STUDY OF CYP6AA3 SUBSTRATES USING *IN VITRO* METABOLISM AND *IN SILICO* HOMOLOGY MODELING

PANIDA LERTKIATMONGKOL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2011

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

STUDY OF CYP6AA3 SUBSTRATES USING *IN VITRO* METABOLISM AND *IN SILICO* HOMOLOGY MODELING

PANIDA LERTKIATMONGKOL 5137068 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : PORNPIMOL RONGNOPARUT, Ph.D., JAMORN SOMANA, M.D. Ph.D., EKACHAI JENWITHEESUK, Ph.D.

ABSTRACT

Cytochrome P450 monooxygenases have been shown to confer insecticide resistance in insects. In *Anopheles minimus* malaria mosquito vector, CYP6AA3 was isolated and previously reported to mediate pyrethroid degradation. Further characterization of metabolic activities and kinetics of CYP6AA3 against various insecticides have been reported. Therefore knowledge of binding interactions between insecticides and CYP6AA3 enzyme would allow insight into CYP6AA3 structure that renders the enzyme suitable for binding of pyrethroid insecticides. In this study homology modeling was employed to construct a three-dimensional structure of CYP6AA3 using multiple template alignment. To better assess structural features of CYP6AA3 model, homology modeling of CYP6P7 was built. CYP6AA3 model was compared with CYP6P7 to better differentiate whether the differences in topologies of both enzymes account for the differences in their metabolic activities toward pyrethroids. The resulting CYP6AA3 and CYP6P7 models were docked with various insecticides including pyrethroids. The model structures comprise common P450 folds but the differences in geometry of their active-site cavities and substrate access channels are prominent. CYP6AA3 model has large predicted active site rendering it to accommodate multitple conformations of pyrethroids (permethrin, cypermethrin, deltamethrin, and λ-cyhalothrin), while predicted CYP6P7 active site is more constraint resulting in less accessible to binding of pyrethroids. Moreover hydrophobic interface in active-site cavities of CYP6AA3 and CYP6P7 could contribute to their substrate selectivity, as illustrated by their lack of enzymatic activities against bioallethrin, chloryrifos, and propoxur, in congruence with their absence of detectable activities *in vitro*. These predicted insecticide binding modes are corresponded to insecticide metabolic activities of CYP6AA3, either substrate or non-substrate compounds. In addition, *in vitro* study demonstrated a role of pyrethroid as a competitive inhibitor of CYP6AA3-mediated BROD activity. The results reported herein could thus be applicable to the understanding of insecticide metabolisms mediated by P450 enzymes.

KEY WORDS: CYTOCHROME P450 / PYRETHROID INSECTICIDE / HOMOLOGY MODELING / MOLECULAR DOCKING / PROTEIN STRUCTURE

64 pages

Copyright by Mahidol University

การศึกษาสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาของไซโตโครม พี 450 6AA3 โดยใช้โปรแกรมความพิวเตอร์และการศึกษาในห้องปฏิบัติการ

STUDY OF CYP6AA3 SUBSTRATES USING *IN VITRO* METABOLISM AND *IN SILICO* HOMOLOGY MODELING

พนิดา เลิศเกียรติมงคล 5137068 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : พรพิมล รงค์นพรัตน์, Ph.D., จามร สมณะ, M.D. Ph.D., เอกชัย เจนวิถีสุข, Ph.D.

บทคัดย่อ

จากการศึกษา พบว่าไซโตโครม พี450 โมโนออกซิจิเนสมีส่วนช่วยในการกำจัดยาฆ่าแมลงออกจากตัวแมลง ส่งผลให้เกิดการดื้อยาฆ่าแมลง โดยเอนไซม์ CYP6AA3 ของยุงก้นปล่อง *Anopheles minimus* สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงชนิดไพรีทรอยด์ได้ เนื่องด้วยการศึกษาในเชิงโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์CYP6AA3ต่อการจับยาฆ่าแมลงชนิดต่างๆจะช่วยให้มีความเข้าใจถึงความสามารถของ CYP6AA3 ที่มีความจำเพาะต่อไพรีทรอย ดังนั้นโครงสร้างสามมิติของ CYP6AA3 จึงถูกสร้างขึ้น โดยใช้เทคนิค Homology modeling และทำการเปรียบเทียบโครงสร้างของ CYP6AA3กับ CYP6P7 เพื่อศึกษาความแตกต่างทางโครงสร้างสามมิติ ที่ส่งผลให้เอ็นไซม์ทั้งสอง มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีทรอยด์ได้แตกต่างกัน ซึ่งพบ ว่าขนาดของบริเวณที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของ CYP6AA3 นั้นมีขนาดใหญ่กว่า CYP6P7 มาก นอกจากนี้ การศึกษาการวางตัวของยาฆ่าแมลงชนิดต่างๆในโครงสร้างของ CYP6AA3 ให้ผลสอดคล้องกับความสามารถในการย่อยสลายยาฆ่าแมลงในห้องทดลองที่รายงานมาก่อนหน้านี้ โดยบริเวณที่ใช้จับของ CYP6AA3 มีขนาดใหญ่มากสามารถให้ยาฆ่าแมลงไพรีทอรย์วางตัวได้หลายลักษณะ ซึ่งอาจนำไปสู่สารผลิตภัณฑ์ที่พบว่ามีหลายชนิด ในขณะที่ CYP6P7 จะมีบริเวณสำหรับเกิดปฏิกิริยาเล็กกว่า ทำให้การวางตัวของไพรีทรอยถูกจำกัดได้เพียงแบบเดียว นอกจากนี้ พื้นผิวที่ใช้ในการจับกับไพรีทรอยยังสอดคล้องกับความมีขั้วของไพรีทอรย์ การศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าไพรีทรอยยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของ CYP6AA3 ต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารเรืองแสงได้อีกด้วย

64 หน้า

Copyright by Mahidol University