

การตรวจสอบบริเวณเร่งของอะลานินดีไฮโดรจีเนสจาก *Aeromonas hydrophila*
โดยการดัดแปรทางเคมี

นางสาวกลิ่นเกษร อ่อนประเสริฐ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543
ISBN 974-346-608-8
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


INVESTIGATION OF THE ACTIVE SITE OF ALANINE DEHYDROGENASE FROM
Aeromonas hydrophila BY CHEMICAL MODIFICATION

Miss Klinkasorn Onprasert


A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Program of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2000
ISBN 974-346-608-8

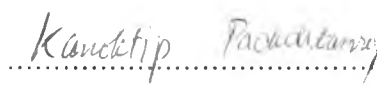
Thesis Title Investigation of the Active Site of Alanine dehydrogenase from
Aeromonas hydrophila by Chemical Modification
By Miss Klinkasorn Onprasert
Department Biochemistry
Thesis Advisor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.

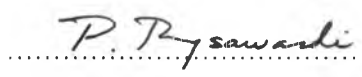
Accepted by Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of
the Requirements for the Master's Degree.

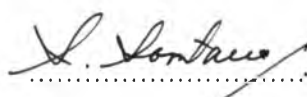

.....Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

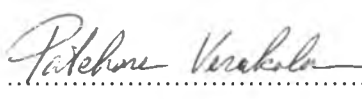
Thesis Committee


.....Chairman
(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)


.....Thesis Adviser
(Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)


.....Thesis Co-adviser
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Patchara Verakalasa, Ph.D.)

กลินเกสร อ่อนประเสริฐ: การตรวจสอบบริเวณเร่งของอะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* โดยการดัดแปรทางเคมี (Investigation of the active site of alanine dehydrogenase from *Aeromonas hydrophila* by chemical modification) อ.ที่ปรึกษา : อ.ดร.กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 84 หน้า. ISBN 974-346-608-8.

การตรวจหากรดอะมิโนจำเป็นของแอลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ด้วยวิธีดัดแปรทางเคมีพบว่าเมื่อดัดแปรกรดอะมิโน เมทไธโอนีน ฮิสติดีน อาร์จินีนและไลซีนด้วย chloramine T (CT) diethylpyrocarbonate (DEPC) phenylglyoxal (PG) และ 2,4,6- trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) ตามลำดับที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์พบว่าเอนไซม์สูญเสียแอกติวิตีทั้งหมด เมื่อดัดแปรไทโรซีนด้วย *N*-acetylimidazole (NAI) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์พบว่าเอนไซม์มีแอกติวิตีเหลือ 88.9% ขณะที่ dithiothreitol (DTT) ซึ่งดัดแปรจำเพาะต่อซีสเตอีนไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ การป้องกันบริเวณเร่งของเอนไซม์ด้วยไพรูเวทหรือ NADH ต่อการดัดแปรด้วย DEPC, PG และ TNBS มีผลให้แอกติวิตีคงเหลือของเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 30-35% และเมื่อป้องกันบริเวณเร่งด้วยไพรูเวทและ NADH ทำให้แอกติวิตีคงเหลือมีค่าสูงถึงประมาณ 90% การป้องกันบริเวณเร่งโดยสับสเตรทเกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเอนไซม์ถูกดัดแปรด้วย CT บ่งชี้ว่า ฮิสติดีน อาร์จินีน และไลซีน น่าจะมีส่วนในบริเวณเร่งของอะลานีนดีไฮโดรจิเนสขณะที่เมทไธโอนีนน่าจะอยู่ไกลจากบริเวณเร่ง รูปแบบของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วย DEPC และ PG เป็นแบบ pseudo - first order โดยมีกลไกแบบ simple-bimolecular mechanism มีอัตราการเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างสารดัดแปรกับเอนไซม์เป็น 1:1 โมลสารต่อโมลหน่วยย่อยเอนไซม์ รูปแบบการป้องกันบริเวณเร่งโดยสับสเตรทบ่งชี้ว่าฮิสติดีนและอาร์จินีนที่ถูกดัดแปรด้วย DEPC และ PG น่าจะอยู่ในบริเวณเร่ง และเมื่อพิจารณากลไกการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้ซึ่งเป็นแบบ sequential order binary-ternary โดยมี NADH เข้าจับก่อนไพรูเวททำให้อัตราฮิสติดีนและอาร์จินีนที่ถูกดัดแปรนั้นน่าจะอยู่ในบริเวณจับกับไพรูเวท เมื่อนำเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติและเอนไซม์ถูกดัดแปรด้วย DEPC มาทำแผนที่เปปไทด์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีประสิทธิภาพสูงและการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ได้ผลการทดลองที่คาดการณ์ได้ว่า His-95 น่าจะเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญในบริเวณจับกับไพรูเวท

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2543.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4072478323: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: L-ALANINE DEHYDROGENASE/ *Aeromonas hydrophila*

KLINKASORN ONPRASERT: INVESTIGATION OF THE ACTIVE SITE OF ALANINE DEHYDROGENASE FROM *Aeromonas hydrophila* BY CHEMICAL MODIFICATION. THESIS ADVISOR: KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph.D. THESIS COADVISOR: ASSOC.PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D. 84 pp. ISBN 974-346-608-8.

