

เอ็กโค สุยน์โต : การสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ของกรดพีนอลิกกลูโคซิลเอสเทอร์และฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (ENZYMATIC SYNTHESIS OF PHENOLIC ACID GLUCOSYL ESTERS AND THEIR EFFECT IN CHOLANGIOCARCINOMA CELLS). อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 155 หน้า.

คำสำคัญ : เบต้ากลูโคซิเดส; กลูโคซิลเอสเทอร์; กลูโคแกลลิน; มะเร็งท่อน้ำดี

Os9BGlu31 เป็นเอนไซม์ในข้าวกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส 1 (GH1) ซึ่งทำหน้าที่หลักในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และ Os9BGlu31 ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการทรานส์ไกลโคซิเลชันในการถ่ายโอนหมู่น้ำตาลไกลโคซิลเพื่อสังเคราะห์สารประกอบไกลโคซิเลตโดยเป็นปฏิกิริยาขั้นตอนเดียวและผลิตภัณฑ์มีความเสถียรมากขึ้น ละลายน้ำได้ มีความสามารถในการถูกดูดซึมสูง และมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ดังนั้นสารประกอบไกลโคซิเลตอาจสามารถนำมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในทางการแพทย์ รวมทั้งฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงฤทธิ์ของสารประกอบไกลโคซิเลต เช่น สารประกอบกรดพีนอลิก กลูโคซิลเอสเทอร์ต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ในการศึกษานี้เอนไซม์ Os9BGlu31 ถูกใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบกรดพีนอลิก กลูโคซิลเอสเทอร์ 8 ชนิด จากกรดพีนอลิกอิสระ จากนั้นสารที่สังเคราะห์ได้ถูกประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพและศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เอนไซม์ Os9BGlu31 ตั้งเดิมและกลายพันธุ์ถูกผลิตโดยแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Origami B(DE3) แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ IMAC จากนั้นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์ Os9BGlu31 และเอนไซม์กลายพันธุ์ถูกตรวจวัดโดยโครมาโตกราฟีเชิงวิเคราะห์แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์-แอลเอช20 โดยโครงสร้างของสารประกอบถูกวิเคราะห์โดยวิธีเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี และผลิตภัณฑ์จากกระบวนการทรานส์ไกลโคซิเลชันถูกวัดความสามารถเบื้องต้นในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธีการตรวจจุลทรรศน์ เพื่อหาสารประกอบกรดพีนอลิกกลูโคซิลเอสเทอร์ที่มีฤทธิ์สูงที่สุดมาศึกษากลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของเซลล์ การตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส และวัดการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกดังกล่าว

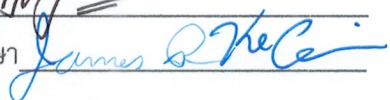
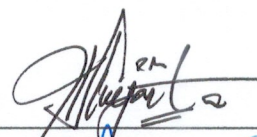
จากการทดลองพบว่า Os9BGlu31 กลายพันธุ์สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการทรานส์ไกลโคซิเลชันได้หลากหลายกว่าเอนไซม์ตั้งเดิมผ่านการถ่ายโอนหมู่น้ำตาลกลูโคซิลไปยังตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลหรือหมู่คาร์บอกซิล โดยผลิตภัณฑ์หลักมาจากการจับของหมู่น้ำตาลกลูโคซิลที่ตำแหน่งของหมู่คาร์บอกซิลของกรดพีนอลิก เอนไซม์ Os9BGlu31 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน W243N และ W243L มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการทรานส์ไกลโคซิเลชันต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ที่สูงกว่าเอนไซม์ตั้งเดิมซึ่งผลิตภัณฑ์หลักที่พบคือ สารประกอบกรดพีนอลิกกลูโคซิลเอสเทอร์ โดยเฉพาะสารประกอบ กรดแกลลิกกลูโคซิลเอสเทอร์ (เบต้ากลูโคแกลลิน) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่า IC_{50} เท่ากับ $3.6 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$

และเบต้ากลูโคสกลัยโคสยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-213A KKU-055 และ KKU-100 โดยมีค่า IC_{50} ภายหลังบ่มสารกับเซลล์แต่ละกลุ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ $67.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$, $19.8 \pm 1.3 \mu\text{M}$ และ $178.7 \pm 4.1 \mu\text{M}$ ตามลำดับ รวมทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ทั้งตามปริมาณและระยะเวลาในการได้รับสาร รวมทั้งยังพบว่าเบต้ากลูโคสกลัยโคสไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าเบต้ากลูโคสกลัยโคสทำให้เกิดการหยุดวัฏจักรของเซลล์ที่ระยะ S ไปยัง G2/M และระยะ G0/G1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-213A และ KKU-055 ตามลำดับ และยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านความเครียด เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม โดยพบว่ามี การเพิ่มการแสดงออกของยีนในกลุ่มโปรตีนหลักของการควบคุมความเครียดเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และการตอบสนองของโปรตีนที่กางออก (unfolded protein response) คือ *XBP1*, *s-XBP1*, *ATF4*, *ATF6* และ *CHOP* ทั้งในเซลล์ KKU-055 และ KKU-213A ดังนั้นในการศึกษานี้สรุปได้ว่า เอนไซม์ Os9BGluc31 ทรานสเกลโคซิเดสในข้าวสามารถใช้ผลิตสารออกฤทธิ์ผ่านกระบวนการไกลโคซิเลชันเพียงขั้นตอนเดียว โดยเฉพาะ เบต้ากลูโคสกลัยโคส ที่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการนำใช้เป็นสารต้านมะเร็งทางเลือกใหม่เพื่อรักษามะเร็งท่อน้ำดีในอนาคต

