การสกัดให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของโดปามีนและเซดโคโลกานินจากใบปรู๋

นางสาว นิธิมา สุทธิพันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวท
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541
ISBN 974-639-698-6

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF DOPAMINE-SECOLOGANIN CONDENSING ENZYME FROM *ALANGIUM SALVIIFOLIUM* WANG SSP. *HEXAPETALUM* WANG LEAVES

MISS NITIMA SUTTIPANTA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998
ISBN 974-639-698-6

Thesis Title	Purification and Characterization of Dopamine-Secologanin Condensing Enzyme from *Alangium salviifolium* Wang ssp. *Hexapetalum* Wang Leaves
By	Ms. Nittima Suttipanta
Department	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, 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 Supawat Chutivonge, M.D.)

Thesis Committee

.....Chairman
(Associate Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Rapepol Bhavovat, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Sumphan Wongseripipatana, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.)

นิธิมา สุทธิพันธุ์ : การสกัดให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของโดปามีนและเซคโคโลกานินจากใบปรู๋ (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF DOPAMINE-SECOLOGANIN CONDENSING ENZYME FROM *ALANGIUM SALVIIFOLIUM* WANG SSP. *HEXAPETALUM* WANG LEAVES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. วันชัย ดีเอกนามกูล, 103 หน้า, ISBN 974-639-698-6

เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมระหว่างโมเลกุลของโดปามีน (Dopamine) และเซคโคโลกานิน (Secologanin) แล้วได้ดีอะเซทิลไอพีโคไซด์ (*R*-Deacetylipecoside) ซึ่งมีโครงสร้างแบบอาร์ จากใบปรู๋ ได้ถูกสกัดแยกให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate), อุลตร้าฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) และผ่าน 3 ขั้นตอนของคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography) สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยอิเลคโตรโฟริซิส (Electrophoresis) พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้ประกอบด้วยสายโพลีเพพไทด์สายเดียว มีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 Da มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ pH 7.5 และอุณหภูมิ 37°C ผลการศึกษาทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ มีค่า k_m 0.69 mM สำหรับโดปามีน และ 0.92 mM สำหรับเซคโคโลกานิน และ V_{max} 7.09 pkat/mg protein สำหรับโดปามีนและ 8.33 pkat/mg protein สำหรับเซคโคโลกานิน เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโดปามินสูงเนื่องจากไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีไทรามีน (Tyramine) และทริปตามีน (Tryptamine) รวมทั้งไม่ถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาเมื่ออยู่ในสภาวะที่สารตั้งต้นมีปริมาณมาก การทำงานของเอนไซม์จะถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาโดยอะแลงจิมารคคีน (Alangimarckine) และดีไฮโดรอะแลงจิมารคคีน (Dehydroalangimarckine) โดยมี IC_{50} ประมาณ 10 μM ผลิตผลของการเชื่อมระหว่างโมเลกุลของโดปามีนและเซคโคโลกานินจะอยู่ในรูปของดีเมธิลอะแลงจิไซด์ (Demethylalangiside) ซึ่งเปลี่ยนแปลงโครงสร้างมาจากดีอะเซทิลไอเพคโคไซด์ (Deacetylipecoside) ระหว่างขบวนการสกัด จากผลการวิจัยที่ได้ จึงตั้งชื่อเอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมโมเลกุลของโดปามีนและเซคโคโลกานินนี้ว่า "Deacetylipecoside synthase" เชื่อว่าจะเป็นเอนไซม์ตัวแรกของวิถีชีวสังเคราะห์ของแอลคาลอยด์ในกลุ่มเตตราไฮโดร ไอโซควิโนลีน โมโนเทอร์ปีน กลูโคไซด์ (Tetrahydroisoquinoline monoterpene glucosides) ทั้งหลายซึ่งมีโครงสร้างแบบอาร์เช่นเดียวกัน

ภาควิชา ..เภสัชเวท.....
สาขาวิชา ..เภสัชเวท.....
ปีการศึกษา ..2541.....

