

Interactions of transgenic insecticidal Cry1Ab protein with soil constituents

adsorption and its effects on transport and activity

Doctoral Thesis

Author(s):

Madliger, Michael

Publication date:

2011

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006646035>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss ETH No. 19542

Interactions of transgenic insecticidal Cry1Ab
protein with soil constituents:
Adsorption and its effects on transport and activity

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
MICHAEL MADLIGER
Dipl. Natw. ETH
born January 14, 1975
citizen of Langenthal, BE, Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. René P. Schwarzenbach
Prof. Dr. Hans M. Textor
Prof. Dr. Joel A. Pedersen
Dr. Michael Sander

2011

Summary

Bt crops are genetically modified to carry the trait of insect resistance by expressing transgenes from *B. thuringiensis* that code for insecticidal Cry proteins. Via various pathways, *Bt* crops release these proteins to agricultural soils. Adsorption is a key process that governs transport, bioavailability, and degradation of Cry proteins in soils. The major goals of this work were (i) to elucidate the adsorption mechanism of Cry1Ab – a commercially important Cry protein – to polar charged surfaces in soils using quartz (SiO₂) as a model, (ii) to assess the activity of Cry1Ab adsorbed to soils and major mineral and organic soil constituents, and (iii) to evaluate commonly employed methods to detect soil-adsorbed Cry proteins.

In a *first* step, the factors governing adsorption of Cry1Ab to negatively charged quartz (SiO₂) and positively charged poly-*L*-lysine (PLL) were investigated at pH 5-8 and constant ionic strength of 50 mM (NaCl) using two *in situ* surface adsorption techniques. Rates and extents of adsorption decreased to SiO₂ and increased to PLL as the pH increased above the isoelectric point (IEP) of Cry1Ab. Inversion of the pH dependence of adsorption upon inversion of the sorbent surface charge demonstrated that electrostatics governed Cry1Ab-sorbent interactions. However, Cry1Ab adsorption to SiO₂ was reversible, suggesting that the electrostatic interactions were weak and that Cry1Ab did not undergo extensive irreversible conformational changes on SiO₂. High conformational stability of Cry1Ab in adsorbed states was supported by supply rate-independent extent of adsorption of Cry1Ab to apolar gold.

In a *second* step, using the same experimental techniques, the ionic strength dependence of Cry1Ab adsorption to SiO₂ and PLL was investigated. Adsorption rates and extents to sorbents that carried the same net charge as the protein (SiO₂ at pH > IEP_{Cry1Ab} and PLL at pH < IEP_{Cry1Ab}) increased with decreasing *I*. This *I*-dependence suggested that Cry1Ab-sorbent electrostatic interactions were not governed by the protein net charge but instead by charged patches on the Cry1Ab surface. This patch controlled electrostatic attraction (PCEA) is supported by the highly non-uniform surface charge distribution of Cry1Ab, as shown by modeling of the surface potentials. Consistent with PCEA, Cry1Ab desorption from SiO₂ at pH >

IEP_{Cry1Ab} increased with increasing pH and I . Weak Cry1Ab-SiO₂ PCEA above pH 7 resulted in reversible, concentration dependent adsorption.

In a *third* step, solution depletion and column transport studies were conducted to study Cry1Ab adsorption to heterogeneous SiO₂ particles at low, environmentally relevant Cry1Ab concentrations, and under various transport regimes. These conditions more closely resembled those in real soils, as compared to the conditions of the *in situ* adsorption technique measurements used in the previous steps. Consistent with the previous results, Cry1Ab-SiO₂ interactions were dominated by patch-controlled electrostatic attraction (PCEA), as evident from increasing Cry1Ab adsorption to SiO₂ with decreasing I at pH at which both Cry1Ab and SiO₂ were net negatively charged and from increasing Cry1Ab desorption upon increasing the solution pH. A fraction of adsorbed Cry1Ab molecules desorbed only slowly, indicating particularly strong Cry1Ab-SiO₂ interactions. Modeling of Cry1Ab breakthrough curves suggested that the surface heterogeneity of SiO₂ particles gave rise to this phenomenon.

