# FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF CONSERVED HYDROPHOBIC RESIDUES IN HELIX 5 OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

**WARAT WISESWONG**

**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**
**2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

การศึกษาหน้าที่ของกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกที่อนุรักษ์ในเกลียวอัลฟา 5 ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF CONSERVED HYDROPHOBIC RESIDUES IN HELIX 5 OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN)

วรัตถ์ วิเศษวงษ์ 4837273 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนันท์ อังศุธนสมบัติ Ph.D. อิศรา สระมาลา Ph.D. ปนัดดา บุญเสริม Ph.D. กุศล ภูธนกิจ Ph.D.

## บทคัดย่อ

หน้าที่ของกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกซึ่งค่อนข้างอนุรักษ์ (conserved) ในเกลียวอัลฟา 5 ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba ยังไม่มีการวินิจฉัยอย่างชัดเจน ในการศึกษานี้ กรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกอนุรักษ์ในเกลียวอัลฟา 5 อันได้แก่ $Leu^{174}$ $Leu^{175}$ $Leu^{186}$ $Leu^{188}$ และ $Ile^{189}$ โดยการแทนที่ด้วย Serine โดยการเปลี่ยนแปลงยีนด้วยเทคนิค PCR โปรตีนกลายพันธุ์ทั้งหมดซึ่งมีขนาด 130 kDa ได้ถูกสร้างในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่ระดับปริมาณที่แตกต่างจากระดับปริมาณของ wild type และเมื่อทดสอบพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ L186S เท่านั้นที่มีฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) ลดลงอย่างชัดเจน นอกจากนั้น โปรตีนกลายพันธุ์ L186S ยังสูญเสียความสามารถในการละลายในคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.0 ทำให้ไม่สามารถทำการศึกษาในขั้นต่อไปได้ ผลการทดลองทั้งหมดนี้ชี้แนะว่า $Leu^{186}$ นั้นน่าจะมีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba และเกี่ยวข้องกับเสถียรภาพเชิงโครงสร้าง แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาต่อเนื่องไปอีกเพื่อที่จะสามารถระบุถึงหน้าที่ที่ชัดเจนของกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกนี้ได้

59 หน้า

Copyright by Mahidol University

FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF CONSERVED HYDROPHOBIC RESIDUES IN HELIX 5 OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

WARAT WISESWONG 4837273 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.,
ISSARA SRAMALA, Ph.D., PANADDA BOONSERM, Ph.D.,
KUSOL POOTANAKIT, Ph.D.

ABSTRACT

Roles of the highly-conserved hydrophobic residues in the helix 5 of the pore-forming domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry δ-endotoxins have not yet been identified. In this study, serine substitutions were performed *via* PCR-based mutagenesis for five highly-conserved hydrophobic residues, $Leu^{174}$ $Leu^{175}$ $Leu^{186}$ $Leu^{188}$ and $Ile^{189}$, in helix 5 of the Cry4Ba mosquito-larvicidal protein. All mutant toxins were overexpressed in *Escherichia coli* as 130-kDa protoxins at relatively similar levels when compared with the wild-type toxin. However, larvicidal activity assays against *Aedes aegypti* mosquito-larvae revealed that only the L186S mutant displayed a large decrease in toxicity. The L186S mutant also lost the ability to solubilize in a carbonate buffer, pH 9.0, preventing further experiments to be performed. Altogether, the data suggest a potential role for this hydrophobic residue ($Leu^{186}$) in the Cry4Ba toxin activity and structural integrity. However, further experimentation is required in order to identify the exact roles of this critical residue.

KEY WORDS: HYDROPHOBIC/ *Bacillus thuringiensis*/ δ-ENDOTOXIN/ LARVICIDAL ACTIVITY/

59 pp.

Copyright by Mahidol University