พองาม ประเสริฐ : การวิเคราะห์โครงสร้างของเอนไซม์ BGLU1 E176Q ที่จับน้ำตาลและการวิเคราะห์โครงสร้างผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากแทรนซ์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์ (STRUCTURAL ANALYSIS OF SUGAR BINDING TO RICE β-GLUCOSIDASE BGLU1 E176Q AND ITS TRANSGLYCOSYLATION PRODUCTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 115 หน้า.

เอนไซม์ BGlu1 (Os3BGlu7) เป็นเอนไซม์ของข้าว (*Oryza sativa*) ซึ่งจัดอยู่ในตระกูล glycoside hydrolase family 1 (GH1) และมีการแสดงออกสูงในดอกและลำต้นของข้าว เอนไซม์ BGlu1 E176Q ถูกผลิตใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ Origami(DE3) ในรูปของโปรตีนที่มีปลายอะมิโนต่อกับโปรตีนไทโอรีดอกซินและบริเวณที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนเรียงต่อกัน 6 ตัวต่ออยู่ที่ส่วนปลายของโปรตีน เอนไซม์ BGlu1 E176Q สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะที่มีลิแกนด์ต่ออยู่กับเรซิน (IMAC) สองขั้นตอน เอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในคอลัมน์ IMAC ครั้งที่หนึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน โปรตีนไทโอรีดอกซินและบริเวณที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนเรียงต่อกัน 6 ตัวต่ออยู่ที่ส่วนปลายของโปรตีนถูกตัดออกจากเอนไซม์ BGlu1 E176Q ด้วยเอนไซม์เอนเทอโรไคเนสและแยกส่วนนี้ออกด้วยวิธี IMAC และใช้เทคนิค gel-filtration ด้วยคอลัมน์ Superdex S-200 เอนไซม์ BGlu1 E176Q ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน การตกผลึกของเอนไซม์ BGlu1 E176Q ประสบความสำเร็จมาแล้วด้วยวิธี hanging drop vapor diffusion ร่วมกับเทคนิค microseeding ผลึกของเอนไซม์ BGlu1 E176Q กับ2,4-dinitrophenyl-2-deoxy-2-fluoro-mannoside (DNP2FM) และเอนไซม์กับน้ำตาลแมนโนส (MAN) สามารถตกผลึกได้ใน 23% (w/v) PEG MME 5000, 0.2 M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 M MES, pH 6.7 และ 10 mM DNP2FM และ 21% (w/v) PEG MME 5000, 0.2 M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 M MES, pH 6.7 และ *p*NPMan ตามลำดับ ข้อมูลจากการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของผลึกเอนไซม์ BGlu1 E176Q กับ DNP2FM หรือ เอนไซม์กับ MAN เก็บได้ที่ 1.95 อังสตรอมและ 1.69 อังสตรอม ตามลำดับ โครงสร้างของเอนไซม์ BGlu1 E176Q กับ DNP2FM และเอนไซม์กับ MAN วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี molecular replacement โดยอาศัยโครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์ BGlu1 E176Q กับ 2-deoxy-2-fluoroglucoside (3AHT) กับโปรตีน 2 โมเลกุลต่อหน่วยอสมมาตร พบว่าในโครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์ มีปริมาณน้ำในผลึกประมาณร้อยละ 47.63 และค่าสัมประสิทธิ์ของ Matthews คือ 2.35 $Å^3 Da^{-1}$ สำหรับโครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์กับ DNP2FM และปริมาณน้ำในผลึกประมาณร้อยละ 47.63 และค่าสัมประสิทธิ์ของ Matthews คือ 2.35 $Å^3 Da^{-1}$ สำหรับโครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์กับ MAN หมู่น้ำตาลไพแรโนสในโครงสร้างของ BGlu1 E176Q กับ DNP2FM บริเวณเร่งมีโครงสร้างแบบ

รีแลกซ์แชร์ $^4C_1$ คล้ายกับโครงสร้างของ BGlu1 E176Q กับ 2-deoxy-2-fluoro-β-D-glucoside (DNP2FG) และพบ MAN ในบริเวณเร่งของ BGlu1 E176Q ที่ตกผลึกกับ *p*NPMan

การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ BGlu1 E176Q ด้วยปฏิกิริยาแทรนซ์ไกลโคซิเลชัน ในการย้ายน้ำตาลจาก *p*NPGlc หรือ *p*NPMan ซึ่งเป็นหมู่ให้ ไปให้ *p*-nitrobenzenethiol (NBT) ซึ่งเป็นหมู่รับในการผลิต *p*-nitrophenyl-thioglycoside ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาแทรนซ์ไกลโคซิเลชันพบในตำแหน่งเดียวกับ *p*-nitrophenyl-thioglycoside ในโครมาโทรกราฟีแผ่นบาง (TLC) และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) การเพิ่มความเข้มข้นของ NBT ถึง 10 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาที่ใช้ *p*NPGlc มีการเพิ่มขึ้นที่เห็นได้ของอัตราร้อยละของ *p*NPGlc เปลี่ยนเป็น *p*-nitrophenyl thioglucoside ในลักษณะเดียวกันร้อยละที่เห็นได้ของการเกิดผลิตภัณฑ์จากการเกิดแทรนซ์ไกลโคซิเลชัน ของผลิตภัณฑ์ *p*-nitrophenyl thiomannoside โดยเพิ่มความเข้มข้นของ *p*NPMan

