การโคลนยีนและการแสดงออกของไตรเทอร์ปีนซินเธสจากปรู่

นางสาวณัฐอร ตันสกุล

ห้องสมุดคณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5476235533

GENE CLONING AND EXPRESSION OF A *TRITERPENE SYNTHASE* FROM *ALANGIUM LAMARCKII*

Miss Nattaon Tansakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacognosy
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	GENE CLONING AND EXPRESSION OF A *TRITERPENE SYNTHASE* FROM *ALANGIUM LAMARCKII*
By	Miss Nattaon Tansakul
Field of Study	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Associate Professor Wanchai De-eknamkul, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Pimpimon Tansakul, Ph.D.

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

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Wanchai De-eknamkul, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Pimpimon Tansakul, Ph.D.)

.....Examiner

(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

.....Examiner

(Supakarn Chamni, Ph.D.)

.....External Examiner

(Assistant Professor Worapan Sitthithaworn, Ph.D.)

ณัฐอร ตันสกุล : การโคลนยีนและการแสดงออกของไตรเทอร์ปีนซินเธสจากปรู่. (GENE CLONING AND EXPRESSION OF A *TRITERPENE SYNTHASE* FROM *ALANGIUM LAMARCKII*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.วันชัย ดีเอกนามกูล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ภญ. ดร.พิมพ์พิมล ตันสกุล, 84 หน้า.

ไตรเทอร์ปีน เป็นสารในกลุ่มเทอร์ปีนที่มีโครงสร้างที่มีความหลากหลายที่พบได้ในพืชชั้นสูง ซึ่งสร้างมาจากสารตั้งต้น 2,3-ออกซิโดสควาลีน โดยเอ็นไซม์ไตรเทอร์ปีนซินเธส มีรายงานการค้นพบสารประกอบไตรเทอร์ปีนในใบของปรู่ (*Alangium lamarckii*) เช่น ฟรีเดลิน, บีต้าซิโตสเตอรอล และ สติกมาสเตอรอล ปรู่จึงน่าจะเป็นแหล่งในการศึกษาหายีนในกลุ่มไตรเทอร์ปีนซินเธส จากการโคลนยีนในกลุ่มไตรเทอร์ปีนซินเธสจากใบปรู่ ทำให้ได้โคลนจำนวน 5 โคลน ซึ่งได้แก่ *AlOSC1*, *AlOSC3*, *AlOSC4*, *AlOSC5* และ *AlOSC6* หลังจากนั้น ทั้ง 5 โคลนได้ถูกแทรกด้วย yeast consensus sequence (HAMAMA) และทำการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดอะมิโนลำดับที่ 2 ของแต่ละโคลน จากเดิมที่เป็น TGG ไปเป็น TCC เพื่อเพิ่มการแสดงออกในยีสต์ ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มที่ได้ถูกแทรก yeast consensus sequence และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดอะมิโนลำดับที่ 2 เป็นแบบเดิม คือ TGG และ (2) กลุ่มที่ได้ถูกแทรก yeast consensus sequence และมีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดอะมิโนลำดับที่ 2 เป็น TCC จากนั้น นำตัวอย่างทั้งหมดมาเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Saccharomyces cerevisae* สายพันธุ์ GIL77 จากผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่ 35 ซึ่งเป็นโคลน pYES2-AlOSC6 จากกลุ่มที่ 1 และมีความเหมือนในระดับนิวคลีโอไทด์กับยีน มัลติฟังค์ชันนอล ไตรเทอร์ปีนซินเธส (*CrAS*) จาก *Catharanthus roseus* ในระดับ 80% สามารถสร้างสารประกอบไตรเทอร์ปีน โมโนแอลกอฮอล ได้ 4 ชนิด คือ ทาแรกซ์ซาสเตอรอล, บีต้าอะไมริน, สูโดทาแรกซ์ซาสเตอรอล และ สารกลุ่มไตรเทอร์ปีน โมโนแอลกอฮอล อีก 1 ชนิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้าง ซึ่งมีความสอดคล้องกับองค์ประกอบไตรเทอร์ปีนจากสารสกัดเฮกเซนของใบปรู่ นอกจากนี้ ยังพบว่า ตัวอย่างโคลน pYES2-AlOSC6 ตัวอื่นๆ จากกลุ่มที่ 1 มีการสร้างสารไตรเทอร์ปีน โมโนแอลกอฮอล เช่นเดียวกันกับตัวอย่างที่ 35 ในขณะที่ ตัวอย่างโคลน pYES2-AlOSC6 จากกลุ่มที่ 2 กลับไม่มีการสร้างสารเกิดขึ้น ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนลำดับที่ 2 ของยีน จาก ทริปโตฟาน ซึ่งถูกแปลรหัสมาจาก TGG ไปเป็นกรดอะมิโนเซอร์รีน ถูกแปลรหัสมาจาก TCC อาจมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ และส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถสร้างสารประกอบไตรเทอร์ปีน โมโนแอลกอฮอลได้

