



УДК 577.3

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДОМЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ТОКСИНОВ *Bacillus thuringiensis*

© 1996 г. О. И. Лосева[#], М. Д. Киркитадзе*, А. П. Добрица, С. А. Потехин*

Государственный научный центр прикладной микробиологии, 142279, пос. Оболенск Московской обл.;

* Институт белка РАН, Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 19.04.96 г.

Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии исследована структура δ -эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) и CryIIIА. Анализ молекулярного плавления показал, что С- и N-концевые половины в молекуле протоксина CryIA(c) из *B. thuringiensis* подвида *kurstaki* HD-73 являются термодинамически независимыми субъединицами, причем С-концевой фрагмент денатурирует при значительно более низкой температуре, чем N-концевой. Третичная структура N-концевого фрагмента не изменяется при переходе протоксин–токсин. Плавление нативной структуры токсина CryIA(c) при pH 9.7–11.0 свидетельствует о существовании в его молекуле двух доменов. У CryIIIА из *B. thuringiensis* подвида *tenebrionis* в щелочных условиях (pH 9.7–11.0) переход из нативного состояния в денатурированное происходит по принципу "two state", т.е. белок плавится как единый кооперативный домен. Процесс плавления токсина CryIIIА при pH 2.2–3.5 описывается двумя перекрывающимися по температуре переходами, что указывает на наличие двух доменов.

Ключевые слова: δ -эндотоксины *Bacillus thuringiensis*, микрокалориметрия, третичная структура.

В настоящее время развивается новая технология защиты сельскохозяйственных растений, предусматривающая в качестве альтернативы химическим пестицидам применение микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности для борьбы с вредителями. Наиболее широко используемыми биопестицидами являются препараты на основе грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). В процессе споруляции этой бактерии формируются кристаллические включения [1, 2], которые могут быть токсичны для насекомых отрядов Lepidoptera, Diptera и Coleoptera, а также для некоторых других организмов [3, 4]. Входящие в состав кристаллов *Bt*-белки, так называемые δ -эндотоксины, являются протоксинами. В кристаллах *Bt*-молекулы протоксина связаны сложной сетью дисульфидных, гидрофобных, водородных и "солевых" связей [5, 6]. В кишечнике насекомых эти связи разрушаются, кристаллы растворяются и протоксин в результате действия протеиназ кишечного сока процессируется, переходя в форму истинного токсина [7, 8]. Токсины образуют поры в эпителии кишечника, что приводит к нарушению осмотического баланса, лизису клеток и в конечном счете к гибели насекомых [5]. Способность образовывать поры показана для ряда токсинов и их фрагментов на мо-

делях бислойных липидных мембран, липосом и везикул из мембран щеточной каемки кишечного эпителия насекомых [9–11].

К сожалению, большинство деталей механизма функционирования δ -эндотоксинов *Bt* продолжает оставаться неизвестным. Важность их изучения определяется необходимостью создания более эффективных биопестицидов и трансгенных растений, устойчивых к вредителям. Знание молекулярных механизмов взаимодействия кристаллических белков *Bt* с клетками насекомых необходимо также для решения проблемы резистентности насекомых к этим токсинам.

Цель настоящей работы – сравнительное изучение третичной структуры Lepidoptera- и Coleoptera-специфического δ -эндотоксинов *Bt* с помощью метода дифференциальной сканирующей микрокалориметрии [12, 13].

Исследуемые белки выделены из клеток *B. thuringiensis* подвида *kurstaki* HD-73 и *B. thuringiensis* подвида *tenebrionis*, в геноме которых присутствует только по одному гену δ -эндотоксинов – *cryIA(c)* и *cryIIIА* соответственно.

Продуктом гена *cryIA(c)* является протоксин с молекулярной массой 130 кДа [14, 15]. Под действием протеиназ насекомых С-концевая половина молекулы отщепляется и разрушается, а оставшаяся устойчивая к протеолизу N-концевая половина представляет собой токсин с молекулярной массой 65 кДа, активный против гусениц некоторых

Сокращения: *Bt* – *Bacillus thuringiensis*, CAPS – циклогексил-аминопропансульфокислота, PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

[#] Автор для переписки.

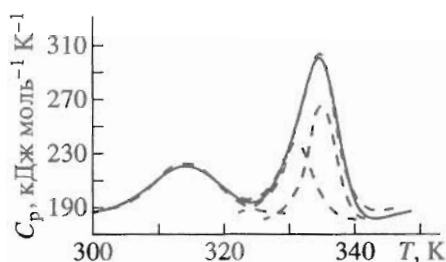


Рис. 1. Кривая зависимости парциальной молярной теплоемкости от температуры (25 мМ CAPS-буфер, pH 9.7) и разложение функции теплоемкости для протоксина *B. thuringiensis* подвида *kurstaki*. Экспериментальная кривая изображена сплошной линией. Результаты разложения представлены штриховыми кривыми.

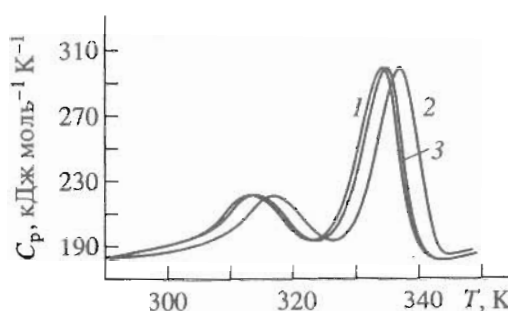


Рис. 2. Кривые зависимости парциальной молярной теплоемкости от температуры для протоксина *B. thuringiensis* подвида *kurstaki* при pH 9.7 (1), 10.5 (2), 11.0 (3) в 25 мМ CAPS-буфере.

насекомых отряда Lepidoptera. В настоящей работе токсин CryIA(c) получен из кристаллического белка путем ограниченного протеолиза трипсином. Обработка протоксина CryI-типа трипсином *in vitro* приводит к образованию полипептида, аналогичного токсину, высвобождаемому протеолитическими ферментами кишечника насекомых [16].

Характерные пики поглощения тепла, наблюдаемые на кривой зависимости парциальной молярной теплоемкости протоксина CryIA(c) от температуры в буфере CAPS в интервале pH 9.7–11 (рис. 1), связаны с кооперативным разрушением жесткой третичной структуры белка [12]. Плавление нативной структуры протоксина – сложный процесс, представленный низкотемпературным пиком теплопоглощения при 44°C и вторым пиком при 65°C, который раскладывается на два перекрывающихся по температуре простых перехода. Наблюдается зависимость стабильности белка от pH, максимум которой приходится на pH 10.5, в то время как уменьшение pH до 9.7 или увеличение до 11.0 приводит к снижению температуры плавления на 3–4°C (табл. 1). Форма кривой не меняется в зависимости от pH (рис. 2).

На кривой зависимости парциальной молярной теплоемкости от температуры для токсина CryIA(c) (рис. 3) низкотемпературный пик ($T_{пл}$ 44°C), наблюдаемый на кривой плавления протоксина (рис. 1), исчезает, но сохраняется пик теплопоглощения при 65°C, который раскладывается на два независимых перехода с теми же значениями температур, что и в случае протоксина. Суммарная энтальпия денатурации равна 1000–1100 кДж/моль (табл. 2).

Как уже говорилось, δ -эндотоксин *B. thuringiensis* CryI-типа существует в кристалле в виде протоксина, молекула которого делится на два структурно и функционально различных С- и N-концевых фрагмента. С-Концевая часть, очевидно, играет важную роль в образовании и стабильности кристаллической структуры, тогда как

N-концевая половина выполняет токсическую функцию [7]. Кроме того, особенности структуры С-концевого домена влияют на растворение кристаллов δ -эндотоксинов в щелочных условиях кишечника насекомых отряда Lepidoptera. Мутации в этом домене приводят к образованию нерастворимых тел включения [17].

Анализ кривых плавления протоксина и токсина *B. thuringiensis* подвида *kurstaki* HD-73 (рис. 1, 3) позволяет сделать следующие выводы. Высокотемпературный переход ($T_{пл}$ 65°C) в протоксине относится к плавлению N-концевой токсической половины молекулы. Низкотемпературный переход ($T_{пл}$ 44°C), очевидно, относится к плавлению С-концевой половины молекулы, деградируемой в процессе протеолиза. К сожалению, невозможно

Таблица 1. Термодинамические параметры тепловой денатурации протоксина *B. thuringiensis* подвида *kurstaki**

pH	$T_{пл}^{энд}$, °C**	$\Delta H^{инд}$ **	$\Delta H^{общ}$ **
		кДж/моль	
9.7	41	240 ± 10	1180 ± 30
	58	400 ± 20	
	62	540 ± 30	
10.5	44	250 ± 10	1210 ± 30
	59	410 ± 20	
	65	550 ± 30	
10.9	43	240 ± 10	1190 ± 30
	57	410 ± 20	
	61	540 ± 30	

* Измерения проводили в 25 мМ CAPS-буфере. Точность измерения температур составляет 0.3°C.

** Температуры плавления и величины энтальпий получены путем разложения экспериментальных кривых на составляющие (см. рис. 1).

*** Величины энтальпий рассчитаны из площади под экспериментальными кривыми.

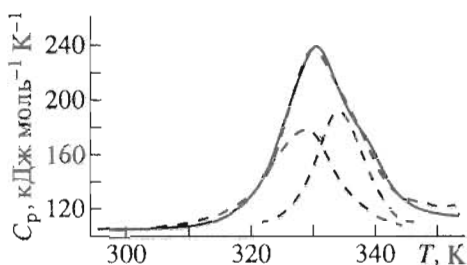


Рис. 3. Кривая зависимости парциальной молярной теплоемкости от температуры и разложение функции теплоемкости для токсина *B. thuringiensis* подвида *kurstaki*. Экспериментальная кривая изображена сплошной линией. Результаты разложения представлены штриховыми кривыми.

выделить и исследовать интактную С-концевую половину молекулы протоксина. Образование токсина из протоксина под действием протеиназ происходит путем последовательного отщепления с С-конца небольших фрагментов до тех пор, пока не остается устойчивая к дальнейшему протеолизу молекула токсина [18, 19]. N- и С-Концевые половины – термодинамически практически независимые субъединицы в молекуле протоксина. Третья структура N-концевого фрагмента не претерпевает существенных изменений при переходе протоксин–токсин.

К аналогичным выводам пришли авторы работы [20], в которой за процессом денатурации молекул протоксина и токсина из *B. thuringiensis* подвида *kurstaki* HD-73 в 6 М гуанидин-HCl и 8 М мочеvine следили по красному сдвигу максимумов спектров флуоресценции. Они считают, что разворачивание молекулы протоксина происходит в два этапа, причем С-концевая половина молекулы разворачивается быстрее, тогда как N-концевой

Таблица 2. Термодинамические параметры тепловой денатурации токсина *B. thuringiensis* подвида *kurstaki**

рН	$T_{пл}^{инд}$, °С**	$\Delta H^{инд}$ **	$\Delta H^{общ}$ ***
		кДж/моль	
9.7	58	490 ± 30	1070 ± 30
	62	580 ± 30	
10.5	59	480 ± 20	1060 ± 30
	65	580 ± 30	
11.0	57	470 ± 20	1030 ± 30
	61	560 ± 30	

* Измерения проводили в 25 мМ CAPS-буфере. Точность измерения температур составляет $\pm 0.3^\circ\text{C}$.

** Температуры плавления и величины энтальпий получены путем разложения экспериментальных кривых на составляющие (см. рис. 3).

*** Величины энтальпий рассчитаны из площади под экспериментальными кривыми.

токсический фрагмент более устойчив к денатурирующим условиям и разворачивается медленнее, аналогично 67-кДа токсину. Процесс денатурации/ренатурации N-концевой половины молекулы протоксина протекает независимо от С-концевой половины, и протеолитическое расщепление протоксина не сопровождается большими конформационными изменениями молекулы токсина.

В то же время полученные нами результаты не согласуются с данными работы [21], где также использовали дифференциальную сканирующую микрокалориметрию для анализа структуры протоксина и токсина из *B. thuringiensis* подвида *kurstaki* HD-73. Кривая плавления протоксина в этой работе представляет собой асимметричную эндотерму с двумя переходами с $T_{пл}$ 59 и 63°C , общая энтальпия – 815 кДж/моль. Эндотерма токсина имеет еще более сложный характер: раскладывается на три перехода в интервале $50\text{--}80^\circ\text{C}$ с общей энтальпией 690 кДж/моль. Таким образом, авторы не обнаружили независимый характер плавления С-концевой и N-концевой частей протоксина. Кроме того, они утверждают, что N-концевой токсический фрагмент претерпевает конформационные изменения при переходе протоксин–токсин, что противоречит результатам, приведенным этими же авторами в работе [20]. Несомненное соответствие результатов, представленных нами и в работе [21], обусловлено, по-видимому, тем, что эти исследователи проводили плавление белков при скорости $50^\circ\text{C}/\text{мин}$ (в нашей работе $1^\circ\text{C}/\text{мин}$), которая мало применима для изучения крупных, мультидоменных белков [22].

