

30387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**“ PAPEL DE LA REGION N-TERMINAL EN LA
INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEINAS CRY
DE *Bacillus thuringiensis* EN RATONES BALB/c ”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. C. Gloria Guillermina Guerrero Manríquez

Tutor: Dra Leticia Moreno-Fierros

México, D.F.

Noviembre de 2004

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de agosto del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna GLORIA GUILLERMINA GUERRERO MANRIQUEZ con número de cuenta 98852105 y número de expediente 66981014, con la tesis titulada: "PAPEL DE LA REGIÓN N-TERMINAL EN LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS Cry DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EN RATONES BALB/c", bajo la dirección del Dra. Leticia Moreno Fierros .

Presidente:	Dr. Edelmiro Santiago Osorio
Vocal:	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Vocal:	Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
Vocal:	Dr. Leopoldo Flores Romo
Secretario:	Dra. Leticia Moreno Fierros
Suplente:	Dr. Rogelio Hernández Pando
Suplente:	Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de octubre del 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LOS SIGUIENTES LABORATORIOS

- EN EL LABORATORIO DE INMUNIDAD DE MUCOSAS PERTENECIENTE A LA UNIDAD DE BIOMEDICINA DE LA FES-IZTACALA BAJO LA ASESORIA DE LA DRA LETICIA MORENO-FIERROS Y FUE APOYADO PARCIALMENTE POR CONACYT 34834, 43102 Y UNAM DGAPA PAPIIT IN207800 Y IN213903. BECA PARCIAL DEL IPICYT DE SAN LUIS POTOSÍ

-EN EL LABORATORIO DEL DR DONALD H DEAN del DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DEL ESTADO DE OHIO EN COLUMBUS OHIO. EUA, APOYADO PARCIALMENTE POR UN GRANT DEL NIH (ROI AI29092) Y POR UNA BECA PARCIAL DEL IPICYT DE SAN LUIS POTOSÍ. MÉXICO.

-EN EL LABORATORIO DEL DR MICHAEL RUSSELL DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DEL CENTRO WITBESKY DE LA UNIVERSIDAD DE NEW YORK EN BÚFALO, NEW YORK. EUA. CON FINANCIAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD DE BÚFALO Y UNA BECA PARCIAL DEL POSGRADO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNAM.

COMITÉ TUTORIAL

**Dra. Leticia Moreno-Fierros
(FES-IZTACALA. UNAM)**

**Dr. Leopoldo Flores Romo
(CINVESTAV-IPN)**

**Dr. Rogelio Hernández Pando
(INSTITUTO NACIONAL
DE NUTRICION)**

Volar tan lejos y tan alto como sea posible

..... con dirección,

..... con sabiduría,

..... con humildad

Dedicatoria

A LA MEMORIA DE

MI PADRE

MI HERMANO

Agradecimientos

¡... A Dios ante todo por la vida, por la salud.....!

*** Agradezco a mi familia especialmente a mi mamá, porque la lucha, el tesón y la superación siempre han sido compartidos. Gracias por esperar tantos años ***

*** A mis hermanos, Gerardo, Sebastián, Freddy, Jaime. A mis hermanas, Paty, Chela, Lolis y Adriana. A mis sobrinos, Marcos Adrián, Ixell, Fara, Luis, Juan Sebastián, Monse, Juan Pablo, que en la medida de sus posibilidades me han ayudado y más que esto, están conmigo ***

*** A Fer por la gran amistad que nos une, porque nunca me dejaste abandonar los sueños, por los momentos inolvidables y por tu enorme paciencia, porque tienes razón la humildad y no el título es lo que nos hace más felices y humanos. Gracias por seguir a mi lado y por todo lo que le has dado a mi vida ***

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, Dra. Leticia Moreno Fierros, Dr. Leopoldo Flores Romo y Dr. Rogelio Hernández Pando por aceptar este proyecto y por compartir su experiencia conmigo durante estos tres años. Asimismo agradezco a la Dra. Leticia Moreno Fierros por permitir desarrollar parte de este proyecto en su laboratorio.

Especialmente quiero agradecer a los Dres Leopoldo Flores Romo y Rogelio Hernández Pando, por su fina asesoría, sus consejos y por darle ese toque humano al trabajo del laboratorio. Gracias por el voto de confianza y sobretodo gracias por su amistad.

Agradezco también la valiosa ayuda de los Dres Clara Espitia, Raúl Mancilla, Dr. Arturo Baitza Gutman, Dr. Edelmiro Santiago y Dra. Gladis Fragoso, por sus sugerencias y consejos que enriquecieron tanto mi formación académica como mi trabajo.
GRACIAS!!!!!!!....

i!!!!!! Mi agradecimiento y mi reconocimiento a todos los miembros del Instituto de Biotecnología de la UNAM así como a los miembros del Centro de Fijación de Nitrógeno, de la UNAM CUYO APOYO HA SIDO CLAVE EN MI VIDA ACADEMICA

A los Drs Marco Villanueva, Gladis Casaab, Amelia Farres, Rosa Maria Uribe del IBT/UNAM por su invaluable apoyo en los momentos críticos de mi vida académica.

A la Dra. Alejandra Bravo de la Parra por su apoyo durante mi estancia en el IBT/UNAM, por todo lo que aprendí en su laboratorio del cual he sacado el máximo provecho y es justo por lo que continuo en el campo de *Bacillus thuringiensis*.

****A los miembros del lab. Del Dr. Donald H Dean (Amir, April, Sylvia, Dr. Ziegler, y Dr Alzate) por su ayuda y por sus sugerencias, por su amistad y por esas amenas discusiones. A los miembros del lab. Del Dr. Michael Russell y Dr. Terry OD Connell por su afabilidad y enorme calidad humana. Así como a los miembros del Departamento de Microbiología e Inmunología que me brindaron y facilitaron enormemente mi trabajo, gracias ****

**** Al laboratorio de Biología de la reproducción, Martín, Juanita, Alex, Eduardo, Lorena, Carmen, gracias por integrarme a su grupo, su apoyo moral y por esas charlas amenas a la hora del break****

**** A los miembros de la UBIPRO, Maestro Ernesto, Maestra Josefina, Dr. Eduardo, Dr. Salvador, Mayra por su cordialidad y compañerismo. Especialmente mi reconocimiento a los miembros de laboratorio de Bioquímica Molecular, Alex, Paty, Ramón, Fernando, Martha, Lety, gracias por su apoyo moral y por su amistad. ****

*** A la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón por las facilidades otorgadas durante mi estancia en esta escuela, gracias por su colaboración ***.

*** A la gran familia de Torreón Maestra Alejandra, Maestra Cueto, Maestra Gaby, Dr Rafael, Raquel, Agneta, el químico, y a todos los miembros de la Escuela de Ciencias Biológicas. Gracias por hacerme parte de su grupo, por su disposición y buena voluntad ***

*** A mis amigos de siempre, Ivonne, Karina, Lucía, Elia, Tere, Carolina, Alfonso, Edith, Leandrito, Cynthia, Blanca, Miguel, Gloria, Polo, Laura, Lalo, Doña Rufi, Nelson, Josué, Maru, Sol, Consuelius, Adriana, Lily, Esme, Sergio, Martha, Edith, Edgar, Nathasha, Tanya, Rosi, Elsi, Rosina, Gaby, Lilián, Fernando, Elsi, Rosina, Gaby, Lily, Claudia, Lety A, Kari, Candi, Lulu, Erika, Lisbeth, Isabel, Nacho, Felipe, Martín De Jesús, Humberto, Tere H, Con G, Tony, Renato, Josefina II, Don Pedro, Poncho, Javier M, Rodrigo, Rubí, Martín H, Enriquito, Jose, Hugo***

*** A la familia Cruz (Especialmente a la Sra Irinea), familia Cabrera, familia Macías, familia de Edi, familia de Moni. Enormes gracias y mi reconocimiento porque sin ustedes simplemente todo hubiera sido más difícil ***

*** A los miembros de la Unidad de Biomedicina, especialmente al Dr. Rafael Villalobos, Dr. Ricardo, Dr Terrazas, Dra Miriam, Flor, Lorena, Rosi, Irma, José Luis, Norma. Gracias por su amistad y apoyo.

Y a todos lo que de alguna forma contribuyeron con su granito de arena a mi formación académica y a mi estancia en FES.

A TODOS
A TOTS
GRACIAS
GRAZE
THANKS
GRÁCIES
MERCÍ

INDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCION	1
1.1. Organización de las toxinas bacterianas	1
1.2. δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
1.3. Estructura	7
1.4. Mecanismo de acción	12
1.5. Relación estructura-función	13
1.6. Propiedades inmunogénicas	14
1.7. Implicaciones prácticas y terapéuticas.....	15
II. OBJETIVOS	19
III. RESULTADOS	25
IV. DISCUSION	37
V. CONCLUSIONES	46
VI. BIBLIOGRAFIA	49
VII. ANEXO METODOLOGICO	65
VIII. APÉNDICE	71

Apéndice 1.....	72
------------------------	-----------

Implicación estructural de la respuesta inmune inducida por las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* en ratones BALB/c mice: Papel de la región N-terminal. Guerrero GG, Dean DH y L. Moreno Fierros. 2004. Mol. Immunol. 41: 1177-1183

Apéndice 2.....	82
------------------------	-----------

El papel de hélice alfa siete del dominio de las toxinas Cry1A de *Bacillus thuringiensis* en la inducción y modulación de una respuesta inmune humoral y celular en ratones BALB/c (Guerrero y col., 2004, sometido).

Apéndice 3.....	111
------------------------	------------

La unión tipo lectina de las toxinas Cry1A de *Bacillus thuringiensis* en ratones BALB/c a las células del sistema inmune es un primer paso en la inducción y modulación de una respuesta celular Th (Guerrero y col., 2004, sometido).

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram-positiva que produce inclusiones cristalinas proteicas durante la fase de esporulación. Estas inclusiones están compuestas de una o más proteínas llamadas δ -endotoxinas o proteínas Cry, tóxicas a una amplia variedad de insectos. Una vez que son ingeridas por insectos susceptibles, las protoxinas Cry (70-140 kDa) son solubilizadas y procesadas proteolíticamente para liberar el fragmento tóxico o toxina de 60 a 70 kDa. La toxina o región amino terminal está formada por tres dominios estructurales. En invertebrados se ha propuesto que esta región juega un papel central en su actividad tóxica. En vertebrados, sólo se sabe que una de las protoxinas homólogas a las protoxinas Cry1A, la protoxina Cry1Ac, induce una respuesta inmune, tanto a nivel sistémico como en mucosas, cuando es administrada por diferentes vías; pero no se ha determinado en qué región reside la inmunogenicidad de las proteínas Cry. Por lo que en la presente tesis se investigó directamente la implicación de la estructura modular de la región N-terminal en la capacidad de las proteínas Cry para inducir una respuesta inmune. Esto se abordó de manera directa, primero se determinó la inducción de una respuesta inmune por las protoxinas Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac) y se comparó con la respuesta inmune inducida por una proteína Cry que de manera natural carece del extremo carboxilo terminal, la protoxina Cry3A (70 kDa); así como por proteínas que pierden el extremo carboxilo terminal por activación de las protoxinas Cry1A, resultando en un fragmento activo tóxico de 60 a 70 kDa, las toxinas Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac). La inducción de anticuerpos por cada una de estas proteínas, se detectó tanto en el suero como en el fluido intestinal y el fluido traqueopulmonar mediante un ensayo indirecto de ELISA. Los datos en conjunto demostraron que la capacidad de inducir anticuerpos IgA a nivel de mucosas, reside mayoritariamente en la región N-terminal y que la inducción de respuesta inmune por las protoxinas Cry1A es un reflejo de la influencia de la región N-terminal sobre la región C-terminal y esto podría deberse a sus características estructurales y funcionales. Para fortalecer esta hipótesis se estudio el papel de cada uno de los dominios que comprenden la región N-terminal. Primero, se estudió uno de los segmentos más conservados entre todas las δ -endotoxinas, la helice alfa siete del dominio I. Por mutagénesis sitio dirigida se intercambió un motivo conservado hidrofóbico presente en la

hélice alfa siete del dominio I por el motivo de la toxina difterica y se midió la capacidad de las toxinas Cry1A mutantes, Cry1Aa8, Cry1Ab2 and Cry1Ac3 para inducir una respuesta inmune humoral por las toxinas Cry1A mutantes, Cry1Aa8, Cry1Ab y Cry1Ac3, administradas tanto por vía intraperitoneal como por vía intranasal y se comparó la inducción de anticuerpos con las respectivas toxinas silvestres Cry1A. También se determinó la subclase de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a, como una medida indirecta de la polarización de la respuesta inmune celular Th por las toxinas Cry1A. Se encontró que hubo un incremento en la magnitud de la inducción de una respuesta inmune de anticuerpos de tipo IgA e IgG después de inmunización por vía intranasal. Mientras que se observó un incremento en la magnitud de la subclase de anticuerpos IgG1 especialmente a nivel de mucosas (intestinales y vías aéreas superiores), indicando un fenotipo de respuesta inmune celular Th2. Estos datos fortalecieron la hipótesis de que la capacidad para inducir una respuesta inmune humoral y celular reside y depende de la región amino terminal de las proteínas Cry. Más aún, los datos sugirieron que la hélice alfa siete del dominio contribuye a esta capacidad por su grado de conservación, por sus características fisicoquímicas que se ajustan bien a los modelos teóricos de predicción de epitopes tanto para células T como para células B. Enseguida, el papel del dominio II tipo lectina de las toxinas Cry1A en su capacidad para inducir una respuesta inmune celular se investigó mediante cinéticas de inducción de citocinas tipo Th1 y tipo Th2 en presencia y ausencia de N-acetilgalactosamina (NacGal). En ausencia de este amino azúcar, se observó que mientras los esplenocitos de ratones BALB/c estimulados con toxina silvestre Cry1Aa indujeron niveles bajos de citocinas tipo Th1 a tiempos tempranos (4 h) mientras que los esplenocitos de ratones BALB/c estimulados con la toxina quimérica Cry1Aa8 produjeron citocinas tipo Th1 (IFN- γ , IL12p70) así como niveles moderados de citocinas tipo Th2 (IL-10). Además se encontró que los esplenocitos de ratones presensibilizados por la vía intranasal con la toxina silvestre Cry1Aa, así como con la toxina quimérica Cry1Aa8 y reestimulados *in vitro* con cada una de estas toxinas, respectivamente activaron diferentes poblaciones celulares productoras de citocinas. Así, los esplenocitos reestimulados con la toxina Cry1Aa activaron predominantemente una población de células productoras de IL12p70 (posiblemente células B) mientras que los esplenocitos estimulados con la toxina Cry1Aa8 activaron una población de células T productoras de IFN- γ e IL-10. Estos resultados se

fortalecieron por la mayor proporción de células B activadas con respecto a las células T. Interesantemente se observó que hubo una inhibición de la activación de células T por la mezcla toxina Cry1Ac + N-acetylgalactosamina, mientras que la activación de células B se vio ligeramente incrementada. Adicionalmente se encontró que en presencia de N-acetilgalactosamina, los esplenocitos estimulados con la mezcla de toxina silvestre Cry1A (Cry1Aa y Cry1Ac) más el aminoazúcar, no produjeron citocinas tipo Th1, sin embargo, la producción de IL10 por estas toxinas se vio incrementada. En contraste, los esplenocitos estimulados con la mezcla de toxina quimérica Cry1Aa8 más NacGal no produjeron citocinas tipo Th1 ni citocinas tipo Th2. Estos resultados sugirieron que el primer paso en la inducción y modulación de la respuesta inmune celular Th hacia un fenotipo de respuesta Th2 ó Th1 por las toxinas Cry en vertebrados, es la unión del dominio II tipo lectina a N-acetylgalactosamina sobre los receptores de las células (B y T) del sistema inmune.

Summary

Bacillus thuringiensis is Gram positive bacteria that produces during proteinaceous inclusions during the sporulation; these inclusions are composed of one or two protoxins named insecticidal crystal proteins (ICPs), Cry proteins, or δ -endotoxins. After ingested by susceptible insects, Cry protoxins are solubilized and proteolytically digested to release the toxic fragment or toxins of molecular weight 60-70 kDa. The toxin or N-terminal region is formed by three structural domains. In invertebrates, it has been proposed that this region play a central role in its toxic activity. In vertebrates, it is known that one of the homolog proteins to Cry1A protoxin, Cry1Ac protoxin, is able to induce an immune response to systemic and mucosal compartments when administered by different routes, but it has not been studied in which region reside the immunogenicity of the Cry proteins. Therefore, in the present thesis it is investigated directly the structural implication of the N-terminal region in the capacity of the Cry proteins to induce an immune response. This was addressed directly; first it was determined the induction of an antibody response by the Cry1A protoxins, Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac and it was compared with the induced immune response elicited by a Cry protein, Cry3A protoxin (70 kDa) which naturally lack the C-terminal region as well as protein that lose the C-terminal by proteolytic activation yielding an active toxin fragment of 60-70 kDa, Cry1A toxins, Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1c. The induction of antibodies by intraperitoneal and intranasal immunization to BALB/c mice of each of these proteins was detected in serum as well as in the tracheopulmonary, intestinal fluids by indirect ELISA assay. The data together showed that the capacity to induce IgA antibodies in mucosal sites reside and depends of the N-terminal region and the induce immune response by the Cry1A protoxins is the reflection of the influence of the N-terminal region on the C-terminal region and this could be due to their structural and functional characteristics. To strength this assumption it was studied the role of each of the domains that comprised the N-terminal region. First, it was tested one of the most conserved segments in domain I between all the δ -endotoxins, by site directed mutagenesis to exchange a conserved hydrophobic motif present in alpha helix seven of this domain by the B fragment diphtheria motif and the ability of the Cry1A mutants, Cry1Aa8, Cry1Ab2 and Cry1Ac3 to induce humoral and cellular (expressed as the IgG1 and IgG2 Ab ratio)

immune response was measured after intranasal and intraperitoneal immunization in BALB/c mice. It was found that an increased and differential Ab response, especially of the IgG and IgA induced by Cry1Aa8 and Cry1Ac after intranasal immunization. Unexpectedly, by intraperitoneal route, it was observed an enhanced magnitude of the IgG1 Ab magnitude in the upperairways and intestinal mucosal sites, suggesting an ability to modulate the Th cellular immune response, mostly by this route and in much lesser extent by intranasal route. The data together indicate that domain I is playing a role in the immunogenicity of the N-terminal region through alpha helix seven by its physicochemical characteristics, structural localization (is in close contact to the binding domain) that fits well with theoretical predictions like T/B cells epitopes. Next, the role of the binding domain II in the above described immunogenic abilities of the N-terminal region was studied by measuring the induction of Th1 (IL-12p70 and IFN- γ) and Th2 (IL-4, IL10) cytokines in the presence and absence of the N-acetylgalactosamine. In the absence of this aminosugar, it was observed that wild types Cry1A toxins, Cry1Aa and Cry1Ac, induce low levels of Th1 and th2 cytokines, in contrast, quimeric toxin Cry1Aa8, induce significant amount mostly of Th1 type cytokines. And very moderate levels of Th2 (IL-10) type cytokines. Furthermore, it was found that Cry1A toxins have the ability to modulate the subsets of cytokine producers after intranasal priming of BALB/c mice. Spleen cells from primed with Cry1Aa toxins and restimulated with this toxin and with Cry1Aa8 toxin, produced predominantly IL12p70, whereas spleen cells from primed with Cry1Aa8 toxins and restimulated with Cry1Aa, Cry1Ac as well as with Cry1Aa8 and Cry1Ab2, induced mostly a mix of IFN- γ and IL10 with different kinetics of induction. These results were stressed by the higher proportion of B cells than T cells observed after stimulation and restimulation in vitro of spleen cells from unprimed and primed BALB/c mice with Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1Aa8. Additionally, it was found that in the presence of the N-acetylgalactosamine, activation of B cells was partially inhibited whereas T cell activation was enhanced. These results are consistent partially with the inhibition of the Th1 and Th2 type cytokines by the quimeric toxin Cry1Aa8. The low levels of these cyokines induced by wild type toxins, Cry1Aa and Cry1Ac especially at very early times (4 h) was inhibited except IL10 production which was enhanced. All the findings together strengthened the ability of the N-terminal region to induce a humoral and cellular immune response in

BALB/c mice. Furthermore, the data show that one step for the induction and modulation of the Th cellular immune response by the Cry1A toxins is the lectin like binding to glycosylated receptors on B and T cells.

I. INTRODUCCION

INTRODUCCION.

I.1. Organización de las toxinas bacterianas

En la naturaleza existe una gran variedad de proteínas tóxicas de interés clínico y comercial. Las toxinas bacterianas son producidas por diferentes organismos y tienen diferentes blancos (Rappuoli y María Grazzia, 1991). Representan el enlace entre la biología celular y las bacterias, por sus efectos tan potentes sobre las células en las que actúan. Las moléculas blanco de estas toxinas representan moléculas claves en importantes vías de señalización en las células eucarióticas, como es en la ruta de transducción de señales mediada por proteínas G (Flatau y col. , 1997) y/o el mecanismo de liberación de neurotransmisores (Schiavo y col., 1999).

Las toxinas bacterianas ejercen su actividad tóxica de diferentes formas, desde la disrupción de la membrana celular hasta la inhibición de la síntesis de proteínas.

La disrupción de la membrana celular puede ejercerse de varias maneras: (a) por simple contacto con los receptores apropiados los cuales van a transmitir la señal hacia el interior de la célula, el ejemplo más conocido de moléculas que actúan por este mecanismo son los superantígenos, (b) por formación de poros o canales iónicos, en este caso se pueden citar varios ejemplos, como son las colicinas, porinas, citolisinas y δ -endotoxinas, (c) por ruptura de moléculas expuestas en la superficie, por ejemplo, la enterotoxina de *Bacteroides fragilis*, la cual puede romper la porción extracelular de la cadherina-E y/o proteínas de la matriz extracelular y (d) por interrupción de la comunicación celular a través de la elevación de AMP cíclico o por modificación de las proteínas G, como es el caso de la toxina de cólera de *Vibrio cholerae*, enterotoxinas termolábiles de *Escherichia coli* y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*.

La inhibición de la síntesis de proteínas es llevada a cabo por las toxinas bacterianas que actúan a nivel del citoplasma catalizando la ADP ribosilación del factor de elongación 2 (EF2), dos ejemplos de este tipo de toxinas que actúan por este mecanismo son la toxina diftérica y la toxina pertúsica (Rappuoli y Montecucco, 1997).

A pesar de que estas toxinas bacterianas actúan sobre diferentes blancos y de diferente forma, no comparten homología de secuencia, pero tienen un requerimiento común –que necesitan insertarse, y en muchos casos translocarse a través de la membrana para poder

ejercer su acción biológica. Cada etapa en el modo de acción de estas toxinas, como son la unión a receptor, inserción/translocación y actividades tóxicas están asociadas con los dominios ó regiones discretas (Parker y Pattus., 1993).

La topología de los dominios en los cuales reside la información estructural para expresar su toxicidad depende de su sitio de acción. Así, por ejemplo, las toxinas que actúan a nivel de la superficie celular formando poros constan de dominios con una topología helicoidal, una excepción a este requerimiento son las porinas producidas por bacterias Gram-negativas y la α -toxina de *Staphylococcus aureus* que contienen mayoritariamente una estructura β . En cambio, las toxinas que actúan bloqueando las vías de señalización, así como las que actúan a nivel intracelular, como la toxina de cólera, y la toxina diftérica, respectivamente, constan de dos dominios con topología combinada entre hélices- α y láminas β plegada (Rappuoli y Montecucco., 1997).

La implicación de la estructura modular de las toxinas bacterianas no solamente tiene que ver con su actividad tóxica sino también tiene un efecto en el tipo de respuesta inmune que induce en el huésped. El ejemplo más estudiado hasta ahora y en el cual se ha demostrado la implicación de los dominios en la inducción de una respuesta inmune humoral y celular, es la toxina de cólera y las enterotoxinas termolábiles de *E. coli*. Estas dos toxinas comparten 86% de homología a nivel de estructura primaria y estructura terciaria. Varios estudios han demostrado que la unión de la subunidad B de topología de lámina β plegada al receptor GM1 [Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)(NeuAc(α 2-3)Gal ((β 1-4)Glc(β 1-1)ceramida)] juega un papel clave en la capacidad de estas toxinas para inducir una respuesta inmune de Ac IgA a nivel de mucosas, así como en la modulación de las subpoblaciones de linfocitos T, hacia Th1 ó Th2 (Marinero y col., 1995; Nashar y col., 1996; Guidry y col., 1997; Williams y col., 1999; Castagliuolo y col., 2004), mientras que la subunidad A, con una topología helicoidal y con actividad de ADP ribosyl transferasa, juega un papel importante en la adyuvancia de estas toxinas (Lycke y col., 1992; Guidry y col., 1997).

Entre las toxinas que actúan a nivel de la superficie celular formando poros pero que también son capaces de inducir una respuesta inmune en el huésped (Ito y col., 2003) como es la expresión de moléculas de adhesión, citocinas inflamatorias, IL-1, IL-6, IL-12 TNF- α y IFN- γ , se encuentra la citolisina seeligeriolisina O (56 kDa) y la listeriolisina, las cuales

son producidas por *Listeria seeligeri* y *monocytogenes*, respectivamente y su acción es dependiente de colesterol (CDC) (Alouff, 1999). Mientras que la actividad citolítica reside y depende de una secuencia altamente conservada en la región C-terminal, ECTGLAWEWWR; se ha propuesto que la inducción de citocinas reside en la región N-terminal. En contraste, las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) consideradas dentro del grupo de las toxinas bacterianas globulares que actúan a nivel de superficie, están formadas por tres dominios, los cuales tienen una topología combinada de hélice- α y lámina β plegada; sin embargo a la fecha, no se ha determinado el papel que juega su estructura modular en su capacidad para inducir una respuesta inmune en el huésped. Por otro lado, los superantígenos, producidos por *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*, requieren sólo de un dominio para ejercer su acción tóxica, son toxinas pequeñas de 28-40 kDa, de topología β plegada. Estas toxinas se unen tanto al complejo de histocompatibilidad (MHC) clase II como a la parte variable del receptor T ($V\beta$ o $V\gamma$) (Li y col., 1998) produciendo la activación policlonal de las células T tanto *in vitro* como *in vivo*. Además se unen a las integrinas humanas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Li y col., 1998).

La definición de la función y la identificación de los límites de cada dominio mediante la determinación de la estructura tridimensional por difracción de rayos X no sólo ha permitido entender el mecanismo de acción de estas toxinas sino que ha revelado que toxinas con diferentes blancos y sin homología de secuencia comparten dominios estructurales como es el caso del dominio formador de poro de las δ -endotoxinas de *Bt*, el cual comparte homología estructural con el de la toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* y la colicina producida por varias cepas de *E. coli* así como por *Citrobacter freundii* (Parker y Pattus., 1993). Esto ha permitido el diseño de nuevas toxinas quiméricas con fines terapéuticos (Strobel y Mowat., 1998; Czerkinsky y col., 1998).

Para entender la implicación de la estructura modular de las proteínas Cry de *Bt* en su actividad biológica (capacidad de inducir una respuesta inmune) en vertebrados, es necesario conocer quienes son y que hacen (1ª parte de los antecedentes) así como sus propiedades (2ª parte de los antecedentes).

ANTECEDENTES

-GENERALES.

1.1. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).

El *B. thuringiensis* fué descubierto por el microbiólogo japonés S. Ishiwata en 1901, aislándolo de las larvas del gusano de seda, desde entonces se le considero como el agente causante de enfermedades en insectos. Sin embargo, no fué hasta 1911, que Berliner lo describe por primera vez, aislándolo esta vez de las larvas de la polilla de *Anagasta kueiella* en la provincia de Thuringia, Alemania.

Por definición, *Bt* es una bacteria Grampositiva altamente emparentada con otras cepas del genero *Bacillus*, principalmente, con *B. cereus* (Abdul-Hammed y Landen, 1994; Daffonchio, y col., 1998). Se caracteriza por su capacidad esporulante (Figura 1A) lo que le confiere su resistencia al calor y climas secos de tal forma que se le puede encontrar y aislar casi de cualquier hábitat (Martin y Traves, 1989). Además, *Bt* produce una serie de factores de virulencia que incluyen también algunas toxinas con propiedades insecticidas, como son, la α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinasas, y fosfolipasas (Hansen y Salamitou., 2000). Asimismo, es considerado como un elemento benéfico para el control de plagas agrícolas. Por otro lado, se ha encontrado que las proteínas Cry sólo tienen efectos tóxicos sobre las líneas celulares de mamífero COS-7 y HEF 293 transfectadas con el receptor de las toxinas Cry $Bt-R_1$ (Dorsch, y col., 2002), mientras que en animales de laboratorio, sólo se observaron algunos efectos adversos a concentraciones de 10^{8-9} CFU (USA, 1989) de preparados de esporas y cristales de *Bt subsp. aisawi, israelensis, kurstaki* o *tenebrionis*, administrados respectivamente por vía intraperitoneal.

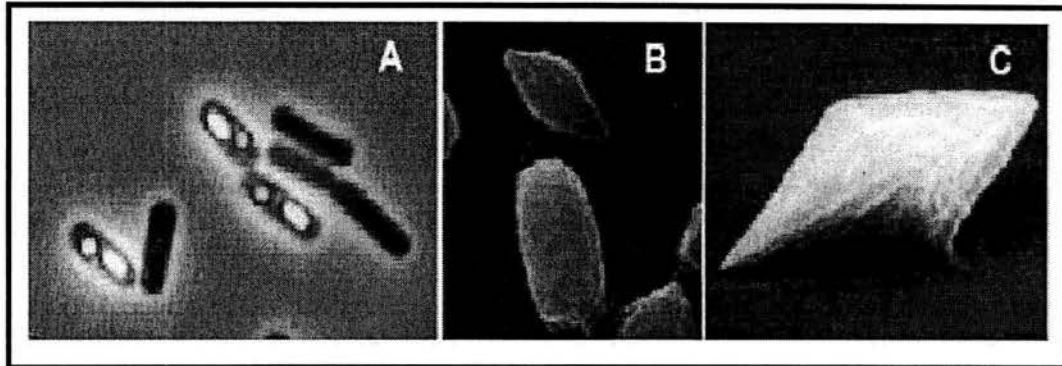


Figura 1. (A) Cepa esporulante de *Bt* donde se aprecia la espora y el cristal. (B). Espora-cristal de *Bt* al microscopio de barrido. (C). Cristal bipiramidal de *Bt*.

Incluso la administración oral de 4.7×10^{11} esporas por Kg de peso corporal no produjeron efectos tóxicos ó señales de infectividad hacia mamíferos. De ahí que *Bt* sea considerado como un organismo seguro y compatible con el medio ambiente (McClintock y col., 1995; de Maagd y col., 2001; Tsudo y col., 2003).

1.2. δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*,

B. thuringiensis produce una gama de proteínas insecticidas, las δ -endotoxinas, las cuales constituyen una familia multigénica de proteínas: Proteínas Cry (cristalinas) y proteínas Cyt (citolíticas). Las proteínas Cry, tema de nuestro estudio, son producidas durante la fase de esporulación (Figura 1A-B) como inclusiones proteicas cristalinas, “Cry” o δ -endotoxina (Höfte y Whiteley, 1989; Schnepf y col., 1998; de Maagd y col., 2001). Están codificadas por los genes *cry* que producen proteínas con un amplio rango de pesos moleculares (50-140 kDa) (Figura C). En la actualidad se han descrito alrededor de 200 genes, cuyos

productos han sido clasificadas en 27 grupos con base en la homología de la secuencia de aminoácidos (Crickmore y col., 1998) (Figura 2). Estas proteínas son tóxicas a diferentes órdenes de insectos: Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Hymenópteros, Homópteros. Una excepción a esto, son las proteínas Cyt también producidas por *Bt* variedad *israelensis*. Estas toxinas tienen una estructura diferente (formada por dos dímeros) a las proteínas Cry, son tóxicas a mosquitos. Se ha propuesto que las toxinas Cyt actúan en la membrana a través de la interacción con fosfolípidos. Evidencias experimentales han demostrado que también lisan eritrocitos y son tóxicas a animales, lo que ha limitado su uso comercial (Li y col., 1996) sin embargo, se ha reportado que tienen actividad anti-tumoral (AlYahyaee y Ellar., 1996; Yamashita y col., 2000).

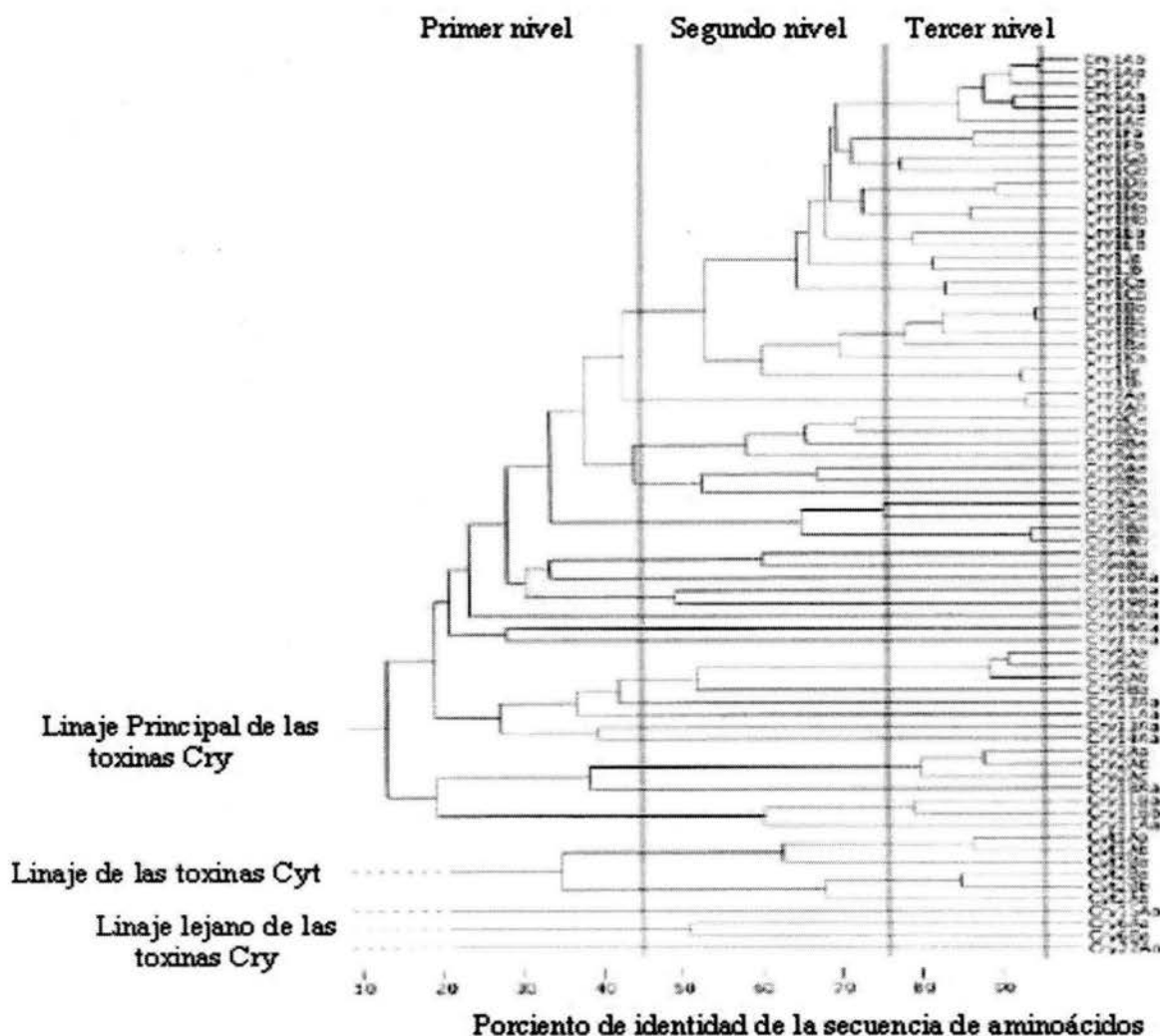


Figura 2. Dendrograma de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (tomada de Crickmore y col., 1998)

1.3. ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS CRY

Varias de las proteínas Cry (Cry1, Cry4, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry14, Cry21, Cry26, Cry27 y Cry28) (Höfte y Whiteley, 1989) son sintetizadas como protoxinas (forma inmaduras) y están organizadas en dos grandes regiones: carboxilo terminal y amino terminal (Figura 3). Cada una de estas regiones están formadas por multidominios, lo que le da a las proteínas Cry características estructurales y biológicas únicas.

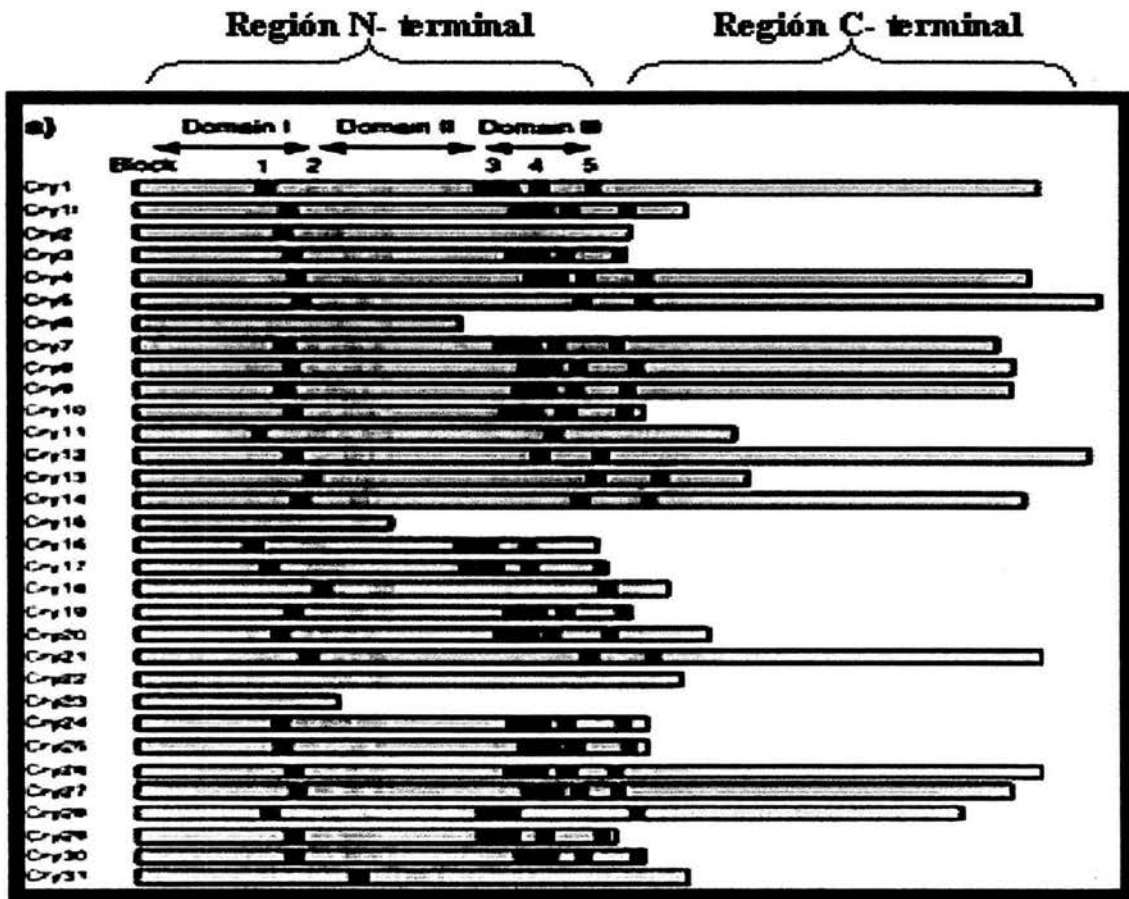


Figura 3. Organización de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. La región amino terminal formada por los tres dominios, I, II y III. La región carboxilo terminal altamente conservada a partir de la lamina β -23 del dominio III (area en color gris) (de Maagd y col., 2001)

REGION CARBOXILO TERMINAL (REGION "PRO")

La estructura tridimensional de esta región no se ha determinado aún. Se ha propuesto en base al análisis de la secuencia (Andrews y col., 1987) y remoción proteolítica secuencial (Chesthukhina y col., 1982; Choma y col., 1990) que podría estar organizada en tres dominios, uno de 35 kDa y dos de 15 kDa. Sin embargo, actualmente no hay evidencias directas que apoyen la existencia de estos dominios estructurales. Basados en un estudio de difracción de rayos X, Holmes y Monroe, 1965, concluyeron que la protoxina es una molécula elipsoide. Más recientemente, se ha reportado que el DNA es un componente integral de los cristales de *Bt*. La asociación de la protoxina con el DNA al parecer es esencial para la formación del cristal y probablemente facilite el secuestro de la proteína durante la esporulación (Clairmont y col., 1998). Esta asociación daría lugar a una estructura como la del virus del tabaco con un corazón central constituido por la región N-terminal más el DNA (Figura 2) y la región carboxilo terminal "pro" estaría envolviendo al N-terminal, lo que explicaría la proteólisis secuencial de la región carboxilo terminal. Muy poco se sabe sobre las funciones de esta región C-terminal, pero el hecho de que su secuencia sea altamente conservada indica que esta región de la protoxina tiene un importante papel estructural. Höfte y Whiteley han sugerido que esta región es conservada porque es esencial para un arreglo cristalino ordenado. Además se ha establecido que los puentes disulfuro en esta región son responsables de estabilizar el cristal proteico (Du, y col., 1994) mientras que las lisinas son requeridas para la solubilización de las protoxinas en condiciones alcalinas y reductoras (Choma y col., 1990).

