# KINETIC CHARACTERIZATION OF HYDROPHOBIC-BINDING SITE RESIDUES OF THE *Anopheles dirus* GLUTATHIONE TRANSFERASE DELTA 4-4

**TASSANEE LERKSUTHIRAT**

**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 2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

การศึกษาเชิงจลศาสตร์ของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการจับสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำของเอนไซม์กลูตาไธโอนทรานสเฟอเรสเดลต้า 4-4 จากยุงก้นปล่อง (KINETIC CHARACTERIZATION OF HYDROPHOBIC-BINDING SITE RESIDUES OF THE *Anopheles dirus* GLUTATHIONE TRANSFERASE DELTA 4-4)

ทัศนีย์ ฤกษ์สุทธิรัตน์ 4837237 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ALBERT J. KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., พีรดา พรหมมีเนตร, Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์กลูตาไธโอนทรานสเฟอเรสกลุ่มเดลตาชนิดที่สี่ (adGSTD4-4) ที่มาจากยุงก้นปล่อง (*Anopheles dirus*) โดยลงรายละเอียดไปที่กรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการจับกับสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ กรดอะมิโนที่ว่าสามารถจำแนกออกเป็นสามบริเวณ ดังต่อไปนี้ 1) Gln-112 Arg-113 Gln-140 2) Thr-174 Phe-212 และ 3) Arg-214 Tyr-215 Phe-216 จากการศึกษาค่าจลศาสตร์ ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ความคงทนต่ออุณหภูมิ และปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราจำกัดของปฏิกิริยาการแทนที่สารประกอบอะโรมาติก พบว่ากรดอะมิโนในบริเวณแรกนั้น มีความสำคัญน้อยมากต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ในทางตรงกันข้าม พบว่ากรดอะมิโนในบริเวณที่สองซึ่งมีตำแหน่งอยู่คาบระหว่างบริเวณที่จับกับกลูตาไธโอน และบริเวณที่จับกับสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำนั้น มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยที่บริเวณนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการบังคับทิศทางของห่วง แอลฟา1-บีต้า1 ให้อยู่ในทิศทางที่เหมาะสมต่อการทำงานของ Ser-9 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญมากต่อจับกับกลูตาไธโอนไอออน นอกจากนี้แล้วบริเวณนี้ยังมีผลต่อการกำหนดอัตราจำกัดของปฏิกิริยาการแทนที่สารประกอบอะโรมาติก และมันยังทำหน้าที่ในการกำหนดความจำเพาะของสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำอีกด้วย แม้ว่าบริเวณสุดท้ายผลการทดลองได้บ่งชี้ว่า เมื่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบริเวณดังกล่าวผลกระทบต่อการเร่งปฏิกิริยามีน้อยกว่าบริเวณที่สอง แต่ถึงกระนั้นจากการพิจารณาค่าคงที่ทางจลศาสตร์ ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น และอัตราจำกัดของปฏิกิริยา สามารถเสนอได้ว่าบริเวณนี้อาจทำหน้าที่ในการปกป้องบริเวณเร่งของเอนไซม์ออกจากสารละลายภายนอกเพื่อช่วยในการเร่งปฏิกิริยาและจำแนกขนาดของสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำที่จะเข้ามาทำปฏิกิริยากับกลูตาโธโอน โดยสรุปแล้วจากผลการทดลองทั้งหมด ได้ชี้ให้เห็นว่ากรดอะมิโนดังกล่าวที่ได้ทำการศึกษานั้น ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยตรง แต่อาจจะเกี่ยวข้องโดยการที่มันมีผลกระทบต่อกรดอะมิโนข้างเคียงที่อาจจะมีความสำคัญมากกว่าในการเร่งปฏิกิริยา

96 หน้า

Copyright by Mahidol University

KINETIC CHARACTERIZATION OF HYDROPHOBIC-BINDING SITE RESIDUES OF THE *Anopheles dirus* GLUTATHIONE TRANSFERASE DELTA 4-4

TASSANEE LERKSUTHIRAT 4837237 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

To date, there are several investigations on the active site of adGSTD4-4 (*Anopheles dirus* glutathione transferase, delta class and isoform 4). Mainly, they have focused on the glutathione binding site (G-site) and subunit interface. In the present study, the hydrophobic substrate binding site (H-site) is therefore of interest to reveal the relationships between structure and function of the enzyme. The putative H-site amino acids were proposed and characterized. These residues are Gln-112, Arg-113, Gln-140, Thr-174, Phe-212, Arg-214, Tyr-215 and Phe-216. These residues can be grouped into three regions: 1) Gln-112, Arg-113 and Gln-140, 2) Thr-174 and Phe-212 and 3) Arg-214, Tyr-215 and Phe-216. The first region is located near the subunit interface whereas the second region lies between the G-site and H-site. The last area is situated at the edge of the active site. The results show that the first area did not appear to be significant for catalytic properties of adGSTD4-4. In contrast, the second area seemed to be important in enzymatic catalysis. This area is suggested to be involved in stabilization of the β1-α1 loop where the critical catalytic residue Ser-9 is situated. It also appeared to contribute to the rate-limiting step of nucleophilic aromatic substitution reaction ($S_NAr$). Moreover, Phe-212 appears to provide a hydrophobic environment to promote $S_NAr$ and substitution nucleophilic bimolecular reaction ($S_N2$). Therefore, this region also plays a role in substrate specificity. Although, the last region showed an effect on enzymatic catalysis it was less than the second region. The results demonstrated that the third region made contributions to the kinetic parameters, rate-determining step and substrate recognition. This region appears to participate in shielding the active site from the bulk solvent by which the local dynamics of the α8-helix would influence the discrimination of hydrophobic substrate size during catalysis. Finally, the results suggest that the residues are not directly involved in catalysis but would influence catalysis through secondary interactions that eventually impact on the catalysis via multiple determinants.

KEY WORDS: GLUTATHIONE TRANSFERASES/ ANOPHELES DIRUS/ DELTA CLASS/ H-SITE

96 pp.

Copyright by Mahidol University