

03088

6

Rij

Universidad Nacional Autónoma de México
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado/CCH
Instituto de Biotecnología

"Análisis de la Actividad de Formación de Poro de las Proteínas Cry de
Bacillus thuringiensis en Presencia de su Receptor Nativo"

T E S I S

que para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología
Presenta

M.C. Argelia Lorence Quiñones

Cuernavaca, Morelos

Noviembre de 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Esta investigación se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología/UNAM, bajo la dirección de la Dra. Ma. Alejandra Bravo de la Parra. Para el desarrollo del trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP-Tesis doctoral) a través de los proyectos 030305, 030385 y 030528.

Agradecimientos

A la Dra. Alejandra Bravo a quien por su dirección y apoyo debo parte fundamental de mi formación.

A los miembros del Comité Tutorial, los Dres. Alejandra Bravo, Alberto Darszon, Rodolfo Quintero y Xavier Soberón, por su valiosa aportación en la supervisión y discusión del trabajo.

A los integrantes del jurado, los Dres. Lourival Possani, Alejandra Bravo, Alberto Darszon, Rodolfo Quintero, Luis Vaca, Lorenzo Segovia y Roberto Stock por su valiosa revisión y discusión del contenido de este documento.

Al Dr. Eduardo Aranda y la Biol. Laura Lina por su apoyo en la cría de los insectos y la realización de los bioensayos.

Al Dr. Arturo Liévano y la M.C. Claudia Díaz por su ayuda y asesoría para los experimentos llevados a cabo en el sistema de bicapas planas.

Al Dr. Humberto Flores y al Sr. Pedro Saucedo por su ayuda en la elaboración de algunas figuras.

Al Dr. Rodolfo Quintero por su ejemplo y apoyo incondicional.

A mis compañeros Roberto Meza y Leopoldo Güereca por la paciencia con la que siempre atendieron mis dudas.

A todos los integrantes de los grupos de la Dra. Alejandra Bravo y el Dr. Mario Soberón por hacer del laboratorio un lugar muy agradable para trabajar.

A Oswaldo

Gracias por tu apoyo

A mis padres

Ma. de Lourdes y Rigoberto

Gracias por su ejemplo y apoyo incondicional

A mis hermanas

Ana Luisa, Lourdes y Elba Esther

Gracias por su ánimo y alegría de vivir

A Jéssica

Por su alegría de vivir

A Mamá Trini y Papá Modes

Gracias por todo su cariño

A mis tías Luz Elba y Tola

Gracias por contagiarme el gusto por la investigación

A mis amigas

Rosa Luz, Alma y Elizabeth

Gracias por su franqueza e incondicional apoyo

Resumen

Las proteínas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis* son una familia de toxinas activas en diversos tipos de insectos plaga. Estas moléculas se acumulan en cristales paraesporales que las proteasas del intestino de las larvas de los insectos solubilizan y activan. Los productos maduros o toxinas, se unen a receptores localizados en la microvellosidad apical (MA) de las células epiteliales del intestino medio, donde, después de un cambio conformacional se insertan en la membrana. La inserción, seguida de la agregación de varias moléculas conduce a la formación de poros que alteran las propiedades endógenas de permeabilidad de la MA causando la entrada de agua a las células, la destrucción del tejido intestinal y finalmente la muerte de las larvas. Se ha reportado que el posible receptor para varias toxinas Cry en diversas especies es una aminopeptidasa N (APN) que está anclada a la membrana por medio de glicosilfosfatidilinositol (GFI). Esta ancla es susceptible a la acción de una fosfolipasa C (FLC) específica. La estructura tridimensional de las proteínas Cry mostró que están organizadas en tres dominios a los que se ha asociado una función específica. Se propone que el dominio I, constituido por siete α -hélices es el responsable de la formación de poros. Existe evidencia que indica que la hélice central tiene un papel importante en esta actividad. El dominio II participa en la interacción reversible e irreversible con el receptor, mientras que el dominio III está involucrado en la preservación de la estructura y en la interacción con el receptor.

El objetivo planteado en este trabajo fue estudiar la actividad de formación de poro de las proteínas Cry en presencia de su receptor nativo y analizar la posible participación de la hélice central en esta actividad. Para abordar estos objetivos se eligió utilizar como modelo la proteína Cry1Ac de la cepa HD-73 var. *kurstaki* y algunas mutantes en la hélice α -5 (A164P y L167F) en dos lepidópteros susceptibles, *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*. Para llevar a cabo este análisis se usaron dos técnicas que permiten caracterizar la actividad de formación de poro. La primera se basa en el monitoreo de la fluorescencia de una sonda que se distribuye dentro y fuera de la membrana en función de los cambios en el potencial. La segunda es una técnica llamada bicapas lipídicas planas (BLP) que permite estudiar canales iónicos con un nivel de resolución unimolecular. En ambos sistemas se utilizaron vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) purificadas a partir del intestino medio de los insectos antes citados.

Los principales resultados obtenidos se pueden resumir como sigue. El efecto producido por la toxina Cry1Ac silvestre a los pocos segundos de estar en contacto con la membrana que contiene a su receptor proveniente de *T. ni* y *H. virescens* es inducir una vía de permeabilidad con una cierta preferencia hacia los cationes. A diferencia de la silvestre, las mutantes A164P y L167F no produjeron efecto alguno aún a una dosis cinco veces mayor. Estos resultados sugieren que las sustituciones puntuales introducidas en la hélice α -5 causaron la pérdida de la capacidad de formación de poro, sin embargo, es necesario llevar a cabo más experimentos para aclarar si participa en el proceso de inserción o forma parte del canal.

Al fusionar VMMA de *T. ni* a BLP se observó la actividad de canales catiónicos endógenos con una conductancia de 160 y 380 pS. Cuando se agregó la toxina Cry1Ac silvestre (200 pM) a las bicapas que contenían el receptor, se notó la aparición de canales catiónicos de conductancia muy alta (1.1-3 nS) con un comportamiento cinético muy diferente del de los canales intrínsecos. Esta evidencia apoya el modelo de poro que contempla una unidad mínima formada de varias moléculas (oligómero). Con la finalidad de obtener registros más finos se propuso analizar la participación del posible receptor de la toxina Cry1Ac, la APN, en la actividad de formación de poro, así como encontrar algún agente que nos permitiera bloquear los canales endógenos. Utilizando el sistema de fluorescencia encontramos que la actividad de formación de poro de Cry1Ac depende de la cantidad de APN presente en las VMMA pero no de su actividad enzimática. Al hacer experimentos con vesículas tratadas con la FLC específica para GFI que eliminó el 75 % de la enzima, se demostró que la APN unida con GFI es el posible receptor para la toxina Cry1Ac. Asimismo se encontró que el Cs⁺ es un agente que permite bloquear los canales intrínsecos sin afectar al poro formado por la toxina. Proponemos que este catión puede ser una herramienta muy útil que en el futuro permitirá hacer estudios más finos acerca de la participación del receptor en la formación del poro así como de los residuos involucrados en esta actividad.

Vo.Bo. Dra. Ma. Alejandra Bravo, de la Parra/Tutor Principal

Summary

Bacillus thuringiensis Cry proteins are a family of toxins active against several insect pests. These molecules accumulate in parasporal crystals. Upon ingestion by susceptible insects the crystals are solubilized and activated by gut proteases producing the active toxin. Subsequently, the toxin binds to receptors on the surface of the midgut epithelial cells, undergoes a conformational change and inserts into the membrane. Oligomerization of the toxin possibly follows, and this oligomer then forms a pore that leads to cell lysis. The putative receptor for several Cry proteins has been described as a 120 kDa aminopeptidase N (APN), that has a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor susceptible to the action of GPI-specific phospholipase C (PIPLC). Structural studies demonstrate that Cry toxins are globular molecules composed by three domains: domain I constituted by α -helices is the pore forming domain, different evidences suggest that α -helix 5 has an important role in pore forming activity, domain II is involved in the receptor interaction both, reversible and irreversible, and domain III is involved in structure stability and specificity.

The objective of this work is to study the pore formation activity of Cry toxins in the presence of its native receptor and to analyze the role of α -helix 5 in this activity. As a model we selected the Cry1Ac toxin from HD-73 strain var. *kurstaki* and some mutants in helix α -5 (A164P, L167F), and two susceptible insects *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. Two different methodologies were used. The first one is based in a fluorescent dye sensitive to membrane potential changes. The second is the planar lipid bilayer (PLB) technique that allows the resolution of single channel conductances. In both systems brush border membrane vesicles (BBMV) isolated from the midgut of selected insects were used.

The Cry1Ac toxin effect, after few seconds of incubation with the membrane, consist in an increase in the permeability to cations. In contrast to the wild type, mutant toxins did not produce any effect even at 5 fold higher doses. These results suggest that this point mutations in helix α -5 caused the lost of capability to form cationic channels. However, it is still necessary to analyze if these mutants are altered in the insertion into the membrane or pore formation activity.

When the BBMV were fused to the PLB, endogenous cationic channels were observed (160 and 380 pS). When the Cry1Ac toxin was added to PLB with fused BBMV different cationic channels were obtained, they exhibited a very high conductance (1.1-3 nS) and showed a very different kinetic behavior to the intrinsic channels. These high conductances channels suggest the participation of several molecules in the pore formation (oligomerization). The role of the receptor was also analyzed. In the fluorescent membrane potential sensitive system we found that Cry1Ac pore forming activity depends on the amount of APN present on the *T. ni* BBMV. Inhibition of APN activity with bestatin did not affect Cry1Ac activity, suggesting that the action of this toxin depends on the presence of APN but not of its enzymatic activity. The BBMV were treated with PIPLC, that release the 75% of APN activity. Under this condition toxin effect was observed only when a 4 fold higher doses was used, suggesting that GPI anchored APN is the possible receptor of Cry1Ac toxin in *T.ni*.

Finally, we found that Cs⁺ blocks the intrinsic channels without affecting the Cry1Ac toxin action. This result may be helpful for the analysis of the pore formation activity of the toxin in the presence of its receptor, as well as for the identification of the residues involved in this activity.



Vo.Bo. Dra. Ma. Alejandra Bravo de la Parra
Tutor Principal

Indice

Indice de Figuras	iii
Indice de Tablas	iv
Resumen	v
Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Los biopesticidas en el marco de la agricultura sustentable	1
1.2. El biopesticida más usado en el mundo, <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
1.3. La familia de proteínas Cry	2
1.4. La estructura de las toxinas Cry3A y Cry1Aa	9
1.5. El mecanismo de acción de las proteínas Cry	11
1.5.1 La solubilización	11
1.5.2 El procesamiento	12
1.5.3 La unión al receptor	13
1.5.3.1 Unión reversible e irreversible	15
1.5.3.2 Naturaleza bioquímica del receptor	16
1.5.4 La inserción en la membrana	18
1.5.5 La agregación	19
1.5.6 La formación del poro	20
1.5.6.1 La función del receptor en la formación del poro	23
1.5.7 La citólisis	25
1.6 La función de los dominios I, II y III	26
Capítulo 2: Objetivos e Hipótesis	39
2.1 Objetivo general	39
2.2 Objetivos específicos	39
2.3 Hipótesis	40
Capítulo 3: Materiales y Métodos	41

3.1	Material biológico	41
3.2	Determinación del espectro de emisión del colorante dis-C ₃ -5 a diferentes pH	42
3.3	Experimentos en bicapas planas	42
3.3.1	Consideraciones en la preparación del material	42
3.3.2	Preparación de los electrodos de cloruro de plata (Ag ⁺ /AgCl)	43
3.3.3	Cámaras para la formación de bicapas	43
3.3.4	Formación de las bicapas	44
3.3.5	Reensamble funcional de las proteínas de las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) de <i>Trichoplusia ni</i> en bicapas y efecto de la toxina Cry1Ac	45
3.3.6	Adquisición y análisis de los datos obtenidos	47
Capítulo 4: Resultados y Discusión		49
4.1	El espectro de emisión de la sonda fluorescente dis-C ₃ -5 en función del pH del medio	49
4.2	El potencial inicial de la membrana de las vesículas de <i>Trichoplusia ni</i> y <i>Heliothis virescens</i>	51
4.3	El efecto de la toxina Cry1Ac en las VMMA de <i>Trichoplusia ni</i> y <i>Heliothis virescens</i>	52
4.4	El efecto de las toxinas mutantes en las VMMA de <i>Trichoplusia ni</i>	54
4.5	Los canales endógenos de las VMMA de <i>Trichoplusia ni</i> en bicapas planas	57
4.6	Los canales formados por la toxina Cry1Ac en bicapas que contenían el receptor de <i>Trichoplusia ni</i>	60
4.7	La participación de la aminopeptidasa N de las VMMA de <i>Trichoplusia ni</i> en la actividad de formación de poro de la toxina Cry1Ac	64
	Argelia Lorence, Alberto Darszon and Alejandra Bravo (1997). "Aminopeptidase dependent pore formation of <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry1Ac toxin on <i>Trichoplusia ni</i> membranes". <i>FEBS Letters</i> 414 (2): 303-307	65
Capítulo 5: Conclusiones y Perspectivas		71
Referencias		74
Anexo 1		87

Indice de Figuras

Figura 1.1.- Representación esquemática de los bloques conservados 1, 2, 3, 4 y 5 dentro de la familia de proteínas Cry.	8
Figura 1.2.- Estructura tridimensional de las proteínas Cry3A y Cry1Aa.	10
Figura 3.1.- Sistema de registro de corrientes a través de proteínas de membrana incorporadas a bicapas planas.	46
Figura 3.2.- Protocolo utilizado para fusionar las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) de <i>Trichoplusia ni</i> a la bicapa de difitanoilfosfatidilcolina (DiFFC).	48
Figura 4.1.- Espectro de emisión del colorante 3,3'dipropiltiodicarbocianina (dis-C ₃ -(5)) a diferentes pH.	50
Figura 4.2.- Efecto de la toxina Cry1Ac en la permeabilidad de la membrana de las VMMA de las células del intestino medio de <i>Trichoplusia ni</i> y <i>Heliothis virescens</i> .	53
Figura 4.3.- Efecto de las toxinas Cry1Ac silvestre y mutantes en el potencial de la membrana de las VMMA de <i>Trichoplusia ni</i> .	55
Figura 4.4.- Registros representativos de canal unitario y curva corriente voltaje de las transiciones más frecuentes de las VMMA de <i>Trichoplusia ni</i> fusionadas a bicapas planas de DiFFC.	59
Figura 4.5.- Canales catiónicos formados por la toxina Cry1Ac en bicapas a las que previamente se fusionaron VMMA de <i>Trichoplusia ni</i> .	61

Indice de Tablas

Tabla 1.1.- Lista actualizada de la familia de proteínas Cry (holotipos).	4
Tabla 1.2.- El mecanismo de acción de las proteínas Cry.	12
Tabla 1.3.- Las proteínas de unión y probables receptores para las δ -endotoxinas.	17
Tabla 1.4.- Metodologías utilizadas para estudiar la actividad de formación de poro de las toxinas Cry en presencia de su receptor.	20
Tabla 1.5.- Análisis de la actividad de formación de poro de las proteínas Cry en bicapas lipídicas planas.	24
Tabla 1.6.- Estudios de mutagénesis en los dominios II y III de las proteínas Cry.	28
Tabla 1.7.- Estudios de mutagénesis en el dominio I de las proteínas Cry.	33
Tabla 4.1.- El potencial inicial de la membrana de la microvellosidad apical de <i>Trichoplusia ni</i> , <i>Heliothis virescens</i> y <i>Spodoptera frugiperda</i> .	51

Resumen

Las proteínas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis* son una familia de toxinas activas en diversos tipos de insectos plaga. Estas moléculas se acumulan en cristales paraesporales que las proteasas del intestino de las larvas de los insectos solubilizan y activan. Los productos maduros o toxinas, se unen a receptores localizados en la microvellosidad apical (MA) de las células epiteliales del intestino medio, donde, después de un cambio conformacional se insertan en la membrana. La inserción, seguida de la agregación de varias moléculas conduce a la formación de poros que alteran las propiedades endógenas de permeabilidad de la MA causando la entrada de agua a las células, la destrucción del tejido intestinal y finalmente la muerte de las larvas. Se ha reportado que el posible receptor para varias toxinas Cry en diversas especies es una aminopeptidasa N (APN) que esta anclada a la membrana por medio de glicosilfosfatidilinositol (GFI). Esta ancla es susceptible a la acción de una fosfolipasa C (FLC) específica. La estructura tridimensional de las proteínas Cry mostró que están organizadas en tres dominios a los que se ha asociado una función específica. Se propone que el dominio I, constituido por siete α -hélices es el responsable de la formación de poros. Existe evidencia que indica que la hélice central tiene un papel importante en esta actividad. El dominio II participa en la interacción reversible e irreversible con el receptor, mientras que el dominio III está involucrado en la preservación de la estructura y en la interacción con el receptor.

El objetivo planteado en este trabajo fue estudiar la actividad de formación de poro de las proteínas Cry en presencia de su receptor nativo y analizar la posible participación de la hélice central en esta actividad. Para abordar estos objetivos se eligió utilizar como modelo la proteína Cry1Ac de la cepa HD-73 var. *Kurstaki* y algunas mutantes en la hélice α -5 (A164P y L167F) en dos lepidópteros susceptibles, *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*. Para llevar a cabo este análisis se usaron dos técnicas que permiten caracterizar la actividad de formación de poro. La primera se basa en el monitoreo de la fluorescencia de una sonda que se distribuye dentro y fuera de la membrana en función de los cambios en el potencial. La segunda es una técnica llamada bicapas lipídicas planas (BLP) que permite estudiar canales iónicos con un nivel de resolución unimolecular. En ambos sistemas se utilizaron vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) purificadas a partir del intestino medio de los insectos antes citados.

Los principales resultados obtenidos se pueden resumir como sigue. El efecto producido por la toxina Cry1Ac silvestre a los pocos segundos de estar en contacto con la membrana que contiene a su receptor proveniente de *T. ni* y *H. virescens* es inducir una vía de permeabilidad con una cierta preferencia hacia los cationes. A diferencia de la silvestre, las mutantes A164P y L167F no produjeron efecto alguno aún a una dosis cinco veces mayor. Estos resultados sugieren que las sustituciones puntuales introducidas en la hélice α -5 causaron la pérdida de la capacidad de formación de poro, sin embargo, es necesario llevar a cabo más experimentos para aclarar si participa en el proceso de inserción o forma parte del canal.

Al fusionar VMMA de *T. ni* a BLP se observó la actividad de canales catiónicos endógenos con una conductancia de 160 y 380 pS. Cuando se agregó la toxina Cry1Ac silvestre (200 pM) a las bicapas que contenían el receptor, se notó la aparición de canales catiónicos de conductancia muy alta (1.1-3 nS) con un comportamiento cinético muy diferente del de los canales intrínsecos. Esta evidencia apoya el modelo de poro que contempla una unidad mínima formada de varias moléculas (oligómero). Con la finalidad de obtener registros más finos se propuso analizar la participación del posible receptor de la toxina Cry1Ac, la APN, en la actividad de formación de poro, así como encontrar algún agente que nos permitiera bloquear los canales endógenos. Utilizando el sistema de fluorescencia encontramos que la actividad de formación de poro de Cry1Ac depende de la cantidad de APN presente en las VMMA pero no de su actividad enzimática. Al hacer experimentos con vesículas tratadas con la FLC específica para GFI que eliminó el 75 % de la enzima, se demostró que la APN unida con GFI es el posible receptor para la toxina Cry1Ac. Asimismo se encontró que el Cs⁺ es un agente que permite bloquear los canales intrínsecos sin afectar al poro formado por la toxina. Proponemos que este catión puede ser una herramienta muy útil que en el futuro permitirá hacer estudios más finos acerca de la participación del receptor en la formación del poro así como de los residuos involucrados en esta actividad.

Capítulo 1 Introducción

1.1 Los biopesticidas en el marco de la agricultura sustentable

La humanidad se encuentra ante un dilema de gran envergadura, debe producir alimentos para una población en constante crecimiento, pero debe hacerlo de manera sustentable, es decir, utilizando métodos de producción que protejan al medio ambiente y a la biodiversidad, y a la vez conserven los recursos naturales para las futuras generaciones. Si se considera que la extensión de tierras cultivables está disminuyendo a causa del crecimiento excesivo de las áreas urbanas, el agotamiento del suelo, la deforestación y la contaminación, este reto es aún mayor (Quintero, 1994). Por estas razones es importante dar mayor impulso al desarrollo de tecnologías que puedan hacer más eficientes los sistemas agropecuarios. Para la producción de alimentos se propone entonces impulsar el uso de prácticas agrícolas que mejoren los procesos que controlan de manera natural a las poblaciones plaga y contemplen el uso de productos para el control biológico, el empleo de plantas resistentes y de algunos pesticidas químicos de espectro reducido.

El control biológico de plagas se ha practicado desde hace más de mil setecientos años en el Lejano Oriente y por más de cien años en Estados Unidos. A pesar de esta antigua tradición se estima que los productos de origen biológico para el control de plagas ocupan el 1 % del mercado mundial de pesticidas. Los insecticidas de origen biológico en particular representan el 5 % del mercado mundial de este tipo de productos el cual se estima es de 7,800 millones de dólares (Tilton, 1993).

Del mercado global de biopesticidas los productos basados en *Bacillus thuringiensis* ocupan el 95 % (Feitelson *et al.*, 1992). El uso constante y creciente de estos productos por ya casi cuatro décadas se debe fundamentalmente a su alta especificidad e inocuidad para otros insectos benéficos, plantas y mamíferos, incluyendo a los humanos (McClintock *et al.*, 1995).

1.2 El biopesticida más usado en el mundo, *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria aerobia, Gram positiva que se caracteriza por la producción de cuerpos de inclusión durante el proceso de esporulación;

estas inclusiones se distinguen como cristales de formas definidas por microscopía de contraste de fases. Los cristales están compuestos por dos diferentes tipos de proteínas: un primer tipo al que se denomina δ -endotoxinas o proteínas Cry cuyo peso molecular varía entre 65 y 138 kDa y un segundo tipo de proteínas más pequeñas (28 kDa) a las que se llama Cyt a causa de su actividad citolítica. Algunas cepas de *Bt* producen además durante la fase exponencial de crecimiento dos exotoxinas. La primera de ellas es la α -exotoxina conocida también como fosfolipasa C, lecitinasa o fosfatidilcolina fosfohidrolasa, esta es una enzima que posee actividad citolítica al actuar sobre los fosfolípidos que forman las membranas de diversos tipos celulares (Faust *et al.*, 1982). La segunda de estas moléculas es la β -exotoxina, un derivado nucleotídico de adenina unido por una molécula de glucosa a un ácido fosfoalárido (Carlberg, 1973). Se ha demostrado que la toxicidad de esta molécula se debe a su capacidad para inhibir la polimerasa del ácido ribonucleico (ARN) (De Barjac y Lecadet, 1976). Sin embargo, es importante señalar que el gran interés científico y comercial que existe a nivel mundial hacia *Bt* se debe fundamentalmente a la actividad biocida de sus δ -endotoxinas.

En fecha reciente se ha descrito que esta bacteria produce durante la fase vegetativa de crecimiento otro nuevo tipo de proteínas con actividad insecticida a las que se denomina proteínas insecticidas del estado vegetativo o ViP (Estruch *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997). Este es un hallazgo importante ya que ahora no sólo se aprovechará la mezcla de esporas y cristales que se obtienen del cultivo de cepas de *Bt*, sino que también se podrá utilizar el sobrenadante del mismo. Por ser el objeto de estudio principal de este trabajo en las siguientes secciones se describirán únicamente las características relativas a las proteínas Cry.

1.3 La familia de proteínas Cry

En 1989 se propuso un esquema de clasificación para las δ -endotoxinas basado en su espectro insecticida y su homología a nivel de estructura primaria (Höfte y Whiteley, 1989). Con estos criterios se les agrupó en cuatro clases, CryI, activa contra lepidópteros (mariposas), CryII, tóxica para lepidópteros y dípteros (moscas y mosquitos), CryIII específica para coleópteros (escarabajos) y CryIV, tóxica para dípteros. Posteriormente se agregaron dos clases adicionales de toxinas activas contra nemátodos (CryV y VI; Feitelson *et al.*, 1992). Al conocerse nuevas secuencias de genes *cry* fueron surgiendo inconsistencias en este sistema de clasificación, ya que por ejemplo se encontraron toxinas con una alta homología con las ya conocidas, pero con un

espectro de acción distinto. En 1993 un grupo de investigadores líderes en el área formó un comité revisor de la nomenclatura de las δ -endotoxinas que forma parte del "Bacillus Genetic Stock Center" (Universidad de Ohio), con la finalidad de actualizar el sistema de clasificación anterior.

La nueva nomenclatura se basa sólomente en la similitud de las secuencia de aminoácidos. El criterio para incluir a una proteína dentro de este esquema es que su secuencia muestre una similitud significativa con una o más de las toxinas conocidas, o bien, provenga de las inclusiones proteicas producidas por *Bt* y tenga actividad pesticida o algún efecto tóxico verificable contra un organismo blanco (Crickmore *et al.*, 1995). La denominación "Cry" se conserva y a cada gen se le asigna un nombre compuesto de cuatro categorías. En la primera categoría los números romanos se sustituyen por arábigos así, por ejemplo, la proteína antes conocida como CryIIIA ahora es Cry3A; a todo gen *cry* cuyo producto muestre una homología menor al 45 % respecto de las proteínas conocidas se le asignará un nuevo número arábigo. La segunda categoría es una letra mayúscula; a los genes *cry* cuyo producto comparta menos del 75 % pero más del 45 % de homología con alguna proteína conocida se le asignará una letra mayúscula distinta. La tercera categoría es una letra minúscula; se asignará a todas las proteínas que compartan menos del 95 % de su secuencia pero más del 75 %. Para diferenciar a las proteínas que representen diferentes tipos (holotipos) de otras que varíen en sólo algunos residuos (variantes) se utiliza una cuarta categoría que es un número arábigo; se asignará a las proteínas cuya secuencia comparta menos del 100% de homología pero más del 95 % respecto de las proteínas conocidas. La actualización constante de esta nueva clasificación se encuentra disponible en la siguiente dirección del WWW: http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.

Hasta el 18 de julio de 1997 se conocían 119 diferentes genes y proteínas Cry agrupadas en 22 clases (Cry1,..., Cry22). Del total, 64 representan holotipos, siendo el resto de ellas variantes. En la **Tabla 1.1** se muestra que el grupo mayoritario es el constituido por las proteínas del tipo 1 con 26 holotipos representativos (Cry1Aa,..., Cry1Ka); la mayor parte de ellas son tóxicas para lepidópteros, aunque algunas despliegan actividad dual (p. ej. Cry1Ca es activa contra lepidópteros y dípteros), e incluso se tiene un ejemplo de una proteína con toxicidad contra tres diferentes grupos de organismos blanco, Cry1Ba, activa contra lepidópteros, coleópteros y áfidos. La clase 2 está formada por tres miembros: Cry2Aa tiene actividad dual (lepidópteros y dípteros) mientras que Cry2Ab y Cry2Ac son activas contra lepidópteros. Se conocen cuatro -

Tabla 1.1- Lista actualizada de la familia de proteínas Cry (holotipos)

Nombre	Nombre anterior	Número acceso	Espectro acción	Principal blanco
Cry1Aa	CryIA(a)	M11250	L	<i>Bombyx mori</i>
Cry1Ab	CryIA(b)	M13898	L	Varios lepidópteros
Cry1Ac	CryIA(c)	M11068	L	<i>Trichoplusia ni</i> y <i>Heliothis virescens</i>
Cry1Ad	CryIA(d)	M73250	L	N.D.
Cry1Ae	CryIA(e)	M65252	L	<i>Heliothis virescens</i>
Cry1Ba	CryIB	X06711	L/C/AF	<i>Pieris brassicae/Leptinotarsa decemlineata/Rhopalosiphum maidis</i>
Cry1Bb	ET5	L32020	L	Amplio espectro
Cry1Bc	PEG5	Z46442	L	N.D.
Cry1Bd	CryE1	U70726	N.D.	N.D.
Cry1Ca	CryIC	X07518	L/D	<i>Spodoptera littoralis</i> y <i>Spodoptera frugiperda/Aedes aegypti</i>
Cry1Cb	CryIC(b)	M97880	L	<i>Spodoptera exigua</i>
Cry1Da	CryID	X54160	L	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Cry1Db	PrtB	Z22511	L	N.D.
Cry1Ea	CryIE	X53985	L	<i>Spodoptera exigua</i>
Cry1Eb	CryIE(b)	M73253	L	N.D.
Cry1Fa	CryIF	M63897	L	<i>Spodoptera exigua</i>
Cry1Fb	PrtD	Z22512	L	<i>Spodoptera exigua</i>
Cry1Ga	PrtA	Z22510	N.D.	N.D.
Cry1Gb	CryH2	U70725	N.D.	N.D.
Cry1Ha	PrtC	Z22513	N.D.	N.D.
Cry1Hb	-	U35780	N.D.	N.D.
Cry1Ia	CryV	X62821	C/L	<i>Leptinotarsa decemlineata/Ostrinia nubilalis</i>
Cry1Ib	CryV	U07642	L	<i>Plutella xylostella</i>
Cry1Ja	ET4	L32019	L	Amplio espectro
Cry1Jb	ET1	U31527	L	<i>Plutella xylostella</i>
Cry1K	-	U28801	L	<i>Artogeia rapae</i>
Cry2Aa	CryIIA	M31738	L/D	<i>Heliothis virescens</i> y <i>Lymantria dispar/Aedes aegypti</i>
Cry2Ab	CryIIB	M23724	L	<i>Manduca sexta</i>
Cry2Ac	CryIIIC	X57252	L	<i>Trichoplusia ni</i> y <i>Manduca sexta</i>
Cry3Aa	CryIIIA	M22472	C/A	<i>Leptinotarsa decemlineata/Macrosiphum euphorbiae</i>
Cry3Ba	CryIIIB	X17123	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Cry3Bb	CryIIIBb	M89794	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> y <i>Diabrotica undecimpunctata</i>
Cry3Ca	CryIIID	X59797	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Cry4Aa	CryIVA	Y00423	D	<i>Aedes aegypti</i>
Cry4Ba	CryIVB	X07423	D	<i>Aedes aegypti</i>
Cry5Aa	CryVA(a)	L07025	N/A	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Haemonchus contortus</i> ¹ / <i>Tetranychus urticae</i>

Nombre	Nombre anterior	Número acceso	Espectro acción	Principal blanco
Cry5Ab	CryVA(b)	L07026	N/A	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Haemonchus contortus</i> ¹ / <i>Tetranychus urticae</i>
Cry5Ac	-	I34543	H	<i>Monomorium pharaonis</i>
Cry5Ba	-	U19725	C	<i>Hypera brunneipennis</i> , <i>Phyllotreta cruciferae</i> , <i>Diabrotica undecimpunctata</i>
Cry6Aa	CryVIA	L07022	N/A	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Haemonchus contortus</i> ¹ / <i>Tetranychus urticae</i>
Cry6Ba	CryVIB	L07024	N/A	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Haemonchus contortus</i> ¹ / <i>Tetranychus urticae</i>
Cry7Aa	CryIIIC	M64478	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Cry7Ab	CryIIICb	U04367	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Cry8Aa	CryIIIE	U04364	C/A	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> / <i>Tetranychus urticae</i>
Cry8Ba	CryIIIG	U04365	C	<i>Cotinis</i> sp.
Cry8Ca	CryIIIF	U04366	C	<i>Anomala cuprea</i>
Cry9Aa	CryIG	X58120	L	<i>Galleria mellonella</i>
Cry9Ba	CryIX	X75019	N.D.	N.D. (gen criptico)
Cry9Ca	CryIH	Z37527	L	Amplio espectro
Cry9Da	N141	D85560	C	<i>Anomala cuprea</i>
Cry10Aa	CryIVC	M12662	D	<i>Aedes aegypti</i>
Cry11Aa	CryIVD	M31737	D	<i>Aedes aegypti</i>
Cry11Ba	Jeg80	X86902	D	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex pipiens</i> y <i>Anopheles stephensi</i>
Cry12Aa	CryVB	L07027	N/A	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Haemonchus contortus</i> ¹ / <i>Tetranychus urticae</i>
Cry13Aa	CryVC	L07023	N	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Haemonchus contortus</i> ¹
Cry14Aa	CryVD	U13955	D/C	N.D. / <i>Diabrotica</i> sp.
Cry15Aa	34kDa	M76442	L	<i>Manduca sexta</i>
Cry16Aa	cbm71 ²	X94146	D	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex pipiens</i> y <i>Anopheles stephensi</i>
Cry17Aa	cbm72 ²	X99478	D	N.D.
Cry18Aa	CryBP1 ³	X99049	C	<i>Melolontha melolontha</i>
Cry19Aa	Jeg65	Y08920	D	N.D.

Nombre	Nombre anterior	Número acceso	Espectro acción	Principal blanco
Cry20Aa	-	U82518	D	N.D.
Cry21Aa	-	132932	N	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Haemonchus contortus</i> ¹
Cry22Aa	-	134547	H	<i>Monomorium pharaonis</i>

Notas: Esta tabla está basada en la información de la página del World Wide Web destinada a la revisión de la nomenclatura de los genes *cry* (http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).

A = ácaros, AF = áfidos, C = coleópteros, D = dípteros, H = himenópteros, L = lepidópteros, N = nemátodos, N.D. = no disponible.

