MUTATIONAL ANALYSIS OF SELECTED RESIDUES IN α4 AND THE α4-α5 LOOP OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa TOXIN

WALAIRAT PORNWIROON

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 974-04-4190-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนในเกลียวอัลฟาที่ 4 และในส่วนเชื่อมต่อเกลียวอัลฟาที่ 4 และ 5 ของโปรตีนสารพิษ Cry4Aa จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* โดยวิธีการเปลี่ยนแปลงยีน (MUTATIONAL ANALYSIS OF SELECTED RESIDUES IN α4 AND THE α4-α5 LOOP OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa TOXIN)

วไลรัตน์ พรวิรุฬห์ 4338025 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., ALBERT KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., ชาติชาย กฤตนัย, Ph.D., กุศล ภูธนกิจ, Ph.D.

บทคัดย่อ

แบบจำลองกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษจาก *Bacillus thuringiensis* นั้นเกี่ยวข้องกับการสอดแทรกของคู่เกลียวอัลฟาที่ 4 และ 5 ซึ่งก่อให้เกิดรูรั่วบนผนังหุ้มเซลล์บุกระเพาะแมลงตัวอ่อน งานวิจัยนี้ได้ศึกษาบทบาทและหน้าที่ของกรดอะมิโนในเกลียวอัลฟาที่ 4 และในส่วนเชื่อมต่อเกลียวอัลฟาที่ 4 และ 5 ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Aa ซึ่งได้เริ่มศึกษาโดยการแทนที่กรดอะมิโนชนิดมีประจุหรือมีขั้วที่ตำแหน่ง Asp-169 Arg-171 Gln-173 His-178 His-180 Gln-182 Asn-183 Glu-187 ในเกลียวอัลฟาที่ 4 และ Asn-190 Asn-195 Asp-198 Asp-200 Tyr-201 Tyr-202 ในส่วนเชื่อมต่อเกลียวอัลฟาที่ 4 และ 5 ด้วย Ala โดยใช้เทคนิค PCR ในการเปลี่ยนแปลงยีน เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกลายพันธุ์พบว่า การแทนที่ ณ ตำแหน่ง His-178 His-180 และ Tyr-202 ทำให้โปรตีน Cry4Aa สูญเสียความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย เมื่อศึกษาเพิ่มเติมพบว่าการแทนที่ His-178 ด้วย Asp Glu Ser Cys หรือ Gln และการแทนที่ His-180 ด้วย Leu Asn Gln Trp Phe หรือ Tyr รวมถึงการแทนที่ Tyr-202 ด้วย Phe นั้นไม่มีผลกระทบต่อฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงของโปรตีนกลายพันธุ์ดังกล่าว จากผลการศึกษานี้รวมถึงผลวิเคราะห์โครงสร้างแบบจำลอง 3 มิติแสดงให้เห็นว่าพันธะไฮโดรเจนแบบ side chain-main chain ระหว่าง His-178 และ Ile-174 รวมถึงขนาดของ side chain ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 180 และโครงสร้าง aromatic ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 202 น่าจะมีความสำคัญต่อความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงของโปรตีน Cry4Aa นอกจากนี้ยังพบว่าพันธะไฮโดรเจนแบบ side chain-main chain สามารถทดแทนด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบ side chain-side chain ระหว่าง Tyr-249 ในเกลียวอัลฟาที่ 6 และ side chain ของกรดอะมิโนที่แทนที่ๆ ตำแหน่ง 178 (Asp Glu Ser Cys หรือ Gln) และเมื่อทดสอบความสามารถในการทำให้ liposomes แตก รวมถึงการเกิดรูอิออนบนผนังเยื่อหุ้มสังเคราะห์พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ H178C H178D H180Q H178Y H180A H180C H180E H180S และ H180V ยังคงมีความสามารถดังกล่าวเช่นเดียวกับโปรตีนต้นแบบ แสดงให้เห็นว่า His-178 และ His-180 ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการแตกของเยื่อหุ้มสังเคราะห์และการไหลของอิออนผ่านรูรั่ว จากการศึกษานี้จึงเสนอว่า พันธะไฮโดรเจนแบบ side chain-main chain ระหว่าง His-178 และ Ile-174 น่าจะมีบทบาทในการทำให้เกิดเสถียรภาพของเกลียวอัลฟาที่ 4 ของโปรตีน Cry4Aa ในขณะที่ His-180 น่าจะเกี่ยวข้องกับการรักษาโครงรูปที่สมบูรณ์ และ Tyr-202 น่าจะจับกับหมู่ฟอสเฟตที่ผนังเยื่อหุ้มเพื่อรักษาเสถียรภาพของรูรั่ว

244 หน้า. ISBN 974-04-4190-4

MUTATIONAL ANALYSIS OF SELECTED RESIDUES IN α4 AND THE α4-α5 LOOP OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa TOXIN

WALAIRAT PORNWIROON 4338025 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS : CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.,
ALBERT KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D.,
CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D.

ABSTRACT

The current model for molecular mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry δ-endotoxins involves penetration of the α4-α5 hairpin into the target larval midgut membrane to form ion-leakage pores. In this study, PCR-based mutagenesis was employed to identify a functionally critical residue in α4 and the α4-α5 loop within the pore-forming domain of the 130-kDa Cry4Aa mosquito-larvicidal protein. Substitutions with alanine of all charged amino acids (Asp-169, Arg-171 and Glu-187 in α4; Asp-198 and Asp-200 in the α4-α5 loop) and selected polar residues (Gln-173, His-178, His-180, Gln-182 and Asn-183 in α4; Asn-190, Asn-195, Tyr-201 and Tyr-202 in the α4-α5 loop) were initially performed. Unlike the others, only *E. coli* cells that expressed H178A, H180A or Y202A mutant toxins were not toxic to *Aedes aegypti* larvae. Further mutagenic analysis of these critical residues showed that conversions of His-178 to Asp, Glu, Ser, Cys or Gln, His-180 to Leu, Asn, Gln, Trp, Phe or Tyr and Tyr-202 to Phe did not affect the toxicity. These results together with structure modeling suggested that the side chain-main chain H-bonding between His-178 and Ile-174 as well as the size of the side chain at the position-180 in α4 and the conserved aromatic structure at position 202 within the α4-α5 loop of the Cry4Aa toxin is critical for toxin activity. In addition, the critical H-bonding between His-178 and Ile-174 could be compensated by the side chain-side chain H-bonding formed by Tyr-249 in α6 and the side chain of substituted residues at the position-178 (Asp, Glu, Ser, Cys and Gln). When both larvicidal active (H178C, H178D and H180Q) and inactive (H178Y, H180A, H180C, H180E, H180S and H180V) mutant toxins were further characterised for their membrane-perturbation and ion-channel activity, it was found that all these 65-kDa activated mutant toxins were able to release entrapped calcein from hybrid liposomes and could assemble cation-selective channels with the activity comparable to that of the wild-type toxin, indicating that His-178 and His-180 in α4 are not involved in membrane perturbation or the passage of ions through the channel. From this study, it is proposed that the side chain-main chain H-bonding between His-178 and Ile-174 might participate in stabilising the structure of α 4 of the Cry4Aa toxin, while His-180 could be involved in maintaining an appropriate conformation for the toxin and Tyr-202 might interact with the phospholipid head groups of lipid membranes for stabilisation of the oligomeric pore structure.

KEY WORDS : *Bacillus thuringiensis* / DELTA-ENDOTOXIN / MUTAGENESIS / LARVICIDAL ACTIVITY / MEMBRANE PERTURBATION / ION CHANNELS

244 P. ISBN 974-04-4190-4