Плавление нативной структуры токсина CтуIA(c) описывается двумя перекрывающимися по температуре переходами (рис. 3), указывающими на наличие в его молекуле двух доменов. Следует заметить, что ранее в ряде работ были получены данные, которые также свидетельствуют о двухдоменном строении токсинов *Vt*. В частности, в работе [23], где изучались спектры флуоресценции токсического фрагмента CтуIA(b) из *B. thuringiensis* подвида *berliner* 1715 в нативных и денатурирующих условиях, авторы обнаружили двухфазовый характер кривых разворачивания белковой молекулы при увеличении концентрации гуанидин-HCl от 0 до 8 М при разных значениях рН. Кроме того, они показали, что при расщеплении токсина химотрипсином, термолизином и проназой образуются, по данным электрофореза в ПААГ, два стабильных фрагмента с M 30 и 36 кДа. Папаин расщепляет этот белок в денатурирующих условиях (5 М гуанидин-HCl) на 32- и 33-кДа фрагменты. Аналогичные результаты, указывающие на существование по крайней мере двух доменов в молекуле токсина CтуIA(c) из *B. thuringiensis* подвида *kurstaki* HD-73, получены в работе [20], где также исследовали протеолитическое расщепление токсина в денатурирующих

условиях. Выявляемое различными методами двухдоменное строение молекул токсинов CryI-типа отражает, по-видимому, наличие в этих белках двух структурно и функционально различных участков: N-концевого α -спирального домена, выполняющего токсические функции, и β -структурного C-концевого фрагмента, содержащего сайты связывания со специфическими рецепторами кишечного эпителия чувствительных насекомых [5, 7].

Совершенно другая картина наблюдается при плавлении δ -эндотоксина из *B. thuringiensis* подвида *tenebrionis* (рис. 4). Штамм *B. thuringiensis* подвида *tenebrionis* несет ген *cryIIIА* и активен против насекомых отряда Coleoptera, в том числе против личинок колорадского жука [24, 25]. Ген *cryIIIА* детерминирует укороченный вариант протоксина с M 72 кДа. После отщепления 57 аминокислот с его N-конца образуется токсин с M 67 кДа.

В настоящее время методом рентгеноструктурного анализа установлена трехмерная структура CryIIIА-токсина из *B. thuringiensis* подвида *tenebrionis* [6]. Молекула токсина имеет клинообразную форму и состоит из трех доменов: одного α -спирального (I) и двух β -структурных (II и III). α -Спиральный домен, представленный пучком из 7 α -спиральных сегментов, участвует в образовании пор в мембране эпителия, тогда как β -структурный домен II (трехскладчатый) ответствен за связывание с рецептором на поверхности эпителия кишечника насекомых, β -структурный домен III располагается на поверхности мембраны клеток эпителия.

Известно, что анализ калориметрической кривой позволяет определить значения энтальпий-эффективной $\Delta H^{\text{эф}}$, рассчитываемой по уравнению Вант-Гоффа, и калориметрической $\Delta H^{\text{кал}}$, определяемой из площади под калориметрической кривой. При сравнении этих параметров можно сделать вывод о механизме данного конформационного перехода [12]. Когда $\Delta H^{\text{кал}}/\Delta H^{\text{эф}} \cong 1$, структура белковой молекулы представляет собой единую кооперативную систему, разрушение которой осуществляется без каких-либо промежуточных состояний. В тех случаях, когда третичная структура белковой молекулы разделена на независимые или слабо взаимозависимые кооперативные единицы – домены, $\Delta H^{\text{кал}}$ может существенно превосходить $\Delta H^{\text{эф}}$ [13]. Отношение $\Delta H^{\text{кал}}/\Delta H^{\text{эф}} \cong 1$ в пределах ошибки при плавлении токсина CryIIIА в щелочных условиях (рис. 4, 1). Следовательно, при плавлении токсина CryIIIА при pH 9.7–11.0 переход из нативного состояния в денатурированное происходит по принципу “двух состояний” (two state) и белок плавится как единая кооперативная структура. Температура перехода по сравнению с токсином CryIA(c) выше (70°C) и не меняется в интервале значений pH 9.5–11.0. Форма

