เอนไซม์และยีนของเจอรานิลเจอรานิล ไดฟอสเฟต ฟอสฟาเตส ในวิถีชีวสังเคราะห์ของเปลาโนทอลในเปล้าน้อย

นางนาฏศจี นวลแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547
ISBN 974-53-2091-9

GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE PHOSPHATASE ENZYME AND GENE OF PLAUNOTOL BIOSYNTHETIC PATHWAY IN *CROTON STELLATOPILOSUS* OHBA

Mrs. Natsajee Nualkaew

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Doctor of Philosophy in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-2091-9

Thesis Title	GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE PHOSPHATASE ENZYME AND GENE OF PLAUNOTOL BIOSYNTHETIC PATHWAY IN *CROTON STELLATOPILOSUS* OHBA
By	Mrs. Natsajee Nualkaew
Field of Study	Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Thesis Advisor	Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Professor Meinhart H. Zenk, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree.

Boonyong Tantisira ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

S. Hongseripipatana ..... Chairman

(Associate Professor Sumphan Wongseripipatana, Ph.D.)

W. De-Eknamkul ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

Nongluksna Sriubolmas ..... Member

(Associate Professor Nongluksna Sriubolmas, Ph.D.)

Khanit Suwanborirux ..... Member

(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

Manee Chanama ..... Member

(Assistant Professor Manee Chanama, Ph.D.)

นาฏศจี นวลแก้ว : เอนไซม์และยีนของเจอรานิลเจอรานิลไดฟอสเฟต ฟอสฟาเตส ในวิถีชีวสังเคราะห์ของเปลาโนทอลในเปล้าน้อย (GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE PHOSPHATASE ENZYME AND GENE OF PLAUNOTOL BIOSYNTHETIC PATHWAY IN *CROTON STELLATOPILOSUS* OHBA) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. วันชัย ดีเอกนามกูล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : Professor Dr. Meinhart H. Zenk 147 หน้า. ISBN 974-53-2091-9.

การป้อนสารติดฉลากของเจอรานิลเจอรานิออล [1-^{3}H]GGOH เข้าสู่ใบและก้อนคัลลัสของเปล้าน้อย พบว่าสารติดฉลากถูกนำไปใช้ในการสร้างเปลาโนทอล จากการศึกษาด้านเอนไซม์ทำให้สามารถตรวจพบกิจกรรมของ เอนไซม์เจอรานิลเจอรานิลไดฟอสเฟต ฟอสฟาเตส (GGDP phos phatase) ได้ทั้งในสารสกัดเอนไซม์จากใบและในคลอโรพลาส เมื่อทำการแยกเอนไซม์เบื้องต้น โดยวิธีเจลฟิลเตชัน โครมาโตกราฟี ทำให้พบว่า GGDP phosphatase ในสารสกัดเอนไซม์ มีอยู่สองชนิดคือ PI และ PII การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ทำให้พบว่า PI มีน้ำหนักโมเลกุล 232 kD ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยของโปรตีนที่มีขนาด 58 kD โดยมีค่า *K*m 0.2 mM ค่า *V*max 277.8 pkat/mg protein และมีสภาวะการทำงานเหมาะสมที่ pH 6.0-6.5 ในขณะที่เอนไซม์ PII เป็นโปรตีนเดี่ยวที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30-34 kD โดยมีค่า *K*m 0.1 mM ค่า *V*max 7.5 nkat/mg มีสภาวะการทำงานเหมาะสมที่ pH 6.5-7.0 และถูกยับยั้งการเร่งปฏิริยาได้โดยสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นสูง นอกจากนี้ยังพบว่า PI และ PII เป็นเอนไซม์ที่เกาะติดกับผนังเซลล์ โดยกิจกรรมเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งได้โดยโมลิบเดตไอออน เอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะของการใช้เจอรานิลเจอรานิลไดฟอสเฟตสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารตั้งต้น เจอรานิลฟอสเฟต และฟาเนสซิลไดฟอสเฟต การศึกษากระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พบว่า การตัดหมู่ไดฟอสเฟตออกจากเจอรานิลเจอรานิลไดฟอตเฟต โดยเอนไซม์ PI และ PII เกิดขึ้นโดยผ่านปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนคือ จากสารตั้งต้นเจอรานิลเจอรานิลไดฟอสเฟต เปลี่ยนไปเป็นเจอรานิลเจอรานิลโมโนฟอสเฟต และเจอรานิลเจอรานิออล ตามลำดับ การโคลนยีนจากใบเปล้าน้อย โดยอาศัยข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนของพรีนิลไดฟอสเฟต ฟอสฟาเตส จากฐานข้อมูล Swiss-Prot ทำให้ได้ยีนที่สามารถถอดรหัสโปรตีนขนาด 33.6 kD และยังคงแสดงกิจกรรมเอนไซม์เจอรานิลเจอรานิลไดฟอสเฟต ฟอสฟาเตส เอนไซม์ฟอสฟาเตสที่แสดงออกนี้ มีกระบวนการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนจาก GGDP ไปเป็น GGOH ในแบบ 2 ขั้นตอน เช่นเดียวกับเอนไซม์ GGDP phosphatase ที่แยกได้จากส่วนใบ คือจาก GGDP ผ่าน GGMP ไปเป็น GGOH ในที่สุด

