พีระณัฐ จาตุรัตน์ทวีโชติ : ผลของกลูโคซิลเซรามิเดสของมนุษย์ต่อระดับของสฟิงโกลิพิในเซลล์ (THE EFFECT OF HUMAN GLUCOSYLCERAMIDASE ON SPHINGOLIPID LEVEL IN CELLS). อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 154 หน้า.

กลูโคซิลเซราไมด์เป็นสารตั้งต้นในการผลิตแกงกลิโอไซด์และเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสามารถสร้างและสลายได้อย่างต่อเนื่องในไกลโคสฟิงโกลิพิดเมตาบอลิซึม การสลายของกลูโคซิลเซราไมด์เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ 2 ชนิด ประกอบด้วย lysosomal acid β-glucosidase/β -glucosylceramidase (GBA) และ nonlysosomal β-glucosidase/β-glucosylceramidase2 (GBA2) ความบกพร่องของเอนไซม์ GBA และ GBA2 มีผลต่อกระบวนการไกลโคสฟิงโกลิพิดเมตาบอลิซึม ซึ่งส่งผลให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนเพื่อทำการศึกษาผลของ GBA และ GBA2 ต่อระดับของสฟิงโกลิพิดภายในเซลล์ โดยเริ่มต้นทำการศึกษา GBA2 isoforms ที่มีผลกระทบต่อระดับของไกลโคสฟิงโกลิพิดใน COS-7 cells โดย 9 human GBA2 isoforms ถูกทำให้แสดงออกใน COS-7cells จากนั้นยืนยันการแสดงออกด้วยวิธี quantitative real time-PCR และ western blotting จากนั้นตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ 4-methylumbelliferyl-β-D-glucopyranoside (4MUG) พบว่า human GBA2 isoform 1 มีการทำงานของเอนไซม์สูงในขณะที่ isoforms อื่นๆมีการทำงานของเอนไซม์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม empty vector Conduritol β-epoxide (CBE) ถูกใช้สำหรับยับยั้งทำงานของ GBA เพื่อยืนยันว่าการทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่มาจาก GBA2 isoform 1 การศึกษาระดับของสฟิงโกลิพิดโดยใช้ shotgun direct infusion mass spectrometry ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ GBA2 isoform 1 ส่งผลให้ระดับของ เซราไมด์สูงขึ้นและระดับของเฮกโซซิลเซราไมด์ลดลง จากนั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างกลูโคซิลเซราไมด์ที่เกี่ยวข้องกับระดับของเซราไมด์แสดงให้เห็นว่า GBA2 isoform 1 สามารถย่อยเฮกโซซิลเซราไมด์เป็นเซราไมด์ที่มีจำนวนคาร์บอนดังนี้ 34:1, 40:1, 42:1 และ 42:2 ซึ่งสนับสนุนว่าจำนวนคาร์บอนดังกล่าวเป็นมีความจำเพาะต่อการทำงานของ GBA2 ซึ่งจากการทดลองพบว่ามีเพียง GBA2 isoform 1 มีผลต่อระดับไกลโคสฟิงโกลิพิดในเซลล์ ส่งผลให้ความบกพร่องของ GBA2 isoform 1 อาจมีความเกี่ยวข้องกับโรคทางระบบประสาท ส่วนที่สองเพื่อศึกษาผลจากการกลายพันธุ์ของยีน heterozygous *GBA* และ *Parkin* ต่อระดับสฟิงโกลิพิดในเซลล์ไฟ

โบรบลาสต์ของป่วยพาร์กินสัน โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีการกลายของยีน *Parkin* และ *GBA* ถูกเลี้ยงในรูปแบบเซลล์ปฐมภูมิจากนั้นทดสอบการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase และวิเคราะห์ระดับของสฟิงโกลิพิดด้วยวิธี shotgun direct infusion mass spectrometry ผลการศึกษาพบว่า *GBA* (1309delG) มีผลต่อระดับของสฟิงโกลิพิดในขณะที่การกลายของยีน *Parkin* แสดงผลที่ไม่ชัดเจนต่อระดับของสฟิงโกลิพิดในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีอุปสรรคเนื่องด้วยจำนวนตัวอย่างไม่เพียงพอซึ่งส่งผลต่อการวิเคราะห์ทางสถิติและการสรุปผล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา พีระนัช ชาตารัตนวิโรจ

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

PEERANAT JATOORATHAWEECHOT : THE EFFECT OF HUMAN GLUCOSYLCERAMIDASE ON SPHINGOLIPID LEVEL IN CELLS. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 154 PP.

GLYCOSIDE HYDROLASE/GLYCOSPHINGOLIPID/GLUCOSYLCERAMIDE/ GLUCOCEREBROSIDASE/SPLICING ISOFORMS

The membrane lipid glucosylceramide (GlcCer) is the precursor of gangliosides and is a major membrane lipid itself. It is continuously formed and degraded in glycosphingolipid metabolism. GlcCer degradation is mainly carried out by 2 enzymes, lysosomal acid β- glucosidase/ β- glucosylceramidase (GBA) and nonlysosomal β-glucosidase/ β- glucosylceramidase2 (GBA2). Deficiencies of GBA and GBA2 affect glycosphingolipid metabolism, resulting in neurological diseases. In this thesis, we performed two experimental parts in order to studies the effect of GBA and GBA2 on sphingolipid level in cells.

Firstly, in order to understand which GBA2 isoforms are active and how they affect glycosphingolipid levels in cells, nine human GBA2 isoforms were expressed in COS- 7 cells. Expression of GBA2 isoforms were determined by quantitative RT- PCR, western blotting, and β-glucosidase activity assay. The human GBA2 isoform 1 showed high activity, while the other isoforms had activity similar to that in cells carrying the empty expression vector. The GBA inhibitor conduritol β-epoxide (CBE) was used minimize the GBA activity as well as to confirm that the activity came primarily from GBA2 isoform 1 overexpression. Sphingolipid levels were determined by shotgun direct infusion mass spectrometry. The result showed that overexpression of GBA2 isoform 1 increased ceramide but decreased hexosylceramide levels, while onther isoforms shown sphingolipid level same

as the empty vector control. Comparison of ratios of glucosylceramides to the corresponding ceramides in the extracts indicated that GBA2 isoform 1 hydrolyzes hexosylceramides with ceramide species 34: 1, 40: 1, 42: 1 and 42: 2, suggesting broad specificity for the lipid component. Therefore, among the possible human GBA2 isoforms, only isoform1 affects glycosphingolipid levels, which may be related to neurological diseases.

Secondly, we investigated whether heterozygous *GBA* mutations found in Parkinson's disease (PD) patients cause any decreases in activity or affect the sphingolipid levels in human fibroblasts. Fibroblasts from PD patients with *Parkin* mutations were tested for enzyme activity and sphingolipid level. Human fibroblasts carrying *GBA* and *Parkin* mutations were grown as primary cell lines, followed by assaying β-glucosidase activity and analyzing lipid profiles by shotgun direct infusion mass spectrometry. The study revealed a range of sphingolipid profiles in control and mutant human fibroblasts, and the small number of samples prevented clear conclusions as to the effects of the mutation classes. However, GBA (1309delG) was identified to have the highest glucosylceramide accumulation in the cell, while the *Parkin* mutations showed no clear affect on sphingolipid levels in fibroblasts.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry

Academic Year 2019

Student's signature นิธยณีย์ ขาหรูตาสวิโรฒ

Advisor's signature