

**STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP ANALYSIS OF
THE PUTATIVE PORE-FORMING FRAGMENT OF
THE *Bacillus thuringiensis* Cry4B DELTA-ENDOTOXIN**

THEERAPORN PUNTHEERANURAK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MOLECUAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003**

**ISBN 974-04-3356-1
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของชิ้นส่วนก่อรูรั้วของโปรตีนสารพิษ Cry4B จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP ANALYSIS OF THE PUTATIVE PORE-FORMING FRAGMENT OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4B DELTA-ENDOTOXIN)

ธีราพร พันธุ์ธีรานุรักษ์ 4136307 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชนันท อังศุชนสมบัติ, Ph.D., ชาติชาย กฤตณัย, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., ALBERT KETTERMAN, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D.

บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ออกฤทธิ์โดยการก่อรูรั้วที่ผนังหุ้มเซลล์บุกระเพาะแมลงตัวอ่อน จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนสารพิษชนิด Cry4B ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ และเมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน จะได้โปรตีนสองชิ้นย่อยที่อยู่ด้วยกันโดยมีขนาดประมาณ 47 และ 21 กิโลดาลตัน โดยชิ้นส่วนเล็กหรือโปรตีนเกลียวอัลฟาที่ 1 ถึง 5 นั้นน่าจะเป็นชิ้นส่วนที่ทำหน้าที่ในการสร้างรูรั้วบนผนังหุ้มเซลล์ งานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างเฉพาะชิ้นส่วนโปรตีนเกลียวอัลฟาที่ 1 ถึง 5 โดยเรียกย่อว่า โปรตีน PPF เพื่อศึกษาหน้าที่และความสามารถในการสร้างรูรั้วโดยไม่เกี่ยวข้องกับโปรตีนอีกส่วนหนึ่ง จากการวิจัยพบว่าโปรตีน PPF มีโครงสร้างโดยรวมเป็นเกลียวอัลฟาโดยการตรวจสอบด้วยวิธี circular dichroism spectroscopy สามารถทำให้ liposome เกิดการรั้วไหลได้ในระดับใกล้เคียงกับโปรตีน Cry4B และจากการทดสอบความสามารถในการนำไฟฟ้าผ่านผนังเยื่อหุ้มจำลอง (planar lipid bilayers) นั้น พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดสามารถทำให้เกิดรูอ็อนที่มีการนำไฟฟ้าจำเพาะต่ออ็อนที่มีประจุบวก แต่ลักษณะของรูที่เกิดจากโปรตีน PPF นั้นมีความแตกต่างคือ รูจะเปิดตลอดเวลา ซึ่งต่างจากโปรตีน Cry4B ที่มีการปิดและเปิดสลับกัน ในการศึกษาได้ทำการสร้างโปรตีน PPF กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Arg158 ในเกลียวอัลฟาที่ 4 เพื่อศึกษาผลกระทบต่อการสร้างรูรั้ว พบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถสร้างรูอ็อนที่มีคุณสมบัติคล้ายกับรูที่เกิดจากโปรตีน PPF แต่ใช้เวลาในการเกิดรูมากกว่าโปรตีน PPF ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างในการรวมตัวของโมเลกุลเพื่อสร้างรูที่มีประสิทธิภาพ จากการศึกษาจึงสรุปได้ว่า ชิ้นส่วน $\alpha 1-\alpha 5$ หรือชิ้นส่วนโปรตีน PPF สามารถทำหน้าที่ก่อรูรั้วได้เองอย่างมีประสิทธิภาพ โดยปราศจากชิ้นส่วนอื่นของโปรตีนสารพิษ Cry4B และจากการศึกษาโดยใช้ atomic force microscopy เพื่อคุณภาพการสร้างรูบนเยื่อหุ้มจำลอง พบว่าโปรตีนสารพิษ Cry4B สามารถสอดแทรกเข้าไปในผนังเยื่อหุ้มได้ด้วยตัวเองและแต่ละรูที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดจากการรวมตัวกันของโปรตีนสารพิษจำนวน 4 โมเลกุล

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP ANALYSIS OF THE PUTATIVE PORE-FORMING FRAGMENT OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry4B DELTA-ENDOTOXIN

THEERAPORN PUNTHEERANURAK 4136307 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
MAJOR IN MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING

THESIS ADVISOR : CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., ALBERT KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis δ -endotoxins are proposed to act by forming a lytic pore in the midgut cell membrane of susceptible insect larvae. The 130-kDa Cry4B toxin upon exposure to proteases *in vitro* is processed to protease-resistant products of ca. 47 kDa and ca. 21 kDa. The 21-kDa α 1- α 5 is a potential candidate for membrane insertion and pore formation. This study aimed therefore to express separately this putative pore-forming fragment (PPF) and to elucidate its possible role in isolation from the rest of the toxin. The cloned PPF fragment that was expressed in *Escherichia coli* showed itself to be capable of inducing liposome permeability and exhibited comparable activity to the full-length activated toxin. In addition, circular dichroism spectroscopy indicated that this fragment exists as an α -helical structure. The activated Cry4B toxin and the PPF fragment formed cation-selective channels in planar lipid bilayers and displayed fast kinetic activities. PPF channels remained always open and displayed multiple conductance levels. Mutagenesis effects on channel properties by alanine-substitution at Arg-158 in the PPF fragment were investigated. PPF-R158A mutant channels were observed to have similar characteristic as the wild-type PPF channels, except it took a longer incorporation time and also displayed more channel activities, suggesting that it has different oligomerization and dynamic properties inside the membrane. These results clearly show that the α 1- α 5 of Cry4B can function as an efficient pore-forming polypeptide without the remainder of the activated Cry4B toxin. By using atomic force microscopy, spontaneous insertion of 65-kDa activated Cry4B toxin in receptor-free lipid bilayers was observed, and that resulted in the formation of a pore-like structure, most likely with a tetrameric association of the toxin molecule.

KEY WORDS : *Bacillus thuringiensis* / DELTA-ENDOTOXIN / PLANAR LIPID BILAYERS / PORE-FORMING FRAGMENT / ATOMIC FORCE MICROSCOPY

197 P. ISBN 974-04-3356-1