

**CHARACTERIZATION OF THE CONTRIBUTION OF THE
ACTIVE SITE RESIDUES TO THE MOLECULAR
ARCHITECTURE OF GLUTATHIONE TRANSFERASES**

JANTANA WONGSANTICHON

**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
2007**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนในบริเวณส่วนเร่งปฏิกิริยาที่มีต่อโครงสร้างของเอนไซม์กลูตาไธโอนทรานสเฟอเรส (CHARACTERIZATION OF THE CONTRIBUTION OF THE ACTIVE SITE RESIDUES TO THE MOLECULAR ARCHITECTURE OF GLUTATHIONE TRANSFERASES)

จันทนา วงศ์สันติชน 4637878 MBMG/D

ปร.ด. (อณุปันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

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

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนในบริเวณส่วนเร่งปฏิกิริยาที่มีต่อโครงสร้างของเอนไซม์กลูตาไธโอนทรานสเฟอเรส adGSTD4-4 จากยุงก้นปล่อง (*Anopheles dirus*) โดยทำการแทนที่กรดอะมิโนของเอนไซม์ด้วยวิธี site-directed mutagenesis ในบริเวณส่วนจับกับสารตั้งต้นที่ไม่ชอบน้ำคือ Tyr-111, Tyr-119 และ Phe-123 และในบริเวณส่วนต่อประสาน subunit แบบ lock-and-key 'Clasp' คือ Phe-104 และ Val-107 ผลการศึกษาพบว่า การแทนที่ Tyr-111 มีผลกระทบต่อทั้งส่วนจับสารตั้งต้นกลูตาไธโอนและส่วนจับสารตั้งต้นที่ไม่ชอบน้ำ โดยการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่เป็นกรดหรือเบสส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการจับกับสารตั้งต้น-กลูตาไธโอน รวมทั้งเหนี่ยวนำให้เกิด positive co-operativity ต่อการจับสารตั้งต้น การแทนที่ Tyr-119 พบว่าตำแหน่งดังกล่าวมีหน้าที่ควบคุมและกำหนดการจับสารตั้งต้นให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือลดลงโดยขึ้นกับชนิดของสาร การแทนที่ในตำแหน่ง Phe-123 ลดความสามารถในการจับสาร CDNB พร้อมทั้งเหนี่ยวนำให้เกิด positive co-operativity ต่อการจับ CDNB ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า Tyr-111 ควบคุมการสื่อสารของ subunit ในส่วนจับกับกลูตาไธโอนและ Phe-123 ควบคุมการสื่อสารของ subunit ในส่วนจับกับสารไม่ชอบน้ำ การศึกษาส่วนต่อประสานของ subunit พบว่าการแทนที่ Phe-104 ลดประสิทธิภาพการจับกับสารกลูตาไธโอน และแทบทุกการแทนที่ในตำแหน่งนี้ก่อให้เกิด positive co-operativity ต่อการจับกับกลูตาไธโอนด้วย ดังนั้น Phe-104 จึงมีหน้าที่สำคัญต่อการสื่อสารระหว่าง subunit ในส่วนจับกับกลูตาไธโอน การแทนที่ Val-107 ส่งผลให้เอนไซม์มีเสถียรภาพสูงขึ้น ดังนั้น Val-107 จึงมีหน้าที่ทางกายภาพ โดยการแทนที่ในตำแหน่งนี้อาจลดความเครียดในส่วนต่อประสาน subunit นอกจากนี้ ได้ศึกษาการตกผลึกของเอนไซม์ต้นแบบและเอนไซม์กลายพันธุ์ที่มีเสถียรภาพสูงคือ Val107Ala โดยทำการตกผลึกร่วมกับสารกลูตาไธโอน พบว่าการกระเจิงของรังสีเอกซ์ผ่านผลึกของเอนไซม์ต้นแบบและผลึกของ Val107Ala ให้ข้อมูลที่มีความละเอียดสูงถึง 2.05 Å และ 2.47 Å ตามลำดับ ชุดข้อมูลที่ได้นี้จะนำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โดยวิธี molecular replacement อันจะนำไปสู่ความเข้าใจถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ในการจับกับสารตั้งต้นและในด้านเสถียรภาพต่อไปในอนาคต 122 หน้า.

CHARACTERIZATION OF THE CONTRIBUTION OF THE ACTIVE SITE RESIDUES TO THE MOLECULAR ARCHITECTURE OF GLUTATHIONE TRANSFERASES

JANTANA WONGSANTICHON 4637878 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

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

ABSTRACT

A number of active site residues of a Delta class glutathione transferase (GST: E.C.2.5.1.18) from *Anopheles dirus*, adGSTD4-4, were characterized for functional and structural properties toward glutathione conjugation activity. Three amino acid residues Tyr-111, Tyr-119 and Phe-123 were investigated as putative hydrophobic substrate binding residues. Substitutions to Tyr-111 demonstrated influences on either the glutathione binding or the hydrophobic substrate binding; depending on the substituted amino acid. Surprisingly, most Tyr-111 mutant recombinants showed minimal effects on the hydrophobic substrate-binding site (H-site); but the charged amino acid replacements exhibited major effects on glutathione binding including positive co-operativity. Tyr-119 is likely to manipulate substrate binding since different amino acid substitutions can strengthen or weaken binding affinity in a substrate-dependent manner. All Phe-123 recombinants displayed lower binding affinity toward CDNB with positive co-operativity for CDNB binding. Thus, Tyr-111 seems to regulate subunit communication through the G-site while Phe-123 appears to have influence on subunit communication through the H-site. In addition, two amino acid residues involved in the unique lock-and-key 'Clasp' motif, Phe-104 and Val-107, were investigated by site-directed mutagenesis. All amino acid substitutions to the 'key' residue Phe-104 deteriorates glutathione binding and most of the mutant recombinants (except Phe104Met) displayed positive co-operativity upon GSH binding. Therefore the pi-pi interaction of Phe-104 in the dimeric interface is likely to regulate subunit communication through the G-sites. Almost all amino acid substitutions to Val-107 enhanced structural stability of the enzyme, particularly in Val107Ala. Changes at Val-107 may contribute to stabilizing forces between subunits and weaken conformational strain of the dimerization. Both Phe-104 and Val-107 involved in the Clasp motif demonstrate a pivotal role in subunit communication between active sites as well as stabilizing the quaternary structure of the enzyme.

A highly stable enzyme Val107Ala and the wild-type enzyme were subjected to X-ray crystallographic study. The crystals of Val107Ala and the wild type enzyme both in complex with glutathione were diffracted to an atomic resolution of 2.47 and 2.05 Å, respectively. The datasets were processed and the molecular replacement method will be used to obtain three dimensional structures of the enzymes to gain understanding of the structural-functional relationship, particularly in the aspect of substrate binding and enzyme stability.

KEY WORDS : GLUTATHIONE TRANSFERASE/ *ANOPHELES DIRUS*/ H-SITE/
SITE-DIRECTED MUTAGENESIS/ PROTEIN CRYSTALLIZATION

122 P.