Thesis Title Identification and Biochemical Property of Chondroitin Sulfate-K

Author Miss Duriya Fongmoon

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Chairperson
Assist. Prof. Dr. Siriwan Ongchai	Member
Prof. Dr. Kazuyuki Sugahara	Member

Abstract

Chondroitin sulfate K (CS-K) from king crab cartilage rich in rare 3-*O*-sulfated glucuronic acid [GlcUA(3S)], displayed neuritogenic activity and affinity towards various growth factors like CS-E from squid cartilage. CS-K-mediated neuritogenesis of mouse hippocampal neurons in culture was abolished by digestion with chondroitinase ABC (CSase ABC), indicating the possible involvement of GlcUA(3S). However, identification of GlcUA(3S) in CS chains by conventional HPLC analysis has been hampered by its CSase ABC-mediated degradation. To investigate the degradation mechanism, an authentic CS-E tetrasaccharide, $\Delta^{4,5}$HexUA-GalNAc(4S)-GlcUA(3S)-GalNAc(4S), was digested with CSase ABC and the end product was identified as GalNAc(4S) by electrospray ionization (ESI) mass spectrometry (MS). Putative GalNAc(6S) and GalNAc(4S,6S), derived presumably from GlcUA(3S)-GalNAc(6S) and GlcUA(3S)-GalNAc(4S,6S), respectively, were also detected by ESI-MS in the CSase ABC digest of a CS-E oligosaccharide fraction resistant to CSases AC-I and AC-II. Intermediates during the CSase ABC-mediated degradation of ΔHexUA(3S)-GalNAc(4S) to GalNAc(4S) were

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

identified through ESI-MS of a partial CSase ABC digest of a CS-K tetrasaccharide GlcUA(3S)-GalNAc(4S)-GlcUA(3S)-GalNAc(4S), and the conceivable degradation mechanism of the (3S) moiety was elucidated. Although a fucose branch was also identified in CS-K, de-fucosylated CS-K exhibited higher neuritogenic activity than the native CS-K, excluding the possibility of the involvement of fucose in the activity. Rather GlcUA(3S)-containing disaccharides are likely involved and leading to the understanding of CS-mediated biological processes.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาเอกลักษณ์ และสมบัติทางชีวเคมีของคอนดรอยตินซัลเฟต-เค

ผู้เขียน นางสาวดุริยา ฟองมูล

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	กรรมการ
Prof. Dr. Kazuyuki Sugahara	กรรมการ

บทคัดย่อ

คอนดรอยตินซัลเฟตเค (CS-K) ซึ่งสกัดได้จากกระดูกอ่อนของแมงดาทะเล มีองค์ประกอบซึ่งเป็น 3-*O*-sulfated glucuronic acid [GlcUA(3S)] เป็นจำนวนมาก ซึ่งคอนดรอยตินซัลเฟตเคนี้ มีความสามารถในการกระตุ้นการยืดยาวออกของเซลล์ประสาท และมีความสามารถในการจับกับปัจจัยการเติบโต อีกหลายๆ ชนิด ซึ่งคุณสมบัติทั้งสองนี้ มีความคล้ายคลึงกับคุณสมบัติของคอนดรอยตินซัลเฟตอี ที่สกัดได้จากกระดูกอ่อนของปลาหมึก เมื่อย่อยคอนดรอยตินซัลเฟตเคด้วยเอนไซม์คอนดรอยติเนส จะทำให้เสียคุณสมบัติในการกระตุ้นความยืดยาวของเซลล์ประสาท ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในความเกี่ยวข้องของโครงสร้าง GlcUA(3S)ในคุณสมบัตินี้ อย่างไรก็ตาม การพิสูจน์ว่ามีโครงสร้าง GlcUA(3S) อยู่ในสายคอนดรอยตินซัลเฟตโดยเทคนิค HPLC นั้นทำได้ยาก เนื่องจากโครงสร้างดังกล่าวมีการสลายตัวเมื่อใช้เอนไซม์คอนดรอยติเนส เอบีซี ในการย่อยสายคอนครอยตินซัลเฟต ดังนั้น เพื่อที่จะศึกษากลไกการสลายตัวของโครงสร้างดังกล่าว จึงได้ทดลองนำเททระแซ็ทคาไรด์ $\Delta^{4,5}$HexUA-GalNAc(4S)-GlcUA(3S)-GalNAc(4S) ซึ่งเตรียมจากสายคอนดรอยตินซัลเฟตอี มาย่อยด้วยเอนไซม์คอนดรอยติเนส เอบีซี และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบได้ตัวสุดท้าย คือ GalNAc(4S) โดยการตรวจด้วยเทคนิค electrospray ionization (ESI) mass spectrometry (MS) นอกจากนี้ GalNAc(6S) และ GalNAc(4S, 6S) ซึ่งคาดว่าสลายตัวมาจาก GlcUA(3S)-GalNAc(6S) และ GlcUA(3S)-GalNAc(4S,6S) ตามลำดับ ก็สามารถตรวจพบได้โดยเทคนิค ESI-MS เช่นกัน เมื่อทำการย่อย CS-E oligosaccharide ที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์คอนดรอยติเนส เอซีวันและเอซีทู ด้วย เอนไซม์คอนดรอยติเนสเอบีซี สารตัวกลางมัธยันตร์ต่างๆ ตั้งแต่ ΔHexUA(3S)-GalNAc(4S) ไปถึง GalNAc(4S) ถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค ESI-MS ในระหว่างที่การสลายตัวเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ระหว่างการย่อย CS-K เททระแซ็ทคาไรด์ GlcUA(3S)-GalNAc(4S)-GlcUA(3S)-GalNAc(4S) และขั้นตอนในการสลายตัวได้อธิบายไว้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย ยังพบอีกว่าในสายคอนดรอยตินซัลเฟตเค มี ฟิวโคส เป็นองค์ประกอบด้วย แต่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อมีการทำลายฟิวโคส ออกจากโครงสร้าง CS-K ก็ยังคงคุณสมบัติกระตุ้นการยืดยาวออกของเซลล์ประสาทอยู่ แสดงว่าฟิวโคสไม่ได้มีผลต่อคุณสมบัติของ CS-K แต่คุณสมบัติดังกล่าว เกิดขึ้นจากโครงสร้าง GlcUA(3S)-containing disaccharides ในสายคอนดรอยตินซัลเฟต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved