

03088 10
215
1997

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO**

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR

TESIS

**Mutagénesis sitio-dirigida de una región hidrofóbica de la toxina
Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* spp *berliner*.**

**Tesis que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
presenta
Roberto Meza Romero**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dedico este fruto de mi esfuerzo constante a
Saritá, alma de mi vida y razón de mi amor.**

Agradecimientos.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Alejandra Bravo y al Dr. Rodolfo Quintero no solo por la oportunidad que me dieron de realizar este trabajo en su laboratorio, sino también por la dirección del mismo y por todos esos consejos que de alguna manera han contribuido a mi desarrollo profesional y a mi crecimiento como persona.

Estoy agradecido con los compañeros y las compañeras de mi laboratorio y de otros por todas esas interacciones académicas y no académicas que me permitieron enterarme de los puntos de vista tan diversos que un grupo puede tener con respecto al quehacer científico.

Quiero agradecer muy particularmente a Polo por todas las enseñanzas que tuve en cuanto a las proteínas, su purificación y su trato hacia ellas. Su conocimiento de las técnicas electroforéticas fueron importantes para el desarrollo de este trabajo.

A mi Padre y a mi Madre, a mis hermanos y a mis hermanas, sobrinos y sobrinas.

A mis abuelas y, a la memoria de mis abuelos.

A Grandma, Ron, Karen, Joel y Rachel, quienes arribaron recientemente a mi vida.

A Germán Aguilar y Anita Luterman, a María Luisa Tabche, Claudia Díaz, Osvaldo López y Raul Noguéz.

Con el jurado Integrado por Miguel Lara, Guadalupe Espín, Eduardo Horjales, Humberto Flores, Lorenzo Segovia, y Edgardo Escamilla, estoy en deuda por las sugerencias que hicieron y que contribuyeron al enriquecimiento de ideas en este trabajo.

Miguel Lara, Edgardo Escamilla, Federico Sánchez y Guadalupe Espín participaron intensamente en mi formación académica durante una buena parte de mis estudios de posgrado. Agradezco a ellos y a ella su participación en mi superación.

A Myriam Ortiz, los Laras (Alberto, Elia, Sonia, Lorena, Lulú, Gaby, y Araceli) y a los Soberones (Neto, Marina, Humbe, Gabriel Moreno) y a los no Soberones (Katy, Daniel, Sonia y Francisco Javier) por su apoyo y tolerancia.

A la Familia Camas-López, por la solidaridad y por el apoyo que recibí de ellos.

También quiero extender mi agradecimiento a Sergio Blancas y Alejandro Uribe por su participación en este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer al CONACyT y a PADEP por el apoyo económico que me dio durante una parte de mis estudios de posgrado.

CONTENIDO

1. Introducción	2
Insecticidas químicos	2
Control biológico y bioinsecticidas	3
Bacillus	
2. Antecedentes	5
<i>B. thuringiensis</i>	5
Las δ -endotoxinas	6
Diversidad génica y clasificación de las δ -endotoxinas	8
Estructura de la toxina	10
Regiones conservadas en las δ -endotoxinas	20
Modo de acción	22
El intestino medio de las larvas de los insectos lepidópteros	22
El papel del "receptor"	25
Regiones conservadas en las δ -endotoxinas	
El receptor	23
Formación del poro iónico	29
3. Objetivos	30
4. Material y métodos.	33
Reactivos	33
Cepas bacterianas y plásmidos	33
Medios de cultivo	34
Oligonucleótidos	34
Reacción en cadena de la polimerasa	34
Técnicas experimentales de biología molecular	35
Mutagénesis y subclonación de las mutaciones	36
Transformación y expresión de las construcciones en <i>Bt</i> y en <i>E. coli</i>	38
Purificación y solubilización de las proteínas	38
Marcaje de las proteínas con biotina	40
Electroforesis	40
Producción de anticuerpos específicos contra la proteína Cry1Ab y experimentos de inmunodetección	41
Experimentos de unión y competencia en vesículas de la microvellosidad apical del intestino medio de los insectos	41
Experimentos en bicapas lipídicas planares y de fluorescencia	42
Determinación de la secuencia de nucleótidos	42
Determinación de la concentración de proteínas	43
5. Resultados	43
Expresión del dominio I de la proteína Cry1Ab de <i>Bt berliner</i>	43
Capacidad formadora de poro	45
Toxicidad de la δ -endotoxina tipo silvestre	46
Estabilidad intracelular de las proteínas mutantes y silvestre	46
Unión específica de las proteínas insecticidas	49
6. Discusión	50
7. Conclusiones	61
8. Perspectivas	62
9. Resumen	63
10. Referencias	65
Artículo original	

1. Introducción.

Insecticidas químicos.

Existen en la naturaleza, una gran cantidad de organismos como microbios, insectos, ácaros y malezas que compiten con el ser humano por los diversos satisfactores, sobretodo por alimento y abrigo. A estos competidores, generalmente artrópodos y ácaros, se les ha tratado de matener en niveles de población bajos, de tal manera que ya no representen un peligro en la competencia, o simplemente se les ha exterminado con el uso de compuestos químicos nada selectivos. Algunos artrópodos (como los insectos pertenecientes a las órdenes lepidópteros, y coleópteros) representan una porción importante de los organismos catalogados como plagas agrícolas. El indiscriminado y diseminado uso de estos químicos sintéticos como el DDT para el control de las plagas en los campos agrícolas, ha atraído la atención pública debido a los riesgos causados por la presencia de esos en productos que ingerimos diariamente (Nakamura, 1994). Además, su aplicación ha sido como un experimento a gran escala en donde el resultado ha sido la selección natural de insectos resistentes a agentes químicos de importancia toxicológica para los seres humanos y la exterminación de organismos útiles susceptibles (King, 1996). Se ha demostrado que estos compuestos son altamente nocivos para diversas especies de vertebrados, incluida la especie humana, ya que interfieren con procesos fisiológicos fundamentales de los organismos. Los canales iónicos son los sitios blancos primarios de varios compuestos insecticidas naturales y sintéticos. Por ejemplo, los canales de sodio neuronales sensibles a el voltaje son el sitio blanco para el DDT y los piretroides, el veratrum y las N-alkilamidas. Recientemente, las proteínas

neurotóxicas de los venenos de escorpiones, algunos de los cuales atacan específicamente canales de sodio de insectos, han sido modificados como biopesticidas por medio de experimentos de ingeniería genética en baculovirus (Bloomquist 1996). Las pirazolininas sintéticas también afectan a los canales de sodio neuronales, aunque algunos miembros de este grupo afectan también canales de calcio neuronales. Los rianoides también han encontrado uso como insecticidas ya que inducen contracturas musculares por activación irreversible de canales liberadores de calcio en el retículo sarcoplásmico. Los arilheterociclos, como el endosulfán y el flupronil, son potentes convulsivos e insecticidas que bloquean los canales de cloro activados por GABA en neuronas. En contraste, las avermectinas actúan los canales de cloro activados por el voltaje y por ligandos lo cual conduce a parálisis (Bloomquist 1996). Por otro lado, también se ha observado que los ecdisteroides están involucrados en el bloqueo de los canales de potasio tanto neuronales como musculares. Actualmente las autoridades públicas y las personas dedicadas a las tareas científicas están tratando de encontrar alternativas compatibles con el medio ambiente para el manejo adecuado de estos competidores.

Control biológico y bioinsecticidas.

Por esta razón, se ha trabajado mucho en la búsqueda y en el uso de estrategias biológicas alternativas compatibles para el control de plagas. El manejo integrado de plagas (MIP) consolida todas las técnicas de control disponibles dentro de un programa unificado para el manejo de poblaciones de plagas. El objetivo es prevenir el daño económico causado por éstas y disminuir los efectos laterales adversos para los ecosistemas (Badri *et al.*,

1996). Esto quiere decir que en ocasiones se echa mano de plaguicidas químicos sintéticos en combinación con los agentes naturales como un último recurso para el control efectivo. El control biológico es una parte fundamental en el MIP y se puede definir como el manejo de enemigos naturales (depredadores, parásitos, y patógenos de plagas) y enemigos benéficos selectos y sus productos para reducir las poblaciones de las plagas y sus efectos (King *et al.* 1988). Una estrategia promisoría es el uso de agentes como virus, hongos, animales y bacterias (o sus productos). Como parte importante del control biológico, el control microbiano se define como el uso de los microbios o de sus productos para el control de insectos plaga (Badli *et al.*, 1996). Aquí también se ha incluido el uso de microorganismos como agentes de control que existen naturalmente, agentes introducidos y la aplicación de microorganismos y/o sus productos como insecticidas microbianos. En la naturaleza los virus, los hongos, las bacterias y los protozoarios causan epizootias en poblaciones naturales de insectos, lo cual ayuda a la regulación natural. Se conocen alrededor de 1500 microorganismos entomopatógenos con potencial en el control microbiano de las poblaciones de los insectos plagas ya sean éstas agrícolas, forestales, ornamentales o de salud. Cientos de especies de bacterias están asociadas con insectos (Badli *et al.* 1996). Sin embargo, las bacterias entomopatógenas de mayor importancia se encuentran en el orden eubacterial y específicamente en la familia Bacillaceae y en el género *Bacillus*. Las bacteria patógenas para insectos se han clasificado en dos grupos atendiendo a su ciclo de vida: las que forman esporas y las que no forman esporas. De las bacterias entomopatógenas, el potencial más alto para el desarrollo de insecticidas microbianos pertenece

a las bacterias que producen esporas. Las bacterias del género *Bacillus* contiene algunas especies que se caracterizan por la producción de cuerpos de inclusión de naturaleza proteica y que frecuentemente es el principio activo de la actividad biocida hacia diferentes especies de eucariontes superiores. Es por esta razón por la que se le ha dado extrema importancia a su potencial uso como agentes de control biológico. Entre ellas están organismos pertenecientes a las especies *Bacillus thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* y *B. morati*.

Mientras que la mayoría son poco conocidas, otras como la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* han sido estudiados detalladamente.

2. ANTECEDENTES.

Bacillus thuringiensis.

Entre los agentes biológicos más ampliamente usados está el hecho a base de bacterias de la especie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Esta es la especie de bacteria estudiada más extensamente de un grupo de bacterias gram-positivas, que incluye a *Bacillus sphaericus* entre otras, y que se diferencian de las demás especies de *Bacillus* en base a la producción de un cristal insecticida durante el proceso de esporulación. Después de la lisis de la célula madre, la espora y la inclusión se liberan en el suelo, el filoplano, los estanques, las corrientes, etc. los cuales son hábitats alimenticios de las larvas de varias especies de insectos. *Bt* es un organismo ampliamente distribuido en la naturaleza y se ha encontrado asociado a insectos muertos, en polvo de granos, sobre las plantas y en el suelo de diversos hábitats desde el bosque tropical lluvioso hasta la tundra ártica.

Desde 1960 se ha usado *Bt* para el control de pestes agrícolas y forestales (revisado en Feitelson *et al.*, 1992) y en un Programa muy exitoso de la Organización Mundial de la Salud para el control de los vectores de la Oncocercosis (Guillet *et al.*, 1990, citado en Knowles, 1994).

Las δ -endotoxinas. *Bt* produce varios tipos de toxinas (Faust y Bulla, 1982; Whiteley y Schnepf, 1986): **a).** las α -exotoxinas o exotoxinas termolábiles y que son probablemente lecitinasas tipo C, **b).** las β -exotoxinas, la cuales son toxinas que funcionan como análogas del ATP y **c).** las δ -endotoxinas, proteínas que se acumulan en un cristal o cuerpo de inclusión. Este puede estar formado por una o más de una cadena polipeptídica cuya masa molecular varía entre 40 y 130 kilodaltones (kDa.)

Las δ -entoxinas forman dos familias multigénicas, las *cyt* y las *cry* (Hofte y Whiteley, 1989; Knowles, *et al.*, 1990). Las δ -endotoxinas Cyt son selectivamente letales a las larvas de los insectos dípteros (Armstrong *et al.*, 1985; Chilcott y Ellar, 1988; Koni y Ellar, 1993) como los mosquitos (vectores de la malaria) y las moscas prietas (vectores de la ceguera parasitaria presente en las zonas tropicales del planeta). Las proteínas Cyt A (el producto del gen *cyt A*) están presentes en las inclusiones parasporales de *Bt* spp. *israelensis* junto con otras tres δ -endotoxinas Cry (Hofte y Whiteley, 1989). CytB, el producto del gen *cyt B*, se ha encontrado en las inclusiones parasporales de *Bt* spp. *kyushuensis* donde es la única proteína responsable de la actividad mosquitocida (Ishii y Ohba, 1994).

Recientemente se ha descrito la estructura tridimensional de esta proteína y esto demostró que no hay alguna relación estructural de las proteínas Cyt con las proteínas Cry (Li, *et al.*, 1996). Ambas proteínas, CytA y CytB muestran sinergismo con las δ -endotoxinas Cry específicas para dípteros.

In vitro, las δ -toxinas Cyt son citolíticas para las células de origen díptero y a concentraciones superiores también pueden dañar a otro tipo de células como los eritrocitos (Gill *et al.*, 1992; Drobniowski *et al.*, 1988)

Inicialmente, se había encontrado que los genes miembros de la familia *cry*, producen proteínas que eran específicamente nocivas contra larvas de los insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros. Los ácaros, las cucarachas, las hormigas y los nemátodos, y aparentemente algunos protozoarios se han incluido últimamente a la lista de víctimas. Las δ -endotoxinas son el principio activo de *Bt* que es tóxico para los insectos. Se sabe que estas proteínas son en realidad protoxinas que necesitan ser proteolíticamente cortadas en posiciones específicas por proteasas presentes en el intestino medio larval. Solo una vez procesadas pueden ejercer su actividad nociva. Choma *et al.*, (1991) han sugerido que las toxinas sufren un gran cambio conformacional después de la activación. Después del procesamiento de las protoxinas de 70 ó 130 kDa, se genera un péptido de 63 a 65 kDa cuya característica estructural fundamental es su resistencia a proteólisis adicional.

Se ha mostrado que no todas las δ -endotoxinas de *Bt* tienen actividad insecticida contra las plagas conocidas: por ejemplo, en estudios realizados, cerca del 40% de las cepas productoras de cristales fueron no-tóxicas para los insectos probados (Martín y Travers, 1989). Las características más importantes de las δ -endotoxinas producidas por *Bt* es su especificidad (ya que no es tóxica contra los mamíferos, las aves o inclusive a algunos insectos benéficos como las abejas) y la baja tasa de desarrollo de resistencia a este bioinsecticida por organismos susceptibles (Nakamura, 1994). Las toxinas individuales usualmente solo matan las

etapas larvarias de ciertas especies dentro de un solo orden de insectos. Algunas subespecies de *Bt* pueden sintetizar cuatro o más clases diferentes de δ -endotoxinas. Los principales órdenes de insectos afectados por *Bt* son los lepidópteros (orugas de mariposas y polillas), dípteros (larvas de mosquitos y moscas negras) y coleópteros (larvas y adultos de escarabajos). Sin embargo, el estrecho espectro de actividad y la no persistencia en el ambiente de las δ -endotoxinas aunque ventajosas ecológicamente, se perciben como problemas desde el punto de vista comercial.

A pesar del uso diseminado de los insecticidas a base *Bt*, actualmente solo se han reportado unos cuantos casos de resistencia principalmente entre los lepidópteros y sobretodo en regiones donde se han administrado aplicaciones fuertes y repetidas durante todo el año (Badii, *et al.*, 1996). No se conocen surgimientos de organismos resistentes dentro de los otros órdenes susceptibles a las toxinas de *Bt*.

Diversidad génica y clasificación de las δ -endotoxinas. En los 15 años que han transcurrido desde que fue clonado el primer gen de δ -endotoxina de *Bt* se ha determinado la secuencia de alrededor de 60 genes diferentes que codifican para otras tantas proteínas. Estos genes pueden estar localizados en el cromosoma o en los megaplásmidos presentes en los bacilos (Aronson, 1993). Hofte y Whiteley (1989), establecieron un sistema de clasificación de las proteínas insecticidas en base a su espectro de acción y al grado de similitud de la estructura primaria deducida a partir de la secuencia nucleotídica de los genes descubiertos. Con este sistema de clasificación las δ -endotoxinas quedaron agrupadas en 4 grandes clases:

las CryI, con una masa molecular de 130 kDa, son proteínas nocivas contra lepidópteros, las CryII (60-70 kDa) contiene proteínas con actividad dual contra lepidópteros y dípteros, las CryIII (60-70 kDa) están compuestas de proteínas tóxicas para larvas de insectos coleópteros y las proteínas CryIV, de 60-130 kDa, que incluyen a proteínas letales contra dípteros. Sin embargo, este sistema de clasificación ha probado ser impráctico a medida que se han ido describiendo nuevos genes con capacidades insecticidas novedosas y con víctimas diferentes, así como también con masas moleculares diversas. Esto ocasionó que se haya buscado un sistema más apropiado para clasificar las diferentes secuencias para las δ -endotoxinas. Este nuevo sistema de clasificación está basado exclusivamente en las relaciones de similitud a nivel de secuencia de aminoácidos, permite que genes estrechamente relacionados sean agrupados juntos. Esto elimina la necesidad de que los investigadores realicen bioensayos en cada nueva cepa aislada contra una cantidad cada vez mayor de organismos. En este nuevo sistema de clasificación los números romanos han sido intercambiados por números arábigos en el rango primario con el fin de acomodar un gran número de nuevos genes esperados. Sin embargo, se ha retenido la terminología *cyt*. Bajo estas premisas, *gen cry* se define como un gen de *Bt* que codifica para una proteína de inclusión parasporal que exhibe una actividad pesticida o algún efecto tóxico experimentalmente verificable hacia un organismo, o que tiene una similitud de secuencia notable a una proteína Cry conocida (Crickmore, *et al.*, 1996). Bajo este sistema revisado, todas las δ -endotoxinas caen en 21 conjuntos: Cyt1A, Cyt2A, y Cry1 hasta Cry19.

Estructura de la toxina. Basados en estudios bioquímicos y de biología molecular varios grupos de investigación ya habían propuesto que las toxinas de *Bt* están construidas por tres dominios funcionales (Ge *et al.*, 1989; Widner y Whiteley, 1990; Lee *et al.*, 1992; Wu y Aronson 1992; Aronson, 1993). El desarrollo reciente más excitante en la investigación de *Bt* ha sido la publicación de la estructura tridimensional de la δ -endotoxina Cry3A primero (Li *et al.*, 1991) y la δ -endotoxina Cry1Aa después (Grochulsky, *et al.*, 1995). En la figura 1 se muestra un esquema de la estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa basado en las coordenadas depositadas en el Protein Data Bank.