Alanine dehydrogenase from *Aeromonas hydrophila* was chemically modified with a series of group-specific reagents to identify essential amino acid residues. Incubation of the enzyme with 10 mM of chloramine T (CT), diethylpyrocarbonate (DEPC), phenylglyoxal (PG), and 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) which were specific for methionine, histidine, arginine, and lysine, respectively, led to complete loss of enzyme activity. In addition *N*-acetylimidazole (NAI), which is specific for tyrosine, reduced the enzyme activity to 88.9%, while dithiothreitol (DTT), a modifier of cysteine, did not affect the enzyme activity. About 30-35 % of the enzyme activity could be regained when pyruvate or NADH protection against the modification of DEPC, PG and TNBS were performed. Moreover, up to 90% of the residual activity was found when the enzyme was protected by both pyruvate and NADH. No significant protection was observed when CT was used as the modifying reagent. The result suggested that histidine, arginine, and lysine should directly involve in the active site of alanine dehydrogenase while methionine should not. The pattern of inactivation by DEPC and PG proceeded through pseudo-first-order kinetics. The simple bimolecular mechanism was observed with a 1:1 stoichiometric ratio of mole reagent per mole enzyme subunit. Substrate protection pattern indicated that DEPC-modified histidine and PG-modified arginine should be parts of the active site. Since kinetic mechanism of this enzyme is sequential order binary-ternary, which pyruvate can bind to the binding site after NADH is already fixed to the active site, modified histidine and arginine were proposed to locate in the pyruvate binding site. Peptide mapping performed in both native and DEPC-modified enzymes by reverse phase high performance liquid chromatography and N- terminal amino acid sequencing suggested that His-95 might be an essential amino acid residue in pyruvate binding site.

Department..... Biochemistry Student's signature.....
Field of study..... Biochemistry Advisor's signature.....
Academic year..... 2000 Co-advisor's signature.....



ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Dr. Kanoktip Packdibamrung and co-advisor, Associate Professor Dr.Piamsook Pongsawasdi, for their excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without their kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Assistant Professor Dr. Tipaporn Limpaseni, Assistant Professor Dr. Suganya Soontaros and Associate Professor Dr. Patchara Verakalasa for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

My appreciation is also expressed to the laboratory of Applied Microbiology, Department of Bioresources Science, and Research Institute of Molecular Genetics, Kochi University, Japan for some chemical reagents and determination of the amino acid sequence.

Sincere thanks are extended to all staff members and friends of the Biochemistry Department, Chulalongkorn University, for their assistance and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents, my older sister, my older brother and Khun Rittirong Konlum for their unlimited love, support and understanding.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENT.....	vii
LIST OF TEBLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	
2.1 Equipments.....	14
2.2 Chemicals.....	15
2.3 Bacteria.....	15
2.4 Bacteria growth medium.....	16
2.5 Preparation of bacteria	
2.5.1 Starter inoculum	16
2.5.2 Cultivation of Bacteria.....	16
2.6 Preparation of crude enzyme solution	
2.6.1 Determination of enzyme activity.....	17
2.6.2 Protein determination.....	17
2.7 Purification of L-alanine dehydrogenase.....	17
2.7.1 Ammonium sulfate precipitation.....	19
2.7.2 Purification of enzyme by DEAE-Toyopearl column.....	19
2.7.3 Purification the enzyme by hydroxyapatite column.....	20
2.7.4 Purification the enzyme by Blue Sepharose column.....	20
2.7.5 Determination of alanine dehydrogenase activity by non- denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).....	21

2.8 Determination of group-specific reagent affect on L-alanine	
dehydrogenase activity.....	22
2.8.1 Effect of <i>N</i> -acetylimidazole on tyrosine residue.....	22
2.8.2 Effect of chloramine T on methionine residue.....	22
2.8.3 Effect of diethylpyrocarbonate on histidine residue.....	23
2.8.4 Effect of dithiothreitol on cysteine residue.....	23
2.8.5 Effect of phenylglyoxal on arginine residue.....	23
2.8.6 Effect of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid on lysine residue.....	23
2.9 .Determination of suitable concentration of group-specific reagents.....	24
2.10 Determination of suitable time for inactivation.....	24
2.11 Identification of amino acid residues involved in enzyme activation.....	24
2.12 The kinetic study of enzyme modification	
2.12.1 The kinetic study of histidine modification	24
2.11.2 The kinetic study of arginine modification	24
2.13 Proteolysis of DEPC modification of alanine dehydrogenase.....	25
2.14 Separation and detection of peptide.....	25
2.15 N-terminal amino acid sequencing	25
CHAPTER III RESULTS	
3.1 Purification of alanine dehydrogenase	26
3.2 Chemical modification of alanine dehydrogenase.....	31
3.2.1 Modification of methionine residues.....	34
3.2.2 Modification of histidine residues.....	34
3.2.3 Modification of arginine residues.....	39
3.2.4 Modification of lysine residues.....	39
3.3 Inactivation pattern	
3.3.1 Inactivation pattern of histidine residues by DEPC.....	42
3.3.2 Inactivation pattern of arginine residues by PG.....	45
3.4 Protection pattern	
3.4.1 Substrate protection of alanine dehydrogenase against	
inactivation by DEPC.....	48

