- 6 AUG 2001

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

MUTAGENESIS OF α4-α5 LOOP RESIDUES IN DOMAIN I OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4B TOXIN

YODSOI KANINTRONKUL

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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
2001

ISBN 974-665-989-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
Y54m
2001
C.2

Copyright by Mahidol University

4237016 MBMG/M : MAJOR: MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING; M.Sc (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
KEY WORDS : DELTA-ENDOTOXIN, *Bacillus thuringiensis*, PORE-FORMATION, MUTAGENESIS, INTERHELICAL LOOP

YODSOI KANINTRONKUL: MUTAGENESIS OF α4-α5 LOOP RESIDUES IN DOMAIN I OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4B TOXIN
THESIS ADVISOR: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D. 184 p. ISBN 974-665-989-8

The proposed mode of action of *Bacillus thuringiensis* (Bt) delta-endotoxins is the formation of lytic pores in the susceptible larval midgut epithelium. Recently, the requirement of the loop for efficient membrane insertion of the Bt α4-α5 hairpin has been reported. Site-directed mutagenesis was employed to identify a critical loop residue for larvicidal activity of the 130-kDa Cry4B toxin. Substitutions of one charged amino acid (Glu-171) and two polar residues (Asn-166 and Tyr-170) in the α4-α5 loop with different amino acids were performed. Much the same as the wild-type Cry4B toxin, all mutant toxins expressed in *Escherichia coli* as cytoplasmic inclusions were structurally stable upon solubilisation and trypsin activation. *E.coli* cells expressing each mutant toxin were bioassayed against *Aedes aegypti* mosquito-larvae. Alanine substitutions of Asn-166 and Tyr-170 almost completely abolished larvicidal activity, while replacing Glu-171 with alanine showed a small reduction in toxicity. In addition, substitutions of Asn-166 with Asp, Arg, Gln, Tyr or Cys did not affect the toxicity while complete loss of biological activity was observed for the substitution of Asn-166 with Ile. Substitutions of Tyr-170 with Asp, Arg or Leu also abolished toxicity while conversion to Trp or Phe seemed to have no or little effect on larvicidal activity. Moreover, replacements of Glu-171 with Lys or Asp drastically decreased toxicity while the replacement with Gln could restore toxicity to the wild type level. These results revealed that Asn-166, Tyr-170 and Glu-171 located within the loop linking α4 and α5 play a crucial role in larvicidal activity of Cry4B toxin, especially polarity at position 166 and aromaticity at position 170.

Copyright by Mahidol University

4237016 MBMG/M: สาขาวิชา: อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์: วท.ม (อณูพันธุศาสตร์ และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

ยอดสร้อย คณินธรกุล: การศึกษาการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนเชื่อมต่อระหว่างเกลียวอัลฟาที่ 4 และอัลฟาที่ 5 ของโปรตีนสารพิษ Cry4B จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (MUTAGENESIS OF α4-α5 LOOP RESIDUES IN DOMAIN I OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4B TOXIN) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., ชาติชาย กฤตนัย, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D. 184 หน้า
ISBN 974-665-989-8

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษากรดอะมิโนในส่วนเชื่อมต่อระหว่างเกลียวอัลฟาที่ 4 และเกลียวอัลฟาที่ 5 ที่มีผลต่อฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายของโปรตีนสารพิษ 130-kDa Cry4B จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* โดยได้เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในส่วนเชื่อมต่อระหว่างเกลียวดังกล่าว โดยที่ กรดอะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ asparagine ที่ตำแหน่ง 166 tyrosine ที่ตำแหน่ง 170 และ glutamate ที่ตำแหน่ง 171 ได้ถูกเปลี่ยนเป็น alanine และกรดอะมิโนอื่นๆ โดยอาศัยวิธีการเปลี่ยนแปลงยีนเฉพาะที่ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ซึ่งได้สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ที่ถูกออกแบบตามแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนสารพิษ Cry4B รวม 17 ชนิด ได้แก่ N166A, N166D, N166Q, N166R, A166C, N166I, N166Y ซึ่งได้เปลี่ยน asparagine ที่ตำแหน่ง166 เป็น alanine, aspartate, glutamine, arginine, cystein, isoleucine และ tyrosine ตามลำดับ และ Y170A, Y170D, Y170R, Y170F, Y170W และ Y170L ซึ่งได้เปลี่ยน tyrosine ที่ตำแหน่ง 170 เป็น alanine, aspartate, arginine, phenylalanine, tryptophan และ leucine ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังได้สร้างโปรตีนกลายพันธุ์อีก 4 ชนิด ได้แก่ E171A, E171K, K171D และ E171Q โดยได้เปลี่ยน glutamate ที่ตำแหน่ง 171 เป็น alanine, lysine, aspartate และ glutamine เมื่อได้แสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* พบว่า โปรตีนกลายพันธุ์ทั้ง 17 ชนิด ได้ถูกสร้างในรูปก้อนผลึก และยังมีความสามารถในการละลายในสารละลายคาร์บอเนต และให้รูปแบบผลจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ทริปซินเหมือนกับโปรตีนต้นแบบ นอกจากนี้เมื่อทดสอบผลจากฆ่าลูกน้ำยุงลาย พบว่าเมื่อแทนที่ asparagine ที่ตำแหน่ง 166 ด้วย กรดอะมิโนที่มีขั้วเช่น aspartate, glutamine, arginine, cystein และ tyrosine จะยังคงมีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายเท่ากับโปรตีนต้นแบบ และการแทนที่ tyrosine ที่ตำแหน่ง 170 ด้วยกรดอะมิโนที่มีโครงสร้าง aromatic ได้แก่ phenylalanine และ tryptophan ไม่มีผลกระทบต่อฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย ในขณะที่โปรตีนกลายพันธุ์ชนิดอื่นสูญเสียความสามารถในการฆ่าลูกน้ำโดยสิ้นเชิง นอกจากนี้เมื่อแทนที่ glutamate ที่ตำแหน่ง 171 ด้วย lysine และ aspartate จะทำให้ฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำลดลง ขณะที่เมื่อแทนที่ด้วย glutamine จะมีฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำสูงขึ้นเหมือนเดิม ผลงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่า asparagine-166, tyrosine-170 และ glutamate-171 ซึ่งอยู่ในส่วนเชื่อมต่อระหว่างเกลียว อัลฟาที่ 4 และ 5 นั้นสำคัญต่อฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งความมีขั้วที่ตำแหน่ง 166, โครงสร้าง aromatic ที่ตำแหน่ง 170.

Copyright by Mahidol University