



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

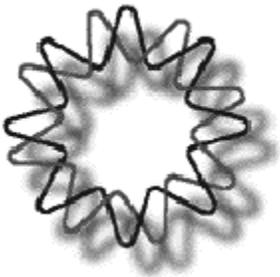
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

“IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE UNA
FOSFATASA ALCALINA DE *Aedes aegypti* CON LA TOXINA
CryIIAa”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :

I.B.Q. ERANDI LIRA NAVARRETE

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Mario Soberón Chávez



CUERNAVACA, MORELOS 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A aquellos que creyeron en mi más que yo misma,
A quienes con su ejemplo me inspiraron para seguir adelante,
A los que sin condiciones estuvieron a mi lado en todo este viaje hasta llegar al final,
A ellos, que siempre estarán conmigo,

A las personas más importantes de mi vida...

A mi familia, les dedico este trabajo por ser siempre mi fuerza para seguir adelante:

Angel Lira Tinajero
Mi Padre, mi ejemplo, mi guía.

María del Rosario Navarrete Melchor
Mi madre, mi fuerza, mi consuelo.

Angel Armando Lira Navarrete
Mi hermano, mi apoyo, mi amigo

Jorge Miró Mairal
Mi compañero, mi inspiración, mi amor, mi todo.

Agradecimientos

El presente trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de un grupo de personas que colaboraron de múltiples formas para llevarlo a término. Y es por eso que las menciono en este apartado, aunque es difícil agradecer por escrito todo lo que hicieron por mi, ya que mis palabras no podrán hacer justicia a la gratitud que cada uno de ustedes se merece.

Indiscutiblemente, en primer lugar debo mencionar al **Dr. Mario Soberón Chávez**. Muchas gracias Doctor por aceptarme en su grupo pese a que yo no tenía ninguna experiencia en un laboratorio, gracias por darme la oportunidad de colaborar en él y por idear un proyecto que me hizo aprender una gran cantidad de cosas (no soy bióloga y ahora sé que un mosquito es mucho más que una molestia por las noches). También agradecerle las facilidades que me brindó para poder titularme lo más pronto posible sin poner reparo alguno. Gracias por ofrecerme quedarme en su laboratorio, de haber sido circunstancias diferentes no hubiera dudado tenerlo de asesor nuevamente.

Dra. Isabel Gómez Gómez, muchísimas gracias por ser la primera persona en ofrecerme su apoyo en el laboratorio y por darme tanta confianza que fuiste capaz de que sólo te llame doctora en este papel pese a que eres una gran investigadora. Jamás olvidaré que tú me enseñaste la mayoría de las cosas que aprendí en el laboratorio, muchas gracias por tus sugerencias a este proyecto, sabes que fueron de gran utilidad para mi. Gracias también por compartir tu apple-software conmigo, de esta manera puedo decir que no sólo colaboraste en la parte experimental del proyecto, sino también para la elaboración de la tesis y las presentaciones. Y sobretodo, muchas gracias por apoyarme en un momento muy difícil durante mi estancia en Cuernavaca. Créeme cuando te digo que nunca olvidaré todo lo que hiciste por mi, incluyendo esa aventura al aeropuerto.

Al **Dr. Juan Miranda Ríos**, a pesar de que no sé como empezar a agradecerle, le diré que lo aprecio mucho, y que agradezco cada consejo y cada lección que me dio en el laboratorio. Estoy impresionada por la cantidad de conocimiento que posee y de su facilidad para transmitirlo. Lo que más le agradezco es que creyera en mi y me subiera a menudo la autoestima, gracias por pensar que hacía un buen trabajo, gracias por pensar que mis escritos eran buenos, gracias por los estímulos, gracias por tomarse el tiempo de leer mi tesis, gracias por acercarse a mi a hablar de cualquier trivialidad, gracias por la ida a Xochicalco y por el bromuro de etidio.

A la **Dra. Alejandra Bravo** decirle que, pese a que no tuve oportunidad de convivir mucho tiempo con ella, sí hizo observaciones importantes a mi trabajo. Muchas gracias doctora por sus comentarios y por pensar que soy una persona divertida. Desde donde yo estaba siempre la he admirado, en el mundo hay pocas mujeres que pueden combinar el éxito y la familia.

Doctores Gerardo Corzo y Pavel Isa, muchas gracias por acceder a formar parte de mi comité tutorial. Les agradezco profundamente el hacerme sentir cómoda y en confianza en cada uno de los exámenes tutorales, gracias por hacerse un espacio en su agenda para los mismos, y por leer los extensos reportes para mi evaluación, gracias por cada comentario y crítica. Ambos jugaron un papel importante no sólo en este proyecto, sino en mi formación académica y personal.

A mi jurado de examen, **Dres. José Luis Puente, Joel Osuna, Adela Rodríguez y Ricardo Grande**. Les agradezco infinitamente el tiempo y la disposición dedicados para leer este trabajo y por las sugerencias que sin duda lo enriquecieron.

A **Teresita Martínez**, espero que sepas lo mucho que me ayudaste desde que entré a realizar mi estudios de maestría. Muchas gracias por ser una gran compañera de mesa, por compartir tu material conmigo, pero más que nada, muchísimas gracias por las discusiones sobre mi trabajo que enriquecían y ampliaban mi visión, no sólo de este proyecto, pero de *Bacillus thuringiensis*. Gracias Tere pequeña, por apoyarme en todo momento, por sacarme del hoyo, por tus palabras de aliento, por tus enseñanzas, por reírte de mis tonterías, por tu compañía los viernes a la hora de comer. Muchas gracias por estar ahí, doctora con disfraz de maestra.

Al experto en biología molecular, **Sabino Pacheco**, gracias por tu ayuda y por tu guía en todos los pasos de este proyecto, pero sobretodo en esos en los que me era necesario utilizar técnicas de biología molecular, gracias por enseñarme y ayudarme a llevarlas a cabo. Y aunque no lo creas, te agradezco también tu música, sin eso las tardes hubieran sido bastante aburridas.

Tere Fernández, en la parte técnica te daré las gracias por ayudarme a conseguir esas larvas tan grandes que facilitaron la recolección de material, gracias por enseñarme a disectarlas. También gracias por compartir tu toxina Cry4Ba conmigo, y por los consejos en el laboratorio. En lo personal, gracias por siempre tratarme tan bien, por llevarme a casa a menudo y por ser tan linda persona.

Al resto de los miembros del laboratorio quisiera decirles que si bien no tuvimos una relación tan profunda como la que tuve con otras personas, tengo que agradecerles un comentario, una palabra o una charla que influyeron de alguna forma u otra en mi. **Dr. Carlos Garay** le agradezco esa sonrisa de cada mañana y el material que alguna vez me facilitó, así mismo a la **Dra. Liliana Pardo**, a la que además tengo que agradecerle sus charlas que animaban la mañana, especialmente esas en las que involucraba a Sabino; sé que de haber acudido a ustedes en algún momento por ayuda la hubiera recibido. A la **Dra. Claudia Pérez**, muchas gracias por resolver tantas dudas con las que llegaba a molestarte, aun me encuentro asombrada de la cantidad de conocimiento que acumulaste y espero que no te haya enfadado demasiado con mis preguntas insistentes, nos vemos en España. Al biol. **Jorge Sánchez** por ser tan buen compañero del mismo dolor, pero sobretodo por facilitarme tanto material, ya que sin éste muchos de los experimentos aquí reportados no se hubieran realizado. A

Lizbeth Cabrera por proporcionarme algunas de las larvas utilizadas en este trabajo, por el resto debo agradecer al insectario de Salud pública. A **Graciela Domínguez** por su apoyo en la parte administrativa y por sus ocurrencias que alegran el laboratorio día a día. A **Sergio Blancas** y **Alejandro Uribe** quisiera darles las gracias porque con su trabajo propician que el nuestro sea mucho más rápido y eficiente, gracias por su disposición y sus charlas. A **Iván Arenas** por ayudarme cuando llegué a ser su vecina y prestarme su tesis, gracias por ser tan divertido. A **Emiliano** por ser tan ocurrente, pero especialmente por ayudarme con el modelo de homología. A **Fernando, Luís Enrique** y **Ramiro** porque al ser los nuevos me hicieron sentir más importante, especialmente gracias a Ramiro por ser tan buen sustituto de **Christopher**. Gracias a **Ángeles** por ser tan particularmente divertida y por mi sorpresa, ¡gracias amiga secreta!. **Nuria**, gracias por ayudarme con la batería de mi ibook, y a **Leivi**, gracias por iniciar junto conmigo esta aventura.

A **Jorge Miró Mairal**, no sólo por ser un gran apoyo y una parte trascendental en mi vida, no sólo por hacer mi estancia en Cuernavaca mas llevadera y por aguantarme durante mis periodos de estrés, sino especialmente por el tiempo que dedicaste a ayudarme en la parte fisica de esta tesis y de las presentaciones que realicé en mi maestría. Gracias por existir.

A mis **padres** en esta ocasión sólo les agradeceré el esfuerzo y el temple con el que han soportado el hecho de tener a su hija tan lejos, gracias por el apoyo y por los ánimos que me dieron para que yo hiciera lo mismo. Por lo demás, no me alcanzarían ni todas las hojas que integran esta tesis, para enlistar el sin número de cosas que han hecho por mi, así que lo resumo en un GRACIAS, los quiero y que Dios los bendiga.

A **Iván Muñoz** tengo que agradecerle el aparecer nuevamente en mi vida, ya que de no encontrarlo en el examen de admisión, esta historia hubiera sido muy diferente. Gracias por compartir casa conmigo durante dos años, pocas personas son capaces de soportarse durante tanto tiempo, gracias por ello.

Al personal de **Docencia**, gracias por su amabilidad y su disponibilidad para hacernos más llevadero todo ese papeleo al que siempre le gusta complicarlo todo. Gracias por su guía y su paciencia.

A **CONACYT** gracias, porque con su ayuda pude realizar mis estudios de maestría en esta ciudad, mediante la beca ortorgada con el número de registro 197180.

Finalmente y no por ello menos importante, mil gracias **Dios**, por permitirme vivir estos momentos y sobretodo por ser tan bueno conmigo y acomodar siempre las cosas para mi.

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ**

ÍNDICE

RESUMEN.	1
ABSTRACT.	1
INTRODUCCIÓN.	3
δ -Endotoxinas Cry.	5
Estructura de las toxinas Cry.	5
Dominio I.	5
Dominio II.	6
Dominio III.	7
Mecanismo de acción de las toxinas Cry.	7
Solubilización.	7
Activación proteolítica.	7
Unión al receptor.	9
Aminopeptidasa N.	9
Cadherina.	9
Fosfatasa Alcalina	10
Mecanismo de acción propuesto.	10
δ -Endotoxinas Cyt.	12
ANTECEDENTES.	14
Importancia de <i>Aedes aegypti</i> .	14
Regiones de Cry11Aa involucradas con la unión al receptor.	15
Proteínas de unión de Cry11Aa en <i>Aedes aegypti</i> .	15
Fosfatasa alcalina.	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL.	19
OBJETIVOS PARTICULARES.	19

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	19
MATERIALES Y MÉTODOS.	21
Purificación de la toxina Cry11Aa.	21
Solubilización y activación de la toxina.	21
Biotinilación de la toxina Cry11Aa.	22
Construcción de nueve fragmentos de la fosfatasa alcalina.	22
Expresión y purificación de los fragmentos de la fosfatasa alcalina.	24
“Western blot”	26
Experimentos de unión de ligando.	26
Corte de la proteína fusión (tiorredoxina) a la fosfatasa alcalina.	26
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).	27
Construcción de un modelo de homología de la ALP-AR93.	27
Preparación de las vesículas de membrana de la microvellosidad apical.	27
Ensayos de unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA.	28
Análisis de disminución de área en la unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA.	28
Construcción de mutantes triples en el fragmento 5.	28
RESULTADOS.	30
Clonación de los nueve fragmentos de la ALP-AR93 en pQE-32.	30
Expresión de los nueve fragmentos de la ALP-AR93 en pQE-32.	31
Producción y purificación de la toxina Cry11Aa.	35
Experimento de unión de ligando.	36
Purificación del fragmento 3 expresado en pQE-32.	37
Clonación y expresión de los nueve fragmentos y de la ALP-AR93 en pET-32b.	37
Purificación de los fragmentos, ALP y Trx, expresados en pET-32b.	40
Ensayos de unión de ligando.	42
Ensayos de unión en ELISA.	46
Secuencias de unión de la ALP-AR93 a la toxina Cry11Aa.	49
Unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA.	52
Diseño de mutantes en los sitios de unión de la ALP-AR93 a la toxina Cry11Aa.	53
Construcción de mutantes triples en el fragmento 5.	54

**Identificación del Sitio de Interacción de una
Fosfatasa Alcalina de *Aedes aegypti* con la toxina Cry11Aa**

DISCUSIÓN.	55
CONCLUSIONES.	59
PERSPECTIVAS.	59
REFERENCIAS.	60

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura cristalográfica de la toxina Cry4Aa a 2.8 Å de resolución (11).	5
Figura 2. Modelo del mecanismo de acción de las toxinas Cry en insectos lepidópteros (46).	11
Figura 3. Predicción de la estructura de Cyt1Aa1 basada en la estructura cristalográfica de Cyt2Aa1 (49).	12
Figura 4. Estructura tridimensional de la fosfatasa alcalina de camarón a 1.9 Å de resolución (57).	17
Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la ALP-AR93.	18
Figura 6. Estrategia experimental.	20
Figura 7. Amplificación de los genes que codifican los fragmentos, para el vector pQE-32.	30
Figura 8. Cinética de expresión del fragmento 8 en pQE-32.	31
Figura 9. PCR en colonia de la cepa de expresión M15.	32
Figura 10. Expresión de los fragmentos en pQE-32.	33
Figura 11. Regiones que cubren en la fosfatasa alcalina los fragmentos que se expresan.	34
Figura 12. Cry11Aa: Activación y solubilización.	35
Figura 13. Biotinilación de Cry11Aa.	35
Figura 14. Experimento de unión de ligando con 10 nM de Cry11Aa.	36
Figura 15. Solubilización del fragmento 3 con 8M de urea.	37
Figura 16. Cinética de expresión frag. 7 en pET-32.	38
Figura 17. Solubilización del fragmento 7 con 8M de urea.	39
Figura 18. Amplificación de los genes que codifican los fragmentos, para pET-32.	39
Figura 19. Solubilización de los fragmentos, ALP y Trx con 8M de urea.	40
Figura 20. Purificación tipo batch.	41
Figura 21. Purificación del fragmento 5 en pET-32b.	41
Figura 22. Experimento de unión de ligando con 1 nM de Cry11Aa.	42
Figura 23. Experimento de unión de ligando con 10 nM de Cry11Aa.	43
Figura 24. Experimento de unión de ligando con la toxina Cry11Aa mutante E266A.	43
Figura 25. Experimento de unión de ligando de diferentes concentraciones de los fragmentos 2 y 5 a la toxina Cry11Aa.	44
Figura 26. Experimento de unión de ligando de la toxina Cry4Ba.	45
Figura 27. Unión por ELISA de 5nM de toxina Cry11Aa a 0.2 µg/µl de los fragmentos 1, 2, 4, 5, 6 y 8.	46
Figura 28. Corte proteolítico de la fusión ALP-Trx mediante trombina.	47

Figura 29. Comparación de la unión de la toxina Cry11Aa a la fosfatasa alcalina con y sin proteína fusión.	48
Figura 30. Unión de distintas concentraciones de los fragmentos 2, 5 y 8 y ALP-AR93, mediante la técnica de ELISA.	49
Figura 31. Esquematización de la unión de la toxina Cry11Aa a ALP-AR93.	50
Figura 32. Modelo de homología de un monómero de la ALP-AR93, con una RMSD de 0.48 Å	51
Figura 33. Competencias de unión de Cry11Aa a las VMMA	52
Figura 34. Mutantes del fragmento cinco purificadas.	54

Lista de Abreviaturas.

2xTY	Medio rico de crecimiento.
ALP	Fosfatasa Alcalina.
ALP-AR93	Fosfatasa alcalina recombinante de <i>Aedes aegypti</i> .
APN	Aminopeptidasa N.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>israelensis</i>
Bt-R1	Caderina de <i>Manduca sexta</i> .
Bt-R175	Caderina de <i>Bombyx mori</i> .
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
ELISA	Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas.
GPI	Glicosilfosfatidilinositol.
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido.
LB	Medio de crecimiento Luria-Bertani.
PBS	Solución amortiguadora fosfato salina.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PI-PLC	Fosfolipasa C fosfatidilinositol específica.
PMSF	Fluoruro de metilfenilsulfonil.
PVDF	Polifluoruro de vinilideno.
SOC	Medio superóptimo de crecimiento, adicionado con glucosa.
SP	Medio mínimo para esporulación.
SPR	Resonancia de plasmones de superficie.
Trx	Tiorredoxina.
VMMA	Vesículas de membrana de la microvellosidad apical.
YENB	Medio de crecimiento libre de sales.
YHD2	Línea de <i>Heliothis virescens</i> resistente a Cry1Ac.

RESUMEN.

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* ejercen su actividad insecticida mediante la unión a proteínas localizadas en el intestino de insectos susceptibles, comúnmente denominadas receptores. En *Aedes aegypti*, una proteína de 65 kDa con actividad de fosfatasa alcalina, interacciona con las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba de *B. thuringiensis* subespecie *israelensis*. La manera en que el receptor interacciona con estas toxinas aún se desconoce, y la identificación de los epítopes de unión puede brindar información para elucidar este punto.

En el presente trabajo, fuimos capaces de identificar dos regiones del receptor fosfatasa alcalina (ALP), que interaccionan con la toxina Cry11Aa, las cuales se encuentran ubicadas entre los aminoácidos 59-102 (sitio 1) y entre los aminoácidos 257-296 (sitio 2), lo anterior se logró fragmentando la fosfatasa alcalina en nueve partes de aproximadamente 150 aminoácidos, de forma que cada fragmento tuviera un traslape con el anterior de alrededor de cien residuos. Mediante experimentos de unión de ligando observamos que las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba unen al sitio 2, mientras que sólo Cry11Aa es capaz de unir al sitio 1. La unión de ambos sitios a la toxina Cry11Aa fue corroborada por ensayos de ELISA y posteriormente se observó la capacidad de estos sitios de inhibir la unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA (Vesículas de membrana de la microvellosidad apical) de *Ae. aegypti*. Finalmente, se observó en experimentos de unión de ligando que la unión del sitio 1 disminuye cuando se ensayan con la proteína Cry11Aa mutante E266A, la cual se encuentra afectada en toxicidad.

Estos resultados nos indican que la ALP de *Ae. aegypti*, no sólo une en dos sitios a la toxina Cry11Aa, sino que además ambos son importantes para la interacción toxina/receptor. Este es el primer reporte de este tipo realizado en insectos dípteros.

ABSTRACT.

Bacillus thuringiensis Cry toxins exert their insecticidal activity by binding some proteins located in the midgut of susceptible insects, usually called receptors. In *Aedes aegypti* a 65 kDa protein with alkaline phosphatase activity, is able to bind *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry11Aa and Cry4Ba toxins. The way in which this receptor interacts with Cry11Aa and Cry4Ba toxins remains unknown; identification of the binding epitopes may give us information to elucidate this issue.

In this work, we identified two regions on the alkaline phosphatase receptor that interact with Cry11Aa toxin, which are located between amino acids 59-102 (site 1) and between amino acids 257-296 (site 2), this was achieved through fragmenting this receptor in nine parts of approximately 150 amino acids, in consequence each fragment overlaps the previous one by about one hundred residues. By ligand blot experiments, we observed that both Cry11Aa and Cry4Ba toxins can bind site 2, and only Cry11Aa binds site 1. Cry11Aa binding to sites 1 and 2 was verified by ELISA assays, later we identified the ability of these fragments to compete binding of Cry11Aa toxin to the *Aedes aegypti* BBMV (Brush border membrane vesicles). Finally, by ligand blot assays, we observed that affinity for binding site 1 is diminished, when it takes place with the Cry11Aa mutant E266A, which is affected in toxicity.

These results show not only that there are two Cry11Aa binding sites in *Aedes aegypti* ALP, but that these sites are also important for toxin/receptor interaction. This is the first report in its kind in dipteran insects.

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva ampliamente distribuida en el ambiente; su característica ubicua ha hecho posible que se hayan podido aislar cepas en diversos sitios como lo son el suelo, superficies de plantas, granos almacenados y cadáveres de insectos (1). Durante su fase de esporulación esta bacteria produce inclusiones cristalinas en el compartimento de la célula madre, representando del 20 al 30% del peso seco de la célula esporulada; tales inclusiones se encuentran formadas por las δ -endotoxinas Cry y Cyt. (1,2). Estas proteínas son muy específicas y altamente tóxicas para el estado larvario de ciertas órdenes de insectos, entre las que se han identificado Lepidóptera, Díptera, Coleóptera e Hymenóptera, aunque también se han aislado cepas en contra de otros organismos como nemátodos, ácaros y protozoarios (1,2). No se ha encontrado que *B. thuringiensis* cause daño a mamíferos o a plantas, esto, aunado a que las toxinas que produce son completamente biodegradables, ha originado que el uso de Bt vaya en ascenso para el control de plagas defoliadoras, principalmente en bosques de Estados Unidos y Canadá; control de mosquitos vectores de enfermedades de importancia en la salud humana, como Malaria (*Anopheles spp.*), Dengue y Fiebre Amarilla (*Aedes aegypti*) y en el control de plagas en la agricultura, principalmente en la modalidad de plantas transgénicas y en menor grado en formulaciones en “spray” (3), el uso de esta modalidad en México para el 2001, se encontraba entre el 4 y 10% del empleo total de insecticidas (4).

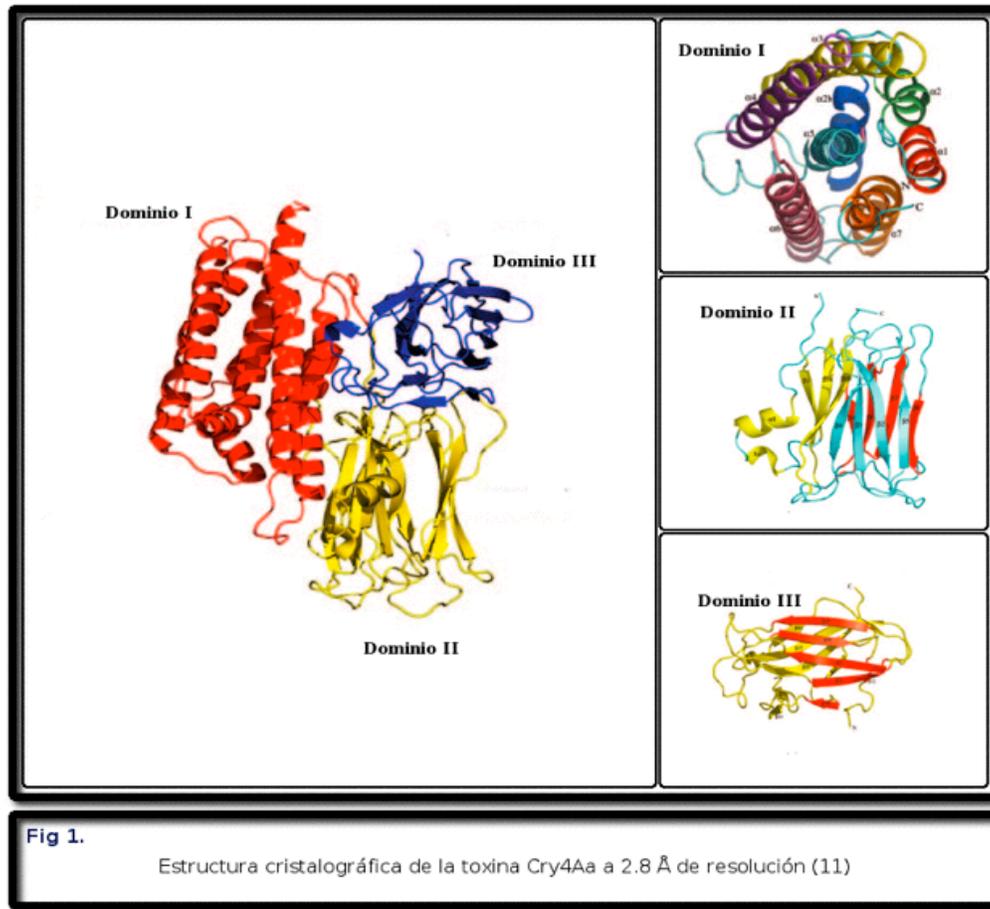
Las proteínas Cry comprenden más de 200 miembros divididos en 40 subgrupos (3). Por definición una proteína Cry es aquella que presenta una inclusión cristalina paraesporal de *B. thuringiensis* que exhiba algún efecto tóxico experimentalmente verificable contra un organismo blanco, o cualquier proteína que tenga una similitud de secuencia obvia, con cualquier proteína Cry conocida (5). Por su parte, Cyt es una proteína de una inclusión cristalina paraesporal de *B. thuringiensis* que exhibe actividad hemolítica, o cualquier proteína que tenga una similitud de secuencia obvia, con cualquier proteína Cyt conocida (5). La nomenclatura de las toxinas Cry y Cyt, está basada en la identidad de la estructura primaria (1,3). En primera instancia debe asignárseles el prefijo Cry o Cyt, seguido de cuatro rangos jerárquicos, el primero de ellos es un número arábigo el cual indica menos del 45% de identidad con otras proteínas Cry. El siguiente rango es una letra mayúscula, la cual se les asigna a las proteínas Cry que comparten menos del 78% pero más del 45% de identidad. El tercer rango, una letra minúscula, es para aquellas toxinas que tengan menos del 95% pero más del 78% de residuos de aminoácidos iguales. El último rango, para aquellas toxinas que tengan más del 95%, sin llegar a ser idénticas, es un

segundo número arábigo (1,3,5). Dado que la nomenclatura pretende reflejar las relaciones evolutivas entre las distintas proteínas Cry, es común que toxinas con el mismo primer rango sean tóxicas contra el mismo orden de insectos, mientras que el segundo y tercer rangos hablan de la potencia que tiene la proteína dentro de ese orden (5). La excepción se da en las proteínas Cry tóxicas contra insectos dípteros, los cuales son susceptibles a una amplia gama de toxinas que comparten baja similitud de secuencia (3).