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C875372 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEY WORD: ALANGIACEAE / *ALANGIUM SALVIIFOLIUM* WANG / DEACETYLIPECOSIDE / DEACETYLIPECOSIDE SYNTHASE / ISOQUINOLINE MONOTERPENE ALKALOID BIOSYNTHESIS/ EMETINE ALKALOID / CHARACTERIZATION / PURIFICATION
NITIMA SUTTIPANTA : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF DOPAMINE-SECOLOGANIN CONDENSING ENZYME FROM *ALANGIUM SALVIIFOLIUM* WANG SSP. *HEXAPETALUM* WANG LEAVES THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D. 103 pp. ISBN 974-639-698-6

Dopamine-secologanin condensing enzyme, the enzyme catalyzing the condensation of dopamine and secologanin to form the (*R*)-epimer of deacetylipecoside, has been purified from the leaves of *Alangium salviifolium* Wang. The enzyme was purified to apparent electrophoretic homogeneity by ammonium sulfate precipitation, ultrafiltration and three subsequent column chromatography steps. The isolated enzyme is a single polypeptide with M_r 30,000 and has a pH optimum at 7.5 and a temperature optimum at 37^0C. The apparent K_m value for dopamine and secologanin are 0.69 mM and 0.92 mM, respectively. The V_{max} for dopamine and secologanin are 7.09 and 8.33 pkat/mg protein, respectively. The enzyme has high substrate specificity to dopamine; neither tyramine nor tryptamine are utilized by the enzyme. No substrate inhibition was observed. The enzyme activity is inhibited by alangimarckine and dehydroalangimarckine with similar IC_{50} value approximately of 10 mM. The enzymatic product was confirmed to be demethylalangiside which is the spontanous lactamization product of (*R*)-deacetylipecoside. From these results, the dopamine-secologanin condensing enzyme was named "deacetylipecoside synthase" which presumeably catalyzes the provision of (*R*)-deacetylipecoside for the formation of tetrahydroisoquinoline monoterpene glucosides that possess also (*R*)-configuration at the same chiral center.

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I am deeply indebted to my thesis advisor, Assosiate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his guidance, suggestion and encouragement which enable me to carry out this work. His precious instructions are not only confined to the area of science but also to the general concept and art of life. The kindness and devotion he has given to me will be long remembered.

I would like to express my appreciation and thank to Assistant Professor Dr. Thitima Pengsuparp, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her helpful consulation and kindly assistance.

I would like to thank the thesis committees, for their serving as copreceptors.

I would like to thank to the members of the Department of Pharmacognosy and Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their kindness and helps.

I would like to thank the University Development Commission (UDC) for a schlolarship, and the R&D unit for Herbs and Spices, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for granting partial financial support to conduct this research work.

I would like to thank my dear friend Miss Nuntakarn Iemwananonthachai for her moral support and unforgetable friendships.

Finally, I would like to express my indebtness and grateful thanks to my parent for their love, understanding and encourgement throughout my life. Without their support , this work would not have been successful.

CONTENTS

CONTENTS (Continued)

CONTENTS (Continued)

CONTENTS (Continued)

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES (Continued)

LIST OF FIGURES (Continued)

ABBREVIATIONS

AA	=	acrylamide
APS	=	ammonium persulfate
AUFS	=	absorbance full scale
Bis	=	N,N′,methylene bisacrylamide
BSA	=	bovine serum albumin
cDNA	=	cloning DNA
cm	=	centimeter
cpm	=	counts per minute
DEAE	=	diethylaminoethyl
dpm	=	disintegrations per minute
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
eg.	=	for example
etc.	=	et cetera
Fig	=	Figure
FPLC	=	fast protein liquid chromatography
fr.wt	=	fresh weight
g	=	gram
HPLC	=	high performance liquid chromatography
hr	=	hour
M+	=	molecular ion
m/z	=	mass to charge ratio
mA	=	miliampere
min	=	minute
ml	=	mililiter
M_r	=	molecular mass relative to 1/12 of the atomic mass ^{12}C
nm	=	nanometer(s)
no.	=	number
opt	=	optimum

pI	=	isoelectric point
pH	=	hydrogen ion concentration
pkat	=	pico katal
pmol	=	picomole(s)
R_f	=	distance spot moved/ distance solvent moved (TLC)
rpm	=	revolutions per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sp.act.	=	specific activity
TEMED	=	N,N,N′,N′-tetramethylethylenediamine
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	ultraviolet light
Ve	=	elution volume
Vo	=	void volume
^3H	=	tritium
β	=	beta
°C	=	degree celsius
g	=	centrifugal force (relative to gravity)
λ_{max}	=	wavelength at maxima absorption
μCi	=	microCurie
μmol	=	micromole
N_2	=	Nitrogen atmosphere
K_m	=	Michaelis constant = substrate concentration at which the rate of enzyme-catalysed reaction is half maximum rate
Da	=	dalton, unit of molecular mass (1/12 of C=1)
kD	=	kilodalton, (x 10^3 Da)
V_{max}	=	maximum velocity of enzyme
μM	=	micro molar(s)
M	=	molar(s)
μg	=	microgram(s)