

00551

10

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

“Determinación del papel de los triptofanos en
el mecanismo de acción de la proteína Cry 1 Ab
de *Bacillus thuringiensis*”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA

GEORGINA HERNANDEZ MONTES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue realizado en el departamento de Microbiología Molecular bajo la dirección de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra. Durante la maestría se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

A mis padres por haberme dado la vida y el mejor de los ejemplos
A Mary, Fer y Amparo por su cariño y por recordarme quien soy
A Javier por el amor, el apoyo y sobre todo por escribir una historia conmigo
A la memoria de Erick Pichardo*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alejandra Bravo por permitirme trabajar en su grupo, por su dirección y por su ejemplo como investigadora.

A las Dras. Gloria Saab, Susana López y a Liliana Pardo por haber formado parte de mi comité tutorial y haber enriquecido mi formación con cada uno de sus atinadas observaciones.

A los integrantes del jurado, los Dres. Alejandro Alagón, Joel Osuna, Ernesto Ortiz, Julio Collado y Alejandra Bravo por revisar mi trabajo.

A los compañeros del laboratorio Lupe, Jorge, Raúl, Isabel, Sergio, Alejandro, Oswaldo, Chela, Giovanni, Iván, Carlos y Claudia que de una u otra forma siempre hicieron una aportación importante a mi trabajo y a mi formación.

A Liz, Mayra, María, Margarito y Claus por brindarme su amistad y su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A los Dres. Mario Soberon y Juan Miranda de quienes aprendí mucho durante los seminarios pues siempre tuvieron ideas brillantes acerca de los problemas.

A la Dra. María Eugenia Núñez y a Laurita por que aunque actualmente no están en el grupo, su colaboración fue parte importante de este trabajo.

A Conde y a Mauricio por su amistad y por que enriquecieron mucho mi vida académica.

A Juan por su apoyo incondicional, sus consejos, su tiempo y su amistad.

A los escolapios que aun después de tanto tiempo seguimos buscando momentos para compartir y los seguimos disfrutando.

A los cuates del cifi con quienes siempre se puede entablar una plática interesante y de quienes siempre pude obtener una visión diferente del mundo.

Al Dr. Ernesto Pérez-Rueda haber revisado mi trabajo, y por brindarme su amistad.

A la familia Izquierdo-Sánchez porque siempre me hicieron sentir en familia.

A todas las personas que de una u otra manera me hicieron la vida difícil, pues gracias a ellos, y a pesar de ellos hoy estoy terminando una de los ciclos más importantes de mi formación.

Y a la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que me ha dado.

CONTENIDO

INTRODUCCION

Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
Características fenotípicas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
Características moleculares de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
Nomenclatura y clasificación de las δ -endotoxinas	4
Estructura de las toxinas Cry	5
Análisis filogenético de las proteínas Cry	8
Mecanismo de acción de las toxinas Cry	9

ANTECEDENTES 13

OBJETIVOS 16

MATERIAL Y METODOS

Obtención de proteínas Cry de cepas recombinantes de <i>E coli</i>	17
Cepas y plásmidos	18
Bioensayos de toxicidad hacia larvas de <i>Manduca sexta</i>	18
Ensayos de solubilidad de la protoxina	18
Activación por tripsina	18
Activación en presencia del anticuerpo scFv73	19
Purificación de anticuerpo scFv73	19
Activación por vesículas	20
Purificación de vesículas de microvellosidad apical de larvas de <i>Manduca sexta</i>	20
Determinación de proteína por el método de Lowry modificado	22
Determinación de aminopeptidasa	22
Determinación de actividad de fosfatasa alcalina	23
Biotinación de proteínas	23
Ensayo de unión	24
Ensayo de formación de poro	24
Extracción de plásmidos	25
Construcción de vectores	25
Células competentes para transformación	26
Transformación de células de <i>E coli</i>	27
Mutagenesis sitio-dirigida por PCR	27

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos Hacia larvas de <i>Manduca sexta</i>	31
Producción de protoxina	32
Solubilización de la protoxina	33
Procesamiento proteolítico con tripsina	35
Unión de toxina a membranas de <i>Manduca sexta</i>	36
Activación en presencia de anticuerpo scFv73	37
Activación con vesículas	38
Ensayos de formación de poro	38

Construcción de mutantes no conservativas	43
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS	47
BIBLIOGRAFIA	48

DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE LOS TRIPTOFANOS EN LA TOXICIDAD DE LA PROTEINA Cry1Ab DE *Bacillus thuringiensis*

Introducción

CARACTERISTICAS GENERALES

Bacillus thuringiensis comprende a un grupo de bacterias que en los últimos años ha adquirido gran importancia, tanto a nivel agrícola por su aplicación como bioinsecticida, como en el ámbito de la investigación debido a su gran potencial biotecnológico, ya que produce proteínas capaces de matar a insectos de diferentes órdenes tales como coleópteros, dípteros y lepidópteros.

La primera referencia de un microorganismo con las características de *Bacillus thuringiensis* apareció en 1901 y fue hecha por Ishiwata, quien describió a *Bacillus soto* aislado del gusano de seda en Japón. Diez años después Berliner asignó el nombre de *Bacillus thuringiensis* a una bacteria aislada de larvas de gusano del maíz, en la provincia de Turingia, Alemania (Feitelson, J S 1993). Se usó como producto comercial por primera vez en el año de 1938 en Francia.

B. thuringiensis es una bacteria aerobia, Gram positiva, que tiene la capacidad de formar esporas. Sus principales nichos los constituyen el suelo, el follaje de algunas plantas, hojas y el intestino de algunos insectos. Esta bacteria está ampliamente distribuida por el mundo ya que se han encontrado esporas en muestras de sedimentos marinos de Japón (Maeda M, et al 2000), España (Iriarte J. et al 2000) y hasta en el Antártico (Forsyth G, et al 2000).

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS

B. thuringiensis es una bacteria capaz de formar esporas, como respuesta a la limitación de fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Este proceso da como resultado la formación de una célula quiescente que es altamente resistente a la desecación, la falta de nutrientes y a la exposición a la luz ultravioleta. Este proceso involucra la regulación temporal de la expresión genética, comunicación intracelular, y diferenciación morfológica que da origen a la espora (Devine K. M 2000).

El proceso de esporulación requiere de 6 a 8 hr para completarse. Se puede dividir claramente en 7 estados que básicamente se resumen de la siguiente manera: En un inicio la célula sensa las condiciones del ambiente y toma la decisión de iniciar la esporulación; posteriormente ocurre una división asimétrica de la célula para dar origen al compartimento que dará lugar a la espora. Dentro de este compartimento se empaqueta una copia del material genético y se crea la corteza de la espora, por último la célula madre se lisa y libera al exterior su espora ya madura (ver Figura 1).

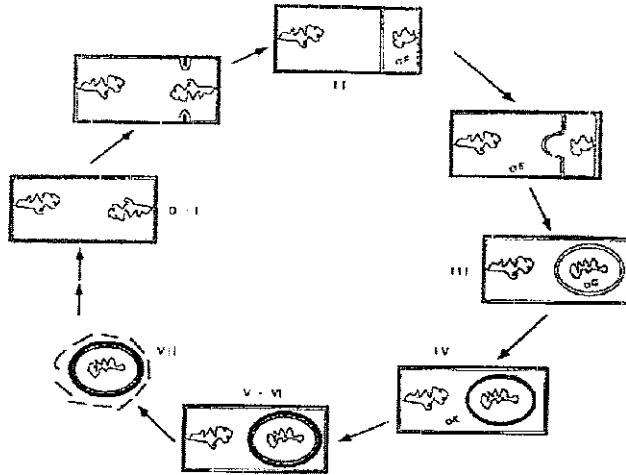


Figura1 Esquematzación de los 7 estadios de esporulación para el género Bacillus

Otra característica que le permite a *B. thuringiensis* asegurar su supervivencia en el ambiente, es su capacidad de producir una serie de factores de virulencia.

En la Tabla 1 se muestran los diferentes factores de virulencia producidas por *B. thuringiensis*.

Tabla 1 Factores de virulencia de *B. thuringiensis*

Factor de virulencia	Características	Efecto	Referencia
Enterotoxina	Proteína de aprox 40kDa Se produce durante la fase vegetativa.	Provoca diarrea en humanos.	Darmagga, H P 1995.
Fosfolipasa C	34kDa	Hidroliza membranas fosfolipídicas	Titbal R.W 1993
Hemolisina II	Proteína de aprox 47kDa	Actúa sobre células de mamífero	Budarina Z I <i>et al</i> 1994.
Quitinasas	45-80kDa	Hidroliza quitina rompiendo enlaces α .1-4 glucosídicos	Kramer J M 1997. Samson, M S 1998
Turicinas	11 6 kDa	Tiene actividad de bacteriocinas contra otras especies de Bacillus	Favret ME <i>et al</i> 1989 Cherif A <i>et al</i> 2001
beta-exotoxinas	Moléculas análogas al ATP	Actúan como inhibidores de la	Kim, Y T <i>et al</i> 1970.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Además de esto *B. thuringiensis* puede producir 2 tipos de proteínas insecticidas:

- a) Las proteínas Vip que se producen durante la fase vegetativa de la bacteria. Son proteínas de 80 a 88 kDa que se excretan al medio extracelular y son activas contra una gran variedad de lepidópteros (Estruch, J. J. *et al* 1996). Se propone que atacan específicamente las células del intestino, provocando parálisis del peristaltismo intestinal, parálisis general en el insecto y la muerte (Yu, C. *et al* 1997).
- b) Las delta-endotoxinas se producen durante la fase de esporulación. Se subdividen en 2 familias, de acuerdo a su similitud en secuencia de aminoácidos:
 - i) Proteínas Cry.- Son una familia de proteínas que pueden ser de 70 kDa hasta 130 a 140 kDa. Forman cristales durante la fase de esporulación de la bacteria y son tóxicas contra una amplia variedad de insectos y algunos nemátodos ya que atacan específicamente las células intestinales.
 - ii) Proteína Cyt.- Se empaca junto con algunas proteínas Cry, es activa contra dípteros y en estudios *in vitro* ha demostrado ser citolítica contra células de larvas de dípteros y contra eritrocitos humanos. Es una proteína de aproximadamente 150 aminoácidos, tiene siete hojas beta y seis hélices alfa que se encuentran rodeando las hojas beta (Li, J. *et al* 1996). Se propone que estas proteínas forman poros en las membranas por la inserción de sus hojas $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 7$ (Promdonkoy, B. 2000).

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE *B. thuringiensis*

Los análisis comparativos de las subunidades pequeñas del RNA ribosomal 16S ha provisto una clasificación adecuada para las bacterias, y el género *Bacillus* no ha sido la excepción. Esta clasificación muestra que *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* pertenecen a un grupo filogenético muy relacionado, inclusive hay quienes proponen que deben ser considerados como miembros de una misma especie. Se propone que la diferencia básica son los plásmidos que codifican para las proteínas Cry en el caso de Bt y la antracina en el caso de *B. anthracis* (Helgason, E. *et al* 2000).

El genoma de *B. thuringiensis* tiene entre 2.7 y 5 Megabases y esto depende de los elementos extracromosomales de cada subespecie (Carlson, C. R. *et al* 1994).

Se sabe que los genes *cry* generalmente están codificados dentro de plásmidos, aunque también se han encontrado genes *cry* dentro del cromosoma y es una característica particular que una cepa nativa de *B. thuringiensis* tenga varios plásmidos que codifiquen para más de una delta endotoxina. Los genes *cry1* están en su mayoría como unidades monocentrónicas, cuyos sitios de inicio de la transcripción están inmediatamente arriba del gene y tienen un terminador *rho* independiente corriente abajo de la región codificante, mientras que hay otros genes (*cry2A*, *cry2B* y *cry11A*)

que forman parte de un operón y que están acompañados de una chaperona conocida como p20

B. thuringiensis produce sus proteínas tóxicas durante la fase de esporulación y las almacena hasta que sobreviene la lisis celular. Se ha observado y cuantificado la cantidad de proteína Cry producida y se ha encontrado que puede llegar a ser hasta el 25% del peso seco de la bacteria. Esta producción ocupa gran parte de la maquinaria celular de la bacteria y está coordinada con la fase de esporulación. Estos procesos están controlados por una serie de mecanismos de regulación a nivel transcripcional, postranscripcional y postraducciona

En *Bacillus subtilis* existe mucha información acerca del mecanismo de regulación espacial y temporal del proceso de esporulación. La esporulación es controlada a nivel transcripcional por una sucesiva activación de factores sigma, los cuales se unen a la RNA polimerasa para dirigir la transcripción de promotores específicos para la esporulación. Se sabe que el factor σA es activo durante la fase vegetativa y los factores σH , σF , σE , σG y σK son activos durante la fase de esporulación y cada uno de éstos aparece en un orden durante el desarrollo. σA y σH aparecen en la fase de transición, σE y σK son activas dentro de la célula madre y σF y σG son activas en la preespora.

Para *B. thuringiensis* se ha encontrado que los genes *cryI* presentan dos promotores sobrelapados BtI y BtII y cada uno es activado a diferentes tiempos durante la esporulación, se sabe que la transcripción de BtI es dependiente de un factor con un 88% de identidad a σE de *B. subtilis*, mientras que BtII es dependiente de un factor como σK (Agaisse, H 1995).

Otro factor importante que contribuye a maximizar la expresión de los genes *cry*, es la producción de RNA mensajero (RNAm) muy estable. Se ha reportado que tiene una vida media de 10 minutos y se sabe que los factores que le confieren estabilidad, se encuentran localizados en segmentos no codificantes, ya sea como estructuras terminales en el extremo 3' o bien como estabilizadores de RNAm en el extremo 5' (Agaisse, H 1995).

