อารยา รานอก : การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะเชิงหน้าที่และโครงสร้างของ YKL-39 ซึ่งเป็นโปรตีนเหมือนไคติเนสจากมนุษย์ (FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF YKL-39, A HUMAN CHITINASE-LIKE PROTEIN) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 194 หน้า

โปรตีน YKL-39 ซึ่งเป็นโปรตีนเหมือนไคติเนสจากมนุษย์ จัดอยู่ในแฟมิลี glycosyl hydrolase 18 (GH-18) ที่ไม่สามารถย่อยไคตินได้ โปรตีนนี้ถูกจัดเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพการกระตุ้นของเซลล์กระดูกอ่อนและการติดตามความก้าวหน้าของโรคข้อเสื่อม แต่กลไกการทำงานยังไม่ทราบแน่ชัด วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกทำการศึกษาเกี่ยวกับการโคลน และผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-39 ในแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นอิมมูนูเจนสำหรับผลิตโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน YKL-39 จากการศึกษาพบว่า ทั้งโพลีโคนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะและทำปฏิกิริยาอย่างสูงต่อโปรตีน YKL-39 ผู้ทำวิจัยสามารถคัดเลือกโมโนโคลนที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน YKL-39 ได้จำนวน 2 โคลนให้ชื่อว่า 6H11 และ 8H3 ซึ่งโคลนทั้งสองสามารถผลิตแอนติบอดีชนิด IgM จากการศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อโปรตีน YKL-39 ด้วยเทคนิค Dot blot พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงต่อโปรตีน YKL-39 ในตัวอย่างน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม และในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ และทีลิมโฟไซต์ จากการค้นหาโปรตีนคู่จับของโปรตีน YKL-39 ในระบบฐานข้อมูล พบว่ามีไกลโคโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน YKL-39 ซึ่งมีบทบาทในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน การสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ สามารถสรุปได้ว่าโพลิโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 ที่ผลิตได้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น การศึกษาวิถีการควบคุมของโปรตีน YKL-39 และการพัฒนาอุปกรณ์ในการตรวจวัดโปรตีนด้วยวิธีอิมมิโนเซนเซอร์เพื่อติดตามความเสียหายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาโครงสร้างสามมิติจากผลึกโปรตีนด้วยวิธีการหักเหของรังสีเอกซ์และศึกษาการจับของโปรตีน YKL-39 ต่อไคตินสายสั้นโดยวิธีอุณหพลศาสตร์ ผลการทดลองที่ได้พบว่าผลึกของโปรตีนสภาพธรรมชาติและที่จับกับไคตินสายสั้นขนาด 2-6 หน่วย สามารถหักเหรังสีเอกซ์ได้ความละเอียดถึง 1.53 ถึง 2.48 อังสตรอม มีโครงสร้างโดยรวมประกอบด้วยสองส่วน คือ โดเมนหลักมีโครงสร้างแบบ (β/α)8-TIM-barrel และโดเมนเล็กแทรกระหว่างโดเมนหลักมีโครงสร้างเป็น $\alpha+\beta$ การวิเคราะห์ทางโครงสร้างพิสูจน์ให้เห็นว่าโปรตีน YKL-39 จับกับน้ำตาลสาย