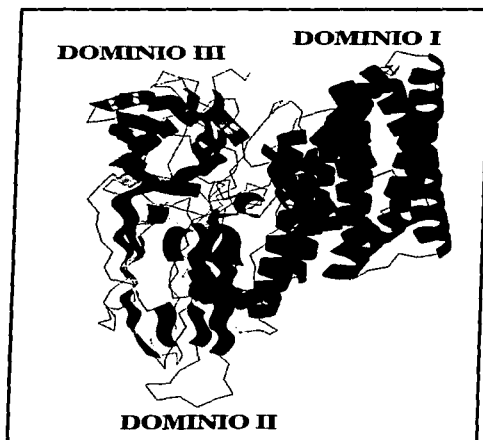


Figura 1: Figura tridimensional de la toxina Cry1Aa. La figura fue hecha considerando las coordenadas atómicas reportadas por Grochulski, *et al.*, 1995 y generadas con el programa InsightII. La estructura tridimensional de la toxina Cry3A esta organizada de la misma manera.

La estructura de las toxinas, la cual comprende una porción de la protoxina 67 kDa en Cry3A y de 130 kDa en las proteínas Cry1Aa, está compuestas de tres dominios estructurales. La estructura del dominio I se encuentra diagramáticamente mostrado en la figura 2A. Este representa la porción N-terminal de la proteína y es un haz compuesto de 6 α -hélices alrededor de una hélice hidrofóbica central (α -hélice 5). Las hélices están orientadas en el sentido contrario a las manecillas del reloj (viendo la proteína con los "loops 1, 2 y 3" en el punto mas distal del observador) en el orden α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_6 , α_7 , con las α -hélices 1 y 7 adyacentes al dominio II y III constituidos predominantemente de hebras tipo β . Tanto en la toxina Cry3A como en la Cry1Aa, la α -hélice 2 esta interrumpida por un segmento no helicoidal y solo la mitad N-terminal está empaçada contra la hélice α_5 . La hélice más larga en ambas toxinas es la número 6 y contiene 9 vueltas completas y casi 45 Å de longitud. Las α -hélices que rodean a la hélice central, están un poco inclinadas hacia el mismo lado (Grochulsky, *et al.*, 1995; Li, *et al.*, 1991). El arreglo concéntrico de las hélices alfa, son similares al encontrado en toxinas formadoras de poro como las colicinas, la toxina de la difteria, la toxina A de *Pseudomonas* y las toxinas termolábiles de *E. coli* y del cólera. En las colicinas, dos hélices hidrofóbicas centrales están aisladas del solvente por 8 hélices anfifílicas, pero en las colicinas estas hélices son regularmente más cortas (Parker, *et al.*, 1989). Al igual que en las colicinas, el haz en las toxinas Cry puede ser una forma soluble de empaque para la hélices hidrofóbicas y anfifílicas que

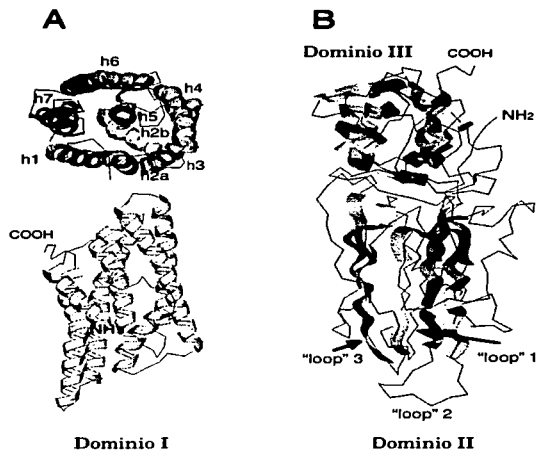


Figura 2. Representación en cintas del dominio I (panel A) y de los dominios II y III (panel B) de la toxina CryIAa de *Bacillus thuringiensis*. h1 a h7: α -hélices 1 a la α -hélice 7. En la figura del dominio I, este está siendo visto desde la horquilla que une a la hélice 5 y a la hélice 6. En la figura de los dominios II y III, el dominio I estaría localizado en la parte central derecha del conjunto.

fomarán poros en la membrana después de un gran cambio en su conformación. Es probable que en las δ -endotoxinas, el dominio I también esté involucrado en la inserción en la membrana y en la formación del poro, ya que las hélices anfipáticas son las estructuras más comúnmente encontradas en los poros transmembranales.

Por medio de varios criterios, al dominio I se le ha asignado el papel de la porción formadora del poro lítico mediante el cual la toxina ejerce su acción biocida. Primeramente, desde el punto de vista estructural el dominio I tiene todas las características de una proteína de membrana, es

decir, está compuesto de un haz de hélices anfifílicas y con una longitud suficiente como para atravesar la membrana. En segundo lugar, tiene una alta semejanza estructural con otras proteínas ó dominios proteicos de otras toxinas (Parker y Patus, 1993) para los cuales se ha demostrado su

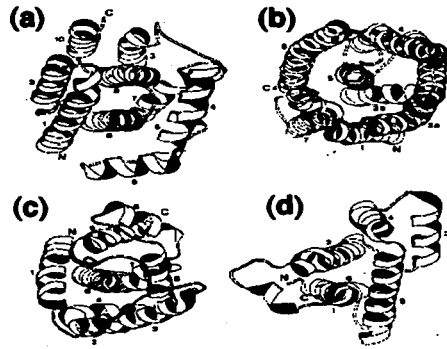


Figura 3. Representaciones en cintas de los dominios de inserción/translocación de varias toxinas de acuerdo a los datos de la cristalografía de rayos-X. A. El dominio formador de poro de las colicinas. b. el dominio formador de poro de la δ -endotoxinas. c. el dominio de translocación de la toxina de la difteria. d. el dominio de translocación de la exotoxina A. (Tomado de Parker y Patus, 1994).

capacidad formadora de poro en bicapas lipídicas planas. Y en tercer lugar, por medio de experimentos de ingeniería genética, ha sido posible separar el dominio I del resto de la toxina con el fin de probar su actividad biológica. La amplificación, la clonación y la expresión de la porción génica que corresponde al dominio I, fue capaz de producir suficiente producto peptídico para hacer experimentos de inserción proteica en bicapas lipídicas planas. Los resultados experimentales apuntan a que este dominio

podría inducir el paso de corriente a través de la membrana después de interaccionar con la bicapa lipídica produciendo corrientes del orden de 40 a 800 o más pS (Von Tersch *et al.*, 1994), como ya se ha mostrado para la toxina completa usando diferentes sistemas (Slatin *et al.*, 1994; Lorence *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1993; Wolfersberger, 1995; Grochulsky *et al.*, 1995). Aparentemente, las regiones de este dominio que tienen que ver con la toxicidad están limitados a unos cuantos residuos dentro de la estructura. Aronson *et al.* (1995) mutagenizaron los residuos que en la estructura de la toxina Cry1Aa corresponderían a la α -hélice 6. La mayoría de los cambios no tuvieron un efecto significativo sobre la toxicidad de las proteína mutantes. Pero la mutación de dos residuos de serina adyacentes y que teóricamente están ubicados en una horquilla que une las α -hélices 4 y 5, tuvieron efectos importantes sobre la toxicidad y sobre la interacción de estas toxinas mutantes a los sitios de unión específicos. Similarmente, y basados en alineamientos estructurales con la Cry3A, Chen *et al.* (1995) reemplazaron la alanina en la posición 92 (A92) (que se localizan en el extremo N-terminal de la hélice 1) y, F148 y Y153 (localizados en la porción C-terminal de la hélice 4 y en la horquilla que conecta las hélices 4 y 5, respectivamente) del dominio I de la Cry1Ab y lo que ellos encontraron fue un decremento dramático en la toxicidad de esta proteína hacia larvas de *Manduca sexta*, lo cual correlacionó con un decremento significativo en la inserción o unión irreversible. Las mutaciones hechas en la α -hélice 5 de la toxina Cry1Ab muestran que el residuo H168 pudiera tener un papel importante en la toxicidad ya que sustituciones de este residuo por una R (H168R) dieron como resultado toxinas mutantes con mayor toxicidad (Wu y Aronson, 1992). Estos resultados apoyan la predicción importante que el

dominio I juega un papel importante en la inserción en la membrana y en la formación del poro. Sin embargo, aún no se ha podido dilucidar completamente el mecanismo mediante el cual este dominio, ya sea aislado o formando parte de la toxina madura, podría interactuar con la membrana hasta un estado que permita la posible oligomerización para la formación de un poro iónico. Debido a la semejanza estructural y topológica que tiene con las colicinas, con la exotoxina A de *Pseudomonas* y con la toxina de la difteria (figura 3), se podría proponer que el mecanismo de inserción pudiera ser muy similar. Quedan, pues, varias preguntas sin contestar. ¿Es suficiente la inserción del dominio I para crear un canal iónico o es necesaria la inserción de otra parte de la proteína también? ¿Que residuos son los responsables de las interacciones para la inserción en la membrana?. ¿Cuántas moléculas de proteína son necesarias para la formación de un canal productivo? ¿Cual es la localización precisa de las diferentes hélices después de que la toxina se ha insertado en la membrana?

En contraste al dominio I, el dominio II consiste de 3 láminas β con topologías similares (figura 2b). Están arregladas en simetría triple y paralelas a la dirección de las hebras. Las dos primeras láminas β , están constituidas cada una por 4 hebras, β_2 a β_5 , y β_6 a β_9 , respectivamente. Las hebras en cada una de la láminas β , están arregladas en la forma de una Y (“llave griega”). La tercera lámina contiene solo 3 hebras y está formada por dos segmentos separados: dos hebras centrales, β_{10} y β_{11} vienen de la parte C-terminal del dominio II, mientras que la externa β_{10} (y la hélice α_9) provienen de la parte N-terminal del dominio II. La hélice α_8 es topológicamente equivalente a la última hebra β de las primeras dos

láminas. Las dos hebras de enmedio de cada una de las tres láminas forman un largo "hairpin". El más largo de ellos se extiende desde la lámina 2. El ápice del dominio II está formado por los "loops" en las puntas de estos "hairpins". El dominio II establece contacto con el dominio I a través de la lámina 3. Las caras externas de las láminas 1 y 2, están expuestas al solvente.

Este dominio es la porción más altamente variable de las proteínas Cry en cuanto a su secuencia aminoacídica. Considerando los resultados experimentales descritos en la literatura el dominio II juega un papel muy importante en la selectividad de este insecticida biológico aunque de acuerdo a los datos presentados recientemente no se puede descartar que también este involucrado en la inserción a la membrana (Smedley y Ellar, 1996). Este es el dominio más extensamente estudiado. De acuerdo a Van Rie (1989) la toxina debe su selectividad a la presencia de sitios de naturaleza proteica de alta afinidad presentes en la superficie de la membrana de las células epiteliales del intestino medio de las larvas de los insectos susceptibles y a que la toxina está dotada estructuralmente de regiones que tienen que ver con esta capacidad. Por medio de intercambios recíprocos de regiones génicas hechos con las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac, las cuales despliegan diferentes toxicidades contra el gusano de seda *Bombyx mori*, se logró saber que la zona de especificidad en este caso está limitada a una región comprendida entre los residuos 332 y 450 de Cry1Aa (Ge *et al.*, 1989) es decir, desde la hebra $\beta 4$ hasta la hebra $\beta 11$ considerando la estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa. Mediante estudios de competencia homóloga y heteróloga en vesículas de microvellosidad apical del intestino medio de larvas de insectos (VMAIM) se

encontró que ésta es la región responsable de la unión a los sitios de la especificidad (Lee *et al.*, 1992). De la misma manera, Cry2Aa y Cry2Ab son idénticas en un 87% de las posiciones pero exhiben diferente espectro de toxicidad: Cry2Aa es tóxica para larvas de dípteros y lepidópteros, mientras que Cry2Ab es nociva solo contra lepidópteros. Experimentos hechos con intercambios de fragmentos entre las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab, mostró que la región de la especificidad de Cry2Aa contra las larvas de mosquitos involucró al fragmento comprendido entre los residuos de aminoácidos 278 a 340 y probablemente la región comprendida entre los residuos 341 a 412, y la región de especificidad de Cry2Aa contra las larvas de *Lymantria dispar* estuvo localizada exclusivamente en el segmento entre los residuos 341 a 412 (Liang y Dean, 1994). Un análisis más detallado de las regiones involucradas demostró que el intercambio de un segmento más corto de la proteína Cry2Aa y que corresponde a los residuos 307 a 382 fue suficiente para alterar la especificidad del rango de hospedero, es decir, cuando una región reemplazó el segmento correspondiente de Cry2Ab, la proteína híbrida resultante adquirió toxicidad contra mosquitos. Esto demostró que, al menos en estas dos toxinas, muy pocos cambios en los residuos de aminoácidos en la zona comprendida entre los residuos 307 y 382, pueden tener un efecto substancial en los espectros de toxicidad de estas proteínas (Widner y Whiteley, 1990). Dada la información que tenemos, es difícil saber si las regiones involucradas en la especificidad de las toxinas Cry2A's están estructuradas como hebras debido a la baja similitud (aproximadamente de 18% a 19%) de éstas con las toxinas para las que se conoce la estructura tridimensional, la Cry1Aa y la Cry3A. ¿Pero cuales de los residuos de aminoácidos son importantes para el despliegue de la

selectividad?. Específicamente y al menos para las toxinas Cry1Aa (Lu *et al.*, 1994) y Cry1Ac (Smedley y Ellar, 1996), las cuales son tóxicas para la larva del insecto *Bombyx mori* y *Manduca sexta*, respectivamente estos residuos se limitan a las posiciones 365 a 371, ya que al mutagenizarlos, la toxina se volvió virtualmente inocua para larvas de esta especie. Desde el punto de vista estructural, estos residuos podrían estar situados en el fondo del "loop" 2 del dominio de especificidad en las toxinas Cry1A's.

Estudios de mutagénesis sitio-dirigida sobre los codones para los residuos 368 a 375 de esta proteína indican que tiene una participación importante en la actividad biológica de la proteína. Substituciones por alaninas de los residuos comprendidos en las posiciones 368-370, disminuyeron la potencia aproximadamente 1000 veces hacia la larva del insecto *Manduca sexta* y 50 veces hacia *Heliothis virescens* y la pérdida de toxicidad fue correlacionada directamente con una afinidad substancialmente reducida por la unión a vesículas de membranas de epitelio intestinal larvario preparadas a partir de insectos susceptibles (Rajamohan *et al.*, 1996a; Rajamohan *et al.*, 1996b). La substitución de los residuos 370-375 por medio de experimentos de mutagénesis sitio-dirigida, también tuvieron efectos dramáticos sobre la toxicidad. En la proteína Cry3A, las substituciones por alanina dentro de los "loops" expuestos a la superficie del dominio II pueden afectar la unión reversible al receptor. Pero otras mutaciones también afectan la unión irreversible (Wu y Dean, 1996). En general, la horquilla 1 y la horquilla 3 de la proteína Cry3A están directamente involucrados en la unión del receptor pero el "loop" 3 también podría jugar un papel en la unión irreversible o en la inserción a la membrana. Las toxinas Cry3A mutantes en la horquilla 2 se comportaron

de manera similar a la toxina silvestre en cuanto a su toxicidad contra larvas de *Tenebrio molitor*.

El dominio III representa la porción C-terminal de la toxina. Este dominio está constituido por dos láminas β torcidas y antiparalelas que forman un sandwich cara con cara (figura 2B). La lámina externa está en contacto con el solvente y la lámina interna enfrenta a los otros dos dominios. Ambas láminas contienen 5 hebras. Desde el cuerpo principal del dominio III se extienden dos largas horquillas cerca de un extremo de las láminas β y éstos constituyen la interface entre los dominios I y III. Quizá, esta es la región menos estudiada de las toxinas desde el punto de vista funcional. La información disponible indica que este dominio está relacionado con la delimitación proteolítica de la toxina tanto al extremo amino como al extremo carboxilo. Algunos reportes indican que éste podría estar involucrado en la toxicidad. En un estudio de híbridos derivados de las toxinas Cry1C y Cry1E, Bosch et al., (1994) mostraron que el dominio III es un determinante importante de la toxicidad hacia *Spodoptera exigua* y *Mamestra brassicae*. Mientras Cry1C es tóxica para estos dos insectos y Cry1E no lo es, un híbrido que consiste de los dominios I y II de Cry1E y el dominio III de Cry1C es también tóxica. También se mostró que para este mismo insecto una toxina que tiene el dominio I y II de Cry1Ab (una toxina moderadamente tóxica para *S. exigua*) y el dominio III de Cry1C (una toxina más activa contra *S. exigua*) es 10 veces más potente aun que la toxina Cry1C sin cambiar la especificidad en vesículas de intestino medio de este insecto (de Maagd, et al., 1996). Estos datos apuntan fuertemente a que el dominio III podría jugar un papel importante en la selectividad de las toxinas para un insecto blanco.

