MUTAGENIC ANALYSIS OF RESIDUES CRITICAL FOR TOXICITY IN DOMAIN II OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

TIPPARAT TUNTITIPPAWAN

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
2004

ISBN 974-04-5510-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การเปลี่ยนแปลงยีนเพื่อศึกษากรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษซึ่งอยู่ในส่วนที่ 2 ของโปรตีนชนิด Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (MUTAGENIC ANALYSIS OF RESIDUES CRITICAL FOR TOXICITY IN DOMAIN II OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN)

ทิพย์รัตน์ ตันติทิพย์วรรณ 4537404 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชนันท์ อังศุธนสมบัติ Ph.D., ปนัดดา บุญเสริม Ph.D., ชาติชาย กฤตนัย Ph.D., GERD KATZENMEIER Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D.

บทคัดย่อ

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ากรดอะมิโนบริเวณส่วนเชื่อมต่อระหว่างเบต้า (β) ซึ่งอยู่ในส่วนที่ 2 ของโปรตีน Cry หลายชนิดจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* มีส่วนเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษต่อแมลงที่จำเพาะเจาะจง ในการศึกษานี้ กรดอะมิโนในส่วนเชื่อมต่อระหว่าง β6-β7 ($SSPS_{390}$) β 8-β9 (S_{410} N_{411} T_{413} T_{415} E_{417} และ G_{418}) และ β10-β11 ($DYNS_{457}$) ซึ่งอยู่ในส่วนที่ 2 ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิด Cry4Ba ได้ถูกแทนที่ทีละตำแหน่งด้วย alanine โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงยีนด้วยเทคนิค PCR ซึ่งพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งหมดซึ่งมีขนาด 130 kDa ได้ถูกสร้างในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่ระดับปริมาณใกล้เคียงกับ wild type และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) พบว่า เฉพาะ *E. coli* ที่สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด P389A S410A E417A Y455A หรือ N456A เท่านั้นที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลดลง ซึ่งความสำคัญต่อการฆ่าลูกน้ำของตำแหน่ง S_{410} E_{417} Y_{455} และ N_{456} ได้ถูกยืนยัน โดยการแทนที่ทีละสองตำแหน่งของกรดอะมิโนเหล่านั้น (S410A/E417A และ Y455A/N456A) และพบว่า โปรตีนกลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิด สูญเสียความเป็นพิษมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ได้ศึกษาโดยการแทนที่ด้วย alanine ของกรดอะมิโนที่ทำนายโดยโปรแกรม Swiss-Pdb ว่าทำหน้าที่รักษาเสถียรภาพของโครงสร้างแบบ β-hairpin ระหว่าง β2-β3 และ β4-β5 (T_{319} R_{323} ใน β2 และ Y_{408} ใน β8) ซึ่งพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด Y408A แสดงความสามารถในการฆ่าลูกน้ำลดลงอย่างชัดเจน เมื่อได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่าการแทนที่ Y_{408} ด้วย phenylalanine ยังคงแสดงความสามารถในการฆ่าลูกน้ำได้เท่ากับ wild type แต่เมื่อแทนที่ด้วย valine tryptophan aspartate glutamate หรือ cysteine พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์เหล่านี้แสดงความเป็นพิษลดลงอย่างชัดเจน จากการวิเคราะห์โครงสร้างจึงได้เสนอว่า โครงสร้าง aromatic ในส่วน side chain ของ Y_{408} ซึ่งมีแนวโน้มที่จะมีปฏิสัมพันธ์กับโครงสร้าง aromatic ของ F_{326} ใน β2 นั้นอาจแสดงให้เห็นถึงความสำคัญต่อความเป็นพิษของโปรตีน Cry4Ba นอกจากนี้เมื่อใช้วิธี immunocytochemistry โดยอาศัย monoclonal antibody ที่จำเพาะ พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด Y408D ซึ่งไม่สามารถฆ่าลูกน้ำได้นั้นสามารถจับกับส่วนบนสุดของเซลบุผิวในส่วนท้ายของกระเพาะลูกน้ำยุงลายลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน wild type ซึ่งแสดงว่า Y_{408} น่าจะเกี่ยวข้องกับการจับกับ receptor โดยสรุปจากผลการศึกษาทั้งหมดนี้จึงเสนอว่า P_{389} ในส่วนที่เชื่อมต่อระหว่าง β6-β7 S_{410} และ E_{417} ในส่วนที่เชื่อมต่อระหว่าง β8-β9 Y_{455} และ N_{456} ในส่วนที่เชื่อมต่อระหว่าง β10-β11 นั้นเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของโปรตีน Cry4Ba นอกจากนี้ Y_{408} ใน β8 ซึ่งน่าจะทำหน้าที่รักษาเสถียรภาพของโครงสร้างแบบ β-hairpin ระหว่าง β2-β3 และ β4-β5 ให้เหมาะสมต่อการจับกับ receptor นั้นมีความสำคัญต่อการจับกับ receptor ของโปรตีน Cry4Ba

163 หน้า. ISBN 974-04-5510-7

MUTAGENIC ANALYSIS OF RESIDUES CRITICAL FOR TOXICITY IN DOMAIN II OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

TIPPARAT TUNTITIPPAWAN 4537404 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISOR : CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., PANADDA BOONSERM, Ph.D., CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D.

ABSTRACT

Loop residues in domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry δ-endotoxins have been demonstrated to be involved in insecticidal specificity. In this study, selected residues in loops β6-β7 ($SSPS_{390}$), β8-β9 ($S_{410,}$ $N_{411,}$ $T_{413,}$ $T_{415,}$ E_{417} and G_{418}) and β10-β11 ($DYNS_{457}$) in domain II of the Cry4Ba mosquito-larvicidal protein were changed individually to alanine via PCR-based site-directed mutagenesis. All mutant toxins were highly expressed in *Escherichia coli* as 130-kDa protoxins at levels comparable to the wild type. Only *E. coli* cells expressing the P389A, S410A, E417A, Y455A or N456A mutants reduced larvicidal activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. The toxic involvement of S_{410}, E_{417}, Y_{455} and N_{456} was confirmed by a more adverse effect on toxicity observed for the two double mutants (S410A/E417A and Y455A/N456A). Furthermore, alanine substitutions of residues that stabilise the β2-β3 and β4-β5 hairpins via Swiss-Pdb (T_{319} and R_{323} in β2 and Y_{408} in β8) revealed that only the Y408A mutant showed a drastic reduction in larvicidal activity. Further replacement of Y_{408} with phenylalanine still retained larvicidal activity as the wild-type level, while replacements with valine, tryptophan, aspartate, glutamate and cysteine drastically decreased larvicidal activity. Structural analysis suggested that the aromatic side chain of Y_{408} interacts with that of F_{326} in β2 implying its functional significance. Using immunocytochemical staining with a specific monoclonal antibody, the larvicidal inactive Y408D mutant reduced binding activity on apical microvilli of *A. aegypti* posterior midgut cells compared with the wild-type toxin, suggesting that Y_{408} is involved in receptor binding. Based on all the results, it is proposed that P_{389} in the β6-β7 loop, S_{410} and E_{417} in the β8-β9 loop, and Y_{455} and N_{456} in the β10-β11 loop are involved in Cry4Ba toxicity. In addition, Y_{408} in β8 that possibly stabilises functional conformation of β2-β3 and β4-β5 hairpins is conceivably important for receptor binding of the Cry4Ba toxin.

KEY WORDS : MUTAGENIC ANALYSIS/ LOOP RESIDUE/ β-HAIRPIN STABILISING RESIDUE/ *Bacillus thuringiensis*/ CRY TOXIN/ RECEPTOR BINDING/ MOSQUITO-LARVICIDAL ACTIVITY

163 P. ISBN 974-04-5510-7