ภาควิชา เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5476235533 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEYWORDS: OXIDOSQUALENE CYCLASE; ALANGIUM LAMARCKII; SACCHAROMYCES CEREVISIAE; TRITERPENES; GENE CLONING

NATTAON TANSAKUL: GENE CLONING AND EXPRESSION OF A *TRITERPENE SYNTHASE* FROM *ALANGIUM LAMARCKII*. ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: PIMPIMON TANSAKUL, Ph.D., 84 pp.

Triterpenes belong to the natural product group of terpenoid compounds with structural diversity mostly found in higher plants. The compounds are formed by cyclisation of 2,3-oxidosqualene which is catalyzed by triterpene synthase. Triterpenes from *Alangium lamarckii* are known to be present in the leaves such as friedelin, β-sitosterol and stigmasterol. Therefore, the leaf part was used in this study as a source of triterpene synthase mRNA. Five triterpene synthase clones, designated *AlOSC1*, *AlOSC3*, *AlOSC4*, *AlOSC5* and *AlOSC6*, were introduced with yeast consensus sequence (HAMAMA) upstream of the sequence and were changed nucleotide codons of the second amino acid from TGG to TCC for increasing expression in yeast. In this study, the samples were classified into 2 groups, (1) TGG group, in which the yeast consensus sequence was introduced up-stream to *AlOSC6* and the nucleotide codon at amino acid position 2 was TGG, and (2) TCC group, in which the yeast consensus sequence was introduced up-stream to *AlOSC6* and the nucleotide codon at amino acid position 2 was TCC. All the introduced clones were induced to express in *Saccharomyces cerevisae* strain GIL77, a lanosterol synthase auxotroph. It was found that the sample no.35, pYES2-AlOSC6 construct from the group 1, which showed 80% nucleotide identity to the multifunctional triterpene synthase (*CrAS*) from *Catharanthus roseus* producing 4 triterpenes, namely taraxasterol, β-amyrin, Ψ-taraxasterol and an unknown triterpene mono-alcohol. These triterpenes could also be detected in hexane extracts of *A. lamarckii* leaves. Moreover, it was found that the samples of (1)-pYES2-AlOSC6 group were able to produce triterpene mono-alcohols related to the sample no.35. In contrast, pYES2-AlOSC6 samples in the group 2 were not found to produce the triterpene mono-alcohols. These results suggested that changing of second amino acid codon, TGG which encodes for tryptophan, to be TCC which encodes for serine had the effect on the protein structure of this multifunctional triterpene synthase and caused no production of triterpene mono-alcohols.

Department: Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Field of Study: Pharmacognosy
Academic Year: 2013

Student's Signature Nattaon Tansakul
Advisor's Signature
Co-Advisor's Signature P. Tansakul

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to sincerely thank my advisor, Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul for his great guidance, caring, criticism, wonderful encouragements and kind understanding that help me to accomplish this thesis. My sincere gratitude also to my lovely co-advisor, Dr. Pimpimol Tansakul for her encouragements during my time of working at the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkla, Thailand and for her kind suggestions and on using the yeast culture.

I would also like to express my heartedly thanks to Associate Professor Dr. Boonchoo Sritularak and Associate Professor Dr. Rutt Suttisri (Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University) for their kind advices and providing authentic standards of ß-amyrin and friedelin.

I am also grateful to the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkla, Thailand for providing working spaces during my short visit, with hospitality and friendliness from nicest memorable people and place.

