Thesis Title Proteomic analysis of *Bacillus* sp.

Author Mr. Supachai Topanurak

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Boonyaras Sookkheo	Member
Prof. Dr.Shui-Tein Chen	Member
Asst. Dr. Hataichanoke Niamsup	Member
Lect. Dr. Dararat Tongkao	Member

ABSTRACT

Bacillus sp. bacteria are the bacteria which can produce several extracellular enzymes which are able to be very industrial useful bacterium. Understanding of adaptation in their environments of these bacteria interested us to uncover their functions which can be applied for improvement of individual strain of *Bacillus* sp. *Bacillus stearotheromophilus* TLS33, isolated from a hot spring in Chiang Mai, Thailand, is a thermophile which is able to grown well at 65°C. It can produce thermostable enzymes such as proteases and lipases. Therefore, the proteomic study of the bacteria in *Bacillus* sp. could provide the basic knowledge of this bacterium. Proteomics is the study on the global changes of protein within the cell. Furthermore, proteomics combined electrophoresis and mass spectrometry in order to characterize proteins.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

In this study, *B. stearothermophilus* TLS33 were encountered to cold stress at 37°C and 25°C while it had entered to mid-log phase. At 37°C, this thermophile synthesized a number of proteins which involved in sporulation signaling proteins. These proteins were TagE, YbbB, RsfA, RsbT, MrpA and PyrC which related to the sigma F and sigma G factors on the Forespore stage of the sporulation process. This bacterium was also exposed to salt stress (10% w/v NaCl), ethanol stress (10% ethanol) and cold stress (25°C). These stress conditions induced unique proteins in individual stress conditions. For instance, EF-TU was up-regulated in salt stress, L-lactate dehydrogenase in ethanol stress and Cold shock protein (CspB) was up-regulated in cold stress. It was also found that a number of proteins related to oxidative stress were up-regulated, for instance, alkyl hydrogen peroxidase (AhpC) or peroxiredoxin (Prx) and thiolperoxidase (Tpx).

In oxidative stress study, Prx was found to possess four isoforms which are denoted that Prx I, Prx II, Prx III and Prx IV which had same molecular weight approximately 27 kDa but different in p*I* 5.0, 4.87, 4.81 and 4.78, respectively. These isoforms shift to more acidic region in 2DE gel corresponding to the increasing of concentration of hydrogenperoxide (H_2O_2). Therefore, it was hypothesized that the shift to more acidic region in 2DE gel might result from the –SH of cysteine residue in protein molecule which was modified by H_2O_2 and to form sulfenic acid (-SO_2H). The tandem mass spectrometry, liquid chromatography mass/mass spectrometry (LC-MS/MS) was performed in order to investigate this post-translational modification. It was found that the 598 *m/z* tryptic peptide from Prx II and Prx III were 598 *m/z* and 598, 809 *m/z*, respectively. These peptide fragments had 135 of mass difference between b3 and b4 ion of 598 *m/z* in both of Prx II and Prx III and in b6 and b7 in 809

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

m/z in Prx III. The mass difference could not be found in Prx IV. It was believed that this isoform might be overoxidized and formed sulfonic acid (-SO_3H).

The Cy3 Maleimide labeling and Pro Q Diamond, phosphoprotein detection reagent, was applied to investigate the thiol oxidized proteins. For the Cy3 Maleimide labeling technique, it was found that the major proteins labeled with Cy3 Maleimide involved in protein synthesis. Furthermore, these proteins related in pentose phosphate pathway such as fructose-bis-phosphate aldolase, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and L-lactate dehydrogenase were participating in NADPH production were up-regulated. It was also found that the Cy3 labeling technique was able to label on the proteins different from Sypro Ruby and Pro Q diamond. It could be preliminary concluded that this technique can be valuable for investigation of post-translational thiol modified proteins which are believed that they had potential as signaling proteins. Moreover, two dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) was also employed for detection of thiol oxidized proteins. This technique can provide reproducibility of 2DE gel. Also, it can assist to view on the differential protein expression obviously. Thus, the investigation of thiol oxidized proteins with fluorescence dyes can be applied for new branch of the proteomics called “Redox proteomics”. However, this study was subjected to be applied for genetic improvement of *B. stearothermophilus* TLS33 in highest benefit of industrial application.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ด้านโปรติโอมของแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส

ผู้เขียน นายศุภชัย โตภาณุรักษ์

ปริญญา วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ร.ศ. ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล	ประธานกรรมการ
ผ.ศ.ดร.บุณยรัศมิ์ สุขเขียว	กรรมการ
ศ.ดร. ส่วยเทียน เฉิน	กรรมการ
ผ.ศ.ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	กรรมการ
อ.ดร. ดารารัตน์ ทองขาว	กรรมการ

บทคัดย่อ

แบคทีเรียสกุลบาซิลลัส ถือได้ว่าเป็นแบคทีเรียสกุลที่มีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ออกจากเซลล์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมได้ การศึกษากลไกการดำเนินชีวิตของแบคทีเรียนี้จึงเป็นส่วนหนึ่งที่สามารถนำไปปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ซึ่งมีความสามารถผลิตเอนไซม์ออกนอกเซลล์ คือ โปรติเอสทนร้อนและ ไลเปสทนร้อน ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมต่างๆเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการศึกษาทางด้านโปรติโอมิกส์ของแบคทีเรียทนร้อนตัวนี้ ซึ่งในการศึกษาโปรติโอมิกส์เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในสิ่งมีชีวิต โดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรรีซีสแบบสองมิติ (Two-dimensional electrophoresis) ร่วมกับเครื่องวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสาร (Mass Spectrometry) มาศึกษาโปรตีนในแบคทีเรียชนิดนี้ แบคทีเรียได้ถูกสร้างสภาวะคับขันด้วยการลดอุณหภูมิลงกระทัน ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 37°C และ 25°C ขณะที่แบคทีเรียกำลังเจริญเติบโต พบว่าแบคทีเรียได้สังเคราะห์โปรตีนมาจำนวนหนึ่ง ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญในการเหนี่ยวนำไปสู่การสร้างสปอร์ นอกจากนี้เมื่อแบคทีเรียตัวนี้ยังมีการนำไปสู่ภาวะคับขันต่างๆ เช่น ภาวะที่เป็นเกลือสูง ร้อยละสิบของโซเดียมคลอไรด์ (10% w/v NaCl), ร้อยละสิบของเอธานอล (10% v/v ethanol) และที่ 25°C พบว่าที่สภาวะคับขันเหล่านี้แบคทีเรียได้สร้างโปรตีนที่แตกต่างกันไปในแต่ละสภาวะ EF-TU ในสภาวะคับขันของเกลือ แอล-แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (L-lactate dehydrogenase) ในสภาวะที่ถูกเผชิญกับเอทานอล หรือ โคลด์ ช็อก โปรตีน บี (Cold Shock Protein B) ในขณะที่เผชิญในสภาวะเย็น นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่ถูกสังเคราะห์ให้มากขึ้นขณะที่แบคทีเรียเผชิญสภาวะต่างคับขันต่างๆมีความเกี่ยวข้องกับ Oxidative stress ยกตัวอย่างเช่น alkyl hydrogen peroxide C (AhpC) หรือ Peroxiredoxin และ Tpx (Thiolperoxidase) ดังนั้นเราจึงศึกษา Oxidative stress พบว่าโปรตีนชื่อว่า Peroxiredoxin มีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของมันในเจลของอิเล็กโตรโฟรีซีสสองทิศทาง พบว่าเมื่อปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพิ่มขึ้นโปรตีนตัวนี้จะย้ายไปที่ตำแหน่งที่เป็นด้านกรดของเจล ซึ่งจากเจลทำให้เราเห็นโปรตีนชนิดนี้มีไอโซฟอร์มทั้งหมด 4 ฟอร์ม ซึ่งได้ให้ชื่อไว้ว่า Prx I, Prx II, Prx III และ Prx IV เรียงตามลำดับจากด้านที่เป็นเบสของเจลอิเล็กโตรโฟริซีสสองทิศทาง จากการทดลองนี้ทำให้มีสมมติฐานว่าโปรตีนเหล่านี้มีการดัดแปลงโมเลกุลหลังการถอดรหัส (post-translational modification) จากสมมติฐานที่ว่าพบว่า กลุ่มของ ซัลไฟดริล (sulfydryl) อิสระของซิสเตอีนมีการเปลี่ยนแปลงด้วย สารจำพวกออกซิเจน ทำให้ เกิดเป็นกรดซัลเฟนนิก (Sulfenic acid) ซึ่งมีผลให้เกิดความเป็นประจุลบ จึงทำให้โปรตีนตัวนี้เคลื่อนที่ไปยังขั้วที่เป็นบวกซึ่งอยู่ด้านที่เป็นกรดของเจล ดังนั้นจึงมีการทดลองที่เพื่อใช้ตรวจสอบสมมติฐานด้วยเทคนิคแทนเด็มแมสสเปกโทรเมทรี-โครมาโทกราฟฟีแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ของเหลว แมส/แมส (Tandem Mass spectrometry Liquid Chromatography mass/mass spectrometry) จึงได้ค้นพบว่า เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยของโปรตีน Prx II ที่มวลโมเลกุล 598 *m/z* และของโปรตีน Prx III ที่มวลโมเลกุล 598 *m/z* และที่ 809 *m/z* ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างของแมสเป็น 135 ของการแตกตัวของเปปไทด์ พบว่าที่ตำแหน่ง b3 และ b4 ของ เปปไทด์ที่ 598 *m/z* และที่ b6 และ b7 ของเปปไทด์ที่ 809 *m/z* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโปรตีนตัวนี้มีการเปลี่ยนแปลงด้วยไฮโดนเจนเปอร์ออกไซด์จึงทำให้เกิดไอโซฟอร์มที่ตำแหน่งต่างๆในเจล

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโปรตีนที่เป็นเป้าหมายของการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ อีกนัยหนึ่งคือการตรวจสอบโปรตีนที่ถูกออกซิไดส์ (oxidized) ที่ตำแหน่งไทออล (thiol) โดยการติดฉลากกับ Cy3 Maleimide และมีการใช้ Pro Q diamond เป็นสีย้อมโปรตีนที่เติมหมู่ฟอสเฟต หรือ ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) เพื่อทดสอบโปรตีนที่มีประจุเป็นลบ จากการทดลองพบว่าเทคนิคการติดฉลากโปรตีนด้วย Cy3 Maleimide พบว่าโปรตีนที่ถูกติดฉลากได้นั้นทำให้ทราบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่ถูกเปลี่ยนนั้นทำหน้าที่การสังเคราะห์โปรตีน และ พบว่ามีการย้อมติดกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเพนโตส ฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) และยังพบอีกว่า การติดฉลากด้วย Cy3 Maleimide ให้การแตกต่างทั้งใน Sypro Ruby และ Pro Q Diamond ดังนั้นจึงพอจะสรุปได้ว่า วิธีการนี้สามารถใช้ศึกษาโปรตีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัสได้ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีศักยภาพเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสื่อสารภายในเซลล์ (Signaling protein) อีกทั้งได้มีการประยุกต์การใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟริซิสแบบสองทิศทางแบบความแตกต่างภายในเจล (two dimensional differential in-gel electrophoresis) ซึ่งช่วยเหลือด้านความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของเจลอิเล็กโตรโฟริซิสแบบสองทิศทาง และยังสามารถช่วยให้มองเห็นโปรตีนที่แตกต่างกันได้อย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชัดเจนมากขึ้น ทั้งนี้วิธีการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับวิทยาการแขนงใหม่ของโปรติโอมิกส์ที่เรียกว่า รีดอกซ์ โปรติโอมิกส์ (Redox Proteomics) ทั้งนี้ทั้งนั้นการศึกษานี้คาดว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ในการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของแบคทีเรียตัวนี้เพื่อได้ประโยชน์สูงสุดของการนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved