تطور وخواص إنزيم الأسيتيل كولين إيستريز أثناء مراحل نمو ناقل حمى الضنك (*أيديس أجيبتي*)

إعداد الطالب

حسن بن علي مسعود الطلحي

إشراف

أ. د. صالح بن أحمد محمد

د. أحمد بن نبيل أبو خطوة

أ. د. خالد بن محمد الغامدي

المستخلص

تركز هذه الدراسة على خواص إنزيم الأسيتايل كولين إيستريز (AChE) (الرقم التقسيمي E.C.3.1.1.7.) أثناء مراحل نمو ناقل حمى الضنك (*أيديس أجيبتي*). تم تنقية AChE جزئياً باستخدام تقنية كروماتوجرافيا الفصل الحجمي بواسطة عمود السيفاكريل إس – 200 والحصول على شكلين للإنزيم أطلق عليهما AChE1 و AChE2. تم الكشف عن اختلاف في التعبير الجيني لهذه الإنزيمات أثناء مراحل نمو الحشرة ووجد أن أعلى نشاط كان في مرحلة الجنين والطور البالغ لكلٍ من AChE1 و AChE2، على التوالي. و قدر الوزن الجزيئى للإنزيمات AChE1 و AChE2 لجميع أطوار نمو الحشرة بين 100 و >2000 كيلو دالتون، على التوالي. تم دراسة التخصص للمادة الوسيطة و تبين أن النسبة المئوية للنشاط لأيودين البيوترايل ثيو كولين (BuSChI) كانت 9.4 و 11.6% للإنزيمات AChE1 و AChE2 بالمقارنة مع أيودين الأسيتايل ثيو كولين (AcSChI)، على التوالي. وقد قدرت قيم ثابت ميكيليس مينتون (K_m) للإنزيمات AChE1 و AChE2 وكانت 0.256 و 0.288 ملي مولار، على التوالي. كما تبين أن AChE1 و AChE2 لهما نفس درجة الحرارة و الأس الهيدروجيني (pH) المثلى عند 37°م و 7.5، على التوالي. و بينما يفقد AChE2 20% من نشاطه، يحتفظ AChE1 بنشاطه عند 40°م . كما تبين أن الكاتيونات الفلزية تؤدي إلى تثبيط AChE1 و

AChE2 جزئياً، بيمنا يؤدي الكوبلت إلى تثبيط كلي لنشاط الإنزيميين. بالإضافة إلى ذلك، وجد أن المثبطات فينايل ميثايل سولفونايل فلورايد (PMSF)، 10,1- فينانو ثرولين، مثبط تربسين و المركب المخلبي (EDTA)يؤدي إلى تثبيط جزئي للإنزيمات AChE1 و AChE2 بينما لوحظ التثبيط الكلي مع المثبط بارا-هيدروكسي ميركوري بنزوات (*p*-HMB). تم تحديد نوع التثبيط ، ثابت التثبيط (K_i) ومعدل التثبيط (K_i ratio AChE1/AChE2) للمبيدات العضوية الفسفورية أوالكربماتية. وجد أن AChE1 كان أكثر حساسية للتثبيط بنسبة 0.9، 0.69 و 0.48 بالمثبطات ميثومايل، كلوربايرفوس ميثايل و برايمفوس ميثايل و أقل حساسية بنسبة 4.3، 1.9 و 1.36 للمثبطات إيزرين، مالاثيون و فينتروثيونمن الإنزيم AChE2، على التوالي. ويمكن الاستفادة من هذه النتائج في عمليات مكافحة نواقل حمى الضنك باختيار المبيدات المناسبة التي تعمل من خلال تثبيط إنزيمات AChE's مع مراحل النمو المناسبة الأكثر حساسية لفعل هذه المبيدات العصبية، كما تضيف هذه الدراسة معلومات أساسية عن خصائص إنزيمات AChE الخاصة بناقل حمى الضنك و التي تعد من أهم النظم الكيموحيوية المستهدفة لفعل المبيدات العصبية كمركبات الفسفور العضوية والكربامات والبيريثرويدات.

Evolution and properties of acetylcholinesterase during developmental stages of dengue vector (*Aedes aegypti*)

By

Hasan Ali Al-Talhi

Supervised By

Prof. Saleh A. Mohamed

Dr. Ahmed N. Abo-Khatwa

Prof. Khaled M. Al-Ghamdi

ABSTRACT

The screening of acetylcholinesterase (AChE) (E.C.3.1.1.7.) during developmental stages, eggs, larvae, pupa and adults of *Aedes aegypti* was detected. Chromatography on a Sephacryl S-200 column revealed the existence of two forms designated as AChE1 and AChE2. Different expression patterns of AChE1 and AChE2 activities were detected. The highest expression of AChE1 and AChE2 were detected at the egg and adult, respectively. The native molecular weights of AChE1 and AChE2 from *Ae. aegypti* were estimated to be > 2,000 and 100 kDa, respectively. The properties of AChE1 and AChE2 from *Ae. aegypti* 36h-old eggs were studied. The substrate specificity of enzymes showed that the relative activity % for butyrylthiocholine iodide was 9.4 and 11.6 for AChE1 and AChE2 as compared to acetylthiocholine iodide (AcSChI), respectively. The Km values for *Ae. aegypti* AChE1 and AChE2 were 0.256 and 0.288 mM AcSChI, respectively. Both enzymes had the same temperature and pH optima at 40˚C and 7.5, respectively. AChE1 was thermal stable up to 40˚C, while AChE2 lost 20% of its activity. All the metal examined caused partial inhibitory effect on the two enzymes**,** except Co^{+2} caused complete inhibition. While PMSF, 1,10-

phenanthroline, trypsin inhibitor and EDTA caused partial inhibitory effect on both enzymes, the activities were completely lost by *p*-HMB. The type of inhibition, bimolecular rate constant (K_i) and Ki ratio AChE1/AChE2 for organophosphate or carbamate as inhibitors were detected. AChE1 was 0.9-, 0.69- and 0.48-fold more sensitive to inhibition by methomyl, chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl, and 4.3-, 1.9- and 1.36-fold less sensitive to inhibition by eserine, malathion and fenitrothion than that of AChE2, respectively. These results could support vector control program by choosing the right pesticide which specifically inhibits any of the molecular forms of AChE's at the right developmental stage. In addition, the obtained results provides important biochemical characteristics of the enzyme AChE from the dengue vector *Ae. aegypti*, the target of neuropesticides such as organophosphorus, carbamates and pyrothroid compounds.