

## Abstract

---

**Project Code : TRG5880106**

**Project Title : Investigation on the control of protonation status of C4a-(hydro) peroxyflavin in bacterial luciferases with fast and slow light decay kinetics.**

**Investigator : Asst. Prof. Dr. Ruchanok Tinikul**

**E-mail Address : ruchanok.tin@mahidol.ac.th**

**Project Period : 2 years**

In this research, the study of pH-dependent effect was used to elucidate insight into enzyme mechanisms of two different enzyme systems. For the first enzyme system, bacterial luciferase (Lux), the effects of pH on protonation status of reactive flavin-oxygen adduct called C4a-(hydro)peroxyflavin intermediate was investigated. When the intermediate spectra were monitored in WT enzyme, the intermediate with  $\lambda_{\max}$  385 nm was detected at low pH (pH 6.5) and this was shifted to shorter wavelength ( $\lambda_{\max}$  375 nm) at high pH (pH 10.5). The results suggested that an intermediate with longer  $\lambda_{\max}$  (385 nm) may represent the protonated form of C4a-hydroperoxyflavin and shorter  $\lambda_{\max}$  (375 nm) may represent deprotonated form of C4a-peroxyflavin. When the same experiment was carried out in His44Ala and His44Asp mutants, only intermediate with  $\lambda_{\max}$  385 nm was observed throughout pH 6.5-10.5. This indicated the crucial function of His44 residue in controlling the intermediate protonation status in Lux reaction. The second system is succinic semialdehyde dehydrogenase from *Acinetobacter baumannii* (AbSSADH) that catalyzes the oxidation of succinic semialdehyde to produce succinic acid and NADPH. The enzyme has two conserved cysteines (Cys289 and Cys291) in active site. Burst kinetics of NADPH production revealed by stopped-flow experiments has suggested that the rate-limiting steps of enzymes reaction is associated with steps that occur after the hydride transfer. The site-directed mutagenesis studies demonstrated that Cys289 is the catalytic cysteine. As the magnitude of burst kinetics represents the amount of NADPH formed during the first,  $pK_a$  of the Cys289 was calculated from a plot of the burst magnitude *versus* pH as  $7.4 \pm 0.2$  which is comparable to the  $pK_a$  obtained from the pH-rate profile of  $7.5 \pm 0.1$ . The Cys289  $pK_a$  was also measured based on the ability of AbSSADH to form NADP-cysteine adduct which can be detected by the increase of absorbance at  $\sim 330$  nm as  $7.9 \pm 0.2$ . Based on three methods of  $pK_a$  measurements, the  $pK_a$  value of Cys289 is 7.4-7.9, indicating that AbSSADH enhances nucleophilicity of the active site cysteine by lowering its  $pK_a$  by 0.6-1 unit.

**Keywords :** pH dependent study, Enzyme mechanism, Bacterial luciferase, and succinic semialdehyde dehydrogenase

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5880106

ชื่อโครงการ: การศึกษาการควบคุมการเกิดโปรตอนเนชั่นของสารตัวกลาง C4a-(hydro)-peroxyflavin ใน  
ปฏิกิริยาของเอนไซม์ลูซิเฟอเรส

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร. รุชนก ตินิกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : ruchanok.tin@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ผลของ pH ต่อปฏิกิริยาเอนไซม์ มาใช้ศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาของรีดอกซ์เอนไซม์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด โดยเอนไซม์ชนิดแรกที่ศึกษา คือ เอนไซม์ลูซิเฟอเรสจากแบคทีเรีย หรือ Lux โดยได้ศึกษาการเกิดสารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin ที่สำคัญของปฏิกิริยา ณ pH ต่างๆ จากการศึกษาสเปกตรัมของสารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin ที่ pH ต่างกันพบว่า เมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH 6.5 สเปกตรัมของสารตัวกลางมีค่า  $\lambda_{\max}$  385 นาโนเมตร ในขณะที่พบสเปกตรัมของสารตัวกลางที่มีค่า  $\lambda_{\max}$  375 นาโนเมตร ในภาวะที่ pH สูง (pH 10.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin มีการเปลี่ยนแปลงโปรตอนเนชั่น โดยสารตัวกลางมีค่า  $\lambda_{\max}$  385 นาโนเมตร น่าจะอยู่ในรูป protonated ในขณะที่สารตัวกลางที่มีค่า  $\lambda_{\max}$  375 นาโนเมตร น่าจะสัมพันธ์กับสารตัวกลางในรูป deprotonated นอกจากนี้งานวิจัยยังพบกรดอะมิโนที่สำคัญ ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมโปรตอนเนชั่นสารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin ซึ่งสำคัญต่อค่า quantum yield หรือแสงที่เปล่งออกมาจากปฏิกิริยาของ Lux ซึ่งได้แก่กรดอะมิโนฮิสติดีน ตำแหน่งที่ 44 การค้นพบนี้ทำให้เราเข้าใจบทบาทของกรดอะมิโนใน active site ของ Lux ที่จะมีประโยชน์ในการปรับปรุงการเปล่งแสงของปฏิกิริยาได้ สำหรับปฏิกิริยาเอนไซม์ที่สอง คือ เอนไซม์ซัคซินิก เซมิเอลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (SSADH) ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารซัคซินิก เซมิเอลดีไฮด์ เป็นกรดซัคซินิก การค้นพบ burst kinetics ในการเกิดผลิตภัณฑ์ NADPH ทำให้ทราบว่า rate limiting step ของปฏิกิริยาเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับขั้นตอนหลังจากการสร้างผลิตภัณฑ์ NADPH จากการวิเคราะห์บทบาทของกรดอะมิโน Cys289 และ Cys291 ใน active site ของเอนไซม์ SSADH ทำให้ทราบว่ากรดอะมิโน Cys289 มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีใหม่การติดตาม  $pK_a$  ของกรดอะมิโน Cys289 โดยใช้ burst kinetics และการเกิด NADP-cysteine adduct ทำให้ทราบค่า  $pK_a$  ของกรดอะมิโน Cys289 ในกลุ่มเอนไซม์ SSADH เป็นครั้งแรก ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $7.4 \pm 0.2$  ค่าที่ได้แสดงให้เห็นว่า active site ของเอนไซม์ SSADH มีบทบาทสำคัญในการช่วยเพิ่ม nucleophilicity ของกรดอะมิโน Cys289 ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

คำหลัก : การศึกษาผลของ pH กลไกการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ เอนไซม์ลูซิเฟอเรสจากแบคทีเรีย และ เอนไซม์ซัคซินิกดีไฮโดรจีเนส