Thesis Title Isolation of Chondroitin Sulfate Oligosaccharides and Its Specific Interaction with Growth Factors

Author Mr. Kanchanok Kodchakorn

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Chairperson

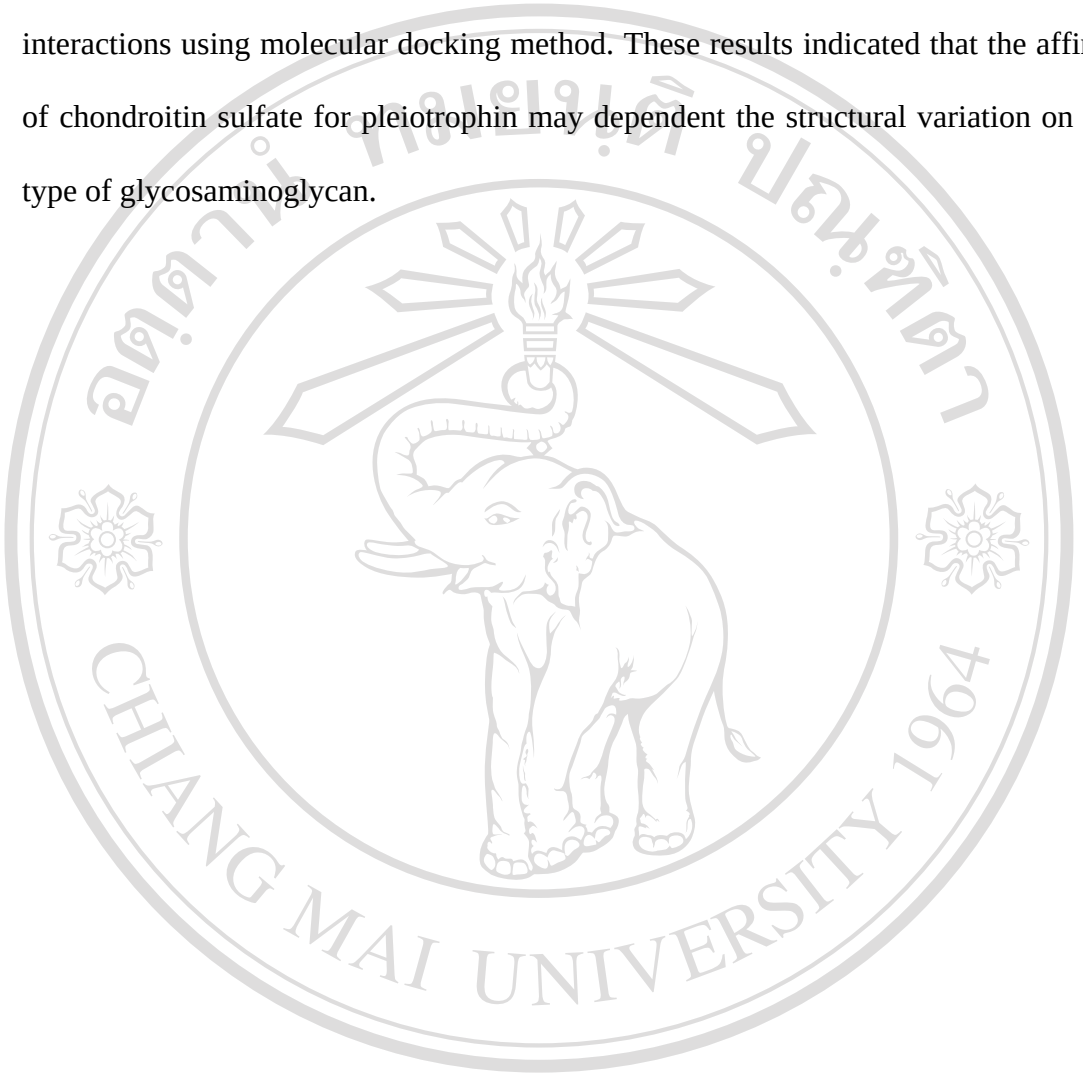
Assist. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai Member

