สุนารี โชคนัด : การโคลนยีน และการวิเคราะห์ลักษณะของโปรตีน MreB และ FtsZ จากเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส ซับทิลิส (GENE CLONING AND CHARACTERIZATION OF MREB AND FTSZ FROM *BACILLUS SUBTILIS*). อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.เศกสิทธิ์ ชำนาญศิลป์, 105 หน้า.

MreB และ FtsZ เป็นโปรตีน โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย MreB มีความสำคัญสำหรับการควบคุมทิศทางในการสร้างผนังเซลล์ ในขณะที่ FtsZ มีความจำเป็นในการแบ่งเซลล์ ไม่นานนี้มีรายงานว่าทั้งสองโปรตีนได้ทำอันตรกิริยากันโดยตรง บริเวณที่มีการสร้างผนังกั้นเซลล์ แนะให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสองทำงานร่วมกันในการแบ่งเซลล์และการสร้างผนังเซลล์ การเกิดเป็นเส้นใยของ MreB และ FtsZ เป็นขั้นตอนแบบพลวัต โดยทั่วไปถูกควบคุมโดยการสลาย ATP และ GTP ตามลำดับ และการเกิดเป็นเส้นใยของ MreB ที่บริเวณผิวภายในเซลล์นั้น ยังต้องการ Mg^{2+} MreB ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำยันเพื่อเชื่อมโยงเอนไซม์ peptidoglycan synthases โดยการทำอันตรกิริยาผ่านกลุ่มโปรตีนชื่อ penicillin binding proteins FtsZ ไม่ได้มีหน้าที่ในการสร้างผนังเซลล์โดยตรงเช่นเดียวกับ MreB แต่ FtsZ ทำหน้าที่ขับเคลื่อนการสร้างผนังเซลล์ในระหว่างการแบ่งเซลล์ ณ เวลาและสถานที่ที่จำเพาะ ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่า เป็นผลที่เกิดจากการทำอันตรกิริยากับโปรตีนในกลุ่ม Min ในการกำหนดตำแหน่งของการแบ่งเซลล์ และทำอันตรกิริยากับ MreB ในการกำหนดทิศทางในการสร้างแผ่นกั้นเซลล์ (Septum)

การทดลองในวิทยานิพนธ์นี้ ประกอบด้วย การโคลนยีน *mreB-Bs* และ *ftsZ-Bs* การแสดงออกของโปรตีน การทำโปรตีน MreB-BS และ FtsZ-Bs ให้บริสุทธิ์ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของคุณสมบัติการสลายนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด และตรวจสอบผลของ apigenin baicalein luteolin α-mangostin และ naringenin ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ ที่สามารถยังยั้งการแบ่งเซลล์และรบกวนความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ แต่ยังไม่ทราบเป้าหมายระดับโมเลกุล โดยวิธี malachite green assay

จากการทดลองพบว่า MreB สามารถสลาย ATP และ GTP ได้ที่ช่วง pH 5.5 – 8.0 MreB สลาย ATP ได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 และสลาย GTP ได้ดีที่สุดที่ pH 6.5 ส่วน FtsZ สามารถสลายได้เฉพาะ GTP ในช่วง pH 5.5 – 8.0 ย่อยสลายดีที่สุดที่ pH 6.5 ผลการศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติ

พบว่า apigenin สามารถลดการสลาย GTP ของ FtsZ ได้ร้อยละ 33.3 และ baicalein ร้อยละ 42.5 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Mayer และ Amann ในปี ค.ศ. 2009 ผลการทดลองนี้ บ่งชี้ว่าการสลายนิวคลิโอไทด์และการเกิดเป็นสายของ MreB-Bs เป็นกระบวนการที่ไม่ขึ้นตรงต่อกัน และยังสนับสนุนรายงานข้างต้นที่ว่าการเกิดเป็นสายของ MreB-Bs ไม่ต้องการการสลาย นิวคลิโอไทด์ ยิ่งไปกว่านั้น ผลการศึกษาครั้งนี้ถือว่าเป็นการรายงานผลครั้งแรกที่แนะว่า FtsZ-Bs เป็นเป้าหมายระดับโมเลกุลของ apigenin และ baicalein อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการทำการทดลองเพื่อยืนยัน และศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสมบัติทั้งทางด้านชีวเคมี และโครงสร้าง เพื่อให้เข้าใจมากขึ้นถึงกระบวนการและขั้นตอนการทำงานของโปรตีนทั้งสองชนิด เพื่อจะนำมาซึ่งข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการออกแบบยาต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

SUNAREE CHOKNUD : GENE CLONING AND CHARACTERIZATION OF MREB AND FTSZ FROM *BACILLUS SUBTILIS*. THESIS ADVISOR : SAKESIT CHUMNARNSILPA, Ph.D. 105 PP.

BACTERAL CYTOSKELATON/ MREB/ FTSZ/ ATPASE/ GTPASE/ NATURAL PRODUCT

MreB and FtsZ are key cytoskeletal proteins of bacteria. MreB plays important roles in bacterial cell wall synthesis while FtsZ is crucial for septum formation and cell division. Interestingly, these two proteins make direct interaction and colocalize at the septum suggesting cooperative functions of these proteins in cell wall synthesis during cell division. Polymerization of MreB and FtsZ is a dynamic process regulated by ATP and GTP hydrolysis, respectively. Polymerization of MreB into filaments at the cell periphery beneath the cell membrane responds to the presence of Mg^{2+}, and ATP hydrolysis. MreB acts as a scaffold for tethering of peptidoglycan synthases to the cell membrane by a mechanism that relies on penicillin binding proteins. Similar to MreB, FtsZ has no peptidoglycan synthases activity. However, FtsZ drives peptidoglycan synthesis during cell division at the particular time and place, presumably via interaction with Min-family of proteins and MreB.

This thesis included gene cloning, protein expression, protein purification, and nucleotides hydrolysis characterization of the *Bacillus subtilis* versions of these proteins, MreB-Bs and FtsZ-Bs. The work found that MreB-Bs has optimum pH for nucleotide hydrolysis at 7.0, which is different from the optimum pH for the protein polymerization, indicating that these two processes occur independently. This result

supports nucleotide hydrolysis independent polymerization by MreB-Bs, reported by Mayer and Amann, 2009. The work also investigated the effect of apigenin, baicalein, luteolin, α-mangostin, and naringenin on ATP and GTP-hydrolysis of MreB and FtsZ by malachite green assay. The results show that MreB was able to hydrolyze both ATP and GTP over a broad pH range (5.5 – 8), with the optimum pH for ATP hydrolysis and GTP hydrolysis of 7.0 and 6.5, respectively. On the other hand, FtsZ was able to hydrolyze only GTP over a broad pH range (5.5 – 8), with optimum pH at 6.5. Importantly, this work also found that apigenin and baicalein were able to inhibit the GTPase activity of FtsZ-Bs by 33.3% and 42.5%, respectively. These results suggest that FtsZ-Bs is a molecular target of apigenin and baicalein in cell wall deformation. In order to get clearer ideas of these two proteins for drugs design, further biochemical and structural studies of these two proteins need to be done.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry Student's Signature _____

Academic Year 2015 Advisor's Signature _____