

**PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 HAIRPIN  
PEPTIDES OF THE *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY4BA  
MOSQUITO-LARVICIDAL PROTEIN**

**SOMPHOB LEETACHEWA**

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

**2006**

**ISBN 974-04-6903-5**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การแยกบริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของเกลียวอัลฟา 4 เชื่อมต่อกับเกลียวอัลฟา 5 ของโปรตีน  
ฆ่าลูกน้ำของ CRY4BA ของแบคทีเรีย *BACILLUS THURINGIENSIS*

PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 HAIRPIN PEPTIDES OF  
THE *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY4BA MOSQUITO-LARVICIDAL  
PROTEIN

สมภพ ลีตะชีวะ 4536649 MBMG/D

ปร.ด. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนันท์ อังศุชนสมบัติ, Ph.D., สกต พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.,  
ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., ปนัดดา บุญเสริม, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

จากรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าเกลียวอัลฟาที่ 4 และ 5 ของโปรตีนสารพิษ Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดรูรั่วที่ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ ในการศึกษาได้ใช้พลาสมิด pS<sup>136</sup>NSSRNP ที่สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ Cry4Ba-T6 ซึ่งมีการเพิ่มตำแหน่งจุดตัดโดยเอ็นไซม์ trypsin ที่ส่วนเชื่อมต่อบริเวณเกลียวอัลฟาที่ 3 และ 4 สำหรับการผลิตชิ้นส่วนเฉพาะเกลียวอัลฟาที่ 4 ที่เชื่อมต่อกับ 5 ( $\alpha$ 4-loop- $\alpha$ 5) รวมถึงอนุพันธ์ของชิ้นส่วนดังกล่าว (T6-R159A และ T6-Y171A) ซึ่งเมื่อละลายผลึกโปรตีนดังกล่าวและตัดย่อยด้วยเอ็นไซม์ trypsin พบว่าโปรตีน Cry4Ba-T6 และอนุพันธ์ ซึ่งมีขนาด 130 kDa จะถูกตัดย่อยเป็นชิ้นส่วน 3 ชิ้น ขนาด 47, 10 และ 6 kDa ที่ไม่ถูกย่อยได้อีก โดยที่ชิ้นขนาด 6 kDa ได้ถูกแยกบริสุทธิ์ โดยการผ่านคอลัมน์แยกตามขนาด (FPLC) และคอลัมน์แยกตาม hydrophobicity (RP-HPLC) และเมื่อตรวจสอบความถูกต้องด้วยการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและมวลโมเลกุล พบว่าตรงกับชิ้นเกลียวอัลฟาที่ 4 เชื่อมต่อกับ 5 และยังพบอีกว่าโครงสร้างของชิ้นส่วนดังกล่าวมีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟา นอกจากนี้ พบว่าความสามารถในการรบกวนผนังเยื่อหุ้มจำลองแบบ liposomes ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง โดยใช้วิธีตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีเรืองแสงของ calcein ที่รั่วออกจาก liposomes (calcein-release assays) ซึ่งเมื่อตรวจสอบการจัดเรียงตัวและลักษณะโครงสร้างของชิ้นเกลียวอัลฟาดังกล่าวในสภาพของเยื่อหุ้มจำลอง (phospholipids membrane) โดยใช้วิธีการ ATR-FTIR spectroscopy พบว่า โครงสร้างส่วนใหญ่ของ  $\alpha$ 4-loop- $\alpha$ 5 มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาอยู่ในเยื่อหุ้มจำลองประมาณ 60% โดยมีการฝังตัวลงไปเยื่อหุ้มประมาณ 80% และมีค่ามุมเอียงเฉลี่ย 60 องศา จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ เป็นการสนับสนุนบทบาทของชิ้นเกลียวอัลฟาที่ 4 เชื่อมต่อกับ 5 ในการทำให้เกิดรูรั่วของโปรตีนฆ่าลูกน้ำของ Cry4Ba

135 หน้า. ISBN 974-04-6903-5

PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 HAIRPIN PEPTIDES OF THE *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY4BA MOSQUITO-LARVICIDAL PROTEIN

SOMPJOB LEETACHEWA 4536649 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D.,  
SAKOL PANYIM, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D.,  
GERD KATZENMEIER, Ph.D., PANADDA BOONSERM, Ph.D.

ABSTRACT

Helices 4 and 5 of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba  $\delta$ -endotoxin have been shown to be important determinants for mosquito-larvicidal activity, likely being involved in membrane-pore formation. In this study, plasmid-pS136NSSRNP encoding the 130-kDa Cry4Ba-T6 mutant toxin containing an additional trypsin cleavage site in the interhelical loop connecting  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4 within the pore-forming domain, was used to produce the  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 hairpin peptide and its derivatives (T6-R159A and T6-Y171A). Upon solubilisation of the toxin inclusions expressed in *Escherichia coli* and subsequent digestion with trypsin, the 130-kDa mutant protoxin and its derivatives were processed to protease-resistant fragments of ca. 47, 10 and 6 kDa. The 6-kDa fragment was identified as the  $\alpha$ 4-loop- $\alpha$ 5 hairpin via N-terminal sequencing and mass spectrometry, and was successfully purified by size-exclusion fast protein liquid chromatography (FPLC) and reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC). Using circular dichroism spectroscopy, the 6-kDa peptide and its derivatives were found to exist predominantly as an  $\alpha$ -helical structure. Membrane perturbation studies via fluorimetric calcein-release assays revealed that the 6-kDa helical hairpin and its derivatives are highly active against unilamellar liposomes compared with the 65-kDa activated full-length toxin. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy was used to determine the orientation and conformation of these hairpins in the lipid membrane. It revealed that the purified  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 hairpin either from the Cry4Ba-T6 mutant or from its derivatives are mainly embedded in phospholipid membranes (ca. 80%) and show a predominant  $\alpha$ -helical structure (ca. 60%). An average tilt angle of ca. 60° for the hairpin peptides was found with respect to the bilayer normal at a lipid:protein ratio of 10:1 (mol/mol). Taken together, the results of this study directly support the role of the  $\alpha$ 4-loop- $\alpha$ 5 hairpin in membrane-perturbing and pore-forming activities of the full-length Cry4Ba toxin.

KEY WORDS: *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY4BA TOXIN/  
PORE-FORMING/ ATR-FTIR

135 P. ISBN 974-04-6903-5