Regiones conservadas entre las delta-endotoxinas. Sin embargo, a pesar de la amplia gama de secuencias que se sabe codifican para proteínas insecticidas, Hofte y Whiteley (1989) identificaron cinco regiones altamente conservadas entre las secuencias de un gran grupo de proteínas Cry. Estas regiones están separadas por segmentos altamente variables en las diferentes proteínas cristal (figura 4A). Todas ellas están localizadas en lo que representa el núcleo fuertemente empacado de las proteínas, es decir, no están expuestas al solvente acuoso que circunda la molécula (figura 4B). Estas regiones seleccionadas durante la evolución, se localizan en regiones estructurales importantes dentro de los dominios individuales o en áreas de contacto interdominios como ha sido mostrado para la mayoría de las

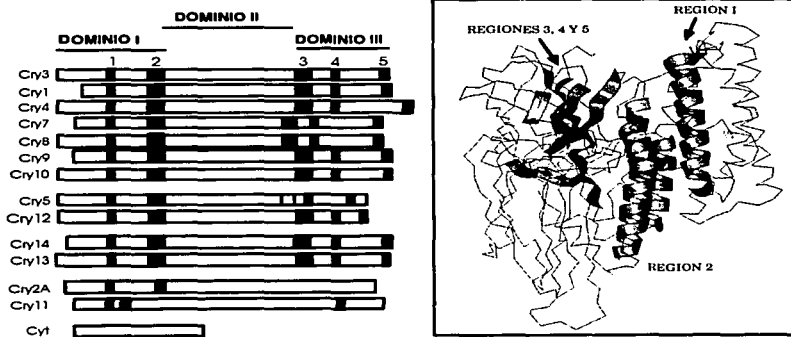


Figura 4: Los bloques conservados de las toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Panel A: Esquema de las regiones conservadas de las toxinas de Bt. Como se puede apreciar, la región 1 y la región 2 están localizadas en el dominio I y una pequeña parte del dominio II, y las regiones 3, 4 y 5 están en el dominio III. Panel B: localización de estas mismas regiones en la estructura terciaria de la toxina Cry1Aa.

proteínas Cry, excepto para las proteínas Cry2, Cry11A y Cry15, por medio de los alineamientos múltiples de las secuencias de las toxinas (datos no mostrados). Por consiguiente, se ha propuesto que todas las toxinas Cry que presentan estos bloques conservados en su secuencia de aminoácidos, podrían formar una familia de proteínas que comparten una estructura similar (Li, *et al.*, 1991). La similitud estructural entre estas toxinas implica que las regiones conservadas están localizadas en la misma posición. La región I comprende la hélice α_5 y está localizada en el dominio I. La región 2 incluye la mitad C-terminal de la hélice α_6 , toda la hélice α_7 y la primera hebra β del dominio II. Esta región conservada contiene 4 puentes salinos en las Cry1A's. El que está formado por el D242 y R265 (y su equivalente en la toxina Cry3A: D278/R301), está conservado en la mayoría de las toxinas, excepto en las toxinas Cry2, las toxinas Cry10, y las toxinas Cry11A. Estos elementos forman la mayor parte de la interfase entre el dominio I y el dominio II. La región 3 está constituida por la última hebra β del dominio II y el segmento N-terminal del dominio III. Este último también forma parte de la interfase entre el dominio I y II. La región 4 corresponde a la segunda hebra β de la lámina del fondo del dominio III (dirigida hacia los otros dos dominios) y la región 5, localizada en la porción C-terminal de la proteína, comprende la hebra central de esta lámina. La última región contiene un fragmento de residuos ácidos involucrados en la formación de puentes salinos con algunos residuos básicos presentes en la región 4. En la figura 4A se muestra el esquema con los bloques conservados ubicados a lo largo de las diferentes toxinas. Como se puede observar, tres de estas regiones altamente conservadas están en el dominio III. La alta similitud estructural de los dominios III entre las toxinas Cry1Aa y

Cry3A, podría no estar limitada a estas dos toxinas sino que puede ser una característica esperada de las demás toxinas Cry con la excepción de las toxinas Cry2, Cry6, Cry11 y Cry15. Esto indica un papel relevante pero aún desconocido del dominio III en la función de las proteínas Cry. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las toxinas Cry conocidas, muestra que un subgrupo que consiste de Cry1, 3, 4, 7, 8, 9, y 10 contienen los 5 bloques. Un segundo subgrupo que consiste de las proteínas Cry5, 12, 13 y 14 contienen los bloques homólogos reconocibles 1, 2, 4, y 5 estando el bloque 3 completamente ausente en este segundo subgrupo de proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 1996).

Modo de acción.

El intestino medio de las larvas de los insectos lepidópteros. Se han propuesto varias teorías para explicar el mecanismo que las δ -endotoxinas tienen para matar a los insectos. La reciente descripción de la estructura tridimensional para dos de las toxinas, nos ha capacitado por primera vez para traducir nuestras ideas en probables eventos moleculares y se podría afirmar que no es posible explicar el modo de acción de las toxinas si no consideramos el ambiente en el cual las toxinas actúan.

El órgano blanco de la actividad de las toxinas es el intestino medio de las larvas de los insectos. El intestino medio larval está revestido de un epitelio estructuralmente sencillo que domina la arquitectura interna de las larvas (figura 5). El tejido intestinal de las larvas de los lepidópteros, está compuesto de dos principales tipos de células: un tipo de célula columnar que se asemeja a aquella de la que están compuestos los epitelios intestinales de los vertebrados con un borde apical micropilado y que está

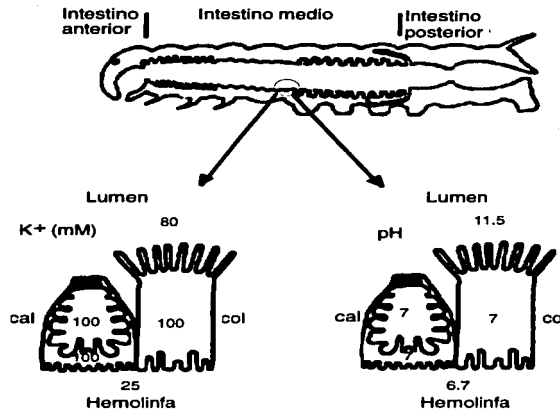


FIGURA 5. Esquema del intestino de la organización del intestino y Estructura del epitelio larval en los insectos lepidópteros. En el par de células de la izquierda se indica la concentración del ión potasio en el compartimento indicado y en el par de la derecha se indica el pH. Col: célula columnar; cal: célula caliciforme. (Tomado de Dow, 1986).

involucrado en la absorción de nutrientes; y células caliciformes (en forma de cáliz) única en el epitelio intestinal larvario de los insectos lepidópteros con una enorme cavidad vacuolar ligada a la superficie apical a través de una válvula (Ciofi, 1979).

Las altas concentraciones de K^+ en las células columnares resulta de los procesos de transporte. Los iones K^+ de las células columnares son transportados a través de la membrana basal por los canales o bombas de K^+ ; alternativamente, los iones K^+ pasan a través de las uniones intercelulares hacia las células caliciformes. Para que el intestino de un

insecto realice sus trabajos de transporte de manera eficiente es necesario que la concentración de K^+ en hemolinfa sea reducida y que se mantenga un gradiente de K^+ entre el lumen y el citoplasma celular. En las larvas de los lepidópteros, esta reducción se realiza a través de las células caliciformes. Sin embargo, la excreción del K^+ se hace por medios indirectos. El primer proceso involucra la extrusión de los iones desde el citoplasma de las células caliciformes hasta su cavidad por medio de una ATPasa tipo V, la cual es estructuralmente similar a otras ATPasas tipo V ya descritas. Los iones K^+ de las células caliciformes son intercambiados por H^+ a través de una proteína antiportadora de $K^+/2H^+$ probablemente localizada en la membrana apical de las células caliciformes. El K^+ acumulado en la cavidad de la célula caliciforme es expulsado al lumen a través de la válvula. Parece ser que además de este bombeo neto de iones K^+ , las células caliciformes también excluyen iones bicarbonato. La excreción de los iones bicarbonato y K^+ simultáneamente, resulta en la formación carbonato/bicarbonato de potasio. Esto trae como consecuencia el incremento del pH hasta valores alcalinos. Esta alta concentración de iones K^+ en el lumen impulsa un número de procesos celulares secundarios como el transporte de aminoácidos desde el lumen hasta el interior de las células a través de un cotransportador localizado en la membrana apical de las células columnares (Gill and Pietrantonio, 1995).

Por otro lado, aunque hasta este momento no se han podido obtener medidas directas del pH citoplásmico en las células caliciformes *in vivo*, se ha encontrado que el pH citoplásmico de las tres regiones del intestino es muy cercano a 7 (figura 5). El fluido luminal en el intestino de los insectos es el más alcalino conocido y puede ser hasta 12 en algunas especies. El

pH del tracto alimentario, a diferencia del pH del citoplasma de las células del intestino, puede variar. Las subregiones anterior y media son las más alcalinas (Dow, 1992).

El papel del "receptor". Un elemento importante en la actividad insecticida de las δ -endotoxinas es su selectividad. Esta característica se debe a que en la superficie de las células de los insectos susceptibles existen moléculas proteicas que son reconocidas por las proteínas cristales insecticidas. Quizá, el término más preciso para estas entidades de la membrana celular es el de sitios de unión de alta especificidad. Los avances en el estudio de los receptores de las toxinas han culminados con la purificación de tres de ellos y la consecuente clonación de los cDNA's codificadores de éstos. Se ha visto que tres de estas proteínas receptoras muestran las características propias de las aminopeptidasas (Sangandala *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 1995) y otra aparentemente se trata de una proteína perteneciente a la superfamilia de las cadherinas (Vadlamudi *et al.*, 1995). La presencia de estos sitios en las vesículas de la microvellosidad apical preparadas a partir de la membrana superficial de las células del intestino medio de las larvas de los insectos susceptibles, fue sugerida por Hofmann *et al.* (1988) y van Rie *et al.* (1989). Se demostró entonces por medio de experimentos de "ligand-blotting" que existe una correlación directa entre la toxicidad y la unión de la toxina a estos sitios (van Rie *et al.*, 1990). Usando esta técnica de experimentación, se ha mostrado que diferentes toxinas Cry1 se unen de manera específica a proteínas de 170, 140 y 120 kDa presentes en las vesículas membranales preparadas a partir de las larvas de *Heliothis*

virescens (un lepidóptero) (Oddou *et al.*, 1991). También se ha descrito la unión de la toxina Cry1Ac a proteínas de 120 kDa presentes en vesículas preparadas a partir de *Manduca sexta* (Knowles *et al.*, 1991; Garczynsky *et al.*, 1991). Vadlamudi *et al.*, (1992), reportaron la purificación de una glicoproteína de 210 kDa aislada de vesículas preparadas a partir de intestino medio de *Manduca sexta* y que une específicamente la toxina Cry1Ab de *Bt berliner*. Lo más relevante de estos experimentos es que esta proteína de alto peso molecular no estuvo presente en vesículas preparadas a partir de *Leptinotarsa decemlineata* (coleóptero) o *Aedes aegypti* (díptero) dos insectos no susceptibles a la toxina. También se ha mostrado que la toxina Cry11A de *Bt israelensis* fue capaz de unirse de manera específica a 6 proteínas con un tamaño molecular que va desde 48 hasta 110 kDa en vesículas de *Tipula oleracea* y a una proteína de 148 kDa en *Anopheles stephensi* (Feldmann *et al.*, 1995).

Anteriormente se ha descrito que la unión a un receptor no siempre correlaciona con la toxicidad o la susceptibilidad de una especie de insecto a una toxina. Masson *et al.*, (1995), encontraron que la toxina Cry1Ac, se unió con la misma afinidad a proteínas de vesículas de intestino medio tanto de una especie sensible como a una resistente de *Plutella xylostella*. Estos datos indican que hay factores diferentes a la unión al receptor (como se explica más abajo en la sección "Formación del poro iónico") que pueden estar alterados en la especie resistente de este lepidóptero y que la unión no es suficiente para explicar la toxicidad.

El caso más complejo de interacciones mostrado hasta ahora es el que se ha descrito para el receptor de la toxina Cry1Ac purificado a partir de larvas de *Manduca sexta*. Masson *et al.*, 1995, reportaron que el receptor

de Cry1Ac contiene dos sitios de unión topológicamente separados en la misma molécula. Uno de ellos fue capaz de unir con alta afinidad a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac y el otro sitio solo fue capaz de unir de manera específica a la proteína Cry1Ac aunque con menor afinidad. En ambos receptores, la unión de la toxina Cry1Ac, pero no la unión de Cry1Aa ó Cry1Ab, a la proteína receptora fue bloqueada por *N*-acetilgalactosamina pero no por otro tipo de azúcares.

A pesar de que varios receptores ya han sido purificados y caracterizados y su secuencia de codificadora de DNA ha sido clonada, aún seguimos careciendo de los datos fundamentales para saber con certeza el papel que estos sitios de unión juegan en la actividad insecticida de las proteínas Cry. La purificación de estas proteínas receptoras a homogeneidad y su incorporación en bicapas lipídicas planares daría pistas acerca del mecanismo mediante el cual los sitios de alta afinidad influyen en la actividad de las proteínas Cry.

Sin embargo, con los resultados experimentales disponibles y considerando el conocimiento obtenido en el estudio de otras toxinas estructuralmente relacionadas (como la toxina de la difteria, la toxina A de *Pseudomonas*, las colicinas y las toxinas del cólera y termolabiles de *E. coli*), que no en estructura primaria, se han propuesto varios modelos para explicar la participación de los receptores en la actividad insecticida de las proteínas Cry (Knowles y Dow, 1993). De todos ellos, el modelo más aceptado propone que el receptor podría favorecer y catalizar la inserción de la toxina en la membrana pero no participa estructuralmente en la formación del poro (figura 6). Esto lo podría hacer simplemente aumentando la concentración efectiva de la toxina cerca de la membrana

y/o disparando un cambio conformacional en la toxina llevándola a un estado competente para la inserción en la bicapa.

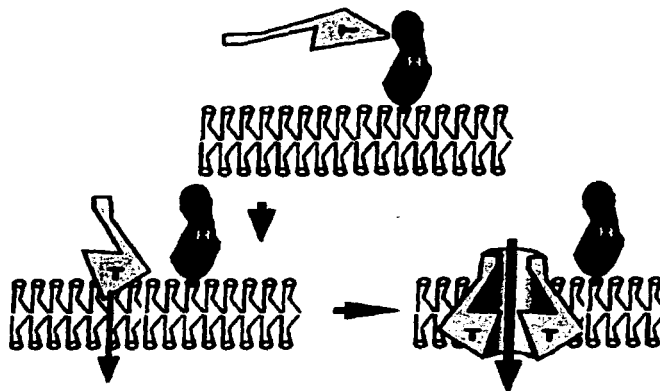


Figura 6. Modelo del modo de acción más aceptado para explicar el mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*. T= toxina; R= receptor, probablemente una aminopeptodasa N. (Tomado de Dow, 1993).

Este modelo implica que el receptor puede ser esencial para la formación del poro si se considera que la toxina no se podría insertar sin antes sufrir un cambio conformacional inducido por la unión. Sin embargo, está claro que el receptor no es el único factor que podría promover un cambio conformacional de la toxina. Este cambio también podría ser inducido por el pH alcalino (Parker y Patus, 1993), como el encontrado en el intestino medio, por la proximidad a la membrana hidrofóbica (Knowles y Dow, 1993) o por el procesamiento de la toxina por las proteasas intestinales (Choma *et al.*, 1991).

Formación del poro iónico.

Pero ¿cual es el mecanismo que las toxinas siguen para formar los poros iónicos? ¿Cuales de las estructuras secundarias participan en el revestimiento del canal? Es decir, ¿en la formación del poro participan solo α -hélices y/o también estructuras β -plegadas?. Se han propuesto dos modelos para explicar la localización topológica de algunas partes de la toxina en el canal (Knowles, 1994). Uno de ellos propuesto por Hodgman y Ellar proponen que las hélices 5 y 6 son las regiones de la toxina que forman el poro. Estas hélices están unidas en el extremo del dominio I en la parte más alejada de la bicapa lipídica y tendrían que ser liberadas y relocalizadas en este dominio para como lo hace una navaja. Este modelo no requiere de un rearrreglo extensivo del resto del dominio I, aunque la α -hélice 4 tendría que deslizarse un poco hacia abajo en relación a la α -hélice 3. Después de la oligomerización de las moléculas de la toxina, se formaría un canal iónico.

El otro modelo, llamado el modelo de la sombrilla, favorece al "hairpin" formado entre la α -hélice 6 y la α -hélice 7 ó la α -hélice 4 y la α -hélice 5 como las estructuras que inician el rearrreglo del resto del dominio I para formar el poro. Estas hélices están unidas en el lado más cercano a la bicapa lipídica y así podría insertarse en la membrana quedando el resto de la hélices abiertas sobre la superficie como una sombrilla abierta, un mecanismo muy similar al propuesto para la inserción de las colicinas (Lakey et al, 1991).

Ambos modelos están basados en lo que se sabe acerca de la inserción para las proteínas formadoras de canales iónicos como los canales de membranas y toxinas formadoras de poro. La iniciación de la inserción

podría requerir un cambio conformacional inducido por la unión al receptor; ésta podría ocurrir espontáneamente y lo suficientemente cerca de la membrana; podría requerir proteólisis de una o más horquillas interhelicoidales (Knowles, 1994).

OBJETIVOS

En nuestro laboratorio, el objetivo general de trabajo está relacionado con el estudio de las δ -endotoxinas producidas por *Bt* considerando su potencial como un agente de control biológico contra las plagas que afectan la productividad agrícola. El enfoque se hace principalmente sobre las plagas de los insectos que pertenecen a los géneros lepidópteros y coleópteros. Por consiguiente este trabajo pretende contribuir al conocimiento de como las δ -endotoxinas o proteínas insecticidas ejercen su actividad letal contra insectos y contra otros organismos invertebrados como nemátodos, protozoarios, áfidos, himenópteros, etc. Muchos de éstos están involucrados en problemas relacionados directamente con la salud y la agricultura.

