

00322



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

18

FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento de anticuerpos monoclonales que reconocen al asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis***

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I Ó L O G A**  
**P R E S E N T A :**  
**ITZEL BENÍTEZ HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**  
**DRA. ISABEL GÓMEZ GÓMEZ**

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2003

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

1



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.

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**

**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente**

Ahor  
UNAM  
CONTI

NOMBRE: Benítez Hernández

Itzel

FECHA: 12/ May / 03

FIRMA:

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Aislamiento de anticuerpos monoclonales que reconocen al asa 3 del dominio II de la toxina CryIAb de Bacillus thuringiensis."

realizado por Itzel Benítez Hernández

con número de cuenta 9622141-7, quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Director de Tesis Propietario	Dra. Isabel Gómez Gómez	
Propietario	Dra. Esperanza Martínez Romero	
Propietario	Dr. Mario Soberón Chávez	
Suplente	Dr. Juan Miranda Ríos	
Suplente	Dr. Ismael Hernández Lucas	

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

2

## **DEDICATORIAS**

Me honra dedicar este trabajo a MIS PADRES quienes me han brindado su apoyo incondicional durante toda mi vida y de quienes estoy muy orgullosa, ya que siempre han apoyado todas mis decisiones brindándome sabios consejos y guiándome por un buen camino. Les agradezco mucho la herencia mas grande que me han dejado.

Dedico este trabajo a mis hermanos ANDRÉS y STEEVENS por brindarme su apoyo y cariño incondicional ante cualquier circunstancia lo cual siempre me ha hecho sentir protegida y saber que cuento con ellos para todo.

Dedico este trabajo a todas las personas que me quieren porque han sido una parte muy importante en mi vida, con quienes he compartido momentos que me han ayudado a poder ser mejor cada día.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS por permitirme vivir esta vida, que es lo más hermoso y preciado que tengo y por permitirme tener a mis padres, a mis hermanos y a todas las personas que quiero, porque son lo más importante para mí y lo que me ayuda a siempre seguir adelante.

Quiero agradecer de manera muy especial a mi MADRE porque siempre me ha apoyado en todo, porque ha sido un ejemplo muy grande para mí y porque siempre me brinda su hombro para apoyarme cuando me encuentro en situaciones difíciles.

Agradezco a mi PADRE porque siempre ha luchado por darnos lo mejor, por el apoyo que me ha brindado y porque siempre ha sido un gran ejemplo de fortaleza y tenacidad para mí.

Agradezco a mi hermano STEEVENS porque siempre me ha apoyado y brindado consejos cuando me encuentro en situaciones nuevas y porque siempre ha sido un gran ejemplo para mí.

Agradezco a mi hermano ANDRÉS porque siempre se ha preocupado por mi bienestar y porque ha sido un apoyo y un gran ejemplo para mí de lo que es la hermandad y perseverancia.

Agradezco a mi novio FÉLIX porque siempre ha sido un gran apoyo para mí tanto en lo académico como en lo emocional, porque siempre está cuando lo necesito, porque me ha tenido mucha paciencia y me ha contagiado de ella cuando más la he necesitado, porque me llena de paz y amor y porque es una persona con un corazón enorme y un gran ejemplo a seguir no solo para mí.

A

Agradezco al Dr. Mario Soberón Chávez por permitirme participar en su grupo de investigación, por la atención e interés que puso en mi trabajo y por las correcciones y comentarios que me hizo durante mi ejercicio de elaboración de tesis.

A la Dra. Isabel Gómez Gómez quien fungió como mi directora de tesis, por dirigir mi trabajo y por las correcciones y comentarios que me hizo durante mi ejercicio de elaboración de tesis.

A la Dra. Alejandra Bravo por el apoyo económico que me brindó durante mi estancia en el laboratorio y por las clases tan enriquecedoras que tomé con ella.

Al Dr. Juan Miranda por las correcciones y comentarios que me hizo durante mi ejercicio de elaboración de tesis y por las veces que aclaró mis dudas siendo siempre muy amable.

A la Dra. Esperanza Martínez por transmitirme su amplio conocimiento en el ámbito de la investigación y por ser siempre tan amable.

Al Dr. Ismael Hernández por las correcciones y comentarios que me hizo durante mi ejercicio de elaboración de tesis y por darme su apoyo emocional en momentos difíciles.

Al Dr. Carlos Muñoz Garay porque siempre me brindó su apoyo en todo momento, porque siempre aclaraba mis dudas, porque siempre tuvo tiempo para brindarme una explicación sustanciosa sobre cualquier tema y por ayudarme a poder seguir adelante.

Agradezco de manera muy especial al Biol. Juan Conde, a la QFB. Claudia Pérez y a la Biol. Lizbeth Cabrera por ser grandes amigos y personas, porque siempre fueron un apoyo muy importante para mí y por los momentos que compartimos juntos.

A todos mis compañeros de laboratorio con quienes compartí mi trabajo de investigación: Dra. Carol, M. en C. María Tabche, Ing. Guadalupe Peña, Biol. Jorge Sánchez, Dr. Raúl Miranda, M en C. Luisa Fernández, Fidel Velasco, Iván Arenas, Giovanni Ríos, Idalia.

A las personas que nos proporcionan material para poder llevar a cabo las diversas actividades que se desempeñan en el laboratorio: Graciela Domínguez, Sergio Blancas, Alejandro Uribe.

**El presente trabajo se realizó en el Departamento de  
Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la  
Universidad Nacional Autónoma de México.**

6

## ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES GENERALES	3
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.2. ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS CRY	5
2.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TOXINAS CRY	7
2.4. FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS DE LAS TOXINAS CRY	9
2.4.1. <i>Dominio I</i>	9
2.4.2. <i>Dominio II</i>	10
2.4.3. <i>Dominio III</i>	12
3. ANTECEDENTES PARTICULARES	12
3.1. RECEPTORES DE LAS TOXINAS CRY	12
3.2. EPÍTOPES	14
3.3. DESPLIEGUE EN FAGOS (PHAGE DISPLAY)	15
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVO PARTICULAR	18
HIPÓTESIS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6. CONCLUSIÓN	36
7. PERSPECTIVAS	36
BIBLIOGRAFÍA	38

## ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
Amp	Ampicilina
APN	Aminopeptidasa N
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina sérica
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bt-R1	<i>Bacillus thuringiensis</i> -receptor 1 ( <i>M.sexata</i> )
Bt-R175	<i>Bacillus thuringiensis</i> -receptor de 175 kDa ( <i>B.mori</i> )
CDR3	Región determinante de complementariedad
D.O.	Densidad óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilen diamino tetra-acético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
GalNac	N-acetil-galactosamina
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
IR	Regiones intergénicas
Kan	Kanamicina
kDa	Kilo daltones
LB	Medio de cultivo Luria
mM	Mili molar
Ni-NTA	Matriz de níquel-agarosa para la purificación de proteínas con cola de histidinas
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial hidrógeno
PMSF	Fenil metanosulfonilfluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes
SP	Medio de cultivo para esporulación
TMB	Tetrametilbencidina
ufc/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
VMMA	Vesículas de la microvellosidad apical-media
$\mu$ g	Micro gramos
$\mu$ l	Micro litros

## RESUMEN

El presente trabajo se enfocó particularmente en la interacción de una región de la toxina Cry1Ab con su receptor. Mediante el uso de la técnica de despliegue en fagos "phage display", se logró la obtención de dos anticuerpos que reconocen al asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*.

La obtención de dichos anticuerpos es una herramienta de gran de valor para poder comprender un poco más acerca de las interacciones de las toxinas Cry con sus receptores en la membrana intestinal de insectos susceptibles, así como para la creación de nuevas estrategias para que las toxinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* aumenten su efecto tóxico.

# **Aislamiento de anticuerpos monoclonales que reconocen al asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis***

## **1. INTRODUCCIÓN**

Año con año México aumenta su población considerablemente y por lo tanto la producción de alimentos es insuficiente. Entre las causas que provocan esta disminución de alimentos está el gran número de plagas que invaden los cultivos de nuestro país, reduciendo hasta un 25% la producción total. En la mayor parte del mundo, el control de plagas se realiza a base de insecticidas químicos y en México esta alternativa es muy utilizada. El uso de insecticidas químicos tiene graves consecuencias sobre el medio ambiente ya que pueden provocar severas intoxicaciones en el humano debido al consumo de alimentos contaminados y de forma general la acumulación de residuos tóxicos provenientes de este tipo de insecticidas puede afectar a otras especies (Githeko et al., 2000, [www.FAO.ORG](http://www.FAO.ORG)).

Considerando estos graves problemas se ha propuesto la búsqueda y caracterización de ciertas proteínas con propiedades insecticidas, las cuales pueden ser utilizadas en el control de plagas lo que permitiría tener una mayor producción y seguridad en los alimentos. Aunque diversos productos naturales derivados de bacterias, hongos y plantas han sido identificados como agentes de gran potencial insecticida, hasta ahora la alternativa más eficiente y mejor estudiada ha sido la producción de proteínas insecticidas como las de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Estas proteínas presentan una gran especificidad contra diversos órdenes de insectos y un alto poder insecticida, además de ser completamente biodegradables, no tienen ningún efecto sobre plantas, humanos y otros vertebrados (Bishop, 1994; Rajamohan et al., 1998). Recientemente se ha logrado la clonación de los genes de las proteínas insecticidas de *Bt* en plantas, haciendo ingeniería genética de las mismas, lo cual permite una eficiente eliminación de la plaga, en áreas fuertemente infectadas (Van Rie, 2000). Sin embargo, comparado con los insecticidas químicos, productos basados *Bt* tienen un papel mínimo, ya que solo cuenta con un 2% de aplicación en campo. La razón de esta preferencia se debe a que los insecticidas convencionales tienen una rápida aplicación, mientras que el utilizar *Bt* es un proceso mas lento y laborioso ya que

estas proteínas insecticidas son tóxicas solo contra estadios larvarios muy específicos de los insectos plaga (Bishop, 1994).

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1. *Bacillus thuringiensis*

En un principio *Bt* fue caracterizada como un patógeno de insectos y esta actividad insecticida fue atribuida en gran medida a la producción de cristales paraesporales. Dicha observación ha permitido el desarrollo de bioinsecticidas basados en *Bt*, para el control de ciertas especies plaga de insectos (Beegle and Yamamoto, 1992) de los órdenes *Lepidóptera* (mariposas y polillas), *Diptera* (moscas y mosquitos), *Coleóptera* (escarabajos y gorgojos) e *Himenóptera* (avispas y abejas). Algunas toxinas Cry muestran actividad tóxica para algunas especies que no son insectos como nemátodos. En cuanto a la ecología de *Bt*, ésta bacteria ha sido aislada del suelo, reservorios de granos, cadáveres de insectos y del rizoplaneo (superficie de la planta) y se le ha considerado como un patógeno oportunista (Schnepf et al., 1998).

Otros trabajos han reportado la presencia de un número de compuestos extracelulares que contribuyen a la virulencia de *Bt*, dentro de los cuales se encuentran algunas fosfolipasas (Zhang et al., 1993),  $\beta$ -exotoxinas, proteasas (Lovgren, 1990), quitinasas y las proteínas insecticidas secretadas vegetativamente (VIPs) (Estruch et al., 1996). En años más recientes se ha encontrado que también las  $\alpha$ -exotoxinas, hemolisinas y las enterotoxinas contribuyen a la virulencia (Hansen and Salamitou, 2000).

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram positiva, aerobia estricta, que posee la característica de formación de esporas, las cuales forman un cuerpo paraesporal llamado cristal durante la fase estacionaria de su ciclo de vida. Éste es de naturaleza proteica, tiene propiedades insecticidas y está constituido por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas, también conocidas como proteínas Cry y Cyt (Beegle and Yamamoto, 1992).