สาขาวิชา เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4376955333 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
KEY WORD: *CROTON STELLATOPILOSUS* / GERANYLGERANIOL / GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE / GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE PHOSPHATASE / PLAUNOTOL BIOSYNTHESIS / PRENYL DIPHOSPHATE PHOSPHATASE

NATSAJEE NUALKAEW : GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE PHOSPHATASE ENZYME AND GENE OF PLAUNOTOL BIOSYNTHETIC PATHWAY IN *CROTON STELLATOPILOSUS* OHBA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR : PROF. MEINHART H. ZENK, Ph.D., 147 pp. ISBN 974-53-2091-9.

The whole leaves and callus cultures of *Croton stellatopilosus* Ohba could incorporate [1-^{3}H]geranylgeraniol into plaunotol. Enzymological studies showed that geranylgeranyl diphosphate phosphatase (GGDP phosphatase) activity was present in cell-free extracts of the leaves and of chloroplasts. The crude enzyme extract could be separated into two peaks of GGDP phosphatase acitivities (PI and PII) by gel filtration. Purification and characterization of both enzyme peaks revealed that PI was a tetrameric enzyme of 232 kD with its subunit size of 58 kD. It showed optimum pH of 6.0-6.5, an apparent *K*m of 0.2 mM, and a *V*max of 277.8 pkat/mg. PII was a monomeric enzyme of 30-34 kD with an apparent *K*m value of 0.1 mM, *V*max of 7.5 nkat/mg and exhibited substrate inhibition. Both PI and PII appeared to be membrane-bound enzymes and their activities could be inhibited by Mo^{2+}. Both preferred GGDP as their substrate rather than geranyl diphosphate or farnesyl diphosphate. Study on the catalysis of the reaction revealed that GGOH was formed from GGDP by two successive monodephosphorylations, rather than a one-step diphosphate dephosphorylation. Cloning of the phosphatase genes from *C. stellatopilosus* leaves, based on the available information of prenyl diphosphate phosphatase in Swiss-Prot database, was also performed using *E. coli* as expression system. The results showed that the encoded protein had its molecular weight of 33.6 kD and could exhibit GGDP phosphatase activity. The expressed phosphatase also showed its process of catalytic dephosphorylation by using two sequential steps of monophosphate dephosphorylation from GGDP to GGMP and to GGOH.

Field of study Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Academic year 2004

Student's signature.....
Advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul, my major advisor for his guidance, valuable advice, encouragement and understanding throughout my work.

I especially thank Professor Dr.Meinhart H. Zenk, my co-advisor for his valuable advice, supervision and understanding throughout my work especially in the part of enzymology. I am also greateful thank Professor Toni M. Kuchan, for her guidance, valuable advice in the field of molecular biology.

I would like to thank Mr. Nils Guennewich, Dr. Karin Springob, and Ms Maja Raschke, for their kindly help and suggestion for my work in Germany.

I am grateful to laboratory assistants, colleagues and friends of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and also the staffs, postgraduates, and friends of Biocenter and those of Institute of Plant Biochemistry, Halle/Saale, Germany, for their assistance and friendship.

I would like to thank the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, The Thailand Research Fund (TRF) for financial support, the German Academic Exchange (DAAD) for partial research grant in Germany and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Biocenter, and Institute of Plant Biochemistry, Germany for providing laboratories facilities, equipments and chemical compounds.

I would like to thank The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University; Siri Ruckhachati Medicinal Plant Garden, Mahidol University; and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Srinakharinwirot University for their support of plant materials.

I am much indebted to Khon-Kaen University for permission enabling me to undertake this higher study.

Finally, I am grateful to my parents, my husband and my family for their love, encouragement, support and entirely care. The usefulness of this dissertation, I dedicate to my parents and all of my teachers.

CONTENTS

Page

Chapter **Page**

LIST OF TABLES

Table **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

ABBREVATIONS

%	=	percent (part per 100); percentage
β	=	beta
β-	=	beta-
δ	=	chemical shift
μCi	=	microCurie
μl	=	microliter (s)
μM	=	micro molar (s)
λ_{max}	=	wavelength at maximum absorption
μmol	=	micromole
/	=	per, or divided by
[1-^{14}C]	=	carbon position 1 of the molecule is labeled with carbon 14
[1-^{3}H]	=	hydrogen position 1 of the molecule is labeled with tritium
^{1}H-NMR	=	proton nuclear magnetic resonance
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
Bis	=	N,N'-dimethyl bisacrylamide
bp	=	base pair
BSA	=	bovine serum albumin
cDNA	=	cloning DNA
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
$CHCl_3$	=	chloroform
Ci	=	Curie
cm	=	centimeter
cpm	=	counts per minute
CTP	=	cytidine 5'-triphosphate
Da	=	Dalton, unit of molecular mass (1/12 of C=1)
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dpm	=	disintegrations per min
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
e. g.	=	for example
EM	=	electron microscope

etc.	=	et cetera
Fig	=	Figure
g	=	gram
g	=	centrifugal force (relative to gravity)
GGPPS	=	geranylgeranyl pyrophosphate synthase
hr	=	hour
Hz	=	Hertz
IDP	=	isopentenyl diphosphate
kD	=	kilodalton, (x 10^3 Da)
kg	=	kilogram
K_m	=	Michaelis constant = substrate concentration at which the rate of enzyme-catalysed reaction is half maximum rate
l	=	liter (s)
LS	=	Linsmair and Skoog (1965) medium
m	=	meter (s)
M	=	molar (s)
m/z	=	mass to charge ratio
mA	=	milliampere
MeOH	=	Methanol
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
mmol	=	millimole
Mr	=	relative molecular mass
MS	=	Murishage and Skoog (1962) medium
MS	=	Mass spectrometry
MW	=	molecular weight
N_2	=	Nitrogen atmosphere
NaOH	=	sodium hydroxide
nkat	=	nano katal

nm	=	nanometer (s)
no.	=	number
^{o}C	=	degree Celsius
opt	=	optimum
PCR	=	polymerase chain reaction
pH	=	hydrogen ion concentration
pI	=	isoelectric point
pkat	=	pico katal
pmol	=	picomole (s)
ppm	=	part per million
q.s.	=	quantum suffices
R_f	=	distance spot moved/ distance solvent moved (TLC)
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	revolutions per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacylamide gel electrophoresis
sec	=	second (s)
sp.act.	=	specific activity
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	ultraviolet light
v/v	=	volume/ volume
Ve	=	elution volume
V_{max}	=	maximum velocity of enzyme
Vo	=	void volume
w/v	=	weight/volume (concentration)
wt	=	weight