Hemos abordado el estudio funcional del dominio I para examinar uno de los aspectos fundamentales de la actividad insecticida de las toxinas: la formación del poro iónico. Este objetivo lo hemos desarrollado mediante la expresión en *E. coli* de un fragmento de DNA que codifica para los 258 residuos N-terminales de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* spp *berliner* que corresponderían al Dominio I, y la purificación de éste con el fin de ensayar su actividad en bicapas lipídicas planas y separado del resto de la toxina. Para ésto, se hizo un alineamiento entre la secuencia de los residuos de aminoácidos de la toxina Cry3A, para la cual está descrita la

estructura tridimensional (Li *et al.*, 1991) y la secuencia de los residuos de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de los genes

```

IA(b)b      MDNNPN10          20          30          40          50
            ECIPYNCLSNPEVEVLGGERTETGYTPIDISLSLTPQLLSSEFVPGAGF
IIIAtc     NPTLEDLNYKEFLRMTADNNTALDSSTTKDVIQKGISVGVGDLGVLVGGAL--VWF
            40          50          60          70          80          90
IA(b)b     VLGGLVDIIWGIQPSQWDAFLVQIEQLINQRIIEFA RNQAI SRLEG LSNLYQIYAESFRE
            60          70          80          90          100          110
IIIAtc     YTNFLNTIWFSPDP--WKAFMEQVEALMDQKIA DYAKNKALAEQLGQLNNVDVVSALLS
            100          110          120          130          140          150
IA(b)b     WEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTA I PLFAVQNYQVPLLSVYVOAANLHL SVLR
            120          130          140          150          160          170
IIIAtc     WQKNPVRSSRNPHSQGRIRLEFSQAESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYAQAAANTHLFLLK
            150          160          170          180          190          200
IA(b)b     DVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERLVWGFDSRDWRIRYNQFR
            180          190          200          210          220          230
IIIAtc     DAQIVGEEWYEEKEDIAEPYKRQLKLTQIEYTDHCVKWNVGLDKLRGSSYVESWVNFNRIR
            210          220          230          240          250          260
IA(b)b     RELTLTVL DIVSLFPNYSRTYPIRTVTSQLTREIYTNPVLENFD-SFGRGSAQIEGSI R
            240          250          260          270          280          290
IIIAtc     REMTLTVL DLIALFPFLYDVRVLPKRVKTELTRDVLTOP IGVVNNLRGYCTFISNIENYIR
            270          280          290          300          310          320
IA(b)b     SPHLMIDILNSITITYTDAHGEY-----YWSGH QIMAS PVGFGSGPEPTFFLYLTMGNAAP
            300          310          320          330          340
IIIAtc     KPHLFDYLHRIQFTRFQPGYGNDSFNYSNGNVVSTRPSIGSNDIITSPFVGNKSSEPV
            330          340          350          360          370          380
IA(b)b     QQRIVAAQLGQGVYRVLSSST-LYRRFPFNI--GINNQQLSVLDGTEYAGTSSNLPSVYVRK
            360          370          380          390          400
IIIAtc     QN--LEFNGEKVYRAVANTNLAVWFS AVYSGVTKVEFSQYNDQT---DEASTOTYDSKRN
            390          400          410          420          430          440
IA(b)b     SGTV--DSDLDEIPPNNNVPPRQGFSGHRLSHVSMFRSGFNSSSVSI TRAPMFSWIHRSAE
            410          420          430          440          450          460
IIIAtc     VGAVSWDSIDQLPPETTDEPLEKGYSHQLNVMCFLLMQGSRGTI---PVLTWTHKSVDD
            450          460          470          480          490          500
IA(b)b     FNNIPSSQIQIPLTKSTNLGSGTSSVVKGPGFTGGDILRRTSFGGISTLRVNIITAPLSQ
            470          480          490          500          510          520
IIIAtc     FPNMIDSKKIIQLPLVKAYLQSGS VVAGPRTFGGDIQCTENGSAATYVTFPVSYSQ
            500          510          520          530          540          550
IA(b)b     RYRVRIRYASTTNLQPHTSIDGRFINQGNFASMTSSGSSNLQSGSFRTVGFPTPFNFNSNGS
            530          540          550          560          570          580
IIIAtc     KYRARIHYASTSQITFTLSDGAPFNQYVFDKTIKNGDTLYNSFNLSASTPFELSGNN
            560          570          580          590          600          610
IA(b)b     SVFTLSAHVFNNSGNEVYI DRIEFVPAEVTFEAEYDLER AQA KAVNELFTSSNQI GLKTDVVT
            590          600          610          620          630          640
IIIAtc     --LQIQVTLGSAQDKVYIDKIEFIPVNX
            620          630          640

```

Figura 7. Alineamiento de las toxinas Cry1Ab de *Bt berliner* y Cry3A de *Bt tenebrionis*. Esto se llevo a cabo con el fin de delimitar el extremo C-terminal más probable del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bt berliner*. El alineamiento se hizo por medio del programa PILEUP considerando los primeros 650 residuos aminoácidos de cada una de las secuencias. Los residuos en negritas delimitan el dominio I de ambas toxinas en su extremo C-terminal.

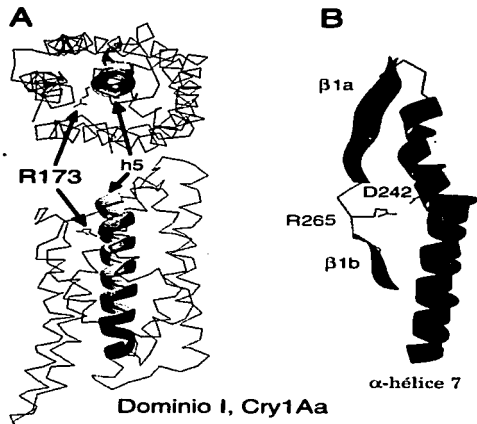


Figura 8. Localización de los residuos mutagenizados en la estructura de la toxina Cry1Aa de *Bt*. Esta toxina comparte el 90% de similitud con la toxina modelo de este trabajo, la toxina Cry1Ab. En el panel A, la R173 en la proteína Cry1Aa (equivalente a la K209 en la Cry3A) está ubicada en la región 1. En el panel B, el D242 de la hélice 7 y la R265 encontrada entre las dos estructuras β -plegadas, están localizadas en la región conservada 2.

cry1A's reportadas (Wabiko, *et al.*, 1986). Esto nos permitió localizar el límite C-terminal más probable del Dominio I en las toxinas Cry1A's en general y de la toxina Cry1Ab en particular (figura 7).

Por otro lado, también hemos explorado la participación en la actividad insecticida de dos de las regiones más conservadas en la mayoría de estas proteínas, la región 1 y la región 2, usando como modelo un miembro particular de las δ -endotoxinas, la Cry1Ab de *Bt berliner*. Se ha descrito que esta proteína es tóxica contra varios insectos del orden lepidóptera entre los que se encuentran *Trichoplusia ni*, *Manduca sexta* y *Heliothis virescens*.

Este objetivo se enfocó fundamentalmente en el papel que estas regiones juegan en la toxicidad, específicamente el residuo R173 localizado en la región 1 y los residuos D242 y R265 localizados en la región 2 (figura 8). Los tres residuos están conservados al menos en el 80% de las secuencias alineadas (Hoftě y Whiteley, 1989). El papel de estos residuos fue evaluado por medio de experimentos de mutagénesis sitio-dirigida de estos residuos en la toxina. El efecto de las mutaciones fue evaluado por: 1. su efecto en la estabilidad estructural, probada por su sensibilidad a la digestión con la proteasa tripsina, 2. su efecto en su capacidad para competir por el receptor contra la toxina silvestre en experimentos de unión de las toxinas a vesículas de membrana aisladas de insectos susceptibles, 3. su capacidad para abrir vías de permeabilidad en vesículas cargadas con un colorante fluorescente sensible a cambios en el potencial de membrana y, 4. mediante bioensayos en larvas de insectos del tercer instar de la especie susceptible *T. ni*.

MATERIAL Y METODOS.

Reactivos. Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado Biología Molecular.

Cepas bacterianas y plásmidos. Las cepas **DH5 α** [*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*], **JM101** [*supE* *thi-1* Δ (*lac-proAB*) F' [*traD36* *proAB*' *lac*' *lacZ* Δ M15)] y **BL21** [*hds* *gal* (Δ *clts*857 *ind1* .*Sam7* *nin5* *lacUV5*-T7 gene 1) de *Escherichia coli* y, la cepa 407 de *Bacillus thuringiensis* (acristalifera), fueron usadas en este trabajo. Los

vehículos de expresión pUC13 y pUC19 fueron comprados de Boehringer-Manheim. El plásmido pBT200 es un derivado de pUC13 y acarrea un fragmento *Bam*HI/*Pst*I de 10.8 kpb que contiene el gen completo *cry*1Ab de *Bacillus thuringiensis* spp *berliner* y fue amablemente donado por el Dr. Luis Herrera Estrella (CINVESTAV, Irapuato). Los plásmidos pIBT78, pTP651.3, pD242N, pD242C, pR265C, pD242C/R265C y pDI258-6 fueron construidos en nuestro laboratorio y son la base de este trabajo.

Medios de cultivo. Las células de *E. coli* fueron cultivadas a 37° C en medio Luria-Bertani líquido o con agar en presencia del antibiótico correspondiente. Las células de *Bt* fueron crecidas hasta la etapa de esporulación (después de 4 días) en medio HCT a 29° C y en presencia de Cm a una concentración de 5 µg/mL.

Oligonucleótidos. La mayoría de los oligonucleótidos usados en esta investigación se encuentran descritos en el cuadro 1 del artículo adjunto. Estos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología, mediante el uso de un sintetizador Applied Biosystems. Varios de ellos cumplieron con dos funciones: para experimentos de PCR usados durante la mutagénesis y como iniciadores para los experimentos de determinación de la secuencia nucleotídica. Los oligonucleótidos T3 y T7 que fueron usados en los experimentos de secuenciación de las clonas mutantes se obtuvieron de Boehringer-Manheim.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta se llevó a cabo en un aparato termociclador marca Perkin-Elmer o en un termociclador OmniGene,

marca Hybaid. Para la extensión y amplificación del fragmento de DNA que codifica para el dominio I de la toxina CryIAb de *Bt berliner*, usamos los oligonucleótidos RM1 y RM13. Como se explica con detalle en el artículo acompañante, el oligonucleótido RM1 se ancla en la porción 5' del gen *cryIAb* a partir de la posición 19 de la secuencia reportada por Wabiko *et al.*, 1986 (ver cuadro 1 del artículo). El oligonucleótido antisentido RM11 hibrida a la hebra de arriba en la posición comprendida desde el codón para Y250 a la R258 (de las bases 888 a la 915). Ambos oligonucleótidos añaden un sitio *Bam*HI en cada extremo del fragmento amplificado. Este fue clonado en el sitio *Bam*HI del plásmido pUC13.

Técnicas experimentales de biología molecular. Todos los experimentos de manipulación genética empleados en la elaboración de este trabajo, están descritos en Sambrook *et al.* (1989). El uso de las enzimas de restricción se hizo de acuerdo a las especificaciones del proveedor. La amplificación y la clonación del fragmento de DNA que codifica para la porción tóxica de la proteína CryIAb de *Bt berliner* se encuentra esquematizada en la figura 9.

Esta estrategia incluye el uso del plásmido pBT200 como templado y dos oligonucleótidos que amplifican desde 14 pb antes de los promotores BTI y BTII en el extremo 5' (RM1) hasta el nucleótido 2093 (RM2 ubicado 22 pb después del sitio *Ecl*I ubicado ahí) hacia el extremo 3' del gen. Cada uno de estos oligonucleótidos inserta un sitio *Bam*HI en los extremos para facilitar la clonación del producto de amplificación. Cuando esta

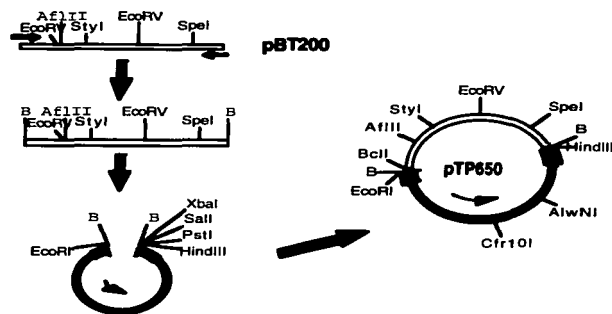


Figura 9. Estrategia de clonación del fragmento de DNA que codifica para los primeros 650 residuos de aminoácidos de la toxina Cry1Ab, la cual corresponde a la porción tóxica.

construcción fue introducida y expresada en *E. coli*, dió origen a la síntesis de un polipéptido de un tamaño molecular esperado de 68 kDa. La estrategia para clonar el segmento de DNA que codifica para el Dominio I, se muestra en la figura 10. Ambos oligonucleótidos añaden un sitio *Bam*HI en cada extremo del fragmento amplificado. Este fue clonado en el sitio *Bam*HI del plásmido pUC13.

Mutagénesis y subclonación de las mutaciones en el puente salino.

El protocolo de mutagénesis usado en la elaboración de este trabajo de investigación, así como los oligonucleótidos usados en el mismo, se encuentran descritos en detalle en el artículo acompañante. Para subclonar las mutaciones D242N, D242C, R265C y D242C/R265C, los fragmentos

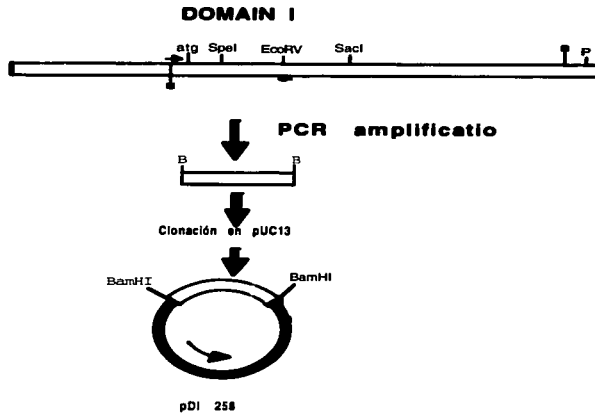


FIGURA 10. Representación esquemática de la estrategia de clonación en pUC13 del fragmento de DNA, amplificado por PCR, que codifica para el dominio I de la toxina Cry1Ab.

mutantes obtenidos por PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *AflIII* y *SpeI* y el fragmento de 1.2 kilopares de bases fue reemplazado por el mismo fragmento pero en la clona silvestre pTP650. Esto dio como resultado las clonas pD242N, pD242C, pR265C y pD242C/R265C (figura 11).

La purificación de plásmidos se hizo por medio del metodo de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) y la purificación de los insertos clonados se hizo mediante la excisión de la banda de interés después de separar los fragmentos restringidos con una electroforesis preparativa. La agarosa fué eliminada y el material genético fue purificado por medio de un kit de GeneClean (Bio101, La Jolla, CA).

Transformación y expresión de las construcciones en *Bacillus thuringiensis* y en *E. coli*. Los experimentos de transformación bacteriana se hicieron por medio del método del Ca^{+2} (Sambrook, *et al.*, 1989). La electrotransformación de las células bacterianas de *E. coli* o de *Bt* 407, se realizó con un aparato GenPulser (Bio-Rad) a una diferencia de potencial de 2.5 kV y a 25 μF , y la resistencia fue fijada a 200 Ohmios. Las células fueron recuperadas en medio SOC (Sambrook *et al.*, 1987) durante 1 hora y seleccionadas en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico apropiado. Las celdas usadas para estos experimentos fueron de 0.2 cm de separación entre los electrodos y se obtuvieron de Bio-Rad. La preparación de las células electrocompetentes de *E. coli* y de *Bt* 407, se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el manual del GenPulser (Bio-Rad). La expresión de estos plásmidos fue ensayada separando electroforéticamente extractos proteicos crudos de cada una de las clonas, las proteínas fueron transferidas a las membranas de nitrocelulosa. Los péptidos se detectaron por experimentos tipo Western con un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab.

Purificación y Solubilización de las proteínas. Las células de *E. coli* con el plásmido correspondiente fueron crecidas en 1 L de LB adicionado con el antibiótico apropiado durante 36 horas y después fueron recuperadas por centrifugación. Posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en 50 mL del mismo amortiguador adicionado con 500 μL de PMSF (Phenylmethylsulphonyl fluoride, Sigma) 100 mM. La suspensión celular fue lisada por disrupción sónica en un instrumento Soniprep (MSE) proporcionando 3 pulsos de 30 segundos de duración cada uno con

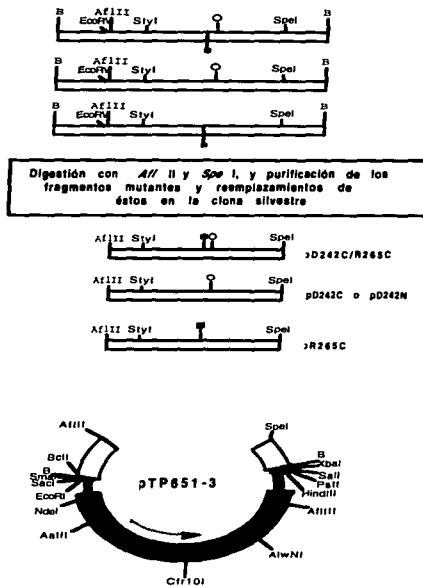


Figura 11. Reemplazamiento de los fragmentos de DNA *Afl*III/*Spe*I mutantes por el mismo fragmento en la clona silvestre pTP650.

descansos de 30 segundo en un baño de hielo. El lisado celular fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 minutos y la pastilla fue incubada durante toda la noche en el amortiguador de solubilización hecho a base de Na_2CO_3 50 mM pH 10.

Solubilización del Dominio I. La pastilla celular proveniente de la clona pDI258, fue solubilizada en una solución amortiguadora compuesta de CHAPS 10mM y Tris-HCl 40mM pH 6.8. Después de centrifugar a 12500 *g* durante 10 minutos, la pastilla fue solubilizada durante 12 horas a 37°C en Tris-HCl 100mM pH 6.8, NP40 al1%, Urea 8M, y β-mercaptoetanol al 0.078%. La solución proteica fue cargada en una columna de intercambio iónico de DEAE-Sepharose previamente equilibrada con la solución de solubilización. Posteriormente, las proteína fueron eluidas con un gradiente de NaCl (0-500mM) y las fracciones fueron colectadas en volúmenes de 7 mL y, analizadas por electroforesis y por experimentos de inmunodetección. Las fracciones positivas fueron dializadas contra un amortiguador de Tris-HCl 50mM, pH 6.8.

Solubilización de las toxinas. Las proteínas insecticidas de *Bt* normalmente se acumulan como cuerpos de inclusión en *E. coli* o como cristales de geometría perfecta en *Bt*. Estas deben ser solubilizadas antes de la purificación. Esto se hizo poniendo los cuerpos de inclusión o los cristales en un buffer de solubilización a base de carbonato de sodio 50mM pH 10 a 37° C durante 4 horas en presencia de un agente reductor de puentes disulfuro como DTT o β-mercapto-etanol a una concentración final de 2 mM y de NaCl a una concentración final de 300mM en agitación lenta.

Marcaje de las proteínas con biotina. El marcaje de las proteína con biotina se describe en el artículo acompañante.

Electroforesis. La separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo en geles de desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% (a menos que

se indique otra cosa) en el sistema Mighty Small de Hoefer de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970).

Producción de anticuerpos específicos contra la proteína Cry1Ab y experimentos de inmunodetección. Parte de la proteína Cry1Ab purificada, fue usada para la producción de anticuerpos específicos en conejos Nueva Zelanda. Estos fueron inmunizados con 800 µg de proteína distribuidas en 4 inyecciones de 200 µg cada 4 días. Tres días después de la última inmunización los conejos fueron sangrados por una de las venas de la oreja, a los cuales se les retiró aproximadamente 30 ml. Los anticuerpos fueron enriquecidos de acuerdo a la metodología descrita por Garvey y Garvey, (1978), se dializaron contra 2000 volúmenes de PBS a 4 °C durante 2 días y se guardaron a -20 °C en alícuotas de 50 µl. Para experimentos tipo Western, el anticuerpo se usó diluido 100000 veces.

