

Abstract

Project Code: TRG4680035

Project Title: Important structural residues of Glutathione S-Transferase control the enzyme function

Investigators: Dr. Jeerang Wongtrakul^{*}, Dr. La-aied Prapanthadara^{*} and Assoc. Prof.

Albert J. Kettermann⁺

^{*}Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University

⁺Institute of Molecular Biology & Genetics, Mahidol university

E-mail Address: wongtrakul@yahoo.com, inhso001@chiangmai.ac.th,

frakt@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years

Glutathione S-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) are a family of detoxifying enzymes that catalyze the conjugation of the sulfhydryl group of glutathione to a wide variety of electrophilic compounds. The GSTs in insect are of particular interest because of their role in insecticide resistance. A knowledge of the structure and function of GSTs is required in order to understand the enzymatic properties. In this study, five mutants of *Anopheles dirus* at position 96, an interface residue, of AdGSTD3-3 and five neighboring residue mutants of the amino acid position 96 were obtained using PCR site directed mutagenesis. The recombinant enzymes were purified using affinity chromatography on a GSTrap column. Differences in the kinetic parameters of the mutants toward the standard substrates CDNB, GSH, inhibitor and insecticides were

observed. Therefore residue changes at an interface position could affect the binding and interaction with those tested compounds. Marked difference in the thermal stability of Arg 96 mutants could be observed. The polar and non-polar residues in this position generate a more stable enzyme than that of the wild type clone, indicating an important role for this residue in structural stabilization. Based on the available crystal structure of the baseline AdGSTD3-3, and the kinetic data, Arg 96 interface residue may affect the interaction with Trp 63 in the other subunit. The positional changes in Trp 63 would then influence the interaction with Gln 49 which is an active site residue in the other subunit and modulate the catalytic activity of AdGSTD3-3.

Keywords: Glutathione transferase, kinetic parameters, site-directed mutagenesis,

s t a b i l i t y

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ TRG4680035

ชื่อโครงการ กรดอะมิโนสำคัญในโครงสร้างโปรตีน Glutathione S-Transferase ที่สามารถควบคุมการทำงานของเอนไซม์

ชื่อนักวิจัย ดร. จีรัง ว่องตระกูล^a, ดร. ละเอียต ประพันธ์ดารา^a และ Assoc. Prof. Albert

J. Ketterman^b

^aสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

^bสถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

E-mail Address: jwongtrakul@yahoo.com, inhso001@chiangmai.ac.th,

frakt@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

กลูตาไธโอนเอสทรานสเฟอเรสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำลายสารพิษโดยการเร่งปฏิกิริยารวมกันของหมู่ sulphydryl ของกลูตาไธโอนกับสารประกอบหลายชนิด GST ในแมลงเป็นที่สนใจเนื่องจากมีบทบาทในการต้านยาฆ่าแมลงการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของGSTทำให้เข้าใจในคุณสมบัติของเอนไซม์นี้มากขึ้น การศึกษานี้ได้ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนเฉพาะที่ของเอนไซม์ AdGSTD3-3 ที่ตำแหน่ง 96 (บริเวณรอยต่อระหว่างโปรตีนสองยูนิต) โดยเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนต่าง ๆ กัน 5 ชนิดและสร้างเอนไซม์กลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบริเวณใกล้เคียงกรดอะมิโน 96 อีก 5 ตัว เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้งหมดได้ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยจับกับ GSTrap column จากการศึกษาทางจลนศาสตร์ได้พบความแตกต่างในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรท GSH และ CDNB สารยับยั้งต่างๆรวมถึงยาฆ่าแมลง ดังนั้นการเปลี่ยนกรดอะมิโนบริเวณดังกล่าวมีผลต่อการจับกับสารที่นำมาทดสอบ ได้ทำการศึกษาเสถียรภาพต่อความร้อนและพบว่ากรดอะมิโนกลุ่มที่โพลาร์และไม่โพลาร์มีเสถียรภาพต่อความร้อนสูงกว่าเอนไซม์ต้น

แบบอย่างมาก ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ในการคงสภาพโครงรูปของโปรตีน จากการศึกษาโครงสร้างผลึกสามมิติของโปรตีนที่มีอยู่และผลจากการศึกษาทางจลนศาสตร์ กรดอะมิโน96อาจจะมีผลต่อกรดอะมิโนใกล้เคียงเช่น Trp 63 ในอีกสับยูนิตและการเปลี่ยนแปลงของ Trp 63 อาจจะกระทบต่อ Gln 49 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนบริเวณเร่งของเอนไซม์ และ ควบคุมแอคทีวิตีของเอนไซม์

คำหลัก: กลูตาไรโอนเอสทรานสเฟอเรส คุณสมบัติทางจลนศาสตร์ การเปลี่ยนกรดอะมิโน
เฉพาะที่ เสถียรภาพต่อความร้อน