1 Se ha reportado que estas toxinas son activas contra las formas larvaria y adulta de los nemátodos (Edwards *et al.*, 1990).

2 Genes aislados a partir de la cepa CH18 de la bacteria anaerobia *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia* (colección Instituto Pasteur) (Barloy *et al.*, 1996).

3 Gen aislado del cromosoma del patógeno obligado *Bacillus popilliae* (Zhang *et al.*, 1997).

proteínas del tipo 3, todas ellas son tóxicas para el coleóptero *Leptinotarsa decemlineata*; la proteína Cry3Bb además muestra actividad hacia *Diabrotica undecimpunctata*. Se encontró que la proteína Cry3A es además activa contra el áfido de la papa (*Macrosiphum euphorbiae*, Walters y English, 1995). Las proteínas Cry4Aa y Cry4Ba, miembros de la clase 4, son activas contra dípteros. La clase 5 está conformada por cuatro integrantes; las proteínas Cry5Aa y Cry5Ab son activas contra nemátodos y ácaros mientras que Cry5Ac y Cry5Ba muestran actividad contra hormigas (himenópteros) y coleópteros, respectivamente. Las proteínas Cry6Aa y Cry6Ba integran la clase 6, ambas son tóxicas contra nemátodos y ácaros. La clase 7 está representada por dos holotipos, Cry7Aa y Cry7Ab, ambas son activas contra coleópteros. Son tres las proteínas que integran el grupo 8; Cry8Aa es una proteína con actividad dual (coleópteros y áfidos), mientras que Cry8Ba y Cry8Ca son tóxicas para coleópteros. Las proteínas Cry9Aa, Cry9Ba, Cry9Ca y Cry9Da conforman la clase 9; la primera y tercera son tóxicas para lepidópteros, mientras que Cry9Da lo es contra coleópteros. No se ha determinado el blanco de la proteína Cry9Ba, pero se sabe que es codificada por un gen críptico. Sólo se conoce una proteína perteneciente a la clase 10 (Cry10Aa) que despliega actividad contra dípteros; las proteínas Cry11Aa y Cry11Ba también son activas contra estos organismos. Las clases 12, 13, 14, 15, 19, 20, 21 y 22 están representadas por un sólo holotipo; Cry12Aa es una toxina con actividad dual contra nemátodos y ácaros, mientras que Cry13A es tóxica para nemátodos; Cry14Aa es activa contra dípteros y coleópteros, mientras que Cry15Aa es específica contra lepidópteros; las

proteínas Cry19Aa y Cry20Aa muestran toxicidad contra dípteros, mientras que Cry21Aa y Cry22Aa la muestran contra nemátodos e himenópteros, respectivamente.

Un hallazgo sorprendente fue encontrar genes cuyos productos muestran actividad insecticida y una alta homología con las proteínas Cry pero que provienen de bacterias distintas a *Bt* (Barloy *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). Estas proteínas se han clasificado en los grupos 16, 17 y 18 donde cada uno de ellos está representado por un sólo holotipo. Los genes *cry16Aa* y *cry17Aa* se aislaron a partir de la cepa CH18 de la bacteria anaerobia *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*, sus productos muestran actividad tóxica contra tres especies de mosquitos (dípteros): *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* y *Anopheles stephensi* (Barloy *et al.*, 1996). El gen *cry18Aa* que se aisló del cromosoma del patógeno obligado *Bacillus popilliae* codifica para una proteína con actividad hacia el coleóptero *Melolontha melolontha* (Zhang *et al.*, 1997).

Por estudios de proteólisis *in vitro* y análisis de delección (Schnepf y Whiteley, 1985; Höfte *et al.*, 1986) se ha demostrado que el fragmento tóxico está localizado en el extremo N-terminal de las δ -endotoxinas. La región C-terminal no se requiere para la actividad tóxica (Wabiko *et al.*, 1985; Chestukina *et al.*, 1990). El alineamiento y comparación de la estructura primaria de las primeras toxinas descritas (las antes llamadas CryI, CryII, CryIII y CryIV) reveló la existencia de cinco bloques o regiones de aminoácidos altamente conservados, que están separados por regiones hipervariables de diferentes longitudes (Höfte y Whiteley, 1989). Al surgir la nueva clasificación y repetirse este tipo de análisis se encontró que además de las cinco regiones antes descritas, existen otras tres que se localizan en el extremo C-terminal (Figura 1.1). Este análisis ha permitido distinguir tres subgrupos de proteínas Cry. Un primer subgrupo está integrado por las clases Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9 y Cry10; estas proteínas se caracterizan por tener los cinco bloques descritos en la clasificación anterior. Un segundo subgrupo está formado por las clases Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14; estas toxinas se caracterizan por tener regiones homólogas a los bloques 1, 2, 4 y 5 clásicos, sin embargo, carecen del bloque conservado 3. Las toxinas de más de 70 kDa que integran estos dos subgrupos, poseen además los bloques 6, 7 y 8. Un tercer subgrupo está integrado por las clases Cry2 y Cry11; estas toxinas poseen el bloque conservado 1 y presentan una variante del bloque 2, pero carecen de los bloques 3, 4 y 5 típicos. La alta conservación de estos cinco bloques, y en particular del primero de ellos, sugiere que son importantes para la función biológica de estas proteínas.

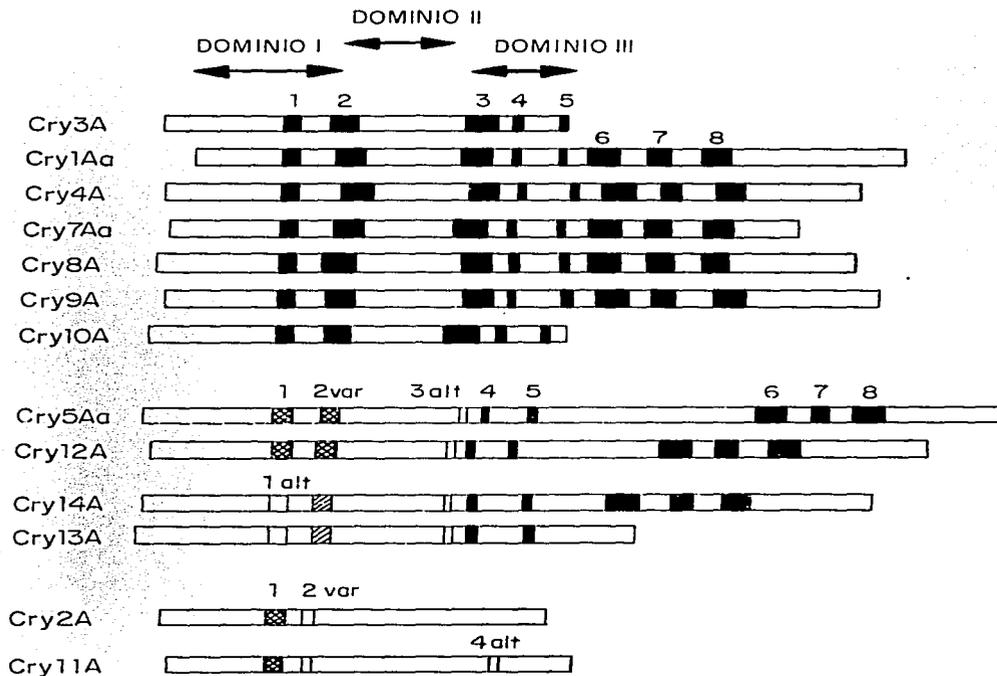


Figura 1.1.- Representación esquemática de los bloques conservados 1, 2, 3, 4 y 5 dentro de la familia de proteínas Cry. Las regiones señaladas como "1 alt" y "3 alt" son posibles bloques 1 y 3 alternativos. Las regiones marcadas como "2 var" son posibles variantes de ese bloque. Los rectángulos indican la posición y el tamaño relativo de cada bloque en la proteína. El color negro indica una homología alta, mientras que el gris indica una mayor variabilidad en esa región. Los rectángulos blancos son posibles secuencias alternativas con ligera o sin homología a los bloques canónicos. Las flechas en la parte superior representan la localización de los dominios de las toxinas Cry1Aa y Cry3A.

Adaptada de: Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Lambert, B., Lereclus, D., Baum, J. y D.H. Dean (1995). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal cry genes. En "Program and Abstracts of the 28th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology". Society for Invertebrate Pathology, Bethesda, M.D., p. 14.

1.4 La estructura tridimensional de las toxinas Cry3A y Cry1Aa

La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de dos miembros de la familia de las δ -endotoxinas, las proteínas Cry3A (Li *et al.*, 1991) y Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), ha revelado que estas moléculas globulares están estructuralmente organizadas en tres dominios (Figura 1.2). El dominio I (Cry 3A, residuos 58 al 290; Cry1Aa residuos 33 al 253) está constituido por un ramillete de seis α -hélices anfipáticas que rodean a otra más bien hidrofóbica, la α -hélice 5. El dominio II (Cry3A, residuos 291 al 500; Cry1Aa, residuos 265 al 461) está formado por dos α -hélices cortas y tres láminas β -antiparalelas que terminan en asas ("loops") en el vértice de la molécula formando un prisma β (Shimizu y Morikawa, 1996). El dominio III (Cry3A, residuos 501 al 644; Cry1Aa, residuos 463 al 609) está compuesto de dos hojas β -plegadas arregladas una sobre otra.

Los cinco bloques conservados en la estructura primaria de la mayor parte de las toxinas Cry están localizados en las regiones central y de comunicación entre dominios tal como se describe a continuación. El bloque 1 está constituido por la α -hélice central del dominio I; el contacto entre los dominios I y II constituye el bloque conservado 2; el bloque 3 abarca la última β del dominio II y la primera del dominio III. Los bloques 4 y 5 corresponden a las hojas β centrales del dominio III (β 17 y β 23) (Li *et al.*, 1991; Grochulsky *et al.*, 1995). La localización estratégica de estas regiones sugiere que por lo menos los miembros de la familia Cry que las contienen pueden tener un plegamiento similar y por lo tanto un mecanismo de acción semejante. El hecho de que las proteínas Cry3A y Cry1Aa que comparten una homología de tan sólo el 35 % (Grochulski *et al.*, 1995) tengan una estructura cuaternaria prácticamente idéntica apoya esta idea.

Los resultados de un análisis filogenético de la estructura primaria de las δ -endotoxinas publicado en fecha reciente indican que la diversidad de estas proteínas ha surgido fundamentalmente del concurso de dos procesos, la evolución independiente de cada dominio y el intercambio de dominios entre diferentes toxinas (Bravo, 1997). Estos resultados aunados al gran cúmulo de evidencia experimental obtenida por varios grupos de investigación han permitido proponer que los tres dominios de las proteínas Cry son estructuras independientes y también han permitido elucidar la función o funciones en la(s) que participa(n) cada uno de ellos; en algunos casos se ha podido incluso identificar las regiones y residuos involucrados. En las secciones si-

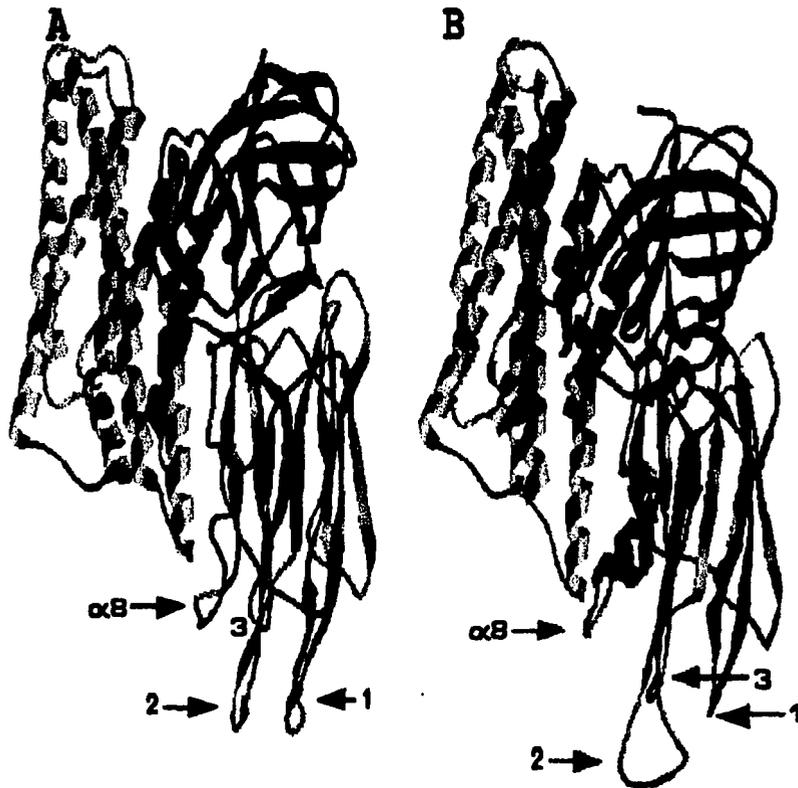


Figura 1.2.- Representación esquemática en forma de listones de la estructura tridimensional de las toxinas Cry3A (A) y Cry1Aa (B) de *Bacillus thuringiensis*. El dominio I que se muestra en verde está constituido por seis α -hélices anfipáticas, que rodean a otra central de carácter hidrofóbico (α -5). El dominio II mostrado en rojo está formado por tres láminas β -plegadas que terminan en asas ("loops") en el vértice de la molécula formando un prisma β (señaladas con flechas). Esta es la región más diferente entre las dos proteínas. El dominio III mostrado en morado tiene una estructura de β -sandwich con una topología típica de doble hélice β .

guientes se describen los aspectos fundamentales del mecanismo de acción de estas toxinas haciendo particular énfasis en la información que relaciona su estructura y función.

1.5 El mecanismo de acción de las proteínas Cry

Los síntomas que se observan a partir del primer minuto posterior a que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de *Bt* son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Gupta *et al.*, 1985; Aronson *et al.*, 1986). Los estudios histopatológicos han mostrado que las células columnares del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente y, en particular, su microvellosidad apical, la cual se destruye en su totalidad (Ebersold *et al.*, 1978; Percy y Fast, 1983). Los efectos en el otro tipo de células de las que está constituido el intestino medio de los lepidópteros, las células calciformes (Cioffi, 1984), son más lentos, pero en este caso también se ha observado citólisis (Gupta *et al.*, 1985; Bravo *et al.*, 1992). El hecho de que los efectos de las proteínas Cry estén confinados a cambios estructurales del epitelio del intestino y la aparente ausencia de un período de latencia, sugieren que las δ -endotoxinas actúan a nivel de membrana y no en el citosol, sin embargo, el nivel de resolución de las técnicas empleadas hasta el momento para su localización *in vivo* no permite excluir esta posibilidad. Los diferentes enfoques que se han empleado para estudiar el mecanismo de acción de las proteínas Cry indican que éste es un proceso de etapas múltiples (Tabla 1.2) y a continuación se describen.

1.5.1 La solubilización

Los cristales producidos por las diversas cepas de *Bt* son insolubles, excepto a pH alcalino (Gringorten *et al.*, 1992). El intestino medio de la mayor parte de las larvas de insectos susceptibles (lepidópteros, dípteros y algunos grupos de coleópteros) se caracteriza por su alto pH y condiciones reductoras, requerimientos indispensables para la solubilización eficiente de las inclusiones proteicas (Knowles, 1994). Se ha observado que la solubilidad de los cristales depende de su composición específica de protoxinas, y que éste es un factor que puede ser importante para la actividad tóxica de estas moléculas (Aronson *et al.*, 1991). La baja toxicidad de algunas cepas de *Bt* se puede explicar por la baja solubilidad de los cristales que producen (Pietrantonio y Gill, 1992).

Tabla 1.2- El mecanismo de acción de las proteínas Cry

Etapa	Características
1.- Solubilización del cristal	El pH alcalino y las condiciones reductoras del intestino medio son indispensables para este proceso
2.- Procesamiento de las protoxinas	Participación de las proteasas predominantes en el intestino medio (tripsina, quimiotripsina, termolisina y catepsinas)
3.- Unión al receptor	Unión reversible Unión irreversible - interacción carbohidrato-proteína - interacción proteína-proteína - interacción con otros componentes de la membrana (glicolípidos)
4.- Inserción en la membrana	Cambio conformacional drástico que conduce a un estado competente para la inserción
5.- Agregación	El modelo propuesto contempla que el poro está formado por 4 - 6 moléculas
6.- Formación de poro	Tamaño de poro estimado 1 - 2 nm Conductancia: 25 - 4000 pS Múltiples estados conductores Selectividad pobre hacia cationes
7.- Citólisis	Efecto sinérgico de los cristales y las esporas

1.5.2 El procesamiento

La mayor parte de las proteínas Cry se producen como productos inmaduros (protoxinas) que para ser activos deben ser procesados por las proteasas del intestino medio de los insectos. Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas Cry1 (130-140 kDa) se da por el corte de los primeros veintiocho residuos del extremo N-terminal y de los últimos quinientos del extremo C-terminal, quedando de esta forma un fragmento resistente a proteasas de entre 55 y 65 kDa. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los miembros de la familia Cry reveló que las toxinas de 70 kDa (Cry2, Cry3 y Cry11) pueden considerarse como formas naturales truncadas de las proteínas de alto peso molecular (Höfte y Whiteley, 1989). Al parecer algunas proteínas Cry pueden ser procesadas *in vitro* más extensivamente en el extremo N-terminal que las de la clase 1. En experimentos de procesamiento *in vitro* se han identificado como sitios de corte los residuos 159 en Cry3A (Carroll *et al.*, 1989), 145 en Cry2Aa

(Nicholls *et al.*, 1989) y 236 y 204 en Cry4Aa y Cry4Ba, respectivamente (Angsuthanasombat *et al.*, 1993; Knowles, 1994). Estos sitios mapean en las asas entre las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$ (Cry3A y Cry2Aa) y $\alpha 5$ y $\alpha 6$ (Cry4Aa y Cry4Ba). Se desconoce si este proceso también ocurre *in vivo* y si tiene alguna relevancia para la inserción.

El procesamiento es un factor que puede contribuir en la determinación de la especificidad. Un ejemplo ilustrativo de esto es el caso de la toxina Cry1Ab proveniente de la cepa IC1 de *Bt* var. *aizawai*, la cual es tóxica para los lepidópteros (*Pieris brassicae*) cuando se procesa con tripsina, y activa para los dípteros (*Aedes aegypti*) cuando se trata con el jugo gástrico de estos mosquitos (Haider y Ellar, 1989a).

A pesar de que se conoce con cierto detalle como es que ocurre el procesamiento de las toxinas de *Bt*, no hay información suficiente acerca de las enzimas que están involucradas en este proceso. La secuenciación del extremo N-terminal de los fragmentos tóxicos de las toxinas Cry1, Cry2 y Cry4 sugiere que las principales endoproteasas involucradas son enzimas del tipo de la tripsina, la quimiotripsina y la termolisina (Dai y Gill, 1993). En el caso de los coleópteros se ha encontrado que las enzimas digestivas predominantes en el intestino medio son de tipo cisteíno-proteasas (Thie y Houseman, 1990) por lo que es probable que estas sean las proteínas involucradas en el procesamiento de las toxinas de tipo Cry3. Al parecer la tripsina es la proteasa involucrada en la remoción de los primeros veintiocho residuos de la toxina Cry1Ab, ya que la mutación R28D, que previene la activación mediada por esta enzima, disminuye la actividad insecticida de la proteína hacia *Manduca sexta* (Martens *et al.*, 1995).

1.5.3 La unión al receptor

Utilizando diversas metodologías se ha demostrado que después de penetrar la matriz peritrófica, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles: lepidópteros (Hofmann *et al.*, 1988), coleópteros (Bravo *et al.*, 1992) y dípteros (Ravoahangimalala *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que la unión a estos sitios específicos es la etapa determinante de la alta especificidad de las δ -endotoxinas (Van Rie *et al.*, 1989) por lo que diversos grupos de investigación han dedicado un gran esfuerzo a entender cómo ocurre este proceso. La metodología más usada ha consistido en llevar a cabo estudios cinéticos de

unión y competencia utilizando proteínas marcadas radiactivamente con yodo y vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA). Con la finalidad de estimar los parámetros de unión, la constante de disociación (K_d) y la concentración de sitios de unión (B_{max}), se han hecho experimentos donde la toxina marcada se pone a competir con toxina fría (competencia homóloga), mientras que para conocer si dos toxinas Cry comparten un mismo sitio de unión se han llevado a cabo experimentos de competencia heteróloga. La mayor parte de los análisis se han hecho con larvas de lepidópteros y toxinas de tipo Cry1 (una revisión completa se puede ver en Pietrantonio y Gill, 1996), a excepción de un trabajo en el que se estudió la interacción entre la toxina Cry3A y sus sitios de unión en las VMMA del coleóptero *Tenebrio molitor* (Belfiore *et al.*, 1994). Se piensa que en los dípteros y demás organismos susceptibles a Bt también debe haber una interacción entre las δ -endotoxinas y moléculas a las que se unen de manera específica, sin embargo, se desconoce cómo ocurre este proceso.

De los resultados obtenidos en los estudios de competencia homóloga se puede generalizar que la constante de disociación (K_d) entre las toxinas y sus sitios de unión para el caso de los lepidópteros es del orden de 0.2 a 50 nM, y que la concentración de sitios de unión (B_{max}) va de 0.4 a 62 pmoles/mg de proteína de vesículas (Pietrantonio y Gill, 1996). Para el caso de la toxina Cry3A y las VMMA de *T. molitor* se determinó que la K_d y B_{max} es de 17.5 nM y 304 pmoles/mg de proteína de vesículas, respectivamente (Belfiore *et al.*, 1994). En la mayor parte de los análisis se ha encontrado que existe una correlación positiva entre los parámetros de unión y la toxicidad. Los resultados de los primeros experimentos en los que se usaron cepas de insectos resistentes para estudiar este proceso apoyaron la idea de que la unión está correlacionada con la susceptibilidad, dado que los insectos resistentes mostraron pérdida de los sitios de unión (Ferré *et al.*, 1991), o bien, una disminución significativa (Van Rie *et al.*, 1990a). Sin embargo, se han reportado varios casos tanto de cepas susceptibles como resistentes para las que los parámetros de unión no correlacionan con la toxicidad (Wolfersberger, 1990a; Gould *et al.*, 1992; Ihara *et al.*, 1993; Estada y Ferré, 1994; Escriché *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995a; Wright *et al.*, 1997).

Los estudios de competencia heteróloga han revelado que la unión no es un proceso simple ya que las toxinas pueden unirse a más de un sitio en el intestino de su blanco, y también se presenta el caso en el que varias toxinas pueden competir por un mismo sitio de unión. Un ejemplo que ilustra esta complejidad es el de *Heliothis virescens*, especie en la que la toxina Cry1Ac se une a varios sitios y éstos son diferentes

de aquél por el que compiten dos toxinas muy relacionadas, Cry1Aa y Cry1Ab (Van Rie *et al.*, 1990b; MacIntosh *et al.*, 1991).

1.5.3.1 Unión reversible e irreversible

Los estudios de competencia homóloga han mostrado que la cinética de unión de las δ -endotoxinas a las VMMA de los insectos susceptibles es bifásica, donde el componente mayoritario es irreversible (Hofmann *et al.*, 1988; Van Rie *et al.*, 1989). La validez de los resultados de los estudios descritos en la sección anterior es cuestionable ya que el análisis de los datos se basa en el supuesto de unión reversible, por lo que la etapa irreversible se ignora en los cálculos de K_d y B_{max} . Los experimentos en los que se analiza la cantidad de toxina unida de manera irreversible a la membrana y que no puede ser desplazada en ensayos de competencia homóloga o heteróloga (ensayos de desplazamiento) han mostrado ser más útiles en el entendimiento de este fenómeno (Chen *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1995). Ahora se sabe que la interacción inicial entre la toxina y su sitio de unión (unión reversible) es un requisito para la toxicidad pero no es suficiente. Los eventos posteriores tales como la unión irreversible y la inserción en la membrana parecen estar más correlacionados con la toxicidad. Un ejemplo que ilustra la utilidad de analizar separadamente los componentes reversible e irreversible de la unión es el caso de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac y el lepidóptero *Lymantria dispar*. El análisis clásico indicó que ambas proteínas comparten el mismo sitio de unión, siendo Cry1Ab 400 veces más potente; aunque el número de sitios de unión es similar para ambas toxinas, la menos potente (Cry1Ac) se unió con mayor afinidad (Wolfersberger, 1990a). Esta paradoja quedó resuelta al encontrarse que a pesar de que Cry1Ab se une con menor afinidad lo hace de forma más irreversible si se compara con Cry1Ac (Liang *et al.*, 1995).

Una metodología alternativa para estudiar la interacción de la toxina y sus sitios de unión es la llamada resonancia de superficie ("surface plasmon resonance"). En este sistema uno de los reactantes (toxina o vesículas) se inmoviliza en una capa hidrofílica de dextrana sobre la superficie de un sensor de oro colocado dentro de una microcelda; cuando se hace pasar un flujo del otro componente y se lleva a cabo la unión, el incremento en la masa total que está unida al sensor cambia el ángulo de la luz polarizada que se refleja de la superficie del mismo; este cambio se detecta por medio de un arreglo de diodos. Al conectar este instrumento a una computadora personal es posible medir la asociación y disociación del complejo toxina-receptor en tiempo

real y no en condiciones de equilibrio como es el caso de los experimentos en los que se utiliza toxina marcada (Szabo *et al.*, 1995). Usando esta técnica se ha estudiado la cinética de unión entre la toxina Cry1Ab y sus sitios de unión en las VMMA de *Choristoneura fumiferana* (Masson *et al.*, 1994) y también aquélla existente entre la proteína Cry1Ac y las VMMA de *Plutella xylostella* (Masson *et al.*, 1995a). En ambos estudios se encontró que la alta afinidad de unión entre las toxinas y sus sitios de unión se debe principalmente a la muy baja tasa de disociación del complejo formado, la cual en ambos casos resultó ser menor de 10^{-5} s^{-1} . La información que se obtiene utilizando este sistema puede ser muy valiosa ya que al analizar separadamente las velocidades de asociación y disociación del complejo toxina-receptor se pueden encontrar alteraciones que no siempre son evidentes en el equilibrio (Masson *et al.*, 1995a). Este aspecto podría tener particular relevancia para el análisis de proteínas mutantes que estén afectadas en la interacción irreversible con el receptor.

1.5.3.2 Naturaleza bioquímica del receptor

Se han hecho importantes esfuerzos dirigidos a la identificación, purificación y caracterización de la(s) molécula(s) que sirve(n) de receptor(es) a las δ -endotoxinas en la microvellosidad apical de las células columnares del intestino medio. La metodología más empleada ha sido separar las proteínas de las VMMA en electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y posteriormente transferirlas a papel de nitrocelulosa; la unión específica de la toxina a alguna de las bandas se revela con un anticuerpo antitoxina y luego con un segundo anticuerpo dirigido contra el primero o bien con la marca de la toxina (biotina-estreptavidina o ^{125}I) ("ligand blotting"). Es discutible que la proteína de unión conserve su estructura nativa en estas condiciones y que pueda interactuar de manera específica con la toxina, pero al parecer así ocurre. Esta evidencia sugiere que el sitio que reconoce la toxina en la proteína de unión es un epítipo muy pequeño o bien un carbohidrato, dado que una gran parte de las proteínas de la microvellosidad apical están glicosiladas (Cioffi, 1984). Haciendo este tipo de experimentos se ha encontrado que para la mayoría de las toxinas Cry1 estudiadas las moléculas a las que se unen con alta afinidad son glicoproteínas de entre 63 y 220 kDa (Haider y Ellar, 1987; Oddou *et al.*, 1991; Garczynski *et al.*, 1991; Knowles *et al.*, 1991; Indrasith y Hori, 1992; Oddou *et al.*, 1993). Se propone que la interacción inicial es la existente entre la toxina y el carbohidrato del receptor, mientras que la unión irreversible se asocia con una interacción más estrecha entre la toxina y la parte proteica de éste (Liang *et al.*, 1995).

Este tipo de estudios es aún incipiente para el caso de los coleópteros y los dípteros. Se encontró que en el coleóptero *Tenebrio molitor* la molécula de unión es una proteína de 144 kDa (Belfiore *et al.*, 1994), mientras que una banda de 148 kDa y otra de 78 kDa se identificaron como las proteínas de unión para la toxina Cry11Aa en las vesículas de los mosquitos *Anopheles stephensi* y *Tipula oleracea* (Feldmann *et al.*, 1995), respectivamente.

Los mayores avances en el esclarecimiento de la naturaleza bioquímica de las proteínas de unión, los posibles receptores para las proteínas Cry1, se han obtenido durante los tres últimos años. En la **Tabla 1.3** se enlistan los resultados que se tienen a la fecha en este sentido. La mayor parte de los análisis muestran que las proteínas de unión para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1C en *Manduca sexta* (Knight *et al.*, 1994; Sangadala *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1996), *Heliothis virescens* (Gill *et al.*, 1995), *Lymantria dispar* (Valaitis *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996a), *Plutella xylostella* (Denolf *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997) y *Bombyx mori* (Yaoi *et al.*, 1997), son miembros de la familia de las aminopeptidasas de tipo N (E.C. 3.4.11.2) con peso molecular cercano a 120 kDa. Existe cierta controversia acerca de cual es la proteína de unión para la toxina Cry1Ab en *M. sexta* ya que mientras que un grupo encontró se trata de un miembro de la familia de las caderinas (Vadlamudi *et al.*, 1995), otro la identificó como una aminopeptidasa N (Denolf *et al.*, 1996).

Tabla 1.3 - Las proteínas de unión y probables receptores para las δ -endotoxinas

Toxina	Insecto	Tamaño (kDa)	Identidad	Referencia
Cry1Aa	<i>Bombyx mori</i>	120	Aminopeptidasa N	Yaoi <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	210	Caderina	Vadlamudi <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	120	Aminopeptidasa N	Denolf <i>et al.</i> , 1996
Cry1Ab	<i>Plutella xylostella</i>	120	Aminopeptidasa N	Denolf <i>et al.</i> , 1996
Cry1Ac	<i>Manduca sexta</i>	120	Aminopeptidasa N	Knight <i>et al.</i> , 1994 Sangadala <i>et al.</i> , 1994
Cry1Ac	<i>Heliothis virescens</i>	120	Aminopeptidasa N	Gill <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	<i>Lymantria dispar</i>	120	Aminopeptidasa N	Valaitis <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	<i>Plutella xylostella</i>	120	Aminopeptidasa N	Luo <i>et al.</i> , 1997
Cry1C	<i>Manduca sexta</i>	106	Aminopeptidasa N	Luo <i>et al.</i> , 1996

Se ha demostrado que al menos una proporción de la aminopeptidasa N (APN) está unida a la membrana mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Garczynski y Adang, 1995). El análisis de la secuencia de dos de las proteínas de unión para Cry1Ac en *M. sexta* (Knight *et al.*, 1995) y *H. virescens* (Gill *et al.*, 1995) que se han clonado indica que el GPI está unido a la proteína en su extremo C-terminal. El ancla de GPI es susceptible a la acción de una fosfolipasa C específica endógena del insecto que la convierte en una forma soluble de 115 kDa (Lu y Adang, 1996). Esta forma soluble retiene su capacidad de unir a la toxina y lo hace de manera específica. Un ejemplo que ilustra la especificidad de la interacción entre las toxinas Cry y sus proteínas de unión es el de las APN de *M. sexta*, que unen exclusivamente Cry1Ac o Cry1C pero no muestran reconocimiento cruzado (Luo *et al.*, 1996). Se ha demostrado que la *N*-acetil-D-galactosamina (NAGal) inhibe de manera específica la unión entre la APN y la toxina Cry1Ac en *M. sexta* (Knight *et al.*, 1994; Masson *et al.*, 1995b), *H. virescens* (Gill *et al.*, 1995), *L. dispar* (Valaitis *et al.*, 1995) y *P. xylostella* (Luo *et al.*, 1997). Esto sugiere que la proteína de unión es un glico-conjugado que contiene NAGal y que este azúcar participa directamente en la interacción entre ésta y la toxina.

Se ha evitado usar el término "receptor" ya que a excepción de un caso (Sangadala *et al.*, 1994) no se ha demostrado que estas proteínas de unión tengan la función biológica de éste, es decir, reducir la concentración de toxina a niveles nano o picomolares para que ejerza su acción de daño en las membranas de los insectos.

1.5.4 La inserción en la membrana

La fase irreversible de la unión de las δ -endotoxinas a las VMMA que contienen a sus receptores suele considerarse como una evidencia de que las proteínas Cry se insertan en la membrana para luego causar como consecuencia final la destrucción del tejido intestinal de las larvas de insectos susceptibles (Van Rie *et al.*, 1989; Ihara *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1995).

Se ha demostrado que a dosis micromolares las proteínas Cry son capaces de interactuar con membranas lipídicas artificiales e insertarse en las mismas, haciéndolas permeables a cationes (English *et al.*, 1991) y solutos neutros relativamente pequeños (Yunovitz y Yawetz, 1988; Haider y Ellar, 1989b). Se comprobó que la capacidad de la toxina Cry1C para interactuar con una membrana modelo y disipar el potencial transmembranal, aumenta de forma sustantiva al disminuir el pH ($\text{pH} < 5$), y que esto está

correlacionado con el aumento en la hidrofobicidad de la superficie de la molécula (Butko *et al.*, 1994). Estos datos sugieren que en estas condiciones *in vitro*, la proteína sufre un cambio conformacional que la lleva a un estado competente para la inserción. Es posible que *in vivo* se logre una transición a un estado conformacional similar, por ejemplo, por la unión al receptor o por procesamiento proteolítico del complejo toxina-receptor. Es importante señalar que a concentraciones fisiológicamente relevantes (pM-nM), las δ -endotoxinas no parecen insertarse de manera espontánea en las membranas biológicas que carecen de los receptores específicos para ellas (Knowles, 1994).

En un estudio reciente llevado a cabo con una colonia de *H. virescens* resistente a la cepa HD-1 de *Bt* (esta cepa contiene los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa* y *cry2Ab*) se encontró que no hay diferencia en los componentes reversible e irreversible de la unión de la proteína Cry1Ac a las VMMA de esta especie cuando se compararon con los obtenidos usando vesículas de una cepa sensible (Lee *et al.*, 1995a). Estos resultados indican que la unión irreversible es una etapa que precede a la inserción, pero ponen de manifiesto que son procesos distintos. Se desconoce cómo es que sucede la inserción, sin embargo, los resultados de los estudios de mutagénesis dirigida llevados a cabo por múltiples grupos de investigación han permitido tener los primeros indicios de las regiones y residuos que pudieran estar involucrados en este proceso; esta información se discute con detalle en la sección 1.6.

1.5.5 La agregación

Haciendo experimentos de protección osmótica se ha encontrado que después de unirse al receptor e insertarse en la membrana, las proteínas Cry forman poros con un diámetro estimado de 1 a 2 nm (Knowles y Ellar, 1987). El tamaño de estos poros y la aparición frecuente de múltiples estados de conductancia en los estudios de la actividad de las proteínas Cry en bicapas lipídicas planas (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993a; Grochulski *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997) se han considerado como evidencias de la formación de diversos estados de agregación de las δ -endotoxinas. Se ha reportado que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac (Feng y Bechtel, 1994) y Cry3A (Walters *et al.*, 1994) forman oligómeros en solución, sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo por el cual estas proteínas se agregan, así como las regiones que pudieran estar involucradas en este proceso.

1.5.6 La formación del poro

La idea de que las toxinas de *Bt* actúan alterando la permeabilidad de la membrana de las células del intestino medio surgió desde hace casi cuatro décadas (Heimpel y Angus, 1959; Angus, 1968). En la **Tabla 1.4** se presentan las diferentes estrategias que se ha usado para estudiar la actividad de formación de poro de las proteínas Cry en presencia de sus receptores nativos.

Tabla 1.4 - Metodologías utilizadas para estudiar la actividad de formación de poro de las toxinas Cry en presencia de su receptor

Metodología	Material	Referencia
Inhibición de la corriente de corto circuito (Icc)	Intestino medio aislado	Griego <i>et al.</i> , 1979 Liebig <i>et al.</i> , 1995
Inhibición de cotransporte de aminoácidos-K ⁺	VMMA	Sacchi <i>et al.</i> , 1986
Liberación de ³ H-alanina y uracilo	VMMA	Hendrickx <i>et al.</i> , 1990
Liberación de ⁸⁶ Rb-K ⁺	VMMA-lípidos APN 120 kDa - FA 65 kDa de <i>Manduca sexta</i> - lípidos	English <i>et al.</i> , 1991 Sangadala <i>et al.</i> , 1994
Protección osmótica por rafinosa y sacarosa	Células CF-1	Knowles y Ellar, 1987
Patch clamp, [Ca ²⁺] (fura 2)	Células Sf-9	Schwartz <i>et al.</i> , 1991
[K ⁺] y pH (PBFI, BCECF)	Células Sf-9	Vachon <i>et al.</i> , 1995
Cambios en el potencial de membrana (dis-C ₃₋₅)	VMMA	Uemura <i>et al.</i> , 1992 Lorence <i>et al.</i> , 1995
Cambios en el potencial de membrana (electrodos)	Intestino medio aislado	Peyronnet <i>et al.</i> , 1997
Dispersión de la luz	VMMA	Carrol y Ellar, 1993
Apagamiento de la fluorescencia de la carboxifluoresceína	VMMA	Carrol y Ellar, 1997
Bicapas lipídicas planas (BLP)	VMMA	Ver Tabla 1.5

Un sistema que se ha empleado con frecuencia es el monitoreo de los cambios en la corriente de corto circuito (I_{cc}) en intestinos medios aislados. La I_{cc} es una medida indirecta del transporte activo de iones de la hemolinfa al lumen (Chen *et al.*, 1993). Al agregar toxinas del lado luminal del intestino medio diversos autores han observado que después de 5 a 60 minutos la I_{cc} cae total o parcialmente como respuesta a la formación de una vía de permeabilidad adventicia (Griego *et al.*, 1979; Liebig *et al.*, 1994). Usando esta metodología se demostró que el Ba²⁺, un agente que bloquea canales de potasio (Hille, 1992) y canales poco selectivos a cationes, es capaz de proteger e incluso revertir el efecto de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac en el intestino de *Manduca sexta* (Crawford y Harvey, 1988).

La entrada de aminoácidos (a.a.) a través del epitelio del intestino medio larvario depende de la existencia del potencial eléctrico transmembranal. Los a.a. entran al citoplasma de las células columnares a través de seis diferentes sistemas simporte dependientes de voltaje que están localizados en la microvellosidad apical (Gill *et al.*, 1992). Se ha demostrado que al afectar la permeabilidad de la membrana apical, las proteínas Cry1 inhiben el cotransporte a.a./K⁺ en VMMA de lepidópteros. Usando esta metodología se ha encontrado que las δ -endotoxinas aumentan la permeabilidad de la membrana blanco al K⁺ (Sacchi *et al.*, 1986), al K⁺ y al Na⁺ (Wolfersberger, 1990b) e incluso a la alanina (Hendrickx *et al.*, 1990).

La principal crítica que se ha hecho a los resultados obtenidos al analizar el efecto de las proteínas Cry en la inhibición tanto de la I_{cc} como del cotransporte a.a./K⁺, es que la información obtenida es tendenciosa, debido a que ambos sistemas están íntimamente ligados al transporte de este ión. Por esta razón diversos autores han diseñado y/o adaptado nuevos sistemas de análisis que permitan determinar la naturaleza del efecto de estas toxinas en el tejido blanco. Tres sistemas diferentes han empleado VMMA como material de trabajo. Un primer enfoque consistió en estudiar con una sonda fluorescente los cambios que produce la toxina Cry1Aa en el potencial de membrana de las vesículas de *Bombyx mori*, encontrándose que ésta aumenta la permeabilidad de la membrana tanto para cationes monovalentes como para divalentes (Uemura *et al.*, 1992). En otro caso se analizó el efecto de Cry1Ac en VMMA de *M. sexta* monitoreando los cambios en la dispersión de la luz debidos a cambios en el volumen de las vesículas; en este caso se observó que Cry1Ac aumentó la permeabilidad tanto para aniones (Cl⁻, SCN⁻, gluconato⁻) como para cationes (K⁺, Na⁺, tetraetilamonio⁺) (Carrol y Ellar, 1993). Las diferencias en el índice de refracción de los solutos, los

cambios en la dispersión de la luz independientes del volumen de las vesículas y los artefactos asociados con el movimiento y agregación de las mismas son algunas de las razones que limitan el uso de este tipo de ensayo. Por estas razones los autores propusieron una alternativa basada en el monitoreo del volumen intravesicular medido como el apagamiento de la fluorescencia de la carboxifluoresceína en VMMA de *M. sexta* (Carrol y Ellar, 1997). Usando este sistema se observó que Cry1Ac forma poros que permiten el flujo libre de la rafinosa, molécula con un diámetro de 1.4 nm, y utilizando no electrolitos de tamaño creciente estimaron que el diámetro limitante de poro es de entre 2.4 y 2.6 nm en condiciones alcalinas (pH 9.0). Los resultados de estos tres últimos sistemas deben considerarse con cuidado, ya que ellos muestran el efecto que las proteínas Cry causan en la membrana biológica después de una hora de interacción, por lo que es cuestionable que el efecto observado corresponda a la acción primaria de estas toxinas en el tejido blanco.

Otro tipo de enfoque ha consistido en estudiar la capacidad de formación de poro de las toxinas Cry en células de insecto en cultivo. Se encontró que la rafinosa y la sacarosa fueron capaces de proteger osmóticamente a las células de la línea CF-1 de *Choristoneura fumiferana* de la acción de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac y así evitar la citólisis (Knowles y Ellar, 1987). Por otra parte los resultados de un estudio de "patch clamp" de los canales iónicos formados por la toxina Cry1C en las células Sf-9 provenientes del ovario de *Spodoptera frugiperda* revelaron que esta toxina forma canales aniónicos de 26 pS en ambos lados de la membrana, y usando el colorante fura-2 se encontró también que causa un aumento inmediato de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Con esta evidencia en mente los autores propusieron un modelo de acción que involucra la internalización de la molécula (Schwartz *et al.*, 1991). Usando esta misma línea celular y dos sondas fluorescentes se demostró que Cry1C aumenta la permeabilidad de la membrana de las células al menos para el H^+ , el K^+ y el Na^+ (Vachon *et al.*, 1995). La principal crítica que se ha hecho a este tipo de ensayos es que el origen de las células utilizadas es muy diferente al de su blanco natural, las células columnares del intestino medio. Es cuestionable en este mismo sentido que los receptores para las toxinas Cry se expresen en estas células y por lo tanto que el efecto observado corresponda al que sucede *in vivo*. Por estas razones deben considerarse con cuidado las conclusiones a las que se ha llegado usando este material biológico.

Una metodología alternativa para estudiar la formación del poro consistió en la medición del efecto de diversas δ -endotoxinas en el potencial eléctrico de la membra-

na apical de intestinos medios aislados usando microelectrodos (Peyronnet *et al*, 1997). La adición de la proteína Cry1Aa a la que *Lymantria dispar* y *B. mori* son muy sensibles causó una depolarización rápida, irreversible y dependiente de la dosis; otras toxinas menos potentes para *L. dispar* (Cry1Ac, Cry1C y Cry1E) produjeron un efecto similar, a pesar de que en el bioensayo su potencia resultó relativamente baja. Aunque esta técnica permite discriminar entre las toxinas activas e inactivas, al menos para el caso de *L. dispar* la habilidad de estas proteínas para alterar el potencial de la membrana apical no refleja su potencia hacia la larva completa, ésto sugiere que existen otros factores *in vivo* que influyen el nivel de toxicidad de las proteínas Cry.

1.5.6.1 La función del receptor en la formación del poro

Se han propuesto varios modelos acerca de las posibles funciones del receptor en la formación del poro (Knowles y Dow, 1993). Una primera posibilidad es que el receptor *per se* sea una canal iónico que se active por la unión de la toxina. Si este fuera el caso se esperaría observar una correlación directa entre la unión y la formación del poro, pero como se citó antes, ésto no sucede para todas las toxinas Cry. Otra posibilidad es que la toxina y el receptor, en conjunto, formen el poro. La evidencia que apoya esta idea se obtuvo al estudiar los canales formados por Cry1Ac y Cry1C en bicapas a las que previamente se incorporaron vesículas de *Manduca sexta* (Martin y Wolfersberger, 1995) y *Spodoptera frugiperda* (Lorence *et al.*, 1995), respectivamente. En ambos casos se encontró que la conductancia y propiedades cinéticas de los canales formados por esas proteínas difieren en presencia y ausencia de su receptor (Tabla 1.5). Esta evidencia aunque incipiente hace pensar que es plausible la participación directa del receptor en la formación del poro.

El receptor podría también catalizar la asociación o inserción de la toxina en la membrana, sin participar en la formación del poro. Dicha catálisis podría consistir en aumentar la concentración efectiva de toxina en la superficie de la membrana, o bien inducir un cambio conformacional que conduzca a la toxina a un estado competente para la inserción. En el primer caso se esperaría que las toxinas a altas concentraciones fueran capaces de formar poros en ausencia de su receptor. Diversos grupos de investigación han obtenido evidencia que sustenta esta propuesta al estudiar la actividad de formación de poro en bicapas lipídicas planares (Tabla 1.5). Usando este sistema se han analizado proteínas de las clases Cry1, Cry2, y Cry3. Todas ellas for-

Tabla 1.5 - Análisis de la actividad de formación de poro de las proteínas Cry en bicapas lipídicas planas

Toxina	Región [proteína]	Composición de la bicapa	pH	Conductancia (pS)	Selectividad PK ⁺ /PCl ⁻	Referencia
Cry3A	α hélice 5 (16 µg/ml)	L:C (5:1)	7.4	30-1000	N.D.	Gazit <i>et al.</i> , 1994
Cry1Ac	α hélice 5 (0.18 µg/ml)	FE o FE:FC (3:1)	4.0	60	Catiónica	Cumming <i>et al.</i> , 1994
Cry1Ac	dominio I (3 µg/ml)	DiFFC	9.5	>600	Catiónica	Walters <i>et al.</i> , 1993
Cry3Bb	dominio I (10-20 µg)	A o DiFFC	9.5	80-1000	2-3:1	Von Tersch <i>et al.</i> , 1994
Cry1Ac	toxina (32 µg/ml)	A	9.7	600	25:1	Slatin <i>et al.</i> , 1990
Cry3A	toxina (23 µg/ml)	A:C (2:1)	9.7	4000	25:1	Slatin <i>et al.</i> , 1990
Cry1C	toxina (2.5-15 µg/ml)	FE:FC:C (7:2:1)	9.5	100-200	Catiónica	Schwartz <i>et al.</i> , 1993
Cry3Bb	toxina (10-20 µg)	A o DiFFC	9.5	25-35	Aniónica	
Cry2A	toxina (10-20 µg)	A o DiFFC	9.5	80-1000	2-3:1	Von Tersch <i>et al.</i> , 1994
Cry1C	toxina (60 µg/ml)	DiFFC	7.0	25 (V)	Canales no selectivos	English <i>et al.</i> , 1994
Cry1Aa	toxina (1-20 µg/ml)	FE:FC:C (7:2:1)	9.0	120	7:1	Díaz, 1995
Cry1C	toxina (40 µg/ml)	Células Sf-9 patch clamp (célula unida)	9.0	452	Catiónica	Grochulski <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	toxina (10 µg/ml)	L + VMMA <i>M.sexata</i> (100 ng/ml)	N.D.	26	Aniónica	Schwartz <i>et al.</i> , 1991
Cry1C	toxina (0.6 µg/ml)	DiFFC + VMMA <i>S.fru-giperda</i> (30 ng/ml)	9.6	13,000-50,000	N.D.	Martin y Wolfersberger, 1995
			8.8	2,000-3,000		
			9.0	360-1,900	8:1	Lorence <i>et al.</i> , 1995

Notas: A = asolectina, C = colesterol, DiFFC = difitanoilfosfatidilcolina, FC = fosfolípidicolessterol, FE = fosfatidiletanolamina, L = lecitina de soja, N.D. = no determinado, VMMA = vesículas de membrana de la microvellosidad apical.

man canales con cierta preferencia hacia los cationes, aunque en uno de los casos se ha observado que la selectividad varía con el pH (Schwartz *et al.*, 1993a). La conductancia de los canales varía entre 25 y 4000 pS y en todos los casos se han observado varios estados o niveles de conductancia. La aparición de estos subestados se ha considerado como una evidencia de que las proteínas Cry actúan en la membrana en forma de agregados u oligómeros.

Otros resultados que también apoyan la idea de que el receptor funciona aumentando la concentración efectiva de toxina en la membrana consistieron en mostrar que la presencia de la microvellosidad apical de *Heliothis virescens* reduce en tres órdenes de magnitud la concentración de Cry1Ac necesaria para aumentar la permeabilidad al $^{86}\text{Rb-K}^+$ de vesículas sintéticas. Se obtuvieron resultados similares al purificar y reconstituir en vesículas sintéticas la aminopeptidasa N de *M. sexta* y una proteína de 65 kDa con actividad de fosfatasa (Sangadala *et al.*, 1994). Esta es la primera demostración *in vitro* de que una de las proteínas de unión identificadas funciona como receptor.

Hasta la fecha en ninguno de los trabajos publicados se ha podido hacer un análisis detallado a nivel de canal único que permita contestar algunas de las preguntas fundamentales que se tienen a este respecto como por ejemplo ¿cuál es la unidad mínima capaz de formar poro (una o varias moléculas de δ -endotoxina)?, ¿cuál es la función del receptor en esta actividad? y ¿qué región y residuos específicos forman parte del canal?, entre otras.

1.5.7 La citólisis

El efecto de la actividad formadora de poros de las δ -endotoxinas en la membrana blanco depende principalmente del medio ambiente celular (Gill *et al.*, 1992; Knowles y Dow, 1993; Knowles, 1994). Se ha propuesto que las proteínas Cry causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH (Wolfsberger, 1992) o por citólisis osmótica (Knowles y Ellar, 1987). La evidencia que sustenta la primera hipótesis es aquella que señala que, de alguna manera, las toxinas de *Bt* aumentan la permeabilidad de la membrana a los cationes, la cual, en condiciones fisiológicas, se propone es poco permeable al K^+ (Wolfsberger, 1992). La hipótesis de citólisis osmótica está avalada por la evidencia que indica que la lesión forma-

da por las δ -endotoxinas permite no sólo el paso de iones, sino también de agua y moléculas de mayor tamaño.

La consecuencia que trae consigo cualquiera de las dos alternativas planteadas es la alteración de la permeabilidad selectiva de la microvellosidad apical. Esto causa a su vez que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que el efecto más devastador de este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que ésto interfiere con el metabolismo celular normal, y causa como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal (Harvey, 1992; Wolfersberger, 1992). Una vez que las células columnares y caliciformes se destruyen, las esporas de *Bt* tienen acceso a la hemolinfa, medio en el que proliferan. Se ha demostrado que en algunos casos el efecto de las proteínas Cry y las esporas es sinérgico (Johnson y McGaughey, 1996) y que algunas de éstas contienen toxina en la superficie, lo que asegura su acceso a la hemolinfa (Du y Nickerson, 1996b). La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia.

1.6 La función de los dominios I, II y III

Varias líneas de evidencia experimental obtenidas por múltiples grupos sustentan la idea de que los dominios I, II y III de las proteínas Cry son estructuras independientes. Las **Tablas 1.6** y **1.7** muestran un resumen de los estudios de mutagénesis sitio-dirigida que han permitido elucidar la función en que participa cada uno de ellos. Esta información se presenta a continuación de acuerdo a las etapas secuenciales en que se ha dividido al mecanismo de acción.

Solubilización: La determinación de la estructura de la proteína Cry3A reveló que existen por lo menos cuatro puentes salinos intercatenarios que la estabilizan (Li *et al.*, 1991). Esto podría explicar las propiedades de solubilidad de esta toxina, la cual se disuelve tanto a pH ácido (3.9 a 4.2) como a pH alcalino (9.5 a 11.3) pero permanece insoluble en la región neutral de pH (Koller *et al.*, 1992). Cry3A es activa contra larvas de escarabajos del tipo de los crisomélidos cuyo pH intestinal es ligeramente ácido (Weltens *et al.*, 1992); en este caso se presume debe haber otros factores en el contenido intestinal que promueven la solubilización de esta toxina.

Respecto de las proteínas de la clase 1, la elucidación de la estructura de la toxina Cry1Aa ha permitido conocer las características que determinan las propiedades de solubilidad de esta molécula. En este caso se sabe que como en todas las δ -endotoxinas que se producen como formas inactivas, es indispensable el medio ambiente reductor para solubilizar los puentes disulfuro que son abundantes en la mitad C-terminal que es eliminada por cortes proteolíticos sucesivos en la siguiente etapa del mecanismo de acción (Knowles, 1994). Se encontró que a excepción de dos residuos, todos los aminoácidos de carácter básico de la parte activa de Cry1Aa son argininas (Grochulsky *et al.*, 1995). Los resultados de la comparación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Cry1 revelaron que la predominancia de argininas es una característica general de todas ellas. Se propone que ésta es una adaptación evolutiva de las toxinas que actúan en el intestino medio de lepidópteros: el muy alto pKa de la arginina (12.5) asegura que la mayor parte de las cadenas laterales estén cargadas, aún en las condiciones más alcalinas, lo que no sucede en el caso de los residuos de lisina cuyo pKa es de 10.8 (Grochulski *et al.*, 1995).

Procesamiento: Diversos trabajos han confirmado la presencia de un sitio conservado de procesamiento en el extremo N-terminal de las toxinas de tipo Cry1 (R27/28, Bietlot *et al.*, 1989). En contraste, la posición del sitio de procesamiento en el extremo C-terminal en estas mismas toxinas no parece ser constante ya que se ha localizado en la región 609 a 630 y no en un sitio específico (Höfte *et al.*, 1986; Wabiko *et al.*, 1986; Haider y Ellar, 1989a; Martens *et al.*, 1995 y Strizhov *et al.*, 1996). En este sentido se ha confirmado la participación de los residuos que conforman la hoja β -plegada 23 (bloque conservado 5) que forma parte del dominio III de las toxinas Cry1Ab (Martens *et al.*, 1995; Wabiko y Yasuda, 1995) y Cry4Aa (Nishimoto *et al.*, 1994) en el mantenimiento y estabilidad de la estructura, dado que las proteínas mutantes resultaron más susceptibles a la acción de la tripsina (Tabla 1.6). Estos datos confirmaron la hipótesis de los autores de la estructura tridimensional de la toxina Cry3A quienes predijeron la importancia de la conservación de esta región β -plegada para permitir su interacción con el dominio I y, de esta manera tener una estructura globular estable y resistente a la acción de las proteasas (Li *et al.*, 1991).

Unión: Las primeras evidencias que sugirieron la participación del dominio II en la interacción con el receptor se obtuvieron al intercambiar las regiones menos conservadas (hipervariables) entre tres toxinas muy similares entre sí (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac) y observar que dicho proceso resultó en el intercambio de especificidades

Tabla 1.6 - Estudios de mutagénesis en los dominios II y III de las proteínas Cry

Toxina	Región	Mutación	Insecto	Efecto unión	Efecto toxicidad	Referencia
DOMINIO II						
Cry1Ab	asa α -8	G282A-S283L	<i>L. dispar</i>	Disminución afinidad (Kd 9X)	Disminución 10 veces	Lee et al., 1996b
Cry1Ac	asa 1	G312V	<i>M. sexta</i>	Disminución unión irreversible	Disminución 6 veces	Smedley y Ellar, 1996
Cry3A	asa 1	N353A-D354A	<i>T. molitor</i>	Pérdida unión inicial	Pérdida total	Wu y Dean, 1996
Cry1Aa	asa 2	Delección o sustitución alanina 365LYRR11L371	<i>B. mori</i>	Disminución afinidad (Kd 11X)	Disminución 1000 veces	Lu et al., 1994
Cry1Ab	asa 2	Delección 370PFNIGI375 F371A, G374A	<i>M. sexta</i>	Disminución unión irreversible	Disminución 400 veces	Rajamohan et al., 1995a
Cry1Ab	asa 2	Sustitución alanina 368RRp370	<i>M. sexta</i>	Pérdida unión inicial	Pérdida total	Rajamohan et al., 1996a
Cry1Ab	asa 2	F371W	<i>M. sexta</i>	Ninguno	Ninguno	Rajamohan et al., 1996a
Cry1Ab	asa 2	F371Y, L o S	<i>M. sexta</i>	Disminución unión irreversible	Disminución 6-40 veces	Rajamohan et al., 1996a
Cry1Ab	asa 2	F371V o C	<i>M. sexta</i>	Disminución unión irreversible	Disminución 400-600 veces	Rajamohan et al., 1996a
Cry1Ab	asa 2	Delección 370PFNIGI375	<i>H. virescens</i>	Pérdida unión inicial	Disminución 50 veces	Rajamohan et al., 1996a
Cry1Ab	asa 2	G374A I375A	<i>H. virescens</i>	Disminución afinidad (Kd 3-5X)	Disminución 5-10 veces	Rajamohan et al., 1996a
Cry1Ab	asa 2	N372A o G Delección N372	<i>L. dispar</i>	Aumento afinidad Disminución afinidad	Aumento 8 veces Disminución 21 veces	Rajamohan et al., 1996b

Toxina	Región	Mutación	Insecto	Efecto unión	Efecto toxicidad	Referencia
Cry1Ab	asa 2	N372A-A282G-L283S	<i>L. dispar</i>	Aumento afinidad (Kd 0.06 X)	Aumento 36 veces	Rajamohan <i>et al.</i> , 1996b
Cry1Ac	asa 2	Y367S R368T R369I	<i>M. sexta</i>	Disminución afinidad (Kd 2-7X)	Disminución 4-10 veces	Smedley y Ellar, 1996
Cry3A	asa 2	P412A, S413 A	<i>T. molitor</i>	Ninguno	Ninguno	Wu y Dean, 1996
Cry1Ab	asa 3	F440A G439A	<i>M. sexta</i>	Disminución unión inicial	Disminución 13 y 100 veces	Dean <i>et al.</i> , 1996
Cry1Ac	asa 3	S438I	<i>M. sexta</i>	Disminución unión irreversible	Disminución 2.5 veces	Smedley y Ellar, 1996
Cry1Ac	asa 3	G439A	<i>M. sexta</i>	Disminución afinidad (Kd 12X)	Disminución 33 veces	Smedley y Ellar, 1996
Cry1Ac	asa 3	S441T	<i>M. sexta</i>	Aumento afinidad (Kd 0.1X)	Ninguno	Smedley y Ellar, 1996
Cry3A	asa 3	Q882A, S484A, R485A	<i>T. molitor</i>	Aumento unión irreversible	Aumento 1.5 veces	Wu y Dean, 1996
DOMINIO III						
Cry1Ac	asa β 15 y β 16	S503I o G S504I o R	<i>M. sexta</i>	Disminución unión inicial	Disminución 5-50 veces	Aronson <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	asa β 15 y β 16	S503R- I508V S504C-G505R S504I-N507D	<i>M. sexta</i>	Disminución unión inicial	Disminución 5-50 veces	Aronson <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	asa β 15 y β 16	R500S, N502K N506T, H, K o Y I508L, Q509H	<i>M. sexta</i>	Ninguno	Ninguno	Aronson <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	asa β 15 y β 16	L501I- I508S G505R- N506H G505A- I508L	<i>M. sexta</i>	Ninguno	Ninguno	Aronson <i>et al.</i> , 1995

(Schnepf *et al.*, 1990). En la actualidad ya se ha logrado hacer un análisis más fino del dominio II y se ha determinado que sus cuatro regiones prominentes: el asa de la α -hélice 8 y las asas 1 (lazo entre $\beta 2$ y $\beta 3$), 2 (lazo entre $\beta 6$ y $\beta 7$) y 3 (lazo entre $\beta 10$ y $\beta 11$), son las regiones que interactúan directamente con el receptor (Tabla 1.6).

Los resultados de los estudios de unión reversible e irreversible, competencia homóloga y heteróloga y "ligand blotting" que se han llevado a cabo con las proteínas mutantes en las asas del dominio II han mostrado que la función de cada una de estas regiones puede ser diferente en los insectos susceptibles a las toxinas silvestres, por esta razón la interpretación de los resultados es complicada ya que es caso-específica.

En este sentido se encontró que los residuos que conforman el asa de la α -hélice 8 de Cry1Ab son importantes para la interacción inicial con el receptor en *Lymantria dispar* ya que la doble mutante G282A-S283L mostró ser 10 veces menos potente que la silvestre debido a una disminución en la unión (Kd 9 veces menor), sin estar alterado el componente irreversible de la unión (Lee *et al.*, 1996c). Cabe señalar que cuando se analizó el comportamiento de esta misma mutante en otras especies sensibles a la toxina silvestre (*Manduca sexta* y *Heliothis virescens*) no se encontró ninguna alteración en la unión. Esta evidencia confirma el planteamiento citado en el párrafo anterior.

Mutaciones llevadas a cabo en el asa 1 de la toxina Cry3A (350YYGND³⁵⁴) mostraron que la doble mutante N353A-D354A perdió su habilidad para unirse al receptor y su toxicidad hacia *Tenebrio molitor*, lo que indica que estos residuos participan en la etapa inicial de la unión (Wu y Dean, 1996). Un análisis de esta misma región usando la toxina Cry1Ac mostró que el aminoácido G312 participa en la interacción irreversible con el receptor en *M. sexta* ya que la sustitución G312V resultó en una proteína con toxicidad disminuida, sin estar afectada la constante de afinidad Kd (Smedley y Ellar, 1996).

El asa 2 de la toxina Cry3A consiste de sólo dos residuos ⁴¹²PS⁴¹³, su sustitución por alanina no tuvo un efecto significativo en la unión al receptor y la toxicidad (Wu y Dean, 1996). Por el contrario, el asa 2 en las toxinas Cry1As activas contra lepidópteros es una región muy larga que de hecho hace la diferencia más importante entre la estructura de las toxinas Cry3A y Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995). En esta última el asa 2 está compuesta por los residuos ³⁶⁷RRILGSGP³⁷⁵, mientras que en Cry1Ab y Cry1Ac está integrada por ³⁶⁸RRPFNIGI³⁷⁵. La delección de una gran parte de esta asa en

Cry1Aa (365LYRRHIL371) o su sustitución por alaninas provocó una pérdida sustancial de la unión inicial con el receptor y la toxicidad hacia *Bombyx mori* (Lu *et al.*, 1994). Se obtuvieron resultados similares al hacer este mismo tipo de sustitución en los residuos 368RRP370 de la toxina Cry1Ab y ensayar las mutantes en *M. sexta*, *H. virescens* (Rajamohan *et al.*, 1996a) y *L. dispar* (Dean *et al.*, 1996). Mutaciones puntuales en los residuos 367YRR369 de la toxina Cry1Ac también afectaron la interacción inicial con el receptor en *M. sexta* (Smedley y Ellar, 1996).

La sustitución por alanina del resto de los residuos que conforman el asa 2 de la toxina Cry1Ab ha mostrado resultados sorprendentes. La sustitución I373A causó una alteración estructural e inestabilidad en la toxina por razones desconocidas. Las mutantes en las que se eliminó la región 371FNIGI375 o se hicieron modificaciones puntuales (F371A y G374A) perdieron cerca de 400 veces su potencia hacia *M. sexta*, pero no mostraron un cambio significativo en los parámetros de unión. La característica que está afectada en estas mutantes es la unión irreversible con el receptor ya que mientras sólo entre el 20 y 25 % de la toxina silvestre se puede desplazar, más del 50 a 55 % de las mutantes se desplazan por la adición de un exceso de toxina (Rajamohan *et al.*, 1995). Experimentos posteriores en los que el residuo F371 se reemplazó por C, V, S, L, Y y W mostraron que la toxicidad de Cry1Ab hacia *M. sexta* está correlacionada con el tamaño e hidrofobicidad del aminoácido de esta posición. Estas sustituciones no tuvieron efecto alguno en la interacción inicial pero si en el componente irreversible de la unión (Rajamohan *et al.*, 1996a). Cabe señalar que contrariamente a lo observado en *M. sexta*, la sustitución de los residuos FNIGI resultó en proteínas mutantes que están afectadas en la interacción inicial con el receptor en *H. virescens* (Rajamohan *et al.*, 1996a).

La secuencia del asa 3 de la toxina Cry1Ab es 438SGFSNS443. La sustitución puntual de cada residuo por alanina produjo alteraciones en la toxicidad hacia *M. sexta*, siendo las mutantes F440A y G439A las más afectadas (13 y 100 veces menor potencia). Los experimentos de competencia heteróloga revelaron que ambas proteínas están afectadas en la unión inicial con el receptor (Dean *et al.*, 1996). La sustitución S441T llevada a cabo en la toxina Cry1Ac mejoró la unión con el receptor en esta misma especie por lo que se propone que este residuo tiene que ver con la interacción inicial entre la toxina y su receptor (Smedley y Ellar, 1996). El análisis de las mutantes de Cry1Ac en el residuo S438 indica que este aminoácido está involucrado en la unión irreversible (Smedley y Ellar, 1996).

En la toxina Cry3A el asa 3 está conformada por los residuos 481MQGSRG486, la sustitución de éstos por alanina resultó en una proteína más tóxica hacia *T. molitor*. Los experimentos de competencia heteróloga revelaron que esta mutante mostró pérdida de la unión inicial, sin embargo, el análisis de la cinética de disociación reveló que esta proteína tiene una mejor unión irreversible lo que explica su mayor potencia hacia dicho coleóptero (Wu y Deati, 1996).

Los estudios de mutagénesis no sólo han permitido conocer la función de los residuos localizados en las aspas de las proteínas Cry, también han mostrado su utilidad para generar mejores toxinas. Un ejemplo que ilustra esto es el caso de una sustitución triple en la toxina Cry1Ab (N372A-A282G-L283S); esta mutante resultó ser 36 veces más tóxica que la toxina silvestre hacia *L. dispar*. Se encontró que las razones de este mejoramiento en la potencia son un aumento en la constante de afinidad de 18 veces, acompañado de un aumento de 4 veces la cantidad total de toxina unida (Rajamohan *et al.*, 1996b).

Los experimentos llevados a cabo con una cepa de *Plutella xylostella* resistente a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac mostraron que ésta presenta reacción cruzada para proteínas con un dominio II similar al de las proteínas Cry1As tal como Cry1F, Cry1J y una quimera que contiene los dominios I y II de Cry1Ab y el dominio III de Cry1C; sin embargo, no mostró este mismo comportamiento para proteínas con un dominio II diferente tales como Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1C, Cry1D, Cry1I y Cry2Aa (Tabashnik *et al.*, 1996). Esta evidencia confirma la importancia del dominio II en la interacción con el receptor.

