CLONING AND EXPRESSION OF *ANOPHELES MINIMUS* NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE GENE AND *IN VITRO* STUDY OF CYP6P7 ENZYME SYSTEM

DOLNAPA KAEWPA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลนและการแสดงออกของยีน NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE ในยุงก้นปล่อง *ANOPHELES MINIMUS* และศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP6P7 ในหลอดทดลอง (CLONING AND EXPRESSION OF *ANOPHELES MINIMUS* NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE GENE AND *IN VITRO* STUDY OF CYP6P7 ENZYME SYSTEM)

ดลนภา แก้วภา 4536174 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พรพิมล รงค์นพรัตน์, Ph.D., จิรันดร ยูวะนิยม, Ph.D., พิมพ์ใจ ใจเย็น, Ph.D.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ NADPH-ไซโตโครม พี 450 รีดักเตส (CPR) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาโยกย้ายอิเล็คตรอนจาก NADPH ไปยังไซโตโครม พี 450 ในเมตาบอลิสมที่เกี่ยวข้องกับไซโตโครม พี 450 การศึกษาครั้งนี้ cDNA ของยีน CPR ได้ถูกแยกออกมาจากยุงก้นปล่อง *Anopheles minimus* และถูกทำให้แสดงออกในระบบของ *Escherichia coli* โดย cDNA ของยีนนี้ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 2,040 คู่เบส ซึ่งถอดรหัสได้โปรตีนที่มีจำนวนกรดอะมิโน 679 ตัวและมีขนาด 77.3 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CPR ที่แยกได้จาก *An. minimus* กับ CPR จาก *An. gambiae*, *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica* และ *Rattus norvegicus* พบว่ามีความเหมือนกัน 96%, 76%, 75% และ 52% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบส่วนของยีนที่ถูกอนุรักษ์โดยเป็นบริเวณที่จับกับ FAD, FMN และ NADPH ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ CPR ยีน CPR ได้ถูกทำให้แสดงออกในรูปของโปรตีนที่ติดอยู่กับ 6xHis-tagged โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ CPR ทั้งในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตซอล โดยส่วนของเอนไซม์ที่จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์และนำไปหาค่า K_m ซึ่งค่า K_m ของไซโตโครม ซี และ NADPH คือ 2.4 และ 3.3 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ CPR ในระยะสภาพคงตัวพบว่าน่าจะมีการจับกันแบบ ternary complex ระหว่างเอนไซม์และสับสเตรททั้งสอง (ไซโตโครม ซี และ NADPH) นอกจากนี้ยีน CYP6P7 ได้ถูกทำให้แสดงออกในระบบของ Baculovirus โดยจากการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์พบว่าเซลล์แมลงที่มีการแสดงออกของ CYP6P7 สามารถทนต่อสารฆ่าแมลงได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ CPR ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์สามารถนำมาใช้ร่วมกับ CYP6P7 ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP6P7 ในเมตาบอลิสมของ 7-อีทอกซีคูมาริน โดยได้ค่า V_{max} 46.13 นาโนโมล / นาที / นาโมลของเอนไซม์ และค่า K_m ประมาณ 139 ไมโครโมลาร์ การศึกษาในครั้งนี้ได้ประสบความสำเร็จในการนำยีน CPR จากยุงที่ถูกทำให้แสดงออกในบักเตรีมาใช้ในในการทดสอบค่ากิจกรรมของ CYP6P7 โดยใช้การจำลองระบบของ CYP6P7-CPR ในหลอดทดลอง

123 หน้า

CLONING AND EXPRESSION OF *ANOPHELES MINIMUS* NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE GENE AND *IN VITRO* STUDY OF CYP6P7 ENZYME SYSTEM

DOLNAPA KAEWPA 4536174 SCBC/D

Ph. D (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: PORNPIMOL RONGNOPARUT, Ph. D. (MOLECULAR BIOLOGY), JIRUNDON YUVANIYAMA, Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY), PIMCHAI CHAIYEN, Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY)

ABSTRACT

NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) catalyzes the transfer of electrons from NADPH to cytochrome P450 in the P450-mediated metabolism. In this study, the complete CPR cDNA from *Anopheles minimus* mosquito was isolated, cloned and expressed in *Escherichia coli* expression system. The complete cDNA contained 2,040 bp encoding a protein of 679 amino acids, with a calculated molecular mass of 77.3 kDa. The deduced amino acid sequence of *An. minimus* CPR revealed 96%, 76%, 75% and 52% identity to the sequence of *An. gambiae, Drosophila melanogaster, Musca domestica* and *Rattus norvegicus* CPR, respectively, and had a typical CPR feature in possessing a conserved domain involved in binding of FMN, FAD, and NADPH cofactors. The CPR cDNA was expressed as 6xHis-tagged fusion protein that was present in both membrane and cytosolic fractions with NADPH-cytochrome *c* reducing activity. The membrane-bound form was subjected to enzyme purification and K_m values determined. K_m for reduction of cytochrome *c* and for NADPH was 2.4 and 3.3 μM, respectively. Steady-state kinetics suggested the possibility that a ternary complex mechanism in which CPR enzyme-substrate (both NADPH and cytochrome *c*) complex is formed. CYP6P7, heterologously expressed in Baculovirus expression system, was capable of protecting *Spodoptera frugiperda* (Sf9) host cells against the toxicity of a number of insecticidal substrates as demonstrated using a cytotoxicity test. The purified CPR was used as the reconstitution element of CYP6P7 activity assay in 7-ethoxycoumarin metabolism. The 7-ethoxycoumarin *O*-de-ethylase expressed activity of CYP6P7 had a V_{max} value of 46.13 nmol/min/nmol P450 and K_m value of approximately 139 μM for 7-ethoxycoumarin. This study revealed that CPR heterologously expressed in *E. coli* could support the activity of CYP6P7 in the CYP6P7-CPR *in vitro* reconstitution system.

KEY WORDS : NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE / *ANOPHELES MINIMUS* / KINETICS / CYP6P7

123 pp.