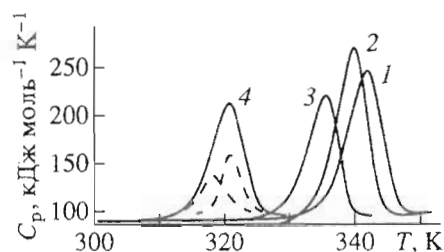


Рис. 4. Кривые зависимости парциальной молярной теплоемкости от температуры и разложение функции теплоемкости для токсина *B. thuringiensis* подвида *tenebrionis*. Измерения проводили в 25 мМ CAPS-буфере, pH 9.7–11.0 (1) и в 0.1 М глицин–HCl-буфере, pH 3.5 (2), 3.0 (3), 2.2 (4). Экспериментальные кривые изображены сплошными линиями. Результаты разложения представлены штриховыми кривыми на примере плавления при pH 2.2.

кривой плавления также остается неизменной. Значение энтальпии перехода равно 670 кДж/моль.

Следует заметить, что плавление 67-кДа токсина CryIIIА нетипично для белка такой молекулярной массы, во-первых, из-за низкого значения энтальпии (680 кДж/моль), тогда как у сравниваемого с ним токсина CryIA(c) и сывороточного альбумина человека (M 67 кДа) она составляет 1100 кДж/моль, а во-вторых, его структура с термодинамической точки зрения представляет собой единый кооперативный домен, в то время как упомянутые выше белки состоят из нескольких доменов. Однако недавно при термодинамическом исследовании α -фетопротеина из сыворотки крови человека (M 69 кДа) обнаружили, что этот белок также плавится как единая кооперативная структура с низкой энтальпией [26, 27], что, вероятнее всего, объясняется утратой одним из доменов жесткой третичной структуры в процессе выделения.

Характер плавления токсина CryIIIА меняется при кислых значениях pH буфера (рис. 4, 2–4). Плавление нативной структуры белка при pH 2.2–3.5 становится сложным процессом, который описывается двумя перекрывающимися по температуре переходами, что указывает на существование двух доменов. Наблюдается зависимость стабильности белка от pH: при снижении pH от 3.5 до 2.2 происходит снижение $T_{\text{пл}}$ от 67 до 47°C и уменьшение энтальпии перехода от 1130 до 800 кДж/моль (табл. 3). Таким образом, структура токсина CryIIIА при pH 2.2–3.5 становится похожей на структуру токсина CryIA(c) при pH 9.7–11.0. Следует отметить, что в кишечнике личинок насекомых отряда Coleoptera среда имеет кислое значение pH [28] в отличие от личинок насекомых отряда Lepidoptera, в кишечнике которых поддерживается pH 10–11 [29]. К выводу о двухдоменной структуре токсина CryIIIА пришли и авторы краткого сообщения [30], опубликованного во

время подготовки этой работы к печати, которые исследовали процесс денатурации этого токсина под действием гуанидин-НСI при pH 3, используя методы флуоресцентного анализа и спектроскопии кругового дихроизма. В работе [30] был сделан вывод, что токсин состоит из двух фрагментов, различающихся стабильностью к денатурирующим условиям. Фрагмент с низкой стабильностью соответствует N-концевому α -спиральному домену, отвечающему за токсическую функцию, тогда как стабильный фрагмент представлен C-концевой половиной молекулы токсина, состоящей из двух β -структурных доменов. Таким образом, хотя, по данным рентгеноструктурного анализа, молекула токсина CryIIIА состоит из трех доменов, установлено, что β -структурные домены ведут себя как единый домен.

Ряд исследователей предлагают модель "зонтика" для взаимодействия токсина *Vt* с фосфолипидной мембраной и образования ион-селективных пор [6, 31]. α -Спиральный домен образован пучком из шести α -спиральных участков, которые окружают расположенную внутри центральную $\alpha 5$ -спираль. Амфипатическая $\alpha 5$ -спираль встраивается в мембрану, при этом ее гидрофобная поверхность обращена к фосфолипидным компонентам мембраны, а гидрофильная формирует пору. В образовании пор принимают участие $\alpha 5$ -спиральные фрагменты нескольких молекул токсина. Остальные α -спиральные участки домена I и β -структурные домены подобно спицам зонтика располагаются на поверхности мембран. Следует заметить, что при такой модели образования пор

α -спиральный домен должен претерпевать существенные конформационные изменения, так как $\alpha 5$ -спираль изначально расположена внутри домена, а в конце оказывается встроенной в мембрану.

