INVESTIGATING THE EXPRESSION OF MUTATED PYRUVATE CARBOXYLASE OF *RHIZOBIUM ETLI* IN ACETYL COENZYME A BINDING SITE

KAMONMAN CHOOSANGTONG 5337217 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMIITTEE: SARAWUT JITRAPAKDEE, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), PIMCHAI CHAIYEN, Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY),

ABSTRACT

Pyruvate carboxylase (PC) is a biotin-dependent carboxylase enzyme catalysing the pyruvate carboxylation reaction to produce oxaloacetate with 2 partial reactions, MgATP-dependent carboxylation of biotin and the transfer of carboxyl group from carboxybiotin to pyruvate. PC is normally found as a tetramer with monomers of around 120-130 kDa in size. Each monomer contains 3 distinct functional domains which are biotin carboxylase (BC) domain, carboxyl transferase (CT) domain, and biotin carboxyl carrier protein (BCCP) domain. The recently found domain which mediates the tetramerization is PC tetramerization (PT) domain or allosteric domain. The previous study of residues in allosteric domain of PC from *Rhizobium etli* (RePC) (Arg427 and Arg472) indicated the important role of these residues in the allosteric regulation of PC. In this study, other residues in allosteric domain which directly interact with acetyl-CoA (Arg469 and Asp471) and indirectly interact with acetyl-CoA (Glu1027 and Asp1018) were examined the effects of these mutations on enzyme activity. R469S and R469K reduced the acetyl-CoA induced enzyme activity but less effect than R427 and R472 mutations. D471A completely destroyed the activity of enzyme activated by acetyl-CoA. E1027R caused decrease in enzyme activity induced by acetyl-CoA. All mutations increased in acetyl-CoA independent pyruvate carboxylation activity and ATP cleavage activity both in the presence and absence of acetyl-CoA. Results agree with previous studies that residues directly interacting with acetyl-CoA impact on the activation of enzyme by acetyl-CoA. Interaction between D1018 and R427 and the interaction between R469 and E360 only in subunit without acetyl-CoA bound support with previous studies that there is the transformation between the asymmetrical conformer and the symmetrical conformer during catalysis. Mutations of these residues may reduce the constraint of the enzyme and cause increase in catalytic activity in the absence of acetyl-CoA.

KEY WORDS: ACETYL-CoA/ ALLOSTERIC REGULATION/ RHIZOBIUM ETLI/ PYRUVATE CARBOXYLASE

88 pages

การศึกษาการแสดงออกของเอ็นไซม์ไพรูเวทคาร์บอกซิเลสที่กลายพันธุ์ของไรโซเบียม เอทิลิในตำแหน่งการจับของแอซิทิล โคเอ็นไซม์เอ

INVESTIGATING THE EXPRESSION OF MUTATED PYRUVATE CARBOXYLASE OF *RHIZOBIUM ETLI* IN ACETYL COENZYME A BINDING SITE

กมลแมน ชูแสงทอง 5337217 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ศราวุฒิ จิตรภักดี, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), พิมพ์ใจ ใจเย็น, Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY)

บทคัดย่อ

ไพรูเวทคาร์บอกซิเลสเป็นเอ็นไซม์ที่อาศัยไบโอตินซึ่งเร่งปฏิกิริยาเติมหมู่คาร์บอนให้ไพรูเวตเพื่อสร้างออกซาโลอะซิเตตด้วย 2 ปฏิกิริยาย่อยคือ การเติมหมู่คาร์บอนให้ไบโอตินโดยอาศัยแมกนีเซียมและการถ่ายหมู่คาร์บอนจากคาร์บอกซีไบโอตินไปยังไพรูเวท โดยปกติแล้วเอ็นไซม์อยู่ในรูปtetramerที่ประกอบด้วยmonomer ขนาด120-130 kDa แต่ละmonomerประกอบด้วย 3โดเมนที่ทำหน้าที่ต่างกันได้แก่ biotin carboxylase หรือBC โดเมน, carboxyl transferase หรือCTโดเมนและ biotin carboxyl carrier protein หรือBCCPโดเมน โดเมนที่เพิ่งถูกพบซึ่งช่วยในการ tetramerization เรียกว่า PC tetramerization โดเมน, PT โดเมน, หรือ allosteric โดเมน การศึกษาของresidue ใน allosteric โดเมนของไรโซเบียม เอทิลิ (RePC)ได้แก่อาร์จินีน427และอาร์จินีน472 บ่งชี้ถึงหน้าที่สำคัญต่อการควบคุมแบบอะโลสเตอริก(allosteric regulation)ของเอนไซม์ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาresidueตัวอื่นในallostericโดเมนที่จับกับแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอโดยตรงได้แก่อาร์จินีน469และแอสพาเตท471และทางอ้อมได้แก่กลูตาเมท1027และแอสพาเตท1018ในผลของการกลายพันธุ์ต่อการทำงานของเอ็นไซม์ R469Sและ R469Kลดการทำงานของเอ็นไซม์เมื่อถูกกระตุ้นโดยแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอแต่ไม่มากเท่าR427และR472ที่กลายพันธุ์ D471Aได้ทำลายการทำงานของเอ็นไซม์เมื่อถูกกระตุ้นโดยแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอ E1027Rลดการทำงานของเอ็นไซม์เมื่อถูกกระตุ้นโดยแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอ เอ็นไซม์ที่กลายพันธุ์ทุกตัวเพิ่มการทำงานของเอ็นไซม์เมื่อไม่มีแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอและเพิ่มการสลายเอทีพีทั้งที่มีและไม่มีแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอ ผลการทดลองได้สนับสนุนการศึกษาก่อนหน้านี้ว่า residueที่จับกับแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอโดยตรงมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์เมื่อถูกกระตุ้นโดยแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอ การจับกันของD1018กับR427และR469กับE360ในหน่วยย่อยของเอ็นไซม์ที่ไม่มีแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอจับเท่านั้นสนับสนุนการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าเอ็นไซม์มีการเปลี่ยนโครงสร้างจากอสมมาตรไปเป็นสมมาตรระหว่างเกิดปฏิกิริยา การกลายพันธุ์ของresidueเหล่านี้อาจไปลดการควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์ทำให้เพิ่มการทำงานของเอ็นไซม์เมื่อไม่มีแอซิทิลโคเอ็นไซม์เอ

88 หน้า