Finally, my most special gratitude to the most adorable couples, my father and mother, for their precious love, kind understanding and supporting that strengthened my driving force throughout the course of this study.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES x

CHAPTER I INTRODUCTION 1

CHAPTER II HISTORICAL 2

2.1 The diversity of triterpenes 2

2.2 Squalene-hopenecyclase (SHC) from *Alicyclobacillus acidocaldarius* 7

2.3 Human oxidosqualene cyclase 9

2.4 Plant oxidosqualene cyclase 12

2.5 Reported characterized plant OSC 13

2.6 *Alangium lamarckii* 17

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS 20

3.1 Plant materials 20

3.2 General chemicals, media and equipments 20

3.3 General techniques 22

3.3.1 Sterilization 22

3.3.2 Media and solution preparations 22

3.3.2.1 Luria-Bertani (LB) 22

3.3.2.2 Yeast extract peptone dextrose (YEPD) 23

3.3.2.3 Synthetic complete minus uracil (SC-U) 23

3.3.2.4 Synthetic complete minus uracil minus glucose (SC-U-G) 24

3.3.2.5 Potassium phosphate buffer (KPB) 24

3.3.2.6 20% galactose and 20% glucose solution 24

3.3.2.7 Ergo-tween stock solution 24

3.3.2.8 Hemin stock solution 24

Page

3.3.2.9 Solutions for plasmid extraction using alkaline lysis method..... 24
3.3.3 Agarose gel electrophoresis..... 25
3.4 cDNA cloning of oxidosqualene cyclase gene from *Alangium lamarckii* leaves..... 25
3.4.1 RNA preparation..... 25
3.4.2 First strand cDNA synthesis by RT-PCR..... 26
3.4.3 PCR amplification..... 27
3.4.4 Plasmid ligation..... 28
3.4.5 *E. coli* competent cell preparation and plasmid transformation..... 28
3.4.6 Plasmid extraction and sequencing..... 29
3.5 Functional expression of OSC genes from *A. larmarckii* in yeast..... 31
3.5.1 Preparation of PCR products for p-YES2 ligation..... 31
3.5.2 Ligation of pYES2-AlOSC plasmid and plasmid preparation for yeast transformation..... 33
3.5.3 Transformation and functional expression of cDNA in yeast..... 36
3.5.4 OSC product analysis..... 38
3.6 Triterpenoid analysis in *Alangium larmarckii* leaves..... 39
3.6.1 Sample preparation..... 39
3.6.2 Compound isolation and detection..... 39
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION..... 41
4.1 cDNA cloning of oxidosqualene cyclase gene from *Alangium lamarckii* leaves..... 41
4.2 Functional expression of cDNA in yeast GIL77..... 42
4.3 Yeast consensus sequence and OSC protein expression..... 49
4.4 Triterpenoid analysis in *Alangium larmarckii* leaves..... 54
CHAPTER V CONCLUSION..... 60
REFERENCES..... 61
Appendix A..... 66

Page

Appendix B 67
Appendix C 68
Appendix D 69
Appendix E 70
Appendix F 71
Appendix G 72
VITA 84

LIST OF TABLES

Page

Table II-1 Reported characterized plant 14
Table III-1 Number labeled samples that separated to codon changing group..... 34
Table IV-1 Amino acid sequence identity between AlOSCs..... 42
Table IV-2 DNA sequence identity between *AlOSC*s..... 42
Table IV-3 DNA sequence identity between *AlOSC*s and reported *OSC*s 42
Table IV-4 Sequencing results of primer introduced yeast consensus sequence 50

