

**CLONING, EXPRESSION AND BIOLOGICAL PROPERTIES
OF TYPE 1 RIBOSOME-INACTIVATING PROTEIN
FROM THE SEEDS OF SPINY BITTER CUCUMBER
(*MOMORDICA COCHINCHINENSIS*)**

JUTHAMAS CHUETHONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลนยีน การแสดงออกและคุณสมบัติทางชีววิทยาของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมประเภทที่ 1 จากเมล็ดของต้นฟักข้าว (CLONING, EXPRESSION AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF TYPE 1 RIBOSOME-INACTIVATING PROTEIN FROM THE SEEDS OF SPINY BITTER CUCUMBER (MOMORDICA COCHINCHINENSIS))

จุฬามาศ เชื้อทอง 4537375 PYBS/D

ปร.ค. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิเศษฐ์ ลีลามานิตย์, Ph.D. (Biochemistry and Molecular Biology), TAKESHI KUROSU, Ph.D. (Molecular Medicine), สารี มั่นเขตต์กรณ์, Ph.D. (Biophysical Chemistry)

บทคัดย่อ

Cochinin B เป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไรโบโซม ประเภทที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน ซึ่งแยกให้บริสุทธิ์จากเมล็ดของต้นฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis*) โดยใช้คอลัมน์ SP Sepharose ซึ่งอาศัยหลักการแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation-exchange chromatography) และคอลัมน์ Superdex 75 ซึ่งอาศัยหลักการแยกขนาด (size-exclusion chromatography) โดยต่อคอลัมน์เข้ากับระบบ fast flow protein chromatography (FFPLC) โปรตีน Cochinin B ที่บริสุทธิ์แสดงฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระบบที่ปราศจากเซลล์โดยใช้ reticulocyte lysate ของกระต่ายแสดงค่า IC_{50} ที่ 0.36 นาโนโมลาร์ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ *N*-glycosidase และค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ที่ IC_{50} สูงกว่า 1,540 นาโนโมลาร์ ที่น่าสนใจคือ Cochinin B มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่แรงต่อเซลล์ human cervical epithelial carcinoma (HeLa) เซลล์ human embryonic kidney (HEK293) และเซลล์ human small cell lung cancer (NCI-H187) โดยมีค่า IC_{50} ที่ 16.9 114 และ 574 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งของ Cochinin B ต่อเซลล์ HeLa นั้นเกิดจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis ซึ่งสังเกตจากลักษณะของเซลล์ การเชื่อมด้วย Annexin V การเกิดการแตกหักของ DNA และการทำ western blotting ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis

เพื่อการศึกษาลักษณะของโปรตีนนี้ โคลนของ cDNA ที่ได้จากจีโนมิกดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับกรดอะมิโน ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดคือ 925 เบส ซึ่งสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนทั้งหมด 259 ตัว Cochinin B มีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซมประเภทที่ 1 จากพืชในวงศ์ Cucurbitaceae ประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์โปรตีน Cochinin B ได้นำเข้าเวกเตอร์ pET28a เพื่อจะทำให้เกิดการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โปรตีนที่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์นิกเกิลเซฟาโรส ซึ่งได้ปริมาณโปรตีนสุทธิประมาณ 0.3-0.5 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยง 1 ลิตร พบว่าโปรตีนที่ได้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระบบที่ปราศจากเซลล์โดยแสดงค่า IC_{50} ที่ 16.25 นาโนโมลาร์ และได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง HeLa ของโปรตีนดังกล่าวด้วย

CLONING, EXPRESSION AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF TYPE 1 RIBOSOME-INACTIVATING PROTEIN FROM THE SEEDS OF SPINY BITTER CUCUMBER (*MOMORDICA COCHINCHINENSIS*)

JUTHAMAS CHUETHONG 4537375 PYBS/D

Ph.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISOR : WICHET LEELAMANIT, Ph.D. (Biochemistry and Molecular Biology), TAKESHI KUROSU, Ph.D. (Molecular Medicine), SAMLEE MANKHETKORN, Ph.D. (Biophysical Chemistry)

ABSTRACT

Cochinin B, a novel ribosome-inactivating protein (RIP) with a molecular weight of 28 kDa, was purified from the seeds of spiny bitter cucumber (*Momordica cochinchinensis*), by cation-exchange chromatography on a SP Sepharose column and size-exclusion chromatography on a Superdex 75 column with a fast protein liquid chromatography (FPLC) system. The purified Cochinin B displayed a strong inhibitory activity on protein synthesis in the cell-free rabbit reticulocyte lysate system with IC_{50} of 0.36 nM. Furthermore, it exhibited *N*-glycosidase activity and cytotoxicity against Vero cell line with IC_{50} higher than 1,540 nM. Interestingly, Cochinin B manifested strong antitumor activities on human cervical epithelial carcinoma (HeLa), human embryonic kidney (HEK293) and human small cell lung cancer (NCI-H187) cell lines with IC_{50} of 16.9, 114 and 574 nM, respectively. In addition, antitumor analyses by observation of cell morphology, annexin V assay, DNA fragmentation assay and western blotting of apoptosis-related proteins indicated that Cochinin B inhibited HeLa cells via apoptotic pathway

To further characterize this protein, cDNA clones were isolated from genomic DNA and total RNA using the degenerative primer designed from the N-terminal amino acid sequence. The entire cDNA contained 925 nucleotides in length and encoded the mature Cochinin B of 259 amino acids. Cochinin B had nearly 60-80% similarity to several type 1 RIPs from the Cucurbitaceae family. The nucleotide sequence encoding mature Cochinin B was constructed in the pET28a vector for overexpression in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). The recombinant protein was purified to homogeneity by Ni Sepharose Fast Flow chromatography with a final yield of about 0.3-0.5 mg/liter of culture. It was found that the protein inhibited luciferase mRNA translation in the rabbit reticulocyte cell-free system with an IC_{50} value of approximately 16.25 nM. The anti-proliferative activity on HeLa cell line was also investigated.

KEY WORDS: RIBOSOME-INACTIVATING PROTEIN/CUCURBITACEAE/
COCHININ B/MOMORDICA
COCHINCHINENSIS/ANTITUMOR/ CYTOTOXICITY/*N*-
GLYCOSIDASE

158 P.