MUTAGENIC ANALYSIS OF LOOP RESIDUES CRITICAL FOR LARVICIDAL ACTIVITY OF THE *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY4BA TOXIN

SARINPORN VISITSATTAPONGSE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7842-5
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การเปลี่ยนแปลงยีนเพื่อศึกษากรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษในบริเวณส่วนที่ 2 ของโปรตีนชนิด Cry4Ba จาก *Bacillus thuringiensis*. (MUTAGENIC ANALYSIS OF LOOP RESIDUES CRITICAL FOR LARVICIDAL ACTIVITY OF THE *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY4BA TOXIN)

สรินพร วิสิฐสัทธาพงศ์ 4737268 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., ปนัดดา บุญเสริม, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., กุศล ภูธนกิจ, Ph.D.

บทคัดย่อ

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ากรดอะมิโนในส่วนเชื่อมต่อระหว่าง β_8-β_9 (S^{410}และ E^{417}) และ β_{10}-β_{11}(Y^{455}และ N^{456}) ซึ่งอยู่ในส่วนที่ 2 ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิด Cry4Ba มีความสำคัญกับการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาด้วยการแทนที่ทีละ 2 ตำแหน่ง โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงยีนด้วยเทคนิค PCR ซึ่งพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งหมดซึ่งมีขนาด 130 kDa ได้ถูกสร้างในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่ระดับปริมาณใกล้เคียงกับ wild type และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย(*Stegomyia aegypti*)พบว่าเฉพาะS410A/E417Dและ Y455F/N456A เท่านั้นที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลดลงในระดับปริมาณเดียวกันกับโปรตีนกลายพันธุ์ต้นแบบ (S410A และ N456A) ในส่วนของ N^{456} ของกรดอะมิโน Y455A/N456A ถูกแทนที่ด้วย glutamine arginine aspartic acid และ tyrosine พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์เหล่านี้แสดงความเป็นพิษลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ ต้นแบบ Y455A จากการวิเคราะห์ผลการทดลองในครั้งนี้จึงได้เสนอว่า โครงสร้างของ negatively charged และ aromatic ในส่วน side chain ของ E^{417} และ Y^{455} รวมทั้งโครงสร้างของกรดอะมิโน asparagine ที่ตำแหน่ง N^{456} มีความสำคัญกับการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ นอกจากนี้เมื่อใช้วิธี immunohistochemistry โดยอาศัย monoclonal antibody ที่จำเพาะพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด S410A/E417Dและ Y455F/N456A สามารถจับกับส่วนบนสุดของเซลล์บุผิวของกระเพาะลูกน้ำยุงลายได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันกับต้นแบบ (S410Aและ N456A) ส่วน Y455A/N456Q จะได้ปริมาณที่ลดลงเมื่อเทียบกับต้นแบบ (Y455A) โดยสรุปของการศึกษานี้พบว่าโครงสร้าง negatively charged ที่ตำแหน่ง 417 และ aromatic ที่ตำแหน่ง 455 รวมทั้งโครงสร้างที่จำเพาะเจาะจงของ asparagine ที่ตำแหน่ง 456 นั้นมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของโปรตีน Cry4Ba

108 หน้า. ISBN 974-04-7842-5

MUTAGENIC ANALYSIS OF LOOP RESIDUES CRITICAL FOR LARVICIDAL ACTIVITY OF THE *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY4BA TOXIN

SARINPORN VISITSATTAPONGSE 4737268 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.,
PANADDA BOONSERM, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D.,
KUSOL POOTANAKIT, Ph.D.

ABSTRACT

Previously, it has been demonstrated that S^{410} and E^{417} in the β_8-β_9 loop, and Y^{455} and N^{456} in the β_{10}-β_{11} loop within domain II are essential in toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba mosquito-larvicidal protein. In this study, double mutations of E^{417} in the β_8-β_9 loop (S410A/E417D, S410A/E417Q, S410A/E417R and S410A/E417Y), Y^{455} in the β_{10}-β_{11} loop (Y455E/N456A, Y455R/N456A, Y455F/N456A and Y455T/N456A) and N^{456} in the β_{10}-β_{11} loop (Y455A/N456D, Y455A/N456Q, Y455A/N456R and Y455A/N456Y) were constructed *via* PCR-based mutagenesis. All double mutant toxins were overexpressed in *Escherichia coli* as a 130-kDa protoxin at levels comparable to the wild-type toxin. Bioassays against *Stegomyia aegypti* mosquito larvae revealed that *E. coli* cells that only express S410A/E417D or Y455F/N456A mutant toxins could retain toxicity of 65% similar to the single mutants (S410A and N456A). When Asn^{456} of the Y455A/N456A mutant was replaced with Gln, Arg, Asp or Tyr, all the mutant toxins exhibited ca. 20% toxicity. Immunohistochemical assays revealed that the S410A/E417D and Y455F/N456A toxins could bind to *S. aegypti* larval midgut section at the apical microvilli of epithelial cells with a signal similar to S410A and N456A template but lower than the wild-type Cry4Ba toxin. However, the Y455A/N456Q toxin showed lower signal compared with the Y455A template and the wild-type toxin. Altogether, the data suggested that a negatively charged residue at position 417, an aromatic residue at position 455 and a specific structure of asparagine at position 456 are essential in larvicidal activity of the Cry4Ba toxin.

KEY WORDS: *BACILLUS THURINGIENSIS*/ CRY4BA TOXIN/
IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSAY/ MUTAGENESIS

108 P. ISBN 974-04-7842-5