NOMENCLATURA Y CLASIFICACION DE LAS δ -ENDOTOXINAS

En 1989 Höfte y Whiteley hicieron una clasificación de las toxinas Cry de acuerdo al orden de insecto contra el que son específicos; así las proteínas tóxicas contra lepidópteros se denominaron CryI, aquellas que son tóxicas contra lepidópteros y dípteros se llamaron CryII, CryIII son tóxicas para coleópteros y las CryIV son específicas para dípteros. Posteriormente, creció el número de secuencias reportadas y se decidió que las proteínas Cry se clasificarían de acuerdo a la homología en su secuencia de aminoácidos. Se propuso que el nombre Cry se conservara y a cada proteína se le asignó un nombre compuesto por 4 categorías. En la primera categoría se cambió el número romano por un número arábigo y a todo gen cuyo producto muestra una homología menor al 45% respecto de las proteínas conocidas se le asigna un nuevo número arábigo. La segunda categoría es una letra mayúscula y se le asigna una nueva letra a todo gen cuya secuencia comparta menos del 75% de homología pero más del

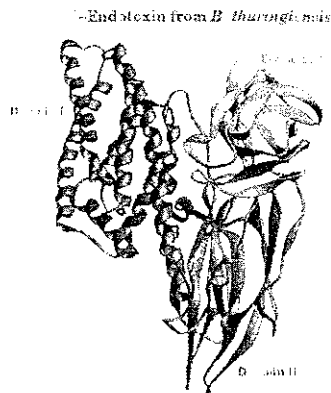
45%. La tercera categoría es una letra minúscula y se asigna a todas las proteínas que compartan menos del 95% de homología pero más del 75%. Para diferenciar a las proteínas que varían solamente en algunos residuos, se asigna una cuarta categoría que consiste en un número arábigo y se le asigna a las proteínas que presentan una homología entre el 95 y 100%

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS TOXINAS Cry

Las proteínas Cry se producen como protoxinas de 70 hasta 130 kDa y son almacenadas en la célula madre en forma de cristales. Dependiendo de su composición estos tienen formas cúbicas, romboidales, bipiramidales, esféricas o irregulares (Schnepf, *et al* 1998)

El fragmento tóxico de aproximadamente 60 kDa se produce después de varios cortes proteolíticos por enzimas digestivas presentes en el intestino del insecto

Hasta el momento se ha determinado la estructura tridimensional de las toxinas Cry3A, Cry1Aa y Cry2Aa y las tres proteínas presentan una estructura globular, compuesta de 3 dominios (Figura 2)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2 Estructura tridimensional de la toxina Cry3a

Dominio I

El dominio I, de aproximadamente 220 aminoácidos, consta de ocho hélices alfa antiparalelas arregladas de forma circular y una hélice alfa central. Algunas de las hélices ($\alpha 3$ - $\alpha 7$) son lo suficientemente largas y anfipáticas para atravesar la membrana, por lo que se ha propuesto que este dominio tiene la capacidad de formar poros en la membrana del epitelio intestinal.

El dominio I tiene similitud con otras toxinas formadoras de poros tales como la colicina A que consta de 2 hélices α centrales rodeadas por ocho hélices α antiparalelas.

(Parker, M W *et al* 1992), o la toxina de la difteria que se propone entra en la membrana por la formación de una estructura tipo “pasador”(Zhan H *et al* 1994)

Se ha propuesto que el dominio I se inserta en la membrana de acuerdo a un modelo llamado de sombrilla, donde un par de hélices se insertan en la membrana y el resto del dominio I se reorganiza sobre la superficie de la membrana simulando una sombrilla abierta (Figura 3). Se hicieron mutaciones que generan puentes disulfuro dentro del dominio I y entre dominio I y II para restringir el movimiento de la proteína. Estas mutantes se analizaron en bicapas sintéticas, en presencia y ausencia de agentes reductores. Los resultados concuerdan con el modelo de sombrilla, es decir, las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se insertan en la membrana (Schwartz J L. *et al* 1997).

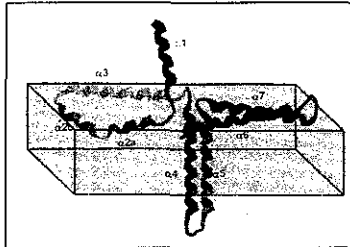


Figura 3 Modelo de sombrilla. Modificado de Gazit *et al* 1998

También se diseñaron péptidos sintéticos de cada una de las hélices y se midió su capacidad de insertarse en la membrana. Se encontró que a excepción de la hélice $\alpha 1$ todos tenían la capacidad de insertarse en una membrana sintética de fosfolípidos y que las hélices 4 y 5 tienen la capacidad de asociarse en el interior de la membrana y que se orientan de forma antiparalela (Gazit E. *et al* 1998). También se reportó que el dominio I aislado en presencia de membranas sintéticas es capaz de formar canales iónicos

Estudios de mutagénesis sitio-dirigida permitieron identificar algunos aminoácidos que están involucrados en la toxicidad de la proteína. En la proteína Cry1Ab se sabe que sustituciones no conservativas en el aminoácido R93 que se encuentra entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ provocan una pérdida de la actividad debido a que probablemente está involucrado en dar conformación a estas dos hélices (Wu, D. *et al* 1992). Mutaciones al azar en las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ provocan la pérdida de actividad *in vitro* (Manoj Kurmar A S *et al* 1999). Sin embargo, otras mutaciones permitieron encontrar mutantes que mejoraban hasta en 5 veces la actividad de la proteína silvestre. La mayoría de esas mutaciones caían dentro de las hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$ y en el lazo entre las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ (Yamamoto I, and Dean, D 2000).

Por otro lado mutaciones en la hélice $\alpha 7$ disminuyen la toxicidad de la proteína sin disminuir la afinidad de unión al receptor, haciendo análisis de permeabilidad a iones se encontró que el poro es menos permeable a Rb^+ que a K^+ . Es por eso que se le atribuye una posible participación en la estructuración del poro (Alcantara, E P *et al* 2001)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dominio II

El dominio II, de aproximadamente 209 aminoácidos, consta de tres hojas beta acomodadas en forma de un prisma piramidal, las dos primeras hojas beta están constituidas por cuatro cadenas beta y la tercera hoja tiene solamente tres cadenas beta. Las hojas 1,2 y 3 están unidas por lazos de 3, 13 y 8 aminoácidos respectivamente y que se encuentran agrupadas en el ápice del prisma.

Los lazos del dominio II se encuentran en una región hipervariable por lo que se propuso que confieren la especificidad a la toxina. Al hacer mutagénesis sitio-dirigida se identificaron algunos residuos involucrados en la unión específica a membranas de lepidópteros y coleópteros (Li, J. *et al* 2001). Se propone que todos los lazos pueden participar en la unión al receptor (Schnepf *et al* 1998).

Por comparación de estructuras se sabe que este dominio tiene una topología parecida a la de cuatro proteínas que unen carbohidratos: la jacalina que se encuentra en plantas, la proteína I que es constituyente de la membrana vitelina del huevo, la aglutinina de *Macula pomifera* y la KM+ de *Artocarpus integrifolia*. Sin embargo hasta ahora no se ha determinado la unión del dominio II a algún carbohidrato en particular, pero se ha demostrado que el dominio III es el que participa en la unión a la N-acetilgalactosamina de la aminopeptidasa (Burton, S L. *et al* 1999)

Dominio III

El dominio III, de aproximadamente 143 aminoácidos, consta de dos hojas beta arregladas de forma antiparalela, formando un β -sandwich.

La estructura de β -sandwich puede estar participando en varios pasos claves en la función de la toxina. Se ha propuesto que el dominio III participa conservando la integridad de la toxina protegiéndola de posteriores proteólisis (Li, J. *et al* 1991). Sin embargo, otros estudios han demostrado que este dominio interacciona con un receptor localizado en el epitelio intestinal. Se demostró que los residuos N506, Q509 y Y513 de la proteína CylAc participan en la unión a la N-acetilgalactosamina de la aminopeptidasa en *Manduca sexta* (Burton, S L. *et al* 1999). Se hicieron intercambios del dominio III entre toxina la Cry1Ab, que no es tóxica para *Spodoptera exigua* y la Cry1Ca que es altamente tóxica y se encontró que al intercambiar el dominio III también se intercambiaba la especificidad del receptor, poniendo de manifiesto la importancia de este dominio en la especificidad (de Maag R. *et al* 1996).

La toxina se encuentra estrechamente empaçada ya que existen aproximadamente 16 puentes salinos y muchas interacciones de van der Waals. Estas interacciones se encuentran principalmente entre los dominios I-II y I-III. Estudios recientes demostraron la importancia de estos puentes salinos, ya que al romperlos se logra una mejor inserción en la membrana pero hay una menor toxicidad debido a que la toxina queda menos empaçada y es más susceptible de ser procesada por las proteasas del intestino (Coux, F. *et al* 2001).

Dentro de la secuencia de las proteínas Cry existen 5 bloques conservados que se encuentran en regiones estructuralmente importantes. El bloque 1 comprende la hélice 5 del dominio I y se propone se inserta en la membrana; el bloque 2 abarca la hélice $\alpha 7$ y la primera hoja beta del dominio II en donde se encuentran los aminoácidos que participan en las interacciones entre los dominios I y II. El bloque 3 contiene las últimas hojas beta de dominio II, cuya ubicación está involucrada en la interacción entre dominio II y III. El cuarto bloque corresponde a la hoja beta 17 del dominio III y el último bloque está formado por la hoja beta 23 del dominio III.

En una revisión elaborada en 1998 por Schnepf, E y colaboradores, encontraron otros tres bloques conservados localizados en el carboxilo terminal de la protoxina que es completamente procesada durante la fase de activación. Esto sugiere que tal vez esta secuencia de aminoácidos pudiera ser importante para la adecuada cristalización de la toxina dentro de la bacteria (Crickmore pp72).

ANALISIS FILOGENETICO

Con las secuencias reportadas para las proteínas Cry se hizo un análisis filogenético que permitió entender cómo es que estas proteínas han evolucionado (Bravo, A 1997). Este análisis se hizo para cada uno de los dominios por separado, y se elaboraron los árboles filogenéticos para cada dominio que se muestran en la Figura 4.

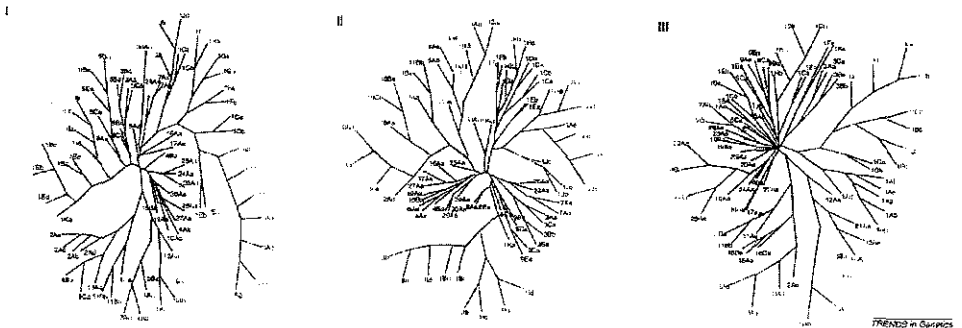


Figura 4 Árboles filogenéticos pertenecientes al dominio I (I) dominio II (II) y dominio III (III)
Tomado de de Maag R *et al* 2001

Los árboles para los dominios I y II muestran una correlación entre el patrón de agrupamiento y la especificidad global hacia un orden de insectos; estos resultados resultan un tanto sorprendentes ya que el dominio I no se propone como un determinante de especificidad sin embargo esto podría ser consecuencia de procesos evolutivos en los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cuales se seleccionaron diferentes tipos de dominios I para actuar en las diferentes condiciones de intestino de distintos insectos, tales como la composición de la membrana y el pH (de Maag R. *et al* 2001).

El dominio III muestra una distribución diferente, es decir la distribución de dominios no está directamente relacionada con la especificidad de la toxina, lo que sugiere que este dominio ha evolucionado independientemente de los dominios I y II. Se propone que durante la evolución de estas proteínas se llevaron a cabo eventos de intercambio del dominio III entre diferentes proteínas (de Maag R. *et al* 2001).

MECANISMO DE ACCION

Una vez que los insectos han ingerido hojas o granos contaminados con restos de *B. thuringiensis*, dejan de comer debido a una parálisis intestinal y, posteriormente, mueren debido a una lisis celular en las células del intestino.

El aparato digestivo de los insectos está dividido en tres secciones y cada una de ellas tiene una función especial. La región anterior se relaciona con la ingestión, trituración y el almacenamiento de la comida, mientras la parte media es el sitio de producción enzimática, digestión y absorción. Finalmente la región posterior sirve para la absorción de agua y formación de heces (Barnés 1989).

El intestino medio está recubierto por una membrana que rodea directamente la comida en el lumen y que se conoce como matriz peritrófica; es sintetizada por el epitelio digestivo, frecuentemente en respuesta a la tensión del intestino medio durante la ingesta de comida.

La matriz peritrófica está compuesta básicamente por quitina, proteoglicano y proteínas. Las proporciones de estos constituyentes varía de especie a especie y durante los estadios de desarrollo. Esta matriz funciona como barrera protectora contra patógenos ya que recubre a las células epiteliales; también es capaz de compartamentalizar e inmovilizar enzimas.

Dentro del intestino medio de los insectos existe una gran cantidad de enzimas que procesan los alimentos. A continuación se muestra una tabla donde se resumen el tipo de enzimas que se han encontrado, condiciones óptimas de trabajo y en qué insectos han sido caracterizadas.

Tabla 2 Enzimas presentes en el intestino de los insectos

Enzima	Nombre	pH óptimo	Insecto
Peptidasas	Tripsina	8-10	O,C,Hi,D,I y T
	Quimiotripsina	8.2-10	O,C,Hi,D yL
	Cistein proteasas	5.5-6	C,H,Hi y T
	Aspartic-proteasas	3.3 -3.5	H,C yD
	Aminopeptidasas	7.2-8.5	O,I,H,C,Hi yD
	Carboxipeptidasa	7.6-8.5	O,C,D y L
Glucosidasas	α -amilasa	4.8-9.5	O,C,Hi,D yL
	Celulasa	Nc	C
	Hemicelulasa	Nc	O,Tri,I
	Quitinasas	Nc	D,L
	Lisosima	Nc	D
	A glucosidasas	3.7-7.3	H,C,D,I yHi
	β -glucosidasas	4.5-6.5	O,H,C,D y L
	Fructosidasas	6	L
	Trehalasa	4.8-6	C,D,L, Hi y Dic
Lipasas	Fosfolipasas	Nc	C
	Estearasas	Nc	Dic, I yD
	TAG y MAG lipasas	Nc	O,LY Dic

Abreviaciones: C coleópteros, D dípteros, L lepidópteros, I isópteros, Hi himenópteros, O ortópteros, T trisánura, H hemipteros, Dic dictópteros Tri tricópteros Nc no se conoce Nota: toda la información está resumida del libro *Biology of the insect midgut* capítulo 6

El mecanismo de acción involucra la solubilización de la protoxina en las condiciones alcalinas y reductoras del intestino medio del insecto. Posteriormente se producen cortes proteolíticos por enzimas digestivas homólogas a la tripsina o quimiotripsina, liberando el fragmento tóxico de 60 a 65 kDa. La toxina es capaz de unirse al receptor que se encuentra en la membrana de las células del intestino medio del insecto. Por último, la toxina es capaz de insertarse en la membrana y formar poros que llevan a la lisis de las células.