สั้นด้วยแรงไฮโดรโฟบิคและด้วยเครือข่ายพันธะไฮโดรเจน ซึ่งการจับของน้ำตาลสายสั้นส่งผลให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปเพื่อให้การจับแน่นขึ้น ผลการวิเคราะห์โครงสร้างแสดงให้เห็นว่าโปรตีน YKL-39 มีบริเวณจับกับน้ำตาล 5 บริเวณย่อย ซึ่งครอบคลุมตำแหน่ง (-3)(-2)(-1)(+1)(+2) โดยมีกรดอะมิโนทริปโตแฟนตำแหน่ง 360 ทำหน้าที่หลักในการจับกับน้ำตาลด้วยแรงไฮโดรโฟบิคที่บริเวณศูนย์กลางของร่องจับของโปรตีน สำหรับการศึกษาอุณหพลศาสตร์ของโปรตีนจับกับไคตินสายสั้นด้วยวิธี isothermal titration calorimetry (ITC) และ intrinsic fluorescence spectroscopy ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน YKL-39 จับกับน้ำตาลสายสั้นด้วยค่าคงที่ในการแตกตัว (K_d) ที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์ และค่าพลังงานของการจับจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนหน่วยของน้ำตาลที่ยาวขึ้น โดยค่าที่พบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างน้ำตาลไคติน 5 หน่วย และ 6 หน่วย จากผลการทดลองนี้ได้สนับสนุนข้อมูลทางโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่แสดงบริเวณการจับต่อน้ำตาล 5 หน่วย และการวิเคราะห์ทางอุณหพลศาสตร์ชี้ให้เห็นว่าการจับของน้ำตาลต่อโปรตีน YKL-39 ถูกขับเคลื่อนโดยเอนทัลปี จากผลการศึกษาทั้งหมดเสนอให้เห็นว่าโปรตีน YKL-39 จับกับน้ำตาลอย่างไร และอาจส่งผลให้เกิดการกระตุ้นสัญญาณต่อระบบภูมิคุ้มกันอัตโนมัติและการปรับรูปร่างของเนื้อเยื่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ARAYA RANOK : FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF YKL-39, A HUMAN CHITINASE-LIKE PROTEIN. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 194 PP.

FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF YKL-39, A HUMAN CHITINASE-LIKE PROTEIN

Human cartilage chitinase 3-like protein 2 (CHI3L2 or YKL-39) is a member of family-18 glycoside hydrolases that lacks chitinase activity. YKL-39 is known as a potential marker for the activation of chondrocytes and the progression of osteoarthritis. This thesis is divided into two parts. The first part involves cloning and expression of YKL-39 in the bacterial system that was used as for production of anti-YKL39 polyclonal and monoclonal antibodies. Both antibody types were highly selective, reacting only with YKL-39. Isotype mapping identified two generated hybridoma clones (so called clones 6H11 and 8H3) as the IgM isotype. Dot blot assay showed that the monoclonal antibody was strongly active with the synovial fluid of an osteoarthritis patient, and human monocyte and T lymphocyte cell lines. A database search for protein binding partners gave high hits with several glycoproteins that play particular roles in cartilage tissue scaffolding, connective tissue formation, and cell-cell interactions. In conclusion, anti-YKL39 polyclonal and monoclonal antibodies were raised and tested to be suitable for immunological application, such as the investigation of the YKL-39 regulating pathway and the development of an immunosensing tool for sensitive detection of cartilage tissue destruction.

In the second part, the binding of chitooligosaccharides to YKL-39 was investigated by protein crystallography and isothermal titration calorimetry. Four crystal structures of human YKL-39 were solved in the absence and presence of chitooligosaccharides. The overall structure of YKL-39 comprises a major $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel domain and a small α+β insertion domain. YKL-39 interacts with chitooligosaccharides through hydrophobic interactions, as well as a hydrogen bonding network. Detailed structural analysis revealed that the binding of chitin fragments induces local conformational changes that facilitate the tight binding and YKL-39 has the least extended chitin-binding cleft, containing five subsites for sugars, namely (-3)(-2)(-1)(+1)(+2), with Trp360 playing a prominent role in the sugar-protein interactions at the centre of the chitin binding cleft. Evaluation of binding affinities obtained from isothermal titration calorimetry and intrinsic fluorescence spectroscopy suggests that YKL-39 binds to chitooligosaccharides with K_d values in the micromolar concentration range and that the binding energies increase with the chain length. There were no significant differences between the K_d values of chitopentaose and chitohexaose, supporting the structural evidence for the five-binding subsite topology. Thermodynamic analysis indicates that binding of chitooligosaccharide to YKL-39 is mainly driven by enthalpy. In conclusion, our data suggest how YKL-39 could possibly interact with endogenous GlcNAc containing ligands that may stimulate the signaling cascades triggering autoimmune response and tissue remodeling.

School of Biochemistry Student's Signature_____

Academic Year 2013 Advisor's Signature_____

Co-adviser's Signature_____