FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CHARGED RESIDUES IN THE β10-β11 RECEPTOR-BINDING LOOP OF *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa AND Cry4Ba TOXINS

SARINPORN VISITSATTAPONGSE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2014

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CHARGED RESIDUES IN THE β10-β11 RECEPTOR-BINDING LOOP OF *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa AND Cry4Ba TOXINS

SARINPORN VISITSATTAPONGSE 5037437 MTMT/D

Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D., SOMPHOB LEETACHEWA, Ph.D., CHALERMPOL KANCHANAWARIN, Ph.D.

ABSTRACT

Cry4Aa and Cry4Ba, two closely related mosquito-active toxins produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* during sporulation, are highly specific to different target mosquito-larvae, according to high dissimilarity between their receptor-binding domain (II). Single-alanine substitutions of five amino-acid residues within the β10-β11 loop of Cry4Aa-domain II revealed that only Lys^{514} is required for Cry4Aa toxicity against *Culex* larvae. Opposite to that of Cry4Aa, the β10-β11 loop of Cry4Ba which is less toxic to *Culex* larvae contains a negative residue–Asp^{454}. Target specificity analysis *via* charge reversal mutagenesis of the Cry4Ba-Asp^{454} revealed that D454K and D454R substitutions can introduce *Culex* toxicity to the Cry4Ba toxin, although D454A mutation showed no effect on toxicity against *Culex* larvae. Consistent with data from bioassays, *in situ* binding analysis *via* immunohistochemical assay displayed that both D454K and D454R mutants, but not the D454A mutant, showed a significant increase in binding to *Culex*-larval gut membrane. These data suggest that charge within the β10-β11 loop is a determinant for different *Culex* toxicity between Cry4Ba and Cry4Aa toxins, thus suggesting that both toxins bind to *Culex* receptor through ionic interactions.

KEY WORDS: LARVICIDAL ACTIVITY/RECEPTOR-BINDING LOOP/ CHARGE-REVERSAL MUTATION/Cry4Aa/Cry4Ba

130 pages

Copyright by Mahidol University

การศึกษาเชิงหน้าที่ของกรดอะมิโนชนิดที่มีขั้วในส่วนเชื่อมต่อ เบต้าที่ 10 และ 11 โปรตีนสารพิษ Cry4Aa และ Cry4Ba จาก *Bacillus thuringiensis*

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CHARGED RESIDUES IN THE β10-β11 RECEPTOR-BINDING LOOP OF *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa AND Cry4Ba TOXINS

สรินพร วิสิฐสัทธาพงศ์ 5037437 MTMT/D

ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., จำรัส พร้อมมาศ, Ph.D., สมภพ ลีตะชีวะ, Ph.D., เฉลิมพล กาญจนวรินทร์, Ph.D.

บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษฆ่าลูกน้ำยุง ชนิด Cry4Aa และ Cry4Ba จากแบคทีเรียชนิด *Bacillus thuringiensis* มีความจำเพาะต่อลูกน้ำยุงที่แตกต่างกัน อันเป็นผลมาจากความแตกต่างทางโครงสร้างในส่วนบริเวณที่ 2 (Receptor-binding domain) ของโปรตีนสารพิษทั้งสองชนิดนี้ การศึกษาด้วยการแทนที่กรดอะมิโนในส่วนเชื่อมต่อเบต้าที่ 10 และ 11 ในบริเวณส่วนที่ 2 ของโปรตีน Cry4Aa ด้วย alanine พบว่าเฉพาะโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด K514A ที่สูญเสียความเป็นขั้วบวกเท่านั้นที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง *Culex quinquefasciatus* ลดลง เป็นที่น่าสังเกตว่าในทางตรงกันข้าม โปรตีน Cry4Ba ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยต่อลูกน้ำยุง *C. quinquefasciatus* นั้นมีกรดอะมิโนที่มีความเป็นขั้วลบ (Asp^{454}) ในส่วนเชื่อมต่อเบต้า 10 และ 11 และจากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ D454R และ D454K ของโปรตีน Cry4Ba มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง *C. quinquefasciatus* เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนกลายพันธุ์ D454A นอกจากนี้ผลจากการทดลองด้วยวิธี immune-histochemistry แสดงให้เห็นว่า เฉพาะโปรตีนกลายพันธ์ชนิด D454R และ D454K เท่านั้นที่สามารถจับกับส่วนบนสุดของเซลล์บุผิวของกระเพาะลูกน้ำยุง *C. quinquefasciatus* ได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นกว่าเดิม จากผลทดลองในครั้งนี้จึงได้เสนอว่าชนิดของความเป็นขั้วที่ตรงกันข้ามของส่วนเชื่อมต่อเบต้า ที่10 และ 11 ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิดนี้มีผลต่อความจำเพาะในการฆ่าลูกน้ำยุงชนิด *C. quinquefasciatus*

Copyright by Mahidol University

130 หน้า