Project Code : RSA40-8-0012

Project Title :

Molecular Biophysical Analysis of Pore-Formation in Artificial Membranes by a Putative Transmembrane Fragment of a *Bacillus thuringiensis* δ-Endotoxin

การวิเคราะห์เชิงอณูชีวฟิสิกส์ของการเกิดรูรั่วในผนังเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นโดยชิ้นส่วนโปรตีนสารพิษจาก *Bacillus thuringiensis*

Investigator : Chanan Angsuthanasombat, Ph.D.
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Mahidol University

E-mail Address : stcas@mahidol.ac.th

Project Period : 3 years (December 1, 1997 - November 30, 2000)

Abstract

The different Cry δ-endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis* have been shown to kill susceptible insect larvae by forming a lytic pore in the target midgut epithelial cell membrane. In the previous studies, we have shown that tryptic activation of the 130-kDa Cry4B toxin produced protease-resistant products of ca. 47 kDa and ca. 21 kDa. The 21-kDa fragment was identified to be the N-terminal five-helix bundle (α1-α5) which is a potential candidate for membrane insertion and pore formation.

In this report, we have constructed the recombinant clone over-expressing the putative pore-forming (PPF) fragment (α1-α5) as inclusion bodies in *Escherichia coli*. The partially purified inclusions were composed of a 23-kDa protein which cross-reacted with Cry4B antibodies and whose N-terminus was identical to that of the 130-kDa protein. Dissimilar to protoxin inclusions, the PPF inclusions were only soluble when the carbonate buffer, pH 9.0 was supplemented with 6 M urea. After renaturation *via* stepwise dialysis, the refolded PPF protein appeared to exist as an oligomer and was structurally stable upon trypsin treatment. Unlike the 130-kDa protoxin, the refolded protein was able to release entrapped glucose from liposomes comparable to the activated toxin, although it lacks larvicidal activity against *Aedes aegypti*.. These results therefore support the notion that the PPF fragment consisting of α1-α5 of the activated Cry4B toxin is involved in membrane pore-formation.

We have also employed single proline substitutions *via* PCR-based mutagenesis and demonstrated that helices 4 and 5 in the pore-forming domain of the Cry4B toxin are essential for mosquito-larvicidal activity, likely to be involved in pore formation rather than in receptor binding. To further identify critical residues for toxicity, substitutions with alanine of each of the charged amino acids (Arg-143, Lys-156, Arg-158 and Glu-159) and one polar residues (Asn-151) in the transmembrane helix 4 were performed. Similar to the wild-type Cry4B protoxin, all five mutant toxins were over-expressed as cytoplasmic inclusions in *E. coli* and were structurally stable upon solubilisation and trypsin activation in carbonate buffer, pH 9.0. Interestingly, a complete loss of activity against *A. aegypti* larvae was observed for the alanine substitution at Arg-158, while replacements at the four other positions did not affect the toxicity. The results reveal a crucial role in toxin function for the positively charged side chain of Arg-158 in helix 4 of the Cry4B toxin.

The putative transmembrane segments, helices 4 and 5 were further studied by means of nanosecond molecular dynamics (MD) simulation. The α4-α5 hairpin (residues Gln140-Glu198) was truncated from a 3D homology model of Cry4B and inserted into a fully hydrated lipid bilayer. It adopts a stable helical hairpin-liked structure of which the amphipathic α4 was stabilised by favorable interactions between pockets of membrane-penetrating water molecules and side chains of polar residues while the relatively hydrophobic α5 appeared to unwind at its C-terminus. Unrestrained MD simulations were performed with a model pore consisting of six copies of the α4-α5 hairpin in a fully hydrated lipid bilayer with Arg-158 pointing inward to pore lumen. Predicted conductance values suggested that the transmembrane α4-α5 hairpin of Cry4B has a potential to form a stable oligemeric pore with 2-3 nm in diameter.

บทคัดย่อ

กลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษแต่ละชนิดจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) นั้น เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดรูรั่วที่ผนังเนื้อเยื่อเซลล์บุผิวกระเพาะอาหารส่วนกลางในตัวหนอนแมลงที่กิน โปรตีนสารพิษนี้เข้าไป จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า โปรตีนสารพิษชนิด Cry4B ขนาด 130 กิโลดาลตัน ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ trypsin จะได้ชิ้นส่วนโปรตีนขนาดประมาณ 47 และ 21 กิโลดาลตัน โดยที่ชิ้น 21 กิโลดาลตัน มีองค์ประกอบเป็นเกลียวอัลฟาที่ 1-5 ซึ่งเชื่อว่าจะเป็นส่วนที่สอดแทรกเข้าไปในผนังเนื้อเยื่อทำให้เกิดรูรั่ว โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่ความเข้าใจมากยิ่งขึ้นเกี่ยวกับกลไกการสอดแทรกและการทำให้เกิดรูรั่วในผนังเนื้อเยื่อที่เกิดโดยโปรตีนสารพิษชนิด Cry4B

ในรายงานนี้ เราได้ใช้เชื้อ *E. coli* ในการสร้างชิ้นส่วนโปรตีน PPF ซึ่งเป็นส่วนเกลียวอัลฟาที่ 1-5 ดังกล่าวเป็นปริมาณมาก และอยู่ในรูปของผลึกโปรตีนที่ไม่ละลาย ซึ่งเมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์เบื้องต้น