ว ทันต จุฬาฯ 2544;24:145-54

คอลลาเจนชนิดที่ I : การสร้างและการควบคุม

พสุธา ธัญญะกิจไพศาล ท.บ. (เกียรตินิยม), Ph.D.

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

คอลลาเจนชนิดที่ I เป็นโปรตีนชนิดเส้นใยแบบไม่ละลาย ที่พบมากที่สุดในกระดูก เนื้อฟัน ผิวหนังแท้และเอ็นกล้ามเนื้อ ในบทความปริทัศน์นี้ จะเน้นถึงกลไกการสร้างและการควบคุมคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งประกอบไปด้วย กระบวนการถอดรหัสพันธุกรรมเพื่อสร้างสายอาร์เอ็นเอนำรหัส การเคลื่อนย้ายสายอาร์เอ็นเอนำรหัสจากนิวเคลียสไปสู่ไซโทพลาสซึม, การแปลสัญญาณของนิวคลีโอไทด์บนอาร์เอ็นเอนำรหัสไปเป็นสายคอลลาเจน และการปรับปรุงสายคอลลาเจนเพื่อให้เหมาะสมกับการทำงาน การมีส่วนเกี่ยวข้องของนิวเคลียร์โปรตีน อาทิเช่น Sp1, CAT binding protein (CBF), NF-I และ NP/NMP4 ในการควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรม รวมทั้งการศึกษาที่นำไปสู่แนวความคิดที่เสนอว่าเซลล์ของแต่ละเนื้อเยื่อมีการสร้างและควบคุมคอลลาเจนชนิดที่ I ที่แตกต่างกัน ดังนั้น ความรู้ที่ได้จึงอาจนำมาประยุกต์ใช้ ในการป้องกันการเกิดโรคเช่น ภาวะเกิดพังผืด ภาวะกระดูกพรุน และโรคปริทันต์อักเสบ

(ว ทันต จุฬาฯ 2544;24:145-54)

บทนำ

คอลลาเจนเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญและพบมากที่สุดในร่างกาย ปัจจุบันมีการค้นพบคอลลาเจนถึง 19 ชนิด[1] ที่มีโครงสร้างส่วนประกอบและแหล่งที่พบแตกต่างกันออกไป เมื่อพิจารณาจากรูปร่างลักษณะโครงลักษณะของโปรตีนสามารถแบ่งคอลลาเจนได้เป็น กลุ่ม[1] คือ

กลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใย (fibril form) ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ I,II,III,V และ XI

กลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นตาข่าย (network-like structres) ได้แก่คอลลาเจนชนิดที่ IV, VIII และ X

กลุ่มที่พบบนพื้นผิวร่วมกับคอลลาเจนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใย (fibril-associated form) ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ VI, IX, XII, XIV, และ XIX

กลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใยยึดเกาะกับเยื่อฐาน (anchoring fibril form) ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ VII

กลุ่มที่มีโครงสร้างสามารถยึดกับเมมเบรน (collagen with a transmembrane domain) ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ XII และ XVII ในการจัดกลุ่มนี้ จะไม่รวมคอลลาเจนชนิดที่ XV และ XVIII เนื่องจากคอลลาเจนทั้งสองชนิดเพิ่งถูกค้นพบทำให้ต้องการข้อมูลเพิ่มในการจัดกลุ่ม

ในบทความนี้ จะเน้นถึงคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พบมากที่สุดในกระดูก, เนื้อฟัน (dentin), ผิวหนังแท้ (dermis) และเอ็นกล้ามเนื้อ (tendon) และพังผืด (fascia) โดยเฉพาะ type I collagen alpha 1(COL1A1) ในแง่ของการสร้างและควบคุมการผลิตในระดับอาร์เอ็นเอนำรหัส (translation) จากจีน (gene) การแปลและสร้างสายโปรตีนคอลลาเจนจากอาร์เอ็นนำรหัส (translation) รวมทั้งการปรับเปลี่ยนสายโมเลกุล

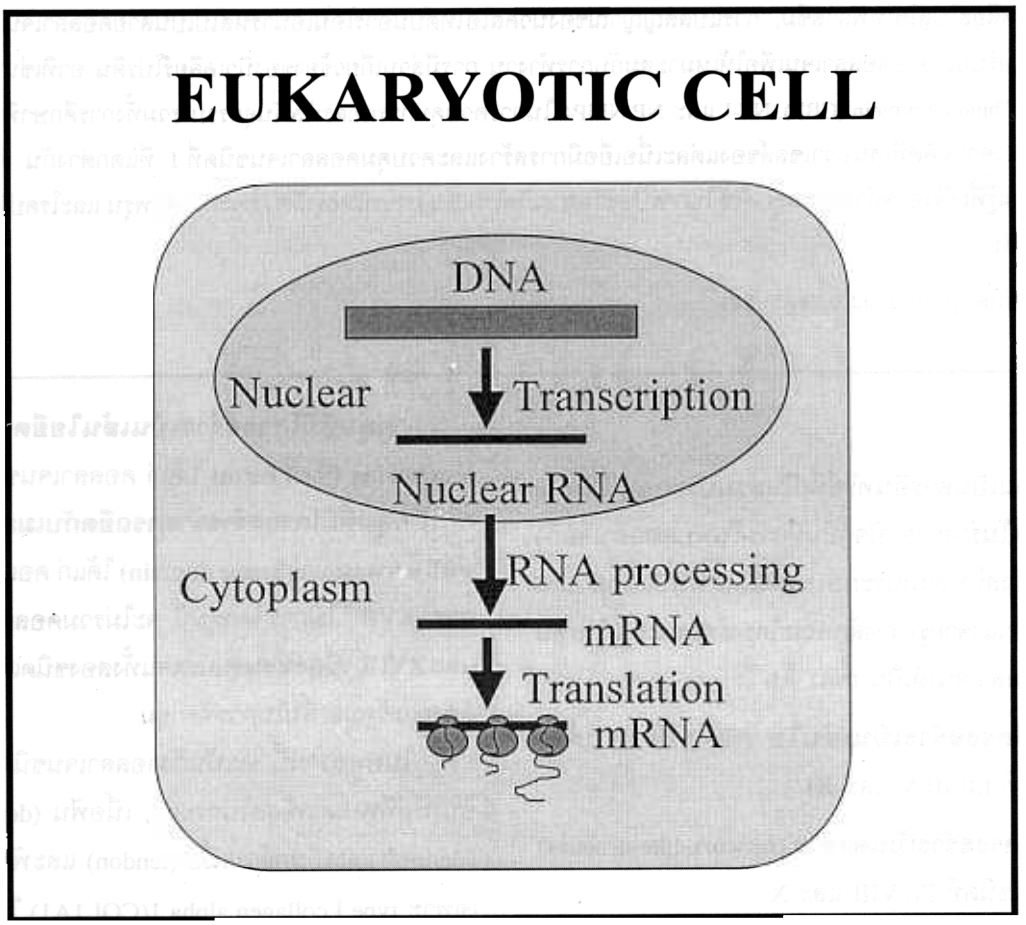
ของคอลลาเจนก่อนที่จะหลั่งออกจากเซลล์ (post-translation modification)

