การนำเข้าและปฏิกิริยาออกซิเดชันของโคลีนในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

นายอภิชาติ ธาตุดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0588-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20604579

UPTAKE OF CHOLINE AND ITS OXIDATION IN HALOTOLERANT CYNOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*

Mr. Aphichart Thartdee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0588-1

Thesis Title	UPTAKE OF CHOLINE AND ITS OXIDATION IN HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*
By	Mr. Apichart Thartdee
Field of Study	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

.....Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Patchara Verakalasa, Ph.D.)

อภิชาติ ธาตุดี : การนำเข้าและปฏิกิริยาออกซิเดชันของโคลีนในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece halophytica* (Uptake of Choline and its Oxidation in Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์, 103 หน้า. ISBN 974-03-0588-1.

โคลีนเป็นสารประกอบไนโตรเจนประเภทไตรเมธิลลามีน โดยเป็นสารตั้งต้นของไกลซีนบีเทนมีคุณสมบัติเป็นสารออสโมไลท์สามารถป้องกันเซลล์เสียสภาพได้เมื่ออยู่ในภาวะที่มีแรงดันออสโมซิสภายนอกเซลล์สูง การนำเข้าโคลีนจากภายนอกในรูปของ [*methyl*-^{14}C] ในภาวะดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece halophytica* เป็นสิ่งที่ต้องตรวจสอบ การนำโคลีนเข้าสู่เซลล์นี้ถูกยับยั้งโดยคลอแรมฟีนิคอลซึ่งเกิดจากไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนการศึกษากลไกทางจลนพลศาสตร์ของการนำโคลีนเข้าสู่เซลล์ พบว่าในภาวะปรกติและภาวะที่มีความเครียดจากแรงดันออสโมซิส มีค่า K_m = 278.6 และ 256.4 μM และอัตราเร็วสูงสุด V_{max} = 17.9 และ 35.7 nmol/min/mg protein ตามลำดับ ผลของการยับยั้งแบบแข่งขันของการนำโคลีนเข้าสู่เซลล์พบว่า สารประกอบที่ปลายโครงสร้างมีหมู่เมธิล และแอลกอฮอล์ หรือหมู่อัลดีไฮด์ จะเป็นสารประกอบที่สำคัญต่อการยับยั้งการนำโคลีนเข้าสู่เซลล์ ส่วนไกลซีนบีเทนนั้นจะไม่ใช่สารประกอบที่แข่งขันกับการนำเข้าของโคลีน สารที่เป็นตัวยับยั้งการสร้างพลังงานภายในเซลล์จะให้ค่าการยับยั้งที่สูง ซึ่งจะเกี่ยวกับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่อยู่ในภาวะความเข้มข้นของเกลือสูง หลังจากที่ทำให้เซลล์แตก แอคติวิตีจำเพาะของโคลีนดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีโคลีน-ไกลซีนบีเทน อยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนใหญ่ และแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือในอาหารสูงขึ้น ไกลซีนบีเทนเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรทมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างมาก การศึกษาผลของเกลือต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl และ KCl เท่ากับหรือน้อยกว่า 0.1 โมลาร์ มีผลกระตุ้นให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ NaCl และ KCl สูงกว่า 0.1 โมลาร์ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ผลของโลหะหนักและสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เพอริพลาสมิคโปรตีนที่แยกได้จาก ไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece halophytica* จากภาวะปกติของเซลล์ในการเจริญและภาวะที่มีความเครียดจากแรงดันออสโมซิส ด้วยวิธี cold osmotic shock จากการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิสในสภาวะเสียสภาพพบว่าโปรตีนที่น่าจะมีบทบาทต่อการปรับตัวต่อความเครียดจากแรงดันออสโมซิสมีน้ำหนักโมเลกุล 19.9, 26.2, 34.6, 47.8 และ 83.9 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (โดยกำหนดเป็น PP 1, PP 2, PP 3, PP 4 และ PP 5) สามารถตรวจพบเพอริพลาสมิคโปรตีนที่จับกับโคลีนด้วยการทำ autoradiograph ของโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรฟอเรซิสในสภาวะไม่เสียสภาพ

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต อภิชาติ ธาตุดี
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4272464723 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: UPTAKE / CHOLINE / OXIDATION / CYANOBACTERIUM
APHICHART THARTDEE : UPTAKE OF CHOLINE AND ITS OXIDATION IN HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, 103 pp. ISBN 974-03-0588-1.