ABSTRACT

The remarkable ability of chondroitin sulfate (CS) to regulate various biological processes is still unclear at a molecular level and suggests the importance of fine structure in controlling the biological properties of glycosaminoglycans (GAGs). Since biological functions are associated with the GAG moieties, the structure of the CS chains is of considerable interest. Here, CS oligosaccharides were isolated from commercial bovine trachea cartilage CS-A, after exhaustive digestion with testicular hyaluronidase, by gel filtration chromatography followed by HPLC on an anion-exchange Mono-Q column. Direct interactions of CS-A oligosaccharide preparations with various growth factors were then evaluated using surface plasmon resonance (SPR, BIAcore™ system), representative growth factors of the pleiotrophin, VEGF, and HGF were chosen. The kinetic constants k_a, k_d, and K_d suggested that the only fraction VI and its five major subfractions specifically bound to pleiotrophin with high affinity (K_d = 0.3 ~ 3 nM), but not by VEGF and HGF. The molecular mass determination showed that the average molecular mass of fraction VI

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

was 1,674 Da, which assumed as hexasaccharide. The three-dimensional (3D) structure was also identified to predict the binding conformation feature of these interactions using molecular docking method. These results indicated that the affinity of chondroitin sulfate for pleiotrophin may dependent the structural variation on this type of glycosaminoglycan.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแยกคอนดรอยตินซัลเฟต โอลิโกแซ็กคาไรด์ และการเกิดปฏิสัมพันธ์จำเพาะกับโปรตีนเร่งการเจริญเติบโต

ผู้เขียน นาย กานต์ชนก คตชาคร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ ประธานกรรมการ

ผศ.ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย กรรมการ

บทคัดย่อ

ความสามารถพิเศษของคอนดรอยตินซัลเฟต (chondroitin sulfate; CS) ต่อการควบคุมกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆ ภายในเซลล์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด พบว่าในระดับเซลล์บทบาททางโครงสร้างของคอนดรอยตินซัลเฟตมีความสำคัญต่อการควบคุมคุณสมบัติทางชีววิทยาของสายไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan; GAG) เนื่องด้วยบทบาททางชีววิทยาที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับส่วนของสายไกลโคซามิโนไกลแคน ดังนั้นความหลากหลายทางโครงสร้างของสายคอนดรอยตินซัลเฟตจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ให้ความสนใจในการศึกษา ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการย่อยคอนดรอยตินซัลเฟตชนิด–เอ ที่เตรียมมาจากกระดูกอ่อนเยื่อบุหลอดลมของวัว (commercial bovine trachea cartilage CS-A) ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (testicular hyaluronidase) จากนั้นทำการแยกสัดส่วนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟีชนิดเจลฟิวเตรชันและเทคนิค HPLC ตามลำดับ สำหรับการศึกษาการเข้าจับของคอนดรอยตินซัลเฟต โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เตรียมได้กับโปรตีนเร่งการเจริญเติบโต คือ pleiotrophin, VEGF และ HGF จะทำการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยเทคนิค surface plasmon resonance (SPR, BIAcore™ system) จากค่าคงที่จลนศาสตร์ (kinetic constants; k_a, k_d, และ K_d) พบว่าเฉพาะคอนดรอยตินซัลเฟต โอลิโกแซ็กคาไรด์จากสัดส่วนที่ 6 และอีก 5 สัดส่วนย่อยของมัน มีความสามารถอย่างสูงต่อการเข้าจับกับโปรตีนเร่งการเจริญเติบโตชนิด pleiotrophin (K_d = 0.3 ~ 3 nM) แต่ไม่สามารถเข้าจับได้กับโปรตีนเร่งการเจริญเติบโตชนิด VEGF และ HGF สำหรับการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลพบว่า คอนดรอยตินซัลเฟต โอลิโกแซ็กคาไรด์จากสัดส่วนที่ 6 มีค่าเฉลี่ยของมวลโมเลกุลเท่ากับ 1,674 ดาลตัน ซึ่งมีรูปแบบเป็นเฮกซะแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงโครงสร้างสามมิติ (3D structure) เพื่อทำนายความเป็นไปได้เชิงโครงสร้างของการเข้าจับที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการทาง molecular docking ดังนั้น จากผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่า ความจำเพาะของการเข้าจับระหว่างคอนดรอยตินซัลเฟตกับโปรตีนเร่งการเจริญเติบโตชนิด pleiotrophin มีบทบาทจากความหลากหลายทางโครงสร้างที่ได้จากไกลโคซามิโนไกลแคนชนิดนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved