

**Project Code:** BRG50-8-0003

**Project Title:**

Structural Basis of Oligomerisation and Pore Formation by the *Bacillus thuringiensis* Mosquito-Larvicidal Proteins

การศึกษาเชิงโครงสร้างของการรวมตัวและการเกิดรูรั่วโดยโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

**Investigator:** Chanan Angsuthanasombat, Ph.D.

Laboratory of Molecular Biophysics and Structural Biochemistry  
Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University

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

**Project Period:** 3 years (May 1, 2007 - April 30, 2010)

**Abstract**

The insecticidal character of *Bacillus thuringiensis* Cry  $\delta$ -endotoxins is believed to be caused by their capability to generate lytic pores in the target larval midgut membrane. Herein, membrane-associated structures of the 65-kDa mosquito-active Cry4Ba toxin was analysed by electron crystallography. 2D crystals of the oligomeric toxin complex have been captured in two distinct conformations *via* detergent dialysis. Both complexes appeared to be trimeric; one crystal form revealed a symmetrical three-bladed pinwheel-like shape whilst the other form revealed a propeller-like conformation displaying an obvious hole in the center region, conceivably implying the open state of the pore. We have also characterised the lipid-induced conformation of a 27-residue Cry4Ba- $\alpha$ 7 peptide in different phospholipid membranes. ATR-FTIR results showed that the peptide in DMPC or DDPC adopted both  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -structure, present in varying proportions depending on the peptide-to-lipid ratio, but only  $\alpha$ -helical conformation was observed in anionic DMPG membranes.  $H^+/D^+$  exchange results showed protection of  $\sim 90\%$  in DMPC for the  $\beta$ -form, with a peptide carbonyl average tilt angle of  $\sim 45^\circ$  with respect to the bilayer normal, whilst the  $\alpha$ -helical form was found preferentially on the membrane surface. 10-ns MD simulations of the  $\alpha$ 7 peptide in DMPC bilayers supported the stability of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -conformations for the membrane-associated and membrane-inserted states, respectively. Moreover, the 65-kDa functional form of the Cry4Ba-R203Q mutant was generated for crystallization by eliminating the tryptic cleavage site at Arg<sup>203</sup>. The 65-kDa trypsin-resistant fragment has been purified and crystallized using the sitting-drop vapor diffusion method. The crystals belong to the rhombohedral space group *R*32 with unit-cell parameters  $a = b = 184.62 \text{ \AA}$ ,  $c = 187.36 \text{ \AA}$ . Diffraction data were collected to at least  $2.07 \text{ \AA}$  resolution using synchrotron radiation X-ray and gave a data set with an overall  $R_{\text{sym}}$  of 9.1% and a completeness of 99.9%. Preliminary analysis indicates that one asymmetric unit contains one molecule of the active full-length mutant with the  $V_M$  coefficient and the solvent content of  $4.33 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  and 71%, respectively.

**Keywords:** ATR-FTIR, Crystallisation, Electron crystallography,  $H^+/D^+$  exchange, Larvicidal activity, Membrane-associated pore complex, Mutagenesis, Trimeric structure

## บทคัดย่อ

ความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษที่ฆ่าแมลง (Cry  $\delta$ -endotoxins) จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* นั้นมีความเชื่อว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถทำให้เกิดรูรั่วและการแตกของเซลล์บุเยื่อเพาะแมลงตัวอ่อนเป้าหมาย ในรายงานนี้เราได้ศึกษาวิเคราะห์โครงสร้างจตุรภูมิโดยวิธี Electron crystallography ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำ Cry4Ba ในเยื่อหุ้มไขมัน DMPC ซึ่งได้จากการตกผลึกโปรตีนด้วยวิธี Detergent dialysis พบว่า มีผลึกสองมิติ (2D crystal) อย่างน้อย 2 ชนิด และจากการวิเคราะห์ภาพถ่ายมุมบนผลึกโปรตีนที่ได้พบว่า ผลึกทั้งคู่ประกอบขึ้นจากสามโมเลกุล (Trimer) ของโปรตีน Cry4Ba ซึ่งผลึกรูปหนึ่งมีรูปลักษณะคล้ายคลึงกับกังหันสามใบ (Three-bladed pinwheel) ในขณะที่ผลึกอีกรูปหนึ่งเป็นรูปใบพัด (Propeller) โดยที่มีรูอยู่ตรงใจกลางของโมเลกุลอย่างเห็นได้ชัดซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นรูรั่วที่โปรตีนดังกล่าวนี้สร้างขึ้น นอกจากนี้เราได้ศึกษาบทบาทหน้าที่ของเกลียวอัลฟาที่ 7 ( $\alpha$ -helix 7) ซึ่งค่อนข้างอนุรักษ์ (Conserved) โดยได้ศึกษาการเหนี่ยวนำโครงสร้างของเปปไทด์สังเคราะห์ Cry4Ba- $\alpha$ 7 ขนาด 27 กรดอะมิโนในชั้นเยื่อหุ้มไขมันต่างชนิดกันด้วยวิธี ATR-FTIR spectroscopy และวิธี  $H^+/D^+$  exchange ซึ่งพบว่า เมื่อ Cry4Ba- $\alpha$ 7 อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มไขมัน DMPC หรือ DDPC เปปไทด์ดังกล่าวจะมีโครงสร้างเป็นได้ทั้งเกลียวอัลฟาและบีตา ( $\beta$ -conformation) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเปปไทด์ต่อเยื่อหุ้มไขมันที่ใช้ อย่างไรก็ตามพบว่า เมื่อเปปไทด์นี้อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มไขมันที่เป็นประจุลบ อันได้แก่ DMPG นั้น มันจะมีโครงสร้างเป็นเกลียวอัลฟาเท่านั้น และยังพบเพิ่มเติมว่า โครงสร้างบีตานั้นจะฝังตัวลงในชั้นเยื่อหุ้มไขมัน DMPC ~90% และมีมุมเอียง ~45° แต่โครงสร้างเกลียวอัลฟานั้นจะวางตัวในแนวราบบนชั้นผิวเยื่อหุ้มไขมันดังกล่าว ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาเปปไทด์ดังกล่าวใน DMPC เช่นกันด้วยวิธี MD simulations นอกจากนี้เราได้สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ Cry4Ba-R203Q ขนาด 65 kDa เพื่อศึกษาโครงสร้างจตุรภูมิที่มีขนาดเต็มส่วนโดยได้กำจัด Arginine ที่ตำแหน่ง 203 ซึ่งเป็นจุดตัดโดย Trypsin ทิ้งไป ในการนี้ได้แยกบริสุทธิ์และตกผลึกโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี Sitting-drop vapor diffusion พบว่า ผลึกโปรตีนที่ได้เป็นแบบ Rhombohedral space group  $R32$  ซึ่งมีค่า Unit-cell parameters  $a = b = 184.62 \text{ \AA}$  และ  $c = 187.36 \text{ \AA}$  และจากการทำ Diffraction โดยใช้ Synchrotron radiation X-ray ที่ระดับอย่างน้อย  $2.07 \text{ \AA}$  resolution จะได้ Overall  $R_{\text{sym}} = 9.1\%$  ที่ความสมบูรณ์ (Completeness) = 99.9% และเมื่อวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่า ในแต่ละ Asymmetric unit จะมีโปรตีนกลายพันธุ์ดังกล่าวอยู่เพียงหนึ่งโมเลกุลโดยมีค่า  $V_M$  coefficient =  $4.33 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  และค่า Solvent content = 71%