LIST OF FIGURES

Page

Figure II-1 Triterpene biosynthetic pathways 3
Figure II-2 The overall steps of triterpenoid cyclisation reaction. 5
Figure II-3 The similarity of biosynthetic pathways of squalene hopene and triterpene synthase 7
Figure II-4 The structure and active site of squalene hopene cyclase 8
Figure II-5 The structure and active site of human lanosterol synthase 9
Figure II-6 Pre-conformation of the substrates at squalene hopene and triterpene synthase at active sites 10
Figure II-7 The overall step of cyclisation and rerrangement of lanosterol via protosteryl cation at the active site of human oxidosqualene cyclase ... 11
Figure II-8 An example of QW motif from a part of amino acid sequence alignment of 5 oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe doiagremontiana* 12
Figure II-9 Aromatic amino acid effect of the cyclisation of triterpenes at the active site of lupeol synthase and β-amyrin synthase 13
Figure II-10 *Alangium lamarckii* 18
Figure II-11 The structures of triterpeoid compounds found in *A. lamarckii* leaves 19
Figure III-1 electrophoresis gel under UV light of the plasmid that contained expected insert after cut-checking with *Hind*III and *Xba*I restriction enzymes was cut with *Not*I and *Xba*I restriction enzymes to get the suitable stricky end and sequence to ligate with pYES2. 32
Figure III-2 insertion check of pYES2-AlOSC plasmid using *Hind*III and *Xba*I restriction enzymes 34
Figure III-3 The crude yeast extract was separated by double developing on a TLC glass plate 39
Figure III-4 The crude leaves extract from hexane part was separated by double developing on a TLC glass plate 40
Figure IV-1 AlOSC product from yeast no.1-no.10 on a TLC plate sprayed with anisaldehyde-sulphuric acid reagent under visual light 43

Page

Figure IV-2 AlOSC product from yeast no.11-no.40 on a TLC plate sprayed with anisaldehyde-sulphuric acid reagent under visual light. 44
Figure IV-3 HPLC chromatograms of (A) standard taraxasterol (15.86 min), (B) standard β -amyrin (15.91 min), (C) sample no. 35 and (D) negative control pYES2. 45
Figure IV-4 The extracted ion chromatogram of fraction 35F1, pYES2 and the standards 46
Figure IV-5 Mass spectrum of the peaks in the extracted ion chromatograms of fraction 35F1 47
Figure IV-6 The stacked plots of extracted ion chromatogram of 35F1 and standards. 47
Figure IV-7 The extracted ion chromatogram of fraction 35F2, pYES2 and the standard friedelin 48
Figure IV-8 The extracted ion chromatogram of fraction TCC group (15F1 and 25F1), TGG group (10F1 and 30F1), pYES2 and standards. 51
Figure IV-9 Mass spectrum of the peaks in the extracted ion chromatograms of fraction 10F1 52
Figure IV-10 Mass spectrum of the peaks in the extracted ion chromatograms of fraction 30F1 52
Figure IV-11 The stacked plots of extracted ion chromatogram of 10F1 and spiked the internal standards. 53
Figure IV-12 The stacked plots of extracted ion chromatogram of 30F1 and spiked the internal standards. 53
Figure IV-13 TLC chromatogram of the *A. lamarckii* leaves extracts 54
Figure IV-14 The extracted ion chromatogram of leaves extract fraction f1 and standards. 55
Figure IV-15 Mass spectrum of the peaks in the extracted ion chromatograms of fraction f1 56
Figure IV-16 The stacked plots of extracted ion chromatogram of leaves f1, sample 35F1 and the standards. 56
Figure IV-17 The extracted ion chromatogram of leaves extract fraction f2 and friedelin 57
Figure IV-18 A rooted phylogenetic tree analysis comparing AlOSCs amino acid sequence and reported OSCs from plants 59

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	Base pair
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
°C	Degree celsius
DMAPP	Dimethylallyl pyrophosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EIC	Extracted ion chromatogram
et al.	Et alii (latin), and others
EtBr	Ethidium bromide
FPP	Farnesyl pyrophosphate
FPS	Farnesyl pyrophosphate synthase
HPLC	High performance liquid chromatography
hr	hour
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
KPB	Potassium phosphate buffer
kb	Kilo base
LB	Luria-Bertani
LC-APCIMS	Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry
M	Molar
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter

mM	millimolar
OD	Optical density
OSC	Oxidosqualene cyclase
PCR	Polymerase chain reaction
psi	Pounds per square inch
qs	Quantum satis (latin), the amount which is needed
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
rpm	Round per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SHC	Squalene-hopenecyclase
SC-U	Synthetic complete minus uracil
SC-U-G	Synthetic complete minus uracil minus glucose
SQE	Squalene epoxidase
SQS	Squalene synthase
sec	Second
TAE	Tris-acetate-EDTA
TLC	Thin layer chromatography
Volt	Voltage
w/v	Weight per volume
YEPD	Yeast extract peptone dextrose
X-gal	5-bromo, 4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
µl	Microliter