17 JAN 2003

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

ENZYMATIC STUDIES OF RECOMBINANT YEAST AND INSECT GLUTATHIONE S-TRANSFERASES

ARDCHARAPORN VARARATTANAVECH

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

TH
A676e
2002
c.2

ISBN 974-04-2594-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

4336311 MBMG/M : **MAJOR: MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING; M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)**

KEY WORDS : **GLUTATHIONE S-TRANSFERASE/ SACCHAROMYCES CEREVISIAE/ANOPHELES DIRUS/SITE-DIRECTED MUTAGENESIS/ KINETIC STUDY/STABILITY ASSAY**

ARDCHARAPORN VARARATTANAVECH: ENZYMATIC STUDIES OF RECOMBINANT YEAST AND INSECT GLUTATHIONE S-TRANSFERASES. THESIS ADVISORS: ALBERT J. KETTERMAN, Ph.D., CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., DUNCAN R. SMITH, Ph.D., 135 p. ISBN 974-04-2594-1

Glutathione S-transferases (E.C.2.5.1.18; GSTs) are a super-gene family of dimeric multifunctional enzymes found in many organisms. They are involved in xenobiotic detoxification. GSTs in yeast have been implicated in oxidative as well as other stress responses, but little is known about the kinetic properties of this enzyme. GSTs in insects are of interest because they play potential roles in insecticide resistance. The objective of this study is to define the enzymatic properties and physiological roles of GSTs of *Saccharomyces cerevisiae* and *Anopheles dirus*.

In part I, GST of *S. cerevisiae* named GTT1 was cloned and characterized for enzymatic properties. It lacks amino acid sequence homology of other GST classes and the specificity toward 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) substrate was significantly different. This demonstrated GTT1 should be grouped into different class from any known GST classe.

In part II, six mutant enzymes of *An. dirus* adGST1-4, L33A, H38A, H50A, P120A, R136A and E37N/H38A were generated in *E. coli* to characterize the critical residues in or near the active site pocket. All mutant enzymes were purified by affinity chromatography. Marked differences in the kinetic parameters could be observed in the mutants except for R136A. The mutations decreased GSH binding affinity, especially L33A, H38A, H50A and E37N/H38A. The mutations not only affected the GSH binding but also significantly decreased the catalytic constant and catalytic efficiency. This finding suggested that these residues play a critical role in the enzyme catalysis in addition to GSH interaction. Substrate specificity and inhibition studies of the mutants demonstrated some differences when compared with the wild type.

In addition, the residues in the active site L33, H50 and P120 appear to be involved in structural stabilization of the enzyme. These results suggested that the involvement of the GSH interaction and enzyme catalysis may be associated with many amino acids around the GSH binding site with different contributions. In addition, the property differences of the mutants may result from conformational changes of the protein.

Copyright by Mahidol University

4336311 MBMG/M : สาขาวิชา: อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์; วท.ม.
(อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

อัจฉราภรณ์ วรารัตน์ธนาเวช: การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรสของยีสต์และแมลง (ENZYMATIC STUDIES OF RECOMBINANT YEAST AND INSECT GLUTATHIONE S-TRANSFERASES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: Albert J. Ketterman, Ph.D., ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., Duncan R. Smith., Ph.D. 135 หน้า
ISBN 974-04-2594-1

กลูตาไธโอน เอส ทรานเฟอเรส (GST) เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ประกอบด้วยสองหน่วยย่อย ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดและมีหน้าที่การทำงานหลายอย่าง เช่น เกี่ยวข้องกับการขจัดสารพิษออกจากเซลล์ แต่ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางปฏิกิริยาทางเคมีของ GST ในยีสต์มีไม่มากนัก GST ยังมีบทบาทในการดื้อต่อยาฆ่าแมลงจึงทำให้ GST ในแมลงเป็นที่น่าสนใจ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติทางปฏิกิริยาเคมีและทางสรีระวิทยาของ GST จาก Saccharomyces cerevisiae และลูกน้ำยุง Anopheles dirus

ยีนสำหรับสร้างเอนไซม์ GTT1 จาก S. cerevisiae ได้ถูกโคลนและเมื่อศึกษาคุณสมบัติทางปฏิกิริยาเคมีพบว่า GTT1 มีความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนและความจำเพาะเจาะจงต่อ CDNB เมื่อเปรียบเทียบกับ GST ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ อย่างสิ้นเชิง ดังนั้น GTT1 น่าจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ GST ที่ต่างออกไป

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณส่วนเร่งของเอนไซม์ An. dirus GST ชนิดที่หนึ่ง กลุ่มที่สี่ (adGST1-4) โดยทำการเปลี่ยนแปลงยีนเฉพาะที่และได้เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้งหมด 6 ชนิด L33A H38A H50A P120A R136A และ E37N/H38A ซึ่งถูกสร้างใน E. coli และได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ซึ่งพบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้งหมดยกเว้นชนิด R136A แสดงคุณสมบัติที่แตกต่างไปคือลดความชอบต่อการจับกับ GSH และยังส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาระหว่าง GSH กับ CDNB อย่างมีนัยสำคัญด้วย เมื่อศึกษาลักษณะความจำเพาะเจาะจงและการถูกยับยั้ง พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์แต่ละชนิดมีคุณลักษณะดังกล่าวแตกต่างกันไป นอกจากนี้พบว่า การเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโน L33 H50 และ P120 ยังส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ด้วย แม้ว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปจะอยู่ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาก็ตาม

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่ากระบวนการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี ระหว่าง GST กับ substrate อาจจะเกิดจากการมีส่วนร่วมของหลายกรดอะมิโนรวมกัน นอกจากนี้คุณสมบัติต่างๆที่เปลี่ยนไปอาจเนื่องมาจากมีการเปลี่ยนโครงรูปของเอนไซม์ร่วมด้วย

Copyright by Mahidol University