

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ RSA5680035
 ชื่อโครงการ การศึกษาโครงสร้างและการทำงานของโปรตีนชนิดสารพิษฆ่า
 ลูกน้ำจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus*
 ชื่อนักวิจัย รองศาสตราจารย์ปนัดดา บุญเสริม
 สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล
 E-mail Address panadda.boon@mahidol.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

แบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* สร้างโปรตีน binary toxin (Bin) ที่ประกอบด้วยโปรตีน BinA และ BinB ที่มีขนาด 42 และ 51 กิโลดาลตันตามลำดับ โปรตีนทั้งสองนี้ต้องทำงานร่วมกันในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญและยุงก้นปล่อง โดยไม่ฆ่าลูกน้ำยุงลาย BinB ทำหน้าที่จับกับตัวรับจำเพาะบนเยื่อหุ้มเซลล์ และ BinA ทำหน้าที่ทำลายเซลล์ เพื่อเข้าใจกลไกการทำงานของโปรตีนสารพิษ Bin ในเชิงลึกถึงระดับโมเลกุลมากยิ่งขึ้น เราได้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน BinB โดยใช้เทคนิค X-ray crystallography โครงสร้างสามมิติของ BinB ประกอบไปด้วยสองส่วน คือทางด้านปลายอะมิโนมีโครงสร้างคล้ายกับโปรตีนที่จับกับน้ำตาล หรือ lectin ส่วนทางด้านปลายคาร์บอกซิลมีรูปร่างยาวและมีโครงสร้างหลักเป็น β -strands ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับโปรตีนสร้างรูรั่วชนิด aerolysin งานวิจัยนี้ยังได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับเซลล์ของลูกน้ำยุงหลังจากได้รับโปรตีนสารพิษ Bin จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนสารพิษ Bin ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพภายในเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุงที่มีลักษณะคล้ายกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis และเซลล์ที่ได้รับโปรตีนสารพิษ Bin ยังสามารถกระตุ้นเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-9 ได้ แสดงให้เห็นว่าเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ Bin ในเซลล์ลูกน้ำยุงมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยผ่านตัวกลาง mitochondria ที่สามารถนำไปสู่การตายของลูกน้ำยุง นอกจากนี้งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการจับและเข้าสู่เซลล์เยื่อบุกระเพาะลูกน้ำยุงของโปรตีนสารพิษ Bin ด้วยการติดตามเรืองแสงที่โปรตีนโดยเปรียบเทียบระหว่างลูกน้ำยุงรำคาญและลูกน้ำยุงลาย จากการเลี้ยงลูกน้ำยุงด้วยโปรตีน BinA และ BinB ที่ติดตามด้วยสารเรืองแสงพบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดมีการอยู่ร่วมกันที่ตำแหน่งเดียวกันทั้งที่บริเวณผิวเซลล์และในไซโทพลาสซึมของเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุงรำคาญ ในขณะที่เลี้ยงลูกน้ำยุงด้วยโปรตีนเพียงชนิดเดียวพบว่าโปรตีน BinA จับที่ผิวเซลล์เท่านั้นแต่โปรตีน BinB สามารถเข้าสู่ไซโทพลาสซึมได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงลูกน้ำยุงลายด้วยโปรตีนทั้งสองชนิด หรือชนิดเดียวก็ตามพบว่าโปรตีนจับอยู่บริเวณผิวเซลล์เท่านั้นโดยไม่เข้าสู่เซลล์ จากผลการทดลองคาดว่าโปรตีน BinB มีหน้าที่ในการนำโปรตีน Bin เข้าสู่เซลล์เยื่อบุกระเพาะลูกน้ำยุงที่ตอบสนองต่อโปรตีน และการเข้าสู่เซลล์ของโปรตีน BinA มีความสำคัญต่อการเกิดความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง

Abstract

Project Code: RSA5680035

Project Title: Insights into the structure and function of the binary toxin: a mosquito control agent produced from *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

The binary toxin produced from *Lysinibacillus sphaericus* is highly toxic against *Culex* and *Anopheles* mosquito larvae but not toxic against *Aedes* larvae. The two components of the binary toxin are 42-kDa BinA and 51-kDa BinB. BinA is proposed to function as a toxic subunit, whereas BinB is responsible for receptor binding. To clarify the structure and function of binary toxin, we successfully determined the crystal structure of BinB. The globular N-terminal domain has a β -trefoil scaffold which is a highly conserved architecture of some sugar binding proteins or lectins, suggesting a role of this domain in receptor-binding. The BinB β -rich C-terminal domain shares similar three-dimensional folding with aerolysin type β -pore forming toxins, suggesting the cytolytic mechanism of BinB via pore formation. To gain deeper insights into the molecular mechanism underlying the toxicity of binary toxin, cellular responses to Bin toxin were examined the cytopathic effects *in vivo* to define the underlying mechanism of larval death. Typical morphological changes consistent with apoptosis were observed. Bin toxin also induced the activation of caspase-9 and caspase-3 in larval midgut cells. Our current observations thus suggest that Bin toxin triggers apoptosis via an intrinsic or mitochondrial pathway *in vivo*, possibly contributing to larval death. We also compared the binding and internalization of binary toxin into the midgut epithelial cells of susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae with those of Bin-refractory *Aedes aegypti*. When fed with a mixture of both components, co-localization of BinA and BinB was detected both on the cell surface and in the cytoplasm of *Culex* larval gut cells. However, administration of BinA alone resulted in localization only on the cell membrane, whereas BinB alone was detected both on the cell membrane and inside the cytoplasm. In contrast, when a mixture of both components, or each individual component, was fed to *Aedes* larvae, BinA and BinB were unable to reach the cytoplasm and were localized only on the cell membrane, suggesting that the internalization of BinA is essential for toxicity.

Keywords: binary toxin, immunohistochemistry, receptor binding, site-directed mutagenesis, larvicidal activity, X-ray crystallography