Después de que las proteínas fueron separadas por electroforesis, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond P, Amersham) de acuerdo al método descrito por Towbin *et al.* (1979) durante 40 minutos a 400 mA y la transferencia de proteínas se confirmó mediante la tinción reversible de la membrana con Ponceau al 1% en una solución de ácido acético al 0.1%. Las proteínas reconocidas por el primer anticuerpo se revelaron con un anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa usando como sustrato Diaminobenzidina (Sigma) y H₂O₂.

Experimentos de unión y competencia en vesículas de la microvellosidad apical del intestino medio de los insectos. Los experimentos de competencia ya han sido descritos en el artículo adjunto.

Experimentos en bicapas lipídicas planares y de fluorescencia. Estos experimentos se realizaron para ensayar la actividad formadora de poro de la toxina en ausencia del receptor. Las bicapas lipídicas planas fueron preparadas como se describe en Lorence, *et al.*, 1995. El fragmento proteico Dominio I fue añadido en el compartimento *cis* a una concentración de 0.6 a 10.6 μM y la incorporación del péptido a la bicapa fue ensayado después de la aplicación de un voltaje sostenido de 50 mV a través de la bicapa. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente. Las corrientes de canal fueron registradas con un aparato Dagan (Dagan Corp., Minneapolis, MN) y se filtraron a 200 o 500 Hz para después digitalizarlos "en línea" a 1 o 2 kHz. Los registros fueron analizados en una computadora personal por medio del uso una interfase Digidata 1200 y los programas Axotape y pClamp (Axon Instruments, Foster City, CA).

Los experimentos de fluorescencia se llevaron a cabo básicamente para explorar la capacidad formadora de poro de las toxinas silvestre y mutante R173S tal y como se describe en el artículo adjunto y en Lorence, *et al.*, 1995.

Secuenciación. La secuencias de DNA fueron determinadas por el método de la terminación de la cadena dideoxy con el kit de Sequenasa versión 2.0 (Amersham, U.S. Biochemical Corp.) y siempre de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Determinación de la concentración de proteínas. Las concentraciones de proteínas fueron determinadas de acuerdo a la técnica de Bradford (1976) y usando seroalbúmina de bovino como estándar.

RESULTADOS.

Los resultados de la mutagénesis sitio-dirigida de los residuos R173, D242, y R265 así como la descripción detallada del sistema de mutagénesis diseñado, son presentados en el artículo que acompaña este trabajo: Meza, R., M. E. Núñez, J. Sánchez, and A. Bravo. 1996. Isolation of Cry1Ab protein mutants of *Bacillus thuringiensis* by a highly efficient PCR site-directed mutagenesis system. FEMS Microbiol. Lett. 145: 333-339.

Expresión del Dominio I de la proteína Cry1Ab de *Bt berliner*. Para saber si la clonación y expresión del dominio I fue exitosa, se purificó DNA plasmídico de las clonas y se analizaron por restricción con *Bam*HI (datos no mostrados). De la clona positiva pDI258-8 se prepararon extractos completos, se centrifugaron a 12500 *g* durante 10 minutos y tanto la pastilla como el sobrenadante fueron analizados electroforéticamente en geles desnaturalizantes de poliacrilamida tipo Laemli (1957). Las proteínas separadas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa y ésta fue tratada con un anticuerpo policlonal dirigido contra la porción tóxica de la protoxina Cry1Ab. Este experimento confirmó la presencia de un péptido de un tamaño molecular de aproximadamente 30 kDa que reaccionó positivamente. Después de la purificación, el péptido Dominio I se sometió

a un experimento de enfoque isoelectrico y las proteínas enfocadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para experimentos de

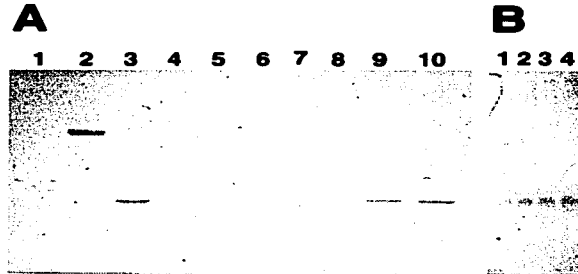


Figura 12. Inmunodetección del péptido dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* en los diferentes pasos de purificación (panel A) y experimento de enfoque isoelectrico del dominio I tripsinado y purificado (panel B). Panel A. Se prepararon extractos crudos de las diferentes clonas, fueron separados electroforéticamente y luego fueron transferidos a la nitrocelulosa. Carril 1: clona que solo lleva el vehículo pUC13; carril 2: porción tóxica; carril 3: pastilla de un extracto crudo que contiene la pDI258; carril 4: sobrenadante del mismo extracto crudo; carriles 5, 6, 7 y 8: diferentes lavados hechos durante la purificación del dominio I; carril 9 y 10: muestra que contiene el dominio I enriquecido. Panel B. carriles 1, 2, 3 y 4: muestran que contienen 100, 200, 300 y 500 ng del péptido dominio I tratado con tripsina y purificado.

inmunodetección. Los resultados de este experimento muestran que la preparación purificada estuvo compuesta de un solo componente que además reaccionó positivamente con el anticuerpo anti-Cry1Ab. De acuerdo con marcadores de pI, se determinó que este péptido tiene un pI de 4.3 (datos no mostrados). Este valor fue similar al predicho por el programa

GeneWorks (Intelligenetics, Mountain View, CA). Estos datos se muestran en la figura 12.

Capacidad formadora de poro. La capacidad formadora de poro del dominio I de Cry1Ab ó de la toxina completa, fue evaluada por medio de la

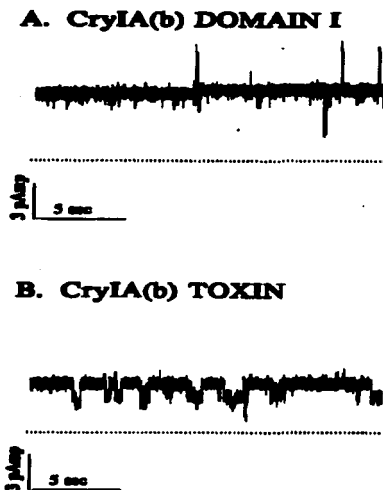


Figura 13. Experimentos en bicapas lipídicas planares con el dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bt berliner*.

interacción de éstos polipéptidos con bicapas lipídicas planas y determinando la capacidad para abrir vías de permeabilidad. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 13. Como se puede observar en esta figura, tanto el dominio I como la toxina completa Cry1Ab fueron capaces de abrir estas vías de permeabilidad en el sistema

a concentraciones del orden de 0.6-10.6 μ M, lo cual quiere decir que el dominio I es capaz de alterar la permeabilidad como lo hace la toxina completa bajo las mismas condiciones experimentales. El experimento control consistió en la adición de solución amortiguadora solamente (datos no mostrados).

Toxicidad de la δ -endotoxina tipo silvestre. La toxina Cry1Ab de *Bt berliner* 1715 es altamente tóxica para al menos 5 especies de insectos lepidópteros consideradas como plagas importante desde el punto de vista agrícola: *Pieris brassicae*, *Trichoplusia ni*, *Manduca sexta*, *Heliothis virescens*, y *Mamestra brassicae*. De éstas, las especies más susceptibles son *Pieris brassicae* y *Trichoplusia ni* con una concentración letal media (LC_{50}) entre 0.7 y 8.6 μ g/ml (Hofté y Whiteley, 1989). *T. ni* también es similarmente susceptible a la toxina Cry1Ac con una LC_{50} de 7.5 μ g/ml. En este estudio, usamos a *T. ni* como organismo modelo para los experimentos. En nuestras manos, la toxicidad de la proteína Cry1Ab de *Bt berliner* 1715 procesada y purificada a partir de una clona expresada en *E. coli* tuvo una LC_{50} de alrededor de 5.2 ng/cm² probada contra larvas de 3er instar de *T. ni*.

Estabilidad intracelular y procesamiento de las proteínas mutantes y silvestre. La clonación del fragmento de DNA que codifica para la porción tóxica dió un producto estable al tratamiento con tripsina (figura 14a) así como también la expresión de la proteína mutante R173S no así la expresión de las proteínas mutantes D242C, D242N, R265C y la doble mutante D242C/R265C. Estas últimas fueron degradadas por las

proteasas intracelulares. Esto fue comprobado al transformar la cepa de *E. coli* BL21 (deficiente en la expresión de algunas proteasas importantes) con los plásmidos que acarrean las secuencias mutantes. (figura 14b). La producción de las proteínas mutantes en los residuos D242, R265, y la doble mutante D242/R265 fue a niveles extremadamente bajos en *E. coli* DH5 α con respecto a la toxina tipo silvestre. De hecho, estas proteínas solo se pudieron detectar exitosamente en los experimentos de inmunodetección. Sin embargo, la expresión fue mejorada en la cepa de *E. coli* BL21, la cual es deficiente en la producción de proteasas (figura 2C en el artículo). En experimentos de digestión con tripsina la proteína Cry1Ab silvestre produjo un fragmento resistente de alrededor de 65 kDa (Figura 14). Estos resultados indican que las proteínas mutantes D242N (dato no mostrado), D242C y R265C se volvieron más susceptibles a las proteasas intracelulares, sugiriendo que las mutaciones en los residuos D242 y/o R265 podrían ser elementos importantes en el plegamiento de las proteínas. La mutación R173S, por el contrario fue estable al tratamiento con tripsina ya que después de la digestión con tripsina se produjo un péptido del tamaño esperado. Sin embargo, hubo diferencias en cuanto a la producción de la proteína mutante R173S dependiendo del hospedero. A pesar de que los niveles de expresión de la proteína mutante en *E. coli* fue similar a la toxina silvestre, la producción de ésta proteína fue distinto a la Cry1Ab silvestre en *B. thuringiensis* (figura 15). De las toxinas mutantes solamente se probó en el fluorómetro la proteína la R173S en debido a que la mutación no alteró sus propiedades de estabilidad, y su actividad fue comprada con la actividad mostrada por la proteína silvestre. Los resultados de este experimento se

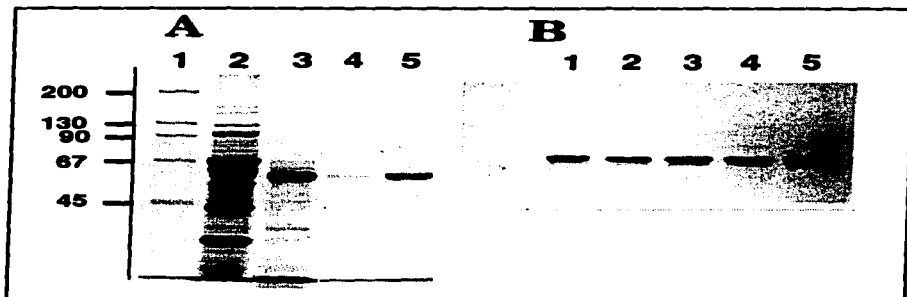


Figura 14. Digestión con tripsina de la proteína silvestre. Panel A, carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: Pastilla después de centrifugar; carril 3: incubación con tripsina (1:100); carril 4: sobrenadante después de la solubilización en amortiguador alcalino; carril 5: sobrenadante después de a solubilización y centrifugación. La clonas de la secuencia mutantes fueron expresadas en la *E. coli* BL21. Se prepararon extractos crudos de estas clonas, las proteínas se separaron electroforéticamente y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Panel B: Carril 1: Proteína silvestre; carril 2: mutante D242N; carril 3: mutante D242C; carril 4: mutante R265C y carril 5: doble mutante D242C/R265C. Las toxinas se inmunodetectaron con un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab.

muestra en la figura 3B del artículo adjunto en donde se puede ver que la mutación R173S tuvo un comportamiento similar a la toxina silvestre en cuanto a su capacidad para abatir el potencial de membrana observado por la salida del colorante indicador. Este dato sugiere que la eliminación de una carga positiva en esta región no tiene efecto sobre la capacidad de formación de poro y por lo tanto de inserción en la membrana de las vesículas. Este dato fue reforzado por el hecho de que la proteína mutante R173S tuvo una toxicidad similar a la de la toxina silvestre cuando fue evaluada por bioensayo (LD50= 9.8 y 6.0, respectivamente).



Figura 15. Síntesis de la toxina Cry1Ab silvestre (A) comparada con la toxina mutante en el residuo R173 en *Bacillus thuringiensis* (B).

Unión específica de las proteínas insecticidas. Estos experimentos fueron llevados a cabo con el fin de saber si la mutación en el residuo aminoacídico R173 tuvo algún efecto sobre la capacidad de unirse a las proteínas presentes en la superficie de las membranas celulares. Los resultados de estos experimentos se encuentran descritos en el artículo acompañante en la figura 3A. Este resultado junto con el descrito arriba, muestran que la mutación R173S no afecta ni la toxicidad ni la selectividad de la toxina aunque si participa de alguna manera en los eventos de competencia entre la toxina mutante y la silvestre. Este punto no fue analizado más detalladamente.

DISCUSION

Las proteínas δ -endotoxinas además de sus propiedades insecticidas son modelos apropiados para los estudios de las relaciones estructura-función en las cadenas polipeptídicas.

En este trabajo nos hemos enfocado en el estudio de ciertos residuos de aminoácidos altamente conservados en la mayoría de los miembros de la familia de las δ -endotoxinas. Los residuos se seleccionaron bajo la premisa de que los residuos aminoacídicos conservados podrían tener funciones importantes en la estructura y/o la función proteica. Ya se ha mostrado para algunas toxinas de *Bt* su capacidad de abrir vías de permeabilidad en bicapas lipídicas planas y/o en vesículas de intestino medio de insectos cargadas con un colorante sensible a los cambios en el potencial de membrana (Schwartz *et al.*, 1994; Slatin *et al.*, 1991; Lorence, *et al.*, 1995) o en experimentos de vesículas membranales con el receptor fusionados a bicapas lipídicas planas (Wolfersberger, 1995; Lorence *et al.*, 1995). Esto ha sido mostrado para las toxinas Cry3A (Slatin *et al.*, 1991), Cry1C (Butko, *et al.*, 199; Lorence *et al.*, 1995), Cry1Aa (Slatin *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995), Cry1Ab (Schwartz *et al.*, 1993), Cry1D (Lorence, *et al.*, 1995) y Cry2A (English *et al.*, 1994). En todos los casos se ha visto que las toxinas forman canales iónicos en presencia del receptor a dosis del orden de μM . Se piensa que esta capacidad de formar canales iónicos reside en la porción N-terminal de la toxina, la que corresponde precisamente al dominio I en la estructura tridimensional. Los experimentos de mutagénesis en la región N-terminal de diversas toxinas han mostrado que esta parte de la toxina es crítica para la toxicidad y que no afectan las propiedades de unión de ellas. Wu y Aronson (1992)

encontraron que ciertos cambios en los residuos A92D y R93A (residuos localizados en la α -hélice 3) de la proteína Cry1Ab, redujeron la toxicidad de 100 a 1000 veces hacia insectos de prueba. La sustitución de los residuos cargados positivamente (R93F) o la adición de un residuo cargado negativamente (A92D) en la región N-terminal de la hélice 3 del dominio I de la proteína Cry1Ac también resulto en una reducción sustancial en la toxicidad contra *Manduca sexta* (Hussain *et al.*, 1996). y que de las mutaciones en los residuos localizados entre las posiciones 164 a la 168 de la proteína Cry1Ac (es decir, en la parte central de la α -hélice 5), solo las mutaciones L167F y N166D fueron capaces de abolir la toxicidad hacia *M. sexta*. Algunas otras mutaciones como A164P y L167K redujeron de 100 a 1000 veces la toxicidad. Todas estas mutaciones caen en la α -hélice 5 del dominio I. Chen *et al.*, (1995) que en la toxina Cry1Ab, las mutaciones Y153R o Y153A (ubicadas en la horquilla que une la α -hélice 4 con la α -hélice 5) no alteraron la toxicidad de manera apreciable pero la mutación Y153D resultó en una gran pérdida de la toxicidad. Ahmad y Ellar (1990) encontraron que en la toxina Cry1Aa las mutaciones F50N, V51N (localizadas en la horquilla que une la α -hélice 1 y la α -hélice 2), A165P y L167M (ubicadas en la α -hélice 5) no afectan las propiedades de unión pero si bajan la citotoxicidad a células en cultivo. Por otro lado, experimentos de mutagénesis hechos en la α -hélice 6 no tuvieron efecto alguno en la toxicidad, pero en un caso, Y211D la estabilidad fue reducida. Estudios más detallados con esta mutante en vesículas de intestino medio mostraron que esta mutante tenia altamente dañada su unión irreversible, es decir, su inserción a las membranas de intestino medio. Experimentos con la α -hélice 5 (localizada en el dominio I) de la toxina Cry3A sintetizado

químicamente mostraron que estos péptidos son capaces de formar canales iónicos en bicapas lipídicas planas (Gazit y Shai, 1993; Gazit, *et al.*, 1994). Desafortunadamente no se mostró información acerca de la actividad de un péptido sintetizado con la misma composición de residuos de aminoácidos arreglados al azar en una secuencia.

Von Tersch, *et al.*, (1994) clonaron un fragmento de DNA obtenido por PCR que codifica para el dominio I de la toxina Cry3A. Este péptido copurificó con una proteína de *E. coli*, como fue demostrado por experimentos de separación electroforética en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Esta preparación fue capaz de inducir la salida de iones a partir de vesículas hechas a base de fosfolípidos. Sin embargo, los resultados no son concluyentes debido a la contaminación por el polipéptido proveniente de *E. coli*.

Con el fin de aclarar el papel que el dominio I juega en la actividad biológica de la toxina, clonamos un fragmento de DNA que codifica para los primeros 258 residuos de aminoácidos de la toxina Cry1Ab de *Bt berliner*. Este fragmento fue expresado en una cepa de *E. coli* en donde fue capaz de dirigir la síntesis de un péptido de un tamaño molecular aproximado de 29 kDa mismo que reaccionó específicamente con un anticuerpo dirigido contra la toxina completa Cry1Ab. Este péptido no fue visto en una cepa que solo acarreó el vehículo. El péptido correspondiente al Dominio I se purificó, se analizó por enfoque isoelectrico para comprobar que la muestra solo estaba constituida por una sola banda proteica (figura 12), y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Este péptido fue capaz de reaccionar nuevamente con el anticuerpo anti-Cry1Ab. Cuando este péptido purificado se puso a reaccionar en un sistema de membranas artificiales

fue capaz de formar canales iónicos como lo hace las toxinas Cry1Ab completa (este trabajo), la toxina Cry1Ab y la toxina Cry3A. Esta actividad fue comparable a la actividad de la toxina completa. Por otro lado y en contraste a la toxina completa, el dominio I indujo vías de permeabilidad con una alta probabilidad de apertura y de una mayor conductancia con eventos de cierre menos frecuentes que la toxina completa bajo las mismas concentraciones molares. Este comportamiento se puede deber a varias causas. Esto podría deberse al hecho de que el dominio I separado del resto de la toxina, podría tener más libertad para insertarse dado que carece de otras restricciones estructurales que podrían estar causando un problema estérico. Podría ser que la presencia de los demás dominios de alguna manera influya en la velocidad de inserción o en la fuerza de la interacción con la bicapa lipídica. Es posible que en la toxina completa, el dominio I tendría que deshacer varias interacciones presentes en la interfase que comparte con el dominio II antes de poder adoptar un estado de competencia para la inserción.