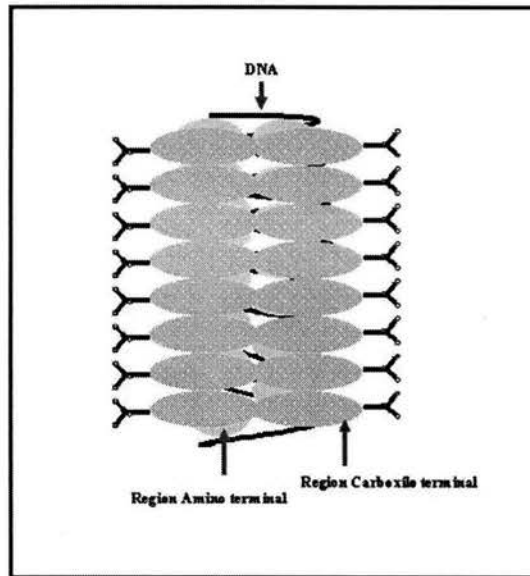


Figura 4. Representación esquemática de la estructura tipo virus del tabaco que forma el complejo protoxina (región carboxilo y región amino)-DNA (Clairmont y col., 1998) basada a su vez en el estudio de Holmes and Monroe sobre el cuerpo paraesporal de *Bacillus thuringiensis*

REGION AMINO TERMINAL

A diferencia de la región carboxilo terminal, la región N-terminal o fragmento tóxico, es una región más organizada, y rica en alfa hélices y beta plegadas, es resistente a la proteólisis. La estructura tridimensional de las toxinas Cry3A (Figura 5A), Cry1Aa (Figura 5B), Cry3Bb, Cyt2A se ha determinado por difracción de rayos X (Li y col., 1991; Grochulski y col., 1995; Li y col., 1996; Galitsky y col., 2001; Morse y col., 2001) la cual reveló que toxinas con diferente especificidad y poca homología a nivel de estructura primaria (36%) (Figura 5A-B), compartían y estaban formadas por tres dominios diferentes, conectados entre sí por uniones simples. El dominio I formado por un ramillete de siete alfa hélices anfipáticas, una de ellas, la hélice α -5 es la central, rodeada por el resto de las hélices anfipáticas que contienen el largo necesario para atravesar la membrana (Li y col.,

1991). El dominio II está formado por tres láminas β -plegadas anti-paralelas con topología similar empacadas alrededor de un corazón hidrofóbico y una o dos α -hélices cortas. Este dominio representa la parte más divergente en la estructura entre dos moléculas de toxina (Grochulski y col., 1995), es una región hipervariable formada por tres lazos dirigidos hacia el ápice de un prisma y el dominio III forma un sandwich de dos láminas β anti-paralelas.

Los estudios *in vitro* con bicapas lipídicas así como de proteólisis, han sugerido que el dominio I está involucrado en la formación de canales iónicos (Slatin y col., 1990; Gazit y col., 1998). El dominio II es el que determina la especificidad de unión al receptor ya que los genes híbridos entre toxinas cercanamente relacionadas resultaron en toxinas quiméricas con especificidad alterada (Ge y col., 1991). La función del dominio III es darle estabilidad al resto de la toxina por la formación de puentes salinos y de hidrógeno con otros residuos vecinos (Grochulski y col., 199), proteger al resto del fragmento tóxico de la proteólisis. También se ha propuesto que puede participar en la formación del canal iónico como sensor de voltaje ya que las mutaciones en los residuos de aminoácidos conservados (R521K y R527K) reducen la toxicidad sin afectar la unión (Chen y col., 1993). Varias evidencias han mostrado que este dominio también puede estar involucrado en la unión al receptor (Lee y col., 1995), además en este dominio se localizan los sitios de unión a moléculas que contienen biotina (Du y Nickerson., 1996).

La interacción entre los dominios I y III es importante para la estabilidad e integridad de la toxina (Li y col., 1991). La mayoría de las interacciones entre el dominio I y II se limitan a la hélice α -7 y la β -1 del dominio II. Los residuos que forman puentes salinos en estos sitios están altamente conservados en la mayoría de las secuencias Cry lo que sugiere que juegan un papel importante para mantener a la toxina en forma compacta globular durante la solubilización y posiblemente para liberar al dominio I del resto de la proteína durante la interacción con el receptor.

Las regiones de homología entre las toxinas Cry reside en cinco bloques conservados (Figura 3, bloques de colores), separados por regiones hipervariables de diferentes longitudes (Höfte y Whiteley, 1989) que se localizan en la parte central de la toxina y en las áreas de contacto entre los dominios (Li y col., 1991). En el dominio I, se localizan los bloques 1 (hélice α 5) y bloque 2 (parte final de la hélice α 6, la hélice α 7 y la β 1 del dominio II). El bloque 3 se localiza en la β 11 del dominio II, mientras que el bloque 4 en la

β 17 y el bloque 5 en la β 23. Li y col., 1991 han propuesto que el grado de conservación de estos bloques y su localización estructural, implicaría que las toxinas Cry que los posean deberían compartir una estructura similar con las toxinas globulares formadas por tres dominios estructurales y por lo tanto tener un mecanismo de acción similar entre ellas (Li y col., 1991; Rausell y col., 2004) y con respecto a otras toxinas formadoras de poro (English y Slatin., 1992; Parker y Pattus., 1993).

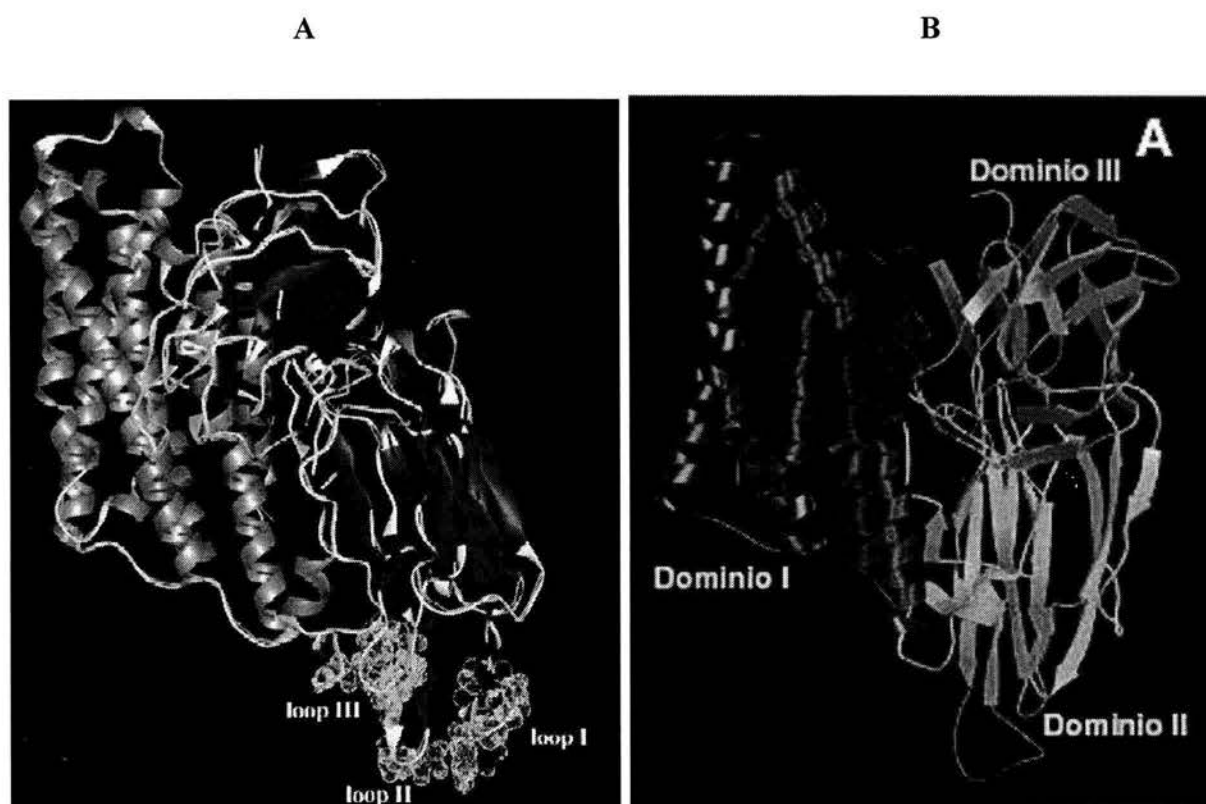


Figura 5. Representación de listón de la estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la toxina Cry3A (A) (Li y col., 1991) tóxica hacia los coleópteros; y la toxina CryIAa (B) (Grochulski y col., 1995) tóxica hacia los lepidópteros.

1.3. MECANISMO DE ACCION TOXICA DE LAS PROTEINAS CRY.

El mecanismo más aceptado del modo de acción de las toxinas Cry es un proceso que incluye múltiples etapas, que iniciaría con la ingestión de la mezcla espora-cristal por las larvas de insectos susceptibles, seguido por la solubilización del cuerpo paraesporal en el medio ambiente alcalino y reductor del intestino del insecto que va a liberar a la protoxina (ó forma inactiva) de 130-140 kDa, y posterior activación de la protoxina, para poder ejercer su acción tóxica.

La activación de las protoxinas solubles se lleva a cabo por acción de las proteasas intestinales, que remueven la región carboxilo terminal, así como un pequeño fragmento, alrededor de 17 aminoácidos del lado del extremo amino terminal, resultando así toxinas activas de 55-70 kDa. Es en esta forma que las proteínas Cry tienen la capacidad para unirse a receptores específicos localizados en la membrana apical del epitelio intestinal del insecto. Se ha propuesto que la unión se lleva a cabo en dos pasos: (1) una unión reversible a través de los lazos 2 (Rajamohan y col., 1996; Wu y Dean., 1996), que implicaría una interacción proteína-proteína (Dorsch, y col., 2002; Gómez y col., 2003) y (2) una unión irreversible que involucra la interacción de los lazos del dominio II con la parte de carbohidrato del receptor, lo que dispararía un cambio conformacional que favorece la ruptura de la hélice α -1; seguido por la formación de una estructura oligomérica denominada preporo. Un segundo cambio conformacional del oligómero, conduciría a la inserción en membrana y formación del poro (Gómez, y col., 2002); lo cual interrumpe el balance iónico, conduciendo a la lisis coloide osmótica de las células del intestino, parálisis y finalmente la muerte del insecto (Sacchi y col., 1986; Knowles y col., 1987).

Uno de los pasos determinantes en el modo de acción de las toxinas Cry es la unión al receptor (van Rie y col., 1990; Ge y col., 1991). Se han identificado dos proteínas diferentes en insectos que pueden funcionar como receptores de las toxinas Cry, una N-aminopeptidasa de 120 y 170 kDa purificada mayoritariamente de las vesículas de bordes dentados de diferentes lepidópteros; de *Manduca sexta* (Knight y col., 1994; Sangadala., y col., 1994), *Heliothis virescens* (Gill y col., 1995; Luo y col., 1997) y *Lymantria dispar* (Lee y col., 1996) a la cual se une a la toxina Cry1Ac. Así como una glicoproteína tipo cadherina de 210 kDa, a la cual se une la toxina Cry1Ab y que ha sido purificada de las vesículas de borde dentado de las larvas de *Manduca sexta* (Nagamatsu y col., 1999).

1.4. RELACION ESTRUCTURA-FUNCION:

Varios estudios experimentales han demostrado que los dominios de las proteínas Cry son estructuralmente independientes (Bravo y col., 1997), es decir, cada dominio por sí mismo puede ejercer su función, así, por ejemplo, el dominio I y la hélice α -5 *per se* son capaces de formar canales catiónicos en bicapas lipídicas (Slatin y col., 1991; Gazit y col., 1998). Mientras que los dominios II y III expresados independientemente mantienen su capacidad de unirse a membranas del epitelio del intestino medio de lepidópteros (Flores y col., 1997). Esto es consistente con la observación hecha por English y Slatin (1992) en el sentido de que las propiedades de las toxinas Cry no deben restringirse a su acción en insectos, sino que debe tenerse en cuenta que son moléculas proteicas y como tales tienen también la capacidad de “unirse a” otras moléculas, así el dominio I, *per se* puede además “interaccionar con” ligandos, receptores, en la membrana superficial de células, ó de epitelios.

Uno de los mejores ejemplos de la relación que hay entre estructura y función que tiene implicaciones en el modo de acción de estas toxinas tanto en invertebrados como en vertebrados (este trabajo) es la topología tipo lectina de los dominios II y III de las toxinas Cry. Se ha propuesto que la unión de estos dominios tipo lectina a receptores apropiados es el primer paso en el mecanismo de toxicidad en insectos (Knowles y col., 1984; Burton y col., 1999). El dominio II comparte la topología de β -prisma con las lectinas de plantas como jacalina (Sankaranayanan y col., 1996; Rosa y col., 1999) y la aglutinina *Maclura pomifera* (Lee y col., 1998), ó con otras proteínas que unen carbohidratos (Shimizu y Morikawa., 1996; Kido y col., 1995), mientras que el dominio III tiene un plegamiento similar al dominio N-terminal de la glucanasa 1,4- β CenC de *Cellulomonas fimi* (Johnson y col., 1996). La base de la actividad biológica de las lectinas es la unión a carbohidratos (Lis and Sharon y col., 1999). De hecho se ha demostrado que la capacidad para inducir una respuesta inmune humoral y celular por la toxina de cólera (de Haan, y col., 1998) así como por la enterotoxina termolábil de *E. coli* (Nashar y col., 1996) reside en la capacidad de la subunidad B para unirse a residuos expuestos de N-acetylgalactosamina sobre los receptores gangliósidos GM1 [Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)(NeuAc(α 2-3)Gal ((β 1-4)Glc(β 1-1)ceramida)] en la superficie de las mucosas. Sin embargo, en los vertebrados no se sabe la

receptores gangliósidos GM1 [Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)(NeuAc(α 2-3)Gal ((β 1-4)Glc(β 1-1)ceramida)] en la superficie de las mucosas. Sin embargo, en los vertebrados no se sabe la influencia de las propiedades tipo lectina del dominio II de las toxinas CryIA en su capacidad para inducir una respuesta inmune humoral y una respuesta inmune celular.

ANTECEDENTES DIRECTOS

I. 6. PROPIEDADES INMUNOGENICAS

Existen muy pocos estudios sobre los efectos fisiológicos e inmunológicos de las proteínas Cry en organismos vertebrados. Los primeros reportes (Prasad y Shethna., 1975, 1976) versan sobre la respuesta inmune aumentada inducida hacia eritrocitos de carnero por cristales proteicos, así como actividad antitumoral de preparados cristalinos de *Bacillus thuringiensis*. Sin embargo, en estos trabajos no se especifica cual de las proteínas Cry es la responsable de esta actividad, y no se realizaron estudios posteriores para caracterizar esta propiedad. Se reportó que dos tipos de proteínas Cyt producidas por *Bt* subs. *isrealensis*, que no comparten homología a nivel de estructura primaria ni terciaria con las proteínas Cry (Figura 2) con un modo de acción diferente (Li y col., 1996), tienen la capacidad de lisar células de mamíferos, además de inducir actividad anti-tumoral (Alyahyae y Ellar., 1996; Yamashita y col., 2000). En general, estos reportes representan una base para tratar de caracterizar las regiones directamente involucradas en la inducción anti-tumoral así como también de aplicación biotecnológica.

Recientemente se reportó que una de las proteínas CryIA homólogas, la protoxina CryIAc (pCryIAc) es capaz de inducir en ratones BALB/c, una respuesta humoral sistémica y en mucosas cuando es administradas por vía intranasal (i.n.), intragástrica (i.g.) e intraperitoneal (i.p.) a ratones Balb/c (Vázquez y col., 1999; Moreno-Fierros y col., 2000); asimismo posee propiedades adyuvantes y ha servido como acarreador de epitopes para el desarrollo de vacunas (Moreno-Fierros y col., 2003). Aún más, usando dos aproximaciones diferentes *in vitro*, mediante ensayo inmunohistoquímico se observó que la pCryIAc se une a la superficie de la mucosa del intestino delgado de ratón, sin embargo, usando ensayos de unión (“ligand blot”) *in vitro* a vesículas de borde dentado purificadas del intestino de ratón

no se encontró inhibición de la unión por N-acetilgalactosamina, manosa ni por biotina (Vázquez y cols., 2000). Mientras que estos mismos azúcares inhiben completamente la unión de la toxina a vesículas purificadas de intestino medio de insecto. Por lo tanto, se concluyó de este trabajo, que la protoxina se une a otro tipo de moléculas ó bien que otras regiones de la protoxina estarían involucradas en la interacción de las proteínas Cry con las células del sistema inmune (Vázquez y col., 2000).

I.7. IMPLICACIONES PRACTICAS Y TERAPEUTICAS.

Evidencias substanciales sugieren que la supresión de autoinmunidad por administración oral de antígenos es una alternativa factible y terapéutica. La selección cuidadosa de adyuvantes de mucosas, (toxinas bacterianas, CpG, microorganismos atenuados) puede ser una forma de usar la tolerancia oral con fines terapéuticos (Strobel y Mowat., 1998). Dos de los inmunógenos y adyuvantes más estudiados y más usados hasta el momento con este fin, son la toxina de cólera y las enterotoxinas termolábiles de *E.coli*, así como las subunidades B de ambas toxinas.

Los efectos antiinflamatorios de toxina de cólera (CTx) y su habilidad para promover la inducción de células T regulatorias (Tr) es la base de su potencial para el tratamiento de enfermedades mediadas por las células T cooperadoras tipo 1 (Th1). Así, en un sinnúmero de condiciones autoinmunes mediadas por células T, la administración por ruta mucosa de CTx se ha demostrado que aumenta la inducción de tolerancia y alivia los síntomas de enfermedad (Lavelle y col., 2004).

La administración nasal de dosis altas de CTx pueden suprimir síntomas clínicos de encéfalo mielitis experimental autoinmune (EAE) un modelo murino de esclerosis múltiple (Yura y col., 2001). Las concentraciones de IFN- γ e IL-12 en el sistema nervioso central (CNS) de los ratones tratados con CTx fueron menores que los del control. También se ha demostrado que la CTx potencia tolerancia a la mielina de sistema nervioso periférico de bovino en el modelo experimental de neuritis autoinmune (Gaupp y col., 1997). Incluso se ha encontrado que la entrega a mucosas de la subunidad CTxB puede de manera independiente ejercer efectos anti-inflamatorios. La entrega oral de CTxB conjugada a la proteína básica mielina protege al ratón en contra del desarrollo de EAE (Sun y col., 1996).

Se propuso que el efecto inhibitorio es el resultado de la inducción de células T regulatorias TGF- β y la regulación disminuida de las quimiocinas del sistema nervioso central (CNS).

La subunidad B recombinante de toxina de cólera (CTxB) aumenta la inducción de tolerancia cuando se une químicamente a antígenos particulados o solubles (Sun y col., 1994). Por ejemplo, la entrega oral de CTxB conjugada a péptidos derivados de una proteína de choque térmico de 60 kDa previene uveítis en mucosa de ratas, este efecto se asoció con el aumento de IL-10 y TGF- β y producción de IFN- γ e IL-12 reducida. Más aún, la administración oral de CTxB conjugada a insulina previno la diabetes en ratones diabéticos no obesos, lo cual se asoció con una disminución en la producción de IFN- γ y la migración de células Tr hacia los islotes pancreáticos (Aspord y col., 2002). La administración oral de CTxB recombinante también previno la colitis inducida por ácido sulfónico trinitrobenzeno mediada por IL12 en un modelo murino (Boirivant y col., 2001). Se encontró una disminución de IL12 e IFN- γ , pero en este caso, no hubo elevación de IL10 ó TGF- β . CTxB conjugada a colágena tipo II, condujo a la supresión de condritis en un modelo de enfermedad autoinmune de oído (Kim y col., 2001).

La administración oral con aloantígenos unidos a CTxB se observó que induce tolerancia inmunológica en contra del rechazo de transplantes (Sun y col., 2000). Se ha demostrado que aún sin conjugación, CTxB podría potenciar la tolerancia oral inducida hacia insulina (Brengholt y col., 2003). Además también se ha encontrado que la subunidad B de las enterotoxinas termolábiles de *E. coli* puede potenciar la tolerancia en mucosas y prevenir la inducción de condiciones inflamatorias autoinmunes incluyendo la artritis inducida por colágeno (Williams y col., 1999). Otra aplicación clínica de la tolerancia oral es su uso terapéutico en alergias a alimentos. Tanto las holotoxinas A-B así como sus subunidades B tienen el potencial para el tratamiento de condiciones inflamatorias vía sus propiedades anti-inflamatorias y a través de la inducción de células Tr (Lavelle y col., 2004).

La administración de autoantígenos expresados en plantas representa también una aproximación para la supresión de enfermedad autoinmunes y recientemente, auto antígeno tales como ácido glutámico descarboxilasa expresada en papas transgénicas se ha demostrado que induce tolerancia y previene el advenimiento de diabetes auto inmune en ratones diabético no obseso (Ma y col., 1997).

Las toxinas Cry además de que puede servir como autodefensa en plantas transgénicas, transformadas con los genes que codifican para estas toxinas frente a insectos plaga (Kota y col., 1999; de Cosa y col., 2001), representan un potencial clínico por su habilidad para inducir respuesta inmune en mucosas principalmente de Ac IgA e IgG, por la inducción de la subclase de Ac IgG1 e IgG2a (medida indirecta de la inducción de respuesta celular Th). Estas toxinas podrían ser servir también como autoantígenos para la inducción de tolerancia y tratamiento de enfermedades autoinmunes y existe la factibilidad de conjugarla o coadministrarla con diferentes antígenos solubles .

JUSTIFICACION

Existen muy pocos estudios sobre las propiedades inmunogénicas de las proteínas Cry. Se ha reportado que la protoxina Cry1Ac es capaz de inducir una respuesta inmune de anticuerpos cuando es administrada por diferentes vías. Sin embargo, se desconoce en cual región de las protoxinas Cry1A, la región carboxilo terminal o región amino terminal reside la capacidad de inducir una respuesta inmune humoral y una respuesta inmune celular. Dado que se conoce la estructura terciaria de la región N-terminal el conocimiento básico que se genere de este estudio permitirá no solo determinar las regiones potenciales responsables de la inmunogenicidad de las toxinas Cry sino contribuir al entendimiento del mecanismo de inmunogenicidad en vertebrados. Mientras que desde el punto de vista aplicado, permitirá el diseño de toxinas quiméricas con propiedades inmunogénicas variadas para inducir un tipo de respuesta inmune humoral y/o celular Th, así como la posibilidad de usar las toxinas Cry1A quiméricas como vectores *per se* o como adyuvantes de epitopes de importancia clínica.

HIPOTESIS DE TRABAJO:

La capacidad de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* para inducir tanto una respuesta inmune humoral como celular en ratones BALB/c reside y depende de la región N-terminal.

II. OBJETIVOS

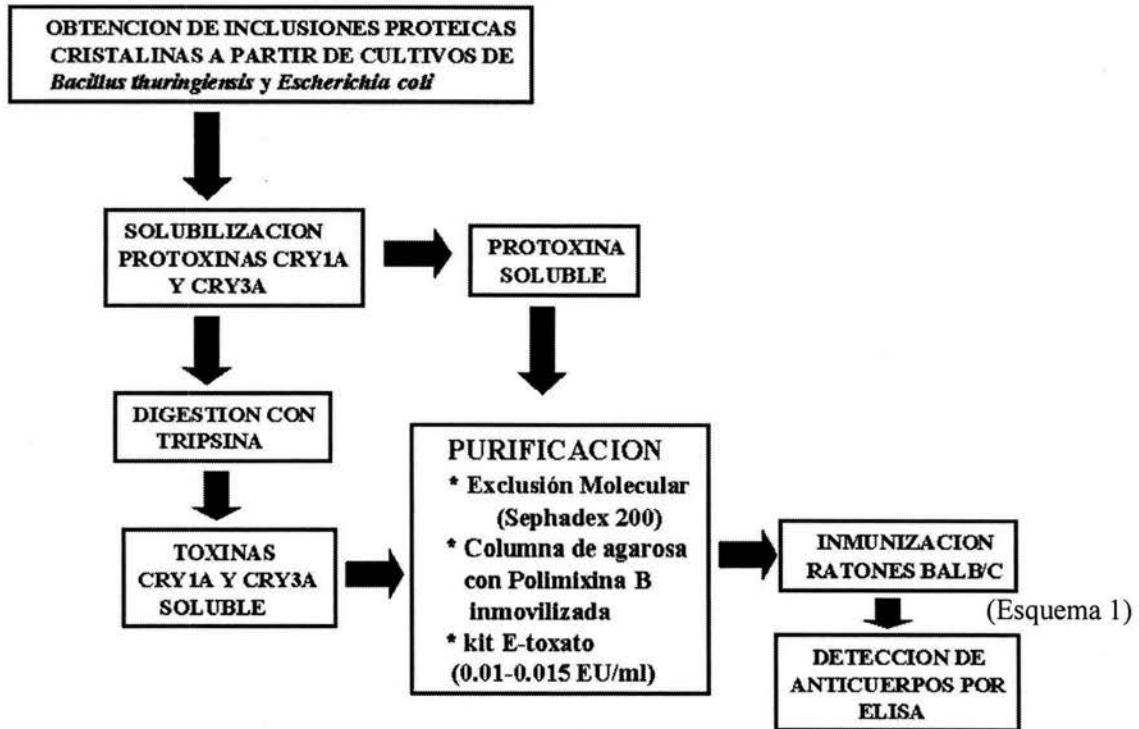
El **OBJETIVO PRINCIPAL** de esta tesis es determinar las regiones de las protoxinas Cry responsables de su inmunogenicidad para esta de forma contribuir al entendimiento del mecanismo de inmunogenicidad de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* en vertebrados.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar en que región de las protoxinas Cry, amino y carboxilo terminal reside la capacidad de inducir una respuesta inmune en ratones BALB/c.
2. Estudiar el papel de dominio I así como de los dominios tipo lectina (II y III) de las toxinas Cry1A en la inducción y modulación de la respuesta inmune humoral y celular en ratones BALB/c.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

No. 1. DETERMINACION DEL PAPEL DE LAS REGIONES CARBOXILO Y AMINO EN LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEINAS CRY.

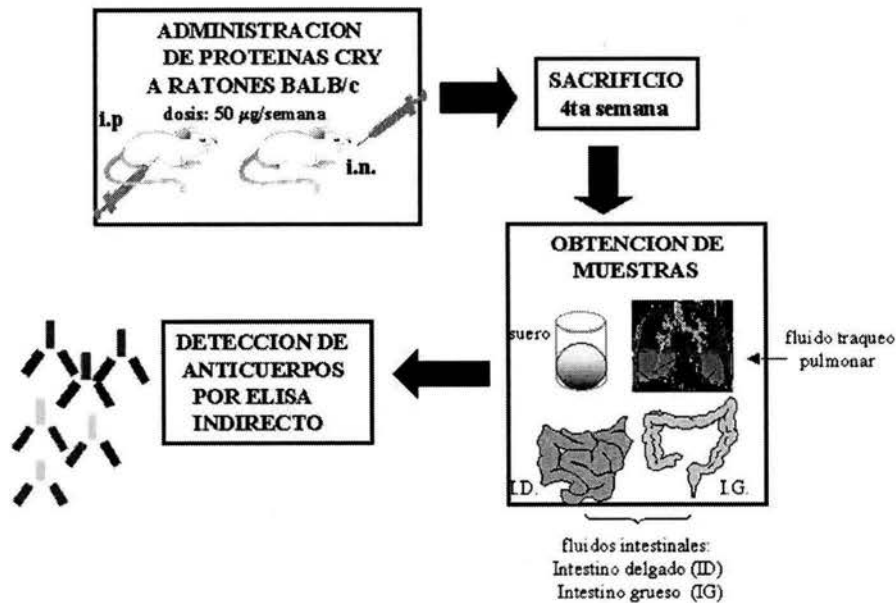


No. 2. DETERMINACION DEL PAPEL DEL DOMINIO I (bloque conservado 2) EN LA INMUNOGENICIDAD DE LAS TOXINAS Cry1A, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.

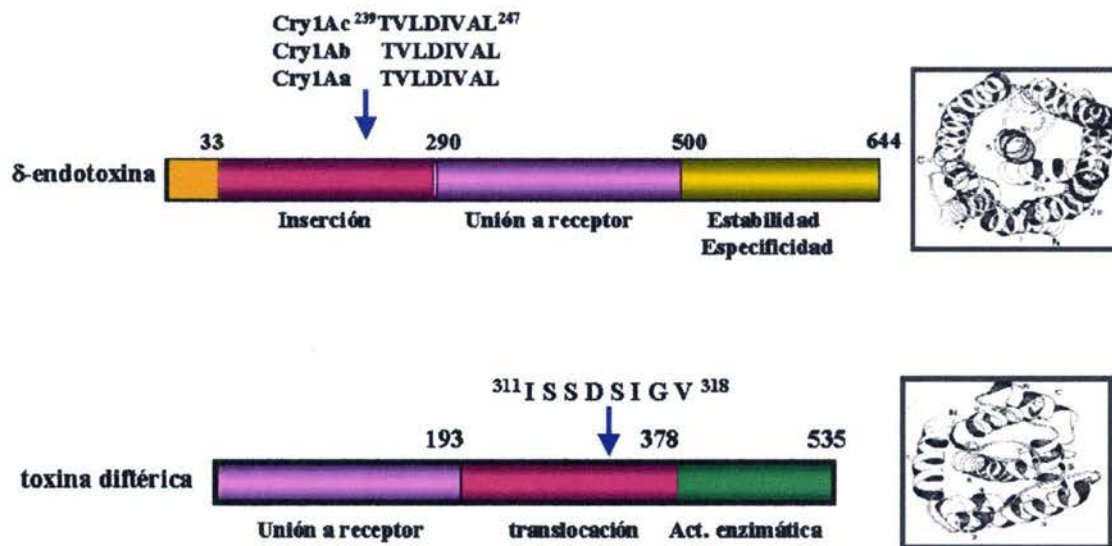
- (1) Mutagénesis sitio dirigida para intercambiar el motivo hidrofóbico conservado presente en la hélice conservada alfa siete del dominio I de las toxinas Cry1A por un motivo similar del fragmento B de la toxina diftérica (esquema 2)
- (2) Obtención de las toxinas Cry1A quiméricas a partir de cultivos de *E. coli*. Purificación de las toxinas por cromatografía de exclusión molecular.

- (3) Inmunización de ratones BALB/c por vía intraperitoneal e intranasal
- (4) Determinación de la inducción de una respuesta inmune de anticuerpos por las toxinas mutantes en ratones BALB/c, medida tanto en el fluido traqueopulmonar como en el fluido intestinal y en suero por ensayo de ELISA indirecto. Se comparó con las toxinas Cry1A silvestres (esquema 1).
- (5) Determinación de la inducción de la subclase de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a por las toxinas silvestres y quiméricas Cry1A en ratones BALB/c medida tanto en fluido traqueopulmonar como intestinal y en suero por ensayo de ELISA indirecto.

PROTOCOLO PARA MEDIR LA INDUCCION DE ANTICUERPOS



Esquema 1



Esquema 2

No. 3. DETERMINACION DE PAPEL DE LOS DOMINIOS TIPO LECTINA DE LAS TOXINAS CRY EN LA INDUCCION Y MODULACION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Th:

(1). Determinación de las cinéticas de inducción de citocinas tipo Th1(IFN- γ , Il12p70) y Th2 (IL-4, IL-10) por esplenocitos de ratones sin previa sensibilización y estimulados *in vitro* con toxinas silvestres y quiméricas Cry1A, respectivamente.

(2). Determinación de las cinéticas de inducción de citocinas tipo Th1 yTh2 por esplenocitos de ratones BALB/c presensibilizados por la vía intranasal y reestimulados *in vitro* con toxinas silvestres y quiméricas Cry1A.

(4). Determinación de la cinética de inhibición de la inducción de citocinas tipo Th1 y Th2 por esplenocitos de ratones BALB/c sin y presensibilizados por la vía intranasal y estimulados y reestimulados *in vitro* con la mezcla toxina + N-acetylgalactosamina.

III. RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se presentan en como artículos (apéndice): el primero publicado en la revista *Molecular Immunology*, volumen 45, pp. 177-1183 y dos sometidos. Asimismo los resultados se han dividido en tres partes. En la primera parte, se aborda de una manera directa el papel que juegan las regiones de las protoxinas, carboxilo y amino terminal en la inducción de una respuesta inmune tanto a nivel sistémico como en mucosas (Apéndice 1); mientras que en la segunda parte, se analiza dentro de la región N-terminal de las proteínas Cry1A si el grado de conservación, la naturaleza hidrofóbica de la hélice alfa siete y su localización contribuyen a la habilidad de la región N-terminal para inducir y modular una respuesta inmune humoral y celular (esta última expresada como la proporción de la subclase de Ac IgG1 e IgG2a) (Apéndice 2). En la tercera parte se analiza si la capacidad de la región N-terminal para inducir y modular una respuesta inmune celular reside en sus dominios tipo lectina mediante la determinación de las cinéticas de inducción e inhibición de las citocinas tipo Th1 (IL12p70 e IFN- γ) y Th2 (IL-10) por esplenocitos de ratones BALB/c estimulados *in vitro* con las toxinas Cry1A silvestres y con las toxinas Cry1A quiméricas (Apéndice 3).

Primera publicación “Implicación estructural de la respuesta inmune inducida por las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*”: Papel de la región amino terminal. Por Guerrero GG., Dean DH y L .Moreno-Fierros. 2004. *Mol. Immunol.* Vol 41: 1177-1183. (Apéndice 1). En este artículo se describe el papel que juegan las regiones carboxilo y amino en la inmunogenicidad de las proteínas Cry. Se purificaron proteínas Cry de diferente tamaño; proteínas grandes de peso molecular de 130 a 140 kDa, con un extremo carboxilo terminal largo que comprende la mitad de la proteína completa y protoxinas pequeñas, sin región carboxilo terminal, la protoxina pCry3A (70 kDa); toxinas ó región N-terminal (55-70 kDa) y se analizó la inducción de una respuesta inmune humoral en ratones BALB/c tanto a nivel sistémico como en mucosas, como se describe en el anexo metodológico.

Las protoxinas homólogas Cry1A son mayoritariamente inmunogénicas por la vía intraperitoneal pero no por la vía intranasal.

Después de la administración por vía intraperitoneal, las tres protoxinas homólogas Cry1A, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (Figura 1A y A', Apéndice 1) indujeron respuestas inmunes similares mayoritariamente de Ac IgG e IgM en los diferentes sitios analizados (detectados en el suero, en el fluido intestinal y en el fluido traqueopulmonar) (Figura 1B, Apéndice 1). En contraste, las tres protoxinas homólogas Cry1A administradas por vía nasal indujeron una respuesta inmune de anticuerpos diferencial. Así, por ejemplo, las tres protoxinas Cry1A homólogas indujeron un nivel muy moderado de Ac IgG e IgM detectado en suero, mientras que a nivel de mucosas, sólo la protoxina Cry1Ac indujo una respuesta significativa de anticuerpos tipo IgA e IgG (detectados en el fluido traqueopulmonar) (Figura 1C, Apéndice 1). Además la protoxina Cry1Ac también indujo Ac IgG, detectados en el fluido de intestino delgado y grueso, respectivamente.

Las proteínas Cry1A y Cry3A que carecen del extremo carboxilo terminal son inmunogénicas tanto por vía intraperitoneal como por vía intranasal.

Remarcablemente, la protoxina Cry3A (Figura 2A-A', Apéndice 1) sintetizada de manera natural como toxina, con un fragmento pequeño de 58 aminoácidos del lado amino terminal. Esta proteína indujo una respuesta significativa de Ac IgG e IgM (Figura 2B, panel superior e intermedio, Apéndice 1) similar a la inducida por las protoxinas Cry1A por la vía intraperitoneal mientras que por la vía intranasal indujo un nivel de Ac IgA (detectado en el fluido traqueopulmonar) similar al inducido por la protoxinas Cry1Ac. En cambio la toxina Cry3A fue poco inmunogénica por la vía i.p. (Figura 2B, pannel inferior Apéndice 1) e indujo niveles bajos de Ac IgG e IgA cuando se administró por la vía nasal. Estos datos sugirieron que la región N-terminal juega un papel importante en la inmunogenicidad de las proteínas Cry. Para apoyar estos resultados, se analizó la capacidad de inducir una respuesta inmune por las toxinas Cry1A, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac. Las toxinas Cry1A (Figura 3A-A', Apéndice 1) no solamente fueron capaces de inducir una respuesta de Ac IgG y una magnitud moderada de Ac IgA (Figura 3B, Apéndice 1) sino que fueron más inmunogénicas en algunos sitios que las mismas protoxinas Cry1A e incluso cuando se administraron por la vía nasal fueron capaces de inducir una respuesta

inmune de Ac IgA) (detectada en fluido intestinal y traqueo pulmonar) (Figura 3C, Apéndice 1).

Los anticuerpos anti-prototoxina están dirigidos hacia el extremo amino terminal.

La implicación estructural directa de la región amino terminal se confirmó mediante ensayos de inhibición, en los cuales se observó que hubo una inhibición del 100% de la unión de los anticuerpos antiprototoxina IgG a las placas cubiertas de Ag (prototoxinas Cry1A) por las toxinas Cry1A, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, respectivamente (Figura. 3D, Apéndice 1) mientras que sólo hubo una inhibición parcial de los Ac anti-prototoxina IgM (Figura 3D, Apéndice 1).

Segunda Publicación “Papel de la hélice alfa siete de las toxinas Cry1A *Bacillus thuringiensis* en la inducción y modulación de una respuesta inmune humoral y celular en ratones BALB/c”. Guerrero GG., Dean DH, Hernández TF y L. Moreno-Fierros. 2004 (sometido, Apéndice 2). En este artículo, se planteó la hipótesis que la hélice alfa siete conservada del dominio I contribuye a la capacidad de las toxinas Cry1A para inducir y modular la inducción de una respuesta humoral y celular en ratones BALB/c. Este estudio se realizó intercambiando el motivo de la hélice alfa siete ²³⁹TVLDIVALF²⁴⁷ por el motivo de la toxina diftérica ISSDSIGVL por mutagénesis sitio dirigida

Construcción de toxinas quiméricas Cry1A por mutagénesis sitio dirigida.

La mutagénesis sitio dirigida es un método rápido y eficiente (> 70%) para intercambiar un número de aminoácidos mayor a uno en plásmidos de doble cadena. Es un método descrito por Deng y Nickeloff, 1992 y modificado por Stratagene, Heidelberg, Germany. En este trabajo se usó este método con resultados positivos e incluso se realizó una modificación del método que lo hizo aún más eficiente, como se describe en el anexo metodológico. La localización precisa del motivo hidrofóbico conservado de la hélice alfa siete del dominio I se muestra en la Figura 1 (Apéndice 2) marcado con un rectángulo y de color rojo. Las tres toxinas silvestres Cry1A, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se seleccionaron para este intercambio porque se había encontrado que inducen anticuerpos IgG e IgA en magnitud diferente cuando son administradas por la vía intranasal (Figura 3C, Apéndice 1) (Guerrero y col., 2004)

Expresión y producción de las toxinas quiméricas Cry1A.

La expresión y purificación de cada una de las toxinas Cry1A quiméricas, Cry1Aa8, Cry1Ab2 y Cry1Ac3 se llevó a cabo a partir de cultivos de *E. coli* como se describe en el anexo metodológico. Importantemente, se encontró que las protoxinas quiméricas (Figura 2A, carriles 5-7, Apéndice 2) se expresaron y se produjeron en cantidades similares a las protoxinas silvestres (Figura 2A, carriles 2-4, Apéndice 2). Las propiedades de solubilidad y de susceptibilidad a digestión por tripsina tampoco se vieron afectadas (Figura 2B, carriles 2-4 y 5-7; Apéndice 2). Los aminoácidos cargados de la hélice alfa siete juegan un papel central en la estabilidad de la estructura de las toxinas Cry1A, mientras que los residuos no polares TVLI al parecer no juegan un papel esencial estructural ya que el cambio de estos aminoácidos por residuos polares no cargados (S) aún cuando causó un cambio en las interacciones entre la hélice alfa siete y el dominio II y un cambio en los ángulos se obtuvieron toxinas Cry1A mutantes estructuralmente estables (Figura 2C, carriles 4-6, Apéndice 2). Esto podría deberse a que hay mayor estabilización de la estructura de las toxinas Cry1A por la formación de puentes de hidrógeno entre los residuos de serina *per se* y con aminoácidos vecinos (Figura 2D, indicados con asteriscos y cruces).

Las toxinas Cry1A quiméricas son inmunogénicas por la vía intraperitoneal.

Después de administración por la vía i.p. se encontró que las tres toxinas Cry1A quiméricas fueron capaces de inducir una respuesta inmune significativa con respecto al control ($P < 0.05$), similar en cuanto al isotipo de anticuerpo (IgG e IgM) inducido pero no en cuanto a la magnitud de la respuesta inmune inducida por las toxinas Cry1A silvestres, respectivas ($P < 0.05$) (Figura 3, Apéndice 2), sin embargo, esta inducción menor sólo se detectó en suero (Figura 3, Apéndice 2). A nivel de mucosas de intestino (detectado en el fluido de intestino delgado y grueso) y de vías aéreas superiores (detectado en el fluido traqueo pulmonar), la magnitud de la respuesta de Ac IgG dependió del compartimiento analizado y de la toxina. Interesantemente, en el fluido traqueo pulmonar se detectaron niveles ligeramente mayores de Ac IgA inducidos por las tres toxinas quiméricas Cry1Aa8, Cry1Ab2 y Cry1Ac3 ($P < 0.05$) que los inducidos por las toxinas silvestres (Figura 3, Apéndice 2).

Las toxinas Cry1A quiméricas inducen niveles mayores de Ac IgG e IgA que las toxinas silvestres por la vía intranasal.

Por esta vía se detectaron también respuestas de Ac IgG e SIgA significativas con respecto al control ($P < 0.05$), en magnitud mayor que los inducidos por las toxinas silvestres, especialmente los detectados en suero y en el fluido traqueo pulmonar ($P < 0.05$) por las toxinas quimérica Cry1Aa8 y Cry1Ac3 (Figura 4, Apéndice 2). La toxina quimérica Cry1Ab2, indujo niveles menores que la toxina silvestre Cry1Ab ($P < 0.05$) aunque el isotipo no se ve afectado. Sin embargo, fue capaz de inducir Ac SIgA (detectado en el fluido traqueo pulmonar y el fluido intestinal) (Figura 4, Apéndice 2).

Análisis de los parámetros fisicoquímicos de la hélice alfa siete del dominio de las toxinas Cry1A.

