

**FUNCTIONAL STUDY OF AMINO ACIDS AT N-AND C-TERMINI OF
CYT2Aa2 TOXIN****SIRIYA THAMMACHAT 4837245 MBMG/D****Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)****THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D.,
BOONHIANG PROMDONKOY, Ph.D., PANADDA BOONSERM, Ph.D., GERD
KATZENMEIER, Ph.D.****ABSTRACT**

Cyt2Aa2 is a 29 kDa cytolytic protein produced by *Bacillus thuringiensis* supsp. *darmstadiensis* during the sporulation stage. This protein exerts lethal activity against mosquito larvae *in vivo* and broad-range activity *in vitro*. To become a 25 kDa active toxin, a proteolytic processing of N-and C-termini is required. This study aims to investigate a functional role of amino acids on the N-terminus (position 1-40) and the C-terminus (position 229-259) of Cyt2Aa2. A number of mutant toxins with destabilizing interactions between these two terminal fragments or two monomers were generated and analyzed in comparison with the wild-type Cyt2Aa2. Results show that substitution by alanine at positions R25, P27, and I31, and by leucine at position D39 and the deletion of 22 amino acids at the C-terminus (N238-N259) did not affect the structure and function of the toxin. On the other hand, alanine substitution at L33, N230, and I233 affected protein conformation and toxicity. C-terminal truncation from S229 and I233 dramatically reduced protein production and toxicity and affected the tertiary structure of Cyt2Aa2. Results suggest that amino acids located at β 1 on the N-terminus and α F on the C-terminus play important roles during structural folding, dimerization, and inclusion formation. Amino acid replacement and deletion of these regions could lead to protein misfolding which causes an inability in the protein to maintain its biological activities.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis* / MUTAGENESIS/ AMINO ACID/
Cyt2Aa2/ MOSQUITO LARVICIDAL TOXICITY

94 pages

การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของกรดอะมิโนบนปลายด้านหมู่อะมิโนและด้านหมู่คาร์บอกซีของ
โปรตีน Cyt2Aa2

FUNCTIONAL STUDY OF AMINO ACIDS AT N- AND C-TERMINI OF CYT2Aa2 TOXIN

สิริยา ธรรมชาติ 4837245 MBMG/D

ปร.ด. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ชาติชาย กฤตชัย, Ph.D. บุญเสียง พรหมคอนกอย, Ph.D.,
ปนัดดา บุญเสริม, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D.

บทคัดย่อ

Cyt2Aa2 เป็นโปรตีนที่มีขนาดเริ่มต้น 29 กิโลดาลตัน พบได้ใน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ *darmstadensis* โปรตีนชนิดนี้จำเป็นต้องถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ที่บริเวณปลายด้านอะมิโนและด้านคาร์บอกซีจึงจะสามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงและทำให้เชื้อหุ้มของเซลล์หลายชนิดแตกได้ในหลอดทดลอง งานวิจัยนี้ได้สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งบนปลายด้านอะมิโน (ตำแหน่ง 1-40) และคาร์บอกซี (ตำแหน่ง 229-259) โดยวิธีการก่อกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะและทำการศึกษาวเคราะห์คุณสมบัติต่างๆของโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งหมดเปรียบเทียบกับโปรตีนต้นแบบ พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ที่ถูกแทนที่ด้วยอะลานีนที่อาร์จินิน25 โพรลีน27 ไอโซลิวซีน31 และลิวซีนที่แอสพาร์เตต39 และที่ถูกตัดทางด้านปลายคาร์บอกซีจากแอสพาราจิน238ยังคงมีโครงสร้างและคุณสมบัติในการออกฤทธิ์เทียบเท่ากับโปรตีนต้นแบบ ในขณะที่โปรตีนกลายพันธุ์ที่ถูกแทนที่ด้วยอะลานีนที่ลิวซีน33 แอสพาราจิน230และไอโซลิวซีน233 มีโครงสร้างที่แตกต่างไปจากเดิมและมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ลดลง นอกจากนี้โปรตีนกลายพันธุ์ที่ถูกตัดทางด้านปลายคาร์บอกซีจากเซอริน229 และไอโซลิวซีน233 มีการผลิตโปรตีนและออกฤทธิ์ได้น้อยลง อีกทั้งยังมีโครงสร้างชั้นตติยภูมิที่แตกต่างไปจากโปรตีนต้นแบบ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ปลายด้านอะมิโนและคาร์บอกซีของโปรตีนCyt2Aa2 มีบทบาทสำคัญในการสร้างโปรตีนในเซลล์ การรักษาเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน การละลายของโปรตีน ความสามารถในการถูกตัดด้วยเอ็นไซม์และประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของโปรตีน