การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของกลูตามีนซินเทเทส ใน KLEBSIELLA SPP.R15

นางสาวบุณฑริกา วงศ์ไวทยากูร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2531

ISBN 974-569-748-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15676

I17512311

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTAMINE SYNTHETASE IN KLEBSIELLA SPP.R15

Miss Boontariga Wongwaitayakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-748-6

Thesis Title Purification and Characterization of Glutamine Synthetase in Klebsiella spp.R15

By Miss Boontariga Wongwaitayakul

Department Biochemistry

Thesis Advisor Dr.Suganya Soontaros, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

.....Member

(Dr.Suganya Soontaros, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

บุณฑริกา วงศ์ไวทยากูร : การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของกลูตามีนซินเทเทส ใน KLEBSIELLA SPP.R15 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTAMINE SYNTHETASE IN KLEBSIELLA SPP.R15) อ.ที่ปรึกษา : ดร.สุกัญญา สุนทรส, 87 หน้า

Klebsiella spp.R15 เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอาศัยที่บริเวณรากข้าวในประเทศไทย สามารถถูกชักนำให้ระดับเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (GS) สูงขึ้นได้โดยเลี้ยงในอาหารปราศจากสารไนโตรเจน และการสังเคราะห์เอนไซม์ถูกกดดันในสภาวะที่มีปริมาณแอมโมเนียมสูง จากการวัดแอคติวิตีจำเพาะของ GS และเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องในขบวนการใช้แอมโมเนียมเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำเทียบกับอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย 100 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่าแบคทีเรียนี้ใช้วิถี GS-GOGAT ในทั้งสองสภาวะ

การทำเอนไซม์ GS ให้บริสุทธิ์ใช้ขั้นตอน Heat treatment, คอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด Affinity Blue Sepharose CL-6B และ Sepharose-4B ตามลำดับ จากการทดสอบด้วย electrophoresis ทั้งแบบ polyacrylamide gel และ SDS-polyacrylamide gel พบว่าให้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 430,000 และประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 54,000 ผลจากการคำนวณแสดงว่ามี 8 หน่วยย่อยต่างกับเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ ฟอสโฟไดเอสเตอเรส จากพิษงู (snake venom phosphodiesterase, SVP) เพื่อไฮโดรไลซ์หมู่อดีนีลออกไป แล้วศึกษาสมบัติต่างๆเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับ SVP พบว่า มีสมบัติหลายประการที่ต่างกันเช่น ค่าคงที่ทางจลศาสตร์, การถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์ และการทำงานใน transferase assay ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเอนไซม์ถูกควบคุมการทำงานโดย covalent modification และ feedback inhibition จากการศึกษาการจับระหว่างเอนไซม์กับ affinity column พบว่า covalent modification เกิดที่ระดับ post synthetic level ซึ่งถูกชักนำได้ด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ การใช้คุณสมบัติของ SVP ที่ตัด adenylyl group ออกจาก GS สามารถนำมาอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดใน isoelectric focusing gel ได้เป็นการสนับสนุนว่า GS มี covalent modification นอกเหนือจากคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงการทำงานใน transferase assay ซึ่งใช้เป็นคุณสมบัติบอกการเกิด covalent modification ของเอนไซม์ในแบคทีเรียอื่นทั่วไป

คุณสมบัติทางจลศาสตร์ซึ่งศึกษาโดย transferase assay ที่สำคัญคือ GS มีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 6.6-6.8 และที่ pH 8.0, มี isoactivity pH ที่ 7.6 การสูญเสียการทำงานใน transferase assay ที่ 50°ซ และการที่ deadenylylated form มี transferase activity ต่ำกว่า adenylylated form เป็นสมบัติที่ทำให้ GS ของ Klebsiella R15 แตกต่างจาก GS ของ E.coli และแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต บุณฑริกา วงศ์ไวทยากูร

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุกัญญา สุนทรส

BOONTARIGA WONGWAITAYAKUL : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTAMINE SYNTHETASE IN KLEBSIELLA SPP.R15
THESIS ADVISOR : Dr.SUGANYA SOONTAROS, Ph.D. 87 pp.

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Klebsiella spp.R15 is a nitrogen fixing bacteria found associated with rice root in Thailand. High activity of glutamine synthetase (GS) could be induced in the culture grown in N-free medium (NF), whereas 100mM NH_4Cl added in the NF medium repressed the GS activity. Ammonium assimilation pathway of Klebsiella R15 was studied by the determination of specific activity of GS and related enzymes involved in ammonium assimilation. The result implied that Klebsiella R15 used GS-GOGAT pathway to assimilate ammonium in both NH_4^+-limited and NH_4^+-excess condition.

GS was purified by heat treatment, Blue Sepharose CL-6B and Sepharose-4B chromatography. Electrophoresis on polyacrylamide gel at pH 8.3 and SDS-polyacrylamide gel showed a single band of the enzyme. GS possessed the molecular weight of 430,000 with 8 identical subunits of 54,000.

The studies of the GS before and after treatment with snake venom phosphodiesterase (SVP) suggested the regulation of enzyme by covalent modification and feedback inhibition. Retarding effect of GS purified from ammonium-shocked cells and nonshocked cells on Blue Sepharose affinity column indicated that covalent modification of GS at the post synthetic level could be induced by the addition of 20 mM ammonium chloride in NF medium. Besides, the specific action of SVP in the removal of adenylyl groups encountered for the reduction in adenylylated states of GS as shown by isoelectric focusing gel patterns. The consequence decrease in transferase activity of SVP-treated GS also supports the existence of GS regulation by covalent modification.