ทบทวนวรรณกรรม

การสร้างและปรับเปลี่ยนสายโมเลกุลของคอลลาเจนชนิดที่ I (Biosynthesis : translation and post-translation regulation of type I colllagen)

ในระดับโมเลกุล คอลลาเจนประกอบด้วยสายพอลีเพ็บไทด์ (polypeptide) 3 สายที่พันเกลียวซึ่งกันและกัน (triple helix) โดยประกอบด้วย 2 สายของ α1(I) *[COL1A1]* และ 1 สายของ α2 (I) *[COL1A2]* ซึ่งสร้างจากจีนคอลลาเจน COL1A1 พบอยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 17 และจีนคอลลาเจน COL1A2 พบอยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 7^2 สายโปรตีนของคอลลาเจนจะมีลักษณะโดยที่ X และ Y ส่วนใหญ่เป็นโพรลีน (proline) และไฮดรอกซิลโพรลีน (hydroxylproline) ตามลำดับ โครงสร้าง G-X-Y domain จะพบเรียงซ้ำต่อกันไปตลอดสายโปรตีนคอลลาเจน การที่มีไกลซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุดอยู่ในสายโมเลกุลทำให้เหมาะสมกับโครงสร้างของคอลลาเจนที่สายโปรตีนพันเกลียวซึ่งกันและกัน

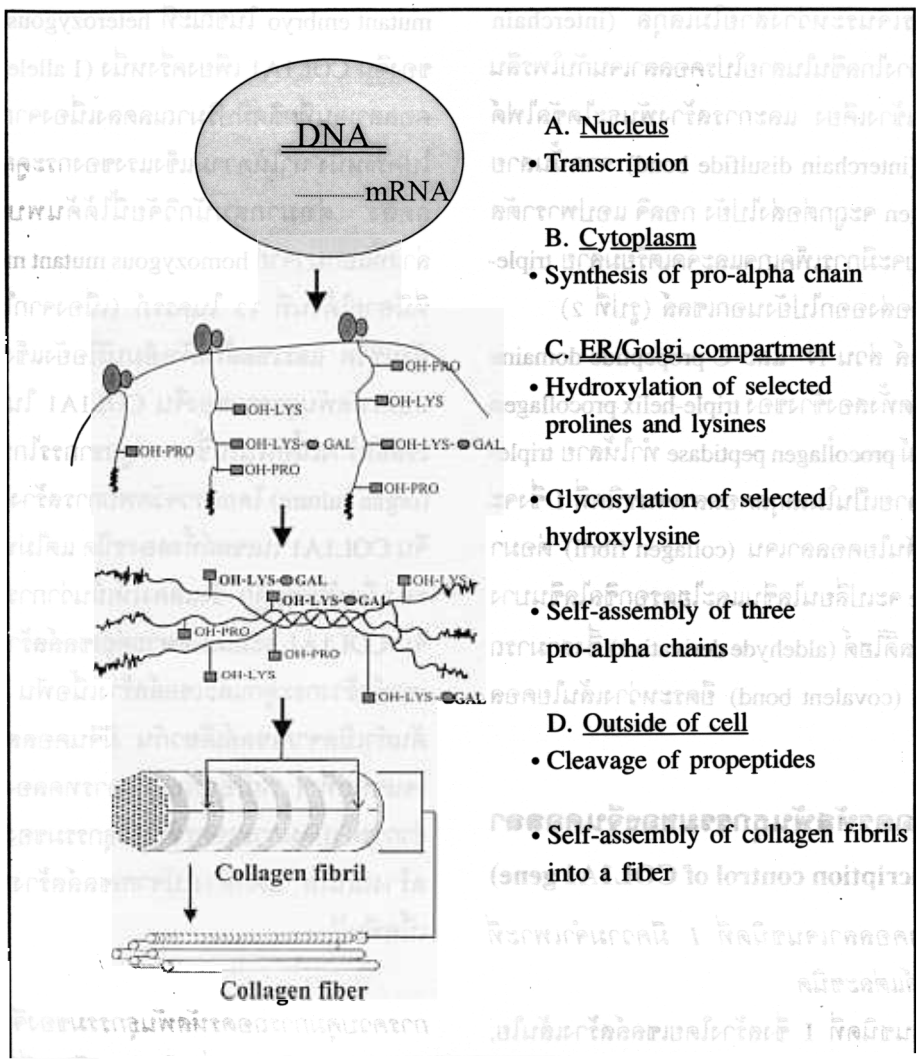
คอลลาเจนชนิดที่ I ส่วนใหญ่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast), เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) และเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) โดยจีนคอลลาเจนจะมีการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) ได้เป็น pre-mRNA และมีการดัดแปลง (post-transcription modification) เพื่อเพิ่มความทนทานต่อการถูกย่อยสลายและได้รูปแบบของอาร์เอ็นเอนำรหัสที่เหมาะสม (stability and maturation) ก่อนที่จะถูกเคลื่อนย้ายจากนิวเคลียสไปยังไซโทพลาสซึม เพื่อที่จะอ่านรหัสของกรดอะมิโนบนอาร์เอ็นเอนำรหัสและแปลเป็นสายโปรตีนต่อไป (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การถอดรหัสของจีนและการปรับปรุงสายอาร์เอ็นเอนำรหัสภายในนิวเคลียส การแปลรหัสของอาร์เอ็นเอนำรหัสไปสู่สายโปรตีนเกิดในส่วนไซโทพลาสซึมของเซลล์

Fig.1 Diagram of the transcription process of gene and post-transcription modification of mRNA in nucleus. The translation process of mRNA into protein molecule occurs in cytoplasm.

