

**FUNCTIONAL ANALYSIS OF CONSERVED AROMATIC RESIDUES
IN HELIX 7 CRITICAL FOR LARVICIDAL ACTIVITY OF THE
Bacillus thuringiensis Cry4Ba TOXIN**

KASORN TIEWSIRI

**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

การศึกษาหน้าที่ของกรดอะมิโนโรมาติกที่อนุรักษ์ในเกลียวอัลฟา 7 ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำของ Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (FUNCTIONAL ANALYSIS OF CONSERVED AROMATIC RESIDUES IN HELIX 7 CRITICAL FOR LARVICIDAL ACTIVITY OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN)

เกษร เดียวศิริ 4636654 MBMG/D

ปร.ค. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนันท อังสุรณสมบัติ Ph.D. จำรัส พร้อมมาส Ph.D.

ปนัดดา บุญเสริม Ph.D. ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph.D. กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา Ph.D.

บทคัดย่อ

บทบาทหน้าที่ของเกลียวอัลฟา 7 ซึ่งค่อนข้างอนุรักษ์ (conserved) ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำของ Cry4Ba ยังไม่มีการวินิจฉัยอย่างชัดเจน ในการศึกษากรดอะมิโนโรมาติกที่อนุรักษ์ในเกลียวอัลฟา 7 อันได้แก่ Trp²⁴³, Phe²⁴⁶, Tyr²⁴⁹ และ Phe²⁶⁴ ซึ่งถูกแทนที่ด้วย Ala พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ W243A, Y249A และ F264A นั้นมีฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำของลาย (*Stegomyia aegypti*) ลดลงมาก ซึ่งเมื่อศึกษาเพิ่มเติมของโปรตีนกลายพันธุ์ใน Tyr²⁴⁹ และ Phe²⁶⁴ พบว่าคุณสมบัติความเป็นโรมาติกของทั้งสองกรดอะมิโนนี้ซึ่งวางหันหน้าไปทางเดียวกันในเกลียวอัลฟาที่ 7 นั้นมีความสำคัญต่อฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำอย่างมากเมื่อถูกเปลี่ยนแปลงพร้อมกัน (Y249L/F264L หรือ F264A/Y249A) เมื่อศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้วิธี ATR-FTIR spectroscopy พบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ขนาด 27 กรดอะมิโนที่เหมือนกับเกลียวอัลฟา 7 ซึ่งอยู่ในสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์จำลองที่เป็น DMPC นั้นมีทั้งที่เป็นลักษณะเกลียวอัลฟา (α -helix) และแผ่นเบต้า (β -sheet) แต่เมื่อเปลี่ยนชนิดของเยื่อหุ้มจำลองเป็น DMPG และ DDPC พบว่าเปปไทด์ดังกล่าวมีลักษณะโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นเกลียวอัลฟาและแผ่นเบต้า ตามลำดับ และเมื่อปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างเปปไทด์และเยื่อหุ้มไขมันที่ใช้พบว่า มีการแสดงลักษณะโครงสร้างของชิ้นส่วนเกลียวอัลฟา 7 ที่เป็นระหว่างอัลฟาและเบต้าในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้พบว่าถ้าเป็นลักษณะโครงสร้างเบตานั้นจะมีการฝังตัวลงในเยื่อหุ้มจำลองชนิด DMPC ประมาณ 90% มีค่ามุมเอียงเฉลี่ย 47° แต่ถ้าเป็นลักษณะโครงสร้างเกลียวอัลฟานั้นจะมีการวางตัวเป็นแนวราบขนานกับผิวหน้าของเยื่อหุ้มจำลองพร้อมกับฝังตัวลงในเยื่อหุ้มประมาณ 40% โดยที่กรดอะมิโนโรมาติกทั้ง 2 ซึ่งสำคัญต่อความเป็นพิษนั้นชี้ไปทางเยื่อหุ้มจำลอง โดยผลการทดลองจาก ATR-FTIR นั้นให้ผลสอดคล้องกับการทำ 10-ns MD simulations ของเปปไทด์ดังกล่าวใน DMPC จากผลการทดลองทั้งหมดนี้แนะนำให้ Tyr²⁴⁹ และ Phe²⁶⁴ ในเกลียวอัลฟา 7 นั้นน่าจะมีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์โปรตีนฆ่าลูกน้ำของ Cry4Ba

FUNCTIONAL ANALYSIS OF CONSERVED AROMATIC RESIDUES IN HELIX 7 CRITICAL FOR LARVICIDAL ACTIVITY OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

KASORN TIEWSIRI 4636654 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.,
CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D., PANADDA BOONSERM, Ph.D.,
PRAPON WILAIRAT, Ph.D., KITTISAK YOKTHONGWATTANA, Ph.D.

ABSTRACT

Functional elements of the conserved helix 7 in the pore-forming domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry δ -endotoxins have not yet been clearly identified. In this study, alanine substitutions were initially performed for four highly conserved aromatic residues, Trp²⁴³, Phe²⁴⁶, Tyr²⁴⁹ and Phe²⁶⁴, in helix 7 of the Cry4Ba mosquito-larvicidal protein. Bioassays against *Stegomyia aegypti* mosquito-larvae revealed that only W243A, Y249A and F264A mutant toxins displayed a dramatic decrease in toxicity. Further mutagenic analysis showed that replacements with an aromatic residue particularly at Tyr²⁴⁹ and Phe²⁶⁴ still retained the high-level toxin activity. In addition, a nearly complete loss in larvicidal activity was found for Y249L/F264L or F264A/Y249A double mutants, confirming the involvement in toxicity of both aromatic residues, which face towards the same direction. By using ATR-FTIR, a 27-residue peptide corresponding to Cry4Ba- α 7 in DMPC multibilayers was found to exhibit a mixture of α -helical and β -sheet structures. However, the α 7 peptide incorporated in DMPG and DDPC could adopt predominantly α -helix and β -sheet, respectively. In addition, changes in the peptide-lipid ratio revealed variations in the peptide conformational ratio of α -helix to β -structure. Hydrogen/deuterium exchange suggested that the β -form was approximately 90% insertion into the DMPC lipid membranes, with an average tilt angle of 47°, whilst the α -helical form was placed on the membrane surface with ~40% insertion and both critical aromatic residues pointing towards the membrane. These results are consistent with that of a 10-ns MD simulations of both conformations in the DMPC bilayers. Altogether, the data suggest a potential role of two critical aromatic residues, Tyr²⁴⁹ and Phe²⁶⁴, in the Cry4Ba toxin activity.

KEY WORDS: AROMATICITY/ ATR-FTIR/ *Bacillus thuringiensis*/ δ -ENDOTOXIN, DMPC/ LARVICIDAL ACTIVITY/ MD SIMULATIONS