASSO. PROF. PRASIT PAVASANT, Ph.D.,
THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. JINTAKORN KUVATANASUCHATI,
166 pp. ISBN 974-17-2762-3

It has been reported that host-derived enzymes, matrix metalloproteinases (MMPs), play a major role in periodontal tissue destruction. The purpose of this study was to examine the effects of bacterial supernatant from mixed gram-negative anaerobic bacteria and *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)* cultivated from periodontal pockets and lipopolysaccharide (LPS) of *P. gingivalis* on expression and activation of MMP-2 in culture of human gingival fibroblasts (HGF) and human periodontal ligament (HPDL) cells. HGF and HPDL were treated with supernatant of mixed gram-negative anaerobic bacteria or supernatant of *P. gingivalis* for 48 hours. RT-PCR and Western analysis were used to analyze MMP-2 expression at transcriptional and translational level, respectively. The level of MMP-2 activation was monitored by gelatin zymography. It was found that supernatant of mixed gram-negative anaerobes and supernatant of *P. gingivalis* could induce MMP-2 activation, but could not alter the mRNA and protein levels of MMP-2. The MMP-2 activation was inhibited by NF-kB inhibitor and metal chelating agents (EDTA, phenanthroline), but not by serine protease inhibitor (aprotinin, PMSF). These results indicated that HGF/HPDL could directly response to the bacterial supernatant by demonstrating the active form of MMP-2. The next experiment, HGF and HPDL were treated with LPS extracted from *P. gingivalis* for 48 hours. The results indicated that *P. gingivalis* LPS could induce MMP-2 activation in both cell types. The mechanism of MMP-2 activation induced by LPS was different from those induced by the supernatant, since the activation process was not inhibited by EDTA or phenanthroline. However, it can be partially inhibited by NF-kB inhibitor and completely blocked by serine protease inhibitor. In addition, LPS induced MMP-2 activation was inhibited by aprotinin and PMSF. These results revealed that the ability of LPS to activate MMP-2 may occur through 2 different pathways, the NF-kB dependent pathway and the serine protease-dependent pathway. In conclusion, bacterial supernatant of mixed gram-negative anaerobes and *P. gingivalis*, and LPS of *P. gingivalis* can activate MMP-2 in HGF and HPDL cells by different mechanism. It is possible that secreted bacterial products of gram-negative anaerobes and *P. gingivalis* play a crucial role in periodontal tissue destruction, by directly activate MMP-2 secreted from HGF and HPDL cells.

Student's signature Kassara Pattamapun

Field of study Oral Biology

Advisor's signature Prasit Pavasant

Academic year 2002

Co-Advisor's signature Jintakorn Kuvatanasucha

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude and sincere appreciation to my adviser Associate Professor Dr. Prasit Pavasant, Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, for his guidance, encouragement, supervision, suggestion, and kindness support throughout both of the course of Master degree program and Doctoral degree program. He deserves my deepest appreciation for his advice, never endless ideas, generosity, patience and the precious time and the energy he spent on my work throughout the course. I am extremely indebted to my co-adviser, Associate Professor Jintakorn Kuvatanasuchati, Department of Microbiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, for providing the laboratory facilities and for his grateful guidance, supervision, valuable technical advice and kindness.

I would like to thanks my thesis committee members; Associate Professor Dr. Anak Iamaroon, Department of Odontology and Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chiangmai University, Associate Professor Dr. Jeerasak Nopakun, Associate Professor Dr. Ratana serinirach, and Dr. Neeracha Sanchavanakit for their suggestion and kindness in being committee members.

I greatly appreciate Associate Professor Tussanee Yongchaitrakul for her helpful suggestion, guidance, and kindness support throughout my work. Grateful thanks to Associate Professor Dr. Apiwat Mutirangkul, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for the knowledge in Cell Biology and Molecular Biology in Medicine, all of these are worth recognizing.

Sincere appreciation is expressed to Associate Professor Dr. Erik W. Thompson, Head of invasive and metastasis unit, St. Vincent's Institute of Medical Research, Melbourne, Australia, who took on the responsibility in valuable technical training, guidance, suggestion, understanding and kindness support. I never forget the sincere friendship from Dr. Marc Lafleur, who gives the best care, suggestion and high working standard in all steps of laboratory experiments.

I am indebted to a group of special friends whose warmest friendship has enormously inspired me and made this thesis possible. These people include Malee Saegauy, Dr. Dumrong Dumrongsri, Thanomsri Anantaworanit, Siriluck Tiranathanagul, Rungaroon Kraingkrai, Noppadol Sa-Ard-Iam and all staffs in Department of Oral Surgery, Anatomy, Periodontology, and Biochemistry. Grateful thanks to Sakornrat Kongkuntein, Somran Suparee and Prayuth Seesuaihoot for their helpful suggestions, kindness and warmest friendship. Starting to culture anaerobes would have been greatly difficult without their valuable technical advice. For others whose names are not mentioned, this success will always be theirs as well.

I would like to acknowledge The Government of Thailand for financial support. This thesis was made possible by research grant from National Research Council of Thailand. I am grateful to Chiangmai University for giving me a chance to study in this program.

