ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NEWLY IDENTIFIED CLASS OF GLUTATHIONE TRANSFERASE IN *ANOPHELES DIRUS*

GULSIRI CHAROENSILP

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY 2006

ISBN 974-04-7188-9
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การจัดจำแนกและศึกษาเอนไซม์กลูตาไธโอนทรานสเฟอเรสชนิดใหม่ในยุง *Anopheles dirus* (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NEWLY IDENTIFIED CLASS OF GLUTATHIONE TRANSFERASE IN *ANOPHELES DIRUS*)

กุลศิริ เจริญศิลป์ 4538045 MBMG/D
ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ALBERT J. KETTERMAN, Ph.D., อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D., ชาติชาย กฤตนัย, Ph.D., DUNCAN R. SMITH, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D.

บทคัดย่อ

เอนไซม์กลูตาไธโอน ทรานสเฟอเรส (GST) ของแมลงกำลังเป็นที่สนใจ เนื่องจากมีกลไกต่อการดื้อยาฆ่าแมลงหลายประเภท เมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบกลุ่มของเอนไซม์ GST ชนิดเอพซิลอน ซึ่งจำเพาะเจาะจงต่อแมลง และยังมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการดื้อยาฆ่าแมลงในยุง *Anopheles gambiae* (*An. gambiae*) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จึงต้องการที่จะจัดจำแนกและศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ GST ชนิดเอพซิลอนตัวที่สี่ ชื่อว่า adGSTE4-4 รวมถึงเอนไซม์กลายพันธุ์ชนิดนี้ในยุง *Anopheles dirus* (*An. dirus*) ซึ่งเป็นพาหะของโรคมาเลเรียในประเทศไทย เพื่อที่จะนำมาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ที่พบในยุง *An. gambiae* และ *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) งานวิจัยนี้เริ่มจากการทำ RT-PCR เพื่อให้ได้ยีนสำหรับการสร้างเอนไซม์ adGSTE4-4 ตัวต้นแบบและเอนไซม์กลายพันธุ์ 3 ชนิดคือ Pro14Leu, Glu44Lys, และ Ile131Thr หลังจากทำการยืนยันลำดับเบสแล้ว ยีนเหล่านี้จึงถูกโคลนเข้าไปในเวคเตอร์ชนิด pET3a เพื่อทำการแสดงออก จากนั้นจึงทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ก่อนนำมาศึกษาคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาเคมี ความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรต ความเสถียรของเอนไซม์ และการถูกยับยั้งโดยสารจำพวกไพรีทรอยด์ จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ adGSTE4-4 มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่พบในยุง *An. gambiae* และ *Ae. aegypti* ประมาณ 85% อย่างไรก็ดีเอนไซม์ adGSTE4-4 นั้นมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเร่งปฏิกิริยาเคมีต่อซับสเตรตชนิด CDNB และมีประสิทธิภาพสูงในการเร่งปฏิกิริยาเคมีต่อซับสเตรตอื่นๆ ทั้งยังมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับสารจำพวกเปอร์ออกไซด์ได้ ซึ่งไม่พบคุณสมบัตินี้ในเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่พบในยุง *An. gambiae* นอกจากนี้เอนไซม์ adGSTE4-4 ยังมีความสามารถในการจับกับยาฆ่าแมลงจำพวกไพรีทรอยด์ได้ดี จากการวิจัยพบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ชนิด Pro14Leu มีประสิทธิภาพต่ำสุดในการเร่งปฏิกิริยาเคมีต่อซับสเตรตทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง อีกทั้งยังไม่สามารถจับกับยาฆ่าแมลงจำพวกไพรีทรอยด์ได้ ขณะที่เอนไซม์กลายพันธุ์ชนิด Glu44Lys มีคุณสมบัติเหมือนกับเอนไซม์ต้นแบบยกเว้นเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ลดลง ส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์ชนิด Ile131Thr นั้นไม่พบคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยากับสารจำพวกเปอร์ออกไซด์ และมีความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรตรวมถึงเสถียรภาพของเอนไซม์เปลี่ยนไป

โดยสรุปเอนไซม์ adGSTE4-4 มีคุณสมบัติต่างไปจากเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่พบในยุง *An. gambiae* เนื่องจากสามารถต้านทานยาฆ่าแมลงจำพวกไพรีทรอยด์ได้โดยการจับตัวกับยาฆ่าแมลง และยังมีคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยากับสารจำพวกเปอร์ออกไซด์ที่ได้มาจากกระบวนการทำลายสารไพรีทรอยด์ในกลไกอื่น ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารเปอร์ออกไซด์ได้ นอกจากนี้ โพรลีนตำแหน่งที่ 14 ยังมีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์รวมถึงการจับกับสารจำพวกไพรีทรอยด์ ในขณะที่การถูกแทนที่ของ กลูทามิกตำแหน่งที่ 44 และ ทรีโอนีนตำแหน่งที่ 131 ส่งผลเล็กน้อยต่อเสถียรภาพทางโครงสร้างของเอนไซม์

135 หน้า ISBN 974-04-7188-9

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NEWLY IDENTIFIED CLASS OF GLUTATHIONE TRANSFERASE IN *ANOPHELES DIRUS*

GULSIRI CHAROENSILP 4538045 MBMG/D
Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: ALBERT J. KETTERMAN, Ph.D.,
APINUNT UDOMKIT, Ph.D., CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D.,
DUNCAN R. SMITH, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D.

ABSTRACT

The insect glutathione S-transferases (GSTs) are of particular interest because of their potential to confer resistance on all the major groups of insecticides. Recently, a cluster of eight insect-specific epsilon class GSTs from *Anopheles gambiae* has been identified and it was found that they are involved in insecticide resistance. The aim of this study is to isolate and biochemically characterize the function of the GST epsilon four (adGSTE4-4) enzyme including variant isoenzymes from the Thai malaria vector, *Anopheles dirus*, and to compare the adGSTE4-4 enzyme with GSTE4-4 enzymes from *An. gambiae* (agGSTE4-4) and *Aedes aegypti* (aaGSTE4-4). The *An. dirus* GSTE4-4 wild type and three variants (Pro14Leu, Glu44Lys, and Ile131Thr) were obtained by RT-PCR. After confirmation by sequencing, the RT-PCR products were subcloned into pET3a expression vector. Proteins were expressed, purified, and characterized for kinetic properties, substrate specificities, half life stabilities, and pyrethroid inhibition. The results showed that *An. dirus* GSTE4-4 shares more than 85% amino acid sequence similarity with two orthologs from *An. gambiae* and *Aedes aegypti*. However, adGSTE4-4 possesses greater catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for CDNB as well as greater activity for several other substrates. In addition, adGSTE4-4 enzyme possesses peroxidase activity while this activity was not observed for the *An. gambiae* enzyme and adGSTE4-4 enzyme also binds two pyrethroid insecticides (permethrin and λ–cyhalothrin) with relatively high affinity. Moreover, the Pro14Leu variant exhibited the lowest enzyme activities for all substrates tested and showed no inhibition with either permethrin or λ-cyhalothrin while Glu44Lys variant had similar kinetic properties to wild type enzyme except a decrease in half life whereas Ile131Thr variant had no detectable peroxidase activity and showed variation in substrate specificity and half life stability. In conclusion, that *An. dirus* GST Epsilon 4 enzyme, unlike the *An. gambiae* enzyme, can contribute to pyrethroid resistance by sequestration as well as protect against oxidation from secondary pyrethroid metabolites via its peroxidase activity. Furthermore, the Pro14 position of adGSTE4-4 appears to be an important residue that impacts on enzyme catalysis and pyrethroid binding affinities while substitution of Glu44 and Ile131 residues showed only small affect on the structural stability of the enzyme.

KEY WORDS: GLUTATHIONE S-TRANSFERASE EPSILON CLASS/ *ANOPHELES DIRUS*/ ENZYME CHARACTERIZATION/ PYRETHROIDS/ PEROXIDASE ACTIVITY

135 p. ISBN 974-04-7188-9