กรุณามบิกาย อาร์ทานาริสวารัน : การวิเคราะห์โครงสร้างและการทำงานของเอ็นไซม์ที่มีลักษณะคล้ายกลูโคซิลเซรามิเดส (GBA2) จาก *Arabidopsis thaliana* (FUNCTIONAL AND STRUCTURAL ANALYSIS OF PLANT GLUCOSYL CERAMIDASE (GBA2)-LIKE ENZYMES FROM *Arabidopsis thaliana*) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 167 หน้า.

กลูโคซิลเซราไมด์ (Glucosylceramide, GlcCer) เป็นองค์ประกอบสำคัญของไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งในสัตว์และพืช กลูโคซิลเซราไมด์ในสัตว์ถูกย่อยสลายด้วยกลูโคซิลเซเรโบรซิเดส (glucosylcerebrosidase) 1 และ 2 (GBA1 และ GBA2) เรียกอีกอย่างว่าไลโซโซมอล (lysosomal) และนอนไลโซโซมอล เบตากลูโคซิลเซรามิเดส (nonlysosomal β-glucosylceramidase) GBA1 เป็นเอ็นไซม์ในตระกูลไกลโคไซด์ไฮโดรเลส 30 (GH 30) และ GBA2 เป็นเอ็นไซม์ในตระกูลไกลโคไซด์ไฮโดรเลส 116 (GH116) ซึ่งพบในพืช ในปัจจุบันศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์ในพืชคือ AtGCD3 ในที่นี้เรียกว่า At4GH116 ซึ่งเป็นหนึ่งในสี่ของเอนไซม์ GH116 ที่ถอดรหัสจากจีโนมของ *Arabidopsis thaliana* อาจมีส่วนร่วมในแคแทบอลิซึมของกลูโคซิลเซราไมด์ At4GH116 สามารถไฮโดรไลซ์กลูโคซิลเซราไมด์ที่สกัดจาก *A. thaliana* ได้ดี แต่มีแอคติวิตีเร่งปฏิกิริยาต่ำต่อ fluorescent GlcCer

ในงานวิจัยนี้ ได้ทดสอบการทำงานของ At4GH116 ต่อสารเมแทบอลิซึมอื่น ๆ ของพืช รวมทั้งกลูโคซิลเซราไมด์ ยีนสี่ตัวที่ถอดรหัสเป็น GH116 homologues ในจีโนมของอะราบิดอบซิส ถูกตั้งชื่อเป็น At1GH116 At3GH116 At4GH116 และ At5GH116 ตามโครโมโซมที่พบ homozygous mutant lines (*Atgh116/Atgh116*) ของทั้งสี่ยีน ไม่พบความผิดปกติในการเจริญเติบโตที่เห็นได้ชัดเจนหรือมีความแตกต่างในลักษณะที่ปรากฏในแต่ละ single homozygous mutants เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Col-0) ภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตปกติ แต่สิ่งที่น่าสนใจคือ มีการสร้างเม็ดสีสีม่วงใน single homozygous mutant lines ทั้งสี่ยีนซึ่งเป็นผลมาจากความเครียดจากแสง เพื่อตรวจหาผลของการสูญเสียหน้าที่ของการกลายพันธุ์ mutant lines ถูกผสมเพื่อสร้าง double mutant lines ความน่าจะเป็นทั้งหมดของการผสมของ single homozygous mutant lines (*Atgh116/Atgh116*) ถูกผสมข้ามเกสร แต่สามารถสร้างได้เพียง double homologous mutant lines *At1gh116* และ *At5gh116*

ในแนวทางอื่นเพื่อวิเคราะห์การทำงาน ของ At4GH116 ผ่านความจำเพาะของสารตั้งต้น โปรตีน At4GH116 แบบรีคอมบิแนนท์ถูกผลิตขึ้นในเชื้อเอสเชอริเชียโคไล (*Escherichia coli*) โปรตีน At4GH116 ถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ตามด้วยวิธี size exclusion chromatography (SEC) ชนิด S200 ส่วนของโปรตีนที่ถูกชะออกจาก SEC ถูกตั้งชื่อเป็นพีค I ถึงพีค III ซึ่งแต่ละพีคมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน การวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์พบว่า At4GH116 สามารถไฮโดรไลซ์ *p*-nitrophenyl (*p*NP)-β-D-glucopyranoside (*p*NPGlc, k_{cat}/K_m = 17.4 $mM^{-1}s^{-1}$) ได้อย่างมีประสิธิภาพ แต่มีแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยต่อ *p*NP-glycosides อื่น ๆ สำหรับไกลโคไซด์ธรรมชาติ At4GH116 สามารถไฮโดรไลซ์ apigenin-7-O-β-D-glucoside (k_{cat}/K_m = 1133 $mM^{-1}s^{-1}$) และ flavonoid-7-O-glucosides อื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด การวิเคราะห์ขนาดและรูปร่างโดย small angle X-ray diffraction (SAXS) พบว่า At4GH116 ที่ได้ใน SEC peak II เป็นโอลิโกเมอร์รูปทรงกลมที่มีประมาณสี่หน่วยโมโนเมอร์

จากผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า At4GH116 สามารถไฮโดรไลซ์ฟลาโวนอยด์กลูโคไซด์ของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง และสามารถรวมตัวเป็นโปรตีนรูปทรงกลมแบบ trimeric หรือ tetrameric ในสารละลาย แสดงว่า At4GH116 อาจมีหน้าที่ทางชีวภาพอื่นอีกนอกเหนือจากเมแทบอลิซึมของกลูโคซิลเซราไมด์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2563 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

KARUNAMBIGAI ARTHANAREESWARAN : FUNCTIONAL AND STRUCTURAL ANALYSIS OF PLANT GLUCOSYL CERAMIDASE (GBA2)-LIKE ENZYMES FROM *Arabidopsis thaliana.*
THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 167 PP.

β-GLUCOSYLCERAMIDASE / *ARABIDOPSIS THALIANA*/ GH116 T-DNA MUTANT PLANT LINES / KINETIC AND STRUCTURAL ANALYSIS

Glucosylceramide (GlcCer) is an important lipid component of plasma membranes in both animals and plants. GlcCer is catabolized by glucosylcerebrosidase 1 and 2 (GBA1 and GBA2), also referred to as lysosomal and nonlysosomal β-glucosylceramidase. GBA1 belongs to the glycoside hydrolase family 30 (GH 30) and GBA2 is a member of glycoside hydrolase family 116 (GH116), in plants. A recent study in plants revealed that AtGCD3, here referred to as At4GH116, one of four GH116 enzymes encoded in the *Arabidopsis thaliana* genome, may participate in GlcCer catabolism. It preferentially hydrolyzed GlcCer extracted from *A. thaliana* and had low catalytic activity towards a fluorescent GlcCer.

Here, I investigated the activity of At4GH116 towards other plant metabolites, in addition to glucosylceramides. The four genes encoding GH116 homologues in the Arabidopsis genome were designated as At1GH116, At3GH116, At4GH116 and At5GH116, according to the chromosome on which they were found. Homozygous mutant lines (*Atgh116*/*Atgh116*) were identified for each of the four genes. Neither obvious growth defects nor differences in appearance were observed in any single homozygous mutants compared to wild type (Col-0) under the normal growth

conditions. Interestingly, purple color pigmentation was observed in all the four single homozygous mutant lines as a result of light stress.

In another approach to analyze the function via the substrate specificity of At4GH116, recombinant At4GH116 protein was produced in *Escherichia coli*. At4GH116 fusion protein was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC), followed by S200 size exclusion chromatography (SEC). Eluted protein fractions from SEC were named as peak I to peak III, each with a different native molecular weight. Kinetic analysis revealed that At4GH116 hydrolyzed *p*-nitrophenyl (*p*NP)-β-D-glucopyranoside (*p*NPGlc, k_{cat}/K_m = 17.4 $mM^{-1}s^{-1}$) efficiently but had little activity toward other *p*NP-glycosides. Among natural glycosides, At4GH116 hydrolyzed apigenin-7-O-β-D-glucoside (k_{cat}/K_m = 1133 $mM^{-1}s^{-1}$) and other flavonoid 7-O-glucosides most efficiently. Analysis of the size and shape by small angle X-ray diffraction (SAXS) revealed that the At4GH116 found in SEC peak II is a globular shaped oligomer with approximately four monomer units.

Our findings show that At4GH116 hydrolyzes plant flavonoid glucosides with high efficiency, and can form a trimeric or tetrameric globular protein in solution. This suggests that At4GH116 may have additional biological functions, aside from glucosylceramide catabolism.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry Student's Signature

Academic Year 2020 Advisor's Signature