

Thesis Title Investigation of the Epitope in Chondroitin Sulfate Chains Recognized
by Monoclonal Antibody MO-225

Author Miss Kittivan Kalayanamitra

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Chairperson

Prof. Dr. Kazuyuki Sugahara Member

Assist. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai Member

ABSTRACT

Six hexasaccharide fractions were purified from shark cartilage chondroitin sulfate-C by gel filtration chromatography after exhaustive digestion with chondroitinase AC-I and followed by anion exchange HPLC. The size and the degree of sulfation of these hexasaccharides were assigned by MALDI-TOF/MS. Their structures were analyzed by a combination of enzymatic digestion in conjunction with anion-exchange HPLC and 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy. The hexasaccharides were composed of five kinds of disaccharide building units of either A [GlcUAβ1-3GalNAc(4S)], B [GlcUA(2S)β1-3GalNAc(4S)], C [GlcUAβ1-3GalNAc(6S)], D [GlcUA(2S)β1-3GalNAc(4S)] or E [GlcUAβ1-3GalNAc(4S,6S)] forming three kinds of tetrasulfated hexasaccharides composed of two A- and one D-units (ΔA-A-D and ΔA-D-A), or two C- with one D-units (ΔC-D-C). Nine kinds of pentasulfated

hexasaccharides either with one A- and two D-units (Δ A-D-D), one C- and two D-units (Δ C-D-D), or with A-, B and D-units (Δ A-B-D) and two kinds of hexasulfated hexasaccharides either with three D-units (Δ D-D-D) or with one E- and two D-units (Δ E-D-D) were also isolated. Mixtures of six pentasulfated hexasaccharides composed of either A-, C-, D- or E-unit were Δ A-D-C, Δ E-D-C and Δ D-D-C containing in fraction 5 and Δ E-D-C, Δ C-E-D with Δ A-E-D containing in fraction 6. Among the hexasaccharides ten sequences *viz.* Δ C-D-C, Δ A-D-D, Δ C-D-D, Δ E-A-D, Δ D-D-C, Δ E-D-C, Δ A-E-D, Δ A-B-D, Δ D-D-D and Δ E-D-D were novel. The 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy revealed that B-unit containing in Δ A-B-D sequence was GlcUA(2S) β 1-3GalNAc(4S). The fluorescent lipid-linked oligosaccharide microarray assay showed the specific reactivity of the commercial available mAb MO-225 towards these structurally defined hexasaccharides using low picomole amounts of fluorescent lipid derivatized hexasaccharides indicating that hexasaccharide containing A-D sequence is the minimum size required for the effective binding of MO-225. Our findings suggest the structural diversity of CS-C chains may share the structural features and biological activities with CS-D and CS-E.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาอิพิโทปในสายคอนครอยตินซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ

โมโนโคลนอล แอนติบอดี MO-225

ผู้เขียน นางสาว กิตติวรรณ กัลยาณมิตร

ปริญญา วิทยาศาสตร์คุษุภัณฑ์ (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ ประธานกรรมการ

Prof. Dr. Kazuyuki Sugahara กรรมการ

ผศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย กรรมการ

บทคัดย่อ

Hexasaccharide 6 fractions แยกออกมาได้จากสายคอนครอยตินซัลเฟต ซี ของกระดูกอ่อนปลาลาตามโดยเทคนิค gel filtration หลังจากที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์คอนครอยตินเนส เอซีวัน และแยกบริสุทธิ์ต่อด้วย anion exchange HPLC ขนาดและจำนวนของหมู่ซัลเฟตในสายคอนครอยตินซัลเฟตที่แยกได้นั้นถูกนำมาศึกษาโดยเทคนิค MALDI-TOF/MS ส่วนโครงสร้างนั้นถูกศึกษาโดยใช้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติย่อยสายคอนครอยตินซัลเฟตได้หลายๆชนิดร่วมกัน และทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค anion-exchange HPLC และ 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy สาย hexasaccharides ที่แยกได้นั้นประกอบไปด้วย disaccharide units 5 ชนิดคือ A [GlcUA β 1-3GalNAc(4S)], B [GlcUA(2S) β 1-3GalNAc(4S)], C [GlcUA β 1-3GalNAc(6S)], D [GlcUA(2S) β 1-3GalNAc(4S)] หรือ E [GlcUA β 1-3GalNAc(4S,6S)] ประกอบกันขึ้นเป็น