# CHARACTERISATION OF RESIDUES STABILISING β2-β3 AND β4-β5 HAIRPINS CRITICAL FOR TOXICITY OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

**BENYAPAT PURIPUNPINYO**

**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

การศึกษาคุณลักษณะของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับเสถียรภาพโครงสร้างของ β2-β3 และ β4-β5 hairpins ซึ่งมีความสำคัญต่อความเป็นพิษของโปรตีน Cry4Ba
(CHARACTERISATION OF RESIDUES STABILISING β2-β3 AND β4-β5 HAIRPINS CRITICAL FOR TOXICITY OF THE Bacillus thuringiensis Cry4Ba TOXIN)

เบญญาพัตร์ ภูริพันธุ์ภิญโญ 4937173 MBMG/M

วท.ม (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนันท์ อังศุธนสมบัติ Ph.D., ALBERT KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., สมภพ ลีตะชีวะ Ph.D.

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของกรดอะมิโนชนิดวงแหวนที่จับกันเป็นกลุ่ม (cluster) ในส่วนของ domain II ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba เทคนิค PCR ได้ถูกนำมาใช้ในการเปลี่ยนแปลงยีนเฉพาะที่ (site-directed mutagenesis) ณ ตำแหน่ง $Phe^{326}$ ใน β2 และ $His^{370}$ ใน β5, $Phe^{326}$ ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนแบบ aliphatic ขนาดเล็กและใหญ่ (alanine และ leucine ตามลำดับ) กรดอะมิโนวงแหวนที่มีขั้วและที่มีขนาดใหญ่ (tyrosine และ tryptophan ตามลำดับ) ส่วน $His^{370}$ ถูกแทนที่ด้วย alanine เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกลายพันธุ์ดังกล่าว พบว่า โปรตีนกลายพันธุ์ทุกชนิดยังคงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงเสมือนกับโปรตีนต้นแบบ (wild type) นอกจากนี้เมื่อได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการแทนที่ทั้ง $Phe^{326}$ และ $His^{370}$ ด้วยกรดอะมิโนแบบมีขั้วแต่ไม่มีประจุ (glutamine) และด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวกและประจุลบ (arginine และ glutamate ตามลำดับ) รวมถึงการแทนที่ $His^{370}$ ด้วยกรดอะมิโนแบบ aliphatic ขนาดใหญ่ (leucine) ซึ่งเมื่อนำโปรตีนกลายพันธุ์มาทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงพบว่า เฉพาะการแทนที่ $Phe^{326}$ ด้วย arginine และ glutamate นั้นทำให้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba สูญเสียความเป็นพิษจนเกือบหมด จากผลการศึกษานี้จึงเสนอว่า คุณสมบัติของความเป็น hydrophobic ของ $Phe^{326}$ มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของโปรตีน Cry4Ba โดยอาจมีส่วนร่วมต่อการสร้างแรงยึดเหนี่ยวแบบ hydrophobic ระหว่างตำแหน่ง 326 นี้กับกรดอะมิโนแวดล้อมอื่นๆที่อยู่ด้านในโครงสร้างเพื่อคงโครงสร้างของ β2-β3 และ β4-β5 hairpins ของ domain II ในขณะที่ ความเป็น hydrophobic ของ $His^{370}$ แสดงความสำคัญต่อความเป็นพิษของโปรตีน Cry4Ba น้อยกว่า เมื่อเทียบกับ $Phe^{326}$

115 หน้า

Copyright by Mahidol University

CHARACTERISATION OF RESIDUES STABILISING β2-β3 AND β4-β5 HAIRPINS CRITICAL FOR TOXICITY OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

BENYAPAT PURIPUNPINYO 4937173 MBMG/M

M.Sc.(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., ALBERT KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., SOMPHOB LEETACHEWA, Ph.D.

ABSTRACT

The aim of this study was to study the structure-function relationship of a ring amino acid cluster in the core of domain II of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. PCR-based mutagenesis was performed to investigate the role of $Phe^{326}$ in β2 and $His^{370}$ in β5 of the Cry4Ba toxin. Replacement of $Phe^{326}$ with aliphatic hydrophobic (alanine and leucine) or aromatic (tyrosine and tryptophan) side chains and $His^{370}$ with alanine were initially performed. All mutants were able to over-express the 130-kDa protoxin as an inclusion body in *Escherichia coli* upon IPTG at a level comparable to the wild type. Similar to the wild type, *E. coli* cells expressing mutant protoxins were toxic to *Aedes aegypti* mosquito larvae. Further replacements were performed with polar uncharged (glutamine), positively or negatively charged (arginine or glutamine) side chains for $Phe^{326}$, and leucine for $His^{370}$. Only *E. coli* cells expressing charge replacement mutants almost abolished larvicidal activity. The data suggest that hydrophobicity at $Phe^{326}$ was essential for the larvicidal activity of Cry4Ba, possibly participating in hydrophobic interaction with surrounding residues inside the core of domain II of Cry4Ba structure, stabilizing β2-β3 and β4-β5 hairpins that are critical for Cry4Ba toxicity. The hydrophobicity of $His^{370}$ plays a smaller role in the Cry4Ba toxicity than $Phe^{326}$.

KEY WORDS: AROMATICITY/ *Bacillus thuringiensis*/ Cry4Ba/ HYDROPHOBIC INTERACTION/ LARVICIDAL ACTIVITY

115 pp.

Copyright by Mahidol University