

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ BRG5980016
ชื่อโครงการ การศึกษาโครงสร้างและการทำงานของโปรตีนชนิดสารพิษฆ่าลูกน้ำยุงจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus*
ชื่อนักวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.ปนัดดา บุญเสริม
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล
E-mail Address panadda.boo@mahidol.ac.th
ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

แบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* สามารถสร้างโปรตีน binary toxin (Bin) ที่ประกอบด้วยโปรตีน BinA และ BinB ที่มีขนาด 42 และ 51 กิโลดาลตันตามลำดับ โปรตีนทั้งสองนี้ต้องทำงานร่วมกันในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญและลูกน้ำยุงก้นปล่อง โดยไม่ฆ่าลูกน้ำยุงลาย โดย BinB ทำหน้าที่จับกับตัวรับจำเพาะบนเยื่อหุ้มเซลล์ และ BinA ทำหน้าที่ทำลายเซลล์ เพื่อเข้าใจกลไกการทำงานร่วมกันและการเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* ของโปรตีน BinA และ BinB การวิจัยนี้ได้ใช้วิธี immunohistofluorescence ร่วมกับการติดตามเรืองแสงที่โปรตีน โดยพบว่าโปรตีน BinA/BinB complex เคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์พร้อมกับ Cqm1 receptor แบบ receptor-mediated endocytosis โดย BinB มีบทบาทในการนำโปรตีน BinA เคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึม และเคลื่อนที่ต่อไปยัง early และ late endosomes ผ่าน endocytic pathway หลังจากนั้น BinA จะเคลื่อนที่ต่อไปยัง mitochondria ซึ่งเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง mitochondria potential และการบวมของ mitochondria แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ Bin ในเซลล์ลูกน้ำยุงรำคาญมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยผ่านตัวกลาง mitochondria นอกจากนี้ยังส่งผลการตอบสนองในการถอดรหัสทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการจับกันกับเซลล์ลูกน้ำยุงของโปรตีนสารพิษ Bin โครงสร้างของเซลล์กระบวนการ metabolism การเผาผลาญอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน และการตอบสนองต่อความเครียด ซึ่งจำนวนของยีนที่มีการแสดงออกลดลงมีจำนวนมากกว่าจำนวนยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และโปรตีนสารพิษ Bin มีผลกระทบอย่างมากต่อการขนส่ง electron ภายใน mitochondria และการขนส่งโปรตีนเข้าออกเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการลดลงของระดับพลังงาน ATP และลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้ม mitochondria และยังพบว่าการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ endocytosis บทบาทการทำงานของ lysosome และการตายของเซลล์แบบ apoptosis จากโครงสร้างสามมิติของโปรตีน BinB ที่ทำหน้าที่นำ BinA/BinB complex เข้าสู่เซลล์พบว่ามีส่วนโดเมนด้านปลายซีทีที่มีกรดอะมิโนแบบออโรมาติกจำนวนมาก เพื่อศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนแบบออโรมาติก เราได้ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนเหล่านี้บางตำแหน่ง โดยพบว่ามีโปรตีนกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง F311A และ F315A สูญเสียคุณสมบัติการฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญ และความสามารถในการสร้างรูรั่ว ในขณะที่ไม่มีผลต่อการจับกันของโปรตีน BinA และ BinB ในสารละลาย แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนทั้งสองตำแหน่งนี้มีบทบาทสำคัญในการสอดแทรกและสร้างรูรั่วนบนเยื่อหุ้มเซลล์