ในไซโทพลาสซึม สายอาร์เอ็นเอนำรหัสของคอลลาเจนจะถูกอ่านและแปล เพื่อผลิตเป็นสายโปรตีนโมเลกุลของ α1(I) และ α2(I) ในรูปแบบที่เรียกว่าพรีโปรคอลลาเจน (preprocollagen) ด้วยการทำงานร่วมกันของอาร์เอ็นเอถ่ายโอน (t-RNA) และโพลีไรโบโซม (polyribosome) บนพื้นผิวของ rough endoplasmic reticulum (RER) และขณะที่มีการอ่านรหัสของกรดอะมิโนจากอาร์เอ็นเอนำรหัส สายโมเลกุลพรีโปรคอลลาเจนจะถูกเคลื่อนย้ายเข้าไปภายใน RER ด้วยสัญญาณชักนำ (signal sequence) ซึ่งอยู่ตรงปลายทางด้าน N-terminus ของโมเลกุล โดยทั่วไปโปรตีนที่สร้างเพื่อผลิตออกนอกเซลล์จะมีสัญญาณชักนำซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มกรดอะมิโนพวก hydrophobic, nonpolar amino acid เมื่อสายพรีโปรคอลลาเจน เข้าไปภายใน RER แล้ว สัญญาณชักนำจะถูกตัดออกจากสายโปรตีนด้วยเอนไซม์ signal peptidase ที่อยู่บนเยื่อหุ้มของ RER จะทำให้สายพรีโปรคอลลาเจนกลายเป็นโปรคอลลาเจน (procollagen) ซึ่งประกอบด้วย N-propeptide, N-telopeptide, triple helical assembly, C-telopeptide และ C-propeptide domains โดยที่ส่วน triple helical assembly จะประกอบด้วย G-X-Y repeated domain ที่จำเป็นต่อการรวมตัวกับอีกสองสายโมเลกุลคอลลาเจนเป็น triple helix ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น



รูปที่ 2 การรวมตัวของของสายโปรตีนคอลลาเจน และการไฮโดรซิเลชั่นและไกลโคซิเลชั่น OH-PRO, ไฮโดรซิลโพรลีน; OH-LYS, ไฮโดรซิลไลซีน; GAL, กาแลกโตส; GLU, กูลโคส.

Fig.2 Diagram of the assembly of the triple helix and the hydroxylation and glycosylation of a procollagen molecule. OH-ORO, hydroxy proline; OH-LYS, hydroxylysine; GAL, galactose; GLU, glucose.

ภายใน RER สายโปรคอลลาเจนจะถูกดัดแปลงโดยการเพิ่มกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxylation) ที่โพรลีนและไลซีนบางตัวด้วยเอนไซม์ hydroxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ต้องการ ascorbic acid เป็น cofactor การขาด ascorbic acid จะทำให้การเพิ่มกลุ่มไฮดรอกซิลของสายคอลลาเจนไม่สมบูรณ์ และทำให้หลอดเลือดเปราะบาง เลือดออกได้ง่าย (scurvy) หลังจากการเพิ่มกลุ่มไฮดรอกซิล จะมีการเพิ่มสารพวกน้ำตาล (glycosylation) ในบางตัวของไฮดรอกซิลไลซีน จากนั้น 2 โมเลกุลของสายโปรคอลลาเจน α1(I) และ 1 โมเลกุลของสายโปรคอลลาเจน α2(I) จะเริ่มพันเกลียวรวมตัวกันเป็น triple helix โดยเริ่มจาก C-terminus ไปยัง N-terminus โครงสร้างนี้จะยึดติดแน่นด้วยการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโมเลกุล (interchain hydrogen bond) ระหว่างไกลซีนในสายโปรคอลลาเจนกับโพรลีนในสายโปรคอลลาเจนข้างเคียง และการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสายโมเลกุล (interchain disulfide bond) จากนั้นสาย triple-helix procollagen จะถูกต่อส่งไปยัง กอลจิ แอปพาราตัส (Golgi apparatus) โดยจะมีการเพ็คเกจและจัดเตรียมสาย triple-helix procollagen เพื่อส่งออกไปยังนอกเซลล์ (รูปที่ 2)

เมื่ออยู่นอกเซลล์ ส่วน N- และ C-propeptide domains ซึ่งอยู่ทางด้านปลายสุดทั้งสองข้างของ triple-helix procollagen จะถูกกำจัดโดยเอนไซม์ procollagen peptidase ทำให้สาย triple-helix procollagen กลายเป็นโมเลกุลคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งจะรวมตัวกันกลายเป็นเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibril) ต่อมาเอนไซม์ lysyl oxidase จะเปลี่ยนไลซีนและไฮดรอกซิลไลซีนบางตัวเป็นอนุพันธ์กลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehyde derivative) ซึ่งสามารถสร้างพันธะโคเวเลนซ์ (covalent bond) ยึดระหว่างเส้นใยคอลลาเจน

การควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรมของจีนคอลลาเจนชนิดที่ I (trancription control of COL1A1 gene)

การควบคุมการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I มีความจำเพาะที่แตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละชนิด

แม้ว่าคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งสร้างโดยเซลล์สร้างเส้นใย, เซลล์สร้างเนื้อฟัน และ เซลล์สร้างกระดูกจะประกอบไปด้วยสายพันธุกรรม (genome) เดียวกัน แต่การควบคุมการผลิตกลับมีความจำเพาะในเซลล์แต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น พาราไทรอยด์ฮอร์โมน (PTH) และวิตามินดี มีผลต่อการสร้างคอลลาเจนในเซลล์สร้างกระดูก ที่แยกมาจากกะโหลกศีรษะของเอ็มบริโอหนู เม้าส์ และ osteoblast cell line[4-8] แต่พาราไทรอยด์ฮอร์โมนไม่มีผลต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่แยกจากเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) และ fibroblast cell line[6-8]

กลุ่มนักวิจัยจากประเทศออสเตรีย[9-11] ได้ตีพิมพ์ถึงการทดลองที่ใช้จีนของไวรัส Moloney leukemia provirus แทรกลงไปในจีน COL1A1 ของกลุ่มหนูทดลอง ซึ่งพบว่า homozygous mouse embryo *Mov 13* ที่มีการกลาย (mutaion) ของจีน COL1A1 ทั้งหมด (2 allele) จะตายเมื่ออายุได้วันที่ 14 ในครรภ์ เนื่องจากการตายของเนื้อเยื่อตับ (liver necrosis) นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I ถูกยับยั้ง โดยไม่พบอาร์-เอ็นเอนำรหัสของจีน COL1A1 ในเนื้อเยื่อของ homozygous mutant embryo ในขณะที่ heterozygous mouse ที่มีการกลายของจีน COL1A1 เพียงครึ่งหนึ่ง (1 allele) สามารถรอดชีวิตแต่คอลลาเจนที่ผลิตมีปริมาณลดลงเนื่องจากสูญเสียจีน COL1A1 ไปครึ่งหนึ่ง ทำให้ความแข็งแรงของกระดูกในการรองรับน้ำหนักลดลง ต่อมากลุ่มนักวิจัยนี้ได้ค้นพบว่ากระดูกขากรรไกรล่างที่แยกมาจาก homozygous mutant mouse embryo *Mov 13* ที่มีอายุได้วันที่ 13 ในครรภ์ (เนื่องจากในวันที่ 13 เอ็มบริโอยังมีชีวิต และเซลล์ในตัวเอ็มบริโอยังแข็งแรงอยู่) พบว่ามีการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 ในเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สร้างเนื้อฟันในชิ้นกระดูกขากรรไกรล่างในสารเพาะเลี้ยง (organ culture) โดยตรวจวัดพบการสร้างอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีน COL1A1 ในเซลล์ทั้งสองชนิด แต่ไม่พบในเซลล์สร้างเส้นใยของเยื่อหุ้มกระดูก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแทรกจีนไวรัสลงไปในจีน COL1A1 จะมีผลเฉพาะต่อเซลล์สร้างเส้นใย แต่ไม่มีผลต่อเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สร้างเนื้อฟัน ทั้งๆ ที่เซลล์เหล่านี้มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียวกัน มีจีนคอลลาเจนและผลิตคอลลาเจนชนิดที่ I เหมือนกัน ผลการทดลองนี้ได้เสนอแนะให้เห็นว่าการควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 ในเซลล์สร้างเส้นใย แตกต่างไปจากเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สร้างเนื้อฟัน[12]

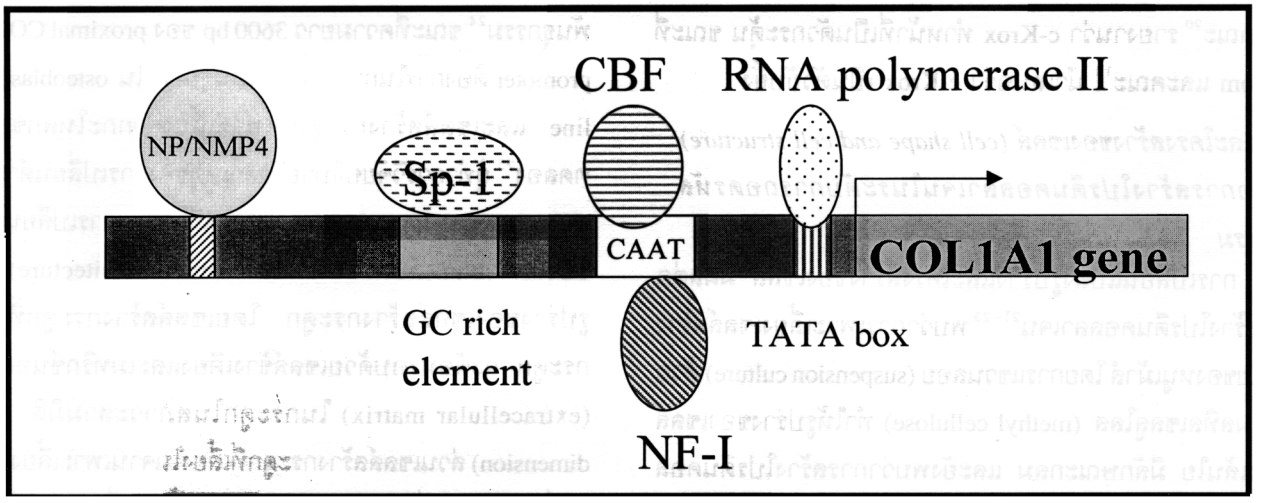
การควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 ประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส ที่มีชื่อเรียกว่า transcription factor และ ส่วนของสายพันธุกรรมที่อยู่ทางด้าน 5'-phosphate ของจีน COL1A1

การถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 ถูกควบคุมโดยการทำงานร่วมกันกลุ่มของโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส ที่เรียกว่า

transcription factor กับส่วนของสายดีเอ็นเอ (DNA) ที่อยู่ทางด้าน 5´-phosphate ของจีน COL1A1 ที่เรียกว่า cis-regulatory element หรือ promoter (รูปที่ 3) โดยที่โปรตีน transcription factor จะมีความจำเพาะในการจับกับ cis-regulatory element ซึ่งมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่เฉพาะเจาะจง โดยนิวคลีโอไทด์จะประกอบด้วย A, C, G และ T ด้วยโครงสร้างพิเศษของโปรตีน transcription factor ที่เรียกว่า DNA-binding domain ซึ่งสามารถแยกแยะความแตกต่างของกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ และเลือกจับเฉพาะกับส่วนของสายดีเอ็นเอที่มีกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บน cis-regulatory element (mutation) จะทำให้ transcription factor สูญเสียความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ RNA polymerase ที่ใช้ในการสร้างอาร์เอ็นเอนำรหัส จะจับกับดีเอ็นเอ ในบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของเฉพาะที่มีชื่อเรียกว่า TATA box ซึ่งประกอบด้วย TATAAT การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ TATA box จาก T เป็น C หรือ G จะทำให้เอนไซม์ RNA polymerase ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอตรงบริเวณ TATA box และไม่สามารถสร้างอาร์เอ็นเอนำรหัส โดยทั่วไปกลุ่มโปรตีน transcription factor อาจจะแบ่งตามหน้าที่ในการควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรม โดยอาจเป็นตัวกระตุ้น (inducer/stimulator) หรือตัวยับยั้ง (inhibitor/suppressor) ดังนั้นการศึกษาเพื่อค้นหาตำแหน่งของ cis-regulatory element ที่มีผลต่อการควบคุมถอดรหัสพันธุกรรมของจีนและ การค้นพบ transcription factor ที่จับบน cis-regulatory element นั้น ย่อมทำให้การควบคุมจีนเป็นไปอย่างจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพ

ได้มีการศึกษาค้นหาตำแหน่งของ cis-regulatory element หรือ promoter ที่สำคัญต่อการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 จากกลุ่มของหนูทดลองที่มีการตัดต่อส่วนของ promoter ของจีน COL1A1 (transgenic mice)[13,14] ซึ่งพบว่าเซลล์ที่สร้างคอลลาเจนแต่ละชนิด ต้องการส่วนของ promoter ที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น promoter ของจีน COL1A1 ยาว 2300 basepair (bp) จากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสพันธุกรรม พบว่าเพียงพอต่อสร้างคอลลาเจนในเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สร้างเนื้อฟัน ขณะที่เซลล์สร้างเส้นใย ที่พบในเอ็นกล้ามเนื้อต้องการ promoter ที่ยาว 3600 bp จึงจะเพียงพอต่อการผลิตคอลลาเจน แต่เซลล์ที่สร้างเส้นใยของชั้นผิวหนังแท้กลับต้องการ promoter ที่ยาวเพียง 900 bp จากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสพันธุกรรม

ได้มีการรายงานถึงกลุ่มของ transcription factor และ cis-regulatory element บริเวณ 220 bp จากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสพันธุกรรม ที่มีบทบาทในการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 ในเซลล์สร้างเส้นใย (รูปที่ 3) อาทิเช่น CCAAT binding factor (CBF) และ Nuclear Factor-I (NF-I) ที่จับ



รูปที่ 3 รูปแสดงบริเวณ promoter ของยีนคอลลาเจนชนิดที่ I และนิวเคลียร์โปรตีนที่เกี่ยวข้อง NP/NMP4, นิวเคลียร์โปรตีน/นิวเคลียร์เมทริกซ์โปรตีน 4; CBF-1, CAAT ไบนดิ่งแฟคเตอร์-1; NF-I, นิวเคลียร์แฟคเตอร์-I

Fig.3 Diagram of the promoter of COL1A1 gene and transcription factors. NP/NMP4, Nuclear protein/Nuclear matrix Protein 4; CBF-1, CAAT binding factor-1; NF-I, Nuclear factor-I

บริเวณ promoter ที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์เป็น CCAAT[15,16] โปรตีน Sp-1 และ c-Krox ก็เป็น transcription factor ที่จำเพาะจับบริเวณ promoter ที่มีนิวคลิโอไทด์ เป็น G และ C เป็นส่วนใหญ่ (GC-rich element)[16-18] รวมทั้งโปรตีน Y-box[19] ที่พบว่าควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 และ COL1A2 โดยทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น

โปรตีน CBF และ NF-I ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น[15,16] การเพิ่มปริมาณของโปรตีนทั้งสองชนิดทำให้การถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 เพิ่มขึ้น ส่วน Sp-1 ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง การเพิ่มปริมาณโปรตีน Sp-1 ทำให้การถอดรหัสพันธุกรรมลดลง เพื่อที่จะยืนยันหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ ได้มีการทดลองเพิ่มเติมโดยการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณ cis-regulatory element ที่ transcription factor เหล่านี้จับ โดยการเปลี่ยนจาก C และ G เป็น A และ T ตามลำดับ ทำให้โปรตีน CBF-NF-I และ Sp-1 ไม่สามารถจับกับ cis-regulatory element เฉพาะตัวได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้น กล่าวคือ การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ ที่ cis-regulatory element ของบริเวณที่จับของโปรตีน CBF หรือ NF-I ทำให้การถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 ลดลง ขณะที่การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ ที่โปรตีน Sp-1 จับกับ promoter ทำให้การถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 เพิ่มขึ้น ส่วนหน้าที่ของ c-Krox โปรตีน ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากผลการทดลองของนักวิจัยสองกลุ่มได้ผลที่ตรงข้ามกันโดย Galera และคณะ[20] รายงานว่า c-Krox ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น ขณะที่ Widom และคณะ[18] นำเสนอว่า c-Krox เป็นตัวยับยั้ง

รูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ (cell shape and cell structure) มีผลต่อการสร้างโปรตีนคอลลาเจนในระดับการถอดรหัสพันธุกรรม

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ มีผลต่อการสร้างโปรตีนคอลลาเจน[21-23] พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยของหนูเม้าส์โดยการแขวนลอย (suspension culture) ด้วยสารเมลทิลเซลลูโลส (methyl cellulose) ทำให้รูปร่างของเซลล์สร้างเส้นใย มีลักษณะกลม และยังพบว่าการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ I และระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของ COL1A1 ลดลงถึง 5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ชนิดเดียวกันที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยง ซึ่งเซลล์มีรูปร่างลักษณะเดียวเรียว ยิ่งไปกว่านั้นครึ่งชีวิต (half life) ของอาร์เอ็นเอนำรหัส COL1A1 จากเซลล์ที่เลี้ยงในสารเพาะเลี้ยงแขวนลอย มีค่าเพียงประมาณ 2 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง มีครึ่งชีวิตของอาร์เอ็นเอนำรหัสประมาณ 8 ชั่วโมง โดยเซลล์สร้างเส้นใยที่เลี้ยงโดยการแขวนลอยและจานเพาะเลี้ยงไม่พบการเปลี่ยน-แปลงของระดับไฟโบรเน็กติน (fibronectin) และเบต้าทูบูลิน (β-tubulin)[21-22] สำหรับเซลล์สร้างกระดูกอ่อน (chondrocyte) ที่แยกมาจากกระดูกอ่อนของกระต่าย เมื่อเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ซึ่งทำให้เซลล์มีรูปร่างลักษณะแบนคล้ายเซลล์สร้างเส้นใยและมีการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I แต่เมื่อนำเซลล์นี้จากจานเพาะเลี้ยงไปเลี้ยงโดยการแขวนลอย จะทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นรูปร่างกลมและกลับมาสร้างคอลลาเจนชนิดที่ II รวมทั้งผลิต cartilage-specific proteoglycan ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกอ่อน[23] จากผลการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้น อาจกล่าวได้ว่าการสร้างคอลลาเจน โดยเฉพาะโปรตีน *COL1A1* นั้นไว (sensitive) ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์

ในเซลล์สร้างกระดูก ได้มีการศึกษาโดยวิธีการตัดส่วนของ COL1A1 Promoter (5′ deletion construct) แล้วชักนำเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ของหนูทดลอง (transgenic mice) หรือชักนำอย่างถาวรเข้าไปในเซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยง (stably transfected osteoblast-like cell line) เพื่อหาตำแหน่งที่ควบคุมการถอดรหัสทางพันธุกรรมของจีน COL1A1 ในเซลล์สร้างกระดูก พบว่าสำหรับการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1 ในกระดูกของ transgenic mice นั้น ต้องการความยาวของ COL1A1 promoter ที่ 2300 bp จากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสพันธุกรรม[24] ขณะที่ความยาว 3600 bp ของ proximal COL1A1 promoter ต้องการในการถอดรหัสพันธุกรรมใน osteoblastic cell line และเซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงจากกะโหลกของหนูทดลอง[25] ผู้ทำการวิจัยอธิบายถึงสาเหตุของการเปลี่ยนตำแหน่งของ cis-regulatory element ว่าอาจเกิดจาก การเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมรอบตัวเซลล์ (microarchitecture) หรือรูปร่างของเซลล์สร้างกระดูก โดยเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ในกระดูก จะล้อมรอบด้วยเซลล์ข้างเคียงและเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ในกระดูกในสภาวะสามมิติ (three dimension) ส่วนเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงนั้นอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นเพียงสองมิติเท่านั้น ซึ่งอาจทำให้การทำงานของจีน COL1A1 ในเซลล์สร้างกระดูกแตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลที่ได้กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า รูปร่างของเซลล์และเมทริกซ์นอกเซลล์ มีผลต่อการสร้างโปรตีนคอลลาเจน ในระดับการถอดรหัสพันธุกรรมภายในนิวเคลียส

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ (cell shape และ cell structure) ที่มีผลต่อการสร้างคอลลาเจน อาจอธิบายได้ด้วยระบบ tissue matrix

Tissue matrix คือการเชื่อมต่อร่วมกันระหว่างเมทริกซ์นอกเซลล์กับภายในเซลล์กับภายในเซลล์รวมทั้งจีนในนิวเคลียส โดยอาศัยระบบโครงร่างที่สานกันเป็นตาข่าย (skeletal framework) ภายในตัวเซลล์ โดยเริ่มจากสารเมทริกซ์นอกเซลล์ที่อยู่รอบตัวเซลล์ อาทิเช่น คอลลาเจนและไฟโบเน็กติน จะยึดติดกับอินทิกริน (integrin) ซึ่งเป็น transmembrane protein อยู่ที่พื้นผิวของเซลล์ ส่วนปลายของอินทิกรินจะอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ (cytoplasmic domain) จะยึดต่อกับโครงร่างของเซลล์ (cytoskeleton) ที่ประกอบไปด้วย แอ็กติน (actin), ไมโครทูบบูลส์ (microtubule), ไมโครฟิลาเมนท์ (microfilament) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับแอ็กติน (actin associated protein) ดังนั้นอินทิกรินจึงทำหน้าที่คล้ายตัวกลางที่เชื่อมระหว่างสิ่งแวดล้อมภายนอกของเซลล์กับภายในของเซลล์ จากนั้นโครงร่างของเซลล์จะเชื่อมติดต่อกับภายในนิวเคลียส ด้วยนิวเคลียร์เมทริกซ์ (nuclear matrix) ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่ยึดเกาะกันเป็นโครงร่างที่สานกันเป็นตาข่ายอยู่ภายในนิวเคลียส ในนิวเคลียสนั้น ดีเอ็นเอหรือจีนวางอยู่บนนิวเคลียร์เมทริกซ์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงจากภายนอกของเซลล์ที่ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง ย่อมสามารถมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของนิวเคลียร์เมทริกซ์ โดยระบบของ tissue matrix และส่งผลต่อไปยังโครงสร้างของจีน รวมทั้งการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน[26-30]

นอกจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ จะมีผลต่อโครงสร้างของจีนแล้ว โปรตีนบางชนิดในนิวเคลียสยังอาจมีผลต่อโครงสร้างของจีนด้วย โดย Alvarez และคณะ[31,32] ได้ค้นพบโปรตีน *NP/NMP4* ซึ่งเป็น nuclear matrix-architectural transcription factor ซึ่งจับกับ COL1A1 promoter ระหว่าง 3489 bp ถึง 3434 bp (-3489/3434) และ ระหว่าง 1594 bp ถึง 1541 bp (-1594/1541) จากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสพันธุกรรมซึ่งเป็นบริเวณที่ต้องการในการถอดรหัสพันธุกรรมใน *in vivo* และ *in vitro* ตามลำดับ จากการทดลองขั้นต้นด้วยวิธีทดสอบความสามารถของโปรตีนในการดัดงอดีเอ็นเอ เมื่อจับกับ cis-regulatory element ของโปรตีนนั้นๆ (circular permutation assay) พบว่า *NP/NMP4* สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างของจีนได้โดยการบิดงอดีเอ็นเอ ซึ่งอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของจีนในนิวเคลียสและอาจส่งผลต่อการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL1A1[32]

จากการทำวิจัยของผู้เขียนขณะทำวิทยานิพนธ์[33] โดยการ clone, sequencing ของ *NP/NMP4* เป็น transcription factor ในกลุ่มตระกูล zinc-finger DNA binding domain ซึ่งพบว่ามีส่วนร่วมในการควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน COL A1 การกลายนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่จับของ *NP/NMP4* ทำให้การสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้นถึงสามเท่า ส่วนการเพิ่มปริมาณของโปรตีน *NP/NMP4* ในเซลล์สร้างกระดูก พบว่าการสร้างคอลลาเจนลดลงถึงสองหรือสามเท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *NP/NMP4* ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งต่อการสร้างคอลลาเจนในเซลล์สร้างกระดูก และ *NP/NMP4* อาจจะเป็นตัวที่เชื่อมต่อระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ที่ส่งผลไปยังโครงสร้างของสายพันธุกรรมและการถอดรหัสพันธุกรรมของจีน

สรุป

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้น ได้นำเสนอถึงการควบคุมการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I ทั้งในระดับการถอดรหัสพันธุกรรมเพื่อสร้างอาร์เอ็นเอนำรหัส, การแปลสัญญาณของอาร์เอ็นเอนำไปเป็นสายโปรตีน และการปรับปรุงสายคอลลาเจนเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งาน การทำงานร่วมกันของกลุ่ม transcription factors บน cis-regulatory element รวมทั้งสภาวะแวดล้อม (microarchitecture) และรูปร่างของเซลล์มีผลต่อการกำหนดทิศทางการถอดรหัสพันธุกรรมของคอลลาเจนชนิดที่ I การที่สามารถควบคุมการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I ได้ในระดับการถอดพันธุกรรม ดูจะเหมาะสมกว่าการที่จะควบคุมการสร้างคอลลาเจนในระดับการแปลสัญญาณของอาร์เอ็นเอนำไปเป็นสายโปรตีน และการปรับปรุงสายคอลลาเจนเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งาน ทั้งในแง่การประหยัดพลังงานและเวลาของเซลล์ ดังนั้นการที่สามารถเข้าใจ และควบคุมการสร้างคอลลาเจนได้เฉพาะเจาะจงในเซลล์แต่ละชนิด จะสามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้ ทั้งในแง่ของการรักษาและป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับคอลลาเจน อาทิเช่น ภาวะเกิดพังผืด ภาวะกระดูกพรุน และโรคปริทันต์อักเสบ ได้อย่างมีประสิทธิภาพและเฉพาะเจาะจงต่ออวัยวะกลุ่มเป้าหมาย โดยอาจจะเป็นการค้นหา transcription factor ที่พบเฉพาะในเซลล์สร้างกระดูก หรือเซลล์สร้างเส้นใย (tissue-specific) transcription factor) ซึ่งจะยิ่งก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการนำไปใช้ ตัวอย่างเช่น เราอาจสามารถกระตุ้นการสร้าง

คอลลาเจนในเซลล์กระดูกของผู้ป่วยที่มีภาวะกระดูกผุ โดยที่ไม่ต้องกังวลถึงผลข้างเคียง (side effect) ต่อเซลล์สร้างเส้นใย ซึ่งอาจทำให้การเกิดภาวะเกิดพังผืดได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. วิสาขะ ลิ่มวงศ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง ดอลลี่ เมธาธราธิป ที่ให้การสนับสนุน, ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์หญิง วันดี อภิณหสมิต, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ทัศนีย์ ยงชัยตระกูล, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์,อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. สุคนธา เจริญวิทย์, อาจารย์ทันตแพทย์ ดร. ดำรงค์ ดำรงค์ศรี, อาจารย์ทันตแพทย์หญิง กนกวรรณ จรูญภัทรพงษ์ และ ทันตแพทย์หญิง สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล ที่ให้คำแนะนำและ

