

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : TRG5780122**Project Title :** การศึกษาเปรียบเทียบสารตัวกลาง C4a-hydroperoxyflavin ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาในเอนไซม์ flavin-dependent monooxygenase และเอนไซม์ flavin-dependent halogenase**Investigator :** นายภิรมย์ เซนประโคน**E-mail Address :** Pirom.che@mahidol.ac.th**Project Period :** 2 มิ.ย. 2557- 2 มิ.ย. 2559**Abstract**

C4a-(hydro)peroxyflavin is a reactive intermediate that is essential for monooxygenation in flavin-dependent monooxygenases. The terminal peroxide group of C4a-hydroperoxyflavin intermediate is found either in the protonated (C4a-hydroperoxyflavin) or deprotonated form (C4a-peroxyflavin), depending on the type of reactions. In general, a terminal peroxide group of C4a-hydroperoxyflavin acts as an electrophile while C4a-peroxyflavin usually performs a nucleophilic attack on substrates. In addition to a conventional oxygenation reaction, the functional role of C4a-(hydro)peroxyflavin is quite versatile ranging from halogenation, dehalogenation, light-emission and oxidation. In this research the protonation status of the peroxide moiety (-OOH) in C4a-(hydro)peroxyflavin of *p*-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase can be directly monitored using transient kinetics. The pK_a value for the wild-type enzyme is 9.8 ± 0.2 , while the values for the H396N, H396V and H396A variants are 9.3 ± 0.1 , 7.3 ± 0.2 and 7.1 ± 0.2 , respectively. The hydroxylation efficiency of these mutants is less than the wild-type enzyme. Solvent kinetic isotope effect studies indicate that the proton transfer is not the rate-limiting step in the formation of C4a-OOH. All data suggest that His396 may act as an instantaneous proton provider for the proton-coupled electron transfer that occurs before the transition state of the C4a-OOH formation. His396 is also important for maintaining the protonation of C4a-OOH by acting as a hydrogen bond acceptor.

บทคัดย่อ

C4a-(hydro)peroxyflavin เป็นสารตัวกลางที่มีความสำคัญสำหรับการเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนอะตอมไปที่สารตั้งต้น(monooxygenation)ของเอนไซม์ในกลุ่มที่เร่งปฏิกิริยานี้โดยใช้ฟลาวินในการเกิดปฏิกิริยา (flavin-dependent monooxygenases)โดยหมู่เปอร์ออกไซด์ของสารตัวกลางนี้สามารถพบได้ในสถานะที่รับโปรตอน(protonated form) เรียกว่า C4a-hydroperoxyflavin และเสียโปรตอน(deprotonated form) เรียกว่า C4a-peroxyflavin ขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปแล้วการเกิดปฏิกิริยาพบว่า C4a-hydroperoxyflavin ทำหน้าที่เป็น electrophile ในขณะที่ C4a-peroxyflavin ทำหน้าที่เป็น nucleophile ทำให้เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลากหลายเช่น halogenation dehalogenation light-emission และ oxidation เป็นต้น ในงานวิจัยนี้สถานะการแตกตัวของโปรตอนของหมู่เปอร์ออกไซด์ของสาร C4a-(hydro)peroxyflavin ซึ่งเป็นสารตัวกลางของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ พาราไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตต-3-ไฮดรอกซีเลส (*p*-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase) สามารถศึกษาได้โดยใช้วิธีการศึกษาจลนพลศาสตร์ในช่วงเวลาที่ปฏิกิริยาก่อนถึงสภาพสมดุล (transient kinetics) จากการศึกษาพบว่าค่า pK_a ของหมู่เปอร์ออกไซด์ของเอนไซม์ปกติที่พบในธรรมชาติ (wild-type) มีค่าเท่ากับ 9.8 ± 0.2 และเมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโน Histidine ที่ตำแหน่ง 396 ซึ่งอยู่บริเวณเร่งปฏิกิริยา(active site) ให้เป็นกรดอะมิโน Asparagine Valine และ Alanine พบว่าค่า pK_a ของเอนไซม์ลดลงเป็น 9.3 ± 0.1 , 7.3 ± 0.2 และ 7.1 ± 0.2 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลายพันธุ์(variants) น้อยกว่าเอนไซม์ปกติที่พบในธรรมชาติ(wild-type) และจากการศึกษาโดยใช้วิธี Solvent kinetic isotope effect พบว่าการถ่ายโอนโปรตอน (proton transfer) ไม่ใช่ขั้นตอนกำหนดปฏิกิริยาของการเกิดสาร C4a-hydroperoxyflavin จากข้อมูลที่ได้การศึกษทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่ากรดอะมิโน Histidine ที่ตำแหน่ง 396 เป็นตัวให้โปรตอนในระหว่างการเกิดสารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin ซึ่งเกิดขึ้นก่อนสภาวะ transition state และการถ่ายโอนโปรตอนเกิดขึ้นพร้อมการกับการถ่ายโอนอิเล็กตรอน(electron transfer) หรือที่เรียกว่า proton-coupled electron transfer และกรดอะมิโน Histidine ที่ตำแหน่ง 396 ยังมีความสำคัญในการควบคุมสารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin ให้อยู่ในสถานะรับโปรตอน(protonated form) โดยเป็นตัวรับพันธะไฮโดรเจน

Keywords : Flavin-dependent monooxygenase, *p*-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase, C4a-(hydro)peroxyflavin, pK_a