

กรุณามบิกาย อาร์ทานริสวารัน : 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 เบตาไกลูโคซิลเซรามิเดส (nonlysosomal  $\beta$ -glucosylceramidase) GBA1 เป็นเอ็นไซม์ในตระกูลไกลโคไซด์ไฮโดรเลส 30 (GH 30) และ GBA2 เป็นเอ็นไซม์ในตระกูลไกลโคไซด์ไฮโดรเลส 116 (GH116) ซึ่งพบในพืช ในปัจจุบันศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์ในพืชคือ AtGCD3 ในที่นี้เรียกว่า At4GH116 ซึ่งเป็นหนึ่งในสี่ของเอ็นไซม์ GH116 ที่ถอดรหัสจากจีโนมของ *Arabidopsis thaliana* อาจมีส่วนร่วมในแคแทบอลิซึมของกลูโคซิลเซราไมด์ At4GH116 สามารถไฮโดรไลซ์กลูโคซิลเซราไมด์ที่สกัดจาก *A. thaliana* ได้ดี แต่มีแอกติวิตีเร่งปฏิกิริยาค้ำต่อ fluorescent GlcCer

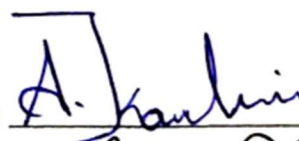
ในงานวิจัยนี้ ได้ทดสอบการทำงานของ At4GH116 ต่อสารเมแทบอลิซึมอื่น ๆ ของพืช รวมทั้งกลูโคซิลเซราไมด์ ยีนสี่ตัวที่ถอดรหัสเป็น GH116 homologues ในจีโนมของอะราบิโดบซิส ถูกตั้งชื่อเป็น At1GH116 At3GH116 At4GH116 และ At5GH116 ตามโครโมโซมที่พบ homozygous mutant lines (*Atgh116/Atgh116*) ของทั้งสี่ยีน ไม่พบความผิดปกติในการเจริญเติบโต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

ในแนวทางอื่นเพื่อวิเคราะห์การทำงานของ A4GH116 ผ่านความจำเพาะของสารตั้งต้น โปรตีน A4GH116 แบบรีคอมบิแนนท์ถูกผลิตขึ้นในเชื้อเอสเชอริเชียโคไล (*Escherichia coli*) โปรตีน A4GH116 ถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ตามด้วยวิธี size exclusion chromatography (SEC) ชนิด S200 ส่วนของโปรตีนที่ถูกชะออกจาก SEC ถูกตั้งชื่อเป็นพีค I ถึงพีค III ซึ่งแต่ละพีคมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน การวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์พบว่า A4GH116 สามารถไฮโดรไลซ์ *p*-nitrophenyl (*p*NP)- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc,  $k_{cat}/K_m = 17.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีแอกติวิตีเพียงเล็กน้อยต่อ *p*NP-glycosides อื่น ๆ สำหรับไกลโคไซด์ธรรมชาติ A4GH116 สามารถไฮโดรไลซ์ apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucoside ( $k_{cat}/K_m = 1133 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) และ flavonoid-7-O-glucosides อื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด การวิเคราะห์ขนาดและรูปร่างโดย small angle X-ray diffraction (SAXS) พบว่า A4GH116 ที่ได้ใน SEC peak II เป็นโอลิโกเมอร์รูปทรงกลมที่มีประมาณสี่หน่วยโมโนเมอร์

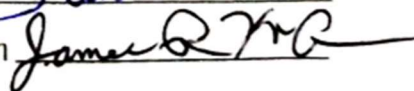
จากผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า A4GH116 สามารถไฮโดรไลซ์ฟลาโวนอยด์กลูโคไซด์ของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง และสามารถรวมตัวเป็นโปรตีนรูปทรงกลมแบบ trimeric หรือ tetrameric ในสารละลาย แสดงว่า A4GH116 อาจมีหน้าที่ทางชีวภาพอื่นอีกนอกเหนือจากเมแทบอลิซึมของกลูโคซิลเซราไมด์

สาขาวิชาเคมี  
ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนักศึกษา



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.

$\beta$ -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  $\beta$ -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.

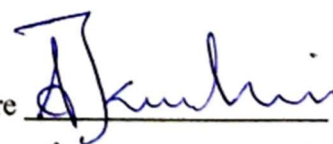
In another approach to analyze the function via the substrate specificity of At4GH116, recombinant At4GH116 protein was produced in *Escherichia coli*. At4GH116 fusion protein was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC), followed by S200 size exclusion chromatography (SEC). Eluted 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)- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPGLc,  $k_{cat}/K_m = 17.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) efficiently but had little activity toward other *p*NP-glycosides. Among natural glycosides, At4GH116 hydrolyzed apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucoside ( $k_{cat}/K_m = 1133 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) 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.

School of Chemistry

Academic Year 2020

Student's Signature



Advisor's Signature