Los genes que codifican para estas proteínas se encuentran en plásmidos transmisibles y flanqueados en algunos casos por elementos transponibles (transposones), lo cual explica como estos genes pueden pasar fácilmente de una cepa a otra. Se ha observado el proceso

de conjugación entre diferentes cepas en el suelo y dentro de insectos (Bravo et al. 1992). La gran cantidad de síntesis de cristal en *Bt* y la coordinación con su producción en la fase estacionaria está controlada por una variedad de mecanismos que ocurren a niveles de transcripción, postranscripción y postraducción. A nivel transcripcional, el desarrollo de la esporulación es controlado por la activación sucesiva de factores sigma, los cuales se unen al centro de la RNA polimerasa, para dirigir la transcripción de promotores específicos para la esporulación. FIG 1.

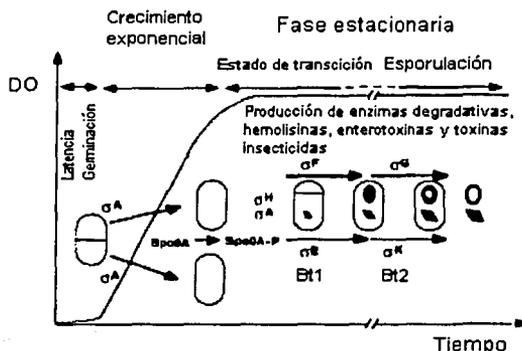


Figura 1. Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis*. Adaptada de Lereclus et al., 2000.

Se mapearon dos sitios que marcan el inicio de la transcripción; Bt I y Bt II, definiendo dos solapamientos de promotores activados secuencialmente. A nivel postranscripcional, la estabilidad del mRNA, es alrededor de 10 min y es 5 veces mas que la vida media del conjunto de mensajeros de la bacteria en promedio. Por último, postraduccionalmente las proteínas Cry generalmente forman inclusiones cristalinas en el compartimiento de la célula madre. Dependiendo de la composición de su protoxina, el cristal puede tomar varias formas: bipiramidal (Cry1), cuboidal (Cry2), rectangular liso (Cry3A), irregular (Cry3B), esférica (Cry4A y Cry4B) y romboidal (Cry1 1A). Diversos estudios muestran que el carboxilo-terminal de las protoxinas Cry1, es rico en cisteínas, lo cual contribuye en la formación y estructura del cristal, a través de puentes disulfuro (Schnepf et al., 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.2. ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS CRY

Las  $\delta$ -endotoxinas de *Bt* pertenecen a dos familias de genes distintas llamadas Cry y Cyt.

De las  $\delta$ -endotoxinas Cry son conocidas mas de 164 secuencias de genes y están clasificadas en 30 subgrupos, los cuales tienen un peso molecular de 60-70 kDa en su forma activa y su estructura comprende tres dominios globulares (Schnepf et al., 1998).

Las  $\delta$ -endotoxinas Cyt forman una pequeña familia de nueve miembros conocidos. Estas presentan un peso molecular de aproximadamente 25 kDa en su forma activa y se componen de un solo dominio (Knowles et al., 1994).

Las estructuras tridimensionales de las toxinas activadas con tripsina Cry3A (específica para *Coleópteros*), Cry1Aa (específica para *Lepidópteros*) y de la protoxina de Cry2Aa (específica para *Dípteros*) se han resuelto por cristalografía de rayos X, mostrando que las tres proteínas están constituidas por tres dominios muy similares (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995; Morse et al., 2001). FIG. 2

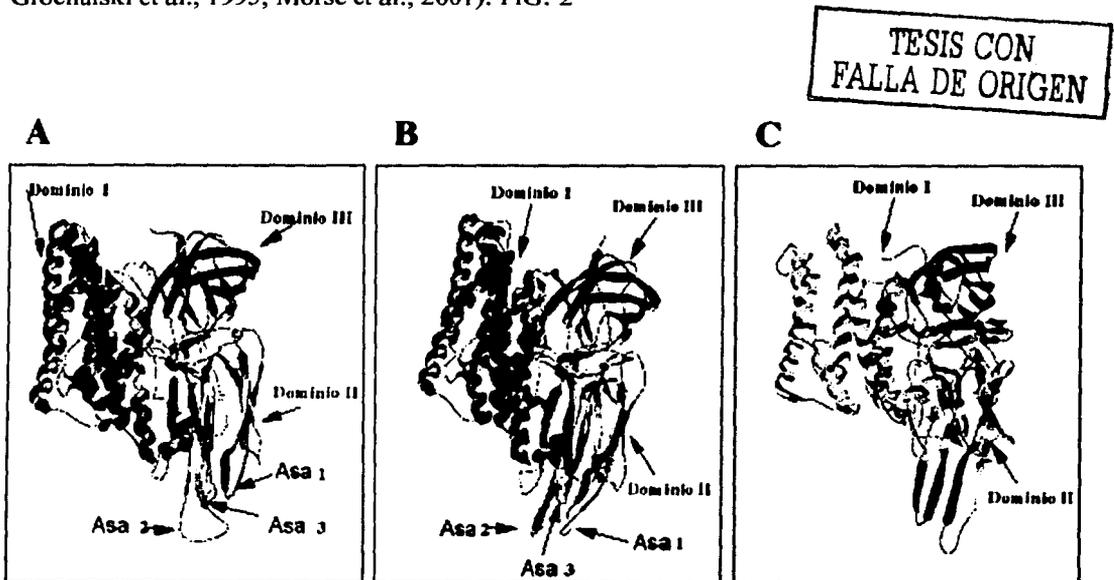


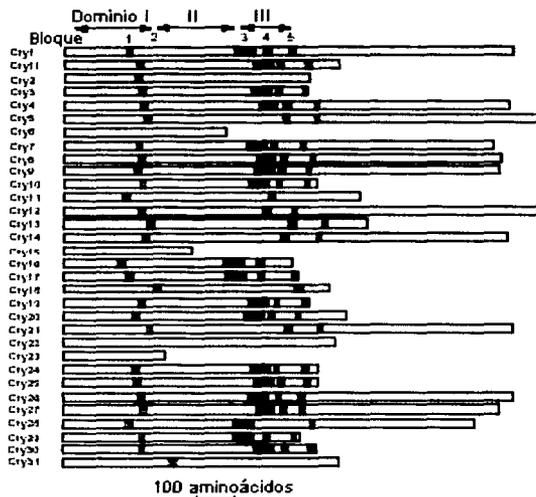
Figura 2. Estructura cristalográfica de las toxinas (A) Cry1Aa, (B) Cry3A y (C) Cry2Aa de *Bacillus thuringiensis*. Tomada de Bravo y Soberón, 2000.

Las toxinas Cry3A y Cry1Aa tienen un 36% de identidad en su secuencia de aminoácidos mientras que la toxina Cry2Aa muestra menos del 20% de identidad en su secuencia de aminoácidos con Cry1Aa y Cry3A (Schnepf et al., 1998). En particular las estructuras de las toxinas Cry1Aa y Cry3A son más semejantes entre sí y presentan las siguientes características:

El dominio I, comprende el extremo amino-terminal y está constituido por siete hélices- $\alpha$  de las cuales la hélice  $\alpha$ -5 se encuentra rodeada por las seis restantes; el dominio II está constituido de tres láminas  $\beta$ -antiparalelas unidas entre sí por asas expuestas que constituyen las regiones variables de las diferentes toxinas Cry. Por este arreglo se propone que estas asas son similares a los sitios de unión a antígenos de las inmunoglobulinas y por lo tanto se piensa que tienen un papel importante en el reconocimiento del receptor de las toxinas Cry; por último, el dominio III constituye el extremo carboxilo-terminal y consta de un  $\beta$ -sandwich compuesto por dos láminas  $\beta$ -antiparalelas, arregladas una sobre otra (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995; Schnepf et al., 1998).

Höfte y Whiteley en 1989 notaron la existencia de cinco bloques conservados en la secuencia de aminoácidos de las toxinas Cry. Por la existencia de estos bloques conservados se propuso que las toxinas Cry presentan una estructura globular similar.

FIG 3.



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Figura 3. Bloques conservados en la secuencia de aminoácidos de las toxinas Cry. Tomada de De Maagd, et al., 2001.

El bloque 1, constituido por la hélice  $\alpha$ -5 del dominio I, la cual está involucrada en la formación de poro. El bloque 2, incluye la hélice  $\alpha$ -7 del dominio I y la primera  $\beta$ -antiparalela del dominio II. Estas dos estructuras comprenden la región de contacto entre ambos dominios. Los bloques 3, 4 y 5 se encuentran dentro del dominio III. El bloque 3, contiene la última  $\beta$ -antiparalela del dominio II, una estructura involucrada en la interacción entre el dominio I y II (Schnepf et al., 1998).

### 2.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TOXINAS CRY

El mecanismo de acción de las proteínas Cry de *Bt* consta de varios pasos dentro de los cuales se encuentran: 1. la solubilización de los cristales dentro del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles, el cual presenta un medio con condiciones alcalinas y reductoras tomando como ejemplo el intestino de muchos lepidópteros y dípteros. 2. Después de la solubilización las proteínas Cry son liberadas como protoxinas, generalmente presentan un tamaño molecular de 130-140 kDa para las toxinas Cry1 (Masson et al., 2001). 3. Una vez solubilizadas, son procesadas proteolíticamente como proteínas con

actividad tóxica de 60-70 kDa, las cuales son resistentes a las proteasas del insecto (Hofman et al., 1988). 4. Estas toxinas activadas se unen con alta afinidad a receptores que se encuentran en las células columnares de la microvellosidad apical del intestino medio de insectos susceptibles (Aronson and Shai. 2001). Se propone que esta unión específica involucra dos pasos: la unión reversible seguida de la unión irreversible (Dean et al., 1996). El paso de unión reversible está asociado con el reconocimiento entre la toxina y su receptor, mientras que la unión irreversible implica la inserción de la toxina en la membrana celular (Schnepf et al., 1998).

5. Posteriormente, ocurre un cambio conformacional en la molécula de la toxina y subsecuentemente se inserta en la membrana (Rajamohan et al., 1998).

Se postula que las moléculas de toxinas Cry forman agregados a través de interacciones toxina-toxina, los cuales son responsables de la formación de poros líticos (Soberón et al., 2000; Lorence et al., 1995; Schwartz et al., 1993), los cuales interrumpen el gradiente iónico de la microvellosidad apical, permitiendo la entrada de cationes, aniones y agua, provocando así una lisis eventual de las células que resulta finalmente en la parálisis del intestino y conlleva a la muerte de la larva (Schnepf et al., 1998). FIG. 4.

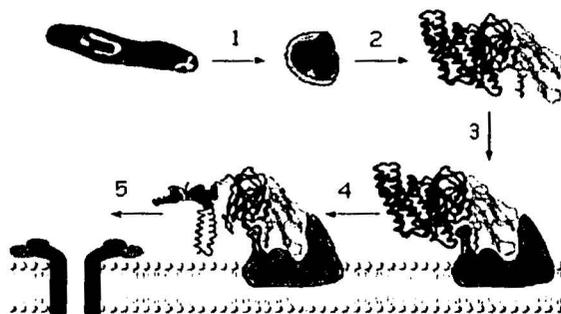


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*, los números representan los pasos secuenciales en este procedimiento. Tomada de De Maagd, et al., 2001.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.4. FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS DE LAS TOXINAS CRY

### 2.4.1. *Dominio I.*

Las hélices del dominio I son altamente anfipáticas, con las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 como las regiones más hidrofóbicas (Grochulski et al., 1995).

La estructura de este dominio, así como los resultados de mutaciones sitio dirigidas, sugieren que éste participa en la inserción de la toxina en la membrana y la formación del poro (Chen et al., 1995). Su estructura es muy similar a las regiones de formación de poro del grupo E1 de las colicinas y a la subunidad B de la toxina de la difteria. Estas estructuras se caracterizan por su actividad de formación de canales iónicos y por la aparente formación de oligómeros (Parker and Pattus, 1993).

Estudios de inserción utilizando espectroscopía de transformación infrarroja para estudiar la estructura y orientación de las hélices de la toxina Cry3A cuando se unen o insertan dentro de la membrana, sugieren que todas las hélices del dominio I excepto la hélice  $\alpha$ -1 interaccionan con la membrana lipídica y las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 presentan una orientación transmembranal de manera antiparalela. Estos resultados son consistentes con uno de los modelos propuesto para describir la orientación de las hélices del dominio I al interaccionar con la membrana, en el cual solo las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 se insertan en la membrana como una "sombrialla" sugiriendo que solamente una parte del dominio I es capaz de insertarse en la membrana.

Las toxinas Cry pueden formar canales iónicos en vesículas fosfolipídicas sintéticas, pero la eficiencia es muy baja y se requiere un exceso de toxina (Lorence et al., 1995). Sin embargo, se ha observado que si se incorpora la molécula receptora se requiere menor cantidad de toxina para la formación de canales iónicos (Schwartz and Laprade, 2000; Lorence et al., 1995)

#### **2.4.2. Dominio II.**

Se propone que el dominio II determina la especificidad ya que representa la parte más divergente en la secuencia de aminoácidos entre las diferentes toxinas Cry siendo las secuencias de las asas las regiones menos conservadas entre las diferentes toxinas. Por estudios de mutagénesis y de pequeñas modificaciones en estas regiones haciendo intercambio de fragmentos, han sido identificados algunos aminoácidos involucrados en la unión a la membrana de ciertos insectos coleópteros y lepidópteros (Dean et al., 1996). Algunos efectos de mutaciones realizadas en las regiones de las asas del dominio II de las diferentes toxinas Cry se muestran en la TABLA 1.

Los datos en esta tabla indican que pueden haber efectos de disminución ó aumento en la unión y toxicidad en las diferentes toxinas Cry al realizar mutaciones en algunos de los residuos del dominio II. También se observa que la misma mutación en algunas asas de la toxina, puede tener efectos diferentes en distintos insectos.

Estos datos han sugerido que estas asas son blancos excelentes para el diseño de nuevas toxinas, con diversa especificidad y toxicidad mejorada. (Schnepf et al., 1998; Rajamohan et al., 1996 a, b).

**TABLA 1.** Efecto de algunas mutaciones en las asas del dominio II de algunas toxinas Cry.  
Tomada de Schnepf et al., 1998.

Gene	Asa	Secuencia	Mutación	Residuo(s)	Efecto en unión <sup>a</sup> R / I	Toxicidad <sup>b</sup>	Insecto
Cry1Aa	1	FNY	AAA	313-315	N / -2%	baja	<i>B. mori</i>
Cry1Aa	2	LYRRIL	AAAAAAA	365-371	-10 x / ND	-1,000	<i>B. mori</i>
Cry1Ab	α8	AL	GS	282-283	N / N	N	<i>M. sexta</i>
Cry1Ab	α8	AL	GS	282-283	+10x / ND	+7	<i>L. dispar</i>
Cry1Ab	2	F	A	371	-2x / -35%	-600	<i>M. sexta</i>
Cry1Ab	2	F	A	371	+0.7x / ND	+1.6	<i>H. virescens</i>
Cry1Ab	2	N	A	372	+4.4x / N	+8.5	<i>L. dispar</i>
Cry1Ab	2	N	G	372	+4.4x / N	+8.5	<i>L. dispar</i>
Cry1Ab	3	G	A	439	-11.7x / N	-103	<i>M. sexta</i>
Cry1Ab	3	F	A	440	-8.9x / N	-19.6	<i>M. sexta</i>
Cry1Ac	1	GYG	VSF	312-314	-0.7x / N	-7.7	<i>M. sexta</i>
Cry1Ac	1	GYG	VYF	312-314	-1.8x / N	-6.2	<i>M. sexta</i>
Cry1Ac	2	YRRP	YRIP	367-370	-10.8x / N	-7.4	<i>M. sexta</i>
Cry1Ac	2	YRRP	FKRA	367-370	N / N	+2.0	<i>M. sexta</i>
Cry1Ac	3	SGFS	SDFS	438-441	-14.8x / N	+1,000	<i>M. sexta</i>
Cry1Ac	3	S	A	438		-200	<i>L. dispar</i>
Cry1Ac	3	G	A	439		-625	<i>L. dispar</i>
Cry1Ac	3	F	A	440		-469	<i>L. dispar</i>
Cry3A	1	YYGND	AAAAA	350-354	-9x / ND	N	<i>T. molitor</i>
Cry3A	2	PS	AA	412-413	N / ND	N	<i>T. molitor</i>
Cry3A	3	MQGSRG	AAAAAA	481-486	-4x / +20%	+2.4	<i>T. molitor</i>
Cry1C	3	Q	K	436	+93	59%	<i>S. littoralis</i>
Cry1C	3	Q	E	436	+110	47%	<i>S. littoralis</i>
Cry1C	3	R	K	437	+28	58%	<i>A. aegypti</i>
Cry1C	3	S	F	438	ND	0	<i>A. aegypti</i>
Cry1C	3	G	A	439	ND	0	<i>A. aegypti</i>

a. la unión reversible se indica como valores en número de veces, mientras que la unión irreversible se indica como porcentaje.

b. valores con signo (-) son decrementos y valores con signos (+) sin incrementos.

R. reversible. I. irreversible.

N. nulo. ND. No detectable.

### **2.4.3. Dominio III.**

Estudios recientes sugieren que el dominio III, junto con el dominio II, están involucrados en la especificidad y el reconocimiento del receptor (Aronson and Shai, 2001).

Se realizaron algunos estudios, utilizando el dominio III para la creación de toxinas híbridas (Lee et al., 1995) y se observó que este dominio determina la especificidad para las toxinas Cry1Ac y Cry1Aa para *L. dispar*. Experimentos de unión de ligando con VMMA, demostraron que las proteínas con el dominio III de la toxina Cry1Aa se unían a una proteína de 210 kDa tipo caderina y las proteínas con el dominio III de la toxina Cry1Ac se unían a una proteína de 120 kDa. Determinando de la misma manera la especificidad de la toxina Cry1Ab y Cry1C en *S. exigua* (De Maagd et al., 1996).

Más recientemente, realizando experimentos de mutagénesis se demostró que el dominio III es necesario para la unión específica de la toxina Cry1Ac en VMMA de *M. sexta* (De Maagd et al., 1999).

## **3. ANTECEDENTES PARTICULARES**

### **3.1. RECEPTORES DE LAS TOXINAS CRY**

Los receptores en la membrana de la microvellosidad apical del intestino medio de insectos blanco, son un factor clave para determinar la especificidad de las toxinas Cry (Garczynski et al., 1991; Wolfersberger et al., 1995). Esta interacción toxina - receptor, se ha estudiado con detalle con toxinas marcadas radiactivamente y con VMMA de insectos lepidópteros (Hofman et al., 1988; Van Rie et al., 1989; Lee et al., 1992).

Hasta ahora, se han podido identificar dos moléculas receptoras de las toxinas Cry, las cuales son descritas como una molécula tipo aminopeptidasa-N (Denolf, 1999) y una molécula tipo caderina (Francis, B and Bulla Jr, 1997; Vadlamudi, R, 1993).

Diferentes trabajos indican que la aminopeptidasa-N (APN) es el receptor de algunas toxinas Cry. La presencia de este receptor de 120 kDa para la toxina Cry1Ac, fue el primero en ser observado en experimentos de unión de ligando con VMMA de *M. sexta* (Garczynski et al., 1991). Antes de ser caracterizado, era sabido que la unión de Cry1Ac

con su receptor era inhibida por N-acetilgalactosamina (GalNac), sugiriendo la presencia de motivos de GalNac asociados al receptor (Knowles et al., 1994). De manera contraria a Cry1Ac, la unión de Cry1Aa ó Cry1Ab a la APN no se afecta por la presencia de este azúcar (Masson et al., 1995).

Posteriormente la proteína fue identificada como una metaloproteasa aminopeptidasa-N y su función como receptor de la toxina Cry1Ac fue demostrada cuando se incorporó a vesículas fosfolípídicas. Su clonación indicó la presencia de sitios de glicosilación y se demostró que está anclada a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI), localizado en su extremo carboxilo-terminal (Denolf et al., 1997; Knight et al., 1995).

El papel de la APN como receptor de la toxina Cry1C se demostró recientemente al realizar una reducción en los niveles de APN mediante la metodología de RNA interferente de doble cadena en larvas de *S. littura*. Como consecuencia de la expresión reducida la sensibilidad de las larvas para la toxina Cry1C disminuye (Rajagopal et al., 2002).

Se ha descrito un segundo receptor del tipo de las caderinas (Bt-R1), el cual fue purificado y clonado de *M. sexta* (Vadlamudi et al., 1993). Presenta entre 30 y 60 % de similitud con otras proteínas de la superfamilia de las caderinas, su peso molecular ha sido estimado a partir de su secuencia de cDNA y es de aproximadamente 210 kDa (Vadlamudi et al., 1995). Se ha observado que a este receptor se unen las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (Francis and Bulla Jr, 1997).

Haciendo híbridos de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac, se demostró que el dominio II de la toxina Cry1Aa es requerido para la unión de la toxina a este receptor de 210 kDa (Ihara et al., 1998).

También se ha descrito una proteína de 175 kDa (Bt-R<sub>175</sub>) similar en un 80 % con el receptor Bt-R1, esta proteína fue purificada de *Bombix mori* y es capaz de unirse a la toxina Cry1Aa (Nagamatsu et al., 1998 y 1999).

Proteínas receptoras del tipo de las caderinas pueden tener función de receptores en otros insectos. Se reportó un receptor de tamaño similar para la toxina Cry1Aa, haciendo experimentos de unión de ligando con VMMA de *L. dispar*, pero la proteína no se ha logrado purificar (Jenkins and Dean 2000).

Tanto Bt-R1 como Bt-R<sub>175</sub> al ser expresados en líneas celulares fueron capaces de unir a las toxinas Cry1A y Bt-R<sub>175</sub> proporcionó sensibilidad hacia la toxina Cry1Aa.

Recientemente se observó que una mutación que interrumpe el gene de la caderina de *H. virescens* provoca resistencia en una población de insectos , mostrando el papel funcional de la caderina como receptor de las toxinas Cry (Gahan et al., 2001).

### 3.2. EPÍTOPES EN LOS RECEPTORES QUE UNEN A LAS TOXINAS CRY

Para determinar los sitios de unión de la toxina Cry1Aa en el receptor Bt-R<sub>175</sub> de *B. mori* se produjeron algunas variantes de esta proteína receptora mediante, logrando identificar una región de aproximadamente 600 aminoácidos localizada hacia el extremo carboxilo terminal que es capaz de unir a la toxina Cry1Aa con Bt-R<sub>175</sub> (Nagamatsu et al., 1999).

Otra estrategia empleada más recientemente para mapear los sitios en los receptores que son reconocidos por las toxinas Cry1A's, ha sido la técnica del "despliegue en fagos". Utilizando esta estrategia se ha podido localizar un epítipo en el receptor Bt-R1 de *M. sexta* que interacciona con las toxinas Cry1A (Gómez et al., 2002).

Para localizar este epítipo, se aisló un anticuerpo tipo scFv, mediante la técnica de despliegue en fagos que fuera capaz de reconocer a la toxina Cry1Ab. Este anticuerpo monoclonal designado como scFv73 fue capaz de competir la interacción de la toxina Cry1Ab con el receptor Bt-R1 de *M. sexta*. La secuencia de aminoácidos del CDR3 del scFv73 (RITQTTNR), mostró 71% de similitud con una región discreta de 8 aminoácidos presentes en Bt-R1 de *M. sexta* (<sup>869</sup>HITDTN<sup>876</sup>NK) (Gómez et al., 2001). Con el fin de conocer que región de la toxina Cry1Ab era reconocida por el anticuerpo scFv73 y tomando como antecedentes trabajos que reportan el papel del dominio II de las toxinas Cry en la unión al receptor (Dean et al., 1996), se hicieron péptidos sintéticos correspondientes con las regiones de las asas expuestas de este dominio. Experimentos de competencia en ensayos tipo "western blot" mostraron que el anticuerpo scFv73 incubado previamente con el péptido sintético del asa 2 de la toxina Cry1Ab es incapaz de unirse a la misma, lo cual sugirió que esta asa reconoce al anticuerpo scFv73 y al receptor Bt-R1 lo cual fue confirmado en experimentos de unión de ligando (Gómez et al., 2002).

### 3.3. DESPLIEGUE EN FAGOS (PHAGE DISPLAY)

La técnica de despliegue en fagos "phage display" involucra la expresión de grandes bibliotecas de moléculas como proteínas ó péptidos fusionadas en la superficie de bacteriófagos filamentosos; de esta forma, estas pueden estar sujetas a selección biológica o molecular para aislar moléculas con propiedades de unión particulares (Smith, 1985; 1993). Inicialmente el sistema fue utilizado para mapear epítopes de anticuerpos por medio de la expresión de grandes bibliotecas ( $10^7$ - $10^8$ ) de péptidos al azar (Parmley and Smith, 1988; Cwirla et al., 1990; Scott and Smith, 1990). Sin embargo, ha probado ser aplicable fácilmente a muchos tipos de interacciones moleculares incluyendo la producción o manipulación de anticuerpos (McCafferty et al., 1990; Barbas et al., 1991, Griffiths et al., 1993), enzimas y sus sustratos (Corey et al., 1993; Dennis et al., 1994), interacciones proteína-proteína (Oldenburg et al., 1992; Rickles et al., 1994) y proteínas de unión a DNA (Rebar and Pabo., 1994; Choo and Klug, 1994).

Repertorios de anticuerpos recombinantes han sido derivados de hospederos inmunizados y no inmunizados. Para la primera fuente, haciendo uso de la PCR se han logrado amplificar los genes VH (Orlandi et al., 1989) de poblaciones de linfocitos del bazo de ratones inmunizados (Ward et al., 1989; Clarckson et al., 1991), de la sangre de sistema circulatorio periférico de humanos inmunizados (Mullinax et al., 1990) y de médula ósea de pacientes infectados por virus (Barbas et al., 1992). La exposición del donador al antígeno(s), resulta en el enriquecimiento del repertorio de genes específicos para el antígeno y típicamente resulta en el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad (Clarckson et al., 1991; Barbas et al., 1992). Sin embargo bibliotecas derivadas de una fuente inmunizada permiten el aislamiento de anticuerpos solamente contra un número de antígenos limitado (Barbas et al., 1992).

Gran diversidad de repertorios de anticuerpos también pueden derivar del rearrreglo de genes de humanos "no inmunizados" (Marks et al., 1991; Griffiths et al., 1993) o de genes semisintéticos generados por PCR de la línea germinal de los genes deseados usando primers que contienen la secuencia correspondiente al CDR3 (Hoogenboom and Winter, 1992; Nissim et al., 1994; De Kruif et al., 1995). Repertorios no inmunes y sintéticos han

permitido aislar miles de anticuerpos con diferente especificidad y afinidad (Hawkins et al., 1992).

Algunas regiones de reconocimiento al antígeno en el anticuerpo pueden ser clonadas y seleccionadas incluyendo:

1. Fragmentos Fv que son heterodímeros de las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) del anticuerpo, asociadas no-covalentemente.
2. Fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) los cuales consisten de las regiones VH y VL ligadas por un péptido flexible.
3. Fragmentos Fabs en los cuales están asociadas no-covalentemente las VH con las cadenas pesadas CH (VH-CH) y las VL con las cadenas ligeras CL (VL-CL) de cada anticuerpo. FIG 6.

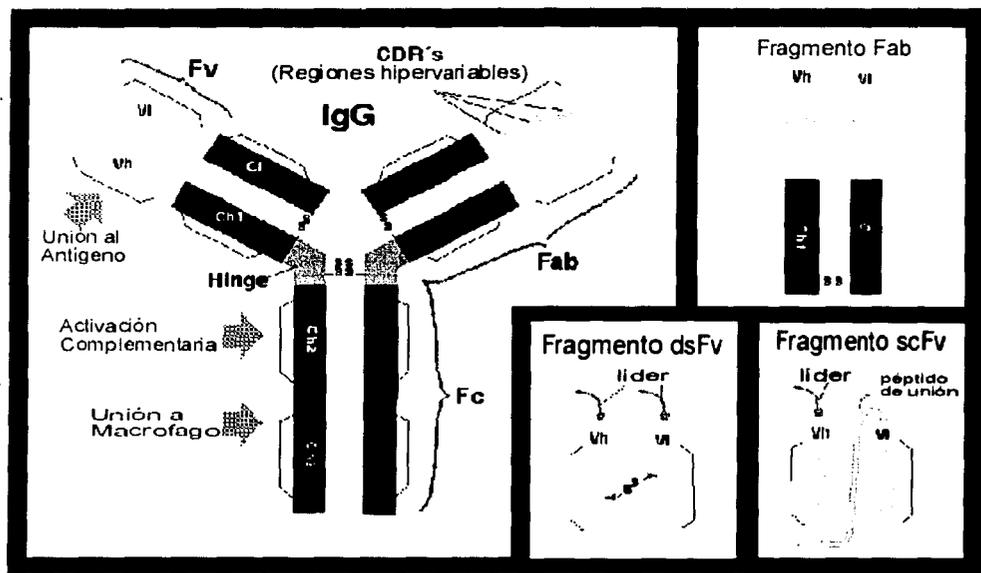


Figura 6. Diversos tipos de fragmentos creados a partir de las regiones variables de los anticuerpos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La expresión de estos fragmentos de anticuerpos se realiza mediante su fusión con algunas de las proteínas de cubierta de un bacteriófago filamentoso. De esta forma el bacteriófago flota libremente en el medio extracelular hasta que hace contacto con la estructura sexual conocida como pili en la superficie de *E. coli*. La adhesión del bacteriófago al pili esta mediada vía gp3, de la cual hay cinco copias en uno de los extremos de la partícula de fago. La gp3 es esencial para la adsorción del fago por medio del pili durante la infección. El DNA puede ser introducido dentro del huésped por otras rutas *in vitro* como transfección por electroporación (Pound, 1998).

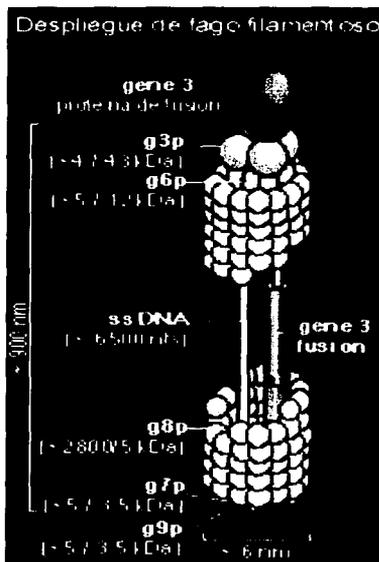


Figura 7. Estructura del bacteriófago filamentoso.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## JUSTIFICACIÓN

Es importante obtener mas información de cómo es la interacción de las toxinas Cry con su receptor en la microvellosidad apical del intestino medio de insectos susceptibles.

Por esta razón la realización de este trabajo, partió de los antecedentes mencionados a continuación:

- Mutaciones en el asa 3 de la toxina Cry1Ab afectan la unión y toxicidad en *M. sexta*.
- La técnica de despliegue en fagos “phage display” es una herramienta poderosa para el estudio de interacciones proteína-proteína.

Previamente en nuestro laboratorio se construyó una biblioteca de anticuerpos scFv a partir de la médula ósea de un conejo inmunizado con la toxina Cry1Ab (Gómez, Tesis Doctoral). Dicha biblioteca presenta una variabilidad de aproximadamente  $10^6$ .

A partir de este repertorio proponemos aislar anticuerpos monoclonales mediante la técnica de despliegue en fagos, que reconozcan específicamente al asa 3 de la toxina Cry1Ab, los cuales nos permitirán identificar que región en el receptor está siendo reconocida por dicha asa.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar el epítotope del receptor Bt-R1 de las toxinas Cry1A que interacciona con el asa 3 del dominio II.

## OBJETIVO PARTICULAR

Aislar anticuerpos scFv monoclonales que reconozcan al asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*.

## HIPÓTESIS

Los anticuerpos que reconozcan al asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* pueden compartir similitud de secuencia con el sitio del receptor que reconoce esta región de la toxina.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Purificación de la proteína Cry1Ab*

Se crece la cepa de *Bacillus thuringiensis* variedad *berliner*, la cual contiene el gene que expresa la proteína Cry1Ab, en 250 ml de medio de esporulación (SP) más 10 µg/ml de eritromicina hasta la esporulación durante 3-4 días, a 30 °C con agitación.

Posteriormente se recupera el cultivo centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min y se elimina el sobrenadante, la pastilla se resuspende y lava en una solución 0.3 M de NaCl, 0.01 M de EDTA, pH 8, centrifugando a 10,000 rpm 10 min tres veces.

Se hacen tres lavados de la pastilla en agua con PMSF 1 mM. Finalmente, se resuspende la pastilla en una solución amortiguadora (TTN) que contiene 20 mM de tris, 300 mM de NaCl, tritón X-100 0.01% pH 7.4 (se puede sonicar si en el medio de cultivo no existe una cantidad suficiente de esporas-cristales, dando tres pulsos de 1 min 3 veces a 20 watts con 1 min de descanso).

Para la purificación de los cristales por gradiente de sacarosa se utilizan las siguientes concentraciones: 84, 79, 72 y 62% de sacarosa agregando a cada una de estas 2 ml de tris-HCl 1 M pH 8, 80 µl de NaCl 5 M y 400 µl tritón X-100, se centrifuga a 23000 rpm por 20 min a 15 °C.

Se separan las fracciones obtenidas y se recupera aquella que contenga los cristales, para eliminar la sacarosa se lava la fracción con agua Milli Q mas tritón X-100 0.01%,

centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min 3 veces. Finalmente se resuspende la pastilla en tris-HCl 50 mM pH 8, 1 mM de PMSF y pueden mantenerse a 4 °C.

### ***Solubilización de los cristales y activación de la protoxina.***

Se toma una alícuota de los cristales (en tris-HCl- PMSF) y se centrifuga 10 min a 10,000 rpm y la pastilla se resuspende en una solución amortiguadora de carbonato de sodio 50 mM pH 10.5 mas 0.02% de mercaptoetanol. Se incuba a 37 °C con agitación durante 2 hrs, pasado este tiempo se centrifuga la muestra a 10,000 rpm por 10 min y se recupera el sobrenadante.

La activación se hace con una proporción 1: 20 (proteína:proteína) de tripsina (SIGMA) incubando la muestra a 37 °C con agitación suave durante 1 h, posteriormente se adiciona 1 mM final de PMSF para inactivar las proteasas, se centrifuga 10 min a 10,000 rpm y se recupera el sobrenadante (toxina de 60-65 kDa).

