

**CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT *DROSOPHILA*
DELTA CLASS GLUTATHIONE TRANSFERASES**

PIYA TEMVIRIYANUKUL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูตาไรโอนทรานสเฟอเรสกลุ่มเดลต้าในแมลงหวี่
(CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT *DROSOPHILA* DELTA CLASS
GLUTATHIONE TRANSFERASES)

ปิยะ เต็มวิริยะนุกูล 4837242 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ALBERT J. KETTERMAN, Ph.D.,

GERD KATZENMEIER, Ph.D., ชนันท อังศุชนสมบัติ Ph.D., พีรดา พรหมมีเนตร Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาหน้าที่ทางสรีรวิทยาของเอนไซม์กลูตาไรโอนทรานสเฟอเรสกลุ่มเดลต้าที่มีการแสดงออกในระยะเอ็มบริโอของแมลงหวี่ จากการทดลองโดยวิธี RT-PCR โดยใช้ RNA จากเซลล์เอ็มบริโอของแมลงหวี่ (SL2) พบว่ามีเอนไซม์กลูตาไรโอนทรานสเฟอเรสกลุ่มเดลต้า 9 ชนิดที่มีการแสดงออกในระยะเอ็มบริโอจากทั้งหมด 11 ชนิด โดยทั้ง 9 เอนไซม์ได้ถูกนำไปแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเมื่อทำเอนไซม์ที่ต้องการให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาค่าจลนศาสตร์โดยใช้ 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) เป็นสารตั้งต้น พบว่าทั้ง 9 เอนไซม์นั้นแม้จะถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มเดลต้า แต่พบว่าเอนไซม์แต่ละตัวมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันโดยสิ้นเชิง และเมื่อศึกษาหน้าที่ทางสรีรวิทยาโดยใช้สารตั้งต้นที่มีการรายงานว่าเป็นพิษและเกิดขึ้นเองในเซลล์จำนวน 6 ชนิด อันได้แก่ HNE adrenochrome PEITC PGA_2 5-HpETE และ cholesterol-5 α ,6 α -epoxide พบว่าเอนไซม์แต่ละตัวมีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นดังกล่าวได้แตกต่างกันและพบว่ามีเอนไซม์ 8 6 2 และ 1 ชนิดที่สามารถใช้ HNE adrenochrome PEITC และ PGA_2 เป็นสารตั้งต้นตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงหน้าที่ทางสรีรวิทยาอันหลากหลายของเอนไซม์อันมีไว้เพื่อการทำงานที่เป็นปกติของเซลล์ อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ทั้ง 9 ชนิดไม่สามารถใช้สารตั้งต้น 5-HpETE และ cholesterol-5 α ,6 α -epoxide ได้ ซึ่ง cholesterol-5 α ,6 α -epoxide คาดว่าเป็นสารตั้งต้นชนิดใหม่ของเอนไซม์กลุ่มนี้ นอกจากนี้พบว่ามีเอนไซม์ 3 ชนิดในกลุ่มเดลต้า ที่ยังมีการตรวจพบ thioltransferase activity ซึ่งโดยปกติแล้วเป็นคุณสมบัติสำคัญของเอนไซม์ในกลุ่มโอเมก้า จึงถือเป็นการค้นพบอันแสดงให้เห็นถึงการมี cross-function ของเอนไซม์กลูตาไรโอนทรานสเฟอเรสทั้งสองกลุ่ม โดยสรุปแล้วเอนไซม์ในกลุ่มเดลต้าทั้ง 9 ชนิดที่แสดงออกในระยะเอ็มบริโอของแมลงหวี่นี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันทั้งการเร่งปฏิกิริยาและหน้าที่ทางสรีรวิทยาในเซลล์

CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT *DROSOPHILA* DELTA CLASS GLUTATHIONE TRANSFERASES

PIYA TEMVIRIYANUKUL 4837242 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS : ALBERT J. KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., PEERADA PROMMEENATE, Ph.D.

ABSTRACT

Interest in *Drosophila* GSTs (EC. 2.5.1.18) has focused on their role in the physiological function networks because *Drosophila* species are fundamental models that can be extended to other metazoans. Nine *Drosophila* Delta class GSTs were obtained out of eleven (82%) found in the genome and were expressed in a *Drosophila* embryonic cell line (SL2). Here, after protein purification development, kinetic characterization were determined using the classical GST substrate, 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB). The kinetic properties revealed that although all nine recombinant *Drosophila* GSTs are classified into the Delta class, nonetheless they possess unique and diverse kinetic properties. Subsequently, nine recombinant enzymes were subjected to determine their physiological functions using six putative physiological substrates (HNE, adrenochrome, PEITC, PGA₂, 5-HpETE and cholesterol-5 α ,6 α -epoxide). Of the nine delta GSTs, six (67%) accepted the cytotoxic end product of lipid peroxidation HNE as a substrate. Two enzymes possessed activity toward neurotoxic adrenochrome which is an oxidative product of adrenaline. Eight enzymes (89%) involved in detoxifying PEITC compound. Only one isoform showed catalytic activity toward cytotoxic PGA₂. All nine enzymes do not play significant roles against lipid hydroperoxides and cholesterol oxidation products. This cholesterol oxidation product was hypothesized to be a candidate physiological compound. The data suggest that the existence and multiple forms of *Drosophila* Delta class GSTs in embryonic cells are able to conjugate HNE, adrenochrome, PEITC and PGA₂. GSTs are highly conserved from insects to mammals and constitutes a crucial biological pathway with potential for detoxification resulting in typical cell functions. Moreover, three enzymes possessed thioltransferase activity that has never been reported before for the Delta class. Finally, the results illustrate that each isoform possesses different properties, both in kinetic properties and for putative physiological functions.

KEY WORDS : GLUTATHIONE TRANSFERASE/ *DROSOPHILA MELANOGASTER*/ PROTEIN CHROMATOGRAPHY/ PHYSIOLOGICAL FUNCTION

95 P.