Cada cepa de *B. thuringiensis* puede producir una combinación de toxinas empaquetadas en uno o múltiples cristales (1). Dependiendo de la composición de los cristales, éstos pueden adquirir varias formas cristalinas, entre las que se encuentran la bipiramidal de Cry1, la cuboidal que presentan las toxinas Cry2, rectangular plana de Cry3A, irregular de Cry3B, esférica de Cry4A y Cry4B y la romboidal de Cry11A (2). Las inclusiones cristalinas de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti), la cual tiene actividad específica para dípteros, están compuestas principalmente de seis toxinas: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba. (6). Ninguna de estas proteínas cuando se usan individualmente es tan tóxica como la inclusión nativa de la cepa, esto puede explicarse por el efecto de sinergismo que se observa con distintas combinaciones de estas proteínas, principalmente combinaciones entre Cyt1Aa con las distintas proteínas Cry de Bti, en las cuales no sólo se ha observado un aumento en la toxicidad de las proteínas Cry contra dípteros (2,7), sino también se tiene reportado que la presencia de Cyt1A suprime la resistencia en una línea de *Culex quinquefasciatus* obtenida en el laboratorio (8). El fenómeno de sinergismo también se ha observado entre toxinas de diferentes cepas; la toxina Cyt2Aa2 de *Bacillus thuringiensis* subespecie *darmstadiensis* sinergiza la actividad insecticida de la toxina Cry4Ba producida por Bti en *Ae. aegypti*. Cyt2Aa2, puede conferir toxicidad a Cry4Ba en *Culex quinquefasciatus*, especie en la cual la actividad de Cry4Ba es prácticamente nula (9). Recientemente se ha demostrado que el sinergismo que ejerce Cyt1Aa sobre Cry11Aa se debe a que la primera funciona como un receptor de la segunda lo que podría explicar todos los casos mencionados anteriormente (10).

δ- ENDOTOXINAS CRY

Estructura de las toxinas Cry.



A la fecha se conocen las estructuras cristalográficas de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Ba y Cry4Aa (11). Pese a que estas toxinas presentan diferencias en la especificidad contra sus insectos blanco y niveles de identidad en secuencia de aminoácidos muy bajos, su estructura terciaria se encuentra altamente conservada (figura 1), razón por la cual se piensa que el mecanismo de acción debe ser bastante similar (12). Las toxinas Cry son proteínas globulares compuestas por tres dominios estructurales:

Dominio I. Posee siete hélices α de naturaleza anfipática, seis de las cuales se encuentran rodeando a la hélice más hidrofóbica $\alpha 5$ (11,12). La longitud de la mayoría de las hélices es mayor a 30 Å, lo que las hace capaces de atravesar la membrana (12). Estructuralmente, este dominio comparte similitudes con otras proteínas formadoras de poro, principalmente con la

toxina de la difteria y con la Colicina A, producida por algunas cepas de *E. coli* (2). El dominio formador de poro de la Colicina A consiste de ocho hélices α rodeando a un par de hélices más hidrofóbicas ($\alpha 8$ y $\alpha 9$), esta horquilla hidrofóbica se inserta en la membrana y marca el inicio de la formación de poro (13). Dada la similitud de las proteínas Cry con la Colicina A, se cree que éstas deben actuar de manera similar, en donde la horquilla hidrofóbica estaría formada por las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$, varios experimentos han evidenciado la importancia de ambas hélices para la formación del poro (2,13). Los datos anteriores llevan a considerar al dominio I de las toxinas Cry como el encargado de la formación del poro y su inserción en la membrana del intestino del insecto blanco, para que esto sea correcto la toxina debe sufrir un gran cambio estructural, que le permita pasar de una forma soluble a una forma capaz de insertarse en la membrana (12), muchas de las proteínas formadoras de poro se concentran para formar oligómeros en la superficie celular (13). Recientemente se reportó que la hélice $\alpha 3$ es importante para la formación de la estructura oligomérica en las toxinas Cry, ya que contiene aminoácidos importantes para la formación de cremalleras de leucina, con otras α hélices de moléculas adyacentes (14). Por otro lado, se ha observado que la eliminación de las primeras hélices, promueve la formación del oligómero (12, 15).

Dominio II. Se trata del dominio más variable entre las moléculas de las toxinas Cry, se encuentra formado por 3 láminas β antiparalelas en una topología de “llave griega” y cuatro asas expuestas (asa1, asa2, asa3 y asa α -8) que varían significativamente en cuanto a longitud y secuencia de aminoácidos (2,11,12). Mutaciones en estas asas pueden causar efectos negativos o positivos tanto en unión como en la toxicidad (2,16,17,18,19). El cambio de un solo aminoácido en el asa 1 del dominio II de la toxina Cry1C abolió el efecto tóxico que esta proteína ejerce contra *Ae. aegypti*, y este cambio no produjo un efecto en la toxicidad de esta proteína en contra de células sensibles de *Spodoptera frugiperda*. Por otro lado, sustituciones en el asa 2 ocasionaron la pérdida de la actividad contra ambos blancos (16). En la toxina Cry3A, activa contra *Tenebrio molitor*, cambios en el asa 1 disminuyeron la toxicidad de la proteína silvestre, mientras que mutantes en el asa 3 fueron 2.4 veces más activas (17). Mediante el intercambio del asa 3 de Cry4Ba por el asa 3 de Cry4Aa, se ha introducido actividad en la toxina Cry4Ba contra especies del díptero *Culex* (en las cuales no tenía un efecto considerable), sin afectar la actividad en contra de especies a las que la toxina está naturalmente dirigida (18). Distintas modificaciones de las asas 1 y 2 de la toxina Cry1Aa, activa contra insectos lepidópteros, confirieron toxicidad en contra de *Culex pippiens*, perteneciente a la orden díptera (19). Esto indica que las toxinas Cry pueden ser modificadas, de tal forma que una sola toxina sea activa contra diferentes insectos debido a la variabilidad en sus asas (18,19). Todos estos datos perfilan al dominio II como el responsable de dar la especificidad a las toxinas Cry.

Dominio III. Está compuesto de dos láminas plegadas β antiparalelas formando un β -emparedado con una topología “jelly roll”, se le han atribuido propiedades de reconocimiento a las proteínas de unión en las membranas apicales del intestino del insecto (2,11,12). Se ha observado que cambios en este dominio pueden afectar la unión de la toxina y la actividad de la misma (2), un ejemplo claro de ello se presenta en la introducción de toxicidad contra *Spodoptera exigua* a la toxina Cry1E, mediante el intercambio de su dominio III, por el dominio III de la toxina más activa contra este lepidóptero, la Cry1C (20). De la misma manera, una toxina híbrida de Cry1Ab conteniendo el dominio III de Cry1C exhibió una actividad más alta que la que presenta la toxina Cry1Ab silvestre contra el mismo lepidóptero (21). Por otra parte, mutaciones en el dominio III de Cry1Ac, mostraron pérdida en la unión al receptor y disminución en la toxicidad en contra de larvas de *Lymantria dispar*, *Manduca sexta* y *Heliothis virescens* (22).

Mecanismo de acción de las toxinas Cry.

SOLUBILIZACIÓN.

Para que las toxinas Cry de *B. thuringiensis* exhiban sus propiedades entomopatogénicas, el insecto susceptible debe comerlas. Bajo las condiciones alcalinas y reductoras del intestino de los insectos lepidópteros y dípteros, el cristal ingerido se disuelve liberando una protoxina. En el caso de insectos coleópteros, la solubilización del cristal ocurre a un pH de neutro a ligeramente ácido (1). La solubilización del cristal es un factor determinante para la especificidad de las toxinas Cry (1,23). Análisis de la actividad de distintas cepas de *B. thuringiensis* demostraron una variabilidad importante, ya que cuando larvas de *Heliothis virescens* ingerían cristales o protoxina de estas cepas, algunas mostraban un aumento en la actividad cuando los cristales habían sido predisueltos (23). Otro caso similar es el de las toxinas Cry1Ba o Cry7Aa que son tóxicas para insectos coleópteros, sólo si el cristal ha sido previamente solubilizado *in vitro* (1).

ACTIVACIÓN PROTEOLÍTICA.

El paso subsecuente a la solubilización del cristal es la activación mediante procesamiento proteolítico de la protoxina por las proteasas del intestino del insecto blanco, la cual depende de su protoxina. A partir del número de aminoácidos, se pueden encontrar dos tipos de protoxinas (2,24). En las protoxinas Cry que tienen una masa de 130 a 140 kDa, como es el caso de Cry1, Cry4, Cry5 y Cry7, la región C-terminal es rica en cisteínas y la formación de

puentes disulfuro entre ellas promueve la cristalización de la protoxina. Durante el procesamiento proteolítico, esta parte equivalente a la mitad de la proteína es eliminada (2,24). Por otra parte, también se lleva a cabo la proteólisis de un péptido del extremo N-terminal, que para el caso de las toxinas Cry1, tiene una longitud de entre 25 y 30 aminoácidos (24). Presumiblemente, esta región previene la internalización de la toxina en membranas no específicas (25), y de no ser eliminado de la protoxina, impide la formación del poro y, por lo tanto, reduce la toxicidad de la misma (26). El procesamiento proteolítico difiere un poco para proteínas de menor peso molecular, toda vez que no hay pérdida de una región C-terminal; sin embargo, sí se lleva a cabo la pérdida de la región N-terminal, que en Cry3A es de 58 residuos y en Cry11Aa de 28 (24). De esta manera, todas las protoxinas liberan un fragmento activo de entre 60 y 70 kDa (24).

Existen casos especiales de activación en los que son necesarios cortes intramoleculares. Un ejemplo de esto lo presenta la toxina Cry11Aa, la cual libera dos fragmentos de 34 y 32 kDa cuando es tratada con las proteasas del intestino de *Culex pipiens*. La activación con tripsina resulta en dos fragmentos de 36 y 32 kDa (27), que permanecen unidos por interacciones no covalentes, conservando de esta forma su capacidad insecticida; ninguno de estos fragmentos por separado es tóxico para las larvas de *Culex pipiens*, pero al combinarlas recupera la actividad (27). Otro caso parecido es el de la toxina Cry4A, cuya protoxina tiene un peso molecular de 130 kDa, similar a las de Cry1, ésta se procesa en un intermediario de 60 kDa, para posteriormente sufrir otro corte por el cual se obtiene un fragmento de 20 kDa y otro de 45 kDa, formando así un heterodímero activo (27).

La especificidad de la toxina también es dependiente de la activación, pues existen diferencias en las proteasas encontradas entre las distintas órdenes de insectos (3). Estas diferencias pueden ser una limitante en la actividad de las toxinas Cry. Lo anterior se aplica en el caso de la pérdida de sensibilidad a la toxina Cry1C de *Spodoptera littoralis* conforme la edad de la larva avanza. Keller *et al.* encontraron diferencias en el patrón de degradación de Cry1C por las proteasas del jugo gástrico en los distintos estadios de este lepidóptero, ya que la capacidad de las proteasas aumentaba con la edad, digiriendo más a la toxina y, por ende, la toxina perdía su capacidad de matar a este insecto (28). Así mismo, en algunas líneas resistentes de *Plodia interpunctella*, se observó que la resistencia estaba generada por la falta de una proteasa con la que contaba la línea sensible (29).

UNIÓN AL RECEPTOR.

Una vez activada la toxina, ésta es capaz de unirse a diversas proteínas localizadas sobre la microvellosidad apical del intestino medio de larvas susceptibles. Usualmente, estas proteínas son llamadas receptores, aunque su función real en el insecto no está precisamente relacionada con su interacción con las toxinas Cry (2). La unión de la toxina a los receptores es quizá el elemento más estudiado de todo el mecanismo de acción, ya que la especificidad de las toxinas Cry hacia su insecto blanco recae fundamentalmente en este punto, y en muchas ocasiones se ha relacionado el desarrollo de resistencia con la interacción toxina-receptor (2,3).

Los receptores mejor caracterizados son los de los insectos lepidópteros, aunque actualmente, el estudio se ha extendido a otras órdenes de insectos, principalmente dípteros. A continuación se enlistan las proteínas más comúnmente reportadas como receptores de toxinas Cry:

➔ **Aminopeptidasa N (APN).** Existen numerosos reportes de distintas proteínas Cry que unen a algún tipo de APN, entre las que se encuentran Cry1A, Cry1B, Cry1C y Cry1F (30). En *Manduca sexta* se observó la unión de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac a una APN con un peso molecular de 120 kDa, mediante unión en tiempo real (SPR); sin embargo, pese a su efecto tóxico no se observó unión de Cry1C a esta proteína (31). Posteriormente, se observó la unión de Cry1C a otra APN de 106 kDa en este mismo insecto lepidóptero (32). En *Lymantria dispar* una APN de 120 kDa es la única proteína de unión de Cry1Ac, misma que no interacciona con Cry1Aa ni Cry1Ab (33). Las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac unen a una APN de 170 kDa en *H. virescens*, y esta unión se correlaciona con la capacidad de estas toxinas para formar poros (34). En *Bombyx mori* la toxina Cry1Aa une en SPR a una APN de 120 kDa, las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac presentan baja actividad contra este insecto y no unen a esta proteína (35). El primer reporte en dípteros de una APN como proteína de unión a una proteína Cry, es el de *Anopheles quadrimaculatus*, cuya APN de 100 kDa une a la toxina Cry11Ba (36).

➔ **Caderina.** Hasta la fecha, las proteínas tipo caderina han sido caracterizadas sólo en insectos lepidópteros, pero se ha observado que la unión de las toxinas a este tipo de proteínas juega un papel crítico en su actividad contra el insecto sensible (30). En *M. sexta* se describió la primera proteína de este tipo que interaccionaba con las toxinas Cry, la cual recibió el nombre de BT-R₁ (30), la cual es capaz de unir a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac. Experimentos de competencias heterólogas mostraron que Cry1Ab y Cry1Ac pueden compartir el mismo sitio de unión en esta proteína (37). En *B. mori* una proteína

tipo caderina denominada BT-R₁₇₅, une a la toxina Cry1Aa, y su expresión en células de *S. frugiperda* las vuelve susceptibles a esta toxina (38). La importancia de una proteína tipo caderina en *H. virescens* quedó de manifiesto cuando Gahan *et al.* reportaron que el gen de esta proteína era el responsable del 40-80% de la resistencia de la línea resistente YHD2 (39).

➔ **Fosfatasa Alcalina (ALP).** Las fosfatasas alcalinas son el grupo de receptores menos analizado; sin embargo, cada vez es mayor el número de reportes de toxinas Cry que unen a este tipo de proteínas. En *M. sexta* una proteína de 65 kDa con actividad de ALP puede unir a la toxina Cry1Ac (40). También pudo observarse la unión de Cry1Ac a una ALP de 68 kDa en *H. virescens*. Además se encontró una reducción en los niveles de esta proteína en la línea resistente YHD2 (41). En el caso de dípteros, el único receptor reportado hasta el momento para la toxina Cry11Aa en *Ae. aegypti* es una fosfatasa alcalina de 65 kDa (42), que presumiblemente sea el mismo receptor que comparte con Cry4Ba (43). Finalmente, en *Anopheles stephensi* se encuentran dos proteínas de unión a las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, con pesos moleculares de 65 y 57 kDa, una de las cuales presenta actividad de ALP, aunque aún no se ha caracterizado cuál de ellas (44).

MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO.

En el laboratorio, se ha estudiado y propuesto un modelo para el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A en lepidópteros (figura 2). El modelo plantea que, posterior a la activación proteolítica, la toxina se une al receptor tipo caderina, esta proteína ayuda a la toxina a sufrir un cambio conformacional mediante la pérdida de la hélice $\alpha 1$, debido a un segundo procesamiento proteolítico (15). Lo anterior promueve la interacción de monómeros de toxina y la formación de un oligómero, presumiblemente un tetrámero (45). Debido a que esta estructura presenta más afinidad por la APN que la forma monomérica de la toxina, se postula que ahora el oligómero puede interaccionar con la APN, la cual permite su internación en la membrana celular, donde finalmente formará un poro (46). Dicho poro trastorna el balance iónico de la célula, causando lisis celular y la destrucción del epitelio intestinal. En consecuencia, el insecto muere por inanición y septicemia, a causa de la proliferación de las esporas de Bt (3).

Recientemente, se reportó que toxinas Cry1A carentes de la hélice $\alpha 1$, eran capaces de abatir la resistencia generada por mutaciones en el receptor caderina en insectos lepidópteros (47). Estos datos apoyan el modelo descrito anteriormente, ya que evidencian que la función de la caderina es la de promover el cambio conformacional que permita a la toxina la posterior

inserción en la membrana (15,46). Si la toxina se encuentra ya modificada para saltarse ese paso, la caderina entonces ya no es necesaria (47).

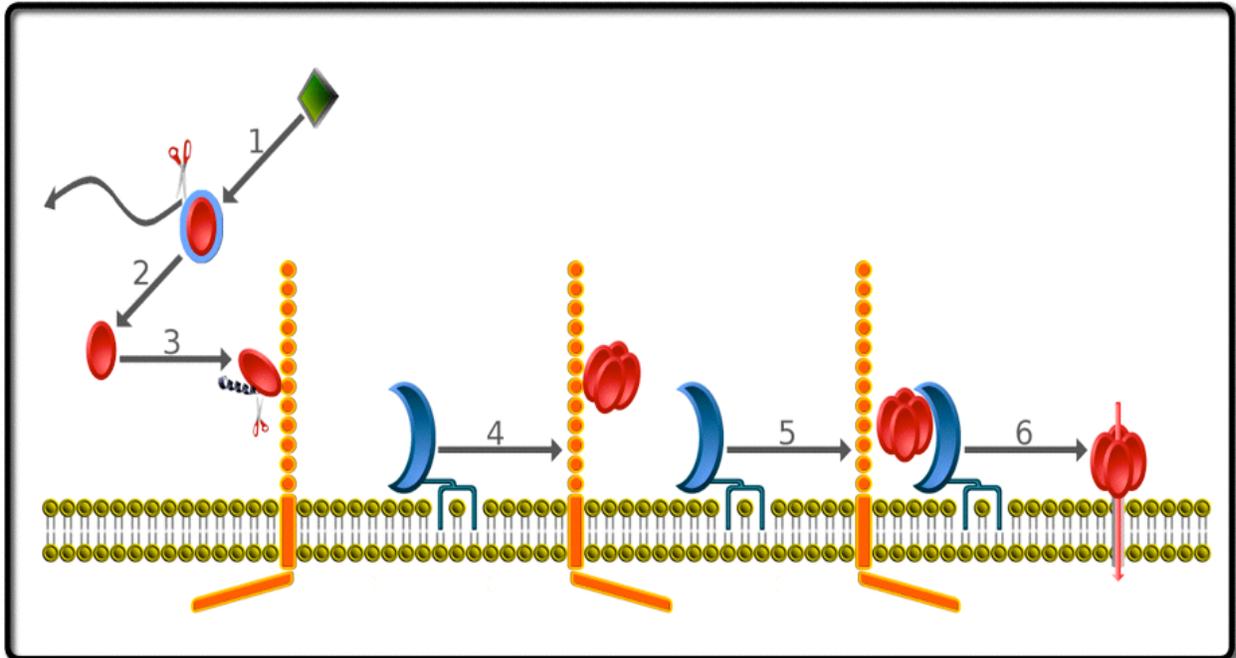


Figura 2. Modelo del mecanismo de acción de las toxinas Cry en insectos lepidópteros. 1) Solubilización del cristal. 2) Activación proteolítica de la protoxina. 3) Unión de la toxina activa al receptor caderina y pérdida de la hélice α -1. 4) Formación del oligómero. 5) Unión del oligómero al segundo receptor APN. 6) Inserción del oligómero en la membrana y formación de poro (46)

δ - ENDOTOXINAS CYT

Las δ -endotoxinas Cyt, a diferencia de las Cry, son producidas únicamente por algunas cepas de *B. thuringiensis* activas contra insectos dípteros. Pese a esto, su actividad mosquitocida es generalmente menor a aquella que ejercen las toxinas Cry activas contra estos insectos (48). Aunque su actividad *in vivo* es restringida, *in vitro* exhibe una amplia actividad lítica para otro tipo de células eucariotes como eritrocitos, linfocitos y fibroblastos (49).

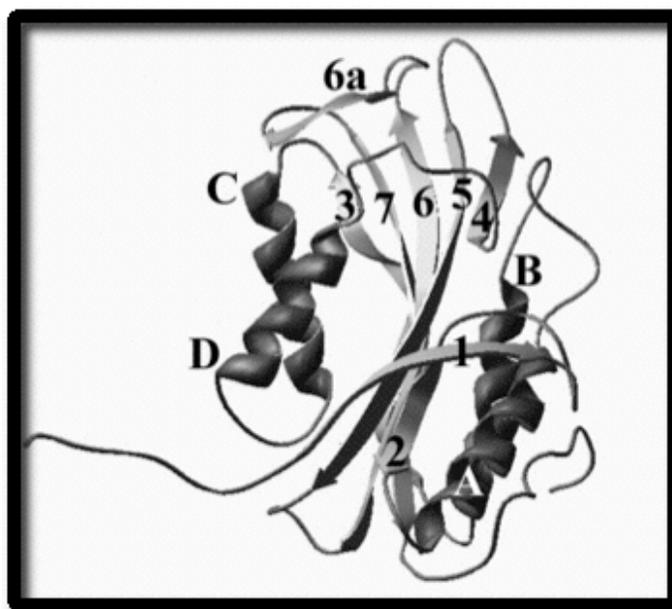


Figura 3. Predicción de la estructura de Cyt1Aa1 basada en la estructura cristalográfica de Cyt2Aa1. Las hélices α se encuentran marcadas por letras y las láminas β por números (49)

Dada la similitud existente entre las toxinas Cyt, se ha predicho un modelo de la toxina Cyt1Aa1 (figura 3) en base a la estructura tridimensional de la toxina Cyt2Aa1, dado que estas proteínas poseen un 39% de identidad (48). Dicho modelo se llevó a cabo con la ayuda del software Swiss-PdbViewer 3.1 y en la figura 3 puede observarse que las proteínas Cyt se encuentran formadas por un solo dominio con una arquitectura α/β , con dos horquillas de hélices α externas, rodeando un “core” de 7 láminas β (48); las asas de unión de estas láminas β son las responsables de la unión de las toxinas Cyt a las membranas (49).

El mecanismo de acción plantea la solubilización del cristal en el ambiente alcalino del insecto liberando una protoxina dimérica (50), unida por las láminas β del amino terminal; el procesamiento proteolítico rompe el entrelazamiento de dichas láminas β para liberar a la toxina Cyt como un monómero activo (51). A diferencia de las toxinas Cry, las toxinas Cyt no unen a proteínas localizadas en el intestino del insecto, en su lugar éstas se unen de forma monomérica a los fosfolípidos insaturados de la membrana, razón por la cual la preincubación de las toxinas Cyt con fosfolípidos neutraliza su actividad citolítica e insecticida (51). Por otro lado, aún se desconoce si esta toxina forma poros para lisar la célula, o si ejerce una acción tipo detergente sobre la membrana celular (49).

ANTECEDENTES

Importancia de *Aedes aegypti*.

