เอนไซม์และยีนโพลีคีไทด์ซินเทสในเจตมูลเพลิงแดง

นางอพัชชา จินดาประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2410-8

POLYKETIDE SYNTHASE ENZYMES AND GENES IN *PLUMBAGO INDICA*

Mrs. Aphacha Jindaprasert

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic year 2005

ISBN 974-14-2410-8

Thesis Title	POLYKETIDE SYNTHASE ENZYMES AND GENES IN *PLUMBAGO INDICA*
By	Mrs. Aphacha Jindaprasert
Filed of study	Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Thesis Advisor	Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Professor Toni M. Kutchan, Ph.D.

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

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

K. Likhit ..... Chairman

(Associate Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

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

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

Nongluksna Sriubolmas ..... Member

(Associate Professor Nongluksna Sriubolmas, Ph.D.)

Rutt Suttisri ..... Member

(Associate Professor Rutt Suttisri, Ph.D.)

Manee Chanama ..... Member

(Assistant Professor Manee Chanama, Ph.D.)

อพัชชา จินดาประเสริฐ: เอนไซม์และยีนโพลีคีไทด์ซินเทสในเจตมูลเพลิงแดง (POLYKETIDE SYNTHASE ENZYMES AND GENES IN *PLUMBAGO INDICA*) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. วันชัย ดีเอกนามกูล, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ศ.ดร.โทนี่ เอ็ม คุทชาน, 127 หน้า. ISBN 974-14-2410-8

การศึกษาในครั้งนี้เกี่ยวกับการค้นหาเอนไซม์ และยีนของเอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทสในเจตมูลเพลิงแดงเพื่อความเข้าใจเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ระดับเอนไซม์ของสารพลัมบาจิน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเจตมูลเพลิงแดงในครั้งนี้สามารถชักนำให้เกิดเป็นเนื้อเยื่อแคลลัส รากเพาะเลี้ยง และต้นพืชขนาดเล็กในหลอดทดลอง โดยแคลลัสที่ได้เกิดจากการใช้ส่วนต้นอ่อนของพืช ภายใต้สภาวะของอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนรากเพาะเลี้ยงเกิดจากการใช้ใบอ่อน ภายใต้สภาวะของอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณรากเพาะเลี้ยง ภายใต้สภาวะของอาหารเหลวสูตร MS ในขณะที่ต้นพืชขนาดเล็กในหลอดทดลองเกิดจากการใช้ส่วนข้อของพืช ภายใต้สภาวะของอาหารสูตร LS เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพลัมบาจินด้วยเทคนิค HPLC พบว่าส่วนต้นและรากของต้นพืชที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีการสะสมของสารมากกว่าแคลลัสและรากเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ดี เมื่อใช้สารกัมมันตรังสี malonyl-CoA เพื่อตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทสในสารสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต่างๆ ไม่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทสในการสร้างพลัมบาจิน ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล มาใช้ในการหายีนของโพลีคีไทด์ซินเทส โดยการทำ cDNA library ที่ได้จากการใช้อาร์เอ็นเอ (RNA) จากชิ้นส่วนราก วิธีการนี้ทำให้ค้นพบ cDNA จำนวน 1 ชิ้นที่สมบูรณ์ ซึ่งเมื่อนำยีนนี้ไปแสดงออกและชักนำให้สร้างโปรตีนใน *Escherichia coli* แล้ว พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้สามารถใช้ acetyl-CoA ทำปฏิกิริยากับ malonyl-CoA ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยานี้พบว่าเป็นสารกลุ่มไพโรน (pyrone) หลายชนิด ซึ่งได้แก่ triketide, tetraketide, pentaketide อย่างละ 1 ชนิด และ hexaketide pyrone อีก 3 ชนิด นอกจากนี้การใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ร่วมกับการเติมสารสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต่างๆ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สามารถเปลี่ยนสาร hexaketide pyrone ตัวหนึ่งไปเป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่ยังไม่รู้โครงสร้างทางเคมี อย่างไรก็ดีการทดลองที่ผ่านมายังไม่สามารถค้นพบการสร้างแนพโทควิโนนพลัมบาจินในสภาวะต่างๆที่มีการศึกษานี้ ปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพลัมบาจินในหลอดทดลองยังไม่ถูกค้นพบ และต้องดำเนินการวิจัยต่อไป

สาขาวิชา เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4476976633: MAJOR: PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
KEY WORD: PLANT POLYKETIDE SYNTHASE/ TISSUE CULTURE/CLONING/
EXPRESSION/ *PLUMBAGO INDICA*/PLUMBAGIN

APHACHA JINDAPRASERT: POLYKETIDE SYNTHASE ENZYMES AND GENES IN *PLUMBAGO INDICA*. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, PH.D., THESIS COADVISOR: PROF.TONI M. KUTCHAN, PH.D., 127 pp. ISBN 974-14-2410-8.

