

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180296

ชื่อโครงการ : การพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างเกลียวอัลฟาของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF จากเชื้อ *Bordetella pertussis* ส่วนที่คาดว่าแทรกตัวเข้าสู่ผนังหุ้มเซลล์ (Identification of the Putative Transmembrane Helices of the *Bordetella pertussis* CyaA-PF Toxin)

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษบา เผ่าทองจีน
ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

E-mail Address : busaba.p@su.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษ Adenylate cyclase-haemolysin (CyaA) เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งของเชื้อ *Bordetella pertussis* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไอกรน โดยพบว่าเฉพาะส่วนของโปรตีนสารพิษที่ทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ (pore-forming domain) มีส่วนร่วมในการเกิดรูรั่วและทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของกลุ่มผู้วิจัยพบว่าโปรตีนเกลียวอัลฟาในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic domain) ของ CyaA ซึ่งได้จากการทำนายโครงสร้าง คือ $\alpha 1_{500-522}$, $\alpha 2_{529-550}$, $\alpha 3_{571-593}$ and $\alpha 5_{678-698}$ มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและได้เสนอว่าส่วนของ $\alpha 3$ น่าจะเป็นโครงสร้างด้านที่หันเข้าหาช่องกลางของรูรั่วที่เกิดขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการสร้างแบบจำลองของบริเวณที่ไม่ชอบน้ำของ CyaA (CyaA hydrophobic region, Leu₅₀₀-Ser₇₀₀) ด้วยวิธี homology modelling โดยใช้โครงสร้างของ bovine rhodopsin เป็นต้นแบบ พบว่าโครงสร้างนี้ประกอบด้วยโปรตีนเกลียวอัลฟา จำนวน 5 เกลียว คือ $\alpha 1_{501-519}$, $\alpha 2_{527-556}$, $\alpha 3_{566-588}$, $\alpha 4_{612-640}$ และ $\alpha 5_{650-685}$ ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับแบบจำลองที่ทำนายในการศึกษาก่อนหน้านี้ จากแบบจำลองที่ได้และผลจากการทำ multiple sequence alignment ของโปรตีนเกลียวอัลฟา 3 ซึ่งมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีนอื่นๆในกลุ่ม pore-forming RTX-cytotoxin ค่อนข้างมาก ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาผลของกรดอะมิโนซึ่งเรียงตัวเป็นโครงสร้างของด้านที่ขอบน้ำของโปรตีนเกลียวอัลฟา 3 ต่อฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนที่มีขั้วและกรดอะมิโนที่มีประจุจำนวน 5 ตัว คือ Glu⁵⁷⁰, Gln⁵⁷⁴, Glu⁵⁸¹, Ser⁵⁸⁴ และ Ser⁵⁸⁵ นำมาทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธี alanine scanning mutagenesis และมีการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดกลายพันธุ์ที่สร้างขึ้น (E570A, Q574A, E581A, S584A และ S585A) โดยวิธี restriction analysis และ DNA sequencing ส่วนโปรตีนสารพิษกลายพันธุ์ขนาด 126 kDa ที่ได้จะตรวจสอบความถูกต้องโดยดูจากขนาด ผลการทำ Western blot analysis และการเกิด acylation ว่าเหมือนกันกับโปรตีนสารพิษต้นแบบ และเมื่อนำโปรตีนสารพิษที่ละลายน้ำในสารที่ได้จากการทำให้เซลล์ *E. coli* แตกไปทดสอบฤทธิ์ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พบว่ากรดอะมิโน Glu⁵⁷⁰ ซึ่งพบในโปรตีนกลุ่ม pore-forming RTX cytotoxin ในตำแหน่งเดียวกันทุกตัว มีความสำคัญต่อการเกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาจเป็นโครงสร้างสำคัญของด้านที่หันเข้าหาช่องกลางของรูรั่วที่เกิดขึ้นและมีความสำคัญต่อการผ่านของไอออน

คำหลัก : Adenylate cyclase-haemolysin, *Bordetella pertussis*, haemolytic activity, pore-forming toxin, transmembrane helices

Abstract

Project Code : MRG5180296

Project Title : Identification of the Putative Transmembrane Helices of the *Bordetella pertussis* CyaA-PF Toxin

Investigator : Busaba Powthongchin, Ph.D.
Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy,
Silpakorn University

E-mail Address : busaba.p@su.ac.th

Project Period : 2 years

Abstract

Adenylate cyclase-haemolysin (CyaA) toxin from *Bordetella pertussis* is unique in that it contains an adenylate cyclase (AC) domain in addition to the common pore-forming (PF) domain of RTX-toxin family. The truncated pore-forming domain of CyaA (CyaA-PF) has been shown to involve in pore-formation and cause lysis of sheep erythrocytes. In our earlier work, the predicted $\alpha_{1500-522}$, $\alpha_{2529-550}$, $\alpha_{3571-593}$ and $\alpha_{5678-698}$ within the PF-hydrophobic stretch were found crucial for haemolytic activity, and α_3 was proposed to be a pore-lining constituent. Here, a plausible 3D-structure of the CyaA hydrophobic region (CyaA-HPR, Leu₅₀₀-Ser₇₀₀) was built by homology modelling based on the known bovine rhodopsin structure. The model comprised five α -helical bundles ($\alpha_{1501-519}$, $\alpha_{2527-556}$, $\alpha_{3566-588}$, $\alpha_{4612-640}$ and $\alpha_{5650-685}$), which mostly resemble previously predicted model. Based on these models and multiple sequence alignment of the putative pore-lining amphipathic- α_3 of CyaA-PF, possible involvement in haemolytic activity of the conserved hydrophilic part was investigated. Five polar or charged residues lining the hydrophilic side (Glu⁵⁷⁰, Gln⁵⁷⁴, Glu⁵⁸¹, Ser⁵⁸⁴ and Ser⁵⁸⁵) have been selected for single-alanine substitutions mutagenesis. The mutant plasmids (E570A, Q574A, E581A, S584A and S585A) were verified by restriction mapping and DNA sequencing. All the 126-kDa mutant proteins over-expressed in *Escherichia coli* were confirmed by size, Western blot analysis and also acylation pattern as conformed to the wild type toxin. When hemolytic activity of *E. coli* lysates containing soluble mutant toxins was tested against sheep erythrocytes, the importance of Glu⁵⁷⁰, which is highly conserved among the pore-forming RTX cytotoxin family, was revealed for pore formation, possibly crucial for a general pore-lining structure involved in ion conduction.

Keywords: Adenylate cyclase-haemolysin, *Bordetella pertussis*, haemolytic activity, pore-forming toxin, transmembrane helices

Executive Summary

1. ชื่อโครงการ

ภาษาไทย	การพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างเกลียวอัลฟาของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF จากเชื้อ <i>Bordetella pertussis</i> ส่วนที่คาดว่าแทรกตัวเข้าสู่ผนังหุ้มเซลล์
ภาษาอังกฤษ	Identification of the Putative Transmembrane Helices of the <i>Bordetella pertussis</i> CyaA-PF Toxin

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	นาง บุชบา เผ่าทองจีน
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Busaba Powthongchin
คุณวุฒิ	ปร.ด. (อณุปันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม)
ตำแหน่งทางวิชาการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
หน่วยงาน	ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่	มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
โทรศัพท์/โทรสาร	0-3425-5801
E-mail	busaba.p@su.ac.th

3. ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

The *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-haemolysin (CyaA) toxin is grouped into the pore-forming RTX cytotoxins by its common pore-forming structural features, which are the N-terminal hydrophobic domain, the Gly-Asp rich nonapeptide repeats and the C-terminal signal sequence. The pore-forming domain of these toxins can cause lysis of target cells (i.e. leukocytes or erythrocytes), but to date the mechanism of pore-formation is still unclear. Herein, we would like to unravel some part of the mechanism of pore-formation by using the truncated CyaA pore-forming domain as a model.

4. วัตถุประสงค์

To investigate the importance of polar and charged amino acids lining on the hydrophilic surface of putative amphipathic helix 3 on haemolytic activity of CyaA-PF toxin.

5. ผลการศึกษา

The hydrophobic region in the pore-forming domain of CyaA, which is believed to be a membrane insertion part, is predicted by homology modelling to compose of five helical bundles in accordance with earlier prediction by our group. High sequence

similarity of each helix, especially helix 3, was found among other 12-related pore-forming RTX cytotoxins by using multiple sequence alignment. Moreover, from helical wheel plot, the projections of the CyaA helix 3 and other aligned toxins showed the amphipathic nature of these segments along with their similar hydrophilic surface supporting the functional importance of these conserved sequences in serving as a lumen-pore-lining segment. Alanine-scanning mutagenesis of the polar (Gln574, Ser584 and Ser585) and charged residues (Glu570 and Glu581) lining the putative CyaA helix 3 was conducted. Five mutant plasmids (E570A, Q574A, E581A, S584A and S585A CyaA-PF) were successfully constructed and verified. The 126-kDa CyaA-PF mutant toxins were expressed as a soluble form in the comparable level to the wild-type toxin. The biological activity of these toxins was tested by haemolytic assay against sheep red blood cells. The results revealed that single-alanine substitutions at Glu570 (E570A) or Glu581 (E581A) caused a drastic decrease in haemolytic activity while substitutions at Gln574 (Q574A), Ser584 (S584A) or Ser585 (S585A) did not severely affect the toxin activity. These results suggest the essential role of negatively charged glutamic acid especially Glu570 pertaining to the putative-pore forming helix 3 in CyaA-PF haemolytic activity.

6. สรุปผล

This study provides further insights into a functional significance of two negatively charged residues in the putative lumen-lining $\alpha 3$ of *B. pertussis* CyaA-haemolysin. The highly conserved Glu570, which is relatively more critical for haemolytic activity against sheep erythrocytes, could act as a gateway of the pore lumen. However, it remains to be tested whether the substitutions at Glu570 and Glu581 are conducive to alterations in the passage of ions through the pore.

7. ผลที่ได้รับจากงานวิจัย

ได้มีการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง ดังนี้ คือ

1. Toxicon. 2011; 57(6):897-903.
2. Protein Expr Purif. 2011; 75(2):127-32

ทั้งนี้ผลงานวิจัยที่ได้มีส่วนในการเพิ่มพูนความรู้พื้นฐานในด้านการศึกษาโครงสร้างของสารพิษในกลุ่ม pore-forming RTX cytotoxin แก่วงการวิชาการอีกด้วย

Project Code : MRG5180296

Project Title : Identification of the Putative Transmembrane Helices of the *Bordetella pertussis* CyaA-PF Toxin

การพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างเกลียวอัลฟาของโปรตีนสารพิษ CyaA-PF จากเชื้อ *Bordetella pertussis* ส่วนที่คาดว่าแทรกตัวเข้าสู่ผนังหุ้มเซลล์

Investigator : Busaba Powthongchin, Ph.D.
Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

E-mail Address : busaba.p@su.ac.th

Project Period : 2 years

Objective

To investigate the importance of polar amino acids lining on the hydrophilic surface of putative amphipathic helix 3 on haemolytic activity of CyaA-PF toxin