KINETIC AND MECHANISTIC STUDIES ON *p*-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE FROM *ACINETOBACTER BAUMANNII*

JEERUS SUCHARITAKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005

ISBN 974-04-6323-1
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาจลนพลศาสตร์และกลไกปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ *p*-Hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase จากเชื้อ *Acinetobacter baumannii* (KINETIC AND MECHANISTIC STUDIES ON *p*-HYDROXYPHENYLACETATE 3-HYDROXYLASE FROM *ACINETOBACTER BAUMANNII*)

จีรัสย์ สุจริตกุล 4437581 SCBC/D
ปร.ด. (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พิมพ์ใจ ใจเย็น, Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY), ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), จิรันดร ยุวะนิยม, Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY)

บทคัดย่อ

เอนไซม์ *p*-Hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase (HPAH) จากเชื้อ *Acinetobacter baumannii* เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydroxylase ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ –OH (hydroxylation) ให้แก่สารตั้งต้น (HPA) ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ 3,4-dihydroxyphenylacetate (DHPA) เอนไซม์นี้ประกอบด้วยโปรตีนสองส่วนแยกกัน (Two-component enzymes) คือส่วนของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยารับอิเลคตรอน (Reductase component : C_1) และส่วนของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา hydroxylation (Oxygenase component : C_2) C_1 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Flavoprotein ซึ่งมีส่วนของ FMN เป็นโคเอนไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนจาก NADH ได้เป็นรีดิวซ์ FMN ($FMNH_2$) จะใช้ออกซิเจน, HPA และ $FMNH_2$ ที่ได้จากปฏิกิริยาของ C_1 เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา C_2

ในการศึกษานี้ประกอบด้วยสองส่วนหลักคือ การโคลนยีนและการแสดงออกของยีน C_1 ใน *E. coli.* และอีกส่วนหนึ่งได้แก่ การศึกษาจลนพลศาสตร์และกลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมี ของเอนไซม์ทั้ง C_1 และ C_2 โดยใช้เครื่องมือ Stopped-flow Spectrophotometer ทั้งแบบ Single- และ Double-mixing mode ในการศึกษาปฏิกริยาการรับอิเลคตรอนจาก NADH ของ C_1 พบว่า เอนไซม์อยู่ในสองรูปแบบ (Two isoforms) คือ แบบที่ทำปฏิกริยารับอิเลคตรอนได้เร็วและช้า ซึ่งมีค่าคงที่อัตราของการเกิดปฏิกริยาต่างกันคือ 11.6 และ 3.06 ต่อวินาทีตามลำดับ แต่ในกรณีที่มี HPA จับกับเอนไซม์ C_1 พบว่า มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเอนไซม์ให้เป็นรูปแบบเดียวกัน (Homogenous form) ที่สามารถทำปฏิกริยารับอิเลคตรอนจาก NADH ได้อย่างรวดเร็วเป็น 300 ต่อวินาที อย่างไรก็ตามการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าในการรับอิเลคตรอน (E^0) ในกรณีที่มี HPA กลับทำให้ค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำลงจาก -236 mV (ไม่มี HPA) เป็น -245 mV (มี HPA) ชี้ให้เห็นว่าการเร่งปฏิกริยาในการรับอิเลคตรอนเมื่อมี HPA ไม่ใช่มาจากปัจจัยทางค่าศักย์ไฟฟ้าแต่น่าจะมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์หลังจากจับกับ HPA เมื่อ C_1 อยู่ในสภาพรีดิวซ์ (Reduced C_1) จะทำปฏิกริยากับออกซิเจนได้เป็นสารผลิตภัณฑ์คือ Hydrogen peroxide (H_2O_2) และ C_1 ซึ่งอยู่ในสภาพออกซิไดซ์ (Oxidized C_1) การศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกริยาระหว่างรีดิวซ์ C_1 กับออกซิเจน พบว่าเอนไซม์ยังมีสองรูปแบบซึ่งแต่ละรูปแบบทำปฏิกริยากับออกซิเจนได้ต่างกัน (คล้ายกับปฏิกริยารับอิเลคตรอนจาก NADH เมื่อไม่มี HPA) ด้วยค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกริยา เท่ากับ 820 $M^{-1}S^{-1}$ และ 320 $M^{-1}S^{-1}$ ตามลำดับ เมื่อมี HPA จับกับรีดิวซ์ C_1 เอนไซม์จะเปลี่ยนรูปร่างมาเป็นแบบที่มีค่าคงที่อัตราเท่ากับ 820 $M^{-1}S^{-1}$ มากขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า HPA เป็นตัวกระตุ้น (Effecter) ของ C_1

ส่วนปฏิกริยา Hydroxylation ของ C_2 ต้องอาศัยสารตั้งต้นได้แก่ $FMNH_2$, HPA และ ออกซิเจน จากการศึกษาพบว่า C_2 สามารถจับกับ $FMNH_2$ ได้แน่น (K_d = 1.2 μM) และรวดเร็ว (>185 ต่อวินาที) แต่ C_2 จับกับออกซิไดซ์ FMN ได้ไม่ดี (K_d = 87 μM) เมื่อ C_2 จับกับ $FMNH_2$ จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน C_2-$FMNH_2$ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนด้วยค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยา $1.1x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$ แต่เมื่อมี HPA จะเกิดเป็น C_2-$FMNH_2$:HPA ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ช้าลงด้วยค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยา $4.8x10^4$ $M^{-1}s^{-1}$ เมื่อ C_2-$FMNH_2$ หรือ C_2-$FMNH_2$:HPA ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจะเกิดสารตัวกลาง (Intermediate) คือ C(4a)-hydroperoxy flavin และจะเติมหมู่ –OH ให้แก่ HPA (Hydroxylation) คล้ายกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัวอื่นในกลุ่ม Flavoprotein monooxygenase ในการศึกษากลไกการเกิด และการวัดค่าคงที่อัตราปฏิกิริยาของ C_2 พบว่า เอนไซม์นี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนก่อนและเกิดเป็น C(4a)-hydroperoxy flavin เพื่อเกิด Hydroxylation กับ HPA ในลำดับถัดมา ซึ่งเป็นกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบ Preferential random-order เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ HPA มากขึ้น จะเกิดปรากฏการณ์ที่เอนไซม์ถูกยับยั้งในขั้นตอนการเปลี่ยนกลับมาสู่สภาพตั้งต้นอันเนื่องมาจาก HPA สามารถจับกับ C(4a)-hydroxy เกิดเป็น C(4a)-hydroxy:HPA ซึ่งมีความเสถียรและทำให้เอนไซม์กลับสู่สภาวะตั้งต้นได้ช้าลง

เมื่อนำส่วนของเอนไซม์ C_1 และ C_2 มาศึกษาในการเกิดปฏิกิริยาร่วมกัน พบว่า FMN ซึ่งเป็นโคเอนไซม์บน C_1 หลังจากที่ถูกรีดิวซ์โดย NADH สามารถทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นให้แก่ C_2 และถูกส่งกลับมายัง C_1 ภายหลังจากเสร็จสิ้นการเกิด Hydroxylation บน C_2 นอกจากนี้ยังพบว่า HPA ซึ่งเป็น Effecter ในปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ C_1 ยังสามารถเร่งการส่งถ่าย $FMNH_2$ จาก C_1 ไปยัง C_2 ด้วยการเพิ่มค่าคงที่อัตราการส่งถ่าย $FMNH_2$ จาก 0.35 ต่อวินาที (ไม่มี HPA) เป็น 74 ต่อวินาที โดยเป็นไปได้ว่าการจับของ HPA ทำโครงสร้างของ C_1 เปลี่ยนแปลงโดยทำให้ $FMNH_2$ ง่ายต่อการเข้าถึงโดย C_2

177 หน้า ISBN 974-04-6323-1

KINETIC AND MECHANISTIC STUDIES ON *p*-HYDROXYPHENYLACETATE 3-HYDROXYLASE FROM *ACINETOBACTER BAUMANNII*

JEERUS SUCHARITAKUL 4437581 SCBC/D
Ph.D.(BIOCHEMISTRY)
THESIS ADVISORS : PIMCHAI CHAIYEN, Ph.D.(BIOLOGICAL CHEMISTRY)
PRAPON WILAIRAT, Ph.D.(BIOCHEMISTRY), JIRUNDON YUVANIYAMA, Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY)

ABSTRACT

p-hydroxyphenylacetate hydroxylase (HPAH) from *Acinetobacter baumannii* catalyzes hydroxylation of *p*-hydroxyphenylacetate (HPA) to 3,4-dihydroxyphenylacetate (DHPAO), and was found to be a two-component enzyme consisting of the reductase component (C_1) and the oxygenase component (C_2). C_1 component is a flavoprotein containing FMN as a cofactor, and its function is to provide reduced FMN for C_2 to hydroxylate a substrate, HPA. The gene encoding for C_1 was isolated, cloned and expressed in *E. coli*. Studies have shown that the recombinant enzyme behaves similarly to the native one. Kinetics of both C_1 and C_2 reactions were investigated by using a stopped-flow spectrophotometer in both single- and double-mixing mode. C_1 alone catalyzes NADH oxidase reaction in which the FMN cofactor is first reduced by NADH and then re-oxidized by oxygen to form H_2O_2. Kinetic results have shown that the reduction of C_1 by NADH is biphasic, indicating that the enzyme exists in two isoforms, and each has the reduction rate constant of 11.6 s^{-1} and 3.06 s^{-1}. The re-oxidation of reduced C_1 by oxygen was also bi-phasic with the rate constants of 820 $M^{-1}s^{-1}$and 320 $M^{-1}s^{-1}$. HPA serves as an effecter to C_1 reaction by modulating the reaction to be single-phasic and enhancing the reduction rate to be 300 s^{-1}. HPA has no effect on the rate of C_1-reoxidation, but causes the enzyme to exist more in a fast-reacting form. The redox potentials indicate that the rate enhancement by HPA is not due to thermodynamics (E^0_m of C_1-HPA complex is -245 mV compared to E^0_m of C_1 of -236 mV), but likely to be the protein conformational change. Studies of C_2 reaction have shown that the enzyme rapidly and tightly binds to reduced FMN (with the rate constant >185 s^{-1} and K_d = 1.2 μM), but loosely binds to oxidized FMN (K_d = 87 μM). A C_2-$FMNH_2$ complex reacted with oxygen to form C_2-C(4a)-hydroperoxy FMN with the rate constant of $1.1x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$ while a C_2-$FMNH_2$**:**HPA reacted in the same reaction with the rate constant $4.8x10^4$ $M^{-1}s^{-1}$. Kinetic mechanism of hydroxylation of C_2 was shown to be the preferential random-order type where the preferred pathway was oxygen reacting with C_2-$FMNH_2$ or C_2-$FADH_2$ to form C(4a)-hydroperoxy flavin prior to HPA binding. Spectra of C(4a)-hydroperoxy FMN(FAD) and C(4a)-hydroxy FMN(FAD) were detected and shown to be similar. At high HPA concentration, HPA formed a dead-end complex with C(4a)-hydroxy FMN(FAD), and inhibited the enzyme from returning to the oxidized form. When the reaction was catalyzed by both C_1 and C_2, it was found that the FMN cofactor on C_1, after being reduced, acted as a substrate for C_2, and then returned back to C_1 after completing oxygenation reaction. It was shown that HPA enhanced the rate of reduced FMN transfer from C_1 to C_2 active site, from 0.35 s^{-1} to be 74 s^{-1} by promoting the reduced FMN to be in a more accessible form.

KEY WORDS: PRE-STEADY STATE KINETIC / STOPPED-FLOW SPECTROPHOTOMETER / *p*-HYDROXYPHENYLACETATE (HPA) / *p*-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE (HPAH) / TWO-COMPONENT / REDUCTASE COMPONENT / FMN / FLAVOPROTEIN / OXYGENASE COMPONENT / FLAVIN

177 P. ISBN 974-04-6323-1