In an additional step, Cry1Ab spike-recovery experiments were conducted to assess the experimental variability in response factors (RF equals the ratio of added versus recovered protein mass) for soil-adsorbed Cry1Ab by an *in vitro* extraction-immunological detection method and an *in vivo* bioassay method using *Ostrinia nubilalis*. Extraction buffers with high pH and I containing nonionic detergent resulted in highest RF_{vitro} , likely due to attenuation of Cry1Ab-sorbent electrostatic interactions and of the hydrophobic effect. At the same time, RF_{vitro} were always smaller than unity. Decreasing RF_{vitro} with increasing Cry1Ab-soil contact time reflected increasing attractive interactions over time. In comparison to the *in vitro* detection, the *in vivo* detection was superior as it resulted in $RF_{vivo} \approx 1$ for Cry1Ab from soils and from major soil constituents. These findings suggest the use of the *in vivo* method in the analysis of Cry1A proteins in soil samples. Furthermore, the bioassays demonstrate that Cry1Ab retains its insecticidal activity when adsorbed to soils and major soil constituents. Adsorption to the soil matrix is therefore not expected to result in inactivation of Cry1Ab.

Zusammenfassung

Bt-Pflanzen sind dahingehend gentechnisch verändert, dass sie resistent sind gegen Schadinsekten, indem die Pflanzen Gene von *B. thuringiensis* exprimieren, welche für insektizide Cry-Proteine codieren. Diese Cry-Proteine gelangen aus der Pflanze in die Landwirtschafts-Böden. Die Adsorption der Cry-Proteine ist ein Schlüssel-Prozess, weil er entscheidend ist für Transport, Bioverfügbarkeit und Abbau dieser Proteine. Die wichtigsten Ziele dieser Arbeit waren, (i) den Adsorptionsmechanismus von Cry1Ab – einem kommerziell wichtigen Cry-Protein – an polare geladene Oberflächen in Böden zu erklären, indem Quarz (SiO_2) als Modelloberfläche verwendet wurde, (ii) die Aktivität von an Böden und wichtige Bodenbestandteile adsorbiertem Cry1Ab zu bestimmen, (iii) gebräuchliche Methoden zur Detektion von in Böden adsorbiertem Cry1Ab zu evaluieren.

In einem *ersten* Schritt wurden die Faktoren bestimmt, die die Adsorption von Cry1Ab an negativ geladenen Quarz (SiO_2) und positiv geladenes Poly-*L*-Lysin (PLL) dominieren bei pH 5 bis 8 und einer gleichbleibenden Ionenstärke von 50 mM (NaCl). Dazu wurden zwei *in situ* Techniken verwendet, mit denen Adsorption von Proteinen direkt an der Oberfläche gemessen werden kann. Adsorbierte Mengen und Adsorptionsraten sanken an SiO_2 und stiegen an PLL mit steigendem pH. Die umgekehrte pH-Abhängigkeit der Adsorption auf diesen gegensätzlich geladenen Oberflächen zeigte, dass die Cry1Ab-Sorbent-Interaktionen durch Elektrostatik dominiert wurden. Die Adsorption von Cry1Ab an SiO_2 war reversibel, was andeutet, dass die elektrostatische Anziehung schwach war und Cry1Ab keinen erheblichen irreversiblen Konformations-Änderungen unterworfen war an der SiO_2 -Oberfläche. Auch die ratenunabhängige maximale Oberflächenbelegung von irreversibel an Gold adsorbiertem Cry1Ab deutete auf eine hohe Konformations-Stabilität von Cry1Ab hin.