เอกสารอ้างอิง

1. Prockop DJ, Kivirikko Kl. Collagen: molecular biology, disease, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 1995;64:403-34.
2. Rossert J, de Crombrugghe B. Principle of bone biology, chapter 10. San Diego. CA.: Academic press. 1996.
3. Kagan HM, Trackman PC. Properties and function of lysyl oxidase. Am J Respir Cell Mol Biol 1991;5:206-10.
4. Rowe DW, Kream BE. Regulation of collagen synthesis in fetal rat calvaria by 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Biol Chem 1982;257:8009-15.
5. Genovese C, Rowe D, Kream B. Construction of DNA sequences complementary to rat alpha 1 and alpha 2 collagen mRNA and their use in studying the regulation of type I collagen synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D. Biochemistry 1984;23:6210-6.
6. Kream BE, Rowe D, Smith MD, Maher V, Majeska R. Hormonal reguation of collagen synthesis in a clonal rat osteosarcoma cell line. Endocrinology 1986;119:1922-8.
7. Kream BE, Rowe DW, Gworek SC, Raisz LG. Parathyroid hormone alters collagen synthesis and procollagen mRNA levels in fetal rat calvaria. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:5654-8.
8. Lichter A, Stover ML, Angilly J, Kream B, Rowe DW. Isolation and characterization of the rat alpha 1 (I) collagen promoter. Regulation by vitamin D. J Biol Chem 1994;269:16518.
9. Schnieke A, Harbers K, Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the alpha 1 (I) collagen gene. Nature 1983;304:315-20.
10. Harbers K, Kuehn M, Delius H, Jaenisch R. Insertion of retrovirus into the first intron of alpha 1 (I) collagen gene to embryonic lethal mutation in mice. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:1504-8.
11. Lohler J, Timpl R, Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. Cell 1984;38:597-607.
12. Schwarz M, Harbers K, Dratochwil K. Transcription of a mutant collagen I gene cell type and stage-specific marker for odontoblast and osteoblast differentiation. Development 1990;108:717-26.
13. Bedalov A, Salvatori R, Dodig M, Kronenberg MS, Kapural B, Bogdanovic Z, et al. Regulation of COL 1A1 expression in type I collagen producing tissues : Identification of a 49 base pair region which is required for transgene expressuion in bone of transgenic mice. J Bone Miner Res 1995;10:1443-51.
14. Rossert J, Eberspaecher H, de Crombrugghe B. Separate cis-acting DNA elements of the mouse proalpha 1 (I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. J Cell Biol 1995;129:142-32.
15. Maity SN, Golumbek PT, Karsenty G, de Crombrugghe B. Selective activation of transcription by a novel CCAAT binding factor. Science 1988;241:582-5.
16. Nehls MC, Rippe RA, Veloz L, Brenner DA. Transcription nuclear factor I and Sp 1 interact with the murine collagen alpha 1 (I) promoter. Mol Cell Biol 1991;11:4065-73.
17. Galera P, Musso M, Ducy P, Karsenty G. c-Krox, a transcriptional regulator of type I collagen gene expression, is preferentially expressed in skin. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:9372-6.
18. Widom RL, Culic I, Lee JY, Korn JH. Cloning and characterization of hcKrox, a transcriptional regulator of extracellular matrix gene expression. Gene 1997;198:407-20.
19. Dhalla AK, Ririe SS, Swamynathan SK, Weber KT, Guntaka RV. chk-YB-1b, a Y-box binding protein activates transcription from rat alpha 1 (I) procollagen gene promoter. Biochem J 1998;336:373-9.
20. Galera P, Park RW, Ducy P, Mattei MG, Karsenty G. c-Krox binds to several sites in the promoter of both mouse type I collagen genes. Structure/function study and developmental expression analysis. J Biol Chem 1996;271:21331-9.
21. Dhawan J, Lichtler AC, Rowe DW, Farmer SR. Cell adhesion regulates pro-alpha 1 (I) collagen mRNA stability and transcription in mouse fibroblasts. J Biol Chem 1991;266:8470-5.
22. Dhawan J, Farmer SR. Regulation of alpha 1 (I) -collagen gene expression in response to cell adhesion in Swiss 3T3 fibroblasts. J Biol Chem 1990;265:9015-21.
23. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell 1982;30:215-24.
24. Bogdanovic Z, Bedalov A, Krebsbach PH, Pavlin D, Woody CO, Clark SH, et al. Upstream regulatory elements necessary for expression of the rat COL 1A1 promoter in transgenic mice. J Bone Miner Res 1994;9:285-92.
25. Pavlin D, Lichtler AC, Bedalov A, Kream BE, Harrison JR, Thomas HF, et al. Differential utilization of regulatory domains within the alpha 1 (I) collagen promoter in osseous and fibroblastic cells. J Cell Biol 1992;116:227-36.
26. Getzenberg RH, Pienta KJ, Coffey DS. The tissue matrix : Cell dynamics and hormone action. Endocri Rev 1990;11:399-417.
27. Bissel MJ, Hall HG, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression?. J Theor Biol 1982;99:31-68.
28. Bissel MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of extracellular matrix on gene expression : Is structure the message?. J Cell Sci Suppl 1987;8: 327-43.
29. Bidwell JP, Alvarez M, Feister H, Onyia J, Hock J. Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. J Bone Miner Res 1998;13: 155-67.
30. Hynes RO. Integrins : A family of cell surface receptors. Cell 1987; 48:549-54.

31. Alvarez M, Long H, Onyia J, Hock J, Xu W, Bidwell JP. Rat osteoblast and osteosarcoma nuclear matrix proteins bind with sequence specificity to the rat type I colllagen promoter. Endocrinology 1997;138:482-9.
32. Alvarez M, Thunyakitpisal P, Morrison P, Onyia J, Hock J, Bidwell JP. PTH-responsive osteoblast nuclear matrix architectural transcription factor binds to the rat type I collagen promoter. J Cell Biochem 1998;69:336-52.
33. Thunyakitpisal P. Cloning and functional analysis of a novel family of nuclear matrix transcription factors (NP/NMP4) that regulate type I collagen expression [dissertation]. Indianapolis (IN) : Indiana University, 2000.

Collagen type I : Synthesis and Regulation

Pasutha Thunyakitpisal D.D.S. (Hons.), Ph.D.

Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstract

Type I collagen is the major insoluble fibrous protein that found in bone, dentin, dermis and tendon. In this review, we focus on the mechanisms of type I collagen synthesis and regulation including transcription, translocation of mRNA from nucleus to cytoplasm, translation from nucleotide codon to amino acid as well as post-translation modifications which are necessary for the collagen. The participation of nuclear transcription factors such as Sp1, NF-I, CBF and NP/NMP4 in the COL1A1 transcription is also described in here. The experiments that leaded to the tissue-specific regulation of type I collagen hypothesis are also included in this review. The knowledge, that we gained, could be further applied to control the pathological diseases such as fibrosis, osteoporosis and periodontitis.

(CU Dent J 2001;24:145-54)

Key words: tissue-specific regulation; transcription; type I collagen