Solubilización

Muchas protoxinas Cry son insolubles en condiciones neutras o ligeramente ácidas, solamente pueden solubilizarse a pH alcalino y en condiciones reductoras, debido a que muchas de ellas contienen en su carboxilo terminal varios residuos de cisteínas que forman puentes disulfuro dando estabilidad al cristal. El intestino medio de muchos lepidópteros y dípteros se caracteriza por tener condiciones alcalinas y reductoras ideales para la solubilización de las protoxinas (Aronson, A. *et al* 1991).

Activación

Las proteínas Cry se producen como precursores inactivos que para volverse activos necesitan ser procesados por proteasas del intestino medio de los insectos dando

una proteína activa capaz de matar al insecto. Aproximadamente el 50% de la protoxina es removida por cortes proteolíticos, en el extremo amino terminal se eliminan aproximadamente 28 aminoácidos mientras que en el extremo carboxilo terminal se remueven alrededor de 600 aminoácidos.

En la Figura 5 se muestra el patrón de corte para algunas protoxinas.

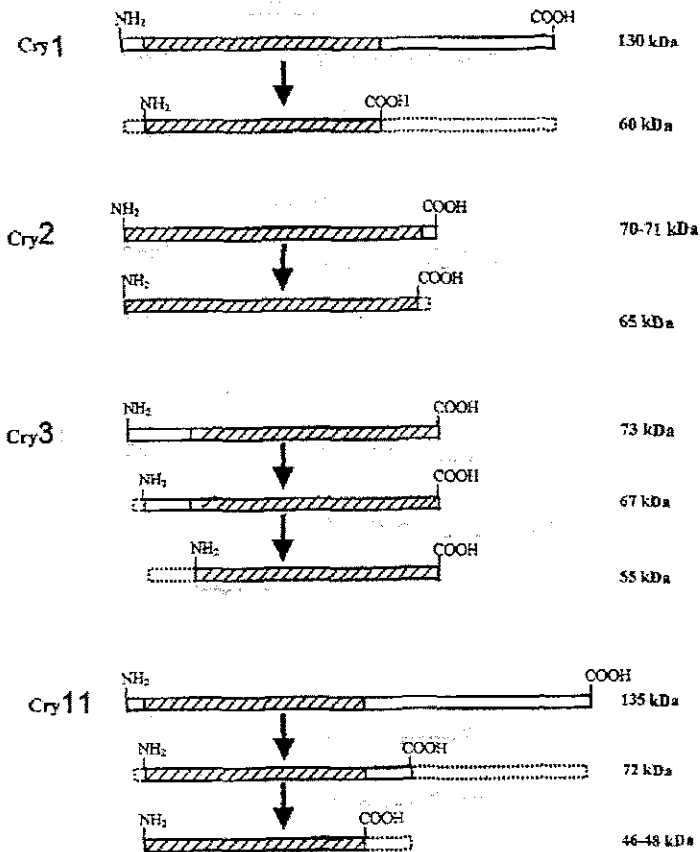


Figura 5 Patrones de corte para las toxinas Cry1 Cry2 Cry3 y Cry 11. Modificado de Rukmini V *et al* 2000

Para caracterizar estas proteínas se han hecho estudios sobre el patrón de corte utilizando varias enzimas, desde tripsina y quimiotripsina, hasta el jugo gástrico de los insectos. Estos últimos ensayos representan una forma más acertada para determinar las condiciones de activación *in vivo*.

De estos estudios se sabe que la toxina Cry1Ab sufre varios cortes intramoleculares. El primer corte se da en entre los aminoácidos Leu57 y Gly68,

localizados dentro de la hélice $\alpha 2^a$, con este corte la hélice $\alpha 1$ es eliminada, posteriormente se produce otro corte entre las hélices $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$ y finalmente se produce un corte dentro del dominio II (Miranda, R. *et al* 2001)

Estudios sobre la actividad de las toxinas después de cada corte demuestran que la toxina sin la hélice $\alpha 1$ es la que promueve mejor la formación del poro *in vitro*

Variaciones en el procesamiento de las protoxinas con diferentes proteasas pueden proveer cierta selectividad o especificidad a la toxina, por ejemplo para la toxina Cry1C1, la cual es activa contra lepidópteros o dípteros dependiendo de la forma de activación. Se propone que las proteasas de lepidópteros cortan un fragmento que va desde el aminoácido 558 hasta el 595. En un corte posterior con proteasas de dípteros se remueve el fragmento de 524-558 (Rukmini, V. *et al* 2000)

Unión a receptor

Los lepidópteros tienen células goblet y células columnares formando la monocapa del epitelio en el intestino medio; en la membrana de estas células se encuentran las microvellosidades que contienen una gran cantidad de proteínas. Dentro de estas proteínas existen dos que tienen la capacidad de unirse con gran afinidad a las toxinas Cry. A estas proteínas se le ha identificado como receptores.

Aminopeptidasa (APN) - Es una proteína de aproximadamente 120 kDa. Se propone que está asociada a una N-acetilgalactosamina (GalNac) y es capaz de unirse a las proteínas Cry. Hay reportes que indican que esta proteína está unida a la membrana por un anclador glicosil-fosfatidil inositol (GPI). Este tipo de proteínas se encuentran en regiones de la membrana conocidos como rafts. A estos complejos se les encuentra asociados con señalización intracelular y como puertas por las que algunos patógenos penetran a la célula (Rosenberger, C M. *et al* 2000).

En la toxina Cry1Ac se determinó que la unión al receptor se lleva a cabo en dos pasos y se mapearon los aminoácidos que participan en dicha unión. De acuerdo con este modelo, el reconocimiento de la APN está determinado por el dominio III, que se une a la GalNac del receptor seguido por el contacto de los lazos del dominio II al receptor (Jenkins, J L. *et al* 2000)

Por estudios estructurales, se determinó que cuando la Cry1Ac se une a la GalNac, sufre un cambio conformacional que puede hacerla competente para inserción u oligomerización (Li, J. *et al* 2001).

Caderina - Se determinó por experimentos de unión a ligando que la proteína Cry1Ab es capaz de unirse a una proteína de 210 kDa en vesículas de microvellosidad apical de *Manduca sexta* la cual se ha identificado como miembro de la superfamilia de las caderinas. (Garczynsky, S F. *et al* 2000). Por otro lado se hicieron estudios en poblaciones de insectos resistentes a la toxina Cry1Ac. Se encontró que estos insectos tienen interrumpido el gen que codifica para una proteína de la familia de las caderinas, lo que apoya fuertemente el papel de esta proteína como receptor (Gahan, I J. *et al*

2001). Así mismo la expresión de la caderina de *Bombix mori* en células Sf9 hace que estas células se vuelvan sensibles a la toxina CryIAa.

Oligomerización y formación de poro.

Aún no se sabe si la unión de la toxina a estas proteínas sólo involucra la posibilidad de que la toxina se oligomerice y se inserte en la membrana, o bien si este evento promueve una cadena de señalización intracelular y lo que aunado a la formación de poros lleve a la lisis y muerte celular.

Después de la unión al receptor se propone que ocurre un cambio conformacional que hace que la toxina sea competente y pueda insertarse en la membrana. Se han hecho estudios en donde se rompen los puentes salinos y por tanto la molécula tiene mayor movilidad. Estudios *in vitro* muestran que estas mutantes forman poros igual que la toxina silvestre, y que se insertan mucho más rápido (Coux, F. *et al* 2001).

En un principio se determinó que proteínas tales como la CryIAc, Cry3B y CryIC son capaces de formar poros de aproximadamente 10-20 Å en bicapas sintéticas y con analogía a otro tipo de toxinas se propuso que las proteínas Cry forman oligómeros conteniendo de 4 a 6 unidades que les permiten insertarse en la membrana (Knowles, B H *et al* 1987) Hasta ahora los estudios han demostrado que las toxinas pueden formar agregados de aproximadamente 200 kDa y que se requieren por lo menos 4 monómeros de toxina para poder formar poros (Soberón, M *et al* 2000)

Hasta el momento se desconoce cuáles son los eventos involucrados poco antes de la formación de poro. Pero se puede pensar en algunas posibilidades; por ejemplo:

- 1) Que las toxinas se oligomericen y posteriormente se unan al receptor para poder insertarse
- 2) Que la toxina se una al receptor, se inserte en la membrana y, una vez ahí se formen los agregados,
- 3) Que la toxina se una al receptor, forme un preporeo con varios monómeros y posteriormente se inserte en la membrana

ANTECEDENTES

En muchos aspectos, el triptófano (Trp) es un aminoácido muy especial. De todos los residuos es el que tiene una área superficial mayor, consta de dos anillos, un anillo bencénico que es altamente hidrofóbico y un anillo heterocíclico que tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno (Uttamkumar, S *et al* 2000) (Figura 6). Por otro lado, de acuerdo con modelos propuestos para evaluar cambios evolutivos en las proteínas se sabe que el triptófano está altamente conservado, es decir que difícilmente cambia por otro residuo a lo largo de la evolución (Dayhoff, M O 1978)

2001). Así mismo la expresión de la caderina de *Bombix mori* en células Sf9 hace que estas células se vuelvan sensibles a la toxina CryIAa.

Oligomerización y formación de poro.

Aún no se sabe si la unión de la toxina a estas proteínas sólo involucra la posibilidad de que la toxina se oligomerice y se inserte en la membrana, o bien si este evento promueve una cadena de señalización intracelular y lo que aunado a la formación de poros lleve a la lisis y muerte celular.

Después de la unión al receptor se propone que ocurre un cambio conformacional que hace que la toxina sea competente y pueda insertarse en la membrana. Se han hecho estudios en donde se rompen los puentes salinos y por tanto la molécula tiene mayor movilidad. Estudios *in vitro* muestran que estas mutantes forman poros igual que la toxina silvestre, y que se insertan mucho más rápido (Coux, F. *et al* 2001).

En un principio se determinó que proteínas tales como la CryIAc, Cry3B y CryIC son capaces de formar poros de aproximadamente 10-20 Å en bicapas sintéticas y con analogía a otro tipo de toxinas se propuso que las proteínas Cry forman oligómeros conteniendo de 4 a 6 unidades que les permiten insertarse en la membrana (Knowles, B H *et al* 1987) Hasta ahora los estudios han demostrado que las toxinas pueden formar agregados de aproximadamente 200 kDa y que se requieren por lo menos 4 monómeros de toxina para poder formar poros (Soberón, M *et al* 2000)

Hasta el momento se desconoce cuáles son los eventos involucrados poco antes de la formación de poro. Pero se puede pensar en algunas posibilidades; por ejemplo:

- 1) Que las toxinas se oligomericen y posteriormente se unan al receptor para poder insertarse
- 2) Que la toxina se una al receptor, se inserte en la membrana y, una vez ahí se formen los agregados,
- 3) Que la toxina se una al receptor, forme un preporo con varias monómeros y posteriormente se inserte en la membrana

ANTECEDENTES

En muchos aspectos, el triptófano (Trp) es un aminoácido muy especial. De todos los residuos es el que tiene una área superficial mayor, consta de dos anillos, un anillo bencénico que es altamente hidrofóbico y un anillo heterocíclico que tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno (Uttamkumar, S. *et al* 2000) (Figura 6). Por otro lado, de acuerdo con modelos propuestos para evaluar cambios evolutivos en las proteínas se sabe que el triptófano está altamente conservado, es decir que difícilmente cambia por otro residuo a lo largo de la evolución (Dayhoff, M O 1978).

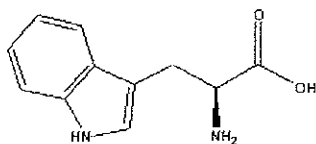


Figura 6. Estructura del triptofano

Además de sus características físicas, tiene otras características estructurales muy importantes. Se propone que la estructura del triptofano es muy similar a la de las bases púricas del DNA, y los sitios de unión en donde se encuentran los triptofanos pueden asemejarse a las regiones de las proteínas donde ocurre la interacción alrededor de las bases como sucede con el DNA. Según esta observación se propone que tal vez el triptofano pudiera tener un importante papel en la interacción con moléculas que tienen cofactores como la adenina (Uttamkumar, S. *et al* 2000)

El Trp también juega un papel importante en la estructura de muchas proteínas y en la interacción de estas con otras moléculas. El ejemplo mejor conocido es el del represor de triptofano en *E. coli*, que reprime la transcripción de algunos operones en presencia de un exceso de triptofano.

También se propone que la participación de un anillo aromático es muy importante en la interacción de las lectinas con un residuo de carbohidrato. Algunos miembros de la familia de las lectinas tienen la secuencia QXW como consenso en el sitio de reconocimiento.

Otro ejemplo de la conservación del triptofano en secuencias, es el motivo WSXWS que se encuentra en los miembros de la clase I de receptores de la superfamilia de las citocinas (Uttamkumar, S. *et al* 2000).

También se ha descrito que existen dominios WW, que participan en la interacción proteína-proteína y su presencia se asocia a algunas enfermedades como distrofia muscular o hipertensión (Staub O, *et al* 1996).

Se propone que los residuos de triptofano son capaces de conferir estabilidad térmica a una proteína, ya que proteínas que son privadas de algunos de estos residuos disminuyen su T_m hasta en 20°C (Chang, Y. 1997).

Otros estudios proponen que los residuos de Trp pueden estabilizar estructuras cuaternarias y ayudar en procesos de plegamiento. En cuanto a la estabilización por triptofano se conocen algunos ejemplos y se ha determinado que estos residuos generalmente se encuentran en la interfase lípido-agua ya sea en la parte interna o externa de la membrana y se propone que cumplen la función de posicionar a la proteína dentro de la membrana (Schiffer, M. *et al* 1992). Estudios más detallados en bicapas sintéticas de fosfatidilcolina han reportado que el anillo nitrogenado del triptofano se mantiene preferencialmente en la interfase polar/no polar, muy cerca de los grupos carbonilo, mientras que el anillo aromático está en contacto con las cadenas acídicas de los lípidos (de Planque, M.R.R. *et al* 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los análisis de las proteínas de membrana cuyas estructuras tridimensionales han sido reportadas muestran que los residuos de triptofano y tirosina prefieren localizarse en las regiones que corresponden a las superficies de la membrana, lo que sugiere que tienen una participación como posicionadores de la proteína (Yau W-M. *et al* 1998, White, D.H. *et al* 1999)

La tirosina, la fenilalanina y el triptofano tienen electrones deslocalizados participando en los enlaces π lo que les permite absorber radiación electromagnética y posteriormente emitir fluorescencia, cada uno de ellos a una longitud de onda particular.

La fluorescencia que se registra en las proteínas se debe principalmente a los residuos de triptofano. El anillo indólico es altamente sensible a la polaridad de los solventes, por lo tanto el espectro de emisión de este residuo puede reflejar la polaridad del ambiente que lo rodea. Es decir, se puede saber si la proteína se encuentra desnaturada o asociada a otra molécula, por ejemplo, algún sustrato.

Otra característica importante, es que la fluorescencia del triptofano puede ser apagada por algunas sustancias tales como yoduros, oxígeno, acrilamida, succinimida, entre otras. Esta sensibilidad se atribuye a la facilidad con que el anillo indólico dona electrones cuando se encuentra en su estado excitado. Esta propiedad permite determinar la exposición o accesibilidad al solvente de los residuos de Trp en una proteína.

Se han hecho estudios estructurales midiendo la fluorescencia del triptofano en algunas proteínas. Las estrategias utilizadas, consisten en monitorear la fluorescencia intrínseca de la proteína nativa y apagar gradualmente esta fluorescencia con algún apagador en solución o poniendo a la proteína en contacto con su sustrato o con membranas lipídicas (Raja, S. *et al* 1999, Verza, G. *et al* 2000 y Weitzman, C. *et al* 1995)

La proteína Cry1Ab tiene dentro de su secuencia nueve triptofanos, siete de los cuales están localizados en el dominio I, es decir en el dominio que se propone se inserta en la membrana.

Con la finalidad de hacer estudios que nos permitan establecer la relación estructura-función de la proteína Cry1Ab utilizando espectroscopia de fluorescencia se decidió fabricar mutantes puntuales en cada triptofano de la proteína cambiándolos por fenilalanina. Este cambio en principio no afecta de manera importante la estructura y plegamiento de la proteína pero eliminando la contribución a la emisión de uno de los residuos de Trp.

OBJETIVO GENERAL

-Caracterizar las mutantes puntuales de triptofano por fenilalanina en cada uno de los pasos del mecanismo de acción

OBJETIVO PARTICULAR

-Construir mutantes puntuales de triptofano por cisteína

MATERIAL Y METODOS

Obtención de proteínas de *E.coli*.

Se siembra sobre placa de medio LB la cepa de *E coli* a 37° C durante 12 horas (hrs)

Se inocula 4 ml de medio "Terrific Broth" (TB) ampicilina a 100 µg/ml (amp¹⁰⁰), con una colonia aislada de *E. coli* y crecer a 37° C durante 8 hrs

Se inocula 440 ml de TB amp¹⁰⁰ (400ml de TB y 40ml de sales de fosfatos +100 µl de ampicilina)

Se incuba de 48 a 60 hrs a 37°C.

Se distribuye en botellas para centrifugar a 5,000 r p m en rotor SS34 Sorvall durante 5 minutos (min)

Se resuspende la pastilla y se agregan 50 ml de solución de lisis a cada botella, la pastilla se resuspende con ayuda de una pipeta Pasteur y a la suspensión se le agregan 2 mg de lisosima y se deja durante 12 hrs a 37° C

Se centrifuga la solución a 10,000 r p m durante 10 min en rotor SS34 Sorvall Se decanta el sobrenadante.

Se resuspende la pastilla en 30 ml de solución de lavado I

Se sonicán las células con 10 pulsos de 10 segundos(seg), con descansos de 30 seg , manteniendo las botellas en hielo.

Se centrifugan las células 10 min a 10,000 r p m en rotor SS34 Sorvall

Se resuspende la pastilla con vórtex en solución de lavado I y se centrifuga a 10,000 r.p.m. durante 10 min en rotor SS34 Sorvall Hacer 4 lavados como el anterior.

Se resuspende la pastilla en 30 ml de solución de lavado II y se centrifuga a 10,000 r p m durante 10 min Estos lavados se repiten 3 veces mas

La pastilla se resuspende en 20 ml de agua estéril con PMSF 0.1mM se centrifuga a 10,000 r.p.m. por 10 min y se repite el lavado una vez mas

Por último se resuspende la pastilla en 5 ml de agua con PMSF 0.1mM

Medio TB

Bactotripton	12g
Extracto de levadura	24g
Glicerol conc	4ml
H ₂ O cbp	900ml

Sales de fosfato

KH ₂ PO ₄	2.3g
K ₂ HPO ₄	12.56g
H ₂ O cbp	100ml

Medio LB

Peptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
H ₂ Ocbp	1000ml

Solución de lisis

Tris	50mM
EDTA	50mM
Sacarosa	15%

Solución de lavado I

NaCl	0.5M
------	------

Solución de lavado II

NaCl	0.5M
TritonX-100	2%

Cepas y plásmidos

Cepa o plásmido	Características
E.coli MV1190	Amp ⁻ , Δlac , Δpro , $\Delta recA$
E.coli DH5 α	Amp ⁻ Nal ⁺ , $\Delta recA$
pBluescriptSK+	Amp ⁺ , lac
pHCPP	Amp ⁺ , origen ColE1.

Bioensayos

Se utilizan larvas de *Manduca sexta* del primer estadio de crecimiento, en placas de 24 pozos con una capacidad de 4ml. En cada pozo se ponen 2 ml de medio de cultivo y se le agregan 35 μ l de la solución con la concentración de toxina que se desea ensayar contra de las larvas (desde 2 ng hasta 500 ng). En cada pozo se coloca una larva y se dejan creciendo de 7 a 8 días. A los 8 días se cuantifican las larvas muertas y se saca el porcentaje de mortalidad con respecto a la silvestre.

Ensayo de solubilidad

La protoxina se solubiliza. Se deja solubilizando durante 2 hrs a 37° C. Después se centrifuga a 10000 r p m durante 5 min. Se guarda el sobrenadante y la pastilla se elimina.

Activación por tripsina.

Se toman 100 μ g de protoxina solubilizada, se adicionan 100 μ l de buffer Tris-HCl pH 8 se le adiciona tripsina solubilizada en relación 1:10, 1:20, 1:50 y 1:100 (m/m). Se incuba durante 2 hrs a 37° C con agitación y se inactiva con PMSF a una concentración final 1mM.

Activación en presencia del anticuerpo scFv73

Se toman 100 µg de protoxina y se pone a incubar con el anticuerpo en proporción 1:1 m/m. durante 1h a temperatura ambiente. Una vez cumplido este tiempo se adicionan las proteasas* en una relación 1:10 m/m. Se deja incubando 1hrs a 37° C. Las proteasas se inactivan con PMSF 1mM concentración final.

La mezcla de reacción se centrifuga 10 min a 10,000 r.p.m.

Se desecha la pastilla y se guarda el sobrenadante para hacer los ensayos de formación de poro.

*Las proteasas que se utilizaron en este ensayo fueron:

Tripsina - Se solubilizan 10 mg de tripsina de la marca SIGMA en 1 ml de una solución con HCl 1mM y CaCl₂ 5mM

Jugo gástrico - Se disectan larvas de *Manduca sexta* del 5° estadio de crecimiento, se corta un segmento del intestino y se extrae el contenido gástrico junto con la matriz peritrófica, se coloca en un tubo y se centrifuga a 5,000 r.p.m. Se toma el sobrenadante y se hace pasar por un filtro de 0.22 µm. Las proteínas se cuantifican por el método de Bradford y se guarda a -70° C

Purificación de anticuerpo scFv73

Día 1

Se siembra una colonia de *E coli* en 50 ml de medio 2xTY con glucosa al 2% y 50 µg/ml de ampicilina.

Se incuba durante 12 hrs a 25° C y 250 r.p.m.

Se pre-calientan a 37° C dos matraces con capacidad para 2 l

Día 2

Se siembran 5 ml del cultivo del día 1 en 500 ml de medio 2xTY con glucosa al 0.1% y ampicilina 100 µg/ml.

Se incuban a 37° C a 200 r.p.m. hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 a 600 nm

La expresión de la proteína se induce con 0.5 mM de IPTG

Se incuban a 25° C durante 4 hrs. a 200 r.p.m.

Se colectan las células centrifugando el cultivo a 5,000 r.p.m. durante 15 min

La pastilla se resuspende en 1/4 de solución PPB (12.5 ml) y se mantiene en hielo por 20 min.

Se centrifuga a 5,000 r.p.m. durante 15 min y se recolecta el sobrenadante (suspensión1)

La pastilla se resuspende en 1/4 de solución de MgSO₄ 5 mM (12.5 ml) y se mantiene en hielo por 20 min (suspensión2)

La suspensión 1 y 2 se centrifugan a 15,000 r.p.m. durante 15 min y se recolecta el sobrenadante

El sobrenadante se transfiere a una membrana de diálisis y se dializa por 14 hrs en 4 l de buffer PBS 1X.

Día3

Se prepara una columna con resina agarosa-níquel-NTA

La resina se lava con 10 ml de una solución de imidazol 20 mM en PBS
 El sobrenadante previamente dializado se carga en las columnas.
 La columna se lava con una solución de imidazol 35 mM en PBS.
 Los dos últimos ml del lavado se recolectan.
 La muestra se eluye con 2 ml de solución IMAC.
 Las columnas se regeneran con una solución de imidazol 500 mM en PBS, se equilibran y se almacenan con 2 ml de PBS 1X y azida al 0.2%.

Medio 2xIY.

Triptona	16g
Extracto de levadura	10g
NaCl	5g
H ₂ Ocbp	1000ml

PBS

NaH ₂ PO ₄	42.64g
Na ₂ HPO ₄	4.72g
NaCl	5.84g
H ₂ Ocbp	1000mL.

Solución PPB

Sacarosa	200mg/ml
EDTA	1mM
Tris-HCl	30mM pH8

Activación por vesículas

Se toman 100 µg de toxina y se ponen a incubar con 10 µg de vesículas de microvellosidad apical, purificadas sin inhibidores de proteasas. Se incuban durante 45 min a 37° C. Se inactivan las proteasas con PMSF a una concentración final de 1 mM. La mezcla de reacción se centrifuga a 10,000 r p m. durante 10 min. Se desecha la pastilla y se guarda el sobrenadante para hacer ensayos de formación de poro.

Purificación de vesículas de microvellosidad apical (VMVA) de larvas de *Manduca sexta*.

Se descongelan en hielo los intestinos, se pesa una cantidad entre 2.5 y 3 g
 La muestra se coloca en el homogeneizador previamente sumergido en hielo y se agregan 30 ml de sol I
 Se coloca el émbolo de teflón en el taladro. Se dan 9 golpes a 2,250 r p m. Estos golpes deben ser suaves, el primer golpe no debe llegar al fondo del homogeneizador solo debe comprimir el tejido, los demás golpes se dan de una manera suave y llegando hasta el fondo del homogeneizador
 Después de los 9 golpes se agregan 30 ml de la sol II, la adición debe ser resbalando el líquido por las paredes del homogeneizador, suavemente
 Se coloca un parafilm en la boca del homogeneizador y se mezcla suavemente por inversión. El homogeneizador se coloca en hielo por 15 min, durante este tiempo se agita por inversión de 5 o 6 veces

En este paso se toman 200 μ l de muestra para hacer las determinaciones de actividad enzimática de fosfatasa alcalina y aminopeptidasa.

*Una vez transcurridos los 15 min la solución se transfiere a dos tubos para centrifuga y se centrifuga a 4,500 r.p.m. durante 15 min a 4° C en un rotor JA-20 Beckman.

*El sobrenadante se transfiere a otros tubos previamente esterilizados y la pastilla se descarta

*El sobrenadante se centrifuga a 16,000 r p m. durante 30 min a 4° C usando el equipo antes descrito.

Se desecha el sobrenadante y la pastilla de un tubo se resuspende en 15 ml de sol I fría con ayuda de vórtex (suavemente procurando despegar la pastilla) y se transfiere al otro tubo, la pastilla se despega suavemente con vórtex y se resuspende. Se le agrega cuidadosamente y resbalando por las paredes 15 ml de sol II fría y se mezcla por inversión, se repiten los pasos marcados con asterisco

La pastilla se resuspende muy suavemente con ayuda de vórtex en 500 μ l de sol I fría y se le adicionan 500 μ l de agua, esta mezcla se transfiere a un homogeneizador (previamente enfriado en hielo) y se coloca el embolo pequeño en el taladro

Se le dan 3 golpes suaves a 2,250 r.p.m. De esta mezcla se toman 50 μ l para hacer las determinaciones de actividad enzimática de fosfatasa alcalina y aminopeptidasa

Esta solución se transfiere a una membrana de diálisis y se dializa 12 hrs contra 1000 volúmenes (1 l de solución) en una solución de diálisis

Posteriormente se cuantifica la proteína por el método de Lowry modificado; también se hacen las determinaciones de actividad enzimática de fosfatasa alcalina y aminopeptidasa

Solución I

Manitol	300mM
Tis-HCl	17mM
EGTA(acido etilen glicol- aminoetil eter tetra acetico)	5mM
DTI(ditiotreitol)	2mM
EDIA(ácido etilendiamino tetracético)	1mM
HEPES	10mM
PMSF	0 1mM
Leupeptina	100 μ g/ μ l
Pepstatina	100 μ g/ μ l
Neomicina	
pH	7 4

Solución II

MgCl ₂	24mM
-------------------	------

Solución de diálisis

KCl	150mM
EGTA	2mM
EDTA	0 5mM

HEPES

10mM

Determinación de proteína por el método de Lowry modificado.

Se toma una muestra de 5 y 10 μ l de muestra (homogeneizado o VMVA) y se llevan a un volumen de 100 μ l. Se agregan 3 ml de la solución AB+C 100:1. Se incuba 1hr a temperatura ambiente y se agregan 3 ml de folin diluido 1:1 con agua, se incuba 45 min a temperatura ambiente. Se hace la determinación en un espectrofotómetro a 625nm y los valores se referencian a la curva estándar.

Curva estándar

De una solución de albúmina sérica de bovino (BSA) de 10 mg/ml se toman 10 ml y se hace una dilución 1:100 con agua para obtener una solución 0.1 mg/ml.

BSA 0.1 mg/ml (μ l)	H ₂ O μ l
0	1000
50	950
100	900
200	800
400	600

Solución AB

Na ₂ CO ₃	2g
SDS	1g
NaOH	0.4g
KNaC ₄ H ₄ O ₆ 4H ₂ O	0.16g
H ₂ O cbp	100ml

Solución C

CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25g
H ₂ O cbp	50ml

Determinación de aminopeptidasa.

Se prepara L-leucina-p-nitroanilida 10mM.

En una celda de poliestireno se pone la siguiente solución:

Tris-HCl	200mM
NaCl	250mM
VMVA	2-10 μ l
H ₂ O mQ cbp	900 μ l

A esta mezcla de reacción se adiciona 100 μ L de L-leucina-p-nitroanilida y se agita por inversión.

Se sigue la cinética de la reacción por 1, 3 y 5 min. en el espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a 405 nm.

Se considera que 0.1 unidades de absorbancia a 405nm equivalen a 1 μ mol/min.

Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina

Se disuelven 1mg/ml de p-nitrofenol fosfato en una solución 100 mM de tris-HCl, 0.5 mM de MgCl₂, pH9 (solución 1).

Se disuelve 1mg/ml de p-nitrofenol fosfato en una solución 100mM de tris-HCl, 0.5 mM de MgCl₂, 0.02% de triton X-100 pH 9 (solución 2).

Se dispersan 20 µg de muestra en 500 µL de la solución 1

Se agita en vórtex y se incuba 15 min a temperatura ambiente. Simultáneamente se hace lo mismo con la solución 2.

Se detiene la reacción agregando 500 µL de una solución 250 mM de EDIA ajustada a pH 8.

Se lee a 405 nm en un espectrofotómetro utilizando celdas de poliestireno de 1 cm de longitud y se refiere a una curva estándar de p-nitrofenol

La actividad enzimática específica se calcula considerando la cantidad de proteína necesaria para transformar 1 nmol de p-nitrofenol fosfato en un minuto.

La cantidad de fosfatasa alcalina se calcula en presencia y ausencia de triton -X 100 para calcular la proporción de vesículas con orientación positiva (fosfatasa orientada hacia el exterior)

Curva estándar

La curva se prepara haciendo diluciones de un estándar de p-nitrofenol 20mM en solución I

Se toman 4 puntos que son: 10, 20, 40 y 80 nM.

Biotinación de proteínas

Se ponen 0.3 mg de toxina y se le adicionan 10µL de reactivo para biotinación del módulo de biotinación de proteínas (Amersham Life Sciences). Se deja incubando durante 1 hr a temperatura ambiente. Se preparan columnas de Cefadex lavadas con 50 ml de buffer PBS 1x

La toxina biotinada se hace pasar por las columnas y se centrifuga a 2,000 r.p.m durante 2 min

Se cuantifica la proteína del sobrenadante por el método de Bradford

Se carga en un gel desnaturalizante de poliacrilamida y posteriormente se transfiere a una membrana de nitrocelulosa

La membrana de nitrocelulosa se lavan con una solución de PBS1X + Tween 20 al 2% durante 5 min.

Se hacen 2 lavados de 5 min con solución PBS1x + Tween20 al 0.05%

Se hacen 2 lavados adicionales de 5 min con una solución de PBS 1x + Tween 20 al 0.1%

Posteriormente la membrana se incuba durante 1 hr con una solución de PBS 1X y estreptavidina acoplada a peroxidasa de Amerham Life Sciences, en una relación 1:4000 v/v.

La membrana se lava con agua corriente y se le hacen 2 lavados de 10 min con una solución de PBS 1X

Se incuba con luminol del módulo SuperSignal Chemiluminiscent Substrate (Pierce) y la señal se imprime en películas para quimioluminiscencia (Amerham pharmaia biotech)

Ensayo de unión.

Se pone 10 µg de vesículas de microvellosidad apical de larvas de *Manduca sexta* en contacto con 100 nM de concentración final de toxina biotinada y se lleva a un volumen final de 100 µL.

Se deja incubando durante 1 hr a temperatura ambiente

Se centrifuga a 14,000 r.p.m. durante 10 min

Se hacen 2 lavados con 100 µL de solución de unión.

Se retira el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 15 ml de PBS y 5 ml de mezcla lítica

Esta mezcla de reacción de hierve por 3 min. en baño de María y se carga un gel de poliacrilamida al 10%.

Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa.

La membrana se lava con PBS 1x y Tween 20 al 2%.

Se incuba con estreptavidina acoplada a peroxidasa 1 hr en una dilución 1:7500

Se lava 2 veces con PBS 1x y Tween 20 al 0.05%

Se revela con luminol (el procedimiento es igual que para biotinación de proteínas).

Solución de unión

0.1% BSA

0.1% Tween20

PBS1x

Mezcla lítica

Glicerol conc 4ml

Tris-HCl (0.5 M pH 6.8) 5ml

SDS(dodecil sulfato de sodio) 0.4g

β-mercaptoetanol 1ml

Azul de bromofenol

Ensayo de formación de poro.

Se pone 1.8 ml de buffer de cloruro de metil-glucamina 150 mM y HEPES 10 mM a pH 8.

Se adiciona 1 µl de colorante 3,3'-dipropiltiodicarbocianina (diS-C3(5)).

La celda se introduce en el espectrofotómetro.

Se le adicionan 10 µg de VMVA

A los 75 seg. se adicionan la muestra ya sea 1 µL de valinomicina o bien toxina para obtener una concentración final de 100 nM

Se hacen adiciones crecientes de KCl 3 M

Extracción de plásmidos.

Se siembra en 5 ml de medio LB amp¹⁰⁰ una asada de la cepa de *E. coli*. Se incuba durante 12 hrs a 37°C

Se toma 1.5 ml de cultivo de *E. coli* con el plásmido de interés y se pone en un tubo Eppendorf.

Se centrifuga a 14,000 r p m. por 2 min

La pastilla se resuspende en 100 µl de solución I + lisosima y se deja en hielo 10 min.

Se adicionan 200 µl de solución II, se mezcla suavemente y se deja en hielo 5 min.

Se adicionan 150 µl de solución III, se mezcla bien y se incuba 10 min a -20° C.

Se centrifuga a 14,000 durante 15 min a 4° C.

El sobrenadante se transfiere a un tubo Eppendorf limpio y se adicionan 450 µl de isopropanol frío. Se deja 20 min a -20° C.

Se centrifuga 10 min a 14,000 r p m a 4° C

Se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 200 µl de agua + 20 µl de acetato de sodio 3 M pH 7

Se adicionan 440 µl de etanol frío y se centrifuga 10 min a 14,000 a 4° C

Se hacen 2 lavados con etanol frío al 80% La pastilla se seca al vacío en un savant y se resuspende el ADN en 50 µl de agua.

Solución I		Solución II		Solución III	
Glucosa	50mM	NaOH	0.2N	Acetato de potasio 5M	60ml
Iris-HCl	25mM pH 8	SDS	1%	Acido acetico glacial	11.5ml
EDTA	10mM			H2O	28.5ml

Construcción de vectores

El gen *cryIAb* se encuentra insertado dentro de un vector de 2562 pb con un origen de replicación ColE1. A este plásmido se le llama plásmido pHCPP, tiene resistencia a ampicilina y tiene un tamaño de 7034 pb. El gen *cryIAb* dentro de su secuencia tiene 2 sitios de corte para la enzima *ClaI* y dentro de este fragmento se encuentran 8 de los 9 triptofanos que presenta esta proteína

El plásmido pHCPP se cortó con *ClaI* (Biolabs) de acuerdo a la siguiente reacción:

plásmido pHCPP	1 µg
Buffer de digestión 10x	2 µl
Enzima	1 µl
H ₂ Ocbp	20 µl

Tiempo de digestión 2hrs, temperatura de digestión 37°C

Se obtuvo un fragmento de 1800 pb que se purificó con el modulo prepagene de biorad

Este fragmento se ligó al vector pSK+/- previamente digerido la enzima *ClaI*

Se utilizó T4 ligasa y buffer marca Boheringer

Fragmento <i>ClaI</i> de 1800 pb	0.5 µg
pBluescritSK+	0.1 µg
Buffer 10x	2 µl
Enzima (10,000U/µl)	1 µl
H ₂ Ocbp	20 µl

Las condiciones de la ligación fueron 12 hrs a 16°C

La reacción de ligación se transformó en células DH5 α , se seleccionó en placas de Lb amp¹⁰⁰ y se tomo una colonia como referencia. A este vector se le llamó pSKHCPP

Células competentes.

Sembrar células DH5 α sobre medio SOB sólido y crecer 12 hrs a 37° C.

Transferir 4 ó 5 colonias bien aisladas en 1 ml de medio SOB líquido + 20mM MgSO₄

El cultivo se diluye en 100 ml de medio SOB + 20mM MgSO₄ en un matraz erlenmeyer de 1 l previamente calentado a 37° C

El cultivo se crece hasta una densidad óptica entre 0.43 y 0.48 a 550 nm

El cultivo se transfiere a tubos para centrifuga y se deja en hielo 5 min , se centrifuga a 10,000 r.p.m. a 4° C durante 5 min

Se desecha el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 40 ml de medio I fb1 frío

Se deja 5 min en hielo y se centrifuga durante 5 min a 10,000 r.p.m. y 4° C

La pastilla se resuspende en 4 ml de Tfb2 frío, se deja 15 min. en hielo.

Se reparte en alícuotas de 20 μ l en tubos Eppendor previamente enfriados en hielo seco

Las células se conservan a -70° C.

Medio SOB

Bactotripton	20g
Extracto de levadura	5g
NaCl	0.5g
H ₂ O cbp	950 ml

Una vez que se disolvieron los reactivos se le agregan 10 ml de KCl 250 mM Se ajusta el pH a 7 con NaOH, se ajusta el volumen a 1 l y se esteriliza por autoclave.

Antes de usar el medio se le agregan 5 ml de una solución estéril de MgCl₂ 2 mM

I fb1

CH ₃ COOK	30mM
LiCl	100mM
CaCl ₂	10mM
MgCl ₂	50mM
Glicerol conc	15%
Ajustar pH a 5.8 con ácido acético	
Esterilizar por filtración	

I fb2

MOPS	10mM
CaCl ₂	75mM
LiCl	10mM
Glicerol conc	15%

Ajustar pH a 6.5 con KOH

Esterilizar por filtración

Transformación de *E.coli*

Se toman 50 µl de células competentes, se descongelan en hielo y se les adicionan 50 µg de ADN.

Se deja incubando 30 min.

La mezcla de reacción se pone a 42° C por 90 seg y se pone en hielo durante 2 min.

Se le agregan 200 µl de medio LB y se deja incubando a 37° C durante una hora.

Se toman 50 µl y se extienden en una caja petri con medio de cultivo LB amp¹⁰⁰.

Mutagénesis sitio-dirigida por PCR

Esta técnica consiste en diseñar oligonucleotidos (oligos) mutagénicos en el codon de interés y usar oligos que se alinean en una región en el polylinker del vector donde esta clonado el fragmento de interés.

Oligos complementarios (un oligo que alinea en el vector y un oligo mutagenico, oli1+oli2 y oli4+oli3) son usados para generar 2 fragmentos de ADN que tiene regiones sobrelapantes. Figura 7.

Estos fragmentos se mezclan posteriormente en una reacción de fusión, donde las regiones sobrelapantes se alinean y subsecuentemente el extremo 3' sobrelapados de cada cadena sirve como cebador para la extensión de la cadena complementaria. El producto resultante de esta fusión es amplificado por PCR usando los oligos que se alinean en el vector. Figura 7.

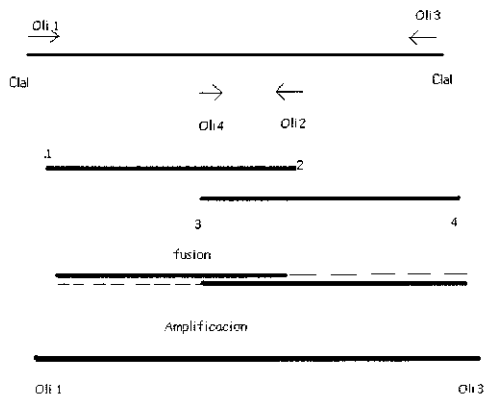


Figura 7 Técnica de mutagénesis sitio-dirigida por extensión de fragmentos sobrelapantes

Reactivos

Polimerasa
Buffer

Vent
para Vent

Biolabs

Las muestras fueron cubiertas con 100 μ l de aceite mineral.

Los ciclos de extensión y alineamiento son:

95°C	2min	1 ciclo
95°C	1 min.	
53°C	1 min.	30 ciclos
72°C	1min	
72°C	5 min.	1 ciclo

Una vez que se tuvieron los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 0.7% a 130 mV y fueron purificados con el módulo prepagene de Biorad para purificación de productos de PCR.

Sobrelapamiento y extensión de mega cebadores.

Los fragmentos generados por el PCR se mezclan en un tubo Eppendorf de 500 μ l, se calentaron en baño de María durante 7 min y posteriormente se mantiene en hielo durante 5 min. Esto con la finalidad de sobrelapar las dos cadenas de ADN. Posteriormente se agregan los nucleótidos la solución amortiguadora y la enzima con la finalidad de extender las cadenas sobrelapadas. Se usaron las siguientes condiciones de desnaturalización, alineamiento y extensión.

Mega cebador dir	100ng
Mega cebador rev	100ng
DNTP's	5 μ l
Buffer 10x	5 μ l
Agua	34 μ l
Enzima	1 μ l

El programa de extensión

72°C	3 min	1ciclo
95°C	1min	
53°C	1min	10ciclos
72°C	1min	
72°C	5min	1ciclo

Para amplificar los fragmentos extendidos se adicionaron a la mezcla de reacción los oligos I7 y I3 pertenecientes al vector donde se clonó el fragmento a amplificar. Las condiciones para obtener el PCR fueron usaron las mismas que el anterior. La mezcla que se adicionó fue:

I7	5 μ l
I3	5 μ l
dNtp's	5 μ l
Buffer 10x	5 μ l
Agua	29 μ l
Enzima	1 μ l

Las condiciones de amplificación fueron:

72°C	3 min	1 ciclo
95°C	1min	
53°C	1min	30 ciclos
72°C	1min	
72°C	5min	1 ciclo

Digestión de fragmentos

Los productos de PCR se digieren con enzima ClaI de biolabs de acuerdo a las siguientes condiciones

ADN	1 μ g
Buffer 10x	4 μ l
H ₂ O	10 μ l
Enzima	1 μ l

Clonación en pSK+/-

Los fragmentos de 1800 pb se clonaron en el vector pBluescriptSK+ de acuerdo a las siguientes condiciones:

Vector (pBluescriptSK+ digerido con ClaI)	0.1 μ g
Inserto (ADN amplificado por PCR)	0.8 μ g
Buffer 10x	2 μ l
H ₂ O	6 μ l
Enzima(ligasa)	1 μ l

El producto de la ligasa se transformó en células DH5 α y se seleccionaron las colonias blancas en medio LB amp¹⁰⁰

RESULTADOS Y DISCUSION

La proteína CryIAb tiene dentro de su estructura 9 triptofanos, los cuales están localizados como se indica en la Tabla 3

Tabla 3. Localización y conservación de los triptofanos

	Posición	Localización	Porcentaje de conservación
1	65	Entre hélice α 2a y α 2b dominio I	77
2	73	Dentro de hélice α 2b dominio I	76
3	117	Dentro de hélice α 3 dominio I	80
4	182	Entre hélice α 5 y α 6 dominio I	90
5	210	Dentro de hélice α 6 dominio I	52
6	219	Entre hélice α 6 y α 7 dominio I.	10
7	226	Dentro de hélice α 7 dominio I	70
8	316	Dentro de hoja β 3r dominio II	75
9	455	Dentro de hoja β 11 dominio II	66

El porcentaje de conservación se calculo utilizando todas las secuencias conocidas de proteínas Cry

Las mutantes fueron construidas en el laboratorio del Dr. D Dean como trabajo posdoctoral de la Dra Maria Eugenia Nuñez.

Bioensayos

Se hicieron bioensayos con larvas de *Manduca sexta* del 1er estadio de desarrollo y los resultados se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4
Mortalidad**

Cepa	% de mortalidad 200ng/cm ²
W65F	75
W73F	90
W117F	100
W182F	90
W210F	50
W219F	90
W226F	10
W316F	5
W455F	20
Wt	100

En este experimento no se determinó la dosis letal media LC₅₀. Sólo se ensayaron 3 concentraciones y lo que se reporta es el promedio de los porcentajes de toxicidad para una sola de las concentraciones

Los resultados anteriores indican que las mutantes W226F, W316F y W455F tienen una mortalidad inferior al 20 por ciento con respecto a la silvestre mientras que las mutantes W73F, W182F, W117F y W219F tienen básicamente inalterada su toxicidad. Las mutantes W65F y W210F tienen una toxicidad entre 50 y 75%. Es necesario mencionar que estos bioensayos se hicieron con proteína total, por lo que no representan potencias reales

Producción

La proteína silvestre y las mutantes se expresaron en el plásmido pSB.12 dentro de la cepa MV1190 de *E. coli*. La proteína se produjo como agregados insolubles en agua, se separó la mayoría de las membranas y el contenido intracelular de las bacterias, quedando una pastilla que está constituida principalmente por la proteína de interés. Las proteínas fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 9% y SDS.

Ocho de las nueve mutantes produjeron la proteína de aproximadamente 130kDa, mientras que la mutante W316F presenta dos bandas menores a 46kDa. Figura 8

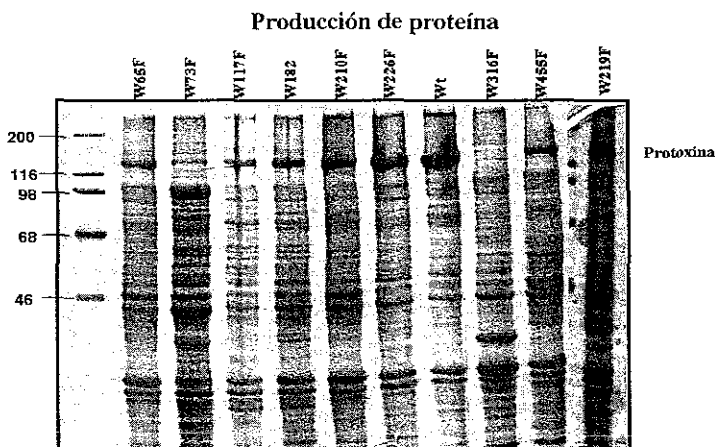


Figura 8. Proteína Cry1Ab silvestre y mutantes en gel de poliacrilamida al 9% con SDS teñido con azul de coomassie

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Se cuantificó el porcentaje de producción de las proteínas de 130 kDa por medio de densitometría.

Tabla 5. Porcentaje de producción

Cepa	% de producción
W65F	53
W73F	25
W117F	33
W182F	32
W210F	60
W219F	63
W226F	82
W316F	7
W455F	36

Todas las mutantes tienen una menor producción de protoxina en comparación de la silvestre, sin embargo, la mayoría de ellas no pierden la toxicidad.

Solubilización

Para saber si alguna de las mutantes que presentaron menor actividad tóxica debido a un problema de plegamiento, se eligieron varias soluciones amortiguadoras para solubilizar la proteína. Las condiciones se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Soluciones amortiguadoras

Solución	Concentración (nM)	pH	Clave
Carbonatos	100	8	A
Carbonatos	100	9	B
Carbonatos	100	10	C
Carbonatos	100	11	D
Cap's	100	10	E
Cap's	100	11	F
Hepes	100	8	G
Ches	100	9	H
Glicina	10	3	I
NaOH	5	12	J

Los resultados se resumen en la tabla 7

TABLA 7. Resultados de solubilización.

Cepa	A	B	C	D	E	F	G	H
W65F	+/-	+/-	+	++	+	++	+/-	+/-
W73F	+/-	+/-	+	++	+	++	+/-	+/-
W117F	+/-	+/-	+	++	+	++	+/-	+/-
W182F	+/-	+/-	+	++	+	++	+/-	+/-
W210F	+/-	+/-	+	++	+	++	+/-	+/-
W219F	+/-	+/-	+	++	+	++	+/-	+/-
W226F	----	----	----	----	----	----	----	----
W316F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
W455F	----	----	----	----	----	----	----	----
Wt	+/-	+/-	++	++	++	++	+/-	+/-

Abreviaturas: ND no determinado ---- no se solubilizó +/- poca solubilización + solubilización óptima ++ máxima solubilización

Las delta endotoxinas activas contra lepidópteros, purificadas de *B thuringiensis* se solubilizan a pH 10.5 en condiciones reductoras tratando de simular las condiciones del intestino medio del insecto. Para caracterizar adecuadamente las mutantes expresadas en *E coli* se probó un intervalo de pH entre 8 y 11 y se usaron dos sales diferentes para obtener esos pHs.

Los resultados mostraron que las mutantes W226F y W455F no se solubiliaron en ninguna de las condiciones probadas. Se decidió utilizar 2 soluciones adicionalmente, una solución amortiguadora con glicina a pH 3, que normalmente se usa para solubilizar delta endotoxinas activas contra coleópteros y otra solución a pH 12 con hidróxido de sodio.

Tabla 8

Cepa	I	J
W226F	----	----
W455F	----	----
Wt	----	++

Abreviaturas: ---- no se solubilizó, ++ SOLUBILIZACIÓN

Como se observa en la tabla anterior, las mutantes W226F y W455F son incapaces de solubilizarse.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Para saber si el perfil de solubilización para las otras mutantes era distinto de la silvestre, se hicieron curvas de porcentaje de solubilidad con respecto al pH de solución amortiguadora de carbonatos. A continuación se muestra la siguiente gráfica.

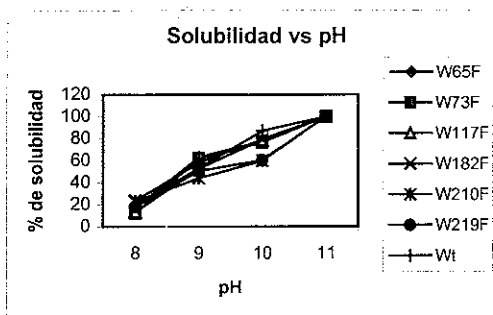


Figura 9 Gráfico donde se muestra el perfil de solubilización para la proteína silvestre y las mutantes

Todas las mutantes que se solubilizaron tienen el mismo patrón que la silvestre, es decir tiene un porcentaje de solubilización mayor a pH 11

También se hicieron curvas de porcentaje de solubilización con respecto al tiempo. Se encontró que todas las proteínas alcanzan su mayor grado de solubilización a las dos horas.

Todas las protoxinas que fueron capaces de solubilizarse muestran el mismo perfil que la silvestre, es decir, presentan una solubilización menor a pH entre 8 y 9 y se solubilizan mejor a pH entre 10 y 11. Las mutantes W226F y W455F fueron incapaces de solubilizarse en las condiciones analizadas.

Las mutantes W455F y W226F no se consideraron para hacer los siguientes ensayos

Procesamiento proteolítico con tripsina

Para determinar la estabilidad de las mutantes, es decir si estaban afectadas en su plegamiento se hicieron digestiones con tripsina que se sabe realiza varios cortes en la protoxina hasta dejar el fragmento tóxico entre 55 y 65 kDa

En la Figura 10 se muestra el patrón de corte para la proteína silvestre y las mutantes en presencia de tripsina en una relación 1:10.

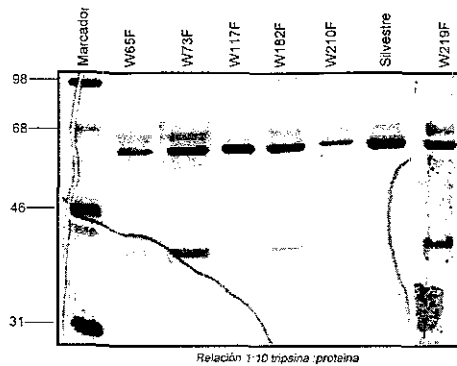


Figura 10 Perfil de corte de la proteína silvestre y mutantes con tripsina

Como se puede observar todas las mutantes tiene el mismo patrón de corte, lo que sugiere que las mutaciones no están causando disminución en la toxicidad debido a deficiencias en plegamiento.

Unión

Para determinar si las mutantes tienen disminuida su toxicidad debido a que no son capaces de unirse al receptor en la membrana se hicieron ensayos de unión.

En este ensayo, las toxinas se marcan con biotina y se ponen en contacto con vesículas de microvellosidad apical, para que la toxina se una a su receptor. Se hacen varios lavados para eliminar la toxina marcada que no se unió. Posteriormente las vesículas se cargan en un gel de poliacrilamida al 9% con dodecil sulfato de sodio para eliminar los lípidos de las membranas. Las proteínas unidas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas se revelan con estreptoavidina acoplada a peroxidasa por medio de una reacción de quimioluminiscencia.

De esta forma si hay proteína marcada, se asume que la toxina fue capaz de unirse a su receptor.

En la Figura 11 se muestra el patrón de unión de la toxina.

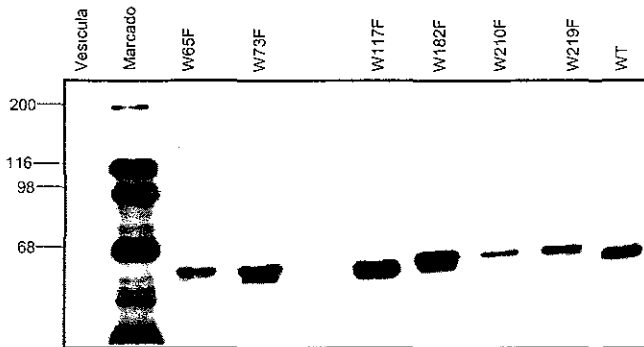


Figura 11 Perfil de unión de las toxinas a vésiculas de microvellosidad apical de *Manduca sexta*.

Todas las proteínas son capaces de unirse al receptor al igual que la silvestre. Sin embargo, este ensayo es cualitativo y no puede dar información acerca de la afinidad de la unión al receptor.

Activación en presencia del anticuerpo scFv73

Se sabe que las proteínas Cry necesitan unirse a un receptor en las membranas de la microvellosidad apical, para poder llevar a cabo su función tóxica. Hasta el momento se conocen 2 tipos de receptores los que pertenecen a familia de las aminopeptididasas y los que pertenecen a la familia de las caderinas.

Para identificar cuáles regiones en el receptor están participando en el contacto con la toxina, en el laboratorio, se generaron anticuerpos contra la proteína Cry1Ab y se probaron para saber si alguno de estos era capaz de competir por el sitio de unión de la toxina. Se identificó que el anticuerpo scFv73 compite por el sitio de unión tanto *in vitro* como *in vivo*. (Gómez, I *et al* 2001)

Haciendo el análisis de la región CDR3 del anticuerpo scFv73, se encontró que muestra 71% de similitud con una región de 8 aminoácidos presente en el receptor Bt-R₁ de *Manduca sexta* con proteínas de la superfamilia de las caderinas y hasta ahora se propone que las caderinas participen como receptores de membrana para las proteínas Cry.

Este anticuerpo se utilizó como modelo de receptor, para activar las toxinas. La protoxina solubilizada se pone en contacto con el anticuerpo y esta mezcla de reacción es cortada por proteasas (tripsina o jugo gástrico; ver; Material y Métodos). La reacción se detiene con PMSF. A continuación se muestra una imagen de un gel donde se ve el patrón de corte de las toxinas, tanto silvestre como mutantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

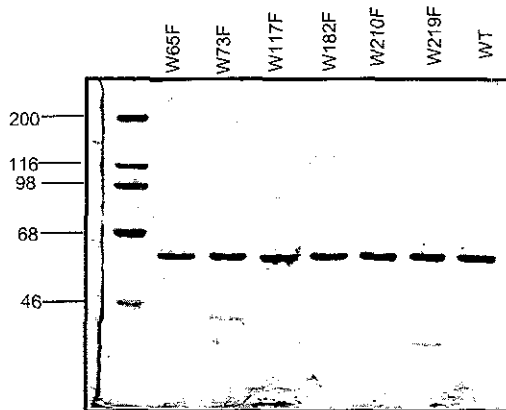


Figura 12 Patrón de corte para las toxinas activadas en presencia del anticuerpo scFv73

Posteriormente se midió la capacidad de formación de poro (ver más adelante)

Activación con vesículas.

Otra forma de activar eficientemente las protoxinas es con vesículas de microvellosidad apical, purificadas sin inhibidores de proteasas. Estas vesículas tienen activas las proteasas asociadas al intestino medio del insecto y el receptor nativo se encuentra presente

La protoxina se pone en contacto con las vesículas, posteriormente se eliminan las vesículas y se toma el sobrenadante donde queda la toxina activada

A estas toxinas también se les midió actividad formadora de poro.

Ensayos de formación de poro

Cuando la toxina está en contacto con las vesículas, se produce un cambio de potencial de membrana provocado por el movimiento de iones a través de la membrana debido a la formación de poros

El cambio de potencial puede registrarse como cambios en la fluorescencia de un colorante ya que este puede distribuirse en la membrana hasta alcanzar su equilibrio de acuerdo al potencial de membrana

Los ensayos de formación de poro se llevan a cabo utilizando vesículas de microvellosidad apical, toxinas activadas y el colorante 3,3 dipropiltiodicarbocianina (diS-C3(5)), que tiene una carga parcial positiva deslocalizada. Las vesículas se cargan con una solución de concentración conocida de KCl. Posteriormente se ponen en contacto con la

toxina activada (se produce una hiperpolarización) y registran los cambios de fluorescencia. Se le adicionan cantidades crecientes de KCl hasta repolarizar completamente la vesícula.

En la Figura 13 se muestra el procedimiento general para medir formación de poro en nuestro sistema

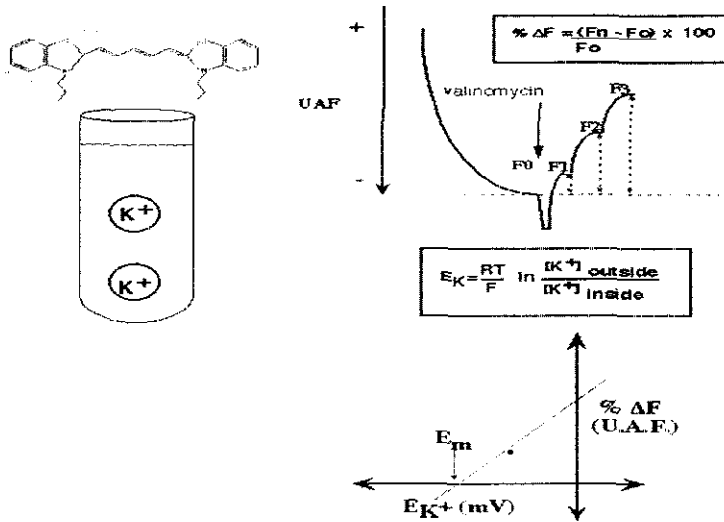


Figura 13 Diagrama de la metodología para medir formación de poro

En este sistema la hiperpolarización se observa como una disminución en la fluorescencia de la cianina, mientras que en la depolarización se observa el efecto opuesto

El potencial de reposo de la membrana (E_m) y el potencial de equilibrio (E_k) para cada una de las adiciones de potasio se calculan utilizando la ecuación de Nerst:

$$E_k = \frac{RT}{F} \ln \frac{(K^+)_{\text{d}}}{(K^+)_{\text{f}}}$$

En donde R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura en Kelvin y F es la constante de Faraday.

Los valores de E_k se grafican contra los cambios de fluorescencia (Figura 14). Al extrapolar los cambios de fluorescencia a cero, se obtiene una estimación del potencial de reposo de la membrana

En la figura 14 se muestran los trazos correspondientes a la valinomicina un ionoforo específico para potasio y control negativo es la solución amortiguadora que se utiliza para solubilizar a toxina.

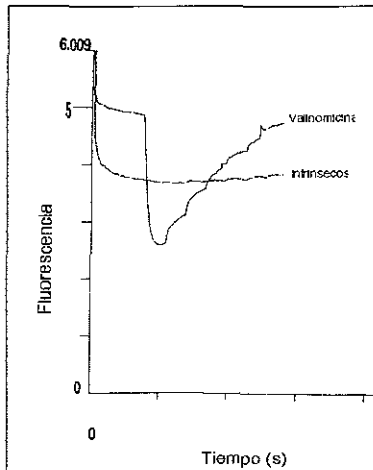


Figura 14. Registro de la fluorescencia de la valinomicina y los canales intrínsecos.

Este procedimiento se hace igual para la proteína silvestre y las mutantes.

En la figura 15 se muestran los trazos correspondientes al control negativo y a la mutante W65F

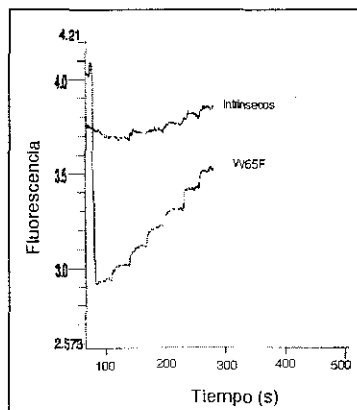


Figura 15 Registro de la fluorescencia para la mutantes W65F y los canales intrínsecos

Los trazos registrados para las demás mutantes son muy similares, y el análisis completo se detalla más adelante

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Se calculó el potencial de equilibrio para cada una de las adiciones de potasio y la pendiente se relaciona directamente con la permeabilidad del potasio en las vesículas.
 Figura 16

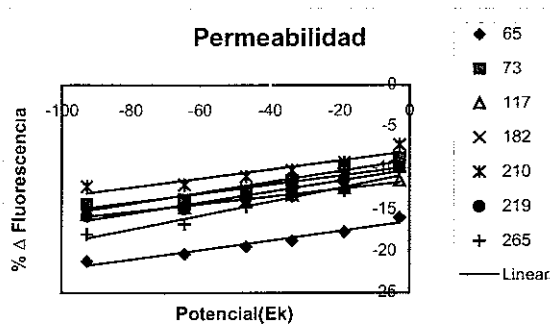


Figura 16 Gráfico de permeabilidad de las vesículas en presencia de la toxina

Se calculó el porcentaje de permeabilidad de la toxina para cada una de las mutantes con respecto a la silvestre y los resultados se muestran en la en la Tabla 9 y en la Figura 17

Tabla 9. Porcentaje de actividad de formación de poro

Cepa	% de formación de poro
W65F	75.4
W73F	96.6
W117F	100
W182F	100
W210F	91.2
W219F	93.9
Wt	100

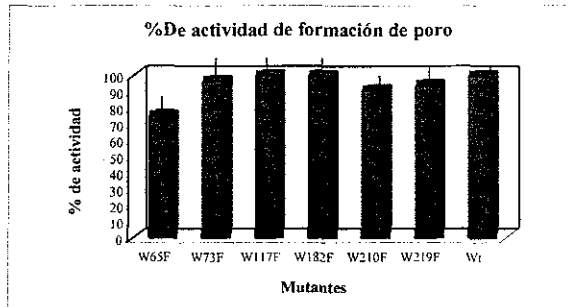


Figura 17 Gráfico donde se muestra el porcentaje de permeabilidad para las mutantes y la proteína silvestre

Papel de los triptofanos en la toxicidad de la proteína Cry1Ab

De acuerdo con los resultados obtenidos, sabemos que los residuos W73, W117, W182, W219 del dominio I no son indispensables, es decir, la presencia de la fenilalanina satisface las necesidades hidrofóbicas en esas regiones dentro de la toxina

Los residuos W65 y W210 del dominio II tiene disminuida su toxicidad en un 25 y 50% respectivamente, sin embargo, muestran un comportamiento similar a la toxina silvestre en activación, unión al receptor y formación de poro. El W65 se encuentra en el lazo que conecta la hélice $\alpha 2a$ y con la $\alpha 2b$, en esta región existe una secuencia de corte para proteasas digestivas *Manduca sexta* que se ha reconocido como FGPSQW y se sabe que el corte se produce entre la F68 y G69 (Miranda, R. *et al* 2001). Al hacer el cambio por fenilalanina en la posición 65 se genera un secuencia F65-G66 que tal vez también es reconocida por las proteasas digestivas y facilita el corte y posterior disminución en la actividad. El residuo W210 se encuentra al final de la hélice $\alpha 6$ y de acuerdo a la estructura tridimensional de la proteína Cry1Aa esta posición esta expuesta hacia el lado opuesto de los dominios II y III; tal vez este residuo este participando en la interacción con otras proteínas

El residuo W226 del dominio I parece estar participando en la interacción del dominio I y dominio II por lo que su ausencia cambia el plegamiento de la proteína provocando que no se solubilice.

Los residuos W316 y W455 del dominio II posiblemente son importantes para el plegamiento de la toxina. Al eliminar el residuo 316 no se obtiene una proteína de 130 kDa, lo que bien podría ser consecuencia de un aumento en la susceptibilidad a la degradación por las proteasas de la bacteria. Por otro lado la ausencia del residuo W455 que se

encuentra dentro del corazón hidrofóbico de la proteína podría producir un plegamiento diferente de la toxina que hace difícil la solubilización.

En la Figura 18 se muestra un modelo de cómo podrían estar orientados los triptofanos de acuerdo a su posición en el momento en el que el dominio I se inserta y forma el poro



Figura 18. Modelo de inserción del dominio I dentro de la membrana

Anteriormente se ha reportado que los residuos de triptofano que se encuentran en algunas proteínas de membrana, tienen la función de anclar a la proteína en la membrana, ya que se encuentran en la interfase lípido-agua (Schiffer, M *et al* 1992). De acuerdo con este modelo se puede proponer que los triptofanos en la proteína Cry1Ab pudieran tener la misma función, es decir están posicionando a la proteína, por lo que al cambiarlos por residuos de fenilalanina que es un aminoácido similar al triptofano, no se afecta de manera importante la función

Mutantes no conservativas

Para saber qué papel está jugando un residuo aromático en las posiciones 65, 73, 117, 182, 210 y 219 se decidió hacer mutaciones no conservativas en cada una de estas posiciones por separado. Se eligió a la cisteína ya que además de ser un residuo polar es muy reactivo y puede acoplarse a colorantes fluorescentes

Estas mutantes se generaron por la técnica de mutagénesis sitio-dirigida por fragmentos sobrelapantes. Para generar las mutantes se hicieron dos construcciones. Partiendo del plásmido pHCPP que contiene el gene *cry1Ab* se corto un fragmento *ClaI* de 1800 pares de bases (pb) dentro del cual se encuentran 8 de los 9 triptofanos. El pHCPP deletado de este fragmento (Δ pHCPP*ClaI*) se religó, mientras el fragmento de 1800 se insertó en el plásmido pSK dentro de la región de múltiples sitios de restricción (pSKHCPP*ClaI*)

A continuación se muestra el esquema de los vectores construidos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cosntrucción de vectores

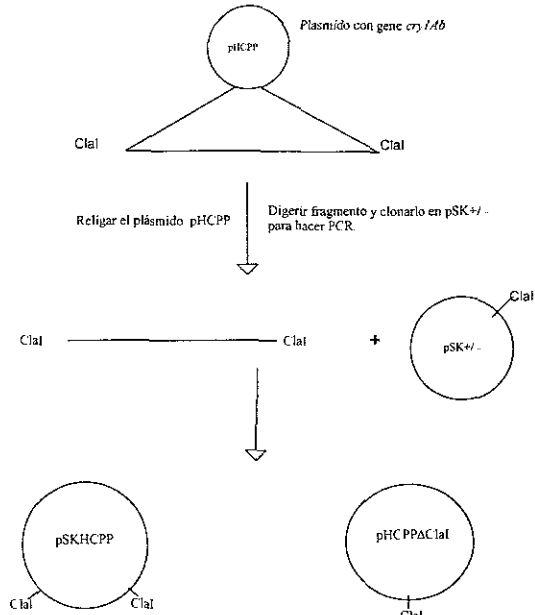


Figura 19 Vectores construidos.

También se diseñaron oligonucleótidos (oligos) sustituyendo el codon de triptofano por el codon para cisteína (ver material y métodos)

Se obtuvieron productos de PCR usando un oligo mutagénico y otro que se alinea en el vector. Así, se obtuvieron fragmentos de diferentes tamaños tal como se muestra a continuación.

Tabla 10. Oligos utilizados y tamaño del fragmento de ADN amplificado.

Oligo de pSK	Oligo mutagenico	Tamaño pb
T3	316 rev	838
T3	226 rev	568
T3	219rev	547
T7	65dir	1094
T7	73dir	1070
T7	117dir	938
T7	182dir	747
T7	210dir	659

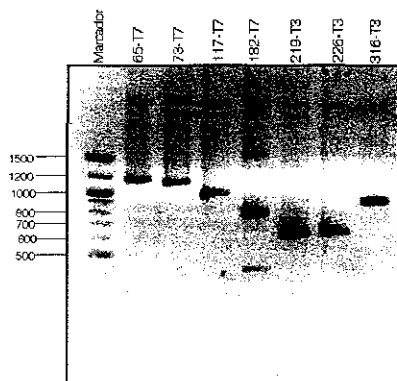


Figura 20 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

Posteriormente se eligieron dos fragmentos de PCR distintos y se sobrelaparon, así, cada fragmento funcionaba como un mega cebador para extender las cadenas y obtener un fragmento de 1800 pb. Los fragmentos sobrelapados son:

- T3-316rev: I7-65dir
- T3-316rev: I7-73dir
- T3-316rev: I7-210dir
- T3-226rev: T7-117dir
- T3-129rev: I7-182dir

Se amplificaron por PCR cada uno de estos fragmentos usando los oligos que se alinean en el vector. Se purificaron las bandas y se digirieron con *Cla*I para generar los extremos cohesivos y poder insertarlos dentro del plasmido pSK. Figura 21.

