

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE *Bordetella pertussis*
CyaA-RTX SUBDOMAIN FRAGMENT

KITTIPONG SUVARNAPUNYA 5036581 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.,
ALBERT KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D.,

ABSTRACT

The bi-functional adenylate cyclase-hemolysin toxin (CyaA) is secreted by *Bordetella pertussis*, whooping cough pathogen, as a major toxin during its colonization in human upper respiratory tract. As a member of repeat-in-toxin (RTX), CyaA contains five blocks of consecutive nona-peptide repeat in the C-terminal. Additionally, to exert its activity, the toxin needed to be acylated at lysine-983 by acyltransferase, CyaC. This study is aimed to elucidate the structure of the RTX region using molecular modeling technique. CyaA-RTX (residues 931-1603) was put into molecular modeling using L3 lipase from *pseudomonas sp.* as model template. The molecular parameters were all in acceptable range with 3.8% amino acid in not allowed region of Ramachandran plot. The main chain and side chain parameters were equivalent or better compared to the standard value. The model suggested that the regions were stabilized by four major forces, network of triggerable calcium binding, core hydrophobic interactions, beta-roll structures and inter-block interactions. In addition, *in vivo* studies reveal that the CyaA-RTX (residues 751-1706) co-expressed with the active CyaC, was unacylated. This infers the importance of the PF region (residues 482-750) in the activation mechanism of the toxin. Understanding the folding and mechanism of the toxin pave the way for better treatment and prevention of whooping cough and others RTX toxin related illness.

KEY WORDS: *Bordetella pertussis*/ ADENYLATE CYCLASE-HEMOLYSIN
TOXIN/ REPEAT-IN-TOXIN/ RTX

131 pages

การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของโปรตีนสารพิษ CyaA ในส่วน RTX จากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis*

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE *Bordetella pertussis* CyaA-RTX SUBDOMAIN FRAGMENT

กิตติพงษ์ สุวรรณบุญย์ 5036581 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ชนันท อังศุรณสมบัติ, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., ALBERT KETTERMAN, Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคไอกรนเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* ซึ่งระหว่างการก่อโรคที่บริเวณทางเดินหายใจส่วนบนจะหลั่งโปรตีนสารพิษหลายชนิดออกมา หนึ่งในโปรตีนสารพิษที่สำคัญคือ CyaA โปรตีนสารพิษนี้จัดอยู่ในกลุ่ม repeat-in-toxin (RTX) ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือ มีชุดของลำดับกรดอะมิโนจำนวน 9 ตำแหน่ง ทั้งหมด 5 ชุด ที่ส่วน C-terminal นอกจากนี้โปรตีนสารพิษ CyaA ต้องการการกระตุ้นโดยการเติมหมู่สายโซ่ acyl โดยเอนไซม์ CyaC ที่ตำแหน่ง lysine-983 ใน การศึกษานี้ ต้องการที่จะสร้างโครงสร้างจำลองระดับโมเลกุลของโปรตีนสารพิษ CyaA ในส่วน RTX (ลำดับกรดอะมิโนที่ 931-1603) ด้วยเทคนิค molecular modelling โดยมีโปรตีน L3 lipase จาก *pseudomonas* sp. เป็นต้นแบบ ค่ามาตรฐานระดับโมเลกุลต่างๆอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ค่ามุมของพันธะเพปไทด์ส่วนที่ยอมรับไม่ได้ใน Ramachandran plot อยู่ที่ 3.8% ค่า main chain และ side chain parameters อยู่ในช่วงมาตรฐานหรือดีกว่ามาตรฐาน โครงสร้างจำลองที่ได้แสดงให้เห็นปฏิสัมพันธ์ของกลุ่มในการก่อโครงสร้างของ CyaA-RTX อันได้แก่ แรงจากการจับกับไอออนแคลเซียม, hydrophobic interaction, beta-roll structures และแรงจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างบลิ๊อค นอกจากนี้ การศึกษาการผลิตโปรตีนสารพิษ CyaA ส่วน RTX (ลำดับกรดอะมิโนที่ 751-1706) ควบคู่กับ เอนไซม์ CyaC ภายในเซลล์เดียวกัน พบว่า CyaA ที่ผลิตได้ไม่ถูกเติมหมู่สายโซ่ acyl แสดงให้เห็นว่า โปรตีน CyaA ส่วน PF (ลำดับกรดอะมิโนที่ 482-750) มีความสำคัญต่อกลไกการเติมหมู่สายโซ่ acyl ของ CyaC การศึกษาการก่อโครงสร้างและกลไกการกระตุ้นโปรตีนสารพิษ CyaA นี้ เป็นพื้นฐาน เพื่อพัฒนาการป้องกันรักษาโรคไอกรน และโรคที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนสารพิษในกลุ่มนี้ต่อไป