การศึกษาความสำคัญทางด้านโครงสร้าง และความสามารถด้านชีวเคมีของโปรตีน Cyt2Aa2 โดยการเพิ่มตำแหน่งตัดจำเพาะของ trypsin

Structure and Functional Investigation of the Outer Layer Helices of Cyt2Aa2 Toxin by Proteolytic Site Engineering

บุญสรรค์ ประเสริฐกุลชัย และ ชาติชาย กฤตนัย

Boonsan Prasertkulchai and Chartchai Krittanai

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Nakhonpathom 73170 Thailand

E-mail:stckt@mahidol.ac.th , http://mb.mahidol.ac.th

บทคัดย่อ: Cytolytic toxin (Cyt2Aa2) เป็น delta-endotoxins ที่มีความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย ซึ่งสร้างมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* โครงสร้าง ของ

Cyt toxin ประกอบด้วย ชั้นของ β-sheet อยู่ตรงกลางระหว่างชั้นของ α-helices 2 ชั้นซึ่งประกบอยู่ด้านนอก กลไกการทำลายเซลล์ของ Cyt toxin ยังไม่เป็นที่ปรากฏแน่ชัด แต่ได้มีการเสนอรูปแบบที่น่าจะเป็นไปได้ 2 รูปแบบ คือ pore-forming model และ detergent-like model จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีเฉพาะส่วนที่เป็น β-sheet ของ toxin เท่านั้นที่แทรกเข้าไปอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ในขณะที่ส่วนของ α-helices จะอยู่บริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้จะมุ่งไปที่การศึกษาลักษณะทางเคมี และความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุง หรือความสามารถในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของ Cyt toxin ที่นำเอา α-helices ออก.

Abstract: Cytolytic toxin (Cyt2Aa2) is mosquito larvacidal delta-endotoxins that generated from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. Cyt toxins are produced as the inclusions that have one β-sheet layer between two outer layers of α-helices. The larvacidal mechanisms of this toxin still not clear but there are two models have been proposed, pore-forming model and detergent-like model. From the previous study, some evident show that only the β-sheet can insert into the membrane to form the lytic pore while the α-helices cannot. This research project aims to systematically remove the two outer layers of helices A-B and C-D by introducing a tryptic site after helices A-B and helices C-D. The resulting toxins will be assessed for structural features, physiochemical property, including in vivo and in vitro activity.

Introduction: *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a gram-positive spore-forming bacterium, which produces crystalline inclusions during sporulation (Nickerson KW, et al. 1975.). Spores of
B.thuringiensis are active against larvae of many species of insect (Schnepf E., et al. 1998) depending on their strain. Cytolytic toxin or Cyt toxin is one of delta-endotoxins (crystalline toxin (Cry) and cytolytic toxin (Cyt)) generated by B. thuringiensis, with lower molecular weight and smaller structure than Cry toxin. Cyt toxin (29.2 kDa) is produced as protoxin which is cleaved by proteases in the insect

midgut converting to the active toxin (21.5 kDa). The active toxin will then bind and insert into phospholipid bilayers membrane, forming pore for cell lysis.

Materials and Methods: First, primers for site-directed mutagenesis will be designed to produce the trypsin cleavage site, N89 and T148 will be changed to lysine. Second, the PCR products will be screened for mutant by Restriction Enzyme Analysis (N89K will be digested with *Dde*I and T148K will be digested with *Cla*I and *Hha*I). After that the sequence of the correct clone will be confirmed by DNA sequencing. Third, proteins that expressed from this mutant will be tested the functional activity and biochemical property, such as hemolytic activity, larvacidal activity or biochemical structure.

Results: After perform the Restriction Enzyme Analysis and DNA sequencing, the correct clones were induced to express mutated toxin, and after that the toxins were tested the activity by Larvacidal activity assay and Hemolytic activity assay.

References:

1. DU, J., Knowles, B.H., Li, J. and Ellar, D.J. (1999). Biochemical characterization of Bacillus thuringiensis cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer. Biochem. J. 338, 185-193.
2. Escobar, E., Segura, C., Vanegas, M. and et.al. (2000). Proteolytic processing of the Cyt1Ab1 toxin produced by Bacillus thuringiensis subsp. medellin. Mem Inst Oswaldo Cruz. 95(5), 693-700.
3. Li, J., Koni, P.A. & Ellar, D.J. (1996). Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from Bacillus thuringiensis ssp. Kyushuensis and implications for membrane pore formation. J. Mol. Biol. 257, 129-152.
4. Juárez-Pérez, V., Guerchicoff, A., Rubinstein, C. and Delécluse, A. (2002). characterization of Cyt2Bc toxin from Bacillus thuringiensis subsp. medellin. Applied and Environmental Microbiology. 68, 1228-1231.
5. Promdonkoy, B. and Ellar, D.J. (2003). Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic δ-endotoxin from Bacillus thuringiensis. Biochem. J. 374, 25-259.

Keywords: Cyt2Aa2, cytolytic toxin, proteolytic cleavage, protein processing, trypsin activation