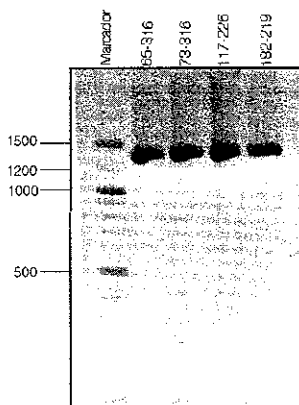


Figura 21 Productos de PCR empalmados y amplificados

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Los fragmentos se insertaron dentro del plásmido pBluescriptSK+, se verificó que efectivamente estuviera el inserto dentro del vector y se mandaron a secuenciar 4 candidatas de cada mezcla de reacción.

Solamente se obtuvieron las mutantes W65C, W73C, W182C, y W219C, de las candidatas seleccionadas para las mutantes W117C y W210C no se encontró ninguna que tuviera la secuencia mutante.

Una vez obtenidas las secuencias el inserto se cortó con enzima *CLAI*, se subclonó el vector Δ pHCPPClal y se verificó la orientación. De esta manera, se cuenta hasta el momento con cuatro de las seis mutantes deseadas.

CONCLUSIONES

1. Las mutantes W65F, W73F, W117F, W182F, W210F y W219F tienen un comportamiento similar a la proteína silvestre (toxicidad, producción, activación, unión a receptor y formación de poro).
2. La mutante W226F pierde la toxicidad debido a que no puede solubilizarse. Ya que el W226 se encuentra en la zona de contacto entre dominio I y dominio II, probablemente la toxina se empaqueta de una manera diferente.
3. La mutante W316F pierde su toxicidad debido a que no se produce una proteína de 130 kDa y por lo tanto no existe el fragmento tóxico de 60 kDa.
4. La mutante W445F pierde su toxicidad debido a que no se solubiliza.
5. Hasta el momento se han construido las mutantes no conservativas W65C, W73C, W182C, y W219C.

Los fragmentos se insertaron dentro del plásmido pBluescriptSK+, se verificó que efectivamente estuviera el inserto dentro del vector y se mandaron a secuenciar 4 candidatas de cada mezcla de reacción.

Solamente se obtuvieron las mutantes W65C, W73C, W182C, y W219C, de las candidatas seleccionadas para las mutantes W117C y W210C no se encontró ninguna que tuviera la secuencia mutante.

Una vez obtenidas las secuencias el inserto se cortó con enzima *CLAI*, se subclonó el vector Δ pHCPPClal y se verificó la orientación. De esta manera, se cuenta hasta el momento con cuatro de las seis mutantes deseadas.

CONCLUSIONES

1. Las mutantes W65F, W73F, W117F, W182F, W210F y W219F tienen un comportamiento similar a la proteína silvestre (toxicidad, producción, activación, unión a receptor y formación de poro).
2. La mutante W226F pierde la toxicidad debido a que no puede solubilizarse. Ya que el W226 se encuentra en la zona de contacto entre dominio I y dominio II, probablemente la toxina se empaqueta de una manera diferente.
3. La mutante W316F pierde su toxicidad debido a que no se produce una proteína de 130 kDa y por lo tanto no existe el fragmento tóxico de 60 kDa.
4. La mutante W445F pierde su toxicidad debido a que no se solubiliza.
5. Hasta el momento se han construido las mutantes no conservativas W65C, W73C, W182C, y W219C.

PERSPECTIVAS

Una vez que se sabe que es posible cambiar los triptofanos de algunas posiciones dentro del dominio I, sin que la toxicidad se vea afectada de manera importante, el siguiente paso es generar mutantes dobles o triples con la finalidad de tener una toxina con el menor número de triptofanos pero que siga siendo tóxica. Con estas mutantes se podrían hacer estudios de fluorescencia utilizando bicapas de lípidos sintéticos, registrando como cambia la fluorescencia cuando la proteína se inserta en la bicapa lipídica.

Por otro lado, con las mutantes de cisteína por triptofano será necesario hacer ensayos de toxicidad, unión y formación de poro. En caso de que estas proteínas no estén afectadas de manera importante en su toxicidad se podrán hacer estudios de fluorescencia marcando los residuos de cisteína con algún fluoróforo.

Para marcar las cisteínas se ha seleccionado el colorante 7 nitrobenz-2 oxa-1,3-diazolil (NBD) ya que tiene una longitud de onda (λ) de excitación a 468 nm y una λ de emisión a 530nm, es decir, muy alejada de la λ de emisión y excitación de los fluoróforos naturales de la proteína. Su estructura es muy similar a la del triptofano, lo que nos permitirá reestablecer el espacio que estaba ocupando el triptofano. Además de que tiene la particularidad de aumentar la intensidad de su emisión, así como su vida media cuando pasa de un ambiente acuoso a un ambiente hidrofóbico.

Con estas mutantes se podrán hacer estudios de fluorescencia en presencia del receptor nativo y de las vesículas extraídas del intestino del insecto, ya que la emisión de las proteínas presentes no afectará la emisión del colorante.

BIBLIOGRAFIA

- Agaisse, H., and Lereclus D.** 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much Insecticidal Crystal Protein? *J Bac* 177: 6027-6032.
- Alcantara, P. E., Alzate, O., Lee, M. K., Curtiss, A., Dean, D. H.** 2001. Role of α helix seven of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin in membrane insertion, structural stability, and ion channel activity *Biochem* 40: 2540-2547
- Aronson, A. I., Han, E.S., McGaughey, W., and Johnson, D.** 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl Environ Microbiol* 57:981-6
- Barnés, D. R.** Zoología de los invertebrados Editorial interamericana 1989 |5ª Edición Capitulo 16
- Bravo, A.** 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains *J Bac* 179: 2793-2801
- Budarina Z. I., Sinev, M. A., Mayorov, S. G., Tomashevski, A.Y., Shmelev, I.V., and Kuzmin, N.P.** 1994. Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus* *Arch Microbiol* 161: 252-257.
- Burton, S. L., Ellar, D. J., Li, J., and Derbyshire, D. J.** 1999. N-acetylglucosamine on the putative insect Receptor aminopeptidase N is recognized by a site on domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin *JMB* 287: 1011-1022
- Carlson, C. R., Johansen, t., Lecadet M.M., and Kolsto, A.B.** 1996. Genomic organization of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subs Berliner 1715. *Microbiology* 142:1625-1634.
- Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S, Boudabous, A** 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1 7, a new strain isolated from soil. *Lett Appl Microbiol* 32: 243-7
- Chang, Y., Zajicek, J., and Castellino, F.J.** 1997. Role of tryptophan 63 of the kringle 2 domain of the tissue-type plasminogen activator in its thermal stability, folding and ligand binding properties. *Biochemistry* 36: 7652-7663
- Coux, F., Vachon, V., Rang, C., Moozar, K., Masson, I., Royer, M., Bes, M., Rivest, S., Brousseau, R., Schwartz, J. L., Laprade, R., and Frutos, R.** 2001. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc *J Biol Chem* 276 :35546-51
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D.H.** 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:807-13.

Damgaard, P.H. 1995. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol Med. Microbiol* 12:245-250.

Dayoff, M.O., Schwartz, R.R., and Orcutt, B.C. 1978. A model of evolutionary change in protein. *Atlas of protein sequence and structure* Ed

de Maagd, R.A., Kwa, M.S.G., van der Klei, H., Yamamoto, I., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekeman, W.J., and Bosch, D 1996 Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ab results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl Environ, Microbiol* 62: 1537-1543

de Maagd, R.A., Bravo, A., and Crickmore, N. 2001 How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17: 193-9.

De Planque, M. R. R., Kruijtzter, J. A.W., Liskamp, R.M.J., Marsh, D., Greathouse, D.V., KoeppeII, R.E., de Kruijff, B., and Killian, A. 1999 Different membrane anchoring position of tryptophan and lysine synthetic transmembrane α helical peptides. *J Biol.Chem* 274: 20839-20846.

Devine, M.K 2000. *Encyclopedia of microbiology* Academic press 2000. Vol 1 pp 373-381

Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G J., Craig, J.A., and Koziel, M.G. 1996 Vip3A a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl acad Sci* 93: 5389-5394

Favret, M. E., and Yousten, A. A. 1989. Thuricin: The bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 53: 206-216

Feitelson, J. S The bacillus turingiensis family tree. *Advanced Engineeed Pesticides* Editor **Leo Kim**. Edit Marcel Dekker pp 64

Forsyth, G., and Logan, N. A 2000 Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. *Lett Appl Microbiol.* 30 :263-6

Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M. S. P., and Shai, Y 1998 The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are cosistent whit an umbrella-like structure of the pore. *Proc Natl. Acad Sci* 95: 12289-12294

Gahan, J.L., Gould,F, and Heckel,D.G 2001 Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliotis virescens*. *Sci* 293: 857-860

Gómez, I., Oltean, D. I., Gill, S., Bravo, A., and Soberón, M. 2001 Mappin the epitope in cadher-like receptors involved in *Bacillus thuribgiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J Biol Chem* 276: 28906-28912

Grochulsiki, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J-L., Brousseau, R., and Cygler, M. 1995 *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation *J Mol Biol* 254:447-464

Güereca, L. and Bravo, A. 1999. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution *Biochimia et Biophysica Acta* 1429: 342-350.

Hofte, H., and Whiteley, R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53: 242-255

Helgason, E., Okstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., and Kolsto, A.B. 2000 *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence.. *Appl Environ Microbiol* 66: 2627-30

Iriarte J, Porcar M, Lecadet M, Caballero P 2000 Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain *Curr Microbiol* 40: 402-8.

Jenkins, J.L., Lee M.K., Valaitis, A.P., Curtiss, A., and Dean D 2000 Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J Biol Chem* 275:14423-14431

Kim, Y.I., and Huang, H. I. 1970. The β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Isolation and characterization *J Invertbr Pathol* 15:11-18.

Knowles, B. H. and Ellar, D J 1987 *Biochim biophys acta* 924: 509-518

Kramer, K.J.; Muthukrishnan, S. 1998 Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides *Insect Biochem and Mol Biol* 27:887-900

Li, J., Carrol, J., and Ellar, D.J 1991 Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution *Nature* 353: 815-821

Li, J., Koni, P.A., and Ellar, D.J. 1996 Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. kyushuensis and implications for membrane pore formation *J Mol Biol* 257:129-52

Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonkoy, B., and Ellar, D. 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water soluble to membrane-inserted forms. Membrane active peptides

Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonkoy, B., and Ellar, D.J. 2001 Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms *Biochem Soc Trans* 29: 571-7

- Maeda M, Mizuki E, Nakamura Y, Hatano T, Ohba M** 2000 Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan *Curr Microbiol* 40: 418-22
- Manoj Kumar, A S, and Aronson, I** 1999 Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J Bac* 181:6103-6107
- Miranda, R., Zamudio, F, and Bravo, A** 2001 Processing of Cry1Ab d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation *Insect biochemistry and molecular biology*
- Parker, M W, Postma, J P.M., Pattus, F., Tucker, A D, and Isernoglou, D.** 1992. Refined structure of pore forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution *J Mol Biol* 224:639-657
- Promdonkoy, B., and Ellar, D** 2000. membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J* 350:275-282.
- Raja, S. M., Rawat, S.S., Chattopadhyay, A., and Lala A K** 1999 Localization and environment of tryptophans in soluble and membrane bound states of a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus* *Biophys Jour* 76:1469-1479
- Rajamohan, F, Lee, M.K., and Dean, D. H.** 1998 *Bacillus thuringiensis* Insecticidal proteins: Molecular mode of action *Progres in Nucleic Acids Research* : 1-26
- Rosenberger, C.M., Brumell, J H, and Finlay, B B** 2000 Microbial pathogenesis: Lipid rafts as pathogen portals *Curr Biol* 10: R823-R825
- Rukmini, V, Redy, C. Y., and Venkateswerlu, G** 2000 *Bacillus thuringiensis* crystal d endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin *Biochimie* 82: 109-116.
- Samson, M.N, and Gooday, G.W.** 1998 Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects *Microbiol* 144: 2189-2194
- Schiffer, M, Chang, C.H., and Stevens, J. S** 1992 The functions of tryptophan residues in membrane proteins *Protein Eng* 5:213-214
- Schnepf, E, Crickmore, N., Van Rie, J, Lereclus, D, Baum, J, Feitelson, J, Zeigler, D.R., and Dean, D.H.** 1998 *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775-806
- Schwartz, J-L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Prefontaine, G, Brousseau, R., and Masson, L.** 1997 Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering *FEBS Lett* 410:397-402



Soberón, M., Pérez, R.V., Nuñez-Valdez, M. E., Lorence A. Gómez, I., Sánchez J and Bravo, A. 2000. Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEMS Microbiology Letters 191:221-225

Staub, O., and Rotin, D 1996 WW domains Structure 4: 495-499.

Titball, R.W. 1993. Bacterial Phospholipases C Microbiol Rev. 57:347-366

Uttamkumar, S., Pal, D., and Chakrabarti, P. 2000 Environment of tryptophan side chains in proteins. Proteins 38:288-300.

Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., Vand Mellaert, H. 1983. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins. Eur J Biochem. 186:239-247

Verza, G., and Bakás, I. 2000. Location of tryptophan residues in free and membrane bound *Escherichia coli* α-hemolysin and their role on the lytic membrane properties. Bioch. Biophys Acta 1464:27-34

Weitzman, C., Consler, I.G., and Kaback, R. 1995 Fluorescence of native single-Trp mutants in the lactose permease from *Escherichia coli*: Structural properties and evidence for substrate-induced conformational change. Protein Sci 4: 2310-2318

White, S.H. and Wimley, W.C. 1999 Membrane protein folding and stability: Physical principles. Annu Rev biophys Biomol Struct. 28: 319-365

Wu, D., and Aronson, A.I. 1992 Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin involved in toxicity and specificity. J Biol Chem 267:2311-7

Yau, W.-M., Wimley, W.C., Gawrisch, K., and White, S.H. 1998. The preference of tryptophan for membrane interfaces. Biochemistry 37: 14713-14718

Yu, C. G., Mullins, M.A., Warren, G. W., Koziel, M.G., and Estruch, J.J. 1997 The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3 lyses midgut epithelial cells of susceptible insects. Appl Environ Microbiol 63: 532-536

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

Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Ed Kluwer Academic Publishers. Edited by: Charles, J. F., Décluse, A., and Nielsen-LeRoux, C. Imprimeur en Amsterdam 2000