Studies on the enzyme and gene of a polyketide synthase in *Plumbagin indica* have been performed in order to understand the enzymatic formation of plumbagin in plant. Tissue cultures of *P. indica* were successfully established in forms of callus, root culture and *in vitro* plantlets. Callus cultures derived from young stem explants were generated on MS medium supplemented with 1.0 g/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.1 mg/l 6-benzylaminopurine (BA). Root cultures were established from young leaf segments on Gamborg's B5 (B5) medium supplemented with 1.0 mg/l α-napthaleneacetic acid (NAA) and 0.1 mg/l kinetin. Induced roots were cultured in Murashige and Skoog (MS) liquid medium without growth regulators for root proliferation. Plantlets were regenerated from nodal segments and maintained on Linsmaier and Skoog (LS) medium also without growth regulators. Plumbagin content present in these *P. indica* tissues were determined using high performance liquid chromatography (HPLC). The analysis revealed that the content of plumbagin in the aerial parts and roots of the micropropagated plantlets was significantly higher than that in callus and root cultures. By using a radiolabelled compound of malonyl-CoA as substrate, a standard enzyme assay was established to detect plant polyketide synthase activities in crude protein extracts prepared from the various tissue cultures of *P. indica*. The formation of plumbagin was, however, not detected in the established enzyme assay conditions. The technique of molecular cloning was, therefore, introduced to express and characterize the enzyme. A cDNA encoding a polyketide synthase, PinPKS, was isolated from a cDNA library prepared from the RNA of *P. indica* roots. The recombinant PinPKS was expressed in *Escherichia coli* and assayed for its polyketide synthase activity with acetyl-CoA as a starter molecule and malonyl-CoA as a co-substrate. Analysis of the resulting reaction mixture revealed that there was enzymatic formation of various sizes of pyrone products. These included the pyrones of triketide, tetraketide, pentaketide (one each) and three hexaketides. Addition of a crude protein extract of *P. indica* tissues into the reaction mixture could lead to an unknown compound which has not been identified. With many attempts, no structures of naphthoquinones formed from the hexaketide level have been found in the enzyme assay. Required factors for plumbagin formation *in vitro* remain to be discovered.

Program Pharmaceutical Chemistry and Natural Products Student's signature Aphacha Jindaprasert

Advisor's signature W. De-Eknamkul

Academic year 2005

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul, of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for his excellent guidance, for providing me an opportunity to gain scientific experiences and continual encouragement throughout the course of this work.

I would like to express my sincere thank to Prof. Dr. Toni M. Kutchan for giving me a chance to learn the techniques of plant molecular biology. Working in the laboratories at the Leibniz Institute of Plant Biochemistry (IPB), Halle (Saale), Germany, was a real pleasure.

I would like to thank the thesis committees, for their serving as copreceptors.

I would like to thank Dr. Karin Springob of IPB, Halle (Saale), Germany, for introducing and guiding me on various techniques of molecular biology. Without her, it would have been much more difficult for me to finish this work.

I would like to thank Dr. Jurgen Schmidt of IPB, Halle (Saale), Germany, for his performance of mass spectrometric analysis.

I would like to thank Ms. Tanja Gulder of Institute of Organic Chemistry, Würzburg University, Würzburg, Germany, for her performance of quantification of plumbagin.

I would like to thank the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, The Thailand Research Fund (TRF) and the Deutsche Akademische Austausch Dienst (DAAD) for financial support throughout this research work.

Finally, I wish to express my indebtedness and grateful thanks to my husband and my family for their love, understanding and cheerfulness. Without their support, this work would not have been successful.

CONTENTS

Page

page

page

page

page

LIST OF TABLES

page

LIST OF FIGURES

page

page

page

ABBREVIATIONS

Abs	absorbance
ACS	acridone synthase
ALS	aloesone synthase
APS	ammonium persulfate
B5	Gamborg medium
BA	6-benzylaminopurine
BAS	benzalacetone synthase
BBS	bibenzyl synthase
bp	base pair
BPS	benzophenone synthase
cDNA	complementary DNA
CHS	chalcone synthase
Ci	Curie
cm	centimeter (s)
CoA	coenzyme-A
cpm	count per minute
CTAS	Coumaroyl triacetic acid lactone synthase
dNTP	2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate
dpm	disintegrations per minute
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
eV	electron volt
h	hour
HEDS	homoeriodictyol/eriodictyol synthase

HPLC	high performance liquid chromatography
IAA	indole-3-acetic acid
IPTG	isopropylthio-β-D-galactoside
g	gram (s)
kinetin	kinetin-6-furfurylaminopurine
kDa	kilodalton ($x10^3$ Da)
kg	kilogram
L	liter (s)
LC-ESI-MS	liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry
LS	Linsmaier and Skoog medium
m	meter (s)
M	molar
min	minute (s)
mg	milligram
ml	milliliter
MMLV-RT	moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase
MS	Murashige and Skoog medium
mRNA	messenger RNA
M^+	molecular ion
m/z	mass to charge ratio
nm	nanometer (s)
NAA	α-naphthaleneacetic acid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OD	optical density
OKS	octaketide synthase

PCS	polyketide chromone synthase
PCR	polymerase chain reaction
Pfu	plaque forming unit
PinPKS	*Plumbago indica* polyketide synthase
PKS	polyketide synthase
RNA	ribonucleic acid
rpm	rotation per minute
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sec	second
STS	stilbene synthase
TEMED	*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine
TLC	thin layer chromatography
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	unit
V	voltage
VPS	phlorisovalerophenone synthase
v/v	volume per volume (concentration)
w/v	weight per volume (concentration)
w/w	weight per weight (concentration)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2-PS	2-pyrone synthase
°C	degree Celsius
λ_{max}	wavelength at maximum absorption

µg	microgram (s) (10^{-6} g)
µl	microliter (s) (10^{-6} l)
µM	micromolar (s)