5 และ 10 มิลลิโมลาร์ และเพิ่มความเข้มข้นของ NBT ถึง 10 มิลลิโมลาร์ แต่ที่ความเข้มข้นของ NBT ที่ 10 มิลลิโมลาร์ และ 2 มิลลิโมลาร์ของสารตั้งต้น *p*NPMan ซึ่งเป็นหมู่ให้ยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ BGlu1 E176Q กรด/เบส (acid/base) สามารถใช้ในการผลิต *p*-nitrophenyl-thiomannoside ซึ่งสามารถผลิตได้ยากโดยการสังเคราะห์แยกอินทรีย์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

POR-NGAM PRASERT : STRUCTURAL ANALYSIS OF SUGAR BINDING TO RICE β-GLUCOSIDASE BGLU1 E176Q AND ITS TRANSGLYCOSYLATION PRODUCTS. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 115 PP.

BGLU1 E176Q/β-GLUCOSIDASE/TRANSGLYCOSYLATION/ GLYCOSIDE HYDROLASE FAMILY 1

Rice BGlu1 (systematically named Os3BGlu7) is a rice (*Oryza sativa*) β-glucosidase that is classified in glycoside hydrolase family 1 (GH1) and is highly expressed in flowers and germinating shoots. The BGlu1 catalytic acid/base mutant E176Q was expressed as an N-terminal thioredoxin/His6 fusion protein in *Escherichia coli* strain Origami(DE3). BGlu1 E176Q was purified by two steps of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) with a proteolytic digestion in between. The fusion protein purified by the first IMAC had an apparent molecular weight of 66 kDa. The thioredoxin/His6 tag was cleaved from the protein with enterokinase, and the tag-free BGlu1 E176Q protein of 55 kDa was purified by IMAC and gel-filtration on a Superdex 200 column. The crystallization of BGlu1 E176Q was accomplished by optimization of the previously utilized conditions in hanging drop vapor diffusion with microseeding. Crystals of BGlu1 E176Q in covalent complexes with 2-deoxy-2-fluoro-β-D-mannoside (DNP2FM) and D-mannose (MAN) were obtained by crystallization of the protein in 23% (w/v) PEG MME 5000, 0.2 M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 M MES, pH 6.7, and 10 mM DNP2FM and 21% (w/v) PEG MME 5000, 0.2 M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 M MES, pH 6.7, and *p*NPMan, respectively. The data sets from diffraction of X-rays with crytals of BGlu1 E176Q with DNP2FM or MAN were collected to 1.95 Å and 1.69 Å resolution,

respectively. The structure of BGlu1 E176Q with DNP2FM and MAN were solved by molecular replacement with the BGlu1 E176Q structure with 2-deoxy-2-fluoroglucoside (3AHT) with two protein molecules per asymmetric unit. These solutions gave a solvent content of 47.63% and Matthews coefficient (*V*M) of 2.35 $Å^3$ Da^{-1} for the BGlu1 E176Q with DNP2FM complex data set, and a solvent content of 47.63% and *V*M of 2.35 $Å^3$ Da^{-1} for the MAN complex data set. The sugar pyranose ring in the BGlu1 E176Q complex with DNP2FM in the active site had a $^4C_1$ relaxed chair conformation similar to that in the BGlu1 E176Q complex with 2-deoxy-2-fluoro-β-D-glucoside (DNP2FG). Free MAN was found in the active site of BGlu1 E176Q with *p*NPMan.

Rice BGlu1 E176Q transglycosylation activity in moving sugars from *p*NPGlc or *p*NPMan donors to *p*-nitrobenzenethiol (NBT) acceptor to produce *p*-nitrophenyl-thioglycosides was characterized. The products of these transglycosylation reactions were found at the same positions as the respective *p*-nitrophenyl-thioglycosides in thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Increasing the concentration of NBT up to 10 mM in the reactions with *p*NPGlc resulted in an increased apparent percentage of the *p*NPGlc converted to *p*-nitrophenyl-thioglucoside**.** Similarly the apparent percent conversion to the transglycosylation product *p*-nitrophenyl-thiomannoside with 5 and 10 mM *p*NPMan increased as the concentration of NBT increased to 10 mM, but 10 mM NBT appeared to inhibit coversion at the 2 mM *p*NPMan donor substrate concentration. These results suggest that the BGlu1 E176Q acid/base mutant may be used to produce *p*-nitrophenyl-thiomannoside, which is difficult to produce by organic synthesis.

School of Biochemistry Student's Signature_____

Academic Year 2012 Advisor's Signature_____