Se ha visto que para la toxina Cry1C al menos, la capacidad para interactuar con las membranas se incrementa cuando el pH de la solución disminuye abajo de 5. Esta propiedad de las toxinas de *Bt* es compartida con otras toxinas bacterianas proteicas, particularmente las colicinas y la toxina de la difteria con las cuales comparte además una alta semejanza estructural sugiriendo que podrían ser un producto de evolución convergente. Se ha mostrado que las colicinas sufren un desplegamiento parcial de su estructura terciaria a pH ácido mientras mantienen la mayor parte de su estructura secundaria, y se propone que esto podría ser parte de un mecanismo similar para la inserción del dominio transmembranal

para las colicinas y para la toxina de la difteria. Bajo estas condiciones, la inserción en la membrana se ve claramente facilitada debido a que la toxina adquiere propiedades parcialmente hidrofóbicas. Sería interesante saber cual es el comportamiento del Dominio I bajo diferentes valores de pH. Este tipo de estudios nos permitiría obtener más información acerca de el mecanismo de inserción de las proteínas formadoras de canales.

Hemos mencionado anteriormente que además de los estudios acerca de las propiedades formadoras de poro del dominio I, se realizaron estudios de mutagénesis sitio-dirigida de la toxina Cry1Ab en residuos de aminoácidos altamente conservados en la mayor parte de las δ -endotoxinas. Estos residuos comprenden a los residuos de aminoácidos R173 (arginina en la posición 173), 242D (ácido aspártico en la posición 242), y R 265 (arginina en la posición 265). El análisis de la estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa muestra que los residuos D242 y R265 (y los residuos homólogos D278 y R301 en la toxina Cry3A) están formando parte de un puente salino que mantiene unidos a los dominios I y II en un ambiente semioculto al solvente. Hofte y Whiteley (1989), identificaron 5 regiones altamente conservadas entre las secuencias de un gran grupo de δ -endotoxinas. La región 1 (que incluye los residuos 157 al 179 en la toxina Cry1Aa y por homología la toxina Cry1Ab) comprende la α -hélice 5 del dominio I. La región 2 incluye la mitad C-terminal de la α -hélice 6, toda la α -hélice 7 y la primera β -plegada del dominio II (Grochulski *et al.*, 1995, Li *et al.*, 1991) (comprende a los residuos 202 a 270 en la Cry1Ab) estableciendo la interfase entre el dominio I y el dominio II. La mutación R173S en la proteína Cry1Ab, aparentemente no altera la toxicidad ni la estabilidad estructural. Nuestros experimentos muestran que la toxicidad

de la mutante Cry1Ab R173S en larvas del tercer instar de *Trichoplusia ni* es comparable a aquella de la toxina tipo silvestre. Además, cuando la proteína mutante R173 fue sujeta al tratamiento con tripsina, se produjo un polipéptido de tamaño similar al producido por la digestión de la proteína silvestre indicando que la mutación no afecta de manera apreciable la sensibilidad a la tripsina y así a la estructura terciaria de la toxina. A la fecha se han descrito varias toxinas mutantes en el dominio I que tienen una estabilidad estructural alterada. Chen *et al.*, (1995) reportaron que las mutaciones F148D y F148R en la proteína Cry1Ab no produjeron niveles detectables de toxina cuando fueron expresadas en *E. coli*. Por otra parte Aronson *et al.*, (1995) reportaron que la mutación Y211D en la toxina Cry1Ac la volvió estructuralmente inestable, ya que la producción de ésta fue menor que la proteína silvestre. Sin embargo, cuando esta proteína fue tratada con tripsina se produjo un péptido activo. La inestabilidad fue debida, aparentemente, a una mayor susceptibilidad de esta mutante particular a las proteasas de *Bt*. Estos datos indican que no hay una relación fuerte entre la estabilidad estructural y la actividad biológica.

La mutación R173S en la toxina Cry1Ab descrita en este trabajo, también influye en su nivel de expresión en *Bt*, ya que el rendimiento proteico fue considerablemente más bajo cuando se comparó con la producción de la toxina silvestre. La acumulación de ambas proteínas en *E. coli* fue similar. Este resultado implica que la baja producción en *Bt* no se debió a una mayor susceptibilidad a las proteasas, sino a otra razón ya que después del tratamiento con tripsina, esta mutante produjo un péptido resistente a proteólisis.

Estudios previos han sugerido que la unión de las toxinas a las membranas de los insectos susceptibles podría incluir dos pasos importantes: una unión inicial reversible representada por la interacción de las toxinas con los sitios de alta selectividad y afinidad presentes sobre la superficie celular y una unión irreversible caracterizada por la inserción de la toxina en la bicapa lipídica (Wolfersberger *et al.*, 1986; Van Rie *et al.*, 1989 y Chen *et al.*, 1995). Ensayos de competencia en vesículas de la microvellosidad apical de intestino medio de larvas de *T. ni*, dieron un resultado inesperado. La unión de la toxina Cry1Ab biotinilada fue eliminada por un exceso de 50 veces la toxina mutante R173S pero con un exceso de 300 veces de la toxina silvestre (figura 3a del artículo adjunto). Este resultado sugiere que la toxina con la mutación muestra una unión más fuerte o una mayor avidez a las vesículas que la toxina silvestre bajo las mismas condiciones. En base a las estructuras descritas de las toxinas Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995) y la toxina Cry3A (Li *et al.*, 1991) el residuo de R173 está localizado en el tercio C-terminal de la α -hélice 5 cerca del "loop" que conecta la α -hélice 5 con la α -hélice 6. De acuerdo con la estructura de Rayos X de la toxina Cry1Aa, una proteína altamente relacionada con la toxina Cry1Ab, el "hairpin" formado por el tercio C-terminal de la hélice 5, la hélice 6 y el "loop" que las conecta podría estar expuesto al solvente (Grochulski *et al.*, 1995). La sustitución R173 con serina elimina una carga positiva y esto podría darle una naturaleza menos polar a esta región de tal manera que la mutante R173S muestre una mayor capacidad de inserción ó una inserción más rápida y/o más eficiente que la Cry1Ab tipo silvestre, ó podría facilitar las interacciones iniciales entre la toxina y la bicapa lipídica después de que el dominio II

interacciona con los sitios unión. Se podría pensar que el mecanismo de inserción podría ser similar al de las colicinas (Van der Goot *et al.*, 1991; Duchè *et al.*, 1994) y al de la toxina de la difteria (Zhan *et al.*, 1994; Silverman *et al.*, 1994). En estas toxinas se propone que el dominio de inserción esta formado por un haz de diez hélices antiparalelas con las hélices 8 y 9 ocultas en el centro. Las hélices 8 y 9, forman un "hairpin" relativamente apolar entre las otras hélices. La inserción a la membrana junto con la formación del canal es disparado por el pH bajo conduciendo a la transición del péptido hasta un estado de "molten globule" (Van der Goot, *et al.*, 1991). Subsecuentemente, el haz se despliega con la retención de la estructura secundaria y se propone que el "hairpin" formado por las hélices 8 y 9 se inserta en la membrana (Duchè, *et al.*, 1994). La mutagénesis exhaustiva de los residuos en el "loop" que conecta la hélice 5 y la hélice 6 podría dar mayor información acerca del papel de esta región en la inserción a la membrana.

Como se mencionó anteriormente, también analizamos las mutaciones en los residuos D242 y R265 localizados en la región conservada 2 de la δ -endotoxina Cry1Ab (precisamente en la α -hélice 7). Estas mutaciones dieron origen a proteínas fuertemente alteradas en su estabilidad. Esto pudo ser debido a un plegamiento alterado de las proteínas resultantes, lo cual las hizo más susceptibles a las proteasas intracelulares en *E. coli*. Cuando estos genes mutantes fueron expresados en una cepa de *E. coli* carente de proteasas, la cepa BL21, hubo un considerable incremento en el rendimiento de las proteínas mutantes (

figura 2c del artículo).

Similarmente, cuando extractos crudos de las cepas que acarrean los genes mutantes fueron tratados con tripsina durante 15 minutos, no se detectó antígeno de la toxina al usar un anticuerpo anti-Cry1Ab (figura 2b del artículo adjunto). Considerando las estructuras tridimensionales de las toxinas Cry1Aa (Grochulski, et al., 1995) y Cry3A (Li *et al.*, 1991), la interfase entre el dominio I y el dominio II está caracterizada por la presencia de numerosas fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. En base a la estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa, se predice que en la toxina Cry1Ab hay un total de 16 puentes salinos: cuatro de ellos son interacciones ocultas que se tienden entre los dominios I y II (Grochulski *et al.*, 1995). Uno de estos puentes salinos fue perturbado de tres maneras: 1. reemplazando el ácido aspártico en la posición 242 con cisteína (D242C) o asparagina (D242N), 2. reemplazando la R en la posición 265 con cisteína (R265C) y 3. o reemplazando ambos de ellos por cisteínas (D242C/R265C). En cualquier caso, fueron sintetizadas proteínas mutantes alteradas en su estabilidad estructural. El residuo R234 también está localizado en la α -hélice número 7 de la proteína Cry1Ab y la estructura tridimensional de la toxina homóloga Cry1Aa muestra que está participando en la formación de un puente salino con el D274 ubicado en el dominio II en la α -hélice 8. La mutagénesis de este residuo en la toxina Cry1Ab causó la síntesis de una proteína con alteraciones estructurales importantes y se volvió altamente susceptible a la tripsina ó al jugo gástrico proveniente del insecto (Dean, *et al.*, 1995, comunicación personal). El puente salino formado entre el D242 y la R265, aparentemente ha sido conservado a través del proceso

evolutivo en todas las δ -endotoxinas Cry1's y las Cry3's descritas hasta ahora y en la mayoría de las proteínas Cry4's y Cry5's. Es una idea general de que los elementos altamente conservados dentro de una familia de proteínas pudieran jugar un papel importante en su estructura y/o en su función. (Creighton, 1994). Se ha mostrado que los puentes salinos conservados, están menos expuestos al solvente que los no conservados (Hendsch y Tidor, 1994; Anderson *et al.*, 1990) e incluso, hay una correlación positiva entre la conservación y la accesibilidad: entre más conservado esté un puente salino más oculto está en la estructura (Chotia, 1976). Esto sugiere un papel relativamente importante a los puentes salinos menos expuestos con respecto a los más expuestos al solvente (Waldburger *et al.*, 1995; Schueler y Margalit, 1995). Se ha propuesto que los puentes salinos ocultos pueden tener un papel más específico en el establecimiento de una estructura determinada que de otra forma no habría sido mantenida, contribuyendo de esta manera a la determinación de la estructura requerida a través del proceso de plegamiento (Hendsch y Tidor, 1994; Schueler y Margalit, 1995). Todos estos resultados sugieren que los puentes salinos en la interfase entre el dominio I y el dominio II pudieran ser importantes durante el proceso de plegamiento de la toxina, pero no se puede descartar si también tiene un papel en la toxicidad.

La información disponible permite dar forma a un modelo sobre un mecanismo de acción en el que cada uno de los dominios juega su papel para dar como resultado final la inserción de la proteína, o parte de ella, en la membrana. Esto finalizaría con la formación de un canal mediante el cual se abate el gradiente electroquímico generado por la bomba electrogénica. De esta manera, la energía necesaria para el transporte de nutrientes hacia

el interior de la célula también se ve afectado. Es interesante pues, que la actividad tóxica de la proteína insecticida producida por *Bt* tenga que ver con la alteración de la permeabilidad de las células blanco tal y como sucede con los insecticidas químicos más potentes (ver la introducción). En todos los sistemas, el transporte de iones a través de la membrana es un proceso fundamental cuya integridad es indispensable mantener con el fin de contender con la homeostasis de los procesos celulares. Es importante señalar que las toxinas más potentes, perturban procesos celulares fundamentales como el anteriormente señalado transporte de iones, la síntesis de proteínas, el transporte activo y la actividad proteolítica.

Tomados juntos, estos datos apoyan el modelo de que el dominio I está involucrado en la inserción en la membrana y en la formación del poro iónico por las δ -endotoxinas de *Bt*.

Luego entonces, el dominio I de las toxinas de *Bt* sería como una proteína efectora en donde la función principal de esta sería formar canales iónicos de manera específica después de que han tenido lugar varios eventos moleculares. Primero, la protoxina es procesada hasta una forma activa, la toxina, de manera controlada por medio de proteasas intestinales que eliminan algunas porciones de la protoxina. Segundo, esa toxina interactúa de manera específica con proteínas membranales (sitios de unión) de tal manera que esta interacción, además de que acerca a la toxina a la bicapa lipídica, la podría conducir a la adopción de un estado competente para la inserción final en la membrana exponiendo residuos aromáticos e hidrofóbicos inicialmente ocultos y ahora expuestos después de un cambio conformacional de gran magnitud en donde el pH del lumen.

la interacción con el sitio de unión con el consiguiente acercamiento a la bicapa lipídica juegan un papel fundamental.

Con respecto al sistema de mutagénesis descrito aquí puede ser un método general que permita obtener más mutantes de manera eficiente con el fin de estudiar otros residuos también conservados y cuidadosamente seleccionados en otras regiones de las toxinas o, aun más, de otras proteínas.

Conclusiones.

Los datos descritos aquí indican que:

1. El dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bt berliner* forma canales iónicos en ausencia del dominio II y el dominio III.
2. La mutación R173 no afecta ni la toxicidad ni la selectividad, pero de alguna manera si afecta a la capacidad de la proteína mutante para competir por el sitio de unión con la proteína silvestre.
3. La mutagénesis de los residuos D242 y R265, afectan la estabilidad de las proteínas mutantes haciéndolas más susceptibles a las proteasas intracelulares y a la tripsina.
4. La técnica de mutagénesis usada aquí es un instrumento útil que nos permite obtener mutantes con alta eficiencia. Sin embargo con este sistema la eficiencia para la obtención de mutantes en un solo codón o en un conjunto de codones contiguos es del 50%. Creemos que aún es posible mejorar este método de mutagénesis de tal manera que las mutaciones sencillas se puedan obtener con un 100% de eficiencia. Esto podría hacerse añadiendo un sitio de restricción en uno de los oligonucleótidos mutagénicos similar al incorporado en uno de los extremos de tal manera que cuando el fragmento de DNA

obtenido por PCR sea digerido para la clonación, también se descarten aquellas secuencias que no llevan la mutación deseada. Consideramos que éste es un método práctico para obtener mutantes con una alta eficiencia.

Perspectivas.

La búsqueda de nuevas toxinas es un campo de intensa investigación. Seguramente el aislamiento de nuevas cepas a partir del suelo dará como resultado el descubrimiento de nuevas toxinas con insectos blanco diferentes a los ahora existentes. Por otro lado el estudio de la toxina desde el punto de vista estructural y funcional conducirá al esclarecimiento de el papel que cada una de las regiones tiene en la participación de la actividad tóxica. Esto permitirá el uso más racional de las técnicas como la mutagénesis dirigida y la recombinación para obtención de toxinas quiméricas con propiedades novedosas.

El estudio de las proteínas receptoras para estas toxinas proporcionará un avance fundamental en el entendimiento de las primeras interacciones entre una toxina y las proteínas y su hospedero. A la fecha, no se conoce con certeza el papel del receptor en la toxicidad de las proteínas insecticidas. Su incorporación en bicapas lipídicas planas y los estudios en este sistema permitirá evaluar la función de estas proteínas de superficie en la toxicidad y en la resistencia. Por otro lado, los experimentos de mutagénesis extensiva de la proteína que sirve como receptor de las toxinas permitirá localizar los residuos que tienen que ver directamente con la unión de las δ -endotoxinas. Este bioinsecticida se perfila como un modelo con una importante perspectiva tanto en el control biológico como en el estudio de las relaciones estructura-función. El estudio del dominio II permitirá diseñar estrategias para la

manipulación dirigida de la selectividad hacia nuevos organismos que se conviertan en peligros potenciales para el ser humano con respecto a la competencia por satisfactores comunes como son los alimentos, el espacio y las materias primas.

Resumen.

Mostramos aquí que una preparación homogénea del dominio I es capaz de formar poros en bicapas lipídicas planas como lo hace la toxina completa. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en donde se muestra la purificación del dominio I de una toxina Cry1A junto con la descripción de la actividad formadora de poro.

En este trabajo también se describe un sistema de mutagénesis por PCR que fue usado para obtener todas las secuencias mutantes descritas aquí. Este sistema se basa en el principio de la extensión de las secuencias mutagénicas por solapamiento. Este sistema de mutagénesis permite obtener de manera dos mutantes sencillas en dos ciclos de PCR y dobles mutantes en tres ciclos con una eficiencia de 100%. La mayoría de los métodos de mutagénesis por PCR tienen en el mejor de los casos de un 30% hasta un 60% de eficiencia.

Describimos aquí también que la mutación R173S no afecta apreciablemente la toxicidad, pero sí afecta la unión a vesículas obtenidas a partir de membranas de la microvellosidad intestinal de larvas de *T. ni*. Sin embargo, este residuo sí afecta la capacidad de competencia de la toxina mutante con la proteína silvestre por sitios receptores localizados en la superficie de las vesículas del intestino medio de larvas de insectos. No investigamos de qué manera este evento es afectado por la presencia de la mutación. El residuo de R173 se localiza en cerca del "loop" que une a la α -

héllice 5 y la α -héllice 6 de la toxina Cry1Ab. Se deben hacer más estudios para conocer el papel de las mutaciones en este y otros residuos en la misma región con el fin de evaluar de manera más precisa su participación en la actividad de la toxina. También mostramos que los residuos D242 y R265 son residuos aminoacídicos importantes en el mantenimiento de la estructura terciaria, probablemente estabilizando el plegamiento de la toxina. La estructura de rayos-X de la toxina Cry1Aa, la cual comparte un 90% de similitud en los primeros 650 residuos N-terminales con la toxina Cry1Ab, muestra que estos dos residuos están participando en la formación de un puente salino ubicado en la interfase entre el dominio I y el dominio II. La eliminación pues de este puente salino dió como resultado la adquisición, por parte de la toxina mutante, de una mayor susceptibilidad a las proteasas intracelulares y a la tripsina lo cual habla de la importante labor estructural que esta interacción iónica tiene dentro de la toxina Cry1Ab.

