ปิยณัฐ หมี่กระโทก : การศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์บีต้า-เอ็น-อะซิติลกลูโค-ซามินิเดส (กลุคแนคเอส) แฟมิลี 20 จากเชื้อ *Vibrio harveyi* และการคำนวณค่า pK_a ของเอนไซม์ไคติเนสแฟมิลี 18 (FUNCTIONAL AND STRUCTURAL STUDIES OF GH20 β-*N*-ACETYLGLUCOSAMINIDASE (GlcNAcase) FROM *VIBRIO HARVEYI* AND pK_a CALCULATIONS OF GH18 CHITINASES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์, 253 หน้า

เอนไซม์ไคติเนสจัดอยู่ในกลุ่มของไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 18 และ 19 ซึ่งมีหน้าที่ในการย่อยสลายไคตินให้เป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นที่ถูกย่อยสลายต่อให้เป็นน้ำตาลกลุคแนคโมเลกุลเดี่ยวโดยเอนไซม์กลุคแนคเอสแฟมิลีที่ 3 20 และ 84 วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน โดยส่วนแรกทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจสอบกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุคแนคเอสโดยวิธีการช่วยเหลือทางเคมี กรดอะมิโน 2 คู่ (Asp303-Asp304 และ Asp437-Glu438) ของเอนไซม์กลุคแนคเอสถูกทำให้กลายพันธุ์โดยเทคนิคการกลายพันธุ์แบบเฉพาะตำแหน่ง การแทนที่กรดอะมิโน Asp303 Asp304 Asp437 และ Glu438 ด้วยกรดอะมิโนอะลานีน แอสพาราจีน หรือกลูตามีนทำให้สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุคแนคเอส อย่างไรก็ดี ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่ลดลงของเอนไซม์กลายพันธุ์ D437A สามารถถูกกู้คืนกลับมาได้อย่างมากตามปริมาณความเข้มข้นของนิวคลีโอไฟล์ (ฟอร์เมตไอออน) ที่ใส่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลายพันธุ์ตัวอื่นยังคงเหมือนเดิม ดังนั้น การช่วยเหลือทางเคมีของเอนไซม์กลุคแนคเอสกลายพันธุ์ D437A โดยการใส่นิวคลีโอไฟล์ช่วยระบุว่า กรดอะมิโน D437 เป็นตัวเร่งแบบนิวคลีโอไฟล์หรือเบส และคู่กรดอะมิโน E438 เป็นตัวเร่งแบบให้โปรตอนหรือรับโปรตอน

ในงานวิจัยส่วนที่สอง หน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์กลุคแนคเอสได้ถูกศึกษาโดยการศึกษาทางด้านผลึกศาสตร์และจลนพลศาสตร์ของโปรตีน การทำโครมาโตกราฟฟีโดยแยกตามขนาดของโปรตีนและการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของอะคริลาไมด์เจลแบบตั้งต้นเสนอแนะว่าเอนไซม์กลุคแนคเอสลูกผสมเป็นแบบโมโนเมอร์โดยมีขนาดเท่ากับ 75 กิโลดาลตัน การศึกษาโครงสร้างแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์กลุคแนคเอสประกอบไปด้วยสามโดเมนที่แตกต่างกันคือ โดเมนที่จับคาร์โบไฮเดรตทางด้านเอ็นเทอมินอล โดเมนที่มีโครงสร้างเป็น $\alpha+\beta$ และโดเมนเร่งปฏิกิริยาที่มีโครงสร้างแบบ TIM-barrel บริเวณร่องที่จับกับสับสเตรทของเอนไซม์กลุคแนคเอสมีโครงสร้างเหมือนกับอุโมงค์ขนาดเล็กซึ่งเหมาะกับการจับน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น การซ้อนทับกันของโครงสร้างที่มีลิแกนด์กับไม่มีลิแกนด์เสนอแนะว่า การจับกันกับน้ำตาลชักนำ

ให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปบริเวณร่องที่จับกับน้ำตาล การวิเคราะห์ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์บริเวณเร่งปฏิกิริยาแสดงให้เห็นว่า คู่กรดอะมิโน D437-E438 มีความสำคัญอย่างมากต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุคแนคเอส

ในงานวิจัยส่วนที่สาม ค่า pK_a ของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง DxDxE sequence motif (ใช้สัญลักษณ์แทนว่า D_1 D_2 และ E) และ pH profile ของเอนไซม์ไคติเนสแฟมิลี 18 ได้ถูกศึกษา การวิเคราะห์พบว่าแขนงข้างกรดอะมิโน D_1 อยู่ในตำแหน่ง “ขึ้น” อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่แขนงข้างของกรดกลูตาเมต E อยู่ในตำแหน่ง “ลง” เป็นส่วนใหญ่ทั้งในรูปของเอนไซม์อิสระและที่จับกับลิแกนด์ ค่า pK_a ที่ได้จากการคำนวณของกรดอะมิโนสามตัวถูกพบว่า ค่า pK_a ของ D_1 มีค่าน้อยกว่า 2 ค่า pK_a ของ D_2 อยู่ระหว่าง 8.0 ถึง 13.0 และค่า pK_a ของ E ถูกพบอยู่ในช่วงตั้งแต่ 6.0 ถึง 9.0 ค่า pK_a ที่คำนวณได้ระบุว่า คู่กรดอะมิโนแอสพาเทต D_1 และ D_2 ในเอนไซม์ไคติเนสใช้ประจุลบเพียงหนึ่งตัวร่วมกันในทุกช่วง pH ในขณะที่กรดกลูตามิก E ถูกทำให้มีโปรตอนที่ค่า pH ที่เอนไซม์อยู่ในรูปที่ทำงานได้ โดยสรุป กรดอะมิโนสามตัวนี้ถูกเสนอแนะเพื่อแสดงบทบาทร่วมกันในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนสแฟมิลี 18 และกรดอะมิโน D_1 D_2 และ E ต้องอยู่ในรูปที่มีประจุ ไม่มีประจุ และไม่มีประจุตามลำดับสำหรับไคติเนสที่อยู่ในรูปทำงานได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

PIYANAT MEEKRATHOK : FUNCTIONAL AND STRUCTURAL STUDIES OF GH20 *β-N*-ACETYLGLUCOSAMINIDASE (GlcNAcase) FROM *VIBRIO HARYEYI* AND pK_a CALCULATIONS OF GH18 CHITINASES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 253 PP.

β-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE, CHITINASES, *VIBRIO HARVEYI*, PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY, ENZYME KINETICS, pK_a CALCULATIONS

Chitinases are a member of family 18 and 19 glycoside hydrolases that are responsible for the successive degradation of insoluble chitin to yield soluble chitooligosaccharides, which are then further hydrolysed to GlcNAc monomers by family 3, 20 and 84 GlcNAcases. This thesis is divided into three parts. The first part is involved with probing the catalytic residues of *Vh*GlcNAcase by a chemical rescue approach. Two invariant acidic pairs (Asp303-Asp304 and Asp437-Glu438) of *Vh*GlcNAcase were mutated using a site-directed mutagenesis strategy. Substitution of Asp303, Asp304, Asp437 or Glu438 with Ala/Asn/Gln produced a dramatic loss of the GlcNAcase activity. However, the activity of the inactive D437A mutant was largely recovered in the presence of an exogenous nucleophile (formate ion) in a concentration-dependent manner, while the activity of other mutants was restored only slightly. In conclusions, chemical rescue of the *Vh*GlcNAcase D437A inactive mutant by an added nucleophile helped to identify Asp437 as the catalytic nucleophile/base, and hence its acidic partner Glu438 as the catalytic proton donor/acceptor.

In the second part, the function and structure of *Vh*GlcNAcase were investigated

by protein crystallography and enzyme kinetics. Size-exclusion chromatography and native-PAGE suggested that the recombinant *Vh*GlcNAcase is a monomeric enzyme with molecular weight of 75 kDa. Structural investigation revealed that *Vh*GlcNAcase comprises three distinct domains, designated as the *N*-terminal carbohydrate-binding domain, the α+β topology domain and the TIM-barrel catalytic domain. The substrate binding pocket of *Vh*GlcNAcase has a small tunnel-like structure, which is suitable to accommodate a short-chain chitooligosaccharide. Superimposition of the crystal structures of ligand-free and ligand-bound *Vh*GlcNAcase suggests that binding of the GlcNAc induces local conformational changes around the sugar binding pocket. Kinetic analysis of the active-site mutants revealed that the adjacent D437-E438 pair is significantly important for the enzymic activity of *Vh*GlcNAcase.

In the third part, the pK_a of the active site residues in the DxDxE sequence motif (referred as 'D_1, D_2 and E') and its pH profiles of family 18 chitinases were investigated. The analysis has found that the side chain of D_1 is mainly in the 'up' position, whereas the side chain of E is mainly in the 'down' position in the apo and holo forms. The pK_a values calculated for the three residues are as follows: pK_a (D_1) < 2.0, pK_a (D_2) in the range between 8.0-13.0 and pK_a (E) in the range from 6.0 to 9.0. The calculated pK_a values indicate that the D_1-D_2 pair holds exactly one negative charge over the whole accessible pH range, whereas the catalytic acid E is protonated over the catalytically competent pH range. In summary, these three acidic groups D_1, D_2 and E are proposed to play a concerted role in the catalysis of family 18 chitinases and must be charged, neutral and neutral, respectively for the chitinases to be active.

School of Biochemistry Student's signature _____

Academic Year 2015 Advisor's signature _____