3.4.2 Substrate protection of alanine dehydrogenase against inactivation by PG	48
3.5 Identification of modified histidine residues	
3.5.1 Separation of peptides by HPLC.....	48
3.5.2 Identification of modified histidine residues.....	48
CHAPTER IV DISCUSSION.....	53
4.1 Purification of L-alanine dehydrogenase from <i>Aeromonas hydrophila</i>	53
4.2 Identification of amino acid residues in the active site of alanine dehydrogenase.....	54
CHAPTER V CONCLUSION.....	60
REFERENCES.....	62
APPENDICES.....	67
BIOGRAPHY.....	84

LIST OF TABLES

Table	Page
1. NAD(P)-dependent amino acid dehydrogenases.....	4
2. Some properties of alanine dehydrohydrogenase from various microorganism.....	7
3. Purification of alanine dehydrogenase from <i>Aeromonas hydrophila</i>	33
4. Effect of various group-specific reagents on the alanine dehydrogenase activity.....	34
5. Residual alanine dehydrogenase activity of CT modification enzyme in the presence and the absence of protective substance(s)	36
6. Residual alanine dehydrogenase activity of DEPC modification enzyme in the presence and the absence of protective substance(s).....	39
7. Residual alanine dehydrogenase activity of PG modification enzyme in the presence and the absence of protective substance(s).....	41
8. Residual alanine dehydrogenase activity of TNBS modification enzyme in the presence and the absence of protective substance(s).....	44

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. The multi-enzyme systems for the synthesis of amino acids.....	3
2. The general reaction of amino acid dehydrogenase	3
3. Stereospecific of hydrogen transfer to C-4 position of NADH by dehydrogenase family.....	6
4. General reaction of alanine dehydrogenase	6
5. The kinetic mechanism of L-alanine dehydrogenase of various sources.....	9
6. Linear alignment of the amino acids sequences of alanine dehydrogenases..	10
7. The purification of alanine dehydrogenase from <i>Aeromonas hydrophila</i>	18
8. Purification of alanine dehydrogenase from <i>Aeromonas hydrophila</i> by DEAE- Toyopearl column.....	27
9. Purification of alanine dehydrogenase from <i>Aeromonas hydrophila</i> by Hydroxyapatite column.....	28
10 Purification of alanine dehydrogenase from <i>Aeromonas hydrophila</i> by Blue Sepharose column.....	29
11. Non-denaturing PAGE of alanine dehydrogenase from each step of purification.....	30
12. Effect of CT on alanine dehydrogenase activity.....	35
13. Inactivation of alanine dehydrogenase activity by 2.4 mM CT at various incubation times.....	35
14. Effect of DEPC on alanine dehydrogenase activity.....	37
15. Inactivation of alanine dehydrogenase activity by 0.08 mM DEPC at various incubation times.....	37
16. Effect of PG on alanine dehydrogenase activity.....	40
17. Inactivation of alanine dehydrogenase activity by 10 mM PG at various incubation times.....	40
18. Effect of TNBS on alanine dehydrogenase activity.....	43
19. Inactivation of alanine dehydrogenase activity by 5 mM TNBS at various incubation times.....	43
20. Inactivation of the alanine dehydrogenase with DEPC.....	46

Figure	Page
21. Inactivation of the alanine dehydrogenase with PG.....	47
22. Protection of alanine dehydrogenase from inactivation by DEPC.....	49
23. Protection of alanine dehydrogenase from inactivation by PG.....	50
24. The reverse-phase HPLC profiles of lysyl endopeptidase digested peptides..	51
25. The nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of alanine dehydrogenase from <i>Aeromonas hydrophila</i>	59

ABBREVIATIONS

μg	microgram
μl	microliter
μM	micromolar
A	absorbance
Ala	alanine
AlaDH	alanine dehydrogenase
cm	centrimeter
CT	chloramine
Da	dalton
DEAE	diethylaminoethyl
DEPC	diethylpyrocarbonate
DH	dehydrogenase
DLD	D-lactate dehydrogenase
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
g	gram
Glu	glutamine
Gly	glycine
k_m	Michaelis constant
KPB	potassium phosphate buffer
l	liter
Leu	leucine
Lys	lysine
M	mole per liter(molar)
Met	methionine
ml	milliliter
mm	millimeter
mol	mole

MW	molecular weight
N	normal
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAM	<i>N</i> -acetylimidazole
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimide
nm	nanometer
nmol	nanomole
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PG	phenylglyoxal
Phe	phenylalanine
pmol	picomole
PMSF	phenyl methy sulfonyl fluoride
rpm	round per minute
Ser	serine
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylene diamine
TFA	trifluoroacetic acid
TNBS	2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid
Tyr	tyrosine
V	volt
V/V	volume by volume
Val	valine
W/V	weight by volume
xg	gravity