นอกจากนี้โครงสร้างโปรตีน BinA และ BinB ยังมีส่วนคล้ายกับโปรตีนในกลุ่ม aerolysin-type β pore-forming toxins รวมทั้งโปรตีน parasporin-2 (PS2) ที่สร้างจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และออกฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งบางชนิด จากโครงสร้างที่คล้ายกันจึงคาดว่าโปรตีน Bin จะสามารถส่งผลยับยั้งหรือทำลายเซลล์มะเร็งเหมือนกับโปรตีน parasporin-2 โดยพบว่าโปรตีน Bin เมื่อใช้ในปริมาณความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งบางชนิด คือ A549, Caco-2, HepG2, HK-1 และ KGU-M055 โดย HK-1 เป็นเซลล์ที่ถูกทำลายมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และการยับยั้งการเคลื่อนที่ การเกาะของเซลล์บนพื้นผิว และการทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis จากผลการทดลองนี้จึงคาดว่าโปรตีน Bin น่าจะสามารถออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ แม้จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าโปรตีน parasporin-2 ก็ตาม ดังนั้นนอกจากการใช้เป็นชีวภัณฑ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงแล้ว โปรตีน Bin อาจสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นชีววัตถุฆ่าเซลล์มะเร็งต่อไปในอนาคตได้

Abstract

Project Code: BRG5980016
Project Title: Structural and functional characterization of mosquitocidal binary toxin produced by *Lysinibacillus sphaericus*
Investigator: Associate Professor Panadda Boonserm
Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University
E-mail Address: panadda.boos@mahidol.ac.th
Project Period: 3 years

Lysinibacillus sphaericus produces the mosquito larvicidal binary toxin consisting of BinA and BinB which are required together for exerting toxicity against *Culex* and *Anopheles* larvae. To investigate the binding and internalization of binary toxin into the midgut epithelial cells of susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae, immunohistofluorescence detection was performed and demonstrated the colocalization of Cqm1 and BinA/BinB complex as endocytic vesicles, indicating that Bin is internalized into the target cell via receptor-mediated endocytosis pathway. Results showed that BinA-BinB complex was internalized into cell and further delivered into the cytosol via early and late endosomal compartments, respectively. BinA subsequently associates with mitochondria and possibly dissipates the mitochondrial membrane potential causing mitochondria swelling, and finally apoptosis induction. Based on transcriptomic analysis, Bin toxin triggers a wide range of transcriptional responses including toxin binding, cytoskeleton, metabolism, immunity and cellular stress with the greater number of down-regulated genes than that of up-regulated genes. Bin toxin mainly affects metabolism, mitochondrial electron transport chain and protein transporter on outer/inner mitochondrial membrane by repressed expression. Whereas, the overexpression was enriched for transcripts involved in autophagic process, lysosomal compartments and apoptotic cell death. Based on structural alignments with other proteins, an aromatic cluster in the C-terminal domain of BinB has been proposed to be important for toxicity or the translocation of BinB or BinA/BinB complex from the membrane into the cytoplasm. Consistent with this hypothesis, two of these mutations, F311A and F315A, were not toxic to *C. quinquefasciatus* larvae and were unable to permeabilize liposomes or elicit ion channel activity, in contrast to wild-type BinB. Whereas, none of these mutations affected significantly act-A/B interaction in solution, indicating that these aromatic residues on the C-terminal domain of BinB are critical for toxin insertion in membranes. In addition, the structures of BinA and BinB have been reported to be highly similar with the C-terminal domains of aerolysin-type β pore-forming toxins

including parasporin-2 (PS2), which is one of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins that exhibits specific cytotoxicity against human cancer cells. The fact that Bin and PS2 share structural similarities raises a question of whether Bin toxin also exhibits cytotoxic or inhibitory effects against human cancer cells. Here, we demonstrated the inhibition of cell proliferation of various human cancer cells (A549, Caco-2, HepG2, HK-1, and KKU-M055) upon trypsin-activated Bin treatment at high concentrations. Of these human cancer cells, HK-1 cells were the most susceptible cells to Bin proteins. Upon Bin toxin exposure, morphological alterations, decreased migration and adhesion activity, and apoptosis induction were observed in HK-1 cells. Altogether, besides the larvicidal activity, Bin toxin also exerts the anticancer activity, albeit at high concentrations, suggesting the high potential to apply Bin toxin as a novel cancer-therapeutic agent in the future.

Keywords: *Lysinibacillus sphaericus*; binary toxin; receptor-mediated endocytosis; parasporin-2, anti-cancer activity