

Abstract

Project Code: BGJ4580018

Project Title: Structure-function Studies in Glutathione S-transferases (GSTs)

Investigator: Ms. Jeerang Wongtrakul and Assoc. Prof. Albert J. Ketterman
Institute of Molecular Biology & Genetics
Mahidol university

E-mail Address: jwongtrakul@yahoo.com, frakt@mahidol.ac.th

Project Period: 10 months

The Cys69 residue of an *Anopheles dirus* glutathione S-transferase isoform (GSTD3-3), was characterized to elucidate its contribution in both catalysis and structural support. Nine mutants were generated at this position by replacing the residue with polar, non-polar and charged residues using PCR-based site-directed mutagenesis. All the mutants enzymes were then purified by affinity chromatography and characterized using several kinetic parameters. Molecular dynamics simulations were also performed to understand all the changes in the enzyme structure. The polar residues changed the V_m of the enzymes. With non-polar residues, the enzymes were unable to fold and were expressed in the insoluble inclusion form. With charged residues, the soluble enzyme yields were only 3% of the wild type protein. All Cys69 mutants have dramatically decreased half-lives. therefore residue 69 may be involved in the initial enzyme folding as well as stability. Molecular dynamics simulation also showed that the location of Cys69 mutants relative to the center of gravity of the protein is different for the wild type indicating a different conformation. These findings are additional evidence of the importance of structural residues that affect the enzymatic properties such as V_m , K_m and enzyme specificity. The information will contribute to identifying the location and nature of important structural regions in insect delta class GSTs that affect enzyme activity and may be useful in identifying selective inhibitors for use in improving the malaria-control strategies.

Keywords: Glutathione transferase, kinetic parameters, Site-directed mutagenesis, molecular dynamics simulation, stability

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ BGJ4580018

ชื่อโครงการ การศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์ Glutathione S-Transferases (GSTs)

ชื่อนักวิจัย นางสาว จีรัง ว่องตระกูล และ Assoc. Prof. Albert J. Ketterman
สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

E-mail Address: : jwongtrakul@yahoo.com, frakt@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 10 เดือน

ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติด้านจลนศาสตร์และบทบาทด้านโครงสร้างของเอนไซม์ AdGSTD3-3 จากยุง *An. dirus* โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนเฉพาะที่บริเวณตำแหน่ง Cys69 เป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆรวม 9 ชนิดประกอบด้วยกลุ่มโพลาร์ กลุ่มที่ไม่โพลาร์ และกลุ่มที่แขนงข้างสามารถแตกตัวได้ ด้วยวิธีการเพิ่มขยาย DNA จากนั้นเอนไซม์กลายพันธุ์ ทุกตัวได้ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ affinity column จากนั้นได้ศึกษาคูณลักษณะของเอนไซม์ และได้สร้างแบบจำลองโครงสร้างเคลื่อนไหวเพื่อให้เข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างของเอนไซม์ซึ่งพบว่ากรดอะมิโนในกลุ่มโพลาร์มีผลต่ออัตราความเร็วสูงสุดของเอนไซม์ กรดอะมิโนในกลุ่มที่ไม่โพลาร์ ทำให้เอนไซม์ละลายน้ำลดลงและตกตะกอนส่วนกลุ่มอะมิโนที่แขนงข้างสามารถแตกตัวได้ทำให้ปริมาณผลผลิตของเอนไซม์ลดลงคิดเป็น 3% ของเอนไซม์ตั้งต้น เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกตัว มีเสถียรภาพต่อความร้อนต่ำกว่าเอนไซม์ตั้งต้น ดังนั้นกรดอะมิโนตำแหน่ง 69 อาจจะมีบทบาท ในการม้วนหรือพับตัว และมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ ส่วนการศึกษาแบบจำลองเคลื่อนไหวของเอนไซม์กลายพันธุ์ Cys69 พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์มีโครงรูปต่างจากเอนไซม์ต้นแบบโดยมีตำแหน่งของจุดศูนย์ถ่วง(Cg)ต่างกัน การศึกษาทั้งหมดได้แสดงให้เห็นถึง บทบาทของกรดอะมิโนสำคัญ ที่ตำแหน่งนอกบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่มีผลต่อคุณสมบัติ ด้านจลนศาสตร์เช่นค่าอัตราความเร็วสูงสุด ค่าคงที่ของมิเคลิส และความจำเพาะของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลในการระบุตำแหน่ง และลักษณะ ของบริเวณโครงสร้าง ที่สำคัญในเอนไซม์GST ที่พบในแมลงซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการ ศึกษาสารยับยั้งที่จำเพาะ เพื่อใช้ในการควบคุมโรคมาเลเรียต่อไป

คำหลัก: กลูตาไธโอนเอสทรานสเฟอเรส คุณสมบัติทางจลนศาสตร์ การเปลี่ยนกรดอะมิโน
เฉพาะที่ แบบจำลองโครงสร้างเคลื่อนไหว เสถียรภาพต่อความร้อน