

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CHARGED RESIDUES IN THE β 10- β 11 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 β 10- β 11 loop of Cry4Aa-domain II revealed that only Lys⁵¹⁴ is required for Cry4Aa toxicity against *Culex* larvae. Opposite to that of Cry4Aa, the β 10- β 11 loop of Cry4Ba which is less toxic to *Culex* larvae contains a negative residue-Asp⁴⁵⁴. Target specificity analysis *via* charge reversal mutagenesis of the Cry4Ba-Asp⁴⁵⁴ 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 β 10- β 11 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

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

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CHARGED RESIDUES IN THE β_{10} - β_{11} RECEPTOR-BINDING LOOP OF *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa AND Cry4Ba TOXINS

สรินพร วิสิฐสัตทาพงศ์ 5037437 MTMT/D

ปร.ค. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ชนนท์ อังศุชนสมบัติ, 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 (Asp⁴⁵⁴) ในส่วนเชื่อมต่อเบต้า 10 และ 11 และจากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ D454R และ D454K ของโปรตีน Cry4Ba มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง *C. quinquefasciatus* เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนกลายพันธุ์ D454A นอกจากนี้ผลจากการทดลองด้วยวิธี immune-histochemistry แสดงให้เห็นว่า เฉพาะโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด D454R และ D454K เท่านั้นที่สามารถจับกับส่วนบนสุดของเซลล์บุผิวของกระเพาะลูกน้ำยุง *C. quinquefasciatus* ได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นกว่าเดิม จากผลทดลองในครั้งนี้จึงได้เสนอว่าชนิดของความเป็นขั้วที่ตรงกันข้ามของส่วนเชื่อมต่อเบต้า ที่ 10 และ 11 ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิดนี้มีผลต่อความจำเพาะในการฆ่าลูกน้ำยุงชนิด *C. quinquefasciatus*