

DISS. ETH No 9032

**MECHANISMS OF CELL INVASION
IN THE INHIBITORY
CENTRAL NERVOUS SYSTEM ENVIRONMENT:
THE ROLE OF PROTEASES**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Paolo A. Paganetti

dipl. Natw. ETH
born 15th April 1961
citizen of Minusio, TI

accepted on the recommendation of
Prof. E. Carafoli, examiner
Prof. M.E. Schwab, co-examiner

Zurich, 1989

SUMMARY

Using several culture models, we could reproduce some specific environmental conditions which are important for cell mobility in the central nervous system (CNS). These models allowed me to study the molecular mechanisms involved in the invasive behavior of glioblastoma cells in the CNS. Rat optic nerve explants, CNS frozen sections, cultured oligodendrocytes, or isolated CNS myelin all represent inhibitory substrates for neurite growth as well as for cell migration for a variety of cell types. This property is due to the presence of defined membrane-bound inhibitory proteins (NI-35 and NI-250) which are associated with differentiated oligodendrocytes and CNS myelin. These inhibitors are specifically neutralized by the monoclonal antibody IN-1. Using these models, I found that a highly invasive CNS tumor line, the rat glioblastoma line C6, was not affected by the myelin-associated inhibitory components. This lack of inhibition was due to modification and inactivation of the inhibitors by a specific mechanism: the metallo-enzyme blocker 1,10-phenanthroline and various synthetic peptides containing metalloprotease blocking sequences (Gly-Phe or Tyr-Tyr) specifically impaired C6 cell spreading on CNS myelin. In the presence of these blockers, C6 cells were affected by the IN-1-sensitive inhibitors in the same manner as control cells, e.g. 3T3 fibroblasts or B16 melanoma cells. On the basis of results obtained with different metalloprotease blockers we concluded that C6 cell associated metalloproteolytic activity is due to a yet unknown enzyme. Specific blockers of the serine-, cysteine-, and aspartyl-protease classes had no effect. C6 cell spreading on inhibitors-free substrates such as CNS grey matter, peripheral nervous system (PNS) myelin, glass, or poly-D-lysine (PLYS) was not sensitive to 1,10-phenanthroline. The inhibitory substrate effect of CNS myelin for 3T3 fibroblasts was strongly reduced by incubation with proteases with broad substrate specificities such as trypsin. The same effect was obtained with a plasma membrane fraction prepared from C6 cells. This inactivation of the inhibitory substrates was sensitive to the same blockers of metalloproteases which impaired C6 cell spreading on CNS myelin. Preliminary results suggested that metalloproteolytic degradation is in fact involved, as judged by SDS PAGE analysis of the isolated inhibitory myelin proteins. In our in vitro model for CNS white matter invasion, only C6 cells, but not 3T3 fibroblasts or B16 melanoma cells migrated into the optic nerve explants, a finding which closely reproduces the in vivo situation. Interestingly, C6 cell invasion was significantly impaired by the presence of the metalloprotease blockers, suggesting a crucial role for this mechanism in cell invasion of CNS tissue in vitro. We have then investigated

if the mechanism allowing high motility to C6 cells had a more general distribution. We found that also some human glioblastoma cell lines behaved similarly to C6 cells and were influenced by metalloprotease blockers. Preliminary results suggest a positive correlation between the invasive behavior in vivo and in vitro for the various cell lines. Also, peritoneal and brain macrophages were able to overcome CNS myelin inhibitory property by means of a metalloproteolytic activity. All these results show that infiltration of CNS white matter by glioblastoma cells or macrophages in vitro occurs by means of a novel metalloproteolytic activity, which probably directly acts on the myelin-associated inhibitory substrates. This metalloprotease may be crucially involved in cell infiltration of CNS tissue in vivo as well.

Zusammenfassung

Anhand verschiedener Zellkultursystemen werden einige, wesentliche Bedingungen der Migration im ZNS nachvollgezogen. Die Etablierung dieser Modellsysteme erlaubte die molekularen Mechanismen des invasiven Verhaltens von Glioblastomzellen im ZNS zu untersuchen. Explantate des Nervus Opticus, Gehirn Gefrierschnitte, kultivierte Oligodendrocyten und isoliertes ZNS-Myelin stellten gleichermaßen hemmende Substrate dar, die sowohl das Auswachsen von Nervenfasern als auch das Migrationsverhalten vieler Zellen beeinträchtigen. Diese Eigenschaft ist auf die Anwesenheit definierter Membran-gebundener Proteine (NI-35 und NI-250) zurückzuführen, die sowohl in differenzierten Oligodendrocyten als auch im Myelin des ZNS vorkommen. Diese Inhibitoren werden spezifisch durch monoklonale Antikörper IN-1 neutralisiert. Mit Hilfe dieser Modellsysteme, wurde es festgestellt, dass eine hochinvasive ZNS-Tumorlinie, die Rattenglioblastomlinie C6, nicht durch die myelin-assoziierten hemmenden Komponenten betroffen ist. Dieser Mangel an Hemmung ist durch eine Modifizierung und Inaktivierung der Inhibitoren durch einen bestimmten Mechanismus bedingt: der Metall-Enzym-Blocker 1,10-Phenanthrolin und verschiedene synthetische Peptide, welche Metalloprotease-blockierende Sequenzen (Gly-Phe und Tyr-Tyr) enthalten, beeinträchtigen spezifisch die C6-Zellausbreitung auf ZNS-Myelin. In Anwesenheit dieser Blocker sind C6-Zellen durch die IN-1-sensitiven Inhibitoren auf die gleiche Weise wie Kontrollzellen (3T3-Fibroblasten oder B16-Melanomzellen) betroffen. Aus der Ergebnissen mit verschiedenen Metalloprotease-Blockern, wurde es geschlossen, dass die C6-Zellen-assoziierte metalloproteolytische Aktivität durch ein bisher unbekanntes Enzym hervorgerufen wird. Spezifische Blocker der Serin-, Cystein- und Aspartyl-Proteaseklassen zeigen keine Wirkung. C6-Zellenausbreitung auf Inhibitoren-freien Substraten, wie ZNS graue Substanz, Myelin des Periphernervensystem (PNS), Glas oder Poly-D-Lysin (PLYS) ist nicht 1,10-Phenanthrolin-sensitiv. Die auf 3T3 Fibroblasten hemmende Substratwirkung des ZNS-Myelins wird stark vermindert durch Behandlung mit Proteasen mit breiter Spezifität wie z.B. Trypsin. Gleiche Wirkung wird mit einer aus C6-Zellen bereiteten Plasmamembran-Fraktion erzielt. Die Inaktivierung dieser Inhibitoren spricht auf die gleichen Metalloprotease-Blocker an, welche die C6-Zellausbreitung auf Myelin des ZNS beeinträchtigen. Erste Resultate weisen darauf hin, dass in der Tat, wie SDS-Analyse von gereinigten hemmenden Myelinproteinen zeigt, eine metalloproteolytische Degradation eine Rolle spielt. In unseren In Vitro Modellen für Invasivität weisser Substanz des ZNS, migrieren nur C6-Zellen, aber nicht 3T3-Fibroblasten

oder B16-Melanomzellen in die optischen Nervenexplantate; ein Resultat, das die In Vivo-Situation widerspiegelt. Interessanterweise, ist die C6-Zelleninvasivität durch die Anwesenheit Metalloprotease-Blocker bedeutend reduziert, was auf die wichtige Rolle hinweist, die dieser Mechanismus für die In Vitro Zellinvasivität der ZNS Gewebe hat. Ferner, wurde es untersucht ob der Mechanismus, der hohe Invasivität von C6-Zellen ermöglicht, eine breitere Verteilung zeigt. Wir stellten fest, dass sich auch menschliche Glioblastomlinien ähnlich wie C6-Zellen verhalten, und, dass durch die gleichen Metalloprotease-Blocker beeinflusst werden. Erste Resultate weisen auf eine positive Korrelation zwischen In Vivo- und In Vitro-Verhalten der verschiedenen Zelllinien. Auch Peritoneal- und Hirn-Makrophagen können, durch metalloproteolytische Aktivität, hemmende Eigenschaften des ZNS Myelins wettmachen. Alle diese Resultate zeigen, dass In Vitro Infiltrierung der weissen Substanz des ZNS von Glioblastomzellen oder Makrophagen durch eine neue metalloproteolytische Aktivität, welche wahrscheinlich direkt auf die myelin-assoziiert hemmenden Substrate agiert, zu Stande kommt. Diese Metalloprotease könnte deshalb auch eine sehr wichtige Rolle für die In Vivo- Zellinvasivität im ZNS spielen.