Aedes aegypti es un insecto díptero capaz de transmitir varias enfermedades, entre las que destacan la fiebre amarilla y el Dengue. Originario de África, la localización de este vector ha aumentado dramáticamente, principalmente en las zonas tropicales o subtropicales. El ciclo de vida de *Ae. aegypti* consiste de una fase acuática, en la que puede encontrarse en forma de huevo, larva o pupa, y una fase aérea, en donde se observa su etapa de adulto (<http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=20>). El riesgo de contraer alguna de las enfermedades que transmite, particularmente Dengue, se ve incrementado dado que las hembras de *Ae. aegypti*, prefieren alimentarse de sangre humana sobre otro tipo de sangre disponible, pudiendo infectar a varias personas en una vivienda (52). Ergo, este mosquito ovoposita en criaderos artificiales como colectores de agua, floreros, llantas usadas, o en cualquier depósito de agua cercano al hábitat humano (53).

Por lo anterior, no es de extrañar que el Dengue sea la enfermedad viral más importante transmitida por artrópodos (53). En México, en el 2007 se reportaron un total de 40559 casos de Dengue clásico y 7897 de Dengue hemorrágico, de los cuales 10 terminaron en muerte (<http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=100>). Contrario a la fiebre amarilla, no existe aún vacuna para el virus del dengue, entre otras razones, por la falta de animales modelo en los cuales estudiar las vacunas (53). Por lo tanto, la prevención del dengue recae principalmente en el control del vector. La manera más eficaz de controlar al mosquito es mediante la reducción de larvas, para lo cual es usado mundialmente el organofosfato temefos. Entre las desventajas que presenta este larvicida, se encuentran el incremento en los reportes de resistencia desarrollada por *Ae. aegypti* hacia este compuesto químico (54), y los efectos adversos que presenta temefos en contra de organismos que no son su blanco (55, <http://extoxnet.orst.edu/pips/temephos.htm>). Lo anterior hace necesaria la búsqueda de una alternativa menos agresiva al medio ambiente y que sea eficaz para el control de este insecto artrópodo. Una alternativa viable para la lucha contra este mosquito es el uso de bioinsecticidas como las toxinas producidas por *B. thuringiensis* subespecie *israelensis*, toda vez que sus inclusiones cristalinas son altamente tóxicas para el estado larvario de *Ae. aegypti*, ya que dada su especificidad no causa daños colaterales, y además estas toxinas son biodegradables (3,4)

De las toxinas producidas por Bti la toxina Cry11Aa es la que presenta mayor actividad en contra de *Ae. aegypti* (2). Pese a ello, no se tiene la misma información sobre el mecanismo de

acción de las toxinas Cry en dípteros que la que se tiene para lepidópteros. Actualmente, varios grupos de investigación se están dedicando a estudiar el efecto de las toxinas Cry en insectos dípteros, principalmente tratando de identificar las proteínas del intestino del insecto que interactúan con las toxinas Cry (36,42,43,44), ya que éstas son la base de la especificidad de las toxinas hacia su insecto blanco.

Regiones de Cry11Aa involucradas con la unión al receptor.

Con el fin de tener un mejor entendimiento acerca del mecanismo de acción de la toxina Cry11Aa en *Ae. aegypti*, recientemente se han identificado los epítopes de interacción del dominio II de la toxina Cry11Aa con las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) de *Ae. aegypti* (56). Para lograrlo se construyó un modelo de la toxina Cry11Aa basándose en la estructura ya reportada de Cry2Ab, mediante el cual se identificaron siete regiones expuestas, de las cuales se sintetizaron péptidos. Dichos péptidos fueron usados para competir la unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA. Se observó que los péptidos análogos al asa α -8, a la región β 4 y al asa 3, fueron los únicos en competir la unión de Cry11Aa, por lo que se concluyó que dichas regiones se encontraban involucradas en la interacción con el receptor. Empleando la técnica de Despliegue en Fagos (Phage Display), se aisló un fago péptido (P5.tox), que mimetiza al receptor y reconoce al asa α -8 de la toxina Cry11Aa, se observó que en presencia de éste, la toxina Cry11Aa no une a las VMMA y además disminuye la toxicidad de la proteína Cry11Aa en un 50%. Por otra parte, se realizó mutagénesis sitio dirigida del asa α -8, las mutantes E266A y V262E se vieron muy afectadas en su toxicidad, aumentando la dosis letal media de 78 (40-112) ng/ml de la toxina silvestre, a 1668 (1022-3622) y más de 30000 ng/ml para las mutantes E266A y V262E, respectivamente. Lo que confirmaba la importancia del asa α -8 en la unión al receptor (56).

Proteínas de unión de Cry11Aa en *Aedes aegypti*.

Con respecto a la identificación de los posibles receptores de la toxina Cry11Aa en *Ae. aegypti*, trabajo previo en el laboratorio logró caracterizar a la proteína de 65 kDa -y a su producto de degradación, una proteína de 62 kDa - como una fosfatasa alcalina, de la que se sabía era proteína de unión (42). En la búsqueda de un receptor unido por GPI, se realizaron experimentos de unión de ligando (Ligand Blot) de la toxina con las VMMA antes y después de tratarlas con Fosfolipasa C (PI-PLC), la cual remueve las proteínas ancladas por GPI de la membrana. Los resultados revelaron que la toxina Cry11Aa une a dos proteínas ancladas por GPI, una de 100 kDa y otra de 65 kDa. Para una mejor caracterización, el sobrenadante obtenido después de tratar a las VMMA con PI-PLC, fue pasado por una columna donde previamente se

acopló la toxina Cry11Aa en su forma nativa, observándose que sólo se une la proteína de 65 kDa, la cual se identificó como una ALP al medir su actividad enzimática (42). Por otro lado, también se aisló un fago péptido (P1.BBMV), utilizando la metodología de despliegue en fagos, que reconoce a la ALP, afectando tanto la unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA como su toxicidad. Al competir la unión de este fago péptido a la toxina Cry11Aa, utilizando los péptidos sintéticos de las regiones expuestas de la toxina descritas anteriormente (56), se observó que sólo el asa α -8 inhibía la unión de P1.BBMV a las VMMA, lo que sugiere que se unen en el mismo sitio y corrobora la importancia del asa α -8 de la toxina Cry11Aa para la unión con el receptor (42).

Fosfatasa alcalina.

Las fosfatasas alcalinas no tienen como función natural ser receptores de las toxinas Cry, de ser así una gran variedad de organismos seríamos blancos de éstas. Las fosfatasas alcalinas son metaloenzimas homodiméricas que catalizan, a un pH básico, la hidrólisis o la transfosforilación de monoésteres de fosfato, los cuales son relevantes en el metabolismo energético, regulación metabólica y en algunas rutas de transducción de señal (57). Aunque aún no se tiene clara la función de esta enzima, se le tiene relacionada con muchas enfermedades referentes a los huesos, probablemente porque juega un papel importante en el metabolismo de los fosfatos de calcio (58). Puede ser encontrada en múltiples organismos, en *E. coli* se le localiza en el espacio periplásmico, y en eucariotes superiores unida a la membrana mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (58). Existe un sitio activo por monómero, cada uno de ellos contiene el aminoácido catalítico serina que forma un intermediario fosfoseril con el sustrato, una arginina que permite la unión del sustrato y la liberación del producto (58), y tres sitios de unión a dos átomos de zinc y uno de magnesio, denominados M1, M2 y M3 (59). Los residuos aminoacídicos que funcionan como ligandos para estos sitios de unión a los iones metálicos son dos histidinas y un aspartato para M1, dos aspartatos y una histidina para M2; y un aspartato, un glutamato y una treonina para M3 (60). En algunas fosfatasas alcalinas, la treonina está remplazado por una serina (58). Todos estos residuos, así como los aminoácidos catalíticos, se encuentran altamente conservados en las secuencias de fosfatasas alcalinas reportadas (57,60).



Figura 4. Estructura tridimensional de la fosfatasa alcalina de camarón a 1.9 Å de resolución (57)

El grupo del Dr. Sarjeet Gill, de la Universidad de California, Riverside, ha obtenido la secuencia de cuatro isoformas de fosfatasas alcalinas encontradas en el intestino *de Ae. aegypti*, de las que ha identificado una capaz de unir a la toxina Cry11Aa, a la cual dio el nombre de ALP-AR93 (Gill, datos sin publicar), y que tiene el mismo peso molecular de la que se ha reportado como receptor de esta toxina. Pese a que estas proteínas son glicosiladas, se espera que la interacción sea proteína-proteína, dado que diferentes azúcares no compiten la unión de la toxina Cry11Aa con su receptor en *Ae. aegypti* (43); sin embargo, el epítipo de unión de la ALP-AR93 a la toxina aún no ha sido caracterizado.

La ALP-AR93 comparte las características antes mencionadas de las fosfatasas alcalinas. Consiste de 542 aminoácidos, de los cuales los primeros 23 pertenecen al péptido señal del N-terminal que conduce a la proteína al retículo endoplasmático (61). Este péptido señal fue predicho con la ayuda del servidor SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La ALP-AR93, también contiene un péptido señal de 27 aminoácidos en el C-terminal, el cual es removido de la proteína para insertar el ancla de GPI (61). El sitio de corte (sitio ω) se predijo en el servidor big_PI predictor (http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) y corresponde a la Ser 515. A partir de un alineamiento de secuencias con la fosfatasa alcalina de *E. coli*, se determinó que el aminoácido catalítico serina se encuentra en la ALP-AR93 en la posición 153 y

la arginina encargada de la unión primaria con el sustrato es la Arg 229. El sitio M1 de unión a zinc está formado por Asp 379, His 383 e His 497. Los aminoácidos del sitio M2 son Asp 103, Asp 420 e His 421, mientras que los que conforman la unión del magnesio (M3), serían Asp 103, Ser 217 y Glu 374 (figura 5).

MYLLRMFAV FVLLSSVLRASRGNPSQEFVQYLTTTPSDHVHPPDRDGDDGNLN
RKKRLISASDYEETAQFWNIGAQLKLKEQLLKRKNFNKAKNVIFFLGDGMSIPTLA
ASRMYLGQKQGHSGEETQLSFEEFPDVLVKTYCVDKQVADSACSATAYLCGVK
ANYATIGVTA AVKYNNCTTGNDPKNHVHSIMSWAQAAGKATGIVTTTRVTHASPA
GTIAHVSNR EHECDADILAQNADPNDQCQDIASQLVRNPNPGKNLKVILGGGRRKFT
PNTEKDPGKPGQRMDGVNLISEWYYSKPLGSARYVTNKQGLMGINFNETEYLMG
LFNYDHMKYHMDSNPKEDPTLSDLTYAAIKTLEKNKAGFVLFVEGGKIDLAHHET
KARKSLDETVQLSEAVQLATQYTNSDDTLILVTA DHAHTMSMAGYSKRGHDILGV
SGSSHDKGKSPYTTLSYANGPGGPSLTDGRRLNITEEMLTNKDFQYPKLVPLKYET
HGGDDVALFAYGPWSHLFSGM YEQNVIPHIIGYAACIGSGLTACIG

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la ALP-AR93. El péptido señal del amino terminal se encuentra subrayado y resaltado en amarillo. Los aminoácidos catalíticos de esta enzima se muestran subrayados y en color rojo, por su parte los aminoácidos del sitio M1 de unión a zinc son mostrados en verde, mientras que los de M2 pueden verse en azul. Los aminoácidos que sirven como ligando al magnesio se observan en color magenta, Asp 103 es ligando en M2 y M3. Finalmente el sitio de corte para el anclado a GPI se muestra en naranja, donde el nuevo C-terminal (ω) es la serina 515 ($\omega+1$ =Gly 516 y $\omega+2$ = Met 517).

HIPÓTESIS.

La ALP-AR93 de *Aedes aegypti*, contiene una región aminoacídica que interacciona con la toxina Cry11Aa.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar el sitio de unión del receptor fosfatasa alcalina (ALP-AR93) en *Aedes aegypti*, que interacciona con la toxina Cry11Aa.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Construir diferentes fragmentos de la fosfatasa alcalina, expresarlos y purificarlos en *E. coli*.
- Caracterizar la unión de la toxina Cry11Aa a los fragmentos de fosfatasa alcalina producidos en *E. coli*.
- Construir y caracterizar mutantes en el sitio de unión de la toxina Cry11Aa en la fosfatasa alcalina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

1. **Expresión de fragmentos recombinantes de la fosfatasa alcalina de *Aedes aegypti* expresados en *E. coli*.** Para localizar la secuencia de aminoácidos de la fosfatasa alcalina que interacciona con la toxina, se construirán nueve fragmentos de aproximadamente 150 residuos de aminoácidos cada uno, lo cual originará un traslape de aproximadamente 100 aminoácidos entre ellos (como se muestra esquemáticamente en la figura 6). Lo anterior propiciará la delimitación del sitio de unión.
-

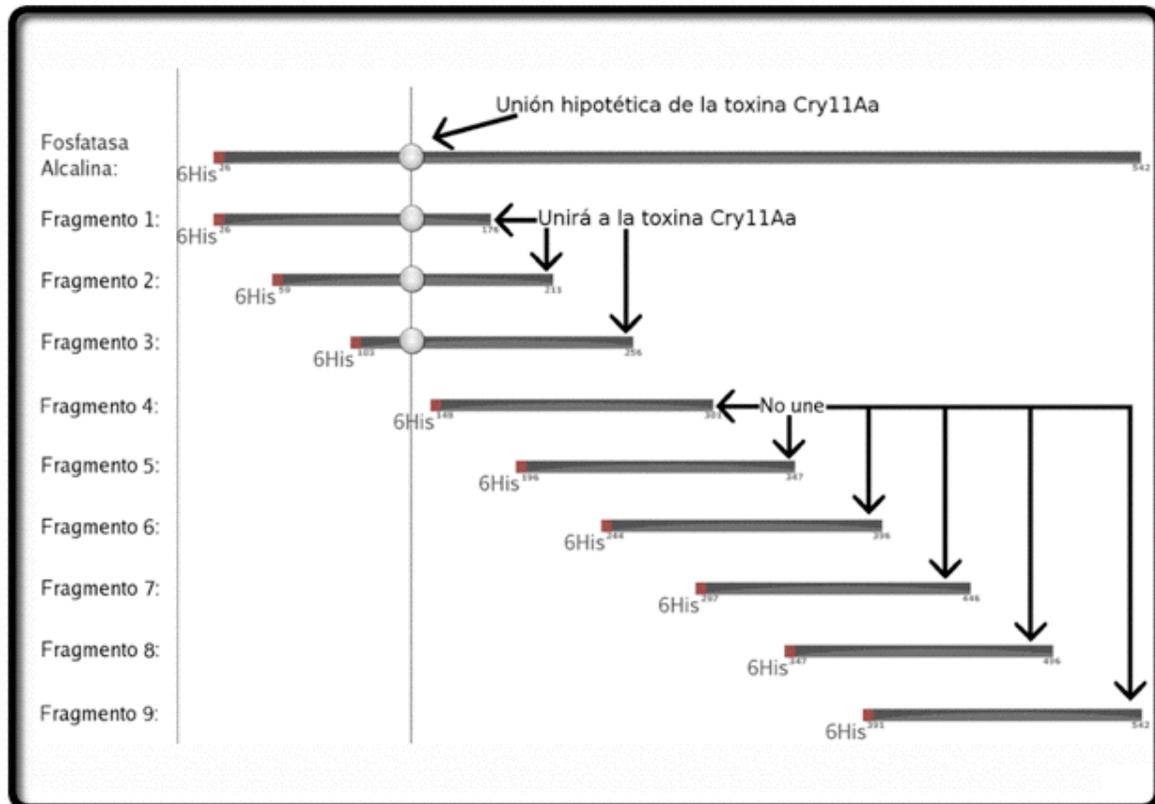


Figura 6. Estrategia experimental. En la figura se muestra un sitio de unión hipotético con fines ilustrativos. De esta manera, se pretende ejemplificar la forma en que se detectará el sitio de unión en la ALP-AR93 a la toxina Cry11Aa, utilizando la estrategia planeada, por tanto el punto representado no tiene por que ser el punto real de unión.

- Ensayos de unión.** La interacción de la toxina con los fragmentos generados se verificará en ensayos de ELISA (interacción en condiciones nativas) y en ensayos de unión de ligando (interacción en condiciones desnaturalizantes). También se realizarán ensayos de unión con la toxina Cry11Aa mutante E266A, que se encuentra afectada en toxicidad y unión a las VMMA (56).
- Construcción de mutantes.** Finalmente, en la región de la ALP-AR93 en que se localice el sitio de unión de la toxina, se realizará un “barrido” de alaninas reemplazando de tres en tres aminoácidos, sobre dicha región. Nuevamente, las mutantes generadas se producirán y purificarán a partir de cultivos de *E. coli* y se analizará la unión de las mismas a la toxina Cry11Aa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de la toxina Cry11Aa.

La cepa de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis*/CG6, la cual contiene el gen *cry11Aa* es usado para la producción de la toxina Cry11Aa, en medio de esporulación (SP) más 25 µg/ml de eritromicina por 72 horas a 30°C con agitación, hasta completar esporulación.

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

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

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

Se separan las fracciones obtenidas y se recupera aquella que contenga los cristales, para eliminar la sacarosa se lava la fracción con agua Mili Q mas tritón X-100 0.01%, centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min 3 veces. Finalmente se resuspende la pastilla en Tris-HCl 50 mM pH 8, 1 mM de PMSF y pueden mantenerse a 4°C.

Solubilización y activación de la toxina.

Los cristales previamente purificados por gradiente de sacarosa se solubilizan durante dos horas a 4°C con 100 mM de NaOH. Se centrifuga a 10000 rpm y se recupera el sobrenadante, la proteína es cuantificada siguiendo el método de Bradford.

Para la activación, la protoxina se neutraliza agregando Tris-HCl 1M pH 8, hasta que el pH de la solución se encuentre entre 8 y 8.5. Se incuba con tripsina en una proporción 1:50 (p/p), dos horas a 25°C con agitación suave. La reacción se detiene con 2.5mM de PMSF; se

centrifuga 10 minutos a 10000 rpm y se recupera el sobrenadante. La cantidad de toxina obtenida se cuantifica por el método de Bradford y el tamaño se analiza en SDS-PAGE al 12%.

Biotinilación de la toxina Cry11Aa.

La toxina se dializa toda la noche a 4°C en 1000 volúmenes de una solución amortiguadora de boratos, la cual está compuesta de ácido bórico 0.05 M, hidróxido de sodio 0.05 M y cloruro de sodio 0.15 M, a un pH 8.6. Posteriormente, la toxina se incuba durante una hora a temperatura ambiente con 40 µl de biotina por microgramo de toxina. La biotina no unida se separa de la toxina con una columna empacada con Sephadex G25 previamente lavada con PBS, se centrifuga 2 minutos a 2000 rpm, se recupera la toxina marcada y se determina la concentración de la misma por el método de Bradford. El marcaje de la toxina se verifica por “western blot”.

Se corre la muestra en SDS-PAGE al 12% y se transfiere a 345 mA por 45 minutos sobre una membrana de PVDF. La membrana se lava con PBS y se bloquea con PBS-Tween 20 al 2% durante 20 minutos. La membrana se lava con PBS y se incuba una hora con estreptavidina acoplada a peroxidasa en PBS-Tween 20 0.1% (1:5000 v/v). Se lava en PBS-Tween 20 0.1% y finalmente en PBS para posteriormente detectar la marca correspondiente con los reactivos de quimioluminiscencia siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Construcción de nueve fragmentos de la fosfatasa alcalina.

A partir de la secuencia de aminoácidos de la fosfatasa alcalina, se diseñaron 9 fragmentos de 150 aminoácidos cada uno, iniciando cada fragmento 45 aminoácidos después que el fragmento anterior. Cada fragmento se amplifica por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los pares de oligonucleótidos correspondientes diseñados en el programa Oligo versión 4.0:

ALPF1-f: 5' –CGG GAT CCC ATC GCA GGA ATT CGT CC- 3'

ALPF1-r: 5' – ACC AAG CTT GGG TAT ATT TGA CCG CAG CCG TC – 3'

ALPF2-f: 5' –CGG GAT CCA GAG ACT GAT TTC CGC GTC G - 3'

ALPF2-r: 5' – ACC AAG CTT GGG GGT GGT CAC AAT GCC TGT GGC – 3'

ALPF3-f: 5' –CGG GAT CCG AGA TGG CAT GCT GAT TCC G- 3'

ALPF3-r: 5' – ACC AAG CTT GGG TCG CAC GAG TTG GGA TGC– 3'

ALPF4-f: 5' –CGG GAT CCA TAA GCA GGT TGC AGA TTC G- 3'

ALPF4-r: 5' – ACC AAG CTT GGG ATA GTA CCA TTC CGA GAT C– 3'

ALPF5-f: 5' -CGG GAT CCT CAT GAG CTG GGC TC- 3'
ALPF5am-f: 5' -CGG GAT CCA ATA TAA CAA CTG CAC G- 3'
ALPF5-r: 5' - ACC AAG CTT GGG CTT CTT TTG TGT TGC TGT CC- 3'
ALPF6-f: 5' -CGG GAT CCA TCC AAA TGA CTG CCA AGA CAT- 3'
ALPF6-r: 5' - ACC AAG CTT GGG ACC GTT TCG TCC AGG GAT TTC - 3'
ALPF7-f: 5' -CGG GAT CCT CTC GGA ATG GTA CTA TAG C- 3'
ALPF7-r: 5' - ACC AAG CTT GGG TTG TCG TGG GAT GAA CC- 3'
ALPF8-f: 5' -CGG GAT CCA AGA AGA CCC CAC CCT AAG C- 3'
ALPF8-r: 5' - ACC AAG CTT GGG GGT TTC GTA CTT CAA AGG- 3'
ALPF9-f: 5' -CGG GAT CCC CCT GGA CGA AAC GGT C- 3'
ALPF9-r: 5' - ACC AAG CTT GGG CCC TAT GCA CGC CGT TAA TCC- 3'
ALPF1bg1-f: 5' -GAA GAT CTA TCG CAG GAA TTC GTC C- 3'
ALPF2bg1-f: 5' -GAA GAT CTG AGA CTG ATT TCC GCG TCG - 3'
ALPF3bg1-f: 5' -GAA GAT CTA GAT GGC ATG CTG ATT CCG- 3'
ALPF4bg1-f: 5' - GAA GAT CTT AAG CAG GTT GCA GAT TCG- 3'
ALPF5bg1-f: 5' -GAA GAT CTC ATG AGC TGG GCT C- 3'
ALPF6bg1-f: 5' -GAA GAT CTT CCA AAT GAC TGC CAA GAC - 3'
ALPF7bg1-f: 5' -GAA GAT CTC TCG GAAT GGT ACT ATA GC- 3'
ALPF8bg1-f: 5' -GAA GAT CTA GAA GAC CCC ACC CTA AGC- 3'
ALPF9bg1-f: 5' -GAA GAT CTC CTG GAC GAA ACG GTC- 3'

Para la amplificación se utilizan 5 µl de MgCl₂, 5µl de la solución tampón de PCR, 5µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 0.5 µl de ADN de ALP-AR93 clonada en el vector pQE-32 como templado, 0.5 µl de Taq polimerasa y el respectivo par de oligonucleótidos para cada fragmento, a una concentración de 20 pmol de cada oligonucleótido; la reacción es llevada a 50 µl con agua libre de nucleasas. Las condiciones de la reacción son las siguientes:

- ⇒ Un primer ciclo de 94 °C por un minuto.
- ⇒ 30 ciclos de 94 °C un minuto para desnaturalización, 55°C un minuto para la hibridación del cebador y 72 °C un minuto para la extensión de la cadena.
- ⇒ Un último ciclo de 72 °C durante 10 minutos.

Los fragmentos amplificados son purificados en gel con el kit de QIAGEN y digeridos en los sitios BamHI y HindIII, o BglII y HindIII, según corresponda, siguiendo las recomendaciones del fabricante (los sitios de restricción se encuentran subrayados en las secuencias de oligonucleótidos). Una vez digeridos se purifican y se ligan 16 horas a temperatura ambiente en

el vector pQE-32, previamente digerido en los sitios BamHI y HindIII o en el vector pET-32b digerido en los sitios BglIII y HindIII.

Se transforman 10 μ l de la ligación purificada en 60 μ l de células electrocompetentes de la cepa de *E. coli* DH5 α en cubetas de 2 mm bajo las siguientes condiciones: 25 μ F, 200 Ω , y 2.5 kV. Las células se dejan recuperar durante 1-3 horas en 1 ml de medio SOC y se platean 25 y 50 μ l en LB sólido adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina. De las colonias crecidas se seleccionan 12 de cada fragmento, y se analiza la presencia de inserto mediante PCR en colonia, y una vez purificado el ADN (con ayuda del kit de promega) mediante una doble digestión y su análisis posterior en un gel de agarosa al 1%. Finalmente se realiza el análisis de secuencia.

Las células electrocompetentes son preparadas de la siguiente manera: 500 ml de medio YENB se inoculan con 2.5 ml de un precultivo crecido toda la noche. Cuando el cultivo alcanza una OD₆₀₀ de 0.7, el cultivo es enfriado en hielo por 15 minutos y centrifugado a 4000 x g por 10 minutos. La pastilla se lava dos veces con 100 ml de agua fría estéril. Las células se resuspenden en 25 ml de glicerol al 10%, se centrifuga a 4000 x g durante 10 minutos. Finalmente, la pastilla es resuspendida en 1.5 ml de glicerol al 10% y se preparan alícuotas de 60 μ l. Las alícuotas no utilizadas para transformación se almacenan a -70 °C.

Expresión y purificación de los fragmentos de la fosfatasa alcalina.

Los vectores con inserto se transforman en células competentes por calcio de las cepas de expresión de *E. coli* M15 (para pQE-32) y ER2566 (para pET-32). Las células son preparadas de la siguiente manera: Se inoculan 2 ml de un precultivo de la cepa de expresión correspondiente (crecido toda la noche), en 100 ml de medio LB. Cuando la OD₆₀₀ sea igual a 0.4, el cultivo se enfría 10 minutos en hielo, y se centrifuga a 6000 rpm por 10 minutos. La pastilla se resuspende en 10 ml de una solución fría de CaCl₂ 60 mM y 15% de glicerol. Se incuba 30 minutos en hielo, y se centrifuga nuevamente a 6000 rpm por 10 minutos. La pastilla resultante se resuspende en 2 ml de la solución fría de CaCl₂ 60 mM y 15% de glicerol, y se preparan alícuotas de 200 μ l. Las células no utilizadas para transformar son almacenadas a -70 °C.

La transformación se realiza añadiendo 100 ng del ADN de cada construcción, a una alícuota de 200 μ l de células, las cuales son incubadas en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las células se someten a un choque de calor (42 °C por 45 segundos) y se incuban en hielo durante dos minutos. Pasado este tiempo se agregan 800 μ l de medio LB, y las

células se dejan recuperar 1 hora. Finalmente se platean 20 μ l en placas de LB agar adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina, más 30 μ g/ml de kanamicina para el caso de la cepa M15 .

Después de 24 horas de crecimiento, se prepara un inóculo de cada una de las clonas a expresar en 3 ml de medio 2xTY adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina para la cepa ER2566 y 100 μ g/ml de ampicilina más 30 μ g/ml de kanamicina para la cepa M15. Se incuban durante 12 h a 30 °C y 250 rpm. Pasado este tiempo se inoculan 500 μ l del precultivo de cada cepa en 10 ml de medio 2xTY más los antibióticos correspondientes (la expresión puede escalarse inoculando 1 ml de precultivo por cada 20 ml de cultivo total). Se incuban a 37 °C a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. La expresión de cada fragmento en la cepa ER2566 es inducida con 1 mM de IPTG a 30 °C durante 5 horas a 250 rpm. En el caso de los fragmentos expresados en M15, la expresión es inducida con 1 mM de IPTG a 25 o 30 °C durante 5 o 6 horas a 250 rpm . La expresión de los fragmentos en la cepa ER2566 se analiza en SDS-PAGE al 12% y la de los fragmentos en la cepa M15 se analiza en SDS-PAGE al 15% .

Las células se recuperan centrifugando el cultivo a 4,000 x g durante 20 min. La pastilla se resuspende en 5 ml de solución B (100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Tris-HCl y 8 M de urea, pH 8) por gramo de células. Se sonica dando dos pulsos de 10 watts por diez segundos, se centrifuga 20 minutos a 14000 rpm y se recupera el sobrenadante.

- ⇒ *Purificación "batch"*. El lisado celular se incuba toda la noche, con 200 μ l de resina de níquel-agarosa (QIAGEN) por ml de lisado celular, con agitación suave. Se centrifuga a 10000 rpm durante dos minutos, se retira el sobrenadante. Se realizan dos lavados de la resina, agregando en cada uno de ellos 350 μ l de imidazol 35 mM, se centrifuga a 10000 rpm durante dos minutos y se retira el sobrenadante. Se lava la resina nuevamente, pero esta vez con 350 μ l de PBS, se centrifuga a 10000 rpm durante dos minutos y se retira el sobrenadante. Finalmente, cada fragmento es eluido con 350 ml de imidazol 500mM, centrifugando a 10000 rpm 10 minutos, el sobrenadante se recupera y se analiza en SDS-PAGE al 12%. Las proteínas son entonces cuantificadas por el método de Bradford.

 - ⇒ *Purificación por columna*. Se empaqueta una columna cromatográfica con 1 ml de resina Níquel-agarosa (QIAGEN). Cinco mililitros del lisado celular se incuban toda la noche con resina de níquel-agarosa, con agitación suave. Se permite que la resina se asiente por gravedad y se acelera el paso del lisado por la columna con ayuda de una bomba peristáltica. Se lava con 10 ml de imidazol 20 mM y con 6 ml de imidazol 35 mM, seguidos de un lavado de 20 ml de PBS. Finalmente, se eluye con 4 ml de imidazol 500
-

mM, dividiendo la elución en dos fracciones. Todas las fracciones son colectadas y analizadas en SDS-PAGE al 12%. Las proteínas son entonces cuantificadas por el método de Bradford.

“Western blot”

Los fragmentos recombinantes se separan en SDS-PAGE al 15%, y son transferidos a una membrana de PVDF a 345 mA por 60 minutos. La membrana se bloquea con leche descremada al 5%, 0.1% Tween 20 en PBS durante una hora. Se lava con PBS-Tween 20 0.1% y se incuba una hora con anticuerpo antihistidinas acoplado a peroxidasa (QIAGEN) en una relación 1:5000 en PBS-Tween 20 0.1%. Finalmente se lava perfectamente con PBS-Tween 20 0.1% y se detecta la expresión con los reactivos de quimioluminiscencia.

Experimentos de unión de ligando

Los fragmentos de la fosfatasa se separan en SDS-PAGE al 12%. Se transfieren a una membrana de nitrocelulosa a 350 mA por 45 minutos. La membrana se lava 20 minutos con PBS. Se bloquea con BSA al 1%, Tween 20 0.1% en PBS durante una hora. Se hacen dos lavados de la membrana por 15 minutos y dos por cinco minutos con PBS-Tween 20 0.1%. Se incuba la membrana durante dos horas con concentraciones de toxina Cry11Aa marcada con biotina que van de 1 a 10 nM (o 10 nM para el caso de la toxina Cry4Ba) en PBS-Tween 20 0.1%. La membrana se lava con 40 ml de PBS-Tween 20 0.1% 15 minutos dos veces y con 30 ml de PBS-Tween 20 0.1% dos veces, por cinco minutos. Se incuba durante una hora con estreptavidina acoplada a peroxidasa (1:5000 v/v). Se enjuaga cinco veces la membrana con 30 ml de PBS-Tween 20 0.1%. Se lava con 40 ml de PBS por 15 min y dos veces con 30 ml de PBS por cinco minutos. La unión de la toxina Cry11Aa o Cry4Ba es revelada usando reactivos de quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Corte de la proteína fusión (tiorredoxina) a la fosfatasa alcalina.

El vector pET-32b, contiene el sitio de corte de trombina, el cual es utilizado para remover la proteína fusión tiorredoxina (Trx). Se utilizan 0.02 U de trombina por cada 30 µg de ALP fusionada a Trx en una reacción de 50 µl totales, en solución amortiguadora de corte (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 1.5 M NaCl, 25 mM CaCl, Novagen). La reacción se incuba durante 16 hrs a 20 °C. El corte es analizado en SDS-PAGE al 10%. La trombina utilizada se encuentra biotinilada, por lo que puede removerse con una resina de estreptavidina-agarosa.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Cien microlitos de distintas concentraciones de cada fragmento (o de la toxina Cry11Aa) en PBS pH 7.2 son colocadas en un pozo de una placa de ELISA. La placa de ELISA se incuba a 4°C toda la noche. Cada pozo se lava con 300 µl de PBS, este procedimiento se repite 3 veces, posteriormente los pozos son bloqueados con 200 µl de BSA al 2% en PBS dos horas a 37°C. Los pozos se lavan con 300 µl de PBS 3 veces. Cada pozo es llenado con 100 µl de distintas concentraciones de Cry11Aa (o de fragmento, según corresponda) en PBS-tween al 0.1%, se incuba 1 hr a temperatura ambiente, posteriormente los pozos son lavados 3 veces con 300 µl de PBS-tween al 0.1% y 3 veces con PBS. Se agregan 100 µl de una solución de PBS-tween al 0.1% con suero antiCry11Aa, en una relación 1:5000 (v/v) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente (los fragmentos, son detectados con antihistidinas 1:2000 (v/v)). La caja de ELISA es lavada 3 veces con 300 µl de PBS-tween al 0.1% y 3 lavados de PBS. Los pozos son ahora incubados con 100 µl de PBS-tween al 0.1% con un suero anticonejo acoplado a peroxidasa 1:5000 (v/v) –el suero antihistidinas se detecta con un suero antiratón en la misma relación que el de anticonejo-, la incubación se realiza por 1 hora a temperatura ambiente y se realizan los 6 lavados correspondientes. Se incuba de 20 a 30 minutos con el sustrato (2mM de o-fenilendiamina, 0.7% de H₂O₂ en 0.1M de una solución amortiguadora de fosfatos pH 5). La absorbancia a 490 nm se determina en un lector de cajas de ELISA.

Construcción de un modelo de homología de la ALP-AR93.

Para la construcción de un modelo de homología de la ALP de *Ae. aegypti*, se hace uso del programa Swiss-Pdb Viewer, el cual permite crear un modelo teórico a partir del conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína a modelar y la estructura conocida de una proteína homóloga. Para la obtención del modelo de la ALP-AR93 se utilizó la estructura cristalográfica de la ALP tejido-no específica de camarón (57). El programa permite la construcción de un modelo preliminar, que posteriormente envía al servidor SWISS MODEL, que construye el modelo de homología final.

Preparación de las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA).

Las VMMA fueron preparadas a partir de intestinos disectados de larvas de *Ae. aegypti* del cuarto estadio. Los intestinos disectados son colocados en una solución MET que contiene 300 mM de Manitol, 5mM de EGTA y 20 mM de Tris-HCl pH 7.4, y almacenados a -70 °C hasta la preparación de las VMMA.

Para la preparación de las VMMA, los intestinos se descongelan y el tejido se rompe con la ayuda de un homogenizador Doucer. Al homogenado se le agrega $MgCl_2$ 240 mM, para una concentración final de 12mM de $MgCl_2$, y se deja reposar en hielo durante 20 min. La mezcla entonces se centrifuga a 3000 xg durante 15 minutos a 2°C. El sobrenadante se recupera manteniéndose en hielo, y la pastilla se resuspende en la solución MET para volverse a tratar. Los sobrenadantes obtenidos se centrifugan a 100000 xg por 10 minutos a 2°C. La pastilla resultante se resuspende en solución MET (1µl por intestino inicial), se cuantifica por el método de Bradford, y se preparan alícuotas, las cuales se almacenan a -70°C.

Ensayos de unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA.

La toxina Cry11Aa biotinilada a una concentración de 5 nM, es preincubada una hora a temperatura ambiente con distintos excesos de los fragmentos y/o de la ALP-AR93 en una solución de BSA 0.1% en PBS-Tween 20 0.1%. Se agregan 10 µg de VMMA para un volumen total de 100 µl y se incuba una hora a temperatura ambiente. La toxina no unida es removida centrifugando a 14000 xg, 10 minutos a 25 °C. La pastilla que contiene las VMMA con la toxina unida es lavada dos veces con BSA 0.1% en PBS-Tween 20 0.1% y finalmente se resuspende en PBS. Las muestras son separadas en SDS-PAGE al 12% y se transfieren a una membrana de PVDF a 350 mA por 45 minutos. La membrana se lava con PBS y se bloquea con PBS-Tween 20 al 2% durante 20 minutos. La membrana se lava con PBS y se incuba una hora con estreptavidina acoplada a peroxidasa en PBS-Tween 20 0.1% (1:4000 v/v). Se lava en PBS-Tween 20 0.1% y en PBS. La membrana se incuba con los reactivos de quimioluminiscencia siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis de disminución de área en la unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA.

La cuantificación de la disminución de la unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA, se realizó mediante el análisis de disminución del área de las manchas en la imagen examinada. Con la ayuda del programa Quantity One 4.6 de BIORAD, se obtuvo la cantidad de puntos por píxel por milímetro cuadrado. El área de la unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA sin competidor fue tomado como el 100%, y a partir de éste se calcularon los porcentajes de unión de la toxina a las VMMA en presencia de cada competidor.

Construcción de mutantes triples en el fragmento 5.

Trece mutantes se diseñaron en base a la secuencia del sitio de unión 2 de la ALP-AR93 a la toxina Cry11Aa, sustituyendo tres aminoácidos por mutante. La construcción de dichas

mutantes se llevó a cabo mediante mutagénesis sitio dirigida con la ayuda del sistema QuikChange de Stratagene, utilizando el plásmido pET-32b que contenía al fragmento 5 como templado y los siguientes oligonucleótidos:

Mutante1 (N257A/N258A/P259A):

5'- GCA TCC CAA CTC CTG CGA GCC GCC GCT GGC AAA AAT TTG AAA GTC ATT C- 3'

Mutante2 (G260A/K261A/N262A):

5'- CTC GTG CGA AAC AAC CCT GCC GCA GCT TTG AAA GTC ATT CTC GGG GG- 3'

Mutante3 (L263A/K264A/V265A):

5'- GAA ACA ACC CTG GCA AAA ATG CGG CAG CCA TTC TCG GGG GCG GCA GAC G- 3'

Mutante4 (I266A/L267A/G268A):

5'- CTG GCA AAA ATT TGA AAG TCG CTG CCG CGG GCG GCA GAC GTA AGT TCA C- 3'

Mutante5 (G269A/G270A/R271A):

5'- AAT TTG AAA GTC ATT CTC GGG GCC GCC GCA CGT AAG TTC ACT CCC AAC ACG- 3'

Mutante6 (R272A/K273A/F274A):

5'- CAT TCT CGG GGG CGG CAG AGC TGC GGC CAC TCC CAA CAC GGA GAA GGA C- 3'

Mutante7 (T275A/P276A/N277A):

5'- GGC GGC AGA CGT AAG TTC GCT GCC GGC ACG GAG AAG GAC CCC TCT GGC- 3'

Mutante8 (T278A/E279A/K280A):

5'- CGT AAG TTC ACT CCC AAC GCG GCG GCG GAC CCC TCT GGC AAA CCG GGA C- 3'

Mutante9 (D281A/P282A/S283A):

5'- CAC TCC CAA CAC GGA GAA GGC CGC CGC TGG CAA ACC GGG ACA GCG CAT G- 3'

Mutante10 (G284A/K285A/P286A):

5'- CAC GGA GAA GGA CCC CTC TGC CGC AGC GGG ACA GCG CAT GGA TGG CGT C- 3'

Mutante11 (G287A/Q288A/R289A):

5'- GGA CCC CTC TGG CAA ACC GGC AGC GGC CAT GGA TGG CGT CAA CCT GAT C- 3'

Mutante12 (M290A/D291A/G2A92):

5'- GGC AAA CCG GGA CAG CGC GCG GCT GCC GTC AAC CTG ATC TCG GAA TGG- 3'

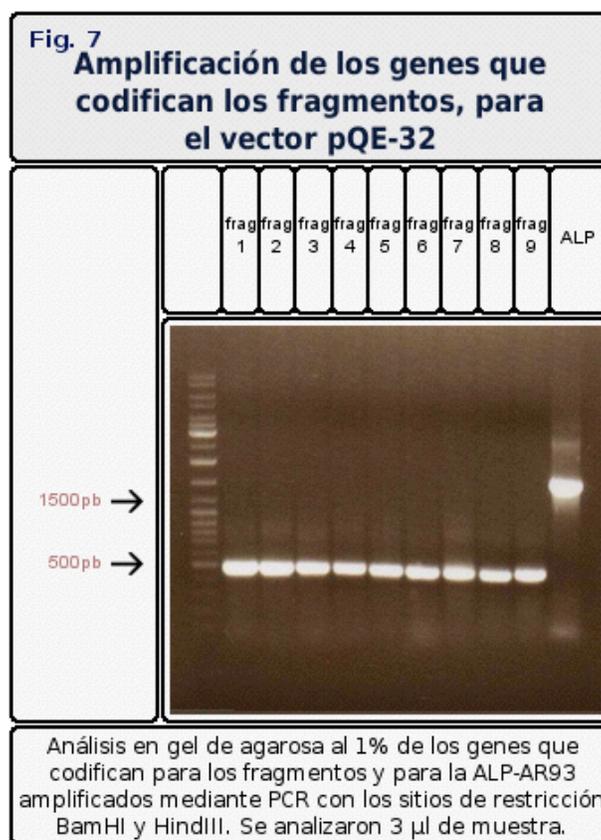
Mutante13 (V293A/N294A/L2A95/I296A):

5'- CCG GGA CAG CGC ATG GAT GGC GCC GCC GCG GCC TCG GAA TGG TAC TAT AGC AAA
CCC- 3'

RESULTADOS.

Clonación de los nueve fragmentos de la ALP-AR93 en pQE-32.

A partir de la secuencia de la fosfatasa alcalina de *Ae. aegypti*, se diseñaron una serie de oligos con los cuales se generaron nueve genes que codifican los fragmentos de la ALP-AR93. Todos y cada uno de los ADN de los fragmentos amplificaron según lo esperado como se ilustra en la figura 7.

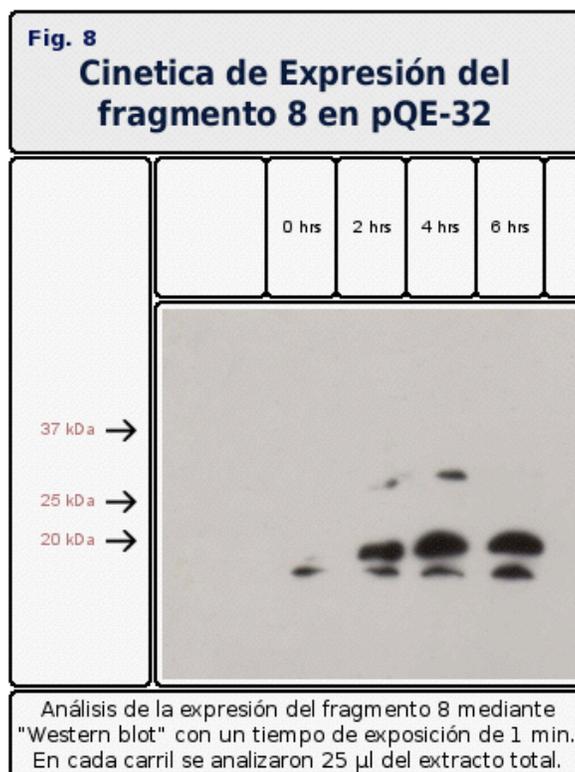


Estos productos fueron purificados y digeridos con las enzimas BamHI y HindIII, lo mismo que vector pQE-32 para ser ligados y transformados en la cepa de *E. coli* DH5 α . Todas las clonaciones fueron corroboradas por secuencia.

De los nueve fragmentos, ocho genes lograron clonarse satisfactoriamente. La excepción fue el fragmento 7, el cual en los primeros intentos de clonación falló el paso de ligación, ya que no se podía conseguir un ADN que tuviera el vector con este inserto. Cuando finalmente se logró insertar el gen que codifica al fragmento 7 en el vector pQE-32 la secuencia del inserto no coincidía con la secuencia esperada.

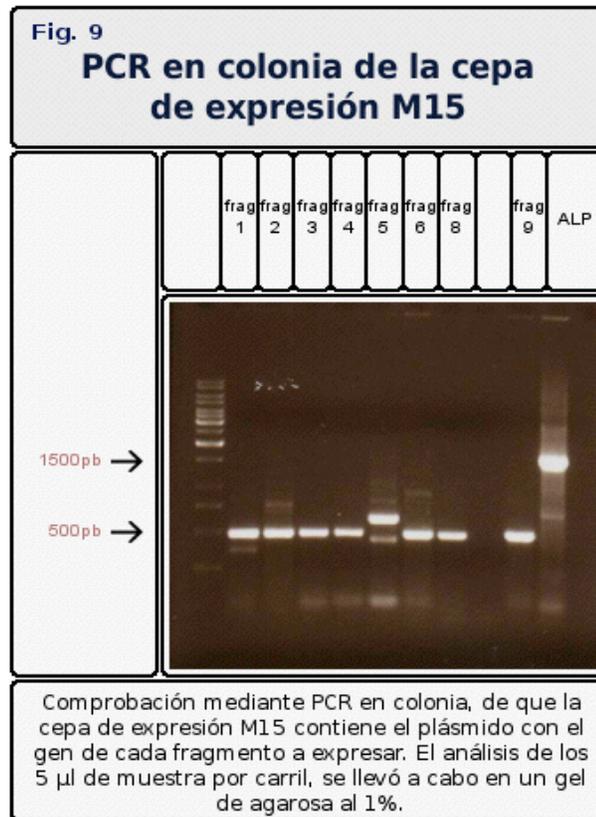
Expresión de los nueve fragmentos de la ALP-AR93 en pQE-32.

El ADN que codifica para cada fragmento de la ALP-AR93 satisfactoriamente clonado y secuenciado, fue transformado en la cepa de expresión M15 de *E. coli*. Con el fin de establecer las condiciones de expresión de cada fragmento, se realizó una cinética de expresión de los mismos. Las condiciones ensayadas fueron 30 °C, 1mM de IPTG y 6 horas de inducción, tomándose muestra durante el proceso cada dos horas. De los ocho fragmentos que se transformaron, los fragmentos 3, 8 y 9 fueron los únicos en los que se observó cierto nivel de expresión bajo estas condiciones. En la figura 8 se muestra la cinética de expresión del fragmento ocho detectado mediante “western blot” con un anticuerpo antihistidinas, es importante notar que la expresión máxima era obtenida a las 4 horas de inducción.



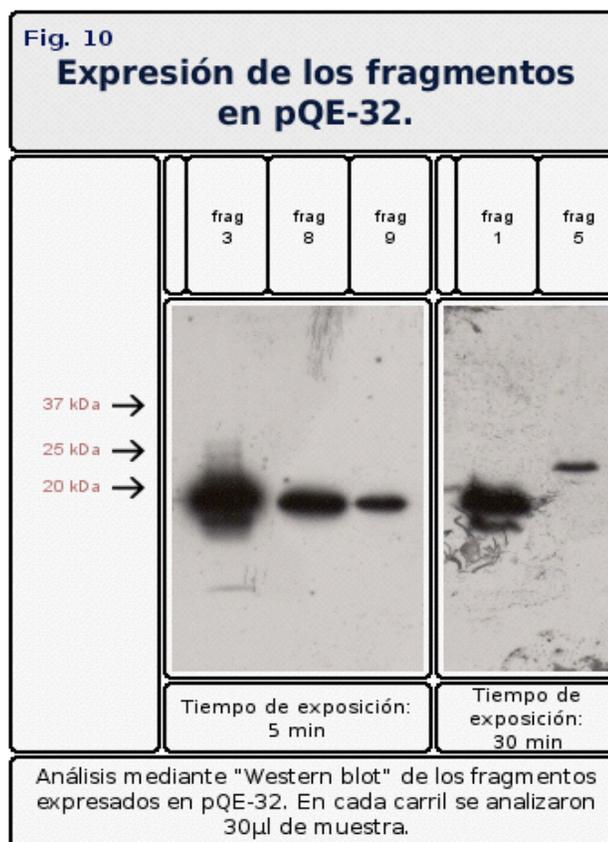
Para tratar de expresar el resto de los fragmentos se modificaron las variables de expresión (disminución de la temperatura durante la inducción, concentración de IPTG, tiempo de inducción); sin embargo, ninguna de las modificaciones permitieron que se expresaran. A partir de este punto, cada vez que una inducción se llevaba a cabo, se transformaban nuevamente los ADN para asegurarse que la falta de expresión no se debía a que la cepa almacenada había perdido el plásmido con inserto. Así mismo, para comprobar que el plásmido

seguía dentro de la cepa, se analizaron mediante PCR en colonia los genes que codifican los fragmentos transformados (figura 9).



Otra estrategia utilizada para tratar de mejorar la expresión de los fragmentos fue la de ampliarlos, para lo cual se utilizó el fragmento 5 como prototipo. En la figura 9 se muestra la fusión del fragmento cuatro con el cinco, esto origina que el tamaño del gen fusionado sea de 597 pb. Posteriormente se mandó sintetizar un oligonucleótido que permitiera amplificar el gen del fragmento cinco 51 pb más con respecto al original, el cual consta de 456 pb, esta estrategia funcionó moderadamente. Con esto se pudo conseguir la expresión del fragmento 5; sin embargo la cantidad de proteína obtenida era muy poca.

Al final a una temperatura de 25°C, cinco horas de inducción y 1mM de IPTG, sólo hubo expresión de cinco fragmentos como se muestra en la figura 10.