δ -Эндотоксины *Vt* относятся к большой группе токсинов, образующих поры в эпителии (колицин, В-фрагмент дифтерийного токсина, α -токсин стафилококков, аэролизин). Колицин имеет в своем составе трехслойный C-концевой домен, образованный из 10 α -спиралей, в котором 2 α -спирали расположены внутри и образуют гидрофобную шпильку [32]. Трансмембранный домен В-фрагмента дифтерийного токсина содержит 9 α -спиралей, 2 из которых неполярны и участвуют во встраивании в мембрану [33]. Для перехода из водного окружения и встраивания α -спиральных шпилек этих белков в мембрану при образовании пор предполагается разворачивание части или всей молекулы [34]. Существование при кислых значениях pH так называемой расплавленной глобулы ("molten globule"), при которой разрушается третичная структура, но сохраняется вторичная, показано для порообразующего полипептида колицина А [35]. Полученные нами результаты плавления δ -эндотоксина CryIIIА-типа свидетельствуют об уменьшении кооперативности и стабильности молекулы белка при кислых значениях pH. Поэтому можно предположить, что для δ -эндотоксина CryIIIА-типа существует аналогичный механизм конформационных изменений при образовании пор.

Возможно, что процесс разворачивания части молекулы δ -эндотоксина может происходить и при щелочных значениях pH, так как кристаллические белки *Vt*, содержащие C-концевой фрагмент, растворяются только при щелочных значениях pH. К этим белкам относятся δ -эндотоксины CryI-, CryII- и CryIV-типа, активные против насекомых, в кишечнике которых высокое значение pH. Однако не исключено, что в этом случае реализуется иной механизм, при котором решающее значение имеет взаимодействие β -структурного домена молекулы токсина со специфическим рецептором на поверхности кишечного эпителия. Следует отметить, что существуют также δ -эндотоксины, которые обладают инсектицидной активностью против личинок насекомых отрядов Coleoptera и Lepidoptera одновременно [36]. Интересно, как реализуется токсический эффект одного и того же белка в совершенно различных условиях.

Таблица 3. Термодинамические параметры тепловой денатурации токсина *B. thuringiensis* подвида *tenebrionis**

pH	$T_{пл}^{инд}$, °C**	$\Delta H^{инд}$ **	$\Delta H^{общ}$ ***
		кДж/моль	
9.7-11.0	70	670 ± 20	670 ± 20
2.2	46	310 ± 20	840 ± 30
	47	530 ± 30	
2.5	51	320 ± 20	850 ± 30
	52	530 ± 30	
3.0	60	300 ± 20	840 ± 30
	62	540 ± 30	
3.5	65	460 ± 20	1130 ± 20
	67	670 ± 20	

* Измерения проводили в 25 мМ CAPS-буфере, pH 9.7-11.0, и в 0.1 М глицин-НСI-буфере, pH 2.2-3.5. Точность измерения температур составляет ±0.3°C.

** Температуры плавления и величины энтальпии получены путем разложения экспериментальных кривых на составляющие (см. рис. 4).

*** Величины энтальпии рассчитаны из площади под экспериментальными кривыми.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуру *B. thuringiensis* подвида *kurstaki* HD-73 выращивали 3-4 сут при 28°C на питательном агаре до спорообразования и лизиса культуры. Спорокристаллическую массу смывали раствором

1 М NaCl, содержащим 1 мМ PMSF, осаждали центрифугированием и 2 раза отмывали от соли, суспендируя в дистиллированной воде с 1 мМ PMSF. Водную суспензию спор и кристаллов фракционировали в 67% растворе верографина [37]. Фракцию кристаллов собирали и отмывали 2 раза дистиллированной водой от верографина.

Очищенные кристаллы растворяли в 50 мМ Na₂CO₃, рН 9.5, с 10 мМ дитиотреитом (буфер А) при 37°C в течение 1 ч, отделяли нерастворившийся материал центрифугированием, а супернатант, содержащий протоксин, диализовали против 25 мМ CAPS-буфера, рН 9.7–11.0, в течение ночи при 4°C.

Гомогенность препаратов белка, используемых для плавления, проверяли методом диск-электрофореза в вертикальных пластинах ПААГ, используя систему Лэммли [38]. В качестве разделяющего геля применяли линейный градиент ПААГ (10–15%).

