



- 8 SEP 2000

**INVESTIGATING THE ROLE OF THE PUTATIVE DISULPHIDE
BOND WITHIN THE LOOP CONNECTING α 4 AND α 5 OF THE
Bacillus thuringiensis Cry4A TOXIN**

WALAIRAT PORNWIROON



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MOLECU LR GENETICS and GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-664-423-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
W1611
8000

45283 c.2

Copyright by Mahidol University

4136316 MBMG/M : MAJOR: MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING; M.Sc (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
KEY WORDS : DELTA-ENDOTOXIN, Cry4A, *Bacillus thuringiensis*, DISULPHIDE BOND

WALAIRAT PORNWIROON: INVESTIGATING THE ROLE OF THE PUTATIVE DISULPHIDE BOND WITHIN THE LOOP CONNECTING $\alpha 4$ AND $\alpha 5$ OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4A TOXIN. THESIS ADVISORS: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D. 116 p. ISBN 974-664-423-8

A 3D model of the activated 65-kDa *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin reveals a putative disulphide bond in the loop connecting helices 4 and 5 that may play a role in function of the toxin. In this study, the recombinant plasmid harboring the *cry4A* gene under control of the *tac* promoter together with the *cry4B* regulatory region was constructed and expressed in *Escherichia coli*. Upon solubilization and trypsin digestion, the 130-kDa Cry4A protein was processed into a 47-kDa polypeptide and a ca. 20-kDa fragment composed of $\alpha 1$ - $\alpha 5$. SDS-PAGE showed that the 20-kDa fragment treated with β -mercaptoethanol had mobility slower than the untreated protein, indicating the existence of the C192-C199 disulphide bond within the loop connecting $\alpha 4$ and $\alpha 5$ of the Cry4A toxin. To investigate the role in toxicity of this disulphide bond, site-directed mutagenesis was employed to convert either Cys-192 or Cys-199 to alanine in order to eliminate the disulphide bond. Like the wild-type protein, the non-disulphide bridged mutants were highly expressed as inclusion bodies and were structurally stable upon solubilization and trypsin activation. Gel-shift assays have confirmed disappearance of the pre-existent disulphide bond. The larvicidal activity against *Aedes aegypti* of *E. coli* cells expressing either C192A or C199A mutant toxin has approximately the same as the wild-type toxin. Interestingly, the larvicidal activity of the wild-type inclusions were apparently at least 2-fold more toxic than both mutant inclusions, thus suggesting that the disulphide bond within the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop might indeed be involved in the Cry4A toxin mechanism.

4136316 MBMG/M : สาขาวิชา: อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์: วท.ม.
(อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

วไลรัตน์ พรวิรุฬห์: การศึกษาบทบาทความสำคัญของพันธะไดซัลไฟด์ที่คาดว่าเชื่อมต่อกัน
เกลียวอัลฟาที่ 4 และ 5 ของโปรตีนสารพิษ Cry4A จาก *Bacillus thuringiensis*
(INVESTIGATING THE ROLE OF THE PUTATIVE DISULPHIDE BOND WITHIN THE LOOP CONNECTING α 4 AND α 5 OF THE *Bacillus thuringiensis*
Cry4A TOXIN) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชันน์ อังสุชนสมบัติ, Ph.D., ชาติชาย กฤต
นัย, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D. 116 หน้า. ISBN 974-664-423-8

โครงสร้างแบบจำลอง 3 มิติในเฉพาะส่วนที่ออกฤทธิ์ได้ขนาด 65 กิโลดาลตัน ของโปรตีน
สารพิษ Cry4A แสดงให้เห็นถึงพันธะไดซัลไฟด์ที่คาดว่าอยู่ในส่วนที่เชื่อมต่อกันระหว่างเกลียวอัลฟา
ที่ 4 และ 5 ซึ่งอาจจะมึบทบาทต่อหน้าที่ของโปรตีนสารพิษ ในการศึกษา นี้ พลาสมิดลูกผสมซึ่งมียีน
cry4A ภายใต้การควบคุมของ *tac* promoter และส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน *cry4B* ได้ถูก
สร้างขึ้นและแสดงออกใน *Escherichia coli* จากการละลายและการตัดด้วยเอนไซม์ trypsin
พบว่า โปรตีนสารพิษ Cry4A ขนาด 130 กิโลดาลตัน ถูกตัดย่อยเป็นชิ้นโปรตีนขนาด 47 และ
ประมาณ 20 กิโลดาลตัน ซึ่งชิ้นส่วนเล็กประกอบด้วยเกลียวอัลฟาที่ 1 ถึงเกลียวอัลฟาที่ 5 จากการ
วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าในสภาวะที่มี β -mercaptoethanol นั้น ชิ้นโปรตีนขนาด 20 กิโลดาลตัน
จะเคลื่อนที่ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่มี β -mercaptoethanol ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการ
มีอยู่ของพันธะไดซัลไฟด์ระหว่าง cysteine ตำแหน่งที่ 192 และตำแหน่งที่ 199 ในส่วนที่เชื่อมต่อกัน
ระหว่างเกลียวอัลฟาที่ 4 และ 5 จากการอาศัยเทคนิคการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงยีนเฉพาะที่
เพื่อศึกษาบทบาทต่อความเป็นพิษของพันธะไดซัลไฟด์ดังกล่าวนี้ ได้เปลี่ยนแปลง cysteine
ตำแหน่งที่ 192 และที่ 199 ไปเป็น alanine ซึ่งเมื่อได้แสดงออกใน *E. coli* พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้ง
2 ชนิดถูกสร้างในรูปของก้อนผลึกโปรตีนเหมือนกับโปรตีนต้นแบบ (wild type) และให้ชิ้นส่วน
โปรตีนที่เสถียรเมื่อถูกละลายและตัดด้วยเอนไซม์ trypsin นอกจากนี้ผลของการตรวจสอบด้วย
วิธี gel-shift ยังยืนยันการหายไปของพันธะไดซัลไฟด์อีกด้วย และเมื่อทดสอบความสามารถใน
การฆ่าลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* โดยใช้ *E. coli* ที่สร้างโปรตีนกลายพันธุ์แต่ละชนิดพบว่า
โปรตีนกลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดสามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ใกล้เคียงกับโปรตีนต้นแบบ แต่เมื่อทดสอบความ
สามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงด้วยก้อนผลึกโปรตีน พบว่าโปรตีนต้นแบบสามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้มาก
กว่าโปรตีนกลายพันธุ์อย่างน้อยประมาณ 2 เท่า ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า พันธะไดซัลไฟด์น่าจะ
จะมีบทบาทในกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษ Cry4A