สาขาวิชาเคมี
ปีการศึกษา 2566

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา



EKO SUYANTO : ENZYMATIC SYNTHESIS OF PHENOLIC ACID GLUCOSYL ESTERS AND THEIR EFFECT IN CHOLANGIOCARCINOMA CELLS. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 155 PP.

Keywords: β -glucosidase; glucosyl ester; β -glucogallin; cholangiocarcinoma

Rice Os9BGlu31 is one of enzyme in glycoside hydrolase family 1 (GH1), an enzyme family that mostly catalyze hydrolysis reactions. In addition to weak hydrolysis activity, Os9BGlu31 has transglycosylation activity that can transfer a glycosyl moiety to other aglycone moiety to form glycosylated compounds through a retaining mechanism. In the transglycosylation reaction, the glycosylated compounds can be produced in a one-step reaction and the products often are more stable, soluble, bioavailable and has enhanced bioactivity. Therefore, the glycosylated compounds are promising functional compounds for human health purposes, including as anti-cancer agents. However, the effect of glycosylated compounds, such as phenolic acid glucosyl esters in cholangiocarcinoma cells has not been reported yet.

In this study, Os9BGlu31 was used to synthesize eight phenolic acid glucosyl esters, and their biological activities were evaluated in cholangiocarcinoma cells. The possible molecular mechanism of inhibition of cholangiocarcinoma cells by phenolic acid glucosyl ester was then investigated. Os9BGlu31 and its mutant variants were expressed in *Escherichia coli* strain Origami B(DE3), then purified by an IMAC column for further enzymatic reaction. The transglucosylation products were detected by analytical chromatography, produced, purified by Sephadex-LH20 resin column chromatography, and their structures were verified by NMR spectroscopy. Furthermore, the activity of transglucosylation products were evaluated, screened for anti-proliferative activity, then followed by a wound healing assay to assess anti-migration activity of selected-phenolic acid glucosyl ester. The possible molecular mechanism of inhibition of cholangiocarcinoma cells was investigated by cell cycle analysis, cell apoptosis analysis, and measured the mRNA expression level of related genes.

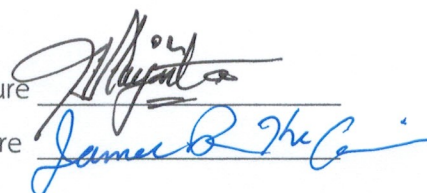
Os9BGlu31 wild type produced single transglucosylation product, whereas Os9BGlu31 mutants tend to produce multiple transglucosylation products, which can transfer a glucosyl moiety to a hydroxyl group or carboxyl group of certain compounds.

However, glucosyl moiety is preferentially attached on the carboxyl group of phenolic acid to produce major transglucosylation products. Os9BGlu31 W243N and W243L showed high activity and also produced high yields of major transglucosylation products than wild type enzyme. The major transglucosylation products were verified as phenolic acid glucosyl esters. Among these products, gallic acid glucosyl ester (β -glucogallin) had strong antioxidant activity with IC_{50} value of $3.6 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$. β -Glucogallin also showed anti-proliferative activity in cholangiocarcinoma cells with IC_{50} values of $67.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$, $19.8 \pm 1.3 \mu\text{M}$, and $178.7 \pm 4.1 \mu\text{M}$ after incubation for 24 h in KKU-213A, KKU-055, and KKU-100, respectively. However, β -glucogallin showed no obvious anti-proliferative activity toward normal human fibroblast cells. It also inhibited the migration of cholangiocarcinoma cells in a time- and dose-dependent manner. Moreover, β -glucogallin induced inhibition of proliferation of cholangiocarcinoma cells through cell cycle arrest in S and G2/M phase in KKU-213A and G0/G1 phase in KKU-055. It also inhibited cholangiocarcinoma cells through up-regulating of gene expression of ER-stress and unfolded protein response (UPR) signaling markers, including *XBP1*, *sXBP1*, *ATF4*, *ATF6*, and *CHOP*, in both KKU-055 and KKU-213A. This study demonstrated that rice Os9BGlu31 transglucosidase is a promising enzyme for glycosylation and production of glycosylated compounds. It also provides evidence that β -glucogallin inhibits proliferation and migration of cholangiocarcinoma cells thus β -glucogallin is a potential agent in the treatment of cholangiocarcinoma cells.

School of Chemistry
Academic Year 2023

Student's Signature

Advisor's Signature



The image shows two handwritten signatures in blue ink. The top signature is for the student, and the bottom signature is for the advisor, James R. The Co. The signatures are written over horizontal lines.