In einem *zweiten* Schritt wurde mit den gleichen *in situ*-Techniken die Ionenstärke-Abhängigkeit der Adsorption von Cry1Ab an SiO_2 und PLL untersucht. Adsorptionsraten und adsorbierte Mengen an Sorbenten mit gleicher Ladung wie die Cry1Ab-Nettoladung (SiO_2 bei $\text{pH} > \text{IEP}_{\text{Cry1Ab}}$ ($\text{IEP}_{\text{Cry1Ab}}$), PLL bei $\text{pH} < \text{IEP}_{\text{Cry1Ab}}$) stiegen an mit abnehmender Ionenstärke. Diese Ionenstärke-

Abhängigkeit deutete darauf hin, dass die elektrostatischen Interaktionen zwischen Cry1Ab und den Sorbenten durch einzelne gegensätzlich zum Sorbenten geladenen Stellen an der Cry1Ab-Oberfläche dominiert wurden und nicht durch die Cry1Ab-Nettoladung. Diese „Patch Controlled Electrostatic Attraction“ (PCEA) ist in Übereinstimmung mit der nicht einheitlichen Verteilung der Oberflächenladung von Cry1Ab, wie die Modellierung des elektrischen Oberflächenpotentials des Proteins gezeigt hat. In Übereinstimmung mit PCEA stiegen Cry1Ab-Desorptionsraten von SiO₂ bei pH > IEP_{Cry1Ab} mit steigendem pH und steigender Ionenstärke. Oberhalb pH 7 resultierten schwache Cry1Ab-SiO₂-Interaktionen in reversible, konzentrationsabhängige Adsorption.

In einem *dritten* Schritt, wurde die Adsorption von Cry1Ab an unterschiedliche heterogene SiO₂-Partikel untersucht in umweltrelevant tiefen Konzentrationen unter verschiedenen hydrodynamischen Transport-Bedingungen (Säulentransport und Adsorption an suspendierte SiO₂-Partikel). Diese Systeme sind näher an den Bedingungen, wie sie in Böden vorherrschen, verglichen mit den *in situ*-Techniken, wie sie in den vorhergehenden Schritten verwendet wurden. In Übereinstimmung mit den obenstehenden Resultaten war die Adsorption durch PCEA bestimmt: Auch bei pH > IEP_{Cry1Ab} stiegen adsorbierte Menge und Adsorptionsraten mit sinkender Ionenstärke, und die Desorptionsraten stiegen mit steigendem pH. Ein Teil des Cry1Ab desorbierte nur langsam. Die Modellierung der Säulentransport-Experimente deuteten darauf hin, dass die Heterogenität der Oberfläche für dieses langsame Desorption verantwortlich ist.

In einem zusätzlichen Schritt, wurden Adsorptions-Wiederfindungs-Experimente durchgeführt, um die Variabilität in der Wiederfindung (Verhältnis von adsorbierter Menge zu detektierte Menge Cry1Ab) von an Boden adsorbiertem Cry1Ab zu bestimmen mit einer (*in vitro*) Extraktions-Immunodetektions-Methode und einer (*in vivo*) Biotest-Methode mit *O. nubilalis* (Maiszünsler) als Test-Organismus. Die Wiederfindung in der *in vitro*-Methode war am höchsten mit Puffern, die einen hohen pH und hohe Ionenstärke hatten und ein nicht-ionisches Detergens enthielten, wahrscheinlich aufgrund der Verminderung elektrostatischer Interaktion und des hydrophoben Effekts. Die Wiederfindung mit der *in vitro*-Methode war nicht vollständig und sank mit längerdauernder Cry1Ab-Adsorption vor der Extraktion. Dagegen war die Wiederfindung mit der *in vivo*-Methode vollständig für an Böden

und Bodenbestandteile adsorbiertes Cry1Ab, und war signifikant höher als die Wiederfindung mit der *in vitro*-Methode. Aufgrund der Resultate scheint die Verwendung der *in vivo*-Methode geeignet zu sein für die Detektion von Cry1A-Proteinen in Böden. Zudem deuten diese Resultate darauf hin, dass die Bioaktivität von in Böden adsorbiertem Cry1Ab nicht vermindert ist.