Finally, I would like to express my appreciation to my father, mother and my sister for their endless love, caring, understanding, encouragement and support. All of these are expressed from a bottom of my heart.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai).....iv

Abstract (English).....v

Acknowledgements.....vi

Table of contents.....vii

List of tables.....x

List of figures.....xi

Abbreviations.....xiii

Chapter

1.General introduction.....1

1.1 Introduction.....1

1.2 Pathogenesis of periodontal tissue destruction.....2

1.2.1 Pathogenesis of gingivitis.....2

1.2.2 Pathogenesis of periodontitis.....4

1.3 Microbial aspects of periodontal disease.....4

1.4 Pathogenic strategies of *Porphyromonas gingivalis*.....5

1.4.1 Entry to oral cavity.....6

1.4.2 Adherence to oral surface and adhesin molecules.....6

1.4.3 Ability of hemagglutination.....8

1.4.4 Nutrient acquisition: peptide and hemin.....9

1.4.5 Potentially destructive compounds.....11

1.5 Host response to plaque microorganism.....12

1.6 Mechanism of alveolar bone destruction in periodontal disease.13

1.7 Matrix metalloproteinases (MMPs)..... 15

1.7.1 Classification of MMPs..... 16

1.7.2 Regulation of MMP function.....16

1.7.3 MMPs in human periodontal disease.....17

1.8 Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2).....18

1.9 Problem and hypothesis.....20

1.10 Specific Aims.....21

2. Activation of MMP-2 by bacterial supernatant cultivated from periodontal pocket.....29

2.1 Introduction.....29

2.2 Materials and methods.....33

2.3 Results.....37

2.4 Discussion 38

3. Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* supernatant in human periodontal ligament cells and gingival fibroblast.....47

3.1 Introduction.....47

3.2 Materials and methods.....51

3.3 Results.....60

3.4 Discussion.....64

4. The effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on MMP-2 activation.....88

4.1 Introduction.....88

4.2 Materials and methods.....92

4.3 Results.....97

4.4 Discussion.....100

5. General discussion and Future Works.....118

References.....129

Appendix

A. Gram-stain.....155

B. LPS extraction.....158

C. Rapid ID 32 A.....159

D. E-TOXATE test.....161

E. Standard curve of MTT assay :PDL and GF.....164

Vita.....166

LIST OF TABLES

Page

Table 1.1 Commom matrix metalloproteinase substrates.....25

Table 4.1 Endotoxin activity measurement by E-TOXATE.....106

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1.1 Domain structure of MMPs.....21

Figure 2.1 Cytotoxicity of mixed anaerobe supernatant.....41

Figure 2.2 Dose relationship of mixed anaerobe supernatant on MMP-2 activation.....41

Figure 2.3 Effect of metal chelating agent (EDTA) on MMP-2 activation.....43

Figure 2.4 Effect of supernatant of bacteria sampling from three patients on MMP-2 activation.....43

Figure 3.1 Black-pigmented colonies.....68

Figure 3.2 Rapid ID 32 A

A. Dehydrated substrates.....71

B. Recorded sheet.....71

Figure 3.3 Genetic identification by Polymerase Chain Reaction (PCR).....72

Figure 3.4 Effect of *P. gingivalis* supernatant

A. Cytotoxicity of *P. gingivalis* supernatant.....74

B. Zymography of MMP-2 activation by *P. gingivalis* supernatant.....74

Figure 3.5 Gelatin zymography of MMP-2 activation in HGF and HPDL cell.....76

Figure 3.6 Gelatin zymography of MMP-2 activation by supernatant of reference and clinical isolated strains.....76

Figure 3.7 Effect of *P. gingivalis* supernatant on MMP-2 expression

A. RT-PCR.....78

B. Western analysis.....78

Figure 3.8 Effect of heat treatment on *P. gingivalis* supernatant.....80

Page

Figure 3.9 Effect of protease inhibitors on MMP-2 activation by *P. gingivalis* supernatant.....82

Figure 3.10 Effect of NF-kB inhibitor on MMP-2 activation by *P. gingivalis* Supernatant.....84

Figure 4.1 Isolation of *P. gingivalis* lipopolysaccharide 102

Figure 4.2 Silver stain of *P. gingivalis* lipopolysaccharide.....102

Figure 4.3 Effect of *P. gingivalis* lipopolysaccharide

A. Cytotoxicity of *P. gingivalis* lipopolysaccharide.....108

B. Dose response relationship of *P. gingivalis* lipopolysaccharide on MMP-2 activation.....108

Figure 4.4 Effect of protease inhibitors on MMP-2 activation by *P. gingivalis* Lipopolysaccharide

A. Gelatin zymography.....110

B. Cytotoxicity of protease inhibitors.....110

Figure 4.5 Effect of NF-kB inhibitor on MMP-2 activation by *P. gingivalis* lipopolysaccharide.....112

Figure 4.6 Effect of *P. gingivalis* lipopolysaccharide on direct MMP-2 activation..114

Figure 5.1 Model of MMPs in periodontal tissue destruction.....126

ABBREVIATIONS

DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	2,3-Dihydroxybutane-1,4-dithiol
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HGF	human gingival fibroblasts
HPDL	human periodontal ligament cells
IL-1	interleukin-1
LPS	lipopolysaccharide
MMPs	matrix metalloproteinases
NF-kB	nuclear factor-kappa B
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
TGF-β	transforming growth factor -beta
TIMPs	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF-α	tissue necrosis factor-alpha
TSA	tryptic soy agar
TSB	tryptic soy broth
SN	supernatant