La introducción de una carga negativa (A92D) o bien la eliminación de la carga positiva del aminoácido R93, residuos situados en el extremo N-terminal de la α -hélice 3 de la toxina Cry1Ac, resultó en proteínas mutantes con toxicidad muy disminuida hacia *M. sexta*, *Trichoplusia ni* y *H. virescens*. Al hacerse los estudios de unión se encontró que las mutantes compitieron de manera efectiva con la silvestre por el receptor en *H. virescens* pero no en *M. sexta*, lo que sugiere la participación de estos residuos del dominio I en esa interacción (Wu y Aronson, 1992). Un análisis más fino de las proteínas con las sustituciones A92D o R93F mostró que la pérdida en toxicidad no se debió a alteraciones en la interacción inicial sino a una reducción de la unión irreversible: 94 % de la toxina silvestre comparado con 65 % de A92D y 75 % de R93F (Tabla 1.7) (Hussain *et al.*, 1996). Se obtuvieron resultados similares al estudiar la

Tabla 1.7 - Estudios de mutagénesis en el dominio I de las proteínas Cry

Toxina	Región	Mutación	Insecto	Efecto unión	Efecto toxicidad	Referencia
Cry1Ab	N-terminal	R28D	<i>M. sexta</i>	Ninguno	Disminución	Martens <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ab	asa $\alpha 1$ - $\alpha 2a$	F50D, V51D	<i>P. brassicae</i>	Ninguno	Disminución 50%	Ahmad y Ellar, 1990
Cry1Ac	inicio α -3	A92D	<i>M. sexta</i>	Pérdida	Pérdida total	Wu y Aronson, 1992
Cry1Ac	inicio α -3	A92D R93F	<i>M. sexta</i>	Disminución unión irreversible	Pérdida total	Ilussain <i>et al.</i> , 1996
Cry1Ab	inicio α -3	A92E	<i>M. sexta</i>	Disminución unión irreversible	Pérdida total	Chen <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ab	asa $\alpha 4$ - $\alpha 5$	Y153R	<i>M. sexta</i>	Disminución unión irreversible	Disminución 23 veces	Chen <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ab	α -5	A165P, L167M	<i>P. brassicae</i>	Ninguno	Disminución 70-80%	Ahmad y Ellar, 1990
Cry1Ac	α -5	Q63P, A164D N166K o D L167K o F H168D	<i>M. sexta</i> <i>H. virescens</i> <i>T. ni</i>	Ninguno	Pérdida total	Wu y Aronson, 1992
Cry1Ac	α -5	Q63R, A164P H168N, L169F	<i>M. sexta</i> <i>H. virescens</i> <i>T. ni</i>	Ninguno	Disminución 10-1000 veces	Wu y Aronson, 1992
Cry1Ac	α -5	Q63H A164G, T o S A165T, S, G o V L167V, H168Q L169S, I o V S170F, V171I o L D174G, V175H	<i>M. sexta</i> <i>H. virescens</i> <i>T. ni</i>	Ninguno	Ninguno	Wu y Aronson, 1992
Cry1Ac	α -5	H168R	<i>M. sexta</i> <i>H. virescens</i> <i>T. ni</i>	Ninguno	Aumento 3-5 veces	Wu y Aronson, 1992

Toxina	Región	Mutación	Insecto	Efecto unión	Efecto toxicidad	Referencia
Cry1Ac	α -6	A207G V208I o L R209A, P, H, G o S W210C, R, L o S Y211N, R, D, F o C N212K o Y T213A o P G214E, V, A o L L215I o V V218N	<i>M. sexta</i> <i>H. virescens</i> <i>T. ni</i>	Ninguno	Ninguno	Aronson <i>et al.</i> , 1995

mutante A92E de la toxina Cry1Ab en *M. sexta* (Chen *et al.*, 1995). Al mapear los residuos 92 y 93 en la estructura de la toxina Cry1Aa se puede ver que el extremo N-terminal de la α -hélice 3 está expuesto hacia la membrana en la misma cara que las asas prominentes del dominio II (Grochulski *et al.*, 1995).

El análisis de la cinética de unión de la toxina Cry1Ab silvestre y las mutantes en un residuo situado en el lazo entre las hélices α -4 y α -5 (Y153A, Y153R y Y153D) mostró que una carga negativa en esta posición resulta desfavorable para la unión irreversible de la toxina silvestre a las VMMA de *M. sexta*, como lo señala la disminución de este parámetro exclusivamente en la mutante Y153D (Chen *et al.*, 1995).

Desde hace algún tiempo se tenía evidencia indirecta que indicaba la participación del dominio III en la determinación de la especificidad (Ge *et al.*, 1991; Caramori *et al.*, 1991). En la actualidad se tiene ya evidencia directa que señala la interacción de esta región con el receptor. La construcción de proteínas quiméricas entre Cry1C y Cry1Ea mostró que el dominio III de la primera es determinante para la especificidad hacia *Spodoptera exigua* y *Mamestra brassicae* (Bosch *et al.*, 1994). Asimismo, se demostró que el intercambio del dominio III entre las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac determina la unión a diferentes receptores en el intestino medio de *L. dispar*, ya que mientras la quimera con el dominio III de Cry1Ac se une a la aminopeptidasa N de 120 kDa, aquella con el dominio III de Cry1Aa se une a una proteína de 210 kDa (Lee *et al.*, 1995b). La construcción de quimeras entre las proteínas Cry1Ab y Cry1C confirmó la importancia del dominio III de ésta última para la unión con el receptor en *S. exigua* y mostró que la substitución del dominio III puede ser una herramienta poderosa para ampliar el repertorio de toxinas con que se cuenta en la actualidad para controlar a las diferentes especies de insectos plaga (De Maagd *et al.*, 1996a y b).

No se conoce que residuos específicos dentro del dominio III son los que participan en la unión con el receptor. La única información que se tiene en este sentido proviene de experimentos en los que se demostró que mutaciones en los residuos S301 y S304 de la toxina Cry1Ac (Tabla 1.6) resultaron en proteínas que perdieron su capacidad de unión y toxicidad hacia *M. sexta* y disminuyeron su capacidad de unión a dos de los cinco posibles receptores en *H. virescens* con la subsecuente disminución de la potencia (Aronson *et al.*, 1995).

En fecha reciente se demostró que el fragmento que comprende los dominios II y III de la toxina Cry1Ab retuvo la capacidad de la toxina completa para unirse al receptor en cortes de tejido de *M. sexta* y *T. ni*, así como a dos proteínas (~120 y 210 kDa) provenientes de las VMMA de *M. sexta* en un análisis tipo "ligand blotting" (Flores *et al.*, 1997). Esta evidencia respalda la idea de que la región dominio II-dominio III es la responsable de la determinación de la unión y especificidad de las δ -endotoxinas.

Inserción y formación de poro. Dos trabajos independientes han mostrado que el dominio I de las toxinas Cry1Ac (Walters *et al.*, 1993) y Cry3Bb (Von Tersch *et al.*, 1994) es capaz de formar poros por sí mismo en bicapas lipídicas sintéticas (Tabla 1.5). Esta es la primera evidencia directa que confirmó la hipótesis surgida de dos análisis de mutagénesis dirigida (Ahmad y Ellar, 1990; Wu y Aronson, 1992) y del conocimiento de la estructura de la toxina Cry3A (Li *et al.*, 1991) en la que se señalaba la posible participación de las α -hélices anfipáticas en dicha actividad. Estos análisis de mutagénesis consistieron en sustituir residuos hidrofóbicos de la α -hélice 5 de las toxinas Cry1Ab (Ahmad y Ellar, 1990) y Cry1Ac (Wu y Aronson, 1992) por residuos cargados o residuos de prolina (Tabla 1.7). Estos reemplazamientos dieron como resultado proteínas que perdieron su actividad hacia los insectos sensibles a las toxinas silvestres (*Pieris brassicae* para Cry1Ab y *M. sexta*, *H. virescens* y *T. ni* para Cry1Ac), pero cuya capacidad de unión al receptor quedó inalterada. Además, se encontró que las mutantes de Cry1Ac fueron incapaces de inhibir la acumulación de leucina dependiente del gradiente de K^+ en las VMMA de *M. sexta* (Wu y Aronson, 1992). Estos resultados en conjunto indican que las sustituciones introducidas en la α -hélice central causaron que las proteínas fueran incapaces de insertarse y formar poros.

Se obtuvo evidencia adicional que apoya la idea de la participación de la α -5 como un componente estructural de los poros formados por las δ -endotoxinas al encontrar que péptidos sintéticos con la secuencia correspondiente a esta región de las toxinas Cry3A (Gazit *et al.*, 1994) y Cry1Ac (Cummings *et al.*, 1994) se estructuraron en forma de α -hélice en un medio hidrofóbico (metanol) y retuvieron la capacidad de formación de poro del dominio I completo en bicapas lipídicas.

Con base en el conocimiento que se tiene acerca de las posibles funciones de cada uno de los dominios y por comparación con otras toxinas bacterianas formadoras de poro (Li, 1992; Parker y Pattus, 1993) se han propuesto dos modelos posibles de la inserción en la membrana para las proteínas Cry. Un primer modelo propone que las

α -hélices 5 y 6 se insertan en la membrana como consecuencia de un cambio confor-macional disparado por el receptor (modelo del "abrecartas"), sin mayor participa-ción de las hélices y dominios restantes. El otro modelo plantea también que es la unión con el receptor la señal que dispara la inserción de la región α 4- α 5, mientras que el resto de las hélices se aplanan sobre la superficie de la bicapa lipídica expo-niendo hacia ella su cara hidrofóbica quedando de esta manera la molécula en forma parecida a un "paraguas" (Knowles, 1994). En fecha reciente se publicó evidencia que respalda este último modelo. Se introdujeron residuos de cisteína en sitios estra-tégicos del dominio I de la toxina Cry1Aa para formar puentes disulfuro entre algunas de las hélices y así restringir el movimiento de la α -5 y posteriormente se analizó la capacidad de estas proteínas para formar canales iónicos en bicapas lipídicas. Se en-contró que a diferencia de la silvestre, las mutantes fueron capaces de formar poros sólomente en presencia de un agente reductor (β -mercaptoetanol), lo que puso de ma-nifiesto la necesidad de que las hélices 4 y 5 conserven flexibilidad en su estructura para una inserción y formación de poro eficiente (Schwartz *et al.*, 1997). En este mis-mo estudio se demostró que un prerequisite para la formación del canal es la separa-ción del dominio I del resto de la molécula, ya que una mutante en la que se diseñó un puente disulfuro en la interfase dominio I-dominio II fue incapaz de formar canales en su estado oxidado. Esta evidencia apoya la idea de que de manera similar a los domi-nios formadores de poro de las colicinas y la toxina de la difteria (Parker y Pattus, 1993), el dominio I de las proteínas Cry debe pasar por un estado desplegado o de "mol-ten globule" (Dobson, 1994) como requisito para su inserción en las bicapas lipídicas.

Los resultados de un estudio de mutagénesis exhaustiva en la α -6 (Tabla 1.7) su-gieren que esta hélice acepta una gran flexibilidad en su estructura ya que ninguna de las sustituciones, aún las más extremas (p. ej. R209A, R209P, Y211D, G214E) produje-ron efecto alguno en la toxicidad de la proteína hacia *M. sexta*, *H. virescens* y *T. ni* (Aronson *et al.*, 1995). Esta evidencia, aunque indirecta también favorece la idea de que es el par α - α 5 el responsable de la inserción.

La comparación de las estructuras de las toxinas Cry1Aa y Cry3A reveló la alta conservación de tres puentes salinos en la interfase dominio I-dominio II (R233-E288, R234-E274 y D242-R265 en Cry1Aa). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las δ -endotoxinas ha revelado la conservación de estos residuos en la mayor parte de ellas (Grochulski *et al.*, 1995). Las sustituciones introducidas en algunas de estas posi-ciones en la proteína Cry1Ab: R234A, D242A (Dean *et al.*, 1996), D242C, D242N, R265C y

D2+2C/ R265C (Meza *et al.*, 1996) produjeron mutantes que perdieron el carácter de resistencia a las proteasas propio de la toxina silvestre. Se propone que estos puentes salinos son importantes para mantener la estructura globular durante la solubilización del cristal y activación de la protoxina (Grochulski *et al.*, 1995) y también, para transmitir del dominio II al dominio I la señal necesaria para que este último alcance un estado competente para la inserción y posterior formación del poro (Li *et al.*, 1991).

Capítulo 2

Objetivos e Hipótesis

La evidencia obtenida hasta el momento indica que las δ -endotoxinas ejercen su efecto tóxico afectando la permeabilidad de la membrana plasmática de las células del intestino medio de los insectos susceptibles cuando su dominio I se inserta y forma poros de conductancia muy alta (Walters *et al.*, 1993; Von Tersch *et al.*, 1994). Al parecer el receptor para las toxinas tiene un papel muy importante en esta actividad al aumentar la concentración efectiva de toxina en la membrana (Lorence *et al.*, 1995; Martin y Wolfersberger, 1995). La evidencia obtenida hasta el momento no permite contestar aún si la participación del receptor consiste sólo en modificar la estructura de la toxina de tal manera que puede pasar de un estado soluble en agua a un estado competente para la inserción en las bicapas lipídicas, o bien, si forma parte del canal. Los resultados disponibles a la fecha sugieren la posible participación de los residuos que forman el bloque más conservado entre las proteínas Cry, la α -hélice 5 del dominio I, en el fenómeno de inserción y formación de poro (Ahmad y Ellar, 1990; Wu y Aronson, 1992; Gazit *et al.*, 1994; Cummings *et al.*, 1994 y Schwartz *et al.*, 1997).

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es estudiar la actividad de formación de poro de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* en presencia de su receptor nativo y analizar la posible participación en esta actividad de algunos residuos de la α -hélice central. Se eligió como modelo de trabajo la proteína Cry1Ac que produce la cepa HD-73 perteneciente a la variedad *kurstaki*.

2.2 Objetivos específicos

1.- Analizar la actividad de formación de poro de la proteína Cry1Ac silvestre y dos mutantes en la hélice α -5 del dominio I: A164P y L167F. Estas proteínas fueron construidas por el grupo del Dr. Arthur Aronson del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Purdue con quien nuestro grupo estableció una estrecha colaboración.

2.- Estudiar al nivel más preciso la acción tóxica de la proteína Cry1Ac en presencia de su receptor. La técnica electrofisiológica llamada bicapas lipídicas planas

(BLP), en la que es posible resolver la actividad de un sólo canal iónico (Müller *et al.*, 1962, Darszon y Liévano, 1996) constituye la mejor herramienta para abordar este problema.

3.- Analizar el efecto de las toxinas Cry1Ac silvestre y mutantes en vesículas de la microvellosidad apical (VMMA) provenientes del intestino de dos insectos muy susceptibles a la toxina silvestre: *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*. Para cumplir este objetivo se propone utilizar un sistema de medición del potencial de membrana basado en la distribución de una sonda fluorescente (3-3' dipropiltiodicarbocianina o dis-C3-5) dentro y fuera de las vesículas. Nuestro grupo tiene ya experiencia en la utilización de esta técnica que ha mostrado ser muy útil para estudiar diversos aspectos relacionados con la capacidad de formación de poro de las toxinas Cry en presencia del receptor nativo, como por ejemplo la selectividad relativa de los canales formados, así como sus propiedades farmacológicas (Lorence *et al.*, 1995).

4.- Explorar la participación del posible receptor para la toxina Cry1Ac, la aminopeptidasa N, en la actividad de formación de poro. Se sabe que al menos una porción de esta enzima está unida a la microvellosidad apical por medio de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que es susceptible a la acción de una fosfolipasa C específica. Para abordar este objetivo proponemos estudiar la capacidad de formación de poro de la proteína Cry1Ac en el sistema de fluorescencia utilizando VMMA tratadas y no tratadas con la fosfolipasa C específica para GPI.

5.- Estudiar las propiedades farmacológicas de los canales endógenos de las vesículas y de los canales formados por la toxina Cry1Ac con la finalidad de encontrar algún agente que nos permita diferenciarlos. Proponemos iniciar este análisis utilizando Ba^{2+} , un bloqueador general de canales de potasio que también actúa sobre algunos canales catiónicos y Cs^+ , un catión que en un estudio previo mostró bloquear los canales endógenos de las VMMA de *Spodoptera frugiperda*, sin afectar al poro formado por Cry1D (Lorence *et al.*, 95).

2.3 Hipótesis

El receptor participa en la actividad de formación de poro de las proteínas Cry al aumentar la concentración efectiva de toxina en la membrana. Algunos residuos de la α -hélice central (α -5) tienen un papel importante en dicha actividad.

Capítulo 3 Materiales y Métodos

La mayor parte de los materiales y métodos empleados en esta investigación se citan en el artículo incluido en los resultados (capítulo 4):

Argelia Lorence, Alberto Darszon and Alejandra Bravo (1997).
"Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis*
Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes". *FEBS Letters* 414(2), 303-307.

Algunos detalles de la metodología empleada en este trabajo se detallan en un artículo que se publicó previamente y se incluye en el anexo 1 al final del texto. En esta sección se describen los métodos que no se detallan en estas publicaciones.

3.1 Material biológico

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron larvas del último estadio de desarrollo de *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*. La cría se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) como parte de una colaboración existente entre el laboratorio del Dr. Eduardo Aranda Escobar y nuestro grupo.

Trichoplusia ni (Hübner) o gusano falso medidor de la col (Lepidoptera: Noctuidae) es un hervívoro polífago que se alimenta de una gran variedad de cultivos de importancia agrícola y comercial (Broadway, 1989), aunque tiene preferencia por la col y el jitomate (Broadway, 1995). En México esta especie plaga tiene particular importancia para los cultivos de crucíferas (col, brócoli y coliflor) de la zona del Bajío, Morelos y Puebla.

El gusano de la yema del tabaco o *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) es un barrenador que causa graves daños a cultivos de importancia a nivel mundial, por ejemplo, perfora las hojas del tabaco y los frutos del jitomate y del chile (Hill, 1983).

Para empezar la cría se colectaron larvas de *T. ni* de los campos de col de Morelos y Puebla; éstas se mantuvieron en cuarentena para seleccionar las que estuvieran libres de parasitoides y patógenos. Las larvas seleccionadas se alimentaron con hojas

de col hasta que alcanzaron el siguiente estadio (pupa). Las pupas se enjuagaron primero con una solución comercial de hipoclorito de sodio al 1 % y después con agua destilada. Los adultos que emergieron se alimentaron con sacarosa al 10 % y se les permitió copular. Los huevos se incubaron a 28 ± 1 °C y 68 ± 2 % de humedad relativa con un fotoperíodo de 16:8 horas. Las larvas neonatas se colocaron en envases de plástico que contenían 30 ml de una dieta artificial (Mihh, 1984). La dieta incluía formalina (10 %), ácido acético (25 %) y cloruro de colina (15 %) para evitar el crecimiento de microorganismos indeseables. Las larvas usadas para la preparación de las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) fueron de la tercera generación.

Para comenzar la cría de *H. virescens* se utilizaron pupas que nos fueron donadas por el Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y del Trigo (CIMMYT). Las larvas se criaron como se cita en el párrafo anterior. Por provenir de una colonia que se ha criado en laboratorio durante varios años, las larvas usadas para preparar las vesículas de *H. virescens* fueron de la primera generación.

3.2 Determinación del espectro de emisión del colorante dis-C3-5 a diferentes pH

Se estudió la variación del espectro de emisión del colorante 3,3-dipropiltiodicarbocianina (dis-C3-5) de acuerdo al pH usando un espectrofluorómetro SIM-AMINCO modelo JD-490 (SLM Instruments, Urbana, IL). Dos mililitros de una solución de *N*-metil-D-glucamina (140 mM), CHES-HCl (10 mM) pH 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 o 10.0 se colocaron en una celda de vidrio a la que se adicionó el colorante antes citado hasta alcanzar una concentración final de 1 μ M. La solución se excitó de forma constante a 620 nm registrando la emisión en el rango de 550 a 800 nm. El experimento se llevó a cabo por duplicado a 30 °C con agitación constante.

3.3 Experimentos en bicapas planas

3.3.1 Consideraciones en la preparación del material

Todas las soluciones utilizadas se prepararon con reactivos del más alto grado de pureza disponibles a nivel comercial en agua MQ bidestilada. El material de vidrio empleado se enjuagó de manera exhaustiva con agua bidestilada y luego se horneó du-

rante 2 horas a 175 °C con la finalidad de eliminar los residuos de materia orgánica y detergente que estuviesen adheridos a las paredes. Una vez preparadas las soluciones se hicieron pasar por un filtro Millex-HA de 0.22 µm (Millipore, Bedford, MA) y luego se esterilizaron y conservaron a 4 °C por un tiempo no mayor a 15 días.

3.3.2 Preparación de los electrodos de cloruro de plata (Ag^+/AgCl)

Para la fabricación de electrodos no polarizables de cloruro de plata se utilizó la técnica clásica que se describe a continuación. Se cortó un par de trozos de alambre de plata pura (Goodfellow, Cambridge) de aproximadamente 4 cm de largo y 1 mm de diámetro. Uno de los extremos se soldó a un conector metálico (Dagan Corp., Minneapolis, MN). El otro extremo se engrosó al fuego hasta obtener una pequeña esfera de 3 a 4 veces el diámetro del alambre. Después de calentar al fuego, los alambres se sumergieron en una solución comercial de hipoclorito de sodio durante al menos 60 minutos con lo que se logró una capa homogénea de cloruro de plata sobre su superficie que fue evidente por la aparición de un color sepia. Una vez concluido este proceso los electrodos se enjuagaron con agua bidestilada y se secaron con papel absorbente.

3.3.3 Cámaras para la formación de bicapas planas

Para la formación de bicapas lipídicas planas (BLP) se utilizó una cámara de teflón diseñada y construida como se describe en Liévano (1989). La cámara consiste de dos compartimentos de 500 µl interconectados por un orificio central de 3 mm en el que se monta un pequeño trozo de polipropileno que en su parte central presenta un orificio de entre 150 y 250 µm. Este pequeño orificio se formó en el plástico con ayuda de un punzón de punta muy afilada (diseño del Dr. Arturo Liévano) que se calentó al fuego. De entre cien ensayos se eligieron los plásticos que presentaron un orificio lo más pequeño y redondo posible. La principal ventaja de este método es que aunque es muy artesanal se pueden lograr orificios casi circulares y con bordes regulares que permiten la formación de bicapas muy estables.

Para el lavado de la cámara se realizó el procedimiento siguiente. Las partes de teflón se hirvieron durante 20 minutos de manera secuencial con NaOH 1 M, HCl 1M y agua bidestilada. Entre las paredes de la cámara y el trozo de polipropileno se depositó una película delgada de vaselina refinada comercial con ayuda de un isopo limpio con el objetivo de sellar esta unión y evitar posibles fugas de líquido. Para eliminar el ex-

ceso de vaselina, la cámara se enjuagó de manera secuencial con los siguientes solventes: hexano, cloroformo, cloroformo-metanol (2:1), metanol, etanol y agua. Con la finalidad de preparar la cámara para la formación de la bicapa se hizo un lavado similar pero en secuencia inversa (agua, ..., hexano).

3.3.4 Formación de las bicapas

Las bicapas se formaron de acuerdo a la técnica desarrollada por Müller y colaboradores (1962) que básicamente consiste en depositar una pequeña cantidad de lípido disperso en un solvente apolar no volátil en un orificio hecho en un septo hidrofóbico e inmerso en un medio acuoso. Una vez que el fosfolípido se deposita en el orificio, el exceso de solvente migra hacia la periferia o *anulus* hasta que las monocapas externas que están en contacto con el medio acuoso coalescen formando una pequeña zona de bicapa que actúa como "foco" de formación de una área mayor (Darszon y Liévano, 1996).

Para los experimentos llevados a cabo en este trabajo se eligió usar diftanoilfosfatidilcolina (DiFFC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) dispersa en *n*-decano a una concentración final de 20 mg/ml. La DiFFC es un lípido sintético que permite la formación de bicapas muy estables por lo que se ha usado extensivamente para la técnica de bicapas planas. Se ha reportado su uso en el estudio de los canales iónicos formados por algunas toxinas Cry en ausencia (Walters *et al.*, 1993; Von Tersch *et al.*, 1994 y English *et al.*, 1994) y presencia (Lorence *et al.*, 1995) de su receptor. El lípido liofilizado se dispersó en el solvente bajo una atmósfera de nitrógeno; esta suspensión se dividió después en alícuotas de 25 μ l que fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso. Para cada ensayo se utilizó una alícuota que se mantuvo en un baño de hielo durante el transcurso del mismo.

Una vez que la cámara se lavó con los solventes antes descritos y se dejó secar a temperatura ambiente se procedió a hacer el "pretratamiento" para la formación de la bicapa. Este procedimiento consistió en depositar una pequeña cantidad de DiFFC con ayuda de un pincel muy fino por ambos lados del orificio y hacer pasar una corriente de nitrógeno a través de éste durante 4 a 8 minutos con el fin favorecer la evaporación del solvente. Después se añadió la solución de trabajo (100 mM KCl, 10 mM CHES-HCl pH 9.50) en cada uno de los compartimentos de la cámara (350 μ l) evitando la formación de burbujas. Terminado este proceso los electrodos de plata se conectaron,

uno al generador de pulsos que aplica voltaje a través de la membrana (*ladocis*) y otro al convertidor de corriente a voltaje que amplifica la corriente que pasa a través de la bicapa y es el lado conectado a la tierra virtual (*ladotrans*). Este dispositivo permitió mantener el sistema en condiciones de fijación de voltaje (Figura 3.1).

Para formar la bicapa ("pintar" la bicapa) se tomó una pequeña cantidad de la dispersión de DiFFC con una pipeta de plástico y se depositó cuidadosamente en el orificio. El proceso de adelgazamiento de la capa de lípidos hasta la formación de un área de bicapa que en general duró entre 1 y 10 minutos se siguió eléctricamente como el incremento de la capacitancia (Darszon y Liévano, 1996). Este parámetro medido en picofaradios (pF) se calculó directamente en el transductor de voltaje (Integrating Patch Clamp modelo 3900A, Dagan Corp., Minneapolis, MN). En algunos casos el proceso de adelgazamiento se favoreció al aplicar un pulso de ± 100 mV. En este trabajo sólo se utilizaron bicapas con una capacitancia de entre 150 y 250 pF.

Para verificar la estabilidad de la bicapa formada, ésta se dejó 10 minutos sin ninguna perturbación; pasado este tiempo se aplicó un par de pulsos de 30 segundos de duración, el primero de +100 mV y el segundo de -100 mV, con la intención de verificar que no se presentara actividad de canal único.

3.3.5 Reensamble funcional de las proteínas de las VMMA de *Trichoplusia ni* en bicapas y el efecto de la toxina Cry1Ac

Para incorporar de manera funcional las proteínas de la membrana de la microvellosidad apical del intestino medio de *T. ni*, incluido el receptor para la toxina Cry 1Ac, se utilizó el método de fusión (Miller y Racker, 1976). Una de las condiciones que favorece este evento es la presencia de un gradiente osmótico que hincha las vesículas y produce una perturbación en la bicapa de las mismas que favorece su integración a la bicapa plana (Darszon y Liévano, 1996).

El protocolo utilizado para fusionar las VMMA de *T. ni* a la bicapa de DiFFC fue como se describe a continuación. El potencial se fijó a +50 mV; después se estableció un gradiente de KCl de 3 a 1 en el compartimento *cis versus trans*. Posteriormente se agregó una pequeña alícuota de las vesículas cargadas con 1 M de sacarosa (8-12 ng de proteína) en el lado *cis* que se mantuvo en agitación constante con ayuda de una barra magnética. La aparición de una espiga en el osciloscopio (Kikusui, modelo

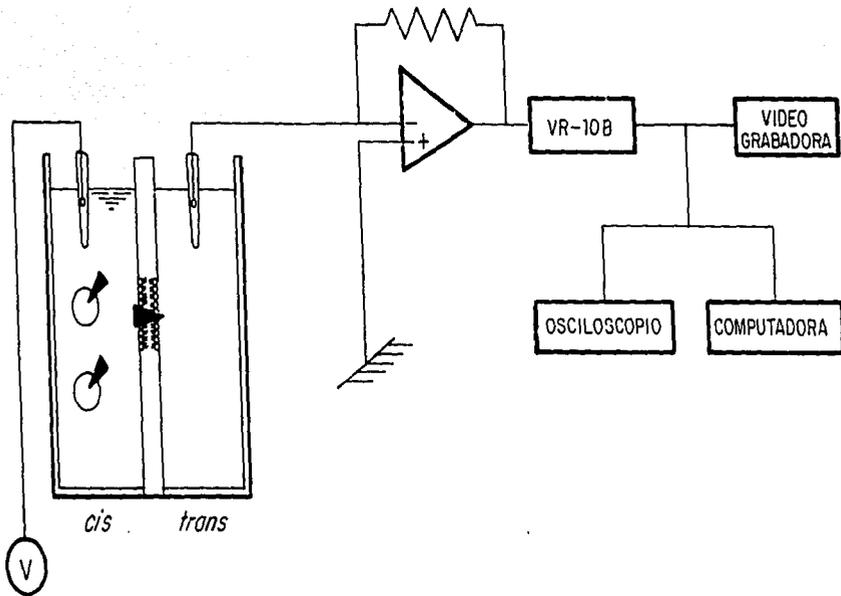


Figura 3.1.- Sistema de registro de corrientes a través de proteínas de membrana incorporadas en bicapas planas. El sistema consta de una cámara plástica de dos compartimentos conectados por un pequeño orificio. La cámara se conecta mediante electrodos no polarizables a un generador de voltaje (V), en el lado *cis*, que es en el que se añaden las vesículas membranales en experimentos de fusión, mientras que el otro compartimento (*trans*) se conecta al transductor corriente-voltaje que lo mantiene virtualmente a tierra (0 mV). Este sistema permitió estudiar los canales iónicos intrínsecos de las vesículas de *Trichoplusia ni* y los formados por la toxina Cry1Ac en condiciones de fijación de voltaje. La corriente resultante del paso de iones a través de dichos canales se observó directamente en un osciloscopio. Simultáneamente la señal se transformó con un registrador digital VR-10B y se almacenó en una videocinta. Fuera de línea los archivos se analizaron en una computadora personal.

COR5521U, Tokyo) que estaba conectado a la salida del transductor, seguida de la aparición de típicos saltos de corriente asociados con la actividad de los canales iónicos endógenos de las VMNA, nos indicó que el proceso de fusión se había concretado (Figura 3.2).

Para evitar que el resto de las vesículas continuara fusionándose a la bicapa, fue necesario intercambiar la solución de trabajo del compartimento *cis* (perfusión). Este proceso se llevó a cabo con la ayuda de una bomba peristáltica (Masterflex 60648, Cole-Parmer Instruments, Chicago, IL) que succionaba la solución al mismo tiempo que depositaba solución nueva a velocidad constante. Una vez que se lavó con 10 veces el volumen de trabajo, se restableció el gradiente de KCl. Concluido ésto, se procedió a registrar la actividad de los canales intrínsecos a diferentes voltajes. El protocolo de pulsos utilizado fue como sigue (mV): +20, -20, +40, -40, +60, -60, +80 y -80, donde cada uno duró 30 segundos y el paso entre uno y otro se hizo siempre pasado por potencial cero (0 mV). Después se adicionó la toxina Cry1Ac (0.2-0.5 nM) y se esperó a que ocurriera su incorporación a la bicapa, ésto se interpretó como la aparición de niveles de corriente distintos a los observados inicialmente, tras lo que se procedió a registrar la actividad siguiendo el protocolo de pulsos antes citado.

3.3.6 Adquisición y análisis de los datos obtenidos

Las corrientes se registraron con un amplificador de patch clamp Dagan 3900 A (Dagan Corp., Minneapolis, MN) como se reporta en Liévano *et al.* (1990). Después se filtraron a 1 kHz y desplegaron en un osciloscopio (Kikusui COR5521U, Tokyo); de forma simultánea se grabaron en una videocinta, utilizando un registrador digital VR-10B (Instrutech, Great Neck, NY) y una videograbadora VHS (ver Fig. 3.1). Posteriormente las corrientes grabadas fueron observadas, digitalizadas a 5 kHz y analizadas en una computadora personal usando una interfase Digidata 1200 y los programas Axotape, pClamp (Axon Instruments, Foster City, CA) y Axum 1.02 (Trimetix Inc., CA).