In transferase assay, GS has pH optima at 6.6-6.8 and 8.0 with the isoactivity at pH 7.6. The characteristics of heat lability of transferase activity at 50°C and the transferase activity of adenylylated form which exceeded that of the deadenylylated form were different from GS in E.coli and other Gram negative bacteria. However, the pattern of transferase activity was similar to that of A.vinellandii. In related to GS structure, the 8 identical subunit reported here resembles the eucaryotic GS.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest appreciation to my supervisor, Dr.Suganya Soontaros, for her keen supervision, encouragement, understanding and supports throughout this thesis.

My appreciation is also express to Associate Professor Sanha Panichajakul, Associate Professor Jariya Boonjawat and Assistant Professor Piamsook Pongsawasdi for serving as thesis committee and their criticism and also for valuable suggestions.

I would like to express my deep gratitude again to Associate Professor Jariya Boonjawat and Assistant Professor Piamsook Pongsawasdi for valuable advice on the initiation of thesis and special thanks as well go to Assistant Professor Tipaporn Limpaseni for providing some materials.

Finally. Thanks are also expressed to all staff members and students of the Biochemistry Department for their helps in the laboratory and discussion with sincerity and friendships.

CONTENTS

THAI ABSTRACT.....IV

ENGLISH ABSTRACT.....V

ACKNOWLEDGEMENT.....VI

CONTENTS.....VII

LISTS OF TABLES.....X

LISTS OF FIGURES.....XI

ABBREVIATION.....XIII

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials 12

2.2 Preparation of bacterial media.....13

2.3 Bacterial cultivation and crude enzyme preparation.....14

2.4 GS assays.....15

2.5 GOGAT and GDH assays.....19

2.6 GS purification.....19

2.7 Polyacrylamide gel electrophoresis.....21

2.8 Isoelectric focusing.....23

2.9 Determination of molecular weight.....25

2.10 Protein determination.....25

III Results

3.1 The stability of glutamine synthetase in crude enzyme.....27

3.2 The stability of glutamine synthetase in frozen cells.....28

3.3 Production of glutamine synthetase in NF medium.....32

3.4 Comparative studies of GS, GOGAT and GDH activities in crude enzyme.....32

3.5 Purification and properties of GS.....36

3.6 Kinetic studies of the purified GS.....55

3.7 Isoelectric focusing.....64

IV DISCUSSION

4.1 Stability of GS.....67

4.2 Production of GS in NF medium.....67

4.3 Comparative studies of GS, GDH and GOGAT activities in crude enzyme.....68

4.4 GS purification 69

4.5 Preparation of highly adenylylated GS.....71

4.6 The stability of purified GS.....72

4.7 Kinetic studies.....73

4.8 Feedback inhibition.....74

REFERENCES.....76

APPENDIX.....86

BIOGRAPHY.....87

LISTS OF TABLES

Table		Page
1	Formula for stock solutions, buffers, gels and reagent for polyacrylamide gel electrophoresis	22
2	Isoelectric focusing gel mixture	24
3	Table of GS purification	40
4	Effect of ammonium on Klebsiella spp.R15 GS transferase activity	49
5	Table of GS purification from ammonium-shocked cells	51
6	K_m values for glutamine and hydroxylamine in transferase activity	58
7	The inhibitory effect on the transferase activity of GS with various single effector	62
8	The inhibitory effect on the transferase activity of GS with combined effectors	63

LISTS OF FIGURES

Figure		Page
1	Pathway of ammonium assimilation in the enteric bacteria for the production of glutamate and glutamine, and some of the role of these compounds in intermediary metabolism	3
2	Three proteins interconversions involved in the regulation of glutamine synthetase in Escherichia coli	4
3	The stability of GS in crude enzyme	29
4	The stability of GS in frozen cells	31
5	Production of GS in NF medium	33
6	Specific activity of GS, GOGAT and GDH during growth in NH_4^+-limited and NH_4^+-excess media	35
7	Profile of GS purification on Blue Sepharose CL-6B column	38
8	Profile of GS purification on Sepharose-4B	39
9	Polyacrylamide gel electrophoresis of GS purification	42
10	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified GS	43
11	Molecular weight calculation of GS	44

Figure Page

12 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of standard molecular weight proteins and GS.....45

13 Molecular weight calculation of GS subunit.....46

14 pH optimum of SVP-treated and nontreated GS.....48

15 Profile of GS purification from ammonium shocked cells on Blue Sepharose CL-6B column....50

16 Stability of purified GS.....53

17 Heat stability of purified GS.....54

18 NH_2OH requirements of GS.....56

19 Lineweaver-Burk plot of NH_2OH requirements of GS.....57

20 Glutamine requirement of GS.....59

21 Lineweaver-Burk plot of glutamine requirements of GS.....60

22 Lineweaver-Burk plot of the effects of NH_4Cl on the transferase activity.....65

23 Isoelectric focusing gel of SVP-treated and nontreated GS.....66

24 Partial structure of Blue Sepharose CL-6B.....70

ABBREVIATIONS

GS	Glutamine synthetase
GOGAT	Glutamate synthetase
GDH	Glutamate dehydrogenase
Imidazole-HCl	10mM imidazole, 5mM MSH, 1mM EDTA, 100mM KCl, pH 7.5.
MSH	-mercaptoethanol
TME	50mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 10mM MSH, 10mM EDTA, pH 7.4.
SVP	Snake venom phosphodiesterase.
NF	Nitrogen free medium.
NFA100	Nitrogen free medium + 100mM NH_4Cl
LB	Luria broth medium