REFERENCIAS.

- Ahmad, W., and D. J. Ellar. 1990. Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 68: 97-104
- Almond, B. D., and D. H. Dean. 1993. Structural stability of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin homolog-scanning mutants determined by Susceptibility to proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2442-2448.
- Anderson, D. E., W. J. Becktel, and F. W. Dahlquist. 1990. pH-Induced denaturation of proteins: a single salt bridge contribute 3-5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysozyme. *Biochemistry.* 29: 2403-2408.
- Armstrong, J. L., G. F. Rohrmann, and G. S. Beaudreau. 1985. Delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 161: 39-46.
- Aronson, A. I. 1993. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. *Mol. Microbiol.* 7: 489-496.
- Aronson, A. I., D. Wu, and C. Zhang. (1995). Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* 177: 4059-4065.
- Badil, M. H., A. E. Flores, R. Foroughbakhch, H. Quiroz, and R. Torres. 1996. Ecología de manejo integrado de plagas (MIP) con observaciones sobre control microbiano de insectos. En: Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. L. J. Galán Wong, C. Rodríguez Padilla, y H. A. Luna Olvera, Eds. Universidad Autónoma de Nuevo León. Mexico. pp 21-49
- Bloomquist, J. R. 1996. Ion channels as targets for insecticides. *Ann. Rev Entomol.* 41: 163-190.
- Butko, P., M. Couroyer, M. Pusztay-Carey, and W. Surewicz. 1994. Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIC. *FEBS Lett.* 340: 89-92.
- Chen, X. J., A. Curtis, E. Alcantara, and D. H. Dean. 1995. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270: 6412-6419.
- Chilcott, C. N., and D. J. Ellar. 1988. Comparative study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2551-2558.
- Choma, C., W. K. Surewicz, and H. Kaplan. 1991. The toxic moiety of the *Bacillus thuringiensis* protoxin undergoes a conformational change upon activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 933-938.
- Chotia, C. 1976. The nature of the accesible and buried surfaces in proteins. *J. Mol. Biol.* 105: 1-14.

- Ciofi, M. 1979. The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue Cell*. 11: 467-479.
- Creighton, T. E. 1994. *Proteins: structures and molecular properties*. W. H. Freeman and Company. New York. 507pp.
- Crickmore, N., D. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, D. Lereclus, J. Baum, J. Van Rie, D. Dean. 1996. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html
- Dean, D. H., F. Rajamohan, M. K. Lee, S. J. Wu, X. J. Chen, E. Alcantara, and S. R. Hussain. 1995. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis: a minireview. (1996) *Gene* 179: 111-117.
- Denolf, P., S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele, and J. Van Rie. 1993. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera:Pyralidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1828-1837.
- Dow, J. A. T. 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect. Physiol.* 19: 187-238.
- Drobniewski, F. A., and D. J. Ellar. 1988. Investigation of the membrane lesion induced in vitro by two mosquitocidal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 16: 195-199.
- Duchè, D., M. W. Parker, J. M. González-Mañas, F. Patus, and D. Baty. 1994. Uncoupled steps of the colicin A pore formation demonstrated by disulfide bond engineering. *J. Biol. Chem.* 269: 6332-6339.
- English, H., H. L. Robbins, M. A. Von Tersch, C. A. Kulesza, D. Ave, D. Coyle, C. S. Jany, and S. L. Slatin. 1995. Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24: 1025-1035.
- Faust, R.M., and A. L. Bulla, Jr. 1982. *Bacterial and other toxins as insecticides in microbial and viral pesticides*. Ed. Edouard Kurstaki. Marcel Dekker, Inc. New York. 3: 75-206.
- Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology*. 10: 271-275.
- Feldmann, F., A. Dullemans, and C. Waalwijk. 1995. Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2601-2605.
- Garczynsky, S. F., J. W. Crim, and M. J. Adang. 1991. Identification of putative brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. *App. Environ. Microbiol.* 57: 2816-2820.

- Gazit, E., and Y. Shai. 1993. Structural and functional characterization of the a5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochemistry*. 32: 4329-3436.
- Ge, A. Z., N. I. Shivarova, and D. H. Dean. 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4037-4041
- Ge, A. Z., D. Rivers, R. Milne, and D. H. Dean. 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIAc. *J. Biol. Chem.* 266: 17954-17958.
- Gill, S. S., and P. Pietrantonio. 1996. Mechanism of action of insecticidal *Bacillus thuringiensis* endotoxins.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, and V. Francis. 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 270: 27277-27282.
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Puzstay-Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler. 1996. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254: 447-464.
- Harvey, W. R., and S. Nedergaard. 1964. Sodium-independent active transport of potassium in the isolated midgut of the cecropia silkworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 51: 757-765.
- Hendsch, Z., and B. Tidor. 1994. Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis. *Prot. Sci.* 3:211-226.
- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansens, and H. Van Mellaert. 1988a. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high affinity bindings sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 7844-7848.
- Hofmann, C., P. Luthy, R. Hutter, and V. Pliska. 1988b. Binding of the δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* 173: 85-91.
- Höfte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Hussain, S. R., A. I. Aronson, and D. H. Dean. 1996. Substitution of residues on the proximal side of CryIA *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226: 8-14.

Ishii, T., and M. Ohba. 1994. The 23-kilodalton CytB protein is solely responsible for mosquito larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *kyushuensis*. *Curr. Microbiol.* 29: 91-94.

King, E. 1996. Control biológico de insectos y ácaros plaga. En: *Avances recientes en la biotecnología de Bacillus thuringiensis*. pp 13-19. L. J. Galán-Wong, C. Rodríguez-Padilla, y H. A. Luna-Olvera, eds. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Knight, P. J. K., N. Crickmore, and D. J. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11: 429-436.

Knight, P. J. K., B. Knowles, and D. J. Ellar. 1995. Molecular cloning of an insect Aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. Biol. Chem.* 270: 17765-17770.

Knowles, B. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin. *Adv. Insect. Physiol.* 24: 275-308.

Knowles, B. H. and D. J. Ellar. 1986. Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific δ -endotoxin. *J. Cell Sci.* 84: 89-101.

Knowles, B. H., P. J. K. Knight, and D. J. Ellar. 1991. *N*-acetylgalactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognises an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 245: 31-35.

Knowles, B. H., and J. A. T. Dow. 1993. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* 15: 469-476.

Knowles, B. H., M. R. Blatt, M. Tester, J. M. Hornsell, J. Carrol, G. Menestrina, and D. J. Ellar. 1989. A cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 244: 259-262.

Knowles, B. H. and D. J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with different insect specificity. *Biochem. Biophys. Acta* 924: 509-518.

Koni, P. A., and D. J. Ellar. 1993. Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. *J. Mol. Biol.* 229: 319-327.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T5. *Nature* 227: 680-685.

Lee, M. K., B. A. Young, and D. H. Dean. 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth ligand receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 216: 306-312.

- Lee, M. K., F. Rajamohan, F. Gould, and D. H. Dean. 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 3836-3842.
- Lee, M. K., R. E. Milne, A. Z. Ge, and D. H. Dean. 1992. Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* 267: 3115-3121.
- Li, J., J. Carrol, and D.J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353: 815-821.
- Li, J., P. A. Koni, and D. J. Ellar. 1996. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* 257: 129-152.
- Liang, Y, and D. H. Dean. 1994. Location of a lepidopteran specificity region in insecticidal crystal protein CryIIA from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 13: 569-575.
- Lorence, A., A. Darszón, C. Díaz, R. Quintero, and A. Bravo. 1995. δ -endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 360: 217-222.
- Lu, H., F. Rajamohan, and D. H. Dean. 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIA(a) associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* 176: 5554-5559.
- Martin, F. G. and W. R. Harvey. 1994. Ionic circuit analysis of K^+/H^+ antiport and amino acid/ K^+ symport energized by a proton-motive force in *Manduca sexta* larval midgut vesicles. *J. Exp. Biol.* 196: 77-92
- Martin, P. A. W., and R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2437-2442.
- Martin, M., and M. Wolfersberger. 1995. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane vesicles act synergistically to cause very large increases in the conductance of planar lipid bilayers. *J. Exper. Biol.* 198: 91-96.
- Masson, L., Y. Lu, A. Mazza, R. Brousseau, and M. J. Adang. 1995. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* 270: 20309-20315.
- Nakamura, K. 1994. Genetic Engineering on *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. pp 665-682. En: Recombinant microbes for industrial and agricultural applications. Y. Murooka and T. Imanaka, Eds. Marcel Dekker, Inc. New York.

- Oddou, P., H. Hartmann, and M. Geiser. 1991. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 202: 673-680.
- Parker, M. W., and F. Patus. 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 391-395.
- Parker, M. W., F. Patus, A. D. Tucker, and D. Tsernoglou. 1989. Structure of the membrane pore-forming fragment of colicin A. *Nature.* 337: 93-96.
- Rajamohan, F., J. A. Cotrill, F. Gould, and D. H. Dean. 1996a. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 271: 2390-2396.
- Rajamohan, F., O. Alzate, J. A. Cotrill, A. Curtiss, and D. H. Dean. 1996b. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: mutations at domain II of CryAb enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 14338-14343.
- Sangandala, S., F. W. Walters, L. H. English, and M. J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryI(A)(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+\text{-K}^+$ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* 269: 10088-10092.
- Schueler, O., and H. Margalit. 1995. Conservation of salt bridges in protein families. *J. Mol. Biol.* 248: 125-135.
- Schwartz, J. L. 1994. Ion channel activity and cellular signalling pathways related to the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its impact to the Environment. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, R.O.C. 17-21, October. Abstract p65.
- Schwartz, J. L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau, and E. Rousseau. 1993. Lepidopteran-specific δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132: 53-62.
- Silverman, J. A., J. A. Mindell, H. Zhan, and H. Collier. 1994. Structure function relationships in diphtheria toxin channels: I. Determining a minimal channel-forming domain. *J. Membr. Biol.* 137: 17-28
- Slatin, S. L., C. K. Abrams, and L. English. 1990. Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Acta* 169: 765-772.
- Smedley, D. P., and D. J. Ellar. 1996. Mutagenesis of the three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possible membrane insertion. *Microbiol.* 142: 1617-1624

- Vadlamudi, R. K., T. H. Ji, L. A. Bulla, Jr. 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp *berliner*. *J. Biol. Chem.* 268: 12334-12340.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji, L. A. Bulla, Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270: 5490-5494.
- Van der Goot, F. G., J. M. Gonzalez-Mañas, J. H. Lakey, and F. Patus. 1991. A "molten globule" membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature.* 354: 408-410.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele, and H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186: 239-247.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele, and H. Van Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinant of the specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1378-1385.
- Von Tersch, M. A., S. L. Slatin, C. A. Kulesza, and L. H. English. 1994. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3711-3717.
- Wabiko, H., K. C. Raymond, and L. A. Bulla, Jr. 1986. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA.* 5: 305-314.
- Waldburger, C. D., J. F. Schildbach, and R. Sauer. 1995. Are buried salt bridges important for protein stability and conformational specificity. *Nat. Struct. Biol.* 2: 122-128.
- Waldburger, C. D., T. Jonsson, and R. Sauer. 1996. Barriers to protein folding: formation of buried polar interactions is a slow step in acquisition of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 2629-2634.
- Walters, F. S., S. L. Slatin, C. A. Kulesza, and L. H. English. 1993. Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) δ -endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 921-926.
- Whiteley, H. R., and H. E. Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 549-576.
- Widner, W. R., and H. R. Whiteley. 1990. Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 172: 2826-2832.

Wieczorek, H., M. Putzenlechner, W. Zelske, and W. Klein. 1991. A vacuolar-type proton pump energizes K^+/H^+ antiport in an animal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266: 15340-15347.

Wolfersberger, M., P. Luthy, A. Maurer, P. Parenti, V. F. Sacchi, B. Giordana, and G. M. Hanozet. 1986. Preparation of brush border membrane vesicles (BBMV) from larval lepidopteran midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* A86: 301-308.

Wu, D., and A. I. Aronson. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* 267: 2311-2317.

Wu, S. J., and D. H. Dean. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA δ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* 255: 628-640.

Zhan, H., S. Choe, P. D. Huynh, A. Finkelstein, D. Eisenberg, and R. J. Collier. 1994. Dynamic transitions of the transmembrane domain of diphtheria toxin: disulfide trapping and fluorescence proximity studies. *Biochemistry.* 33: 11254-11263.

Isolation of Cry1Ab protein mutants of *Bacillus thuringiensis* by a highly efficient PCR site-directed mutagenesis system

Roberto Meza, Maria-Eugenia Nuñez-Valdez, Jorge Sanchez, Alejandra Bravo *

Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Mor., Mexico

Received 26 August 1996; revised 3 October 1996; accepted 9 October 1996

Abstract

A site-directed mutagenesis method was designed and used to create Cry1Ab mutant proteins in two of the five highly conserved blocks present in the Cry protein family. Region 1 comprises the central α -helix 5 of domain I and has been implicated in the pore formation activity of the toxin. Substitution of arginine by serine at position 173 (R173S) affects neither structural integrity nor toxicity. Region 2 comprises the major part of the domain I/domain II interface, characterized by the presence of numerous hydrogen bonds and electrostatic interactions. Mutations in the salt bridge formed by aspartic acid 242 and arginine 265 (D242N, D242C, R265C, and D242C/R265C) resulted in structurally unstable mutant proteins as is shown by their increased protease sensitivity and lack of biological activity.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Crystall protein; Mode of action; Receptor binding; PCR mutagenesis

1. Introduction

δ -Endotoxins are members of a protein family produced as crystal inclusion proteins (ICP) by *Bacillus thuringiensis* strains during sporulation [1]. ICPs are highly toxic to a wide variety of important insect pests as well as other invertebrates. Upon ingestion by a susceptible larva, these proteins are solubilized and proteolytically cleaved to a toxic fragment that binds to high affinity sites on the apical membrane of midgut epithelium cells before insertion into the membrane. The inserted toxins disturb the electrolyte balance by creating pores in the cell

membrane, leading to cell lysis and finally to larval death.

The tertiary structures of Cry3A [2] and Cry1Ab toxins [3] have been determined. Both toxins are formed of three structural domains. The N-terminal domain I is a bundle of eight α -helices, with the central α -helix 5 surrounded by amphipathic helices. Domain II consists of three antiparallel β -sheets and 1-2 short α -helices, and domain III is a β -prism structure of two antiparallel strands. Höfte and Whiteley [1] have identified five highly conserved regions among the Cry sequences. The location of these regions in Cry1Aa and Cry3A toxins is similar, found at the central positions of each domain or involved in interdomain contacts. It has been proposed that the high degree of conservation of these blocks and their important structural location would

* Corresponding author. Tel.: +52 (73) 297635; Fax: +52 (73) 172388; E-mail: bravo@ibt.unam.mx

imply that all of the Cry toxins that possess these blocks would share similar structures [2]. The first two conserved regions have the highest degree of identity among the whole Cry family. Region 1 comprises the central α -helix 5 of domain I and region 2 the major part of the domain I/II interface, including the C-terminal half of α -helix 6, α -helix 7, and the β -1 strand of domain II [2,3]. Properties of α -helix 5 have been analyzed by site-directed mutagenesis in the CryIAc toxin. Substitutions in this region maintained receptor binding but caused reduced toxicity for the three tested insects, *Manduca sexta*, *Trichoplusia ni*, and *Heliothis virescens* [4].

In this work, we studied site-directed mutagenesis in regions 1 (residues 157-179) and 2 (residues 202-270) of the *cryIAb* gene in order to know their role in toxicity. The substitutions were introduced by an improved overlapping extension PCR site-directed mutagenesis method [5]. Substitutions in the arginines 173 and 265 (R173S, R265C) and aspartic acid 242 (D242N, D242C) were created.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and media

Escherichia coli strains JM101 [*supE thi-1 D(lac-proAB) F'(traD3proAB+lacIqlacZDM15)*], BL21 [*hsdS gal (lclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)*], DH5 α (*F' lacZ M15 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA relA1 recA1*) and plasmids pUC13 (New England Biolabs), pC34 [6], pBluescript-SK (Stratagene,

La Jolla, CA) and pTH315 [7] were used for the cloning experiments. *E. coli* strains were grown in Luria broth (LB) at 37°C. AcrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* strain 407 [8] was kindly provided by Dr. Lereclus and was grown at 30°C in LB. Antibiotic concentrations for bacterial selection were as follows: ampicillin 100 μ g/ml (for *E. coli*); erythromycin 250 μ g/ml for *E. coli* and 7.5 μ g/ml for *B. thuringiensis*.

2.2. Cloning of the *cryIAb* N-terminal toxic portion

The oligonucleotides RM1 and RM2 (Table 1) were used for PCR amplification of the 2.0 kb fragment containing the N-terminal portion of CryIAb protoxin from pC34 [6]. Both primers contained an extra 8 bp with the *Bam*HI restriction site and primer RM2 has the stop codon TAA. Reaction conditions were as follows: 2 min at 95°C (once), followed by 30 cycles of 1 min at 53°C, 1 min at 72°C and 1 min at 92°C; an extra incubation at 72°C for 5 min. The plasmid pTP650 was constructed by cloning the obtained PCR product into *Bam*HI-digested pUC13.