El proceso de solubilización y activación de protoxina a toxina se verifica en un gel de acrilamida al 9% en condiciones desnaturizantes.

### ***Determinación de la concentración de proteína.***

Esta se determina por el método de Bradford (Bio-Rad) tomando como referencia una curva preparada con albúmina bovina (BSA).

### ***Rescate de la biblioteca de scFv's de médula ósea de conejo inmunizado con toxina Cry1Ab.***

Se inoculan 50 µl de la biblioteca en 50 ml de medio de cultivo 2xTY con 100 µg/ml de ampicilina y glucosa 1%. El cultivo se incuba a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) leída a 600 nm de 0.5. Se infectan 10 ml de este cultivo con el fago ayudador M13 en una proporción 1:20 (bacterias:fago) e incuban sin agitación a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se centrifugan las células a 1,385 rpm por 10 min y se

resuspende la pastilla en medio de cultivo 2xTY con 100 µg/ml ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina y se adiciona a 270 ml de 2xTY amp/kan dejando incubar con agitación a 30 °C toda la noche (Nissim, et al. 1994).

### ***Precipitación de los fagos con polietilenglicol (PEG)***

Centrifugar el cultivo anterior a 16,950 rpm por 10 min y adicionar 60 ml de PEG 20%, NaCl 2.5 M (PEG/NaCl) al sobrenadante (1/5 del volumen final), mezclar bien e incubar a 4 °C durante 1 h. Pasado este tiempo, centrifugar a 16,950 rpm por 30 min y resuspender la pastilla en agua estéril mas 8 ml de PEG/NaCl, mezclar bien e incubar a 4 °C durante 20 min. Se centrifuga la muestra a 1,385 rpm por 30 min y se resuspende la pastilla en PBS estéril, se vuelve a centrifugar a la misma velocidad por 10 min para remover cualquier residuo de bacterias y se recupera el sobrenadante que contiene los fagos, los cuales pueden almacenarse a 4 °C por un periodo corto (Nissim, et al. 1994).

### ***Selección de fagos en inmunotubo.***

Dejar pegando una concentración conocida de la toxina Cry1Ab que puede variar entre 1-100 µg, en una solución amortiguadora de carbonatos 50 mM pH 9.6 en un inmunotubo (Nunc, maxisorp<sup>4</sup>) toda la noche a 4 °C. Al siguiente día lavar el inmunotubo 3 veces con PBS, posteriormente se bloquea con leche descremada al 2% en PBS (MPBS) incubando a 37 °C durante 2 hrs, transcurrido este tiempo se lava 3 veces el inmunotubo con PBS para después adicionar  $1 \times 10^{10}$  fagos en 4 ml MPBS 2% e incubar 2 hrs a temperatura ambiente haciendo rotaciones ocasionales.

Lavar 20 veces el inmunotubo con PBS-Tween-20 (0.1%) y otras 20 veces con PBS.

Finalmente se recuperan los fagos unidos a la proteína (toxina Cry1Ab) pegada en el inmunotubo con 1 ml de trietilamina 100 mM agitando perfectamente el inmunotubo durante 10 min e inmediatamente, al pasar el tiempo de agitación adicionar 200 µl de tris 1 M pH 7.4 para neutralizar.

Para realizar la amplificación de los fagos recuperados del inmunotubo, se toma una alícuota para infectar 5 ml de un cultivo de la cepa TGI de *E. coli*, se incuba a 37 °C por 30

min sin agitación para permitir la infección, posteriormente se distribuye la muestra en cajas petri de 20 x 20 cm con medio 2xTY amp/gluc y se incuban a 37 °C toda la noche. Al siguiente día se adiciona a cada caja 2 ml de medio 2xTY más 2 ml de glicerol y se recuperan las células con una varilla de vidrio para iniciar una nueva ronda de selección. FIG 8.

**NOTA:** Para realizar las rondas de selección, se toman 50 µl de este homogenado y se ponen en un matraz con 50 ml de medio 2xTY amp/glu y se continúa siguiendo los mismos pasos que para el rescate de la librería de scFv's con el fago ayudador M13.

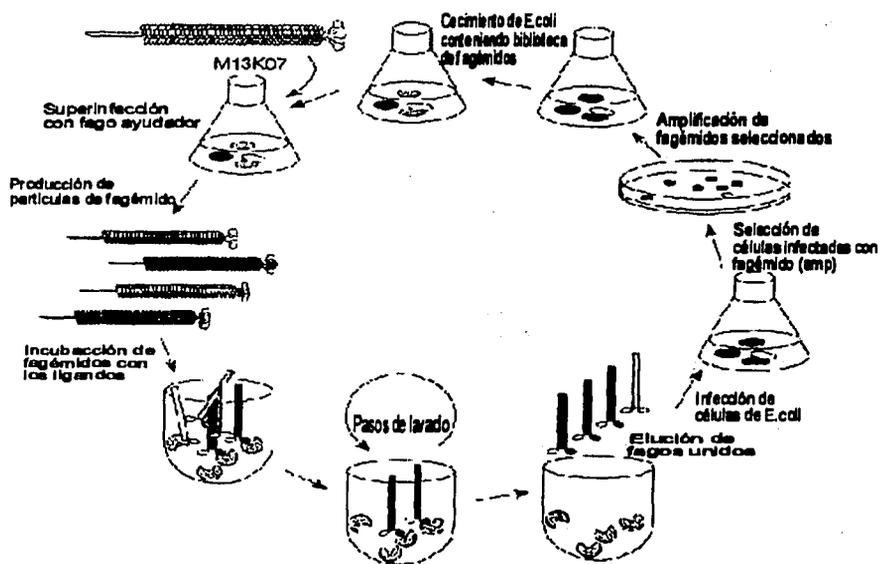


Figura 8. Selección de fagos en inmunotubo (phage display).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### ***Titulación de fagos obtenidos en cada ronda de selección.***

Después de recuperar los fagos, se toman 10 µl de los mismos y se mezclan con 990 µl de medio 2xTY ( $1 \times 10^{-2}$ ) y se preparan diluciones seriadas.

Posteriormente se toman 10 µl de cada dilución de los fagos y se mezclan con 990 µl de un cultivo de la cepa TG1 previamente crecido a una D.O. leída a 600 nm de 0.5, se incuban a 37 °C durante 30 min sin agitación para permitir la infección. Por último se platean 100 µl de células infectadas correspondientes a cada dilución en cajas petri con 2xTY amp/gluc. Dejar toda la noche a 37 °C y contar el número de colonias resistentes a ampicilina.

### ***Análisis de los patrones de restricción de los fagos- anticuerpos scFv seleccionados.***

Se crecen colonias aisladas en medio LB amp incubando toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se purifica el DNA de cada colonia utilizando el Kit de Wizard y se verifica en un gel de agarosa al 1 %.

Posteriormente se amplificaron los fragmentos scFv por PCR con los oligos Aw1(5' GAA TTT TCT GTA TGA GG 3') y JK52 (5' TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC 3') (Hawlich, et al. 1999) en las siguientes condiciones:

Un ciclo de 94 °C durante 5 min, 30 ciclos: 94 °C 1 min, 55 °C 1 min 30 s, 72 °C 2 min 30 s y un ciclo de 72 °C durante 10 min.

Al finalizar la reacción de PCR se verifica la talla de los fragmentos amplificados en un gel de agarosa al 1.5 %, la cual debe ser de aproximadamente 900 bp.

A continuación se digieren los productos de la reacción de PCR con la enzima de restricción AluI durante 3 hrs a 37 °C y se verifican los productos de la digestión en un gel de agarosa al 3 %.

### ***Producción y purificación de anticuerpos scFv en forma soluble.***

Se crece cada clona individual en 50 ml de medio 2xTY amp/gluc 2% a 37 °C, hasta una D.O. leída a 600 nm de 0.7-1.0 y se centrifuga el cultivo a 1,090 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente la pastilla se resuspende en 50 ml de medio 2xTY

conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y 1 mM de isopropil-β-D tiogalactopiranosido (IPTG) y se incuba toda la noche a 30 °C.

Centrifugar el cultivo a 1,090 rpm durante 15 min a 4 °C, resuspender la pastilla en 1 ml de una solución amortiguadora (PB) conteniendo: PBS 1X, NaCl 1 M y EDTA 1 mM e incubar en hielo la muestra durante 15 min, transcurrido este tiempo centrifugar la muestra nuevamente a 1,090 rpm durante 10 min a 4 °C y recuperar el sobrenadante en el cual está presente el contenido periplásmico de las células, posteriormente agregar MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 2 mM y 400 µl finales con una proporción 1:1 de Ni-NTA : PB e incubar 10 min con agitación.

Centrifugar 15 seg aproximadamente a 120 rpm y desechar el sobrenadante, lavar la pastilla con 10 ml de la solución amortiguadora PB tres veces centrifugando en cada coacción 15 seg a 120 rpm, después del último lavado eluir la muestra con 100 µl de imidazol 250 mM incubando durante 10 min, transcurrido este tiempo centrifugar 15 seg a 120 rpm y recuperar el sobrenadante.

#### ***Recuperación de fagos "monoclonales" con PEG/NaCl.***

Se crece cada clona individual en 10 ml de 2xTY amp/gluc 2%, a 30 °C, hasta una D.O. leída a 600 nm de 0.5. Se infectan las células con el fago ayudador M13 (1:20) y se incuban a 37 °C con agitación suave durante 1 h, posteriormente se toman 5 ml del cultivo y se inoculan en 50 ml de 2xTY amp/Kan y se dejan creciendo toda la noche a 37 °C con agitación.

Al día siguiente se centrifuga el cultivo a 16,950 rpm por 10 min y se adiciona 1/5 del volumen de PEG/NaCl al sobrenadante y se mantiene 1 h ó mas a 4 °C. Se centrifuga a a 16,950 rpm por 30 min y se resuspende la pastilla en agua estéril mas PEG/NaCl, se mantiene 20 min a 4 °C, se vuelve a centrifugar a 1,385 rpm por 30 min y se resuspende la pastilla en 1 ml de PBS estéril posteriormente se centrifuga a 1,385 rpm por 10 min para remover cualquier residuo de bacterias y se guarda el sobrenadante que contiene los fagos a 4 °C por un periodo corto.

### ***“Western blot”***

En un gel preparativo al 9 % en condiciones desnaturizantes se corren 5 µg de la toxina Cry1Ab y posteriormente se realiza la transferencia de la proteína a una membrana de PVDF al terminar la transferencia se tiñe la membrana con rojo de ponceau para verificar que la proteína fue transferida. El exceso del colorante se lava con agua.

Se bloquea la membrana con leche descremada en PBS-T al 0.05 % con agitación durante 1h, se lava tres veces con PBS-T 20 e incubó con los scFv's purificados durante 90 min, se lava con PBS-T y posteriormente se incubó durante 2 hrs con el anticuerpo primario anti-c-myc (dilución 1:5000), se lava con PBS-T y se incubó 2 hrs con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa utilizando la misma dilución.

Para revelar se utilizaron los reactivos de quimioluminiscencia (PIERCE) como lo indican las recomendaciones del fabricante.

### ***Experimento de ELISA***

Se cubren los micropozos de una placa de 96 pozos (Corning) con 100 µl de una solución con 10-100 µg/ml de antígeno (toxina Cry1Ab) preparada en una solución amortiguadora de carbonato 50 mM pH 9.6. Incubar la placa a 4 °C toda la noche.

Al día siguiente lavar 3 veces con PBS, posteriormente cubrir cada pozo con 200 µl de MPBS 2% durante 2 hrs a 37 °C para bloquear. Lavar 3 veces con PBS y adicionar  $1 \times 10^{10}$  fagos precipitados con PEG/NaCl, completando a un volumen final de 100 µl con MPBS 2% final, incubar por 90 min a temperatura ambiente.

Lavar 3 veces con PBS-Tween-20 0.05% y después lavar 3 veces con PBS. Adicionar el anticuerpo primario sheep-anti-M13 preparando una dilución 1:1000 con MPBS 2%, incubar por 90 min a temperatura ambiente y posteriormente lavar la placa 3 veces con PBS-Tween-20 0.05% y después lavar 3 veces con mas PBS. Adicionar el anticuerpo secundario HRP-anti-sheep-M13 y seguir el mismo procedimiento que para el primario.

Desarrollar la reacción con el sustrato TMB (disolver 5 mg de TMB en 1 ml de DMSO): añadir 250 µl de la solución TMB a 12 ml de una solución reguladora de citratos y 10 µl de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %, utilizar 100 µl de esta solución en cada micropozo, dejar transcurrir de 20-30 min máximo en la oscuridad. Para detener la reacción adicionar 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, donde la reacción cambiará de un color amarillo a azul, por último leer la absorbancia de 450-650 nm en un lector de placas de ELISA (Nissim et al., 1994).

**NOTA:** Para la realización del experimento de competencia en placa de ELISA, se pre-incubaban los fagos monoclonales con la toxina Cry1Ab durante 1 hr mientras transcurren las 2 hrs de incubación de la placa con MPBS 2% y posteriormente se continua el mismo procedimiento antes descrito.

*Secuencia de aminoácidos del péptido sintético utilizado para el experimento de competencia en placa de ELISA.*

Secuencia de aminoácidos del asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab sintética

S G F S N S S V S

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **“ Purificación de cristales por gradiente de sacarosa y procesamiento de la protoxina Cry1Ab”**

En el presente estudio se investigó la interacción de las toxinas Cry1, específicamente la toxina Cry1Ab con su receptor en el intestino medio de insectos susceptibles. Para obtener mas información de este reconocimiento nos propusimos aislar anticuerpos scFv que reconozcan al asa 3 de esta toxina.

Este trabajo se inició con la purificación de la toxina Cry1Ab.

La toxina Cry1Ab se purificó de la cepa *Bacillus thuringiensis* variedad *berliner/1715*, la cual contiene el gen que expresa esta proteína para posteriormente realizar todos los experimentos contenidos en este trabajo.

La purificación de los cristales de esta bacteria se realiza mediante un gradiente discontinuo de sacarosa previamente descrito en materiales y métodos.

Después de la purificación de los cristales, se lleva a cabo la solubilización de los mismos y el resultado de este procesamiento es una proteína de aproximadamente 130 kDa llamada protoxina la cual puede observarse en un gel en condiciones desnaturizantes como se muestra en la FIG 9.

Para que esta proteína pase a su forma activa se requiere procesarla con tripsina utilizando una relación 1:20 (tripsina:proteína), finalmente se recupera la fracción soluble que contiene una proteína de aproximadamente 60-65 kDa a la que designamos como toxina activada, la cual también se puede apreciar en la FIG 9.

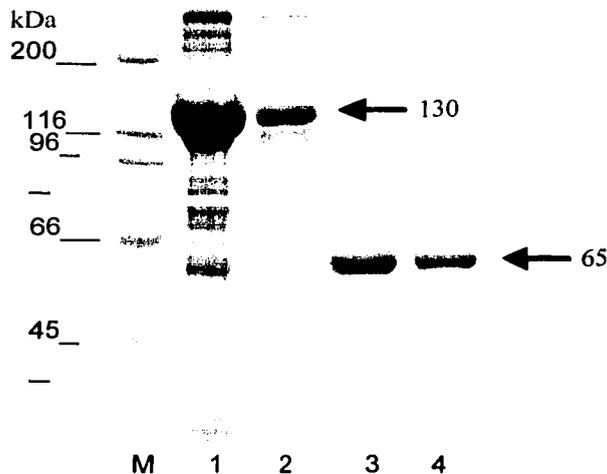


Figura 9. Solubilización de los cristales y activación de la toxina Cry1Ab.

M. marcador de peso molecular.

1. cristales de *Bt*.

2. protoxina de aproximadamente 130 kDa.

3-4. toxina Cry1Ab de aproximadamente 65 kDa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**“Selección de anticuerpos scFv que reconocen al asa 3 de la toxina Cry1Ab por medio de la técnica de despliegue en fagos“ Phage display”**

Para la recuperación de los anticuerpos de interés, se partió de una biblioteca inmune previamente generada en nuestro laboratorio (Gómez Tesis Doctoral), la cual fue clonada en el fagémido pCANTAB y los scFv's fueron fusionados a la proteína 3 del bacteriófago M13.

El proceso de selección de los anticuerpos anti-asa 3 se realizó mediante la técnica de despliegue en fagos “phage display”, la cual está documentada como una herramienta poderosa y muy útil para el mapeo de epítopes involucrados en interacciones proteína-proteína. Cada ronda de selección consiste de un ciclo de unión de los fagos que expresan los scFv's al antígeno inmovilizado, lavado de los fagos que no se unieron, elusión de los fagos unidos y la amplificación y enriquecimiento de los mismos para iniciar una nueva ronda de selección. FIG 8.

Los datos correspondientes al título de fagos de entrada, eluidos y finalmente amplificados durante las rondas de selección realizadas en este trabajo se encuentran resumidos en la TABLA 2.

**TABLA 2.** Títulos obtenidos en las rondas de selección en inmunotubo y ronda de selección en placa de ELISA.

Ronda de selec.	Título de fagos de entrada	Título de fagos eluidos	Título de fagos amplificados	[] de antígeno inmunotubo/placa
1 <sup>a</sup>	$1.0 \times 10^{11}$ ufc/ml	$2.2 \times 10^6$ ufc/ml	$3.4 \times 10^{13}$ ufc/ml	50 µg de toxina Cry1Ab.
2 <sup>a</sup>	$1.0 \times 10^{11}$ ufc/ml	$4.5 \times 10^6$ ufc/ml	$9.0 \times 10^{11}$ ufc/ml	50 µg de toxina Cry1Ab.
3 <sup>a</sup> Asa 3	$1.0 \times 10^{11}$ ufc/ml	$2.4 \times 10^7$ ufc/ml	$2.2 \times 10^{13}$ ufc/ml	10,000 nM de asa 3 sintética biotinilada.

Como se observa en esta tabla , las dos primeras rondas de selección se realizaron con la toxina Cry1Ab y en la tercera ronda ya utilizamos nuestro blanco de interés, es decir el asa 3 del dominio II de esta toxina.

Esta estrategia se eligió con la finalidad de reducir el número de clonas inespecíficas que pueden estar presentes en el repertorio original y además porque la selección contra el asa 3 se realizó con un péptido sintético acoplado a biotina del cual se dispone de una cantidad limitada; esta misma situación nos llevó a realizar la tercera ronda de selección en placas de 96 pozos acopladas a estreptavidina.

Es interesante notar que en la tercera ronda de selección fuimos capaces de recuperar anticuerpos contra el asa 3 a pesar de la baja concentración del antígeno y esto nos habla del enriquecimiento previo que se obtuvo al realizar las dos rondas de selección con la toxina completa.

### **“Caracterización de clonas anti-asa 3”**

Después de haber recuperado los fagos que reconocieron al asa 3 sintética del dominio II de la toxina Cry1Ab ( $2.4 \times 10^7$ ), se eligieron al azar 10 colonias aisladas con el fin de conocer su patrón de restricción y determinar cuanta variabilidad había entre ellas.

Para la realización de este experimento, se amplificaron por medio de PCR los fragmentos scFv y los productos obtenidos se digirieron con la enzima de restricción AluI.

El análisis de estos patrones indicó la existencia de al menos 6 clonas con patrón de restricción diferente las cuales se pueden observar en la FIG 10. Estos seis scFv's fueron utilizados para los experimentos posteriores.

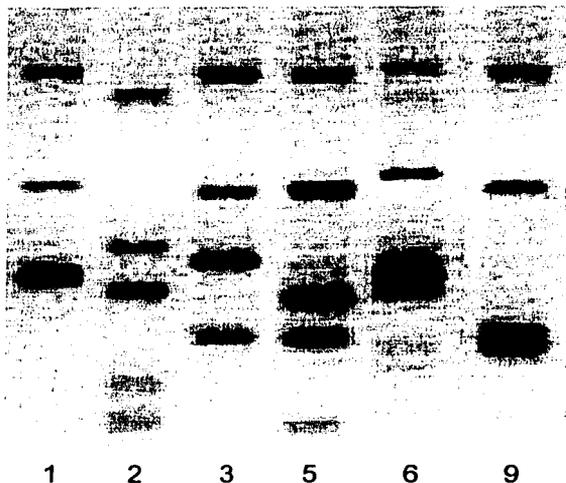


Figura 10. Patrones de restricción de las clonas 1, 2, 3, 5, 6 y 9.

#### **“Purificación de los seis anticuerpos monoclonales (scFv) en forma soluble”**

Como se mencionó anteriormente en nuestro laboratorio se construyó una biblioteca de anticuerpos inmunes contra la toxina Cry1Ab. Dicha biblioteca fué clonada inicialmente en el vector fagémido pCANTAB el cual se muestra en la FIG 11, este vector carece de una cola de histidinas y esto dificulta la purificación de anticuerpos en forma soluble, por esta razón fue necesario subclonar dichas clonas en el vector fagémido pSyn1 entre los sitios *EcoR1* y *Hind III* FIG 11, el cual presenta una cola de histidinas que facilita la purificación de los anticuerpos scFv en forma soluble.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

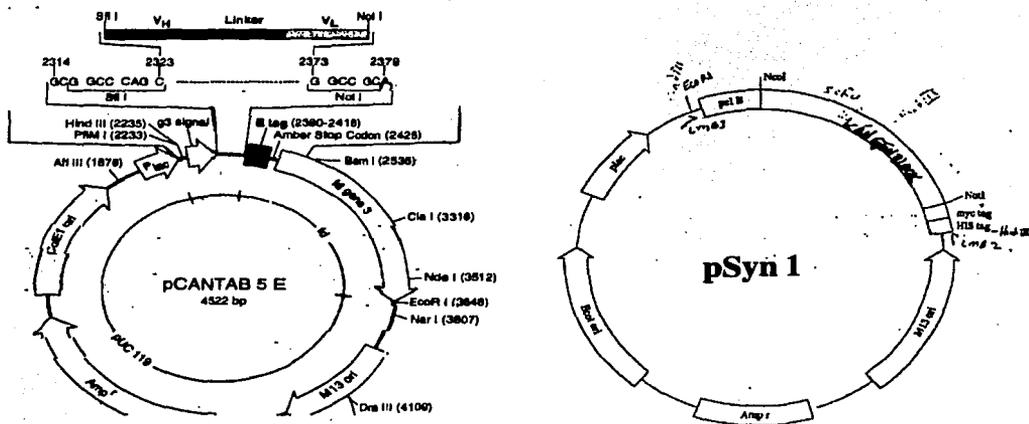


Figura 11. Vectores utilizados para la clonación y subclonación de la biblioteca de scFv's inmune contra la toxina Cry1Ab de *Bt*.

