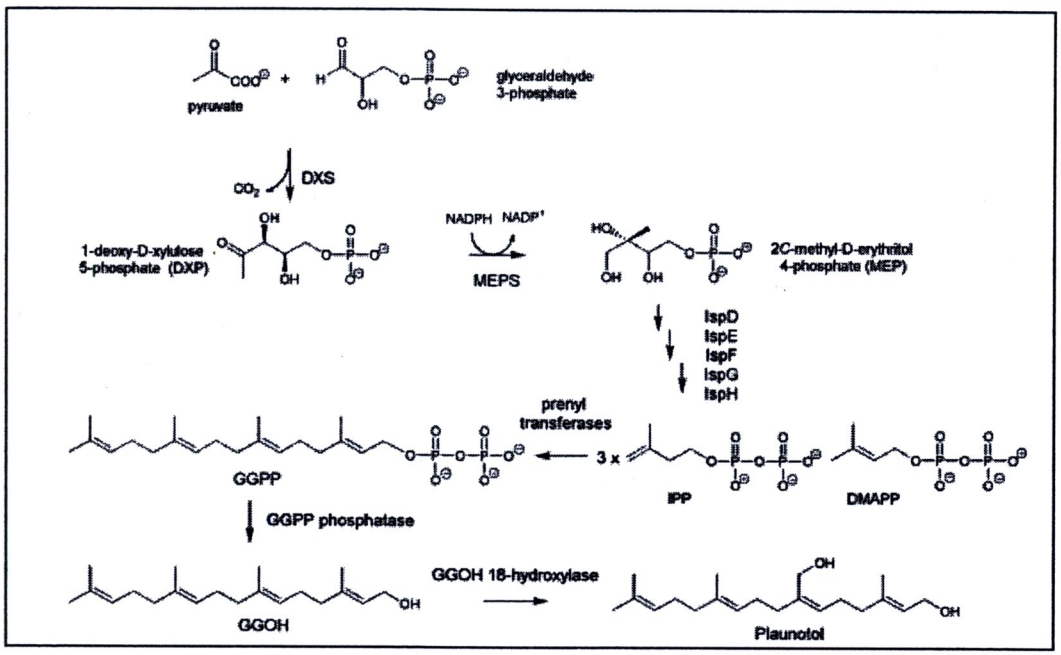
บทที่ 1
บทนำ

Geranylgeraniol (GGOH) เป็นสารในกลุ่มพรีนิลแอลกอฮอลล์ (prenyl alcohol) มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการ apoptosis ใน human tumor cell line หลายชนิดได้แก่ human lung adenocarcinoma A549 cell, human hepatoma cell และ human leukemia U937 cell (Masuda et al., 1997) โดย GGOH กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ทำให้ DNA เกิดการแตกตัวเป็น fragment และนำไปสู่การเกิด apoptosis ในที่สุด (Takeda et al., 2001) นอกจากนี้ GGOH ยังเป็นสารตัวกลางสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ของเปลาโนทอล (plaunotol) ซึ่งเป็นยารักษาแผลในกระเพาะอาหารที่ได้จากเปล้าน้อย (*Croton stellatopilosus* Ohba) (Tansakul and De-Eknamkul 1998)

วิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH ใน *C. stellatopilosus* เกิดขึ้นในแบบ DXP pathway (Wungsintaweekul and De-Eknamkul. 2005) ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์สำคัญคือ geranylgeranyl diphosphate synthase (*GGPPS*) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวระหว่าง farnesyl diphosphate (FPP) กับ isopentenyl diphosphate (IPP) ได้เป็น geranylgeranyl diphosphate (GGPP) (Sitthithaworn et al., 2001) จากนั้นเอนไซม์ prenyl diphosphate phosphatase (*PDPase*) จะเข้ามาตัดหมู่ฟอสเฟตทีละตัวได้เป็น GGOH (Nualkaew et al., 2005) (รูปที่ 1)

