FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF TWO β-HAIRPINS IN THE RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4B TOXIN

SAHAPAT BARUSRUX

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY 2003

ISBN 974-04-3637-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาหน้าที่ความสำคัญของคู่ β-hairpin ในส่วนที่ใช้จับกับ receptor ของโปรตีนสารพิษ Cry4B จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF TWO β-HAIRPINS IN THE RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4B TOXIN)

สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์ 4237030 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., อานนท์ บุณยะรัตเวช Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., ชาติชาย กฤตนัย Ph.D.

บทคัดย่อ

เพื่อศึกษาหน้าที่ความสำคัญของ β2-β3 loop และ β4-β5 loop ซึ่งอยู่ในส่วนที่ใช้จับกับ receptor (receptor-binding domain) ของโปรตีนสารพิษ Cry4B จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ว่ามีส่วนต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่จำเพาะเจาะจง (insecticidal specificity) ในการนี้ได้สร้างโปรตีนสารพิษ Cry4B กลายพันธุ์โดยการแทนที่กรดอะมิโนชนิดมีขั้วหรือมีประจุด้วยกรดอะมิโน alanine ในบริเวณส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างเบต้า 2 กับเบต้า 3 (β2-β3 loop) ได้แก่ Y332A Q333A D334A R336A และระหว่างเบต้า 4 กับ เบต้า-5 (β4-β5 loop) ได้แก่ S362A S366A N367A รวมถึงในเบต้า 4 ได้แก่ Y359A S361A และในเบต้า 5 ได้แก่ T369A H370A รวมเป็นจำนวน 11 ชนิด ซึ่งเมื่อทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกลายพันธุ์ดังกล่าวพบว่า เฉพาะการแทนที่ ณ ตำแหน่ง Tyr-332 และ Thr-369 (Y332A, T369A) ทำให้โปรตีน Cry4B สูญเสียความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย(*A. aegypti*) ซึ่งให้ผลยืนยันโดยการทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุงลายโดยตรง (*ex vivo* cytotoxicity test) นอกจากนี้เมื่อทดสอบด้วยวิธี immuno-histochemical staining พบว่า ความสามารถในการจับ (binding activity) กับชิ้นเนื้อเยื่อกระเพาะลูกน้ำยุงลายของโปรตีน Y332A และ T369A น้อยกว่าของโปรตีน wild-type แต่อย่างไรก็ตามโปรตีน Y332A และ T369A ยังคงมีความสามารถในการทำให้ liposome แตกได้เช่นเดียวกับโปรตีน wild-type เมื่อศึกษาเพิ่มเติมพบว่าการแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 332 ด้วย phenylalanine หรือ tryptophan และการแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 369 ด้วย serine, cysteine หรือ aspartate นั้นสามารถทำให้โปรตีนกลายพันธุ์ดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายได้เช่นเดิม นอกจากนี้เมื่อศึกษาเพิ่มเติมที่บริเวณ β4-β5 loop พบโครงสร้าง aromatic ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 364 ก็มีความสำคัญต่อความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายเช่นกัน ฉะนั้นผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า โครงสร้าง aromatic ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 332 และ 364 รวมถึง พันธะไฮโดรเจนแบบ side chain-side chain ระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 369 และ328 นั้นเกี่ยวข้องต่อความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องในขั้นตอนการจับ (binding step) มากกว่าขั้นตอนการสร้างรูรั่ว (pore forming step)

ผลการศึกษาครั้งนี้จึงเสนอว่า ส่วนโครงสร้างแบบ aromatic ที่ยื่นออกมาของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง 332 (บน β2-β3 loop) และตำแหน่ง 364 (บน β4-β5 loop) นั้นประกอบกันเป็นโครงรูปแบบที่เหมาะสมเฉพาะของโปรตีนสารพิษ Cry4B ซึ่งอาศัยพันธะไฮโดรเจนที่จำเพาะระหว่างกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 369 บนสายเบต้า 5 กับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 328 บนสายเบต้า 2 ทำหน้าที่เชื่อมระหว่างคู่ β-hairpin ดังกล่าวให้มีเสถียรภาพและเหมาะต่อการจับกับ receptor

186 หน้า. ISBN 974-04-3637-4

FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF TWO β-HAIRPINS IN THE RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4B TOXIN

SAHAPAT BARUSRUX 4237030 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.,
AHNOND BUNYARATVEJ, Ph.D. PRAPON WILAIRAT, Ph.D.,
GERD KATZENMEIER, Ph.D., CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D.

ABSTRACT

PCR-based mutagenesis was employed to examine the role in insecticidal specificity of two surface-exposed loops (β2-β3 and β4-β5 loops) in the receptor-binding domain of the *B. thuringiensis* Cry4B mosquito-larvicidal protein. A total of 11 mutants with a single alanine substitution within the β2-β3 loop (Y332A, Q333A, D334A and R336A), β4 (Y359A and S361A), the β4-β5 loop (S362A, S366A and N367A) and β5 (T369A and H370A) were initially generated. Similar to the wild type, all mutant toxins were over-expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli* and were structurally stable upon solubilisation and trypsin activation. Mosquito bioassays of alanine substituted mutants showed that only Y332A and T369A mutants made no toxic effect on the *Aedes. aegypti* larvae. The mutagenic effect of these two positions was also confirmed by an *ex vivo* cytotoxicity assay using *A. aegypti* isolated larval midguts. This result suggested that Tyr-332 and Thr-369 are the critical residues for larvicidal activity of the Cry4B toxin. In addition, Y332A and T369A mutants were still able to release entrapped calcein from liposomes as comparable to the wild type toxin, but showed a decrease in binding activity to larval midgut sections detected by immuno-histochemical staining. Further mutagenic analysis of these two critical residues showed that only the conversions of Ala-332 to phenylalanine or tryptophan, and Ala-369 to serine, cysteine or aspartate were able to restore the larvicidal activity. The results suggested that an aromatic structure at the 332-residue and specific side chain–side chain H-bonding between the 369 and 328-residues also play an important role in larvicidal activity of the Cry4B toxin, most likely being involved in receptor binding rather than membrane insertion and pore formation. In addition, an aromatic structure at Phe-364 at the tip of the β4-β5 loop was also found to be important for toxicity.

In this study, it is proposed that two critical residues, Tyr-332 and Phe-364, are optimally exposed as “the aromatic structure” to the specific receptor by the optimal conformation of both the β2-β3 and the β4-β5 loops. The specific side chain-side chain interaction *via* H-bonding between the residues 328 and 369 apparently stabilises the β 2-β3 and β4-β5 loop structures.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*/ Cry4B/ DELTA-ENDOTOXIN/ IMMUNO-HISTOCHEMISTRY/ LARVICIDAL ACTIVITY/ MUTAGENESIS/ RECEPTOR BINDING/ MEMBRANE PERTURBATION

186 P. ISBN 974-04-3637-4