La purificación de los anticuerpos de las seis clonas con patrón de restricción diferente se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos. Después de haber realizado este procedimiento la cantidad de proteína soluble (scFv) recuperada de cada clona fue muy poca para continuar con los experimentos posteriores; sin embargo se realizó un ensayo tipo "western blot" para observar la interacción entre cada uno de los diferentes scFv's y la toxina Cry1Ab obteniendo los resultados que se muestran en la FIG 12.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

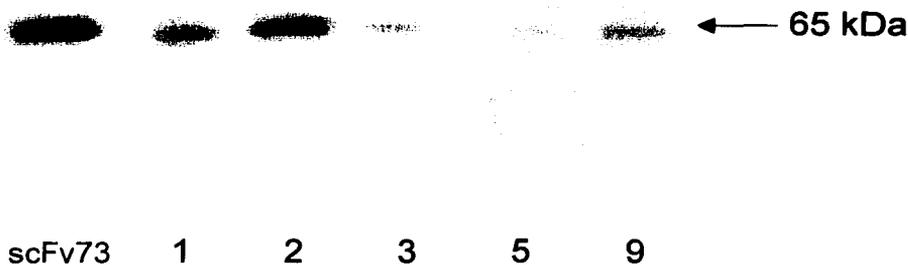


Figura 12. Interacción entre cada scFv purificado con la toxina Cry1Ab.

En esta figura podemos observar que las clonas 1, 2 y 9 presentan una mayor interacción con la toxina Cry1Ab, como en el caso del anticuerpo scFv73 el cual ya ha sido caracterizado en trabajos anteriores (Gómez et al., 2002) y por lo tanto lo utilizamos como control positivo.

La figura muestra también la ausencia de la clona 6 debido a que no fue posible subclonarla en el fagémido pSyn 1 y en el caso de la clona 3 la cantidad de proteína soluble no es muy buena por lo que se observa poca interacción con la toxina Cry1Ab.

TESIS CON  
FOLLA DE ORIGEN

Con respecto a la obtención de una baja cantidad de proteína de scFv's solubles y respecto al scFv de la clona 6 que no fue posible purificar; se sabe que algunas secuencias de los anticuerpos pueden presentar una alta susceptibilidad a las proteasas contenidas en la bacteria huésped y de esta manera la expresión de los anticuerpos solubles no se logra o es muy baja, ya que la célula comienza a degradarlos en cuanto le son introducidos o bien porque para ella esa molécula resulta tóxica. De esta forma se ha observado que la expresión y secreción de proteínas exógenas puede dañar a las células bacterianas y es por eso que es necesario el uso de un promotor que pueda ser altamente regulado para que las células puedan crecer a la D.O. necesaria sin que se pierda el plásmido o se degrade la secuencia del anticuerpo, antes de que la expresión sea inducida (Paund et al. 1998).

Otra posible causa por la cual no se obtuvo una proteína soluble, puede ser la no compatibilidad de codones, puesto que los anticuerpos para crear la biblioteca inmune son extraídos de células de mamífero y al transferir estas moléculas a una célula procarionte es probable que ocurra esta incompatibilidad, la cual no permite la expresión adecuada de los anticuerpos y por lo tanto no es posible obtenerlos en una forma soluble.

Dado que la cantidad de anticuerpo soluble en las seis clonas fué escasa, se decidió continuar el trabajo con los anticuerpos monoclonales en el formato fago-anticuerpo.

#### **“Purificación de los seis anticuerpos monoclonales seleccionados en formato fago-anticuerpo”**

Para continuar con la caracterización de las seis clonas anti-asa3 se realizó la purificación de las mismas en formato fago-anticuerpo mediante la precipitación con PEG como se describe en materiales y métodos. Al llevar a cabo este procedimiento para purificar los anticuerpos monoclonales, se obtuvo un crecimiento muy escaso tanto en medio sólido como en cultivo líquido de la clona 5, por lo que fue descartada para la purificación de anticuerpo monoclonal, obteniendo finalmente los títulos de las cinco clonas restantes, los cuales se presentan en la TABLA 3.

**TABLA 3.** Títulos obtenidos de la purificación de los anticuerpos-monoclonales en formato fago-anticuerpo de cada clona seleccionada.

<b>Clona</b>	<b>Título</b>
1	$4.6 \times 10^{11}$ ufc/ml
2	$6.5 \times 10^{10}$ ufc/ml
3	$1.9 \times 10^{11}$ ufc/ml
6	$8.0 \times 10^{10}$ ufc/ml
9	$1.2 \times 10^{11}$ ufc/ml

**“Experimento de competencia en placa de ELISA utilizando un exceso de asa 3 sintética como competidor”**

Después de haber obtenido cada fago monoclonal se realizó un experimento de ELISA para observar la interacción de cada uno de estos con la toxina Cry1Ab utilizando 5 µg de toxina Cry1Ab con  $1.0 \times 10^{10}$  ufc/ml (100 µl) de cada fago monoclonal, obteniendo los valores de absorbancia que se muestran en la FIG 13.

Posterior a la observación de la interacción de cada fago monoclonal con la toxina Cry1Ab, se realizó un experimento de competencia, en el cual se preincubaron los fagos con un exceso del asa 3 sintética de dicha toxina para saber si estos eran capaces de seguir uniéndose a la misma. En este experimento se utilizó como control al asa 2 sintética de la toxina Cry1Ab para asegurar que la interacción de las clonas anti-asa 3 aisladas sea específica contra dicha asa de esta toxina.

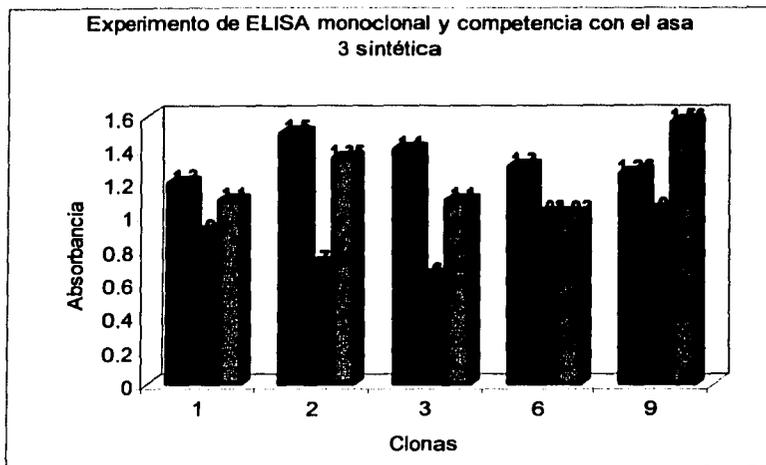


Figura 13. Experimento de ELISA con los fagos monoclonales y competencia con el asa 3 de la toxina Cry1Ab de *Bt*.

- \*Interacción de cada clona (fago monoclonal) con la toxina Cry1Ab de *Bt*.
- \*Interacción de cada clona previamente incubada con un exceso del asa 3 sintética y la toxina Cry1Ab de *Bt* (competencia).
- \*Interacción de cada clona previamente incubada con un exceso del asa 2 sintética y la toxina Cry1Ab de *Bt* (competencia).

Como se observa en la FIG 13 los valores de absorbancia correspondientes a la interacción de cada fago monoclonal con la toxina Cry1Ab, son mayores con respecto a los obtenidos al preincubar los fagos con un exceso de 50  $\mu$ l de asa 3 y asa 2 sintéticas como competidor con excepción de la clona 9 la cual muestra tener una mayor interacción con el asa 2 de la toxina Cry1Ab.

Por otra parte al observar los valores de absorbancia de estas cinco clonas, se puede notar que las clonas 2 y 3 reconocen de manera muy específica al asa 3 sintética del dominio II de la toxina Cry1Ab y no al asa 2 de la misma toxina utilizada como control, esto es claro ya que el valor de la absorbancia disminuye drásticamente (aproximadamente en un 50 %)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

al poner el exceso de asa 3 sintética como competidor, lo cual sugiere que ambas clonas compiten mejor por la unión del asa 3 de la toxina Cry1Ab que las tres restantes.

Es preciso señalar que existen diferencias en la sensibilidad por las toxinas en los diversos órdenes de insectos, de ahí la importancia de conocer los sitios de interacción de estas proteínas insecticidas con su receptor, ya que esta puede ser la clave de la especificidad de estas toxinas que muestran un efecto tóxico diferente en cada insecto blanco. Como se ha reportado con anterioridad las toxinas Cry presentan una gran variabilidad en algunas de las asas que conforman el dominio II involucrado en la toxicidad de las mismas y estas diferencias en dichas regiones pueden deberse a que las toxinas presentan variación en cuanto a su blanco de acción. Tal es el caso del asa 3 sobre la cual se realizó este estudio, puesto que esta región es totalmente distinta en la toxina Cry1Aa (QAAGAVY) y en la toxina Cry1Ab (SGFSNSSVS) y ambas toxinas al parecer reconocen a los mismos receptores en el intestino medio de diferentes insectos blanco.

## 6. CONCLUSIÓN

Durante el desarrollo de este trabajo se obtuvieron al menos dos anticuerpos en formato fago-anticuerpo que reconocen al asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*, lo cual es de gran importancia para poder entender mas acerca de la interacción de las toxinas Cry1A con su receptor(es) en el intestino medio de insectos susceptibles.

## 7. PERSPECTIVAS

El haber obtenido dos anticuerpos que reconocen al asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* conlleva a un arduo trabajo donde algunos de los experimentos por realizar son los siguientes:

1. Lograr una buena expresión de los anticuerpos como proteína soluble para su empleo en experimentos de competencia y unión a la toxina Cry1Ab.
2. Caracterizar cada uno de los anticuerpos obtenidos (2 y 3) lo cual involucra la obtención de su secuencia de aminoácidos y la identificación de la región del receptor con la que estos muestren similitud de secuencia.
3. Continuar con la realización de experimentos *in vitro* utilizando estos anticuerpos para poder determinar cual es el papel del asa 3 en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A.
4. Realizar experimentos *in vivo* con cada uno de estos anticuerpos para determinar y comprobar su papel sobre el mecanismo de acción de las toxinas Cry1 en larvas de algunos insectos susceptibles

De esta forma, realizando este tipo de experimentos se podrán identificar ésta y otras regiones tanto en la toxina como en el receptor(es) que intervengan en el mecanismo de acción de las toxinas Cry, siendo la técnica de despliegue en fagos "phage display" una herramienta de gran utilidad para la localización de dichas regiones.

## BIBLIOGRAFÍA

**Aronson, A. I., Shai, Y.** 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective : unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Lett.* 195: 1-8

**Barbas, C. F., Bjorling, E., Chiodi, F., Dunlop, N., Cababa, D., Jones, T. M., Zebede, S. L., Persson, M. A., Nara, P. L., Norrby, E., and Burton, D. R.** 1992. Recombinant human Fab fragments neutralize human type-1 immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 9339-9343.

**Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A. and Benkovic, S. J.** 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces (Phabs): the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7978-7982.

**Beegle, C. C. and Yamamoto, T.** 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can. Entomol.* 124: 587-616.

**Bishop, D.H.L.** 1994. Biopesticides. *Curr. Opin. Biotech.* 5: 307-311.

**Bravo, A., Jansens, S. and Peferoen, M.** 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 237-246.

**Bravo, A y Soberón, M.** 2000. Microbios en línea. Coordinación de la investigación científica, UNAM. Martínez, R. E. y Martínez, R. J (editores).

**Burton, S. L., Ellar, D. J., Li, J. And Derbyshire, D. J.** 1999. N-Acetilgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III lectin-like fold of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287: 1011-1022.

**Chen, X. J., Curtiss, A., Alcántara, E. Dean, D. H.** 1995. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *M. sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270: 6412-6419.

**Chomczynsky, P. and Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

**Choo, Y. and Klug, A.** 1994. Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized fingers displayed on phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11-163.

**Clarckson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., and Winter, G.** 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature.* 352: 624-628.

**Corey, D., Shiau, A., Yang, Q., Janowski, B. and Craik, C.** 1993. Trypsin display on the surface of bacteriophage. *Gene.* 128: 129-134.