Choline is a trimethylated nitrogen compound, a precursor of glycine betaine which is one of the most potent osmoprotectants. Uptake of exogenous [*methyl*-^{14}C]choline upon osmotic stress by a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* was investigated. This uptake could be inhibited by chloramphenicol, suggesting an involvement of protein synthesis. Study of kinetics of [*methyl*-^{14}C] choline uptake revealed K_m values of control and stress conditions to be 278.6 and 256.4 μM respectively, the maximum velocities (V_{max}) were 17.9 and 35.7 nmol/min/mg protein respectively. The results of competition study suggest that *N*-methyl and an alcohol group or aldehyde group at the ends of molecule were important in its recognition by the system. Glycinebetaine was not a competitor, its uptake system was distinct from that of choline. Choline uptake was highly susceptible to a variety of inhibitors, which may be related to the dependence on metabolism of cells grown in the presence of high NaCl concentration. Oxidation of choline by choline dehydrogenase, the first enzyme in choline-glycine betaine pathway, was found to localize mainly in the membrane fraction of the disrupted cells. The enzyme activity was enhanced by the high salinity of growth medium.The glycine betaine aldehyde as substrate analog showed strong inhibition towards choline dehydrogenase activity. NaCl and KCl at or below 0.1 M stimulated choline dehydrogenase activity. At higher than 0.1 M KCl and NaCl the enzyme activity was inhibited. Metal ions and various reagents at concentration 1.0 mM showed inhibition on choline dehydrogenase activity. Periplasmic proteins were obtained from control cells and salt stressed cells of *Aphanothece halophytica* using the method of cold osmotic shock. Five proteins with apparent molecular masses of 19.9, 26.2, 34.6, 47.8 and 63.9 kDa (designated PP 1, PP 2, PP 3, PP 4 and PP 5) were found to play a role for adaptation to salt stress. The effect of salt stress on choline binding protein has been investigated using periplasmic proteins fractions. This binding protein could be identified by autoradiography of non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

Department BIOCHEMISTRY
Field of study BIOCHEMISTRY
Academic year 2001

Student's signature ...Aphichart Thartdee.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature .....

พิพิธภัณฑ์กลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Aran Incharoensakdi, for his excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this study. Without his kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Assistant Professor Tipaporn Limpaseni and Associate Professor Patchara Verakalasa for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

Sincere thanks are extended to all staff members and friends of the Department of Biochemistry and Department of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for assistance and friendship.

Finally, I wish to my express my deepest gratitude to my family for their support infinite love and understanding.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT....iv

ENGLISH ABSTRACT....v

ACKNOWLEDGEMENT....vi

CONTENTS....vii

LIST OF TABLES....xi

LIST OF FIGURES....xii

LIST OF ABBREVIATIONS....xiv

CHAPTER I INTRODUCTION....1

Osmotic adaptation in microorganisms-two strategies....4

Compatible solutes: characteristics and function....6

Transport of compatible solutes....10

The role of glycine betaine....11

Accumulation of glycine betaine in cyanobacterium....15

Function of choline and metabolism....17

The choline-glycine betaine pathway....20

The periplasmic substrate-binding protein....23

CHAPTER II MATERIAL AND METHODS....26

2.1 Instruments....26

2.2 Chemicals....27

2.3 Supplies....30

2.4 Kit....30

2.5 Bacterial strains....30

2.6 Growth rate determination....30

2.10.3 Effect of metal ions and various reagents
on choline dehydrogenase activity.....40
2.11 Isolation of periplasmic proteins by cold osmotic shock.....41
2.12 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).....41
2.12.1 Non-denaturing PAGE.....41
2.12.2 SDS-PAGE.....42
2.12.3 Detection of proteins in the slab gel
by coomassie blue staining.....43
2.12.4 Choline dehydrogenase activity staining.....43
2.12.5 Radiolabeling of periplasmic protein.....43
2.13 Determination of protein.....44
CHAPTER III RESUTS
3.1 Growth rate determination.....45
3.1.1 Growth of *A. halophytica* in various NaCl concentrations.....45
3.1.2 Choline functions as an osmoprotectant in *A. halophytica*.....45
3.1.3 Effect of choline concentration on growth at diferrent
salinity of *A. halophytica*.....46
3.1.4 Effect of choline on the salinity growth range
of *A. halophytica*.....51
3.2 Determination of [*methyl*-^{14}C]choline uptake system.....53
3.2.1 Uptake of [*methyl*-^{14}C]choline upon hyperosmotic stress.....53
3.2.2 Inhibition of induction by chloramphenicol.....53
3.2.3 Effect of various osmoticum on choline uptake.....54
3.3 Characterization of choline uptake system.....54
3.3.1 Kinetics of choline uptake.....54

3.3.2 Na^+ requirement of the uptake system.....60

3.3.3 Substrate specificity of choline uptake.....60

3.3.4 Effect of various inhibitors on choline uptake.....63

3.4 Choline oxidation by choline dehydrogenase.....64

3.5 Molecular weight determination on SDS-PAGE.....69

3.6 Non-denaturing PAGE.....69

CHAPTER IV DISCUSSION.....73

Osmoregulation in *A.halophytica*.....73

Determination of [*methyl*-^{14}C]choline uptake system.....74

Choline oxidation by choline dehydrogenase.....78

Evidence for periplasmic binding protein.....79

CHAPTER V CONCLUSION.....81

REFERENCES.....83

APPENDICES.....94

APPENDIX 1.....95

APPENDIX 2.....97

APPENDIX 3.....98

APPENDIX 4.....102

BIOGRAPHY.....103

LIST OF TABLES

Page

1. Uptake system for compatible solutes.....12

2. Effect of potential competitors on the initial rates of choline uptake.....62

3. Effect of various inhibitors on the initial rates of choline uptake.....63

4. Effect of choline analogues on the choline dehydrogenase activity.....66

5. Effect of metal ions and various reagents on choline dehydrogenase activity.....68

LIST OF FIGURES

Page

1.1 Structure of select osmoprotectants.....8

1.2 Structure of glycine and glycine betaine.....13

1.3 Biosynthetic pathway of glycine betaine from choline via betaine aldehyde.....21

2.1 Glass Microanalysis Filter Holder (for 25 mm disc filter).....34

3.1 Microscopic picture of *A. halophytica* grown in Turk Island Salt Solution plus modified BG_{11} medium at day 14 (x2250).....47

3.2 Growth of *A. halophytica* in Turk Island Salt Solution plus modified BG_{11} medium containing various NaCl concentration.....48

3.3 Choline functions as an osmoprotectant in *A. halophytica*.....49

3.4 Effect of choline concentration on growth at differrent salinity of *A. halophytica*.....50

3.5 Effect of choline on the salinity growth range of *A. halophytica*.....52

3.6 Time intervals of choline uptake by *A. halophytica*.....55

3.7 Inhibition of induction by chloramphenicol on uptake of [*methyl*-^{14}C]choline under control and stress condition.....56

3.8 Effect of various osmoticum on [*methyl*-^{14}C]choline uptake under control and stress condition.....57

3.9 Kinetics of [*methyl*-^{14}C] choline uptake by *A. halophytica* under control and stress condition.....58

3.10 Lineweaver-Burk transformation of the data.....59

3.11 Effect of different Na^+ concentration on choline uptake.....61

Page

3.12 Choline dehydrogenase activity of *A. halophytica* in low and high salinties.....65

3.13 Effect of monovalent cations on choline dehydrogenase activity.....66

3.14 SDS- PAGE pattern of periplasmic proteins obtained from cells adapted to 0.5 M and 2.0 M NaCl.....70

3.15 Molecular weight calibration curve of standard protein on 12% SDS- PAGE.....71

3.16 Non-denaturing PAGE pattern of periplasmic proteins obtained from cells adapted to 0.5 M and 2.0 M NaCl.....72

ABBREVIATION

BSA	bovine serum albumin
°C	degree celsius
CDH	choline dehydrogenase
DTT	dithiothreitol
g	relative centrifugal force $= 1.12r\ (RPM/1000)^2$
h	hour
Hepes	*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-ethanesulfonic acid
kDa	kilodalton
l	litre
lux	Photometric (light density)
ma	miloampare
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
µCi	microrcurie
µl	microlitre
µM	micromolar
nm	nanometre
nM	nanomolar
OD	optical density
Rpm	revolution per minute

SDS	sodium dodecyl sulphate
Tris-HCl	Tris hydrochloride