Los fragmentos 3, 8 y 9 se expresaron consistentemente, aunque el rendimiento no se mejoró de manera notable al variar condiciones. En la figura 10 se analizaron 30 µl de un volumen de cultivo total de 10 ml, como la expresión no era evidente con una tinción de Coomassie, se analizaron las muestras mediante "western blot". Para el resto de los fragmentos hubo necesidad de concentrar las células diez veces, y a partir de esto se cargaron 30 µl en un gel que fue analizado por western blot. Sólo se observó expresión de otros dos fragmentos: el 1 y el 5 (figura 10).

A partir de este resultado, se analizó a qué partes de la ALP-AR93 correspondían cada uno de los fragmentos expresados.

Fragmento 1: aminoácidos del 26 al 176 :

SQEFVQYLTTTPSDHVVHPPDRDGGDGNLNRKKRLISASDYEEETAQFWNIGAQLKLKEQLLKRKNFNK
AKNVIFFLGDGMSIPTLAASRMVYLGQKQGHSGEETQLSFEEFPDVGLVKTYCVDKQVADSACSATAYL
CGVKANYATIGVTAA

Fragmento 3: aminoácidos del 103 al 256:

DGMSIPTLAASRMVYLGQKQGHSGEETQLSFEEFPDVGLVKTYCVDKQVADSACSATAYLCGVKANYA
TIGVTA AVKYNNCTTGNDPKNHVHSIMSWAQAAGKATGIVTTTRVTHASPAGTYAHVSNREHECDADI
LAQNADPNDCQDIASQLVR

Fragmento 5 amplificado: aminoácidos del 179 al 347:

YNNCTTGNDPKNHVHSIMSWAQAAGKATGIVTTTRVTHASPAGTYAHVSNREHECDADILAQNADPN
DCQDIASQLVRNPNPGKNLKVILGGRRKFTPNTEKDPGKPGQRMG VNLISEWYYSKPLGSARYVTN
KQGLMGINFNETEYLMGLFNVDHMKYHMDSNPKE

Fragmento 8: aminoácidos del 347 al 496:

EDPTLSDLTYAAIKTLEKNKAGFVLFVEGGKIDLAHHETKARKSLDETVQLSEAVQLATQYTNSDDTLIL
VTADHAHTMSMAGYSKRGH DILGVSGSSHDKGKSPYTTLSYANGPGPSLTDGRRLNITEEMLTNKD
FQYPKLVPLKYET

Fragmento 9: aminoácidos del 391 al 542:

LDETVQLSEAVQLATQYTNSDDTLILVTADHAHTMSMAGYSKRGH DILGVSGSSHDKGKSPYTTLSYA
NGPGPSLTDGRRLNITEEMLTNKDFQYPKLVPLKYETHGGDDVALFAYGPWSHLFSGMYEQNVIPHI
IGYAAACIGSGLTACIG

En la figura 11 se puede observar que estos cinco fragmentos son suficientes para “barrer” la proteína completa, por lo que con estas muestras se procedió a hacer un experimento de unión de ligando.

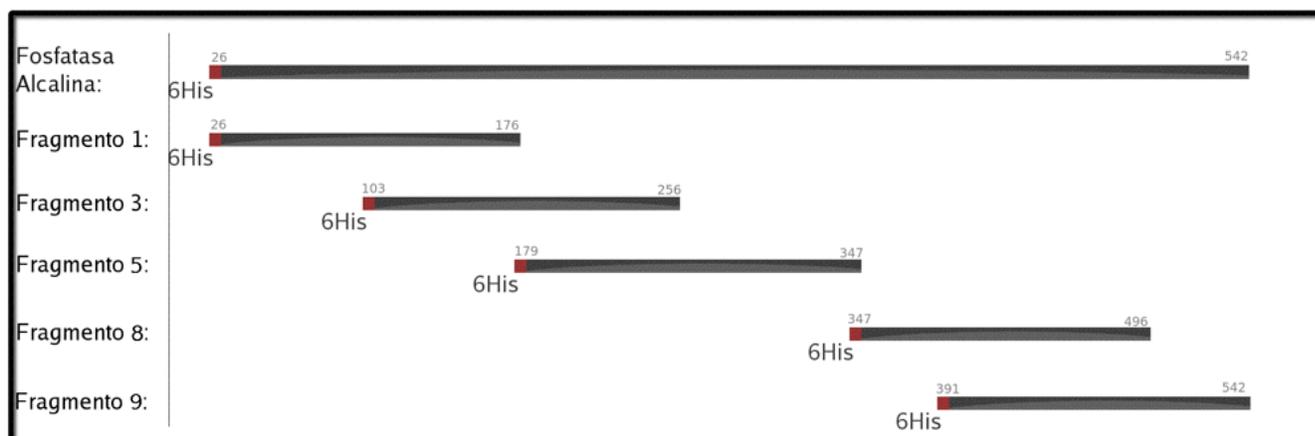
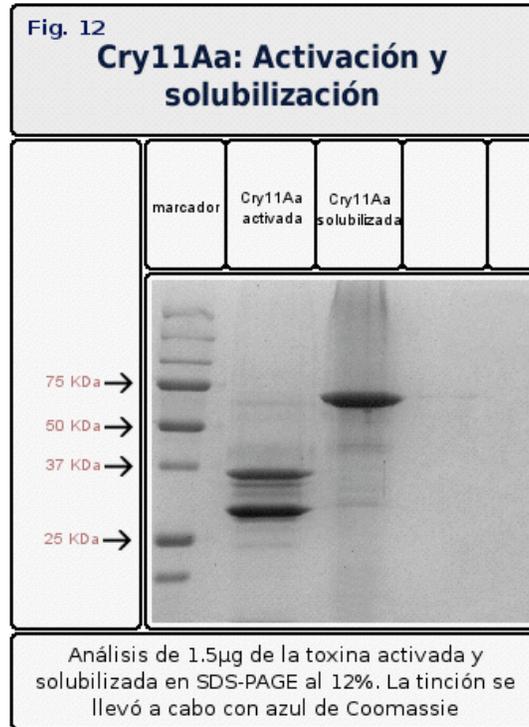


Figura 11.

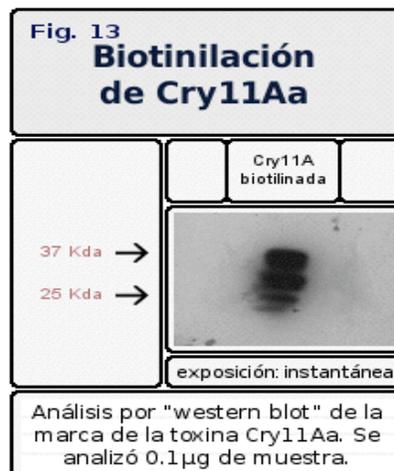
Regiones que cubren en la fosfatasa alcalina los fragmentos que se expresan.

Producción y purificación de la toxina Cry11Aa.

La obtención de los cristales de la toxina Cry11Aa se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Posterior a la purificación de los cristales, se tomó una alícuota de 500 μ l para solubilizarla y activarla con tripsina, previa cuantificación de la misma. En la figura 12 se muestra a la toxina en su forma soluble y activa. Como se reporta en la literatura, la protoxina de Cry11Aa tiene un peso de 70 kDa, mientras que su forma activada con tripsina consiste de dos fragmentos: uno de 36 y otro de 32 kDa (27).

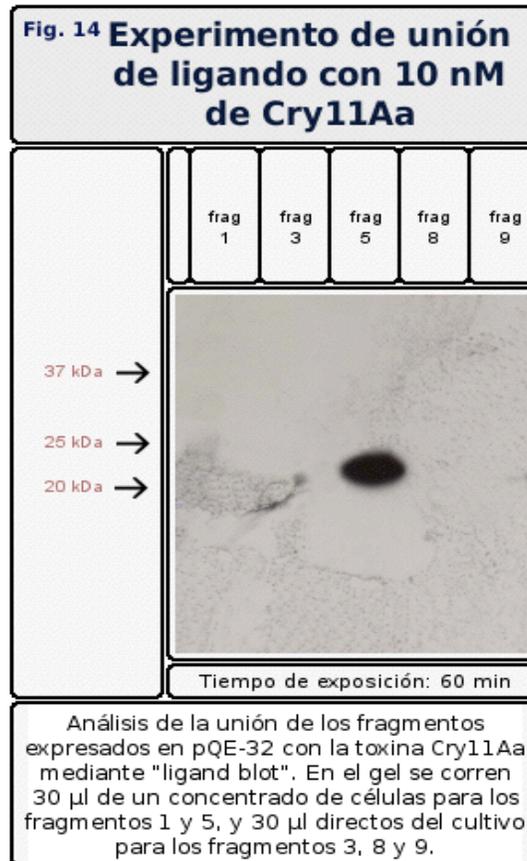


Una vez activada la toxina, ésta se marcó con biotina para poder ser usada en los ensayos de unión de ligando. La comprobación de la marca de la toxina, se llevó a cabo mediante un “western blot” el cual puede verse en la figura 13.



Experimento de unión de ligando.

Treinta microlitros de las mismas muestras en las que se observó expresión (figura 10), fueron usados para realizar el experimento de unión con la toxina Cry11Aa marcada con biotina. Tras 15 minutos de exposición sólo se observaba la unión de la toxina al fragmento cinco (datos no mostrados) y a los 60 minutos no se observó nada mas que el aumento de intensidad de la banda del fragmento 5 (figura 14).



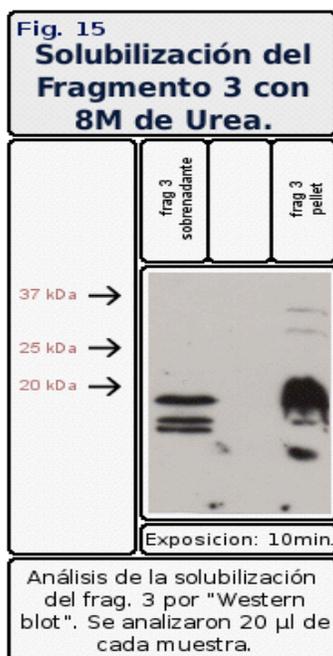
El experimento no pudo reproducirse por dos razones principales:

- ⇒ No siempre hay expresión de los fragmentos 1 y 5.
- ⇒ No se analiza la unión con la misma cantidad de fragmento. La muestra utilizada es extracto total del cultivo y, en ocasiones, la toxina une inespecíficamente a proteínas de *E. coli*, pues hay mayor cantidad de ellas que de los fragmentos expresados.

Por lo tanto, era necesario repetir el experimento con los fragmentos purificados.

Purificación del fragmento 3 expresado en pQE-32.

Siendo el fragmento 3 el que muestra una mejor expresión entre los cinco, se intentó purificarlo a partir de un cultivo de 300 ml. Para la solubilización del fragmento se utilizó urea 8 M (ver materiales y métodos). La figura 15 nos muestra que el fragmento es prácticamente insoluble, pues al analizar la pastilla y el sobrenadante después del tratamiento con urea, el fragmento se encuentra mayoritariamente en cuerpos de inclusión.

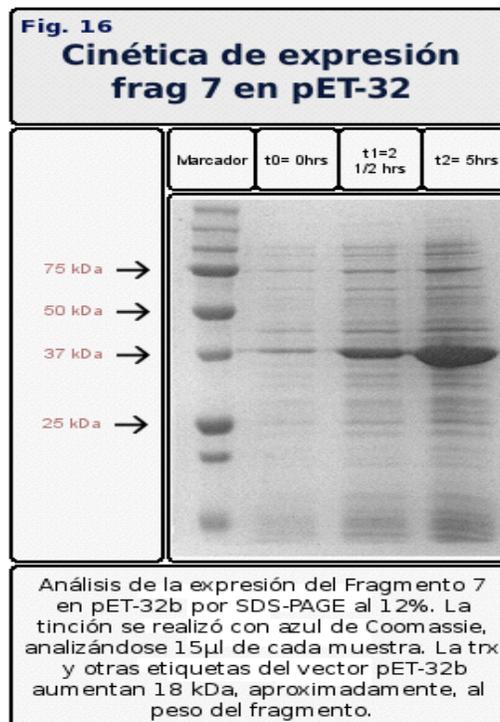


Clonación y expresión de los nueve fragmentos y de la ALP-AR93 en pET-32b.

Dados los problemas de expresión y purificación de los fragmentos clonados en el vector pQE-32, se buscó una alternativa que facilitara la obtención de estos productos. Existen múltiples variables que pudieron ocasionar el fracaso obtenido con el vector pQE-32 entre los que se encuentran: inestabilidad del mRNA, rápida degradación de los fragmentos al término de la traducción debido a que no adquieren una estructura estable, y/o porque al ser la secuencia de una proteína eucarionte existen diferencias en el uso de codones con respecto a las proteínas procariontes, lo anterior puede inhibir la síntesis de la proteína, y afectar la estabilidad del mRNA y del propio plásmido (62,63). En el caso del aminoácido arginina, de las 16 argininas presentes en la secuencia de ALP-AR93, cinco se encuentran codificadas por los codones AGG y AGA, que son infrecuentemente utilizados por *E.coli* (63), y seis por los codones CGA Y CGG cuya frecuencia en *E. coli* es baja, aunque no causa tantos problemas de expresión como los codones AGG y AGA (63).

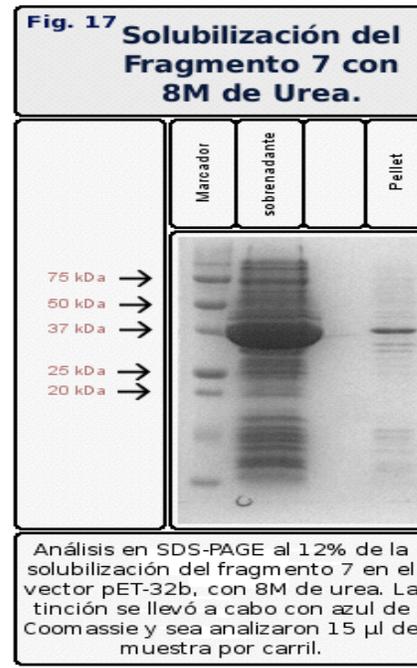
Por lo anterior, se consideró hacer pruebas con cambios de vector, cepa o incluso sistema de expresión. La primera prueba se hizo mediante un cambio en el vector, se escogió el pET-32b porque además de tener un promotor fuerte (T7), cuenta con una proteína fusión (tiorredoxina), que proporciona una serie de ventajas a la proteína que se fusiona, como estabilidad del mRNA, estabilidad a la proteína pasajero post-traducción (dado que la tiorredoxina adquiere su estructura terciaria rápidamente), solubilidad, y una probabilidad más alta de que la traducción llegue a término pese a la presencia de codones raros en la proteína pasajero (62,63).

La prueba se llevó a cabo con el fragmento 7, fue escogido al ser el único que no se pudo clonar en el vector pQE-32. Se tuvo que diseñar un oligonucleótido sentido distinto para poder clonarlo en pET-32b, pues de usarse el ya diseñado para pQE-32, correría el marco de lectura del fragmento. La expresión del fragmento 7 fue realizada induciendo con 1mM de IPTG, por cinco horas a 30°C. En la figura 16 se observa la cinética de expresión de este fragmento. En el gel se analizaron 15 µl de cada una de las muestras tomadas con dos horas y media de diferencia.

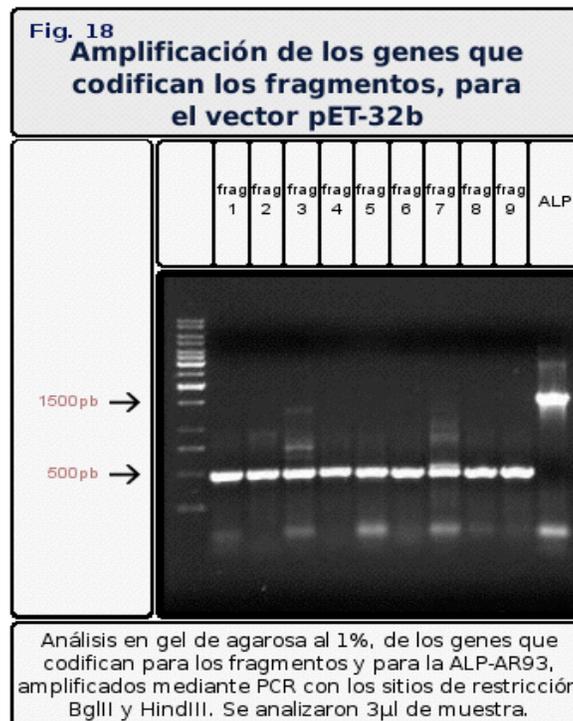


La expresión observada claramente por tinción con azul de Coomassie sugirió el cambio de todos los fragmentos a este vector; sin embargo, era necesario tener la certeza de que el fragmento expresado no permanecería en cuerpos de inclusión, como fue el caso del fragmento 3 expresado en pQE-32. En la figura 17 se observa la solubilidad del fragmento 7 con 8 M de urea. Cabe señalar que la tiorredoxina no consiguió la solubilidad del fragmento 7 sin el uso de urea,

pero en la literatura se menciona que no siempre es garantía que la tioredoxina haga soluble a la proteína pasajero (62).

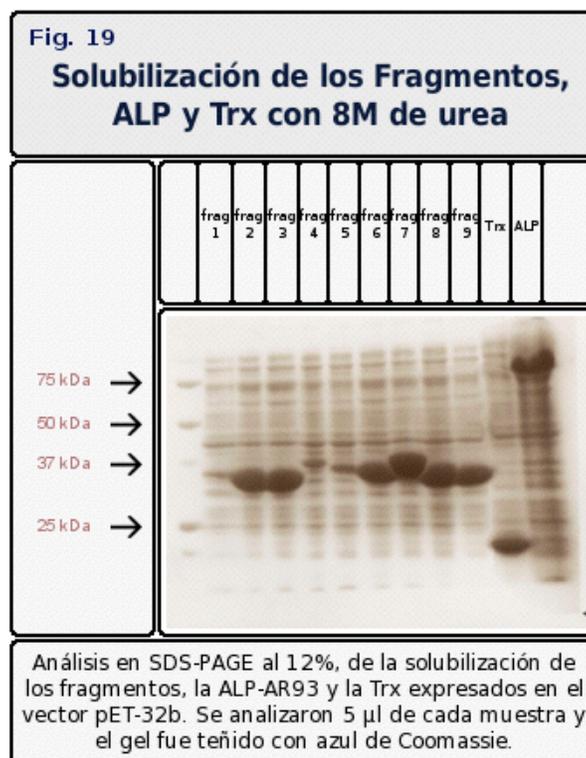


Debido al resultado positivo del cambio de vector, fue innecesario modificar más variables, por lo que se diseñaron nuevos oligonucleótidos sentido para cada fragmento, los cuales cuentan con el sitio de corte BglII. Los genes que codifican para los nueve fragmentos y la ALP-AR93 fueron amplificados con los nuevos oligonucleótidos como se observa en la figura 18.



Todos los fragmentos y la fosfatasa alcalina fueron satisfactoriamente clonados en el vector pET-32b.

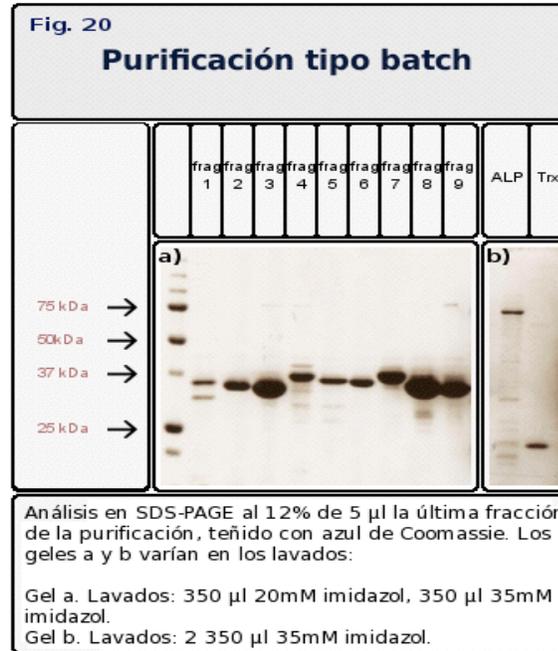
La expresión de los fragmentos y de la ALP se hizo en base a las condiciones de expresión montadas para el fragmento 7. Ninguno de los fragmentos pudo solubilizarse en ausencia de urea. En la figura 19, se muestran cada uno de los fragmentos después de la solubilización con 8M de urea. En el gel se analizaron 5 μ l de un cultivo total de 10 ml de cada fragmento, de la ALP-AR93 y de la Trx.



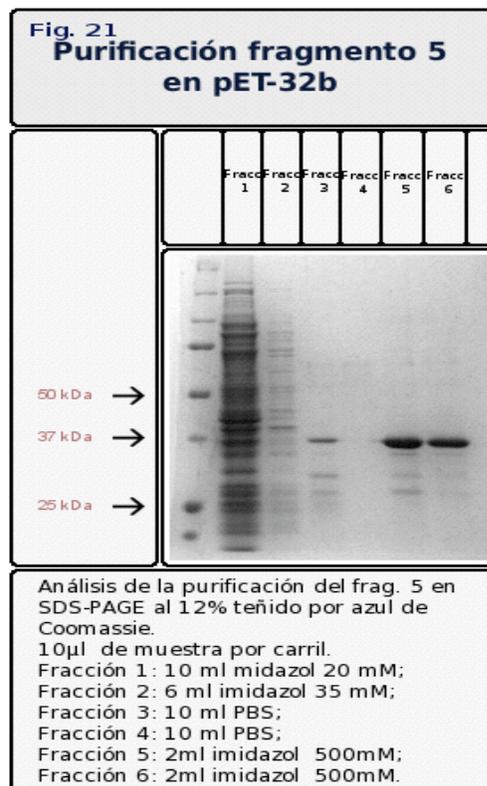
En la figura 19 – y más claramente en la figura 20 – se observa que pese a que los nueve fragmentos tienen aproximadamente el mismo número de aminoácidos, estos migran de manera distinta en los geles desnaturalizantes. Estas pequeñas discrepancias, podrían deberse a las diferencias en las cargas de los aminoácidos que los integran.

Purificación de los fragmentos, ALP y Trx, expresados en pET-32b.

Para poder realizar adecuadamente los experimentos de unión, todas las proteínas expresadas se purificaron en pequeña escala, mediante una purificación “Batch” (ver materiales y métodos), gracias a la afinidad de la etiqueta de histidinas (con la que cuentan estas proteínas) a la resina de níquel-agarosa. La figura 20 muestra el producto final.

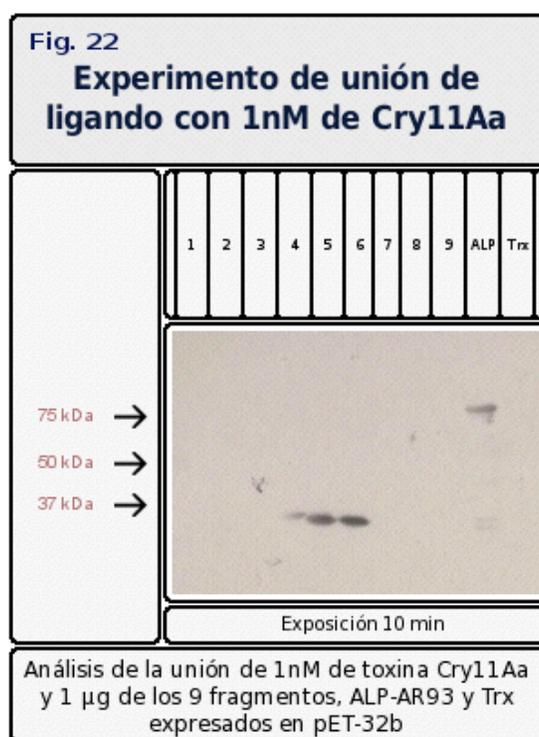


Las proteínas que unieron a la toxina Cry11Aa (ver más adelante), se expresaron en cultivos escalados y se purificaron por cromatografía de afinidad en columna. En la figura 21 se muestran las fracciones recolectadas de la purificación del fragmento 5. Para competir la unión de las histidinas a la resina de níquel-agarosa, se utilizaron distintas concentraciones de imidazol.

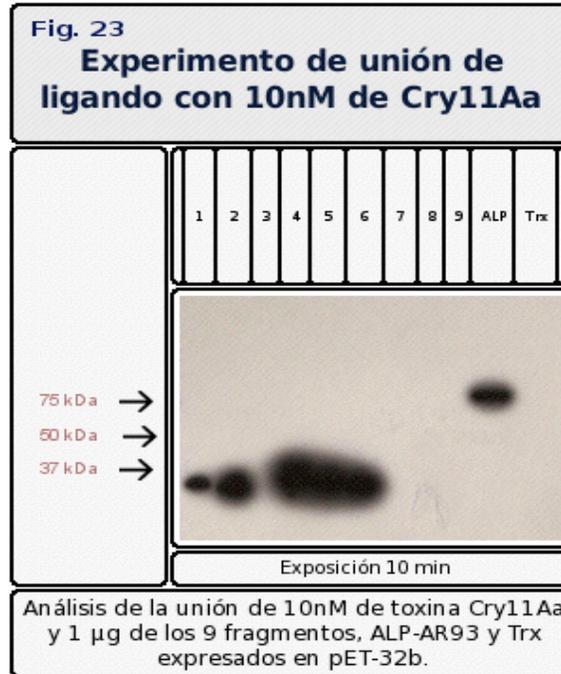


Ensayos de unión de ligando.

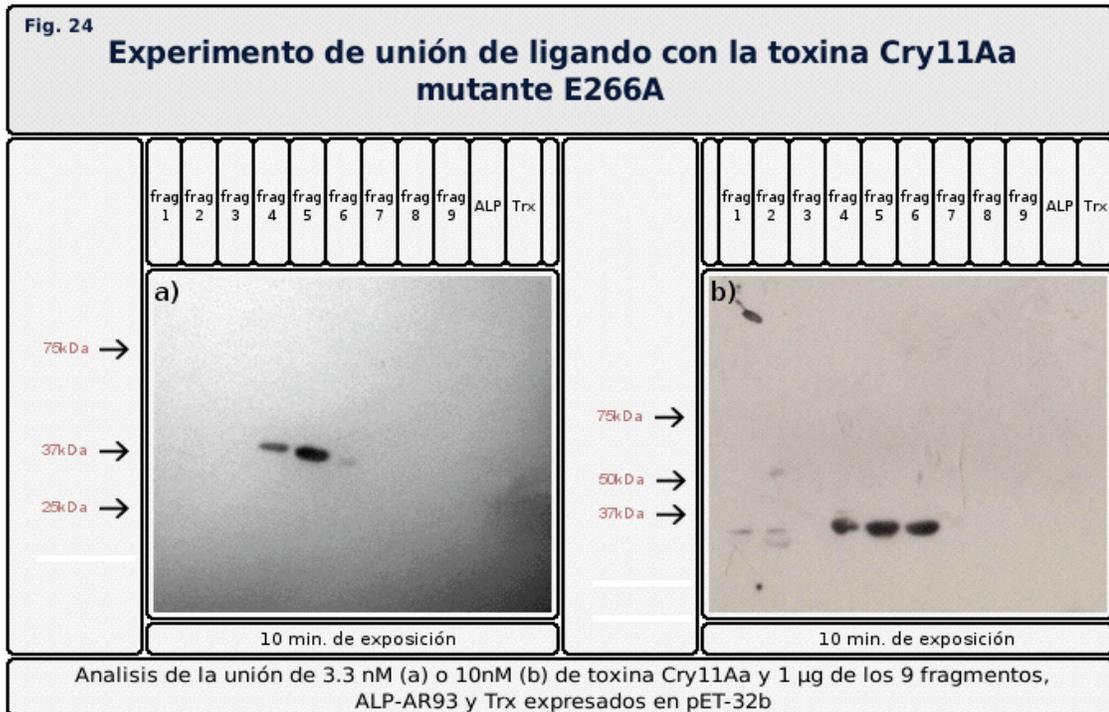
Para realizar los experimentos de unión de ligando se cargó en el gel a transferir 1 μ g de cada fragmento, de la fosfatasa alcalina, y de la tiorredoxina (para comprobar que la toxina no tiene afinidad por la tiorredoxina, y que por lo tanto no uniría a ninguno de los fragmentos por estar fusionados a ella). Incubando la membrana con una concentración 1nM de toxina y condiciones fuertes de lavado (PBS-tween 0.5%), pudo observarse la unión de los fragmentos 5, 6, 4 (aunque más débilmente) y de ALP-AR93. No hubo unión de la toxina a la tiorredoxina (Figura 22).



Incubando la membrana con concentraciones mayores de 1 nM de toxina y lavando con PBS-tween al 0.1%, se observa una unión más clara de los fragmentos 4, 5 y 6, además de la unión de la toxina a los fragmentos 1 y 2. En la figura 23, se muestra la unión de la toxina Cry11Aa a los fragmentos citados, cuando la membrana se incubó con una concentración de toxina de 10nM.

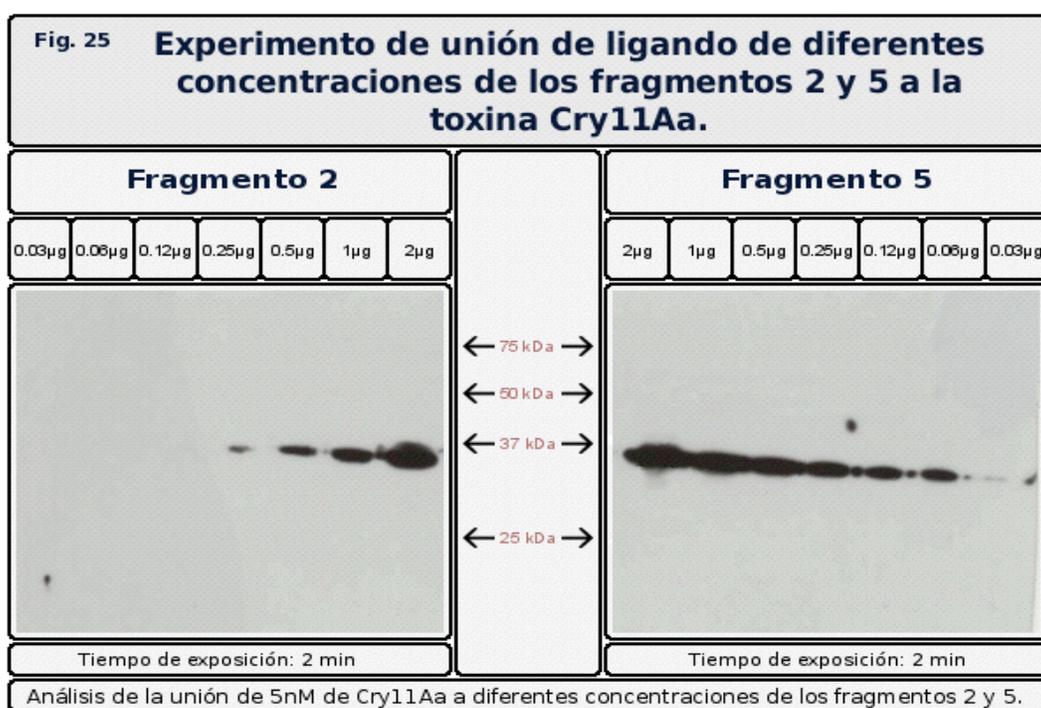


El experimento de unión también fue analizado empleando la toxina Cry11Aa que contiene la mutación E266A, localizada en el asa α -8. A pesar de que esta toxina mutante tiene una activación adecuada con tripsina, se encuentra altamente afectada en toxicidad y en unión a las VMMA (56). En la figura 24, se muestra la unión a los fragmentos cuando la membrana fue incubada con 3.3nM (a) y 10 nM (b) de toxina Cry11Aa mutante E266A.

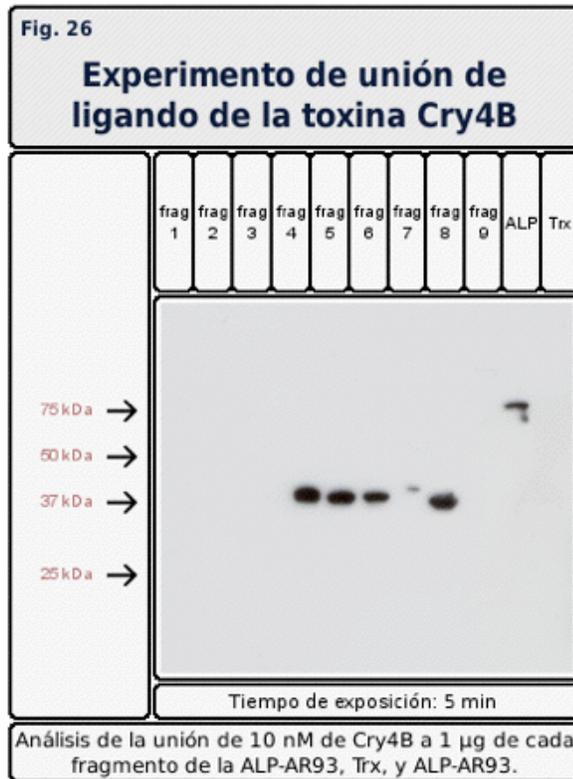


En la figura 24 se observa cómo la toxina deja de unir a los fragmentos 1, 2 y a la ALP-AR93. También se observa una aparente disminución de la unión de la toxina a los fragmentos 4, 5 y 6.

Posteriormente, se analizó la cantidad mínima de fragmento necesaria para que una concentración de 5 nM de toxina Cry11Aa silvestre uniera a los mismos. Se escogieron los fragmentos 2 y 5 como representantes de cada sitio de unión, esto considerando que los fragmentos 1 y 2 comparten un sitio de unión; y los fragmentos 4, 5 y 6 comparten uno distinto al de los fragmentos anteriores. Para ambos fragmentos se analizaron las mismas cantidades de proteína que iban desde 0.031 µg hasta 2 µg. En la figura 25 se observa cómo la toxina es capaz de unir a todas las cantidades analizadas de fragmento 5. No así al fragmento 2, donde la cantidad mínima para unir 5 nM de Cry11Aa es 0.25 µg.



Otro experimento de unión que podría brindar información acerca de que en los fragmentos 1, 2, 4, 5 y 6 se encuentra el sitio o los sitios de interacción toxina Cry11Aa/Receptor ALP, era probar la unión de los 9 fragmentos y de la ALP-AR93 a la toxina Cry4Ba. Esto debido a que en la literatura se tiene reportado que la toxina Cry11Aa comparte receptor con la toxina Cry4Ba, y además, ambas compiten por la unión de dicho receptor (43), lo que sugiere que estas toxinas unen en el mismo sitio o en sitios cercanos. En base a esto, se realizó un experimento de la unión de 10 nM de toxina Cry4Ba a 1 µg de los fragmentos de la ALP-AR93, cuyo resultado puede observarse en la figura 26.



El resultado de este experimento (figura 26) muestra que la toxina Cry4Ba, al igual que la toxina Cry11Aa une a los fragmentos 4, 5 y 6, pero difiere de que la Cry11Aa une también a los fragmentos 1 y 2, mientras que la toxina Cry4Ba une al fragmento 8. Lo anterior sugiere que el sitio de unión de ambas toxinas se encuentra en la región que comparten los fragmentos 4, 5 y 6; y este dato coincide con lo reportado anteriormente (43). La falta de unión de la toxina Cry4Ba a los fragmentos 1 y 2, no los descarta de contener un sitio de unión importante para la Cry11Aa, ya que estas toxinas pueden unir cada una a un sitio de unión distinto además del que comparten, lo que explicaría la unión de la Cry4Ba al fragmento 8. Sin embargo, dada la estrategia de fragmentación (figura 6), para que existiera un sitio de unión en el fragmento 8, la toxina debería unir por lo menos a otro fragmento, por lo que la unión de la toxina Cry4Ba al fragmento 8 pudiera ser un artefacto debido a la desnaturalización de los fragmentos y/o a la estrategia, aunque se observa una ligera unión en el carril del fragmento 7. Un análisis más exhaustivo pudiera contestar esta pregunta.

Ensayos de Unión en ELISA.

A partir de los resultados observados en los experimentos de unión de ligando, se realizaron ensayos de ELISA con los fragmentos que unieron a la toxina Cry11Aa.

En la figura 27 se muestra un gráfico con la unión 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de los fragmentos 1, 2, 4, 5 y 6 a 5nM de toxina Cry11Aa. La unión de la toxina Cry11Aa al fragmento 8 mostrada en ese mismo gráfico, funge como control negativo.

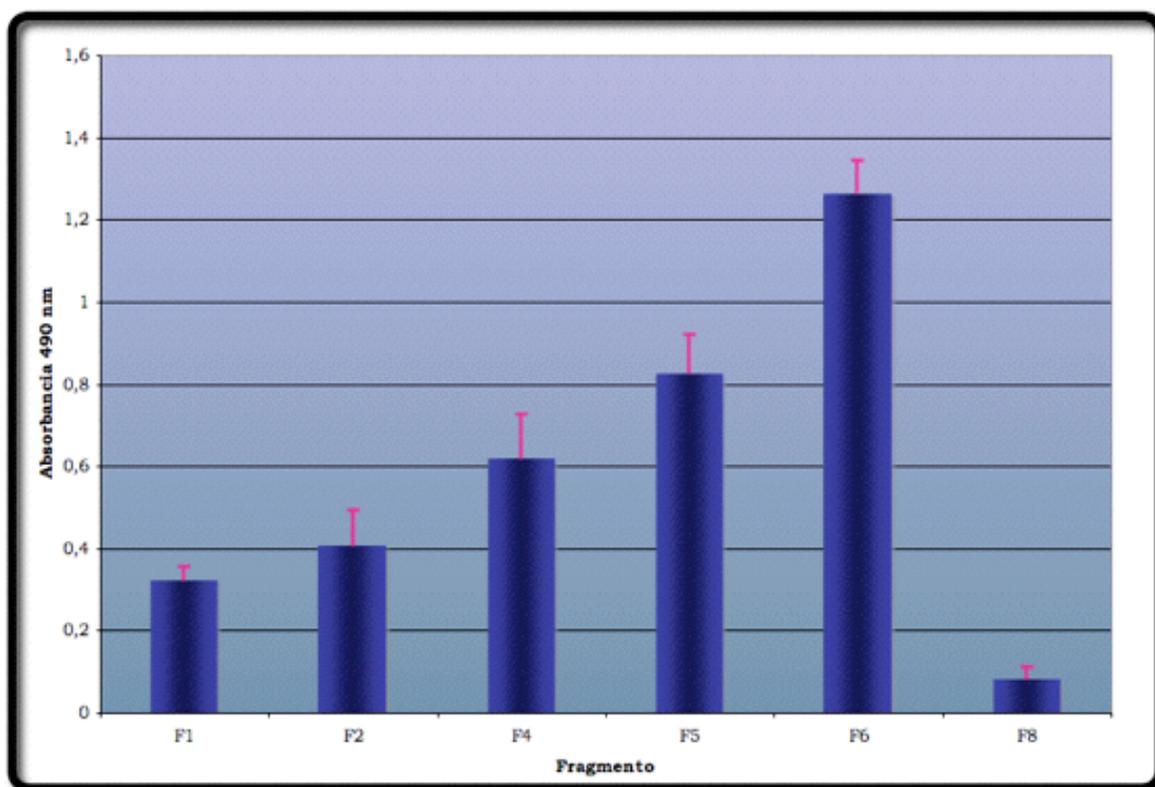
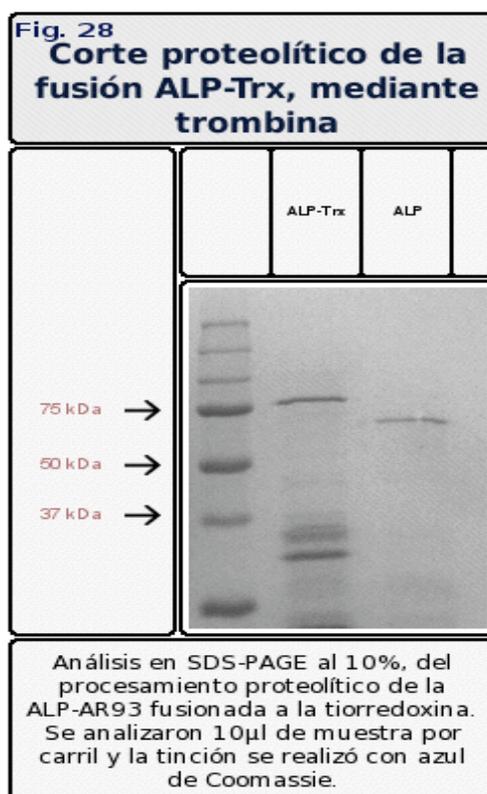


Figura 27. Unión por ELISA de 5nM de toxina Cry11Aa a 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de los fragmentos 1, 2, 4, 5, 6 y 8.

En la figura anterior se observa que el fragmento que mejor une a la toxina Cry11Aa es el fragmento 6, seguido de los fragmento 5 y 4. Los fragmentos 1 y 2 no tienen una unión evidente, esto podría deberse a que, como se observó en los experimentos de unión de ligando, la unión de la toxina a los fragmentos 4, 5 y 6 es más fuerte que la de los fragmentos 1 y 2. Por lo tanto, para observar mayores absorbancias de estos fragmentos es probable que se requiera fijar una concentración mayor de proteína en la placa de ELISA. Por otro lado, las diferencias de unión del fragmento 4 con respecto al 5 o al 6 pudiera deberse a que el sitio de unión se encuentra en el

extremo C-terminal del fragmento 4 (véase figura 31), y esto pudiera dificultar la unión de la toxina a este fragmento; no así en los fragmentos 5 y 6 donde el sitio se encuentra en el centro del fragmento y en el N-terminal respectivamente.

Otro factor que pudiera estar interfiriendo con la unión de la toxina a los fragmentos es la proteína fusión, la cual pudiera impedir el acceso de la toxina al sitio de unión. Esto se planteó toda vez que cuando se realizaba el ensayo de ELISA fijando la ALP-AR93 las lecturas de las absorbancias daban alrededor de cero (datos no mostrados). Dado lo anterior se llevó a cabo el corte proteolítico de la tiorredoxina de la ALP-AR93, aprovechando el sitio de corte de trombina que se encuentra entre la proteína fusión y la proteína pasajero. En la figura 28, se muestra la eficiencia del corte.



A partir de lo anterior, se realizó un ensayo de ELISA comparando la unión de la toxina Cry11Aa a la ALP aún fusionada a Trx y sin la fusión. El resultado se muestra en el gráfico de la figura 29.

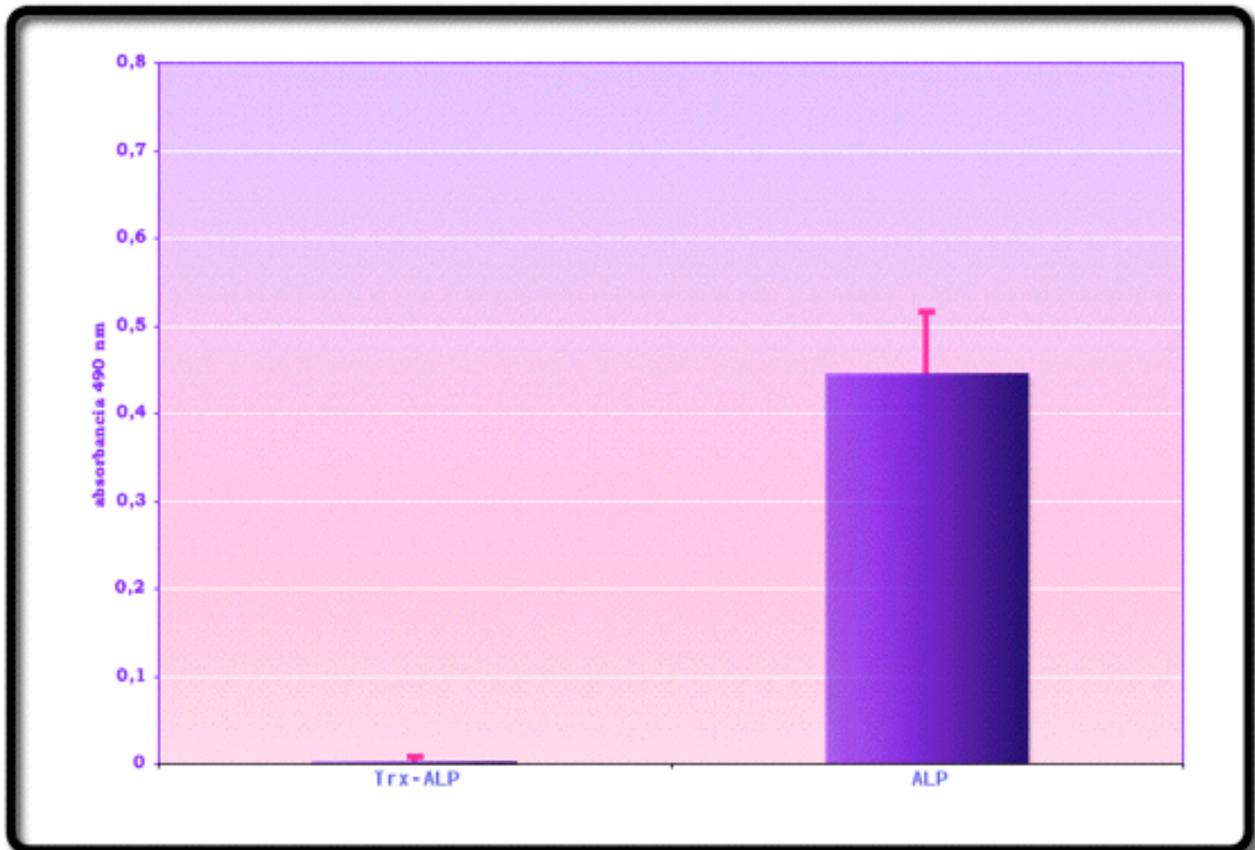
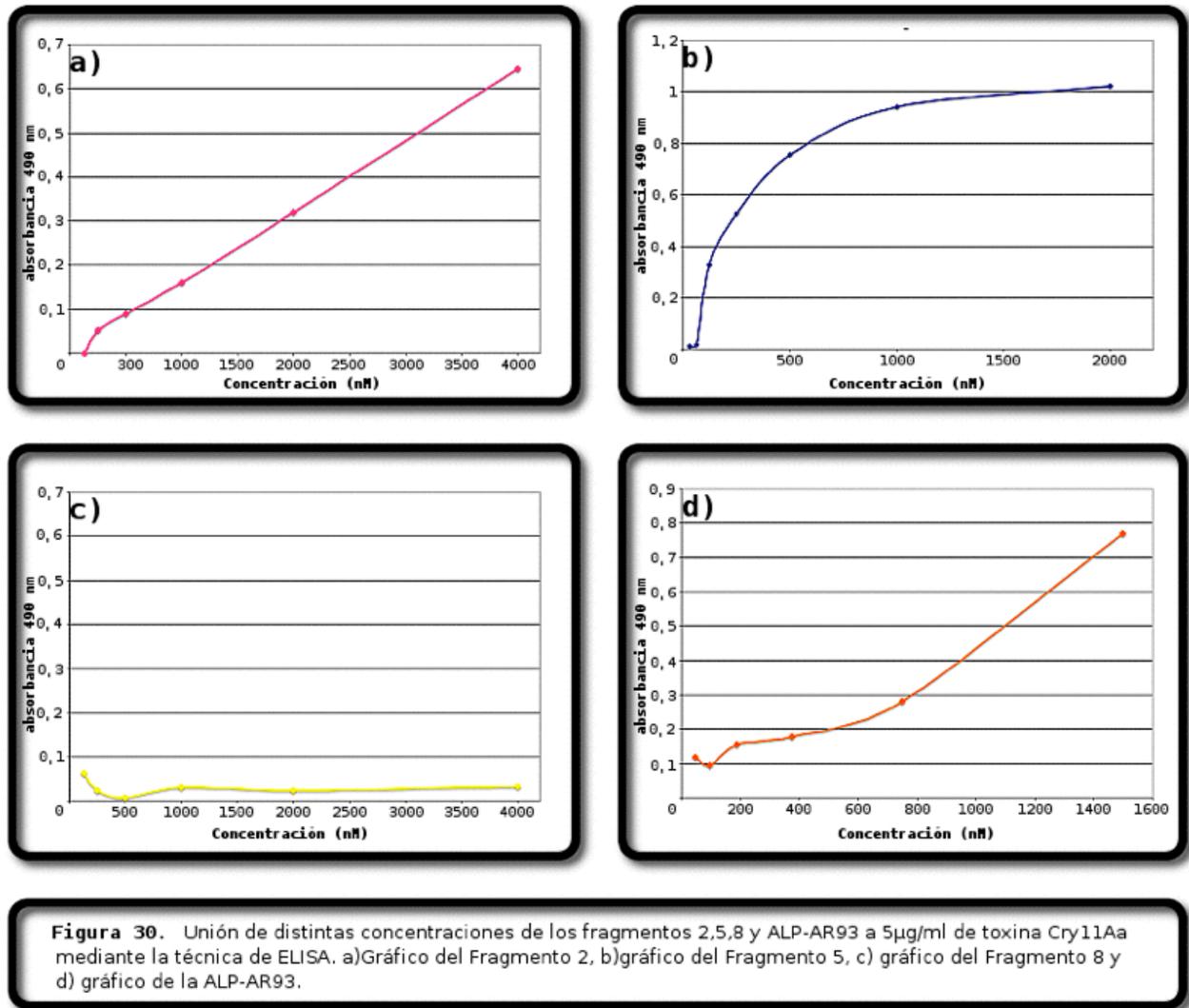


Figura 29. Comparación de la unión de la toxina Cry11Aa a la fosfatasa alcalina con y sin proteína fusión. El ensayo se realizó con 0.05 µg/µl de la ALP-AR93 con y sin Trx, y 5 nM de Cry11Aa.

La ALP-AR93 sin Trx dio una absorbancia a 490 nM de 0.445 cuando se ensayó con 5nM de Cry11Aa, por otro lado la ALP-AR93 fusionada a Trx continuó dando absorbancias alrededor de cero. Con lo anterior se observó que la tiorredoxina ejerce un impedimento estérico sobre la fosfatasa alcalina cuando ésta se fija a la placa de ELISA, lo que impide la unión de la toxina Cry11Aa a la ALP-AR93. Dados estos resultados, se optó por realizar el ensayo fijando 5µg/ml de toxina a la placa de ELISA, incubando con distintas concentraciones de cada fragmento o de la ALP-AR93, de esta manera se homogeniza la cantidad y la calidad de proteína fijada a la placa ya que para cada ensayo la proteína inmovilizada será la misma.



En la figura 30, se observa el comportamiento de la unión a la toxina de los fragmentos 2 y 5, como representantes de los sitios de unión supuestos. Podemos observar que el fragmento 5 alcanza la saturación con 2000 nM de proteína incubada con toxina, mientras que el fragmento 2 no llega a alcanzarla con una concentración del mismo de 4000 nM. La ALP-AR93 muestra un comportamiento favorable sin llegar a saturación a una concentración de 1500 nM de proteína. Mientras que el fragmento 8 funge como control negativo, al no mostrar ningún ascenso en la curva sin importar la concentración del mismo que se utilice.

Secuencias de unión de la ALP-AR93 a la toxina Cry11Aa.

A partir de los datos anteriores y gracias a la estrategia que se utilizó para dividir a la ALP-AR93 en fragmentos escalonados, se pudieron definir dos regiones de unión, una de 44 residuos y otra de 40.

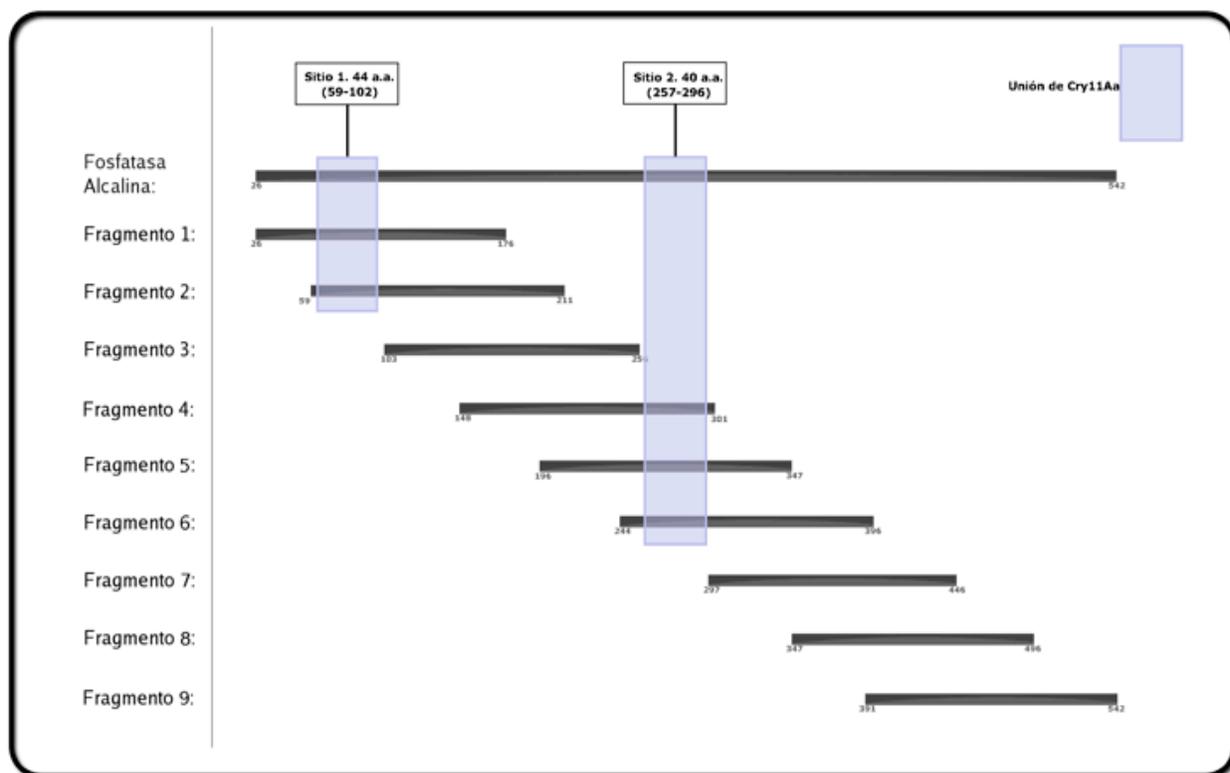


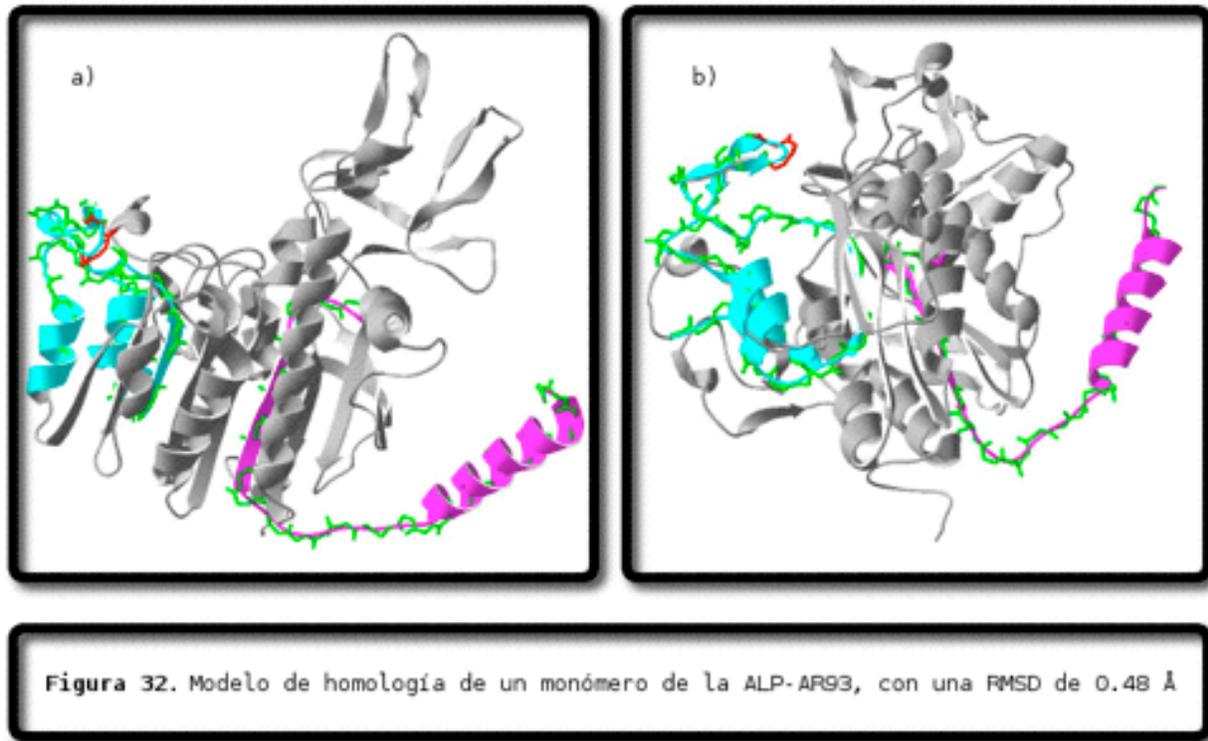
Figura 31. Esquematación de la unión de la toxina Cry11Aa a ALP-AR93.

Como se observa en la figura 31, la toxina Cry11Aa une a los fragmentos 1 y 2, pero no así al fragmento 3, por lo tanto, puede deducirse que el primer sitio de unión a la toxina se encuentra entre los aminoácidos 59 -102. Para el segundo sitio de unión, la toxina une a 4, 5 y 6, pero no a 3 ni a 7, por lo que la unión debiera encontrarse entre los aminoácidos 257 y 296. La secuencia de estos sitios de unión se muestra a continuación:

Sitio 1 (fragmentos 1 y 2): ⁵⁹RLISASDYEETAQFWNIGAQLKLKEQLLKRKNFNKAKNVIFFLG₁₀₂.

Sitio 2 (fragmentos 4, 5 y 6): ²⁵⁷NNPGKNLKVILGGRRKFTPNTTEKDPSGKPGQRMDGVNLI₂₉₆

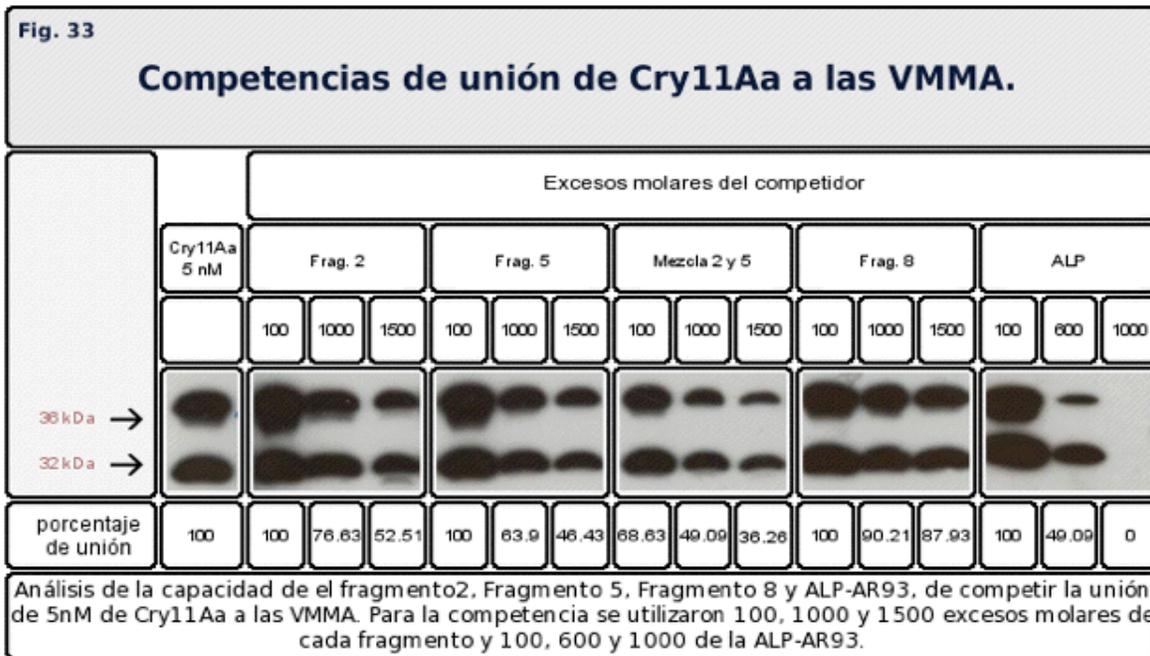
Al no contar con la estructura cristalográfica de la ALP-AR93, se diseñó un modelo de homología con la ayuda del programa Swiss-Pdb Viewer, para tener una idea de la localización espacial de estas regiones de unión. El templado para la construcción del modelo fue la fosfatasa alcalina sitio no específica de camarón (57), pues presenta una identidad de secuencia del 47% con la ALP-AR93, por lo que se esperaría un buen modelo, ya que un templado debe poseer al menos 30% de identidad con la secuencia a modelar (64).



En la figura 32 se muestran dos caras del monómero de la ALP-AR93 modelado. En magenta se muestra el sitio de unión 1 y en cian el sitio de unión 2. El modelo tiene una desviación estándar de 0.48 Å para 451 aminoácidos. Esta desviación estándar (RMSD de sus siglas en inglés) es una medida para calcular un promedio entre las distancias de los esqueletos carbonados de proteínas superimpuestas, esta medición se hace usualmente entre los carbonos alfa (http://en.wikipedia.org/wiki/Root_mean_square_deviation_%28bioinformatics%29). Dado el resultado de la RMSD, se puede decir que el modelo de homología obtenido es un modelo confiable, considerando que cuando la estructura de la ALP de camarón se superimpone con la ALP placentaria (41% de identidad), su RMSD es de 1.07 Å para 455 aminoácidos y de 1.33 Å para 343 aminoácidos cuando se superimpone con la ALP de *E. coli* (26% de identidad) (57). El modelo de la ALP-AR93 coincide con el templado con excepción de cuatro regiones muy pequeñas, las cuales todas son asas, y omitiéndolas la RMSD disminuye, con 439 aminoácidos involucrados a 0.1 Å. El modelo sólo pretende ser utilizado con fines ilustrativos y no para el diseño de ningún experimento. En la figura 32, puede observarse en rojo una de las 4 regiones que no se adaptan bien al modelo. Dicha región comprende 3 aminoácidos ²⁸²PSG₂₈₄, los cuales se encuentran en el sitio 2 de unión a la toxina.

Unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA.

Una vez identificados los sitios de unión candidatos de la fosfatasa alcalina ALP-AR93 a la toxina Cry11Aa, se decidió evaluar la capacidad de estos sitios de interferir la unión de la toxina a una forma más natural del receptor fosfatasa alcalina, es decir, la unión de la toxina a las vesículas de la microvellosidad apical de *Ae. aegypti*, donde se encuentra la ALP caracterizada ya como receptor (42). Para lograrlo se preincubaron varias cantidades del fragmento 2 (representante del sitio de unión 1 a la toxina), fragmento 5 (representante del sitio 2 de unión), fragmento 8 (control negativo) y ALP-AR93 (control positivo), con 5nM de toxina Cry11Aa. Con lo anterior se espera que los fragmentos 2 y 5, así como la ALP recombinante unan a la toxina dejando menos lugares libres para que la toxina pudiese unir a las VMMA, pues los sitios con los que suele unir a la ALP estarían bloqueados por estas proteínas. En la figura 33 se muestra la unión de la toxina a las VMMA en ausencia de fragmento y la disminución de la misma cuando se agregan distintos excesos molares de los fragmentos 2, 5, una mezcla de ambos y de la fosfatasa. También se observa una ligera disminución en la unión de la toxina a las VMMA cuando se compete con el fragmento 8, a este efecto se le consideró ruido de fondo, dado que la disminución no es tan aparente como con los otros fragmentos ensayados, y pese a que no es una cantidad despreciable, es importante considerar que son muchos excesos molares de competidor los que se utilizan.



En la figura podemos observar que se requieren menos excesos molares para interferir la unión de la toxina a las VMMA cuando se incuba con la proteína completa, así mismo la mezcla de fragmentos compite más por la unión a la toxina con el receptor, que cuando estos fragmentos se prueban individualmente, aunque el fragmento 5 parece competir mejor que el fragmento 2.

Diseño de mutantes en los sitios de unión de la ALP-AR93 a la toxina Cry11Aa.

Para tener una región de unión más delimitada en cada uno de los sitios encontrados, la estrategia de mutagénesis plantea el cambio de tres aminoácidos del sitio 2 de unión a Cry11Aa, por alaninas en cada una de las mutantes generadas (exceptuando la última, que tendrá cuatro aminoácidos cambiados), de tal forma que para el sitio 2 de unión a la toxina habrá 13 mutantes con las siguientes secuencias:

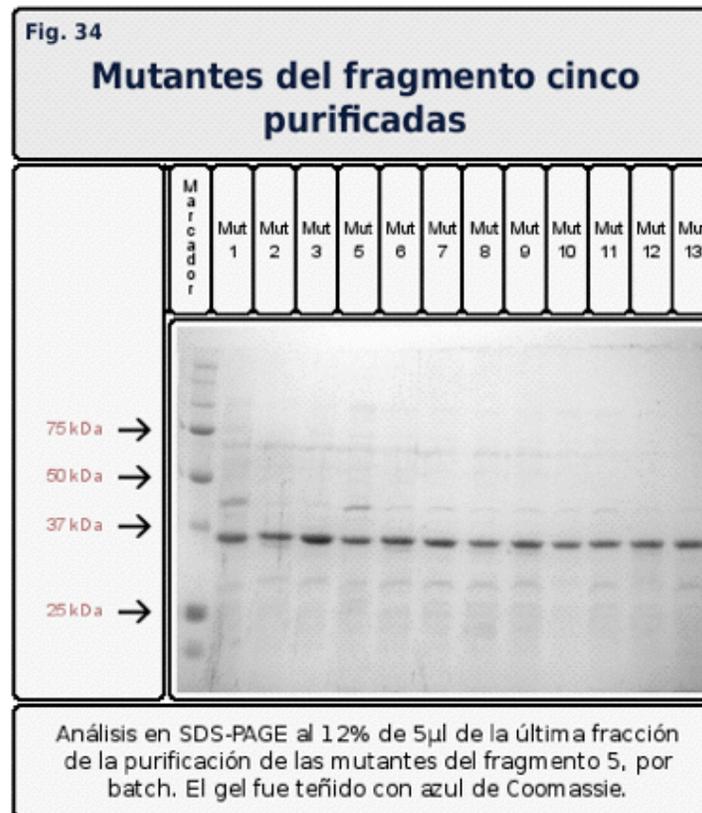
1. ²⁵⁷**AAA**GKNLKVILGGRRKFTPNT**EE**KDPSGKPGQRMDGVNLI₂₉₆.
2. ²⁵⁷NNP**AAA**LKVILGGRRKFTPNT**EE**KDPSGKPGQRMDGVNLI₂₉₆.
3. ²⁵⁷NNPGKN**AAA**ILGGRRKFTPNT**EE**KDPSGKPGQRMDGVNLI₂₉₆.
4. ²⁵⁷NNPGKNLKV**AAA**GRRKFTPNT**EE**KDPSGKPGQRMDGVNLI₂₉₆.
5. ²⁵⁷NNPGKNLKVILG**AAA**RKFTPNT**EE**KDPSGKPGQRMDGVNLI. ₂₉₆
6. ²⁵⁷NNPGKNLKVILGGG**RAAA**TPNT**EE**KDPSGKPGQRMDGVNLI₂₉₆.
7. ²⁵⁷NNPGKNLKVILGGRRK**FAAA**TEKDPSGKPGQRMDGVNLI₂₉₆.
8. ²⁵⁷NNPGKNLKVILGGRRKFTP**NAAA**DPSGKPGQRMDGVNLI₂₉₆.
9. ²⁵⁷NNPGKNLKVILGGRRKFTPNT**EEAAA**GKPGQRMDGVNLI₂₉₆.
10. ²⁵⁷NNPGKNLKVILGGRRKFTPNT**EE**KDPS**AAA**GQRMDGVNLI₂₉₆.
11. ²⁵⁷NNPGKNLKVILGGRRKFTPNT**EE**KDPSGKP**AAAM**DGVNLI₂₉₆.
12. ²⁵⁷NNPGKNLKVILGGRRKFTPNT**EE**KDPSGKPGQR**AAAV**NLI₂₉₆.
13. ²⁵⁷NNPGKNLKVILGGRRKFTPNT**EE**KDPSGKPGQRMDG**AAAA**₂₉₆.

La estrategia de mutación es un poco distinta para el sitio 1 de unión a la toxina Cry11Aa. Previamente, en el laboratorio se había predicho el sitio ⁶⁴SDYEETAQFWNI₇₅, como un sitio de unión a la toxina mediante complementariedad hidropática con el asa α -8 (Soberón, datos sin publicar). Por lo que las mutantes triples serán diseñadas sólo para la región comprendida entre el aminoácido 59 y el aminoácido 75.

Construcción de mutantes triples en el fragmento 5.

Las trece mutantes diseñadas del sitio 2 de unión, fueron construidas sobre el fragmento 5, debido a que éste tiene una unión muy fuerte a la toxina, y a que es más fácil trabajarlo y purificarlo que la proteína completa. De las trece mutantes verificadas por secuencia, sólo se obtuvieron 12. La mutante 4 (I266A/L267A/G268A), no pudo obtenerse.

Los plásmidos que contenían los genes que codifican las doce mutantes, fueron transformados en la cepa de expresión ER2566 y expresados de acuerdo a las condiciones montadas para los nueve fragmentos de la ALP-AR93 (30°C, cinco horas de inducción con 1mM de IPTG). Ninguna mutante tuvo problemas de expresión. En la figura 34 se muestran las doce mutantes purificadas por el método "Batch".



DISCUSIÓN.

Las toxinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* han demostrado ser una alternativa viable para el control de plagas y vectores de enfermedades que afectan directamente al ser humano. La principal ventaja que ofrece el uso de estas proteínas es la sustitución de insecticidas químicos que son agresivos contra el medio ambiente. Por ello, el interés en conocer cómo actúan estas alternativas de control biológico está en ascenso. A través del estudio del mecanismo de acción de estas proteínas se ha evidenciado que un paso trascendental para la acción entomopatogénica de *B. thuringiensis* es la interacción toxina/receptor, así como la identificación de los epítopes, tanto de la toxina como del receptor, involucrados en este paso. Estos estudios proveen la información necesaria para el desarrollo de proteínas insecticidas con mayor afinidad, especificidad, y en consecuencia, mayor toxicidad hacia su insecto blanco, o bien para la prevención de la generación de insectos resistentes.

En este contexto, se tienen algunos reportes acerca de los epítopes de los receptores que interaccionan con las toxinas Cry. En *Bombyx mori* se identificó una región de 64 aminoácidos del receptor APN que interacciona con la toxina Cry1Aa (65), y en el receptor caderina de este mismo lepidóptero, se observó la importancia del motivo extracelular 9 y de una región de 112 aminoácidos próxima a la membrana para la unión de Cry1Aa (38). El caso del receptor Bt-R₁ de *Manduca sexta* es el más estudiado en la interacción toxina/receptor, con las toxinas Cry1A, se tienen reportados 3 sitios de unión que se encuentran en los motivos extracelulares 7, 11 y 12, cada uno de los cuales interactúa con asas distintas del dominio II (66,67,68,69). Finalmente, para *Heliothis virescens* la región comprendida entre los aminoácidos 1422-1440 del receptor caderina, interacciona con el asa 3 de la toxina Cry1Ac (70). No obstante, todos los ejemplos anteriores son estudios hechos en insectos lepidópteros, y no se tiene ningún reporte para insectos dípteros, de ahí la importancia de la investigación en este rubro.

En el presente estudio, se determinaron dos sitios de interacción del receptor ALP de *Aedes aegypti* con una longitud de 44 y 40 aminoácidos, respectivamente. Para lograrlo, se ideó una estrategia que consistía en fragmentar la proteína fosfatasa alcalina en nueve partes, de forma que cada fragmento se traslapara con el anterior en aproximadamente 100 aminoácidos, esto gracias a que se contaba con la secuencia de la proteína completa (Gill, datos sin publicar). En un primer intento de expresar los fragmentos se utilizó el vector pQE-32, cuya elección se basó en la expresión de 7 fragmentos del receptor tipo caderina de *H. virescens* (70). Sin embargo, la expresión de proteínas en *E. coli* no es una tarea trivial, y la expresión exitosa de un gen en un vector dado, no garantiza que genes distintos puedan expresarse de la misma manera.

Este fue el caso de la ALP-AR93 y sus fragmentos, donde un cambio de vector (pET-32b), fue suficiente para obtener cantidades importantes de proteína. Lo anterior podría explicarse por la proteína fusión (Trx) codificada por dicho vector, ya que ofrece una serie de ventajas a la proteína pasajero, como estabilidad tanto del mRNA como de la misma proteína y expresión de ella pese a la existencia de codones raros para *E. coli* en la secuencia (62,63), lo que permitió que estas proteínas pasaran de una expresión casi nula (figura 10) a una expresión evidente (figura 20).

Los experimentos de unión de la toxina Cry11Aa a estos fragmentos nos permitieron delimitar dos sitios de unión en la ALP-AR93. El primero de ellos, localizado en la región que comparten los fragmentos 1 y 2 (aminoácidos 59-102); y el segundo entre los aminoácidos 257-296, que es la región que tienen en común los fragmentos 4, 5 y 6 (figura 31). Los resultados obtenidos mostraron que la unión de la toxina Cry11Aa al sitio 2 es más fuerte que la unión al sitio 1, toda vez que el sitio 2 pudo detectarse con concentraciones bajas de toxina como 1 nM (figura 22), no así el sitio 1; además, la figura 25 nos muestra que 5nM de toxina Cry11Aa puede unir a 0.03 µg de fragmento 5 que contiene el sitio 2, mientras que la cantidad mínima de fragmento 2 (sitio 1) para unir a esa misma concentración de toxina, fue de 0.25 µg. Esta mayor afinidad también pudo observarse en ensayos de ELISA, donde la unión de la toxina Cry11Aa al fragmento 5 alcanza la saturación en 2000 nM de fragmento, por otro lado, el fragmento 2 no alcanzó la saturación con 4000 nM de fragmento incubado con la toxina (figura 30).

