

**FUNCTIONAL ELUCIDATION OF DOMAIN III OF
THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN**

PORAMED CHAYARATANASIN

**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
2007**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาหน้าที่ของ DOMAIN III ของโปรตีน Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (FUNCTIONAL ELUCIDATION OF DOMAIN III OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN)

ปรเมษฐ์ นายรัตนศิลป์ 4537105 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชนันท อังสุชนสมบัติ, Ph.D. ชาติชาย กฤตณัย, Ph.D.

GERD KATZENMEIER, Ph.D. กุศล ภูชนกิจ, Ph.D. ปนัดดา บุญเสริม, Ph.D.

บทคัดย่อ

จากงานวิจัยที่ผ่านมาเสนอว่า domain III ของโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สามารถทำหน้าที่ในการรักษาเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน การจับกับโปรตีนตัวรับจำเพาะหรือการควบคุมการไหลผ่านของอออน ในการศึกษานี้โปรตีนกลายพันธุ์ (Y537A, Y543A, Y543R, Y543E, Y543Q, Y543I, R540A, R542A, R542K, R542E และ R542Q) ได้ถูกสร้างขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนซึ่งมีความอนุรักษ์สูงที่อยู่บน $\beta 17$ ใน domain III ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิด Cry4Ba และพบว่าตำแหน่งเหล่านี้มีความสำคัญต่อเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย (*Stegomyia aegypti*) พบว่า positive charge ของ Arg⁵⁴² และความเป็นไฮโดรโฟบิกของ Tyr⁵⁴³ มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง เมื่อศึกษาบทบาทการทำงานโดยใช้เทคนิค surface plasmon resonance พบว่าชิ้นส่วน domain III ที่แยกบริสุทธิ์ได้ซึ่งมีขนาด 21 กิโลดาลตัน สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์จำลองโดยผ่านสองขั้นตอนและมีค่าคงที่ของสมดุลของการแยก (dissociation rate constant) คล้ายกับของโปรตีนเต็มขนาด 65 กิโลดาลตันและพบว่าเมื่อโปรตีนทั้งสองชนิดที่จับกับเยื่อหุ้มเซลล์แล้วจะถูกย่อยโดย proteinase K ได้เพียงบางส่วนแสดงว่าชิ้นส่วน domain III สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ดังกล่าวโดยอาจจะฝังตัวอยู่ใน นอกจากนี้เมื่อศึกษาโดยใช้วิธี immunohistochemistry พบว่าชิ้นส่วน domain III สามารถจับกับส่วนบนสุดของเซลล์บุผิวของกระเพาะลูกน้ำยุงลายได้แม้ในปริมาณที่น้อยกว่าโปรตีนเต็มขนาดแสดงว่า domain III น่าจะเกี่ยวข้องกับการจับกับตัวรับจำเพาะ เมื่อศึกษาเพิ่มเติมพบว่าชิ้นส่วน domain III ไม่สามารถทำให้เกิดการแตกของ liposome หรือการเกิดอออนได้และเมื่อทดสอบความเป็นพิษพบว่าชิ้นส่วน domain III ไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายและเซลล์ยุงลาย (*S. albopictus* C6/36 cells) จากการศึกษาสามารถเสนอได้ว่าชิ้นส่วน domain III ของโปรตีนชนิด Cry4Ba น่าจะมีบทบาทในการรักษาเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน การจับกับเยื่อหุ้มเซลล์จำลองและโปรตีนตัวรับจำเพาะ

FUNCTIONAL ELUCIDATION OF DOMAIN III OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

PORAMED CHAYARATANASIN 4537105 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

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

ABSTRACT

It has been suggested that the C-terminal domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry δ -endotoxins is involved in various functions including structural integrity, receptor binding and ion-channel regulation. In this study, eleven mutants (Y537A, Y543A, Y543R, Y543E, Y543Q, Y543I, R540A, R542A, R542K, R542E, and R542Q) of conserved residues located in β 17 within domain III of the Cry4Ba mosquito-larvicidal toxin were constructed and shown to be critical for structural integrity. Toxicity assays against *Stegomyia aegypti* mosquito larvae suggested that positive charge at Arg⁵⁴² and hydrophobicity at Tyr⁵⁴³ are pivotal for Cry4Ba toxicity. Furthermore, the cloned Cry4Ba-domain III fragment was functionally characterised *via* surface plasmon resonance spectroscopy, demonstrating that the 21-kDa domain III protein tightly binds to the immobilised artificial phospholipid membrane *via* two-step manner with a similar rate of dissociation to that of the full-length Cry4Ba toxin. In the proteinase K protection assays, the membrane-bound form of both proteins was partially resistant to proteinase K digestion. This revealed that the domain III fragment alone was able to associate with and possibly embed itself within the lipid membrane. *In vitro* binding analysis *via* immuno-histochemical assay revealed that the Cry4Ba-domain III protein was able to bind to the apical microvilli of the susceptible *S. aegypti* larval midguts, albeit at lower-binding activity when compared with the 65-kDa full-length active toxin. This demonstrated that the Cry4Ba-domain III protein conceivably participates in toxin-receptor recognition. Unlike the full-length toxin, the Cry4Ba-domain III fragment could not induce leakage of calcein-entrapped liposome or display any ion channel activity on receptor-free phospholipid bilayers, indicating no membrane-destabilising activity. For toxicity assays, the cloned Cry4Ba-domain III protein did not display toxicity against either *S. aegypti* larvae or *S. albopictus* C6/36 cell lines. Altogether, these studies suggest that the cloned Cry4Ba-domain III protein plays a role in maintaining structural integrity, membrane binding, and receptor recognition.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*/ β -SHEET / IMMUNO-HISTOCHEMISTRY / MEMBRANE BINDING/ SURFACE PLASMON RESONANCE

110 P.