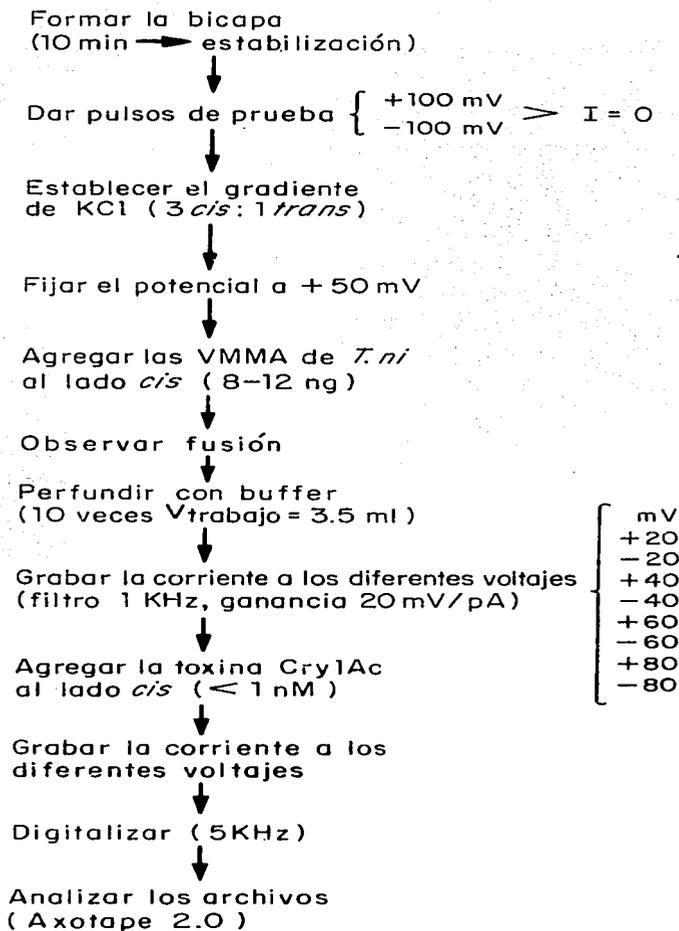
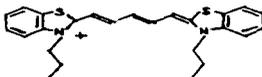


Fig 3.2 Protocolo utilizado para fusionar las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) de *Trichoplusia ni* a la bicapa de difitanolifosfatidilcolina (DIFFC)

Capítulo 4 Resultados y Discusión

4.1 El espectro de emisión de la sonda fluorescente dis-C₃-5 en función del pH del medio

El colorante elegido para monitorear el potencial de membrana de la microvellido apical es una molécula que a pH neutro posee una carga positiva deslocalizada (Bashford y Smith, 1979), tal como se ilustra a continuación. La presencia de un grupo ionizable débil en cada uno de los dos heterociclos de que consta, implica que el pH del medio puede modificar su distribución dentro y fuera de la membrana en función del potencial.



El pH fisiológico del intestino medio de los insectos, sitio donde actúan las proteínas Cry, se caracteriza por ser muy alcalino (8-12) (Knowles, 1994). Se ha determinado que el pH del intestino medio de los lepidópteros usados en este estudio: *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens* es de 8.0 (Broadway, 1989) y 9.5 (Johnson y Felton, 1996), respectivamente.

Con la finalidad de encontrar una condición de trabajo más parecida a las condiciones fisiológicas, se decidió estudiar el espectro de emisión del colorante en función del pH del medio de incubación. En la Figura 4.1 se puede ver que la eficiencia de emisión del colorante dis-C₃-5 se modifica a pH mayores o iguales a 8.5. Por esta razón en los experimentos de fluorescencia subsiguientes se utilizó una solución de trabajo con pH 8.0.

Se prefirió usar HEPES-HCl en la composición de los medios intra y extravésicular ya que esta molécula se considera prácticamente impermeable para las membranas biológicas, por lo que su contribución a la partición de la sonda dentro y fuera de la membrana puede considerarse despreciable.

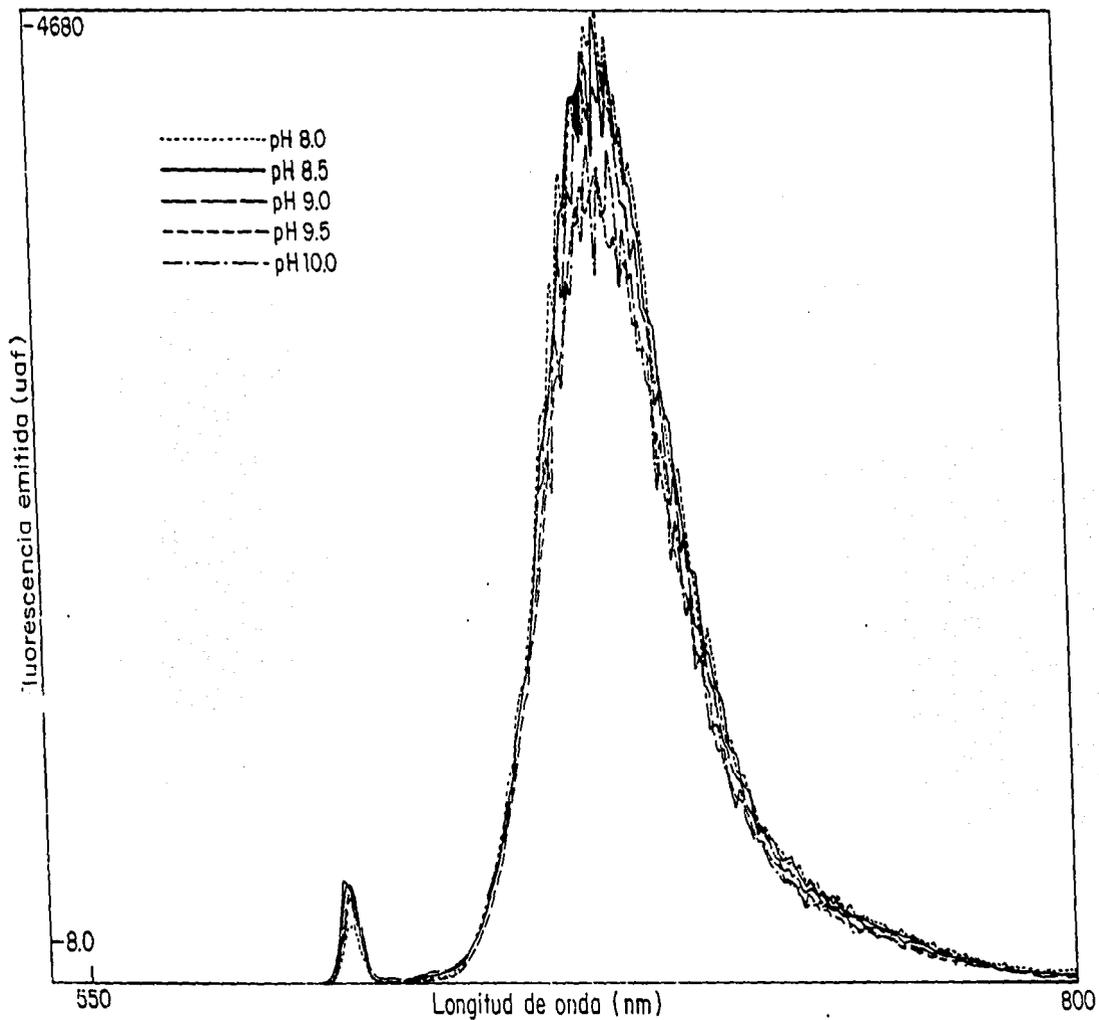


Fig 4.1 Espectro de emisión del colorante 3,3'-dipropilidodicarbocianina (dis-C₃-(5), 1 μ M Molecula Probes, Eugene OR) a diferentes pH. uaf = unidades arbitrarias de fluorescencia

4.2 El potencial inicial de la membrana de las vesículas de *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*

El potencial de reposo de una célula es el parámetro que nos permite conocer cuál es la permeabilidad principal de una membrana (Hille, 1992). En la **Tabla 4.1** se muestran los resultados de la estimación del potencial inicial (E_i) de la membrana de las vesículas provenientes de *T. ni* y *H. virescens*. En ambos casos se encontró que la permeabilidad principal de esta membrana es al K^+ , tal como lo señala la cercanía del potencial inicial al potencial de equilibrio de este ión (E_{K^+}) calculado en cada caso. Este parece ser un comportamiento general de este tipo de preparaciones, tal como lo reflejan los datos obtenidos anteriormente con otro lepidóptero, *Spodoptera frugiperda* (Lorence *et al.*, 1995).

Tabla 4.1 - El potencial inicial de la membrana de la microvellosidad apical de *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens* y *Spodoptera frugiperda*

		E_{K^+}	E_i 140 mM MeGlu	E_i 140 mM NaCl
<i>T. ni</i>	lote 1	-118 mV	-111 ± 2 mV (n=24)	-110 ± 2 mV (n=5)
	lote 2	-94 mV	-98 ± 3 mV (n=16)	-98 ± 5 mV (n=6)
<i>H. virescens</i>		-109 mV	-103 ± 3 mV (n=10)	-100 ± 1 mV (n=4)
<i>S. frugiperda</i>		-108 mV	-99 ± 5 mV (n=38)	No determinado

En concordancia con lo anterior se observó que las membranas estudiadas son permeables al K^+ en ausencia de valinomicina (trazos control mostrados en las **Figuras 4.2 y 4.3**). En otros trabajos en los que se ha analizado la permeabilidad endógena de vesículas obtenidas de otros lepidópteros (Uemura *et al.*, 1992; Carrol y Ellar, 1993 y Carrol y Ellar, 1997) o bien de vesículas híbridas compuestas de microvellosidad apical y lípidos sintéticos (English *et al.*, 1991) también se ha observado un comportamiento similar.

Algunos autores han propuesto que en condiciones fisiológicas la microvellosidad apical no es permeable al K^+ , con base en los resultados de experimentos en los que se ha medido la corriente de corto circuito y se ha observado que el $^{86}Rb^+$ es incapaz de pasar del lumen al citoplasma en intestinos medios aislados (Harvey, 1992; Wolfersberger, 1992). La discrepancia de estos resultados con los citados en el párrafo anterior puede deberse a diferencias del nivel de resolución de las técnicas empleadas.

das, o bien a la modificación de la regulación de los canales endógenos de esa membrana en los sistemas *in vitro*.

4.3 El efecto de la toxina Cry1Ac en las VMMA de *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*

La adición de 50 nM de la toxina Cry1Ac a las VMMA de *T. ni* y *H. virescens* suspendidas en el medio con 140 mM de cloruro de *N*-metil-D-glucamina (MeGluCl) produjo una hiperpolarización muy rápida (**panel A, Figura 4.2**). Después de que las vesículas estuvieron en contacto con Cry1Ac, la permeabilidad al K^+ de la membrana de éstas aumentó si se compara con la del trazo control en el que se agregó un volumen similar de la solución en la que se almacenó la toxina. La hiperpolarización (*T. ni*, -10.7 ± 3 mV, $n=5$; *H. virescens* -16.6 ± 4 mV, $n=5$) y la mayor sensibilidad de las vesículas al K^+ externo son congruentes con la idea de que este aumento de la permeabilidad al K^+ de la membrana se debe a la formación de canales iónicos por parte de dicha proteína.

Con la finalidad de explorar la selectividad de los canales formados por la toxina Cry1Ac silvestre en las VMMA de *T. ni* y *H. virescens*, el MeGluCl se sustituyó con NaCl en el medio externo. En esta condición que es más fisiológica, la proteína produjo una pequeña hiperpolarización (**Figura 4.2, panel B**). Esta respuesta se debe a la combinación de dos efectos: la salida del K^+ de las vesículas y la entrada del Na^+ . Este resultado sugiere que la vía de permeabilidad inducida por Cry1Ac no es muy selectiva entre los cationes monovalentes. Sin embargo, al parecer los canales formados por Cry1Ac en estos insectos discriminan mejor entre el K^+ y el Na^+ que los formados por Cry1D en las VMMA de *S. frugiperda*, ya que en este caso el efecto observado en el medio de incubación con NaCl fue una depolarización (Figura 1B, Lorence *et al.*, 1995).

En apariencia esta poca selectividad entre los diferentes cationes es una característica general de los poros formados por las toxinas Cry, ya que tampoco las toxinas Cry1Aa en *Bombyx mori* (Uemura *et al.*, 1992) y Cry1D en *S. frugiperda* (Lorence *et al.*, 1995) forman poros selectivos para alguno de estos iones.

Una vez que se comprobó la capacidad de formación de poro de la toxina Cry1Ac silvestre en el sistema *in vitro* usado y se confirmó su actividad biocida contra larvas neonatas de estas especies de insectos (datos no mostrados), se procedió a analizar la

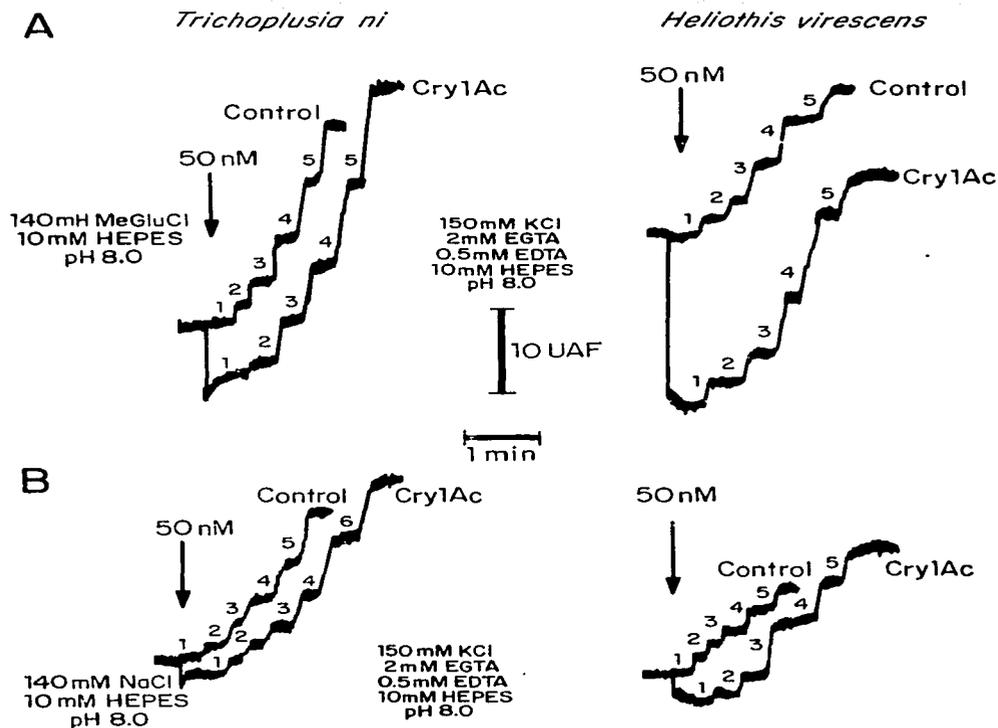


Figura 4.2.- Efecto de la toxina Cry1Ac en la permeabilidad de la membrana de las vesículas de la microvellosidad apical (VMMA) de las células del intestino medio de *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*. El potencial de la membrana de las vesículas (20 μ g) cargadas con (mM): 150 KCl, 2 EGTA, 0.5 EDTA, 10 HEPES-HCl pH 8.0 se registró con el colorante fluorescente dis-C₃-(5) como se cita en la sección de materiales y métodos y la respuesta obtenida se corrigió como se cita en Lorence *et al.*, (1995, anexo 1). Una deflexión hacia abajo indica una hiperpolarización. La flecha en la parte superior de los trazos corresponde al tiempo en que se agregó la toxina o el buffer en el que ésta se solubilizó (10 mM CHES pH 9.50). UAF= unidades arbitrarias de fluorescencia. (A) El medio en el que se suspendieron las vesículas fue (mM): 140 MeGluCl, 10 HEPES-HCl pH 8.0. En (B) el MeGluCl se sustituyó con NaCl. Las concentraciones finales de K⁺ fueron (mM): 1=7, 2=19, 3=42, 4=85 y 5=170 para *T. ni* y 1=11, 2=28, 3=62, 4=131 y 5=268 para *H. virescens*. En el trazo control se agregó el buffer o bien 250 nM de la toxina Cry1Ac inactivada por ebullición.

actividad de algunas toxinas mutantes en la α -hélice central en este mismo sistema. Cabe señalar que para los experimentos sucesivos se decidió utilizar solamente la especie *T. ni* debido a dificultades en la estabilidad de la cría de *H. virescens*.

4.4 El efecto de las toxinas mutantes en las VMMA de *Trichoplusia ni*

Recibimos del laboratorio del Dr. Aronson tres diferentes proteínas denominadas "A", "B" y "C" en forma de polvos liofilizados. Las muestras se solubilizaron en una solución 10 mM CHES pH 9.5 y se almacenaron a 4 °C. En estas condiciones algunas de las mutantes, particularmente la "B" y la "C" mostraron baja solubilidad y para evitar su agregación y precipitación fue necesario adicionar por lo menos 100 mM de KCl o NaCl a la solución en la que se solubilizaron.

En la **Figura 4.3** se ilustra la respuesta obtenida al estudiar el efecto de la toxina Cry1Ac silvestre (**panel A**), y las proteínas "A", "B" y "C" (**paneles B, C y D**) que nos envió el grupo del Dr. Aronson en las VMMA de *T. ni* (lote 2) suspendidas en el medio de incubación con MeGluCl. De los trazos es claro que la única toxina que mostró actividad de formación de poro a una dosis similar a la toxina silvestre fue la proteína "A", tal como lo muestran las pendientes calculadas a partir de las curvas en las que se relaciona la diferencia en fluorescencia causada por cada una de las adiciones de KCl (curva DF vs E_{K^+}) correspondientes ($n=3$): $m_{\text{silvestre}}=0.71$, $m_{\text{toxina "A"}}=0.71$, $m_{\text{toxina "B"}}=0.30$, $m_{\text{toxina "C"}}=0.34$ vs $m_{\text{control}}=0.33$). La depolarización observada al agregar las toxinas silvestre y "A" se debe a la entrada de K^+ proveniente de la solución en que fueron solubilizadas.

Para comprobar si las proteínas "B" y "C" tenían sólo disminuida la capacidad de alterar la membrana de las VMMA, se decidió estudiar su efecto a una dosis mayor. Sin embargo, sólo fue posible hacerlo para la proteína "C" debido a la muy baja solubilidad de la toxina "B". En este sentido se encontró que aún a una dosis de 250 nM la proteína "C" no produjo efecto alguno, ya que los trazos obtenidos fueron similares a los del control ($m_{\text{toxina "C"}} = 0.34$, $n=3$ vs $m_{\text{control}} = 0.33$, $n=3$).

Estos resultados fueron enviados al laboratorio del Dr. Aronson y su respuesta es congruente con el comportamiento observado ya que la proteína "A" corresponde a una toxina Cry1Ac silvestre purificada por ellos, mientras que las proteínas "B" y "C" son una mutante con actividad disminuida (A164P, CI.50 para *T. ni* 5 veces mayor que

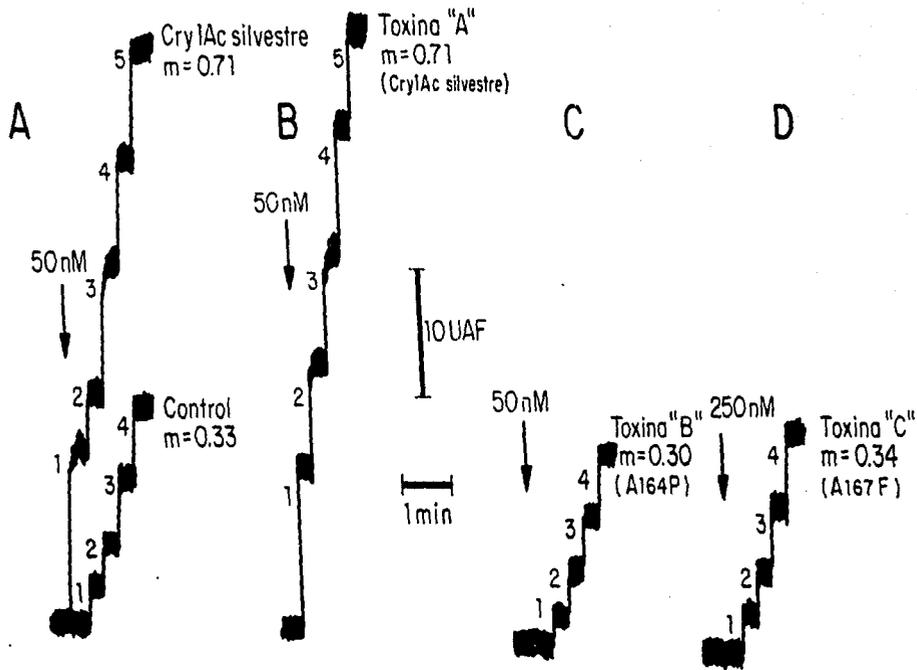


Figura 4.3.- Efecto de las toxinas CryIAc silvestre (A) y mutantes (B-D) en el potencial de la membrana de las VMMA de *Trichoplusia ni*. El potencial de las vesículas cargadas con (mM): 150 KCl, 2 EGTA, 0.5 EDTA, 10 HEPES-HCl pH 8.0 se registró como se cita en la sección de materiales y métodos. Las VMMA se suspendieron en 140 mM MeGlucI, 10 mM HEPES-HCl pH 8.0. Una deflexión hacia arriba indica una depolarización. La flecha en la parte superior de los trazos corresponde al tiempo en que se agregó la toxina o el buffer en el que ésta se solubilizó (100 mM KCl, 10 mM CHES pH 9.5). UAF = unidades arbitrarias de fluorescencia. (A) Respuesta de las VMMA a la toxina CryIAc silvestre (50 nM). Las concentraciones finales de K^+ fueron (mM): 1=9, 2=26, 3=60 y 4=127. (B) Respuesta a la toxina "A" (50 nM). Las concentraciones finales de K^+ fueron (mM): 1=6, 2=24, 3=59 y 4=127. (C) Respuesta de la toxina "B" (50 nM). Las concentraciones finales de K^+ fueron (mM): 1=8, 2=25, 3=60 y 4=127. (D) Respuesta a la toxina "C" (250 nM). Las concentraciones finales de K^+ fueron como en (C). m = pendiente calculada de la curva $\Delta F(\%)$ versus E_{K^+} del trazo correspondiente. En todos los casos la concentración final de K^+ citada incluye el K^+ agregado con la toxina.

la de la silvestre) y otra que perdió su toxicidad por completo (L167F), respectivamente. Los resultados obtenidos en estos experimentos con un diseño tipo "doble ciego" ponen de manifiesto la utilidad y confiabilidad del sistema de fluorescencia usado para estudiar la formación de poro de las toxinas Cry.

El dominio I de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac es prácticamente idéntico a excepción de una sustitución en la posición 248 (Grochulski *et al.*, 95). Dado que la estructura terciaria de la proteína Cry1Aa se conoce, es posible hacer un análisis de la relación estructura-función de las mutantes Cry1Ac A164P y L167F. Los residuos de las posiciones 164-168 están situados en la región media de la hélice α -5. El efecto de la introducción de una prolina en la posición 164 en sustitución de la alanina (A164P) causa la ruptura de la hélice. La cadena lateral de la leucina 167 (L167) está inmersa en un medio ambiente muy hidrofóbico: está situada en medio de los anillos aromáticos del triptofano 65 (W65) y la tirosina 107 (Y107), y flanqueada por la leucina 60 (L60), la metionina 137 (M137) y la leucina 141 (L141). La sustitución de la leucina 167 por un residuo muy grande como la fenilalanina (L167F) causa una perturbación importante en la estructura terciaria del dominio I (Grochulski *et al.*, 95).

La ausencia de la capacidad de formación de poro de las proteínas Cry1Ac A164P (toxina "B") y L167F (toxina "C") observada no implica que estos residuos de la región central de la hélice α -5 estén involucrados directamente en la formación del canal. Sin embargo estas mutantes pueden ser muy útiles para estudiar los pasos intermedios entre la unión al receptor y la formación del poro, es decir, la inserción y la agregación (oligomerización). Para hacer este tipo de estudios es necesario diseñar o adaptar técnicas que se han empleado para llevar a cabo análisis similares en otro tipo de proteínas que forman poros tales como las colicinas. Algunas metodologías que pudieran aportar información relevante acerca del mecanismo de inserción y de agregación de las proteínas Cry son el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptofano por acción de fosfolípidos bromados y la transferencia de energía de fluorescencia (Lakey *et al.*, 91).

Con la finalidad de evitar agregar KCl o NaCl en el medio de solubilización de las toxinas que hace más difícil la interpretación de los resultados obtenidos en el sistema de fluorescencia, se decidió tratar de reemplazar estas sales por alguna sal impermeable. Se encontró que el MeGluCl resultó efectivo para mantener solubles las toxinas y al ser impermeable no influyó en la partición de la sonda fluorescente. En los experi-

mentos posteriores el medio en que se solubilizaron las toxinas fue (mM): 100 MeGluCl, 10 CHES-HCl pH 9.5.

Una vez concluido este análisis, se procedió a estudiar el comportamiento de la toxina Cry1Ac silvestre en el sistema de bicapas lipídicas planas en presencia de su receptor nativo proveniente de *T. ni* para después compararlo con el de las mutantes A164P y I167F.

4.5 Los canales endógenos de las VMMA de *Trichoplusia ni* en bicapas planas

Las bicapas formadas con la dispersión de DiFFC fueron estables por más de una hora en las condiciones usadas (100 mM KCl, 10 mM CHES-HCl, pH 9.5 en ambos compartimentos y potencial fijo a +50 mV), tiempo suficiente para llevar a cabo el experimento. Siguiendo el protocolo citado en la sección de materiales y métodos fue posible obtener cotidianamente eventos de fusión de las VMMA de *T. ni* a las bicapas. De hecho la fusogenicidad de las vesículas fue tan alta que se convirtió en un factor limitante al que nos enfrentamos para poder estudiar a nivel unitario la actividad de los canales intrínsecos de las VMMA. En un estudio previo realizado en el laboratorio para observar fusión de las vesículas de *S. frugiperda* se usaron entre 0.2 y 3.7 µg de proteína (Lorence *et al.*, 1995), mientras que para el caso de *T. ni* fue necesario reducir esta concentración en tres órdenes de magnitud (8-12 ng). Dado que en ambos casos la composición de la bicapa fue la misma, y además se usaron condiciones similares para favorecer la fusión, es posible que la diferencia observada entre estas dos especies de lepidópteros se deba a una composición lipídica diferente de su microvellosidad apical.

El análisis de los canales endógenos se dificultó también debido a que su actividad sólo pudo observarse durante los 2 o 3 minutos siguientes a la fusión, después de lo que su actividad se perdió. Este comportamiento conocido como "rundown" se ha observado con frecuencia al incorporar vesículas de membrana de diferentes tejidos de otros organismos a bicapas planas (Hille, 1992) e incluso se observó también al estudiar los canales intrínsecos de las VMMA de *S. frugiperda* (Lorence *et al.*, 1995). Con base en la experiencia previa que se tiene en este sentido es posible sugerir que los canales endógenos de *T. ni* perdieron su actividad porque *in vivo* están regulados por algún metabolito que estuvo ausente en las condiciones experimentales usadas.

A continuación se presentan los resultados del análisis preliminar que pudo hacerse a partir de los registros correspondientes a la actividad de los canales endógenos de las VMMA de *T. ni*.

El **panel A** de la **Figura 4.4** ilustra las transiciones más frecuentes observadas a nivel de canal unitario que se detectaron en presencia de un gradiente de KCl de 3 a 1 en *cis* respecto a *trans* en ocho experimentos. A partir de la relación entre el potencial de membrana aplicado y la corriente obtenida (curva corriente-voltaje o I/V) se calcularon conductancias de 160 y 380 pS (**panel B**). El potencial de inversión (E_{rev}) obtenido fue de -9 y -20 mV, respectivamente. Utilizando el valor del E_{rev} y la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (Hille, 1992) se estimó la permeabilidad relativa K^+/Cl^- de estos canales encontrándose que prefieren el paso del K^+ al del Cl^- ($P_{K^+}/P_{Cl^-} \sim 4.3$ y 6.5, respectivamente).

No hay estudios profundos a nivel unitario de los canales endógenos de las células columnares y caliciformes del intestino medio de los insectos. Sólo hay dos reportes en la literatura en los que se hizo un análisis preliminar en este sentido. Un primer trabajo de "patch clamp" efectuado en la membrana basolateral de las células caliciformes del intestino medio de *Manduca sexta* mostró la existencia de al menos cuatro tipos de canales de acuerdo a su conductancia en condiciones simétricas de KCl: pequeños (20 pS), medianos (40 pS), grandes (120 pS) y maxi (220 pS) (Moffett y Lewis, 1990); los autores no mencionan si existe similitud entre estos canales y otros que son abundantes en el intestino de otros organismos. En un trabajo previo llevado a cabo en nuestro grupo se encontró que las transiciones más frecuentes después de fusionar VMMA de *S. frugiperda* a bicapas planas fueron de 31, 47 y 76 pS en presencia de un gradiente de KCl de 3.7 a 1. Estos canales presentaron un potencial de inversión de alrededor de -20 mV lo que indica su selectividad hacia los cationes ($P_{K^+}/P_{Cl^-} \sim 5.7$) (Lorence *et al.*, 1995). Es posible que existan diferentes tipos de canales en las distintas especies de lepidópteros e incluso es posible que esto varíe de acuerdo al estadio de desarrollo, sin embargo, este es un aspecto que se ha estudiado muy poco.

Es posible que los canales intrínsecos observados en el presente estudio con un gradiente de 3 a 1 (160 y 380 pS) sean similares a los canales grandes y maxi que se encontraron en *M. sexta* en condiciones simétricas (120 y 220 pS). En un estudio aún en proceso relacionado con la caracterización de los canales endógenos de las VMMA de *Lymantria dispar* se han encontrado canales de hasta 900 pS de conductancia (Pey-

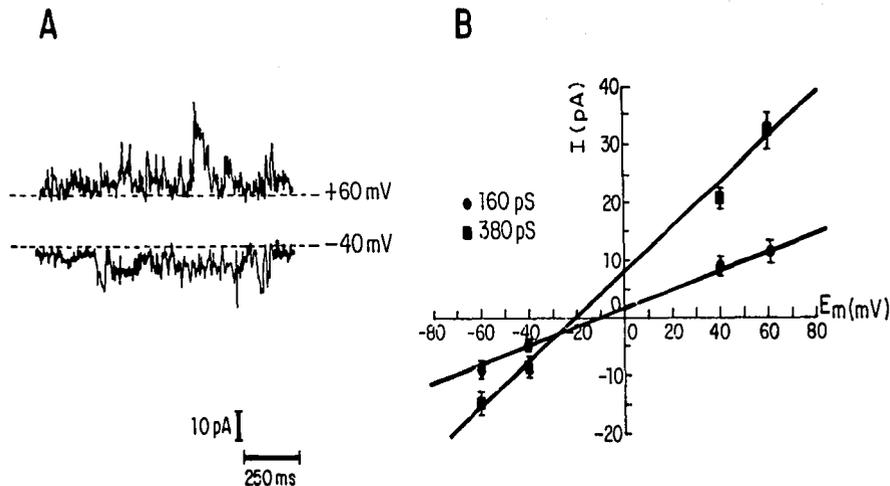


Figura 4.4.- Registros representativos a nivel de canal unitario (A) y curva corriente-voltaje (I/V) de las transiciones más frecuentes (B) de las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) de *Trichoplusia ni* fusionadas a bicapas planas compuestas de diftanoilfosfatidilcolina (DIFFC). Los registros se obtuvieron en presencia de 300 mM KCl, 10 mM CHES-HCl pH 9.5 en *cis* y 100 mM KCl, 10 mM CHES-HCl pH 9.5 en *trans*. A la derecha de cada trazo se indica el potencial de mantenimiento (mV). La línea punteada indica el nivel cero de corriente. Las corrientes se filtraron a 1 kHz y se digitalizaron a 3 kHz. Cada punto de la curva representa el promedio de por lo menos diez transiciones y en cada caso se indica la desviación estándar. El potencial de inversión (E_{rev}) fue de -9 y -20 mV para los canales de 160 y 380 pS, respectivamente.

ronnet, 1997). Estos resultados en conjunto ponen de manifiesto que es frecuente encontrar canales con conductancias muy grandes en este tipo de preparaciones.

Es difícil discernir si los canales observados en los trabajos en los que se han fusionado VMMA a bicapas lipídicas planas (BLP) provienen de la microvellosidad apical o de la membrana basolateral, sin embargo, cabe señalar que en todas las preparaciones que se han analizado hasta el momento en nuestro grupo, tanto en el sistema de fluorescencia como en el de bicapas, siempre se ha observado permeabilidad intrínseca en estas vesículas.

En la mayor parte de los estudios llevados a cabo hasta el momento las VMMA se han purificado mediante un método de centrifugación diferencial que utiliza Mg^{2+} y EGTA aprovechando la alta electronegatividad de la microvellosidad apical (Wolfesberger *et al.*, 1987). Sin embargo, los contaminantes más comunes en este tipo de preparaciones son la membrana mitocondrial y la membrana basolateral. Para poder seleccionar de forma más específica las vesículas que contienen microvellosidad apical se podría llevar a cabo una etapa adicional que aproveche la riqueza en glicoproteínas que contiene esta membrana. La selección consistiría en hacer pasar las VMMA por una columna de lectinas; de esta manera sólo se unirían a la columna las vesículas que contuvieran glicoproteínas expuestas hacia afuera, eliminándose el resto de ellas.

4.6 Los canales formados por la toxina Cry1Ac en bicapas que contenían el receptor de *Trichoplusia ni*

Como se citó en la sección anterior una limitante muy importante para el desarrollo de los experimentos en el sistema de bicapas fue la excesiva fusogenicidad de las VMMA de *T. ni*. Esta fue la razón principal por la que pudieron lograrse muy pocos análisis completos, es decir, experimentos en los que se logró estudiar tanto los canales endógenos de las vesículas, como los formados por la toxina Cry1Ac. A continuación se presentan los resultados preliminares del análisis de los registros correspondientes a la actividad observada después de agregar toxina Cry1Ac a bicapas que contenían el receptor de *T. ni* ($n = 5$).

En la **Figura 4.5A** se ilustra la respuesta obtenida al agregar la proteína Cry1Ac a bicapas de DiFFC que contenían vesículas de *T. ni*. Como puede verse en el trazo co-

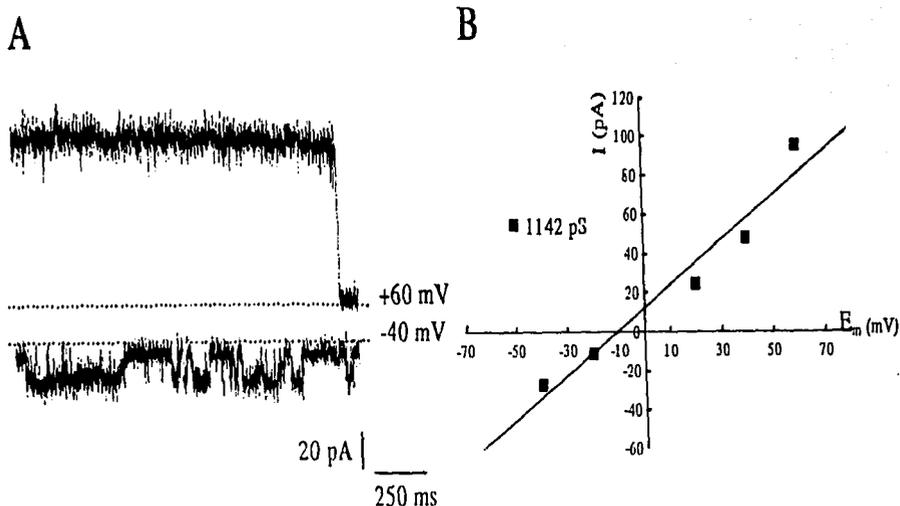


Figura 4.5.- Canales catiónicos formados por la toxina Cry1Ac en bicapas a las que previamente se fusionaron VMMA de *Trichoplusia ni*. Los registros se obtuvieron en 300 mM KCl, 10 mM CHES-HCl, pH 9.5 en *cis* y 100 mM KCl, 10 mM CHES-HCl en *trans*. (A) Transiciones representativas a +60 y -40 mV observadas después de agregar 0.2 nM de la toxina Cry1Ac a bicapas que contenían vesículas fusionadas. La línea punteada indica el nivel de corriente cero. Las corrientes se filtraron a 1 kHz y se digitalizaron a 5 kHz. El potencial de inversión (E_{rev}) es cercano a -11 mV, lo que indica la naturaleza catiónica de estos canales. (B) Curva corriente-voltaje (I/V) de las transiciones presentadas en (A). Cada punto de la curva representa el promedio de tres transiciones donde la desviación estándar fue menor al 5%.

respondiente al potencial positivo (+60 mV), el canal formado por la toxina Cry1Ac se mantuvo abierto la mayor parte del tiempo, presentando entre una y dos transiciones al estado cerrado en un minuto de registro. La curva I/V de la respuesta mostrada en (A) en presencia de un gradiente de KCl de 3 a 1 indica que los canales formados por Cry1Ac son catiónicos (Erev = -11 mV) (**panel B**). Esta respuesta se observó en 4 de 5 experimentos donde la conductancia aumentó entre 3 y 20 veces (1.1-3 nS), respecto de la obtenida antes de agregar Cry1Ac. Los canales se observaron de inmediato (0-5 minutos, n=4) aún usando concentraciones de toxina muy bajas (0.2-0.5 nM). Cabe señalar que en tres experimentos en los que se omitió la fusión de las VMMA no se observó ninguna actividad de la toxina a las dosis usadas en el presente estudio. Para obtener formación de canales por parte de la toxina Cry1C en bicapas a las que previamente se fusionaron VMMA de *S. frugiperda*, fue necesario emplear una concentración de toxina mucho mayor (5-10 nM) (Lorence *et al.*, 1995). Al parecer este comportamiento está correlacionado con la concentración letal media (CL₅₀) de las toxinas hacia sus respectivos blancos (4-15 ng/cm² de Cry1Ac vs 35-70 ng/cm² de Cry1C).

Dos diferentes grupos han descrito que los canales formados por Cry1Ac a una concentración de ~30 µg/ml en ausencia de su receptor son catiónicos con un estado principal de conductancia cercano a 500 pS (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1994). En la **Figura 4.5B** se muestra que la conductancia de los canales de Cry1Ac a una dosis de 12-32 ng/ml en presencia de su receptor es de 1142 pS; en otros experimentos se llegaron a resolver transiciones con conductancia de hasta 3 nS. Estos resultados indican que el receptor reduce en tres órdenes de magnitud la concentración necesaria de toxina para observar canales iónicos en bicapas planas. Es posible que los canales formados por Cry1Ac en presencia de su receptor funcional sean más grandes que los inducidos por esta misma proteína en bicapas sintéticas, sin embargo para aclarar este punto es necesario hacer estudios más profundos a nivel de canal unitario en ambas condiciones.

Otra característica muy diferente de los canales observados en presencia del receptor (este trabajo) y los trazos publicados de los canales formados por Cry1Ac en ausencia del receptor (Slatin *et al.*, 90) es el comportamiento cinético del canal, sobre todo a potenciales positivos. En la **Figura 4.5A** se ilustra que a un potencial fijo de + 60 mV, el canal formado por Cry1Ac en presencia de su receptor se cerró con muy poca frecuencia, mientras que en los trazos publicados a + 40 mV se observan muchas más transiciones entre los estados cerrado y abierto del canal. Estas observaciones sugeri-

rían que en presencia del receptor la probabilidad de apertura del canal es mayor. Otra posible explicación a las diferencias observadas es que en ausencia del receptor se pudo resolver la actividad de estados de agregación más pequeños y que en presencia del receptor observamos agregados u oligómeros más grandes. Otra característica diferente de los poros formados por Cry1Ac en ausencia y presencia de su receptor es su selectividad al K^+ comparada con la del Cl^- : ($P_{K^+}/Cl^- \sim 25$) (Slatin *et al.*, 1990) vs el resultado obtenido en este trabajo ($P_{K^+}/Cl^- \sim 5$).

En un análisis ya publicado del efecto de Cry1Ac en bicapas que contenían VMMA de *M. sexta*, aunque no se muestra ninguna transición a nivel de canal único, si se ilustra una respuesta macroscópica para la que se calculó una conductancia de entre 13 y 50 nS (Martin y Wolfersberger, 1995): Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo. Dado que en ambos estudios se utilizó como modelo la misma toxina y que su potencia es similar para las especies analizadas, las diferencias entre el trabajo de estos autores y el presentado aquí probablemente se deban a la concentración de vesículas y toxina usadas: 100 ng/ml VMMA *M. sexta* y 10 μ g/ml de Cry1Ac (Martin y Wolfersberger, 1995) comparado con 23-34 ng/ml VMMA *T. ni* y 12-32 ng/ml de Cry1Ac. Estas observaciones en conjunto indican que para estudiar a nivel unitario los canales formados por Cry1Ac en presencia de su receptor en el sistema de bicapas es necesario reducir aún más las concentraciones de toxina y de proteína de vesículas. Una metodología alternativa que podría utilizarse con este fin es el "patch clamp" aprovechando que está disponible una línea celular de *T. ni* proveniente de intestino medio (línea BTI-Tn M, Wickham *et al.*, 1992).

Se ha demostrado que en solución las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac pueden existir como monómeros y oligómeros (Feng y Becktel, 1994). Nuestros datos son congruentes con la hipótesis que plantea que son estructuras oligoméricas (agregados) las responsables de la formación de los canales iónicos de conductancia tan grande como los aquí encontrados.

En fecha reciente se reportó que los canales formados por Cry1Ac en BLP que contenían el receptor (complejo de aminopeptidasa N y fosfatasa) proveniente de *M. sexta* no muestran una relación I/V lineal, es decir presentan rectificación (Schwartz *et al.*, 1996; Adang *et al.*, 1996). Esta afirmación es arriesgada si se considera que no se ha hecho un análisis fino de los diferentes estados conductores que despliegan las proteínas Cry. Los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 4.5) muestran una

relación I/V lineal para los canales de Cry1Ac en presencia de su receptor de *T. ni*. La diferencia entre los resultados obtenidos por dichos autores y los aquí mostrados podría deberse a que el "receptor funcional" esté formado no sólo por la mezcla de aminopeptidasa y fosfatasa, sino que también participen otros componentes de la membrana. Se obtuvo evidencia que apoya esta idea al estudiar la unión de Cry1Ac en vesículas en las que se reconstituyó la mezcla de aminopeptidasa y fosfatasa y se comparó con la unión en VMMA de *M. sexta*, encontrándose una Kd dos órdenes de magnitud más grande (100-200 nM) en el modelo reconstituido (Sangadala *et al.*, 1994).

La gran diferencia observada al estudiar la capacidad de formación de poro de la toxina Cry1Ac en BLP en presencia (este trabajo) y ausencia de su receptor (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1994), y el desconocimiento de los parámetros que controlan la eficiencia de la capacidad de formación de poro de estas proteínas, a la luz del nuevo conocimiento acerca del posible receptor de dicha toxina en varias especies de insectos, la aminopeptidasa N (APN), nos motivó a estudiar el efecto de esta enzima en la actividad de Cry1Ac, con la finalidad de poder obtener registros más finos en el sistema de bicapas. Con este mismo propósito en mente se decidió también tratar de encontrar algún agente que nos permitiera bloquear la actividad de los canales endógenos de las vesículas de *T. ni*. Para lograr ésto se llevaron a cabo experimentos en el sistema de fluorescencia y los resultados se muestran y discuten en la siguiente sección.

4.7 La participación de la aminopeptidasa N de las VMMA de *Trichoplusia ni* en la actividad de formación de poro de la toxina Cry1Ac

Esta información se presenta y discute en el artículo que se anexa a continuación, mismo que fue aceptado para publicación y apareció en el número 2 del volumen 414 de la revista FEBS Letters de este año.

Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin on *Trichoplusia ni* membranes

Argelia Lorence, Alberto Darszon, Alejandra Bravo*

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

Received 9 July 1997

Abstract The insecticidal *Bacillus thuringiensis* CryIAc δ -endotoxin specifically binds to a 120 kDa aminopeptidase N (APN) in the midgut of susceptible insects such as *Manduca sexta*, *Heliothis virescens*, *Lymantria dispar* and *Plutella xylostella*. The 120 kDa APN has a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor susceptible to the action of GPI-specific phospholipase C (PIPLC). Here we show that CryIAc pore-forming activity depends on the amount of APN present on brush border membrane vesicles (BBMV) from *Trichoplusia ni* larvae. Inhibition of APN activity with bestatin did not affect CryIAc pore formation, suggesting that CryIAc action depends on the presence of APN, but not on its enzymatic activity. *N*-Acetyl-D-galactosamine blocks the action of the toxin, indicating that this sugar is also directly involved in the CryIAc toxin-receptor interaction. Membrane potential measurements using PIPLC treated and non-treated BBMV suggest that both APN could participate as CryIAc receptor. The kinetic characterization of PIPLC sensitive and resistant APN indicates that they could be different isoforms. Finally, we show that in the presence of 200 mM Cs⁺ intrinsic BBMV *T. ni* channel permeability is not observed, while the toxin induced permeability is not affected, allowing an accurate analysis of the effect of the CryIAc toxin on *T. ni* midgut membranes.

© 1997 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: δ -Endotoxin; Aminopeptidase N; Toxin receptor; Mode of action; Ionic channel; *Bacillus thuringiensis*

1. Introduction

The crystal proteins (Cry) from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) are toxic to different insect larvae. After solubilization and proteolytic activation, Cry toxins bind to specific high affinity toxin binding proteins on the surface of midgut epithelial cells [1]. It is thought that after binding, Cry toxins undergo a conformational change and insert into the membrane. Oligo-

merization of the toxin follows, and this oligomer forms ionic channels [2] which lyse the cell and eventually lead to the death of the insect [3,4].

CryIAa, CryIAb, CryIAc, and CryIc binding proteins have been identified and purified from *Manduca sexta* [5-9], *Heliothis virescens* [10], *Lymantria dispar* [11], *Plutella xylostella* [12], and *Bombyx mori* [13]. The CryIAb binding protein is a cadherin-like glycoprotein [7], and CryIAa, CryIAc and CryIc binding proteins are aminopeptidase N (APN) (EC 3.4.11.2) family members [5,6,8-13]. The 120 kDa APN has a C-terminal glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor [14], susceptible to endogenous GPI-specific phospholipase C (PIPLC) digestion [15]. When a mixture of 120 kDa APN and 65 kDa phosphatase was incorporated into phospholipid vesicles, the toxin concentration required to induce ⁸⁶Rb⁺-K⁺ release from the vesicles was lowered 1000-fold, suggesting their participation as functional CryIAc receptors [5]. Recently, it was shown that a fraction of APN resistant to PIPLC, isolated from *M. sexta* as a complex with attached lipids, reconstituted in phosphatidylcholine:phosphatidylserine (PC:PS) liposomes and fused to phosphatidylethanolamine:phosphatidylcholine:cholesterol (PE:PC:C) planar lipid bilayers could also lower the CryIAc and CryIc toxin concentrations required to observe ionic channels [16].

In this study we analyzed the pore-forming activity of the most potent *Bt* toxin against *Trichoplusia ni* larvae, the CryIAc protein. The results indicate that this activity is directly related to the amount of APN present in the *T. ni* brush border membrane vesicles (BBMV), but not to the APN enzymatic activity. We also analyze the different types of APN activities present in the BBMV and their relation with the toxin action.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All materials were from Sigma (St. Louis, MO), unless otherwise stated.

2.2. Preparation of the brush border membrane vesicles

BBMV from fifth instar *T. ni* larvae were prepared and analyzed as previously reported [2] except that neomycin sulfate (2.4 μ M/ml) was included in the buffer (300 mM mannitol, 20 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 150 μ g ml⁻¹ pepstatin A, 100 μ g ml⁻¹ leupeptin, 1 μ g ml⁻¹ soybean trypsin inhibitor, 10 mM HEPES-HCl pH 8.0). BBMV were dialyzed overnight against 500 volumes of 150 mM KCl, 2 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 10 mM HEPES-HCl pH 8.0 and stored at -70°C until used.

2.3. Preparation of CryIAc and CryIc toxins

Bt var. *kurstaki* strain HD-73 encoding CryIAc toxin was grown for 3 days at 29°C in nutrient broth sporulation medium [17]. The spores and crystals were harvested and washed with 0.01% Triton X-100, 30 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5 buffer. Crystals were

© 1997 FESB.

*Corresponding author. Fax: (52) (73) 17 23 88.
E-mail: bravo@ibt.unam.mx

Abbreviations: APN, aminopeptidase N; BBMV, brush border membrane vesicles; CHES, [2-(*N*-cyclohexylamino)-ethanesulfonic acid]; dis-C₃-(5), 3,3'-dipropylthiocarbonylamine; DMSO, dimethyl sulfoxide; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol-bis[β -aminoethyl ether]-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; GalNAc, *N*-acetyl-D-galactosamine; GPI, glycosylphosphatidylinositol; HEPES, [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid)]; LpNA, L-leucine-*p*-nitroimidate; MeGluCl, methylglucamine chloride; PBS, phosphate buffered saline; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PEG 8000, polyethylene glycol molecular weight 8000; PIPLC, GPI-specific phospholipase C; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PS, phosphatidylserine; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Tris-HCl, tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

purified by sucrose gradients as in [18]. Purified crystals were solubilized and activated by trypsin 1:10 w/w for 2 h and purified by anion exchange chromatography (Q-sepharose) as described [19]. The purified toxin was concentrated in dialysis bags (Spectra/Por cut-off 12-14 kDa; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) covered with PEG 8000, dialyzed against 1000 volumes of 100 mM methylgallium chloride (MeGaCl₂), 10 mM CHES pH 9.5 and stored at 4°C until used. Toxin purity was examined by SDS-PAGE [20] staining with Coomassie brilliant blue or silver (Bio-Rad, Richmond, CA). Western blot analyses [21] were done using a polyclonal anti-CryIAb [22] and a goat anti-rabbit immunoglobulin coupled to peroxidase as secondary antibody. Protein was measured by a protein dye method [23] using bovine serum albumin (New England Bio-Labs, Beverly, MA) as standard.

Escherichia coli recombinant strain containing the *cry1C* gene, derived from *Bt* var. *entomobactis* was kindly supplied by Dr. M. Peferoen. The inclusion bodies were solubilized, activated and purified as described [24].

2.4. Bioassay

Insect toxicity was assayed with first instar *T. ni* larvae by the diet surface contamination procedure as described [25]. LD₅₀ value is reported as ng of protein applied to artificial diet (cm²).

2.5. Fluorescence measurements

Membrane potential was monitored with the positively charged fluorescent dye 3,3'-diethylcarbo-cyanine (di-*C₁₂*-5) (Molecular Probes, Eugene, OR; 1.75 μM final, 1.4 mM stock in DMISO) as previously described [2]. Ba²⁺ and Cs⁺ were from Merck (Darmstadt).

2.6. Aminopeptidase assays

APN activity was assayed at 25°C in 250 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer using 1 mM *L*-leucine-*p*-nitroanilide (LpNA) as substrate. The initial rate at 405 nm (UHU spec II spectrophotometer; Pharmacia LKB) was used to calculate specific enzymatic activity. The absorption coefficient of *p*-nitroanilide used was $9.9 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [26]. One unit of specific APN activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the hydrolysis of 1 μmol of LpNA min⁻¹ mg protein⁻¹ at 25°C.

The initial velocity rate (*v*) of both APN activities (sensitive and resistant to PIPLC) was studied as a function of substrate concentration (*S*, 0.05–5 mM LpNA). The Michaelis constant, *K_m*, was calculated from the double reciprocal plot and, the maximum velocity, *V_{max}*, from an Eadie-Hofstee plot as described [27].

The pH dependence of APN catalysis was determined measuring the maximum velocity as a function of pH (5.5–9.5). The assay conditions were as described above, with 5 mM of LpNA.

2.7. Phosphatidylcholine specific phospholipase C digestion

T. ni brush border membrane vesicles (100 μg) were suspended in 500 μl buffer saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.2). One unit of PIPLC from *Bacillus cereus* (Boehringer, Mannheim) was added to BBMV suspension and incubated for 90 min at 30°C. The vesicles were washed twice with PBS (14 000 rpm, 20 min) and suspended in 150 mM KCl, 2 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 10 mM HEPES-HCl pH 8.0.

3. Results and discussion

3.1. The resting membrane potential of *T. ni* BBMV

The resting membrane potential of *T. ni* BBMV loaded with 150 mM KCl and assayed with the membrane potential sensitive fluorescent dye di-*C₁₂*-5, is close to the K⁺ equilibrium potential (*E_K* ≈ -92 mV) calculated by the Nernst equation, in the presence of either 140 mM NaCl or 140 mM MeGaCl₂ (Table 1). These data suggest that at rest, K⁺ permeability contributes significantly to the membrane potential in *T. ni* midgut BBMV. K⁺ addition experiments indicate that vesicles have intrinsic channels permeable to K⁺ (Fig. 1A, control trace). This is shown quantitatively as the slope of the control traces (Table 2).

3.2. Effect of CryIAc

Toxicity assays showed that the CryIAc toxin preparation was highly active against *T. ni* larvae (LD₅₀ ≈ 15 ng/cm²), whereas the denatured CryIAc form or CryIc toxin showed no activity.

Addition of 50 nM CryIAc to BBMV suspended in 140 mM MeGaCl₂ produced a fast hyperpolarization (Fig. 1A). After toxin exposure, the vesicles increased their response to KCl additions, when compared to controls to which the same amount of buffer, 200 nM of boiled CryIAc toxin or 200 nM of the non-toxic CryIc protein was added (Fig. 1A, Table 2). The hyperpolarization (-14 ± 4 mV, *n* = 7) and the higher sensitivity to external K⁺, seen as a higher slope of the toxin trace compared to the control trace, are consistent with a toxin-induced increase in K⁺ permeability probably due to ion channel opening.

3.3. Involvement of APN on the effect of CryIAc toxin

It has been reported that treating BBMV with PIPLC resulted in 30–40% APN release in *Bombyx mori* [28,29] and 59% in *Manduca sexta* [14]. To explore the possible involvement of APN in the pore formation of CryIAc toxin, *T. ni* BBMV were preincubated with PIPLC. After this treatment 25% (*n* = 3) of the total APN activity was left in the BBMV. A second PIPLC treatment did not cause further APN release. When 50 nM CryIAc was added to PIPLC treated BBMV, a toxin effect on membrane permeability was not observed (*m_{toxin}* = 0.40, *n* = 3 vs. *m_{control}* = 0.40, *n* = 7, Table 2). This response suggests that in *T. ni* midgut membranes, the APN-GPI anchored could play a major role as CryIAc receptor. A similar observation was reported in *Lymnoria dispar*, where treatment of midgut membranes with PIPLC substantially re-

Table 1
The resting membrane potential of *T. ni* BBMV

Potential	Batch			
	A	B	C	D
<i>E_K</i>	-94.4 mV	-92.3 mV	-84.5 mV	-92.5 mV
<i>E₀</i>	-87 ± 4 mV	-94 ± 5 mV	-76 ± 1 mV	-70 ± 2 mV
140 mM MeGaCl ₂ , 10 mM HEPES pH 8.0	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 8
140 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 8.0	-87 ± 3 mV	N.D.	-78 ± 2 mV	N.D.
	<i>n</i> = 7		<i>n</i> = 10	

The response of di-*C₁₂*-5 was calibrated and the resting membrane potential (*E₀*) calculated as described [2]. The values show the average ± S.D.; *n* = number of experiments. *E_K* = K⁺ equilibrium potential calculated with the Nernst equation. N.D. = not determined.

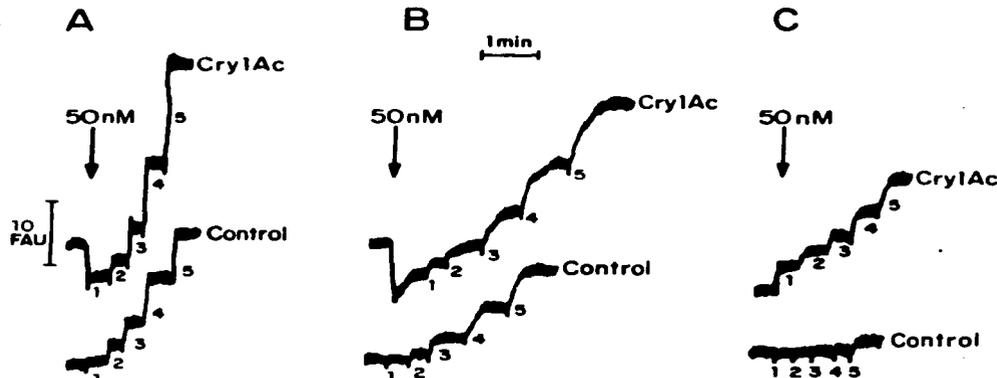


Fig. 1. Effect of Cry1Ac toxin on the membrane potential in *T. ni* midgut BBMV. Membrane potentials of BBMV (20 μ g) loaded with (mM): 150 KCl, 2 EGTA, 0.5 EDTA, 10 HEPES-HCl pH 8.0 and suspended in 140 mM NaCl, 10 mM HEPES-HCl pH 8.0, were recorded as described [2]. A downward deflection indicates a membrane potential hyperpolarization. The arrow at the top of the traces corresponds to the time of toxin or buffer A (100 mM MeGluCl, 10 mM CHES pH 9.5) addition. Final K^+ concentrations were (mM): 1=4; 2=12; 3=27; 4=56; 5=114. FAU, fluorescence arbitrary units. The calibration bar is on the left of the figure and the time scale is in the middle. As previously observed for Cry1C and Cry1D toxins, Cry1Ac interferes with the dye in the absence of BBMV, producing a small fluorescence decrease (data not shown) which was determined for each ionic condition and subtracted as described [2]. A: Toxin response on *T. ni* BBMV. Control trace was obtained with addition of buffer A, 200 nM Cry1C toxin or 200 nM boiled Cry1Ac toxin. The toxin effect on BBMV preincubated with 250 μ M GalNAc gave a trace similar to the control trace. B: Cry1Ac effect on BBMV preincubated with 10 mM bestatin. In the control, buffer A was added instead of toxin. C: Effect of Cry1Ac on BBMV preincubated with 200 mM Cs⁺. In the control, buffer A was added instead of toxin. All experiments were repeated at least 3 times on two different vesicle batches.

duced the inhibition of short circuit current produced by Cry1Ac toxin [30].

In order to analyze if the PIP2C resistant APN could also function as receptor in *T. ni*, the Cry1Ac toxin concentration was increased in the assay with PIP2C treated BBMV. When the Cry1Ac concentration was increased four times (From 0.2 to 0.8 pmol toxin/ μ g BBMV protein) the pore-forming activity was recovered. This is shown quantitatively as the slope of the traces: $m_{\text{toxin}} = 0.64$, $n = 3$; $m_{\text{toxin}} = 0.42$, $n = 3$ and $m_{\text{control}} = 0.40$, $n = 7$. We excluded the possibility that this effect was due to a direct action of Cry1Ac on the bilayer, since

in liposomes, where specific receptors are absent, 50–200-fold higher toxin concentrations are needed to see a response [5,31–33]. These data indicate that the Cry1Ac toxin induced K^+ permeability effect can be observed even in the absence of GPI anchored APN, and suggest that other proteins resistant to PIP2C treatment could function as Cry1Ac receptors. In accordance with this finding it was shown that PIP2C resistant APN from *M. sexta* function as Cry1Ac receptor when it was reconstituted and fused to planar lipid bilayers [16].

It was observed that BBMV with higher APN activity apparently display a higher Cry1Ac induced K^+ permeability

Table 2
BBMV biochemical characterization and their response to Cry1Ac toxin

	Batch		
	A	B	A-PIP2C
Neomycin sulfate	+	–	+
% BBMV facing out ^a	99	96	99
BBMV APN specific activity (U min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	51.8 \pm 1.0	32.0 \pm 0.4	13.0 \pm 1.0
APN specific activity enrichment BBMV/homogenate	12	4	3
m_{control}^b	0.40 ($n = 10$)	0.37 ($n = 5$)	0.40 ($n = 3$)
m_{toxin}^b	0.62 ($n = 10$)	0.46 ($n = 5$)	0.40 ($n = 3$)
% K^+ permeability increase	55	22	0

^aCalculated from the ratio of alkaline phosphatase specific activity in the presence and absence of 0.1% Triton X-100.

^bSlope of the traces obtained when buffer or boiled Cry1Ac was added instead of active toxin and after successive KCl additions.

^cSlope of the traces obtained when BBMV were treated with 50 nM Cry1Ac and successive KCl additions. Values are averages; all standard deviations were less than 5%; n = number of experiments. A-PIP2C, vesicles from batch A treated with phosphatidylinositol-specific phospholipase C.

increase (Table 2). These data indicate that the toxin effect depends on the quantity of APN.

Some authors have shown that CryIAC toxin has no effect on the activity of purified APN from *M. sexta* [5,8]. Experiments in the fluorescence system using preincubated BBMV with the APN inhibitor, bestatin, were done in order to analyze if an active APN is necessary for CryIAC activity. Bestatin inhibits 100% of APN, without affecting the CryIAC induced K^+ permeability increase in *T. ni* BBMV (Fig. 1B). The hyperpolarization value obtained in this condition (-16 ± 2 mV, $n=3$) is within the range of the normal response (see Section 3.2). These data indicate that the presence of APN is necessary for CryIAC pore formation, but not its enzymatic activity.

3.4. N-Acetyl-D-galactosamine inhibits CryIAC pore-forming activity

It has been reported that N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) blocks the binding of CryIAC to *M. sexta* and *P. xylostella* BBMV [34,12]. Also, it has been shown that GalNAc blocks the binding of CryIAC to the purified APN [6,19]. Fluorescence measurements performed preincubating the BBMV with different GalNAc concentrations showed that 250 μ M GalNAc was able to inhibit the CryIAC pore-forming activity ($m_{\text{min}} = 0.44$, $n=3$ vs. $m_{\text{control}} = 0.40$, $n=3$). These results suggest that also in *T. ni* larvae the CryIAC receptor is a GalNAc bearing glycoconjugate, and that GalNAc is directly involved in the binding of CryIAC toxin to its receptor, as has been reported for *M. sexta* and *P. xylostella* larvae.

3.5. APN characterization

In order to analyze the possibility that both APN (sensitive and resistant to PIPLC) are different enzymes, their kinetic constants, K_m and V_{max} , were determined by performing experiments where the initial rate, v , was studied as a function of L-leucine-p-nitroanilide concentration. It was found that PIPLC sensitive APN displays a $K_m = 0.052 \pm 0.003$ mM and $V_{\text{max}} = 18.2 \pm 0.3$ μ mol min^{-1} mg protein $^{-1}$, while the PIPLC resistant APN has a $K_m = 0.203 \pm 0.005$ mM and $V_{\text{max}} = 21.3 \pm 0.8$ μ mol min^{-1} mg protein $^{-1}$.

The profile of V_{max}/pH curves showed that the optimal pH of both APN was close to 7.2. Thus, the K_m values suggest that both APN, sensitive and resistant to PIPLC, could be different isoforms. However, the V_{max} and optimal pH were similar. We cannot exclude the possibility that differences in

K_m could be due to the influence of the lipid environment on GPI anchored APN activity. The existence of at least two different APN, putative receptors of CryIAC and CryII toxins, in *M. sexta* has been reported [5,6,9]. Further experiments with purified APN are needed to clarify if PIPLC sensitive and resistant APN could be different isoforms on the *T. ni* midgut.

3.6. Cs⁺ effect and ion selectivity

Intrinsic channels of *Spodoptera frugiperda* BBMV are sensitive to Cs⁺ [2]. Table 3 shows that Cs⁺ permeability of the *T. ni* intrinsic channels is 5-fold lower than K⁺ permeability. Fig. 1C illustrates that K⁺ permeability of intrinsic *T. ni* channels is extremely low in the presence of 200 mM Cs⁺, when compared to permeability of the CryIAC induced pores. The slope of the toxin trace in the presence of Cs⁺ ($m_{\text{min}} - m_{\text{control}} = 0.25$, $n=5$) is equivalent to the slope of the toxin effect without Cs⁺ ($m_{\text{min}} - m_{\text{control}} = 0.22$, $n=7$), indicating that this condition could be useful for analysis of the CryIAC pore-forming activity. The depolarization induced by CryIAC in this condition is due to the electrogenic uptake of Cs⁺, and suggests that the toxin induced permeability pathway is not very selective among monovalent cations. Therefore the relative selectivity X⁺/K⁺ of the CryIAC pores was analyzed in the presence of 200 mM Cs⁺ (Table 3). The selectivity series was: Li⁺ > K⁺ \approx Na⁺ \approx Cs⁺ > Rb⁺. CryIAC induced pores are poorly selective among different monovalent cations. A similar behavior was previously reported for CryIIA and CryIID induced pores in *B. mori* and *S. frugiperda* BBMV, respectively [35,2].

The results obtained in this study suggest that APN could participate as CryIAC receptor on *T. ni* midgut, but its enzymatic activity is not necessary to get the toxin-induced permeability. Finally, we found a condition to assay separately the CryIAC effect without interference of the intrinsic channels. The utilization of Cs⁺ will be a very useful tool to perform more precise studies both in the fluorescence system and in the planar lipid bilayer system.

Acknowledgements: We thank E. Aranda and L. Lina for bioassays; J. Sánchez and R. Campos for technical assistance and Dr. M. Pedersen for providing *E. coli* strain. This work was supported in part by DGAPA, CONACYT and PADEP. A.L. acknowledges CONACYT for a Ph.D. fellowship.

References

- Hofman, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. and Van Mellaert, H. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7844-7848.
- Lorence, A., Darsson, A., Diaz, C., Liévano, A., Quintero, R. and Bravo, A. (1995) FEBS Lett. 360, 217-222.
- Knowles, B.H. (1994) Adv. Insect Physiol. 24, 275-308.
- Pietrantoni, P.V., and Gill, S.S. (1996) In: M.J. Lehane and P.F. Billingsley (Eds.), Biology of the Insect Midgut. Chapman and Hall, London, pp. 345-372.
- Singadahi, S., Walters, F.S., English, L.H. and Adang, M.J. (1994) J. Biol. Chem. 269, 10088-10092.
- Knight, P.J.K., Crickmore, N. and Ellar, D.J. (1994) Mol. Microbiol. 11, 429-436.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, L., Ji, T.H. and Bulla Jr., L.A. (1995) J. Biol. Chem. 270, 5490-5494.
- Knight, P.J.K., Knowles, B.H. and Ellar, D.J. (1995) J. Biol. Chem. 270, 17765-17770.
- Liao, K., Lu, Y.L. and Adang, M.J. (1996) Insect Biochem. Mol. Biol. 26, 783-791.

Table 3
Relative ion permeability

Cation	BBMV intrinsic permeability ($m_{\text{K}^+}/m_{\text{K}^+}$)	CryIAC induced permeability ($m_{\text{K}^+}/m_{\text{K}^+}$) ^a
K ⁺	1.00	1.00
Na ⁺	0.97	0.99
Li ⁺	2.04	2.60
Cs ⁺	0.19	0.96
Rb ⁺	1.12	0.71

Ion selectivity was estimated from the ratio of the slope of the fluorescence rises which result from additions of increasing concentrations of a certain cation vs. that a K⁺. m_{K^+} , slope of the fluorescence changes induced by different XCl additions to BBMV; X⁺, different monovalent cations; m_{K^+} , slope for KCl additions.

^aRelative permeability of CryIAC induced pores measured in the presence of 200 mM Cs⁺, which blocks the intrinsic permeability. Standard deviations were less than 5%, $n=5$ in two different vesicle batches.

- [10] Gill, S.S., Cowles, E.A. and Francis, V. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27277-27282.
- [11] Valaitis, A.P., Lee, M.K., Rajamohan, F. and Dean, D. (1995) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 1143-1151.
- [12] Luo, K., Tabashnik, B.E. and Adang, M.J. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1024-1027.
- [13] Yaol, K., Kadotani, T., Kuwano, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H. and Sato, R. (1997) *Eur. J. Biochem.* **246**, 652-657.
- [14] Gurezyński, S.F. and Adang, M.J. (1995) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 409-415.
- [15] Lu, Y.J. and Adang, M.J. (1996) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 33-40.
- [16] Adang, M.J., Gurezyński, S., Luo, K., Sungadala, S., Lu, Y.-J., Masson, L., Schwartz, J.L. and Tabashnik, B. (1996) Abstracts, SIP 29th Annual Meeting and 11th International Colloquium on *Bacillus thuringiensis*, 1-6 September, Córdoba, Spain, p. 1.
- [17] Iacculus, D., Agalisse, H., Gominet, M. and Chauvaux, J. (1995) *BioTechnology* **13**, 67-71.
- [18] Thomas, W.E. and Ellar, D.J. (1983) *J. Cell Sci.* **60**, 181-197.
- [19] Masson, L., Lu, Y.-J., Mazza, A., Brousseau, R. and Adang, M.J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20309-20315.
- [20] Lucimili, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- [21] Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- [22] Meza, R., Nuñez, M.A., Sánchez, J. and Bravo, A. (1996) *FEMS Microbiol.* **145**, 333-339.
- [23] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- [24] Häfte, H., Grave, H., Seuring, J., Janssens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vandereckhove, J., Vanderbruggen, H., Van Montagu, M., Zabeau, M. and Vaeck, M. (1986) *Eur. J. Biochem.* **161**, 272-280.
- [25] Beegle, C. (1990) in: L.A. Hickle and W.L. Fitch (Eds.), *Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis**. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 14-21.
- [26] Haßkenscheld, J.C.M. (1984) in: J. Bergmayer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. V, Enzymes 3: Peptidases, Proteinases and their Inhibitors. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 2-34.
- [27] Hammes, G.G. (1982) *Enzyme Catalysis and Regulation*. Academic Press, Orlando, FL.
- [28] Takesue, S., Yokota, K., Miyajima, S., Taguchi, R., Ikezawa, H. and Takesue, Y. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**, 7-11.
- [29] Tomita, M., Obara, H., Takesue, Y., Tamura, H.O., Miyajima, S., Taguchi, R. and Ikezawa, H. (1994) *Int. J. Biochem.* **26**, 977-986.
- [30] Lee, M.K., You, T.H., Young, B.A., Cotrill, J.A., Valaitis, A.P. and Dean, D.H. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2845-2849.
- [31] Yunovitz, H. and Yawetz, A. (1988) *FEBS Lett.* **230**, 105-108.
- [32] Haider, M.Z. and Ellar, D.J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **978**, 216-222.
- [33] English, L.H., Readdy, T.L. and Bastian, A.E. (1991) *Insect Biochem.* **21**, 177-184.
- [34] Knowles, B.H., Knight, P.J.K. and Ellar, D.J. (1991) *Proc. R. Soc. Lond. B* **245**, 31-35.
- [35] Uemura, T., Ihara, H., Wudano, A. and Himeno, M. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1976-1979.

En el artículo presentado en la sección anterior se muestra que la aminopeptidasa N (APN) unida a la microvellosidad apical mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) es una de las moléculas que Cry1Ac puede utilizar como receptor en el intestino medio de *T. ni*. Sin embargo, los resultados obtenidos en las VMMA tratadas con la fosfolipasa C específica para GPI indican que la toxina puede utilizar como receptores otros componentes de la membrana que son resistentes a este tratamiento. Estos datos y la diferencia de dos órdenes de magnitud de la constante de afinidad (K_d) calculada para la unión de Cry1Ac a las VMMA de *M. sexta* y a la APN de *M. sexta* reconstituida (Sangadala *et al.*, 94), sugieren que el receptor puede estar formado por más de un componente.

Con la evidencia disponible hasta el momento no es posible llegar a una conclusión definitiva acerca de la participación del receptor en la formación del poro. Es necesario hacer experimentos finos a nivel de canal único en presencia y ausencia del receptor en los que se tenga un número suficiente de registros que permitan calcular la conductancia, la selectividad, la probabilidad de apertura y cierre, el diámetro del poro y sus propiedades farmacológicas. La técnica de bicapas planas a las que se fusionen VMMA con una concentración conocida de receptor o bien el hacer "patch clamp" a células de intestino medio de insecto en cultivo podrían ser herramientas útiles que aporten información más clara acerca de la función del receptor en la formación del canal.

Es muy importante también enfatizar que hasta el momento se conoce muy poco acerca de lo que sucede entre la unión al receptor y la formación del poro. El diseño de mutantes y su análisis usando técnicas que permitan estudiar separadamente la inserción, la agregación y la formación del poro son los retos más importantes a enfrentar en el entendimiento del mecanismo molecular de acción de las proteínas Cry.

Capítulo 5

Conclusiones y Perspectivas

Respecto del estudio del espectro de emisión de la sonda fluorescente utilizada, se encontró que a pH mayores o iguales a 8.5 la eficiencia de emisión disminuye, por lo que se estableció como condición de trabajo usar una solución con pH 8.0. Este resultado será de utilidad para hacer estudios similares a los aquí mostrados en los que se usen vesículas de la mayor parte de las especies de lepidópteros, dípteros y algunas familias de coleópteros ya que semeja el pH predominante en su intestino (Knowles, 1994).

El potencial inicial de la membrana de las VMMA en las especies analizadas, *T. ni* y *H. virescens* resultó ser muy cercano al potencial de equilibrio del K^+ ; ésto indica que en el reposo la permeabilidad principal de la membrana es para este ión. Al parecer este es un comportamiento general de los lepidópteros ya que se obtuvieron resultados similares al estudiar VMMA de *Spodoptera frugiperda* (Lorence *et al.*, 1995).

El efecto producido por la toxina Cry1Ac a los pocos segundos de estar en contacto con la membrana que contiene a su receptor funcional proveniente de *T. ni* y *H. virescens* es inducir una vía de permeabilidad con una cierta preferencia hacia los cationes. Comparativamente, los canales inducidos por Cry1Ac en las especies antes citadas discriminan mejor entre el K^+ y el Na^+ (Figura 4.2) que los inducidos por Cry 1D en las VMMA de *S. frugiperda* (Figura 1B, Lorence *et al.*, 1995).

De los resultados obtenidos al estudiar la acción de algunas proteínas Cry1Ac mutantes en la α -hélice 5 en el sistema de fluorescencia con un diseño experimental tipo doble ciego podemos concluir que esta metodología es útil para distinguir las toxinas activas (Cry1Ac silvestre, paneles A y B de la Figura 4.3) de otras con capacidad de formación de poro y toxicidad reducidas (A164P, panel C de la Figura 4.3) o nulas (L167F, panel D de la Figura 4.3).

Al incorporar las VMMA de *T. ni* a bicapas lipídicas planas se encontraron transiciones debidas a la actividad de canales iónicos endógenos. De las curvas corriente-voltaje correspondientes, se calcularon conductancias de 160 y 380 pS y potenciales de inversión de -9 y -20 mV, respectivamente, lo que indica su preferencia hacia los cationes. Estos canales son similares en cuanto a conductancia a otros descritos en las

células caliciformes de *Manduca sexta* (Moffett y Lewis, 1990) y en vesículas de *Lymantria dispar* (Peyronnet, 1997), pero tienen conductancias mayores a las calculadas para los canales endógenos de las VMMA de *S. frugiperda* (Lorence *et al.*, 1995).

Las vesículas de *T. ni* resultaron extremadamente fusogénicas a las bicapas compuestas de difitanoilfosfatidilcolina (DiFFC) si se compara con el comportamiento observado previamente para las vesículas de *S. frugiperda* ya que la concentración de proteína necesaria para observar fusión fue de 8 a 12 ng para el primer caso y 0.2 a 3.7 µg para el segundo. Dado que en ambos casos la composición de la bicapa y las soluciones de trabajo fue la misma y se usaron condiciones similares para favorecer la fusión, es probable que la diferencia observada se deba a una composición lipídica diferente de la microvellosidad apical de estos insectos.

Los canales formados por la toxina Cry1Ac silvestre en bicapas que contenían al receptor funcional proveniente de *T. ni* son catiónicos ($E_{rev} -11$ mV) y presentan una conductancia de entre 1.1 y 3 nS. Estos canales de conductancia tan alta se observaron aún usando concentraciones de proteína muy bajas (0.2-0.5 nM = 12-32 ng/ml). Esta evidencia favorece la idea de que son estructuras oligoméricas las responsables de la formación de este tipo de poros. Para poder excluir la posibilidad de que el receptor participe directamente en la formación del canal es necesario llevar a cabo experimentos en los que se pueda controlar o por lo menos estimar el número de receptores presentes en cada vesícula con la finalidad de lograr registros más finos. Una alternativa que pudiera aportar información relevante en este sentido sería hacer estudios de "patch clamp" a células de insecto en cultivo.

Respecto de los experimentos llevados a cabo en el sistema de fluorescencia para aclarar el papel de la aminopeptidasa N, la molécula identificada como la proteína de unión para Cry1Ac en diversas especies, en la formación del poro se puede concluir lo siguiente:

La actividad de formación de poro de la toxina Cry1Ac depende de la cantidad de aminopeptidasa N (APN) presente en las VMMA de *T. ni*.

La inhibición de la actividad enzimática de la APN con bestatina no afectó la capacidad de formación de poro de la toxina Cry1Ac. Este dato sugiere que el efecto de la toxina depende de la presencia de esta proteína, pero no de su actividad enzimática.

La *N*-acetil-D-galactosamina (250 μ M) bloquea la acción de la proteína Cry1Ac en las vesículas de *T. ni*, indicando que este azúcar está involucrada directamente en la interacción toxina-receptor.

Los experimentos llevados a cabo con VMMA de *T. ni* tratadas y no tratadas con la fosfolipasa específica para glicosilfosfatidilinositol (GPI) sugieren que la toxina Cry1Ac puede utilizar como receptor la APN anclada con GPI y también alguna otra molécula o moléculas que son resistentes a este tratamiento.

La caracterización cinética de las aminopeptidasas N sensible y resistente a la fosfolipasa específica para GPI, indica que éstas pueden ser isoformas.

Respecto de los resultados obtenidos al hacer la caracterización farmacológica de los canales endógenos de las VMMA de *T. ni* y los formados por Cry1Ac se pueden citar las conclusiones siguientes:

El Cs^+ es un agente que bloquea los canales endógenos de la vesículas pero no altera el efecto de la toxina Cry1Ac. Es posible que la actividad de este ión sea general al menos para los canales intrínsecos de los lepidópteros de la familia Noctuidae, ya que también es capaz de bloquear los canales de las VMMA de *S. frugiperda* (Lorence *et al.*, 1995).

En presencia de 200 mM de Cs^+ se encontró que el poro inducido por Cry1Ac es muy poco selectivo entre los diferente cationes monovalentes ensayados. La serie de selectividad determinada es: $\text{Li}^+ > \text{K}^+ \sim \text{Na}^+ \sim \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+$. En apariencia esta es una característica general de las proteínas de tipo Cry1 ya que se observó un comportamiento similar para los canales inducidos por Cry1D en las VMMA de *S. frugiperda* (Lorence *et al.*, 1995).

La utilización del Cs^+ es una herramienta muy útil que permitirá llevar a cabo estudios más finos en el sistema de fluorescencia y también en el de bicapas planas, ya que podrá diferenciarse con mayor claridad la actividad de los canales endógenos de los inducidos por las proteínas Cry.

Referencias

- Adang, M.J., Garczynski, S., Luo, K., Sangadala, S., Lu, Y.-J., Masson, L., Schwartz, J.L. y B. Tabashnik (1996). Function of membrane components in *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin action. SIP 29th Annual Meeting and III International Colloquium on *Bacillus thuringiensis*. Córdoba, España. 1 al 6 de septiembre, Abstracts, p. 1.
- Ahmad, W. y D.J. Ellar (1990). Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 68, 97-104.
- Angsuthanasombat, C., Crickmore, N. y D.J. Ellar (1993). Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop in *Bacillus thuringiensis* CryIVB δ -endotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 111, 255-262.
- Angus, T.A. (1968). Similarity of effect of valinomycin and *Bacillus thuringiensis* parasporal protein in larvae of *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 11, 145-146.
- Aronson, A.I., Beckman, W. y P. Dunn (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50, 1-24.
- Aronson, A.I., Han, E.S., McGaughey, W. y D. Johnson (1991). The solubility of inclusion protein from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 981-986.
- Aronson, A.I., Wu, D. y C. Zhang (1995). Mutagenesis of specific and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* 177, 4059-4065.
- Barloy, F., Delécluse, A., Nicolas, L. y M. Lecadet (1996). Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*, encoding a new mosquitoicidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *J. Bacteriol.* 178, 3099-3105.
- Bashford, C.L. y J.C. Smith (1979). The use of optical probes to monitor membrane potential. *Methods in Enzymology* LV, 569-587.
- Belfiore, C.J., Vadlamudi, R.K., Osman, Y.A. y L.A. Jr. Bulla (1994). A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 359-364.
- Biedt, H., Carey, P.P., Kaplan, H., Lessard, T. y M. Pozsgay (1989). Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem. J.* 260, 87-91.
- Bosch, D., Schipper, B., Van der Kleij, H., de Maagd, R.A. y W.J. Stiekema (1994). Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/Technology* 12, 915-918.
- Bravo, A., Jansens, S. y M. Peferoen (1992). Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 237-246.
- Bravo, A. (1997). Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179, 2793-2801.

- Broadway, R.M. (1989). Characterization and ecological implications of midgut proteolytic activity in larval *Pieris rapae* and *Trichoplusia ni*. *J. Chem. Ecol.* 15, 2101-2113.
- Broadway, R.M. (1995). Are insects resistant to plant proteinase inhibitors?. *J. Insect Physiol.* 41, 107-116.
- Butko, P., Cournoyer, M., Puztai-Carey, M. y W.K. Surewick (1994). Membrane interactions and surface hidrofobicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIC. *FEBS Lett.* 340, 89-92.
- Caramori, T., Albertini, A.M. y A. Gallizi (1991). *In vivo* generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. *Gene* 98, 37-44.
- Carlberg, G. (1973). Biological effects of the thermostable beta exotoxin produced by different serotypes of *Bacillus thuringiensis*. Academic disertation for public criticism. University of Helsinki.
- Carroll, J., Li, J. y D.J. Ellar (1989). Proteolytic processing of a coleopteran-specific δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochem. J.* 261, 99-105.
- Carroll, J. y D.J. Ellar (1993). An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins action on insect-midgut-membrane permeability using lighth-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* 214, 771-778.
- Carroll, J. y D.J. Ellar (1997). Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* 245, 797-804.
- Chen, X.J., Lee, M.K. y D.H. Dean (1993). Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9041-9045.
- Chen, X.J., Curtiss, A., Alcantara, E. y 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.
- Chestukhina, G.G., Tyurin, S.A., Kostina, L.I., Osterman, A.L., Zalunin, I.A., Kodova, O.A. y V.M. Stepanov (1990). Subdomain organization of *Bacillus thuringiensis* entomocidal proteins N-terminal domains. *J. Protein Chem.* 9, 501-507.
- Cioffi, M. (1984). Comparative ultrastructure of arthropod transporting epithelia. *Amer. Zool.* 24, 139-156.
- Crawford, D.N. y W.R. Harvey (1988). Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 137, 277-286.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feltelson, J., Schnepf, E., Lambert, B., Lereclus, D., Baum, J. y D.H. Dean (1995). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal cry genes. En "Program and Abstracts of the 28th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology". Society for Invertebrate Pathology, Bethesda, MD, p. 14.

- Cummings, C.E., Armstrong, G., Hodgman, T.C. y D.J. Ellar (1994). Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Mol. Membr. Biol.* 11, 87-92.
- Dai, S.-M. y S.S. Gill (1993). *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23, 273-283.
- Darszon, A. y A. Liévano (1996). Reconstitución de canales iónicos. En "Biofísica y fisiología celular". Latorre, R., López-Barneo, J. Bezanilla, F. y R. Llinás (eds). Universidad de Sevilla, Sevilla, pp. 385-401.
- De Barjac, H. y M.M. Lecadet (1976). Dosage biochimique de l'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN polymerases bacteriennes (note). C.R. Acad. Sc. Paris.
- De Maagd, R.A., Kwa, M.S.-G., Van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, W.J. y D. Bosch (1996a). Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1537-1543.
- De Maagd, R.A., Van der Klei, H., Bakker, P.L., Stiekema, W.J. y D. Bosch (1996b). Different domains of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2753-2757.
- Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.-J., Chen, X.J., Alcántara, E. y S.R. Hussain (1996). Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis- a minireview. *Gene* 179, 111-117.
- Denolf, P., Hendricks, K., Seuryneck, J., Vandamme, J., Jansens, S., Peferoen, M. y J. Van Rie (1996). Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding protein. SIP 29th Annual Meeting and III International Colloquium on *Bacillus thuringiensis*. Córdoba, España, 1-6 septiembre. Abstracts, p. 20-21.
- Díaz, C. (1995). "Mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*". Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado. Cuernavaca, México. Tesis de Maestría.
- Dobson, C.M. (1994). Solid evidence of molten globules. *Curr. Biology* 4, 636-640.
- Du, C. y K.W. Nickerson (1996). *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry 1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3722-3726.
- Ebersold, H.R., Lüthy, P., Geiser, P. y L. Ettlinger (1978). The action of the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study. *Experientia* 34, 1672.
- English, L.II., Readdy, T.L. y A.E. Bastian (1991). Delta-endotoxin induced leakage of $^{86}\text{Rb-K}^+$ and H_2O from phospholipid vesicles is catalyzed by reconstituted midgut membrane. *Insect Biochem.* 21, 177-184.
- English, L., Robbins, H.L., Von Tersch, M.A., Kulesza, C.A., Ave, D., Coyle, D., Jany, S.C. y S.L. Slatin (1994). Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24, 1025-1035.

- Escriché, B., Martínez-Ramírez, A.C., Real, M.D., Silva, F.J. y J. Ferré (1994). Occurrence of three different binding sites for *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins in the midgut brush border membrane of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 315-327.
- Estada, U. y J. Ferré (1994). Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3840-3846.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. y M.G. Koziel (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5389-5394.
- Faust, R.M. y A.L. Jr. Bulla (1982). Bacterial and their toxins as insecticides. En "Microbial and Viral Pesticides". Kurstaki, E. (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 75-206.
- Feitelson, J.S., Payne, J. y L. Kim (1992). *Bacillus thuringiensis*. Insect and beyond. *Bio/Technology* 10, 271-275.
- Feldmann, F., Dullemans, A. y C. Waaijwijk (1995). Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2601-2605.
- Feng, Q. y W.J. Becktel (1994). pH-Induced conformational transitions of CryIA(a), CryIA(c) and CryIIIA δ -endotoxins in *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry* 33, 8521-8526.
- Ferré, J., Real, M.D., Van Rie, J., Jansens, S. y M. Peferoen (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5119-5123.
- Flores, H., Soberón, X., Sánchez, J. and A. Bravo (1997). Isolated domain II and III from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett.* 414, 313-318.
- Garczynski, S.F., Crim, J.W. y M.J. Adang (1991). Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2816-2820.
- Garczynski, S.F. y M.J. Adang (1995). *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) δ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25, 409-415.
- Gazit, E. y Y. Shai (1993). Structural and functional characterization of the $\alpha 5$ segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochemistry* 32, 3429-3436.
- Gazit, E., Bach, D., Kerr, I.D., Sansom, M.S.P., Chejanovsky, N. y Y. Shai (1994). The alpha-5 segment of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: *in vitro* activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochem. J.* 304, 895-902.
- Gazit, E. y Y. Shai (1995). The assembly and organization of the $\alpha 5$ and $\alpha 7$ helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* 270, 2571-2578.

- Ge, A.Z., Rivers, D., Milne, R. y D.H. Dean (1991). Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domain of CryIA(c). *J. Biol. Chem.* 266, 17954-17958.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. y P.V. Pietrantonio (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 615-636.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. y 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.
- Gould, F., Martínez-Ramírez, A., Anderson, A., Ferré, J., Silva, F.J. y W.J. Moar (1992). Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7986-7990.
- Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D.G., López, J., Micinski, S., Leonard, R. y M. Laster (1997). Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3519-3523.
- Griego, V.M., Moffett, D. y K.D. Spence (1979). Inhibition of active K⁺ transport in the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut after ingestion of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Insect Physiol.* 25, 283-288.
- Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. y K. Van Frankenhuyzen (1992). Suppression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 47-52.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. y M. Cygler (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254, 447-464.
- Gupta, B.L., Dow, J.A.T., Hall, T.A. y W.R. Harvey (1985). Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions and electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta* *in vitro*. *J. Cell Sci.* 74, 137-152.
- Haider, M.Z. y D.J. Ellar (1987). Characterization of the toxicity and cytopathic specificity of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein using insect cell culture. *Mol. Microbiol.* 1, 59-66.
- Haider, M.Z. y D.J. Ellar (1989a). Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin. Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity on the protein. *J. Mol. Biol.* 208, 183-194.
- Haider, M.Z. y D.J. Ellar (1989b). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin: interaction with fosfolipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 978, 216-222.
- Harvey, W.R. (1992). Physiology of V-ATPases. *J. Exp. Biol.* 172, 1-17.
- Heimpel, A.M. y T.A. Angus (1959). The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *J. Insect Pathol.* 1, 152-170.

- Hendricks, K., de Loof, A. y H. Van Mellaert (1990). Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* 95 C, 241-245.
- Hill, D. (1983). *Agricultural insect pests of the tropics and their control*, 2ª edición. Cambridge University Press, Cambridge, 746 p.
- Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer, Assoc., Sunderland, MA, 607 p.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. y H. Van Mellaert (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7844-7848.
- Höfte, H., de Greve, H., Seurinck, J., Jansens, J., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Vanderbruggen, H., Van Montagu, M., Zabeau, M. y M. Vaeck (1986). Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715. *Eur. J. Biochem.* 161, 273-280.
- Höfte, H. y H.R. Whiteley (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.
- Hussain, S.-R., Aronson, A.I. y D.H. Dean (1996). Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 226, 8-14.
- Ihara, H., Kuroda, E., Wadano, A. y M. Himeno (1993). Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 200-204.
- Indrasith, L.S. y H. Hori (1992). Isolation and partial characterization of binding proteins for immobilized delta endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombyx mori*, and the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102 B, 605-610.
- Johnson, D.E. y W.H. McGaughey (1996). Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. *Curr. Microbiol.* 33, 54-59.
- Johnson, K.S. y G.W. Felton (1996). Potential influence of midgut pH and redox potential on protein utilization in insect herbivores. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32, 85-105.
- Knight, P.J.K., Crickmore, N. y D.J. Ellar (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAC delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11, 429-436.
- Knight, P.J.K., Knowles, B.H. y 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.H. y D.J. Ellar (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 924, 509-518.

- Knowles, B.H., Knight, P.J.K. y D.J. Ellar (1991). *N*-acetyl-D-galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 245, 31-35.
- Knowles, B. y 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. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advan. Insect Physiol.* 24, 275-308.
- Koller, C.N., Bauer, L.S. y R.M. Hollingworth (1992). Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native δ -endotoxin crystals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 692-699.
- Kostichka, K., Warren, G.W., Mullins, M., Mullins, A.D., Craig, J.A., Koziel, M.G. y J.J. Estruch (1996). Cloning of a *cryV*-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. *J. Bacteriol.* 178, 2141-2144.
- Kumar, P.A., Sharma, R.P. y V.S. Malik (1996). The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 1-43.
- Lakey, J.H., Baty, D. y F. Pattus (1991). Fluorescence energy transfer distance measurements using site-directed single cysteine mutants. *J. Mol. Biol.* 218, 639-653.
- Lee, M.K., Rajamohan, F., Gould, F. y D.H. Dean (1995a). Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3836-3842.
- Lee, M.K., Young, B.A. y D.H. Dean (1995b). Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 306-312.
- Lee, M.K., You, T.H., Young, B.A., Cottrill, J.A., Valaitis, A.P. y D.H. Dean (1996a). Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2845-2849.
- Lee, M.K., You, T.H., Curtiss, A. y D.H. Dean (1996b). Involvement of two amino acid residues in the loop region of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin in toxicity and binding to *Lymantria dispar*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 139-146.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M. y J. Chaufaux (1995). Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis* *spo0A* mutant. *Bio/Technology* 13, 67-71.
- Li, J., Carroll, J. y D.J. Ellar (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815-821.
- Li, J. (1992). Bacterial toxins. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 2, 545-556.
- Liang, Y., Patel, S.S. y D.H. Dean (1995). Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* 270, 24719-24724.

- Liebig, B., Stetson, D.L. y D.H. Dean (1995). Quantification of the effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on short-circuit current in the midgut of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 41, 17-22.
- Liévano, A. (1989). "Caracterización de canales de calcio de la membrana plasmática del espermatozoide del erizo de mar". Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Tesis doctoral.
- Liévano, A., Vega-Saenz de Miera, E.C. y A. Darszon (1990). Ca²⁺-channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* 95, 273-296.
- Lorence, A., Darszon, A., Díaz, C., Liévano, A., Quintero, R. y 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., Rajamohan, F. y D.H. Dean (1994). Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* 176, 5554-5559.
- Lu, Y.-J. y M.J. Adang (1996). Conversion of *Bacillus thuringiensis* CryIAc-binding aminopeptidase to a soluble form by endogenous phosphatidylinositol phospholipase C. *Insec. Biochem. Molec. Biol.* 26, 33-40.
- Luo, K., Lu, Y.J. y M.J. Adang (1996). A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 783-791.
- Luo, K., Tabashnik, B.E. y M.J. Adang (1997). Binding of *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1024-1027.
- MacIntosh, S.C., Stone, T.B., Scott-Jokerst, R. y R.L. Fuchs (1991). Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8930-8933.
- Martens, J.W.M., Visser, B., Vlak, J.M. y D. Bosch (1995). Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) protoxin. *Mol. Gen. Genet.* 247, 482-487.
- Martin, F.G. y M.G. 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. Exp. Biol.* 198, 91-96.
- Masson, L., Mazza, A. y R. Brousseau (1994). Stable immobilization of lipid vesicles for kinetic studies using surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* 218, 405-412.
- Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R. y B. Tabashnik (1995a). Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *J. Biol. Chem.* 270, 11887-11896.
- Masson, L., Lu, Y.-J., Mazza, A., Brousseau, R. y M.J. Adang (1995b). The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* 270, 20309-15.

- McClintock, J.T., Schaffer, C.R. y D. Sjoblad (1995). A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pest. Sci.* 45, 95-105.
- Mihn, J. (1984). Técnicas eficientes para la crianza masiva de infestación de insectos en la selección de plantas hospedantes para resistencia al gusano de la mazorca o elotero *Heliothis zea*. Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y del Trigo. *Folleto técnico*, 17 pp.
- Miller, C. y E. Racker (1976). Ca^{2+} induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers. *J. Membr. Biol.* 30, 283-300.
- Moffett, D.F. y S.A. Lewis (1990). Cation channels of insect midgut goblet cells: conductance diversity and Ba^{2+} activation. *Biophys. J.* 57, 85a.
- Monette, R., Potvin, L., Baines, D., Laprade, R. y J.L. Schwartz (1997). Interaction between calcium ions and *Bacillus thuringiensis* toxin activity against Sf9 cells (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 440-447.
- Müller, R., Rudin, D.O., Tien, H.T. y W.C. Wescott (1962). Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system. *Nature* 194, 979-980.
- Nicholls, C.N., Ahmad, W. y D.J. Ellar (1989). Evidence of two different types of dual specificity insecticidal P2 toxins in *Bacillus thuringiensis* subspecies. *J. Bacteriol.* 171, 5141-5147.
- Nishimoto, T., Yoshisue, H., Ihara, K., Sakai, H. y T. Komano (1994). Functional analysis of block 5, one of the highly conserved amino acid sequences in the 130-kDa CryIVA protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEBS Lett.* 348, 249-254.
- Oddou, P., Hartmann, H. y M. Geiser (1991). Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 202, 676-680.
- Oddou, P., Hartmann, H., Radecke, F. y M. Geiser (1993). Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) δ -endotoxin. *Eur. J. Biochem.* 212, 145-150.
- Parenti, P., Morandi, P., Consonni, P., Leonardi, M.G. y B. Giordana (1996). Does aminopeptidase play a role in amino acid transport along the midgut of *Bombyx mori* larvae? XX International Congress of Entomology. Florencia, Italia, 25-31 Agosto. *Proceedings*, p. 160.
- Parker, M.W. y F. Pattus (1993). Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *TIBS* 18, 391-395.
- Percy, J. y P.G. Fast (1983). *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* 41, 86-98.
- Peyronnet, O. (1997). Comunicación personal.
- Peyronnet, O., Vachon, V., Brousseau, R., Baines, D., Schwartz, J.L. y R. Laprade (1997). Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1679-1684.

- Pietrantonio, P.V. y S.S. Gill (1992). The parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandongensis*: characterization and screening for insecticidal activity. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 295-302.
- Pietrantonio, P.V. y S.S. Gill (1996). *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action on the insect midgut. En "Biology of the Insect Midgut". Lehane, M.J. y P.F. Billingsley (eds.). Chapman & Hall, Londres, pp. 345-372.
- Plakidou-Dymock, S., Tanner, M.J. y J.D. McGivan (1993). A role for aminopeptidase N in Na⁺ dependent aminoacid transport in bovine renal brush border membranes. *Biochem. J.* 290, 59-65.
- Quintero, R. (1994). Desarrollo sustentable: un reto de nuestro tiempo. En "Desarrollo sustentable, retos y prioridades". Olguín, E.J., Sánchez, G., Ramírez, M.A. y G. Mercado (compiladores). Instituto de Ecología, A.C., Jalapa, pp. 67-79.
- Rajamohan, F., Alcantara, E., Lee, M.K., Chen, X.J., Curtiss, A. y D.H. Dean (1995). Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 177, 2276-2282.
- Rajamohan, F., Cottrill, J.A., Gould, F. y 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., Alzate, O., Cottrill, J., Curtiss, A. y D.H. Dean (1996b). Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14338-14343.
- Ravoahangimalala, O., Charles, J.F. y J. Schoeller-Raccaud (1993). Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxin in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *Res. Microbiol.* 44, 271-278.
- Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Lüthy, P. y M.G. Wolfersberger (1986). *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺ gradient dependent-amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett.* 204, 213-218.
- Sangadala, S., Walters, F.W., English, L.H. y M.J. Adang (1994). A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryI(Ac) toxin binding and ⁸⁶Rb⁺-K⁺ efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 269, 10088-10092.
- Schwartz, J.L., Garneau, L., Masson, L. y R. Brousseau (1991). Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1065, 250-260.
- Schwartz, J.L., Garneau, L., Masson, L., Brousseau, R. y E. Rousseau (1993a). Lepidopteran-specific δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132, 53-62.
- Schwartz, J.L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. y R. Laprade (1993b). Comparative study of ionic channels formed by CryI(Aa), CryI(Ab), CryI(Ac) and CryI(C) *Bacillus thuringiensis* toxins in planar lipid bilayers. *Biophys. J.* 64, A94.

- Schwartz, J.L., Potvin, L., Laflamme, J., Mazza, A., Masson, L., Brousseau, R. y R. Laprade (1994). Effect of single site mutations on ionic channels formed by CryIA(c) *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin. *Biophys. J.* 66, A221.
- Schwartz, J.L., Lu, Y.J., Soehnlein, P., Brousseau, R., Masson, L., Laprade, R. y M. Adang (1996). *Manduca sexta* midgut receptors for *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins affect ion channels formed by the insecticidal proteins in planar lipid bilayers. *Biophys. J.* (Part 2) 70, A195.
- Schwartz, J.L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Préfontaine, G., Brousseau, R. y L. Masson (1997). Restriction of intramolecular movements within the CryIAa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* 410, 397-402.
- Schirmanns, K. y W. Zeiske (1994). K⁺ channel permeation and block in the midgut epithelium of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 197, 179-200.
- Schnepf, H.E. y H.R. Whiteley (1985). Delineation of a toxic-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* 260, 6264-6272.
- Shimizu, T. y K. Morikawa (1996). The β -prism: a new folding motif. *Trends Biochem. Sci.* 21, 3-6.
- Slatin, S.L., Abrams, C.K. y L. English (1990). δ -Endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 765-772.
- Smedley, D.P. y D.J. Ellar (1996). Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* 142, 1617-1624.
- Smith, G.P. y D.J. Ellar (1994). Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J.* 302, 611-616.
- Strizhov, N., Keller, M., Konez-Kálmán, Z., Regev, A., Sneh, B., Schell, J., Koncz, C. y A. Zilberstein (1996). Mapping of the entomocidal fragment of *Spodoptera*-specific *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC. *Mol. Gen. Genet.* 253, 11-19.
- Szabo, A., Stolz, L. y R. Granzow (1995). Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr. Opinion. Struct. Biol.* 5, 699-705.
- Tabashnik, B.E., Malvar, T., Liu, Y.-B., Finson, N., Borthakur, D., Shin B-S, Park S-H, Masson, L., De Maagd, R.A. y D. Bosch (1996). Cross-resistance of the diamondback moth indicated altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2839-2844.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.-B., Finson, N., Masson, L. y D.G. Heckel (1997). One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1640-1644.
- Thie, N.M.R. y J.G. Houseman (1990). Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochem.* 20, 313-318.
- Tilton, H. (1993). Biopesticides have 5% market share of 7.8 billion dollars chemical insecticides market. *Chemical Marketing Reporter* May, SR11.

- Uemura, T., Ihara, H., Wadano, A. y M. Himeno (1992). Fluorometric assay of potential change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1976-1979.
- Vachon, V., Paradis, M.-J., Marsolais, M., Schwartz, J.L. y R. Laprade (1995). Ionic permeabilities induced by *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells. *J. Membrane Biol.* 148, 57-63.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, L., Ji, T.H. y L.A. Jr. Bulla (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494.
- Valaitis, A.P., Lee, M.K., Rajamohan, F. y D.H. Dean (1995). Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25, 1143-1151.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. y H. Van Mellaert (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 186, 239-247.
- Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.D. y H. Van Mellaert (1990a). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247, 72-74.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. y H. Van Mellaert (1990b). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1378-1385.
- Von Tersch, M.A., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. y L.H. English (1994). Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIII δ 2 and CryIII δ 2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3711-3717.
- Wabiko, H., Held, G.A. y A. Jr. Bulla (1985). Only a part of the protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 is necessary for insecticidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 706-708.
- Wabiko, H., Raymond, K.C. y A.L. Jr. Bulla (1986). *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA* 5, 305-314.
- Wabiko, H. y E. Yasuda (1995). *Bacillus thuringiensis* protoxin: location of toxic border and requirement of non-toxic domain for high-level *in vivo* production of active toxin. *Microbiology* 141, 629-639.
- Walters, F.S., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. y L.H. English (1993). Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) δ -endotoxin. *Biochem., Biophys. Res. Commun.* 196, 921-926.
- Walters, F.S., Kulesza, C.A., Phillips, A.T. y L.H. English (1994). A stable oligomer of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, CryIII δ A. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24, 963-968.
- Walters, F.S. y L.H. English (1995). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins towards the potato aphid in an artificial diet bioassay. *Entomol. Experiment. Appl.* 77, 211-216.
- Weltens, R., Peferoen, M., Steels, P. y E. Van Kerkhove (1992). Electrophysiological measurements and cable analysis of coleopteran midgut epithelium: effect of ionic changes and of an insecticidal product. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 100, 6.

- Wickham, T.J., Davis, T., Granados, R.R., Shuler, M.L. y H.A. Wood (1992). Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol. Prog.* 8, 391-396.
- Woltersberger, M.G. (1990a). The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia* 46, 475-477.
- Woltersberger, M.G. (1990b). Specificity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to lepidopteran larvae: insights from studies utilizing midgut brush border membrane vesicles. En "Invertebrate Pathology and Microbial Control: 1990". D.E. Pinnock (ed.). Society for Invertebrate Pathology. Adelaide, pp. 278-282.
- Woltersberger, M.G. (1992). V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. *J. Exp. Biol.* 172, 377-386.
- Woltersberger, M.G., Chen, X.J. y D.H. Dean (1996). Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 279-282.
- Wright, D.J., Iqbal, M., Granero, F. y J. Ferré (1997). A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1814-1819.
- Wu, D. y 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. y 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.
- Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H. y R. Sato (1997). Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry IAa toxin. *Eur. J. Biochem.* 246, 652-657.
- Yu, C.-G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G. y J.J. Estruch (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 532-536.
- Yunovitz, H. y A. Yawetz (1988). Interaction between the δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* spp. *entomocidus* and liposomes. *FEBS Lett.* 230, 105-108.
- Zhang, J., Hodgman, T.C., Krieger, L., Schnetter, W. y H.V. Schairer (1997). Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 179, 4336-4341.

Anexo 1

**Lorence, A., Darszon, A., Díaz, C., Liévano, A., Quintero, R. y A. Bravo (1995).
"δ-Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush
border membrane in suspension and in planar lipid bilayers".
FEBS Letters 360, 217-222.**

δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers

Argelia Lorence, Alberto Darzon, Claudia Díaz, Arturo Liévano, Rodolfo Quintero, Alejandra Bravo*

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 5163, Cuernavaca 62271, Mor., México

Received 5 August 1994; revised version received 12 January 1995

Abstract Membrane potential measurements using a fluorescent dye indicated that two specific toxins active against *Spodoptera frugiperda* larvae (CryIC and CryID) cause immediate permeability changes in midgut epithelial brush border membrane vesicles (BBMV). The initial response and the sustained permeability change are cationic, not very K^+ selective, and occur at *in vivo* lethal doses (nM). The toxin response has a different ion selectivity and is more sensitive to Ba^{2+} than the intrinsic cation permeability of BBMV. Experiments incorporating BBMV into planar lipid bilayers (PLB) demonstrated that these vesicles contain cation channels (31–47 and 76 pS). A 2–40 fold conductance increase was induced by nM concentrations of toxin in PLB containing BBMV. Cationic single channel transitions of 50, 106, 360 and 752 pS were resolved. Thus, *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins induce an increase in cation membrane permeability involving ion channels in BBMV-containing functional receptors.

Key words: δ -Endotoxin; Mode of action; Ionic channel; *Bacillus thuringiensis*

1. Introduction

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram-positive bacterium that during sporulation produces crystalline inclusions formed by proteins called δ -endotoxins or insecticidal crystal proteins (ICP), which are toxic to the larvae of various insects, many of which are disease vectors or major crop pests. Numerous ICP genes have been cloned, sequenced, and classified into five groups and several subgroups on the basis of sequence homology and toxicity spectra [1].

ICP are synthesized in the form of inactive protoxins that are solubilized and proteolytically activated in the insect gut. The activated toxin binds to specific receptors located in the apical microvilli of epithelial cells in the insect's midgut. After binding, the toxin inserts irreversibly into the cell plasma membrane [2] and forms a pore or lesion that allows net uptake of ions and water, leading to midgut cell swelling and eventual lysis. It has been proposed that K^+ -selective pores are involved in this process [3–7].

The purified ICP have the ability to induce ion leakage in synthetic phospholipid vesicles [8,9]. In the absence of specific receptors CryIA(c), CryIIIA, CryIIIB2 and CryIC toxins form cation-selective channels at alkaline pH; CryIC also forms anion-selective channels at pH 6.0, in planar bilayers [10–13].

The toxin concentrations needed to exert these effects are at least 1000-times higher than the *in vivo* biocidal concentration. It has been proposed that the receptor functions as a binding protein to increase the local concentration of the toxin in the vicinity of the membrane [11]. Recently the receptor for CryIA(c) toxin in *Manduca sexta* has been identified as a metalloprotease aminopeptidase N [14].

Recent *in vitro* assays using brush border membrane vesicles (BBMV) have shown permeability changes induced by Cry toxins at physiological concentrations (nM) [15,16]. However, the toxin effects were recorded after 1 h of incubation with the vesicles, missing the initial response produced by the toxin once it interacts with its receptor.

Here we show that nM concentrations of ICP cause an immediate change in membrane potential, measured with a potential-sensitive fluorescent dye, in BBMV isolated from the midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae. Two specific toxins active against this insect (CryIC and CryID) and two non-toxic ICP (CryIIIA and CryIAtet) were used. We studied the ionic basis of the toxin-induced membrane potential changes and explored their pharmacology. Having found specific toxin responses in these BBMV, we incorporated them into planar bilayers where they displayed intrinsic single channel cation conductances mainly of 31, 47 and 76 pS. A 2–40 fold conductance increase was observed when nM concentrations of toxin were added to bilayers containing BBMV. The toxin-induced conductance increase was extreme, and single channel transitions of 50, 106, 360 and 752 pS could be resolved. These results indicate that the toxin receptor is fundamental for efficient toxin-induced cation pore formation.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of the brush border membrane vesicles

BBMV from 5th instar *S. frugiperda* larvae were prepared as reported [17]. The vesicles were dialyzed overnight against 400 vols. of 150 mM KCl, 2 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 10 mM HEPES-HCl, pH 7.5 (Sigma, St. Louis, MO), and sonicated for six 30-s periods at 25°C (Branson 1200 sonic bath; Danbury, CT) in the same solution. The BBMV used in the planar lipid bilayer experiments were loaded overnight with 1–26 M sucrose at 0°C and stored at –70°C until used.

BBM attachment was estimated according to the alkaline phosphatase (AP) to cytochrome c oxidase activity ratio (9.5–12.5 fold increase/protein relative to the initial homogenate), which were measured as reported [18,19]. Vesicle orientation was determined from the AP activity in the presence and absence of 0.02% Triton X-100 (Sigma).

Toxin concentration in the vesicles and the homogenate was measured after CryIC binding using monoclonal antibody 20A6E9 against the toxin supplied by Dr. M. Pedersen, Plant Genetic Systems, Gent, Belgium and a second antibody coupled to peroxidase (data not shown).

*Corresponding author. Fax: (52) (71) 732 388.
E-mail: bravo@pbr322.ceingchi.unam.mx

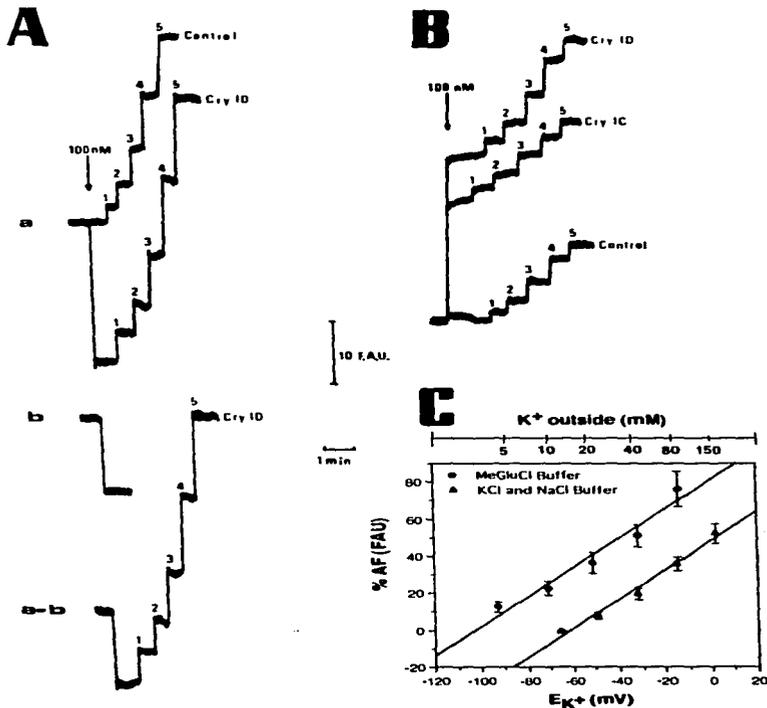


Fig. 1. Effect of the CryIC and CryID toxins on the membrane potential in *Spodoptera frugiperda* midgut brush border membrane vesicles. Membrane potentials of BBMVs (20 μ g) loaded with (mM) 150 KCl, 2 EGTA, 0.5 EDTA, 10 HEPES-HCl, pH 7.5, were recorded as described in section 2. Pre-equilibration with 1.5 μ M DiS-C₂(5) (9 min) and the effect of 0.5 μ M oligomycin are 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. (A) CryID response of BBMVs suspended in 140 mM methylglucamine chloride, 10 mM HEPES-HCl, pH 7.5. (Aa) Final K⁺ concentrations were (mM): 1 = 4; 2 = 13; 3 = 30; 4 = 64 and 5 = 133. In the control, buffer A was added instead of toxin. (Ab) Interaction of the CryID toxin with the dye in absence of BBMVs. (B) CryIC and CryID effects upon substitution of methylglucamine chloride incubation buffer by 10 mM KCl, 130 mM NaCl, 10 mM HEPES-HCl, pH 7.5, buffer. Final K⁺ concentrations were (mM): 1 = 23; 2 = 44; 3 = 85; 4 = 165; 5 = 367. The control trace was obtained with buffer A addition, as well as with CryIIA, CryIAt(e) and boiled CryIC and CryID toxins additions. (C) Resting membrane potential was determined as described in section 2.3 from a ΔE_{K^+} (%) vs. E_{K^+} (mV) curve. In the presence of external 10 mM KCl, 130 mM NaCl, the measured resting membrane potential was -59 ± 3 mV ($n = 13$), and -99 ± 5 mV ($n = 38$) in external 140 mM MeGluCl.

2.2. Preparation of insecticidal crystal proteins

Escherichia coli recombinant strains containing the cryIC and cryID genes, derived from *Bt* var. *entomobdus* and *otizawai*, respectively, were kindly supplied by Dr. M. Peferoen. The inclusion bodies were solubilized, activated and purified as in [20]. Crystals from *Bt* var. *teuchriomis* strain BTSt1, containing CryIIA protein, and from *Bt* var. *kurstaki*

strain 11D-73, containing CryIA(c) protein, were produced and purified as described in [21]. Toxins were dialyzed against 200 vols. of 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.6 (buffer A), and maintained at 4°C at most for a month. Activated toxin purity was examined by SDS-PAGE [22] and by Western blots [23]. The CryIC and CryID toxins were denatured by boiling them for 30 min in 90 mM NaOH and then

neutralized with HCl. The denatured toxins lost their insecticidal activity for *S. frugiperda*. Insecticidal activity was assayed with 1st instar *S. frugiperda* larvae according to [24]. Protein was measured as described in [25] using BSA as a standard (New England BioLabs, Beverly, MA).

2.3. Fluorescence measurements

Membrane potential was monitored with the fluorescent positively charged dye, 3,3'-diethylthiobenzocarbocyanine (DiSC-C₁₂(5); Molecular Probes, Eugene, OR.; 1.5 μ M final, 1 mM stock in DMSO). Fluorescence was recorded at the 620/67 nm excitation/emission wavelength pair using a Hansatech system (Norfolk, England), as in [26]. Hyperpolarization causes dye internalization into the 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 μ M) by successive additions of KCl to BBMV (20 μ g) suspended in various media (700 μ l). Neither carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazine (CCCP, 1 μ M; Calbiochem), a mitochondrial uncoupler, nor oligomycin (0.5 μ M; Sigma), an ATPase inhibitor, altered the membrane potential measurements, indicating that there is no mitochondrial contribution to the recorder signals (data not shown). All determinations were made at 30°C with constant stirring. Time 0 (t_0) was considered to be when the BBMV were added, and the KCl additions were made after 9 min. Membrane potential determinations were done 10 times with 4 different vesicle batches under the different experimental conditions used. Cation substitutions in the incubation buffer were made by replacing the *N*-methyl-D-glucamine chloride (MeGluCl) by the indicated salt(s) (mM per mM), maintaining the osmolality (~150–160 mOsm). Cl⁻ was substituted with methanesulfonate⁻.

K⁺ channel blockers Ba²⁺ and Cs⁺ were from J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, tetraethylammonium chloride (TEA) and 4-aminopyridine (4-AP) were from Alomone Labs, Jerusalem, Israel.

2.4. Planar lipid bilayer experiments

Planar lipid bilayers (PLB) were made by the Müller and Rudin method [27], as in [28], with diphytanoyl-phosphatidyl choline (diphyPC) (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL; 20 mg/ml in *n*-decane). Typical bilayer capacitance values were between 150 and 250 pF. Buffer solution (300 μ l of 150 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) was added to each of the cell compartments. Once the bilayer was formed, a transmembrane salt gradient was established raising [KCl] to 550 mM in *cis*, the compartment where sucrose loaded BBMV (0.2–3.7 μ g protein) were added for fusion; *trans* was held at virtual ground. Vesicle incorporation was assayed after application of a 50-mV holding potential across the PLB. Toxin (0.6–10.6 nM) was added to the *cis* compartment. All experiments were performed at room temperature.

Single channel currents were recorded with a Dagan 3900A patch-clamp amplifier (Dagan Corp., Minneapolis, MN) as in [28]. Currents were filtered at 200 or 500 Hz and digitized on-line at 1 or 2 kHz, respectively, and analyzed on a personal computer using a Digidata 1200 interface and Axotape and pClamp software (Axon Instruments, Foster City, CA).

3. Results and discussion

3.1. The resting membrane potential of BBMV

The resting membrane potential of BBMV loaded with 150 mM KCl, and assayed with the membrane potential-sensitive fluorescent dye DiSC-C₁₂(5), is not far from the K⁺ equilibrium potential (E_K) calculated by the Nernst equation. In the presence of external 10 mM KCl, 130 mM NaCl, the measured resting membrane potential was -59 ± 3 mV ($n = 13$), and -99 ± 5 mV ($n = 38$) in external 140 mM MeGluCl (Fig. 1C). The calculated E_K were -71 and -108 mV, respectively. This suggests that in the BBMV of *S. frugiperda*, K⁺ permeability contributes significantly to the resting membrane potential. K⁺ addition experiments without valinomycin indicated that the vesicles have intrinsic channels permeable to K⁺ (Fig. 1A and B, control traces).

3.2. Effect of δ -endotoxins

The CryIC toxin was about 2 fold more active than CryID toxin against *S. frugiperda* larvae (LD₅₀'s of 31.2 ng/cm² with a 18–48 CL₅₀ and 77.6 ng/cm² with a 17–147 CL₅₀, respectively), whereas the CryIA(c) and CryIIA toxins showed no activity.

Addition of 100 nM of either of the active toxins (approximately 2.5 pmol toxin/ μ g BBMV protein) to BBMV suspended in 140 mM MeGluCl produced a fast hyperpolarization. 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 (Fig. 1Aa). Experiments in the absence of BBMV with an equivalent concentration of fluorescent dye, showed that both toxins induce a fast fluorescence decrease, smaller than the hyperpolarization seen with the vesicles (Fig. 1Ab). This artifact, which may result from electrostatic interaction of the toxins with the dye, was determined under each ionic condition and subtracted in all subsequent experiments (Fig. 1Aa,b). The hyperpolarization (9 ± 3 mV, $n = 23$) and the higher sensitivity of the vesicles to external K⁺ are consistent with a toxin-induced increase in K⁺ permeability, possibly mediated by ion channel opening.

3.3. Ion selectivity and specificity

It has been reported that CryIA(a) toxin increases cation permeability non-selectively, even for divalents, in BBMV from *Bombyx mori* [15]. To explore the selectivity of CryIC and CryID responses in *S. frugiperda* BBMV, MeGluCl was replaced by NaCl in the external media. Under this condition, which is more physiological, both CryIC and CryID toxins induced a depolarization, even though the toxin addition artifact decreases fluorescence (Fig. 1B). This response is due to the electrogenic uptake of Na⁺, and suggests that the toxin-induced permeability pathway is not very selective among monovalent cations.

As mentioned above, the cation permeability of BBMV increases after toxin addition (100 nM CryID, see Fig. 1A). In this condition ion selectivity can be estimated from the ratio of the slope of the fluorescence rises which result from additions of increasing concentration of a certain cation vs. that of K⁺ (m_{X^+}/m_{K^+}). Since BBMV have intrinsic cation permeabilities, the response to serial additions of each cation was determined in the absence of toxin, as described earlier, and the slope subtracted from those obtained in its presence. Table 1 shows the selectivity series for the intrinsic permeability of BBMV

Table 1
Relative ion permeability

Cation	BBMV intrinsic permeability (m_{X^+}/m_{K^+})	CryID-induced permeability (m_{X^+}/m_{K^+}) ^a
K ⁺	1.00	1.00
Na ⁺	0.83	0.70
Li ⁺	0.98	0.56
Cs ⁺	1.15	0.32
Rb ⁺	0.83	0.65
NH ₄ ⁺	1.25	0.79

Calculations were as described in section 3.3. m_{X^+} , slope of the fluorescence changes induced by different NaCl additions to BBMV; X⁺, different monovalent cations; m_{K^+} , slope for KCl additions. ^aEstimated relative permeability of the toxin CryID-induced pores after subtracting the intrinsic channel relative permeability. All standard deviations were less than 5% ($n = 5$).

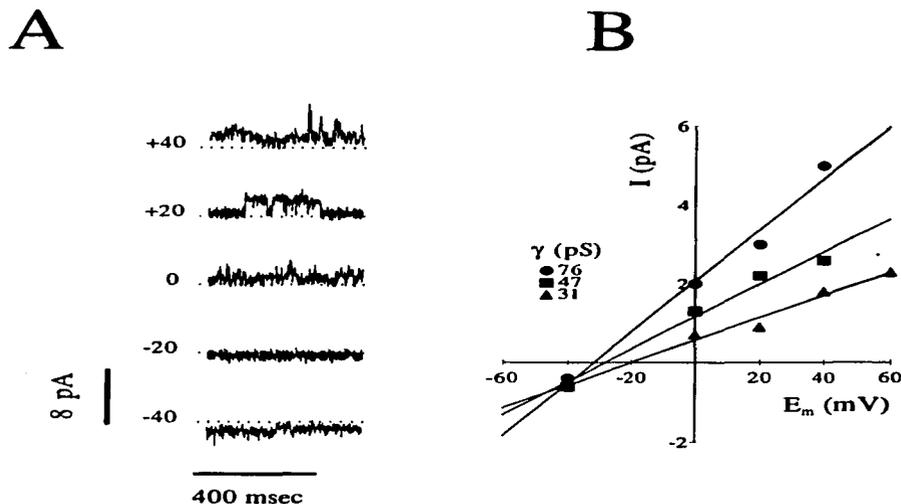


Fig. 2. Representative single channel records (A) and I/V curves from the most common current transitions (B) of BBMV from *S. frugiperda* fused to a diPEC lipid bilayer. Records were obtained in 550 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0, *cis*; 150 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0, *trans*. Holding potentials in mV are indicated on the left of each record. Zero current level is indicated by dashed lines. E_h was around -20 mV.

($\text{NH}_4^+ > \text{CS}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Rb}^+ = \text{Na}^+$) and for that induced by the toxin ($\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li}^+ > \text{Cs}^+$). As the initial response triggered by the toxin, the sustained permeability change is cationic, although not very K^+ selective.

Osmotic swelling experiments in BBMV from *Atanduca sexta* have indicated that CryIA(c) toxin increases anion permeability [16]. Experiments where MeGluCl was substituted by MeGlu-methanesulfonate in the incubation buffer showed that the toxin does not induce anion permeability changes, but a hyperpolarization (8 ± 2 mV, $n = 3$) due to K^+ efflux (as in Fig. 1A). However, intrinsic anionic channels may exist in these vesicles.

The coleopteran-specific toxin (CryIIIA) and the non-toxic lepidopteran-specific toxin (CryIA(c)) were used to determine the specificity of the effect. Neither toxin affected BBMV intrinsic permeability, even at higher concentrations (500 nM and 200 nM, respectively). In addition, the CryIC and CryID toxins lost their insecticidal activity and their capacity to change the permeability of the vesicles when boiled.

Although the CryIC toxin is 2 fold more toxic to *S. frugiperda* than CryID toxin, it is less potent in inducing permeability changes to the BBMV. However, the toxicity assays were performed with 1st instar larvae, in contrast to the permeability assays which were performed with BBMV purified from the last

instar. In BBMV isolated from the 2nd and 3rd instar we have found that CryIC and CryID have similar effects (data not shown). It is possible that the CryIC and CryID receptor density in BBMV varies during larval development.

3.4. Pharmacological characterization

Previously it was reported that the CryIAs-induced permeability increase is very sensitive to external Ba^{2+} and Ca^{2+} [3]. Table 2 compares the effect of some K^+ channel blockers and Ca^{2+} on the intrinsic channels of BBMV and on their response to CryID toxin. The intrinsic channels are more sensitive to

Table 2
Effect of K^+ channel blockers and Ca^{2+} on the in vitro activity of the CryID toxin

K ⁺ channel blocker	Intrinsic channels		CryID channels	
	A	B	A	B
Ba^{2+}	$400 \pm 45 \mu\text{M}$ (50%)		$200 \pm 20 \mu\text{M}$ (50%)	
Ca^{2+}	$400 \pm 40 \mu\text{M}$ (50%)		$600 \pm 40 \mu\text{M}$ (50%)	
Cs^+	$10 \pm 2.5 \text{ mM}$ (50%)		$100 \pm 10 \text{ mM}$ (0%)	
TEA	$30 \pm 5.0 \text{ mM}$ (50%)		$200 \pm 20 \text{ mM}$ (26%)	
4-AP	$4 \pm 0.5 \text{ mM}$ (50%)		$30 \pm 5 \text{ mM}$ (0%)	

A, channel blocker concentration (\pm S.D., $n = 5$). B, % of K^+ permeability inhibition. IC₅₀ were determined from dose response curves.

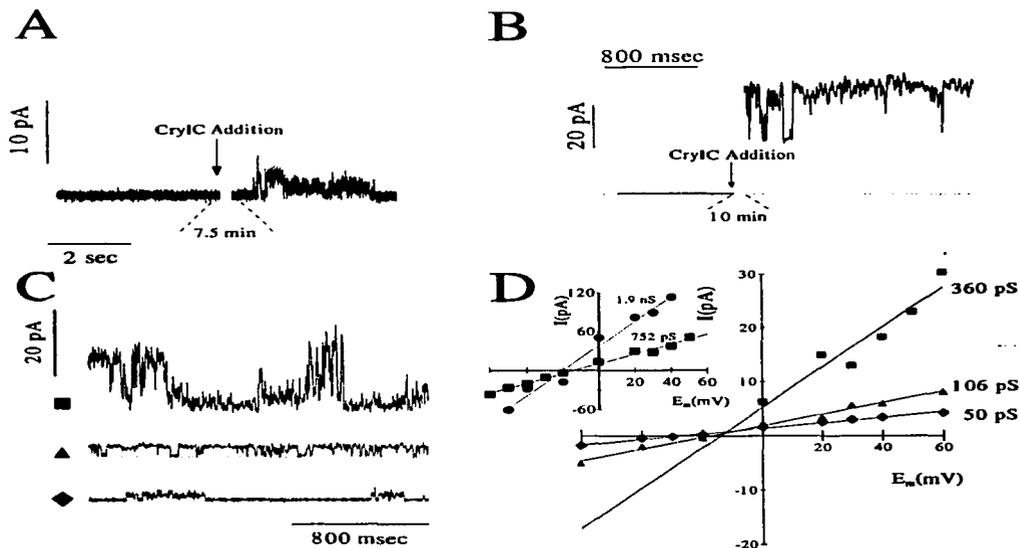


Fig. 3. Cation channels formed by CryIC toxin in bilayers with fused BBMV. Ionic conditions were as in Fig. 2. (A) Single channel transitions observed 7.5 min after 10.6 nM CryIC addition. (B) Macroscopic response observed at 10 min with the same toxin concentration. (C) Representative single channel transitions at 0 mV from bilayers containing BBMV exposed to 1.3–10.6 nM CryIC toxin. The dotted lines indicate the zero current level. E_m were close to -20 mV, indicating that these channels are cationic. (D) $I-V$ plot of the single channel transitions presented in C. The insert in the left side also shows the $I-V$ curve of a macroscopic response ($\gamma = 1.9$ nS).

Ca^{2+} , Cs^+ , TEA^+ and 4-AP, but less sensitive to Ba^{2+} . The distinct ion selectivity and sensitivity towards various blockers of the intrinsic and the CryID-induced permeability changes suggest that they are different.

3.5. Toxin responses of planar lipid bilayers containing BBMV

The previous results suggest that cation channels mediate the toxin effects. Thus, toxin-induced single channel activity was examined in planar bilayers. Fig. 2A illustrates the most frequent single channel transitions detected in PLB to which BBMV were fused (see section 2). These experiments were performed having a 3.7 fold higher KCl concentration *in cis* than in *trans*. Single channel conductances of 31, 47 and 76 pS were calculated from $I-V$ curves of these transitions which have reversal potentials of ~ -20 mV, indicating that these channels are cation-selective with a $P_{\text{K}^+}/P_{\text{Cs}^+} \sim 5.7$ (Fig. 2B).

The endogenous BBMV channels washout, lasting only 1–2 min. This makes their characterization difficult; however, in 2/3 experiments made in 100 mM CsCl *cis*/100 mM KCl *trans*, no single channel activity was detected after BBMV addition, al-

though channels appeared after nM toxin addition. These preliminary results suggest that the endogenous channels are blocked by Cs^+ while those induced by the toxin are not, in agreement with the membrane potential experiments.

It has been shown that the purified toxins alone can induce single channel activity in PLB [10–13]. We repeated these experiments and never saw channel activity ($n = 25$) unless $> 5 \mu\text{M}$ toxin was used. The single channel transitions observed with μM concentrations of toxin were cationic and similar to those described earlier [10–13].

The response to CryIC of PLB containing BBMV was tested. Two types of toxin responses are illustrated in Fig. 3: one involving few channels (Fig. 3A,C), and a macroscopic conductance increase (Fig. 3B) where some large single channel transitions can be resolved. $I-V$ curves of the toxin-induced single channel events (Fig. 3D) or from macroscopic responses (Fig. 3D insert), 1.9 nS curve) measured under a 3.7 fold KCl gradient indicated that the toxin-activated channels are cationic. Toxin responses were observed in 15/17 experiments where the conductance increase ranged from 2 to 40 fold. The

time to induce a response in bilayer experiments depended on the toxin concentration. Low concentrations (0.6-3 nM) required up to 45 min ($n = 13$), while at higher concentrations (5-10.6 nM) the response was seen after 0-10 min ($n = 5$). Fig. 3C shows examples of the toxin-induced single channel transitions 752, 360, 106 and 50 pS in bilayers containing BBMV. The symbol on the left side of each current record corresponds to the $I-V$ curve for that channel (Fig. 3D).

This work presents additional evidence that BBMV contain a functional *Bt* toxin receptor. Both in vesicles and in PLB₁ICP after interacting with their receptors induce an increase in cation membrane permeability involving ion channels. The responses were observed at toxin concentrations (nM) which correlate with the *in vivo* lethal doses and with the range needed to inhibit amino acid uptake into BBMV of other insects [7]. The results indicate that midgut cell lysis results from receptor mediated toxin-induced cation pore formation.

Acknowledgements: We thank M.C. Felipe Espinosa for technical assistance, Dr. M. Peferoen for providing monoclonal antibodies and *E. coli* strains, M.C. Eduardo Aranda and Laura Lina for performing the bioassays. This work was partially supported by DGAPA and CONACYT, A.D. is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

References

- [1] Höfte, H. and Whiteley, H.R. (1989) *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.
- [2] Van-Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. and Van-Mellaert, H. (1989) *Eur. J. Biochem.* 186, 239-247.
- [3] Crawford, D.N. and Harvey, W.R. (1988) *J. Exp. Biol.* 137, 277-286.
- [4] Giordana, B., Tascia, M., Villa, M., Chiantore, C., Hanozet, G.M. and Parenti, P. (1993) *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 403-407.
- [5] Griego, V.M., Moffett, D. and Spence, K.D. (1979) *J. Insect. Physiol.* 25, 283-288.
- [6] Harvey, W.R. and Wolfersberger, M.G. (1979) *J. Exp. Biol.* 83, 293-304.
- [7] Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Lüthy, P. and Wolfersberger, M.G. (1986) *FEBS Lett.* 204, 213-218.
- [8] Haider, M.Z. and Ellar, D.J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 978, 216-222.
- [9] Yunovitz, H. and Yawetz, A. (1988) *FEBS Lett.* 230, 105-108.
- [10] Schwartz, J.L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. and Rousseau, E. (1993) *J. Membrane Biol.* 132, 53-62.
- [11] Slatin, S.L., Abrams, C.K. and English, L.H. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 765-772.
- [12] Walters, F.S., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. and English, L.H. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 921-926.
- [13] Von Tersch, M.A., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. and English, L.H. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3711-3717.
- [14] Knight, P.J.K., Crickmore, N. and Ellar, D.J. (1994) *Mol. Microbiol.* 11, 429-436.
- [15] Uemura, T., Ihara, H., Wadano, A. and Himeno, M. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1976-1979.
- [16] Carroll, J. and Ellar, D.J. (1993) *Eur. J. Biochem.* 214, 771-778.
- [17] Wolfersberger, M., Lüthy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, V.F., Giordana, B. and Hanozet, G.M. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 86A, 301-308.
- [18] Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual*, pp. 597. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [19] Garcia-Soto, J., González-Martínez, M., De la Torre, L. and Darszon, A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 944, 1-12.
- [20] Höfte, H., Grave, H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Vanderbruggen, H., VanMontagu, M., Zabeau, M. and Vaek, M. (1986) *Eur. J. Biochem.* 161, 272-280.
- [21] Mahillon, J. and Delcour, J. (1984) *J. Microbiol. Methods* 3, 69-76.
- [22] Laemmli, U.K. and Favre, M. (1973) *J. Mol. Biol.* 80, 575-599.
- [23] Towbin, H.T., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- [24] Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. and Bravo, A. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 353-356.
- [25] Marwell, M.A.K., Haas, S.M., Vieber, Z.Z. and Tolbert, N.E. (1978) *Anal. Biochem.* 87, 206-210.
- [26] Reynaud, E., De la Torre, L., Zapata, O., Liévano, A. and Darszon, A. (1993) *FEBS Lett.* 329, 210-214.
- [27] Müller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T. and Westcott, W.C. (1962) *Nature* 194, 979.
- [28] Liévano, A., Vega-Saenz de Miera, E. and Darszon, A. (1990) *J. Gen. Physiol.* 95, 273-296.