De ahí que observemos la importancia del sitio 2 en la unión a la toxina Cry11Aa, importancia que se hizo más evidente en el experimento de unión de los 9 fragmentos a la toxina Cry4Ba. Buzdin *et al.* (43), observaron que las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba unían a la misma proteína de 65 kDa localizada en las VMMA de *Ae. aegypti*, proteína que posteriormente fue caracterizada como una fosfatasa alcalina por Fernández *et al.* (42). Adicionalmente, Buzdin *et al.* (43), reportaron que Cry11Aa competía la unión de la toxina Cry4Ba a la proteína de 65 kDa y viceversa, lo que los llevó a concluir que ambas toxinas comparten el mismo sitio de unión, o que sus sitios de unión respectivos se encuentran en lugares adyacentes. Nuestro dato de la figura 26 sustenta esta hipótesis, ya que la toxina Cry4Ba une a los mismos fragmentos que contienen el sitio 2 de unión a Cry11Aa (fragmentos 4, 5 y 6). Por otro lado, Cry4Ba no une al sitio 1 de Cry11Aa y en su lugar une al fragmento 8. Es probable que la unión del fragmento 8 se trate de un artefacto del experimento, dado las condiciones del mismo, se podrían exponer regiones de la ALP-AR93 que normalmente no se encuentran expuestas. Esto es factible ya que según la estrategia de fragmentación (figura 6), la toxina debe de unir al menos a 2 fragmentos, toda vez que el traslape de los fragmentos es tan grande, que es muy difícil que un fragmento tenga una región única que no comparta con otro. Por otro lado, en la figura 24 puede

observarse una ligera unión de la toxina Cry4Ba al fragmento 7 y en el modelo de homología de la ALP-AR93 se observa que una parte de la región que comparten los fragmentos 7 y 8 se encuentra expuesta (datos no mostrados). Un análisis más exhaustivo debe hacerse para identificar las regiones de la toxina Cry4Ba que interactúan con el receptor, y así descartar la interacción del fragmento 8 con la toxina Cry4Ba o confirmarla. Finalmente, Fernández *et al.* (42), observaron una disminución del 40% de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, cuando la toxina Cry11Aa estaba unida a la proteína. Lo anterior podría explicarse con el modelo de homología diseñado para la ALP-AR93 (figura 32), en donde se observa que las regiones expuestas del sitio 2 se encuentran próximas al sitio catalítico de la ALP (en la figura 4 puede observarse el sitio catalítico ubicando los átomos de Zn). Por lo tanto, la unión de la toxina al sitio 2 podría ocasionar un impedimento estérico dado el tamaño de la toxina, por lo que al sustrato le costaría acceder al sitio catalítico de la ALP. Sin embargo, es necesario contar con la estructura cristalográfica de la ALP-AR93 y con los aminoácidos exactos del sitio 2 que interaccionan con la toxina, para poder comprobar esta hipótesis. No obstante, toda esta información en conjunto apoya al sitio 2 de unión, como una región importante en la interacción toxina/receptor.

Los datos anteriores, sin embargo, no descartan al sitio 1 como una región de importancia para la unión de Cry11Aa. Las interacciones toxina/receptor en las diferentes proteínas Cry han demostrado ser variables. Las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab unen al mismo sitio del receptor APN en *M. sexta*, mientras que Cry1Ac comparte con estas toxinas uno de los dos sitios de unión que tiene la aminopetidasa N para Cry1Ac (31). Así pues, que Cry11Aa y Cry4Ba coincidan sólo en un sitio de unión no resulta extraño, después de todo son proteínas diferentes. Un dato que perfila el sitio 1 como región de interacción con Cry11Aa es el obtenido en el experimento de unión de ligando con la toxina mutante E266A. Esta mutante se encuentra en el asa α -8 de Cry11Aa, y está afectada en la unión a las VMMA y en toxicidad cuando se ensaya con larvas de *Ae. aegypti* (56). En la figura 24 se muestra la disminución en la unión a los fragmentos 1 y 2 (en los que se encuentra el sitio 1) con la toxina mutante E266A. Mediante complementariedad hidropática (Soberón, datos sin publicar), se determinó que la toxina Cry11Aa interacciona por el asa α -8 con los aminoácidos ⁶⁴SDYEETAQFWNI₇₅ de la ALP-AR93, dicha región se encuentra en el sitio 1 identificado en este trabajo. Esta metodología es válida, ya que gracias a ella se han determinado algunas de las interacciones toxina/receptor publicadas (66,68,70). En el caso de la toxina Cry11Aa, el asa α -8 ha sido la única región reportada como sitio de unión al receptor en *Ae. aegypti* (56), por lo que faltaría determinar la región de la toxina que interacciona con el sitio 2 de la ALP-AR93. Trabajo en el laboratorio ha demostrado la unión de la toxina Cry11Aa a la ALP-AR93 por alguna región del dominio III

(Fernández, datos sin publicar), dado que se ha visto que el dominio III en otras toxinas Cry juega un papel de reconocimiento del receptor (20,21,22), es probable que la contraparte del sitio 2 de ALP-AR93 se encuentre en este dominio.

Existe un modelo de unión secuencial bivalente de la toxina Cry1Ac con el receptor APN, del lepidóptero *Lymantria dispar* (71). Dicho modelo plantea la unión de la toxina Cry1Ac por el dominio III a la N-acetilgalactosamina del receptor APN, seguido de la unión del dominio II de la toxina a otra región no caracterizada del receptor. Pese a que la unión del dominio II de la toxina Cry1Ac a APN, es más fuerte que la del dominio III, la unión de la toxina Cry1Ac se abate completamente si se presenta una pérdida en la unión del dominio III al receptor (37). Esto podría explicar por qué la toxina Cry11Aa mutante E266A, no une a la ALP-AR93, y por qué se observa una disminución en la intensidad de la señal para los fragmentos 4, 5 y 6 (figura 24). De la misma manera explicaría la falta de unión de la toxina Cry11Aa silvestre a la Trx-ALP, en ensayos de ELISA cuando ésta se inmoviliza en la placa, ya que si la tiorredoxina impidiera el acceso de la toxina Cry11Aa al sitio de unión 1 que se encuentra próximo al N-terminal, el sitio de unión 2 aún podría estar accesible para la toxina, empero no se observa señal (figura 29). Sin embargo, los resultados de los experimentos de unión de la Cry11Aa a las VMMA, no parecen coincidir, ya que no se observa una pérdida total de la unión cuando la toxina se preincuba con el fragmento 2, por otro lado, se observa una disminución menor cuando se compite la unión con la ALP-AR93 completa o con una mezcla equimolar de ambos fragmentos, que cuando se ensayan por separado. Por lo que puede que no sea un prerrequisito que la toxina una a un sitio para poder unir al otro, aunque también es probable que la unión no se abata completamente porque la toxina une a otros receptores presentes en las VMMA que aún no han sido caracterizados (42).

Sea cual sea el mecanismo que siga esta toxina para unirse a la ALP-AR93, los resultados expuestos en el presente trabajo revelaron dos sitios de unión no anteriormente reportados, de los cuales, al menos uno de ellos (sitio 2), es de suma importancia para la unión *in vitro* de Cry11Aa a su receptor. Los datos aquí expuestos pueden servir de antecedente para realizar estudios que evidencien aún más la importancia de la ALP en la toxicidad de Cry11Aa contra *Ae. aegypti*.

CONCLUSIONES.

- ⇒ Se lograron expresar las nueve fragmentos diseñados de la ALP-AR93 en *E. coli*.
- ⇒ Se caracterizaron dos regiones de unión a la toxina Cry11Aa en la proteína ALP-AR93, los cuales tienen una longitud de 44 y 40 aminoácidos.
- ⇒ De las regiones encontradas, el sitio 2 presenta una unión más fuerte por la toxina que el sitio 1. El sitio 2 parece ser una región de importancia para la interacción Cry11Aa/ALP-AR93.
- ⇒ Se diseñaron trece mutantes triples en el sitio 2 de unión, las cuales fueron expresadas satisfactoriamente en *E. coli*.

PERSPECTIVAS.

- ⇒ Construir y expresar las mutantes diseñadas en el sitio 1 de unión a la toxina Cry11Aa.
 - ⇒ Caracterizar la unión de la toxina Cry11Aa a las mutantes de los sitios 1 y 2 para facilitar la determinación de los aminoácidos de la proteína ALP-AR93 involucrados con la interacción toxina/receptor.
 - ⇒ Observar la funcionalidad del receptor, transfectando la ALP-AR93 en células de insecto, mediante la evaluación de la toxicidad de Cry11Aa cuando el receptor está siendo expresado. Con esta misma metodología determinar la importancia de los dos sitios de unión a la toxina en ALP-AR93.
 - ⇒ Caracterizar la unión de la toxina Cry4Ba a la ALP-AR93 de igual forma que se hizo para la toxina Cry11Aa.
-

REFERENCIAS.

1. De Maagd R.A., Bravo A., Crickmore N. (2001). **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world.** Trends in Genetics. 17: 193-199
 2. Schnepf E. Crickmore N., Van Rie J., Lereclus 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.
 3. Bravo A. Soberón M. Gill S.S. (2004). ***Bacillus thuringiensis*: Mecanismos and Use.** In Comprehensive Molecular Insect Science. p.p. 175-206. (Gilbert L.I., Iatrou K., and Gill S.S.). ELSEVIER © 2005 Elsevier BV.
 4. Tamez P., Galán J.L., Medrano H., García C. Rodríguez C., Gómez R.A., Tamez R.S. (2001). **Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México.** Ciencia UANL. 6: 143-152.
 5. Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H. (1998) **Revision of Nomenclature for *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3): 807-813.
 6. Ben Dov E., Nissan G., Pelleg N., Manasherob R., Boussiba S., Zaritsky A. (1999) **Refined, Circular Restriction Map of *Bacillus thuringiensis* susp. *israelensis* Plasmid Carrying the Mosquito Larvicidal Genes.** Plasmid 42:186-191
 7. Wu D., Chang F.N. (1985). **Synergism in Mosquitocidal Activity of 26 and 65 kDa Proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Crystal.** FEBS lett. 190: 232-236.
 8. Wirth M.C. Georghiou G.P., Federici B.A. (1997) **CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* overcome high levels of CryIV resistance in mosquito, *Culex quinquefasciatus*.**
 9. Promdonkoy B., Promdonkoy P., Panyim S. (2005). **Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae.** FEMS Microbiology Letters. 252: 121-126.
 10. Pérez C., Fernández L.E., Sun J., Folch J.L., Gill S.S., Soberón M., Bravo A. (2005). ***Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor.** PNAS. 102: 18303-18308.
 11. Boonserm P., Mo M., Angsuthanasombat C., Pescar J. (2006). **Structure of the Functional Form of the Mosquito Larvicidal Cry4Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom Resolution.** Journal of Bacteriology. 188:3392-3401.
 12. Boonserm P., Davis P., Ellar J.D., Li J. (2005). **Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications.** J. Mol. Biol. 348:363-382.
 13. Parker M. W., Feil S.C., (2005). **Pore-Forming Protein Toxins: from Structure to Function.** Progr Biophys Mol. Biol. 88:91-142.
-

14. Jiménez-Juárez N., Muñoz-Garay C., Gómez I., Saab-Rincón G., Damian-Almazo J.Y., Gill S.S., Soberón M., Bravo A. (2007). ***Bacillus thuringiensis* CryAb Mutants Affecting Oligomer Formation Are Non-toxic to *Manduca Sexta* Larvae.** . Journal of Biological Chemistry. 282: 21222-21229.
 15. Gómez I., Sánchez J., Miranda R., Bravo A., Soberón M. (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 Letters. 513: 242-246.
 16. Smith G.P., Ellar D.J. (1994). **Mutagenesis of Two Surface-Exposed Loops of a *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -Endotoxin Affects Insecticidal Specificity.** Biochemical Journal. 302:611-616.
 17. Wu S.J., Dean D.H. (1996). **Functional Significance of Loops in the Receptor Binding Domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIa δ -Endotoxin.** J. Mol Biol 255:628-640.
 18. Abdullah M., Alzate O., Mohammad M., McNall R., Adang M., Dean D.H. (2003). **Introduction of *Culex* Toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by Protein Engineering.** Appl. Environ. Microbiol. 69: 5343-5353.
 19. Xinyan S.L., Dean D.H. (2006). **Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa Toxin into a Mosquito Toxin.** Protein Engineering, Design & Selection. 19(3):107-111.
 20. De Maagd R.A., Bakker P., Staykov R., Dukjandjiev S., Stiekema W., Bosch D.,(1999). **Identificación of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1C Domain III Amino Acid Residues Involved in Insect Specificity.** Appl Environ. Microbiol. 65: 4369-4374.
 21. De Maagd R.A. Kwa M.S., Van Der Klei H., Yamamoto T., Schipper B., Vlak J.M., Stiekema W.J., Bosch D. (1996). **Domain III Substitution in *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin CryIA(b) Results in Superior Toxicity for *Spodoptera exigua* and Altered Membrane Protein Recognition.** Applied and Environmental Microbiology. 62(5):1537-1543.
 22. Lee M. K., You T.H., Gould F. L., Dean D.H. (1999). **Identification of Residues in Domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin that Affect Binding and Toxicity.** Applied and Environmental Microbiology. 65(10):4513-4520.
 23. Jaquet F., Hütter R., Lüthy P. (1987). **Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin.** Applied and Environmental Microbiology. 53(3):500-504.
 24. Bravo A. Soberón M. Gill S.S. (2007). **Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt Toxins and Their Potential for Insect Control.** Toxicon. 49(4):423-435.
 25. Kouskoura T., Tickner C., Crickmore N. (2001). **Expression and Crystallization of an N-Terminally Activated Form of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca Toxin.** Current Microbiology. 43:371-373.
-

26. Bravo A., Sánchez J., Kouskoura T., Crickmore N. (2002). **N-terminal Activation Is an Essential Early Step in the Mechanism of Action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal Toxin.** Journal of Biological Chemistry. 277: 23985-23977.
 27. Yamagiwa M., Sakawaga K., Sakai H. (2004). **Functional Analysis of Two Processed Fragments of *Bacillus thuringiensis* Cry11A Toxin.** Biosci. Biotechnol., Biochem. 68(3): 523-528
 28. Keller M., Sneh B., Strizhov N., Prudovsky E., Regev A., Koncz C., Schell J., Zilberstein A. (1996). **Digestion of δ -Endotoxin by Gut Proteases may Explain Reduced Sensitivity of Advanced Instar Larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC.** Insect Biochem Molec. Biol. 26(4):365-373.
 29. Oppert B., Kramer K.J., Beeman R.W., Johnson D., McGaughey W.H. (1997). **Proteinase-mediated Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins.** Journal of Biological Chemistry. 272(38):23473-23476.
 30. Pigott C.T., Ellar D.J. (2007). **Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71(2): 255-281.
 31. Masson L., Lu Y., Mazza A., Brousseau R., Adang M. (1995). **The CryIA(c) Receptor Purified from *Manduca sexta* Displays Multiple Specificities.** The Journal of Biological Chemistry. 270(35):20309-20315.
 32. Luo K., Lu Y.J., Adang M.J. (1996). **A 106 kDa Form of Aminopeptidase is a Receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -Endotoxin in the Brush Border Membrane of *Manduca sexta*.** Insect. Biochem, Molec. Biol. 26:783-791.
 33. Valaitis A.P., Lee M. K., Rajamohan F., Dean D.H. 1995. **Brush Border Membrane Aminopeptidase- N in the Midgut of the Gypsy Moth Serves as the Receptor for the CryIA(c) δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis*.** Insect. Biochem, Molec. Biol. 25(10):1143-1151.
 34. Luo K., Sangadala S., Masson L., Mazza A., Brousseau R., Adang M. J. 1997. **The *Heliothis virescens* 170kDa Aminopeptidase Functions as "Receptor A2 by Mediating Specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -Endotoxin Binding and Pore Formation.** Insect. Biochem, Molec. Biol. 25 (8/9):735-743.
 35. Jenkins J.L. Dean D.H. (2001). **Binding Specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for Purified, Native *Bombyx mori* Aminopeptidase N and Cadherin-like Receptors.** BMC Biochemistry. 2:12.
 36. Abdullah M.A.F., Valaitis A.P., Dean D.H. (2006). **Identification of *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba Toxin-Binding Aminopeptidase from Mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*.** BMC Biochemistry. 7:16.
 37. Keeton T.P., Bulla L.A.(1997) **Ligand Specificity and Affinity of BT-R₁, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxin Receptor from *Manduca sexta*, Expressed in Mammalian and Insect Cell Cultures.** Applied and Environmental Microbiology. 63(9): 3419-3425.
 38. Nagamatsu Y., Koike T., Sasaki K., Yoshimoto A., Furukawa Y. (1999). **The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin.** FEBS Letters 460: 385-390.
-

39. Gahan L. J., Gould F., Heckel D.G.(2001). **Identification of a Gene Associated with Bt Resistance in *Heliothis virescens***. Science. 293:857-860.
 40. McNall R.J., Adang M. J. (2003). **Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Binding Proteins in *Manduca sexta* Midgut through Proteomic Analysis**. Insect. Biochem, Molec. Biol. 33:990-1010.
 41. Jurat-Fuentes J.L., Adang M. (2004). **Characterization of a Cry1Ac-receptor Alkaline Phosphatase in Susceptible and Resistant *Heliothis virescens* Larvae**. J. Biochem. 271: 3127-3135.
 42. Fernández L.E., Aimanova K.G., Gill S.S., Bravo A., Soberón M. (2006). **A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa in *Aedes aegypti* larvae**. Biochem J. 394: 77-84.
 43. Buzdin A.A., Revina L.P., Kostina L. I., Zalunin I.A., Chestukhina G.G., (2002). **Interaction of 65- and 62- kD Proteins from the Apical Membranes of *Aedes aegypti* Larvae Midgut Epithelium with Cry4B and Cry11A Endotoxins of *Bacillus thuringiensis***. (2002). Biochemistry (Moscow). 67:540-546.
 44. Dronina M.A., Revina L.P., Kostina L. I., Ganushkina L.A., Zalunin I.A., Chestukhina G.G. (2006). **Toxins Binding Proteins from Midgut Epithelium Membranes of *Anopheles stephensi* Larvae**. Biochemistry (Moscow). 71: 133-139.
 45. Soberón M., Pérez R.V., Núñez-Valdéz M.E., Lorence A., Gómez I., Sánchez J., Bravo A. (2000). **Evidence for intermolecular interaction as a step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin**. FEMS Microbiology Letters. 191: 221-225.
 46. Bravo A., Gómez I., Conde J., Muñoz-Garay C., Sánchez J., Miranda R., Zhuang M., Gill S.S., Soberón M. (2004). **Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains**. BB Acta. 1667: 38-46.
 47. Soberón M., Pardo-López L, López I., Gómez I., Tabashnik B.E., Bravo A.(2007). **Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance**. Science. 10.1126/science.1146453
 48. Promdonkoy B., Chewawiwat N., Tanapongpipat S, Luxananil P., Panyim S. (2003). **Cloning and Characterization of a Cytolytic and Mosquito Larvacidal δ - Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmastadiensis***. Current Microbiology. 46: 94-98
 49. Butko P. (2003). **Cytolytic Toxin Cyt1A and Its Mechanism of Membrane Damage: Data and Hypotheses**. Applied and Environmental Microbiology. 69: 2415-2422.
 50. Cheong H., Gill S.S. (2003). **Cloning and Characterization of a Cytolytic and Mosquitocidal δ - Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan***. Applied and Environmental Microbiology 63: 3254-3260.
 51. Li J., Koni P.A., Ellar D.J. (1996). **Structure of the Mosquitocidal δ -Endotoxin Cyt B from *Bacillus thuringiensis* sp. *Kyushuensis* and Implication for Membrane Pore Formation**. J. Mol. Biol. 257:129-152.
 52. Harrington L.C., Edman J. D., Scott T.W. (2001). **Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood?**. J. Med. Entomol. 38(3): 411-422.
-

53. Gubler D.J. (1998). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(3): 480-496.
 54. Jirakanjanakit N., Saengtharapit S., Rongnoparut P., Duchon S., Bellec C., Yocsan S. (2007). **Trend of Temephos Resistance in *Aedes (Stegomyia)* Mosquitoes in Thailand During 2003–2005**. *Environ. Entomol.* 36(3): 506-511.
 55. Mortimer M.R., Chapman, H.F. (1995). **Acute toxic effects of (S)-methoprene and temephos to some Australian non-target aquatic crustacean species**. *Australasian Journal of Ecotoxicology*. 1(2):107-111.
 56. Fernández L.E., Pérez C., Segovia L., Rodríguez M.H., Gill S.S., Bravo A., Soberón M. (2005). **Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop α -8 of domain II**. *FEBS Lett.* 579: 3508-3514.
 57. De Backer M., McSweeney S., Rasmussen H.B., Riise B.W., Lindley P., Hough E. (2002). **The 1.9 Å crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase**. *J. Mol Biol.* 318: 1265-1274.
 58. Yang M.Y., Wang Z., MacPherson M., Dow J.A.T., Kaiser K. (1999). **A Novel *Drosophila* Alkaline Phosphatase Specific to the Ellipsoi Body of the Adult Brain and the Lower Malpighian (Renal) Tubule**. *Genetics*. 154: 285-297.
 59. Holtz M. K., Kantrowitz R. E. (1999). **The mechanism of the alkaline phosphatase reaction insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis**. *FEBS Letters*. 462: 7-11.
 60. Stec B., Hehir M.J., Brennan C., Nolte M., Kantrowitz E.R. (1998). **Kinetic and X-ray Structure of Three Mutant *E. coli* Alkaline Phosphatases: Insights into the Catalytic Mechanism Without the Nucleophile Ser 102**. *J. Mol. Biol.* 277: 647-662.
 61. Ikezawa H. (2002). **Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins**. *Biol. Pharm. Bull.* 25 (4): 409-417.
 62. Baneyx F. (1999). **Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli***. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 411-421.
 63. Makrides S.C. (1996). **Strategies for Achieving High Expression of Genes in *Escherichia coli***. *Microbiological Reviews*. 60(3): 512-538.
 64. Guex N., Peitsch M.C. **Principles of Protein Structure, Comparative Protein Modeling and Visualization**. GlaxoWellcome Experimental Research S.A. Chapter 6. [En línea]. <http://swissmodel.expasy.org/course/course-index.htm>.
 65. Yaoi K., Nakanishi K., Kadotani T., Imamura M., Koizumi N., Iwahana H., Sato R. (1999). ***Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin binding region of *Bombyx mori* aminopeptidase-N**. *FEBS Letters*. 463:221-224.
-

66. Gómez I., Miranda-Ríos J., Rudiño-Piñera E., Oltean D.I., Gill S.S., Bravo A., Soberón M. (2002). **Hydrophobic Complementarity Determines Interaction of Epitope ⁸⁶⁹HITDTNNK⁸⁷⁶ in *Manduca sexta* Bt-R₁ Receptor with Loop 2 of Domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxins.** The Journal of Biological Chemistry. 277(3):30137-30143.
 67. Dosch J.A., Candas M., Griko N.B., Maaty W.S.A., Midboe E.G., Vadlamudi R.K., Bulla Jr L.A. (2002). **Cry1A Toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a Region Adjacent to a Membrane-Proximal Extracellular Domain Bt-R₁ in *Manduca sexta*; Involvement of a Cadherin in the Entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*.** Insect Biochemistry and Molecular Biology. 32:1025-1036.
 68. Gómez I., Dean D., Bravo A., Soberón M. (2003). **Molecular Basis for of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Specificity: Two Structural Determinants in the *Manduca sexta* Bt-R₁ Receptor interact with Loops α -8 and 2 in Domain II of Cry1Ab Toxin.** Biochemistry. 42:10482-10489.
 69. Hua G., Jurat-Fuentes J.L., Adang M. (2004). **Bt-R_{1a} Extracellular Cadherin Repeat 12 *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and Cytotoxicity.** The Journal of Biological Chemistry. 279 (27):28051-28056.
 70. Xie R., Zhuang M., Ross L., Gómez I., Oltean D. I., Bravo A., Soberón M., Gill S.S. (2005). **Single Amino Acid Mutations in the Cadherin Receptor from *Heliothis virescens* Affect Its Toxin Binding Ability to Cry1A Toxins.** The Journal of Biological Chemistry. 280 (9): 8416-8425.
 71. Jenkins J.L., Lee M.K., Valaitis A.P., Curtis A., Dean D. (2000). **Bivalent Sequential binding Model of a *Bacillus thuringiensis* Toxin to Gypsy Moth Aminopeptidase N Receptor.** The Journal of Biological Chemistry. 275(19):14423-14431.
-