Получение токсина *B. thuringiensis* подвида *kurstaki* HD-73. К раствору протоксина в буфере А добавляли трипсин (Spofa, ЧСФР) в соотношении 1 : 10 по весу и инкубировали 2 ч при 37°C. Полученную суспензию наносили на колонку с сефадексом G-200, уравновешенным 100 мМ Na₂CO₃, рН 10.0. Фракции, содержащие токсин, собирали, концентрировали на мембране PM-30 (Amicon, США) и диализовали против 25 мМ CAPS-буфера.

Культивирование *B. thuringiensis* подвида *tenebrionis* осуществляли в среде Ches [39] по методу [37]. Кристаллы выделяли, используя ступенчатый градиент растворов сахарозы (67, 72 и 82%) в дистиллированной воде [40]. Очищенные кристаллы растворяли в буфере А при 37°C в течение 1 ч, отделяли нерастворившийся материал центрифугированием, а супернатант, содержащий токсин, диализовали против 25 мМ CAPS-буфера. При исследовании структуры δ-эндотоксина СгуША при кислых значениях рН кристаллы растворяли в 0.1 М глицин-НСl-буфере (рН 2.6) при 37°C в течение 1 ч, центрифугировали и супернатант диализовали против 0.1 М глицин-НСl-буфера, рН 2.2–3.5.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [41], используя бычий сывороточный альбумин для построения калибровочной кривой. Точность измерения составляла ±0.05 мг/мл.

Калориметрические измерения осуществляли с помощью прецизионного сканирующего микрокалориметра ДАСМ-5 (НПО "Биопробор", Пушкино) с объемом ячейки 0.46 мл, скоростью сканирования 1 К/мин и избыточным давлением 2.5 атм. Плавление белков проводили в интервале рН 9.7–11.0 с использованием 25 мМ CAPS-буфера и в 0.1 М глицин-НСl-буфере, рН 2.2–3.5. Концентрация белка составляла 1.5–4.5 мг/мл. Парциаль-

ную молярную теплоемкость и анализ кривых плавления проводили по стандартной процедуре [42]. Данные обрабатывали с помощью программы Scal. 2.

Финансирование работы частично осуществлялось за счет средств, выделяемых Международным научно-техническим центром (проект № 363).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aronson A.I., Beckmann W., Dunn P. // Microbiol. Rev. 1986. V. 50. P. 1–24.
2. Whiteley H.R., Schnepf H.E. // Ann. Rev. Microbiol. 1986. V. 40. P. 549–576.
3. Lereclus D., Delecluse A., Lecadet M.-M. // *Bacillus thuringiensis* an Environmental Biopesticide: Theory and Practice / Eds P. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs. Chichester: J. Wiley, 1993. P. 37–69.
4. Feitelson J.S., Payne J., Kim L. // Bio/Technology. 1992. V. 10. P. 271–275.
5. Bulla L.A., Bechtel D.B., Kramer K.J. // CRC Crit. Rev. Microbiol. 1980. V. 8. P. 147–204.
6. Li J., Carrol J., Ellar D.J. // Nature (London). 1991. V. 353. P. 815–821.
7. Hoefte H., Whiteley H.R. // Microbiol. Rev. 1989. V. 53. P. 242–255.
8. Gill S.S., Cowles E.A., Pietrantonio P.V. // Annu. Rev. Entomol. 1992. V. 37. P. 615–636.
9. Walters F.S., Slatin S.L., Kulesza C.A., English L.H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 196. P. 921–926.
10. Cummings C.E., Armstrong G., Hodgman T.C., Ellar D.J. // Mol. Memb. Biol. 1994. V. 11. P. 87–92.
11. von Tersch M.A., Slatin S.L., Kulesza C.A., English L.H. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 3711–3717.
12. Privalov P.L. // Adv. Prot. Chem. 1979. V. 33. P. 167–241.
13. Privalov P.L. // Adv. Prot. Chem. 1982. V. 35. P. 1–104.
14. Kronstad J.W., Whiteley H.R. // J. Bacteriol. 1984. V. 160. P. 95–102.
15. Bietlot H., Carey P.R., Choma C. // Biochem. J. 1989. V. 260. P. 87–91.
16. Chestukhina G.G., Kostina L.I., Michailona A.L., Tyurin S.A., Klepikova F.S., Stepanov V.M. // Arch. Microbiol. 1982. V. 11. P. 159–162.
17. Wabiko H., Yasuda E. // Microbiology. 1995. V. 141. P. 629–639.
18. Choma C.T., Surewicz W.K., Carey P.R., Pozsgay M., Raynor T., Kaplan H. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 189. P. 523–527.
19. Ogiwara K., Indrasith L.S., Asano S., Hori H. // J. Invert. Path. 1992. V. 60. P. 121–126.
20. Choma C.T., Kaplan H. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 10971–10977.
21. Choma C.T., Surewicz W.K., Kaplan H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 179. P. 933–938.
22. Ковригин Е.Л., Куркутадзе М.Д., Потехин С.А. // Биофизика. 1996. Т. 41. Вып. 3. С. 549–553.