**Cwirla, S., Peters, E., Barret, R. and Dower, W.** 1990. Peptides on phage a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6378-6382.

**De Kruif, J., Terstappen, L., Ejand Logtenberg, T.** 1995. Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 3938-3942.

**De Maagd, R. A., Bakker, P. L., Masson, L., Adang, M. J., Sangadala, S., Stiekema, W. and Bosh, D.** 1999. Domain III of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAc is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 31: 463-471.

**De Maagd, R. A., Bravo, A., Crickmore, N.** 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Rev. TRENDS in Genetics*. 17 (4): 193-199.

**De Maagd, R. A., Kwa, M. S. G., van der Klei, H., Yamamoto, T., Scripper, B., Vlak, J., Stiekema, W. J. and Bosh, D.** 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1537-1543.

**Dean, D. H., Rajamohan, F., Lee, M. K., Wu, S-J., Chen, X. J., Alcántara, E. and Hussain, S. R.** 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis-minireview. *Gene (Amst)* 179: 111-117.

**Dennis, M. S. and Lazarus, R. A.** 1994. Kunitz domain inhibitors of tissue factor-factor. Potent and specific inhibitors by competitive phage selection. *J. Biol. Chem.* 269: 22: 137-22, 144.

**Denolf, P.** 1999. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin receptor in the insect midgut. *Recent Res. Devel. Microbiol.* 3: 235-267.

**Denolf, P., Hendrickx, K., Vandamme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. and Van Rie, J.** 1997. Cloning and Characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 248: 748-761.

**Estruch, J. J., Warren, G. W. Mullins, M.A., Nye, G. J., Craig, J. A. and Koziel, M. G.** 1996. Vip 3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5389-5394.

**Francis, B. R. and Bulla Jr., L. A.** 1997. Further characterization of Bt-R1, the cadherin-like receptor for Cry1Ab toxin in Tobacco hornworm (*M. sexta*) midguts. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27: 541-550.

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

**Garczynski, S. F., Crim, J. W. and Adang M. J.** 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2816-2820.

**Githeko, A.G., Lindsay, S.W., Confalonieri, E. U., Patz, J. A.** 2000. Climate change and vector-borne disease: a regional analysis. Bulletin WHO. *Internal J. Public.* 78, 9: 1136-1147.

**Gómez, I., Miranda-Rios, J., Rudiño, E., Oltean, D., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M.** 2002. Hidropathic complementarity determines interaction of epitope <sup>869</sup>HITDTNNK <sup>876</sup> in *Manduca Sexta* Bt-R1 receptor with loop2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *JBC Papers in Press. Manuscript: M203121200.* 20: 32-44.

**Gómez, I., Oltean, D., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M.** 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using Phage Display. *The Journal of Biological Chemistry.* 276 (31): 28906- 28912.

**Griffiths, A. D., Malqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., Hughes-Jones, N. C., Hoogenboom, H. R. and Winter, G.** 1993. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* 12: 725-734.

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

**Hansen, B. M. and Salamitou, S.** 2000. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application ( Charles, J et al., eds ) pp. 41-64, Kluwer Academic Publishers.

**Hawkins, R. E., Russell, S. J., and Winter, G.** 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity-mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* 226: 889-896.

**Hawlich, H. zu Vilsendorf, A. M., Bautsch, W., Klos, A. and Kohl, J.** 2000. Guinea pig C3 specific rabbit single chain Fv antibodies from bone marrow, spleen and blood derived phage libraries. *J. Immunol. Meth.* 236: 117-131.

**Hofman, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S. and Van Mellaert, H.** 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin is correlated with presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 7844-7848.

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

**Hoogenboom, H. R. and Winter G.** 1992. By passing immunization: human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 227: 381-388.

**Ihara, H., Uemura, T., Masuhara, M., Ikawa, S., Sugimoto, S., Wadano, A., and Himeno, M.** 1998. Comparative. Biochem. Physiol. B. *Biochem. Mol. Biol.* 120: 197-204.

**Jenkins, L. J., Lee, M. K., Valaitis, A. P., Curtiss, A. and Dean, D. H.** 2000<sup>a</sup>. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 14423-14431. (9)

**Jenkins, L. L. and Dean, D. H.** 2000<sup>b</sup>. Exploring the mechanisms of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. In *Genetic Engineering: Principles and Methods*. Setlow, J. K. (ed.), New York: *Plenum Press*, pp 33-54.

**John, D. Pound.** *Immunochemical Protocols. Second Edition. Methods in Molecular Biology.* Humana Press. Totowa, New Jersey. 1998.

**Knighth, P. J., Knowles, B. and Ellar, D.** 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) toxin. *J. Biol. Chem.* 270: 17765-17770.

**Knowles, B. H.** 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24: 275-308.

**Kwak, I-J., Lu, H. and Dean, D. H.** 1995. Exploration of receptor binding of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* 90: 75-79. (1)

**Lee, M. K., Milne, R. E., Ge, A. Z. and Dean, D. H.** 1992. Location of a *Bombix mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* 267: 3115-3121.

**Lee, M. K., Rajamohan, F., Gould, F. and Dean, D. H.** 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A  $\delta$ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3836-3842.

**Lee, M. K., Young, B. A. and Dean, D. H.** 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 306-312. (3)

**Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S., Gominet, M.** 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int. J. Med. Microbiology.* 290: 295-299.

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

**Lorence, A. Drszon, A., Díaz, C. Liévano, A., Quintero, R. And Bravo, A.** 1995.  $\delta$ -endotoxins induce action channels in *Spodoptera fugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 360: 217-222.

**Lovgren, A., Zhang, M. Y., Engstrom, A., Dalhammar, G. and Landen, R.** 1990. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 4: 2137-2146.

**Lu, H., Rajamohan, F. and Dean, D. H.** 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombix mori*. *J. Bacteriol.* 176: 5554-5559. (2)

**Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. D., McCafferty, J., Griffiths, A. D., and Winter, G.** 1991. By-passing immunization-human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.

**Masson, L., Lu, Y., Mazza, A., Brousseau, R. and Adang, M. J.** 1995. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* 270: 20309-20315.

**Masson, L., Mazza, A., Sangadala, S., Adang, M.J., Brousseau, R.** 2001. Polydispersity of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins in solution and its effect on receptor binding kinetics. *Biochimica et Biophysica. Acta.* **36536.** 1-11.

**McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. and Chiswell, D. J.** 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* **348:** 552-554.

**Morse, R. J., Yamamoto, T. and Stroud, R. M.** 2001. Structure of Cry2Aa suggest an unexpected receptor binding epitope. *Struture (Lond)* **9:** 409-417.

**Mullinax, R. L., Gross, E. A., Amberg, J. G., Hag, B. N., Hogrefre, H. H., Kubitz, M. M., Greener, A., Altingmees, M., Ardourel, D., Short, J. M., Sorge, J. A. and Shopes, B.** 1990. Identification of human antibody fragment clones specific tetanus toxoid in a bacteriophage-lambda immunoexpression library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87:** 8095-8099.

**Nagamtsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S. and Kogure, M.** 1998. Cloning sequencing and expression of the *Bombix mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(a) toxin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62:** 727-734.

**Nagamatsu, Y., Koike, T., Ssaki, K., Yoshimoto, A. and Furukawa Y.** 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and citotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1aa toxin. *FEBS Lett.* **460:** 385-390.

**Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, D. L. and Winter, G.** 1994. Antibody fragments from a "single plot" phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* **13:** 692-698.

**Oldenburg, K., Longanathan, D., Goldstein, I., Scholtz, P., and Gallop, M.** 1992. Peptide ligands for a sugar binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89:** 5393-5397.

**Orlandi, R., Gussow, D. H., Jones, P. T. and Winter, G.** 1989. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain-reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 3833-3837.

**Parker, M. W. and Pattus, F.** 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 391-395.

**Parmley, S. and Smith, G.** 1998. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity-purification of target genes. *Gene* 73: 305-318.

**Pound, J. D.** 1998. Immunochemical protocols. Second Edition. *Methods in Molecular Biology. Humana Press.* Totowa, New Jersey, pp 474-530.

**Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal Neema, Malhotra pavan, and Bhatnagar, R. K.** 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Mol. Bio. Chem.* 277: 46849-46851.

**Rajamohan, F., Alcántara, E., Lee, M. K., Chen, X. J., Curtiss, A. and Dean, D. H.** 1995. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J.Bacteriol.* 177: 2276-2282. (4)

**Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J. A., Curtiss, A. and Dean, D. H.** 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin: Mutations at domain II of Cr1Ab enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 14338-14343. (6)

**Rajamohan, F., Cotrill, J. A., Gould, F. and Dean, D. H.** 1996. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 271: 2390-2396. (5)

**Rajamohan, F., Hussain, S-R., Cotrill, J. A., Gould, F. and Dean, D. H.** 1996. Mutations in domain II, loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midgut. *J. Biol. Chem.* 271: 25220-25226. (7)

**Rajamohan, F., Lee, M. K. and Dean, D.H.** 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. Molecular mode of action. *Prog. Nucl. Ac. Res.* 60: 1-27.

**Rauf, M. A., and Ellar, D. J.** 1999. Mutations of loop 2 and loop 3 residues in Domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin affect insecticidal specificity and initial binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes. *Cur. Microbiology.* 39: 94-98. (11)

**Rebar, E. J. and Pabo, C. O.** 1994. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. *Science* 263: 671-673.

**Rickles, R. J., Botfield, M C., Weng, Z., Taylor, J. A., Green, O. M., Brugge, J. S., and Zoller, M. J.** 1994. Identification of Src, Fyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *EMBO J.* 13: 5598-5604.

**Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J.V., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62 (3): 775-806.

**Schwartz, J.-L. and Laprade, R.** 2000. Membrane permeabilization by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. In: *Entomopathogenic Bacteria:*

from Laboratory to Field Application ( Charles, A., Delecluse, A. and Nielson-Leroux, C. Eds ), pp. 1-19. Kluwer Associate Publishing, Norwell, M. A.

**Schwartz, J.-L., Garne, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. and Rousseau, E.** 1993. Lepidopteran- specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132: 53-62.

**Scott, J. And Smith, G.** 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science.* 249: 386-390.

**Smedley, D. P., and Ellar, D. J.** 1996. Mutagenesis of three surface-exposed loops of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiol.* 142: 1617-1624. (8)

**Smith, G. P.** 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the phage surface. *Science* 225: 1315-1317.

**Smith, G. P.** 1993. Surface display and peptide libraries. *Gene* 128: 1-2.

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

**Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, T. H., and Bulla Jr, L. A.** 1995. Cloning and expression of a receptor for a insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270: 5490-5494.

**Vadlamudi, R.K., Ji, T. H. and Bulla Jr, L. A.** 1993. A specific binding protein from *M. sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. Berliner. *J. Biol. Chem.* 268: 12334-12340.

**Van Rie, J.** 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 463-469.

**Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. and Melleart, V.** 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186: 239-247.

**Ward, E. S., Gussow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T., and Winter, G.** 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature.* 341: 544-546.

**Ward, E. S., Gussow, D., Griffiths, A. D., Jones, P.T., and Winter, G.** 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *E. coli*. *Nature.* 341: 544-546.

**Wolfersberg, M. G.** 1995. Permeability of *Bacillus thuringiensis* CryI toxin channels. In J. M. Clark (ed.), Molecular action of insecticides on ion channels. American Chemical Society. Washington, D. C.

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

**Wu, S-L., and Dean, D. H.** 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII $\delta$   $\delta$ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* 255: 628-640. (10)

**Wulfig, C. and Pluckthun, A.** 1994. Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 12: 685-692.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA