MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OLIGOMERIZATION AND PORE FORMATION OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

WILAIWAN SRIWIMOL 5137682 MTMT/D

Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D., SOMPHOB LEETACHEWA, Ph.D., CHALERMPHOL KARNCHANAWARIN, Ph.D.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis Cry4Ba toxin, a mosquito-larvicidal protein, forms oligomeric pores in the midgut epithelial cell membrane, causing cell lysis and larval death. However, a molecular feature of the oligomerization process is still unclearly solved. This study aims to provide clear insight into the structural basis for oligomerization of the Cry4Ba toxin. Here, it was found that the 65-kDa toxin monomer was unable to self-assemble into a pre-pore oligomer in solution. When the 65-kDa toxin monomer was incubated with micelles designed as a membrane-mimetic environment, the micelle-induced trimer of ~200 kDa was observed *via* both modified SDS-PAGE and size-exclusion chromatography. Additionally, this ~200-kDa trimer, which exhibited a high stability in solution, was mainly formed through a network of salt bridges. The FPLC-purified toxin trimer was more effective for membrane perturbation activity on calcein-entrapped liposomes than the toxin monomer. A three-dimensional (3D) structure of the toxin trimer at ~5 nm resolution was successfully obtained by negative-stain electron microscopy (EM) in combination with single-particle reconstruction to show a symmetrical three-fold propeller-like structure. Additionally, fitting of the 65-kDa full-length Cry4Ba atomic structure into the EM-3D map showed domain organization of individual subunits within the trimeric complex. Moreover, the molecular organizations of toxin trimers were clearly elucidated by high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) to be composed of three subunits with a structural transition from the propeller-like structure into a globular-shaped trimer upon interacting with the lipid membrane. Furthermore, a trimeric arrangement of toxin monomers was demonstrated by successive HS-AFM imaging, illustrating subunit interactions within the DMPC/CHAPSO bicelle membrane. Altogether, these findings provide direct insight into the structural requirement of a membrane-bound monomer for the trimerization process of the Cry4Ba toxin.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*/ Cry4Ba/ OLIGOMERIZATION/ MICELLE/ HIGH-SPEED ATOMIC FORCE MICROSCOPY

143 pages

การศึกษาคุณลักษณะเชิงโมเลกุลของการรวมตัวเป็นโอลิโกเมอร์และการสร้างรูรั่วของโปรตีนสารพิษ Cry4Ba ซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OLIGOMERIZATION AND PORE FORMATION OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN

วิไลวรรณ ศรีวิมล 5137682 MTMT/D

ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., จำรัส พร้อมมาศ, Ph.D., สมภพ ลีตะชีวะ, Ph.D., เฉลิมพล กาญจนวรินทร์, Ph.D.

บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษ Cry4Ba ซึ่งเป็นโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* สามารถสร้างรูรั่วในเยื่อหุ้มไขมันของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารทำให้เกิดการแตกของเซลล์และการตายของลูกน้ำ อย่างไรก็ตามความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการรวมตัวเป็นโอลิโกเมอร์ที่ก่อให้เกิดรูรั่วของโปรตีนสารพิษดังกล่าวนั้นยังคงไม่กระจ่างชัด ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายรายละเอียดอย่างชัดเจนเข้าไปในโครงสร้างพื้นฐานของกระบวนการรวมตัวเป็นโอลิโกเมอร์ของโปรตีนสารพิษ Cry4Ba ในที่นี้พบว่าการรวมตัวกันของโปรตีนสารพิษเพื่อสร้างโอลิโกเมอร์นั้นไม่สามารถเกิดขึ้นได้เองในสารละลาย อย่างไรก็ตามเมื่อโมโนเมอร์ที่มีขนาด 65 กิโลดาลตันถูกบ่มผสมกับไมเซล (micelle) ที่ถูกนำมาใช้จำลองสภาวะแบบเยื่อหุ้มไขมัน พบว่าเกิดไตรเมอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไมเซลขนาดประมาณ 200 กิโลดาลตันโดยการวิเคราะห์ด้วย modified SDS-PAGE และวิธี size-exclusion chromatography นอกจากนี้พบว่าไตรเมอร์ขนาดประมาณ 200 กิโลดาลตันนี้มีความเสถียรอย่างมากในสารละลายโดยมีการรวมตัวกันเป็นไตรเมอร์ด้วยพันธะ hydrophobic interactions เป็นหลัก และยังพบว่าไตรเมอร์บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการแตกของ calcein-entrapped liposome ได้มากกว่าโมโนเมอร์ ในการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างโครงสร้างแบบสามมิติของไตรเมอร์ที่มีความละเอียดประมาณ 5 nmโดยอาศัยโครงรูปที่ได้จากวิธีการ negative-stain electron microscopy (EM) ร่วมกับ single-particle reconstruction พบว่าไตรเมอร์มีโครงสร้างคล้ายใบพัดที่มีสมมาตรแบบสามซ้ำ นอกจากนี้พบว่าสามารถที่จะจัดเรียงโครงสร้างของโมโนเมอร์เข้าไปภายใน EM-3D map ได้อย่างลงตัว ซึ่งทำให้สามารถบ่งบอกถึงการจัดเรียงตัวของ domain ของแต่ละ subunit ภายในไตรเมอร์ได้ นอกจากนี้พบว่าการจัดระเบียบเชิงโมเลกุลของไตรเมอร์นี้สามารถถูกแสดงอย่างชัดเจนโดยใช้ high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) ซึ่งประกอบด้วยสาม subunit ที่มีการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างจาก propeller-like structure เป็น globular-shaped trimeric structure เมื่อมีการจับกับเยื่อหุ้มไขมัน ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าการจัดเรียงตัวเป็นไตรเมอร์ของโมโนเมอร์ได้ถูกแสดงอย่างชัดเจนเช่นกันด้วยการถ่ายภาพแบบต่อเนื่องด้วย HS-AFM ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการรวมตัวกันของแต่ละหน่วยย่อยเป็นไตรเมอร์ภายในเยื่อหุ้มไขมันที่เตรียมจาก DMPC/CHAPSO bicelle โดยสรุปจากการค้นพบทั้งหมดเหล่านี้เป็นการแสดงหลักฐานโดยตรงของความต้องการเชิงโครงสร้างของโมโนเมอร์ที่จับกับเยื่อหุ้มไขมันสำหรับกระบวนการรวมตัวเป็นไตรเมอร์ของโปรตีนสารพิษ Cry4Ba

143 หน้า