23. Convents D., Houssier C., Lasters I., Lauwerwys M. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 1369–1375.
24. Bernhard K. // FEMS Microbiol. Lett. 1986. V. 33. P. 261–265.
25. Carroll J., Li J., Ellar D.J. // Biochem. J. 1989. V. 261. P. 99–105.
26. Uversky V.N., Kirkitadze M.D., Narizhneva N.V., Potekhin S.A., Tomashevsky A.Yu. // FEBS Lett. 1995. V. 364. P. 165–167.
27. Киркитадзе М.Д., Нарижнева Н.В., Томашевский А.Д., Уверский В.Н., Потехин С.А. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 408–414.
28. Koller C.N., Bauer L.S., Hollingworth R.M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992. V. 184. P. 692–699.
29. Crawford D.N., Harvey W.R. // J. Exp. Biol. 1988. V. 137. P. 277–286.
30. Stepanov V.M., Zalunin I.A., Ort P., Kriger I. // Molecular Responses of Plant to Biotic and Abiotic Stresses / Eds T. Pehu, S. Somersalo. Helsinki: Sympos. Proc. 1996. P. 38–39.
31. Gazit E., Shai Y. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 2571–2578.
32. Parker M.W., Pattus F., Tucker A.D., Tsernoglou D. // Nature (London). 1989. V. 337. P. 93–96.
33. Choe S., Bennet M.J., Fujii G. // Nature (London). 1992. V. 357. P. 216–222.
34. London E. // Mol. Microbiol. 1992. V. 6. P. 3277–3282.
35. van der Goot F., Gonzalez-Manas J.M., Lakey J.H., Pattus F. // Nature (London). 1991. V. 354. P. 408–410.
36. Taylor R., Tippett J., Gibb G., Pells S., Pike D., Jordan L., Ely S. // Mol. Microbiol. 1992. V. 6(9). P. 1211–1217.
37. Mahillon J., Delcour J. // J. Microbiol. Methods. 1984. V. 3. P. 69–76.
38. Laemmli U.K. // Nature (London). 1970. V. 227. P. 680–685.
39. Chestukhina G.G., Zalunin J.A., Kostina L.A., Kotova T.S., Katrukha S.P., Stepanov V.M. // Biochem. J. 1980. V. 187. P. 457–460.
40. Thomas W.E., Ellar D.J. // J. Cell Sci. 1983. V. 60. P. 181–197.
41. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
42. Privalov P.L., Potekhin S.A. // Methods Enzymol. 1986. V. 131. P. 4–51.

Thermodynamic Analysis of the Domain Organization of *Bacillus thuringiensis* Toxins

O. I. Loseva*, M. D. Kirkitadze**, A. P. Dobritsa*, and S. A. Potekhin**

*State Research Center of Applied Microbiology, pos. Obolensk, Moscow oblast, 142279 Russia

**Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

Abstract—The structure of δ -endotoxins CryIA(c) and CryIIIA from *Bacillus thuringiensis* was studied by differential scanning microcalorimetry. The analysis of molecular melting showed that the *N*- and *C*-terminal halves of the CryIA(c) protoxin from *B. thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-73 are thermodynamically independent subunits, with the *C*-terminal fragment being denatured at a much lower temperature than the *N*-terminal fragment. The tertiary structure of the *N*-terminal fragment undergoes no changes during the protoxin–toxin transition. The melting of the native structure of CryIA(c) at pH 9.7–11.0 suggests that it consists of two domains. In CryIIIA from *B. thuringiensis* subspecies *tenebrionis*, the transition from the native to denatured state under alkaline conditions (pH 9.7–11.0) proceeds by the “two state” principle; i.e., the protein melts as one cooperative domain. The melting of the CryIIIA toxin at pH 2.2–3.5 is described by two transitions overlapping by temperatures, indicating the presence of two domains.

Key words: *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins, microcalorimetry, tertiary structure.