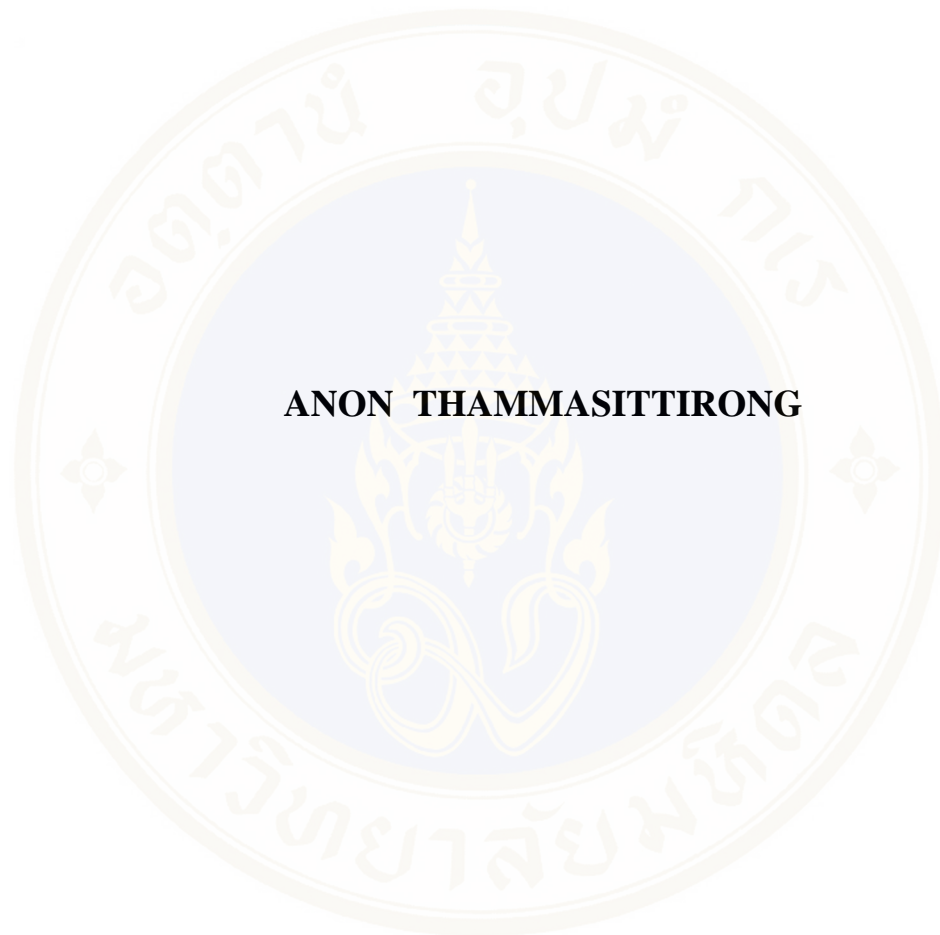


**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
Cry4Ba TOXIN-RECEPTOR INTERACTIONS**



ANON THAMMASITTIRONG

**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
2011**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF Cry4Ba TOXIN-RECEPTOR INTERACTIONS

ANON THAMMASITTIRONG 5137028 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.,
KUSOL POOTANAKIT, Ph.D., CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis Cry4Ba toxin is highly toxic against *Aedes aegypti* larvae. This toxin contains three different structural domains which function together to exert the larvicidal activity. In this work, functions of Pro³⁸⁹, Asn³⁹¹, and Arg³⁹² on the β_6 - β_7 loop and Pro⁴¹⁴ and Pro⁴¹⁶ on the β_8 - β_9 loop of Cry4Ba-domain II were studied with an emphasis on their involvement in toxicity and receptor binding. These residues were individually substituted with other functional side-chain residues using PCR-based site-specific mutagenesis. Bioassay results against *A. aegypti* larvae revealed that these residues were involved in the toxicity of Cry4Ba toxin. The toxicity also showed correlation with the rigidity property of the β_6 - β_7 loop. It was proposed that Pro³⁸⁹ functions in providing the rigidity to the β_6 - β_7 loop which may be required for the binding of adjacent residues (Asn³⁹¹, Arg³⁹²) to insect midgut receptor (s). In contrast to Pro³⁸⁹, Pro⁴¹⁴ and Pro⁴¹⁶ on the β_8 - β_9 loop may form a structural conserved sequence (PxP, x is any amino acid) suitable for binding to the receptor. Glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase (GPI-ALP) from the epithelial membrane of *A. aegypti* larval midgut, which has been reported as a Cry4Ba toxin receptor, was subcloned into pET-17b expression vector. The recombinant plasmids, pET-Aa-mALP, containing truncated Aa-mALP (without signal sequence and GPI signal) with additional C-terminal in-frame 6-His codons, were transformed into *Escherichia coli* BL21. The size of the expressed Aa-mALP on SDS-PAGE was 54 kDa, which is similar to the expected size for non-glycosylated Aa-mALP. The Aa-mALP was purified using the Ni-NTA affinity column. The refolded-ALP showed binding to the 65-kDa activated Cry4Ba toxin under non-denaturing (dot blot) conditions. Quantitative binding assay via Quartz Crystal Microbalance (QCM) revealed that the immobilized ALP was bound by Cry4Ba in a stoichiometry of about 1:2.4 with high affinity (dissociation constant [Kd] of ~14 nM). QCM analysis also revealed that Cry4Ba mutants (P389A, P389G, P414G, P416G, P414A/P416A, P389A/P414A/P416A, P414A/P416A/E417A) bound to immobilized Aa-mALP with a similar binding affinity level compared with that of wild-type Cry4Ba protein. Altogether, the results from this study suggest that Pro³⁸⁹ on the β_6 - β_7 loop, and Pro⁴¹⁴ and Pro⁴¹⁶ on the β_8 - β_9 loop of Cry4Ba-domain II are involved in toxicity with different functions, and the binding of the Cry4Ba toxin to the expressed Aa-mALP receptor may not rely only on these residues.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis* / MEMBRANE-BOUND ALKALINE PHOSPHATASE /
QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE/ TOXIN-RECEPTOR INTERACTIONS/
Cry4Ba Toxin

190 pages

การศึกษาที่ระดับโมเลกุลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนสารพิษ Cry4Ba และโปรตีน receptor
MOLECULAR CHARACTERIZATION OF Cry4Ba TOXIN-RECEPTOR INTERACTIONS

อานนท์ ธรรมสิทธิ์รงค์ 5137028 MBMG/D

ปร.ด. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ชนนท์ อังศุณสมมติ, Ph.D., กุศล ภูชนกิจ, Ph.D., จำรัส พร้อมมาศ, Ph.D.,
ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษ Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ *israelensis* ประกอบด้วย 3 โดเมนทำหน้าที่ร่วมกันในการสร้างความเป็นพิษต่อตัวอ่อนของลูกน้ำยุง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหน้าที่ของกรดอะมิโน Pro³⁸⁹ Asn³⁹¹ Arg³⁹² บน β_6 - β_7 loop และ Pro⁴¹⁴ Pro⁴¹⁶ บน β_8 - β_9 loop ในโดเมนที่ 2 โดยเน้นที่ความเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษและการจับกับโปรตีน receptor โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงยีนด้วยเทคนิค PCR จากผลทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงหลายพบว่ากรดอะมิโนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของ Cry4Ba โดยคาดว่า Pro³⁸⁹ ทำหน้าที่ในการช่วยเพิ่มความแข็งแรงของโครงสร้างบริเวณ β_6 - β_7 loop ซึ่งอาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการจับกันของกรดอะมิโนใกล้เคียงคือ Asn³⁹¹ และ Arg³⁹² กับโปรตีน receptor ในขณะที่ Pro⁴¹⁴ และ Pro⁴¹⁶ บน β_8 - β_9 loop มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนแบบ Pxx (x คือกรดอะมิโนใดๆ) ซึ่งอาจมีความเหมาะสมในการจับตัวกับโปรตีน receptor โดยตรง นอกจากนี้ในการศึกษาวิจัยนี้ได้โคลนชิ้นยีนเก็บรหัสสำหรับโปรตีน alkaline phosphatase (Aa-mALP) ซึ่งยีนดังกล่าวผ่านการโคลนมาจากเชื้อแบคทีเรียอาหารของลูกน้ำยุงและคาดว่าทำหน้าที่เป็นโปรตีน receptor ของ Cry4Ba โดยได้ตัดส่วนนิวคลีโอไทด์ที่เก็บรหัสสำหรับ signal sequence และ GPI-signal ออกและเพิ่มลำดับสำหรับกรดอะมิโนฮิสติดีน จำนวน 6 กรดอะมิโนทางปลาย 3' และเชื่อมต่อขึ้นขึ้นเข้ากับพลาสมิด pET-17b แล้วจึงชักนำให้แสดงออกใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน Aa-mALP ขนาด 54-kDa ซึ่งตรงกับขนาดที่คาดไว้สำหรับ Aa-mALP ที่ไม่มีการเติมหมู่ น้ำตาล (glycosylation) จากนั้นจึงแยกโปรตีนชนิดนี้ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Ni-NTA ผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของ Cry4Ba และ Aa-mALP ด้วยเทคนิค Dot blot พบว่าสามารถจับกันได้ ในสภาพแวดล้อมที่ไม่ทำลายโปรตีน (non-denaturing condition) และจากการศึกษาในเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Quartz Crystal Microbalance พบว่าโปรตีนสารพิษ Cry4Ba จับกับ Aa-mALP ได้ อย่างดี (high affinity) ด้วยค่า $K_d \sim 14$ nM ในอัตราส่วนประมาณ 2.4:1 และพบว่าโปรตีนสารพิษที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนชนิด P389A P389G P414G P416G P414A/P416A P389A/P414A/P416A และ P414A/P416A/E417A มีความสามารถในการจับกับโปรตีน receptor ในระดับเดียวกันกับ Cry4Ba จากผลการทดลองจึงคาดการณ์ว่า Pro³⁸⁹ Pro⁴¹⁴ และ Pro⁴¹⁶ มีความสำคัญต่อความเป็นพิษของ Cry4Ba โดยมีหน้าที่ที่แตกต่างกันและ Cry4Ba อาจใช้ส่วนกรดอะมิโนอื่น ๆ ในโดเมน 2 หรือ 3 ร่วมกันในการจับกับโปรตีน Aa-mALP