2.3. DNA manipulations and transformation

Plasmids were extracted from *E. coli* by standard alkaline lysis procedure [9]. Restriction enzymes and T4 DNA ligase were from Boehringer-Mannheim (Mannheim, Germany). DNA fragments were purified from agarose gels using GeneClean (Bio101, La Jolla, CA). Oligonucleotides were synthesized by an Applied Microsystems DNA Synthesizer in the Insti-

Table 1
Characteristics of PCR primers used

Primer	Sequence	Position in <i>cryIAb</i> gene
RM1	5'-GGCGGATCCATTAGTTCGACCTTGTGC	19- 42
RM2	5'-GCGGGATCCTTAAACTAAATGGGATCTGATCAATATGATA	2067-2105
RM3	5'-GGGTTTGTATAAAATTCGCATGTTAATTGG	923- 953
RM4	5'-AACACATAACTGTAATATGTCATCGTTCTCTA	849- 880
RM5	5'-CTAACTGATTAATATCGTTCTCTA	853- 880
RM6	5'-ARACTGPARACATCSNRCARACTGATAAATG	642- 675
RM7	5'-CCTTTATCACTANNSSGGTCACGCTCAAATTTA	610- 643
T3	5'-GCCCGAATTTAACCTCACTAAG	-
T7	5'-CGCGCGTAATACGACTCACTATAG	-
RM8	5'-CCAATCGATATTTCTTGTCCGTAACGC	244- 272
RM9	5'-CTTAAATGGCTGGATTAGTAGGATCTGCTTCC	491- 523
RM10	5'-GCTATATGGAACATATGGGAATGACGCTCC	1149-1179

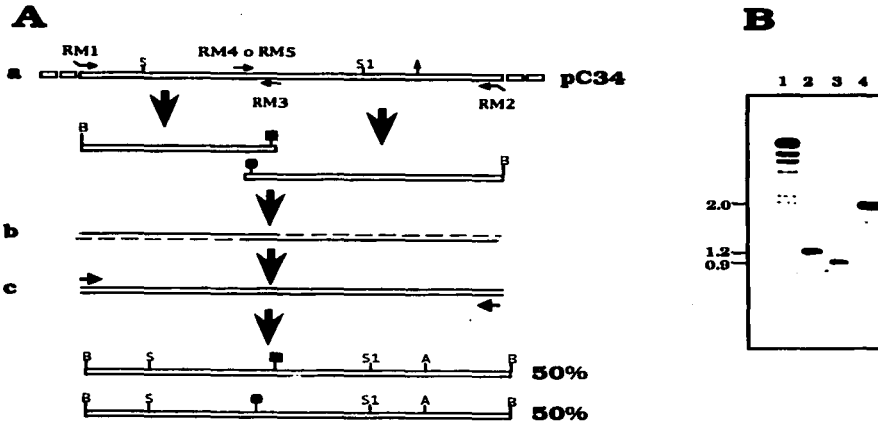


Fig. 1. OE PCR-based site-directed mutagenesis strategy. A: Two separate PCR reactions were run using the flanking and the internal mutagenic primers (a); there is an overlap region between the PCR products, the primers are removed and DNA is denatured, reannealed and extended to produce the full length *cry1Ab* gene (b); finally the flanking primers were added and allowed to amplify until completion for 25 cycles (c). B: Analysis by agarose gel electrophoresis of PCR mutagenic products. Molecular weight markers (1); PCR product obtained using the RM2 and RM4 primers (2); PCR product obtained using the RM1 and RM3 primers (3); PCR product obtained in the second round of PCR after RM1 and RM2 primer addition (4).

tute of Biotechnology/UNAM and PCR amplifications were performed using a thermal cycler GeneAmp PCR system 480 (Perkin-Elmer, Foster City, CA). *Taq* DNA polymerase, PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3) and deoxynucleotides (dNTPs, 250 nM) were from Boehringer-Mannheim. Standard procedures were used for *E. coli* transformation [9]. *Bt* cells were transformed by electroporation as described [8].

2.4. Overlap-extension (OE) PCR site-directed mutagenesis

The OE-PCR mutagenesis strategy requires four oligonucleotides in two sequential PCR reactions (Fig. 1). Table 1 shows the flanking and mutagenic primers used.

2.4.1. Mutagenesis of D242 and R265

First round of PCR: Two separate PCR reactions were run, containing 7 pmol of pTP650 template. One reaction used RM1 and the mutagenic RM3 primers (20 pmol each) to amplify the first portion of the *cry1Ab* gene; the second reaction used RM2 and one of the mutagenic direct primers (RM4 or RMS) to amplify the remaining sequence of the *cry1Ab* gene. The PCR reactions containing 3.0 U *Taq* were done according to the following program: 94°C for 5 min (once), followed by 24 cycles, each consisting of 53°C for 1 min, 72°C for 1 min and 94°C for 1 min.

Second round of PCR: After purification of both PCR products by excising the agarose gel band, a Klenow reaction was performed in order to make the ends blunt [9]. The two PCR products overlap approximately 60 bp. 5 pmol of each purified PCR

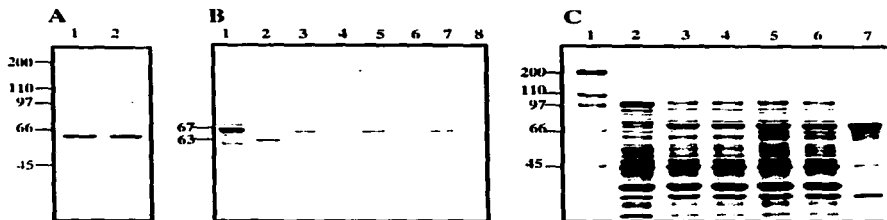


Fig. 2. Expression and trypsin sensitivity of CryIAb mutant proteins. A: Western blot analysis of wild-type (1) and mutant R173S (2) toxins after trypsin digestion. Crude extracts of each clone were treated for 30 min with a 1:50 trypsin to protein ratio. B: Western blot analysis of wild-type (1, 2) and mutants D242C (3, 4), R265C (5, 6) and D242C/R265C (7, 8) before (1, 3, 5, 7) and after trypsin digestion (2, 4, 6, 8) with a 1:50 trypsin to protein ratio for 30 min. C: Electrophoretic analysis on SDS-polyacrylamide gels of wild-type (7) and mutant D242N (3), D242C (4), R265C (5) and D242C/R265C (6) toxins expressed in the protease-minus *Escherichia coli* strain BL21. *E. coli* BL21 strain containing pUC13 plasmid (2); molecular weight markers (1).

product was put in a tube, denatured by boiling for 10 min and cooled on ice for 5 min. PCR buffer and 3 U *Taq* were added, and allowed to extend to produce the full-length *cryIAb* gene, according to the following PCR schedule: 72°C for 3 min (once), followed by 5–7 cycles of 94°C for 1 min, 53°C for 1 min and 72°C for 1 min. Then, 20 pmol of the flanking primers (RM1 and RM2) was added and allowed to amplify until completion for 25 cycles. The mutagenic PCR products were precipitated by adding 0.5 v/v of 7.5 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ and 2 v/v of ethanol at -20°C for 1 h, centrifuged at $10000\times g$ for 15 min, washed twice with cold 70% ethanol, dried and suspended in 20 μl H_2O and restricted with 5 U of *SpeI* and *BfiI* for 2 h. The 1.1 kb *SpeI*-*BfiI* DNA fragment was purified from the agarose gel, ligated to previously *SpeI*/*BfiI*-digested pTP650 and introduced into *E. coli* JM101 strain. The cloned 1.1 kb DNA fragment was sequenced (USBSequance Version 2.0 kit) using RM8, RM9 and RM10 primers (Table 1) as specified by the manufacturer. The double mutant D242C/R265C was obtained using the same strategy with the single mutant D242C cloned in pTP650 as template.

Mutagenesis of R173: A 375 bp *XbaI* fragment from the *cryIAb* gene containing α -helix 5 from domain I was cloned into plasmid pBluescript-SK, this construction was named pC375 and was utilized as

template for the mutagenic PCR reactions. The mutagenic PCR products were produced as described above by two rounds of PCR. The first two simultaneous PCRs were done one with the 5' flanking primer T3 and the mutagenic primer RM6 producing a 294 bp product and the other with the RM7 mutagenic primer and a 3' flanking T7 primer producing a 288 bp product. After the second round of PCR a final PCR product of 541 bp was obtained by amplification with T3 and T7 primers. The mutagenic PCR product was purified, digested with *XbaI* and cloned in the vector pBluescript-SK. This mixture was used to transform *E. coli* strain DH5 α . Colonies were picked at random and sequenced using T3 and T7 primers. The mutated fragment were transferred into the wild-type *cryIAb* protoxin gene by subcloning into the *E. coli*-*Bt* shuttle vector pH7315 [7].

2.5. Preparation of brush border membrane vesicles (BBMV) and fluorescence measurements.

BBMV from fifth instar *Trichophtusia ni* larvae were isolated and prepared as previously reported [10]. Membrane potential changes were monitored with the fluorescent positively charged dye 3,3'-di-propylthiadicarbocyanine (Dis-C $_2$ (5); Molecular Probes, Eugene, OR) as described [10]. Fluorescence was recorded at the 620/670 nm excitation/emission

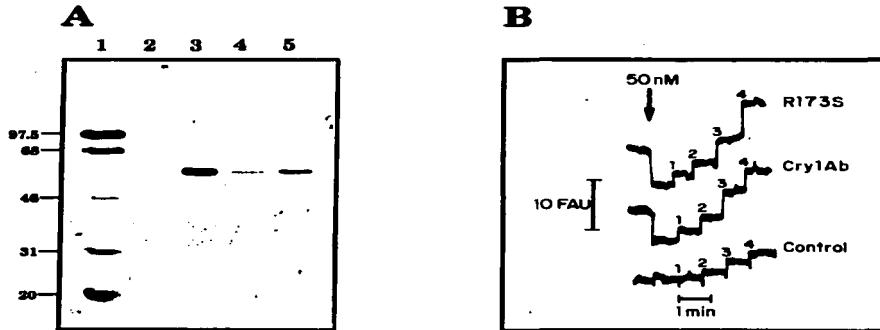


Fig. 3. Analysis of binding capacities and pore formation activity of mutant R173S. A: Homologous competition binding assays on brush border membrane vesicles (BBMV) isolated from *Trichophtasia ni* larvae. Biotinylated Cry1Ab toxin was incubated with the BBMV in the absence (lane 3) or in the presence of a 50-fold excess of unlabeled R173S mutant Cry1Ab competitor (lane 4) or a 300-fold excess of unlabeled Cry1Ab toxin (lane 5). After 1 h of incubation, unbound toxins were removed and vesicles containing bound toxins were loaded onto SDS-PAGE and blotted to a nitrocellulose membrane. Labeled proteins were visualized by means of streptavidin-peroxidase conjugate. Lane 1, biotinylated molecular weight markers. Lane 2, *T. ni* BBMV incubated with unlabeled Cry1Ab toxin. B: Effect of the Cry1Ab and R173S toxins on the membrane potential in *T. ni* midgut BBMV. Membrane potentials of BBMV (20 μ g) loaded with 150 mM KCl, 2 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 10 mM HEPES-HCl pH 7.5 were suspended in 140 mM methylglucamine chloride, 10 mM HEPES-HCl pH 7.5 buffer and recorded as described in Section 2. Pre-equilibration with 1.5 nM Dis-C₃(5) (9 min) is not shown. An upward deflection indicates a membrane potential depolarization. The arrow on top of the traces corresponds to the time of toxin or buffer A addition. FAU=fluorescence arbitrary units. Final K⁺ concentrations were (mM): 1=12, 2=30, 3=66 and 4=136. In the control, buffer was added instead of toxin.

wavelength pair using a Hansatech system (Norfolk, UK). Hyperpolarization causes dye internalization into BBMV and a fluorescence decrease; depolarization causes the opposite effect. Dye calibration and determination of resting membrane potential were performed in the presence of valinomycin (2 mM) by successive additions of KCl to BBMV (20 μ g).

2.6. Binding assays

Homologous competition binding assays of mixtures of biotinylated and native toxins to BBMV were performed as described [11].

2.7. Bioassays

Larvae of *T. ni* were reared on artificial diet and

bioassays with third instar larvae were done as previously described [12].

3. Results and discussion

3.1. OE-PCR mutagenesis of the cry1Ab gene

Traditional OE-PCR strategy utilizes four primers in two sequential PCR reactions to insert a single internal mutation into the target sequence [13]. Two separate PCR reactions are run to amplify separate overlapping sequences of the DNA template. After purification of these mutant fragments, they are brought together, denatured and reannealed. The overlapped duplexes are extended to give a full length fragment containing the mutation. A frequent

problem with this methodology is that the overlapping sequences are too short, resulting in some heteroduplex formation and therefore, yields of mutants are low [14]. We describe here a modification of the OE-PCR method that allows the creation of two independent mutations in two rounds of PCR and double mutations in three rounds of PCR by using four specific primers (Fig. 1). Unlike the traditional OE-PCR method, this one is more effective since the overlapping sequences are longer, improving heteroduplex formation. Also, 50% of the PCR product carries one mutation and the other 50% carries a second mutation. An advantage of this strategy is that no restriction sites are needed to monitor the mutations. We introduced point mutations in a highly conserved residue within the α -helix 5 (R173, present in 32 out of 42 *cry* genes) and within a conserved salt bridge found in the domain I/II interface (D242-R265, present in 38 out of 42 *cry* genes).

3.2. Analysis of the *CryIAb* R173S mutant

In the acrySTALLIFEROUS *Bt* 407 strain, the mutant R173S was expressed and a stable protein was produced following digestion with trypsin (Fig. 2A). The mutation did not alter the toxicity against *T. ni* larvae. Insecticidal activities of wild-type and mutant R173S toxin were comparable (LD_{50} = 9.8 ng/cm² with 7.3-12.3 Cl₉₅ for *CryIAb* toxin and 6 ng/cm² with 3-9 Cl₉₅ for R173S mutant).

Competition binding assays of biotinylated *CryIAb* and R173S were performed with *T. ni* BBMVs to analyze the effect on receptor binding ability. Binding of 10 nM biotinylated *CryIAb* to 20 μ g of BBMVs was inhibited by an excess of 300-fold native *CryIAb* protein (Fig. 3A, lane 5). In contrast, a 50-fold excess of R173S mutant protein was enough to eliminate the binding of biotinylated *CryIAb* toxin (Fig. 3A, lane 4). These results suggest that both proteins recognize the same binding site on the surface of *T. ni* BBMVs and that R173S mutant could have a stronger binding to BBMVs than *CryIAb* toxin under the same conditions. The R173 is located in the C-terminal end of α -helix 5 near the loop connecting α -helices 5 and 6. According to the X-ray structure of the *CryIAa* toxin, the loop connecting α -helices 5 and 6 may be exposed to

the solvent [3]. The substitution R173S could result in a more hydrophobic region, allowing a faster binding or more efficient insertion than wild-type toxin. Mutagenesis of residues in the loop connecting both α -helices could give more insight into the role of this region in irreversible binding.

The effect of mutant R173S in the permeability of BBMVs was analyzed. Addition of 50 nM of either the *CryIAb* or R173S mutant activated toxins to 20 μ g BBMVs produced a fast hyperpolarization (Fig. 3B). After toxin exposure, the vesicles also increased their response to KCl additions when compared to the control to which the same amount of buffer was added. There was no difference in the permeability changes produced by the two toxins showing that the substitution R173S does not affect the pore formation activity. The data presented here indicate that although R173 is highly conserved, the presence of a positive charge in this position is not crucial for the biological activity of the toxin. Since in position 173 only positively charged residues (38 out of 42) or neutral residues (4 out of 42) were found, the substitution by a negatively charged residue could give hints about its possible role in the mode of action of *Cry* toxins.

3.3. Analysis of *CryIAb* mutants in the salt bridge D242-R265

The D242 and R265 are located within the domain I/II interface where numerous van der Waals, hydrogen and electrostatic interactions are present. In the *CryIAb* toxin there are four buried salt bridge interactions between domains I and II [3]. We present the disruption of one of those salt bridges either (i) by replacing Asp 242 with either Cys (D242C) or Asn (D242N); (ii) by replacing Arg 265 with Cys (R265C); or (iii) by replacing both residues with Cys (D242C/R265C). In all cases, mutant proteins altered in stability were synthesized. In *E. coli* JM101 strain the mutant proteins were only observed by detection with polyclonal antibody (Fig. 2B, lanes 2, 4 and 6). These proteins were highly susceptible to trypsin digestion (Fig. 2B, lanes 3, 5 and 7). When mutant genes were expressed in a protease-minus *E. coli* strain BL21, there was a considerable increase in yield (Fig. 2C, lanes 3-6). The D242-R265 salt bridge is highly conserved within

the Cry family. In most cases, conserved elements are important for the proper structure or functionality of proteins [15]. Also, it has been proposed that conserved salt bridges are less exposed to solvent [16] suggesting a relatively important role of the buried salt bridges for establishing a certain structure [17,18]. Point mutations D242A and R234A in Cry1Ab toxin also produced toxins highly susceptible to trypsin or gastric juice (D. Dean, personal communication) supporting the proposition that salt bridges in the domain I/II interface are important for the proper folding of the toxin. Nevertheless, a role in toxicity of this region cannot be ruled out.

Acknowledgments

We thank L. Güereca for technical assistance, P. Gaytan and E. Lopez for oligonucleotide synthesis, E. Aranda and L. Lina for bioassays. R.M. was indebted to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for a fellowship. This work was supported by Programa de Apoyo a la División de Estudios de Posgrado and Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM IN304293.

References

- [1] Hofte, H. and Whiteley, H.R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.
- [2] Li, J., Carroll, J. and Ellar, D.J. (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815-821.
- [3] Grochulsky, P., Musson, L., Borisova, S., Pusztay-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. and Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254, 447-464.
- [4] Wu, D. and Aronson, A.I. (1992) Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* 267, 2311-2317.
- [5] Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the PCR. *Gene* 77, 51-56.
- [6] Wabiko, H., Raymond, K.C. and Bulla Jr. L.A. (1986) *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA* 5, 305-314.
- [7] Arantes, O. and Lereclus, D. (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108, 115-119.
- [8] Lereclus, D., Arantes, O., Chauvaux, J. and Lecadet, M.-M. (1989) Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 211-218.
- [9] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [10] Lorence, A., Darzon, A., Diaz, C., Liévano, A., Quintero, R. and Bravo, A. (1995) δ -endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 360, 217-222.
- [11] Boshch, D., Schipper, B., van der Kleij, H., de Maagd, R.A. and Stiekema, W.J. (1994) Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *BioTechnology* 12, 915-919.
- [12] Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. and Bravo, A. (1994) PCR analysis of the insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 353-356.
- [13] Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R.K. (1988) A general method of *in vivo* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16, 7351-7367.
- [14] Shyamala, V. and Ames, F.L.G. (1991) Use of exonuclease for rapid polymerase-chain-reaction-based *in vitro* mutagenesis. *Gene* 97, 1-6.
- [15] Creighton, T.E. (1993) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd edn., pp. 261-325. W.H. Freeman and Company, New York.
- [16] Schueler, O. and Murgalit, H. (1995) Conservation of salt bridges in protein families. *J. Mol. Biol.* 248, 125-135.
- [17] Hendsch, Z.S. and Tidor, B. (1994) Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatics analysis. *Prot. Sci.* 3, 211-226.
- [18] Waldburger, C.D., Schildbach, J.F. and Sauer, R.T. (1995) Are buried salt bridges important for protein stability and conformational specificity? *Struct. Biol.* 2, 122-128.