ROLE OF CYSTEINE ON PROTEIN FOLDING AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE BINARY TOXIN "BINB" FROM *BACILLUS SPHAERICUS*

PATCHARAPORN BOONYOS

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
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาบทบาทของกรดอะมิโน Cysteine ต่อการม้วนพับของโปรตีนและการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงของโปรตีนพิษ “BinB” จาก *Bacillus sphaericus* (ROLE OF CYSTEINE ON PROTEIN FOLDING AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE BINARY TOXIN “BINB” FROM *BACILLUS SPHAERICUS*)

พชรพร บุญยศ 4837259 MBMG/M

วทม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ปนัดดา บุญเสริม, Ph.D., บุญเฮียง พรมดอนกอย, Ph.D., ชาติชาย กฤตนัย, Ph.D.

บทคัดย่อ

Bacillus sphaericus ผลิตผลึกโปรตีนพิษ ซึ่งประกอบด้วย BinB และ BinA ทั้งสองโปรตีนต้องทำงานร่วมกันเพื่อฆ่าลูกน้ำยุง ดังนั้นจึงถูกเรียกว่า “Binary toxin” จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า BinB ทำหน้าที่ในการจับกับ receptor ในขณะที่ BinA จะทำหน้าที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง และพบว่าโปรตีนส่วนที่เป็น active core ของ *B. sphaericus* ทุกสายพันธุ์ มีกรดอะมิโน Cysteine ที่ตำแหน่ง 67 161 และ 241 ดังนั้น จึงทำการศึกษาบทบาทของกรดอะมิโน Cysteine เหล่านี้ต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยใช้วิธี site-directed mutagenesis ในการแทนที่ Cysteine ด้วย Alanine หรือ Serine ซึ่งพบว่าการแทนที่ ณ ตำแหน่ง 67 และ 161 ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงแต่ไม่มีผลกระทบต่อระดับการสร้างโปรตีน และจากผลการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะที่มีและไม่มี reducing agent พบว่าเมื่ออยู่ในรูปละลาย โปรตีนซึ่งถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนดังกล่าว มีรูปแบบการเคลื่อนที่บนเจลคล้ายกับโปรตีนต้นแบบ ในขณะที่โปรตีนที่อยู่ในรูปผลึก มีการเคลื่อนที่ต่างออกไป ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่า การก่อตัวของโปรตีนพิษชนิดนี้อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะ disulfide ภายในโมเลกุลของโปรตีนในระหว่างการเกิดผลึกโปรตีน ผลการวิเคราะห์โครงสร้างโดยรวมของโปรตีนโดยการวิเคราะห์ intrinsic fluorescent spectrum บ่งชี้ว่าโปรตีนกลายพันธุ์ C67S C161A C241A C241S มีโครงสร้างโดยรวมคล้ายคลึงกับโปรตีนต้นแบบ ในขณะที่โปรตีนกลายพันธุ์ C67A C161S ส่งผลต่อสภาพแวดล้อมรอบกรดอะมิโน Tryptophan การวิเคราะห์การจับกันของโปรตีนระหว่าง BinA กับ BinB ด้วยวิธี Dot blot แสดงให้เห็นว่าการที่ C67 และ C161 สูญเสียฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงนั้น อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งเหล่านี้ รบกวนการจับกันระหว่าง BinA และ BinB

115 หน้า.

ROLE OF CYSTEINE ON PROTEIN FOLDING AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE BINARY TOXIN "BINB" FROM *BACILLUS SPHAERICUS*

PATCHARAPORN BOONYOS 4837259 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS : PANADDA BOONSERM, Ph.D., BOONHIANG PROMDONKOY, Ph.D., CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D.

ABSTRACT

Bacillus sphaericus produces toxic crystal proteins which are composed of BinB (51 kDa) and BinA (42 kDa). Both proteins function together to kill mosquito larvae; so called, binary toxin. Recently, the increasing application of *B. sphaericus* in the field has led to cases of resistance. In order to restrict these resistant developments, we need to understand the nature and mode of action of *B. sphaericus* toxins. It has been proposed that BinB is responsible for the regional binding to the specific receptor while BinA is crucial for the toxicity. The active core of BinB contains three Cysteine residues at positions 67, 161, and 241. In order to investigate the role of Cysteine on the function of the binary toxin, Alanine and Serine substitutions were performed. The results showed that Cys67 and Cys161 of BinB were crucial residues for the toxicity, and substitutions of these residues did not affect the expression level. SDS-PAGE analysis of the wild type and mutant proteins with and without a reducing agent showed similar profiles for the solubilized proteins whereas the same analysis showed different results for the inclusion forms. Those results suggested that an intra-molecular disulfide bond may be formed during inclusion formation. Intrinsic fluorescent spectrum analysis indicated that four mutants (C67S, C161A, C241A, and C241S) should have a conformation similar to that of the wild-type protein, while C67A and C161S affect the environment around Tryptophan residues leading to the lower emission intensity compared to the wild-type. The study of interaction between BinA and BinB by dot blot analysis showed that the significant reduction in toxicity of Cys67 and Cys161 BinB mutants might be due to the reduction in the interaction to BinA. This result suggests that Cys67 and Cys161 are the crucial residues for inter-molecular interaction between BinA and BinB.

KEY WORDS : *BACILLUS SPHAERICUS* / BINARY TOXIN / CYSTEINE / DISULFIDE BOND / TOXICITY

115 pp.