Para fortalecer la hipótesis de que las características estructurales así como fisicoquímicas de la hélice alfa siete del dominio I juegan un papel en la inducción y modulación de una respuesta inmune en ratones BALB/c se usó el programa integrado ANTHEPROT (Deléage y col., 2001) el cual analiza varios parámetros fisicoquímicos como el perfil de antigenicidad (Parker y col., 1986); hidrofobicidad (Kyte y Doolittle., 1982), perfil de antigenicidad (Welling y col., 1985); hidrofiliidad (Hopp y Woods., 1981); regiones membranales helicoidales (von Heijne., 1992) y accesibilidad al solvente (Boger y col., 1986). Estos parámetros permiten en conjunto localizar determinantes antigénicos en una secuencia polipeptídica, segmentos hidrofóbicos con potencial de formación de hélice, segmentos de hidrofiliidad, lazos hidrofílicos. El perfil de antigenicidad de acuerdo a Parker y col., 1986 se basa en los valores de hidrofiliidad e hidrofobicidad derivados de los tiempos de retención en columnas de fase reversa (HPLC), así como en el parámetro de flexibilidad atómica. La escala de hidrofiliidad se calcula asignándole a un residuo de aminoácido un valor de hidrofóbico de -10 y al residuo que muestra el mínimo tiempo de retención, un valor hidrofílico de $+10$. El resto de los aminoácidos se escalan proporcionalmente. El método de Hoops and Woods asigna a cada aminoácido un valor numérico (un valor de hidrofiliidad) y después promedia repetitivamente estos valores a lo largo de la cadena peptídica. La secuencia con valor promedio local de hidrofiliidad más alto invariablemente corresponde ó esta inmediatamente adyacente a un determinante

antigénico. El programa indico tres determinantes antigenicos en la secuencia que corresponde a los picos 1, 2 y 3 (Figura 5, Apéndice 2). El primer determinante antigénico se localiza entre los aminoácidos 223S, 224R y 225D (Tabla 2), el segundo determinante incluye a los aminoácidos, 227V, 228R, 229Y, 230N y 231Q mientras que el tercer determinante corresponde a los aminoácidos, 232F y 233R (Tabla 2)(Apéndice 2). De acuerdo con Hoops y Woods, 1981 y Boger y col., 1986, los aminoácidos, 223S, 230N, 231Q, 232F y 233Y son los que estarían más accesibles al solvente, apoyando la hipótesis de que las regiones antigénicas son principalmente hidrofílicas en la superficie de la molécula de proteína (Tabla 2). De acuerdo con el perfil de Welling y col., 1985 que se basa también en los valores de hidrofiliidad, se observaron dos picos de menor tamaño correspondientes a los aminoácidos 237T y 241L (Tabla 2)(Figura 5, Apéndice 2). El perfil de la hélice alfa siete de las toxinas Cry1A quiméricas fue diferente con respecto al de las toxinas Cry1A silvestres. Se observó un pico adicional correspondiente a los aminoácidos del motivo de la toxina diftérica en la hélice alfa siete 238L239I 240S (Tabla 2A) y (Figura 5 I y II, Apéndice 2). Los cambios en los parámetros tanto de hidrofobicidad como en los valores hidrofiliidad cambiaron en algunos casos drásticamente (Tabla 2A). Por ejemplo, el perfil de antigenicidad de los aminoácidos 237T y 238L cambiaron de 0 a 37 y de 0 a 100 respectivamente mientras que en el caso del aminoácido 238L, hay un cambio en su perfil de antigenicidad (Welling y col., 1985) de 0.66 a -2.215 (Tabla 2A). Estos datos teóricos indican que con el cambio conformacional y el cambio de ángulo (Tabla 3) se están exponiendo los residuos hidrofóbico. Adicionalmente, se observaron otras diferencias menores entre cada una de las toxinas silvestres (Figura 5, Apéndice 2) (indicado por cabeza de flecha), especialmente en el caso de la toxina Cry1Ab (Figura 5, panel intermedio, Apéndice 2) que corresponden a las variaciones en los residuos de aminoácidos 227 I y 239A presentes en las toxinas toxinas silvestres Cry1Aa y Cry1Ac, las cuales tienen valores muy similares entre ellas.

Por otro lado, DeLisi y Berzofsky han propuesto que un péptido inmunogénico se caracteriza por la presencia de una estructura primaria con la habilidad para formar hélices alfa anfipáticas (Margalit y col., 1987). Las hélices alfa del dominio I de las toxinas Cry1A se caracterizan por su carácter anfipático (Li y col., 1991; Pereyra y col., 1992; Chandra y col., 1999). En este trabajo, el análisis de los diferentes parámetros fisicoquímicos,

particularmente la anfifilicidad usando el programa ANTHEPROT apoyaron no solo previos estudios sobre el carácter anfipático de la hélice alfa siete de las toxinas Cry1A silvestre y quimérica (Figura 5 y 5I) sino su antigenicidad y su posible función como epítipo para células T. En el caso de los epítopes para las células B, se ha descrito que su estructura se caracteriza por las cadenas móviles, flexibles, vueltas y estructuras al azar. Asimismo, Rothbard y Taylor, encontraron una correlación entre la presencia de los epítopes para células T con la siguiente secuencia de aminoácidos: un aminoácido cargado o glicina, de 2 a 3 aminoácidos hidrofóbicos, una glicina ó un residuo polar. Se ha propuesto que debe haber una correlación entre el número de motivos en una secuencia polipeptídica con la capacidad para inducir una respuesta inmune. De acuerdo con esta predicción teórica, la hélice alfa siete de las toxinas Cry1Aa tendría 5 motivos Rothbard, mientras que las hélices alfa siete de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac como la hélice alfa siete de las toxinas quiméricas Cry1A presentan cuatro (Figura 5III). Estos datos teóricos correlacionan parcialmente con la inmunogenicidad de las toxinas quiméricas Cry1Aa8 y Cry1Ac3, que indujeron niveles mayores de Ac IgA e IgG a nivel de mucosas que las toxinas silvestres (Figura 3-4, Apéndice 2). En resumen, estos datos de predicción teórica con base en el carácter anfipático, conformación helicoidal, presencia de aminoácidos antigénicos y de motivos Rothbard en la hélice alfa siete tanto de las toxinas Cry1A silvestres como de las toxinas Cry1A quiméricas podrían funcionar como epítopes para células T lo que conduciría a una mayor activación de las células T y como consecuencia a la producción de citocinas importantes para la diferenciación de las células B en células productoras de anticuerpos. De esta forma es como en este trabajo se propone que la hélice alfa siete del dominio I contribuye a la capacidad de la región N-terminal para la inducción de una respuesta inmune humoral y celular en ratones BALB/c.

Antigenicidad del motivo de la toxina diftérica mayoritariamente por vía intranasal.

Para apoyar la hipótesis de que la hélice alfa siete quimérica podría funcionar como epítipo tanto para células T como para células B, la antigenicidad del motivo de la toxina diftérica se evaluó *in vivo*. Las toxinas Cry1A quiméricas, Cry1Aa8, Cry1Ab2 y Cry1Ac3 se administraron a ratones BALB/c respectivamente, tanto por vía i.p. como por vía i.n. Se detectaron Ac anti-toxina diftérica de los tres isotipos en los diferentes fluidos analizados

(Figura 6, Apéndice 2) significativos con respecto al control ($P < 0.05$) y en magnitud similar entre las tres toxinas Cry1A quiméricas. La inducción de anticuerpos se detectó mayoritariamente después de la administración por vía i.n. (Figura 6a, Apéndice 2) mientras que por vía i.p. (Figura 6b, Apéndice 2) sólo se detectaron niveles bajos de Ac IgG e IgM en el suero y en el fluido traqueo pulmonar (Figura 6b, Apéndice 2). La especificidad de los anticuerpos anti-toxina diftérica se confirmó por ensayos de competencia, usando con cada una de las toxinas silvestres Cry1A como competidor (Figura 6c).

Las toxinas Cry1A silvestres inducen niveles mezclados de Ac IgG1 e IgG2a por la vía intraperitoneal y por la vía intranasal.

Las toxinas silvestres Cry1Aa y Cry1Ab indujeron mayoritariamente una mezcla de Ac IgG1 e IgG2a, significativa con respecto al control ($P < 0.05$) indicando de manera indirecta una inducción de respuesta Th mixta (Th1 y Th2) (Figura 7, 8, Apéndice 2), excepto la toxina Cry1Ac, la cual, en algunos sitios (mucosa intestinal) indujo predominantemente Ac IgG2a ($P < 0.05$) o un fenotipo de respuesta Th1. Mientras que por la vía intranasal, las toxinas silvestres indujeron niveles también mezclados de Ac IgG1 e IgG2a, en menor magnitud ($P < 0.5$) que los inducidos por la vía intraperitoneal (Figura 7, 8 Apéndice 2) incluyendo la toxina Cry1Ac.

Las toxinas Cry1A quiméricas inducen y modulan los niveles Ac IgG1 e IgG2a por la vía intraperitoneal pero no por la vía intranasal.

Las toxinas quiméricas indujeron en sitios de mucosas (detectado en fluido de intestino delgado y grueso) predominantemente Ac IgG1 o IgG2a ($P < 0.05$) significativos con respecto al control ($P < 0.05$), indicando de manera indirecta una polarización de la respuesta inmune celular Th, hacia Th1 ó Th2 (Fig. 7, 8, Apéndice 2). Mientras que por la vía intranasal el fenotipo de respuesta inducido fue mezclado entre IgG1 e IgG2a, o un fenotipo de respuesta Th1-Th2 en la mayoría de los sitios analizados (Fig. 7, 8 Apéndice 2)

Tercera Publicación, “La unión de los dominios tipo lectina de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* a las células del sistema inmune (B y T) es el primer paso en la inducción y modulación de la respuesta celular Th en ratones BALB/c. Por Guerrero, GG, Russell M y L. Moreno-Fierros. 2004 (sometido, Apéndice 3). En este artículo se analiza de manera directa el papel de los dominios tipo lectina en la capacidad de las toxinas Cry1A para inducir y modular la respuesta inmune celular Th. Debido a que este es el primer estudio que se realiza con las toxinas Cry1A, se consideró importante caracterizar la inducción de la citocinas realizando cinéticas desde 4 hasta 72 h, lo que permitiría a la vez determinar si las toxinas Cry son capaces de modular la respuesta inmune celular Th hacia una respuesta celular Th1 o Th2.

La toxina Cry1Aa8 quimérica pero no la silvestre induce niveles significativos de citocinas tipo Th1 y Th2.

Los esplenocitos de ratones BALB/c estimulados con la toxina silvestre Cry1A (10µg/ml), produjeron niveles pequeños de citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-10) y tipo Th1 (IFN-γ e IL-12p70) a tiempos tempranos (4 h) (Figura 1A, Apéndice 3). En contraste, en el sobrenadante de los esplenocitos estimulados con la toxina quimérica Cry1Aa8, se detectaron niveles significativos de citocinas tipo Th1 (IFN-γ, IL12) y pequeñas cantidades de citocinas tipo Th2 (IL-10) hasta las 48 h (Figura 1B, Apéndice 3), pero la producción fue sostenida, manteniéndose la inducción, mientras que la producción de IL12p70 es pequeña a tiempos tempranos (4 h) pero se incrementa a tiempos tardíos (Figura 1B, Apéndice 3). Estos resultados indicaron que la toxina silvestre Cry1Aa, aunque en menor magnitud que la toxina quimérica Cry1Aa8, estimularon poblaciones diferentes de células productoras de citocinas tipo Th1 ó Th2.

La toxina diftérica induce mayoritariamente citocinas tipo Th2 (IL10).

Los esplenocitos estimulados con toxina diftérica (10µg/ml), produjeron pequeñas cantidades de IL-4 cantidades significativas de IL-10, a las 24 hs después de la estimulación *in vitro* (Figura 2A, Apéndice 3). A diferencia de la toxina Cry1Aa8 quimérica, esta toxina produjo muy pequeñas cantidades de IFN-γ con una cinética de inducción no uniforme (Figura 2A, Apéndice 3), además de que no hubo producción de IL12p70. En contraste, el lipopolisacárido (LPS, 2.5 µg/ml) induce niveles bajos de

IL12p70 a tiempos tempranos mientras que a las 72 h se empieza a acumular. Además el LPS produce niveles muy moderados de IL10 IL4 e IFN- γ (Figura 2B, Apéndice 3). Mientras que la concanavalina (ConA) (1.25 $\mu\text{g/ml}$) induce niveles muy significativos de IL-4, IL10 e IFN- γ (Figura 2C). Estos datos apoyan fuertemente la hipótesis de que la hélice alfa siete de las toxinas Cry1A contribuye a la inducción de una respuesta inmune celular por sus características anfipáticas que se ajustan bien con los modelos de predicción y identificación de epítopes para células T (Margalit y col., 1987; Rothbard y Taylor., 2000).

Los esplenocitos de ratones BALB/c presensibilizados con la toxina Cry1A silvestre inducen predominantemente la producción del componente Th1 (IL12p70).

Los esplenocitos de ratones BALB/c presensibilizados por vía intranasal se reestimularon con las toxinas Cry1Aa y Cry1Aa8, respectivamente. Los reestimulados con la primera, produjeron niveles significativos de IL12p70, y niveles pequeños de IL10 en todos los tiempos analizados (4 a 72 h) (Figura 3C, Apéndice 3), los niveles de IL12 fueron incluso mayores que los inducidos por LPS (Figura 3B, Apéndice 3). Mientras que otra lectina, ConA indujo niveles muy moderados de IL12p70 (Figura 3A, Apéndice 3) y niveles bajos de IL10, sugiriendo que las toxinas silvestres están estimulando tanto a las células B para la producción de IL12p70 como a las células T (producción de IL10) y esto se fortaleció cuando se reestimularon los esplenocitos con la toxina quimérica Cry1Aa8, los cuales además de producir IFN- γ e IL10, produjeron IL12p70 con una cinética de inducción única aunque en menor magnitud que la inducida por la toxina Cry1Aa y el LPS (Figura 3C, 3B. Apéndice 3).

Los esplenocitos de ratones BALB/c presensibilizados con la toxina Cry1A8 quimérica inducen un patrón mezclado de citocinas Th1 y Th2 pero no producen IL12.

Los esplenocitos de ratones presensibilizados con Cry1Aa8 y reestimulados tanto con las toxinas silvestres Cry1Aa, Cry1Ac como con las toxinas quiméricas Cry1Aa8 y Cry1Ab2 produjeron un patrón de respuesta Th diferente. Los esplenocitos reestimulados con todas las toxinas indujeron predominantemente IFN- γ e IL10, respectivamente pero no hubo producción de IL12p70 (Figura 4A-D, Apéndice 3).

Activación diferencial de las poblaciones de células B y T por las toxinas Cry1A.

Los esplenocitos estimulados (Figura 5 A-D) y reestimulados (Figura 5 A'-D') con las toxinas silvestres Cry1Ac (Figura 5 A-D), toxina diftérica (Figura 6A), Cry1Aa (Figura 6B), Cry1Aa8 (Figura 6C) a una concentración de 10 µg/ml, respectivamente. Además, se estimularon esplenocitos con la mezcla toxina Cry1Ac + N-acetylgalactosamina y Jacalina + N-acetylgalactosamina. Se marcaron con los anticuerpos anti-CD3+ (linfocitos T), y anti-B220+ (linfocitos B), acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) así como con el marcador de activación temprana, anti-CD69+ acoplado a ficoeritrina (PE). El análisis de las poblaciones se realizó por citometría de flujo. Se encontró que en general las toxinas silvestres y quiméricas activaron en mayor proporción a las células B que a las células T (Figura 5-6, Apéndice 3). Interesantemente se observó que mientras la N-acetylgalactosamina inhibe alrededor de un 15 a 20% la activación de las células B, la activación de las células T se ve aumentada arriba de un 50% (Figura 7A).

La unión del dominio tipo lectina a los receptores sobre las células inmunes es el primer paso en la inducción y modulación de la respuesta celular Th por las toxinas Cry1A.

Para determinar si la interacción de las toxinas Cry con las poblaciones de linfocitos B y T de bazo es mediada por la unión de los dominios tipo lectina de las toxinas Cry1A a residuos de NacGal sobre los receptores y de esta manera inducir y modular la respuesta inmune celular Th en ratones; de manera similar a como otras toxinas bacterianas como la toxina difícil de *Clostridium* y la toxina de cólera de *Vibrio* (Lis y Sharon., 1998; Lavelle y col., 2000; Castagliulo y col., 2004) modulan la respuesta inmune células Th. Los esplenocitos de ratones BALB/c sin presensibilizar y presensibilizados, se incubaron con la mezcla de toxina Cry1A silvestre y quimérica con NacGal, respectivamente. Se encontró que hubo un 100% de inhibición de la inducción de citocinas tipo Th1 (IFN-γ e IL12p70) y tipo Th2 (IL10) por los esplenocitos estimulados con Cry1Aa8 (Figura 8, Apéndice 3). En contraste, los esplenocitos estimulados con las toxinas silvestres Cry1Aa y Cry1Ac produjeron mayor cantidad de IL10, con la mezcla toxina-NacGal (Figura 8I, Apéndice 3) y la producción baja de las otras citocinas a tiempos tempranos (4 h) (datos no mostrados) fue inhibida por este amino azúcar.

IV. DISCUSSION

La discusión de esta tesis se ha dividido también en tres partes. En la primera, se discute sobre la implicación de la estructura de las proteínas Cry en su capacidad para inducir una respuesta inmune humoral. En la segunda y tercera parte, la discusión esta centrada exclusivamente y en el análisis del papel de cada uno de los dominios que forman la región N-terminal en la capacidad de las toxinas Cry1A para modular una respuesta inmune celular Th en vertebrados. 2ª parte, se discute sobre la naturaleza hidrofóbica del dominio I y en la 3ra parte, sobre las propiedades tipo lectina del dominio II y III (en el caso de la toxina Cry1Ac).

Análisis del papel de las regiones (carboxilo y amino) de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* en ratones BALB/c.

Las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* como muchas otras toxinas bacterianas, toxina de diftérica de *Corynebacterium diphtheriae*, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, toxina de cólera de *Vibrio cholerae* y enterotoxinas termolábiles de *Escherichia coli* están organizadas como módulos o dominios funcionales discretos (English y Slatin., 1991; Parker y Pattus., 1993; Rappuoli y Montecucco., 1997). La implicación de la estructura modular de estas toxinas reside en que los dominios funcionales pueden llevar a cabo acciones específicas. Así, en el caso de las propiedades inmunogénicas de la toxina de cólera (CTx) y las enterotoxinas termolábiles (LTx), se ha reportado que reside mayoritariamente en la capacidad de unión de la subunidad B a las superficies mucosas (Nashar et al., 1996). La inducción de una respuesta inmune humoral de la protoxina Cry1Ac está apoyada por varios estudios (Vázquez y col., 1999; Moreno-Fierros y col., 2000). Sin embargo, no se había determinado en que regiones de las protoxinas, carboxilo y amino terminal, reside la inmunogenicidad de las proteínas Cry. Los datos de este trabajo muestran que las propiedades inmunogénicas de las protoxinas Cry1A, altamente homólogas, reside y depende de la región N-terminal. Esto podría deberse a la mayor diversidad en estructura y las funciones de esta región (Chunjatupornchai y col., 1988).

El papel de la región carboxilo terminal de las protoxinas en la habilidad para inducir una respuesta inmune mostrada por las proteínas Cry1A en vertebrados es muy especulativo porque es una región que es susceptible a proteólisis, es altamente conservada

en secuencia, y la estructura tridimensional aún no se ha determinado, en su lugar se ha propuesto que la protoxina completa es una molécula elipsoide (Holmes y Monroe, 1965). Se caracteriza por su naturaleza predominantemente hidrofílica, la mayoría de las lisinas y cisteínas (formación de enlaces disulfuro) se encuentran en esta región (Choma y col., 1990). En invertebrados, se ha propuesto con base en estas características estructurales y fisicoquímicas, que esta región juega un papel central en la formación y ensamble del cristal (Choma y col., 1990; Schnepf y col., 1998), así como en las propiedades de solubilidad de las protoxinas.

En contraste, la región amino terminal es resistente a proteólisis, organizada en tres dominios (Li y col., 1991; Grochuski y col., 1995; Galistky y col., 2002) es rica en α -hélices y β -plegadas (Chestukhina y col., 1982; Chunjatupornchai y col., 1988; Convents y col., 1991). La funcionalidad de unión a carbohidratos reside en esta región (Dominios II y III) (Burton y col., 1999); la cual le da a las toxinas Cry la habilidad para unirse a receptores tipo glicoproteína, presente en el intestino medio de los insectos, por ejemplo, la N-aminopeptidasa o la E-cadherina (Knight y col., 1994; Nagamatsu y col., 1999). Este tipo de moléculas también está presente en el intestino de los vertebrados, funcionando en adhesión a células y absorción de nutrientes (Angst y col., 2001). Sin embargo, experimentos *in vitro* demostraron que la protoxina Cry1Ac no se une a estas moléculas (Vázquez y col., 2000) sobre las vesículas de borde dentado del intestino delgado, purificadas de intestino de ratón; ya que la unión no fue inhibida por N-acetylgalactosamina ni por manosa y /o biotina, sugiriendo que otras regiones de las protoxinas y otro tipo de moléculas estarían involucradas en la interacción electrostática *in vivo* (van Rie y col., 1990). Así la capacidad de inducir anticuerpos por las protoxinas Cry1A (130 kDa) podría explicarse tomando en cuenta que moléculas de alto peso molecular (≥ 130 kDa) pueden interactuar con las células presentadoras de antígeno (Ag) (APCs) presentes en la cavidad peritoneal y en la vías aéreas superiores (Banchereau y col., 2000; Balabanian, 2002) y a la influencia de la región N-terminal sobre la región C-terminal.

La implicación estructural de la región N-terminal en la respuesta de anticuerpos inducida por las proteínas Cry se demostró por la capacidad de las toxinas Cry1A para inhibir la unión de los anticuerpos antiprotoxina IgG, así como en la capacidad de las toxinas Cry, incluyendo la protoxina Cry3A, para inducir anticuerpos de los tres isotipos,

remarcablemente, anticuerpos IgA secretores en los sitios de mucosas administradas por vía i.p. e i.n. (Bouvet y Decroix., 2002)

Por lo tanto, sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo, se propone que la región N-terminal puede ser la responsable de la fuerte inducción de anticuerpos específicos inducido por las proteínas Cry. Esto es consistente con el conocimiento de que la unión del Ag (toxinas Cry) a receptores apropiados en el epitelio nasal o intestinal podría facilitar la captación, y posterior procesamiento conduciendo a respuestas de anticuerpos aumentadas (Takada y col., 2000).

Análisis del papel de la hélice alfa siete del dominio I en la capacidad de las toxinas Cry1A para inducir y modular una respuesta inmune humoral y celular.

El papel directo de cada uno de los dominios de la región N-terminal de las proteínas Cry en la capacidad para inducir una respuesta inmune y celular no se ha determinado. Estudios previos demostraron la importancia de la región N-terminal en la inmunogenicidad de las proteínas Cry en ratones BALB/c (Guerrero y col., 2004) (Apéndice 2). Esta región está organizada en tres dominios funcionales (Li y col., 1991; Grochulski y col., 1995) y se caracteriza por la presencia de cinco bloques conservados. Se ha propuesto que el grado de conservación de estos bloques es importante tanto a nivel estructural como funcional en la actividad biológica de estas región (Li y col., 1991). Por lo que en este trabajo se planteó la hipótesis de que el dominio I por la presencia de los dos bloques más conservados en sus estructura así como por sus características helicoidales anfipáticas juega un papel importante en la capacidad de las toxinas Cry para inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular en ratones BALB/c. Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo apoyan esta hipótesis. El papel estructural de la hélice alfa siete del dominio I en la capacidad de las toxinas Cry1A para inducir una respuesta inmune de anticuerpos se basa en su naturaleza hidrofóbica, así como en su localización estructural y grado de conservación. Esta hélice se encuentra justamente en la interfase conservada entre el dominio I y el dominio II (Figura 1) en contacto cercano con la β -1 y cercana al lazo de la hélice alfa ocho y el lazo del dominio II (Li y col., 1991; Grochulski y col., 1995). Por lo tanto, está bien colocada para sensar la unión a receptor (es) y participar así en la

interacción con membranas (Höfte y Whiteley, Chandra y col., 1999; Alcántara y col., 2001). De hecho estudios biofísicos han demostrado que todas las hélices alfa del dominio I tienen afinidad por la membrana (Gazit y col., 1998). Sin embargo, a diferencia de la hélice alfa cinco la cual tiende a agregarse en bicapas lipídicas, permear vesículas fosfolipídicas y formar canales iónicos (Gazit y col., 1998), la hélice alfa siete se extiende sobre la superficie de la membrana. Esta hélice se caracteriza por la presencia de un motivo hidrofóbico conservado entre la mayoría de las toxinas Cry1A de ocho aminoácidos, TVLDIVALF (Péreyra y col., 1992). Interesantemente, un motivo similar se encontró en el extremo carboxilo terminal del fragmento B de la toxina diftérica (DTB) (Choe y col., 1987). El motivo DTB es parte del dominio transmembranal que ayuda ó facilita la translocación de la subunidad A al citoplasma. Por lo tanto el efecto de este motivo en la hélice alfa siete es aumentar su afinidad por la membrana y/o aumentar la unión del dominio II por su receptor esto dado por un cambio conformacional más efectivo. Los resultados experimentales observados en insectos son consistentes con esto ya que la substitución del motivo conservado de la hélice alfa siete de la δ -endotoxina Cry1Ac por el motivo DTB causó un aumento en la toxicidad en larvas de insectos susceptibles (Chandra y col., 1999). El mecanismo de este aumento se ha propuesto que podría deberse a un incremento en la afinidad de la hélice alfa siete por la membrana del epitelio del intestino de insecto (Chandra y col., 1999), lo que ayudaría al dominio II en la interacción con los receptores glicoproteicos. Interesantemente, en este trabajo se encontró que la substitución del motivo conservado en la hélice alfa siete del dominio I de las tres toxinas Cry1A por el motivo de la DTB quiméricas causó un aumento en la magnitud de la inducción de Ac IgA especialmente después de la inmunización por la vía intranasal y una magnitud diferencial después de la inmunización por la vía i.p. El mecanismo de aumento en la inmunogenicidad, principalmente el inducido por las toxinas quiméricas Cry1Ac3 y Cry1Aa8 (Figura 4) por la vía intranasal, se podría explicar con base en las características fisicoquímicas de la hélice alfa siete: (1) la substitución de los aminoácidos hidrofóbicos por los residuos de aminoácidos polares no cargados causó un cambio en las interacciones entre el dominio I y II (2) un cambio en los ángulos de hélices y láminas beta, un cambio conformacional (Tabla 3) así como un aumento en el grado de movilidad de esta hélice (causado por la presencia de las serinas 240S, 241S, 243S) conduciendo a una exposición

de residuos hidrofóbicos (236L, 237T, 238L, 239 I, 240V, 242D, 246L) (Tabla 2A, Apéndice 3). Por otro lado se ha descrito que el intercambio de dominios puede contribuir a la versatilidad en las funciones de una proteína generando nuevas toxinas quiméricas (Bennet y col., 1994). Esto es común entre proteínas globulares con una estructura modular (Baron y col., 1991) como es el caso de la toxina diftérica y las toxinas Cry. En este trabajo, se encontró que por el intercambio de cuatro aminoácidos (TVLI por ISSS) se generaron dos toxinas quiméricas, Cry1Aa8 y Cry1Ab2 además de la toxina Cry1Ac3, la cual no se habían reportado sus propiedades inmunogénicas; con una función adicional, la inducción de Ac anti-Cry IgA y anti-toxina diftérica IgA en las vías aéreas superiores dirigida a un sitio específico. Más aún, las hélices anfipáticas del dominio I y particularmente la hélice alfa siete podrían contribuir a la inmunogenicidad de la toxinas Cry1A funcionando como epitopes para células T y células B, las cuales colaborarían en la producción de anticuerpos anti-Cry y anti-toxina diftérica que se observó que se ajusta bien a los modelos teóricos de predicción de antigenicidad (programa ANTHEROT) (Deléage y col., 2001) así como a los modelos para identificar epitopes para células T y B, los cuales indican que los sitios para células T generalmente son anfipáticos (Rothbard y Taylor., 1988; Margalit y col., 1987) (Tabla 3). Esta hipótesis de que los sitios antigenicos son altamente anfipáticos es consistente con numerosas observaciones de otros péptidos asociados a membrana y sugieren un papel importante de la anfipaticidad en los modelos moleculares de activación de las células T (Kaiser y Kezdy., 1984).

Las diferencias observadas entre la magnitud de la inducción de la respuesta inmune por las toxinas Cry1A quiméricas podría explicarse tomando en cuenta los factores del huésped como son la regionalización tanto de los receptores como de las células presentadoras de Ag (Banchareau y col., 2000; Takada, y col., 2001) que también influyen en el fenotipo de respuesta que se induce. Los datos obtenidos en este estudio además de que reafirman la hipótesis de que la inmunogenicidad de las proteínas Cry de *Bt* reside y depende la región amino terminal por su estructura más diversa, esto se fortaleció por la determinación del papel del dominio I a través de la hélice alfa siete en la capacidad de la región N-terminal de las proteínas Cry para inducir y modular la respuesta celular Th, y la hacen un blanco potencial para la estimulación de células T CD4+.

Análisis del papel de los dominios tipo lectina en la capacidad de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* para modular una respuesta inmune celular en ratones BALB/c.

En base a las propiedades tipo lectina tanto de las toxinas bacterianas (toxina de cólera y enterotoxinas termolábiles de *E. coli* (Loris y col., 1998) como de las lectinas de plantas (Sankaranarayanan y col., 1996; Lee y col., 1998; Rosa y col., 1999) que se unen a carbohidratos para ejercer su actividad biológica, en este trabajo se propone que la unión a N-acetylgalactosamina (NacGal) sobre los receptores de las células inmunes es el primer paso en la inducción y modulación de la respuesta inmune celular por las toxinas Cry1A en ratones BALB/c.

Las propiedades inmunomoduladoras de muchas moléculas como lectinas de plantas, toxinas bacterianas (Ctx y LTx) ó proteínas que unen carbohidratos como concanavalina, fitohemaglutinina (FHA) (Lis y Sharon 1998; Lavelle y col., 2000; Castagliuolo y col., 2004) reside precisamente en su habilidad para unirse a los residuos de carbohidratos sobre receptores de la membrana de las células del sistema inmune. Así, CTx y LTx se unen de forma independiente al glicoesfingolípido gangliósido GM1[Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)(NeuAc(α 2-3)Gal ((β 1-4)Glc(β 1-1)ceramida)] sobre las superficies de las células de mamífero para inducir y modular la respuesta inmune celular, por ejemplo, inducen células T regulatorias así como las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8+ (Nashar y col., 1996; Lavelle y col., 2004), mientras que las lectinas de plantas, como jacalina, se unen específicamente a Gal- β -1-2- GalNAc y otros monosacáridos (Pineau y col., 1991) y activan linfocitos CD4+T induciendo su proliferación. En invertebrados, las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* se unen a residuos expuestos de NacGal sobre los receptores inmersos en la membrana del epitelio de los insectos (Knight y col. , 1994; Burton y col. , 1999) y este paso es clave en la especificidad y toxicidad de las proteínas Cry (van Rie y col., 1990). En este trabajo lo que se encontró es que las toxinas Cry también se unen a NacGal ya que la preincubación de la toxina con este azúcar inhibió la producción de citocinas tanto tipo Th1 como Th2 por los esplenocitos estimulados con la toxina silvestre Cry1Aa y la toxina quimérica Cry1Aa8. Una excepción a esto, fue la producción de IL-10 por esplenocitos estimulados con la toxina silvestre Cry1Aa, en lugar de una inhibición

por la NAcGal, se observó una estimulación (Figura 7, Apéndice 3). Estos resultados sugirieron que la inducción y modulación de una respuesta inmune celular depende de la unión del dominio tipo lectina a los receptores sobre las células del sistema inmune. Más aún, las toxinas Cry1A activaron una mayor proporción de linfocitos B (CD69+/B220+) que de linfocitos T (CD69+/CD3+) (Figura 6A-B y 6A'-B', Apéndice 3) y de acuerdo a la Figura 7, esta activación también está mediada por la interacción de las toxinas Cry con residuos expuestos de NAcGal sobre los receptores en las células B y T. La implicación de la activación de las células B tendría que ver con una mayor captación del Ag y por consecuencia una mayor activación de las células T que a su vez produciría una diferenciación de la población de células T CD4+ en Th1 y Th2 (Constant y Bottomly., 1997) y la producción de las citocinas apropiadas para la diferenciación de las células B hacia células productoras de anticuerpos. Por lo tanto, la interacción de las toxinas Cry1A con las células del sistema inmune al parecer tiene que ver con la modulación de las subpoblaciones de linfocitos T y B. Esto fue más claro cuando esplenocitos de ratones presensibilizados por inmunización intranasal seguida de reestimulación *in vitro* con las toxinas Cry1A silvestre y quimérica (Figura 3A) activaron diferentes subpoblaciones de células productoras de citocinas tanto tipo Th1 (IL12p70, IFN- γ) como Th2 (IL10). Estos resultados sugirieron que la toxina Cry1Aa estaría activando células B mientras que la toxina quimérica Cry1Aa8 estaría estimulando a los linfocitos T. Un reporte reciente apoya esta propuesta ya que se encontró que el CpG (Shirota y col., 2002) activa a las células B de murino las cuales van a producir IL12p70. Los niveles bajos de IL-4 que se detectaron en el sobrenadante de las células de bazo en cultivo podría deberse entre a dos razones principales: (1) la citocina está siendo reutilizada por las células en proliferación (Herrick y col., 2000) y (2) los esplenocitos de ratones presensibilizados también por esta vía podrían estar induciendo células T regulatorias (Tr1) productoras de IL10 con niveles bajos ó apenas detectables de IL-4 (McGuirk y col., 2002). La observación de que las toxinas Cry pueden modular la inducción de las citocinas IL12p70 e IL10, es interesante si se toma en cuenta que esta habilidad puede aplicarse para el tratamiento de enfermedades crónicas (por ejemplo, en autoinmunidad, diabetes mellitus). Una de las moléculas que se ha usado con este fin, es la subunidad B de la toxina de cólera y la enterotoxina termolábil de *E. coli*. La coadministración oral o nasal de esta subunidad con algún otro antígeno de

interés clínico (insulina, colágena tipo II) induce células T regulatorias que juegan un papel en la inducción de tolerancia en mucosas (McGuirk y col., 2002; Lavelle y col., 2004) y la prevención de condiciones inflamatorias autoinmunes (Williams y col., 1999). Si bien es cierto que existen otras moléculas de origen bacteriano como son el LPS, los glicolípidos, el RNA de doble que tienen también propiedades inmunomoduladoras (McGuirk y col., 2002), su uso es limitado por su toxicidad (LPS) y disponibilidad. Aunado a esto anterior poco se sabe de las células presentadoras y de las citocinas que promueven la inducción de células T regulatorias *in vivo* (Shevach, 2002) por estas moléculas.

En conjunto, los resultados de esta tercera parte del proyecto fortalecen la capacidad de la región N-terminal en la inducción de una respuesta inmune celular Th (citocinas tipo Th1 y Th2) porque apoyan la hipótesis de que uno de los dominios (o dominios) que participan y que incluso son claves en esta capacidad son precisamente el dominio II y III (sólo en el caso de la toxina Cry1Ac) por sus características tipo lectina que constituyen el paso inicial para la inducción y modulación de esta respuesta una respuesta inmune celular en ratones BALB/c asistido por la helice alfa siete del dominio I.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES GENERALES

1. El análisis de los datos de la inducción de una respuesta inmune tanto por proteínas completas (protoxinas Cry1A) como por proteínas sin extremo carboxilo terminal, protoxina y toxina Cry3A, y toxinas Cry1A, indican que la capacidad de estas proteínas para inducir una respuesta inmune reside y depende mayoritariamente en la región N-terminal .
2. El análisis de los datos de la inducción de la subclase de Ac IgG, IgG1 e IgG2a (medida indirecta de la respuesta celular Th) por las toxinas Cry1A, apoya fuertemente el papel del N-terminal no sólo en la inducción de estos anticuerpos sino en su modulación en ratones BALB/c. La importancia de la región N-terminal se fortaleció por la determinación de la contribución de cada uno de sus dominios. Así, el dominio I contribuye a la capacidad de las toxinas Cry para modular una respuesta inmune tanto humoral como celular por su naturaleza conservada entre las todas las δ -endotoxinas (motivo conservado) hidrofóbico, e importantemente por su localización, en contacto cercano con el dominio de unión a receptor).
3. Los resultados del análisis de la activación, inducción e inhibición de la producción de citocinas tipo Th1 y Th2 por las toxinas Cry en ratones BALB/c, sugieren un papel clave de los dominios tipo lectina II y III (solo en el caso de la toxina Cry1Ac) en cada uno de estos eventos en la inducción de una respuesta inmune celular.

4. Las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* no sólo representan una clase de toxinas bacterianas definidas por su acción tóxica en insectos, los datos de este trabajo demuestran que estas toxinas también se pueden definir sobre la base de sus propiedades inmunomoduladoras, ya que tienen la habilidad de unirse a, e interaccionar con receptores sobre las células del sistema inmune de vertebrados.

5. Las toxinas Cry1A representan un potencial adyuvante que pueden tener usos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades crónicas por su habilidad para modular la respuesta inmune celular Th hacia Th1 o Th2 en vertebrados.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Alouf, JE. 1999. Introduction to the family of the structurally related cholesterol-binding cytotoxins ('sulfhydryl-activated' toxins), p. 443-4456. In J. E. Alouf and J.H. Freer (ed), The comprehensive sourcebook of bacterial proteins toxins. Academic Press, London, United Kingdom.
2. Alcántara, PE., Alzate, O., Lee, K. Mi., Curtiss, A. y DH Dean. 2001. Role of the α helix seven of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin in membrane insertion, structural stability and ion channel activity. *Biochemistry* 40: 2540-2547.
3. AlYahyaee, SA. y DJ. Ellar. 1996. Cell targeting of a pore forming toxin, CytA delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies israelensis by conjugating CytA with anti-Th1 monoclonal antibodies and insulin. *Bioconj. Chem.* 7: 451-460.
4. Andrews, RE. Jr., Faust, RM., Wabiko, H, Raymond, KC., LA Jr. Bulla. 1987. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.* 6: 165-230
5. Angst, BD., Marozzi, C., AJ. Magee. 2001. The cadherin-superfamily. *J. Cell. Sci.* 114: 625-626.
6. Aspod, C., Czerkinsky, C., Durand, A., Stefanutti, A., C. Thivolet. 2002. α 4 Integrins and L-selectin differentially orchestrate T cell activity during diabetes prevention following oral administration of CTB-insulin. *J. Autoimmun.* 19: 223-232.
7. Balabanian, K. 2002. Interleukin 10 modulates the sensitivity of peritoneal B lymphocytes to chemokines with opposite effects on stromal cell-derived factor-1 and B lymphocyte chemoattractant. *Blood*, 15: 427-436.
8. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, YJ y col. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811.
9. Baron, M., Norman, DG. y LD. Campbell. 1991. Protein Modules. *Trends Biochem. Sci.* 16: 13-17
10. Bennet, MJ., Choe, S. y D. Eisenberg. 1994. Domain Swapping: entangling alliances between proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3127-3131
11. Boger, J., Emini, EA., A. Schmidt. Surface probability profile. An heuristic approach to the selection of synthetic peptide antigens. Reports on the sixth international congress in immunology. Toronto. 1986.p 250.
12. Boirivant, M., Fuss, IJ., Ferroni, L., De Pascale, M., W. Strober. 2001. Oral administration of recombinant cholera toxin subunit B inhibits IL12-mediated murine experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis. *J. Immunol.* 166: 3522-3532.

13. Bouvet, J. y N. Decroix. 2002. Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination?. *Trends in Immunol.* 23: 209-213.
14. Bravo, A. 1997. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains. *J. Bacteriol.* 179: 2793-2801.
15. Bregenholt, S., Wang, M., Wolfe, T., Hughes, A., Baerentzen, L., Dyrberg, T., von Herrath, MG., JS. Petersen. 2003. The cholera toxin B subunit is a mucosal adjuvant for oral tolerance induction in type 1 diabetes. *Scand. J. Immunol.* 57: 423-438.
16. Burton, LS., Ellar, DJ., Li, J. y DJ. Derbyshire. 1999. N-Acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the Domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287: 1011-1022.
17. Bravo, A. 1997. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains. *J. Bacteriol.* 179: 2793-2801.
18. Chandra, A., Ghosh, P., Mandaokar, DA., Bera, KA., Sharma, PR., Das, S. y AP. Kumar. 1999. Aminoacid substitution in α -hélix siete of CryIAC δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* leads to enhanced toxicity to *Helicoverpa armigera* Hubner. *FEBS Lett.* 458: 175-179.
19. Chen, XJ., Lee, MK. y DH. Dean. 1993. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibiiton of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9041-9045.
20. Chestukhina, GG., Kostina, LJ., Mikhailova, AL., Tyurin, SA., Klepikova, FS. y VM. Stepanov. 1982. The main features of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin molecular structure. *Arch. Microbiol.* 132: 59-162.
21. Chunjatupornchai, W., Hofte, H., Seurinck, J., Angsuthanasombat, Ch., y M. Vaeck. 1988. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for diptera and lepidoptera. *Eur. J. Biochem.* 173: 9-16.
22. Choma, ChT., Surewicz, WK., Carey, PR., Pozsgay, M., Raynor, T. y H. Kaplan. 1990. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. *Eur. J. Biochm.* 189: 523-527.
23. Czerkinsky, C., Anjuere, F., McGhee, JR., George-Chandy, A., Holmgreen, J., Kieny, MP., Fujiyashi, K., Mestecky, JF., Pierrefite-Carle, V., Rask, C. y JB. Sun. 1999. Mucosal Immunity and Tolerance; relevance to vaccine development. *Immunol. Rev.* 170: 197-222.

24. Clairmont, FR., Milne, RE., Pham, VT., Carriere, MB. y H. Kaplan. 1998. Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 273: 9292-9296
25. Constant, SL. y K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: The alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 297-322.
26. Convents, D., Cherlet, M., Van Damme, J., Lasters, I. y M. Lauwereys. 1991. Two structural domains as a general fold of the toxic fragment of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Eur. J. Biochem.* 195: 631-635.
27. Crickmore, N., Zeigler, DR., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. y DH Dean. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol y Mol. Biol. Rev.* 72: 807-813.
28. Castagliuolo, I., Sardina, M., Brun, P., DeRos, C., Mastrotto, C., Lovato, L., G. Palu. 2004. *Clostridium difficile* toxins A carboxyl-terminus peptide lacking ADP-ribosyltransferase activity acts as a mucosal adjuvant. *Infec. Immun.* 72: 2827-2836
29. de Aizpurua HJ., y GJ. Russell-Jones. 1988. Oral Vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J. Exp. Med.* 167: 440-451.
30. de Haan, L., Verweij, W., Agsteribbe, E. y J. Wilschut. 1998. The role of the ADP-Ribosylation and GM1-binding activity in the mucosal immunogenicity and Adjuvanticity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and *Vibrio cholerae* cholera toxin. *Immunol. and Cell Biol.* 76: 270-279.
31. Deng, WP., y JA., Nickoloff. 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200: 81-88
32. de Maagd, RA., Bravo, A. y N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trend in Genetics.* 17: 193-199.
33. Deléage, G., Combet, C., Blanchet, C., C. Geourjon. 2001. ANTHEPROT: An integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comp. Biol. Med.* 31: 259-267.
34. Dorsch, JA., Candas, M., Griko, NB., Maaty, WSA., Midboe, EG., Vadlamudi, RK., LA Bulla, Jr. 2002. Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically for a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R1 in *Manduca sexta*: Involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32: 1025-1036.
35. Du, C. y KW Nickerson. 1996. The *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin binds biotin-containing proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2932-2939

36. Du, C., Martin, PAW. y KW. Nickerson. 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystal. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3847-3853
37. English, L. y S. slatin. 1992. Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. Insect. Biochem. Molec. Biol. 22: 1-7
38. Enioutina, YE. Visic, D. AD. Raymond. 2002. The induction of systemic and mucosal immune responses to antigen-adyuvant compositions administered into the skin: alterations in the migratory properties of dendritic cells appears to be important for stimulating mucosal immunity. Vaccine 18: 2753-2767.
39. Flatau, GE., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorenti, C. y P. Boquet. 1997. Toxi-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. Nature. 387: 729-733.
40. Flores, H., Soberón, X., Sánchez, J., A. Bravo. 1997. Isolated domain II and III from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. FEBS Lett. 414: 313-318.
41. Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luff, JR., Pangborn, W., y L. English. 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta endotoxin Cry3Bb of *Bacillus thuringiensis*. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 57: 1101-1109.
42. Gaupp, S., Hartung, HP., Toyka, K., S. Jung. 1997. Modulation of experimental autoimmune neuritis in Lewis rats by oral application of myelin antigens. J. Neuroimmunol. 79: 129-137.
43. Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, MS. y Y. Shai. 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore forming domain of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin are consistent with an umbrella-like structure of the pore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 12209-12294.
44. Ge, AZ., Pfister MR. y DH. Dean. 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. Gene, 93: 49-54.
45. Ge, AZ., Rivers, D., Milne R. y DH. Dean. 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. J. Biol. Chem. 266: 17954-17958.
46. Gill, SS., Cowlest, EA. y V. Francis. 1995. Identification, isolation and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem. 270: 27277-27282.

47. Gómez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., M. Soberón. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Lett. 513: 242-246.
48. Gómez, I., Dean, DH., Bravo, A., y M. Soberón. 2003. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Specificity: Two structural Determinants in the *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor Interact with Loops α -8 y 2 in Domain II of Cry1Ab toxin. Biochem.423: 10482-10489
49. Guerrero, GG., Dean DH., y L. Moreno-Fierros. 2004. Structural implications of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. Mol. Immunol. 41: 1177-1183
50. Greenfield, L., Bjorn, MJ., Horn, G., Fong, D., Buck, GA., Collier, RJ., DA. Kaplan. 1983. Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 80: 6853-6857
51. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Putsztai-Carey, M., Schwartz, JL., Brousseau, R. y M. Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol. 254: 447- 464
52. Guidry, JJ., Cardenas, L., Chueng, E. y JD. Clements. 1997. Role of receptor binding in toxicity, immunogenicity, and adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Infect. Immun. 65: 4343-4350.
53. Hansen, BM. y S. Salamitou. 2000. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In Entomopathogenic Bacteria; from Laboratory to Field Application (Cahrls, J. y col., eds.). pp. 41-64, Kluwer Academic Publishers.
54. Herrick, CA., McLeod, H., Glusac, E., Tigelaar, RE. y K. Bottomly. 2000. Th2 responses induced by epicutaneous versus inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. J. Clin. Invest. 105: 765-775.
55. Höfte, H. y HR. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol., Rev. 53: 242-255
56. Holmes, KC. y RE, Monro. 1965. Studies on the structure of parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. J. Mol. Biol. 14: 572-581
57. Hopp, TP. y KR, Woods. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 3824-3828
58. Ito, Y., Kawamura, I., Kohda, Ch., Baba, H., Nomura, T., Kimoto, T., Watanabe, I. y M. Mitsuyana. 2003. Seeligeriolysin O, a Cholesterol-Dependent Cytolysin of *Listeria seeligeri*, induces Gamma Interferon from Spleen Cells of Mice. Infect. Immun. 71: 234-241

60. Kaiser, ET., y FJ, Kézdy. 1983. Secondary structure of proteins and peptides in amphiphilic environment . (A review). Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 1157-1143
61. Kido, S., Doi, Y., Kim, F., Morishita, E., Narita, H., Kanaya, S., Ohkubo, T., Nishikawa, K., Yao, T. y T. Oi. 1995. Characterization of vitelline membrane outer layer protein I, VMO-I: amino acid sequence and structural stability. J. Biochem. (Tokyo). 117: 1183-1191.
62. Kim, N., Cheng, KC., Kwon, SS., Mora, R., Barbieri, M., TJ. Yoo. 2001. Oral administration of collagen conjugated with cholera toxin induces tolerance to type II collagen and suppresses chondritis in an animal model of autoimmune ear disease. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 110: 646-654.
63. Knight, P., Crickmore, N. y DJ. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol. Microbiol. 11: 429-436.
64. Kyte, J., RF, Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol. 157: 105-132.
65. Knowles, BH., WE Thomas. y DJ Ellar. 1984. Lectin like binding of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. FEBS Lett. 168: 197-202
66. Knowles, BH. y DJ. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with different insect specificity. Biochem. Biophys. Acta. 924: 509-514
67. Knowles, BH., Knight, PJK y DJ. Ellar. 1991. N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognize an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Proc. R. Soc. Lond B. 245: 31-35.
68. Kurosaka, A., Yano, A., Itoh, N., Kuroda, T., Nakagawa y T. Kawasaki. 1991. The structure of a new specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by anti-horseradish peroxidase serum. J. Biol. Chem. 266: 4168-4172
69. Laemmli, WK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the Bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685
70. Lavelle, EC., Grant, G., Pusztai, A., Pfuller, U., DT. O'Hagan. 2000. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. Immunology. 99: 30-37
71. Lavelle, Ec., Andrew, J., McNeela, E., Armstrong, ME., Higgins, SC., Leavy, O., y KHG. Mills. 2004. Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent. J. Leuc. Biol. 75: 756-763.

72. Lee, MK., Young, BA. y DH. Dean. 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 306-312.
73. Lee, MK., You, TH., Young, BA., Cotrill, JA., Valatais, PA. y DH Dean. 1996. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2895-2849.
74. Lee, X., Thompson, A., Zhang, Z., Ton-that, H., Biesterfeldt, J., Ogata, C., Xu, L., Johnston, R.A. y NM. Young. 1998. Structure of the complex of *Maclura pomifera* agglutinin and the T-antigen disaccharide, Gal β ,3GalNAc. *J. Biol. Chem.* 273: 6312-6318
75. Li, J., Carroll, J. y DJ. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* 353: 815-821
76. Li, J., Koni, PA. y DJ. Ellar. 1996. Structure of mosquitoicidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* 257: 129-152.
77. Li, H., Liera, H. y RA. Mariuzza. 1998. Structure-functions studies of T-cell receptor-superantigen interactions. *Immunol. Rev.* 163: 177-186.
78. Licke, N., Tsuji, T., Holmgren, J. 1992. The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile toxin is linked to their ADP-ribosyl transferase activity. *Eur. J. Immunol.* 22: 2277-2281.
79. Lis, H. y N. Sharon. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98: 637-674.
80. Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., L. wyns. 1998. Legume lectin structure. 1383: 9-36
81. Luo, K., Sangadala, S., Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R. y M. Adang. 1997. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as receptor by mediating specific *Bacillus thuringiensis* CryIAa δ -endotoxin binding and pore formation. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 27: 735-743.
82. Margalit, H., Spouge, JL., Cornette, JL., Cease, KB., Delisi, CH., y JA. Berzofsky. 1987. Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immunol.* 138: 2213-2229
83. Marinaro, M., Staats, HF., Hiroi, T., Jackson, RJ., Coste, M., Boyaka, PM., Okahshi, NY., Yamamoto, M., Kiyono, H., H, Bluethmann. 1995. Mucosal adjuvant effect of

- cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *J. Immunol.* 155: 4621-4629
84. Marinaro, M., Di Tomasso, A., Uzzau, S., Fasano, A., y MT. De Magistris. 1999. Zonula Ocludens Toxins Is a powerful Mucosal Adjuvant for Intranasally Delivered Antigens. *Infec. Immun.* 67: 1287-1291.
 85. McClintock, JT., Schaffer, CR. y RD. Sjobland. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45: 95-105
 86. McGuirk, P. y KHG. Mills. 2002. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends. in Immunol.* 23: 450-455.
 87. Moreno-Fierros, L., Reséndiz-Albor, AA. y López-Revilla. 1999. Different amebic antibody isotype patterns in the large and small intestine after local and systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed trophozoites. *Life. Sci.* 64: 1079-1089
 88. Moreno-Fierros, L., García, N., Gutiérrez, NR., Neri-Bazán, L., López-Revilla, R. y R. Vazquez-Padrón. 2000. Intranasal, rectal, and intraperitoneal immunization with protoxin CryIAc from *Bacillus thuringiensis* induces serum, vaginal and pulmonary responses in Balb/c mice. *Microbes and Infection* 2: 1-6
 89. Moreno-Fierros, L., Ruíz-Medina, EJ., Esquivel, R., López-Revilla, R., ET. S. Piña-Cruz. 2003. Intranasal CryIAc protoxin is an effective mucosal and systemic Carrier and Adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in Mice. *Scand. J. Immunol.* 57: 45-55.
 90. Morse, RJ., Yamamoto, T. y RM Stroud. 2001. Structure of Cry2Aa suggest an unexpected receptor binding epitope. *Structure.* 9: 409-417.
 91. Mau, SW., Zhao, DL., Yin, ZQ. Mukherjee, R., Singh, B., Qin, HY., Stiller, CR, AM. Jeniker. 1997. Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to unduce oral immune tolerance. *Nat. Med.* 3, 793-796.
 92. Nagamatsu, Y., Koike, T., Sasuki, K., Yoshimoto, AA., Y. Furukawa. 1999. The Cadherin-like family protein is essential for the specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett.* 460: 385-390.
 93. Nashar, OT., Webb, HM., Eaglestone, S., Williams, AN. y T. Hirst. 1996. Potent immunogenicity of the B subunits of *Escherichia coli* heat -labile enterotoxin: Receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 226-230.

94. Okano, M., Satoskar, AR., Nishizaki, K. y DA Harn Jr. 2001. Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J. Immunol.* 167: 442-450
95. Parker, MW. y P. Pattus. 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem Sci.* 18: 391-395
96. Parker, JMR., Guo, D. y RS. Hodges. 1986. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochem.* 25: 5425-5432
97. Parra, M., Hui, G., Jonson, HA., Berzofsky, JA., Roberts, T., Quakyi, IA. Y DW Taylor. 2000. Characterization of Conserved T- and B-Cell Epitopes in *Plasmodium falciparum* Major Merozoite Surface Protein 1. *Infect and Imm.* 68: 2685-2691
98. Peréyra-Alfárez, B., Bravo, A., Quintero, R. y X. Soberón. 1992. The δ -endotoxin protein family displays a hydrophobic motif that might be implicated in toxicity. *Mol. Microbiol.* 6: 2095-2098
99. Prasad, S. y Shethna, Y. 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* subsp. *thuringiensis*. 62: 517-523.
100. Prasad, S. y Shethna, Y. 1976. Mode of action of a purified antitumor protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida ascites sarcoma cells. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 10: 293-298.
101. Rappuoli, R. y M. Pizza. Structure and evolutionary aspects of ADP-ribosylating toxins. 1991. In *Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. J. Alouf and J. Freer, editors. Academic Press Ltd., London. 1-20.
102. Rappuoli, R. y C. Montecucco (ed). 1997. *Guidebook to Protein Toxins and their Use in Cell biology*. Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
103. Rajamohan, F., Citrill, JA., Gould, F. y DH Dean. 1996. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 271: 2390-2396
104. Raussell, C., Garcia-Robles, I., Sanchez, J., Muñoz Garay, C., Martinez-Ramirez, AC., Real, MD. A. Bravo. 2004. Role of the toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxin in membrane of *Leptinotarsa decemlineata*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1660 : 99-105.

105. Rosa, J.C., DeOliveira, P.S.L., Garrat, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M.C. y L.J. Greene. 1999. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the β -prism fold. *Protein Sci.* 8: 13-24
106. Ryan, E.J., Daly, L.M. y KHG. Mills. 2001. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trend in Biotech.* 19: 293-304.
107. Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Luthy, P. y M. Wolfersberger. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺ gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett.* 204: 213-218.
108. Sangadala, S., Walters, F.W., English, L.H. y M.J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAc toxin binding and ⁸⁶Rb⁺-K⁺ efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 269: 10088-10092.
109. Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A. y Mamannamana Vijayan. 1996. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moraceae* plant lectin with a β -prism fold. *Nat. Structural Biol.* 3: 596-603
110. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. y D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 : 775-806.
111. Schiavo, G.B., Poulain, O., Rossetto, F., Benfenati, L., Taun y C. Montecucco. 1999. Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *EMBO J.* 11: 3577-3583.
112. Shevach, E.M. 2002. CD4+CD25+suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 389-400.
113. Shimizu, T. y K. Morikawa. 1996. The β -prism: a new folding motif. *TIBS.* 21: 3-6
114. Shirota, H., Sano, K., Hirasawa, N., Terui, T., Ohuchi, K., Hattori, T., G. Tamura. 2002. B cells capturing antigen conjugated with CpG oligonucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J. Immunol.* 169: 787-794
115. Slatin, S.L., Abraham, C.K. y L. English. 1990. Delta endotoxins from cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 765-772.
116. Strobel, S. y A.I. Mowat. 1998. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today.* 19: 173-181

117. Sun, JB. Holmgren, J., C. Czerkinsky. 1994. Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10795-10799.
118. Sun, JB., Rask, C., Olsson, T., Holmgren, J., C. Czerkinsky. 1996. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 7196-7201.
119. Sun, JB., Li, BL., Czerinsky, C., J. Holmgren. 2000. Enhanced immunological tolerance against allograft rejection by oral administration of allogeneic antigen linked to cholera toxin B subunit. *Clin. Immunol.* 97: 130-139.
120. Takata, S., Ohtani, O. y Y. Watanabe. 2000. Lectin binding patterns in rat nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and the influence of various types of lectin on particles uptake in NALT. *Arch. Histol. Cytol.* 63: 305
121. Tsuda, Y., Nakatani, F., Hashimoto, K., Ikawa, S., Matura, Ch., Fukada, T., Sugimoto, K. y M. Himeno. 2003. Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins on mammalian cells transfected with Cadherin-like receptor gene of *Bombyx mori* (silkworm). *Biochem. J.* 369: 697-703.
122. van Rie, JS., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. y H. VanMelleart. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1378-1385
123. Vázquez-Padrón, RI., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., de la Riva, GA. y López-Revilla, R. 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 49: 578:584.
124. Vázquez-Padrón, RI., González-Cabrera, J., Garcia Tovar, C., Neri-Bazán, L., Hernandez, M., Moreno-Fierros, L., R. Lopez-Revilla, GA. de la Riva. 2000. Cry1Ac Protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD 73 Binds to Surface Proteins in the Mouse Small Intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 54-58
125. von Heijne, G. 1992. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive inside rule. *J.Mol. Biol.* 225: 487-494.
126. Welling, GW., Weijer, WI., van der See, R., S. Welling-Wester. 1985. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* 188: 215-218
127. Williams, NA. Hirst, TR., TO. Nashar. 1999. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Trends in Genetics.* 20: 95-101.
128. Wu, SJ. y DH Dean. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain I of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* 255: 628-640

129. Yamashita, S., Akao, T., Misuki, E., Saitoh, H., Higuchi, K., Park, YS., Kim, H., y M. Ohba. 2000. Characterization of the anti-cancer parasporal proteins of *Bacillus thuringiensis* isolate. *Can. J. Microbiol.* 46: 913-919.
130. Yura, M., Takahashi, I., Terawaki, S., Hirió, T., Quejón, MN., Yuki, Y., H. Kiyono. 2001. Nasal administration of cholera toxin (CT) suppresses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis /EAE). *Vaccine.* 20: 134-139.

VII. ANEXO METODOLOGICO

Organismos y Condiciones de Cultivo.

La cepa de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se creció en medio de esporulación HCT con eritromicina (7.5 µg/ml): 5 g/l de bactotripton, 2 g/l de casaaminoácidos, 50 ml/l de solución I (6.8 g en 100 ml de KH₂PO₄); 1 ml /l de solución II(1.23 g de MgSO₄7H₂O, 0.02 g de MnSO₄H₂O y 0.14 g de ZnSO₄7H₂O); 10 ml/l de solución III (0.2 g de Fe(SO₄)7H₂O, 10 ml de H₂SO₄ (stock 1 N); 10 ml/l de solución IV (1.5 g de CaCl₂); y 33 ml/l de glucosa al 10%. La cepa de *E. coli* se creció en medio terrific broth (TB) con ampicilina (100 mg/ml) a 37°C.

Construcción de Mutantes.

Los genes silvestres *cryIAc*, *cryIAb* y *cryIAa* clonados en el vector pKS(+/-) se usaron para construir las proteínas quiméricas de CryIAc, CryIAa y CryIAb. La mutagénesis sitio dirigida de cada uno de los genes se llevó al cabo usando el kit de mutagénesis sitio dirigida de doble cadena Camaleón (Stratagene, Heidelberg, Alemania). Los primeros mutagénicos usados para la construcción de las proteínas CryIA quiméricas que contienen la secuencia -

CryIAa: 5' AGA AGA GAA TTA ACA CTA ATT TCG TCG GAT TCC ATA
GGC GTT CTT TCA ACC TAT GAT AGT AGA 3'

CryIAb: 5' AGA AGA GAA TTA ACA CTA ATT TCG TCG GAT TCC ATA
GGC GTT CTT CCG AAC TAT GAT AGT AGA 3'

CryIAc: 5' AGA AGA GAA TTA ACA CTA ATT TCG TCG GAT TCC ATA
GGC GTT CTT CGG AAT TAT GAT AGT AGA 3'

del motivo del fragmento B de la toxina diftérica. Brevemente, el DNA plasmídico blanco de doble cadena se desnaturalizó por calor, y los dos oligonucleótidos se pegaron simultáneamente a una de las dobles cadenas. Uno de los primeros, el de selección, cambia un sitio de restricción no esencial a un nuevo sitio de restricción, mientras que otro primero codifica para una mutación específica en una secuencia definida del gene de interés

insertado en el plásmido. Los dos primeros se extienden alrededor del plásmido usando una mezcla de nucleótidos y una mezcla de enzima que contiene T7 DNA polimerasa y T4 DNA ligasa. La nueva cadena contiene ahora la mutación deseada pero ya no contiene más el sitio único de restricción. Posteriormente se digiere el DNA plasmídico con la enzima de restricción que corresponde al sitio no esencial presente en el plásmido parenteral sin mutar, mientras que el plásmido mutado permanece sin digerir. Finalmente, el DNA extendido y digerido es entonces transformado en las células competentes de *E. Coli* XlmutS. Debido a que la eficiencia de transformación de los plásmidos circulares es exponencialmente más grande con respecto a los plásmidos lineales, las mutantes son favorecidas. Las clonas mutantes se checaron por análisis de restricción del DNA basado en la presencia de un sitio *Hin*I en el primero mutagénico y por secuenciación. El vector que lleva el gene mutado se movilizó a la cepa de *E. Coli* DH5 α .

INMUNOGENOS

Proteínas silvestres.

Las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry3A se purificaron por separado a partir de un cultivo esporulado de 72 h de la cepa de *Bacillus thuringiensis* HD73. Las pastillas celulares recuperadas por centrifugación (10000 rpm/10 min /12°C) se lavaron una vez con agua bidestilada filtrada y estéril más inhibidor de proteasa (EDTA 5 mM) y ZnCl₂ 5 mM. Posteriormente, se lavaron tres veces con la solución I (agua, tritón X 100 al 2% e inhibidor de proteasas), centrifugando cada vez a 10000 rpm/10 min/12°C. Finalmente se lavó la pastilla (2 a 3 veces) con la solución II (agua, NaCl 0.5 M e inhibidor de proteasas) y se centrifugó cada vez a 10000 rpm/10 min/12°C. La pastilla recuperada constituye una fracción enriquecida de cristal (protoxina). Los cristales se obtuvieron por solubilización de la fracción enriquecida en amortiguador carbonato a pH 10.5 con ditioneitol (DTT). El sobrenadante (protoxina soluble) se recupera por centrifugación a 10000 rpm/20 min/12°C. Las proteínas solubles se checaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (Laemmli UK. 1970). La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford.

Proteínas Quiméricas.

Las candidatas con la mutación deseada se expresaron en la cepa de *E. Coli* DH5 α . Cultivos de esta cepa se realizaron en medio terrific broth con ampicilina (100 mg/ml) a 37°C por 48 hs. La purificación de las inclusiones proteicas se realizó de acuerdo al método descrito por Ge y col., 1990. Brevemente, el método consiste primero en lisar las células con Búfer I (Tris 50 mM a pH 8.0, EDTA 5mM, Sacarosa al 15% y lisozima 200 μ g/ml), incubación a 37°C por 1 h, seguido por sonicación en hielo (sonicador Fisher Desmembranador Modelo 300, ciclos de 3 x 5 min, con punta grande). La suspensión se centrifugo por 10 min a 10000 rpm, desechando el sobrenadante. La pastilla (inclusiones) se lava dos veces con NaCl 0.5M con Triton X-100 al 2%. M), centrifugando cada vez como en el paso anterior y manteniendo el tubo en hielo. Finalmente, la pastilla se lava dos veces con Búfer de III (NaCl 0.5 M). Las inclusiones proteicas se solubilizan en amortiguador carbonato 0.1 M con DTT 0.010 M, a pH 9.5 por 1 h a 37°C. La activación de la toxina se realizó por digestión con tripsina (stock 10 mg/ml) en una proporción 1:20 (w/w) por 1 h a 37°C. La reacción se detuvo con PMSF. El contenido de lipopolisacárido (endotoxina) de las preparaciones se probaron con el kit Limulus ameobocyte lipato) (LAL) (Sigma-Aldrich. Co) con un rango de detección de 0.001 a 0.005 EU/ml. La determinación de proteína se realizó usando el método de Bradford. La solubilización y digestión de la protoxinas Cry1A y Cry3A se confirmaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes, y se tiñeron con azul de Coomassie.

Purificación de las Proteínas Cry silvestres y quiméricas.

La protoxina y toxina activada se purificaron a través de una cromatografía de exclusión molecular usando un gel de Sephadex G-200. Las proteínas se eluyeron de una columna de Sephadex 200 en amortiguador buffer carbonato 0.05 M, NaCl 0.4M (para la protoxina) a pH 9.5 y en Búfer carbonato 0.05M (para la toxina) pH 9.5. Las fracciones eluidas de la columna se checaron con electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se tiñeron con azul de Coomassie.

Animales.

Machos Balb/c de 8 a 10 semanas se adquirieron de la compañía Harlan, Indianápolis, EUA.

Inmunizaciones.

Ratones de 8-10 semanas de ratones Balb/c se inmunizaron por vía intraperitoneal (i.p.) con 50 µg de Cry1Ab, Cry1Ac y Cry3A disuelta en 0.1 ml de fosfato salino estéril (PBS) y por vía intranasal (i.n.) en 25-30 µl de PBS. Cada grupo experimental consistió de 5 animales a los cuales se le aplicaron tres dosis en los días 0, 7 y 14; los ratones control recibieron tres dosis de 100 µl de PBS y 0.026-0.030 µl de PBS respectivamente (i.p. e i.n.) De manera similar ratones machos Balb/c de 8 a 10 semanas se inmunizaron con las protoxinas Cry1Ac, pCry1Aa, toxinas Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab y las proteínas quiméricas, Cry1Ac3, Cry1Aa8 y Cry1Ab2 por vía i.p. e i.n. respectivamente. Las protoxinas y toxinas se obtuvieron como se describió en párrafos anteriores. 50 µg de cada una de estas proteínas se administraron por vía i.p. en PBS mientras que por vía i.n. se administraron en un volumen de 15 a 20 µl durante tres semanas.

Recolección de muestras

La sangre, y los lavados intestinales y traqueopulmonar se colectaron a la cuarta semana después de la tercera inmunización. Las muestras de suero se obtuvieron de la sangre extraída por punción cardíaca de los ratones anestesiados con éter. El suero se obtuvo por centrifugación a 2000 rpm por 10 min a 4°C. Los lavados intestinales y traqueopulmonar se clarificaron por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos y se guardaron a -70°C hasta su uso. Los fluidos del intestino delgado y grueso se colectaron de acuerdo a como se describió por Moreno-Fierros y col., 1999. Los contenidos de intestino delgado se lavaron con 5 ml del medio frío RPMI y los de intestino grueso con 3 ml del mismo medio; se adicionó inmediatamente a cada uno de los lavados el inhibidor PHMB (p-hidroximercuribenzoato) a una concentración de 100 mM en Tris 150 mM. Para recolectar el fluido traqueopulmonar, la tráquea y los pulmones se escindieron en "toto" y se lavaron a través con medio frío RPMI-1640 para eliminar la sangre contaminante; 1 ml de medio frío se lavó por la tráquea hasta que transudó por los pulmones y entonces se colectó en una caja de Petri estéril de 5 ml. Cada uno de los lavados obtenidos de los fluidos intestinales y

traqueopulmonares se centrifugaron por 10 min a 8000 g a 4°C y los sobrenadantes se congelaron y se almacenaron a -40°C.

ELISAS

La detección de anticuerpos específicos anti-Cry en suero, fluidos intestinales y traqueopulmonares se realizó mediante ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA). Brevemente, placas de 96 pozos se recubrieron con 100 µl de Cry1Ab, Cry1Ac y Cry3A (10 µg/ml) en amortiguador de carbonato 0.1 M, a pH 9.6. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C y se lavaron (una vez) con 0.05% de PBS Tween 20 (PBST). Los sitios inespecíficos se bloquearon con leche Svelty al 3% en PBST y se incubaron por tres horas a temperatura ambiente ó 1 h a 37°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBST cada uno con intervalos de 5 minutos. La dilución seriada de las muestras de suero se hizo con leche al 1% en PBST. El lavado de intestino delgado y grueso respectivamente se diluyeron 1:2 con leche al 6% en PBST. El lavado traqueopulmonar se diluyó en PBST y se agregaron 100 µl de cada una de las muestras por pozo. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C, se lavaron tres veces (intervalos de 5 min) con PBST y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-ratón chivo marcado con peroxidasa) anti-IgG, anti-IgM ó anti-IgA. Las placas se lavaron con PBST y el revelado se llevó a cabo por adición de 100 µl de la solución del sustrato, ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzthioline-6-acido sulfónico) (Sigma, Aldrich, Co.) más H₂O₂. La reacción se detuvo a los 15 minutos por adición de 100 µl de SDS al 10%. Después del desarrollo del color, la densidad óptica se midió a 405 nm en un lector de ELISA Multiskan MCC/340.y se graficaron los valores medios de las absorbancias y las desviaciones estándar (±) para cada grupo experimental (n= 5).

De manera similar, la detección de los anticuerpos específicos anti-Cry y anti-toxina diftérica en suero, lavados traqueopulmonar e intestinal inducidos por las toxinas mutantes se realizó mediante ensayo indirecto ELISA. Brevemente, cada una de las toxinas Cry mutantes se diluyeron por separado en amortiguador carbonato a 0.1 M pH 9.6 a una concentración de 1 (µg/ml) y se dispensaron 100 ml en cada pozo de las placas de 96 pozos. Siguiendo la incubación toda la noche a 4°C, las placas se lavaron una vez con PBSTween al 0.05% y se bloquearon con leche svelty al 3% por 3 h a temperatura

ambiente. Después se lavaron tres veces con PBSTween al 0.05% . El suero y los fluidos de las mucosas se diluyeron en leche/PBSTween 0.05% al 1% y 6% respectivamente y se adicionaron a pozos por duplicado. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C seguido por lavado con PBSTween 0.05% (3 veces). Los conjugados anti-ratón acoplados a peroxidasa IgG, IgA e IgM se diluyeron en PBSTween 0.05% 1: 5000, 1: 1000 y 1:250 y 1:100 respectivamente. Las placas se incubaron por 2 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBSTween al 0.05% y se revelaron similarmente usando ABTS como sustrato. Las subclases de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2A inducidos por administración i.p. e i.n. de cada una de las protoxinas, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac así como de las respectivas toxinas Cry1A se detectaron en suero y en fluidos de la mucosas de manera similar a como describió en párrafos anteriores

ELISA COMPETITIVO.

Placas de 96 pozos se recubrieron con 100 µl de la protoxina Cry1Aa y la pCry3A a una concentración final de 10 µg/ml en Búfer de carbonato 0.1 M a pH 9.6. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Después de este tiempo se lavaron con 0.05% de PBS Tween 20 (PBST). Los sitios inespecíficos se bloquearon con leche al 3% en Búfer PBST por 3 h a temperatura ambiente. Posterior a este tiempo, las placas se lavaron con el Búfer PBST para eliminar el exceso de leche. Previo a la incubación con el primer anticuerpo, se realizó primero una mezcla en un volumen final de 100 µl de concentraciones crecientes del competidor (toxinas silvestres Cry1A y la toxina silvestre Cry3A) con el antisuero antiprotoxina (Okano y col., 1999). Esta mezcla de reacción se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Cada una de las mezclas se adicionaron a la placa correspondiente. La placa se incubó por 2 h a 37°C, y se lavó con PBST. Finalmente se incubó con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa anti-IgG y anti-IgM. Se reveló la reacción por adición de la solución de sustrato ABTS + H₂O₂. La absorbencia se midió a 405 nm en un lector de ELISA Multiskan MCC /340.

Por otro lado, placas de 96 pozos también se recubrieron con 1 microgramo de TD (toxina diftérica) (Sigma-Aldrich, Co.) (Reconstituida con agua bidestilada filtrada y estéril) por pozo y por duplicado. Se incubaron toda la noche a 4°C. Después se incubaron con leche al 1% en PBS-Tween 0.05% por 3 h a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS-

Tween al 0.05%. Tiempo después se incubó con una mezcla de antisuero mas concentraciones crecientes del competidor (toxinas silvestres, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac) por 2 h a 37°C. Posterior a este tiempo se lavó con PBS-Tween al 0.05% y se incubó con el conjugado anti-ratón IgG e IgM en diluciones con PBS-Tween al 0.05% 1:100 y 1:250 respectivamente. Después de lavar con PBSTween al 0.05% se reveló con el substrato ABTS + H₂O₂. El desarrollo del color se midió a 405 nm. Los resultados para cada grupo experimental (n= 5) se presentaron como el promedio de la OD a 405 nm más la desviación estándar (\pm).

Cultivo de células y determinación de citocinas.

Ratones Balb/c se sacrificaron una semana después de inmunización i.n. Se preparó la suspensión celular única de bazo de ratones BALB/c control así como de ratones presensibilizados por vía i.n. Se cultivaron a 2×10^6 células por ml en 3 ml de medio RPMI 1640 (GIBCO BRL) en placas de ocho pozos, y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂. El medio de cultivo consiste de medio RPMI 1640, complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 2mM L-glutamina, 10 mM de HEPES, 100 U de penicilina G por ml, 100 μ g de estreptomina por ml, y 0.05 mM de 2 mercaptoetanol. Los cultivos se establecieron en presencia o ausencia de antígeno. Similarmente se tomaron volúmenes de 0.5 ml del medio de cultivo a los tiempos deseados para el análisis de la producción de citocinas y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Los niveles de interleucina 10 (IL10), interleucina 12, (IL12), interleucina 4, (IL-4) e interferón gamma (IFN- γ) liberados al medio de cultivo se cuantificaron usando el ensayo inmunoenzimático ELISA (BD Bioscience) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. Las concentraciones de las muestras se calcularon usando una curva estándar, usando la concentración de la citocina recombinante como estándar.

Citometría de flujo.

La suspensión celular única se aisló de bazos ocho días después de la sensibilización por vía i.n. y estimuladas con los diferentes Ag, solo con medio, con Cry1Aa, Cry1Ac y Cry1Aa8, a 10 µg/ml por 4 h, incubadas a 37°C en 5% de CO₂. Las células estimuladas se lavaron con Búfer de fosfato frío conteniendo 3% de suero fetal bovino (SFB) y 0.05% de azida de sodio (Búfer de tinción). Aproximadamente 1×10^6 células se marcaron con 0.1 µg con anti-CD4 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-B220+ -FITC, y CD69+ marcado con ficoeritrina (PE), y los controles de isotipo (Pharmingén) en un volumen total de 100 µl de Búfer de tinción. Posteriormente las células se lavaron con Búfer de tinción en frío conteniendo 0.05% de azida de sodio. El análisis de citometría de flujo se llevo al cabo usando el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Las células muertas se excluyeron del análisis usando tinción con yoduro de propidio (Molecular Probes, Eugene, OR). La población de linfocitos se seleccionó usando los parámetros, “forward” y “side scatter” y al menos 10,000 eventos se adquirieron y analizaron. Los números se calcularon en contra de controles de tinción relevantes.

Cálculos

Los datos en las gráficas son los valores promedio de la densidad óptica a 405 nm. Las barras representan los niveles medios de anticuerpos y la \pm SD para cada grupo experimental (n=5) a 405 nm. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de anticuerpos entre grupos experimentales independientes se calcularon usando la prueba de ANOVA.

VIII. APÉNDICE

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Apéndice 1: Implicación estructural de la respuesta inmune inducida por las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* en ratones BALB/c: Papel de la región N-terminal



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Molecular Immunology 41 (2004) 1177–1183

Molecular
Immunology

www.elsevier.com/locate/molimm

Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins: role of the N-terminal region

Gloria Guillermina Guerrero^{a,*}, Donald H. Dean^b, Leticia Moreno-Fierros^a

^a FES-IZTACALA, Universidad Nacional Autónoma de México, Biomedicine Av de los Barrios s/n Col.

Los Reyes Iztacala 54090 Tlanepantla, Edo de México, Mexico

^b Department of Biochemistry, Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA

Received 27 April 2004

Available online 23 August 2004

Abstract

The potential role of the regions (carboxyl and amino) of the Cry proteins in the ability of these proteins to elicit strong immune responses was investigated. Intraperitoneal immunization of mice with the homologous Cry1A protoxins (130–133 kDa), with the long C-terminal half gave rise mostly to similar, strong serum and mucosal IgG and IgM antibody response but a lower induction of these Ab by intranasal route. Remarkably, Cry3A protoxin, devoid of C-terminal half was able to induce a significant mucosal IgG, and IgM Ab as well as Cry1A protoxins, suggesting us that immunogenic abilities are not restricted to C-terminal half but N-terminal half itself could be involved. In fact, this assumption was strengthened by the strong immunogenic abilities of the Cry1A toxins, specially IgG and IgA Ab induced by both routes in different mucosal sites. These data indicate that immunogenic abilities of the *Bt* Cry proteins reside and depends of the N-terminal half. © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cry proteins; *Bacillus thuringiensis*; immunogenicity; N-terminal region

1. Introduction

Bacillus thuringiensis is the source of the insecticidal crystal proteins (ICPs) (Höfte and Whiteley, 1989), formed during sporulation phase as protoxin crystalline inclusions (50–140 kDa) (reviewed by Schnepf et al., 1998). Upon ingestion by a susceptible insect, protoxins are solubilized and proteolytically processed from the C-terminal half releasing the toxic fragment of 60–70 kDa toxin (Höfte and Whiteley, 1989). The toxin binds to specific receptors localized in the midgut epithelium (Bravo et al., 1992; VanRie et al., 1990), leading to the disruption of the epithelial barrier, and larval death (Knowles, 1994; English and Slatin, 1992).

The Cry1 protoxins contain ~1175 amino acids and are composed of an NH₂-terminal toxic moiety and a COOH terminal region. N-terminal region (toxin region) is organized

in three domains as has been determined by X-ray crystallographic determination (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995; Galitsky et al., 2001). Domain I, is a bundle of seven α -helix, involved in pore formation. Domain II, formed by a three antiparallel β -sheet represents the most variable part in the structure between the Cry toxins (Sankaranarayanan et al., 1996; Shimizu and Morikawa, 1996) and Domain III, a β -sandwich of two antiparallel β -sheets. Domain II and III are involved in the receptor binding and as determinants of insect specificity (Burton et al., 1999). The β -sandwich region appear to be critical to the structural integrity of the toxin (Sankaranarayanan et al., 1996). Five highly conserved regions, mapping in the central position of each domain or connecting them, have been identified (Höfte and Whiteley, 1989). There is little doubt that these conserved motifs play an important in the biological function of these proteins, since toxins with different insect specificity (Cry1Aa versus Cry3A) share a similar conformation (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995). Previous studies with Cry1Ac protoxin have showed its strong immunogenic properties (Vázquez et al., 1999; Moreno-Fierros et al., 2000). The aim of this work, was to investigate the role of the regions (carboxyl and amino) in the immunogenic abilities of *Bt* Cry proteins. Our results show that the capacity to in-

Abbreviations: *Bt*, *Bacillus thuringiensis*; Ab, antibody; Ag, antigen; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate, polyacrylamide gel electrophoresis; TB, terrific broth; SEC, size exclusion chromatography; BSA, bovine serum albumin; pCry1A, and tCry1A, Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac protoxin and toxins, respectively

* Corresponding author. Tel.: +52-11-55-5623-12-91;

fax: +52-11-55-563-12-25.

E-mail address: gloriaguillermina@correo.unam.mx (G.G. Guerrero).

duce strong humoral Ab response of Cry1A proteins reside and depends of the N-terminal region through her unique structural characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Bovine serum albumin (BSA), dithiothreitol, β -mercaptoethanol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthioline-6-acido sulfonico) (ABTS), were obtained from Sigma–Aldrich (San Luis Missouri, USA). Sodium chloride (NaCl), sodium carbonate, sodium bicarbonate, sodium phosphate, were purchased from J.T. Baker Corp. (USA). Anti-mouse IgG, IgM and IgA peroxidase conjugate were purchased from Zymed (USA). All other reactives were of analytical purity.

2.2. Inclusion bodies purification

Escherichia coli strains harboring the *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* and *cry3A* genes were grown in terrific broth (TB) medium, supplemented with ampicillin (100 μ g/ml), at 37°C for 48 h. Inclusions bodies were purified as described previously (Ge et al., 1990). Purified inclusion bodies (protoxins) were solubilized in 50 mM Na₂CO₃, pH, 10.2, 10 mM DTT, at 37°C for 1 h, and activated with trypsin (1:20 w/w) for 1 h at 37°C (Burton et al., 1999).

2.3. Size exclusion chromatography

Size-exclusion chromatography (SEC) was performed to purify protoxin and toxin, using a HPLC system on a Superdex 200 10/60 and 10/30 column (all from Amersham-Pharmacia Biotech), either with 50 mM 0.1 M Na₂CO₃, 0.4 M NaCl, pH 9.5–10 (protoxins) or with 50 mM Na₂CO₃ pH 9.90 (toxins), at a flow rate of 0.5 ml/min, respectively. The proteins were detected by UV absorbance at 280 nm. Purified fractions of both proteins were examined by 10% SDS-PAGE and visualized by Coomassie reagent staining (Pierce, USA). The protein concentration was quantified using Coomassie protein assay reagent (Pierce, USA). The lipopolysaccharide (endotoxin) content of preparations was determined, and none was detected after fractions that contained protoxin or toxin, were passed through a column containing agarose immobilized polymyxin B (Bio-Rad, USA) and tested with the *Limulus ameobocyte* lysate kit (Sigma, Aldrich, Co. San Louis Missouri, USA).

2.4. Animals, sample collection and immunization protocol

Eight to ten weeks old male Balb/c mice were purchased from Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, USA). Antibody responses were measured after intraperitoneal (i.p.)

(100 μ l) and intranasal (i.n.) immunization (20 μ l) of groups of five mice with 50 μ g of either Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac) protoxins (pCry1A), or with the respective Cry1A toxins (tCry1A), in 0.1 M carbonate buffer weekly during three occasions. The same protocol was followed with the Cry3A protoxin (pCry3A) and toxin. Control mice were given carbonate buffer. Blood, and mucosal fluids (trachea, small and large intestine) were collected 1 week after the third immunization as described by Moreno-Fierros et al. (1999).

2.5. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)

Microtiter plates (Nunc) were directly coated with either Cry1A and Cry3A protoxins or toxins at 1 μ g/ml in 0.1 M carbonate–bicarbonate Na₂CO₃–NaHCO₃ buffer, overnight at 4°C. Detection of Ag-specific Ab production by Cry proteins was made using secondary Ab consisting of 100 μ l of dilutions 1:12000, 1:5000, and 1:1000 in phosphate-buffered saline (PBS) (0.05% Tween 20) of biotinylated goat anti-mouse IgG, IgM and IgA specific Ab, added to the plates, respectively. Developed adding substrate solution were ABTS, 0.03% H₂O₂ 30% (Sigma). The optical density was read at 405 nm (OD₄₀₅) in an automated scan reader (Molecular Devices, Menlo, Park, CA).

Competitive ELISA for Ag-specific IgG was followed as described (Okano et al., 2001). Briefly, ELISA plates were coated with Cry1Aa protoxin overnight at 4°C. Serum samples were diluted 1:1000 and mixed with different doses of Cry1A toxins as inhibitors. After incubation with anti-IgG peroxidase conjugate, levels of bound Ab were determined by the addition of ABTS substrate and stopped by addition of acid or SDS as described above. Results are presented as the average OD at 405 nm.

2.6. Statistical analysis

Data of the antibody levels are expressed as the mean \pm S.D. for each subject group ($n = 5$). Statistical analysis was performed using ANOVA and Student's *t*-test for group analysis. Differences were considered statistically significant at the level of $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Highly homologous Cry1A protoxins elicited a similar IgG antibody response by systemic route but not by intranasal route

Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac protoxins, expressed and produced at levels similar to those reported elsewhere (Ge et al., 1990; Bulla et al., 1981) were of the standard 133 kDa size (Fig. 1A). Intraperitoneal immunization of mice with each of these pCry1A, resulted mostly in a strong and similar

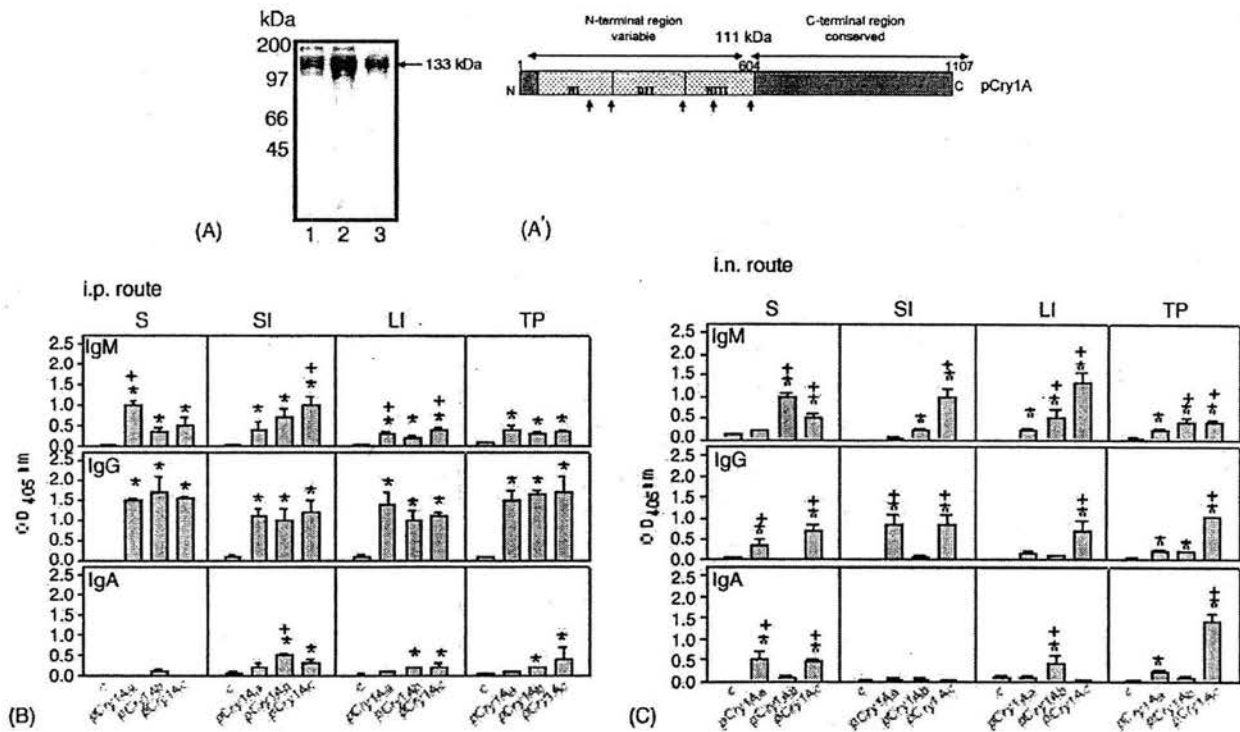


Fig. 1. (A) Coomassie stained SDS-10% PAGE showing the purified Cry1A protoxins. Lanes 1, pCry1Aa; 2, pCry1Ab; 3, pCry1Ac. Molecular mass markers position are indicated to the left. (A') Schematic representation of the structural organization of the Cry1 protoxins. N-terminal region formed (dotted gray) by three domains, and C-terminal half (dark gray). The remainder of the protoxin, consisting of the short fragment (~20–40 amino acids) (dark gray), preceding the first domain and the C-terminal part following the third domain, are digested away by gut proteases during the activation process. The numbers above the scheme refer to the amino acid position. Domain I start at aminoacid 33. N and C, refer to the N- or C-terminal half of Cry1A protoxins, respectively. Arrows indicate the position of the five conserved blocks in the N-terminal region. (B) Cry1A protoxins induces mostly IgG and IgM Ab responses by i.p. route detected in serum (S), small intestine (SI), large intestine (LI) and tracheo pulmonary fluids (TP). (C) By i.n. route, Cry1A protoxins induces a differential pattern of Ab. Levels of Ab were measured by indirect ELISA. Data are presented as the average of OD 405 nm \pm S.D. of five individual per group. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: (*) vs. control animals; (+) vs. between Cry1A protoxins.

IgG antibody (Ab) level in all the sites analyzed (systemic versus mucosal) (Fig. 1B), moderate IgM Ab, and two of the highly homologous protoxins, Cry1Ab and Cry1Ac induced a very small level of secretory IgA (SIgA) Ab in two different mucosal sites (detected in the small intestine and tracheo pulmonary fluids (TP)), respectively. Therefore, it can be considered that in general, pCry1A induce a high level of IgG Ab, moderate levels of IgM but are poor inducers of S-IgA Ab when administered by this route.

In contrast, by intranasal route, it was observed clearly a different behaviour of the highly homologous pCry1A. pCry1Aa induced serum and mucosal IgG Ab and a small level of serum IgA ($P < 0.05$). Unexpectedly, the Cry1Ab protoxin, was not able to induce any serum and mucosal IgG Ab response. It was able only to elicit a small level of IgM and SIgA ($P < 0.05$) (Fig. 1C). Interestingly, Cry1Ac protoxin induce mostly IgG Ab in all the sites analyzed, a significant level of S-IgA Ab in upperairways (detected in trachea fluids) and a small level of serum IgA ($P < 0.05$), suggesting us that differences in the immunogenic abilities of Cry1A protoxins, could be due to regionalization of the distribution of the APCs (peritoneal cavity versus nasal epithelium) (Banchereau and Steinman, 1998; de Becker et al.,

1994) or the binding molecules nasal versus gut (Takata et al., 2000; Balabanian, 2002); and could be reflecting the influence of the N-terminal half.

3.2. Cry3A protoxin shows similar immunogenic abilities than long C-terminal Cry1A protoxins administered by systemic and nasal routes

pCry3A (Fig. 2A, lane 1) was able to elicit mostly IgG and IgM when is administered by i.p. route similar to pCry1A. IgG Ab response was detected in serum in lower magnitude ($P < 0.05$) than pCry1A but higher in mucosal sites ($P < 0.05$) (Fig. 2B upper panel). IgM Ab response was high except those detected in the large intestine fluids ($P < 0.05$) (Fig. 2B, upper panel). Remarkably by nasal route, this protein was able to induce a similar level of serum IgA Ab response than Cry1Aa and Cry1Ac protoxins (Fig. 2B, middle panel), and similar S-IgA Ab in upperairways (detected in trachea fluids) than Cry1Ac protoxin. Thus, these data show that a protein without C-terminal half is able itself to induce significant IgG (i.p. route) and SIgA Ab responses (i.n. route). Surprisingly, activation of pCry3A by proteolytic removal of a small fragment (~57 aminoacids)

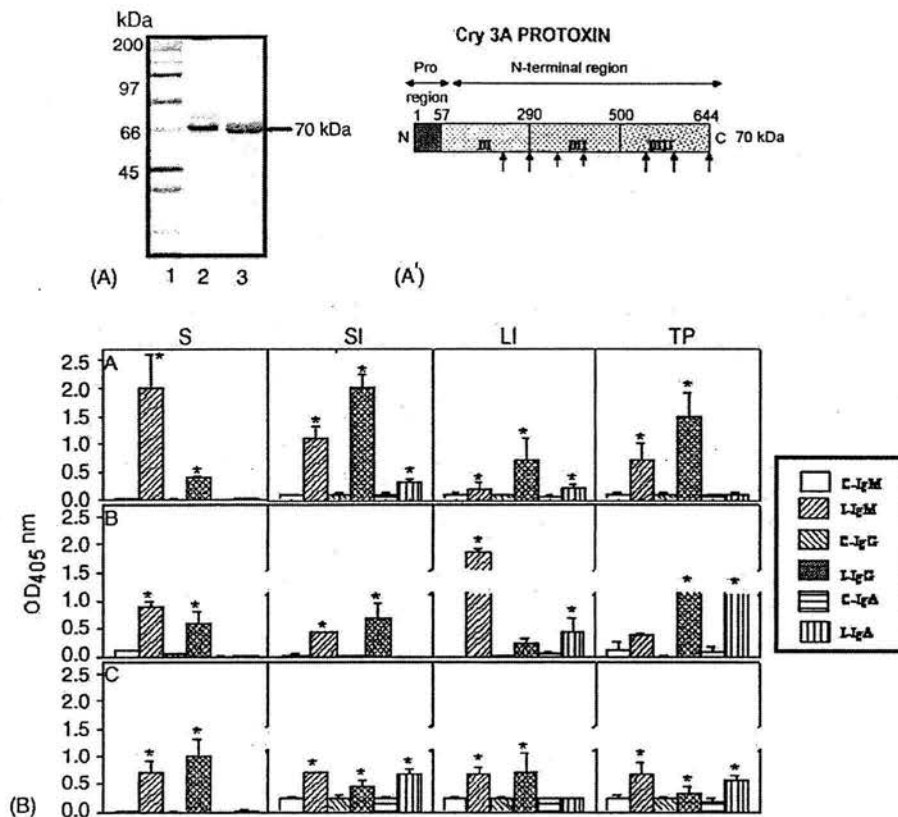


Fig. 2. (A) Coomassie stained SDS-10% PAGE showing the purified Cry3A protein. Lanes 1, molecular mass marker; 2, Cry3A protoxin; 3, Cry3A toxin. (A') Schematic primary structure of the three domain organization (domain I–III) of the Cry3A toxin; domain I involved in membrane insertion and pore formation (dotted blue), domain II (dotted red), and domain III (dotted dark blue), are involved in receptor recognition and binding. Black arrows indicate the position of the five conserved block. Red arrows, indicate binding receptor loops (loop 1 and 3) in domain II. A short fragment of 57 amino acids (dark gray) preceding the first domain, released after proteolytic digestion. (B) Upper panel (A), pCry3A induces significant IgG and IgM Ab responses with respect to control animals ($P < 0.05$), and similar to pCry1A administered by i.p. route, detected in serum (S), small intestine (SI), large intestine (LI) and tracheo-pulmonary (TP) fluids. Middle panel (B), by i.n. route, pCry3A induces Ab of the three isotypes, IgM, IgG and IgA, similar to pCry1Ac and pCry1Aa. Lower panel (C), tCry3A, is able to induce similar Ab responses than pCry3A but in lower magnitude. Levels of Ab were measured by indirect ELISA. Data are presented as the average of OD 405 nm \pm S.D. of five individuals per group. Significant differences ($P < 0.05$) with respect to control animals are indicated as asterisk (*). Right legend indicate, C, control; I, immunized.

from the N-terminal half, giving tCry3A (Fig. 2A, lane 3) affected the immunogenic abilities of pCry3A, since the magnitude of the Ab response was lower by i.p. route except those detected in serum ($P < 0.05$) (Fig. 2C, lower panel). Interestingly, and in contrast to the pCry1A, tCry3A was able to induce SIgA Ab in two different mucosal sites (gut versus upperairways). By nasal route, tCry3A, only elicited IgG Ab in upperairways (detected in trachea fluids) (data not shown). These results support the assumption of the potential role of the N-terminal region in the specific induction of Ab (IgG and IgA).

3.3. N-terminal half (toxin region) of the Cry1A proteins favoured specific antibody responses by intraperitoneal and intranasal administration to mice

In contrast to activation of pCry3A, proteolytic processing from both amino- (~17 residues) and carboxyl- (~70 kDa)

terminal ends of the protoxin (Fig. 1A), releasing the N-terminal region or toxin (~70 kDa) (Fig. 3A, lanes 1–3), did not affect the immunogenic capabilities of the Cry1A proteins, but favoured high IgG Ab and very moderate levels of SIgA Ab responses induced by each of the Cry1A toxin, in the different sites analyzed, with significant differences between them and with respect to controls ($P < 0.05$). It is interesting that tCry1A were able to induce not only high IgG Ab responses (detected in serum and trachea fluids), but in some sites (detected in both small and large intestine fluids), were higher than pCry1A ($P < 0.05$). Even more, tCry1Ab and tCry1Ac, were able to induce higher levels of mucosal IgM Ab than pCry1A ($P < 0.05$) in both sites of gut (detected in small and large intestine fluids) (Fig. 3B). These findings are interesting since tCry1A were able to induce serum and mucosal antibodies, indicating a more effective stimulation of the immune system by the N-terminal region, and support the concept of stimulation

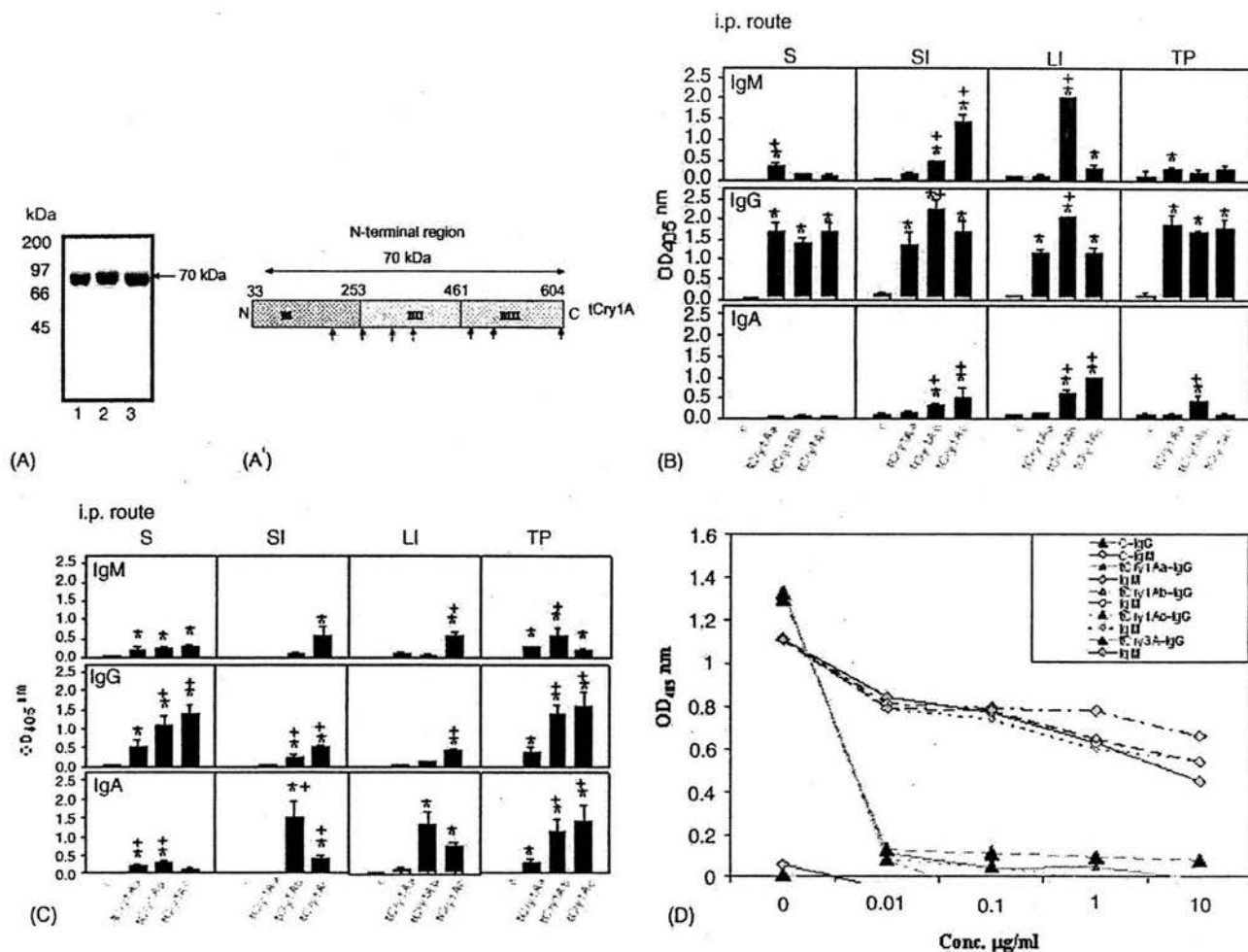


Fig. 3. (A) Coomassie stained SDS-10% PAGE showing the purified Cry1A toxins. Lanes 1, tCry1Aa; 2, tCry1Ab; and 3, tCry1Ac. Molecular mass marker position are indicated to the left. (A') Schematic primary structure of the three domain organization (domain I to III) of the Cry1A toxins, similar to Cry3A toxin. Domain I (dotted dark blue); domain II (dotted sky blue), and domain III (dotted green). Black arrows indicate five conserved blocks. Red arrows indicate binding receptor loops in domain II (loop 1 and 2). (B) By i.p. route, Cry1A toxins induces high levels of IgG detected in serum (S), small intestine (SI), large intestine (LI) and tracheo pulmonary (TP) fluids. Besides, these toxins are able to induce in both sites of gut (measured in SI and LI) high and moderate levels of IgM and IgA Ab responses, respectively. (C) By i.n. route, Cry1A toxins induces mostly SIgA and IgG, detected in (S) and (TP) fluids. Levels of Ab were measured by indirect ELISA. Data are presented as the average of OD 405 nm \pm S.D. of five individuals per group. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: (*) vs. control animals; (+) vs. between the Cry1A toxins. (D) Inhibition ELISA for anti-pCry1Aa IgG Ab using Cry1A toxins as competitors. Results are given as the average OD 405 nm \pm S.D. of five individual mice; control animals, immunized with and without inhibitor.

of local Ab production (Bouvet and Decroix, 2002). So far, nasal immunization with each of the Cry1A toxins, highlighted these assumption, because, by this route, the three Cry1A toxins were able by themselves, to induce high IgG and SIgA Ab responses specially those detected in serum, trachea fluids, as well as significant levels of SIgA in both mucosal sites of gut ($P < 0.05$) (Fig. 3C). Regionalization of the binding molecules could account for the differences in the immunogenic abilities observed between the tCry1A, specially tCry1Aa which elicited lower Ab responses than tCry1Ab and tCry1Ac ($P < 0.05$). From these data, it can be proposed that Cry proteins depend of the N-terminal region to induce specific Ab response by both routes.

3.4. Anti-pCry1A IgG antibodies are directed toward the N-terminal region of the Bt Cry proteins

To strengthen that specific immunogenic abilities of the pCry1A reside in the N-terminal region, it was performed a competitive inhibition ELISA (Okano et al., 2001). The three tCry1A and tCry3A completely inhibit, at very low doses, IgG Ab binding to Cry1Aa-coated plates, in comparison with controls (Fig. 3D). On other hand, tCry1A and tCry3A partially inhibit, in a dose dependent manner, IgM Ab binding to Cry1Aa-coated plates. These data suggest that IgG Ab are mostly directed to the N-terminal region rather than C-terminal region, whereas IgM Ab are directing to both regions of the pCry1A.

4. Discussion

It has been reported that potent immunogenicity of some bacterial toxins, like cholera toxin (Ctx) and heat-labile toxins (LTx), reside mostly in the binding capability of the B subunit to mucosal epithelials (de Haan et al., 1998; Guidry et al., 1997; Nashar et al., 1996). The strong immunogenic abilities of pCry1Ac is supported by several studies (Vázquez et al., 1999; Moreno-Fierros et al., 2000). However, the regions (N- and C-terminal) involved in the induction of Ab responses remain unclear. The data from this work show that immunogenic properties of the highly homologous pCry1A reside and depends of the N-terminal region. This is could be due to the greater diversity in structure and functions of this region (English and Slatin, 1992; Li et al., 1991; Sankaranarayanan et al., 1996; Chestukhina et al., 1982).

The role of C-terminal half of the protoxins in the immunogenic abilities showed by Cry proteins in vertebrates is very tempting to speculate, because is readily attacked by proteinases, predominantly hydrophilic in nature, highly conserved sequence, and most of the lysine and cysteine residues are localized in this region (Chestukhina et al., 1982), which are essential in the assembly of the crystal as well as in the solubility properties (Chestukhina et al., 1982; Choma et al., 1990). Furthermore, three-dimensional structure of this “pro” region is not known, it has been proposed that the whole protoxin is an ellipsoid molecule, instead (Holmes and Monro, 1965). In contrast, N-terminal region, is resistant to proteolysis, the three dimensional structure of this region is formed by three domains, rich in alpha helix, and β sheets (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995; Galitsky et al., 2001); and carbohydrate functionality reside in this region (Domain II and III) (Ge et al., 1991; Sankaranarayanan et al., 1996; Burton et al., 1999). This function gives to the Cry toxins the ability to bind to glycoproteins like receptors, present in the insect midgut, i.e. N-aminopeptidases, or E-Cadherins (VanRie et al., 1990; Ge et al., 1991; Angst et al., 2001). Similar molecules are present in the bowel of vertebrates, i.e. function in the cellular adhesion and nutrient absorption (Angst et al., 2001). However, experiments in vitro have shown that pCry1Ac does not bind to this molecules (Vázquez-Padrón et al., 2000), instead, it has been suggested that other region of the protoxin could be involved in the electrostatic interaction in vivo (Knight et al., 1994). Thus, the capacity to induce Ab response by Cry1A protoxins could be explained taking in account that large molecules can interact with the antigen presenting cells (APCs) present in the peritoneal cavity (Balabanian, 2002), and to the influence of the N-terminal half on the C-terminal region. The structural implication of the N-terminal half in the Ab response induced by Cry proteins is shown in the ability of the tCry1A to block the anti-pCry1Aa IgG Ab (Fig. 3D), as well as in the capacity of Cry toxins, including pCry3A, to induce antibodies of the three isotypes, remarkably, SIgA Ab in mucosal sites by both routes (Bouvet and Decroix, 2002) Fig. 2B and 3B). Therefore, it can be proposed from

these data that N-terminal region may be the responsible of the strong specific Ab responses induced by Cry proteins. This is consistent with the notion that binding to the appropriate receptors in the nasal or gut epithelium could facilitate uptake, and further processing leading to enhanced Ab responses (Takata et al., 2000; Guidry et al., 1997). The findings of this work will support future studies regarding adjuvanticity properties of the *Bt* Cry toxins in order to develop safe and effective adjuvants of clinically relevant antigens.

5. Concluding remarks

Systemic and nasal immunization of mice with tCry1A and pCry3A strengthened the importance of the N-terminal half in the effective induction of Ab IgG and IgA specially in the different mucosal compartments (upperairways versus gut). Therefore, the absence of the C-terminal half did not affect the immunogenic abilities of the Cry proteins, but favored specific Ab responses. Even more, support the assumption that the three domains that comprise this region, are playing a key role in the overall humoral and cellular (in preparation) immunogenic abilities of the Cry proteins.

Acknowledgements

To IPICYT, San Luis Potosi, and National University of Mexico for financial support. Dr. Oscar Alzate, for his help in Cry1A protoxins purification. Dr. Leopoldo Flores Romo, Dr. Jorge Campos and M.C. Fernando Hernández Terán for critically reviewing the manuscript.

References

- Angst, B.D., Marcozzi, C., Magee, A.J., 2001. The cadherin-superfamily. *J. Cell. Sci.* 114, 625–626.
- Balabanian, K., 2002. Interleukin 10 modulates the sensitivity of peritoneal B lymphocytes to chemokines with opposite effects on stromal cell-derived factor-1 and B lymphocyte chemoattractant. *Blood* 99, 427–436.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of the immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Bouvet, J., Decroix, N., 2002. Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination? *Trends Immunol.* 23, 209–213.
- Bravo, A., Jansens, S., Peferoen, M., 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 237–246.
- Bulla, L.A., Kramer Jr., Cox, Jones, K.J., Davidson, D.J., B.L., L.I., Lookhart, G.L. 1981. Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 256, 3000–3004.
- Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J., Derbyshire, D.J., 1999. N-acetylglucosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287, 1011–1022.
- Chestukhina, G.G., Kostina, L.J., Mikhailova, A.L., Tyurin, S.A., Klepikova, F.S., Stepanov, V.M., 1982. The main features of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin molecular structure. *Arch. Microbiol.* 132, 59–162.

- Choma, C.T., Surewickz, W.K., Carey, P.R., Pozsgay, M., Raynor, T., Kaplan, H., 1990. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Struct. Implicat.* 189, 523–527.
- de Becker, G., Sornasse, T., Nabavi, N., Bazin, H., Tielemans, F., Urbain, J., et al., 1994. Immunoglobulin isotype regulation by antigen-presenting cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* 24, 1523–1528.
- de Haan, L., Verweij, W., Agsteribbe, E., Wilschut, J., 1998. The role of the ADP-ribosylation and GM1-binding activity in the mucosal immunogenicity and adjuvanticity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and *Vibrio cholerae* cholera toxin. *Immunol. Cell. Biol.* 76, 270–279.
- English, L., Slatin, S.L., 1992. Mode of action of delta endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 1–7.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Puzstai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R., Cygler, M., 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254, 447–464.
- Galitsky, N., Cody, A.V., Wojtczark, D., Ghosh, J.R., Panghorn, W.L., English, L., 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta D: Biol. Crystallogr.* 57, 1101–1109.
- Ge, A.Z., Pfister, R.M., Dean, D.H., 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin-Encoding Gene in *Escherichia coli*: Properties of the Product, 93; pp. 49–54.
- Ge, A.Z., Rivers, D., Milne, R., Dean, D.H., 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 17954–17958.
- Guidry, J.J., Cárdenas, L., Chueng, E., Clements, J.D., 1997. Role of receptor binding in toxicity, immunogenicity, and adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immunol.* 65, 4343–4350.
- Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242–255.
- Holmes, K.C., Monro, R.E., 1965. Studies of the Structure of Paraesporal Inclusions from *Bacillus thuringiensis*, 4; pp. 572–581.
- Knight, P.J., Crickmore, N., Ellar, D.J., 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11, 209–213.
- Knowles, B.H., 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin. *Adv. Insect Physiol.* 24, 275–308.
- Li, J., Carroll, J., Ellar, D.J., 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815–821.
- Moreno-Fierros, L., Reséndiz-Albor, A.A., López-Revilla, R., 1999. Different antiamebic antibody isotype patterns in the large and small intestine after local and systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed trophozoites. *Life Sci.* 64, 1079–1089.
- Moreno-Fierros, L., García, N., Gutiérrez, N.R., Neri-Bazán, L., López-Revilla, R., Vázquez-Padrón, R., 2000. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces serum, vaginal and pulmonary responses in Balb/c mice. *Microbiol. Infect.* 2, 1–6.
- Nashar, T.O., Webb, H.M., Eaglestone, S., Williams, N.A., Hirst, T.R., 1996. Potent immunogenicity of the B subunits of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: Receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 226–230.
- Okano, M., Satoskar, A.R., Nishizaki, K., Ham Jr., D.A., 2001. Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J. Immunol.* 167, 442–450.
- Schnepf, H.E., Crickmore, N., Van Rie, J., Dereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.
- Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A., Vijayon, M., 1996. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a β -prism fold. *Nat. Struct. Biol.* 3, 596–603.
- Shimizu, T., Morikawa, K., 1996. The β -prism: a new folding motif. *Trend Biochem. Sci.* 21, 3–6.
- Takata, S., Ohtani, O., Watanabe, Y., 2000. Lectin binding patterns in rat nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and the influence of various types of lectin on particles uptake in NALT. *Arch. Histol. Cytol.* 63, 305–312.
- VanRie, J.S., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., VanMellaert, H., 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1378–1385.
- Vázquez, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., De la Riva, G., López-Revilla, R., 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 49, 578–584.
- Vázquez-Padrón, R.I., González-Cabrera, J., García Tovar, C., Neri-Bazán, L., Hernández, M., Moreno-Fierros, L., López-Revilla, R., de la Riva, G.A., 2000. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD 73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 54–58.

Faltan páginas

Nº 80-81

Apéndice 2: Papel de la hélice alfa siete del dominio I de las toxinas Cry1A de *Bacillus thuringiensis* en la inducción y modulación de una respuesta inmune humoral y celular en ratones BALB/c.

Role of alpha helix seven of domain I from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in the induction and modulation of the humoral and cellular response in BALB/c mice.

¹Guerrero GG* , ²Dean DH., ³Hernández TF and ¹L. Moreno-Fierros. 2004. ¹Lab de Inmunidad de mucosas. UBIMED. FES-IZTACALA. UNAM. Av de los Barrios No 1. Col. Los Reyes Iztacala. Tlanepantla Edo de México. ²Department of Biochemistry, Ohio State University, Columbus, OH. 43210, USA. ³Escuela de Ciencias Biológicas, Unidad de Torreón. Universidad Autónoma de Coahuila, México.

ABSTRACT

To investigate the role of domain I in the immunogenicity of the Cry toxins, site directed mutagenesis was performed to generate Cry1A mutants at the selected conserved Block 2. Structurally stable Cry1A mutants were tested for their ability to induce humoral and cellular immune response in mice. Our results show that exchange of the eight conserved hydrophobic motif in alpha helix seven of domain I (²³⁹TVLDIVALF²⁴⁷) for a similar fragment B diphtheria toxin motif (²³⁹ISSDSIGVL²⁴⁷) did not affect the biochemical properties, nor the ability of the mutants to induce antibody response, but a positive effect in the magnitude of the IgG and IgA Ab response after intranasal immunization (i.n.). Quimeric Cry1A toxins retained also its capacities by intraperitoneal immunization (i.p), but the magnitude of the Ab response was dependent of site analyzed. The induction of the IgG1 and IgG2a Ab subclasses (as an indirect measure of the Th cellular immune response) by wild type and quimeric Cry1A toxin was similar, but in addition, quimeric toxins were able also to modulate the ratio of this antibodies, unexpectedly, by i.p. route. Furthermore, the implication of wild type and quimeric α -helix 7 of domain I was stressed by theoretical predictions and by the detection of anti-diphtheria toxin Ab after i.n.immunization. Together, our results not only strengthen the immunogenic capacities of the N-terminal region but suggest that highly conserved α -helix 7 of domain I contribute to this capacity through its physicochemical and structural characteristics.

*To whom correspondence should be addressed: gloriaguillermina@correo.unam.mx

Key words., δ -endotoxin, *Bacillus thuringiensis*, α -7 helix, diphtheria toxin, immunogenicity.

Abbreviations. Ab, Antibody, Ag, antigen, Cry1A toxins, Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac, DTB, fragment B diphtheria motif, SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate, polyacrylamide gel electrophoresis; TB, terrific broth medium; SEC, size exclusion chromatography; BSA, bovine serum albumin. ELISA, enzyme linked immunoabsorbent assay. ICP, insecticidal crystal proteins

Introduction.

Bacillus thuringiensis produces proteinaceous crystals (ICPs) toxic to a wide range of insects of economical importance (1). After crystal ingestion by susceptible insects, protoxins are solubilized in the alkaline midgut and activated by gut proteases, to render a toxic fragment of 65-70 kDa. The activated toxins then binds to a specific receptor immersed on the apical brush border of the midgut epithelial columnar cells (2). After reversible binding, the toxin undergoes a conformational change leading to its membrane insertion, followed by the aggregation of Cry toxins molecules (3) and formation of lytic pores, that disrupt the cell integrity, ionic balance and transepithelial potential difference; accompanied by cell swelling and lysis caused by the inflow of water and finally, paralysis of the midgut and larval death (5).

The N-terminal half or toxic fragment of Cry proteins with different specificity, Cry1Aa and Cry3A, is comprised of three domains, as was determined by x-ray crystallographic diffraction (6, 7); domain I, implicated in pore formation, is a bundle of seven alpha helices with one central alpha helix five surrounded by the other six amphipathic helices. Domain II, represent the most hypervariable region among all the Cry proteins, is a three- β antiparallel sheet domain, (8, 9, 10). This domain is involved in receptor binding and insect specificity determination (11). Domain III, a β -sandwich of two antiparallel β -sheets, is involved also in toxin protection of further proteolysis and as voltage sensor (12). Höfte and Whiteley (12) identified five conserved blocks that built the main core of the toxic fragment. The largest conserved block, D2, include α -helix 6, 7 and β -1 from domain I and II respectively. α -helix 7 is located in the crucial junction between domain I and II,

and is in contact with the first β -sheet of domain II (6, 7). Thereby, it is well positioned to sense receptor binding to membrane surfaces (6, 14). Interestingly, within alpha helix seven (D2) there is a highly conserved hydrophobic stretch, with 60% overall sequence identity among all crystal proteins (15). A similar motif to the Cry toxins is found in alpha helix nine of transmembrane domain of fragment B diphtheria toxin (15). Diphtheria toxin, is an A/B type toxin that cause mammalian cell death at extremely low concentrations, 100 ng/ kg of body weight. It is composed of two fragments, the A fragment (21 kDa) with ADP-ribosyl transferase activity and the B fragment (37 kDa) divided in two domains; the R (receptor binding) and T (transmembrane) domains (15). In general, several studies have shown the role of alpha helix seven of domain I not only in the structural stability of the Cry toxins (17) but in the toxicity in insects, as a sensor of the initial binding to the receptor (18) and in the interaction with loops of α -helix 8 and 2 of domain II (4). To further investigate the function of domain I in vertebrates and to gain insight in the mechanism that are used by Cry1A toxins to induce strong Ab responses in mucosal sites, using site directed mutagenesis a hydrophobic conserved eight motif (TVLDIVALF) present in all the δ -endotoxins was substituted by a similar fragment B diphtheria toxin (DTB) (ISSDSIGVL). The resulting quimeric toxins were tested for its ability to induce humoral and Th cellular immune response (indirectly measured as the induction of IgG Ab subclass) in BALB/c mice. Furthermore, the importance of the helical domain I, specially of the wild type and quimeric α -helix seven was stressed by using ANTHEPROT program (20, 21, 22) and some theoretical models (23, 24). Our findings show that α - helix seven is contributing to the strong abilities of the N-terminal region of the Cry proteins by its helical conformation and amphipathic character. Interestingly, these physicochemical characteristics correlate well with the experimental levels of Ab induced *in vivo* by these proteins. This meant that the potential antigenic segments predicted by the ANTHEPROT program, could be functioning like T/B cell epitopes, which can collaborate for the production of

antibodies, further assessed by the induction of specific anti-diphtheria toxin Ab remarkable after i.n. immunization by wild and quimeric Cry1A toxins.

Material and Methods.

Site-directed mutagenesis. Oligonucleotides were from (Integrated DNA Technologies, Inc. Iowa, USA). The kit for mutagenesis was from Stratagene (Heidelberg, Germany). The cry1A genes (*cry1Aa*, *cry1Ab* and *cry1Ac*) of *B. thuringiensis* cloned in the *Escherichia coli* pKS(+/-) plasmid was used for mutations. Primers used for the mutagenesis (Table 1). Site directed mutagenesis was carried out accordingly with the manufacturer's instructions, except that after first round of selection and enrichment, positive mutant plasmid were selected with Hinf I restriction enzyme, the new site introduced by the mutagenic primer site. Sequencing of these clones was done with the Dye Terminator Ready Reaction kit (Perkin Elmer) at the Biopolymer facility, The Ohio State University, OH, USA.

Table 1. Primers used for site directed mutagenesis exchange in α -helix seven of Cry1A toxins

239 TVLDIVSLF 247 \longrightarrow 239 ISSDSIGVL 247

cry1Aa 5'AGAAGAGAATTAACACTAATTTGTCGGATTCCATAGGCGTTCCTTCAAACACTATGATAGTAGA 3'
cry1Ab 5'AGAAGAGAATTAACACTAATTTGTCGGATTCCATAGGCGTTCCTCCGAACACTATGATAGTAGA 3'
cry1Ac 5'AGAAGAGAATTAACACTAATTTGTCGGGATTCCATAGGCGTTCCTCCGAATTATGATAGTAGA 3'

Antigens. Toxin preparation.

Cry1A toxins, wild type and quimeric toxins, were grown in 500 ml of Terrific Broth Medium for 48 h at 37°C under vigorous agitation (250 rpm). Pelleted cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 15% sucrose, and 10 μ g/ml of lysozyme) and incubated for 2 h at 37°C (23). Purification of inclusion bodies, protoxin solubility, and toxin activation with trypsin was carried out as described previously (25). Purified toxins were eluted from a Sephadex 200 30/8.0 column in Sodium-Carbonate buffer at pH 10.2 The lipopolysaccharide (endotoxin) content of the preparations was tested using the E-toxato kit accordingly to the manufacturer's instructions.

The levels were described (negative or was under the levels of detection). The quality of toxins mutants were considered to be purified to homogeneity as analyzed by SDS-PAGE.

Animals, sample collection and immunization protocols.

Balb/c mice of age 8 to 10 weeks (Harlan, Co. Indianapolis, In. USA) were used. Antibody responses to Cry1A wild type and mutants were measured after intranasal (i.n.) and intraperitoneal (i.p.) administration of mice with 50 µg of protein in PBS, weekly on three occasions. Control mice were given PBS. Blood samples as well as mucosal fluids (trachea, and gut secretions) were collected 1 week after the last immunization as previously described.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs).

Microtiter plates (Nunc) were directly coated with Cry1A toxins (Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac) and the respective Cry1Aa mutants at 1 µg/ml in Carbonate buffer, pH 9.6. Concentrations of anti-Cry IgM, IgG and IgA antibodies in serum and gut fluids (small and large) as well as in tracheo pulmonary fluids were determined as described elsewhere (26). IgA (α-chain-specific; Zymed) at 1µg/ml in PBS followed by serially diluted mouse IgA. Goat anti-mouse IgG (Fc-fragment-specific), or goat anti-mouse IgA (α-chain-specific; Zymed) peroxidase conjugate was added to all wells. The anti-Cry IgM, IgG and IgA titer giving a titer $A_{405} \leq 2.0$ was determined. Determination of the anti-diphtheria toxin antibodies in the collected samples, was realized as described above, but, antigen coating plate was diphtheria toxin (1µg/ml) in Carbonate buffer, pH 9.6, instead.

Competitive assays. To assess for Ag-specific IgG and IgM, competitive ELISA assay was performed as described (26). Briefly, ELISA plates were coated with diphtheria toxin, (1µg/ml) overnight at 4°C. Plates were washed with PBS/0.05 Tween 20, and blocked. Samples were diluted at 1:1000 dilution in PBS/Tween 0.05% and mixed with different doses of Cry1A toxins, respectively as competitors. Following incubation for 15 min at room temperature, samples were added to the Ag coated plates in duplicate and for 2 hs at room temperatures. The levels of anti-DT IgG, IgM and IgA was revealed with ABTS/H₂O₂ 0.03% and absorbances were recorded at 405 nm.

The values are expressed as the mean \pm SEM of duplicates from sera of five individual mice with competitors added and without it.

Statistical analysis. Data are expressed as the mean \pm SD for each subject group. Statistical analysis was performed using ANOVA and Student's t- test for group comparisons. Differences were considered statistically significant at the level of $P < 0.05$.

Results

Construction of Cry1A mutants toxins by site directed mutagenesis. Site directed mutagenesis is an efficient ($> 70\%$) and quick method to exchange more than one aminoacid residue in any double-stranded plasmid, is a Deng and Nickoloff (27) modified method described by Stratagene, Heidelberg, Germany. The precise localization of the hydrophobic conserved motif in alpha helix seven of domain I is shown in Figure 1 (marked with a rectangle and DTB motif coloured in red). Cry1A toxins (Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac) were selected for exchanging the hydrophobic conserved because they induce differential Ab (IgG and IgA) responses by i.n. route and significant by i.p. route (IgG and IgA) (25).

Cry1A mutants showed stability and similar biochemical properties than wild types. Expression and purification of the three quimeric Cry1A mutants, Cry1Aa8, Cry1Ab2 and Cry1Ac3 were made from *E. coli*. Inclusion bodies, protoxins, from wild type and mutants were analysed by SDS-PAGE. All the mutants proteins were expressed at levels similar to the wild-type (Figure 2A, lanes, 2-4), and were of the standard 130 kDa size (Figure 2A, lanes 5-7). Upon activation by trypsin, all the mutants protoxins (Figure 2A, lanes 5-7) yielded stable 70 kDa toxins (Figure 2B, lines 6-8) as well as after size exclusion chromatography (SEC)(Figure 2C, lanes 9-11). Stability to SDS and similar retention times than wild types were observed when analyzed by gel filtration chromatography (data not shown). Since most of the charged aminoacids in the alpha helix seven play an essential structural role, the exchange of the polar residue (T) by non polar hydrophobic residue (I), and non polar (V, L) to polar residue (S, S), instead, stabilize the structure by hydrogen

bond formation between the new serines *per se* and with other residues (Figure 2D) in the vicinity yielding stable toxins (Figure 2C).

Differential and enhanced humoral responses by quimeric Cry1A toxins in BalB/c mice. Next, to test the capacity of the quimeric Cry1A toxins to induce an Ab response, BALB/c were immunized by i.p. route. It was found that the three quimeric toxins, Cry1Aa8, Cry1Ab2 and Cry1Ac3, were able to induce Ab responses, significant with respect to controls ($P < 0.05$), similar between them ($P < 0.05$), and in less amount than wild types ($P < 0.05$), only, those levels detected in serum (Figure 3). Interestingly, as expected differential levels were found in the mucosal sites of gut and upperairways ($P < 0.05$), measured in the intestinal and tracheo pulmonary fluids) (Figure 3), respectively. In contrast, after i.n. immunization, the three quimeric toxins, Cry1Aa8, Cry1Aab, and Cry1Ac3, retain the capacity to induce Ab responses, but with different magnitud. The levels of Ab induced were significant with respect to controls ($P < 0.05$); and in some sites, significant between them ($P < 0.05$) and with respect to wild types ($P < 0.05$). For example, enhanced levels of IgG in serum ($P < 0.05$), and IgA was detected in tracheopulmonary ($P < 0.05$), and large intestine fluids ($P < 0.05$) (Figure 4). Remarkably, quimeric Cry1Aa8, induced in all the fluids analyzed higher levels of the three Ab (IgG, IgM and IgA) ($P < 0.05$) than wild type Cry1Aa toxin, which induced poor immunogenic responses by this route (Figure 4). These results suggest that the exchange of motifs between the Cry1A toxins and fragment B of diphtheria toxin did not affect the capacity of the Cry1A toxins to induce Ab responses but reveal the role of alpha helix seven

Physicochemical analysis of the role of α -helix 7 of domain I from *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. Next, to strength the assumption that the contribution of alpha helix seven in the capacity of the N-terminal region to induce an antibody response is through its physicochemical features, it was used ANTHEPROT program. This program (20), integrate several physicochemical algorithms, such as combined antigenicity profile (22), hydrophobicity (Kyte and Doolittle, 1982), antigenicity profile (23), hydrophilicity profile (29), Prediction of transmembranous regions (30)

and solvent accessibility profile (31) to predict antigenic sequential epitopes. Based in the known primary structure of helical domain I and consistent with the already described program, α 3- α 6 helices from domain I have several antigenic sites (data not shown), whereas, highly conserved α -7 from the three Cry1A toxins has three potential antigenic segments (Figure 5A-B) (Tabla 2A).

Minor differences were observed in α -helix 7 profile of Cry1Ab toxin (Figure 5B, right and second pannel), can be due to the aminoacid variations, I227 \rightarrow V227 (Cry1Aa8 and Cry1Ac3) and S239 \rightarrow A239 (Fig 5 B) which could correlated with the differences observed in the level of the Ab response *in vivo*, i.e. Cry1Ab induced higher Ab responses of IgA than Cry1Aa in mucosal sites of gut (Figure 3-4). Moreover, the exchange of motifs in alpha helix seven of Cry1A toxins, introduced not only a new restriction HinfI (as described in material and methods) site but a new antigenic determinant in this helix with a amphipatic character (Tabla 3), aminoacids LIS (Figure 5 b-Ib) (Tabla 2B) with higher values of combined antigenicity (22), hydrophilicity, and solvent exposed regions than in the wild type alpha helix seven (Table 2B). Accordingly to Hopps and Woods (29) antigenic regions are primarily hydrophilic at the surface of the protein molecule.

By other hand, DeLisi and Berzofsky (20) proposed that immunogenic peptide have a primary structure consistent with an ability to form a stable amphipathic α -helices (i.e. one with separated hydrophobic and hydrophilic surfaces), displaying periodicity in hydrophobic residues (Figure 2D). Rothbard and Taylor (24) correlate the presence of T cell epitopes with the following sequence of residues: a charged amino acid or glycine, two to three hydrophobic amino acids, and glycine or a polar residue. While wild type Cry1Aa α -7 contain five of these motifs, α -7 from Cry1Ab and Cry1Ac toxins as well as the α -7 from quimeric Cry1A toxins contain four (Figure 5III). It has been suggested that the number of Rothbard motifs in a polypeptide chain determine its immunogenicity Interestingly, while, the levels of antibody induced by at least of two of the quimeric Cry1A toxins (Cry1Aa8 and Cry1Ac3) correlate with the amphipatic character of the α .helix seven and the

potential antigenic segments, the Rothbard theoretical predictions partially fits with these experimental levels of Ab induced by the quimeric Cry1A toxins..

Antigenicity of the fragment B Diphtheria motif inserted in alpha helix seven of domain I after intranasal administration. To support the above theoretical predictions, BALB/c mice were immunized three times with the quimeric Cry1A toxins and sought for the antibodies anti-Cry and anti-diphtheria toxins. The resultant samples, serum and mucosal fluids were screened by ELISA for antibodies which reacted with purified wild type and quimeric Cry1A toxins, as well as diphtheria toxin. Remarkably, mice produced moderate Ab immune responses, mostly IgG and IgA Ab (taking in account the size of the DTB motif), specially those induced in the different mucosal sites of upperairways and gut (Figure 6a), significant with respect to controls ($P < 0.05$), and with respect to the route ($P < 0.05$). Although by i.p. route, the three quimeric Cry1A toxins, elicited Ab of three isotypes, IgG, IgM and IgA, they were only detected in very small amounts in serum and in the tracheopulmonary fluids. Only the quimeric Cry1Ac3 toxin, induced very small levels of IgA, detected in the small intestine fluids (Figure 6b). Specificity of the Ab anti-DT were tested and confirmed by competitive ELISA assays. As it is shown in Figure 6c, the Ag is still recognized by the antiserum anti-quimeric Cry1A toxins, Cry1Aa8, Cry1Ab2 and Cry1Ac3, since there were not a change in the levels of IgG and IgM Ab expressed as the mean values of absorbances at 405 nm, indicating not competence at all by the wild type Cry1A toxins and strengthen the assumption that wild type and quimeric α -7 contain antigenic segment that could be acting like T/B cell epitopes, which can collaborate in the production of antibodies anti-Cry and anti-diphtheria toxin.

Induction and modulation of the ratio of IgG1 and IgG2a by intraperitoneal immunization of the Cry1A toxins. To investigate the contribution of alpha helix seven to the capacity of the Cry1A toxins to induce and to modulate the Th cellular immune response (measured like IgG1 and IgG2a ratio); mice were immunized by i.n. and i.p. routes. By systemic route, wild type Cry1A toxin induced a mix of IgG1 and IgG2a at the systemic level (detected in serum) and mucosal sites of gut and upperairway (detected in small intestine and tracheopulmonar fluids), suggesting a mixed

pattern of Th1/Th2 response (Figure 7), and IgG1 > IgG2a was detected in the fluids of large intestine mostly, suggesting a bias to Th2 response. In contrast, quimeric toxins Cry1A induce significant IgG Ab subclasses with respect to controls ($P < 0.05$) and with respect to wild types ($P < 0.05$). Remarkably, quimeric toxins, Cry1Aa8 and Cry1Ab2, induced a higher level of IgG1 than IgG2a ($P < 0.05$) in all the sites analyzed, suggesting a predominance of the Th2 phenotype of the immune response. However, even quimeric toxin Cry1Ac3 was able to induce enhanced magnitudes of the levels of IgG1 and IgG2a ($P < 0.05$) with respect to wild type, specially those detected in tracheopulmonary and gut fluids (small and large intestine) (Figure 7), the phenotype of the Th response was mixed between Th1 or Th2. Therefore, these data show that alpha helix seven can play a role in the polarization of the Th cellular response toward a Th2 phenotype.

Quimeric toxins Cry1A induce a similar pattern of Th cellular response than wild types by intranasal route. Next, since mucosal sites of upperairways is target of DT and Th default in this region is Th2 (31, 32), it was tested the contribution of the alpha helix seven of domain in the polarization toward a Th2 phenotype. Interestingly, it was found that wild type and quimeric toxins, both, induce a mix of IgG1 and IgG2a Ab, indicating a mixed phenotype of Th cellular immune response in all the sites analyzed. Except in the case of the wild type toxin Cry1Aa which induced a bias toward Th2 (IgG1 > IgG2a) (detected in the tracheopulmonary fluids) ($P < 0.05$); and a bias to Th1 (IgG2a > IgG1) ($P < 0.05$) in both mucosal sites of gut (Figure 8). Quimeric toxin, Cry1Ac3, which induce higher levels of IgG2a than IgG1 Abs (detected in the fluids of large intestine) ($P < 0.05$) suggesting a bias to Th1 cellular immune response. Together, these data indicate that domain I through α -helix seven by this route has a partial role in the induction of a Th2 phenotype of immune response, suggesting that other regions of the Cry1A toxins are participating in the modulation the Th cellular response.

Discussion.

A major goal to understand the immunogenic mechanism of *Bt* Cry toxins in vertebrates is to elucidate the functions of its domains. The N-terminal region of these proteins is formed by three domains (6, 7). Previous work have showed that strong immunogenicity in mice reside and depends of this region. (26). Direct involvement of each of the domains that comprise this region has not been studied. Since domain I is helical and two of the most conserved blocks map in this region (Höfte and Whiteley), one of them is in close contact with the domain lectin like, in this work is investigated the role of domain I of the *Bt* Cry proteins in the capacity of the N-terminal region to induce humoral and cellular immune response in BALB/c mice. Our results show that domain I is playing a role through alpha helix seven to this capacity by its highly levels of conservation, helicoidal conformation and physicochemical features that fit well like T/B cell epitopes.

The implication of the domain I through α -7 in the immunogenic abilities of the Cry toxins is based in its structural as well as its physicochemical features. Domain I is a bundle of seven alpha helices and has been implicated in pore formation in insects midgut. It is analogous to other bacterial pore forming domains, like diphtheria toxin of *Corynebacterium diphtheriae* (32) colicin of *Citrobacter freundii* and exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* (33). This helix is hydrophobic in nature, is part of the largest conserved block 2 (13) and is precisely located in the interface of I and II domains (Figure 1), in close contact with the first β -sheet closer to the loops of α -8 and 2 of domain II (6, 7). Therefore, is well positioned to sense the binding to receptor (s) and participate, thus, in the initial interaction with membranes of insect midgut (13, 17, 18). In fact, biophysical studies have shown that α -7 and not α 5 extends on membrane surfaces (planar bilayers) rather than to aggregate within lipid membranes (13). Interestingly, within this helix there is a highly conserved hydrophobic conserved stretch, TVLDIVAL (15) with 60% overall sequence identity among all δ -endotoxins which stress its importance in the process of pore formation (6). Interestingly, a similar motif was found with an aspartic acid, D242 interacting with the β -1 sheet of domain I, thus, this

residue plays an essential structural stability of the Cry toxins. Even more, a similar motif with an aspartic acid in the middle is found in the C-terminal of B fragment of diphtheria toxin (DT) which which makes large pores in the mammalian cell membranes (16), playing also an essential role in toxicity instead (16). The exchange of this motifs in the conserved alpha helix seven of the Cry1Ac toxin since this motif is precisely located in a domain that penetrates the membrane facilitating the translocation of the A subunit to the cytoplasm (16,32). In fact, experimental results in insects reported by Chandra *et al.* (18) are consistent with this before, since substitution in Cry1Ac δ -endotoxin lead to an enhanced insect toxicity. The mechanism of this was correlated with a improvement in the initial binding affinity that makes more competent to the Cry toxins to insert to the membrane of the epithelial midgut. In mice we found that the insertion of this motif in alpha helix seven of the Cry1A toxins including Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab, leads to enhanced (by i.n. route) and differential antibody response (by i.p. route) specially in the mucosal sites of upperairways, target of diphtheria toxin in mammals (16). The mechanism of this could be correlating with the nature of the DTB motif itself and the environment of the antigen presenting cells in the host. This meant that the presence of the new serines caused a change of the angles of the hydrophobic aminoacids in alpha helix seven (Tabla 3), a higher segmental mobility, flexibility that make more effective the conformational change that expose critical residues, especially hydrophobic residues that normally would not be directly accessible to a immune cell (Tabla 2A). In fact it has been proposed that the ability of the peptide to forma an α -helix like structure induced and stabilized by the amphipathic environment at the surface of the antigen-presenting cells. The periodicity of hydrophobicity would favor such induction and stabilization of an α -helix (19, 20).

Second, α -helices are one of the parameters that are used by some algorithms for the identification of T cell epitopes, and T cell antigenic sites tend to be amphipathic structures, it can be proposed that amphipathic helices of domain I, especially α -helix 7 could contribute to the overall immunogenicity of the Cry1A toxins by functioning precisely like T cell epitopes. This was stressed

by the analysis with ANTHEPROT program that this helix contain antigenic segments that could be functioning like T/B cell epitopes which can collaborate (34) for the production of both types of antibodies anti-Cry (Figures 3, 4, 7, 8) and anti-diphtheria toxin (Figure 6). The differences observed between the immunogenic abilities of the quimeric Cry1A toxins, could be explained by the regionalization of APCs and receptor binding molecules present in the different compartments (35, 36).

In summary, the findings of this work stress the capacity of the N-terminal region of the Cry proteins to induce and modulate the humoral and cellular immune response (reported here as an IgG1 and IgG2a ratio). The improvement of the immunogenicity by the different Cry1A toxins in mice correlate well with the physicochemical features of the alpha helices of domain I, especially of the highly conserved α -helix seven, that make it a potential target for the stimulation of the CD4+ T cells.

Acknowledgments. The author thanks partial financial support of IPICYT, San Luis Potosi, México and it is grateful with the members of Deans'lab for their technical assistance. Dr. Rodrigo Arreola and Dr Arturo Baitza Gutman for fruitful discussion.

References

1. Schnepf, H.E., Crickmore, N., van Rie, J., Dereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., and D.H. Dean. 1998. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
2. van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., and H. vanMellaert. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1378-1385
3. Gómez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., and M. Soberón. 2002. *FEBS Lett.* 513: 242-246
4. Gómez, I., Dean, DH., Bravo, A., and M. Soberón. 2003. *Biochem.* 423: 10482-10489
5. Wolfersberger, M.G. 1992. *J. Exp. Biol.* 172: 377-386.
6. Li, J., Carroll, J., and D.J. Ellar. 1991. *Nature.* Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. 353 : 815-821

7. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R., and M. Cygler. 1995. *J. Mol. Biol.* 254 : 447-464
8. Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A., and M. Vijayon. 1996.. *Nat. Struct. Biol.* 3: 596-603.
9. Lee, X., Thompson, A., Zhang, Z., Ton-that, H., Biesterfeldt, J., Ogata, C., Xu, L., Johnston, R.A. and N.M. Young. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 6312-6318
10. Rosa, J.C., DeOliveira, P.S.L., Garrat, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M.C., and L.J. Greene. 1999. *Protein Sci.* 8: 13-24
11. de Maagd, R.A., van der k., Bakker, D.L., Stiekema, W.J., D. Bosch. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2753-2757
12. Chen, X.J., Lee, M.K., and D.H. Dean. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9041-9045.
13. Höfte, H., and H.R. Whiteley. 1989. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255
14. Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, MS., and Y. Shai. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12209-12294.
15. Peréyra-Alfárez, B., A. Bravo., R. Quintero and X. Soberón. 1992. *Mol. Microbiol.* 6: 2095-2098
16. Greenfield, L. Bjorn, M.J., Horn, G., Fong, D., Buck, G.A., Collier, R.J., D.A. Kaplan. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.* 80: 6853-6857
17. Alcántara, P.E., Alzate, O., Lee, K. Mi., Curtiss, A., and D.H. Dean. 2001. *Biochemistry* 40: 2540-2547
18. Chandra, A., Ghosh, P., Mandaokar, D.A., Bera, K.A., Sharma, P.R., Das, S., and A.P. Kumar. 1999. *FEBS Lett.* 458: 175-179.
19. Margalit, H., Spouge, J.L., Cornette, J.L., Cease, K.B., Delisi, C., and J.A. Berzofsky. 1987. *J. Immunol.* 138: 2213-2229
20. Delisi, C., and J.A. Berzofsky. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7048-7052
21. Deléage, G., Combet, C., Blanchet, C., C. Geourjon. 2001. *Comp. Biol. Med.* 31: 259-267.
22. Parker, J.M.R., Guo, D., and R.S. Hodges. 1982. *Biochem.* 25: 5425-5432
23. Welling, G.W., Weijer, W.J., van der Zee R., Welling-Wester, S. 1985. *FEBS Lett.* 188: 215-218
24. Rothbard, J., and W. Taylor. 1988. *EMBO.* 7: 93-100
25. Ge, A.Z., R.M. Pfister., D.H. Dean. 1990. *Gene.* 93: 49-54

26. Guerrero, G.G., Dean, D.H., and L. Moreno-Fierros. 2004. *Mol. Immunol.* 41: 1177-1183.
27. Deng, W.P., and J.A. Nickoloff. 1992. *Anal. Biochem.* 200: 81-88
28. Kyte and Doolittle. 1982. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132
29. Hopps, T.P., and K.R. Woods. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3824-3828
30. von Heijne. *J. Mol. Biol.* 225: 487-494
31. Boger, J., Emini, EA., A. Schmidt. Reports on the sixth international congress in immunology. Toronto. 1986.p 250.
32. Choe, S., Bennett, M.J., Fuji, G., Curmi, P.M.G., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J., and D. Eisenberg. 1992. *Nature.* 357: 216-222
33. Parker, MW., and F. Pattus. 1993. *Trends in Biochem. Sci.* 18: 391-395
34. Jones, H.P., Hodge, L.M., Fujihashi, K., Kiyuno, H., McGhee, J.R., Simecka, JW. 2001. *J. Immunol.* 167: 4518-4526
35. Banchereau, J., and R.M Steinman. 1998. *Nature.* 392: 245-252
36. Takata, S., Ohtani, O., and Y. Watanabe. 2000. *Arch. Histol. Cytol.* 63: 305-312

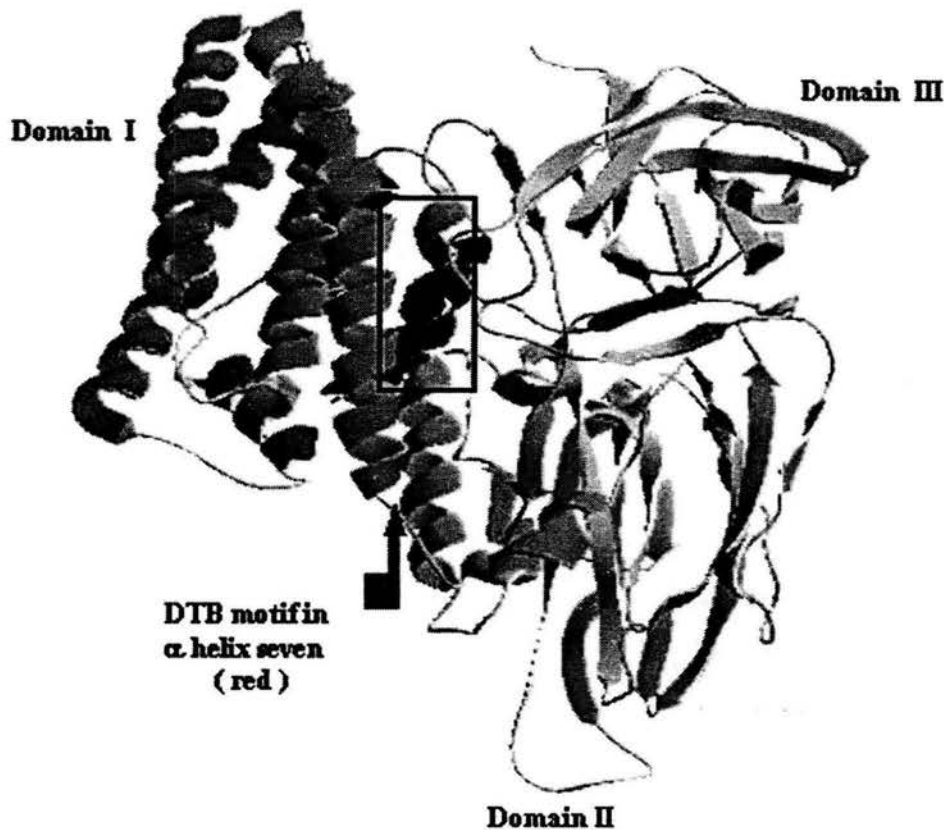


Figure 1. Schematic representation (ribbon) of the three dimensional structure from the *Bacillus thuringiensis* quimeric toxin Cry1Aa. Domain I (blue) formed by a bundle of seven alpha amphipathic helices. Domain II (green) is the binding domain with a β -prism topology. Domain III (orange), with a β sheet conformation, participate in the protection of the toxic fragment of further proteolysis, and binding to the midgut receptor (s). DTB (²³⁹ISSDSIGVL²⁴⁷) motif in α -helix seven (red, marked with a rectangle) of domain I (blue).

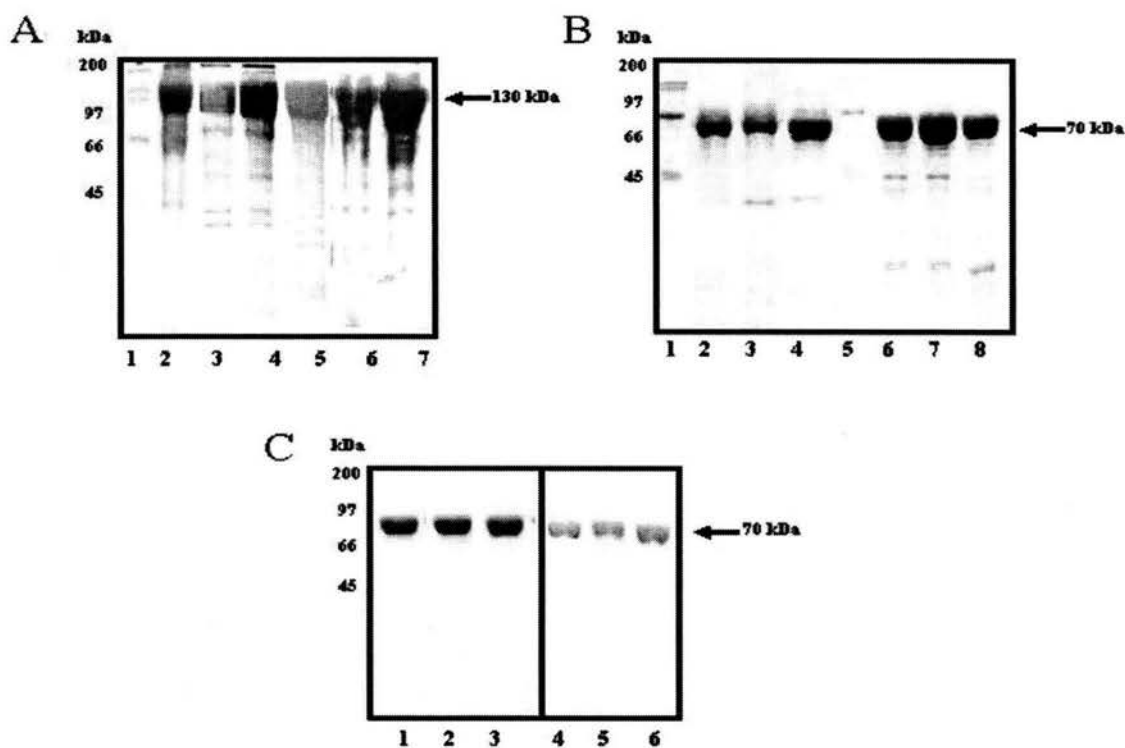
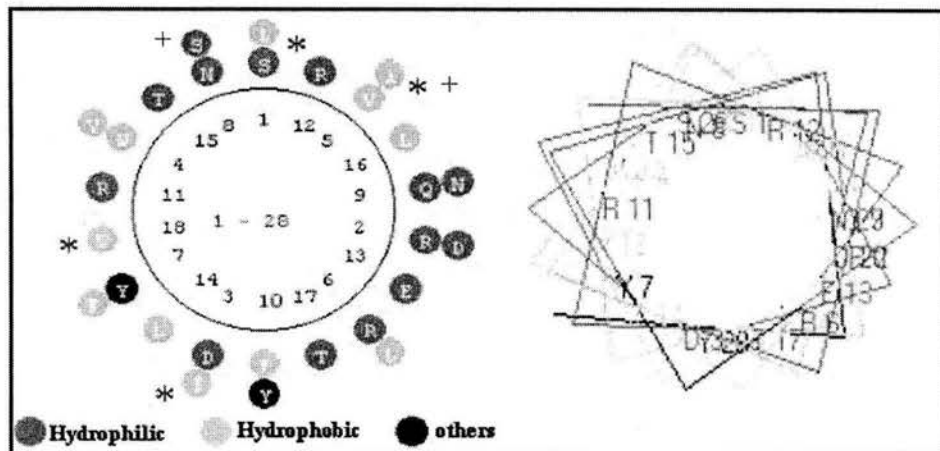


Figure 2. Comparative Coomassie stained SDS-10% PAGE between wild type and quimeric Cry1A proteins. **A.** Solubilized wild type and quimeric Cry1A protoxins. Lane 1, Molecular Markers; Lane 2, pCry1Aa; Lane 3, pCry1Ab; 4, pCry1Ac; Lane 5, pqCry1Aa8; Lane 6, pqCry1Ab2; Lane 7, pqCry1Ab3. **B.** Wild type and quimeric Cry1A toxins after proteolytic digestion with trypsin (1:50) (w/w). Lanes 2-4, tCry1Aa, tCry1Ab and tCry1Ac. Lanes 6-8, tqCry1Aa8, tqCry1Ab2 and tqCry1Ac3. **C.** Quimeric purified Cry1A toxins by size exclusion chromatography. Lane 1, Cry1Aa8, Lane 2, Cry1Ab2, and Lane 3, Cry1Ac3.

a

wild type α -helix seven of CryIAa toxin
 sRDWVRYNQFRRELTLTVLDIVALFsNY



b

Quimeric α -helix seven of CryIA8 toxin
 sRdWVRYNQFRRELTLISSDSIGVLSNY

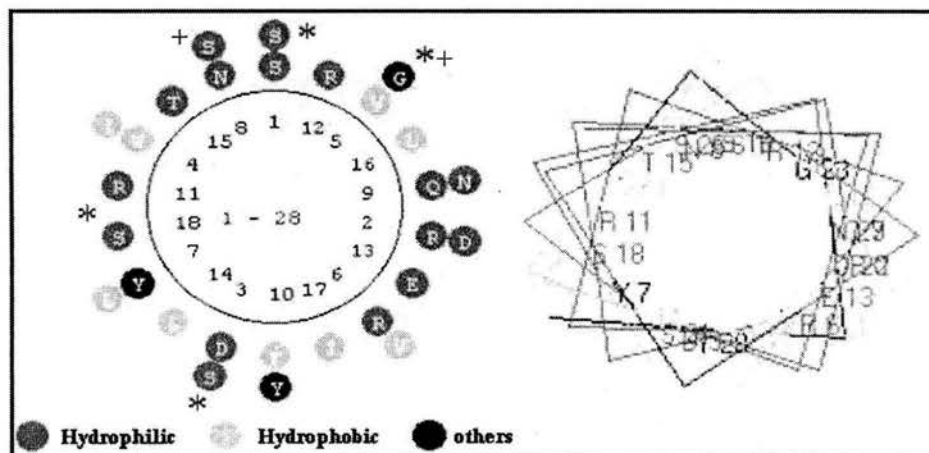


Figure 2D. Wheel representation and three dimensional representation of the wild type (a) and quimeric α -helix seven (b) of domain I from CryIAa toxin. In the wild type, interactions (*) are between hydrophobic and hydrophilic amino acid residues, while in the quimeric toxins, the interactions are between polar--polar uncharged aminoacids (*). α -helix seven of CryIAb and CryIAc toxins have, instead of S—N interactions (+) P---N interactions and α CryIAb toxin has I---S (+) instead of A—V.

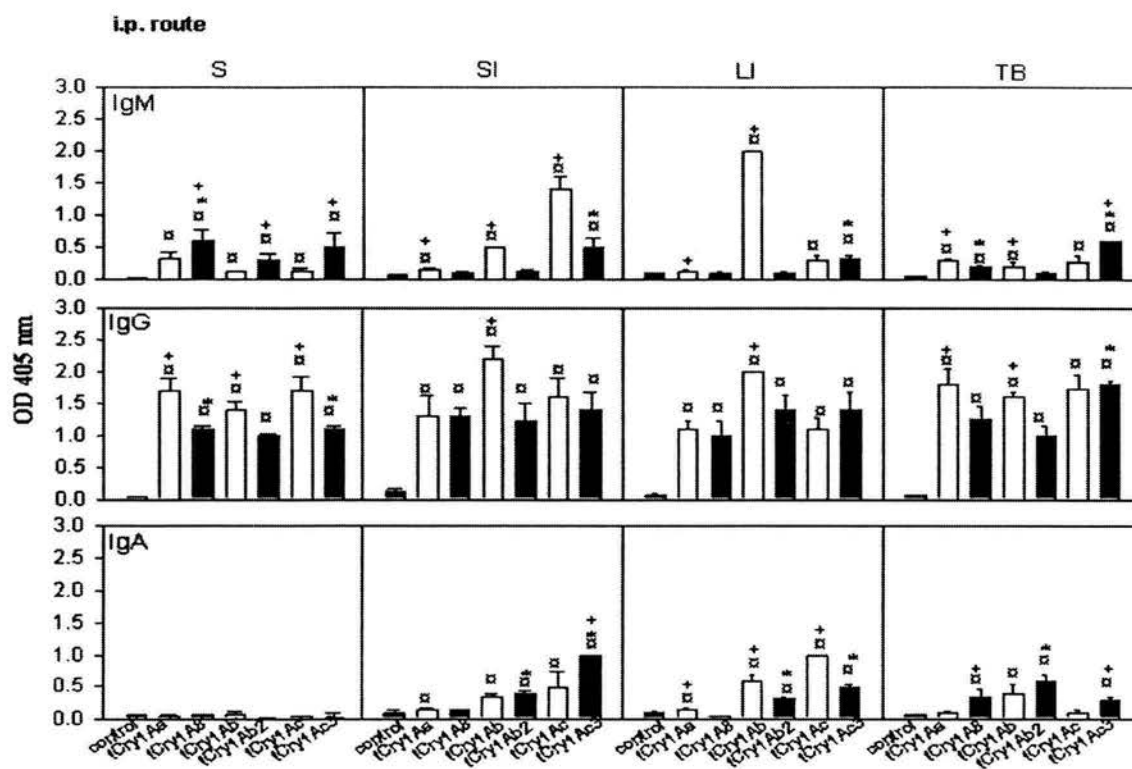


Figure 3. Quimeric Cry1A toxins elicited similar Ab isotype responses (black) than wild type (white), after intraperitoneal immunization but with differential magnitude. For example, the three quimeric toxins, Cry1Aa8, Cry1Ab2 and Cry1Ac3 elicited in serum (S) a lesser magnitude, while in the mucosal sites of gut [detected in small intestine, (SI) and large intestine, (LI)], and upperairways (detected in tracheopulmonary fluids (TP)], the magnitude was . Levels of Ab were measured by indirect ELISA. Data are presented as the average OD 405 nm \pm SD of five individual per group. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: (α) versus control animals; (*) between Cry1A quimeric toxins, and (+) versus wild type .

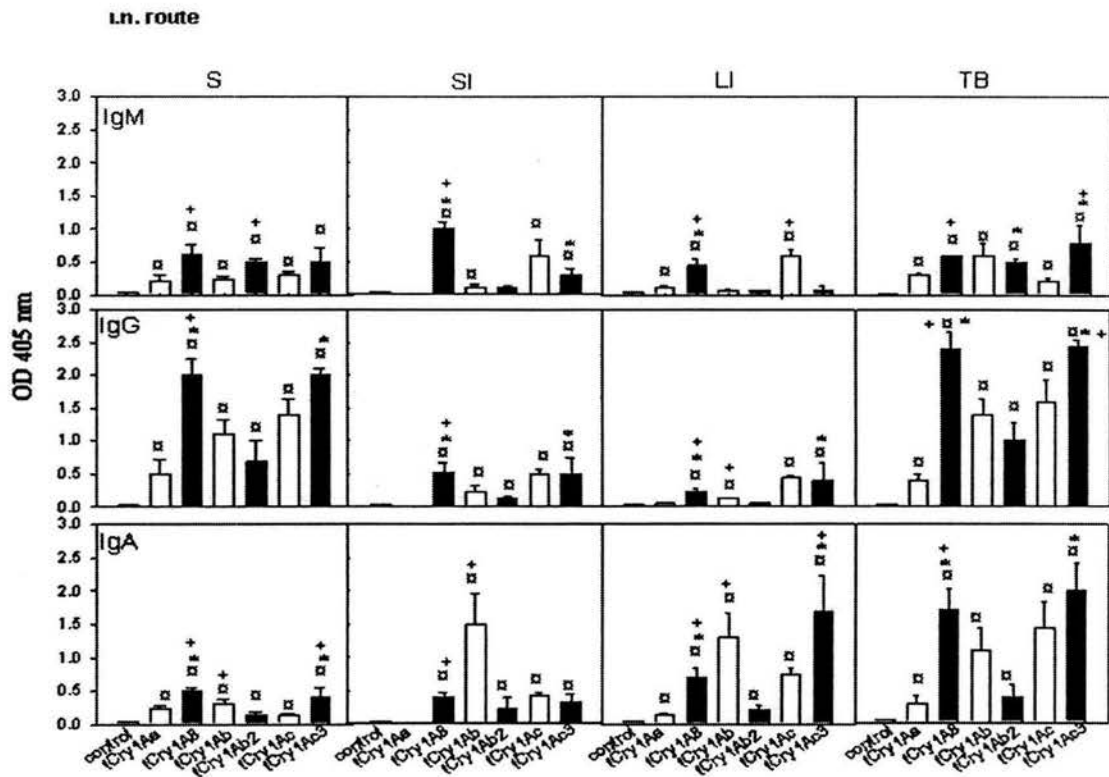


Figure 4. After intranasal immunization quimeric Cry1A toxins (black) induced higher levels of Ab (IgA, IgG) with respect to wild types toxins (white), specially those detected in serum (S), and tracheopulmonary fluids (TP). Levels of Ab were measured by indirect ELISA- Data are presented as the averages of OD 405 nm \pm SD of five individual per group. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: (□) versus control animals; (*) between Cry1A quimeric toxins, and (+) versus wild type.

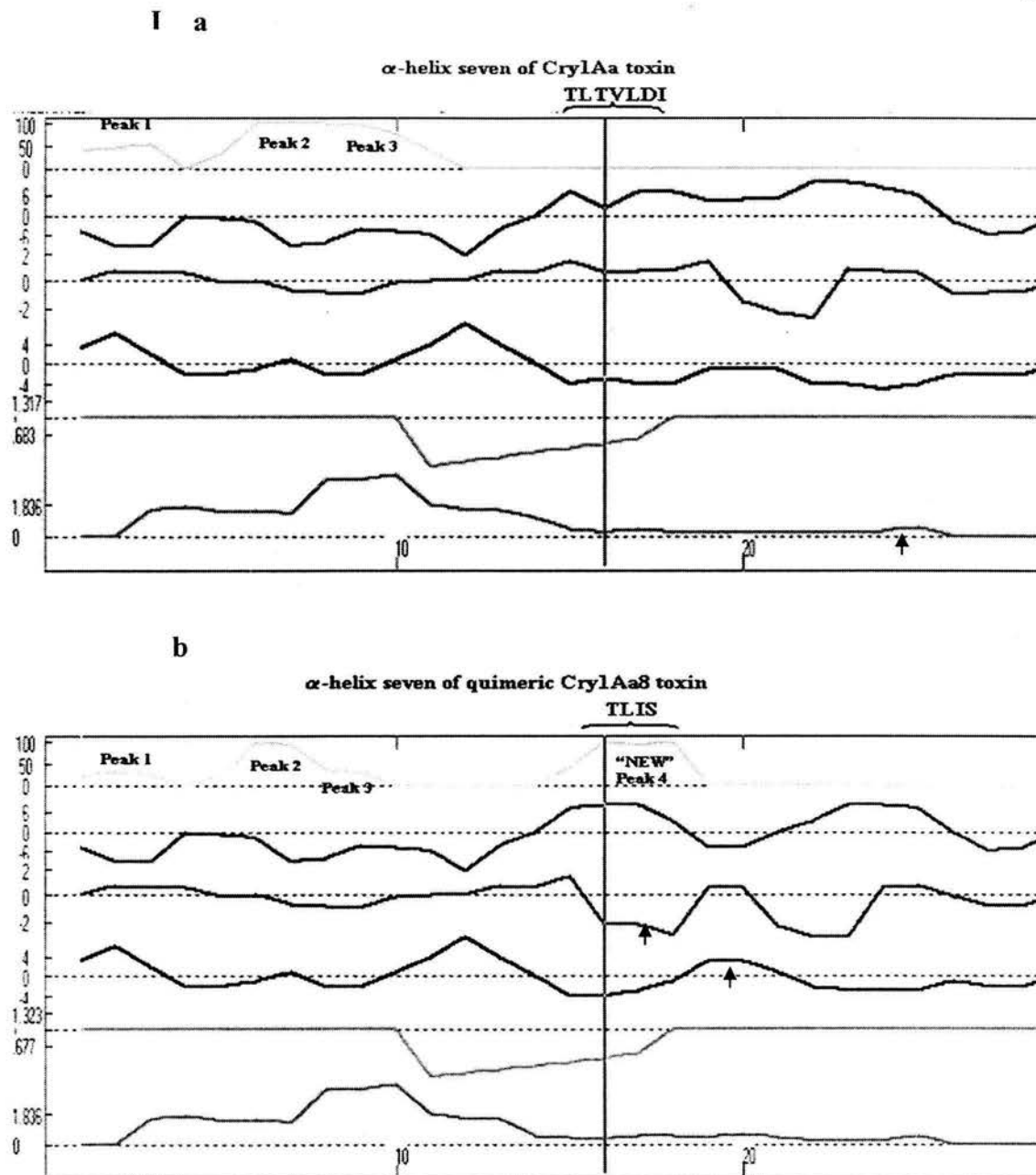
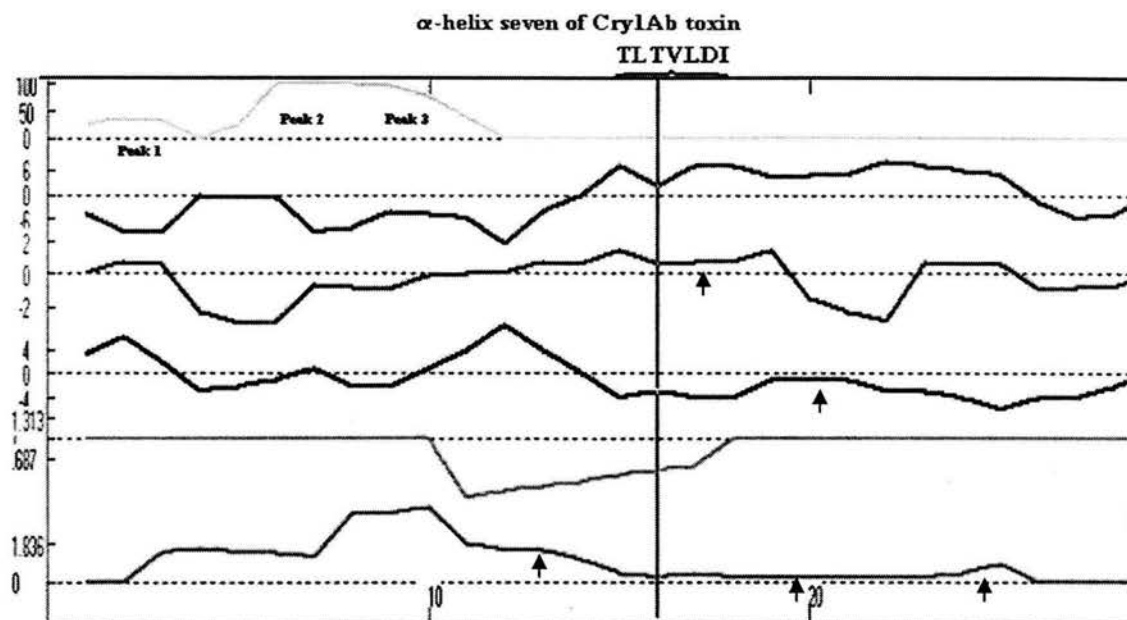


Figure 5. Physicochemical profiles of wild type (a) and quimeric (b) α -helix seven of CryIAa (I) and CryIAb (II) toxins. Antigenicity profile (yellow) according to Parker *et al.*, 1986; hydrophobicity (red), Kyte and Doolittle., 1982; antigenicity profile (dark green) according to Welling *et al.*, 1985, hydrophilicity (dark blue), Hopps and Woods., 1981; transmembranous regions (blue), von Heijne, 1982; solvent exposed (green), Boger *et al.*, 1980. Differences between wild type and quimeric α -helix seven (arrows).

II a



b

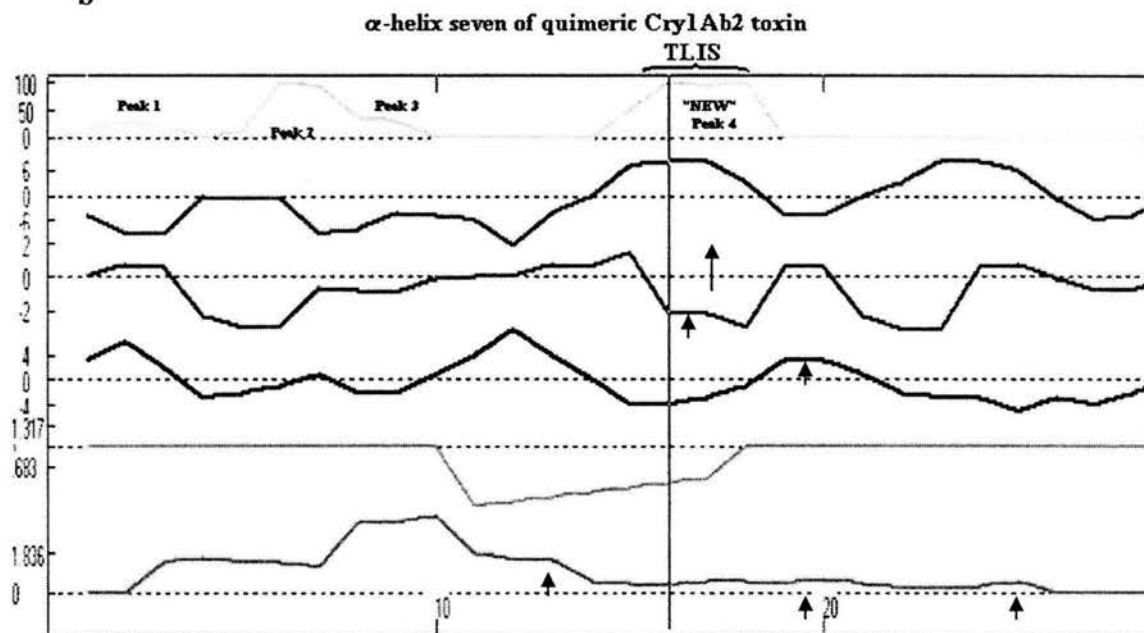


Table 2. Physicochemical parameters of the antigenic aminoacids in wild type and quimeric α -helix seven from Cry1A toxins

PHYSICOCHEMICAL PARAMETER	*Peak 1 223S 224R 225D	*Peak 2 226V 227R 228Y 229N 230Q	*Peak 3 232F 233R
Antigenicity Parker <i>et al.</i> , 1986	35 (21) 26 (16) ^a 44 (32) 36 (27) ^a 52 (26) 31 (21) ^a	31 (18) 23 (12) ^a 100 (100) 100 (94) 100 (98) 97 (98) 97 (90) ^a	70 (0) 38 (0)
Hydrophobicity Kyte and Doolittle, 1982	-7.5 (-7.5) -7.5 (-7.5) -7.5 (7.0) ^a -9.5 (-9.5)	-7.5 (-7.5) -7.5 (-7.5) -8.0 (-8.0) -9.0 (-9.0) -11.5 (-11.5)	-7.5 (7.0) ^a -8.0 (7.5) ^a -11.5 (-11.5)
Antigenicity Welling <i>et al.</i> , 1985	.300 (0.300) .618 (0.618) .600 (0.600) .600 (-0.085) ^a	-.093 (-.093) -3.0 (-3.0) ^a -.120 (-.120) -3.0 (-3.0) ^a -.840 (-.840) -2.3 (-2.3) ^a -.787 (-.787) -2.2 (-2.2) ^a -.830 (-.830)	-0.048 (-0.048) -0.076 (-0.076)
Hydrophilicity (Hopp and Woods, 1981)	2.5 (2.5) 3.5 (3.5) 3.0 (3.0)	0.0 (0.0) -1.0 (1.5) ^a -1.0 (-1.0) -1.5 (-1.5) ^a -2.5 (-2.5) -3.0 (-3.0) ^a -1.0 (-1.0) 1.5 (1.5)	2.5 (2.5) 2.5 (1.0) ^a 4.5 (4.5)
Helicoidal membranous regions (von Heijne, 1992)	1.0 (1.0) 1.0 (1.0) 1.0 (1.0)	1.0 (1.0) 1.0 (1.0) 1.0 (1.0) 1.0 (1.0) 1.0 (1.0)	1.00 (1.00) 0.05 (0.03) 4.03 (2.53) ^a
Solvent accessibility (Boger <i>et al.</i> , 1986)	0.00 (0.00) 1.64 (1.64) 1.64 (1.45) ^a	1.47 (1.47) 1.58 (1.58) 1.39 (1.70) ^a 1.26 (1.26) 1.44 (1.44) ^a 3.32 (3.32) 1.19 (1.19) ^a 3.32 (3.32) 3.32 (3.67) ^a	3.67 (3.67) 1.88 (1.11) 1.88 (1.88) ^a

*peaks 1, 2 and 3 correspond to physicochemical profile from figure 5 (I) and (II). Values in parentheses correspond to antigenic aminoacid residues of the Cry1A quimeric toxin. No label means, similar values between the three quimeric toxins Cry1Aa8, Cry1Ac3 and Cry1Ab2. ^aCry1Ab toxin values different from the quimeric toxins Cry1Aa8 and Cry1Ac3.

Table 2A. Physicochemical parameters of the wild type motif (239TVLIDIVAL245) and quimeric motif (239ISSDSIGV245) in α -helix seven of domain I from Cry1A toxins

PHYSICOCHEMICAL PARAMETER	237T	238L	239T-I ;	240V-S	241L-S	242D-D	243I-S	244V-I	245A-G 245S-G ^b	246L-V
Antigenicity Parker <i>et al.</i> , 1986	0 (43) 0 (49) ^a	0 (100)	0 (91)	0 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (0) 16 (0) ^a 0 (0) ^a	0 (0)
Hydrophobicity Kyte and Doolittle 1982	9.0 (9) 4.5 (5) ^a	11.5 (7) 6.5 (7) ^a	9 (7)	9 (2.5)	10 (1)	9.5 (-1) 8.5 (-1) ^a	12.0 (1) 10.5 (1) ^a	13.5 (5) 11.5 (5) ^a	11.5 (7.5) 8.0 (7.0) ^a	7.5 (7.0) 7.0 (7.5) ^a
Antigenicity Welling <i>et al.</i> , 1985	1.42 (-1.45) 1.42 (-0.05) ^a	1.37 (-1.90)	1.74 (-1.53)	-0.181 (-2.30) -0.78 (-2.30) ^a	0.27 (-1.96)	-1.49 (-2.43)	-1.48 (-2.42) -1.55 (-2.75) ^a	-1.81 (-2.44) -1.95 (-2.45) ^a	-0.36 (-2.43) -1.23 (-2.46) ^a	-1.14 (1.87)
Hydrophilicity Hoops and Woods, 1981	-4 (0) -2 (-2) ^a	-4 (-6.0) 1 (3.5) ^a	-4.5 (-3.0)	-6.5 (1) -4.0 (-1) ^a	-3.5 (0.5)	-3.0 (1.5) -2.5 (1.5) ^a	-3.5 (0.5)	-5.5 (-2) -5.0 (-2) ^a	-4.5 (-2.5) -4.5 (3.5) ^a	-6.5 (3.5) -6.5 (4.5) ^a
Helicoidal membranous regions (von Heijne, 1992)	.41 (33)	.50 (41) .49 (41) ^a	.59 (51) .58 (50) ^a .56 (50) ^a	.10 (1.0) .67 (0.6) ^a .64 (0.6) ^a	1.0 (1.00) 0.7 (0.66) ^a	1.00 (1.00) 0.78 (0.71) ^a	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
Solvent accessibility (Boger <i>et al.</i> , 1986)	.42 (37)	.20 (28)	.40 (57)	.20 (53)	.18 (45)	.12 (64) .16 (64) ^a	.14 (22) .14 (35) ^a .18 (35) ^a	.14 (22) .19 (22) ^a	.12 (17) .18 (20) ^a	0.26 (21) 0.40 (24) ^a

- Cry1Aa (Cry1Aa8), ^aCry1Ab (Cry1Ab2), ^cCry1Ac (Cry1Ac3) values of antigenic amino acids. Values in parentheses correspond to aminoacids in the quimeric α -helix seven. Wild type and quimeric Cry1A toxins, Cry1Aa, Cry1Ac have very similar values. LIS, new peak in figures 5I, and 5II.

Table 3. Analysis of the wild type and quimeric α -helix seven of domain I amphiphilicity

Aminoacid residue	helix	sheet	helix angle	Sheet angle
236 L	63 (115)	59 (21)	90 (98)	180 (164)
237 T	81 (131)	86 (56)	90 (118)	147 (140)
238 L	23 (39)	60 (41)	90 (120)	174 (140)
239 T - - (D)	27 (23)	64 (37)	90 (90)	146 (147)
240 V - - (S)	56 (12)	91 (15)	120 (90)	140 (140)
241 L - - (S)	79 (26)	65 (31)	120 (120)	140 (140)
242 D - - (D)	94 (26)	34 (32)	104 (90)	140 (143)
243 I - - (S)	58 (11)	50 (22)	120 (120)	140 (144)
244 V - - (D)	56 (28)	45 (13)	119 (112)	180 (140)
245 A - - (G)	58 (46) 49 (46) ^c	32 (26) 25 (26) ^c	113 (120))	180 (140)
246 L - - (V)	48 (33)	5 (21)	97 (117)	157 (180)
247 F	24 (30)	6 (14)	111 (112)	140 (180)

-values in parentheses are from the quimeric α -helix seven amino acid residues, ^ccorrespond to values from CryI Ac toxin different.

5III.

wild type α -helix seven of CryIA toxins.

223 SRDWVRYNQFRRELTLVLDIVALFSNY 247

quimeric α -helix seven of CryIA toxins.

223 SRDWVRYNQFRRELTLISSDSIGVLTVLSNY 247

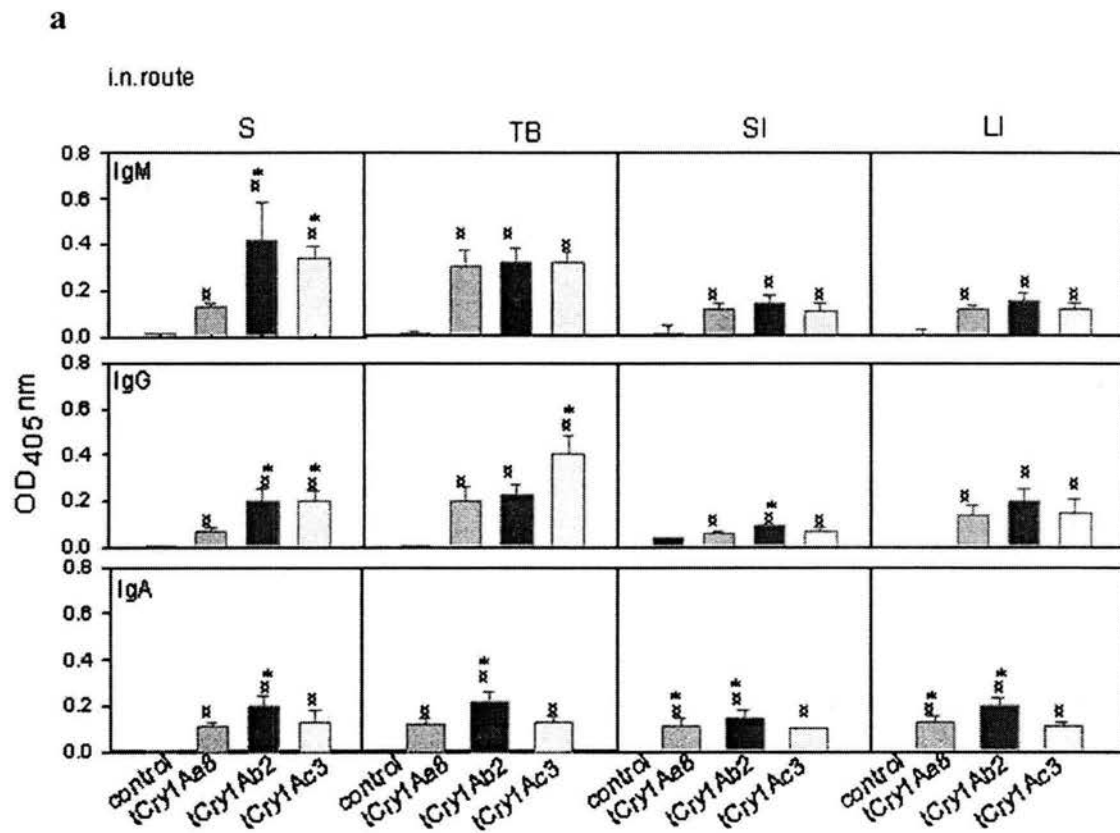
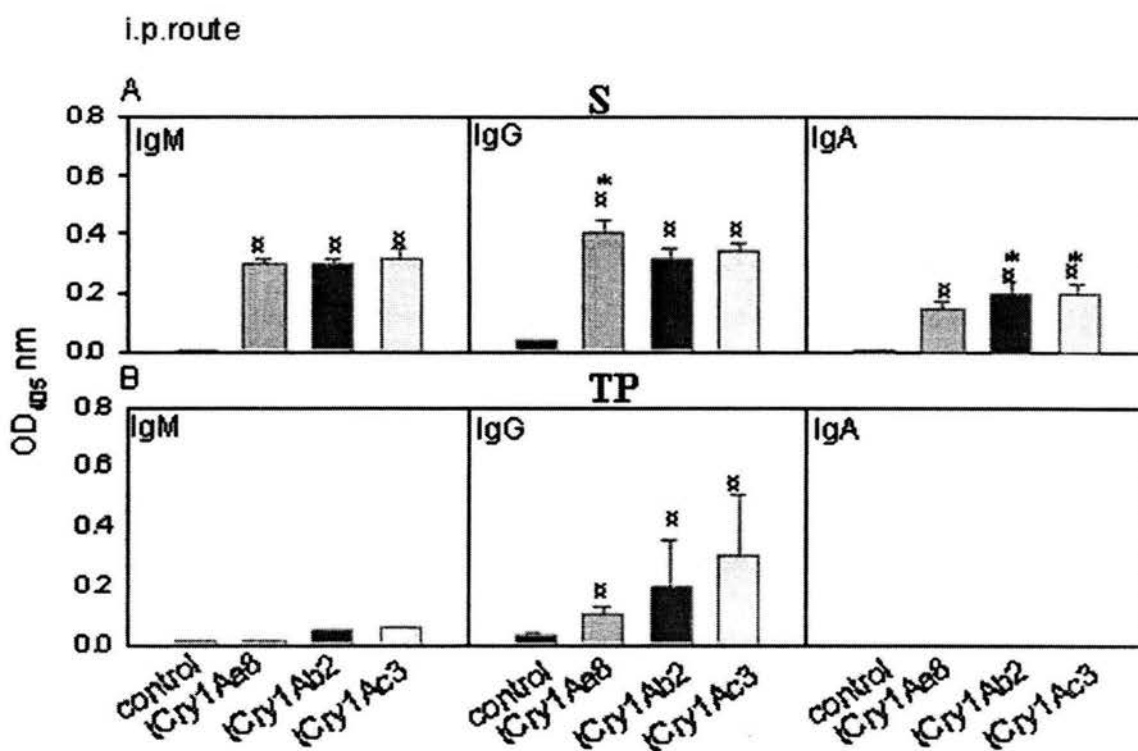
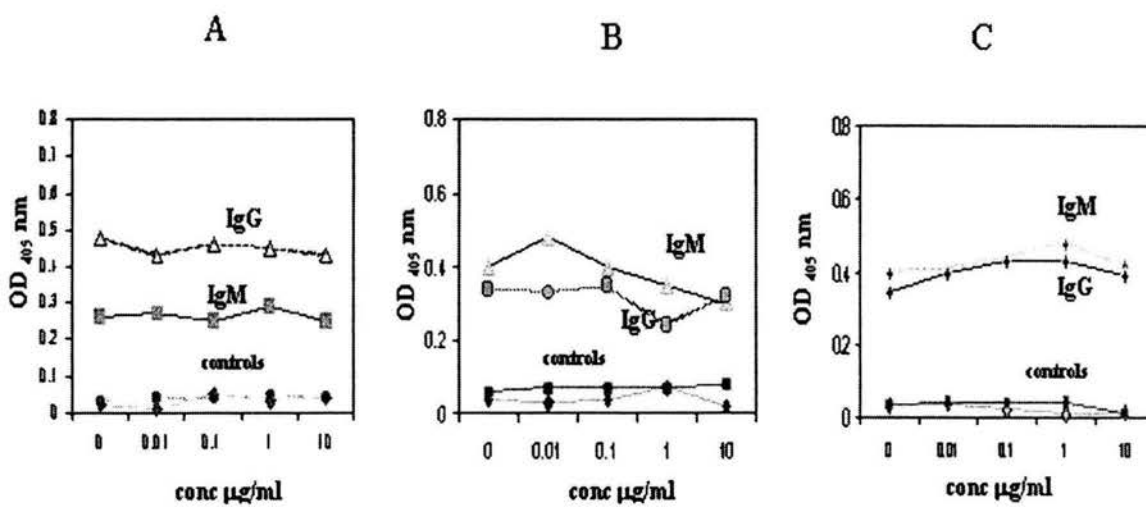


Figure 6. Antigenicity of the DTB motif in α -helix seven Cry1A toxins, evaluated by the detection of the Ab in all the fluids analyzed by intranasal (a) and intraperitoneal route (b) analyzed by indirect ELISA, and expressed as the average OD 405 nm \pm SD of five individual mice. Specificity of the anti-diphtheria toxin, anti-Cry1Aa8 (A), anti-Cry1Ab2 (B) and anti-Cry1Ac3 (C), are given as the average OD 405 nm \pm SD of five individual mice; control animals, immunized with and without the inhibitor (wild type Cry1A toxins)

b



c



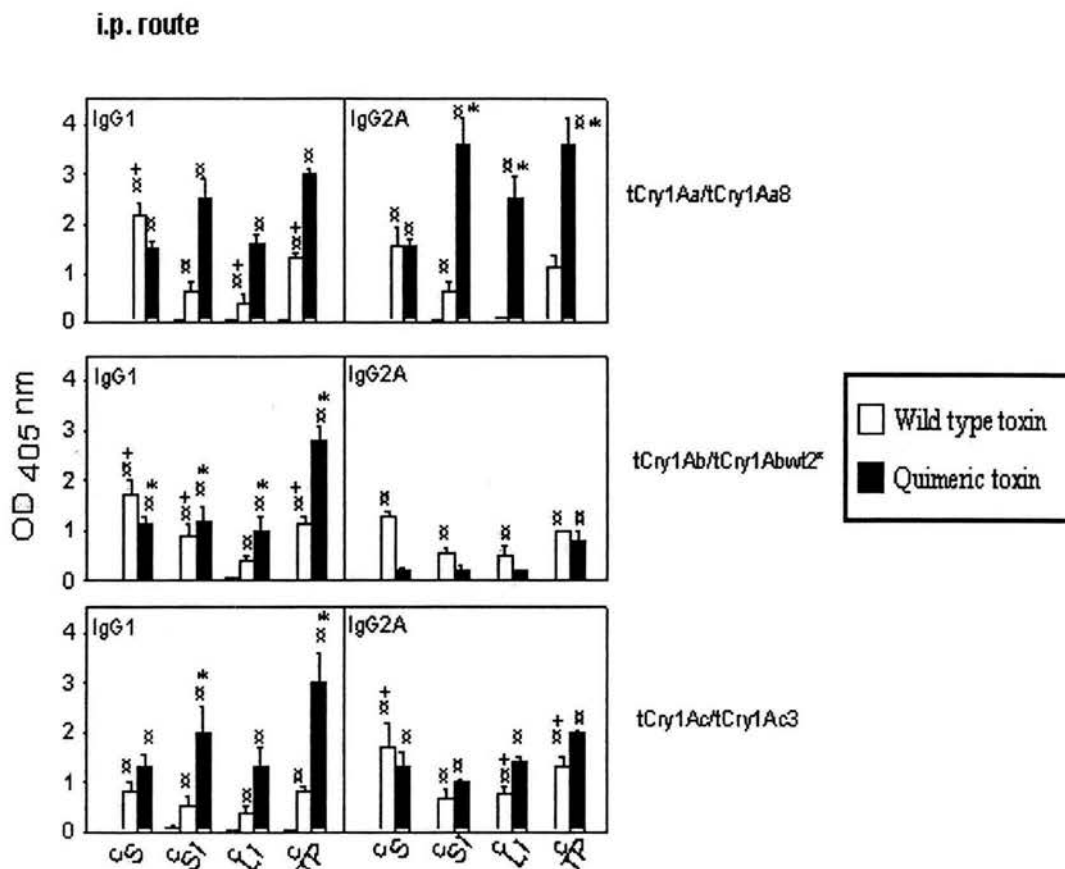


Figure 7. Wild type and quimeric Cry1A toxins induce a mix of IgG Ab subclass, IgG1 and IgG2a, (indirect measure of the Th cellular immune response), indicating a mix of Th1-Th2 cellular immune response. In addition, quimeric Cry1A toxins were able to modulate these Th cellular response toward Th2 (IgG1 < IgG2a) after intraperitoneal route. The detection of the antibodies in serum (S), small intestine (SI), large intestine (LI) and tracheopulmonary fluids (TP) was measured by indirect ELISA. Ab levels are expressed as the average OD 405 nm \pm SD of five individual mice. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: (□) versus control animals; (*) between Cry1A quimeric toxins; (+) between wild Cry1A type.

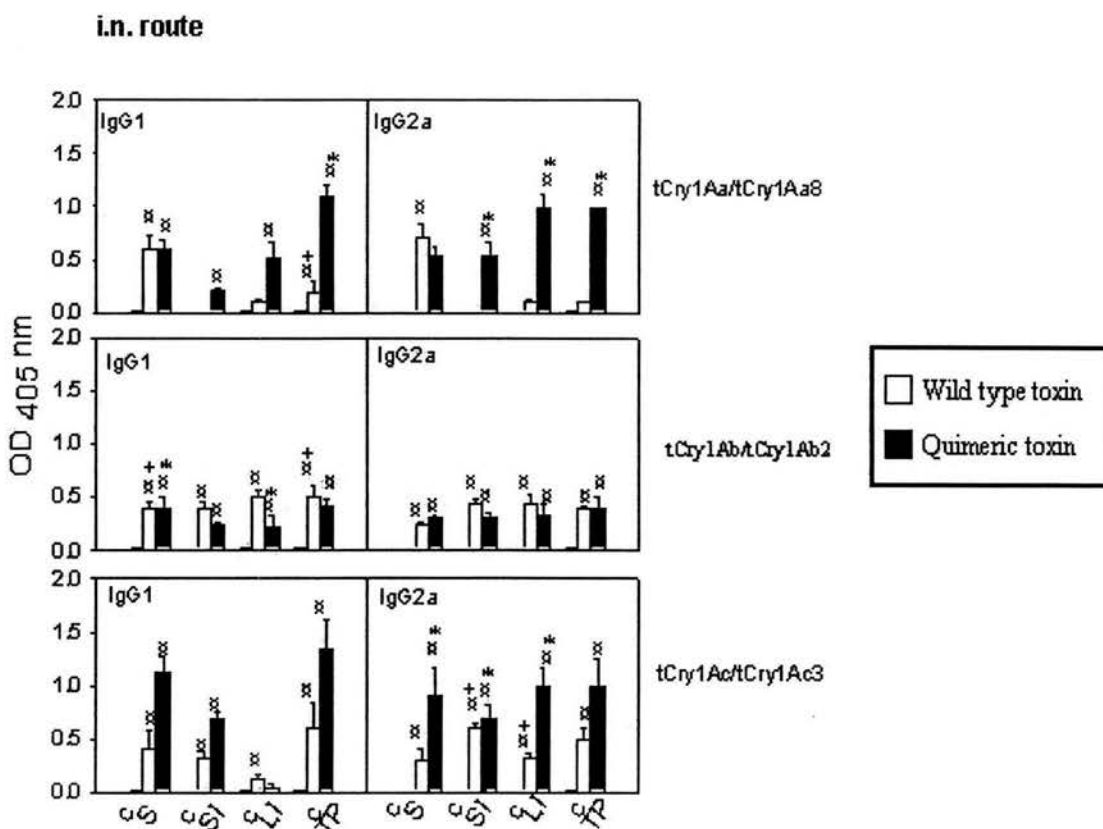


Figure 8. Wild type and Quimeric Cry1A toxins induced a similar pattern of IgG1 and IgG2a Ab after intranasal immunization in BALB/c mic in the different fluids analyzed, serum (S), small intestine (SI), large intestine(LI) and tracheopulmonary fluids (TP). Except wild type Cry1Ac toxin, which elicited a higher level of IgG2a Ab, indicating a bias to Th1 cellular immune response, whereas the quimeric toxin, Cry1Ac3 induced a mix of IgG1 and IgG2a Ab, indicating a mixed phenotype Th1-Th2. The levels of these subclasses of Ab are expressed as the average OD 405 nm \pm SD of five individual mice. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: (α) versus control animals; (*) versus between Cry1A quimeric toxins; (+) between wild type.

Apéndice 3: La unión de los dominios tipo lectina de las toxinas Cry1A a las células del sistema inmune es un primer paso en la inducción y modulación de una respuesta inmune celular Th en ratones BALB/c.

Lectin like binding by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins is a first step in the induction and modulation of the Th cellular immune response by Cry1A toxins in BALB/c mice.

¹Guerrero GG*, ²Russell, M. and ¹L. Moreno-Fierros. ¹Laboratorio de Inmunidad de mucosas. Unidad de Biomedicina. FES IZTACALA. UNAM. Av de los Barrios No 1. Col. Los Reyes Iztacala. Tlanepantla, Edo de México. ²Witebsky Center of Microbial Pathogenesis. Department of Microbiology and Immunology. SUNY. Buffalo, NY. USA.

Abstract.

The mechanism of the induction of the Th cellular immune response by *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins in vertebrates is investigated. Using kinetics of induction of Th1-Th2 cytokines by spleen cells stimulated *in vitro* with wild type Cry1A and quimeric toxin (DTB motif in α -helix seven domain I) and inhibition assays with N-acetylgalactosamina (GalNAc), in this work, is shown, that lectin-like binding of Cry1A toxins to the receptors on immune cells is the initial step in this mechanism. Spleen cells stimulated with Cry1Aa toxin induce a small amount of IL-10, IL-4 (Th2 type cytokines) and IL12p70, IFN- γ (Th1 type cytokines) at very early times (4 hs). The production of both types of cytokines, except IL10 was inhibited by the preincubation of the toxin with GalNAc. Quimeric Cry1Aa8 toxin induce higher levels of IL10, IL12p70 and IFN- γ than wild type at all times measured, except IL-4. The production of the three cytokines was also inhibited by GalNAc. Moreover, both types of toxins were able to activate in greater proportion B cells than T cells; and to prime different populations of effectors cells, i.e. IL12p70 producer cells were primed by Cry1A toxins whereas, IFN- γ and IL10 producers cells were primed by Cry1Aa8. All these data together, indicate that GalNAc is part of the Cry1A receptor on immune cells and support the assumption that one mechanism that can be used by these toxins for the modulation of the Th cellular immune response is signalling via receptors on immune cellst through its lectin like binding domains.

*To whom correspondence should be addressed: gloriaquillermana@correo.unam.mx

Keywords, δ -endotoxin, *Bacillus thuringiensis*, immunomodulatory molecules, lectin like domains, N-Acetylgalactosamina, alpha helix seven .

Abbreviations used. Cry1A toxins, Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac. DTB, diphtheria motif B fragment, IL, interleukin, SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate, TB, terrific broth. SEC, Size exclusion chromatography. GalNAc, N-Acetylgalactosamine, LPS, Lipopolysaccharide, GM1,

Introduction.

δ -endotoxin forms part of a family of insecticidal crystal proteins (ICPs) produced by *Bacillus thuringiensis*, during sporulation, toxic to a different orders of insects as well as to other invertebrates (Schnepf *et al.*, 1998). Upon ingestion by a susceptible insect, the inclusion or protoxins (~ 130 kDa) are solubilized and activated by the insect midgut proteases into a 65 kDa toxin. After binding to receptors in the gut, the activated toxin form cationic pores that destroy the large transepithelial potential, leading to an increase in intracellular pH and larval death. δ -endotoxin are also members of the pore forming bacterial toxins. They are composed of three domains as was resolved by x ray diffraction (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995; Galistky *et al.*, 2001). Domain I, is a bundle of seven alpha helix, involved in pore formation. Domain II, a three anti-parallel β -sheets, is the receptor binding domain, whereas, Domain III, a β sandwich of two anti-parallel β -sheets, is important for the stability of the toxic fragment (Li *et al.*, 1991), and recently involved in receptor binding (Burton *et al.*, 1999) as well as in the regulation of the pore formation activity (Chen *et al.*, 1993). Lectin binding properties of the Cry toxins reside in domain II and domain III (Cry1Ac toxin). Domain II, constitute the most divergent region of the Cry1A type toxins. Interestingly, its tridimensional structure is shared with other carbohydrate binding proteins such as vitelline membrane outer layer protein I (VMOI), jacalin (Sankaranarayanan *et al.*, 1996); KM⁺ manose *Arthocarpus integrifolia* (jackfruit) (Rosa *et al.*, 1999), and *Maclura pomifera* agglutinin (MPA) from the genus *Maclura* (Lee *et al.*, 1998). By other hand, domain III is similar with the N-terminal cellulose-binding domain from the bacterium *Cellulomonas fimi* 1,4- β -glucanase CenC (Johnson *et al.*, 1996). Receptor binding is a key step in specificity and toxicity of Cry

Faltan páginas

N° 114 - 115

Aproximately 1×10^6 cells were labeled with 0.1 μg of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD4, FITC-labeled B220, and phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD69 mouse antibodies, and isotype matched controls (Pharmingen) in a total volume of 100 μl of staining buffer. Then cells were washed with cold staining buffer containing 0.05% sodium azide. Flow cytometry analysis was performed using FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Dead cells were excluded from analysis using propidium iodide (Molecular Probes, Eugene, OR) staining. Lymphocytes were gated according to forward and side scatter and at least 10,000 events were acquired and analyzed. Numbers were calculated against the relevant staining controls.

Statistical analysis. Data are expressed the mean \pm SD for independent experiments. Statistical analysis was performed using ANOVA .

Results

Wild type Cry1A type toxins induce small amounts of Th1-type and Th2 type cytokines .

Spleen cells from BALB/c mice stimulated with Cry1Aa toxin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), produced small and moderate amounts of Th1 and Th2 cytokines, both, accumulated at very early times (4 h). For example, IL-4 (a Th2 type cytokine) started to accumulate at 4 hs, followed by an slight increase at 24 hs and 72 h (Fig. 1A); whereas, IL10 (Th2 also) was produced also in small amounts only at 4 h (Fig. 1A). IFN- γ (a Th1 type cytokine) accumulate very early followed by a linear decrease (Fig. 1A). IL12p70 production was small and reached a maximum at 24 h, followed by an extinction at later times points (Fig. 1A).

Quimeric Cry1A toxin induce mostly Th1 type cytokines.

Remarkably, after spleen cells were stimulated with Cry1A8 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), it was observed differences in the magnitude of Th1-Th2 type cytokines induced with respect to Cry1Aa toxin (Fig. 1A-B). Thus, for example, IL10 accumulated in small amount at 24 h followed by a sustained production at later times points (Fig. 1B). IFN- γ production reached a plateau at 48 h, followed by a decrease at 72 h (Fig. 1B). IL12p70 was synthesized at significant amount than LPS (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), but the induction reached a plateau at later times (24 h) (Fig. 1B). The production of IL10 at this time is low (Fig. 1B) and there was not IL4 (Fig. 1B). In contrast, LPS induced in significant and small amounts, IL10 and IL-4, respectively (Fig. 2A). Furthermore, spleen cells stimulated with diphtheria toxin (DT) (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), produced mostly IL-10 (a Th2 type cytokines) and moderate amounts of IL-4 (Fig. 2B). While IFN- γ (a Th1 type cytokine) was produced in a small amount at two different times 4 and 72 h (Fig. 2B), and it did not induce IL12p70 (Th1). Concanavalin (ConA, 125

$\mu\text{g/ml}$) induce significant amount of IFN- γ , IL-4 and IL-10 (Fig 2C). These data suggested us that quimeric Cry1A toxins are priming IFN- γ and IL-10 T cell producers.

Wild type Cry1A toxin induce predominantly a component cellular (Th1) after restimulation of spleen cells from intranasally primed Balb/c mice.

Spleen cells from BALB/c mice primed intranasally with Cry1Aa toxin and restimulated with ConA produced small amounts of Th1 type cytokines (Fig 3A). In contrast, spleen cells restimulated *in vitro* with Cry1Aa (10 $\mu\text{g/ml}$), produced predominantly a Th1 component, IL12p70 (Fig. 3C) which reached a plateau at 24 h, whereas, IL10 production by Cry1Aa, was small and a plateau was observed after 24 h of *in vitro* stimulation, consistent with the capacity of the Cry1A toxins to modulate Th1 and Th2 type cytokines. In fact, the production of IL12p70 was higher than that induced by LPS (Fig.3B). Even more, spleen cells restimulated with Cry1Aa8 (Fig 3C) showed a different kinetics of induction than Cry1Aa, LPS, and DT (fig 3B). It was observed an steadily increase until 24 h, followed by a decrease (Fig. 3C). Cry1Aa and Cry1Aa8 induced also IL10 at later times than the maximum of IL12p70, strengthening one more time, the capacity of the Cry1A toxins to function like immunodulatory molecules, similarly to other bacterial derived products (Williams *et al.*, 1999; McGuirk *et al.*, 2002; Langenkamp *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2001; Constant *et al.*, 2002).

Quimeric Cry1Aa8 toxin induce a mix of Th1-Th2 type cytokines after restimulation of spleen cells from intranasally primed BALB/c mice

Next, to address directly the above assumption mice were primed by intranasal immunization administration. Interestingly, spleen cells restimulated with Cry1Aa and Cry1Ac, both induced significant amounts of IL10 and IFN- γ (Fig. 4). The two pore forming mutants showed a similar production but with a different kinetic (Fig. 4). Spleen cells restimulated with these both types of Cry1A toxins did not produce IL12p70 (Fig.4). In contrast, spleen cells restimulated with LPS and DT did not produced any amount of cytokines; suggesting that priming of cells by Cry1Aa8 toxin is specific for molecules like lectins since ConA was able to induce significant amounts of IFN- γ and IL10 with moderate production of IL-4 but no IL12p70 (Fig 4D).

Cry1A toxins causes increased activation of spleen B cells. Spleen cells from BALB/c mice (Fig 5 I, A-D) and spleen cells from intranasally primed BALB/c mice (I, A'-D'') were stimulated different type of Cry1A toxins, Cry1Ac (Fig 5I), Cry1Aa (Fig 5II), DT and Cry1Aa8 (Fig 5II), respectively. A high proportion of B cells [B220+(CD69+)] were activated from unprimed mice (B-D) than from intranasally primed mice (B'-D'). In contrast, a less proportion of T cells (CD3+/CD69+) than B cells were activated by Cry1Ac toxin (Fig. 5I). Similar results were observed in the case of the Cry1Aa and Cry1A8 toxins (Fig. 5II). Even more, it was observed that GalNAc inhibit partially the activation of B cells (Fig 6II) whereas, stimulate the activation of T cells (Fig 6I). These preliminary results suggest the assumption that the cellular effects induced by the Cry1A toxins, could be mostly on B cells.

N-Acetylgalactosamine inhibits the cytokine induction by wild type and pore forming Cry1A mutants.
To assess the assumption that a first step in the immuno modulatory capacity of the Cry1A toxins is the lectin like binding of these toxins to B and T cells, spleen cells from unprimed and intranasally primed mice were stimulated and restimulated with the mix Cry1A toxin : GalNAc. Essentially, similar results were found whether the spleen cells were from unprimed (Fig 7) and primed mice (Fig. 8). IFN- γ and IL12p70 (Th1) production by these toxins were inhibited at all times measured, except IL10 production by spleen cells stimulated and restimulated with Cry1Aa and Cry1Ac toxins, respectively, instead it was observed an stimulation. Conversely, IL-10 production by spleen restimulated with ConA and Cry1A8 (Fig 7) was inhibited by the aminosugar, especially in the case of Cry1Aa8.

Discussion.

Lectins are a class of carbohydrate-binding proteins, devoid of catalytic activity, that exert their biological activity by binding to mono- and oligosaccharides (Lis and Sharon., 1998). Bacterial toxins are also, carbohydrates binding proteins, called sometimes lectins (Loris *et al.*, 2002). These toxins exerts its potent immunogenicity by binding to the glycosphingolipid, GM1 ganglioside [Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)(NeuAc(α 2-3))Gal((β 1-4)Glc(β 1-1)ceramide)] on the surfaces of mammalian cells in vertebrates (Nashar *et al.*, 1996; Lavelle *et al.*, 2000). In this work is reported the involvement of the lectin like binding domains in the strong immunogenicity induced by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. Our results stress not only the capacity of the Cry toxins to induce and modulate the Th cellular immune response but suggest that a first step in these

capacities is the lectin like binding by Cry1A toxins to to receptor (s) specific for GalNAc on immune cell. Furthermore, it is proposed that alpha helix of domain I is assisting to domain II in the initial interactions with the immune cells because it is in close contact with this domain and due to its hydrophobic nature (Guerrero *et al.*, submitted).

It is well documented that other bacterial toxins by binding to the glycosphingolipid, GM1 ganglioside [Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)(NeuAc(α 2-3)Gal((β 1-4)Glc(β 1-1)ceramide)] on the surfaces of mammalian cells (Nashar *et al.*, 1996; Lavelle *et al.*, 2004), not only modulate the Th cellular immune response but the lymphocytes subsets (Nashar *et al.*, 1996), whereas plant lectins, like jacalin, by binding specifically to Gal- β -1,2-GalNAc and to others monosaccharides (Pinneau *et al.*, 1991) activate CD4⁺ T cell lymphocytes and inducing them to divide; other lectins that are also carbohydrate-binding proteins, devoid of catalytic activity, such as, concanavalin (ConA), and phytohemagglutinin (PHA) (Lis and Sharon., 1998), are potent mitogen of T cells (Lis and Sharon *et al.*, 1998). Interestingly, we found 100% inhibition of the cytokine production by spleen cells stimulated with Cry1A and Cry1Aa8, except IL10 which was enhanced (Cry1Aa and Cry1Ac) (Fig. 7, 8), suggesting that induction and modulation of the Th cellular immune response depends of binding to the receptor (s) specific for GalNAc on immune cells in mice. Furthermore, and similarly to other bacterial lectins (Lorie, 2002), bacterial Cry1A stimulate lymphocyte populations, a higher activation of B cells (CD69⁺/B220⁺) than T cells (CD69⁺/CD3⁺) was observed (Fig. 5I, II). This higher activation of B cells has been usually is associated with an enhancement of their competency as antigen-presenting cells (Lassila *et al.*, 1988) leading to activation and differentiation of the CD4⁺T cell populations into Th1 and Th2 subsets (Constant and Bottomly., 1997) and to the production of the appropriate cytokines for the differentiation of the B cells toward antibody producer cells. Furthermore, it was observed a differential activation by Cry1Ac toxin, whereas, T cells activation was stimulated in the presence of GalNAc, a 15-20% inhibition of B cell activation after 4 h of *in vitro* stimulation (Fig 6I-II). Therefore, Cry1A toxins could be modulating also not only the cytokine production but the lymphocyte subsets. This was further supported by the different effectors populations of immune cells after priming mice, first, by intranasal route followed by the restimulation *in vitro* of the spleen cells with wild type and quimeric Cry1A toxins (Fig. 3-4). The low levels of IL-4 detected in supernatants of spleen cell cultures could be due to several reasons, one is that reutilization of the cytokine by proliferating cells, since the induction of Th2 priming following intranasal antigen delivery has been

shown to require IL-4 (Herrick et al., 2000) and, second, after spleen cells of intranasally primed mice were restimulated with wild type (Cry1Aa, Cry1Ac) and quimeric Cry1A toxins (Cry1Aa8, Cry1Ab2) (Fig. 4) could be inducing T cell regulatory (Tr1), producers of high levels of IL10 with low or undetectable IL-4 (McGuirk et al., 2002); similarly to what has been reported for cholera toxin (Lavelle et al., 2003). In addition, these data, are strengthened by the kinetics of cytokine induction and inhibition of the cytokines, IL-10 and IL12 production by spleen cells. This ability is shared with other pathogen-derived immuno-modulatory molecules such as, bacterial toxins (CTx, Etx) (Willimas et al., 1999) LPS, CpG (Shirota et al., 2002) glycolipids. Some of these molecules stimulate IL10 production from macrophages and /or dendritic cells (DCs) (McGuirk et al., 2002) and /or inhibit IL12 signalling pathways (Ryan et al., 2001). However, little is known about APCs and cytokines that promote the induction of regulatory T cells *in vivo* (Shevach., 2002). Two examples of lectins, that has been reported to induce IL10 by dendritic cells (DCs) with suppressor activity, directing naïve T cells into regulatory phenotype; are the filamentous hemagglutinin (FHA) (McGuirk et al., 2002) and cholera toxin (Lavelle et al., 2004). In this work, it was found that spleen cells from intranasally primed mice and restimulated with Cry1Aa and Cry1Aa8 (Fig. 3-4) induce high and moderate levels significant amount of IL12p70 and no IL10 production at this time but at later times points (Fig.4), suggesting a induction of some type of regulatory cells.

In summary, in the present study, it is shown that a first step in the activation, induction of a cellular Th immune response by Cry1A toxins is precisely its lectin like binding domain II to the receptors on immune cells. Thus, Cry1A toxins represent a potential and safe mucosal adjuvant that can be used for the treatment of chronic diseases, inflammatory diseases, autoimmune and food allergy due to their abilities to induce regulatory T cells. So far, it could be used in the treatment of infectious disease also, specially caused by intracellular pathogens since they induced an important cellular component (Th1).

Acknowledgements. The author thanks the financial support of the Witebsky Center of Microbial Pathogenesis, SUNY. Buffalo, New York. USA. Graduate Studies from UNAM. México, D.F; Dr Sergio Arce for its technical assistance and fruitful discussion.

References.

1. H.E. Schnepf, N. Crickmore, J. van Rie, D. Dereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, and D.H. Dean. **1998**. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
2. J. Li, J. Carroll, & D.J. Ellar. **1991**. *Nature*. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. 353: 815-82
3. P. Grochulski, L. Masson, S. Borisova, M. Puzsai-Carey, J.L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **1995**. *J. Mol. Biol.* 254: 447-464
4. N. Galitsky, A.V. Cody, D. Wojtczark, J.R. Ghosh, W.L. Panghorn, and L. English. Structure of the insecticidal bacterial delta endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. **2001**. *Acta. D. Biol. Crystallogr.* 57 : 1101-1109.
5. R. Sankaranarayanan, K. Sekar, R. Banerjee, V. Sharma, A. Surolia, & M. Vijayon. **1996**. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a β -prism fold. *Nat. Struct. Biol.* 3: 596-603.
6. J.C. Rosa, P.S. Lopes de Oliveira, R.Garratt, L. Beltrmini, K. Resing, M.C. Roque-Barreira, and L.J. Greene. **1999**. KM⁺, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: Amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the β -prism fold. *Protein Sci.* 8: 13-24.
7. X. Lee, A. Thompson, Z. Zhang, H. Ton-that, J. Biesterfeld, C. Ogata, A.Z. Johnston, and N. M. Young. **1998**. Structure of the complex of *Maclura pomifera* Agglutinin and the T-antigen Disaccharide, Gal β 1-3GalNAc. *J. Biol. Chem.* 273(11): 6312-6318.
8. Shimizu, T. y K. Morikawa. 1996. The β -prism: a new folding motif. *TIBS.* 21: 3-6
9. J.S. van Rie, S. Jansen, H. Hofte, D. Degheele, and H. vanMellaert. **1990**. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1378-1385.
10. R.K.Vadlamudi., E. weber., I. Ji., T.H. Ji., and L.A. Bulla. **1995**. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270: 5490-5494.
11. S.L. Burton, D.J. Ellar, J. Li, and D.J. Derbyshire. **1999**. N-acetylgalactosamine on the Putative Insect Receptor Aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III Lectin-Like Fold of a *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin. *J. Mol. Biol.* 287: 1011-1022.
12. P.E. Johnson, D.J. Manish, P. Tomme, D.G. Kilburn & L.P. McIntosh. **1996**. Structure of the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem.* 35: 14381-14394.
13. X.J. Chen., M.K. Lee and D.H. Dean. **1993**. Site directed mutations in a highly conserved region of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9041-9045.

14. P. Denolf, K. Hendrickx, J. van Damme, S.Jansens, M. Peferoen, D. Degheele, J. van Rie. 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzyme related to *Bacillus thuringiensis* toxin binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 248: 748-761
15. P. Knight., N. Crickmore., and D.J. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11: 429-436
16. Y. Nagamatsu., *et al.* 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin. *FEBS Lett.* 460: 385-390.
17. R.I. Vázquez-Padrón, J. González-Cabrera, C. Garcia Tovar, L. 2000. Neri-Bazán, M. Hernández, L. Moreno-Fierros, R. López-Revilla, and G. A. de la Riva. Cry1Ac Protoxin from *Bacillus thuringiensis sp. kurstaki* HD 73 Binds to Surface Proteins in the Mouse Small Intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 54-58
18. Y.I. Kawamura, R. Kawashima, Y. Shirai, R. Kato, T. Hamabalat, M. Yamamoto, K. Furakawa, K. Fujihashi, J.R. McGhee, H. Hayashi, T. Dahi. 2003. Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NFi-kappaB translocation. *Eur. J. Immunol.* 33: 3205-3212.
19. A. Ozinsky, D.M. Underhill, J.D. Fontenot, A.M. Hajjar, K.D. smith, C.B. Wilson, L. Schroeder, A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 13766-13771.
20. G.G. Guerrero, D.H. Dean and L. Moreno-Fierros. 2004. Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins: Role of the N-terminal half. *Mol. Immunol.* 45: 1177-1183
21. A.Z. Ge., R.M. Pfister., and D.H. Dean. 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. *Gene.* 93: 49-54
22. P.E. Alcantara, O. Alzate, K. M. Lee, A. Curtiss, and D.H. Dean. 2001. Role of the α helix seven of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin in membrane insertion, structural stability and ion channel activity. *Biochemistry* 40: 2540-2547.
23. N.A. Williams, T.R. Hirst, T.O. Nashar. 1999. *Immunol. Today.* 20: 95-101.
24. P. McGuirk, Chantelle McCann, and Kingston H.G. Mills. 2002. Pathogen-specific T regulatory cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: A novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by. *J. Exp. Med.* 195(2): 221-231.
25. A. Langekamp, M. Messi, A. Lanzavecchia and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat. immunol.* 1(4): 311-316.
26. E.J. Ryan, L.M. Daly and Kingston H.G. Mills. 2001. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends in Biotech.* 19(8): 293-304. .

27. S.L. Constant, J.L. Brogdon, A. Damani, Ch. Piggott, A. Herrick, I. Visintin, N.H. Ruddle, and K. Bottomly. **2002**. Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation *in situ*. *J. Clin. Invest.* 110(10): 1441-1448.
28. T.O. Nashar, H.M. Webb, S. Eaglestone, N. Williams, and T. R. Hirst. **1996**. Potent immunogenicity of the B subunits of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: Receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. (immunol)* 93: 226-230.
29. R. Loris. **2002**. Principles of structure of animal and plant lectins. *Biochim Biophys. Acta.* 1572: 198-208
30. E.C. Lavelle, G. Grant, A. Puzstai, A. Pfuller, D.T. O'Hagan. **2000**. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. *Immunol.* 99: 30-37
31. E.C. Lavelle, A. Jarnicki, E. McNeela, M.E. Armstrong, S.C. Higgins, O. Leavy, and K.H.G. Mills. **2004**. Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent. *J. Leuc. Biol.* 756-763
32. N. Pineau, P. Aucoturier, J.L. Preud'homme, K. Hagiwara, K. Kobayashi. **1991**. *Mol. Immunol.* 28: 185-187
33. H. Lis, and N. Sharon. **1998**. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98: 637-674.
34. P. McGuirk, and K.H.G. Mills. **2002**. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol.* 23: 450-455.
35. L. Constant, and K. Bottomly. **1997**. The induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 297-322.
36. C.A. Herrick, H. McLeod, E. Glusac, R.E., Tigelaar, and K. Bottomly. **2000**. Th2 responses induced by epicutaneous versus inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. *J. Clin. Invest.* 105: 765-775.
37. O. Lassila, O. Vainio, & P. Metzinger. **1988**. Can B cells turn on virgin T cells. *Nature (London)*. 334: 253-256
38. P. McGuirk, Chantelle, McCann and K.H.G. Mills. **2002**. Pathogen-specific T regulatory cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: A novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses. *J. Exp. Med.* 195: 221-231
39. E.C. Lavelle, E. McNeela, M.E. Armstrong, O. Leavy, S.C. Higgins, K.H.G. Mills. **2003**. Cholera toxin promotes the induction of regulatory T cells specific for bystander antigens by modulating dendritic cell activation. *J. Immunol.* 171: 2384-2392
40. H. Shirota, K. sano, N. Hirasawa, T. Terui, K. Ohuchi, T. Hattori, G. Tamura. **2002**. B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J. Immunol.* 169: 787-

41. E.M. Shevach. **2002**. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 389-400.

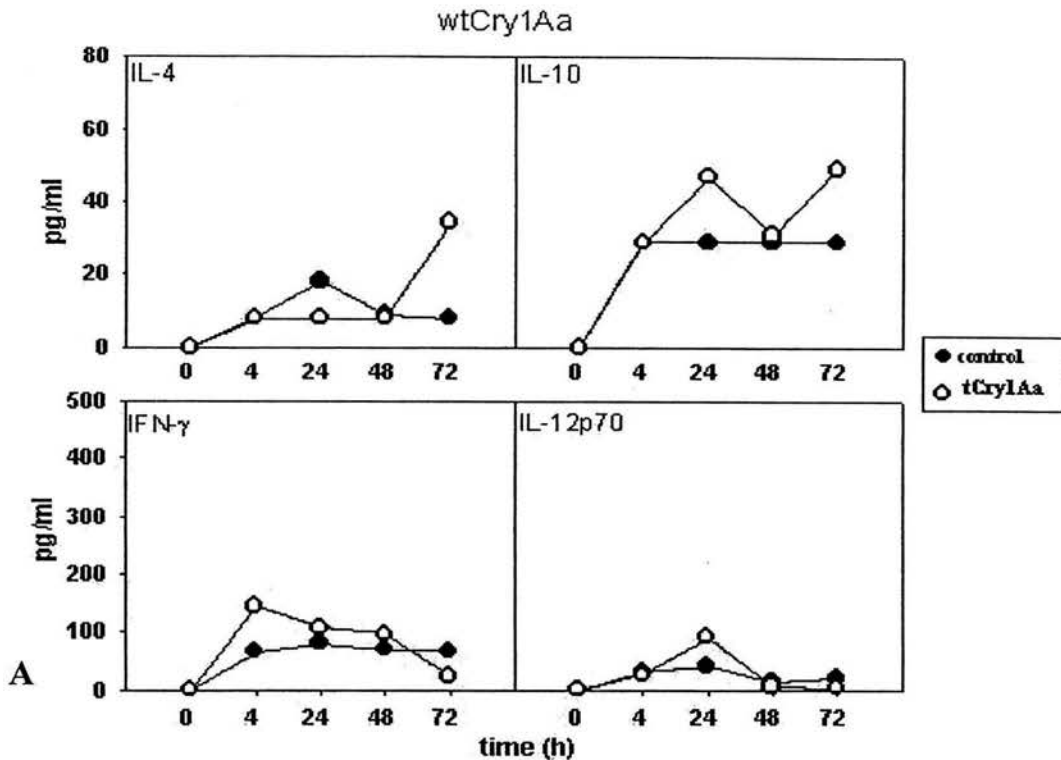
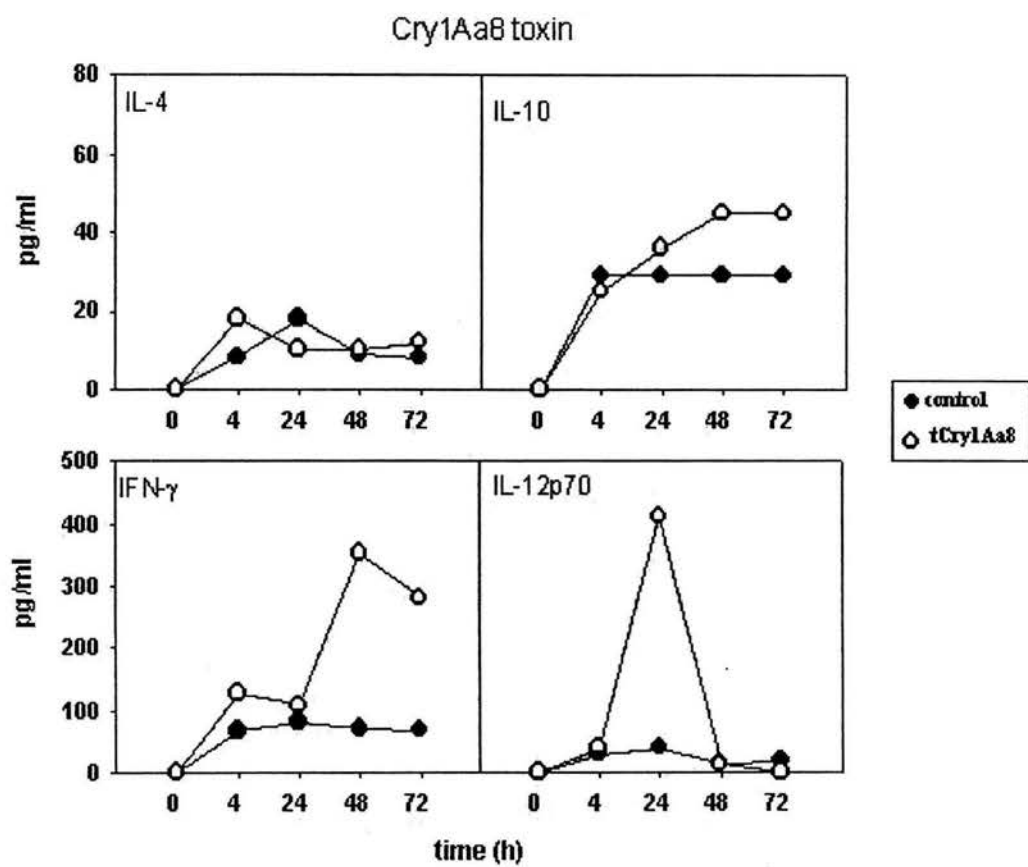


Figure 1. A. Wild type Cry1Aa toxin induce a mix of Th1-Th2 type cytokines. Spleen cells from unprimed BALB/c mice were stimulated *in vitro* with Cry1Aa (10 μ g/ml), and produced small amounts of IL10 and IL12, very small levels of IL-4 is produced at late times (white circles). B. Quimeric Toxins induce mostly Th1 type cytokines, IFN- γ and IL12p70 after stimulation of spleen cells from BALB/ c mice with Cry1Aa8 (10 μ g/ml). IL-4 and IL-10 is detected in low amounts Control (black circles). Concentration of cytokines present in the culture supernatants at different times were determined. Limit of detection was 7.8 pg/ml (IL-4); 31.3 pg/ml (IL-10); 15.6 pg/ml (IFN- γ) and 62.5 pg/ml (IL12p70), respectively, in the culture supernatants by ELISA. It is shown one representative experiment.

B



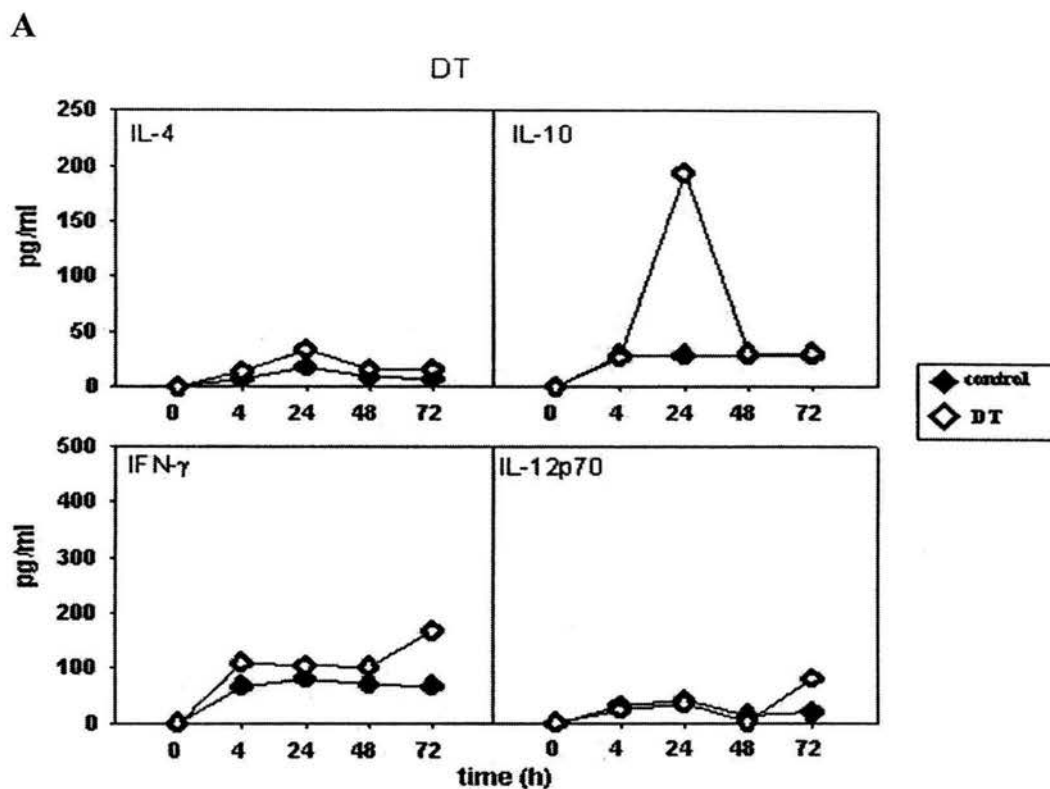
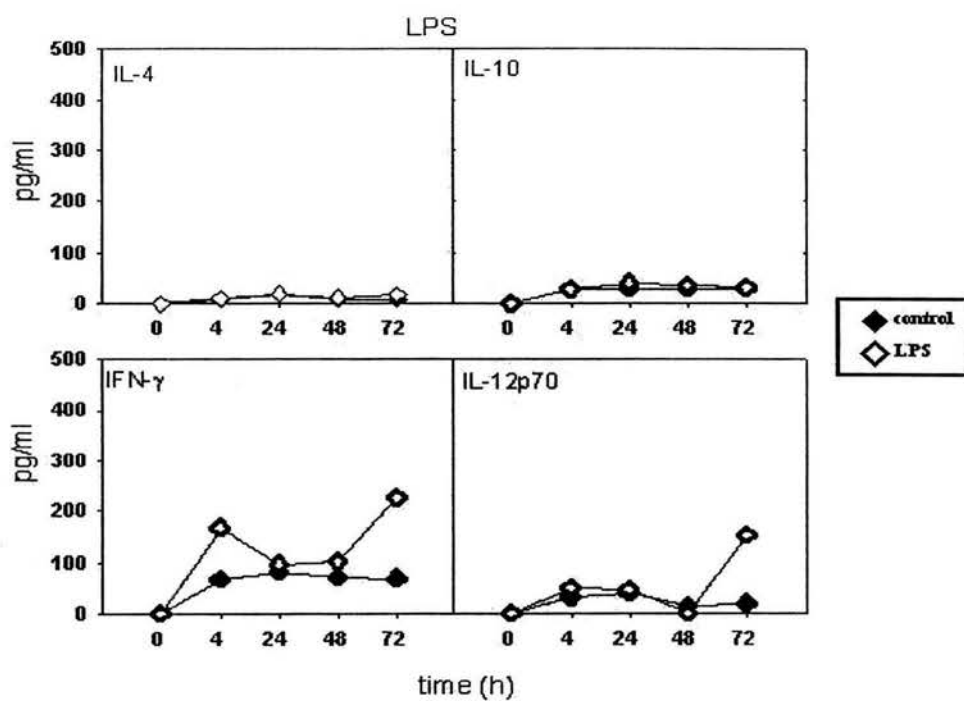
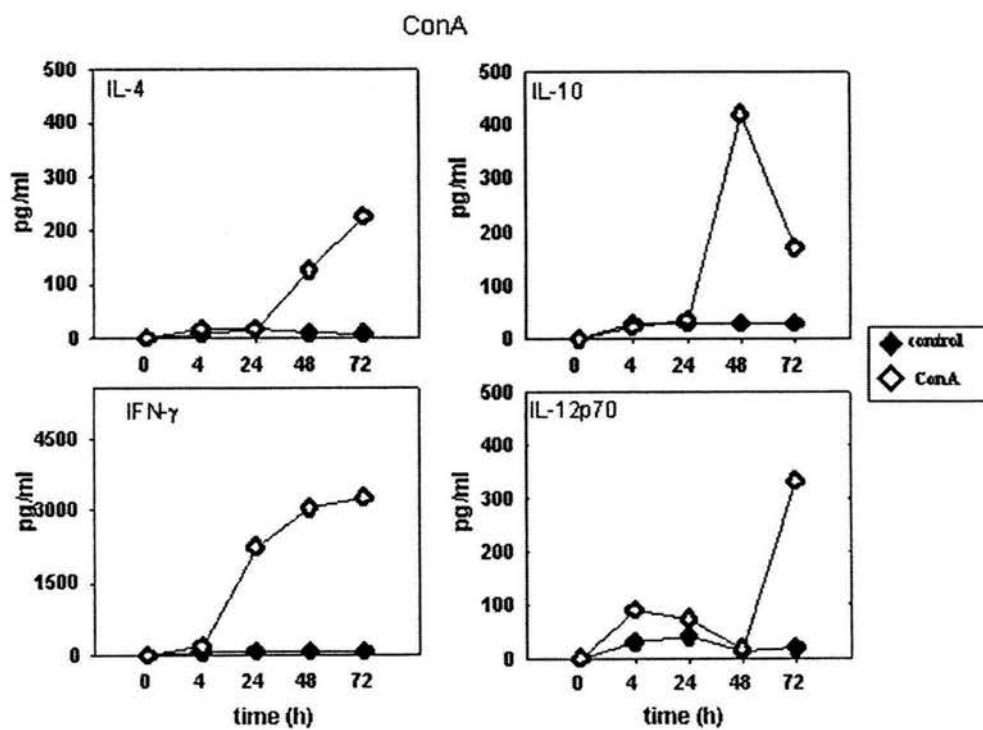


Figure 2. Diphtheria toxin (DT) (A) induces mostly a Th2 component (IL-10), very small amounts of IL1270 and IFN- γ was produced in small amounts. Whereas LPS (B) induced moderate amounts of IL12p70 until 72 hs, and small amounts of Th2 type cytokines. The spleen cells were stimulated with 10 μ g/ml and LPS (2.5 pg/ml), respectively. Concanavalina (C) induce significant amount of Th1 (IFN- γ) and Th2 cytokines (IL-4, IL-10). Detection of cytokines in the culture supernatants was made accordingly to manufacturer's instructions. It is shown one representative experiment.

B



C



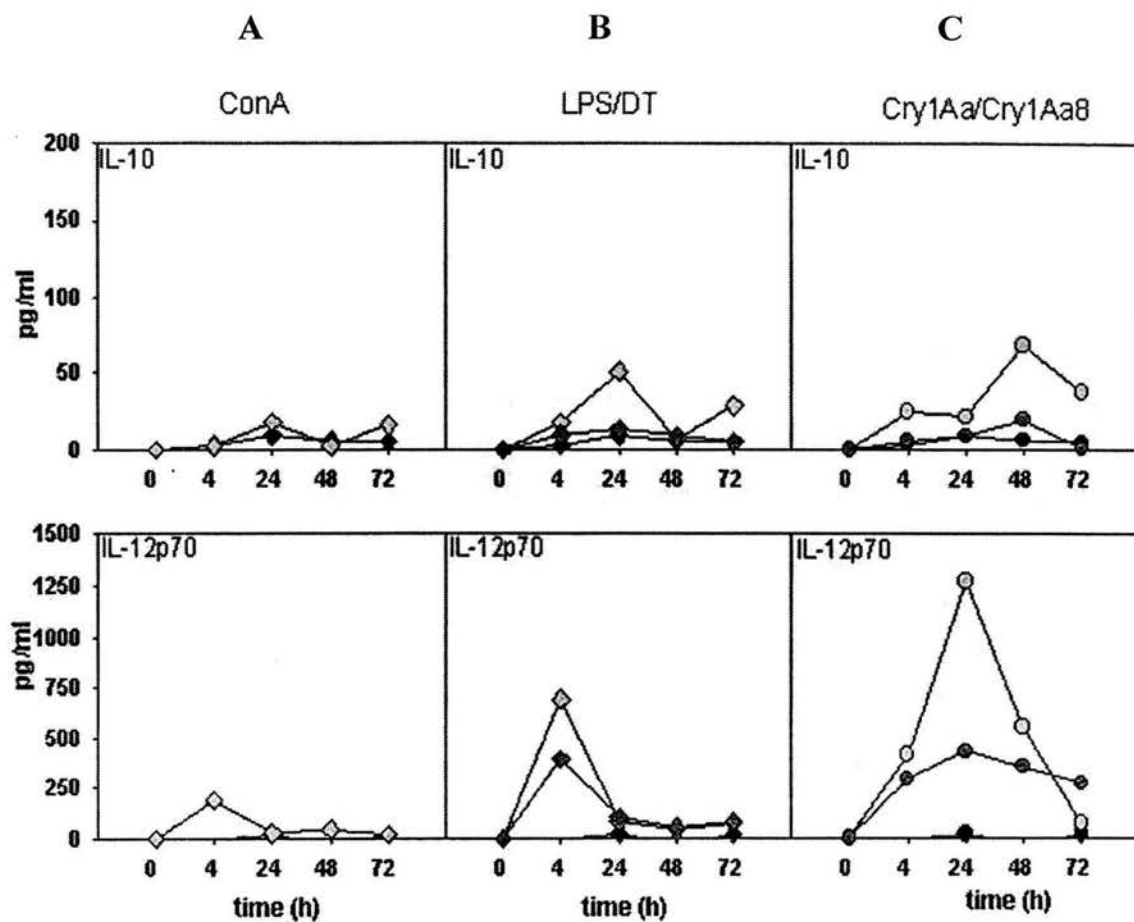


Figure 3. Cry1Aa toxin primes mostly a Th1 component, IL12p70 cells producers (gray symbols). After i.n. priming of BALB/c mice, with Cry1Aa toxin, spleen cells were restimulated *in vitro* with (A) ConA (2.5 $\mu\text{g/ml}$), (B) LPS/DT (gray and dark triangles, respectively), (C) Cry1Aa (10 $\mu\text{g/ml}$) and Cry1Aa8 $\mu\text{g/ml}$) (dark gray circles). Controls (black circles). The production of a predominantly Th1 component by priming spleen cells with Cry1Aa toxin was even higher to that induced by LPS (B). Detection of cytokines was made as described in materials and methods. It shown one representative experiment.

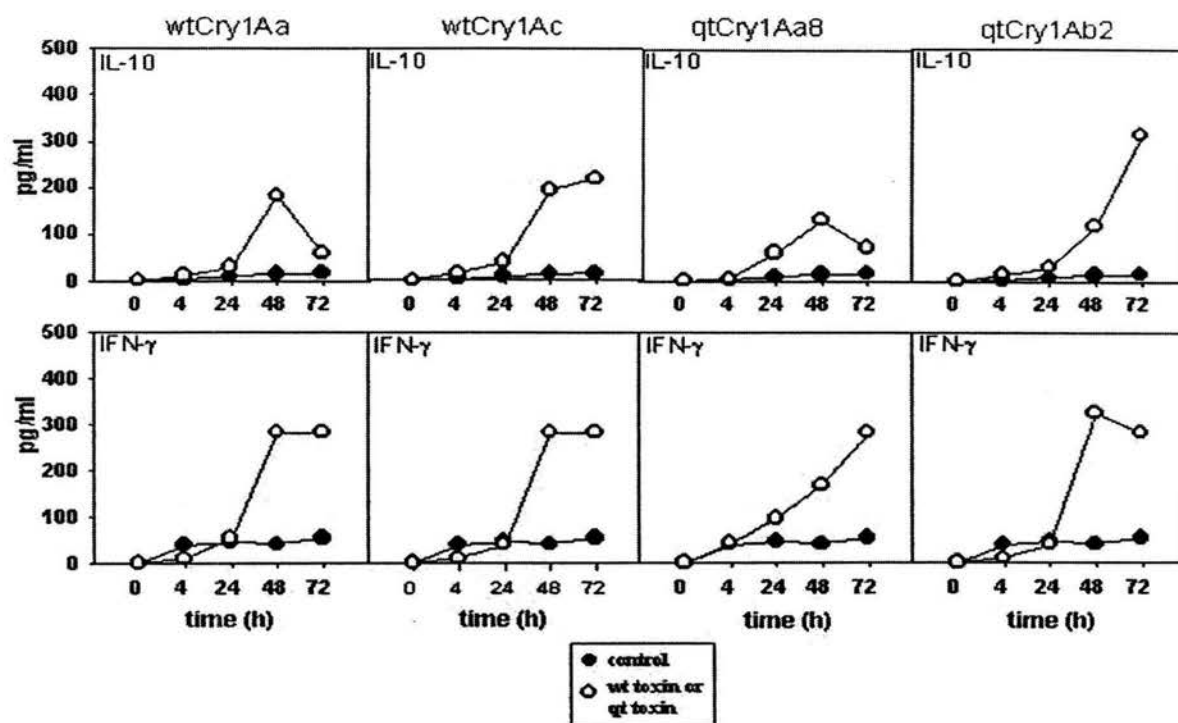


Figure 4. Quimeric toxin Cry1Aa8 primes a mix of T cells subpopulations, Th1-Th2 cytokine producers. Spleen cells of mice intranasally primed mice with Cry1Aa8 (50 $\mu\text{g/ml}$) and restimulated with wild type toxins, Cry1Aa and Cry1Ac (10 $\mu\text{g/ml}$), Cry1Aa8 (10 $\mu\text{g/ml}$), and Cry1Ab2 (10 $\mu\text{g/ml}$) produced a mix of IFN- γ and IL-10, respectively. There was not production of IL12p70. The detection of the cytokines in the supernatants cultures were made as described in material and methods. It is shown one representative experiment of two independent experiments.

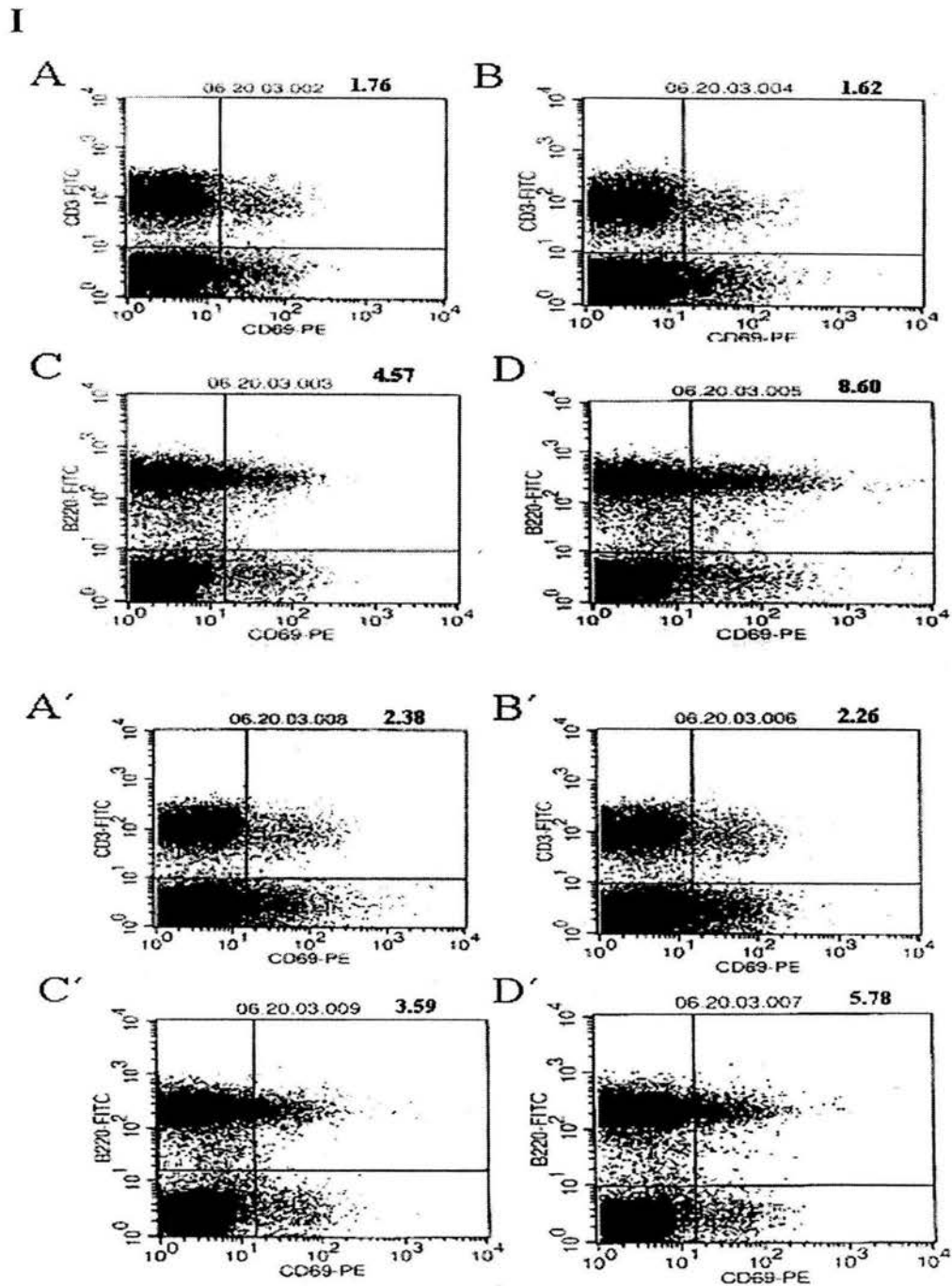
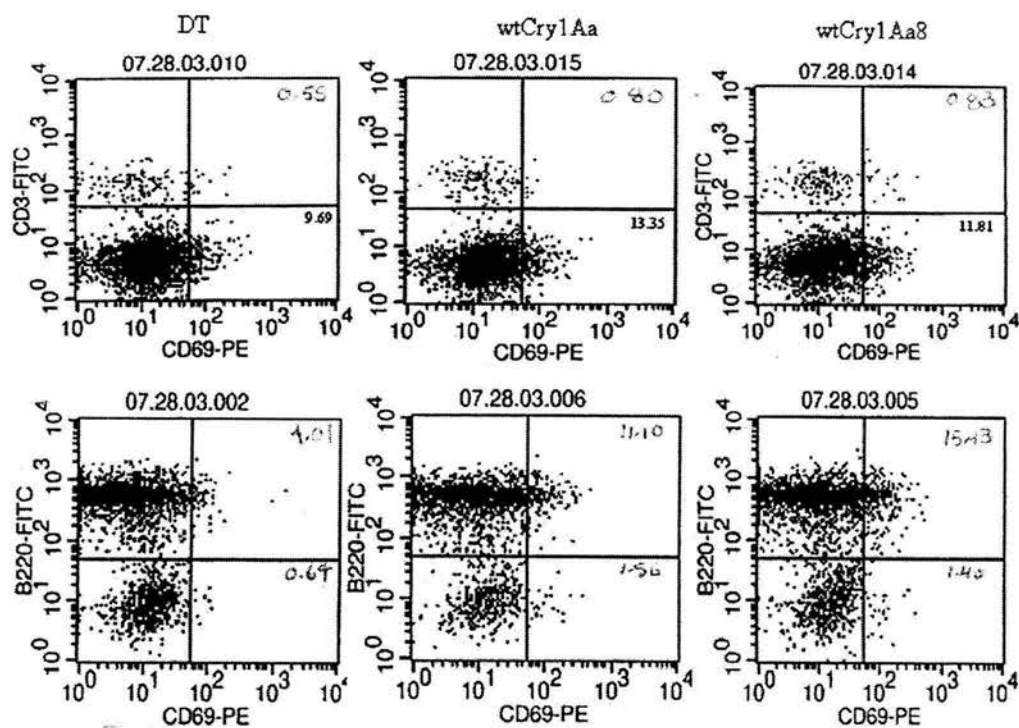
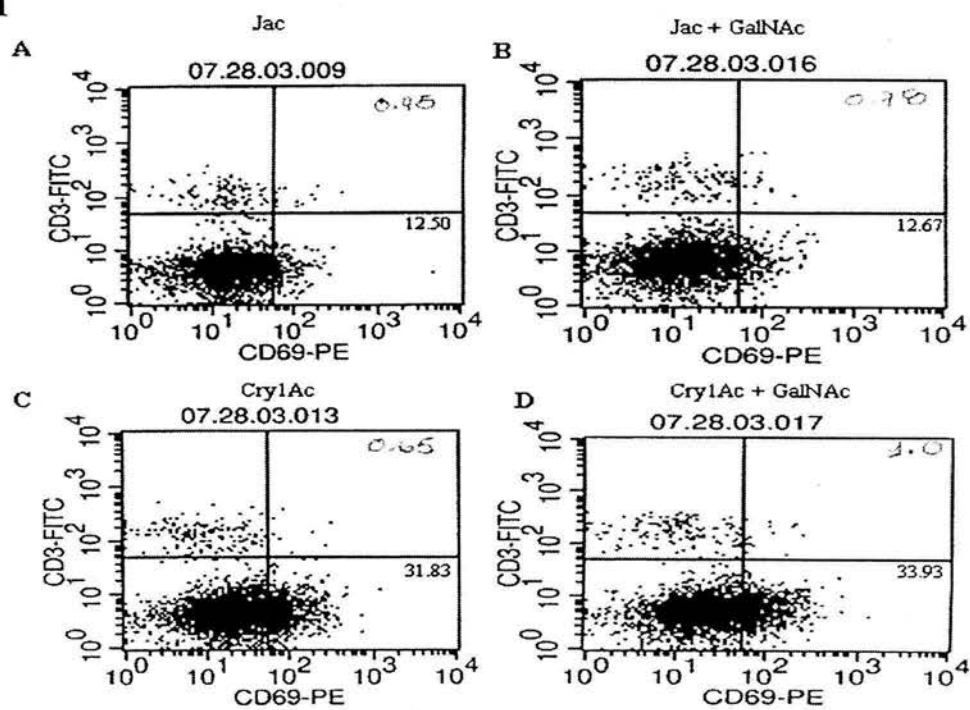


Figure 5. Activation of B cells and T cells by Cry1Ac toxin. After 4 h spleen cells from unprimed mice were stimulated with buffer (A-C), with Cry1Ac toxin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (I), Diphtheria toxin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Cry1Aa (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and Cry1Aa8 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (II), were marked with anti-CD3+/CD69+ and B220-/CD69+, mAbs, coupled to FITC and PE, respectively, for flow cytometry analysis. Similarly spleen cells from intranasally primed mice were restimulated *in vitro* with buffer (A'-C'), with Cry1Ac toxin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (I, A'-D') and also marked for flow cytometry analysis. Values in the upper right quadrant indicate the percentage of double positive cells from one representative experiment.

5II



6I



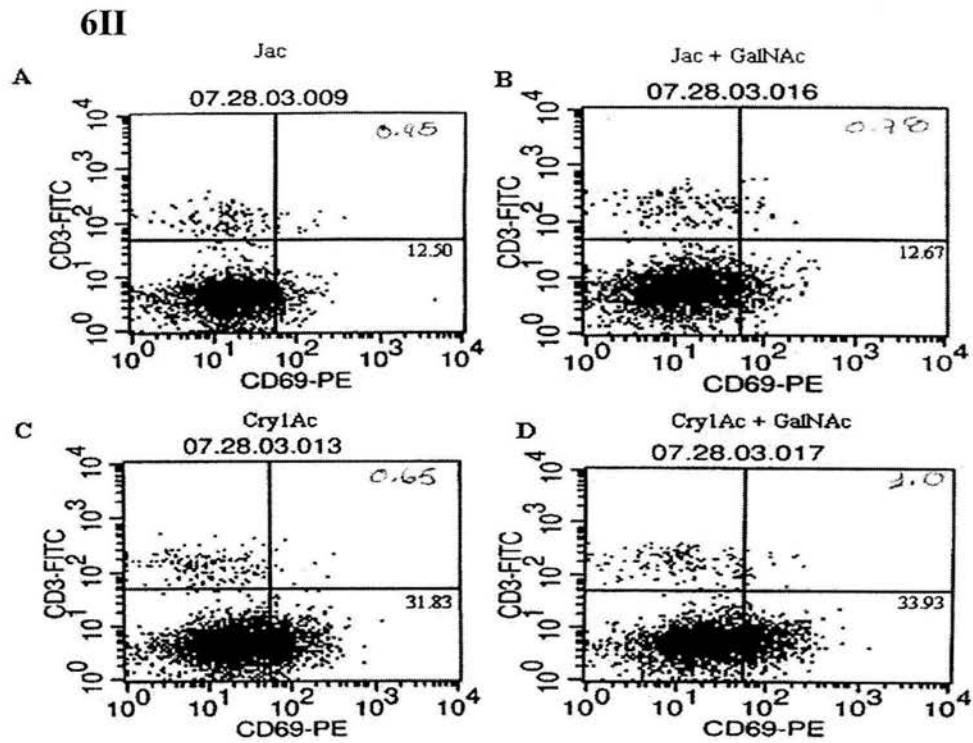


Figure 6. Differential effect of the N-Acetylgalactosamine carbohydrate on activation of T (I) and B cells (II) by two lectins, Jacalin and Cry1Ac. After 4 h of *in vitro* stimulation of spleen cells from unprimed mice with Jacalin () and Cry1Ac (10 μ g/ml), spleen cells were marked with anti-CD3+/CD69+ and B220-/CD69+ mAbs coupled to FITC and PE, respectively for flow cytometry analysis. Values in the upper right quadrant indicate the percentage of double positive cells from one representative experiment.

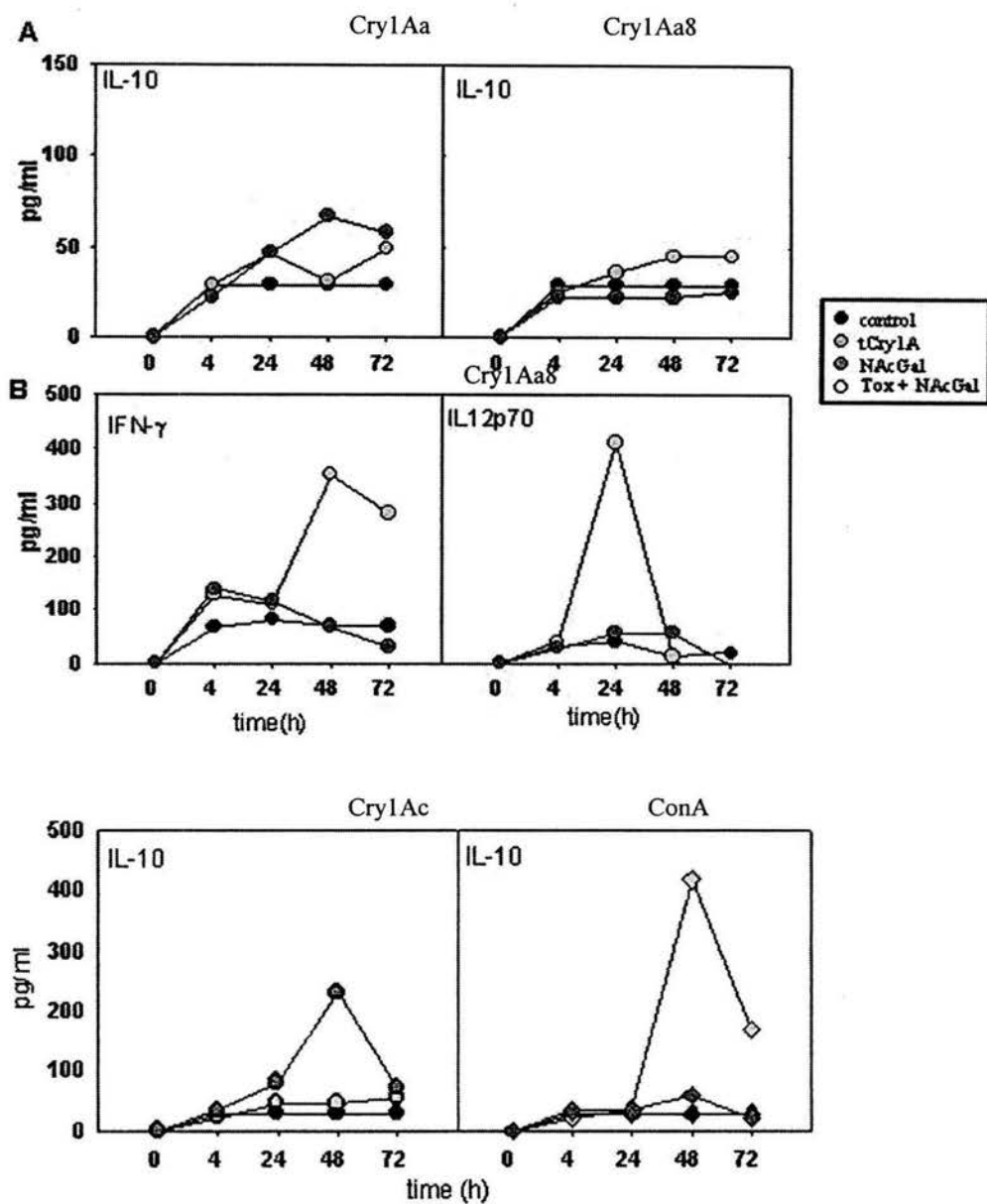


Figure 7. N-Acetylgalactosamine inhibition of the Th1/orTh2 cytokine induction by spleen cells from unprimed mice. Spleen cells were stimulated with the mix; Cry1A toxins, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1A8 and ConA with GalNAc, respectively (see mat and met). 100% inhibition of the Th1-Th2 cytokine productions were observed in the case of the Cry1Aa8 (A) and ConA. However in the case of the wild type Cry1Aa and Cry1Ac toxins the production of IL10 which was enhanced

instead. The detection of the cytokines in the supernatants cultures was made by ELISA as described in materials and methods. It shown one representative experiment.

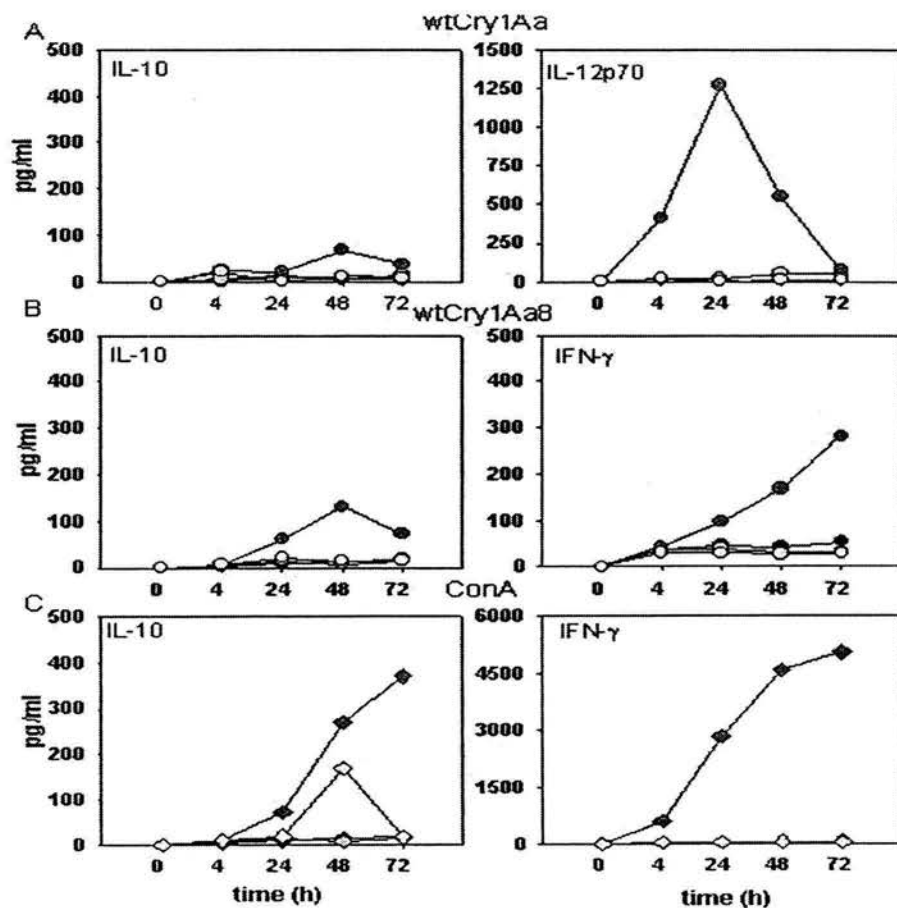


Figure 8. Spleen cytokine production inhibition by N-acetylgalactosamine. After spleen cells from intranasally primed mice with Cry1Aa, Cry1Aa8 were restimulated *in vitro* with the mix GalNAc + Cry1Aa (A), (B) Cry1A8 and (C) ConA, Th1 and Th2 type cytokines induction were measured in the cell culture supernatant by ELISA assay. Controls (dark grey symbols), induction (medium colour grey symbols); inhibition (grey symbols). It is shown one representative experiment.

Los resultados de este trabajo se presentaron en Congresos de Inmunología tanto a nivel internacional (celebrados en Orlando, Flórida; San Francisco, California; París, Francia; Dublín, Irlanda; Habana, Cuba; Nápoles, Italia; Montreal, Canadá.) como nacional (Estado de México, Ixtapa, Zihuatanejo y Oaxaca, Oaxaca).