- 6 AUG 2001

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

p-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE FROM *Acinetobacter baumannii* : A NOVEL TWO-COMPONENT FLAVOPROTEIN HYDROXYLASE

CHUTINTORN SUADEE

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2001

ISBN 974-665-980-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
C564P
2001
C.2

Copyright by Mahidol University

4036411 SCBC/M : MAJOR: BIOCHEMISTRY; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : *p*-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE / TWO-COMPONENT ENZYME.

CHUTINTORN SUADEE: *p*-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE FROM Acinetobacter baumannii: A NOVEL TWO-COMPONENT FLAVOPROTEIN HYDROXYLASE. THESIS ADVISORS: PIMCHAI CHAIYEN, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., 89 p. ISBN 974-665-980-4.

p-Hydroxyphenylacetate hydroxylase (HPAH), an inducible enzyme isolated from *Acinetobacter baumannii*, catalyzes the hydroxylation of *p*-hydroxyphenylacetate (HPA) yielding 3,4-dihydroxyphenylacetate (DHPA). Degradation of HPA is important for controlling environmental pollutants. This benzene derivative compound is one of the major metabolites from decomposition of lignin and is also found as degradation product from pesticides such as 4-chlorophenylacetic acid. In this study, HPAH isolated from this organism was found to be a two-protein component enzyme. Each component was purified to homogeneity and biochemical properties of the enzyme were studied in detail. The first component, C_1 is a homodimeric protein with a subunit molecular weight of 32 kDa, and contains FMN as the native prosthetic group. In presence of HPA, O_2, and flavin, C_1 alone catalyzed oxidation of NADH resulting in formation of H_2O_2 without hydroxylation of substrate HPA. Combining C_1 with the second component, C_2, resulted in hydroxylation of HPA to DHPA and eliminated the non-productive NADH oxidase activity of C_1. C_2 is a tetrameric protein with a subunit molecular weight of 50 kDa, and C_2 by itself did not catalyze NADH oxidation. None of the redox cofactors was found on C_2. When reduced flavin, substrate HPA, and O_2 were supplied in the reaction, C_2 alone catalyzed hydroxylation of HPA to DHPA. This data indicated that C_1 was a reductase component to supply the reduced flavin to C_2 and C_2 was a hydroxylase component to hydroxylate HPA by using reduced flavin and oxygen. HPAH from *Acinetobacter baumannii* showed a broad flavin specificity. It could use FMN, FAD, or riboflavin as a coenzyme with a preference for FMN while all of other aromatic flavoprotein hydroxylases reported so far preferred using FAD as coenzymes. Mixing of reduced flavin, substrate and C_2 under a limited amount of oxygen resulted in the formation of C(4a)-flavin intermediate suggesting that the mechanism of this enzyme is similar to bacterial luciferase mechanism in catalyzing the reaction normally carried out by FAD-associated enzyme.

Copyright by Mahidol University

4036411 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

ชุตินธร เสือดี: การศึกษาเอนไซม์พาราไฮดรอกซีฟีนิลอะซีเตทไฮดรอกซีเลส จากเชื้อ Acinetobacter baumannii. (*p*-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE FROM Acinetobacter baumannii: A NOVEL TWO-COMPONENT FLAVOPROTEIN HYDROXYLASE). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ พิมพ์ใจ ใจเย็น, Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., 89 หน้า. ISBN 974-665–980-4.

p-Hydroxyphenylacetate hydroxylase (HPAH) เป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำจากเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย โดยเอนไซม์ทำหน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ให้กับสาร *p*-Hydroxyphenylacetate (HPA) นำมาซึ่งสารผลิตภัณฑ์คือ 3,4-dihydroxyphenylacetate (DHPA) สารตั้งต้น HPA เป็นสารตัวกลางสำคัญที่พบในกระบวนการย่อยสลายสารลิกนิน และยาฆ่าแมลงที่มีส่วนประกอบของสารจำพวก 4-chlorophenylacetate จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ HPAH ที่แยกได้จากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ประกอบไปด้วยโปรตีนสองส่วน (two-protein component enzyme) ส่วนแรก(C_1) เป็นโปรตีนซึ่งมี FMN (flavin adenine mononucleotide) เป็นโคเอนไซม์และประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 กิโลดาลตัน ส่วนที่สอง(C_2) ประกอบไปด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน ในสภาวะที่มี HPA, O_2, และ flavin พบว่า C_1 สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH ได้โดยไม่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับ HPA และได้ H_2O_2 เป็นสารผลิตภัณฑ์ การรวมโปรตีนทั้งสองส่วนของเอนไซม์เข้าด้วยกันนำมาซึ่งการเติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับสารตั้งต้นได้ผลิตภัณฑ์เป็น DHPA โดยที่ปฏิกิริยาการเกิด H_2O_2 จะถูกกำจัดออกไป นอกจากนี้ยังพบว่า C_2 เพียงส่วนเดียวมีความสามารถในการเติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับสารตั้งต้นได้ถ้าหากใส่ reduced flavin และ O_2 ลงในปฏิกิริยา แสดงให้เห็นว่าในการทำงานของเอนไซม์ HPAH, C_1 เป็นส่วนเร่งปฏิกิริยารีดักชันทำหน้าที่ผลิต reduced flavin ส่งให้ C_2 และ C_2 จะใช้ reduced flavin กับ O_2 เพื่อเติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับ HPA ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง C_2 กับ reduced flavin และ O_2 สามารถตรวจพบสารตัวกลาง C(4a)-flavin species นอกจากนี้ยังพบว่า FMN เป็นโคเอนไซม์ช่วยให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โคเอนไซม์ชนิดต่างๆ (FAD และ riboflavin) จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่ากลไกการทำงานของเอนไซม์ HPAH จากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้คล้ายกับการทำงานของเอนไซม์ luciferase และเป็นรายงานแรกของเอนไซม์ในกลุ่มที่ทำหน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับสารจำพวก aromatic (aromatic hydroxylase) ที่ใช้ FMN เป็นโคเอนไซม์

Copyright by Mahidol University