ปัจจุบันมีรายงานการผลิต GGOH โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพในแนวทางต่างๆ ได้แก่ การผลิตในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell suspension culture) จาก *C. stellatopilosus* Ohba (Wungsintaweekul et al., 2007) การทำวิศวกรรมเมทาบอลิคในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH ในเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ent-kaurene synthase ทำให้ปริมาณ GGPP เพิ่มขึ้นเป็นผลให้มีการผลิต GGOH ในปฏิกิริยาต่อมาสูงขึ้น และการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ GGPPS ร่วมกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ squalene synthase (SQS) ในเชื้อจุลินทรีย์ทำให้มีการผลิต GGOH เพิ่มมากขึ้น (Muramatsu et al., 2008) ดังนั้นจากวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH ที่เริ่มจากสารตั้งต้น GGPP คณะวิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่าการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ PDPase ใน *Escherichia coli* จะสามารถเพิ่มการผลิต GGOH ได้ จึงได้มีการโคลน cDNA ของยีน *PDPase* จาก *C. stellatopilosus* และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกใน *E. coli* BL21(DE3)RIL แต่ผลที่ได้ไม่พบการสะสม GGOH ซึ่ง Albermann และคณะอธิบายว่าอาจมีสาเหตุมาจากปริมาณ GGPP ใน *E. coli* มีปริมาณต่ำ ดังนั้นการแสดงออกของยีน *PDPase* ไม่สามารถเพิ่มการสะสม GGOH ได้ (Albermann

et al., 2008) นอกจากนี้การผลิต GGOH ด้วยวิธีการทางเคมีมักได้ผลผลิตต่ำและผลิตภัณฑ์ที่ได้มักเกิดเป็นของผสม racemic mixture (Ohta et al., 2009)



รูปที่ 1.1 วิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH ใน *C. stellatopilosus* Ohba (Wungsintaweekul et al., 2008)

ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH จาก *C. stellatopilosus* Ohba ที่มีการศึกษามาแล้วได้แก่ *GGPPS* (Sitthithaworn et al., 2001) และ *PDPase* (Nualkaew et al., 2004) ดังนั้นการแสดงออกร่วมของยีนทั้งสองในระบบแบคทีเรีย น่าจะเป็นทางเลือกที่มีความเป็นไปได้ เนื่องจากเอนไซม์ *GGPPS* จะเข้าไปเพิ่มการสร้าง GGPP ซึ่งจะทำหน้าที่ผลิตสารตั้งต้นให้เอนไซม์ *PDPase* ส่งผลให้มีการผลิต GGOH ในปฏิกิริยาต่อมาสูงขึ้น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงทำการแสดงออกร่วมของยีน *GGPPS* และ *PDPase* โดยเริ่มจากการโคลนยีน *GGPPS* ของเปล้าน้อยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank และใช้ยีน *PDPase* จากเวคเตอร์ pET101/TOPO/*PDPase* ซึ่งมีอยู่แล้ว จากนั้นทำการตัดต่อเพื่อนำยีนทั้งสองมาอยู่บนพลาสมิดเดียวกันคือ pETDuet-1 โดยใช้หลักการ 2 ยีน 2 โปรโมเตอร์ และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดใน *E. coli* BL21(DE3)RIPL และวัดปริมาณการผลิต GGOH ภายในเซลล์โดยเปรียบเทียบระหว่างโคลนที่มีการแสดงออกร่วมกับโคลนที่มีการแสดงออกของยีนเดียว และจะศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง GGOH ของริคอมบิแนนท์ *E. coli* เช่น การทำfeeding ของกลีเซอรอล และการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้งก่อนและหลัง

เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน โดยคาดว่าจะได้ริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีความสามารถในการผลิต GGOH เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเปลาโนทอล (plaunotol) โดยการแสดงออกร่วมกับเอนไซม์ GGOH-18-hydroxylase จากเปล้าน้อยในขั้นตอนต่อไป