

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DEL PROCESO DE OLIGOMERIZACIÓN
DE TOXINAS Cry1A PRODUCIDAS POR *Bacillus thuringiensis*.

T E S I S

Que para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Nuria Jiménez Juárez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Alejandra Bravo de la Parra

Cuernavaca, Morelos. Abril de 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo lo dedico con cariño a mis padres,
Violeta y Fidel:

Gracias por su amor y apoyo incondicional.
Estoy muy orgullosa de ser su hija.
Los quiero mucho.

A mis hermanos: Tama, Tany, Gunter y Yara
Por recordarme que la vida es un instante que se
tiene que vivir.

Toda persona dispone de los datos de sus sentidos, y puede coincidir o no con los demás sobre cuales son esos datos. Pero los principios filosóficos fundamentales que subyacen a la realidad y los principios teológicos o la falta de principios son elegidos por el individuo. Un hombre o una mujer deben ser libres de buscar lo bueno, lo verdadero y lo bello. Pues la negativa a dar a otros un amplio margen para definir sus creencias ha conducido una y otra vez al desastre...

Tomado del libro "La caja negra de Darwin"
Michael J. Behe

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a todas las personas que contribuyeron de alguna manera para hacer posible que este trabajo llegara a buen término.

Dra. Alejandra Bravo, quisiera darte las gracias por todo el apoyo que me has dado desde que llegué a este laboratorio. Me siento muy afortunada de haberte conocido, porque además de ser una excelente jefa eres también una extraordinaria persona. Te admiro y respeto mucho. Me llevo la grata experiencia de haber recibido tus consejos y de haber compartido contigo más que estrategias experimentales.

Dr. Mario Soberón, gracias por los consejos, ideas, sugerencias y críticas que contribuyeron de manera importante a este proyecto. Gracias sobre todo por los pequeños instantes, por las risas, por las pláticas, que me hicieron ver que eres un magnífico ser humano.

A los doctores Agustín López y Edgardo Escamilla, miembros del comité tutorial, quisiera agradecer por sus comentarios críticos que sin duda alguna fueron aportaciones importantes para el desarrollo de este proyecto. Gracias, además por contribuir de manera importante con mi formación académica.

A los miembros del jurado de examen: Dra. Gloria Saab, Dra. Claudia Treviño, Dra. Alicia González y Dr. Baltazar Becerril, gracias por las críticas, preguntas y correcciones realizadas a este trabajo, que permitieron mejorar este escrito final.

Dra. Liliana Pardo gracias por tu crítica y contribuciones a este proyecto, por haber trabajado mano a mano conmigo cuando estaba atorada en el camino, pero sobre todo gracias por ser mi amiga. No me alcanzan las palabras para decirte que te admiro y quiero muchísimo. Te deseo lo mejor en tu estancia en este laboratorio y recuerda siempre que tienes en mí a una amiga sincera e incondicional.

A los biólogos Jorge Sánchez y Lizbeth Cabrera quisiera agradecerles de manera especial por el apoyo técnico brindado. He aprendido mucho de ustedes, gracias por estar siempre dispuestos a ayudar.

A Sergio Blancas y Alejandro Uribe, gracias por el apoyo técnico que nos brindan. Especialmente quiero agradecer a Sergio, quien fue mi vecino todos estos años y sin duda alguna es una pieza clave en el laboratorio. Gracias por compartir conmigo.

A Graciela Domínguez por su ayuda administrativa. Gracias por estar siempre de buen humor y por contagiarnos con tu alegría. Te quiero mucho matadita.

A mis compañeros de laboratorio: Leivi, Tere Martínez, Erandi, Ramiro, Emiliano, Carlos, Ivan, Luis Enrique, Tere Fernández, Sabino, Isabel, Juan y Fernando. Gracias por los buenos momentos que compartimos en el laboratorio.

A mis amigas Claudia Pérez, Lizbeth Cabrera, Angeles Cancino, Luisa Fernández y Graciela Domínguez, gracias por tan gratas pláticas, consejos, chistes, chismes, fiestas, pasteles, comilonas, experiencias personales y todo lo demás que compartimos. Sin duda alguna son personas muy especiales para mí, y el hecho de saberme su amiga es el mayor tesoro que descubrí en este laboratorio. Las quiero mucho y sépanse mis amigas para siempre.

Mis más especiales gracias a mi familia y amigos, quienes aunque no están físicamente en este laboratorio, siempre los llevo conmigo. Gracias mil por escuchar mis chistes malos, por soportar mis histerias, por apoyarme y brindarme su mano en los malos momentos, pero sobre todo por compartir y disfrutar conmigo lo bello de la vida. Gracias a ustedes me fortalezo día con día y soy capaz de vencer todas las adversidades que se me presentan. Los quiero.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR
DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM,
DIRIGIDO POR LA DRA. ALEJANDRA BRAVO,
FINANCIADO POR EL PROYECTO CONACyT-48631
Y POR LAS BECAS CONACyT, DGEP

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
ABREVIATURAS	8
1. RESUMEN	9
ABSTRACT	11
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1 Toxinas formadoras de poro (PFTs)	13
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> y sus endotoxinas	14
2.2.1 Activación proteolíticas de toxinas Cry	17
2.2.2 Unión a receptor	19
2.2.2.1 Receptores de toxinas Cry	21
2.2.2.1.1 Caderina	21
2.2.2.1.2 Aminopeptidasa N (APN)	22
2.2.2.1.3 Fosfatasa alcalina (ALP)	25
2.2.2.1.4 Glicolípidos	26
2.2.2.1.5 Glicoconjugado	27
2.2.3 Oligomerización	27
2.2.4 Formación de poro	28
2.2.5 Mecanismo de acción de toxinas Cry	31
2.2.5.1 Modelo Bravo-Soberón	31
2.2.5.2 Modelo de señalización celular	34
2.2.5.3 Modelo Jurat-Fuentes	37

3. ANTECEDENTES	39
3.1 Oligomerización de toxinas Cry1A	39
3.2 Proteólisis limitada de la toxina Cry1Ab	40
3.3 Mutagénesis en el dominio I de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac	42
3.4 Estructuras Coiled-coil y oligomerización	45
3.4.1 Participación de los coiled-coils en la oligomerización de toxinas Cry	47
4. HIPÓTESIS	50
5. OBJETIVOS	51
5.1 Objetivos generales	51
5.2 Objetivos específicos	51
6. MATERIALES Y MÉTODOS	52
6.1 Cepas y medios de cultivo	52
6.2 Construcción de mutantes del dominio I de Cry1Ab	54
6.3 Purificación de cristales de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I	56
6.4 Cuantificación de proteína mediante Bradford	57
6.5 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	57
6.6 Bioensayos con las mutantes del dominio I	57
6.7 Purificación del anticuerpo scFv73	57
6.8 Extracción de jugo gástrico de <i>Manduca sexta</i>	58
6.9 Ensayos de competencia de la oligomerización de Cry1Ab con los péptidos sintéticos de las hélices α del dominio I	59
6.10 Western-blot	59
6.11 Solubilización de cristales de Cry1Ab y mutantes del dominio I	59
6.12 Tripsinación de Cry1Ab y mutantes en dominio I	60
6.13 Biotinación de la toxina Cry1Ab y mutantes en dominio I	60
6.14 Extracción de vesículas de vellosidad de membrana apical (VVMA)	60
6.15 Ensayos de unión y competencias heterólogas con las mutantes del dominio I	61

6.16 Purificación de un fragmento del receptor Bt-R1	62
6.17 Ensayo de unión a ligando con un fragmento del receptor Bt-R1	62
6.18 Determinación de constantes de afinidad por ELISA	63
6.19 Preparación de liposomas de fosfatidilcolina	63
6.20 Activaciones <i>in vitro</i> de Cry1Ab con liposomas	63
6.21 Ensayos de formación de poro en bicapas lipídicas planas	63
6.22 Cromatografía de exclusión de peso molecular	64
7. RESULTADOS	65
7.1 Estandarización de la activación de Cry1Ab <i>in vitro</i>	65
7.2 Papel de las hélices alfa del dominio I de Cry1Ab en la oligomerización	67
7.3 Construcción de mutantes en los coiled-coils del dominio I de la toxina Cry1Ab	68
7.4 Bioensayos con las mutantes del dominio I de Cry1Ab	72
7.5 Solubilización y activación de las mutantes del dominio I de Cry1Ab	73
7.6 Unión a vesículas de vellosidad de membrana apical (VVMA)	74
7.7 Unión de las mutantes del dominio I de Cry1Ab al receptor Bt-R1	76
7.8 Análisis de la oligomerización de Cry1Ab silvestre y mutantes	77
7.9 Análisis de formación de poro en bicapas lipídicas planas	79
8. DISCUSIÓN	83
9. CONCLUSIONES	88
10. PERSPECTIVAS	90
11. BIBLIOGRAFÍA	92
Anexo I. Competencias de la formación de oligómero con los diferentes péptidos sintéticos de las hélices α del dominio I de Cry1Ab.	103

Anexo II. Western-blot del oligómero de la mutante Y107E que muestra su inestabilidad a temperatura. 104

APÉNDICE I. Contribución original 105

Bacillus thuringiensis Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. **Jiménez-Juárez, N.**, Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincón, G., Damián-Almazo, J., Gill, S., Soberón, M and Bravo, A. The Journal of Biological Chemistry. 2007. 282 (29):21222-21229.

APÉNDICE II. Artículo en colaboración. 114

Structural and functional análisis of the pre-pore and membrane-inserted pore of Cry1Ab toxin. Pardo-López, L., Gómez, I., Muñoz-Garay, C., **Jiménez-Juárez, N.**, Soberón, M. and Bravo, A. Journal of Invertebrate Pathology. 2006. 92:172-177

APÉNDICE III. Artículo de revisión. 121

The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce Insect death in *Manduca sexta*. **Jiménez-Juárez, N.**, Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Soberón, M. and Bravo, A. Peptides. 2008. 29:318-323.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. A) Imagen de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Aa mostrando sus tres dominios. B) Imagen de los Dominios I, II y III de la toxina Cry1Aa, vistos individualmente.	17
Figura 2. Modelo del mecanismo secuencial de acción de toxinas Cry1A, Bravo et al., 2004.	34
Figura 3. Modelo de señalización celular, Zhang, et al., 2006.	37
Figura 4. Modelo de acción de toxinas Cry, Jurat-Fuentes et al., 2006.	38
Figura 5. Representación esquemática del coiled-coil formado por dos hélices α .	46
Figura 6. Representación esquemática de los coiled-coils predichos para la hélice α -3 de las toxinas Cry1Aa, Cry3Aa y Cry4Ba.	49
Figura 7. Estrategia para la construcción de mutantes del dominio I de Cry1Ab utilizando los plásmidos PBSKSAb y PHT315Ab.	56
Figura 8. Esquema del ensayo de formación de poro en bicapas lipídicas planas, realizado con la toxina Cry1Ab activada con liposomas de fosfatidilcolina.	64
Figura 9. Activación <i>in vitro</i> de la toxina Cry1Ab con y sin liposomas de fosfatidilcolina.	67
Figura 10. Competencia <i>in vitro</i> de la formación de oligómero de Cry1Ab con péptidos sintéticos de las hélices α -3 y α -6 del dominio I analizadas	68

mediante Western-blot.

- Figura 11.** A) Representación esquemática de los coiled-coils predichos para las hélices α -3 y α -6. B) Esquema de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Aa en la que se muestran los aminoácidos de las hélices α -3 y α -6 mutados. 69
- Figura 12.** Digestión de los plásmidos PHT315Ab subclonados con los fragmentos Cla de las diferentes mutantes. 70
- Figura 13.** Cristales de las mutantes del dominio I de Cry1Ab purificados mediante gradientes discontinuos de sacarosa. 71
- Figura 14.** Cristales puros de las mutantes inestables visualizados mediante Western-blot de gel semidesnaturalizante 72
- Figura 15.** Toxinas Cry1Ab silvestre y mutantes activadas con tripsina. 74
- Figura 16.** Ensayo de unión en solución de Cry1Ab silvestre y mutantes a las VVMA de *M. sexta*. 75
- Figura 17.** Competencias de unión heteróloga realizadas con las toxinas mutantes del dominio I de la toxina Cry1Ab. 76
- Figura 18.** Unión de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I a un fragmento de Bt-R1 que contiene tres sitios de unión a la toxina Cry1Ab. 77
- Figura 19.** A) Activación *in vitro* de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I en presencia de SUV visualizada mediante Western-Blot. B) Análisis de la estabilidad a temperatura de los oligómeros de Cry1Ab silvestre y de la mutante R99E, visualizada mediante Western-blot. 78

Figura 20. Análisis de formación de poro del monómero y oligómero puros de la toxina Cry1Ab en bicapas lipídicas planas (Rausell, et al., 2004).	80
Figura 21. Ensayo de la actividad de formación de poro en bicapas lipídicas planas de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I.	81
Figura 22. A) Actividad de formación de poro de Cry1Ab silvestre y mutante L100E evaluada en bicapas lipídicas planas. B) Curvas corriente-voltaje de las mutantes del dominio I de Cry1Ab.	82
Tabla 1. Oligonucleótidos para la construcción de mutantes del dominio I de Cry1Ab.	55
Tabla 2. Diferentes condiciones evaluadas en la activación <i>in vitro</i> de la toxina Cry1Ab.	66
Tabla 3. Bioensayos de las mutantes del dominio I de Cry1Ab con larvas de <i>M. sexta</i> .	73

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Toxinas formadoras de poro (PFTs)

Las toxinas formadoras de poro (PFTs), son producidas por una gran variedad de organismos, que incluyen insectos, reptiles venenosos, gusanos, plantas, amibas, hidras, anémonas marinas y particularmente bacterias [5, 82]. La función de algunas de estas es participar en la digestión, en el deterioro del hospedero o como armas en la defensa contra posibles invasores. Una de sus principales características es que pueden existir como proteínas solubles en un ambiente acuoso o como proteínas insertadas en la membrana, por lo que requieren sufrir cambios conformacionales para ejercer su efecto tóxico [82].

Dentro de este grupo, las toxinas producidas por bacterias son consideradas como los venenos más potentes conocidos por el hombre. Pueden actuar inhibiendo procesos específicos como síntesis de proteínas o mediante procesos más generales como la formación de poros en la membrana. En el segundo caso, las toxinas pueden liberar compuestos tóxicos a través del poro que van dirigidos hacia sitios específicos de la célula ó permitir el paso de iones y agua al interior de la célula causando lisis celular. El grupo de las toxinas bacterianas agrupa una gran diversidad de toxinas, mismas que difieren en su estructura, por lo que se han clasificado con base en el tipo de poros que forman, en dos subgrupos: α -PFTs y β -PFTs. Se ha predicho que las α -PFTs forman poros usando hélices α , mientras que las β -PFTs lo hacen con un barril β que se inserta en la membrana. Dentro del primer grupo se encuentran las colicinas, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, las toxinas Cry y la toxina diftérica. En el segundo grupo están la α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, la aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, la toxina del ántrax y las citolicinas dependientes de colesterol, entre otras [102].

En cuanto a su mecanismo de acción, se ha propuesto que ciertos pasos básicos son necesarios para la generación de poros. Primero, la toxina es secretada por la bacteria. Después de ser ingerida por el hospedero, se une a receptores ubicados en la superficie celular. En seguida, oligomeriza y por último, se inserta en la membrana celular. Como consecuencia, se forma un poro, que finalmente ocasiona la lisis de la

célula ó que permite la translocación de algún componente tóxico. Si bien, la formación de un poro es uno de los primeros efectos que ocasionan, se ha sugerido que algunas PFTs como la aerolisina y la listeriolisina O, también actúan sobre las células del sistema inmune causando apoptosis. Por lo que se ha propuesto que diferentes mecanismos pueden actuar conjuntamente [102]. No obstante, existen particularidades en el modo de acción de cada una de las toxinas que integran este grupo que aún se desconocen por completo. En este trabajo nos enfocamos en estudiar el modo de acción de un grupo específico de toxinas formadoras de poro: las toxinas Cry o δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.

2.2 *Bacillus thuringiensis* y sus endotoxinas

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram-positiva que pertenece a la familia *Bacillaceae*. Esta familia incluye seis especies: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* [88]. De las cuales *B. thuringiensis* se distingue porque produce toxinas con capacidad insecticida. Su ciclo de vida involucra dos fases: vegetativa y de esporulación. En la fase vegetativa, las bacterias se duplican por bipartición cada treinta a noventa minutos. En la fase de esporulación, se efectúa la diferenciación de bacteria a espora y se presenta cuando la bacteria crece bajo limitación de nutrientes. Esta consta de siete fases. En la fase I se induce la formación del filamento axial. Después de ocho horas de crecimiento, la bacteria entra en la fase II, que se distingue por la formación del septo espora de división asimétrica que involucra mesosomas. A la novena hora, ocurren cambios a nivel membranal y citoplásmico para la formación de la espora, y también inicia la síntesis del cristal insecticida. A las doce horas, se forma el exosporio, la pared celular primordial, la corteza y las capas de protección de la espora (fases IV a la VI). En la fase VII, ocurre la maduración de la espora y la síntesis de enzimas líticas que liberan a los cristales insecticidas y a las esporas [9].

Bacillus thuringiensis produce un cristal paraesporal durante la fase de esporulación, el cual puede estar formado por una o varias proteínas con capacidad insecticida, llamadas δ -endotoxinas. Por lo que *B. thuringiensis* ha sido utilizado durante las últimas décadas para producir bioinsecticidas en contra de insectos plaga

que dañan la agricultura, para el control de mosquitos y el manejo de bosques, dada su alta especificidad e inocuidad para el ambiente [94].

Las δ -endotoxinas de Bt han sido clasificadas con base en su identidad de aminoácidos en más de cincuenta grupos. Se define como toxina Cry cualquier proteína paraesporal producida por *Bacillus thuringiensis* que tenga un efecto tóxico hacia algún insecto y que pueda ser probado por bioensayo, o que se parezca a toxinas Cry ya descritas [21]. Este grupo abarca toxinas que tienen dos diferentes masas moleculares, 130 ó 70 kDa. Presentan un amplio rango de especificidad contra diferentes órdenes de insectos: *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Mallophaga* y *Acari* y otros invertebrados que incluyen los órdenes *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes* y *Sarcomastigophora* [12, 94]. La familia de proteínas Cry de tres dominios agrupa a la mayor parte de las δ -endotoxinas, incluyendo más de treinta tipos y más de cien subtipos con especificidades únicas [12].

A la fecha se han elucidado las estructuras de las toxinas activadas: Cry3Aa [62] y Cry3Bb [30], específicas contra coleópteros; Cry1Aa [40] específica para lepidópteros; Cry4Aa [11] y Cry4Ba [10], específicas para dípteros. También se resolvió la estructura de la protoxina Cry2Aa que mata a insectos lepidópteros y dípteros [72]. Todas presentan una estructura de tres dominios muy similar, a pesar de su baja similitud de secuencia. El dominio I está formado por siete hélices alfa cuya hélice central (α -5) está rodeada por seis hélices externas (Figura 1). Cada una de las hélices externas es de naturaleza anfipática, en donde los residuos cargados o polares están expuestos al solvente mientras que los residuos hidrofóbicos se proyectan hacia la hélice central. La mayoría de las hélices son mayores de 30Å y podrían atravesar la membrana hidrofóbica. Lo anterior, aunado a la gran similitud estructural que guarda con el dominio formador de poro de la hemolisina, la colicina Ia y el dominio de translocación membranal de la toxina diftérica, han llevado a hipotetizar que el dominio I participa en la formación de poro de las toxinas Cry [85, 94]. Aunado a esto, análisis mediante mutagénesis sitio-dirigida indican que las hélices α 4 y α 5 podrían ser las más importantes para la formación de poro [95, 96].

El dominio II consta de tres láminas beta antiparalelas que forman un β -prisma. Dos de las láminas están formadas por cuatro cadenas que están expuestas al solvente y forman un motivo de “llave griega” (Figura 1). Estructuralmente, este dominio es el más variable, presentando lasos con diferente longitud, conformación y secuencia. Dada esta variabilidad y el análisis de mutantes en estos lazos, se ha sugerido que son importantes para conferir especificidad. Además, las similitudes entre este dominio y las regiones determinantes de la complementariedad de las inmunoglobulinas sugieren un papel en la unión al receptor. Aunado a esto, este dominio tiene una gran similitud con proteínas que unen carbohidratos como la vitelina, las lectinas Mpa y la jacalina, por lo que se ha sugerido que podría unir carbohidratos, pero esto aún no se ha demostrado [23, 85].

El dominio III está formado por dos láminas beta antiparalelas que forman un β -sándwich (Figura 1). En donde las dos láminas β se empaacan con una topología de “anillo”, la lámina externa se orienta hacia el solvente y la interna hacia el dominio II. Los dos lazos se extienden al final del dominio II e interactúan con el dominio I. El dominio III muestra menos variabilidad estructural que el dominio II y las principales diferencias se presentan en la longitud, la orientación y la secuencia de los lasos. Un claro ejemplo son las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac, en donde existen diferencias determinadas por la extensión del laso de Cry1Ac que crea una cavidad de unión a N-acetilgalactosamina, la cual está implicada en el reconocimiento de este azúcar presente en el receptor APN. Este dominio muestra similitud con moléculas de unión a carbohidratos (CBMs) presentes en proteínas como las glucósido hidrolasas, las liasas y las esterases. Por lo que se ha hipotetizado que el dominio III de algunas toxinas Cry podría unir carbohidratos [85]. Esto último, únicamente se ha demostrado para la toxina Cry1Ac [17, 24].

Por otro lado, para que estas toxinas ejerzan su efecto tóxico, se propone que son necesarios los siguientes pasos: 1) solubilización de la protoxina al interior del intestino del insecto susceptible, 2) activación proteolítica, 3) unión a receptores de las células del epitelio intestinal y 4) formación de poros líticos [55]. A continuación se detallarán cada uno de estos pasos.

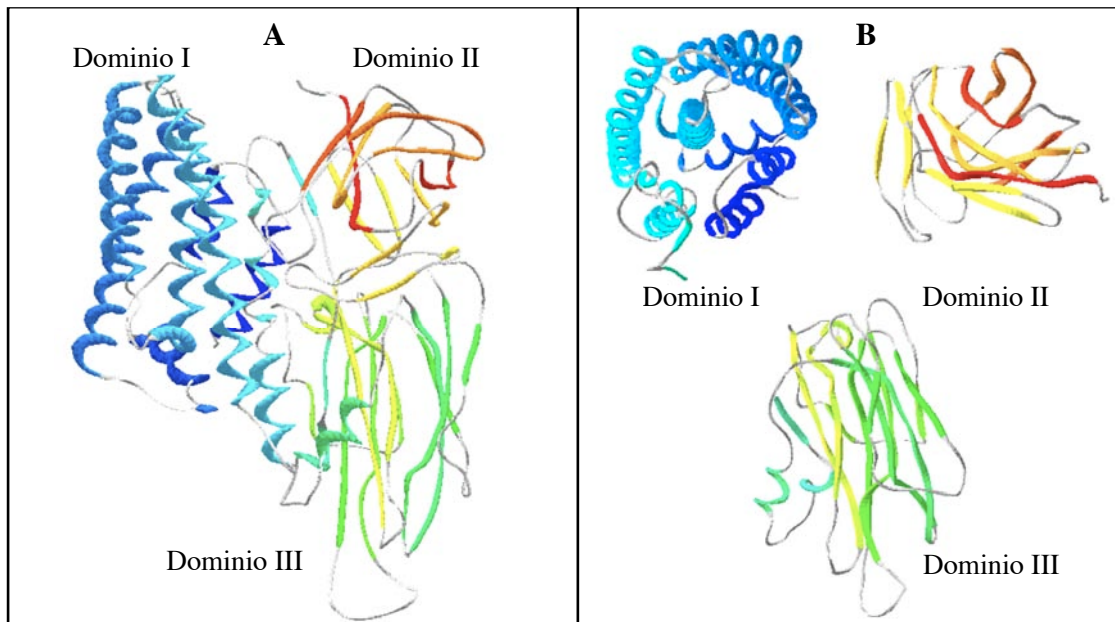


Figura 1. A) Imagen de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Aa mostrando sus tres dominios. B) Imagen de los Dominios I, II y III de la toxina Cry1Aa, vistos individualmente.

2.2.1 Activación proteolítica de toxinas Cry.

Las toxinas Cry son sintetizadas como protoxinas inactivas que requieren ser activadas mediante procesamiento proteolítico. Existen todavía preguntas sin responder sobre el procesamiento de toxinas Cry1A *in vivo*. Se ha propuesto que el procesamiento de toxinas Cry de 130 kDa se efectúa secuencialmente, iniciando en el extremo carboxilo terminal, produciendo cortes de 10 kDa, hasta llegar a un tamaño de 65 kDa. Después, se corta en el extremo amino terminal, removiendo los primeros 20 a 55 aminoácidos según la toxina [14, 15].

En un trabajo realizado con la toxina Cry1Ab se reportó que cuando es activada por proteasas del intestino medio del insecto *Manduca sexta*, sufre tres cortes intramoleculares. El primer corte ocurre al inicio de la hélice α_{2a} , siendo eliminada la hélice α_1 , y generando un fragmento de 58 kDa, el cual en ensayos de permeabilidad a K^+ *in vitro*, causa un incremento en la actividad de formación de poro. El segundo corte se efectúa entre las hélices α_{2a} y α_{2b} , generando un producto de 56 kDa, el cual pierde la actividad de formación de poro. El tercer corte se produce dentro del dominio II generando dos fragmentos de aproximadamente 30 kDa, este último corte ocasiona una

importante reducción en la actividad de formación de poro y la disminución de la toxicidad. También se encontró que la digestión *in vitro* de la protoxina con tripsina genera cortes tanto en el extremo amino terminal como en el carboxilo terminal, resultando en la formación de una toxina de 60 kDa, pero no produce los primeros dos cortes intramoleculares que se observan al activar Cry1Ab con jugo gástrico del insecto susceptible, por lo que se ha sugerido que la ó las proteasas responsables de estos cortes son diferentes a tripsina [71].

En otros trabajos, se ha propuesto que serinproteasas como tripsina, quimiotripsina y eleastasa, que participan en la digestión de los insectos, también están involucradas en el procesamiento proteolítico de estas toxinas. En el caso específico de *Choristoneura fumiferana*, se reportó que una enzima tipo tripsina participa en la activación de la toxina Cry1Ac [70]. También en *Plodia interpunctella* se describió la participación de enzimas con actividad tipo tripsina y quimiotripsina en la activación de Cry1Ac [79].

Otra propuesta es que las proteasas endógenas de *B. thuringiensis* podrían estar involucradas en la activación de toxinas Cry. Esta hipótesis se basa en el hecho de que su esporulación está asociada con una gran producción de proteasas, misma que coincide con la etapa de producción de cristales. Para validar esta propuesta, en un trabajo se analizó la producción de proteasas intracelulares de dos cepas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, LB1 y HD251, encontrando que mientras LB1 producía una banda de 68 kDa correspondiente a la toxina activa, en HD251 no estaba presente ya que produjo menos del 10% de la actividad proteolítica encontrada en LB1. También demostraron que esto se debió a que en LB1 la síntesis de proteasas incrementaba conforme las células esporulaban mientras que en HD25 la actividad aparecía mucho después de la etapa de esporulación [3]. Posteriormente, en otro trabajo se demostró que la activación de una protoxina de 132 kDa a una toxina de 66 kDa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ocurría sin necesidad de tripsina, pero este procesamiento era inhibido al agregar EDTA, implicando la participación de una metaloproteasa en la activación de esta proteína [58].

Por otra parte, aunque la activación descrita anteriormente para cada grupo de protoxinas engloba los pasos generales del procesamiento, es importante mencionar que pueden presentarse variaciones en los cortes, lo cual dependerá de la composición de las

proteasas presentes en el jugo gástrico, así como de su actividad enzimática y su especificidad. No obstante, un mal procesamiento o el corte excesivo de la toxina podría generar resistencia [78]. Al respecto, en un trabajo realizado con una población de *Heliothis virescens* resistente a toxinas Cry, se encontró que las proteasas presentes en el jugo gástrico procesaron las protoxinas de Cry1Ac más lentamente y degradaron la toxina más rápido que las enzimas de una línea susceptible de insectos [28]. En otro trabajo realizado con *Spodoptera littoralis*, el aumento en la actividad específica de las proteasas del intestino de las larvas de quinto *instar* se asoció con la pérdida de sensibilidad a la toxina Cry1C, posiblemente debido al incremento en su degradación [54]. Además también se demostró que insectos resistentes a Cry1Ac de *Plodia interpunctella* carecen de una proteasa que activa a las protoxinas de *Bt* y que su ausencia está ligada genéticamente a la supervivencia de las larvas [78].

2.2.2 Unión a Receptor

La unión de las toxinas Cry con sus receptores es un determinante importante de la especificidad y la toxicidad. La correlación entre unión, especificidad y toxicidad, se demostró por primera vez mediante ensayos de competencia utilizando vesículas de vellosidad de la membrana apical (VVMA) de los lepidópteros *Manduca sexta* y *Pieris brassicae*. En este trabajo se demostró que las toxinas Cry1Ab y Cry1Ba se unieron específicamente a las VVMA de *P. brassicae*, pero solo Cry1Ab se unió a las VVMA de *M. sexta*. Aunque ambas toxinas mataron a larvas de *P. brassicae*, solo Cry1Ab mató a larvas de *M. sexta*, por lo que se demostró que existe una correlación directa entre la unión y toxicidad [46]. Posteriormente, en otro trabajo se demostró, mediante competencias de unión homólogas y heterólogas, que las toxinas Bt2, Bt3 y Bt73, igualmente tóxicas para *M. sexta* pero con diferente toxicidad contra *Heliothis virescens* ($LC_{50}=7, 157$ y 2 ng/cm^2 , respectivamente) presentaron heterogeneidad en los sitios de unión, ya que las tres toxinas compartieron una población de sitios de unión, mientras que solo Bt2 y Bt73 reconocieron una segunda población y una tercera población fue reconocida solo por la toxina Bt73. Además, en este mismo trabajo se demostró que las toxinas Bt15, Bt13 y Bt8, no tóxicas contra larvas de *H. virescens*, no compitieron por la unión de Bt2, Bt3 y Bt73, respectivamente. Estos datos confirmaron que las toxinas Cry son específicas en su unión [109]. Sin embargo, en otro trabajo se reportó que no siempre se podría establecer una correlación directa entre unión y toxicidad, ya que la

toxina Cry1Ac, la cual tiene menor toxicidad contra *Lymantria dispar* que Cry1Ab, aparentemente mostraba una mayor afinidad que Cry1Ab en la unión a membranas de *L. dispar* [114]. Posteriormente, en otro trabajo, este comportamiento se explicó mediante un esquema de interacción de dos pasos. Con este sistema se analizó por separado la cinética de unión reversible e irreversible, encontrando que la unión reversible correlaciona con la unión de la toxina al receptor, mientras que la unión irreversible se relaciona con el paso de inserción [63]. Por lo que la unión irreversible se correlaciona directamente con la toxicidad.

Respecto a la identificación de los receptores de toxinas Cry, en un trabajo realizado por Adang et al, 1994, se demostró que la toxina Cry1Ac es capaz de unirse a dos proteínas, una de 120 kDa, identificada como aminopeptidasa N y otra de 65 kDa, una fosfatasa putativa, ambas aisladas de las VVMA de *M. sexta*. Estas dos proteínas se reconstituyeron en liposomas artificiales y posteriormente se analizó la liberación de Rb⁸⁶ inducido por su interacción con la toxina Cry1Ac. La conclusión del trabajo fue que la unión de la toxina a bajas concentraciones indujo la actividad de formación de poro, lo cual correlacionó directamente con la toxicidad [93].

Otros grupos han identificado diferentes proteínas que se unen a las toxinas Cry. Se propone que algunas de estas proteínas funcionan como receptores específicos. Los mejor caracterizados en lepidópteros son la aminopeptidasa N y las proteínas tipo caderina. Otro grupo de receptores incluyen a las alcalinofosfatasas (ALP), un gliconjugado de 270 kDa y una proteína de 252 kDa. También se propone que los glicolípidos pudieran jugar un papel importante como receptores en insectos y nemátodos [85].

En seguida se detallarán las características de estas proteínas y las evidencias que se han presentado para validar su función como receptores de toxinas Cry.

2.2.2.1 Receptores de toxinas Cry.

2.2.2.1.1 Caderina

Las caderinas son glicoproteínas transmembranales calcio-dependientes formadas por un dominio transmembranal, un dominio citoplasmático y un ectodominio con sitios de

unión a calcio (Ca^+). Las caderinas clásicas tienen cinco repetidos de caderina, pero se han reportado hasta con 34 repetidos. Algunas tienen también repetidos de mucina, laminina ó tipo factor de crecimiento epidérmico. Presentan funciones diversas que incluyen adhesión celular, migración, organización del citoesqueleto y morfogénesis [4].

Las proteínas tipo caderina se han aislado del epitelio intestinal de lepidópteros y también se ha demostrado que unen a toxinas Cry. Estas proteínas son muy similares a las caderinas clásicas, ya que presentan una organización estructural similar, salvo algunas diferencias. Por ejemplo, la caderina de *M. sexta*, presenta secuencias en el ectodominio que no están presentes en las caderinas clásicas: una secuencia de adhesión celular (HAV) y secuencias de unión a integrina (RGD y LDV), sin embargo no se ha determinado su papel funcional [25]. Otra de las diferencias, es que mientras las caderinas clásicas se localizan en las uniones celulares involucradas en la adhesión celular, las caderinas de lepidópteros se localizan en la membrana apical de las células columnares del epitelio intestinal [18, 41].

Los receptores tipo caderina mejor caracterizados son Bt-R1 de *M. sexta*, BtR175 de *B. mori* y HevCaLP de *H. virescens* [85]. El receptor Bt-R1 de *M. sexta*, fue el primero que se caracterizó como proteína de unión a la toxina Cry1Ab, mediante inmunoprecipitación con Cry1Ab, seguido de electroforesis en dos dimensiones [105]. Posteriormente, se demostró que después de transfectar células de mamífero COS-7 y HEK-293 con este receptor, la toxina Cry1Ab se unió con una constante de disociación similar a la del receptor nativo [106]. Este receptor también se expresó en células S2 de *Drosophila*, teniendo como efecto que estas células se volvieran susceptibles a diferentes toxinas Cry1A, causando la muerte del 12 al 14% de las células [48].

De igual forma, en *B. mori* se identificó otra proteína tipo caderina (Bt-R175) como receptor de la toxina Cry1Aa, mediante ensayos de inmunoprecipitación [76, 77]. Para demostrar su papel como receptor, esta proteína también se expresó en diferentes líneas celulares. Específicamente, cuando se expresó en células Sf9 y estas se trataron con la toxina Cry1Aa, se observó el hinchamiento celular después de 15 minutos y el número de células con este efecto incrementó 45 minutos después de la adición de la toxina, debido a la formación de poro [75].

En cuanto a HelvCaLP de *H. virescens*, existen diferentes trabajos que apoyan su papel como receptor de toxinas Cry. Primero, se demostró que en la línea resistente a Cry1Ac, YHD2 de *H. virescens*, la resistencia se generó por la ausencia de expresión del gene HevCaLP [29]. Aunado a esto, cuando este receptor se expresó en la línea celular S2, causó sensibilidad a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac [52].

Por otra parte, a la fecha se tienen identificadas algunas regiones de las caderinas involucradas en la interacción con toxinas Cry. Por ejemplo, en el receptor Bt-R175 se identificó una región que va del aminoácido 1245 al 1464, la cual es necesaria para la unión de Cry1Aa a éste receptor [75]. Un resultado similar se obtuvo con un péptido sintético correspondiente a los residuos 1296 al 1301 (repetido CR11), el cual bloqueó parcialmente la unión de Cry1Aa y Cry1Ab [37]. En otro trabajo con Bt-R1, mediante ensayos de competencia, se identificaron dos regiones de Cry1Ab que unen a éste receptor: una que va del aminoácido 869 al 876 (repetido CR7) y la otra del 1331 al 1342 (repetido CR12) [35]. También se demostró que Cry1Ac se une a los residuos 1217 al 1461 de la caderina de *Helicoverpa armigera* [112]. Mientras que la caderina de *H. virescens* se une a la toxina Cry1A mediante una región que incluye los aminoácidos 1422 al 1440 [117]. Finalmente, también se identificaron como sitios de unión el lazo α -8 y el lazo 2, en la toxina Cry1Ab y en la toxina Cry1Aa, los lazos 2 y 3 [35, 36].

2.2.2.1.2 Aminopeptidasa N (APN)

La aminopeptidasa N es una glicoproteína anclada a la membrana por un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI). Pertenecen a la superfamilia de metaloproteasas-peptidasas de unión a zinc, presentando un motivo corto zincin (HEXXH). Su función enzimática es cortar aminoácidos en el amino terminal de polipéptidos. Respecto a su función en el intestino de larvas de lepidópteros, se sabe que participa en la digestión de proteínas derivadas de la dieta de los insectos, en cooperación con las carboxipeptidasas y endopeptidasas [113]. Estas proteínas se clasifican en cinco clases con base en su identidad de secuencia [42]. Se ha demostrado que todas las clases de APN unen toxinas Cry [85].

Respecto a las evidencias que confirman la participación de la APN en la toxicidad de toxinas Cry, se pueden mencionar algunos trabajos de permeabilidad y

toxicidad *in vivo*. En cuanto a la formación de poro, anteriormente se mencionó que la unión de APN y fosfatasa de *M. sexta* inducen la formación de poro en la toxina Cry1Ac [93]. Resultados similares fueron observados en otros trabajos en donde la actividad de formación de poro, en liposomas reconstituidos con la APN de *H. virescens*, fue inducida por las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac [66]. En otros trabajos donde se realizaron ensayos de formación de poro en bicapas lipídicas planas, con las toxinas Cry1Aa Cry1Ac y Cry1Ca, se demostró que la presencia de la APN de *M. sexta* permitió la formación de canales a concentraciones de toxina menores a las utilizadas en membranas sin receptores [96].

Por otro lado, *in vivo* se demostró que larvas de *Drosophila* transgénicas en las que se expresó una APN de *M. sexta*, al ser alimentadas con la toxina Cry1Ac (50 µg/ml) fueron susceptibles, a diferencia de las larvas control que fueron resistentes aún a concentraciones mayores de toxina [33]. Pero la evidencia más fuerte que sustenta el papel de la APN como receptor es el silenciamiento de la APN en larvas de *Spodoptera litura*. En este trabajo se logró reducir en un 95% la expresión de este receptor en las larvas, lo que ocasionó la disminución del 75% de la toxicidad, al ser tratadas con la toxina Cry1Ca [87].

En cuanto a las regiones de interacción de la APN, se ha propuesto que el azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) es un determinante importante en la interacción con la toxina Cry1Ac. Esto se demostró en un trabajo donde se construyeron híbridos de Cry1Aa y Cry1Ac, en los que únicamente las toxinas con el dominio III derivado de Cry1Ac podían unirse a la APN purificada de *Limantria dispar* [60]. Después, en otro trabajo se demostró que GalNAc podía inhibir esta interacción [49]. Resultados similares se reportaron para híbridos de Cry1Ca con el dominio III de Cry1Ac insertado, los cuales se unieron a la APN de *M. sexta* y ésta unión fue competida con GalNAc [22]. Sin embargo, en un trabajo donde se caracterizaron los sitios de N-glicosilación de la APN clase 1 de *M. sexta*, se identificaron cuatro sitios, de los cuales ninguno tuvo GalNAc como componente [99]. Además, con este trabajo se corroboró que Cry1Ac interactúa con la APN a través de su C-terminal rico en treonina, que está orto-glicosilado con glicanos tipo mucina [99]. En otro trabajo realizado con una APN purificada de *B. mori*, se digirió este receptor y su unión con Cry1Aa se evaluó en

ensayos de unión a ligando. El resultado fue que la toxina se unió a dos fragmentos de 30 kDa correspondientes a los residuos Asp40 a Lys313 [99]. Después, estos fragmentos de APN se expresaron como proteínas de fusión en *E.coli* y se evaluó su unión a la toxina Cry1Aa, encontrando que únicamente los fragmentos más pequeños (residuos Ile135 a Pro198) unieron a la toxina Cry1Aa [99].

Por otro lado, respecto a los sitios de unión a APN presentes en las toxinas Cry, a la fecha se han identificado tres regiones. El primer sitio se localiza en la lámina externa del dominio III. Este sitio se identificó mediante la construcción de mutantes en la lámina β -16 de la toxina Cry1Ac, las cuales presentaron una disminución en la unión. Después de competir la unión de estas mutantes a las VVMA de *M. sexta* con GalNAc, la unión no disminuyó, confirmando que Cry1Ac requiere GalNAc para unirse a las membranas [17]. Aunado a esto, la estructura cristalográfica de Cry1Ac, en presencia y ausencia de GalNAc, reveló que Cry1Ac une a la APN de una manera GalNAc dependiente, mediante un sitio de inserción de seis residuos en el dominio III, el cual no está presente en Cry1Aa y Cry1Ab [24]. El segundo sitio se comparte por las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, el cual se cree que está formado por los lasos expuestos al solvente y se encuentra en la parte superior del dominio II. La participación de este sitio se confirmó mediante la construcción de las mutantes R368 y R369 del laso 2 de Cry1Ab y Cry1Ac, las cuales perdieron su toxicidad y la unión a VVMA de *M. sexta* y *L. dispar*, respectivamente [59]. No obstante, en otro trabajo, mediante el ensayo de unión a ligando se observó que la unión de Cry1Ab a la APN de *M. sexta* en presencia o ausencia de péptidos sintéticos, correspondientes a los lasos 2, 3 ó α -8 del dominio II, no compitieron la unión [35, 36]. El tercer sitio, identificado en Cry1Aa y Cry1Ab está cerca de la interfase entre los dominios II y III. Este sitio se reconoció mediante el mapeo de epítopes de dos anticuerpos monoclonales que unieron a Cry1Aa y bloquearon la unión con APN. Estos anticuerpos se unieron a la lámina externa del dominio III en distintos sitios sobrelapantes: $^{508}\text{STLRVN}^{513}$ (β -16) y $^{582}\text{VFTLSAHV}^{589}$ (β -22) [8]. Finalmente, en otro trabajo también se demostró que péptidos sintéticos correspondientes a la β -16 compitieron la unión de Cry1Ab con APN [34].

2.2.2.1.3 Fosfatasa alcalina (ALP)

Las fosfatasa alcalinas comprenden un grupo de enzimas heterogéneas que catalizan la hidrólisis de ésteres monofosfato en pH alcalino. Esta actividad enzimática se ha reportado en una gran variedad de organismos, desde bacterias hasta mamíferos, pero su función fisiológica no se conoce del todo. Se sabe que se localiza en forma soluble en el suero de mamíferos pero también se encuentra asociada a la membrana celular y dependiendo del tejido en donde se localiza, es la función que realiza. Por ejemplo, en las células del epitelio intestinal tiene como función participar en la absorción y en la hidrólisis de fosfatos de la dieta [27].

Estas proteínas fueron identificadas como receptores de Cry1Ac en *M. sexta* [68, 92] y en *H. virescens* [53]; y de Cry11Aa, en *Aedes aegypti* [26]. En *M. sexta*, la ALP (65 kDa) se identificó mediante electroforesis en geles de dos dimensiones, seguida del análisis de unión a la toxina Cry1Ac mediante ensayos de unión a ligando. No obstante, se desconoce el papel que juega en la toxicidad de Cry1Ac [68].

La ALP de *H. virescens* es una proteína anclada por GPI con masa molecular de 68 kDa. Primero se demostró, mediante ensayos de unión a ligando, que esta proteína se une a Cry1Ac, al parecer mediante el residuo N-acetilgalactosamina. En este mismo trabajo, se demostró que en una línea resistente de *H. virescens*, los niveles de expresión de ALP estaban disminuidos, sugiriendo que juega un papel en la toxicidad [53].

En cuanto a la ALP de *A. aegypti*, ésta tiene características similares a las ALP identificadas en lepidópteros. Se sabe que su masa molecular es de 65 kDa y que está anclada a la membrana mediante GPI. La unión de Cry11Aa a este receptor se demostró mediante ensayos de unión a ligando y cromatografía de afinidad [26].

2.2.2.1.4 Glicolípidos

Los glicolípidos se caracterizaron como receptores de toxinas Cry en líneas resistentes a la toxina Cry5Ba del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Para lo cual, mediante genética reversa, se identificaron los genes que podían restaurar la susceptibilidad a la toxina, mismos que fueron nombrados genes *bre* (*bre2*, *bre3*, *bre4* y *bre5*). Después de caracterizar estos genes, se encontró que codifican para glicosiltransferasas que no muestran ninguna similitud con los otros receptores identificados a la fecha. El primer

gene caracterizado fue *bre5*, el cual codifica para una proteína de la familia β -1,3-galactosiltransferasa. El gene *bre2* codifica para una β -1,3-glicosiltransferasa. Mientras que *bre3* codifica para una glicosiltransferasa putativa, homóloga a la proteína de *Drosophila* EGGHEAD. Por último, *bre4* codifica para una UDP-GalNac:GlcNac β -1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa [39].

Para demostrar si la toxina Cry5Ba podía unirse a glicolípidos, se purificó el componente B (glicoesfingolípido) de las membranas de *C. elegans* y después se incorporó en liposomas de fosfatidilcolina. En seguida, se evaluó la unión de la toxina Cry5Ba marcada con fluorescencia a estos liposomas, obteniendo que Cry5Ba si se unió de una manera dependiente de la dosis. Después, se analizó si diferentes azúcares podrían inhibir la unión de la toxina a glicolípidos. Para lo cual, el componente B fue fijado en placas de poliestireno y se analizó la unión de Cry5Ba, en ausencia y presencia de diferentes monosacáridos. El resultado fue que la galactosa inhibió la unión de Cry5Ba en un 92% [39]. En este mismo trabajo se demostró que la unión de las toxinas Cry a los glicolípidos es específica, ya que las toxinas Cry1Ac, Cry1Aa y Cry1Ab únicamente se unieron a glicolípidos extraídos del lepidóptero *M. sexta*, siendo capaces de competir por dicha unión [39].

2.2.2.1.5 Glicoconjugado

En otros trabajos se ha demostrado que las toxinas Cry se unen a dos tipos adicionales de receptores: BTR-270 y P252. El primero es un glicoconjugado de 270 kDa, el cual se aisló de *Limantria dispar*. Se sabe que es una proteína aniónica altamente glicosilada que forma parte del glicocáliz de las VVMA de *L. dispar* y ha sido demostrado que une a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ba [107].

El otro receptor, P252, se aisló de la fracción soluble de las VVMA de *Bombix mori*. Aunque su masa molecular es de 252 kDa, al ser purificado mediante cromatografía de exclusión de peso molecular, se purificó un oligómero de aproximadamente 985 kDa. Se demostró que este receptor puro une a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, sin embargo no se ha demostrado si juega un papel en la toxicidad [47].

2.2.3 Oligomerización

Al igual que otras toxinas formadoras de poro, como la aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y la α -toxina de *Clostridium septicum*, se sugiere que las toxinas Cry, después de ser activadas, forman un pre-poro oligomérico, el cual se inserta en la membrana y forma el poro lítico [1, 32, 69, 108]. En diferentes trabajos que apoyan esta hipótesis, se demostró que las toxinas Cry1Ab, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ga, Cry3A y Cry4Ba, después de ser activadas *in vitro*, en presencia de sus receptores (VVMA), formaron una estructura oligomérica de masa molecular de 250 kDa, adicional al monómero [38, 43, 74, 89]. En uno de éstos trabajos, se evaluó la formación de poro de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea Cry1Fa y Cry1Ga activadas en presencia de receptor, mediante ensayos de permeabilidad a potasio, encontrando que las mezclas de oligómero y monómero presentaron una mayor actividad de formación de poro a comparación de la toxina monomérica activada únicamente con tripsina [74]. Respecto a la función del oligómero como entidad formadora de poro, en un trabajo realizado con la toxina Cry1Ab, se demostró que preparaciones de oligómero puras se insertaron en bicapas lipídicas planas formando poros líticos estables con alta probabilidad de apertura, a diferencia del monómero el cual presentó una actividad inestable únicamente a concentraciones mucho mayores [90].

Sin embargo, a la fecha, se tiene poca información sobre las características de este preporo. En el caso de las toxinas Cry1A, se ha sugerido que el preporo está formado por cuatro subunidades, basándose en su masa molecular (250kDa) [38]. En cambio, para la toxina Cry4Ba, con base en el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión, se sugiere que el oligómero es un trímero [10, 80].

Respecto a las regiones de la toxina monomérica involucradas en la oligomerización, se propone que el dominio I, participa en este proceso, basándose en estudios de mutagénesis, y de proteólisis limitada. Esta información se detalla en el apartado de antecedentes específicos.

2.2.4 Formación de poro

Como se mencionó anteriormente, las toxinas Cry pertenecen a la familia de toxinas formadoras de poro. Un determinante para incluirlas dentro de este grupo es su capacidad para interactuar con membranas lipídicas artificiales en ausencia de receptores e insertarse formando canales permeables a cationes principalmente [97]. No obstante, cabe mencionar que a concentraciones fisiológicamente relevantes, en el orden de nano ó picomoles, estas no se pueden insertar espontáneamente, lo cual sugiere la participación de receptores en este proceso [65].

Se sugiere que el dominio I o parte de este dominio participa en la formación de poro. La primera evidencia que sustenta esta hipótesis es la estructura del dominio I, el cual consta de siete hélices anfipáticas, que tienen gran afinidad por la membrana, con excepción de la hélice $\alpha 1$, por lo que se sugiere que las hélices 2 a la 7, juegan un papel importante en la interacción inicial de formación de poro. Aunado a esto, este dominio presenta gran similitud estructural con el dominio formador de poro de otras toxinas bacterianas como la toxina diftérica y la colicina [83].

Por otra parte, en un trabajo realizado con la toxina Cry1Ac truncada correspondiente al dominio I, se demostró que este fragmento formó canales iónicos similares a los formados por la toxina completa [111]. Otra evidencia la constituyen diversos trabajos en los que se realizó la mutagénesis extensiva en las hélices $\alpha 2$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$, encontrando que únicamente las mutantes en la hélice $\alpha 5$ perdieron la actividad de formación de poro [7, 115]. En otro trabajo en el que se mutaron los residuos cargados de la hélice $\alpha 4$ de la toxina Cry1Aa, se demostró que cambios en cinco de estos residuos ocasionaron la pérdida de la toxicidad debido a la reducción en la habilidad para conducir iones a través del canal iónico, lo cual sugiere que esta hélice forma parte del poro, orientándose hacia el interior del canal iónico [67]. Además, también se demostró que las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se insertan en la membrana de una manera antiparalela, mientras que las otras hélices permanecen en la superficie de la membrana [95]. En cuanto a la hélice $\alpha 7$, mediante el análisis de Transferencia de energía de resonancia (RET), se demostró que el amino terminal de la hélice $\alpha 7$ de la toxina Cry3A, se ubica en la superficie de la membrana, mientras que la hélice $\alpha 5$ forma agregados que se organizan en una manera paralela dentro de la membrana [31].

Es importante mencionar que existe cierta controversia respecto a cuales son las regiones del dominio I que se insertan para formar el poro. Por ejemplo, en un trabajo realizado con la toxina Cry1Aa, mediante mutagénesis sitio-dirigida se introdujeron cisteínas para crear enlaces disulfuro intramoleculares dentro de la región formadora de poro o las regiones interdominio, con la finalidad de restringir la flexibilidad o el movimiento de las hélices dentro de dominio I ó los movimientos del dominio I relativos al dominio II. El resultado fue que la formación del poro requiere que el dominio I se separe del resto de la proteína y además que las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se separen del resto del dominio y se particionen dentro de la bicapa lipídica formando el poro lítico [95]. No obstante, en otro trabajo se reportó que la introducción de enlaces dobles de cisteína en la toxina Cry1Aa, en las mismas posiciones reportadas en el trabajo anterior, no impidieron que las toxinas mutantes particionaran dentro de la membrana y formaran el poro lítico. Además, en este mismo trabajo reportaron que cuando estas mutantes se evaluaron en bioensayos contra larvas de *Manduca sexta* y *Bombix mori*, en presencia o ausencia de un agente reductor, la toxicidad no presentó cambios significativos. Por lo que los autores sugirieron que tanto las hélices $\alpha 4$, 5, 6, y 7 e incluso el dominio II se insertan en la membrana [2]. Es importante tomar en cuenta que en estos trabajos se utilizaron diferentes sistemas *in vitro* para medir la actividad de formación de poro, lo que podría ser la causa de la variación en los datos. Por ejemplo, en el primer trabajo, se usó la técnica de reconstitución de la toxina en bicapas lipídicas planas de una mezcla 7:2:1 de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y colesterol. Mientras que en el segundo trabajo, los ensayos se realizaron mediante la técnica de “voltaje mantenido”, utilizando la membrana peritrófica aislada del intestino del insecto. Además, también es importante mencionar que aunque el segundo trabajo proporcionó datos *in vivo* sobre la toxicidad de esas mutantes, estos datos si muestran que hubo una reducción en la toxicidad de todas las mutantes respecto a la toxina silvestre, que fue mayor en las mutantes SS1 (puente disulfuro entre la hélice $\alpha 3$ y $\alpha 4$) y SS3 (puente disulfuro entre las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 7$).

Dadas las contradicciones en los diferentes trabajos sobre el papel de las hélices alfa del dominio I en la formación de poro, se proponen tres diferentes modelos de formación de poro que consideran la inserción de la toxina monomérica: 1) modelo de

navaja, 2) modelo de sombrilla y 3) modelo de dragón. En el primer modelo, se sugiere que las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ se insertan en la membrana, alejándose del dominio I, simulando una navaja abierta, sin un rearrreglo significativo del resto del dominio [45]. En el modelo de sombrilla, se sugiere que las hélices $\alpha 4$ y 5 se insertan en la membrana, mientras que el resto de las hélices se organizan en la superficie membranal, tal como las costillas de una sombrilla [62]. Finalmente, el modelo de dragón sugiere que todo el dominio I se inserta en la membrana [2, 103].

No obstante, en otros trabajos se propone que la entidad que se inserta en la membrana no es la toxina monomérica sino un pre-poro oligomérico, tal como ocurre en otras toxinas formadoras de poro. Una de las pruebas que apoya esta hipótesis es el hecho de que el oligómero puro de la toxina Cry1Ab se inserta eficientemente en la membrana induciendo la formación de poro en bicapas lipídicas planas. Este poro presenta conductancia estable, con una alta probabilidad de apertura. En cambio, el monómero puro presenta una interacción marginal con la bicapa lipídica y únicamente a concentraciones elevadas, induce una actividad de poro muy inestable, presentando múltiples estados de conductancia [90].

Respecto a las características del poro, mediante microscopía de fuerza atómica se demostró que la toxina Cry1Aa forma un poro de cuatro subunidades, con un diámetro central de aproximadamente 1.5 nm [110]. La naturaleza tetramérica del poro coincide con la masa molecular (250 kDa) reportada para el oligómero de diferentes toxinas Cry (Cry1Ab, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea y Cry1Fa) [38, 43, 74]. Sin embargo, recientemente se reportó, mediante el análisis con microscopía electrónica de transmisión, que la toxina Cry4Ba forma un oligómero trimérico que se inserta en la membrana [80]. Es importante considerar que no se demostró la funcionalidad de este trímero en la formación de poro. Por lo anterior, aún es necesario un análisis más detallado tanto del pre-poro soluble como insertado en la membrana.

2.2.5 Mecanismo de acción de toxinas Cry

A la fecha, se han propuesto tres diferentes modelos del mecanismo de acción para las toxinas Cry. A continuación, se describen brevemente cada uno de ellos.

2.2.5.1 Modelo Bravo-Soberón

En este modelo se propone que se requiere la transición de la toxina monomérica a un pre-poro oligomérico para insertarse en la membrana y formar un poro, el cual es la entidad responsable de la toxicidad. Al mismo tiempo, se sugiere que es necesaria la unión secuencial de la toxina a los receptores Bt-R1 y APN. Diversos trabajos realizados por este grupo sustentan este modelo secuencial de acción.

Primero, se demostró que la unión de la toxina Cry1Ab a caderina promueve el corte proteolítico de la hélice α -1 y la formación del preporo oligomérico. Para lo cual se aislaron anticuerpos de cadena sencilla (scFv), mediante la técnica de despliegue en fagos, que interfirieron con la interacción de la toxina Cry1Ab con las vesículas de vellosidad de membrana apical (VVMA). Uno de ellos, el anticuerpo scFv73 presentó una similitud del 71% con una región de ocho aminoácidos presente en Bt-R1 y compitió la unión de la toxina Cry1Ab a este receptor pero no compitió por la unión con APN [37]. En presencia de este anticuerpo, que mimetiza al receptor caderina, se realizaron activaciones *in vitro* de la protoxina Cry1Ab con el jugo gástrico de *Manduca sexta*, encontrando que además de generarse una proteína monomérica también se formó un pre-poro oligomérico con una masa molecular aproximada de 250 kDa. Este oligómero también se observó en muestras activadas con VVMA (que contienen los receptores). En cambio, en las muestras activadas solo con jugo gástrico, únicamente se observó el monómero. Las mezclas de monómero y oligómero, resultado de la activación con el anticuerpo scFv73, se separaron mediante cromatografía de exclusión de peso molecular y después se evaluó su actividad de formación de poro, encontrando que solamente el oligómero fue activo. Por último, se determinaron las secuencias amino terminales del monómero y el oligómero, encontrando que la secuencia monomérica correspondía al inicio de la hélice α 1, mientras que el amino terminal del oligómero correspondió a una región localizada entre las hélices α 1 y α 2, por lo que la hélice α 1 no estuvo presente en el pre-poro oligomérico [38].

Respecto a la secuencialidad del modelo, se demostró que la APN y las toxinas Cry co-localizan en los microdominios de membrana de *M. sexta* y *H. virescens* [14]. Esto sugeriría que la APN podría dirigir a las toxinas Cry1A a estos microdominios de

membrana. Para validar esta hipótesis se realizó la inmunolocalización de los receptores caderina y APN en las membranas solubles o insolubles de las VVMA de *M. sexta*, previamente incubadas con o sin la protoxina Cry1Ab. Como resultado se encontró que cuando las VVMA eran incubadas con la protoxina, la distribución del receptor Bt-R1 cambiaba, ya que la mayoría se asociaba con la fracción insoluble y no a la parte soluble como ocurría en ausencia de protoxina. Respecto a la APN, se encontró que en ausencia ó presencia de la protoxina se asociaba a la fracción insoluble. Como control se rasuraron las membranas con fosfolipasa C, que corta específicamente a las proteínas ancladas por GPI como la APN. Esto ocasionó una reducción en la cantidad de APN presente en esta región causando, a su vez, una drástica disminución en la cantidad de toxina unida a los microdominios de membrana. Por lo anterior se confirmó que la aminopeptidasa N juega un papel importante en la inserción de la toxina [13].

Por otra parte, la presencia de APN, Bt-R1 y el oligómero de Cry1Ab en los microdominios sugería la interacción de estos durante la activación de la toxina. Para analizar como ocurría esta interacción en un lapso de tiempo, las muestras de monómero y oligómero puros de Cry1Ab se inmunoprecipitaron con las proteínas de las VVMA solubilizadas y se analizaron mediante Western-blot, detectando con tres anticuerpos diferentes: anti-Cry1Ab, anti-Bt-R1 y anti-APN. El resultado fue que la toxina monomérica coprecipitó con el receptor Bt-R1. En cambio, la APN solo coinmunoprecipitó con el oligómero. Esto indicaba que el primer contacto del monómero ocurre con el receptor Bt-R1, mientras que el oligómero se asocia directamente con la APN. Para entender como era la interacción del monómero y oligómero con la APN, se determinaron las constantes de disociación aparentes mediante ELISA, encontrando que la K_D para el monómero fue igual a 165nM, mientras que para el oligómero fue de 0.75nM, lo que confirmó que el oligómero es más afin a la APN [13].

En resumen, este modelo propone que después de la ingestión del cristal, la protoxina es solubilizada y procesada por proteasas del intestino medio. Durante este procesamiento, la mitad del carboxilo terminal (aproximadamente 600 aminoácidos) y 29 residuos del amino terminal son cortados. La toxina activada se une a receptores ubicados en las células del epitelio intestinal. Con base en los datos de afinidad de la toxina monomérica y oligomérica a los receptores Bt-R1 y aminopeptidasa N, se

propone que la primera interacción de la toxina ocurre con el receptor Bt-R1. Esta unión promueve un cambio conformacional en la toxina facilitando el corte proteolítico de la hélice α -1, por una proteasa unida a membrana. Este corte conlleva a la formación de un pre-poro que se inserta en la membrana. La toxina oligomérica se une a APN, la cual dirige al complejo del pre-poro a los microdominios de membrana donde se inserta y forma un poro (Figura 2) [13].

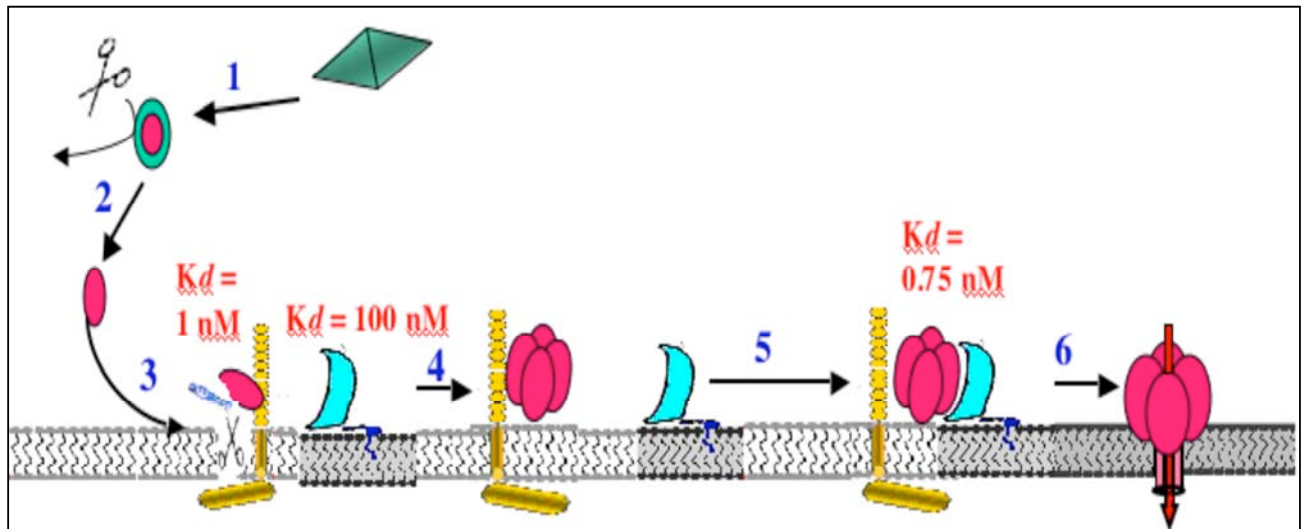


Figura 2. Modelo del mecanismo secuencial de acción de toxinas Cry1A propuesto por Bravo, et al.,2004. 1)Solubilización del cristal, 2) activación proteolítica, 3) unión de la toxina al receptor Bt-R1 y corte de la hélice α 1, 4) oligomerización, 5) unión del oligómero a APN y 6) formación del poro lítico en los microdominios de membrana.

Es importante mencionar que recientemente se publicó que mutantes de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, en las que se eliminó la hélice α 1 por ingeniería genética, son capaces de formar oligómeros al ser activados con tripsina en ausencia del receptor caderina y también son capaces de matar insectos resistentes a ambas toxinas por deficiencias en la síntesis de caderina. Es decir, insectos que no tienen caderina y que son resistentes a toxinas Cry, se vuelven susceptibles a las mismas toxinas si estas carecen de la hélice α 1. Estos datos comprueban que el modelo de acción secuencial es correcto, ya que la toxina puede omitir el paso de unión a caderina y continuar su toxicidad uniéndose al segundo receptor para finalmente formar el poro lítico [98].

2.2.5.2 Modelo de señalización celular

Este modelo propone que el monómero de Cry1Ab se une al receptor Bt-R1 iniciando una cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} que promueve la muerte celular (Figura 3). Esta hipótesis se sustenta en experimentos realizados con células H5 originarias de una línea celular de ovario de *Trichoplusia ni*, que fueron transfectadas con el receptor Bt-R1. Primero, se analizaron los cambios morfológicos de estas células después de tratarlas con la toxina Cry1Ab, encontrando que después de veinte minutos de exposición a la toxina, las células formaron crecimientos alrededor de la membrana y presentaron desarreglos en la membrana; después de 40 minutos, las células se hincharon y sufrieron lisis, como resultado de un aumento en la permeabilidad de la membrana. Para contestar a la pregunta de qué era lo que causaba los desordenes en la membrana y el hinchamiento de las células, se examinó el efecto de protectores de osmosis tales como glucosa, sacarosa y rafinosa, los cuales evitarían el hinchamiento celular solo si su tamaño molecular fuera mayor al del canal iónico. El resultado fue que la rafinosa evitó la formación de desordenes membranales y las células no se hincharon después de ser tratadas con la toxina. La sacarosa lo hizo parcialmente y la glucosa no interfirió. Sin embargo, aunque las células tratadas con rafinosa no sufrieron cambios en su morfología, de todas formas murieron, lo que sugirió que la citotoxicidad se relacionaba con eventos diferentes a la formación de poro [120].

Por otra parte, en otro trabajo se había observado que la citotoxicidad era dependiente de magnesio (Mg^{2+}), por lo que se determinó el efecto de este sobre cambios citológicos en las células expuestas a la toxina Cry1Ab, utilizando diferentes queladores de catión divalente (EDTA y EGTA). Como resultado, solo el EDTA evitó las respuestas celulares de hinchamiento y crecimientos en la membrana, inhibiendo la muerte celular completamente. Por lo que se sugirió que un mecanismo intracelular dependiente de Mg^{2+} estaría activándose para inducir la muerte celular [120].

Dado que el Mg^{2+} parecía requerirse para causar la muerte celular, se propuso que una cascada dependiente de AMPc es inducida por la acción de la toxina, involucrando la activación de una proteína G, la adenilato ciclasa (AC) y la fosfocinasa A (PKA). Para demostrar esto, se midió la producción de AMPc en células tratadas con la toxina, encontrando que la producción de AMPc aumentaba a medida que se incrementaba el tiempo de exposición a la toxina. El tratamiento con EDTA evitó la

muerte celular, lo cual correlacionó con la disminución en la producción de AMPc. A continuación se evaluó el papel de la adenilato ciclasa, la cual es activada por la proteína G, por lo que se evaluó el efecto del inhibidor NF449, antagonista de la proteína G. Este inhibidor causó la disminución del 50% de la toxicidad, sin embargo otro inhibidor de esta proteína (NF023) no presentó ningún efecto sobre la toxicidad. No obstante, con base en este resultado se concluyó que la activación de la proteína G y la estimulación de la adenilato ciclasa son necesarios para inducir la toxicidad y la muerte celular. Por último se evaluaron dos inhibidores de PKA: H89 y PKAI 14-22-amida. Ambos inhibieron la muerte celular indicando que la inhibición de PKA evita la acción de la toxina. No obstante, cuando se evaluó un análogo de AMPc (pCPT-cAMP), este no indujo la muerte celular [120]. Después de probar un activador de la adenilato ciclasa membranal (FSK), se obtuvo un incremento de los niveles de AMPc, pero esto no ocasionó la muerte celular.

Todos estos datos nos indican que pudiera haber una respuesta intracelular, pero el hecho de que no todos los controles fueron exitosos muestra cierta incertidumbre respecto al mecanismo de acción que se desencadena intracelularmente después del contacto de las células con las toxinas. Faltaría además, evaluar estos efectos en un modelo *in vivo* que involucre larvas de insecto.

Finalmente, cabe resaltar que el hecho de que toxinas modificadas carentes de hélice $\alpha 1$ son capaces de matar a insectos que no tienen caderina y que eran resistentes, indica que las toxinas Cry pueden matar por otros mecanismos en donde la caderina no participa.

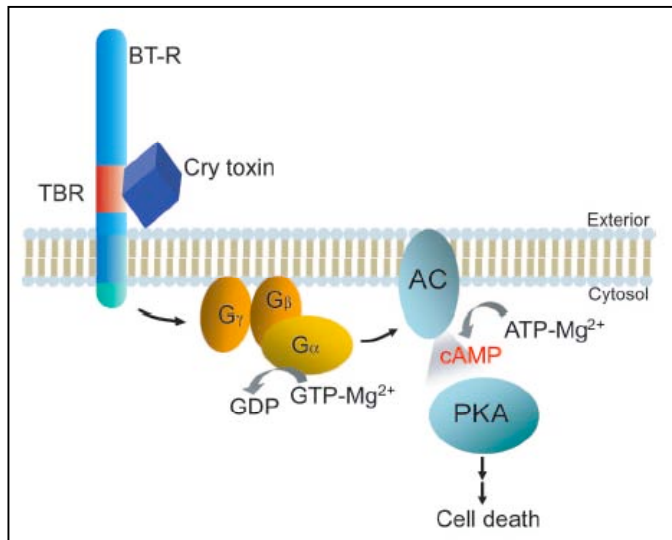


Figura 3. Modelo de señalización celular propuesto por Zhang, et al., 2006. Se observa que la unión de la toxina Cry monomérica desencadena una cascada de señalización celular dependiente de magnesio.

2.2.5.3 Modelo Jurat-Fuentes

Este modelo se propuso para explicar el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ac en *Heliothis virescens*. Sugiere que la citotoxicidad se debe al efecto combinado de la lisis osmótica y la señalización celular, incorporando elementos de los dos modelos descritos anteriormente. Este modelo se basa en diferentes estudios en líneas resistentes de *H. virescens*. En un trabajo realizado por Gahan *et al.*, con la cepa YHD2, se demostró que su resistencia a la toxina Cry1Aa es ocasionada porque el gene HevCaLP, que codifica para la proteína caderina, no se expresa [29]. La ausencia de expresión del mismo gene también se observó en la línea resistente YHD-B, la cual es resistente más de 73,000 veces a la toxina Cry1Ac y además presenta resistencia cruzada con Cry1A y Cry1Fa, lo cual sugiere que hay otros mecanismos que inducen la resistencia [53]. También se encontró que las VVMA de las líneas resistentes YHD2 y KCBhyb presentan una reducción en la unión de Cry1Aa pero no a Cry1Ab y Cry1Ac [51]. Aunado a esto, cuando el receptor HevCaLP se expresó en células S2, Cry1Fa no se unió y si fue tóxica, sugiriendo que la unión a este receptor no es suficiente para conferir toxicidad. Finalmente, Cry1Ac que fue la más tóxica, mató solo al 20% de las células a concentraciones elevadas, confirmando la participación de otros receptores en la toxicidad [52].

En cuanto a la participación de otros receptores, MacNall y Adang identificaron dos proteínas que unen a Cry1Ac: una fosfatasa alcalina (HvALP) anclada por GPI y una actina [64]. En el caso de la fosfatasa alcalina, se encontró que su actividad en las VVMA de las líneas resistentes YHD2-B, CXC y KCBhyb, estaba disminuida en por lo menos 50% [53]. En cuanto a la actina, Lilien y Balsamo hipotetizaron que esta podría interactuar con el dominio citosólico de la caderina para activar cascadas intracelulares en respuesta a señales extracelulares [64]. Aunado a esto, Jurat-Fuentes identificó en los proteomas de líneas celulares de *H. virescens* un grupo de proteínas que corresponden a fosfatasas intracelulares [51]. Con base en esta información, el autor del modelo, propone que la unión a caderina (HevCaLP) y a proteínas ancladas por GPI (APN y HvALP) conllevan a la activación de una cascada de señalización celular a través de la unión de la toxina a caderina o por la agregación de proteínas ancladas por GPI en los microdominios de membrana, lo cual provoca apoptosis. Siendo posible que tanto el choque osmótico causado por la formación de poro, como la apoptosis ocurran y sean los causantes de la toxicidad (Figura 4) [51].

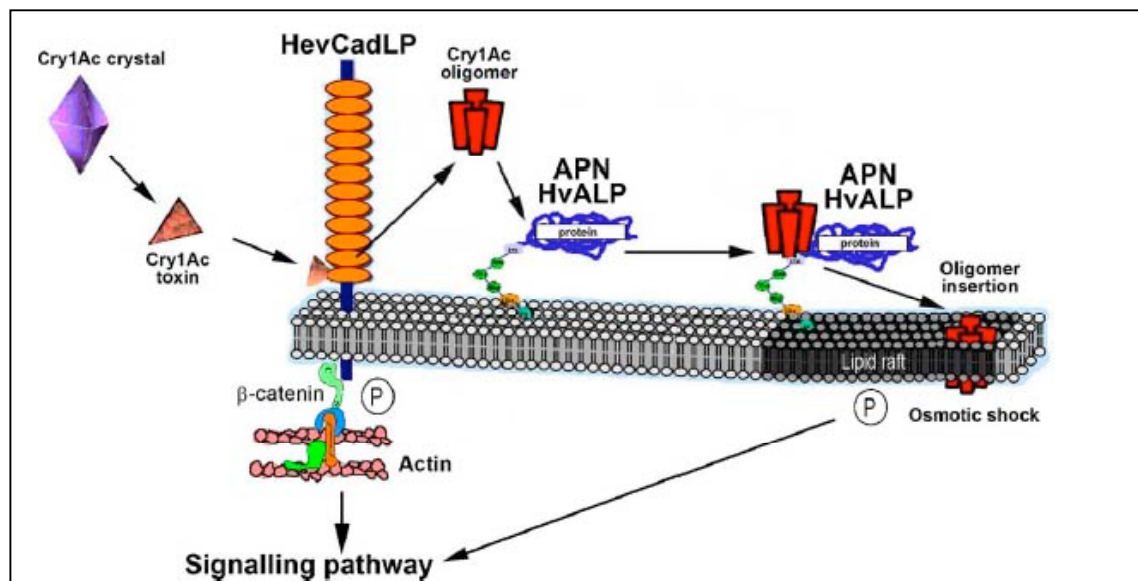


Figura 4. Modelo del mecanismo de acción de toxinas Cry propuesto por Jurat-Fuentes et al., 2006. Se combinan los modelos de formación de poro y señalización celular.

1.RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram-positiva que produce toxinas insecticidas (Cry) durante la fase de esporulación. Estas son tóxicas para diferentes especies de insectos y nemátodos. La acción primaria de las toxinas Cry es lisar las células del epitelio intestinal del insecto susceptible. No obstante, su modo de acción no se ha comprendido del todo.

En nuestro grupo, proponemos la hipótesis de que las toxinas Cry son toxinas formadoras de poro. Sugerimos que las toxinas Cry interaccionan secuencialmente con los receptores caderina y aminopeptidasa N (APN), y que la formación del pre-poro oligomérico es importante para la formación del poro y para la toxicidad. En este modelo del mecanismo de acción, se propone que las inclusiones cristalinas al ser ingeridas por el insecto susceptible, son disueltas en el ambiente alcalino del intestino de la larva, liberando una protoxina soluble de 130 kDa. Después, la protoxina inactiva es cortada por proteasas liberando una toxina monomérica de 60 kDa, la cual en seguida se une a receptores específicos localizados en la membrana de las células del epitelio intestinal. La unión de la toxina monomérica al receptor caderina promueve el corte de la hélice α -1 y la formación de un pre-poro oligomérico de 250 kDa. El oligómero muestra un incremento en la afinidad por un segundo receptor, la APN. La interacción con la APN es importante para la inserción del oligómero en la membrana. También ha sido sugerido que la fosfatasa alcalina podría participar como segundo receptor de toxinas Cry en los insectos *Manduca sexta* y *Heliothis virescens*.

El objetivo de este trabajo es demostrar si el oligómero de Cry1Ab es un intermediario obligado de la toxicidad en contra del insecto blanco. Para lo cual se aislaron mutantes afectadas en la oligomerización. Estas mutantes se construyeron en las hélices α -3 y α -6 del dominio I, donde previamente se predijo, con el programa COILS, la presencia de estructuras tipo coiled-coils. Estos son motivos estructurales formados por la interacción entre dos a cinco hélices α , y se ha demostrado que estructuras tipo coiled-coils participan en la oligomerización de varias proteínas que forman oligómeros. Después de analizar las mutantes del coiled-coil encontramos que dos proteínas mutadas, en las posiciones *a* y *d* de la hélice α -3, perdieron la capacidad de oligomerizar. Estas mutantes se procesaron

correctamente y se unieron al receptor caderina con afinidad similar a la toxina silvestre ($K_D = 8 \text{ nM}$). No obstante, fueron severamente afectadas en su toxicidad ($LC_{50} > 2000 \text{ ng/cm}^2$) y en la actividad de formación de poro, la cual se analizó en bicapas lipídicas planas. Estos datos validan nuestra hipótesis de que el oligómero de Cry1Ab es un intermediario obligado en la toxicidad.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) gram-positive bacteria produce insecticidal toxins (Cry) during sporulation phase. These are toxic to different insect species and nematodes. Cry toxins primary action is to lyse midgut epithelial cells in their specific target cells. Nevertheless their mode of action is not completely understood.

In our group, we support the hypothesis that Cry toxins are pore forming toxins. We described a sequential interaction of Cry1A toxins with two receptors, cadherin and aminopeptidase N (APN), and the formation of an oligomeric pre-pore structure that is important for pore formation and toxicity. In this model of mode of action, the crystal inclusions are ingested by the susceptible larvae and dissolved in the alkaline environment of the larval midgut, releasing soluble protoxins of 130 kDa. The inactive protoxins are then cleaved by midgut proteases yielding ~60 kDa monomeric toxins, which then bind to specific membrane receptors. The monomeric Cry toxins bind to the cadherin receptor, which promotes a proteolytic processing of helix α -1 of the toxin and the formation of a 250 kDa pre-pore oligomeric structure. The oligomer shows increased affinity to the secondary receptor, APN. The interaction with APN is important for membrane insertion and in another report it has been suggested that Alkaline Phosphatase could also participate as a secondary receptor in *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*.

The aim of this work was to demonstrate if Cry1Ab oligomer is an obligate intermediate in toxicity against the target insect. We isolated mutants affected in oligomer formation. Cry1Ab mutants were constructed in helices α -3 and α -6 of domain I where coiled-coil structures could be present as predicted by COILS program. The coiled-coils are protein-folding motives formed in the interaction between two to five helices and are involved in oligomerization of several proteins that form oligomers. After the analysis of the isolated coiled-coil mutants, we found two mutated proteins, in positions *a* and *d* of helix α -3 that lost their ability to form oligomers. These two mutants were correctly activated and bound to cadherin receptor with similar affinity as wild type toxin ($K_D=8\text{nM}$). However, they were severely affected in their toxicity ($LC_{50}>2000\text{ ng/cm}^2$) and in their pore

forming activity analyzed in black lipid bilayers. These data support our hypothesis that Cry1Ab oligomer is an obligate intermediate in toxicity.

3. ANTECEDENTES

3.1. Oligomerización de toxinas Cry1A.

Al igual que para otras toxinas formadoras de poro, nuestro grupo propone que en las toxinas Cry, es necesaria la formación de un pre-poro oligomérico, el cual es la unidad competente para insertarse en la membrana. En un intento por entender cómo ocurre la transición del estado soluble al insertado en membrana, se evaluaron los cambios estructurales ocurridos durante ésta transición. Para lo cual, se analizó la fluorescencia intrínseca de los triptófanos presentes en la toxina Cry1Ab (nueve en total, siete en el dominio I y dos en el dominio II) tanto en preparaciones puras de monómero así como de oligómero soluble e insertado en la membrana.

Primero se observó la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de la toxina monomérica en estado nativo y en el oligómero de la toxina. Este experimento indicó que algunos Trp permanecen en el interior de la toxina y que en el oligómero algunos otros cambian su ambiente hacia un estado más hidrofóbico. Para obtener información del grado de exposición de los Trp se utilizaron apagadores de la fluorescencia como I⁻ y acrilamida, con los que se demostró que hay diferencias en la distribución de los triptófanos en ambas formas de la toxina, ya que mientras en el monómero el 49.5% de los Trp están expuestos al solvente, en el oligómero en solución solo el 22.9% lo están, implicando una reducción del 27% en la cantidad de Trp expuestos al solvente en el oligómero [90].

También se analizó la interacción de ambas estructuras con la membrana, utilizando preparaciones de monómero y oligómero puros, los cuales se incubaron con liposomas de fosfatidilcolina (Small Unilamellar Vesicles ó Large Unilamellar Vesicles). Se probaron diferentes relaciones lipido:proteína. Después de incubar por un cierto tiempo, tanto el monómero como el oligómero puro con las membranas, se ultracentrifugó y se analizaron la fluorescencia del sobrenadante y del pellet. El resultado fue que más del 96% del oligómero se insertó en la membrana, como función de la relación lipido:proteína, mientras que solo el 10% del monómero se insertó. Se demostró además que cuando el

oligómero se inserta en la membrana, ninguno de los triptófanos está accesible al apagamiento por I, es decir, que ningún Trp está expuesto al solvente [90].

Finalmente, se analizó la fluorescencia del oligómero insertado en membrana utilizando lípidos brominados en diferentes posiciones de la cadena acil. Estos funcionan como apagadores de la fluorescencia, por lo que se puede obtener información de la localización relativa de los Trp comparados con la superficie de la membrana. El resultado fue que la mayoría de los triptófanos se localizaron cerca de los apagadores, es decir se ubicaron cerca de la interfase agua-membrana [90]. Para otras proteínas membranales como la bacteriorodopsina, las porinas bacterianas, los intercambiadores aniónicos, las proteínas bacterianas resistentes a multidrogas, los canales de potasio, y el centro de reacción fotosintético, ha sido propuesto que los triptófanos tienen como función anclar los segmentos transmembranales a la membrana, al mismo tiempo que confieren rigidez a los segmentos de la periferia transmembranal [118]. Por lo anterior, se sugirió que los triptófanos presentes en el oligómero de la toxina Cry1Ab podrían ser importantes para su anclaje en la membrana.

3.2. Proteólisis limitada de la toxina Cry1Ab

En otras toxinas formadoras de poro como la colicina A, la exotoxina A, la toxina diftérica y la equinotoxina, se ha demostrado que el pre-poro oligomérico sufre una transición al estado “molten globe” antes de insertarse en la membrana, el cual puede ser inducido por un cambio hacia pH ácido [19, 73, 86, 119]. Con el objetivo de analizar los cambios estructurales en la toxina Cry1Ab que anteceden la inserción del pre-poro en la membrana, se estudiaron los eventos de desplegamiento inducidos por agentes cautrópicos a diferentes valores de pH. Para lo cual, se monitorearon los cambios en la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de Cry1Ab en su forma monomérica, oligomérica y del poro insertado en membrana. Los resultados de estos experimentos mostraron, primero que el pre-poro y el poro tienen una conformación más flexible que la del monómero y que el pH alcalino incrementó la flexibilidad de estas estructuras, principalmente en los dominios II y III. En segundo lugar, después de la inserción del pre-poro en la membrana, es necesario que se

tenga un pH alcalino o neutro para que el dominio I cambie a una estructura más flexible, necesaria para la formación del poro activo insertado en membrana [91].

La desnaturalización de Cry1Ab en presencia de agentes cautrópicos como urea, mostró que, tanto el monómero como el pre-poro oligomérico presentan un proceso de desnaturalización de dos pasos. No obstante, las tres estructuras analizadas tuvieron diferentes patrones de desplegamiento, lo cual también es indicativo de diferentes patrones de plegamiento. Aunado a esto, la naturaleza bifásica de desnaturalización indicó que el proceso de desplegamiento ocurrió secuencialmente en dos regiones de la toxina [90].

Para analizar esta secuencialidad, primero se efectuó la proteólisis de la toxina Cry1Ab monomérica, bajo condiciones de desnaturalización parcial. Después de digerir con proteinasa K a pH 7 con 5M de urea, condición en la que ocurre la primera transición de desplegamiento, se analizaron los productos de proteólisis. El resultado mostró que los fragmentos resultantes correspondieron al dominio I, mismos que se detectaron con un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab y con un anticuerpo monoclonal (mAb-4D), que reconoce un epítipo correspondiente a las hélices α -5 y α -6. En cambio, ninguno de los fragmentos se detectó al usar un anticuerpo anti-dominios II-III (scFv45). Lo anterior sugiere que, en el primer paso de desplegamiento, se desplegaron los dominios II y III y fueron completamente digeridos por la proteasa, por lo que estos dominios constituyen la región con mayor flexibilidad en la toxina [90].

Un experimento semejante se realizó con el oligómero analizando la proteólisis con proteinasa K. El oligómero se desnaturalizó parcialmente con 2M de urea a pH 7 y se cortó con proteinasa K. Como resultado, el oligómero fue más resistente a la proteólisis que el monómero, formándose dos fragmentos minoritarios, uno de 100 kDa y uno de 25 kDa. La banda de 25 kDa se detectó con anticuerpos anti-dominio I y no así por anti-dominios II-III, lo cual sugirió que los dominios II-III se desnaturalizaron parcialmente y se digirieron, mientras el dominio I permaneció protegido. Se propuso que el fragmento de 100 kDa representa un oligómero truncado que corresponde a cuatro dominios I, de 25 kDa cada uno. Esto permite concluir que los dominios II y III pueden ser cortados, sin que las

interacciones monómero-monómero sean afectadas en el prepore, implicando que el dominio I está involucrado en las interacciones monómero-monómero [91].

Por otra parte, también se evaluó el efecto de la temperatura en la desnaturalización del monómero y del oligómero de Cry1Ab, midiendo la unión del colorante hidrofóbico ANS, el cual se une a regiones hidrofóbicas expuestas en la proteína desplegada. Los resultados mostraron de nuevo que la estructura de oligómero y de poro son más flexibles que el monómero, ya que hubo un aumento en la unión del ANS al monómero cuando se desnaturalizó a 60°C, mientras que el máximo de ANS unido al oligómero se obtuvo a menor temperatura (50°C). El poro insertado en la membrana fue más susceptible a la desnaturalización por calor, ya que la unión máxima de ANS se obtuvo a 40°C. Finalmente, se realizaron estudios de transferencia de energía (FRET) en los que se midió la proximidad de los triptófanos al ANS unido a la proteína desnaturalizada. Es importante recordar que siete triptófanos se localizan en el dominio I y solo dos en el dominio II. En este experimento, únicamente se lograría la transferencia de energía si los triptófanos se ubicaban cerca del ANS. En el caso del monómero, los resultados de FRET fueron similares a los encontrados al excitar directamente el ANS, es decir, hubo transferencia de energía, indicando que los triptófanos se ubican cerca del ANS. En el oligómero soluble, la transferencia de energía disminuyó significativamente, sugiriendo que el dominio I está más estructurado que el resto de la proteína y que es menos susceptible a la desnaturalización por calor. En cuanto al poro insertado en membrana, este mostró una reducción drástica en la transferencia de energía, lo que es indicativo de que no hubo desnaturalización del dominio I provocada por el calor y que solo los dominios II y III fueron sensibles al calor [90].

3.3 Mutagénesis en el dominio I de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac

La participación de las hélices del dominio I en la formación de poro se ha estudiado en diferentes toxinas Cry1A, aislando mutantes en estas regiones y analizando su efecto en la toxicidad. El efecto en la toxicidad, se ha correlacionado directamente con la pérdida de formación de poro. No obstante, en pocos trabajos se ha evaluado si la pérdida de

formación de poro está ocasionada por la ausencia de oligomerización, paso que antecede a la formación de poro.

Por ejemplo, en un trabajo realizado con la toxina Cry1Aa se mutaron los aminoácidos cargados de la hélice α -3, que no están involucrados en formar puentes salinos intramoleculares. La mayoría de los residuos fueron reemplazados por cisteína, glutamina o lisina, que se suponía no tendrían efecto sobre las propiedades del poro. Sin embargo, la mitad de esas mutantes, que fueron menos tóxicas que la silvestre, presentaron una disminución en la velocidad de formación de poro al ser evaluadas mediante light-scattering a pH 10.5. Respecto a las propiedades del poro, en todas las mutantes se observó la disminución en la permeabilidad a azúcares como rafinosa y sacarosa, con excepción de la mutante D120Q que tuvo una permeabilidad mayor a la de Cry1Aa silvestre, sugiriendo que podría estar formando poros de mayor tamaño. Interesantemente, las mutantes en la posición R99 (cambios por C, E y Y) perdieron completamente su toxicidad, lo cual correlacionó con la pérdida de la actividad de formación de poro, al ser evaluadas mediante ensayos de “luz pausada” [104]. No se analizó la oligomerización.

En un trabajo con la toxina Cry1Ac, se realizó mutagénesis de una región hidrofóbica del dominio I altamente conservada. Se encontró que únicamente cambios en el residuo R93, ubicado en la hélice α -3, disminuyeron la toxicidad, diez veces en la mutante R93H y de 100 a 1000 veces en las mutantes R93G, R93A ó R93S. Estas mutantes se unieron a los receptores presentes en las VVMA [116]. La oligomerización y la formación de poro no se analizaron.

En otro trabajo con la toxina Cry1Ac se efectuó la mutagénesis al azar de dos segmentos del gene de *B. thuringiensis* que codifica para las hélices α -3, α -4 y el lazo que une a las hélices α -4 y α -5. Las mutaciones en el lazo que conecta las hélices α -4 y α -5 ó en la hélice α -3, tuvieron poco efecto en la toxicidad. Mientras que las mutantes de la hélice α -4 (Q133R, I132S, I132L, I132V e I132N) perdieron su toxicidad. Estas mutantes formaron oligómeros de 200 kDa cuando fueron activadas con VVMA, pero no formaron canales funcionales, al ser analizadas mediante experimentos de “luz pausada”. Cabe

mencionar que en la toxina silvestre, adicional a ésta banda de 200 kDa, se observó un oligómero de mayor peso molecular (aproximadamente 250 kDa), que estuvo ausente en las mutantes [57]. No obstante, en este artículo no se correlacionó la ausencia de los agregados mayores a 200 kDa con la pérdida de formación de poro.

En otro trabajo más reciente, realizado por los mismos autores, se reportó que mutantes de la toxina Cry1Ac, en el caso que una de las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (A92D y R93F) y en la hélice $\alpha 5$ (A164D, A164P, L167F) estuvieron afectadas en su toxicidad. Según los autores, ésta pérdida de la toxicidad correlacionó con la ausencia de unión a la membrana y con la pérdida de formación de un oligómero de 200 kDa. En cambio, la toxina Cry1Ac silvestre, al ser activada con VVMA si fue capaz de unirse a la membrana y de oligomerizar. En el caso de la mutante A92D, que perdió completamente su toxicidad, ésta si se unió reversiblemente a la membrana pero no se insertó. Una excepción a la correlación de toxicidad y formación del oligómero fue la mutante H168R, la cual fue tóxica pero no formó oligómeros de 200 kDa, no obstante si se detectó una banda de 250 kDa, que también estuvo presente en la toxina silvestre activada con VVMA [6]. Es importante destacar que la banda de 250 podría corresponder al oligómero que nosotros observamos después de activar toxinas Cry1A *in vitro*, el cual se ha probado que se inserta en la membrana y que forma el poro lítico en bicapas lipídicas planas [38, 90]. No obstante, en este trabajo no fue demostrado que la banda de 200 kDa es funcional y la banda de 250 kDa no fue analizada.

Por otra parte, en la toxina Cry1Aa se realizó la mutagénesis de los aminoácidos cargados de la hélice $\alpha 4$. Cinco de estas mutantes perdieron completamente su toxicidad: E129K, R131Q, R131D, D136N y D136C. Estas mutantes si se unieron a las VVMA tal como la toxina silvestre, pero la actividad de formación de poro disminuyó. Se demostró que éste efecto se produjo por la reducción en la conducción de iones a través del canal iónico. También se demostró que los residuos E129 y D136 se orientan hacia el interior del canal y que están directamente involucrados en el flujo de iones [67]. En este trabajo la pérdida de toxicidad fue correlacionada con la formación de poro, sin embargo la oligomerización de estas mutantes no fue analizada.

Finalmente en un trabajo realizado con las toxinas Cry1Ac y Cry1Ab5 se reportó que la mutante N135Q de la hélice α -4, perdió la toxicidad contra larvas de *M. sexta* debido a la ausencia de oligomerización y formación de poro. Para concluir esto, primero, se analizó la unión de ambas mutantes a membranas, encontrando que la mutante de la toxina Cry1Ab5 se unió con menor afinidad a las VVMA, al compararla con la silvestre; mientras que la mutante de Cry1Ac mostró una afinidad mayor a la silvestre. No obstante, después de analizar la oligomerización, activando en presencia de VVMA de *M. sexta*, se encontró que, mientras en la toxina silvestre se observaron bandas de 65, 135 y 200 kDa correspondientes al monómero, el dímero y el oligómero, en las mutantes de ambas toxinas, solo se observó la banda de 65 kDa correspondiente al monómero. Finalmente cuando se analizó la actividad de formación de poro, las mutantes de ambas toxinas fueron inactivas [101].

Todos estos estudios nos indican que el dominio I tiene un papel muy importante en la inserción en la membrana y en la formación de poro, sin embargo falta un análisis sistemático de los residuos involucrados directamente en la oligomerización para definir cuáles hélices participan en la oligomerización y cuáles en la formación de poro.

3.4. Estructuras tipo Coiled-coil y oligomerización.

Los coiled-coils son motivos estructurales que median la oligomerización de una gran variedad de proteínas. Son estructuras formadas por dos a cinco hélices anfipáticas que se superponen una sobre otra formando un superenrollamiento. La secuencia primaria consta de siete residuos que se repiten periódicamente llamada heptada de residuos. Dentro de la heptada, las posiciones *a* y *d* son ocupadas por residuos apolares o hidrofóbicos. Los aminoácidos ubicados en estas posiciones son importantes dado que cuando dos hélices se superponen, son internalizados, estabilizando la estructura, mientras que las posiciones *g* y *e*, generalmente están ocupadas por aminoácidos cargados, que permanecen expuestos en la superficie del coiled-coil. También las interacciones iónicas son importantes porque contribuyen a la estabilidad del coiled-coil, modulando su ensamblaje dependiendo del pH (figura 5) [16].

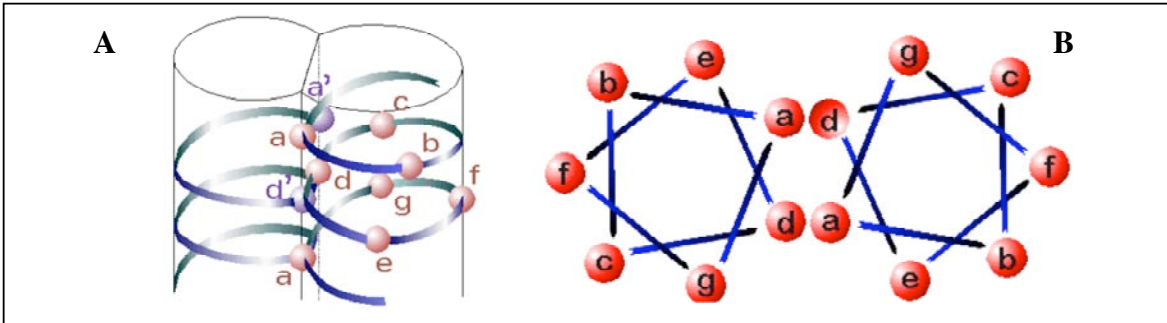


Figura 5. Representación esquemática del coiled-coil formado por dos hélices α . A) Esquema de dos hélices α interaccionando a través de los aminoácidos ubicados en las posiciones a y d del coiled-coil. B) Esquema que muestra la distribución de aminoácidos de la heptada de residuos del coiled-coil.

La primera proteína en donde se identificaron estructuras tipo coiled-coils fue la α -queratina, la cual es componente del citoesqueleto de células eucariontes. Su arquitectura consiste en un dímero, formado por coiled-coils, flanqueado a ambos lados por dominios no-helicoidales. Otra proteína del citoesqueleto que forma coiled-coils es la vimentina humana, cuya dimerización es necesaria para el ensamblaje del citoesqueleto, proceso en el que participan los coiled-coils. Se pueden mencionar otras proteínas que también tienen una función estructural en el citoesqueleto como la laminina o la glicoproteína de capa superficial de la arqueobacteria *Staphylothermus marinus* que utilizan coiled-coils para oligomerizar [44].

Los coiled-coils también se identificaron como componentes de proteínas motoras del citoesqueleto como las miosinas, las quinesinas y las dineínas, las cuales son responsables de los movimientos que ocurren en la célula, necesarios para reproducción y supervivencia [16]. El coiled-coil de la cola de la miosina es el bloque de construcción para los filamentos delgados del músculo, al mismo tiempo, los dominios motores de la cabeza de la miosina que interaccionan con el filamento delgado tienen arreglos helicoidales formados por dominios tipo coiled-coil [20]. La quinesina, es una proteína dimerica, que puede moverse varios micrómetros a lo largo de los microtúbulos sin disociarse. Se ha demostrado que la región del cuello de esta proteína, asume una conformación coiled-coil,

la cual participa en la dimerización, necesaria para el proceso de movimiento [56]. Por su parte, la dineína está formada por un dominio de ATPasa, un dominio coiled-coil antiparalelo ramificado y un dominio de unión a microtúbulos. Se ha postulado que el dominio coiled-coil actúa como un brazo rígido que amplifica los cambios conformacionales dentro de la dineína necesarios para la hidrólisis del ATP [50].

Las proteínas SNARE, que participan en el reconocimiento molecular, se agrupan en un complejo heterotetramérico ensamblado mediante coiled-coils. Este complejo contiene una hélice de la proteína sinaptobrevina la cual está anclada a membrana, una hélice de la syntaxina, anclada a la membrana blanco, y dos hélices de la proteína SNAP-25 también anclada a la membrana blanco. Se demostró que en este complejo, las proteínas interaccionan a través del coiled-coil de cada proteína de la membrana blanco, mediante un residuo de glutamina ubicado en posición *d*, mientras que la sinaptobrevina se une mediante una arginina también en posición *d* de su coiled-coil. Esta conformación es indispensable para que se lleva a cabo el crecimiento celular [100].

Diversos factores de transcripción tienen coiled-coils que son responsables del reconocimiento molecular. Las proteínas que forman la familia b/ZIP son factores transcripcionales que tienen un dominio de activación, un dominio de dimerización constituido por un coiled-coil y un dominio de unión a DNA. La homo o heterodimerización de las proteínas b/ZIP modulan la actividad transcripcional de los blancos [61].

3.4.1 Participación de los coiled-coils en la oligomerización de toxinas Cry

A la fecha no se había descrito la existencia de coiled-coils en las toxinas Cry. No obstante, basándonos en que el dominio I podría estar participando en la oligomerización de las toxinas Cry1A, y con base en su estructura (formado por siete hélices alfa), hipotetizamos que el dominio I podría formar coiled-coils, necesarios para la formación del pre-poro oligomérico. Para validar esta hipótesis, se analizaron las secuencias de las hélices alfa del dominio I de diversas toxinas Cry utilizando el programa COILS. Este programa permite

analizar una secuencia de interés, la cual es comparada contra una base de datos de secuencias de coiled-coils conocidos y deriva un valor de similitud, mismo que es comparado con los valores de las proteínas globulares con coiled-coils, para finalmente calcular la probabilidad de formación de coiled-coils de esa secuencia. El valor máximo de probabilidad de formación de coiled-coil que asigna el programa es igual a 1. Tras analizar el dominio I de las toxinas Cry con este programa encontramos que la hélice α -3 presentó una alta probabilidad de formación de coiled-coils: 0.4 para Cry1Ab, 0.97 para Cry2Aa, 0.99 para Cry3A y 0.9 para Cry3Ba. De manera sorprendente, aunque la hélice α -3 no está conservada dentro de las toxinas Cry, las posiciones *a* y *d* del coiled-coil de esta hélice si estuvieron altamente conservadas en todos los miembros de la familia de toxinas Cry. Un alineamiento de los aminoácidos en posición *d* del coiled-coil predicho para la hélice α -3 de las toxinas Cry1, Cry3, Cry7, Cry8 y Cry9, mostró que los aminoácidos Trp117, Tyr110, Leu103 y Ala96, están altamente conservados; mientras que las toxinas Cry4, Cry2 y Cry10 tienen cambios conservados. En cuanto a la posición *a*, este análisis mostró que los aminoácidos Arg-93, Leu-100, Tyr-107 y Phe-114, están también conservados en todos los miembros de la familia de toxinas Cry. Lo anterior se observa en la figura 6, en la que se muestra una representación esquemática de los coiled-coils predichos para la hélice α -3 de las toxinas Cry1Aa, Cry3Aa y Cry4Ba.

Por otra parte, la hélice α -6 también presentó una alta probabilidad de formación de coiled-coil para las toxinas Cry1Ca, Cry1Fa, Cry4Ba, Cry5Ba, Cry7Aa, Cry8Aa, Cry13Aa, Cry14Aa, Cry20Aa, Cry21Aa, y Cry30Aa (0.99). Sin embargo, para la toxina Cry1Ab la probabilidad de formación de coiled-coil fue solo de 0.1.

Por lo anterior, en este trabajo se analizará si los coiled-coils potenciales de las hélices α -3 y α -6 participan en la oligomerización de la toxina Cry1Ab.

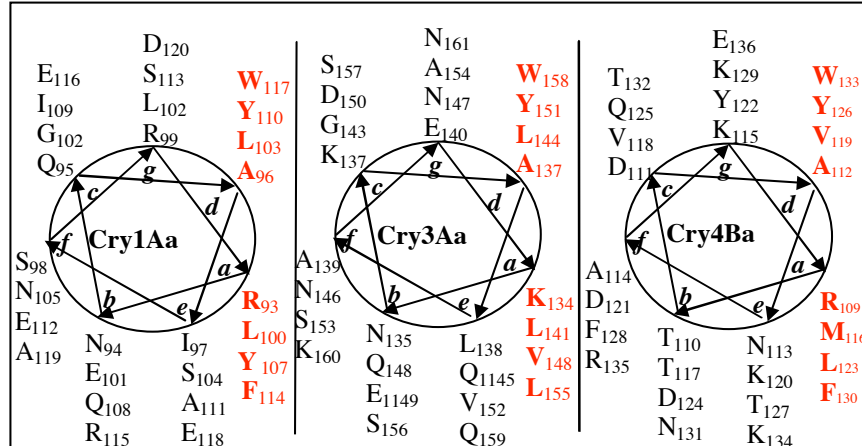


Figura 6. Representación esquemática de los coiled-coil predichos para la hélice α -3 de las toxinas Cry1Aa, Cry3Aa y Cry4Ba, en la que se observa que los aminoácidos ubicados en las posiciones *a* y *d* (rojo) están altamente conservados o tienen cambios conservativos.

4. HIPÓTESIS

Diversas toxinas formadoras de poro, como parte de su mecanismo de acción, sufren cambios conformacionales que permiten el paso del estado soluble al insertado en membrana. Durante esta transición, las toxinas oligomerizan pasando a un estado “molten globe” que facilita su inserción en la membrana y la formación del poro lítico. Se ha propuesto que las toxinas Cry son toxinas que para ejercer su efecto tóxico requieren la formación de poros líticos, no obstante su mecanismo de acción no se ha elucidado por completo. A la fecha han sido propuestos tres modelos para explicar el modo de acción de estas toxinas. En el modelo Bravo-Soberón o modelo secuencial de acción, se sustenta que las toxinas Cry forman un pre-poro oligomérico que es la unidad competente para insertarse en la membrana y formar el poro lítico, tal como sucede en otras toxinas formadoras de poro. En otro de los modelos se ha sugerido que la unión de la toxina monomérica con el receptor Bt-R1 desencadena una cascada de señalización que conlleva a la muerte celular, descartando completamente que la acción lítica del poro contribuya en la toxicidad. Finalmente, el tercer modelo propone que la toxicidad es causada por una combinación de la acción lítica del poro y la señalización celular.

Con la finalidad de validar el modelo secuencial de acción, proponemos como hipótesis de este trabajo que la oligomerización de las toxinas Cry1A es necesaria para la formación del poro lítico y para la toxicidad.

5.OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

1. Demostrar cuál es el papel del pre-poro oligomérico en el mecanismo de acción de toxinas Cry1A.
2. Analizar qué regiones en la toxina Cry1Ab monomérica están involucradas en el proceso de oligomerización.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar las condiciones de oligomerización de la toxina Cry1Ab *in vitro*.
2. Construir mutantes en los coiled-coils de las hélices α -3 y α -6 del dominio I de la toxina Cry1Ab.
3. Analizar la toxicidad de las mutantes en bioensayos con larvas de *M. sexta*.
4. Analizar las mutantes en cada paso de su mecanismo de acción: activación proteolítica, unión a receptor, oligomerización y formación de poro.
5. Evaluar la activación proteolítica de las mutantes mediante su tripsinación *in vitro*.
6. Analizar la unión de las toxinas mutantes a membranas de *M. sexta* (VVMA) mediante ensayos de unión en solución y competencias heterólogas.
7. Analizar la unión al receptor Bt-R1 mediante ensayos de unión a ligando y ELISA competitiva.
8. Analizar la formación de poro del preporo oligomérico insertado en membrana en bicapas lipídicas planas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas y medios de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron:

Bt-407 acristalífera. Cepa de *Bacillus thuringiensis* sin plásmidos que expresen protoxinas Cry, por lo que no produce cristal.

Bt-407 Cry1Ab, cepa de *B. thuringiensis* que contiene el plásmido que expresa la protoxina Cry1Ab (resistente a eritromicina).

X-L1 blue. Cepa de *Escherichia coli* utilizada para expresar los plásmidos PBSKSIIAb (resistente a ampicilina y eritromicina) que contiene un fragmento de la toxina Cry1Ab; y el plásmido PHT315Ab (resistente a eritromicina) que contiene todo el gene de la protoxina Cry1Ab.

TG1. Cepa de *E. coli* que contiene el vector pSyn que expresa el fragmento scFv73, el cual mimetiza al receptor caderina.

BL21. Cepa de *E. coli* que tiene el plásmido pET22b, el cual expresa un fragmento del receptor Bt-R1 con los sitios de unión a la toxina Cry1Ab (repetidos CR7 al CR12).

Los medios de cultivo se enlistan a continuación:

LB (Luria-Bertani)

Bacto-peptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar	15 g

Aforar a 1 litro con agua destilada y ajustar el pH a 7 con NaOH. En caso de requerirse sólido, agregar el agar al final. Esterilizar durante 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez esterilizado, agregar el antibiótico (ampicilina 100 µg/ml ó ertromicina 10 µg/ml).

SP

Caldo nutritivo	4 g	Stock 3: CaCl ₂ 2 H ₂ O (0.5 M)	400 µl
-----------------	-----	---	--------

MgSO ₄ 7H ₂ O	0.125 g	Bacto-agar	7.5 g
KCl	0.5 g	Eritromicina	100 µg/ml
Stock 1-MnCl ₂ 4H ₂ O (10 mM)	500 µl		
Stock 2-Fe (SO ₄)7H ₂ O (10 mM, disuelto en H ₂ SO ₄ 1N)	800 µl		

Mezclar el sulfato de magnesio, el cloruro de potasio y el stock 1. Después, aforar a 500 mililitros con agua destilada y ajustar el pH a 7. Si se requiere el medio sólido agregar el bacto-agar. Esterilizar por 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez frío el medio, agregar los stocks 2 y 3, y la eritromicina.

HCT

Bacto-triptona	2.5 g
Casaminoácidos	1.0 g
Bacto-agar	7.5 g

Aforar a 446 mililitros con agua destilada. Después, ajustar el pH a 7.25 con KOH. Si se requiere sólido, agregar el agar al final. Esterilizar 20 minutos a 15 lb/ps. Una vez frío el medio agregar las siguientes soluciones previamente esterilizadas:

Solución 1	KH ₂ PO ₄	6.8 g	Disolver en 100 ml de agua destilada. Agregar 25 ml
Solución 2	MgSO ₄ 7H ₂ O	1.23 g	
	MnSO ₄ H ₂ O	0.0169 g	Disolver en 100 ml de agua destilada.
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.14 g	Agregar 0.5 ml
Solución 3	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g	Disolver en 100 ml de agua destilada.
	H ₂ SO ₄ 1N	10 ml	Agregar 5 ml
Solución 4	CaCl ₂ 2H ₂ O	1.47 g	Disolver en 100 ml de agua destilada. Agregar 5 ml
Glucosa al 10%	Agregar 15 ml		Eritromicina 10 µg/ml final

2X-TY

Triptona	16g
Extracto de levadura	10g
NaCl	5g

Aforar a un litro con agua destilada. Esterilizar durante 20 minutos a 15 lb/sq.

BHI (Brain-Heart Infusion)

Bacto-BHI dihidratato	37g
-----------------------	-----

Aforar a un litro con agua destilada. Esterilizar durante 20 minutos a 15 lb/sq.

6.2 Construcción de mutantes del dominio I de Cry1Ab.

Se realizaron mutaciones puntuales en los aminoácidos ubicados en las posiciones *a* y *d* de los coiled-coils de las hélices α -3 y α -6, cambiándolos por residuos con grupos R polares. Para lo cual se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes a cada mutante (Tabla 1). Para la construcción de las mutantes, se utilizó un equipo comercial de mutagénesis dirigida (QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). Las mutantes, R93F, R99E, Y193D, L196D, I200D, y Y203D se construyeron en el plásmido PBSKSIIAb, que contiene un fragmento correspondiente al dominio I de Cry1Ab, utilizando los oligonucleótidos correspondientes a cada mutación. Una vez confirmada la secuencia, las mutantes se subclonaron en el plásmido PHT315Ab, que contiene la secuencia que codifica para la protoxina Cry1Ab completa. Para lo cual, los plásmidos mutantes PBSKSIIAb, se cortaron con la enzima Cla1, generando un fragmento con la mutación de aproximadamente 1.1 Kpb. Cada fragmento mutante se ligó al plásmido PHT315Ab previamente cortado con Cla1 (PHT315Ab Δ Cla). Finalmente, la orientación del inserto se verificó mediante enzimas de restricción. Tanto la construcción de las mutantes como su subclonación se realizó en *Escherichia coli*, posteriormente con los plásmidos purificados se transformaron células de *Bacillus thuringiensis* (Bt-407). Dado que la subclonación de los fragmentos Cla mutantes en el vector PHT315Ab de las mutantes L100E, L103E, Y107E y Y110E, no se pudo realizar, se cambió de estrategia. Por lo que éstas mutantes se construyeron mediante

mutagénesis sitio-dirigida directamente en el plásmido PHT315, utilizando el mismo equipo comercial de mutagénesis. Las mutantes fueron secuenciadas en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM. Después, fueron transformadas en *B. thuringiensis* (Bt-407). Por último, se verificó la producción de cristal al microscopio y la expresión de proteína en gel SDS-PAGE (Figura 7).

Tabla 1. Oligonucleótidos para la construcción de mutantes del dominio I de Cry1Ab

Aminoácido- Cambio	Secuencia del oligonucleótido mutagénico
R99-E	5'-CAAGCCATTTCTGAATTAGAAGGACTA-3'
L103-E	5'-TTCTAGATTAGAAGGAGAAAGCAATCTTTA-3'
Y110-E	5'-ATCTTTATCAAATTGAAGCAGAATCTTTTAGA-3'
R93-F	5'-GAAGAATTCGCTTTTAACCAAGCCA-3'
L100-E	5'-AGCCATTTCTAGAGAAGAAGGACTA-3'
Y107-E	5'-CTAAGCAATCTTGAGCAAATTTACGCA-3'
I200-D	5'-AACTAGGCTTGATGGCAACTATACA-3'
Y193-D	5'-ATCAATAGTCGTGATAATGATTTAACTAGG-3'
Y203-D	5'-TATTGGCAACGATACAGATCATGCT-3'
L196-D	5'-TTATAATGATGATACTAGGCTTATTGGC-3'

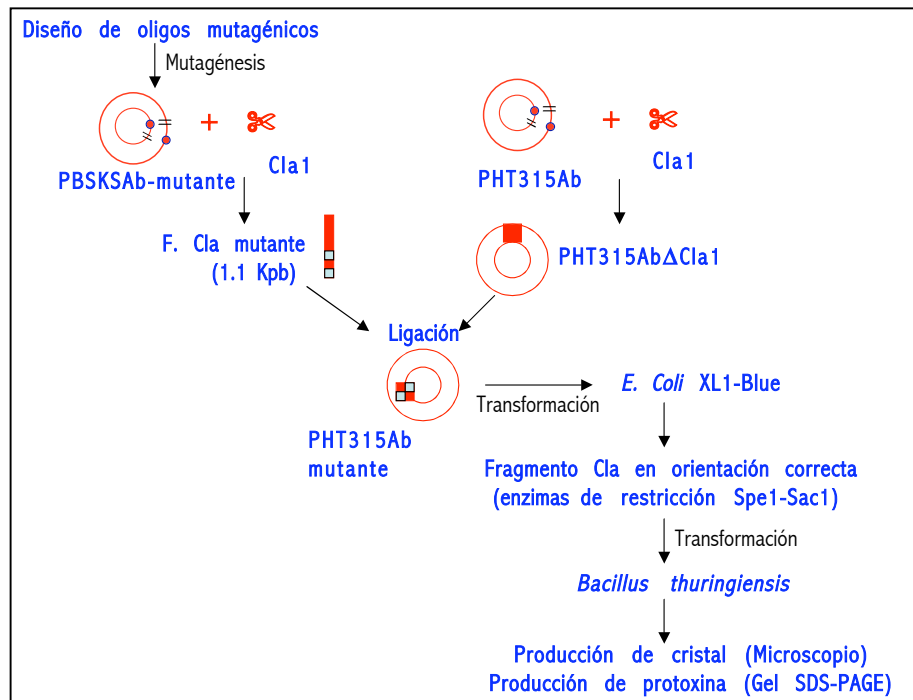


Figura 7. Estrategia para la construcción de mutantes del dominio I de Cry1Ab utilizando los plásmidos PBSKSAb y PHT315Ab.

6.3 Purificación de cristales de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I.

Para la purificación de cristales, las cepas Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I se crecieron en medio HCT, a 30°C durante 48 horas aproximadamente hasta alcanzar la fase de esporulación, en la cual se verificó la producción de cristal al microscopio. Se recuperó el paquete celular centrifugando 10 minutos a 10,000 rpm. Después, la pastilla se resuspendió en 30 ml de agua con PMSF 1mM y se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm. Estos lavados se repitieron tres veces. En seguida, la pastilla se resuspendió en 6 ml de buffer TTN (Tris 30mM, NaCl 300 mM, Tritón X-100 al 0.1%, pH 7.2) y se sonicó dando 5 pulsos de un minuto (a 20 Watts) con un minuto de descanso entre cada sonicación. Posteriormente, se realizaron los gradientes discontinuos de sacarosa, agregando 6 mililitros de una solución de sacarosa al 84% en el fondo del tubo, después se colocaron lentamente las soluciones de sacarosa al 79, 72 y 69%. En seguida, se agregaron 2 ml del paquete celular previamente sonicado y se centrifugó durante 20 minutos a 23,000 rpm, 15°C. Las fracciones se separaron y se observaron al microscopio, conservando las fracciones libres de esporas (F1 y F2). La sacarosa fue eliminada lavando con 30 ml de agua destilada y tritón al 0.01%. Se efectuaron tres lavados, entre los cuales se centrifugó

10 minutos a 10,000 rpm. Finalmente, la pastilla se resuspendió en buffer Tris 50 mM pH 8, PMSF 1 mM. Se cuantificó la concentración de proteína mediante Bradford y se corrió un gel SDS-PAGE para verificar la pureza del cristal.

6.4 Cuantificación de proteína mediante Bradford

En un tubo se colocaron 795 μ l de agua destilada y 5 μ l de la muestra. Se agitó para homogeneizar la muestra y se agregaron 200 μ l de reactivo de Bradford de Biorad. Después de incubar 5 minutos, se realizó la lectura de proteína en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB UltraspecII), midiendo a una λ de absorbancia de 595 nm. El valor de absorbancia fue interpolado a una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) que abarca un rango de concentraciones de 1 a 20 μ g/ml, para así obtener el valor de concentración.

6.5 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para el análisis de las proteínas purificadas se utilizó electroforesis en geles desnaturalizantes. Para lo cual se prepararon geles al 8 ó 10% de acrilamida, tal como se describe por Laemmli et al., 1970. Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul de Coomasie (Biorad).

6.6 Bioensayos con las mutantes del dominio I.

Se evaluaron diferentes dosis de cristales puros de cada una de las mutantes (de 0.1 a 2000 ng/cm²), las cuales fueron agregadas en la dieta de larvas de *Manduca sexta* de primer instar. Los ensayos se realizaron por triplicado en placas de 24 pozos, en los que se colocó una larva por cada pozo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y después de siete días, se cuantificó la mortalidad en cada dosis, la cual fue usada para estimar la dosis letal media (LC₅₀) con el programa Probit (Polo-PC LeOra Software).

6.7 Purificación del anticuerpo scFv73

La cepa TG1 de *E. coli* que expresa el anticuerpo scFv73, se inoculó en 50 ml de medio 2xTY suplementado con glucosa al 2% y ampicilina (50 μ g/ml). Se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm. Posteriormente, 5 ml del preinóculo se agregaron a 500 ml de medio 2xTY previamente suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) y glucosa (0.1%). Se incubó a

37°C y 200 rpm durante 2 horas hasta alcanzar una D.O. de 0.7. Después, el cultivo se indujo con IPTG (0.5 mM) y se incubó a 30°C y 200 rpm durante 5 horas. Los cultivos se recuperaron centrifugando 15 minutos a 5000 rpm. A continuación, el paquete celular se resuspendió en 15 ml de buffer PPB, se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó 15 minutos a 5000 rpm. Posteriormente, el sobrenadante se recuperó y el pellet se resuspendió en 15 ml de MgSO₄ 5 mM, incubándolo en hielo durante 20 minutos. En seguida, el pellet resuspendido y el sobrenadante se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos, recuperando únicamente el sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante se dializó en buffer PBS, toda la noche; se recuperó y filtró (membrana de 0.45 µm).

Para la purificación del scFv73, las columnas de cromatografía se cargaron con 4 ml de la resina agarosa Ni-NTA. Después, se hicieron cuatro lavados con buffer PBS. Posteriormente, cada columna se equilibró con 5 ml de imidazol 20 mM en PBS. Después, se cargó la muestra dializada en la columna y se lavó con 10 ml de imidazol 35 mM en PBS. En seguida, la muestra se eluyó con 3 ml de imidazol 250 mM en PBS, recuperando este mismo volumen. Finalmente, se lavó la columna con PBS y se regeneró con 2ml de imidazol 500 mM en PBS. La muestra eluída se visualizó en un gel SDS-PAGE al 10%.

Buffer PPB

Sacarosa 13.5g
EDTA (stock 0.5 M) 135 µl
Tris-HCl pH 8 (1M) 2 ml
Aforar a 67.5 ml de agua estéril.

Buffer PBS

NaCl 8.5 g
NaH₂PO₄ 0.38 g
Na₂HPO₄ 1.02 g
Aforar a 1 litro y ajustar el pH a 7.2 con NaOH.

6.8 Extracción de jugo gástrico de Manduca sexta

Las larvas de *M. sexta* de cuarto instar se colocaron en un recipiente con hielo durante 15 minutos. Después, cada extremo de la larva se fijó con alfileres sobre una tabla de disección. Se realizó un corte transversal después de los tres primeros segmentos de la larva y otro corte transversal antes de los dos últimos segmentos. En seguida, se realizó un corte longitudinal en la línea media. Se separó el intestino medio y el contenido se colocó en un

tubo de 50 ml para centrífuga. Una vez extraído el jugo de todas las larvas, se centrifugó a 9,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró (membrana de 0.45 μm), se hicieron alícuotas de 500 μl y se almacenaron a -70°C .

6.9 Ensayos de competencia de la oligomerización de Cry1Ab con los péptidos sintéticos de las hélices α del dominio I.

Los cristales de Cry1Ab puros se activaron con el jugo gástrico de *Manduca sexta* y el anticuerpo scFv73, en buffer de solubilización (carbonatos pH 10.5, 2-mercaptoetanol 0.02%). La activación se realizó en presencia de diferentes concentraciones de péptidos sintéticos correspondientes a las hélices α del dominio I (0.05, 0.10, 0.15 y 0.20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Después de incubar 1h, se centrifugó 20 minutos a 14,000 rpm, se recuperó el pellet y sobrenadante para analizarlos mediante Western blot.

6.10 Western-Blot.

Las muestras separadas mediante gel SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PVDF Immobilon-P Milipore) durante 45 minutos a 350 mA en cámara húmeda. La membrana se bloqueó con leche Svelty al 5% en PBS-tween 0.05%, durante 1.5 horas con agitación. Después, se lavó tres veces con agua destilada estéril y tres veces con PBS-tween 0.05%. Se colocó el primer anticuerpo, anti-Cry1Ab en una relación 1:30,000 en PBS-tween 0.05%, incubando durante 1.5 horas con agitación. En seguida, la membrana se lavó tres veces con PBS-tween 0.05%, se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG acoplado a peroxidasa (1:30000) y se incubó durante 1 hora con agitación. Finalmente, la membrana se lavó dos veces con PBS-tween 0.05% y dos veces con PBS, se agregaron los reactivos de quioluminiscencia (Pierce) y se reveló la señal.

6.11 Solubilización de cristales de Cry1Ab y mutantes en dominio I.

1 μg de cristales puros de Cry1Ab silvestre o mutantes se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000 rpm. El pellet se resuspendió en buffer carbonatos pH 10.5 β -mercaptoetanol 0.02%, se incubó por 2 horas a 37°C con agitación suave. Después, se centrifugó 20 minutos a 90,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificó proteína por Bradford y se corrió un gel SDS-PAGE al 10% para verificar la presencia de la protoxina (130 kDa).

6.12 Tripsinación de CryIAb y mutantes en dominio I.

A 1µg de protoxina solubilizada se le ajustó el pH a 8.5 con buffer Tris 1M pH 8, después se agregó tripsina (1:20, tripsina:proteína) incubando 2 horas a 37°C con agitación suave. La reacción se detuvo con PMSF 1mM y por último se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm. Se recuperó el sobrenadante, se cuantificó proteína por Bradford. Finalmente, se corrió un gel SDS-PAGE al 10% para verificar el producto de la tripsinación (toxina de 60 kDa).

6.13 Biotinación de la toxina CryIAb y mutantes en dominio I.

Las toxinas tripsinadas se incubaron con biotina durante 45 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de marca al pasar la mezcla por una columna de agarosa-estreptoavidina. Se recuperó el filtrado y se cuantificó proteína mediante Bradford. Después, la muestra se corrió en un gel SDS-PAGE 10% y se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa para verificar la marca con estreptoavidina acoplada a peroxidasa.

6.14 Extracción de vesículas de vellosidad de membrana apical (VVMA)

Se extrajeron 3 gramos de intestinos de larvas de quinto estadio de *M. sexta*. Para lo cual, se durmió a las larvas, colocándolas en hielo durante 15 minutos. Después de fijar cada larva, por cada uno de sus extremos sobre una tabla de disección, se cortaron los primeros tres segmentos cefálicos y los dos segmentos caudales con un corte transversal. En seguida, se realizó un corte longitudinal en la región dorsal y se separó el intestino de la cutícula. A continuación, se vació el contenido intestinal y el intestino fue lavado exhaustivamente con la solución I. El intestino limpio se colocó en un tubo falcon y se pesó. Para la extracción de VVMA, tres gramos de intestinos y 30 ml de solución II (dilución 1:10 peso/volumen) se colocaron en un tubo de vidrio para homogeneizar estéril. Después, se introdujo dentro del tubo, el émbolo de teflón del homogeneizador estéril, previamente conectado a un taladro Black and Decker U114 tipo FV. A continuación, a una velocidad de 2,250 rpm, el émbolo se fue hundiendo poco a poco hasta llegar al fondo del tubo y luego se sacó lentamente. Esto se repitió cinco veces. Después se agregaron 30 ml de una solución de MgCl₂ 24 mM, se tapó y se mezcló suavemente. La muestra fue incubada en hielo por 15 minutos. Después, se centrifugó a 4,500 rpm por 15 minutos a 4°C, recuperando el

sobrenadante, el cual fue centrifugado a 16,000 rpm por 30 minutos a 4°C, recuperando la pastilla en 15 ml de solución II fría y 15 ml de MgCl₂ 24 mM. Los dos pasos de centrifugación anteriores se repitieron una vez más, recuperando la pastilla únicamente, en solución II fría. Finalmente, esta muestra se dializó toda la noche en 1,000 volúmenes de buffer de diálisis, a 16 grados centígrados y con agitación. La muestra se recuperó y se cuantificó proteína mediante Bradford.

Solución I		Solución II	
Manitol	300 mM	Manitol	300 mM
Tris-HCl	17 mM	Tris-HCl	17 mM
EGTA	5 mM	EGTA	5 mM
DTT	2 mM	DTT	2 mM
PMSF	0.5 mM	Leupeptina (1mg/ml)	10 µl
Ajustar a pH 7.4 con KOH		Pepstatina (1mg/ml)	10 µl
		PMSF (100 mM)	100µl
		Sbti (10 mg/ml)	10 µl
		Sulfato de neomicina	6µl
		Ajustar pH a 7.4 con KOH	
Buffer de diálisis			
KCl	150 mM		
EGTA	2 mM		
EDTA	0.5 mM		
HEPES	10 mM		
Ajustar pH a 7.4 con KOH			

6.15 Ensayos de unión y competencias heterólogas con las mutantes del dominio I.

Para los ensayos de unión, las toxinas mutantes biotinadas (10 nM) se incubaron con 10µg de VVMA (preparadas con inhibidores de proteasas), en buffer de unión (PBS-tween 0.1%), durante una hora a temperatura ambiente. Después, la mezcla se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm y el pellet se recuperó. Se lavó dos veces con buffer de unión; se resuspendió en PBS. Finalmente, se realizó electroforesis y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente visualizar la unión de las toxinas biotinadas con estreptoavidina acoplada a peroxidasa. Las competencias heterólogas se realizaron incubando 10µg de VVMA con la toxina Cry1Ab biotinada (10 nM) en presencia de

excesos molares (100 a 500) de toxina no marcada (mutantes) durante una hora, posteriormente se continuó con el mismo procedimiento realizado para las uniones.

6.16 Purificación de un fragmento del receptor Bt-R1

La cepa CR1-12, que expresa un fragmento del receptor Bt-R1 (con tres sitios de unión a la toxina Cry1Ab), se inoculó en 50 ml de medio 2XTY suplementado con glucosa al 2% y ampicilina (50 µg/ml). Después de incubar toda la noche a 30°C y 200 rpm, 5 ml del preinoculo se agregaron a 500 ml de medio 2XTY suplementado con glucosa al 0.1% y ampicilina (100 µg/ml). A continuación se incubó durante dos horas a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ igual a 0.7. El cultivo fue inducido con IPTG (0.5 mM) y después de incubar durante cinco horas a 30°C y 200 rpm, el paquete celular se recuperó centrifugando 15 minutos a 15000 rpm. Las células se resuspendieron en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, urea 8 M, NaH₂PO₄ 100mM, se ultracentrifugó 30 minutos a 60000 rpm y el sobrenadante se recuperó y filtró (Milipore 0.45 µm).

Para su purificación, la columna de cromatografía se cargó con 20 ml de la resina agarosa Ni-NTA y se lavó cuatro veces con buffer PBS. Posteriormente, la columna se equilibró con 5 ml de imidazol 20 mM en PBS. Se cargó la muestra en la columna y se lavó con 20 ml de imidazol 20 mM en PBS, para quitar la urea. Después, se realizó otro lavado con 10 ml de imidazol 35 mM. En seguida, la muestra se eluyó con 20 ml de imidazol 250 mM en PBS. Finalmente, se lavó la columna con PBS y se regeneró con 10 ml de imidazol 500 mM en PBS. La muestra eluida se visualizó en un gel SDS-PAGE al 10%.

6.17 Ensayo de unión a ligando con un fragmento del receptor BtR1.

Diez microgramos del fragmento Bt-R1 puro se agregaron en cada pozo de un gel SDS-PAGE al 10%, después de realizar la electroforesis, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con albúmina sérica bovina (BSA) y después se incubó dos horas con las toxinas Cry1Ab silvestre y mutantes biotinadas. Se hicieron tres lavados con buffer PBS-tween 0.1%, cada uno de 10 minutos, para eliminar la toxina no unida. Para detectar la unión de la toxina a BtR1, la membrana se incubó con estreptoavidina (1:5000) y se reveló con luminol.

6.18 Determinación de constantes de afinidad por ELISA.

Para determinar la constante de disociación aparente (K_D), el fragmento Bt-R1 (10 nM) se incubó con concentraciones crecientes de las toxinas Cry1Ab silvestre y mutantes (de 0.1nM a 1 μ M) durante 1 hora a temperatura ambiente. Con el objetivo de determinar la cantidad de fragmento Bt-R1 no unido, esta mezcla se colocó en una placa de poliestireno de 96 pozos, previamente incubada con 2.5 μ g de toxina. Se realizaron tres lavados y se agregó el primer anticuerpo (anti-Cry1Ab), seguido de un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, cuya señal se detectó por actividad. La concentración de toxina Cry1Ab WT ó mutante a la cual se detectó la mitad máxima de señal corresponde a la constante de disociación.

6.19 Preparación de liposomas de fosfatidilcolina.

2.6 μ mol de liposomas de fosfatidilcolina (Avanti Polar lipids) se tomaron del stock de cloroformo y se secaron con nitrógeno. Después, se colocaron toda la noche en vacío (Savant, Speed Vac SVC100) para eliminar los residuos de cloroformo. Por último, se hidrataron en 2.6 ml de buffer CHES 10mM, KCl 150mM pH 9; y se sonicaron cinco veces durante 3 minutos en un sonicador Branson-1200.

6.20 Activaciones in vitro de Cry1Ab con liposomas.

Las protoxinas Cry1Ab silvestre y mutantes solubilizadas (0.2 μ g) se activaron con jugo gástrico de *M. sexta* en presencia de liposomas sintéticos de fosfatidilcolina (small unilamellar vesicles ó SUV) y del anticuerpo scFv73, en buffer carbonatos pH 10.5, β -mercaptoetanol 0.02%, durante 1 hora a 30°C ó 37°C con agitación suave. Después, la reacción se detuvo con PMSF (1 mM) y se centrifugó a 90,000 rpm durante 1 hora a 4°C. El pellet se recuperó y se realizó electroforesis (SDS-PAGE 8%). Finalmente, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y la formación de oligómero se visualizó mediante Western Blot.

6.21 Ensayos de formación de poro en bicapas lipídicas planas.

Las bicapas lipídicas se construyeron con fosfolípidos de fosfatidilcolina según el protocolo de Müeller and Rudin. Se utilizó un sistema de dos compartimentos conectados entre si

mediante un orificio. A su vez, cada compartimiento está conectado a un electrodo, del lado *cis* el electrodo aplica una corriente que se mantiene constante y del lado *trans* el electrodo detecta los cambios producidos en la corriente mediante un amplificador operacional. En cada compartimiento se agregó buffer CHES 10mM pH9, adicionado de KCl 300 mM del lado *cis* y KCl 10 mM del lado *trans*. La bicapa de lípidos se construyó en el orificio que conecta ambos contenedores, mostrando una capacitancia típica entre 250 y 300 pF. En seguida, en el lado *cis*, se añadió el oligómero previamente incorporado en los liposomas y después de su fusión con la bicapa, se detectaron los cambios en la corriente mediante el amplificador operacional (Figura 8). Los datos así obtenidos fueron procesados con los programas Digidata 1200 interface, Axotape y pClamp [65].

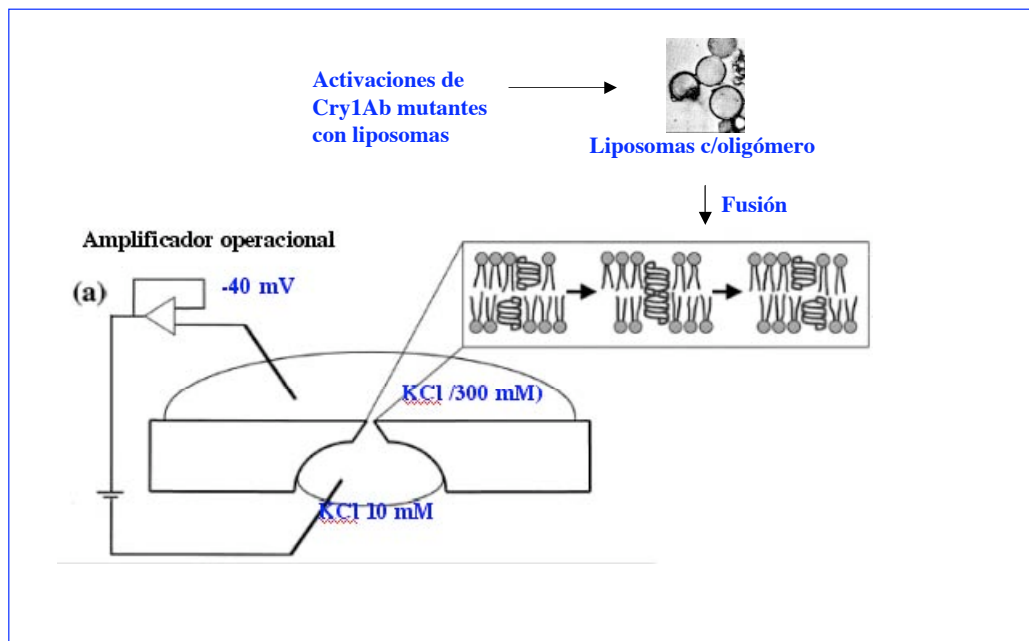


Figura 8. Ensayo de formación de poro en bicapas lipídicas planas. Después de fusionar los liposomas con el oligómero a la bicapa, los cambios en la conductancia generados por el poro son monitoreados en un lapso de tiempo determinado.

6.22 Cromatografía de exclusión de peso molecular.

Las toxinas Cry1Ab silvestre y mutantes R99E y Y107E activadas con liposomas de fosfatidilcolina (SUV) se delipidaron durante 1 hora con tritón X100 al 10% (concentración final), incubando a 25°C . Después se ultra-centrifugaron a 45,000 rpm durante 1h a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se pasó por una columna Superdex 200HR.

7. RESULTADOS

7.1 Estandarización de la activación de Cry1Ab *in vitro*.

En un trabajo previo, se demostró que cuando la protoxina Cry1Ab es activada *in vitro* con jugo gástrico de *M. sexta*, en presencia de membranas (VVMA) ó del anticuerpo scFv73 (que mimetiza al receptor caderina), se visualiza un oligómero de la proteína Cry1Ab de aproximadamente 250 kDa, que no se observa si se activa únicamente con el jugo gástrico. Posteriormente, se demostró que este oligómero de 250 kDa presentó actividad de formación de poro, al ser evaluado en bicapas lipídicas planas. Sin embargo, es importante mencionar que la activación de toxinas Cry1A *in vitro* para la formación de oligómero, planteado hasta ese momento era un proceso muy poco eficiente, dado que se obtenía poco oligómero, y este proceso no siempre era reproducible. Puesto que el objetivo principal de éste trabajo era estudiar la oligomerización, se requería obtener oligómero de manera eficiente y reproducible. Por lo que se realizó un trabajo sistemático y exhaustivo para modificar las condiciones de activación *in vitro* de la toxina Cry1Ab, incluyendo el tipo de buffer, el pH, la fuerza iónica, la concentración de cristal ó protoxina soluble, la relación cristal:anticuerpo scFv73, la concentración de jugo gástrico, la temperatura, el tiempo de activación e incluso se probaron proteasas puras como la tripsina y una elastasa comercial durante la activación. Las diferentes condiciones ensayadas, en todas las combinaciones posibles se muestran resumidas en la tabla 2.

Como resultado de esta estandarización, encontramos que el uso de un pH básico (10.5) era determinante para la oligomerización de la toxina Cry1Ab, ya que con esto se lograba la solubilización eficiente de la protoxina y como consecuencia su correcta activación proteolítica. Otro factor importante fue realizar la activación partiendo de la protoxina soluble y no del cristal completo, con lo que se lograba una estimación correcta de la proteína utilizada en el ensayo. Pese a estos avances, bajo ninguna de las condiciones evaluadas se logró desplazar completamente el equilibrio hacia la formación de oligómero, ya que la mayoría de la toxina permanecía como monómero soluble.

Tabla 2. Diferentes condiciones evaluadas en la activación *in vitro* de la toxina Cry1Ab

Condición	Cambios en las condiciones de activación de la toxina Cry1Ab								
Temperatura (°C)	30	37	45						
Tiempo de activación (horas)	0.5	1	2						
Tipo de Buffer	Carbonato de sodio	Fosfatos							
Fuerza iónica (M)	0.01	0.05	0.1						
pH	9	9.5	10	10.2	10.5	10.7	11		
Concentración de cristal (µg/µl)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.9	
Relación cristal:scFv73	1:1	1:2	1:4	1:6					
Jugo gástrico de <i>M. sexta</i> (µg/µl)	0.005	0.015	0.025	0.05	0.075	0.1	0.15		
Elastasa ó tripsina (µg)	0.5	2.5	5	8	10	16	26		

Posteriormente, basados en un trabajo realizado por Rausell, et al., 2001, en el que utilizando muestras de oligómero y monómero puros, se demostró que el oligómero se inserta eficientemente en membranas artificiales de fosfatidilcolina mientras que el monómero no se inserta, se propuso activar Cry1Ab en presencia de liposomas de fosfatidilcolina. Esto se realizó con el objetivo de proveer un ambiente hidrofóbico necesario para la formación de un oligómero estable. El resultado fue que la incorporación de liposomas de fosfatidilcolina en la activación de Cry1Ab *in vitro*, permitió en primer lugar, utilizar menos proteína (veinte veces menos) y en segundo lugar, desplazó el equilibrio hacia la formación de oligómero. En la figura 9 se observa el resultado de la activación de la protoxina Cry1Ab soluble, con liposomas y sin liposomas, en donde se observa que hay una mayor eficiencia de formación de oligómero en aquellas muestras activadas con liposomas (Figura 9A), a diferencia de las que se activaron sin liposomas (Figura 9B). Es importante mencionar que mientras en la muestra activada con liposomas se utilizaron 0.2 µg de protoxina, la cual fue convertida casi en su totalidad a oligómero; en la muestra activada sin liposomas, se utilizaron 5 µg de protoxina, misma que permaneció

mayoritariamente como monómero. También se observa que con los liposomas se favoreció la incorporación de la fracción oligomérica a las membranas (P) mientras que el monómero permaneció soluble (S), lo cual posteriormente nos permitiría realizar análisis de formación de poro en bicapas lipídicas planas.

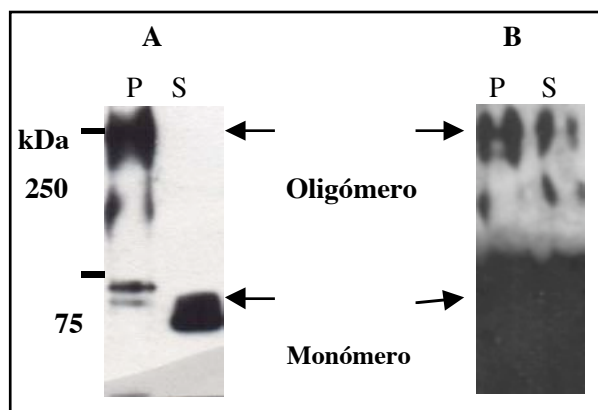


Figura 9. Activación *in vitro* de la toxina Cry1Ab con y sin liposomas de fosfatidilcolina. A) Después de activar con liposomas, el oligómero se incorporó en la membrana (P), mientras que el monómero se localizó en la fracción soluble (S). B) En la activación sin liposomas, la mayoría de la proteína permanece como monómero, mientras que el oligómero se encuentra tanto en la fracción soluble (S) como en la insoluble (P).

Una vez que se estandarizaron las condiciones de activación de Cry1Ab *in vitro* en presencia de liposomas de fosfatidilcolina para la formación de oligómero, se inició el análisis de las regiones involucradas en la oligomerización.

7.2 Papel de las hélices alfa del dominio I de Cry1Ab en la oligomerización

En un trabajo previo, estudios de proteólisis limitada sugirieron que el dominio I de la toxina Cry1Ab participa en las interacciones monómero-monómero en el preporo-oligomérico [13]. Con el objetivo de demostrar el papel de cada hélice alfa del dominio I de Cry1Ab, se construyeron péptidos sintéticos de las hélices α_2 , α_3 , α_4 y α_6 . Con estos péptidos se compitió la formación del oligómero de Cry1Ab *in vitro*. Para lo cual se activaron cristales de Cry1Ab con jugo gástrico de *Manduca sexta* en presencia del anticuerpo scFv73 que mimetiza al receptor caderina. Es importante mencionar que este

ensayo de activación se realizó en ausencia de liposomas. Al realizar esta activación se obtiene una proteína de 250 kDa correspondiente al pre-poro oligomérico (Figura 10). La oligomerización fue inhibida cuando se compitió con concentraciones crecientes del péptido sintético correspondiente a la hélice $\alpha 3$ (Figura 10), lo cual no ocurrió cuando se compitió con la hélice $\alpha 6$ (Figura 10) ó con las otras hélices $\alpha 2$ y $\alpha 4$ del dominio I (datos incluídos en el anexo 1). Con base en el resultado anterior, sugerimos que la hélice $\alpha 3$ del dominio I podría participar en la oligomerización de la toxina Cry1Ab.

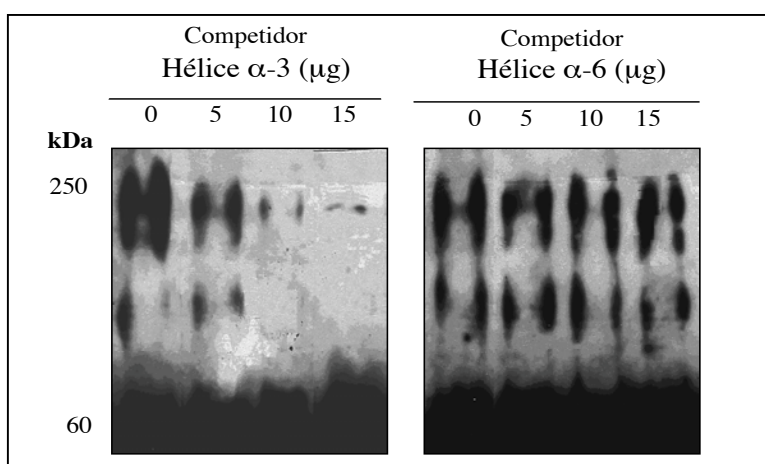


Figura 10. Competencia *in vitro* de la formación de oligómero de Cry1Ab con péptidos sintéticos de las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 6$ del dominio I analizadas mediante Western-blot. Se observa que la presencia de concentraciones crecientes del péptido sintético de la hélice $\alpha 3$ inhibieron la oligomerización de Cry1Ab, mientras que la hélice $\alpha 6$ no lo hizo.

7.3 Construcción de mutantes en los coiled-coils del dominio I de la toxina Cry1Ab

Por otra parte, como se explicó anteriormente, basándonos en el análisis con el programa COILS, que predice la formación de estructuras tipo coiled-coils, se encontró que las hélices α -3 y α -6 del dominio I de Cry1Ab presentan una alta probabilidad de formación de estas estructuras. Puesto que se ha demostrado que los coiled-coils participan en la oligomerización de diversas proteínas y que mutaciones en éstas estructuras conducen a la pérdida de oligomerización, se propuso estudiar el papel de los coiled-coils predichos para

las hélices α -3 y α -6 en el proceso de oligomerización de toxinas Cry1A. Para lo cual, se construyeron mutantes en las posiciones *a* y *d* de la heptada de residuos de los coiled-coils de las hélices α -3 y α -6 del dominio I de la toxina Cry1Ab. Los aminoácidos seleccionados para la mutagénesis fueron: en la hélice α -3 posición *a*, R93F, Y107E y L100E; posición *d*, L103F y Y110E; posición *g*, R99E; y en la hélice α -6 posición *a*, I200D y Y193D; posición *d*, Y203D y L196D (Figura 11A). Cabe mencionar que se decidió construir el mutante R99E, ubicada en la posición *g*, dado que, en un reporte previo, al mutar este residuo en la toxina Cry1Aa, ésta perdió la toxicidad y la actividad de formación de poro, no obstante, la formación de oligómero no fue analizada. En la figura 11B se muestra la localización de los aminoácidos mutados en la estructura monomérica de la toxina Cry1Aa, en la cual se observa que los aminoácidos en las posiciones *a* (rojo) y *d* (azul) de ambas hélices se encuentran orientados hacia el interior del dominio I, mientras que el aminoácido R99 (verde) está ubicado hacia la superficie de la proteína.

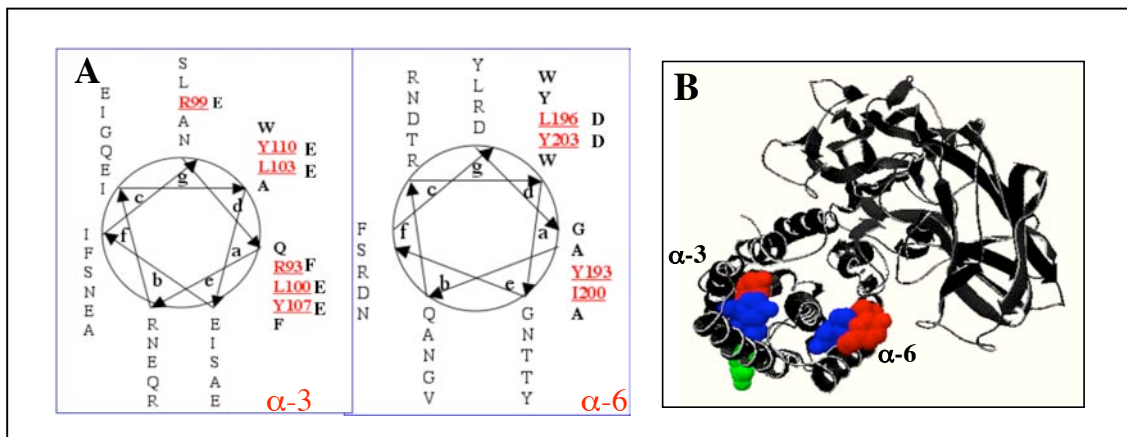


Figura 11. A) Representación esquemática de los coiled-coils predichos para las hélices α -3 y α -6 en la que se muestra la posición que ocupan los aminoácidos en la heptada de residuos. En rojo se muestran los aminoácidos en posiciones *a* y *d* seleccionados para mutageneizar. B) Esquema de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Aa en la que se muestran los aminoácidos de las hélices α -3 y α -6 mutados: en rojo, posición *a*; en azul, posición *d* y posición *g*, en verde.

Se construyeron diez mutantes, tal como se explica en materiales y métodos. Seis de las cuales (R93F, R99E, Y193D, L196D, I200D, y Y203D) se construyeron con un

equipo comercial de mutagénesis sitio-dirigida sobre el plásmido PBSKSIIAb, que tiene insertado un fragmento Cla del dominio I de la protoxina Cry1Ab. Posteriormente se realizó la transformación en *E. coli* y por medio de la secuenciación del DNA de las candidatas se comprobó que tuvieran el cambio esperado. Las candidatas correspondientes a cada mutación se digirieron con la enzima *Clal*, obteniendo un fragmento con un tamaño de 1.1 Kpb que incluye la región mutada (fragmento Cla). Con los fragmentos Cla mutantes se realizó una subclonación en el plásmido PHCPP Δ Cla1 (sin fragmento Cla). Para la selección de las colonias mutantes, primero se verificó que presentaran el fragmento Cla insertado, para lo cual fueron digeridas con la enzima *Clal* (Figura 12A). Después, para verificar la orientación del fragmento Cla insertado, las candidatas fueron digeridas con las enzimas *SpeI* y *SacI*, esperando que la digestión de los fragmentos Cla orientados correctamente generara cuatro productos con tamaños de 6.2, 2.3, 1.1 y 0.8 kpb, tal como se

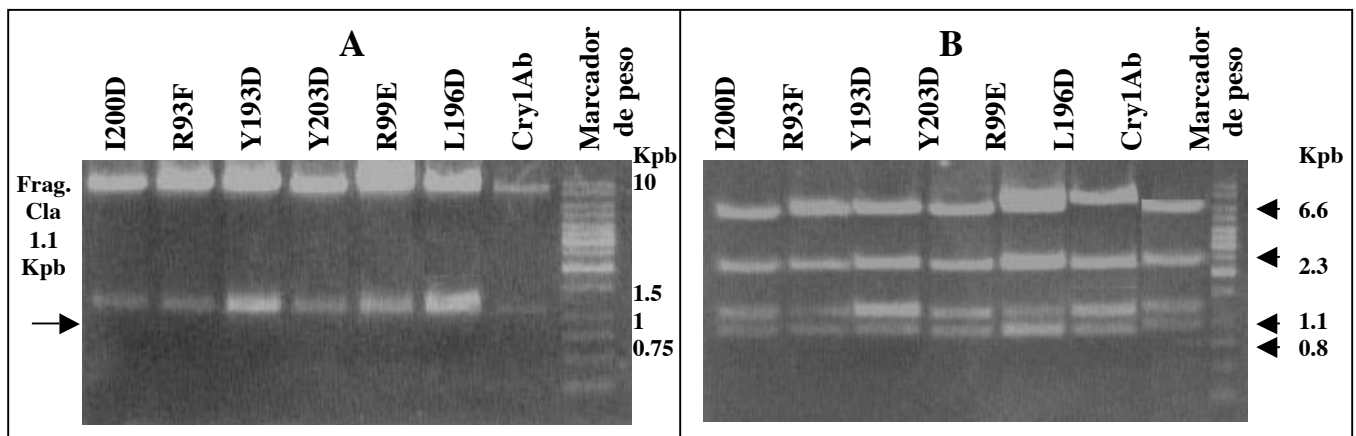


Figura 12. Digestión de los plásmidos PHT315Ab subclonados con los fragmentos Cla de las diferentes mutantes. A) Digestión con la enzima *Clal*, en la que se observa la liberación del fragmento Cla con masa molecular igual a 1.1 Kpb. B) Digestión con las enzimas *SpeI* y *SacI*, en la que se observa la liberación de cuatro fragmentos con tamaños de 6.2, 2.3, 1.1 y 0.8 Kpb, lo que indica la orientación correcta de los fragmentos Cla subclonados en PHT315Ab.

observa en la figura 12B. En caso de que los fragmentos Cla se hubiesen orientado incorrectamente, con esta digestión se generarían tres fragmentos de 7.8, 2.3 y 0.89 kpb. Por otra parte, dado que las mutantes L100E, L103E, Y107E y Y110E no pudieron

construirse mediante la técnica anterior, se construyeron directamente en el vector PHT315Ab utilizando el mismo equipo de mutagénesis sitio-dirigida. Después de transformar en *E. coli*, las candidatas se digirieron con Cla, para verificar la presencia del fragmento y se mandaron secuenciar.

Así, los vectores con los genes de las proteínas mutantes se transformaron en la cepa acristalífera 407 de *Bacillus thuringiensis*. Estas clonas se crecieron en medio HCT suplementado con eritromicina hasta alcanzar la esporulación completa, verificando la producción de cristal al microscopio y mediante geles desnaturalizantes. Después, se purificaron sus cristales mediante gradientes discontinuos de sacarosa y su pureza se visualizó en el microscopio así como en geles desnaturalizantes. La figura 13 muestra el patrón de proteínas de los cristales purificados de cada mutante. En ésta, se observa que las mutantes Y203D, I200D, R99E, L100E y Y107E producen una protoxina de masa molecular igual a 130 kDa, tal como Cry1Ab silvestre. En cambio, las mutantes R93F,

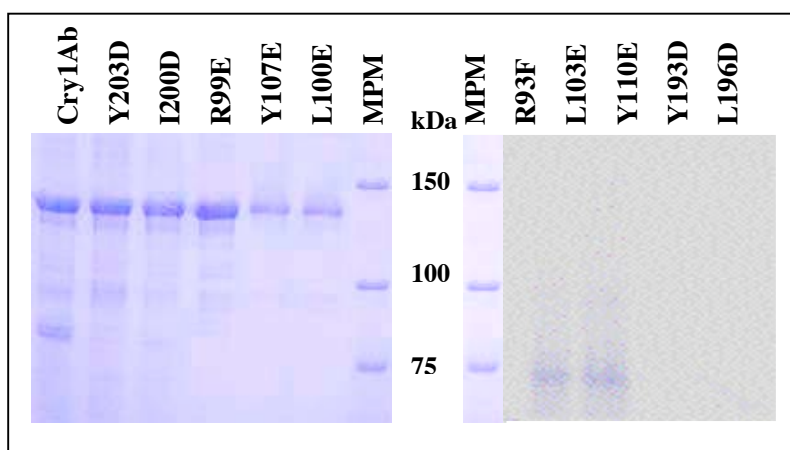


Figura 13. Cristales de las mutantes del dominio I de Cry1Ab purificados mediante gradientes discontinuos de sacarosa visualizados en gel desnaturalizante. Únicamente cinco de las mutantes, Y203D, I200D, R99E, Y107E y L100E, produjeron la protoxina de 130 kDa, tal como lo hace la toxina Cry1Ab silvestre. Las otras cinco mutantes (R93F, L103E, Y110E, Y193D y L196D), si produjeron cristal pero estos fueron inestables por lo que la protoxina fue degradada y no pudo visualizarse en el gel desnaturalizante.

L103E, Y110E, Y193D y L196D aún cuando si se visualizaron cristales pequeños al microscopio, en geles SDS-PAGE no se visualizó protoxina, lo que pudiera deberse a que los cristales fueron inestables, siendo degradados con el tratamiento con calor requerido para la preparación de la muestra. Por lo anterior, se realizaron geles semidesnaturalizantes (SDS al 0.01%), en los que la muestra no fue calentada. También se realizó Western blot de estos geles, utilizando un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab, para tratar de visualizar las protoxinas de estas mutantes. Sin embargo, solo se observaron productos de menor masa molecular, resultado de la degradación de los cristales (Figura 14), confirmando su inestabilidad. Por este motivo, se decidió trabajar únicamente con las mutantes que produjeron cristales estables.

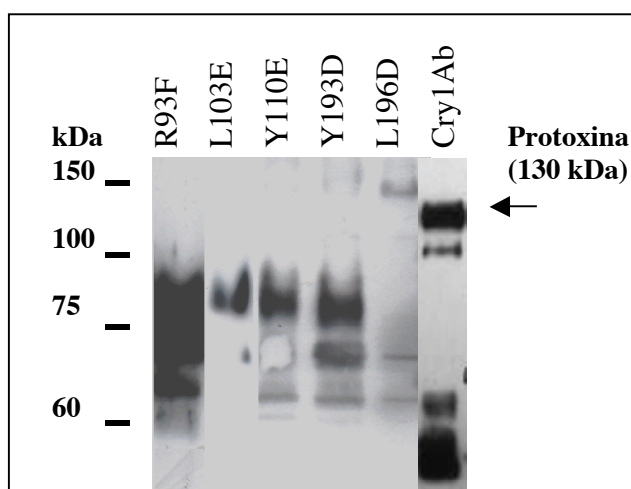


Figura 14. Cristales puros de las mutantes inestables visualizados mediante Western-blot de gel semidesnaturalizante (SDS 0.01%), utilizando un anticuerpo anti-Cry1Ab policlonal. En el último carril se observa la protoxina Cry1Ab silvestre de 130 kDa, mientras que en las protoxinas mutantes solo se observan proteínas de menor peso molecular, productos de degradación, lo que confirma la inestabilidad de los cristales.

7.4 Bioensayos con las mutantes del dominio I de Cry1Ab

Para evaluar la toxicidad de las mutantes se realizaron bioensayos utilizando larvas de *Manduca sexta* de primer instar, que fueron alimentadas con diferentes dosis de cristales puros (0.1 a 2000 ng/cm², 24 larvas por dosis). Después de siete días, se cuantificó el porcentaje de mortalidad y con estos valores se calculó la dosis letal media (LC₅₀). En la

tabla 3 se resumen los resultados del bioensayo realizado por triplicado, en la cual se observa que las mutantes Y107E y R99E de la hélice α -3 fueron severamente afectadas en su toxicidad. Fue imposible calcular la LC_{50} , ya que no se observó mortalidad al utilizar la dosis más alta (2000 ng/cm²) que corresponde a una dosis 2000 veces mayor a la silvestre, por lo que concluimos que estas mutantes no son tóxicas. Por otro lado, la mutante L100E, también localizada en la hélice α -3, mostró una LC_{50} dos veces menor a la silvestre, implicando que fue dos veces más tóxica. En cambio, las mutantes de la hélice α -6 conservaron su toxicidad, ya que presentaron valores de LC_{50} similares a los de la toxina Cry1Ab silvestre. A continuación, las mutantes R99E y Y107E ubicadas en la hélice α -3, que fueron severamente afectadas en su toxicidad, fueron analizadas en cada uno de los pasos del mecanismo de acción (solubilización, activación, unión a receptor Bt-R1, oligomerización y formación de poro), con el objetivo de determinar si la ausencia de toxicidad era debida a la pérdida de oligomerización ó si estas mutaciones interferían en alguno de los otros pasos del mecanismo de acción. Las otras mutantes también fueron evaluadas en cada paso del mecanismo de acción como controles de los diferentes ensayos.

Tabla 3. Bioensayos de las mutantes del dominio I de Cry1Ab con larvas de *M. sexta*

TOXINA	LC_{50} ng/cm ² (Límites de confianza 95%)
Cry1Ab silvestre	1.3 (0.9-1.7)
R99E	>2000
Y107E	>2000
L100E	0.6 (0.4-0.8)
I200D	1 (0.4-2.4)
Y203D	3.6 (1.2-2.8)

7.5 Solubilización y activación de las mutantes del dominio I de Cry1Ab.

El primer paso en el mecanismo de acción a evaluar fue la solubilización de los cristales de las mutantes del dominio I de Cry1Ab. Para lo cual, los cristales puros de las mutantes R99E, Y107E, L100E, I200D y Y203D se solubilizaron a pH alcalino. El resultado fue que

todas las mutantes fueron solubilizadas correctamente, liberando una protoxina de 130 kDa. Posteriormente, con la finalidad de verificar si las mutantes eran activadas correctamente, éstas fueron tripsinadas, tal como se explica en materiales y métodos. Como resultado se obtuvo que todas las mutantes generaron un fragmento de aproximadamente 65 kDa, que corresponde a la toxina activada, tal como se observa en la figura 15.

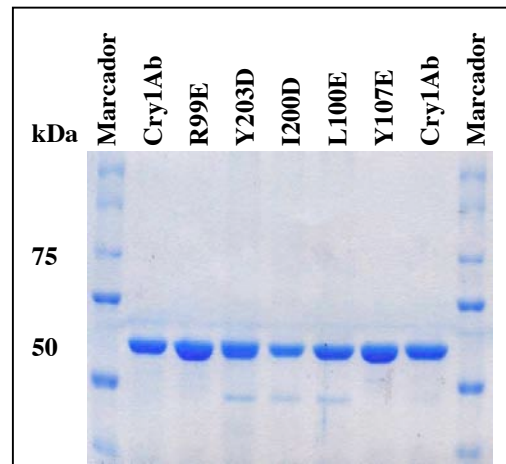


Figura 15. Toxinas Cry1Ab silvestre y mutantes activadas con tripsina, visualizadas en gel desnaturizante teñido con coomasie. Se observa que todas las mutantes así como Cry1Ab silvestre, se activaron correctamente, generando un producto de aproximadamente 65 kDa, que corresponde a la toxina activa.

7.6 Unión a vesículas de vellosidad de membrana apical (VVMA)

Dado que todas las mutantes se activaron correctamente, el siguiente paso en el mecanismo de acción a evaluar fue su unión a las vesículas de vellosidad de membrana apical (VVMA). Para lo cual las toxinas mutantes activadas se marcaron con biotina, al mismo tiempo que se purificaron las VVMA a partir de la membrana del intestino medio del lepidóptero *M. sexta*. En seguida, las toxinas marcadas con biotina y las VVMA se pusieron a interactuar en solución. Tras una serie de lavados, mediante centrifugación, se recuperaron las membranas con la toxina unida. Finalmente, la marca de biotina en la fracción membranal se visualizó revelando con estreptoavidina. El resultado de este experimento se muestra en la figura 16, en la que es claro que todas las mutantes se unieron a las membranas tal como lo hizo la toxina Cry1Ab silvestre.

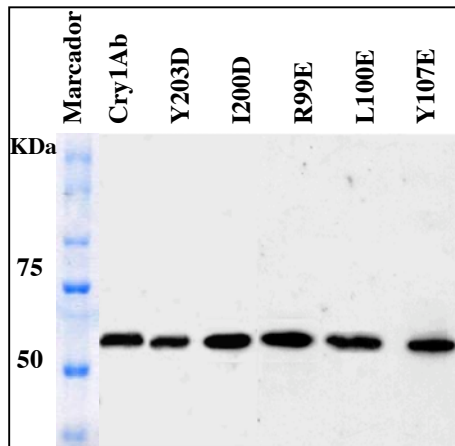


Figura 16. Ensayo de unión en solución de Cry1Ab silvestre y mutantes a las VVMA de *M. sexta*. Las bandas de 65 kDa corresponden a la señal de biotina de las toxinas silvestre y mutantes unidas a las membranas de *M. sexta*, revelada con estreptoavidina.

A continuación, con el objetivo de analizar la afinidad de unión de las toxinas mutantes a la membrana, se realizaron competencias de unión heterólogas. En este ensayo se compitió la unión de la toxina silvestre marcada con biotina a las VVMA, con excesos molares de las diferentes mutantes no marcadas (100, 500, 1000 y 5000 nM). De tal forma que si las mutantes compiten por la unión de la toxina silvestre a las VVMA, se observará un desplazamiento de la toxina silvestre unida. El resultado se muestra en la figura 17, en la cual se presentan los resultados de las competencias visualizadas mediante Western blot (figura 17A) así como las curvas de desplazamiento obtenidas después de analizar las bandas de este experimento mediante densitometría (figura 17B). Es notorio que todas las mutantes desplazaron la unión de la toxina silvestre a las VVMA de manera similar. Todas desplazaron la unión del 20 al 30% de Cry1Ab silvestre, a excesos molares de 100 y 500 nM respectivamente. A excesos molares de 1000 nM, la toxina silvestre desplazó la unión más del 80%, igualmente lo hicieron las mutantes I200D y R99E, mientras que las mutantes L100E, Y107E y Y203D la desplazaron 70, 60 y 50% respectivamente. Todas desplazaron la unión de Cry1Ab casi en su totalidad cuando se compitió a excesos molares de 5000.

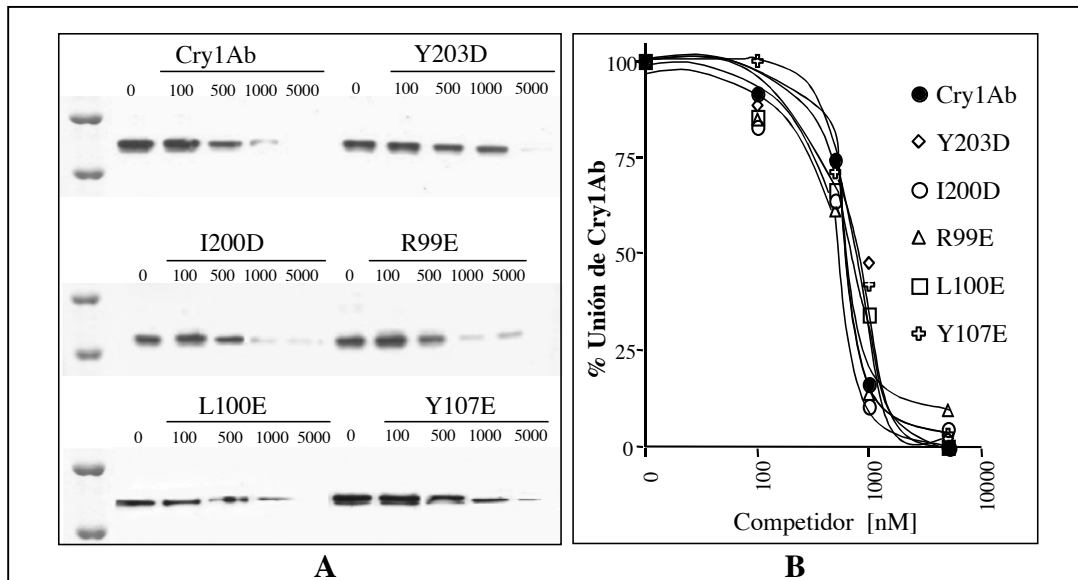


Figura 17. Competencias de unión heteróloga realizadas con las toxinas mutantes del dominio I de la toxina Cry1Ab. A) Desplazamiento de la unión de la toxina Cry1Ab silvestre marcada con biotina efectuado por las diferentes toxinas mutantes no marcadas a excesos molares de 100, 500, 1000 y 5000, visualizado mediante Western-blot. B) Curvas de desplazamiento de la unión de la toxina Cry1Ab silvestre por las diferentes mutantes, en las que se observa una cinética de desplazamiento similar a la de la toxina silvestre, lo que indica una afinidad de unión similar.

7.7 Unión de las mutantes del dominio I de Cry1Ab al receptor Bt-R1

La unión de las mutantes a un fragmento del receptor Bt-R1, que contiene tres sitios de unión a la toxina Cry1Ab, fue evaluado mediante ensayos de unión a ligando. Para realizar este ensayo, el fragmento de Bt-R1 se purificó como se explica en materiales y métodos. Después, el receptor puro se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa. En seguida, la membrana se puso a interactuar con las diferentes toxinas mutantes marcadas previamente con biotina, se lavó para quitar la toxina no unida y la señal de la toxina unida al receptor se reveló con estreptoavidina. El resultado se muestra en la figura 18A, en la que se aprecia que todas las mutantes se unieron al fragmento del receptor Bt-R1, tal como lo hizo la toxina silvestre. Finalmente, mediante ELISA competitiva se calcularon las constantes de disociación de las toxinas mutantes y silvestre, encontrando que todas las

mutantes tuvieron valores de K_D similares al de la toxina silvestre (Figura 18B). Por lo anterior concluimos que ninguna de las mutantes fue afectada en su unión reversible.

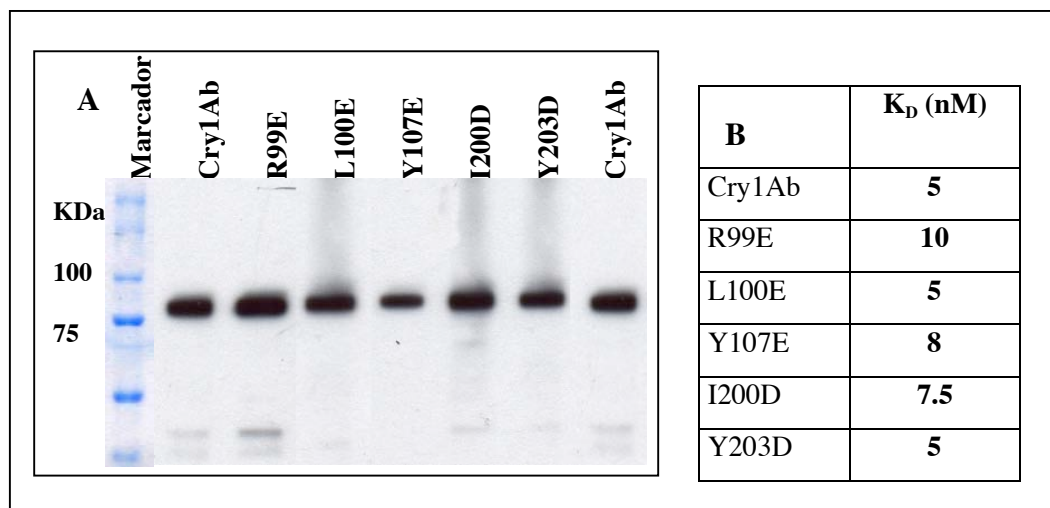


Figura 18. Unión de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I a un fragmento de Bt-R1 que contiene tres sitios de unión a la toxina Cry1Ab. A) Ensayo de unión a ligando realizado con el fragmento de Bt-R1 y las toxinas Cry1Ab silvestre y mutantes, en el que se observa que todas las mutantes se unieron al receptor. B) Tabla de las constantes de disociación aparente (k_D) de las toxinas Cry1Ab silvestre y mutantes calculadas mediante ELISA competitiva, en la que se observa que todas las mutantes se unieron al fragmento de Bt-R1 con una afinidad similar al de la toxina silvestre.

7.8 Análisis de la oligomerización de Cry1Ab silvestre y mutantes.

Puesto que las mutantes R99E y Y107E no fueron afectadas en su unión al receptor Bt-R1, el siguiente paso en el mecanismo de acción a evaluar fue la oligomerización. Para lo cual, las protoxinas solubles silvestre y mutantes se activaron *in vitro* con el jugo gástrico de *M. sexta* en presencia del anticuerpo scFv73 y de vesículas unilaminares pequeñas de fosfatidilcolina (SUV). Las activaciones se analizaron mediante Western-blot. El resultado se muestra en la figura 19A, en la que se observa que las mutantes R99E y Y107E, que fueron severamente afectadas en su toxicidad, no formaron el pre-poro oligomérico (proteína de 250 kDa), en cambio, la toxina silvestre y el resto de las toxinas que si

conservaron su toxicidad (Y203D, I200D y L100E), si formaron oligómeros de tamaño similar al de Cry1Ab silvestre (Figura 19A).

Después, con el objetivo de evaluar si las mutantes R99E y Y107E podrían estar formando oligómeros inestables, las activaciones se analizaron en geles con menor concentración de SDS (0.01%), calentando las muestras activadas a diferentes temperaturas. El resultado de este ensayo mostró que la ambas mutantes formaron oligómeros sensibles a la desnaturalización por calor y SDS, en contraste con el oligómero silvestre el cual es resistente a temperatura. En la figura 19B se muestra el resultado de este experimento realizado con la mutante R99E y la toxina silvestre. El resultado de este mismo ensayo efectuado con la mutante Y107E se incluye en el anexo 2.

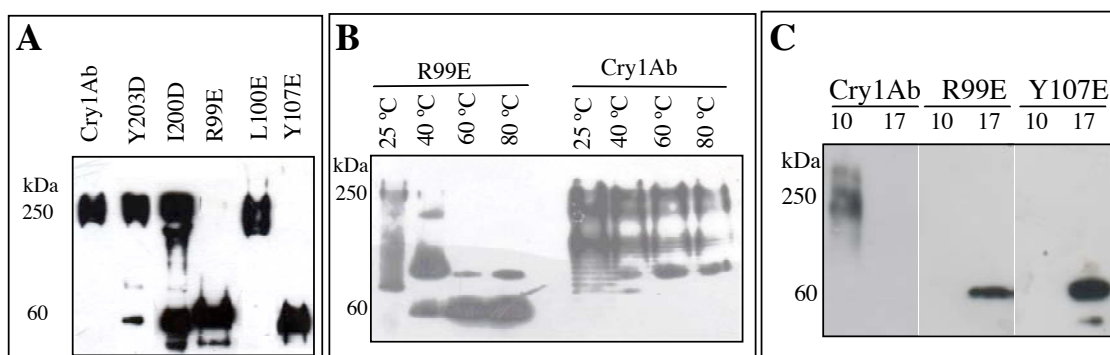


Figura 19. A) Activación *in vitro* de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I en presencia de SUV visualizada mediante Western-Blot, en la que se observa una proteína de 250 kDa correspondiente al oligómero, con excepción de las mutantes R99E y Y107E, que fueron afectadas en su toxicidad. B) Análisis de la estabilidad a temperatura de los oligómeros de Cry1Ab silvestre y de la mutante R99E, visualizada mediante Western-blot, en la que se observa la inestabilidad del oligómero de esta mutante. C) Cromatografía de exclusión de peso molecular de Cry1Ab silvestre y mutantes R99E y Y107E, activadas con SUV. Después de delipidarlas, la fracción soluble se pasó a través de la columna, encontrando que ambas mutantes eluyeron en las fracciones correspondientes al monómero, mientras que la toxina silvestre lo hizo en las fracciones correspondientes al oligómero.

Finalmente, la oligomerización de las mutantes R99E y Y107E también fue evaluada mediante cromatografía de exclusión de peso molecular. Para lo cual, las mutantes fueron

activadas en presencia de SUV, después fueron delipidadas con tritón X-100 y finalmente se pasaron a través de la columna Superdex 200 HR. Previamente fue reportado que el oligómero de Cry1Ab eluye en las fracciones 10 y 11 mientras que el monómero eluye en las fracciones 17 a la 18 [90]. Como se observa en la figura 19C, la toxina silvestre eluyó en las fracciones correspondientes al oligómero (fracción 10) mientras que las mutantes R99E y Y107E eluyeron en las fracciones correspondientes al monómero (fracción 17). Con lo anterior se demostró que los oligómeros formados por estas mutantes fueron sensibles a la delipidación, confirmando su inestabilidad.

7.9 Análisis de formación de poro en bicapas lipídicas planas.

Finalmente, para analizar si los oligómeros inestables formados por las mutantes R99E y Y107E eran funcionales, es decir, si presentaban actividad de formación de poro, se evaluó esta actividad en bicapas lipídicas planas. Es importante mencionar que la actividad de formación de poro, del monómero y el oligómero de Cry1Ab puros, ya ha sido evaluada en trabajos previos, utilizando bicapas lipídicas planas. El resultado de un trabajo realizado por Rausell et al., 2004, se observa en la figura 20, en la que se aprecia que el oligómero puro indujo cambios en la amplitud de la corriente, donde el cero está ausente, que corresponden a un canal con una conductancia muy estable, el cual se mantiene abierto casi todo el tiempo (figuras 20C y D); mientras que el monómero, mostró estados de subconductancia inestables y permanece cerrado en conductancia cero mucho más tiempo (figuras 20A y B). Además, es importante mencionar que mientras el oligómero mostró respuesta a una concentración de 6 nM, se requirió veinte veces más monómero (150 nM) para inducir la actividad de canal iónico [90].

Por otra parte, después de activar las toxinas Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I en presencia de liposomas de fosfatidilcolina (SUV), se verificó la presencia del oligómero insertado en la membrana mediante Western blot; y finalmente, el oligómero se fusionó a las bicapas planas de fosfatidilcolina. Las mediciones de actividad de poro se efectuaron en un gradiente de KCl 300/10 nM en los compartimentos *cis/trans* para facilitar la inserción de los liposomas en la bicapa. Después de la fusión, se aplicó una corriente

igual a -40 mV, y se monitorearon los cambios de corriente, inducidos por la formación del canal iónico, a lo largo de un lapso de tiempo. En seguida estos cambios se graficaron mediante los programas Digidata 1200 interface, Axotape y pClamp, tal como se detalla en la metodología. Este estudio electrofisiológico fue realizado con ayuda del Dr. Carlos Muñoz.

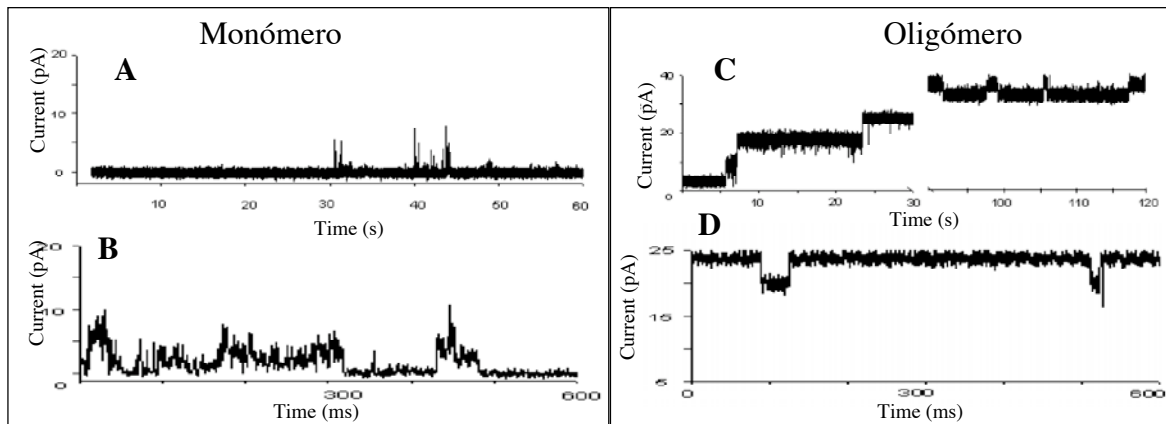


Figura20. Análisis de formación de poro del monómero y oligómero puros de la toxina Cry1Ab en bicapas lipídicas planas (Rausell, et al., 2004). A) Trazo que muestra la actividad de formación de poro del monómero en un lapso de 60 segundos, en el que se actividad de formación de poro nula (conductancia cercana a cero). B) Trazo de 600 segundos que muestra estados de subconductancia inestables inducidos por el monómero de Cry1Ab. C) Trazo de 120 segundos, en el que se observan cambios en la corriente inducidos por el oligómero, en donde el cero está ausente, lo que indica actividad de formación de poro. D) Trazo de 600 segundos que muestra la formación de un canal estable, inducido por el oligómero, que se mantiene abierto casi todo el tiempo.

El resultado de este experimento se muestra en la figura 21A, en la que se observa el cambio de la amplitud de corriente inducido por la toxina Cry1Ab silvestre. Este trazo de 12 segundos corresponde a la formación de un canal estable con una alta probabilidad de apertura, tal como se había observado en los ensayos realizados con el oligómero puro de Cry1Ab (Figuras 20C y D). Las mutantes I200D y Y203D de la hélice α -6, que conservaron su toxicidad y formaron oligómeros similares a los de la toxina silvestre, también formaron poros estables con características idénticas a las de la toxina silvestre, tal como se observa

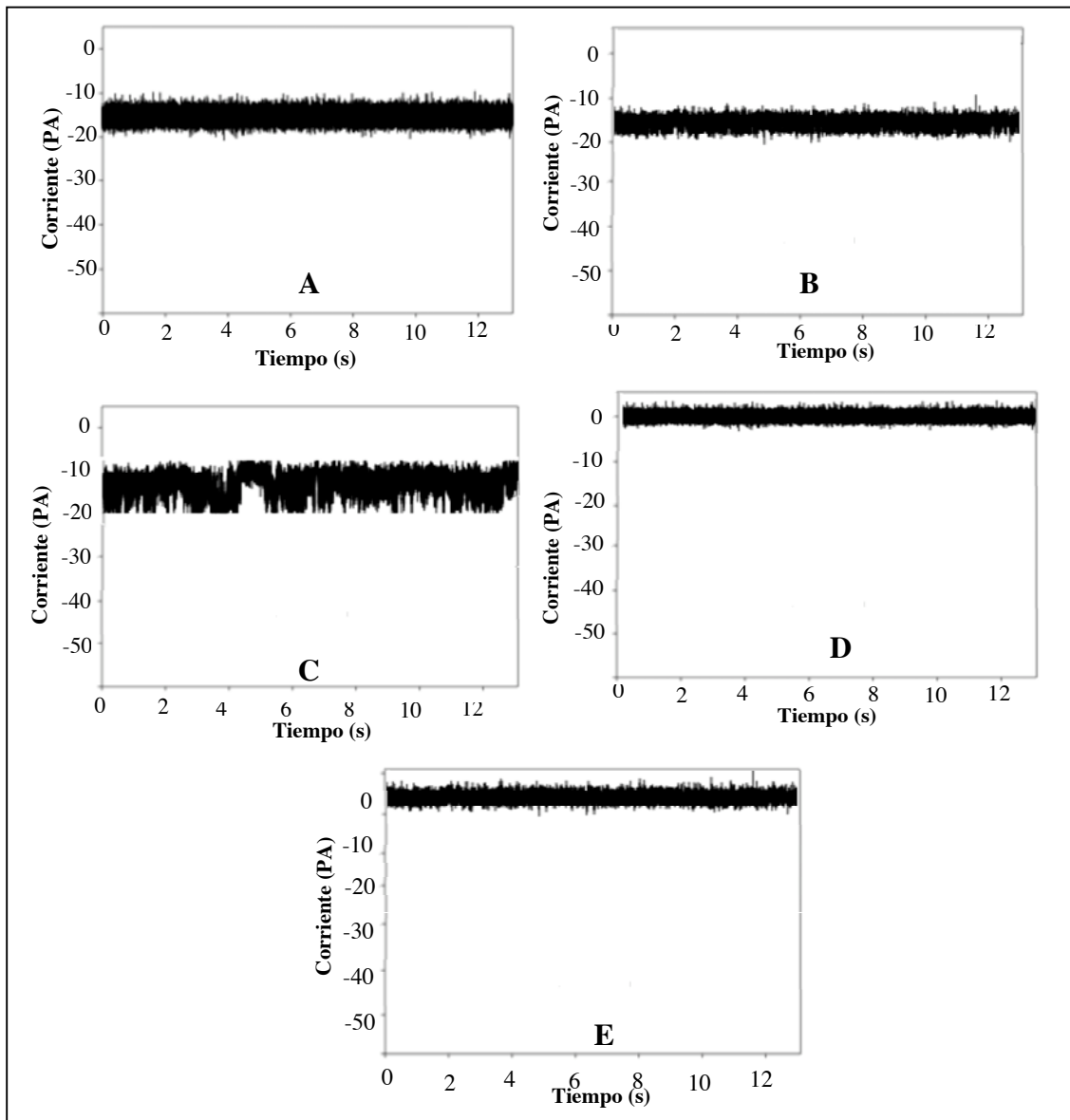


Figura 21. Ensayo de actividad de formación de poro en bicapas lipídicas planas de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I. En todos los gráficos se muestra el trazo correspondiente al cambio de amplitud de corriente inducido por el oligómero de las diferentes toxinas, evaluado en un lapso de tiempo de 12 segundos. A) Trazo para el oligómero de Cry1Ab silvestre que muestra la formación de un poro estable. En los trazos de las mutantes I200D (B) y Y203D (C) se observa que los cambios en la amplitud de corriente, corresponden a poros similares a los de la toxina silvestre. En cambio, los trazos de las mutantes R99E (D) y Y107E (E) muestran que la corriente permanece en cero, lo que indica la ausencia de actividad de formación de poro.

en las figuras 21B y 21C. En cambio, las mutantes R99E y Y107E de la hélice α -3, que perdieron toxicidad y no oligomerizaron, no presentaron actividad de formación de poro, tal como se observa en las figuras 21D y 21E. Por último, la mutante L100E también ubicada en la hélice α -3, que fue dos veces más tóxica y que si oligomerizó, presentó una actividad de formación de poro diferente a la silvestre, ya que indujo una corriente mayor, lo cual podría significar una inserción más eficiente de la toxina durante la activación o la formación de un oligómero con diferentes propiedades cinéticas (Figura 22A).

Adicionalmente, en la figura 22B se muestran las curvas corriente-voltaje (I/V) correspondientes a la toxina Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I. Esta figura muestra el resultado del ensayo de formación de poro, después de aplicar corriente a diferentes valores de voltaje. Este resultado confirma que las mutantes I200D y Y203D de la hélice α -6, formaron poros muy semejantes a la toxina silvestre; en cambio, las mutantes R99E y Y107E de la hélice α -3, que perdieron toxicidad y no oligomerizaron, no presentaron actividad de formación de poro.

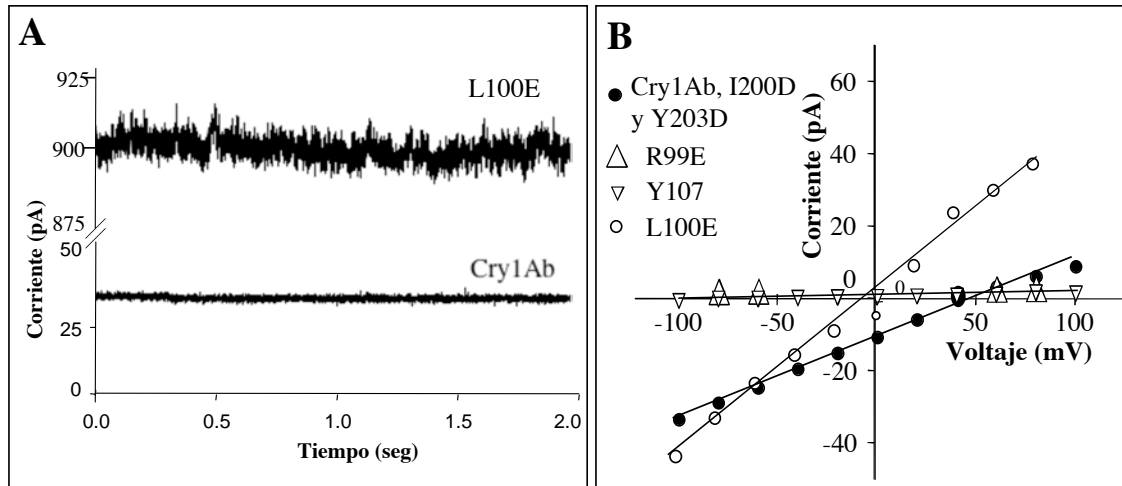


Figura 22.A) Actividad de formación de poro de Cry1Ab silvestre y mutante L100E evaluada en bicapas lipídicas planas. Ambos trazos muestran que los oligómeros de estas toxinas indujeron la formación de canales, pero el cambio en la corriente inducido por la mutante L100E fue mucho mayor al de la toxina silvestre. B) Curvas corriente-voltaje de las mutantes del dominio I de Cry1Ab, en las que se muestran los cambios en la conductancia inducidos por los oligómeros de Cry1Ab silvestre y mutantes a diferentes valores de voltaje.

8. DISCUSIÓN

Las toxinas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis* han sido usadas como bioinsecticidas durante las últimas décadas. Se clasifican dentro del grupo de toxinas formadoras de poro (PFT), ya que su acción primaria es lisar las células del epitelio intestinal de los insectos blanco mediante la formación de poros líticos. Este es el modo de acción general también presente en otras toxinas formadoras de poro como las colicinas, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, la toxina diftérica, la aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, la α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, la toxina del ántrax, entre otras. Básicamente, las toxinas formadoras de poro son producidas como proteínas solubles que tras una serie de cambios estructurales forman una estructura oligomérica, que es competente para insertarse en la membrana. En el caso de las toxinas Cry1A, se ha propuesto que la estrategia utilizada para insertarse en la membrana es oligomerizar y pasar a un estado “molten globule” [81]. En este estado, la flexibilidad de la toxina se incrementa, lo cual es promovido por el pH alcalino. Se ha reportado que en el estado “molten globule”, los dominios II y III de la toxina Cry1Ab permanecen más flexibles, mientras que el dominio I está estructurado [81].

Respecto a cuales son las regiones en la toxina Cry monomérica involucradas en la oligomerización, poco se sabe. En un trabajo de proteólisis limitada realizado con el oligómero de la toxina Cry1Ab y proteinasa K, se demostró que mientras el dominio I fue protegido de la proteólisis, los dominios II y III se degradaron completamente, implicando que las interacciones monómero-monómero se llevan a cabo a través del dominio I. Sin embargo, debido a que a la fecha no se conoce la estructura del oligómero de ninguna toxina Cry1A, se desconoce cuales son las regiones de este dominio involucradas en la oligomerización.

Como se mencionó anteriormente, existen algunos reportes de caracterización de mutantes puntuales de las hélices α del dominio I de diferentes toxinas Cry1A, cuya pérdida de toxicidad se relacionó directamente con la pérdida de actividad de formación de poro. En dos de estos trabajos realizados con mutantes del dominio I de la toxina Cry1Ac, específicamente en las hélices α_4 y α_5 , se correlacionó la pérdida de toxicidad con la

ausencia de oligomerización. No obstante, ambos trabajos fueron inconsistentes y poco objetivos en su interpretación, puesto que no purificaron el oligómero observado y además presentaron datos que contradicen la participación de estas hélices en la oligomerización. La contradicción radica en que la mutante H168R con mayor actividad tóxica, no formó un oligómero de masa molecular igual a 200 kDa, pero si formó un agregado de aproximadamente 250 kDa, también presente en la toxina silvestre y que es similar al reportado por nuestro grupo. Sin embargo, sin haber purificado ambas proteínas para analizar cuál es la responsable de la formación de poro, sugieren que el oligómero funcional es la proteína de 200 kDa y no la de 250 kDa, por lo que la conclusión es confusa.

En un intento por entender cual es el papel de las hélices α del dominio I en la oligomerización de toxinas Cry, realizamos un experimento en el que se compitió la oligomerización de Cry1Ab con diferentes péptidos sintéticos correspondientes a las hélices α del dominio I. El resultado fue que solo la hélice α_3 inhibió completamente la oligomerización de la toxina Cry1Ab, mientras que el resto de las hélices no lo hicieron, implicando que la hélice α_3 podría jugar un papel importante en la oligomerización.

En relación a la hélice α_3 , existen dos trabajos reportados a la fecha. En uno de ellos se realizó la mutagénesis de algunos aminoácidos cargados de la hélice α_3 de la toxina Cry1Aa, encontrando que únicamente las mutantes en posición R99 perdieron completamente su toxicidad y actividad de formación de poro. En el otro trabajo, se mutageneizó una región hidrofóbica del dominio I altamente conservada, encontrando que solo el residuo R93 perdió completamente su toxicidad. No obstante, en ninguno de los dos trabajos se evaluó el paso de oligomerización.

Adicionalmente, dado que el dominio I de las toxinas Cry está formado por siete hélices α , hipotetizamos que podrían formar estructuras tipo coiled-coil o zippers de leucina, los cuales participan en la oligomerización de diferentes proteínas. Para validar esta hipótesis, se utilizó el programa COILS que predice la probabilidad de formación de coiled-coils a partir de una secuencia primaria de interés. Tras efectuar el análisis de la

toxina Cry1Ab con este programa, se encontró que si existe una cierta probabilidad de formación de coiled-coils para las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 6$, siendo más alta para la hélice $\alpha 3$. Como fue mencionado anteriormente, las posiciones *a* y *d*, dentro del coiled-coil, que son ocupadas por residuos hidrofóbicos, son importantes para las interacciones proteína-proteína, ya que mutaciones en estas posiciones afectan la estabilidad de la interacción. Es importante destacar que la presencia de residuos cargados en las posiciones *a* y *d* en algunos coiled-coils se ha correlacionado con el alineamiento, la orientación y la selectividad de los coiled-coils, contribuyendo considerablemente a su estabilidad. En el caso de las toxinas Cry1A hay una arginina (R) en posición 93, al inicio de la hélice $\alpha 3$, que está altamente conservada en la familia de toxinas Cry, que podría estar jugando un papel muy importante en la estabilidad del coiled-coil. Además, se ha reportado que la presencia de un puente salino dentro de las hélices que forman los coiled-coils estabiliza la estructura. Es importante mencionar que existe un puente salino intrahelical en la hélice $\alpha 3$ de las toxinas Cry1A, en cuya formación participa el residuo R93. Aunado a esto, los residuos en las posiciones *a* y *d* de la hélice $\alpha 3$ están altamente conservados en toda la familia de toxinas Cry, sugiriendo que esta hélice es altamente estable y podría jugar un papel importante en la oligomerización.

Por lo anterior, se diseñaron mutantes en las posiciones *a* y *d* de las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 6$. En total se construyeron diez mutantes, de las cuales únicamente cinco produjeron cristales de tamaño normal y fueron activadas correctamente (R99E, Y107E, L100E, I200D y Y203D). Las otras cinco (R93F, L103E, Y110E, Y193D y L196D) produjeron cristales pequeños e inestables, por lo que resultó imposible su análisis. La inestabilidad de estas últimas cinco mutantes probablemente se debió a que estos aminoácidos se orientan hacia el interior de las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 6$ en la toxina monomérica (figura 11B), por lo que estos residuos podrían jugar un papel importante en la estructuración de la proteína. No existen reportes en la literatura en los que se hayan construido mutantes en estas posiciones, con excepción del residuo R93F. Al respecto, en un trabajo realizado con la toxina Cry1Ac, el residuo R93, ubicado en posición *a* del coiled-coil de la hélice $\alpha 3$, se sustituyó por diferentes aminoácidos, encontrando que únicamente las mutantes con aminoácidos cargados positivamente conservaron la toxicidad, mientras que cualquier otro cambio

ocasionó la pérdida completa de toxicidad. Los autores hipotetizaron que una carga positiva en esta posición podría participar en la formación de un dominio de unión específico en la membrana o con algún receptor, o que la presencia de esta carga afectaría la conformación de este dominio, lo que podría interferir indirectamente con la especificidad de la toxina. No obstante, ni la oligomerización ni la formación de poro fueron analizados.

Por su parte, las mutantes que produjeron cristales estables, fueron evaluadas en cada paso de su mecanismo de acción: solubilización, activación proteolítica, unión a receptor, oligomerización y formación de poro. De manera interesante, únicamente las mutantes R99E y Y107E, ambas ubicadas en la hélice $\alpha 3$, perdieron severamente su toxicidad. Esta pérdida de toxicidad se debió a que ambas mutantes formaron oligómeros inestables, sensibles al calor y al SDS. Aunado a esto, después de evaluar la actividad de formación de poro de estos oligómeros, se encontró que ninguna de estas mutantes formó poros funcionales. En cambio, la toxina silvestre, así como las mutantes de la hélice $\alpha 6$ que conservaron su toxicidad y que si oligomerizaron, si presentaron actividad de formación de poro. Con base en esta información logramos establecer una correlación directa entre la pérdida de toxicidad y la oligomerización. Sustentando el modelo de acción propuesto por nuestro grupo, en el que es necesaria la formación de un pre-poro oligomérico, el cual es la unidad competente para insertarse en la membrana y formar el poro lítico.

Finalmente, es importante destacar que después de evaluar la unión de las mutantes R99E y Y107E a la membrana intestinal de *M. sexta* y a un fragmento del receptor Bt-R1, demostramos que si se unieron, con una afinidad similar a la de la toxina Cry1Ab silvestre. Este dato nos permite afirmar que la sola unión de estas mutantes al receptor Bt-R1 no fue suficiente para causar la toxicidad, tal como proponen Zhang, et al., en su modelo de señalización celular. Por lo que podemos afirmar que se requieren eventos posteriores como son la oligomerización y formación de poro para matar eficientemente a las larvas del insecto *M. sexta*.

De cualquier forma, no podemos excluir la posibilidad de que una respuesta intracelular tenga un papel sinérgico en la actividad de toxinas Cry1A en larvas de insecto.

Por ejemplo, en otras toxinas formadoras de poro como la α -toxina de *Staphylococcus aureus* y la aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, la muerte celular es provocada mediante dos mecanismos, formación de poro y apoptosis, dependiendo del tipo celular y de la dosis de toxina. La sobre expresión de una proteína anti-apoptótica bloquea la apoptosis inducida por aerolisina, sin embargo este efecto solo se observa a bajas concentraciones de toxina. Mientras que a concentraciones elevadas de toxina, las células mueren rápidamente y la apoptosis no es activada. Por otro lado, para la aerolisina fue demostrado que la apoptosis no es provocada por la unión de la toxina al receptor, sino por la producción de un número pequeño de canales en la membrana, indicando que los efectos intracelulares son dirigidos por la formación de poro y la desporalización de la membrana. Los resultados presentados en este trabajo apoyan que la formación de poro inducida por la toxina oligomérica es requerida para la toxicidad de toxinas Cry1A *in vivo*.

9. CONCLUSIONES

Después de construir y evaluar las mutantes de los coiled-coils predichos para las hélices α -3 y α -6 del dominio I de la toxina Cry1Ab, en cada uno de sus pasos del mecanismo de acción, concluimos que la hélice α 3 participa en el proceso de oligomerización. Esta conclusión está basada en el hecho de que las mutantes R99E y Y107E, ubicadas en las posiciones *g* y *a* del coiled-coil de la hélice α 3, perdieron completamente su toxicidad, dado que fueron afectadas en su capacidad de oligomerizar y formar poros funcionales, pero no fueron afectadas en ningún otro paso del mecanismo de acción. Lo anterior también implica, que es necesaria la formación de un pre-poro oligomérico previo a la formación del poro lítico. Por lo que con estos resultados, validamos el modelo del mecanismo de acción Bravo-Soberón, en el que se propone que la unidad competente para insertarse en la membrana es el pre-poro oligomérico y que para que la toxina ejerza su efecto tóxico es necesaria la formación de un poro lítico, tal como ocurre en otras toxinas formadoras de poro.

En segundo lugar, también demostramos que las mutantes R99E y Y107E se unieron a un fragmento del receptor Bt-R1 con una afinidad similar a la de la toxina Cry1Ab silvestre, no obstante, perdieron completamente su toxicidad, al ser evaluadas en un modelo *in vivo*, utilizando larvas del lepidóptero *M. sexta*, por lo que concluimos que la sola interacción de la toxina monomérica con el receptor Bt-R1 no es suficiente para inducir la muerte del insecto, tal como se hipotetiza en el modelo de señalización celular propuesto por Zhang, et al. Es posible que una diferencia importante sea el modelo de estudio, ya que en el trabajo de Zhang se utilizó una línea celular que no proviene de intestino larvario por lo que este modelo de estudio "*in vitro*" del mecanismo de acción de toxinas Cry pudiera estar presentando particularidades de células que no representan lo que ocurre *in vivo* dentro de la larva.

Por su parte, la mutante L100E, ubicada en posición *a* del coiled-coil de la hélice α 3, fue dos veces más tóxica que Cry1Ab silvestre, presentando una actividad de formación de poro con características diferentes a las de la toxina silvestre, al parecer debida a una

inserción más eficiente. Por lo que es necesario evaluar esta mutante a nivel de canal unitario, para poder concluir si esta mutación afectó las propiedades del canal o si esta actividad mayor se deba a una mayor eficiencia de inserción en los liposomas.

Respecto a la hélice α_6 , encontramos que, las mutantes I200D y Y203D, ubicadas en posiciones *a* y *d*, respectivamente, conservaron completamente su toxicidad, oligomerizaron y formaron poros con características similares a los de la toxina silvestre. Por lo anterior, concluimos que éstos aminoácidos no participan en la oligomerización. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que otros residuos de la hélice α_6 si jueguen un papel en la oligomerización, por lo que es necesaria la construcción de nuevas mutantes, en otras regiones de ésta hélice.

Por otra parte, es importante recordar que las mutantes R93F, L103E, Y110E, Y193D y L196D produjeron cristales inestables, lo que podría implicar que estas posiciones juegan un papel importante en la estructuración del cristal. Sin embargo no fue el objetivo de este trabajo estudiar más a detalle este proceso.

10. PERSPECTIVAS

Si bien, demostramos que los residuos R99E y Y107E de la hélice α -3 participan en la oligomerización de la toxina Cry1Ab, es necesario realizar una mutagénesis exhaustiva tanto de ésta hélice así como de las otras hélices del dominio I, para elucidar el papel de otros residuos en la oligomerización. Respecto a esto, es importante mencionar que en este trabajo se realizó la competencia de la oligomerización de Cry1Ab con los péptidos sintéticos correspondientes a las diferentes hélices del dominio I, encontrando que la hélice α -3 inhibió la oligomerización, no obstante, no observamos este efecto con ninguna de las otras hélices. Esto último pudo deberse a que los péptidos sintéticos estuvieron menos estructurados o a que fueron más sensibles a degradación por las condiciones del ensayo. Por lo que, otra estrategia que proponemos es evaluar las interacciones entre las hélices α del dominio I mediante otro tipo de experimento como es el ensayo de complementación de la actividad enzimática dehidrofolato reductasa, tal como fue reportado por Pelletier, et al [84]. Al respecto, hemos comenzado con esta parte del trabajo pero no podemos concluir nada hasta el momento.

Además, hemos comenzado a trabajar con una colección de mutantes de las hélices α 3 y α 4 de la toxina Cry1Aa, proporcionadas por el Dr. Luke Masson, las cuales se reportó que fueron afectadas en su toxicidad pero el proceso de oligomerización no fue evaluado. Algunas de ellas fueron evaluadas en el paso de formación de poro, y la mayoría no formaron poros funcionales. Con estas mutantes afectadas en la formación de poro, también hemos comenzado a evaluar si presentan fenotipo dominante negativo, es decir si alguna de las mutantes es capaz de abatir la toxicidad de la toxina silvestre, al combinarla en una relación 1:1. Si probáramos que esto es posible, esto constituiría una prueba más de que la formación del poro es fundamental para la toxicidad de las toxinas Cry1A. Podemos decir que resultados preliminares con la mutante D136N, que no forma poro pero si oligomeriza, mostraron que es capaz de inhibir la toxicidad de Cry1Ab en bioensayos realizados *in vivo* con larvas de *M. sexta*. Este dato sugiere que se forman hetero-oligómeros incapaces de formar poro. No obstante, estos datos deben confirmarse por lo que proponemos terminar el análisis de esta colección de mutantes para tener datos sólidos al respecto.

También sería de gran importancia evaluar si los dominios II y III participan en la oligomerización o si esta función la realiza únicamente el dominio I. Aunque aún no hemos explorado esta parte, cabe mencionar que hemos iniciado la construcción de los cristales bidimensionales del oligómero de Cry1Ab con la finalidad de poder elucidar su estructura mediante microscopía electrónica de transmisión. A la fecha, hemos avanzado en la construcción de estos cristales, usando la técnica de reconstitución de proteínas. Los resultados obtenidos con la toxina mutante Cry1Ab $\Delta\alpha 1$ activada en presencia de octiltiogluósido y el uso de bio-beads, son prometedores, ya que logramos ver arreglos estructurados del oligómero que en un futuro podrían ser analizados para la reconstitución de la estructura del oligómero. Esperamos obtener buenos resultados en esta parte puesto que con la estructura elucidada podríamos responder a muchas preguntas sobre cómo ocurren las interacciones entre monómeros al interior de la estructura oligomérica en solución, así como el oligómero insertado en membrana.

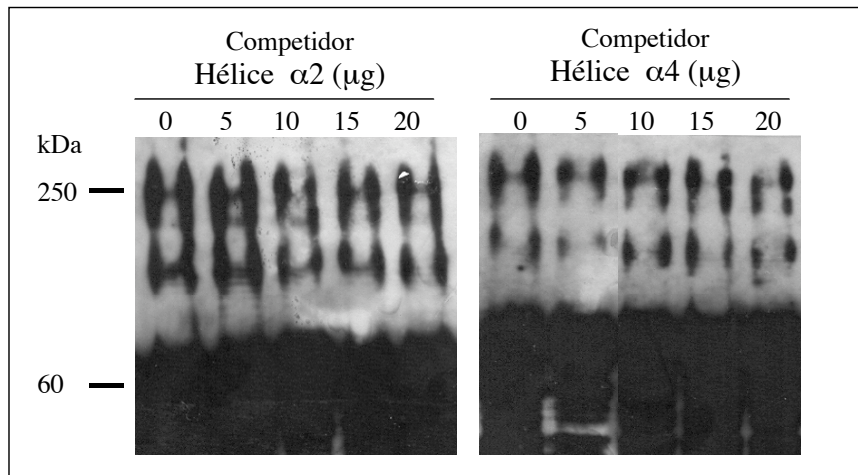
Los resultados de este trabajo fueron publicados en las revistas *Journal of Biological Chemistry*, 2007 Jul 20;282(29):21222-9 y *Peptides*, 2008 29:318-323. Estos trabajos se anexan en los apéndices I y II al final de la tesis.

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
APN	Aminopeptidasa N
ALP	Fosfatasa alcalina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANS	1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Enzima que realiza la hidrólisis de ATP
BSA	Albúmina sérica bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bt-R1	Caderina de <i>Manduca sexta</i>
Bt-R175	Caderina de <i>Bombix mori</i>
CBMs	Moléculas de unión a carbohidratos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima
FRET	Transferencia de energía fluorescente en resonancia
FSK	Forskolin (activador de la adenilato ciclasa)
GalNac	N-acetilgalactosamina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HevCaLP	Caderina de <i>Heliothis virescens</i>
HvALP	Fosfatasa alcalina de <i>Heliothis virescens</i>
I	Yoduro
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
K_D	Constante de disociación aparente
KDa	Kilo-daltones
Kpb	Kilo-pares de bases
LC₅₀	Dosis letal media
PBS	Buffer fosfato de sodio
PC	Fosfatidilcolina
PFTs	Toxinas formadoras de poro
PKA	Fosfocinasa A
Probit	Unidades de probabilidad
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
RET	Transferencia de energía en resonancia
scFv	Fragmento de anticuerpo de cadena sencilla de la región variable
scFv73	Fragmento de anticuerpo que mimetiza al receptor Bt-R1
SDS	Sodio duodecil disulfato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizante
SP	Medio de esporulación
SUV	Vesículas unilaminares pequeñas
Trp	Triptófano
VVMA	Vesículas de vellosidad de membrana apical

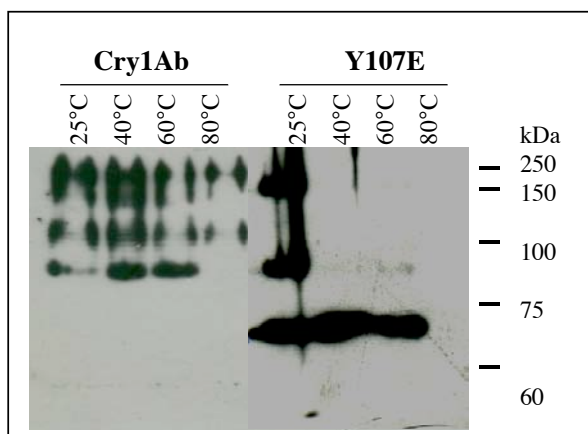
ANEXO I

Competencias de la oligomerización de Cry1Ab realizadas *in vitro* con los péptidos sintéticos de las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 4$ del dominio I. A) Se muestra el Western-blot de la activación de Cry1Ab realizada en presencia de concentraciones crecientes del péptido sintético de la hélice $\alpha 2$. El oligómero se formo incluso cuando se compitió a concentraciones de 20 μg . B) Se observa el el Western-blot de la activación de Cry1Ab realizada en presencia de concentraciones crecientes del péptido sintético de la hélice $\alpha 4$. Este péptido tampoco inhibió la oligomerización de Cry1Ab.



ANEXO II

Ensayo de estabilidad a temperatura del oligómero de la toxina Y107E, visualizado mediante Western-blot, en el que se observa que el oligómero de esta mutante, al igual que la mutante R99E, fue sensible a temperatura a comparación de la toxina silvestre, cuyo oligómero es estable a temperatura.



APÉNDICE I

CONTRIBUCIÓN ORIGINAL

***Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation
are non-toxic to *Manduca sexta* larvae**

Nuria Jiménez-Juárez, Carlos Muñoz-Garay, Isabel Gómez, Gloria Saab-Rincon, Juanita Y. Damian-Almazo, Sarjeet S. Gill, Mario Soberón y Alejandra Bravo.

The Journal of Biological Chemistry. 2007, 282 (29):21222-21229

Bacillus thuringiensis Cry1Ab Mutants Affecting Oligomer Formation Are Non-toxic to *Manduca sexta* Larvae*

Received for publication, February 15, 2007, and in revised form, May 23, 2007. Published, JBC Papers in Press, May 30, 2007, DOI 10.1074/jbc.M701314200

Nuria Jiménez-Juárez¹, Carlos Muñoz-Garay², Isabel Gómez², Gloria Saab-Rincon², Juanita Y. Damian-Almazo², Sarjeet S. Gill³, Mario Soberón², and Alejandra Bravo^{1,1}

From the ¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. 510-3, Av. Universidad 2002, Col. Chamizal CP 62250, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico and the ²Department of Cell Biology and Neuroscience, University of California, Riverside, California 92506

Pore-forming toxins are biological weapons produced by a variety of living organisms, particularly bacteria but also by insects, reptiles, and invertebrates. These proteins affect the cell membrane of their target, disrupting permeability and leading eventually to cell death. The pore-forming toxins typically transform from soluble, monomeric proteins to oligomers that form transmembrane channels. The Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis* are widely used as insecticides. These proteins have been recognized as pore-forming toxins, and their primary action is to lyse midgut epithelial cells in their target insect. To exert their toxic effect, a pre-pore oligomeric intermediate is formed leading finally to membrane-inserted oligomeric pores. To understand the role of Cry oligomeric pre-pore formation in the insecticidal activity we isolated point mutations that affected toxin oligomerization but not their binding with the cadherin-like, Bt-R₁ receptor. We show the helix α -3 in domain I contains sequences that could form coiled-coil structures important for oligomerization. Some single point mutants in this helix bound Bt-R₁ receptors with similar affinity as the wild-type toxin, but were affected in oligomerization and were severely impaired in pore formation and toxicity against *Manduca sexta* larvae. These data indicate the pre-pore oligomer and the toxin pore formation plays a major role in the intoxication process of Cry1Ab toxin in insect larvae.

Bacillus thuringiensis (Bt)² is a Gram-positive bacterium that produces insecticidal Cry toxins. Cry proteins are widely used for insect control in agriculture and forestry and against mosquitoes, due to their high specificity and safety for humans and for the environment (1, 2).

* This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant 46176-Q), by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (Grants IN206200 and IN216300), by National Institutes of Health Grant R01 AI066014, and by U. S. Department of Agriculture Grant 2207-35607-17780. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-777-329-1635; Fax: 52-777-317-2388; E-mail: bravo@ibt.unam.mx.

² The abbreviations used are: Bt, *B. thuringiensis*; Bt-R₁, cadherin-like Bt receptor; PC-SUV, phosphatidylcholine-small unilamellar vesicles; BBWV, brush-border membrane vesicle; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HRP, horseradish peroxidase; FA, protective antigen; wt, wild type; CHES, 3-(3-cyclohexylamino)ethanesulfonic acid.

Although Bt Cry toxins are widely used as insecticides their mode of action is still not completely understood. These Cry toxins are pore-forming toxins that induce cell death by forming ionic pores following insertion into the membrane, causing osmotic lysis of larvae midgut cells (1–3). However, recently an alternative model proposed that these toxins activate a signal pathway through Bt-R₁ receptor interaction, which results in insect cell death without the participation of lytic pores into the membrane (4). It is important to note that this alternative model was proposed based on the effect of Cry1Ab toxin to cultured *Trichoplusia ni* H5 insect cells expressing the *Manduca sexta* toxin receptor, Bt-R₁.

Nevertheless, in both models, receptor interaction with exposed regions in domains II and III of Cry1A toxins (1–4) is a key step that determines insect toxicity. In the case of Cry1A toxins, two receptors have been characterized in several lepidopteran species: cadherin-like proteins, known as Bt-R receptors (5) (Bt-R₁ in the case of *M. sexta*), and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, as aminopeptidase-N or alkaline phosphatase (6, 7).

In the pore-forming model, it is proposed that both receptors are important and participate in a sequential manner (3, 8, 9). After proteolytic activation of Cry1A protoxin by insect midgut proteases, the activated toxin binds to a Bt-R receptor, and this interaction facilitates additional cleavage of the N-terminal end of the toxin, resulting in the formation of a pre-pore oligomer (10). This oligomeric structure has been observed in several Cry toxin members of the three-domain family (11–17). The pre-pore binds to a second receptor, a glycosylphosphatidylinositol-anchored aminopeptidase, due to its higher affinity to this receptor, facilitating insertion of the oligomeric toxin into membrane lipid rafts resulting in pore formation (3, 18). However, a glycosylphosphatidylinositol-anchored alkaline phosphatase protein has been also recognized as a Cry1Ac receptor in *Heliothis virescens* and *M. sexta* (7, 8). This receptor could also participate in facilitating pore membrane insertion potentially explaining why Cry1Ac toxin mutations that were severely affected in aminopeptidase binding were still active against *M. sexta* larvae (19, 20). In this model, the pre-pore oligomer is responsible for initiating cell death.

In other pore-forming toxins mutations affecting toxin oligomerization correlated with a severe disruption in toxicity, suggesting that oligomerization is an essential step (21–25). To determine the role of oligomer formation for Cry1Ab toxin action, we isolated and characterized single point mutations



that affected toxin oligomerization. We show that domain I helix α -3 contains sequences that potentially form coiled-coil structures important for oligomerization. The α -helical coiled-coils, also called leucine zippers, constitute an important protein-folding motif (26). These coiled-coil structures are formed in the interaction between two to five α -helices and are involved in oligomerization of several proteins, forming specific oligomers with high thermodynamic stability (27). Site-directed mutagenesis in helix α -3 results in CryIAb mutants, which still bind Bt-R₁ receptor as the wild-type toxin but are affected in their oligomerization, resulting in a complete loss of pore formation activity and non-toxic against *M. sexta* larvae. These results indicate that the pre-pore oligomer is an obligate intermediate in the intoxication process of CryIAb toxin.

MATERIALS AND METHODS

Construction of Coiled-coil Mutants—Residues localized at positions *a* and *d* of the coiled-coil structures predicted for helices α -3 and α -6 were selected for mutagenesis. Substitutions L100E, L103E, Y107E, and Y110E were produced by site-directed mutagenesis (QuikChange, Stratagene, La Jolla, CA) using the pHT315Ab plasmid harboring the *cryIAb* gene, and substitutions R93F, R99E, Y193D, L196D, I200D, and Y203D were obtained by overlap-extension PCR as described (28) using a *Cla*I fragment of *cryIAb* gene cloned into pBluescript-SK (Stratagene, CA) as template. Automated DNA sequencing at facilities of the Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México verified the single point mutations. The mutated *Cla*I fragments were obtained by restriction and subcloned into pHT315Ab Δ *Cla*I. Acrylamidiferous *B. thuringiensis* strain 407 was transformed with the recombinant plasmids containing the mutated *cryIAb* genes as reported (29) and selected in Luria broth at 30 °C supplemented with 10 μ g ml⁻¹ erythromycin.

CryIAb Toxin Purification—*B. thuringiensis* transformant strains were grown for 3 days at 30 °C in nutrient broth sporulation medium supplemented with 10 μ g ml⁻¹ erythromycin until complete sporulation. Crystal inclusions were observed under phase-contrast microscopy and purified by sucrose gradients (30). Purified crystals were solubilized in 50 mM Na₂CO₃, 0.2% β -mercaptoethanol, pH 10.5. The monomeric toxins were obtained by trypsin activation in a mass ratio of 1:20 (1 h at 37 °C). Phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM final concentration) was added to stop proteolysis. The oligomeric CryIAb structure was produced as described previously (10, 11) or by incubation of 0.2 μ g of protoxin with scFv73 antibody (mass ratio 1:2) and 5% midgut juice from *M. sexta* larvae, in 100 μ l of solubilization buffer for 1 h at 37 °C in the presence of phosphatidylcholine-small unilamellar vesicles (PC-SUVs) prepared as reported (11) at 12 μ M final concentration. The membrane fraction was separated by ultracentrifugation (30 min at 430,000 \times g), and the pellet was suspended in 20 μ l of 10 mM CHES, 150 mM KCl, pH 9. Finally, the CryIAb toxin inserted into the liposomes was visualized by Western blot. A control without PC-SUV was included, and under this condition no protein or pellet was recovered after centrifugation.

Western Blot of CryIAb Toxin—Wild-type and CryIAb mutant proteins incorporated into PC-SUV were boiled 5 min

in Laemmli sample loading buffer, separated in SDS-PAGE, and electrotransferred onto nitrocellulose membrane. The proteins were detected in Western blots (10, 11) using polyclonal anti-CryIAb (1/30,000, 1 h) and a secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (HRP, Sigma) (1/5,000, 1 h) followed by luminol (ECL, Amersham Biosciences) as described by the manufacturers.

scFv73 Antibody Purification—Antibody scFv73 was purified from *Escherichia coli* cells by a nickel-agarose column as described previously (10).

Size-exclusion Chromatography—60 μ M SUV containing the activated CryIAb toxins (mutant or wild-type) were solubilized 1 h at 25 °C with 100 μ l of 10% (v/v) Triton X-100 and clarified by centrifugation at 152,000 \times g for 60 min at 4 °C. Detergent extracts were then applied to Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) fast-protein liquid chromatography size exclusion with a mobile phase of phosphate-buffered saline/1 mM EDTA plus 0.1% Triton X-100 (31). Fraction samples were analyzed in Western blot using polyclonal anti-CryIAb antibody as above.

Bioassays—Different doses of pure crystals (from 0.1 to 2000 ng/cm²) were applied onto the diet surface of 24-well polystyrene plates (Cell Wells, Corning, NY), one first instar *M. sexta* larvae per well, using 24 larvae per toxin concentration in three repetitions (10). The plates were incubated at 28 °C with 65% \pm 5% relative humidity and a light-dark photoperiod of 16:8 h. Mortality was recorded after 7 days, and the 50% lethal concentration (LC₅₀) was estimated by using Probit analysis (Polo-PC LeOra Software).

Preparation of Brush-border Membrane Vesicles—*M. sexta* eggs were reared on an artificial diet. BBMV from fourth instar *M. sexta* larvae were prepared as reported before (32).

Toxin Binding Assay and Binding Competition—BBMV protein (10 μ g) were incubated in 100 μ l of binding buffer (phosphate-buffered saline, 0.1% bovine serum albumin, w/v, 0.1% Tween 20, v/v, pH 7.6) with 5 nM biotinylated wild-type CryIAb toxin (RPN28, Amersham Biosciences) in the absence or presence of different -fold excesses (50–1,000) of unlabeled toxins for 1 h. Unbound toxin was washed twice by centrifugation (10 min at 14,000 \times g). The resulting membrane pellet was boiled for 5 min in Laemmli sample loading buffer, loaded in 10% SDS-PAGE, and transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). The biotinylated toxin bound to the vesicles was visualized by incubating with streptavidin-HRP conjugate (1:4,000 dilution) for 1 h and developed with luminol as described by the manufacturers. Scanning of the 60-kDa signal was performed to quantify binding.

Cloning and Expression of Truncated Bt-R₁ Fragment—Total RNA from *M. sexta* midgut tissue was prepared using the acid guanidinium-phenol-chloroform method (33). cDNA was generated with a First Strand cDNA synthesis kit for reverse transcription-PCR (AMV, Roche Applied Science), using TCT TAA GCT TGC TGA AGG TGT CCG CGA TAA AG primer. A PCR reaction was performed with Vent-Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) and primers TAC AGA ATTCC ATG ATC GAC TTC CTC ACG GGT CAA ATT TCC and TCT TAAGCTTG CTG AAG GTG TCC GCG ATA AAG, that include EcoRI and HindIII restriction sites (underlined),



Cry/Ab Oligomer Intermediate Is Required for Insect Toxicity

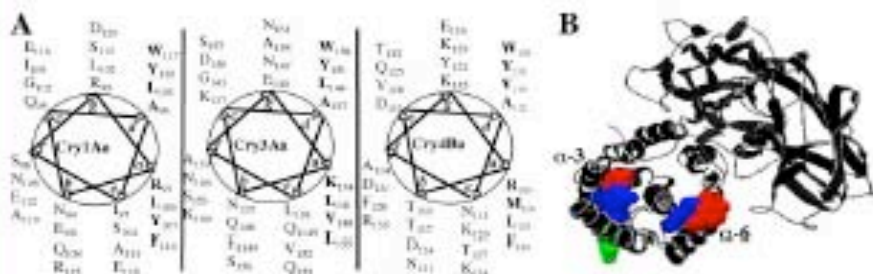


FIGURE 1. Schematic representation of the coiled-coil structure of helix α -3 from different Cry toxins. **A**, schematic representation of helix α -3 from Cry1Aa, Cry3Aa, and Cry4Ba toxins is presented. These toxins are toxic to different insect orders: Lepidoptera, Coleoptera, and Diptera, respectively. The position of residues *a*–*g* of the heptads and the conserved amino acid residues located in positions *a* and *d* are presented. **B**, location of the mutated residues in the monomeric Cry1Aa toxin structure. Residues in position *a* are illustrated as space-filling model in red, position *d* are shown in blue, and residue Arg-99 located in helix α -3 is presented in green.

respectively. The PCR product (1960 bp) was purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA), digested with EcoRI and HindIII (New England Biolabs) and ligated into the previously digested vector pET22b (Novagen, EMD Biosciences, Inc.). DNA constructs were electroporated into *E. coli* BL21 cells. Protein expression of the His-tagged protein and purification on a nickel affinity column were performed as reported (34). This partial Bt-R₁ clone expresses a protein fragment corresponding to residues 810–1480 of Bt-R₁ receptor and includes the toxin-binding regions from cadherin repeats CR7 to CR12.

Quantitative Determination of Binding Affinities by Competition ELISA.—The Bt-R₁ fragment (10 nM) was incubated with increasing concentrations of Cry1Ab or mutant toxins (from 0.1 nM to 1 μ M) in 100 μ l of binding buffer for 1 h at 25 °C. The incubation mixtures were transferred to a 96-well ELISA plate previously coated with 2.5 μ g of Cry1Ab toxin, to determine the amount of unbound Bt-R₁ fragment. The ELISA plates were washed three times and detected with anti-HisTag antibody coupled to HRP (Qiagen) and detected by HRP enzymatic activity. The concentration of Cry1Ab or mutant toxins at which the half-maximal ELISA signal is detected corresponds to the apparent dissociation constant K_D (35–37).

Ligand Blot Assay.—Ten micrograms of purified Bt-R₁ fragment was separated in 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with bovine serum albumin and incubated for 2 h with 10 nM biotinylated Cry1Ab wild-type or mutant toxins. Unbound toxins were removed by washing 3 \times with 20 ml of phosphate-buffered saline buffer. Bound toxins were detected by incubation with streptavidin-HRP conjugate (1:5000) for 1 h and visualized with luminal (ECL, Amersham Biosciences).

Pore-forming Activity of Cry1Ab Toxins.—Black lipid bilayers were made as reported (38) with egg-derived PC (Avanti Polar Lipids). Bilayer capacitance values were between 250 and 300 picofarads. Buffers 300 mM KCl, 10 mM CHES, pH 9, and 10 mM KCl, 10 mM CHES, pH 9, were added to the *cis* and *trans* compartments, respectively. Once a bilayer was formed, 2.0 μ M SUV containing the activated Cry1Ab toxins (mutant or wild-type) was added to the *cis* compartment; the *trans* compartment was held at virtual ground. Single-channel currents were recorded with a patch clamp amplifier (3900A, Dagan Corp.,

Minneapolis, MN) as described (39). Currents were filtered at 200 or 500 Hz, digitalized on-line at 1 or 2 kHz, and analyzed using a Digidata 1200 interface and Axotape and pClamp software (Axon Instruments, Foster City, CA).

RESULTS

Regions of Domain I Involved in Oligomerization.—Previous studies indicated that domain I of Cry1Ab toxin was involved in oligomerization (40). Because domain I is a seven α -helix-bundle we hypothesized that coiled-coil structures of

certain α -helices might be involved in oligomer formation. To analyze this, we determined the possibility of coiled-coil structure formation by using the program COILS that compares a sequence to data base of known coiled-coils and derives a similarity score, then by comparing this score to the distribution of scores in globular and coiled-coil proteins, this program calculates the probability that the sequence will adopt a coiled-coil conformation (41). A value of 1 is the highest value indicating that the amino acid sequence has a high probability to form a coiled-coil structure. The amino acid sequence of coiled-coil structures is characterized by heptads of residues, $(abcdefg)_n$, with a unique pattern of internal *a* and *d* positions occupied mostly by apolar residues forming and hydrophobic core and positions *g* and *e* occupied by charged residues. Analyses of protein sequences of some Cry toxins revealed that helix α -3 gave the highest score (0.4 for Cry1Ab, 0.97 for Cry2Aa, 0.99 for Cry3Aa, and 0.90 for Cry3Ba). Although the primary structure of helix α -3 is not conserved among Cry toxins, it is surprising that positions *a* and *d* of the predicted coiled-coil structure are highly conserved among members of the three-domain Cry toxin family (Fig. 1A). Alignment of helix α -3 revealed that the corresponding residues at positions *d* (Trp-117, Tyr-110, Leu-103, and Ala-96) are present in all Cry1, Cry3, Cry7, Cry8, and Cry9 toxins, whereas Cry1, Cry2, and Cry10 toxins show some conservative substitutions. The same analysis showed that residues corresponding to positions *a* (Arg-93, Leu-100, Tyr-107, and Phe-114) are also conserved among members of the three-domain Cry toxin family, the first residue being a positive charged residue (Arg or Lys), whereas the three following residues in these positions correspond to hydrophobic amino acids (Tyr, Phe, Val, or Leu). The second highest score for Cry toxins was helix α -6 (0.1 for Cry1Ab), but it is surprising that in some Cry toxins as Cry1Ca, Cry1Fa, Cry3Ba, Cry5Ba, Cry7Aa, Cry8Aa, Cry13Aa, Cry14Aa, Cry20Aa, Cry21Aa, and Cry30Aa the probability score to form coiled-coils for helix α -6 ranged up to 0.99.

To determine the role of each α -helix in oligomer formation, we assayed for Cry1Ab oligomer formation in the presence of synthetic peptides with the amino acid sequences corresponding to the different helices of domain I. It is important to mention that the structure of each of these peptides was analyzed by CD spectroscopy revealing that they adopt predominantly

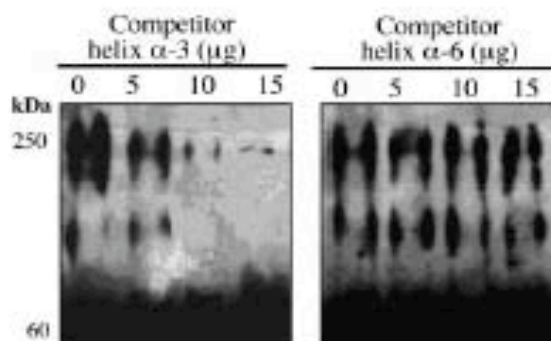


FIGURE 2. Competition of *in vitro* Cry1Ab oligomer structure formation by synthetic peptides corresponding to different helices of domain I. Western blots revealed with anti-Cry1Ab polyclonal antibody of toxin structures obtained after activation of Cry1Ab protoxin with *M. sexta* midgut juice and scFv73 antibody, performed in the presence of different concentrations of helix α -3 or helix α -6 synthetic peptides. The oligomeric Cry1Ab structures observed as a 250-kDa band, and the monomeric toxin is observed as a large band of 60 kDa. In addition, a 120-kDa band is observed that probably represent a dimer as has been observed in many preparations of Cry1Ab oligomeric structures (Gomez et al. 10).

α -helical structure (data not shown), similar to what has been observed for synthetic peptides of Cry3Aa toxin (42, 43) and consistent with their structure in the intact Cry1Ab molecule. In this assay, Cry1Ab protoxin was activated in the presence of antibody scFv73 that mimics a cadherin-binding epitope (10, 18). Fig. 2 shows that the synthetic peptide corresponding to helix α -3 inhibited formation of the 250-kDa oligomer. In contrast the synthetic peptide corresponding to helix α -6 did not affect oligomer formation. Neither of the other α -helices of domain I inhibited oligomer formation (data not shown).

Construction of Cry1Ab Mutants in Helices α -3 and α -6—To determine the role of helix α -3 in oligomer formation, we performed site-directed mutagenesis of residues in positions *a* (R93F, L100E, Y107E) and *d* (L103E and Y110E) of the predicted coiled-coil structure. Also, the R99E mutant, in position *g* of the predicted coiled-coil, was constructed, because this Cry1Aa mutation previously showed a loss of toxicity and pore formation (44), effects that could be explained by impairment in oligomer formation. We also mutagenized helix α -6 residues in positions *a* (Y193D and I200D) and *d* (L196D and Y203D) of the predicted coiled-coil structure. Fig. 1B shows the location of the mutated residues in the monomeric Cry1A toxin. Residues in position *a* (illustrated as space-filling model in red) and *d* (illustrated as space-filling model in blue) of the coiled-coil sequence of helices α -3 and α -6 face the interior of domain I, whereas residue Arg-99 (space-filling model in green) faces the surface of the protein.

Some of the mutant toxins produced small bipyramidal crystals that were highly susceptible to degradation with trypsin (R93F, L103E, Y107E, Y193D, and L196D), suggesting that these residues could be important in maintaining the monomeric toxin structure. Thus, these mutants were not further analyzed. The rest of the protein mutants (R99E, L100E, Y107E, I200D, and Y203D) produce crystal inclusions similar to the wild-type toxin. After trypsin digestion these mutants gave 60-kDa fragments as the wild-type toxin, which were recognized by several monoclonal and polyclonal Cry1Ab-specific

TABLE 1

Toxicity of wild-type and mutated Cry1Ab toxins against *M. sexta* larvae and binding kinetics of these toxins to Bt-R₁ CR7-CR12 protein fragment

δ -Endotoxin	LC ₅₀ ^a (95% fiducial limits)	Apparent K _d ^b
wt Cry1Ab	1.5 ng/cm ²	5
R99E	>2000	10
L100E	0.6 (0.4–0.8)	8
Y107E	>2000	8
I200D	1.0 (0.4–2.4)	7.5
Y203D	3.6 (1.2–2.8)	8

^a Apparent dissociation constant of Cry1Ab proteins to Bt-R₁ CR7-CR12 protein fragment obtained from ELISA competition assay.

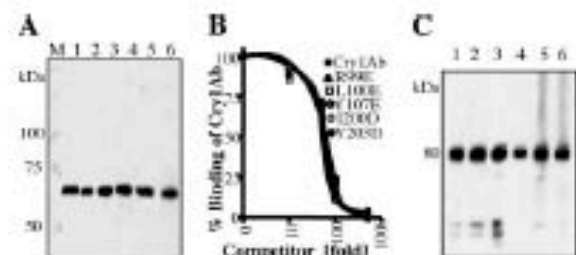


FIGURE 3. Binding of Cry1Ab and mutant proteins to *M. sexta* BBMV and to Bt-R₁ fragment. **A**, binding analysis of biotinylated Cry1Ab wild-type and mutant toxins to *M. sexta* BBMV. **B**, heterologous binding competition of biotinylated wild-type Cry1Ab to BBMV in the presence of unlabeled wild-type or mutant toxins (1- to 1000-fold excess) as competitors. **C**, ligand blot assay of wild-type and mutated toxins to Bt-R₁ protein fragment blotted in the gel. Lanes 1, wild-type Cry1Ab; lanes 2, R99E; lanes 3, L100E; lanes 4, Y107E; lanes 5, I200D; and lanes 6, Y203D.

antibodies (data not shown), suggesting that these mutations did not cause major structural disturbance. Table 1 shows the toxicity of the Cry1Ab mutants to *M. sexta* larvae. The mutants R99E and Y107E located in helix α -3 were severely affected in toxicity with LC₅₀ > 2000 ng/cm². In contrast, the L100E mutant and the two mutants in helix α -6, showed slightly higher or similar toxicity to *M. sexta* larvae as the wild-type Cry1Ab toxin.

Mutants in Helix α -3 Bind to the Bt-R₁ Receptor—To determine if the non-toxic Cry1Ab mutants had altered receptor binding, trypsin-activated proteins were labeled with biotin, and a qualitative binding assay to *M. sexta* BBMV was performed (Fig. 3A). All mutants were able to bind to BBMV with similar affinity, because heterologous binding competition of biotinylated-Cry1Ab toxin with unlabeled mutant proteins revealed that all mutants competed with the binding of Cry1Ab as the unlabeled wild-type Cry1Ab (Fig. 3B). To characterize the binding of Cry1Ab mutants to Bt-R₁ receptor, ligand blots of biotinylated proteins against a Bt-R₁ protein fragment that contains cadherin repeats CR7 to CR12 was performed. This cadherin region contains all the Cry1Ab binding sites characterized so far (45, 46). Fig. 3C shows that all mutants bound to the Bt-R₁ protein fragment (Fig. 3C). Finally, the binding affinity of the mutants to the Bt-R₁ protein fragment was quantitatively determined by ELISA binding competition assays. Table 1 shows that all Cry1Ab mutants bound the Bt-R₁ fragment with a similar dissociation constant as wild-type Cry1Ab. This ELISA procedure permits the determination of true association rate constants in solution, and several reports have shown good

Cry/Ab Oligomer Intermediate Is Required for Insect Toxicity

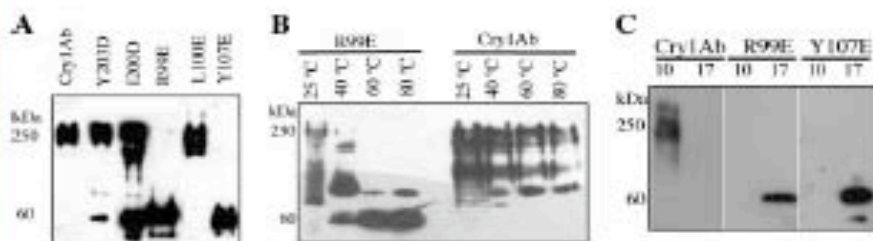


FIGURE 4. Analysis of oligomer formation of Cry1Ab and mutant toxins. **A**, the oligomeric structure of Cry1Ab toxins was produced by incubation of soluble protoxin with scFv73 antibody (which mimics Bt-R₁ receptor), 5% midgut juice from *M. sexta* larvae, and small unilamellar vesicles (PC-SUV). Membrane pellets were recovered by centrifugation, and protein samples were boiled 3 min, loaded in the SDS-PAGE 1% SDS, transferred to nitrocellulose membrane, and detected by Western blot using polyclonal anti-Cry1Ab antibody. **B**, analysis of heat sensitivity of the oligomeric structure of Cry1Ab toxin and mutant R99E. Oligomeric structures of Cry1Ab and mutants R99E and Y107E were incubated 5 min at different temperatures, loaded in the SDS-PAGE 0.1% SDS, transferred to nitrocellulose membrane, and detected by Western blot. **C**, oligomeric structures of Cry1Ab and mutant R99E were delipidated with Triton X-100 and loaded in Superdex 200 HR column. Fractions of the size-exclusion chromatography were boiled 3 min, loaded in the SDS-PAGE 1% SDS, transferred to nitrocellulose membrane, and detected by Western blot using polyclonal anti-Cry1Ab antibody.

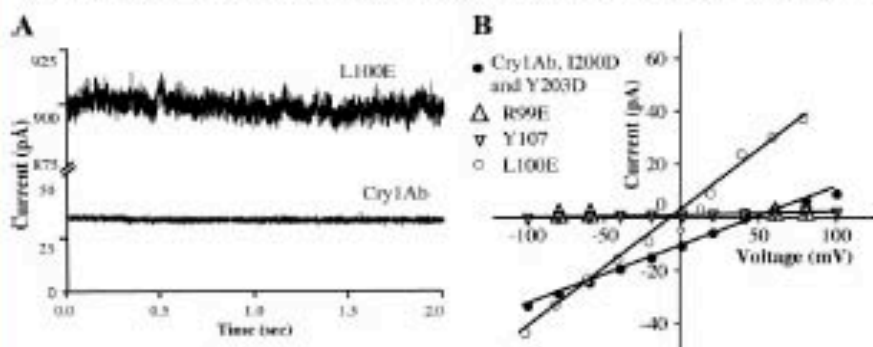


FIGURE 5. Pore formation activity of wild-type Cry1Ab and mutant toxins. **A**, representative ionic channel records of most common transitions induced by wild-type Cry1Ab or mutant toxins in lipid bilayers. The observed responses with the wild-type Cry1Ab and L100E mutant showed stable channels with high open probability. Similar traces to the wild-type Cry1Ab were observed for mutants I200D and Y203D. Records were obtained in 300:10 mM KCl (cis:trans), 10 mM CHES, pH 9.8, current/voltage (i/V) relationship of macroscopic currents induced by the wild-type and mutated toxins.

agreement in the determination of K_D values by ELISA binding competition assays and those obtained by conventional methods (immunoprecipitation of the radiolabeled antigen, fluorescence transfer, or surface plasmon resonance) (35–37, 45).

Toxicity Directly Correlates with *In Vitro* Oligomer Formation and Pore Formation.—The Cry1Ab mutants were proteolytically activated in the presence of an antibody scFv73 to determine if the mutations affected the formation of pre-pore oligomeric structure. Fig. 4A shows that the two protein mutants that were severely affected in toxicity, R99E and Y107E located in helix α -3, did not form the 250-kDa oligomeric structure. In contrast, L100E, I200D, and Y203D mutants produced the 250-kDa oligomer. To determine if the R99E and Y107E mutants could form unstable oligomers, the oligomeric structures were revealed after SDS-PAGE under less rigorous conditions avoiding boiling of the sample before electrophoresis. Fig. 4B shows that the R99E did form an oligomeric structure, but this structure was extremely sensitive to heat denaturation in contrast with the wild-type Cry1Ab oligomer that is quite stable and resisted all temperatures, including boiling (Fig. 4B). Similarly, the Y107E oligomer was found to be heat-labile (data not shown).

We also analyzed oligomer formation by size-exclusion chromatography. Protein samples activated in the presence of scFv73 antibody and SUV were delipidated with Triton X-100 and loaded in a Superdex 200 HR column (10, 11, 31). Previous studies with Cry1Ab showed that oligomeric structure eluted in fractions 9–11 of the column, whereas monomeric structure eluted in fractions 16–18 (10, 11). Fig. 4C shows that oligomer structure of the wild-type toxin eluted in fractions 10–12, whereas with mutants Y107E and R99E no oligomer was observed in these fractions, only the monomeric structure was observed in fractions 17 and 18 of the column. These data suggest that oligomer structures of the mutants Y107E and R99E were unstable and highly sensitive to detergent delipidation.

Black lipid bilayers were used to analyze the pore formation activity of the mutant and Cry1Ab protein samples that were proteolytically activated in the presence of scFv73 and liposomes. Current amplitude induced by toxin samples incorporated in the same concentration of SUV was analyzed. Control sample containing only SUV gave a negative response. These experiments were performed in a KCl gradient 300/10 mM in the *cis/trans* compartments to facilitate liposomes insertion in the bilayer. The observed responses with the wild-type Cry1Ab and mutants I200D, Y203D, and L100E, showed stable channels with high open probability, and these responses were very similar to the previously characterized pore formation induced by pure Cry1Ab pre-pore oligomer (11). Mutants I200D and Y203D, located in helix α -6, showed similar I/V curves as with the Cry1Ab toxin (Fig. 5). In contrast, the observed response of mutant L100E located in helix α -3 showed a higher current that suggests a more efficient insertion of the toxin in liposomes during the activation process (Fig. 5). Finally, mutants R99E and Y107E located in helix α -3 were severely affected in permeability, showing no change in the current or a low response when liposomes containing these proteins were added to the lipid bilayer, suggesting an important role of these residues in gating and permeability.

It was previously reported that some mutation in the anthrax protective antigen (PA), that result in non-toxic proteins unable to translocate the lethal factor, and edema factor are also defective in pore formation and produce defective oligomeric structures that lost SDS-resistance (47). These PA mutations were characterized as dominant negative, because when mixed

with wild-type toxin (tested in 1:8 mixtures wt/mutant) the toxicity of wt toxin was inhibited (47). We analyzed if mutant R99E was able to inhibit toxicity of wild-type Cry1Ab. Mixtures of 1:10 (Cry1Ab: R99E) showed a measurable inhibitory activity (up to 60% inhibition of Cry1Ab toxicity) similarly to the dominant negative mutants of PA.

DISCUSSION

Bt Cry proteins belong to a class of bacterial toxins known as pore-forming toxins that are secreted as water-soluble proteins and undergo conformational changes to form oligomers that insert into cell membranes of their target (48).

Previous studies involving partial unfolding of the oligomeric Cry1Ab structure in the presence of urea and limited proteolysis suggested that the α -helical domain I of Cry1Ab toxin is involved in monomer-monomer interaction of the pre-pore (40). Because α -helical coiled-coils structures are involved in the oligomerization of several proteins (27), we decided to look for coiled-coils in Cry toxins. We found that helix α -3, of domain I of Cry toxins, has the highest probability to form coiled-coil structures. The internal hydrophobic positions *a* and *d* of coiled-coils are important for protein-protein interactions with a matching α -helix, and mutagenesis of these positions affects the stability of this interaction (49). The presence of charged residues in these positions correlates with proper alignment, orientation, and selectivity of coiled-coils and contributes considerably to their stability (27). In addition, a salt bridge within the α -helix that forms the coiled-coil stabilizes this structure and is important in triggering the leucine zipper (50). Helix α -3 in Cry1A toxins contains an intrahelical salt bridge (51). These data in addition to the high conservation of positions *a* and *d* of helix α -3 in the three-domain Cry family suggest that this helix is highly stable and could play an important role in toxin oligomerization.

Previously, helix α -3 of a closely related toxin (Cry1Aa) was subjected to mutagenesis of charged residues, but none of the mutated residues corresponded to positions *a* or *d* of the predicted coiled-coil structure, and the authors did not analyze the capacity of these mutants to form the oligomeric structure nor the interaction of these mutants with the Bt-R₁ receptor (44). However, the authors concluded that most of the helix α -3 mutants were affected to some extent in their rate of pore formation (44). In the same work, substitutions in residue Arg-99 resulted in a complete loss of pore activity (44). All these data could be explained if the isolated mutants in helix α -3 were unable to form stable oligomers that are important for making pore channels. In other reports the Arg-93 and Ala-92 of Cry1Ac toxin (located at the beginning of helix α -3) were changed to different amino acids, only the conservative change R93K was fully active, some other changes of Arg-93 (Gly, Ala, and Ser) showed 100- to 1000-fold reduced toxicity, whereas all other changes resulted in complete loss of toxicity (52, 53). The authors concluded that a positive charge in this position could participate in the formation of specific binding domain or that the conformation of this domain could indirectly disrupt the specificity domain of the toxin (52). The mutations A92E and A92D were also severely affected in toxicity and correlated with loss of pore formation (52, 53). It was proposed that the irre-

versible insertion of these mutants into the BBMV was affected (53). Residue Arg-93 is located in position *a* of the predicted coiled-coil structure of helix α -3 (Fig. 1), and as stated above this is a highly conserved amino acid within the Cry toxin family. Unfortunately, the authors neither analyzed oligomer formation nor pore activity of the Arg-93 mutants. We isolated a mutant R93F in this work, but due to the small crystal inclusion produced by this mutant we did not analyze the pore formation or the oligomer formation.

In addition, it was suggested that helix α -5, located in the central position of domain I, was involved in Cry1Ac toxin oligomerization, because several point mutations in this helix disrupted oligomerization (54). The helix α -5 mutants affected in toxin oligomerization resulted in loss of toxicity against *M. sexta* with the exception of mutant H168R, which showed high insecticidal activity but could not form the 200-kDa oligomeric structure observed with wild-type Cry1Ac in SDS-PAGE (54). However, these authors also showed that this highly active mutant is able to form an oligomeric structure of >200 kDa that was also observed with the wild-type Cry1Ac toxin, probably a 250-kDa structure. Unfortunately, the pore-forming activities of the reported Cry1Ac mutants in helix α -5 were not analyzed, and it will be important to analyze their functionality to understand their role in toxin activity (work in progress).

As mentioned above, Zhang *et al.* (4) proposed that binding of monomeric Cry1A toxin with Bt-R₁ receptor is sufficient to induce insect death by a signal transduction mechanism (4). In this work, we identified single-point mutants in helix α -3 that severely affect *in vitro* pore formation and toxicity without affecting their ability to bind the receptor Bt-R₁. It was previously demonstrated that the Cry1Ab oligomeric structure is highly stable, even after boiling and urea denaturation (11, 40), and that purified Cry1Ab oligomer structure can be resolved as a SDS-resistant band in SDS-PAGE (11). Analysis of SDS resistance of the oligomeric structure produced by R99E and Y107E mutant toxins showed that these mutants produce a defective oligomeric structure, which is highly sensitive to temperature and impaired in pore formation and toxicity against *M. sexta* larvae. These results are similar to the dominant negative mutants isolated in another toxin, the anthrax protective antigen PA (47). These PA mutants produce unstable heptamers that lost SDS resistance, lost pore formation activity, and were non-toxic. In this case, the mutant proteins can be used as anti-toxins that co-assemble with wild-type PA toxin producing defective heptameric structures that lost toxicity, indicating the importance of having stable protein structures to perform their function *in vivo* (47). Mutant R99E showed a similar inhibitory effect when mixed with the wild-type Cry1Ab, suggesting that helix α -3 plays an important role in oligomerization. Exhaustive mutagenesis of helix α -3 will help to determine the residues involved in pre-pore contacts and in dominant negative phenotype (work in progress).

The helix α -3 mutants bound a Bt-R₁ protein fragment with similar high nanomolar affinity as has been reported for Cry1Ab binding to the full-length Bt-R₁ receptor (55). This suggests that binding to Bt-R₁ receptor is not sufficient by itself to cause insect death and supports that oligomer and pore formation are two steps necessary to kill the larvae. In addition, we





Cry/Ab Oligomer Intermediate Is Required for Insect Toxicity

recently reported the characterization of scFvM22 antibody that competed with the binding of Cry1Ab oligomer to aminopeptidase-N receptor and inhibited the toxic effects of Cry1Ab, suggesting that the interaction of Cry1Ab oligomeric pre-pore with aminopeptidase-N is also important for toxicity (56).

We cannot, however, exclude the possibility that intracellular responses could have a role and synergize the effect of the toxin in insect larvae. With other pore-forming toxins, such as the α -toxin from *Staphylococcus aureus* and aerolysin produced by *Aeromonas hydrophila*, cell death is triggered by two mechanisms, pore formation and apoptosis, depending on the cell type and on the dose of toxin (57, 58). Overexpression of antiapoptotic protein could block aerolysin-induced apoptosis, although this effect is overcome if higher toxin concentrations are used, where cells die quickly and apoptotic pathway is not triggered (58). In the case of aerolysin it was demonstrated that apoptosis is not directly triggered by binding of the toxin to its receptor, but rather it is caused by the production of a small number of channels in the membrane (58) indicating that the intracellular downstream effects are triggered by pore formation and membrane depolarization. The data presented in this work also indicate that pore formation induced by oligomeric toxin is required for Cry1A toxicity *in vivo*.

Acknowledgments—We thank Jorge Ibarra, Javier Luevano-Burroel, Jorge Sánchez, Oswaldo López, and Lisbeth Cabrera, for technical assistance.

REFERENCES

- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Leredou, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. B., and Dean, D. H. (1998) *Micobid. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775–806
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., and Schnepf, H. E. (2008) *Ann. Rev. Genet.* **37**, 409–433
- Bravo, A., Gómez, L., Cordero, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gil, S. S., and Soberón, M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1667**, 38–46
- Zhang, X., Cardas, M., Grisko, N. B., Taining, B., and Balla, A. Jr. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9897–9902
- Vadlamati, B. K., Weber, E., Li, L. J., T. H., and Balla, L. A., Jr. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5490–5494
- Knight, P., Crickmore, N., and Ellar, D. J. (1994) *Mol. Microbiol.* **11**, 429–436
- Jurat-Fuentes, J. L., and Adang, M. J. (2004) *Eur. J. Biochem.* **271**, 3127–3135
- Jurat-Fuentes, J. L., and Adang, M. J. (2006) *J. Invertebr. Pathol.* **92**, 166–171
- Bravo, A., Gil, S. S., and Soberón, M. (2007) *Toxicol.* **49**, 425–435
- Gómez, L., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., and Soberón, M. (2002) *FEBS Lett.* **513**, 242–246
- Russell, C., Muñoz-Garay, C., Miranda-CasasLuzago, R., Gómez, L., Rudiño-Piñera, E., Soberón, M., and Bravo, A. (2004) *Biochemistry* **43**, 166–174
- Tigun, N. J., Jacoby, J., and Ellar, D. J. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5715–5720
- Pardo-López, L., Gómez, L., Russell, C., Sánchez, J., Soberón, M., and Bravo, A. (2006) *Biochemistry* **45**, 10829–10836
- Herrero, S., Gonzalez-Cabrera, J., Ferrer, J., Bakker, P. L., and de Maagd, B. (2004) *Biochem. J.* **384**, 507–513
- Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Damozon, A., de Maagd, B. A., Bakker, P., Soberón, M., and Bravo, A. (2006) *J. Membr. Biol.* **212**, 61–68
- Russell, C., Garcia-Balles, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Martínez-Ramírez, A. C., Real, M. D., and Bravo, A. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1660**, 99–105
- Likhitvatavanong, S., Katzenmeier, G., and Angathanasombati, Ch. (2006) *Arch. Biochem. Biophys.* **445**, 46–55
- Zhuang, M., Ohtan, D. I., Gómez, I., Pullkuth, A. K., Soberón, M., Bravo, A., and Gil, S. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13863–13872
- Barton, S. L., Ellar, D. J., Li, J., and Derbyshire, D. J. (1999) *J. Mol. Biol.* **287**, 1011–1022
- Jenkins, J. L., Lee, M. K., Sangobala, S., Adang, M. J., and Dean, D. H. (1999) *FEBS Lett.* **462**, 373–376
- Baba Mousa, L., Wernmer, M., Coiro, D. A., Koller, D., Sanni, A., Dalla Serra, M., Montel, H., and Prevost, G. (2006) *J. Biomat. Biotech.* **2006**, 1–8
- Gerisnet, Ch., Galeotti, C. L., Lupetti, P., Mercati, D., Skibinski, D. A. G., Barro, S., Batistutta, E., de Bernard, M., and Telford, I. L. (2006) *Infect. Immun.* **74**, 1786–1794
- Melton-Witt, J. A., Bentzen, L. M., and Tweten, R. K. (2006) *Biochemistry* **45**, 14347–14354
- Abdel Ghani, E. M., Weis, S., Walev, I., Kohse, M., Bhakdi, S., and Palmer, M. (1999) *Biochemistry* **38**, 15204–15211
- Walter, B., and Bayley, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 23065–23071
- Chothia, C., Levitt, M., and Richardson, D. (1981) *J. Mol. Biol.* **145**, 215–250
- Barkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S. V. (2001) *Trends Cell Biol.* **11**, 82–88
- Meza, R., Nuñez-Valdez, M. E., Sánchez, J., and Bravo, A. (1996) *FEBS Microbiol. Lett.* **145**, 333–339
- Lorecha, D., Arantes, C., Chantoux, J., and Locatet, M.-M. (1989) *FEBS Microbiol. Lett.* **60**, 211–218
- Thomas, W. E., and Ellar, D. J. (1983) *J. Cell. Sci.* **60**, 181–197
- Gierseca, L., and Bravo, A. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1429**, 342–350
- Wolfenberger, M., Lütly, P., Mauerer, A., Parenti, F., Sacchi, V., Giordana, B., and Hancock, G. M. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**, 301–308
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156–159
- Gómez, L., Ohtan, D., Gil, S. S., Bravo, A., and Soberón, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 28906–28912
- Dong, L., Chen, S., Bartsch, U., and Schuchner, M. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 60–70
- Hardy, F., Djavadi-Chaniane, L., and Goldberg, M. E. (1997) *J. Invertebr. Morphol.* **200**, 155–159
- Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Chaniane, L., and Goldberg, M. E. (1985) *J. Invertebr. Morphol.* **77**, 305–319
- Müeller, P., Radin, D. O., Tien, H. T., and Westcott, W. C. (1962) *Nature* **194**, 979–980
- Lorenzo, A., Damozon, A., Díaz, C., Liévano, A., Quintan, R., and Bravo, A. (1995) *FEBS Lett.* **360**, 353–356
- Russell, C., Pardo-López, L., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Morera, C., Soberón, M., and Bravo, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 55168–55175
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991) *Science* **252**, 1162–1164
- Guzik, E., and Shui, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2571–2578
- Guzik, E., La Rocca, P., Sansom, M. S. P., and Shui, Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12289–12294
- Vachon, V., Prefontaine, G., Coux, F., Bang, C., Marceau, L., Masson, L., Brassica, R., Frutos, E., Schwartz, J.-L., and Laprade, R. (2002) *Biochemistry* **41**, 6178–6184
- Gómez, L., Dean, D. H., Bravo, A., and Soberón, M. (2003) *Biochemistry* **42**, 10482–10489
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L., and Adang, M. J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 28051–28056
- Mourez, M., Yan, M., Lacy, D. B., Dillon, L., Bentzen, L., Marpos, A., Maurin, C., Hotoz, E., Wiggleworth, D., Pimental, R.-A., Ballard, J. D., Collier, R. J., and Tweten, R. K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13805–13808
- Packer, M. W., and Feil, S. C. (2005) *Protein Biophys. Mol. Biol.* **88**, 91–124
- O'Shea, E. K., Lumb, K. J., and Kim, P. S. (1993) *Curr. Biol.* **3**, 658–667
- Kammerer, R. A., Jarvins, V. A., Frank, S., Schulthess, T., Landwehr, R.

Cry/Ab Oligomer Intermediate Is Required for Insect Toxicity

- Lastig, A., Garcia-Echeverria, C., Alexandrescu, A. T., Engel, J., and Steinmetz, M. O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 13685–13688
51. Grochalaki, P., Mamon, L., Bocisova, S., Pustai-Carey, M., Schwartz, J. L., Broussau, B., and Cygler, M. (1995) *J. Mol. Biol.* **254**, 447–464
52. Wu, D., and Aronson, A. I. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2311–2317
53. Chen, X. J., Curtiss, A., Alcantara, E., and Dean, D. H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 6412–6419
54. Amason, L. A., Geng, Ch., and Wu, L. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2508–2507
55. Vadlamudi, R. K., Ji, T. H., and Billa, L. A., Jr. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12334–12340
56. Gómez, I., Armas, I., Beráñez, L., Miranda-Bios, J., Becerra, B., Grande, G., Almagro, J. C., Bravo, A., and Suberón, M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 34032–34039
57. Menzies, B. E., and Koutseva, I. (2000) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**, 39–45
58. Nelson, K. L., Brodsky, E. A., and Backley, J. T. (1999) *Cell Microbiol.* **1**, 69–74



APÉNDICE II

ARTÍCULO EN COLABORACIÓN

Structural and functional analysis of the pre-pore and membrane-inserted pore of Cry1Ab toxin.

Liliana Pardo-López, Isabel Gómez, Carlos Muñoz-Garay, Nuria Jiménez-Juárez, Mario Soberón y Alejandra Bravo.

Journal of Invertebrate Pathology. 2006, 92:172-177



Structural and functional analysis of the pre-pore and membrane-inserted pore of CryIAb toxin

Liliana Pardo-López, Isabel Gómez, Carlos Muñoz-Garay, Nuria Jiménez-Juarez, Mario Soberón, Alejandra Bravo^{*}

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, México

Received 15 December 2005; accepted 6 February 2006

Available online 14 June 2006

Abstract

Bacillus thuringiensis produces insecticidal Cry proteins that are active against different insect species. The primary action of Cry toxins is to lyse midgut epithelial cells in the target insect by forming lytic pores on the apical membrane. After interaction with cadherin receptor, Cry proteins undergo conformational changes from a monomeric structure to a pre-pore-oligomeric form that is able to interact with a second GPI-anchored aminopeptidase-N receptor and then insert into lipid membranes. Here, we review the recent advances in the understanding of the structural changes presented by CryIAb toxin upon membrane insertion. Based on analysis of the Trp fluorescence of pure monomeric and oligomeric CryIAb structures in solution and in membrane-bound state we reported that oligomerization caused 27% reduction of Trp exposed to the solvent. After membrane insertion there is another conformational change that allows an additional rearrangement of the Trp residues resulting in a total protection of these residues from exposure to the solvent. The oligomeric structure is membrane insertion competent since more than 96% of the CryIAb oligomer inserts into the membrane as a function of lipid:protein ratio, in contrast to the monomer of which only 5–10% inserts into the membrane. Finally, analysis of the stability of monomeric, pre-pore and pore structures of CryIAb toxin after urea and thermal denaturation suggested that a more flexible conformation could be necessary for membrane insertion and this flexible structure is obtained by toxin oligomerization and by alkaline pH. Domain I is involved in the intermolecular interaction within the oligomeric CryIAb and this domain is inserted into the membrane in the membrane-inserted state.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Cry toxins; Membrane insertion; Tryptophan fluorescence; Oligomerization

1. Introduction

Pore forming toxins (PFT)¹ are secreted as water-soluble proteins undergoing conformational changes in order to insert into or to translocate across cell membranes of the host. PFTs have been characterized in two main groups: the alpha-helical toxins that involve α -helix regions to form the

transmembrane pore and the β -barrel toxins that insert into the membrane by forming a β -barrel composed of β -hairpin structures from each monomer. The first class includes toxins such as the colicins, exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa* and diphtheria toxin. On the other hand, aerolysin from *Aeromonas hydrophila*, α -hemolysin from *Staphylococcus aureus*, anthrax protective antigen and cholesterol dependent toxins as the perfringolysin O from *Clostridium perfringens* belong to the β -barrel toxins (see Parker and Feil, 2005 for review). In general, PFT producing-bacteria secrete their toxins and these toxins interact with specific receptors located on the host cell surface. In most cases, toxins are activated by host proteases after receptor bind-

^{*} Corresponding author. Fax: +52 777 3172388.

E-mail address: bravo@ib-ctim.unam.mx (A. Bravo).

¹ Abbreviations used: Bt, *Bacillus thuringiensis*; PFT, pore forming toxin; Trp, Tryptophan; PLB, planar lipid bilayer; ANS, 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid.

ing inducing the formation of an oligomeric structure that is insertion competent. Finally, membrane insertion is triggered by a decrease in pH that induces a molten-globule state of the protein (Parker and Feil, 2005).

Our hypothesis is that, similarly to other pore forming toxins, Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt), follow a similar strategy: oligomerization of monomeric subunits and a molten-globule state as a successful strategy to overcome the high-energy barrier of membrane insertion. Previous studies showed that the mechanism of action of CryIA toxin, i.e., the protease resistant core derived from the protoxin, shares several characteristics with other pore-forming toxins since they show specific binding to membrane-bound receptors followed by toxin activation and formation of an oligomeric structure (Gómez et al., 2002a).

2. Mode of action of CryIA toxins

CryIA toxins are produced as crystal inclusion bodies, that need to be ingested by the susceptible larvae to be toxic. These crystals are dissolved in the alkaline and reducing environment of the larval midgut, releasing soluble protoxins of 130 kDa. The inactive protoxins are then cleaved by midgut proteases yielding ~60 kDa monomeric toxins (Hofmann et al., 1988). In the case of the lepidopteran *Manduca sexta*, the monomeric CryIA toxin structure binds to a cadherin receptor. This interaction promotes a proteolytic processing of helix α -1 of the toxin, which might result in a conformational change with exposure of hydrophobic regions and formation of a pre-pore toxin, probably a tetrameric structure (Gómez et al., 2002a). The oligomeric CryIA structure binds to a second receptor, the aminopeptidase N (APN), that is involved in driving the CryIA oligomeric structure into detergent resistant membranes or lipid rafts where the pre-pore complex is converted into a membrane-inserted pore that leads finally to ion leakage, cell lysis and insect death (Bravo et al., 2004).

The three-dimensional structure of several Cry toxins has been solved showing that they share similar structures comprised of three domains. Domain I, a seven α -helix bundle considered the pore-forming domain. Domains II and III, composed of β -sheets involved in receptor binding (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995; Morse et al., 2001; Boonserm et al., 2005).

3. What are the structural changes of Cry toxins during oligomer formation and insertion into the membrane?

Little is known about the structural changes of Cry toxins during oligomerization and insertion into the membrane. In order to analyze these steps, we induced in vitro oligomerization of CryIAb toxin by using a single chain antibody scFv73 that mimics the cadherin receptor (Gómez et al., 2001). This antibody specifically recognizes CryIAb domain II loop 2 (Gómez et al., 2002b). The CryIAb crystals, or the CryIAb-soluble protoxin, was incubated at pH 10.5 with the scFv73 antibody in the presence of midgut

juice proteases from *M. sexta* larvae. This assay resulted in the formation of a 250 kDa structure that is recognized by polyclonal antibodies directed to CryIAb toxin. The amino terminal sequence of the 250 kDa structure revealed that this oligomeric structure consists of CryIAb toxin monomers that have lost the first helix α -1. The cleavage of helix α -1 has been proposed to be important in triggering oligomerization due to exposition of hydrophobic regions within domain I (Gómez et al., 2002a).

We found that upon oligomerization, CryIAb toxin undergoes a conformational change that leads to the rearrangement of Trp side chains. CryIAb toxin has nine Trp residues, seven of them located in domain I, and two in domain II. The Trp fluorescence was analyzed by steady state fluorescence measurements and by quenching analysis experiments performed with soluble quenchers (Fig. 1). The oligomerization of CryIAb reduces the Trp accessibility to the solvent reducing also the accessibility to water-soluble quenchers such as I⁻ or acrylamide. Our results indicated that the oligomeric structure occludes ~26% of the Trp that were exposed in the monomeric structure (Rausell et al., 2004a). In the oligomeric structure only 23% of Trp residues remain exposed to the solvent, and after membrane insertion there is another conformational change that allows an additional rearrangement of the Trp residues resulting in a total protection of these residues from exposure to the solvent (Rausell et al., 2004a) (Fig. 1).

Membrane-bound quenchers were also used in order to determine the depth of Trp residues inserted into the membrane. Brominated and spin-label phospholipids are effective collisional quenchers of the indole group that have been extensively used for determining the position of Trp

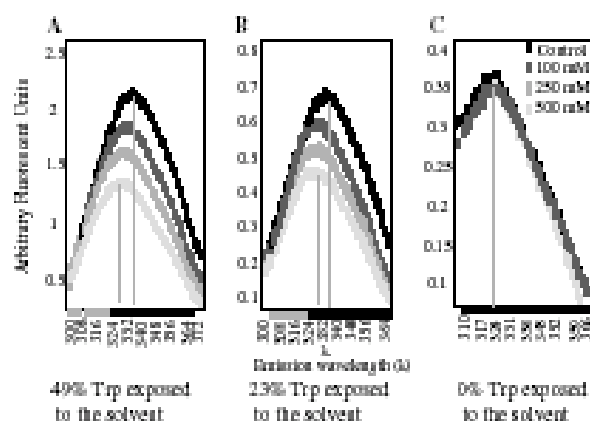


Fig. 1. Fluorescent quenching experiments performed with I⁻ (KI) from 0 to 500 nM. The fluorescence emission spectra in the presence of different quencher concentrations were recorded after excitation at 290 nm. (A) Quenching analysis of CryIAb monomeric structure showing 49% of Trp residues exposed to the solvent. (B) Quenching of CryIAb pre-pore oligomeric structure showing 23% of Trp residues exposed to the solvent. (C) Quenching analysis of CryIAb oligomeric structure inserted into phosphatidyl choline membrane showing 0% of Trp residues exposed to the solvent. The spectra presented were average of four scans and were also corrected for background and dilution.

Table 1
Insecticidal toxicity of multiple Trp mutants of CryIAb toxin against first instar larvae of *Manduca sexta*

δ-Endotoxin	LC ₅₀ ng/cm ² (95% fiducial limits)
Wt CryIAb	2.3 (1.2–3.5)
W117F, W182F, W210F, W219F, W226F, W316F, W455F	11.4 (3.5–26.8)
W65F, W73F, W210F, W219F, W226F, W316F, W455F	3.7 (2.2–4.6)
W65F, W73F, W117F, W182F, W316F, W455F	2.9 (1.5–5.4)
W65F, W73F, W117F, W182F, W210F, W219F, W226F	23.1 (11.6–35.0)

within the bilayer. We found that the majority of the Trp residues of the membrane-inserted CryIAb oligomer are located close to the membrane-water interface (Rausell et al., 2004a). These data are similar to those of previous analyses of other toxins like aerolysin, perfringolysin O and α-toxin where Trp-rich domains are involved in binding to the membrane and their Trp residues are also located at the membrane-water interface when these proteins are inserted into the membrane (Raja et al., 1999). It has been proposed that Trp residues are involved in the orientation of peptides and proteins into the membrane, since its flat rigid shape limits its access into the hydrocarbon core and its π electronic structure favors residing in the complex water-bilayer interface environment (Yau et al., 1998).

To determine the exact position of each Trp site directed mutants replacing the Trp residues by Phe or by Cys were constructed. Single point mutations in each Trp residue showed that all Phe replacements and several Cys replacements conserved insecticidal activity against *M. sexta* (Padilla et al., 2006). Multiple mutants with several Trp residues replaced by Phe were also constructed. Preliminary studies showed that these mutant toxins retain toxicity against *M. sexta* larvae (Table 1). Future work with these mutants will help to understand the position in the three-dimensional structure of specific Trp residues during CryIAb oligomer formation and during insertion into the membrane.

4. The oligomeric pre-pore structure inserts efficiently into the membrane inducing stable ionic pores in planar lipid bilayer

To characterize the insertion of CryIAb toxin into the membrane, the fluorescence emission spectra of the Trp residues of the monomeric and oligomeric structures of CryIAb toxin, purified by size exclusion chromatography, were recorded (Rausell et al., 2004a). We recorded the emission spectra of pure CryIAb structures in soluble state and then we incubated these structures with phosphatidyl choline liposomes at different lipid:protein ratios (from 1 to 10,000). After this incubation, the membrane fraction was separated by ultracentrifugation (1 h at 100,000g) and fluorescence spectra were recorded in both the supernatant and in the membrane pellet fractions. Fig. 2A shows that that

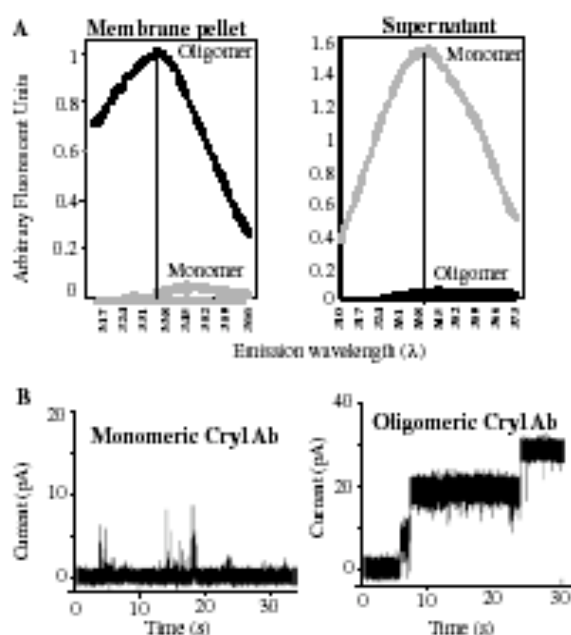


Fig. 2. Analysis of CryIAb toxin insertion into the membrane. (A) Pure monomeric and oligomeric CryIAb structures were inserted into phosphatidyl choline membrane vesicles using a lipid:protein ratio of 5000. The fluorescence emission spectra were recorded in the membrane pellet and in the supernatant obtained after centrifugation for 1 h at 100,000g using excitation at 295 nm. (B) Representative ionic channel records of most common transitions induced in lipid bilayers by purified preparations of monomeric (left) or oligomeric (right) structures of CryIAb toxin. Records were obtained in 300 mM KCl, 5 mM Hepes, pH 7.4. Holding potential was 40 mV. Concentration of monomeric and of oligomeric structure was 1.50 and 6 nM, respectively.

a lipid:protein ratio of 5000, 96% of the oligomeric CryIAb was inserted into the membrane, in contrast to the monomeric structure, of which only 5–10% was able to interact with the liposomes. The ionic channel activity of pure monomeric and oligomeric structures in synthetic planar lipid bilayers (PLB) was also studied. The response of PLB after spontaneous CryIAb oligomer insertion showed stable channels that had a high open probability at 20-fold lower toxin concentration than the monomeric form (Rausell et al., 2004a). Fig. 2B shows that the oligomeric structure of CryIAb induced a stable conductance state where zero current state is absent. In contrast, the monomeric structure induced currents with very unstable transitions showing multiple channels or subconductance stages (Fig. 2B). These experiments indicated that the oligomeric CryIAb is the toxin structure with physiological relevance because it inserts efficiently into the membrane and forms stable pores (Rausell et al., 2004a).

5. Do CryIA toxins have a molten-globule state?

Since the pre-pore structure is only an intermediate state of the CryIA toxin, we studied what are the conditions to

form the membrane associated complex and the pore. It has been proposed that proteins must partially unfold to facilitate membrane insertion and channel formation. Several mammalian specific PFTs are partially unfolded during cell internalization. A flexible conformation, related to a molten-globule state, is triggered by acidic or mildly acidic pH and the molten-globule state has been recognized as the membrane insertion intermediate (Blewitt et al., 1985; van der Goot et al., 1991; Milne and Collier, 1993). The CryIA toxins are active against the midgut cells of lepidopteran insects. The midgut lumen of these insects is characterized by a high basic pH (up to pH 11). We analyzed the pH dependence of pore formation and the unfolding patterns of CryIAb toxin in its monomeric and oligomeric structures.

5.1. Alkaline pH increases the flexibility of the monomeric and oligomeric structures of CryIAb toxin

To further analyze the structural conformation differences of the monomer, the pre-pore oligomer and the membrane-inserted oligomer and their relationship with a putative molten-globule state, the unfolding patterns of these structures induced by chaotropic agents at different pH values were determined by monitoring the intrinsic Trp fluorescence (Fig. 3). The alkaline pH increases the flexibility of the monomeric toxin since lower concentrations of urea were needed to unfold the protein at pH 11 condition (Fig. 3A). Toxin flexibility was increased by the

oligomerization of the monomeric toxin, and it was further increased after membrane insertion (Fig. 3A) (Rausell et al., 2004b). These data support the hypothesis that the molten-globule-like state of CryIA toxin is induced by alkaline pH.

Denaturation of the three CryIAb structures in the presence of urea showed that it is a two-step process, suggesting that the process of unfolding could be occurring sequentially in two different protein regions (Fig. 3B). We performed a proteinase K digestion of partially denatured proteins in order to identify the region of the toxin that unfolds during the first transition of urea denaturation. The protein-fragment products obtained after proteinase K treatment were loaded on an SDS-PAGE gel and detected with a polyclonal antibody or with different monoclonal antibodies that recognized only domain I or domains II and III. When we analyzed the partially denatured monomeric CryIAb toxin (5 M Urea, pH 7.0), all protein-fragments were detected with the anti-domain I monoclonal antibody, suggesting that domains II and III were susceptible to proteolytic degradation. The partially unfolded pre-pore structure (2 M Urea, pH 7.0) was quite resistant to proteolysis with proteinase K; the only protein-fragments that were obtained had an apparent molecular mass of 100 and 25 kDa. The 25 kDa fragment was detected with the anti-domain I monoclonal antibody not with the anti-domains II and III antibody (Rausell et al., 2004b). The 100 kDa fragment was only detected with the polyclonal CryIAb antibody. Since anti-domain I antibody did not recognize the oligomeric structure, probably due to conformational constraints as epitope burying into the oligomeric structure or conformational changes of these epitopes in the oligomeric structure, it was proposed that the 100 kDa band could represent a truncated pre-pore complex composed of polypeptides with an apparent molecular mass of 25 kDa (Rausell et al., 2004b). These data indicate that domain I is involved in the monomer-monomer interactions in the oligomeric structure and that domains II and III are more flexible.

5.2. Domain I is involved in oligomer formation and inserts into the membrane

We confirmed that domain I is protected during oligomerization and during membrane insertion by analyzing the unfolding patterns by temperature. The hydrophobic dye 1-anilino naphthalene-8-sulfonic acid (ANS) that binds to hydrophobic regions exposed in partially unfolded proteins was used. Using different temperature conditions high ANS binding to the monomeric CryIAb structure was observed at 60 °C. The maximal ANS binding for the oligomeric pre-pore structure and membrane-inserted pore structure was observed at lower temperatures, 50 °C and 40 °C, respectively (Fig. 4), suggesting that the oligomeric structure is more flexible than the monomeric structure and therefore more susceptible to heat denaturation (Rausell et al., 2004b).

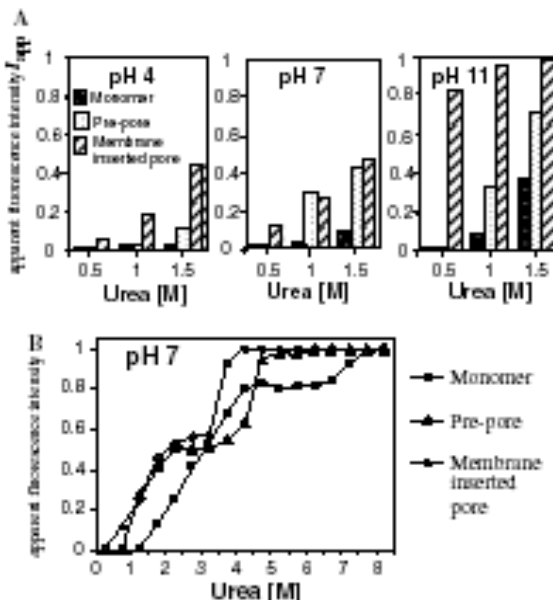


Fig. 3. Unfolding of CryIAb induced by urea at different pH values. (A) Urea denaturation of the different CryIAb toxin structures: monomeric toxin, pre-pore oligomer in solution and pore complex inserted in liposomes of phosphatidyl choline, performed at different pH values using 0.5, 1 or 1.5 M urea. (B) Normalized denaturation curves at pH 7.0. The excitation wavelength was 295 nm.

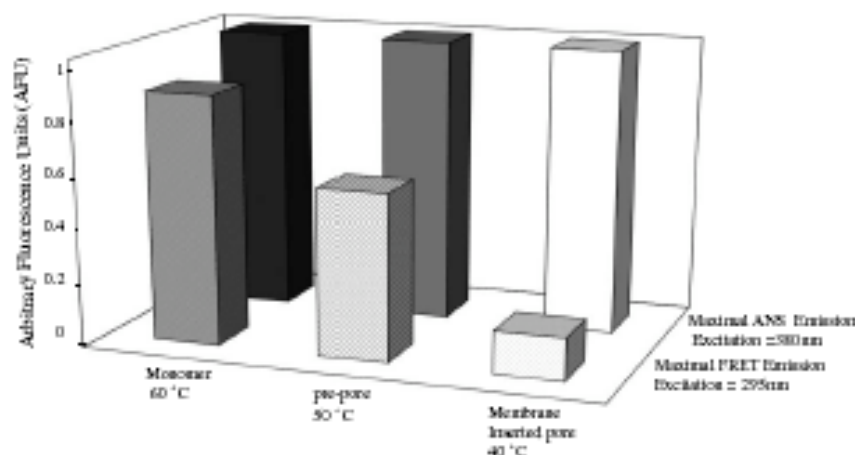


Fig. 4. Unfolding of CryIAb toxin induced by temperature. The fluorescence of 50 μ M ANS at 480 nm was monitored as a function of temperature in the presence of 50 nM monomeric toxin, 15 nM pre-pore complex in solution, and 15 nM membrane-inserted pore complex. The excitation wavelength was 380 nm to directly excite the bound ANS dye or 295 nm for energy transfer analysis by FRET between Trp residues and ANS. Under these conditions Trp residues are excited and energy transfer to ANS bound to the protein occurs if both (Trp and ANS) are in close proximity. Experiments were performed at least three times.

In order to determine if domain I was denatured during the heat treatment, the energy transfer from Trp residues to ANS bound to the unfolded protein was determined. In these studies the ANS is excited only if the Trp residues are located in close proximity to the hydrophobic regions where ANS bound after heat denaturation. It is important to remember that domain I contains seven of the nine Trp residues of CryIAb toxin. The energy transfer analysis performed with the monomeric structure showed a similar fluorescence pattern to the one obtained by directed excitation of ANS (Fig. 4), suggesting that domain I is unfolded by temperature in the monomeric CryIAb structure. In contrast, the maximal energy transfer observed with the pre-pore structure showed a significantly reduced fluorescence pattern than the one obtained by the direct excitation of ANS dye indicating that domain I in the pre-pore is more structured than the rest of the protein and thus less susceptible to heat denaturation (Fig. 4). Finally, the membrane-inserted CryIAb pore complex showed a severe reduction in energy transfer between Trp residues to ANS bound to the molecule (Fig. 4), indicating that the Trp-rich region is not or far less denatured by heat treatment in the membrane-inserted oligomer and that domains II and III are highly flexible and sensitive to denaturation by temperature (Rausell et al., 2004b). These results indicated that membrane insertion of the toxin protects domain I from thermal denaturation, suggesting that this domain may be inserted into the bilayer in contrast to domains II and III that remain on the surface of the membrane.

6. Conclusions

PFTs are produced as water-soluble monomeric proteins, and change from hydrophilic to amphipatic proteins after insertion into the membrane. Membrane insertion

involves conformational changes resulting in the formation of an oligomeric structure. In most of the PFT the trans-membrane regions are hidden within the fold of the water-soluble oligomer and could adopt quite different folds in the membrane-inserted state. In the mammalian specific PFT the conformational changes are triggered by acidic pH causing a molten-globule state that is a partly unfolded but compact state characterized by an increment in the flexibility of the lateral chains that maintain the secondary structure (Parker and Feil, 2005).

Cry toxins follow a similar strategy where oligomerization of monomeric subunits and a molten-globule state overcome the high-energy barrier of membrane insertion. The flexibility of the toxin increased by alkaline pH and by toxin oligomerization. Domains II and III are more flexible than domain I. Domain I is involved in monomer-monomer contact in the oligomeric structure and is responsible for membrane insertion, forming an active pore in the membrane at high pH. These results are in agreement with the umbrella model for pore formation by Cry toxins (Knowles, 1994; Gazit et al., 1998). This model suggests that α -4 and α -5 helices of domain I are inserted into the membrane as the handle of an umbrella while the rest of helices are rearranged on the membrane surface. Until now, there are no structural data of PFT composed of α -helices when they are inserted into the membrane. The main goal of our work is the elucidation of the three-dimensional structure of the CryIAb pre-pore structure and the determination of the structural changes involved in its insertion into the membrane.

Acknowledgments

This research was supported in part by DGAPA/UNAM IN207503-3 and IN206503-3, CONACyT J45863-

Q and 46176-Q, NIH 1R01 AI066014-01 and USDA 2002-35302-12539.

References

- Blewitt, M.G., Chung, L.A., London, E., 1985. Effect of pH on the conformation of diphtheria toxin and its implications for membrane penetration. *Biochemistry* 24, 5458–5464.
- Boomsma, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J., 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348, 363–382.
- Bravo, A., Gómez, I., Miranda-Caso Luengo, R., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., 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. *Biochem. Biophys. Acta* 1667, 38–46.
- Czok, E., La Rocca, P., Sansom, M.S.P., Shai, Y., 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an “umbrella-like” structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12289–12294.
- Gómez, I., Oltean, D.I., Sánchez, J., Bravo, A., Gill, S., Soberón, M., 2001. Mapping the epitope in Cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J. Biol. Chem.* 276, 28906–28912.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M., 2002a. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513, 242–246.
- Gómez, I., Miranda-Ries, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, D.I., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., 2002b. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope ²⁸⁹HITDTNKK³⁰⁰ in *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* 277, 30137–30143.
- Grochulski, P., Maillon, L., Borisova, S., Pustai-Carey, M., Schwartz, J.L., Breuseau, R., Cygler, M., 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254, 447–464.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Mellaert, H., 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7844–7848.
- Knowles, R.H., 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24, 275–308.
- Li, J., Carroll, J., Ellar, D.J., 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815–821.
- Milne, J.C., Collier, R.J., 1993. pH-dependent permeabilization of the plasma membrane of mammalian cells by anthrax protective antigen. *Mol. Microbiol.* 10, 647–653.
- Morse, R.J., Yamamoto, T., Stroud, R.M., 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 9, 409–417.
- Padilla, C., Pardo-López, L., de la Riva, G., Gómez, I., Sánchez, J., Hernández, G., Nuñez, M.E., Carey, M.P., Dean, D.H., Alzate, O., Soberón, M., Bravo, A., 2006. Role of tryptophan residues in the toxicity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 901–907.
- Parker, M.W., Feil, S.C., 2005. Pore-forming proteins: from structure to function. *Progress Biophys. Mol. Biol.* 88, 91–124.
- Raja, S.M., Rawat, S.S., Chattopadhyay, A., Lala, A.K., 1999. Localization and environment of tryptophans in soluble and membrane-bound states of a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Biophys. J.* 76, 1469–1479.
- Rausel, C., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Miranda-Caso Luengo, R., Rudiño-Piñera, E., Soberón, M., Bravo, A., 2004a. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry* 43, 166–174.
- Rausel, C., Pardo-López, L., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Morera, C., Soberón, M., Bravo, A., 2004b. Unfolding events in the water-soluble monomeric Cry1Ab toxin during transition to oligomeric pre-pore and membrane inserted pore channel. *J. Biol. Chem.* 279, 55168–55175.
- van der Goot, F.G., González-Mañas, J.M., Lakey, J.H., Pattus, F., 1991. A ‘molten-globule’ membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* 354, 408–410.
- Yau, W.-M., Wimley, W.C., Gowriach, K., White, S.H., 1998. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* 37, 14713–14718.

APÉNDICE III

ARTÍCULO DE REVISIÓN

The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*

Nuria Jiménez-Juárez, Carlos Muñoz-Garay, Isabel Gómez, Sarjeet S. Gill, Mario Soberón y Alejandra Bravo. Mario Soberón y Alejandra Bravo.

Peptides. 2008, 29:318-323

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Review

The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*

N. Jiménez-Juárez^a, C. Muñoz-Garay^a, I. Gómez^a, S.S. Gill^b, M. Soberón^a, A. Bravo^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, México

^b Department of Cell Biology and Neuroscience, University of California, Riverside, CA 92506, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2007

Accepted 10 September 2007

Published on line 14 December 2007

Keywords:

Bacillus thuringiensis

Cry toxins

Oligomerization

Pore-formation

ABSTRACT

The insecticidal Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* bacteria are pore-forming toxins that lyse midgut epithelial cells in insects. We have previously proposed that they form pre-pore oligomeric intermediates before membrane insertion. For formation of these oligomeric coiled-coil structures are important, and helix α -3 from Cry toxins could form coiled-coils. Our data shows that different mutations in helix α -3 are affected in pore formation and toxicity. Mutants affected in toxicity bind Bt-R₁ receptor with a similar K_D as the wild type toxin but do not form oligomers nor induce pore formation in planar lipid bilayers, indicating that the pre-pore oligomer is an obligate intermediate in the intoxication of Cry1Ab toxin and that interaction of monomeric Cry1Ab with Bt-R₁ is not enough to kill susceptible larvae.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	318
2. Models of the mode of action of Cry toxins in lepidopteran insects	319
3. Role of coiled coil structures in oligomerization of different proteins	319
3.1. Analysis of coiled-coil structures in Cry toxin family and their role in toxin oligomerization	320
3.2. Mutagenesis of helix α -3 of different Cry toxins	320
4. Analysis of pore formation induced by oligomeric structures of different Cry toxins	321
5. Final remarks	321
Acknowledgements	322
References	322

1. Introduction

Pore forming toxins are biological weapons produced by a variety of living organisms, particularly bacteria but also some insects, reptiles and marine invertebrates [34]. These proteins affect the membrane of target cells, disrupting the

permeability barrier, and leading eventually to cell death. The pore-forming toxins typically transform from soluble, monomeric proteins to oligomers that form transmembrane ionic channels [34]. The Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt) are widely used as insecticides [10,35,39]. These proteins have been recognized as pore-forming toxins and their

* Corresponding author. Tel.: +52 777 3291635; fax: +52 777 3291634.

E-mail address: bravo@ibt.unam.mx (A. Bravo).

primary action is to lyse midgut epithelial cells in target insects by forming lytic pores in the apical microvilli membrane. It has been proposed that in order to exert their toxic effect, a pre-pore oligomeric intermediate is formed leading finally to membrane inserted oligomeric pores [3,35]. However, an alternative model proposed that the toxicity of Cry proteins is mainly due to the interaction of monomeric toxin with the Bt-R₁ receptor activating a PKA signaling pathway that results in cell death [45,35].

Numerous Bt strains have been isolated that show activity towards lepidopteran, dipteran or coleopteran insects. In addition, Bt strains active against Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera and Mallophaga insect orders and to other non-insect organisms like nematodes, mites and protozoa have been reported [10,39]. The entomopathogenic activity of Bt is mainly due to Cry toxins. These toxins are highly specific to their target insect, innocuous to humans, vertebrates and plants, and completely biodegradable. Therefore, Bt is a viable alternative for the control of insect pests in agriculture and disease vectors of importance in public health. More than 150 different cry genes have been isolated. This constitutes an important arsenal for the control of a wide variety of insect pests [10].

The 3D structures of several Cry toxins have been solved. The overall topology is similar within these toxins, suggesting similar mechanisms of action. The toxins are composed of three structural domains. Domain I is a seven α -helix bundle in which a central helix α -5 is surrounded by six outer helices. This domain has been implicated in formation of a membrane channel. Domain II consist of three antiparallel β -sheets packed around a hydrophobic core in a "beta-prism". This domain has been described as the specificity-determining domain. Finally, domain III is a β -sandwich of two antiparallel β -sheets. It is also implicated in insect specificity since it is involved in receptor binding [10,39].

Despite the fact that Cry toxins are widely used as insecticides, their mode of action is still not completely understood. In this review, we will summarize our current knowledge on the mode of action of Cry toxins that are active against lepidopteran insects and provide some novel information regarding the role of the toxin oligomeric structure in forming ionic channels in the targeted membrane and in the overall toxicity against insect larvae.

2. Models of the mode of action of Cry toxins in lepidopteran insects

Different models describing the mechanism of action of Cry toxins have been reported. For many years the Cry toxins have been recognized as pore-forming toxins that induce cell death by forming ionic pores [10,35,39]. Cry toxins insert into lipid rafts membranes present in the apical microvilli membrane of midgut cells of susceptible larvae, causing osmotic lysis and subsequent death of the larvae [3,30,39,46]. A second model proposed that these toxins activate a signal pathway through receptor interaction, resulting in insect cell death without the participation of lytic-pores [45]. It is important to note that this alternative model was proposed based on the effect of Cry1Ab toxin to cultured *Trichoplusia ni* H5 insect cells expressing the

Muscarda sexta toxin-receptor, Bt-R₁, not in insect larvae. Finally, a third model suggested that besides membrane disruption by Cry toxins, other midgut bacteria are necessary to produce septicemia that kill the larvae [4].

In the pore-forming- and signal transduction-models, toxin receptor interaction is a key step that determines toxicity. In the case of Cry1A toxins, two receptors have been characterized in several lepidopteran species, cadherin-like proteins (named Bt-R₁ in the case of *M. sexta*) [42], and the GPI-anchored proteins aminopeptidase-N (APN) and alkaline phosphatase [22,25].

In the pore-forming model, it is proposed that Bt-R₁ and GPI-anchored receptors are important and participate in a sequential manner [3,23]. After proteolytic activation of Cry1A protoxin by insect midgut proteases, the activated toxin binds to the Bt-R₁ receptor, and this interaction facilitates additional cleavage of the N-terminal end of the toxin, eliminating helix α -1, resulting in the formation of a pre-pore oligomeric structure [13]. The oligomeric structure has been observed in several Cry toxins [1,13,18,26,30,33,36,37,40]. The pre-pore binds to a second receptor, the GPI-anchored aminopeptidase, due to its higher affinity to this receptor [3], facilitating the insertion of the oligomer into membrane lipid rafts and forming pores [3,46]. Importantly, another GPI-anchored protein, an alkaline phosphatase, has been recognized as a Cry1Ac receptor in *Heliothis virescens* and *M. sexta* [22,23]. Alkaline phosphatase could also participate in facilitating the pre-pore membrane insertion into lipid rafts, explaining why Cry1Ac toxin mutations that were severely affected in APN binding are still active against *M. sexta* larvae [6,20]. In the pore-forming model, the pre-pore oligomer is responsible for initiating cell death [3]. In contrast, in the signal transduction model [45], only the binding of the monomeric form of the Cry toxin to Bt-R₁ receptor is responsible for toxicity, and interaction with the GPI-anchored receptors and pore formation are not relevant for Cry toxicity. It was proposed in the signal transduction model that binding of Cry toxin to Bt-R₁ receptor activates a G protein and adenylyl cyclase, which promotes production of intracellular cAMP. The increased levels of cAMP activate Protein Kinase A that causes cell death [45].

3. Role of coiled coil structures in oligomerization of different proteins

There are many proteins that form stable oligomeric structures and many of these oligomers are stabilized by α -helical coiled-coil structures. These coiled-coils constitute an important protein-folding motif formed in the interaction between two to five α -helices. They are involved in oligomerization of several proteins, forming specific oligomers with high thermodynamic stability [5,9]. The primary structure of coiled-coil structures is characterized by heptads of residues ($abcd\text{efg}$)_n, with a unique pattern of internal *a* and *d* positions occupied mostly by apolar residues forming a hydrophobic core and positions *g* and *e* occupied by charged residues. The hydrophobic core of coiled coils is important for protein-protein interactions with a matching α -helix and mutagenesis of these positions affects the stability of this interaction [32]. It is

similar change constructed in Cry1Ab toxin (mutant R99E) was severely affected in toxicity to *M. sexta* and in pore formation activity when analyzed in black lipid bilayers [21]. The low response in pore formation of mutant R99E correlated with the inability of this mutant to form the 250 kDa oligomeric structure [21]. In addition the binding characteristics of this mutant was analyzed, showing that mutant R99E was able to bind to BBMV with similar high affinity as the wild type, since binding competition of biotinylated-Cry1Ab toxin with unlabelled mutant protein was identical to that of the unlabelled wild type toxin [21]. Specifically the binding interaction with Bt-R₁ was not affected, since ligand blots and ELISA binding competition assay of the mutant R99E to a Bt-R₁ protein fragment that contains all the Cry1A binding sites characterized so far (CR7–CR12) [14,15,39] showed that it bound to Bt-R₁ protein fragment with the same K_D as the wild type Cry1Ab toxin [21]. It is important to mention that the procedure of ELISA competition assay permits the determination of true association rate constants in solution, and several reports have shown agreement in the determination of K_D values by these assays and those obtained by conventional methods (immunoprecipitation of the radiolabeled antigen, fluorescence transfer or surface plasmon resonance) [11,12,17].

Other important mutations performed in helix α -3 of Cry1Ac toxin are those introduced in residues R93 and A92. These mutants were also affected toxicity, but only the conservative change R93K was fully active, while other changes of R93 (C, A, and S) showed 100–1000 fold reduced toxicity and many other changes resulted in complete loss of toxicity [8,44]. The authors of this study concluded that a positive charge in this position could participate in the formation of specific binding domain or that it could be important for the arrangement of α -helices in the amino terminal region of the toxin, and that the conformation of this domain could indirectly disrupt the specificity domain of the toxin [44]. The introduction of a negative charge in residue A92 supported this hypothesis since mutations A92E and A92D were severely affected in toxicity and correlated with loss of pore formation [8,44]. It was finally proposed that the irreversible insertion into the BBMV was affected in A92E and A92D mutants [8]. Residue R93 is located in position α of the predicted coiled coil structure of helix α -3 (Fig 1), and as stated above this is a highly conserved amino acid within the Cry toxin family. The presence of polar residues in the apolar interface has been documented for some coiled coil structures, it is correlated with proper alignment, orientation and selectivity of coiled-coils and contribute considerably to their stability [5,9]. In addition, it has been reported that a salt bridge within the α -helix that forms the coiled-coil stabilizes this structure and is important to trigger the coiled-coil [24]. The residue R93 of Cry1A toxins participate in a salt-bridged [36] suggesting that this helix could play an important role in toxin oligomerization.

Unfortunately the authors did not analyze oligomer formation or pore activity of R93 mutants. More recently we isolated a mutant R93F of Cry1Ab toxin, but this mutation resulted in formation of an unstable small crystal inclusion that was not analyzed further. However, we were able to isolate another mutant in Cry1Ab located in position α of the coiled coil structure of helix α -3, Y107E. This mutant was severely affected in toxicity to *M. sexta* with a $LC_{50} > 2000$ ng

cm². Oligomer formation was not observed with this mutant, and the pore formation activity was not present when analyzed in black lipid bilayers, suggesting an important role of this residue in oligomerization and channel formation [21]. It is important to mention that the binding affinity of this mutant to Bt-R₁ receptor was not affected and the K_D value obtained was similar to that of the wild type toxin [21].

4. Analysis of pore formation induced by oligomeric structures of different Cry toxins

Different approaches have been used to study pore formation activity. One approach analyses changes in ion permeability using a fluorescent dye that is sensitive to changes in membrane potential, 3,3'-dipropylthiobarbituric acid iodide (DiSC₅) [2,27,43]. Using this strategy it was reported that oligomeric Cry1Ab induced a dose-dependent K⁺ permeability and that the oligomeric Cry1Ab structure has a much higher pore-forming activity than the corresponding monomeric structure [30].

The oligomer and pore formation activities of other Cry toxins have also been reported (Cry1Aa, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, and Cry1Fa) [30], showing that samples containing the oligomeric toxin showed higher pore-formation activity than samples activated with trypsin that only contain monomeric toxin [30]. This data shows that the oligomeric structure of Cry toxins, but not the monomer, is the intermediate that is responsible for insertion into the membrane and pore formation.

5. Final remarks

Most of the bacterial toxins known as pore forming toxins are secreted as water-soluble proteins and undergo conformational changes in order to insert into cell membrane of their target. These toxins are activated by host proteases after receptor binding inducing the formation of an oligomeric pre-pore structure that is insertion competent [34].

To determine the role of the pre-pore oligomer formation in the toxicity of Cry toxins some single-point mutations that affected pre-pore formation were isolated, showing that helix α -3, of domain I of Cry toxins is involved in oligomerization and mutations in some residues of this helix severely affected pore formation and toxicity without any effect in the binding interaction with Bt-R₁ receptor [21]. These data suggest that oligomer formation is an important step in the mechanism of action and that the pre-pore is playing a major role in toxicity in insect larvae.

Formation of the pre-pore oligomer has been observed in several Cry proteins with different specificity including lepidopteran specific, Cry1Ab [13,36,40], Cry1Ac [23], Cry1Ca [18,30], Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa [30], coleopteran specific, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Ca [37], and dipteran specific, Cry4Ba [26] and Cry11Aa (Pérez and Bravo, unpublished results). Protein samples containing Cry1Ab pre-pore oligomer were more toxic to *M. sexta* larvae than protein samples containing only monomeric Cry1Ab toxin [13]. In addition, Cry toxin samples containing oligomeric structures correlated with high pore

activity in contrast to monomeric samples that showed marginal pore-formation activity [13,30,36]. The Cry1Ab pre-pore oligomer is membrane insertion competent in contrast to monomeric toxin that showed low membrane insertion rates [36]. The pre-pore oligomer induces high stable conductance in synthetic lipid bilayers suggesting insertion of a single conformation. In contrast insertion of the monomeric toxin induced multiple subconducting states showing unstable traces with current jumps of intermediate levels that are difficult to resolve [36]. All these data support the pore forming model, suggesting that the pre-pore oligomer is an obligate intermediate in the intoxication of Cry1Ab toxin and that the interaction of monomeric Cry1Ab with Bt-R₁ is not sufficient to kill susceptible larvae. However, we cannot exclude the possibility that intracellular responses also have a role and synergize the effect of the toxin in insect larvae. In fact, we know that Cry toxins insert into lipid rafts membranes and it is important to mention that lipid rafts are detergent-resistant membranes enriched in glycosphingolipids, cholesterol and GPI-anchored proteins and are involved in signal transduction, sorting and trafficking of plasma membrane proteins in mammalian cells [38]. Also, they function as pathogen portals for different viruses, bacteria and toxins [7,38]. Recently, we demonstrated that the APNs in *M. sexta* and *H. virescens*, are located in lipid rafts, and that the integrity of these microdomains is essential for Cry1Ab pore activity [46]. These data could indicate that signal transduction induced by Cry toxin insertion into lipid rafts could be part of the mechanism of action of these toxins, but this remains to be demonstrated. It is important to mention that other pore forming toxins, such as the α -toxin from *Staphylococcus aureus* and aerolysin produced by *Aeromonas hydrophila*, induced cell death by two different mechanisms, pore-formation and apoptosis, depending on the cell type and on the dose of toxin [29,31]. Over-expression of antiapoptotic protein could block aerolysin-induced apoptosis and apoptotic pathway was not triggered [31]. In the case of aerolysin it was demonstrated that apoptosis was not directly triggered by binding of the toxin to its receptor, but rather it was caused by the production of a small number of channels in the membrane [31] indicating that the intracellular downstream effects were triggered by pore formation and membrane depolarization. The data presented in this work also indicate that pore formation induced by oligomeric toxin is required for Cry1A toxicity *in vivo*.

Acknowledgments

The research work of our groups was supported in part by CONACYT U48631-Q and 46176-Q, USDA 2007-35607-17780 and NIH 1R01 AD65014.

REFERENCES

[1] Aronson AI, Chaosian G, Wu L. Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin upon binding to target insect

larval midgut vesicles. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2503–7.

[2] Bashford CL, Smith JC. The use of optical probes to monitor membrane potential. *Methods Enzymol* 1979;55:569–86.

[3] Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 2004;1667:38–46.

[4] Bodevinck NA, Raffa KF, Handelsman J. Midgut bacteria acquired for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:15196–9.

[5] Buschard P, Skarstedt J, Stråtkov SV. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 2001;11:82–8.

[6] Burton SL, Ellar DJ, Li J, Derbyshire DJ. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J Mol Biol* 1999;287:1011–22.

[7] Cabiaux V, Wolff CH, Ruyschaert JM. Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxin virulence. *Int J Biol Macromol* 1997;21:285–98.

[8] Chen XJ, Curtiss A, Alcantara E, Dean DH. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ab reduced the irreversible binding of toxin to Manduca sexta brush border membrane vesicles. *J Biol Chem* 1995;270:6412–9.

[9] Chothia C, Levin M, Richardson D. Helix to helix packing in proteins. *J Mol Biol* 1981;145:215–50.

[10] de Maagd RA, Bravo A, Barry C, Crickmore N, Schnepf HE. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Ann Rev Genet* 2003;37:409–33.

[11] Dong L, Chen S, Bartsch U, Schachner M. Generation of affinity matured scFv antibodies against mouse neural cell adhesion molecule L1 by phage display. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:60–70.

[12] Fiquet B, Chaffotte AF, Djavadi-Ohanizadeh L, Goldberg ME. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1985;77:305–19.

[13] Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett* 2002;513:242–6.

[14] Gómez I, Oltman D, Gill SS, Bravo A, Soberón M. Mapping the epitope in cadherin like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J Biol Chem* 2001;276:28906–12.

[15] Gómez I, Dean DH, Bravo A, Soberón M. Molecular basis for *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* 2003;42:10482–9.

[16] Gochalski P, Masson L, Boissou S, Pustai-Garay M, Schwartz JL, Brousseau R, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(x) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol* 1995;254:447–64.

[17] Huxley F, Djavadi-Ohanizadeh L, Goldberg ME. Measurement of antibody/antigen association rate constants in solution by a method based on the enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1997;200:155–9.

[18] Herrera S, González-Cabrera J, Ferrás J, Bakker PL, de Maagd R. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domain II and III in specificity towards *Spodopopta exigua* larvae. *Biochem J* 2004;384:507–13.

- [19] Hua G, Just-Fuentes JL, Adang MJ. Bt- δ , a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. *J Biol Chem* 2004;279:28051–6.
- [20] Jenkins JL, Lee MK, Sangudala S, Adang MJ, Dean DH. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity. *FEBS Lett* 1999;462:373–6.
- [21] Jiménez-Juárez N, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saub-Rincon G, Damian-Alamazo JY, Gil SS, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem* 2007;282:21222–9.
- [22] Just-Fuentes JL, Adang MJ. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem* 2004;271:3127–35.
- [23] Just-Fuentes JL, Adang MJ. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J Invertebr Pathol* 2006;92:166–71.
- [24] Kummerer RA, Jaravine VA, Frank S, Schultheis T, Landwehr R, Lutzig A, et al. An intracellular salt bridge within the trigger site stabilizes the GCN4 leucine zipper. *J Biol Chem* 2001;276:13685–8.
- [25] Knight P, Crickmore N, Ellar DJ. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase. *Mol Microbiol* 1994;11:429–36.
- [26] Likivitsanavong S, Katzenmeier G, Angathanasombut Ch. Asn183 in $\alpha 5$ is essential for oligomerization and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Arch Biochem Biophys* 2006;445:46–55.
- [27] Lorenze A, Darsson A, Díaz C, Liévano A, Quinero R, Bravo A. δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett* 1995;360:217–22.
- [28] Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled-coils from protein sequences. *Science* 1991;252:1162–4.
- [29] Méndez BE, Kourouva I. Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;29:39–45.
- [30] Muñoz-Garay C, Sánchez J, Darsson A, de Maagd RA, Bakker P, Soberón M, et al. Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different Cry toxins. *J Membr Biol* 2006;212:61–8.
- [31] Nelson KL, Brodsky RA, Buckley JT. Channels formed by subnanomolar concentrations of the toxin aerolysin trigger apoptosis of T lymphomas. *Cell Microbiol* 1999;1:69–74.
- [32] O'Shea EK, Lumb KJ, Kim PS. Peptide Velcro: design of a heterodimeric coiled coil. *Curr Biol* 1993;3:658–67.
- [33] Pardo-López L, Gómez I, Russell C, Sánchez J, Soberón M, Bravo A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric prepore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* 2006;45:10329–36.
- [34] Parker MW, Fall SC. Pore-forming proteins: from structure to function. *Progress Biophys Mol Biol* 2005;88:91–124.
- [35] Pigeon CR, Ellar DJ. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:255–81.
- [36] Russell C, Muñoz-Garay C, Miranda-Casasolugo R, Gómez I, Rodiño-Ribera E, Soberón M, et al. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry* 2004;43:166–74.
- [37] Russell C, García-Robles I, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Martínez-Ramírez AC, Real MD, et al. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* [Say]. *Biochem Biophys Acta* 2004;1660:99–105.
- [38] Rosenberger CM, Brunell JH, Finlay BB. Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol* 2000;10:823–5.
- [39] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum JR, Feilstein J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:705–806.
- [40] Tighe NJ, Jacoby J, Ellar DJ. The alpha-helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:5715–20.
- [41] Vachon V, Prefontaine G, Cout F, Rang C, Marcou L, Masson I, et al. Role of helix 3 in pore formation by *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* 2002;41:6178–84.
- [42] Vallamudi RK, Weber E, Ji L, Ji TH, Bulla Jr LA. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem* 1995;270:5490–4.
- [43] Waggoner A. Optical probes of membrane potential. *J Membr Biol* 1976;27:317–34.
- [44] Wu D, Aronson AI. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J Biol Chem* 1992;267:2311–7.
- [45] Zhang X, Candau M, Grško NB, Talsing R, Bulla Jr A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PLA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9897–902.
- [46] Zhuang M, Oltman DK, Gomez I, Pullikuth AK, Soberon M, Bravo A, et al. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J Biol Chem* 2002;277:13863–72.

11.BIBLIOGRAFÍA

1. Abrami, L., Fivaz, M., and van der Goot, F.G., *Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface*. Trends Microbiol, 2000. **8**(4): p. 168-72.
2. Alzate, O., You, T., Claybon, M., Osorio, C., Curtiss, A. and Dean, D.H., *Effects of disulfide bridges in domain I of Bacillus thuringiensis CryIAa delta-endotoxin on ion-channel formation in biological membranes*. Biochemistry, 2006. **45**: p. 13597-13605.
3. Andrews R.E., B., M.M., Bulla, L.A, *Protease activation of entomocidal protoxin of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*. . Appl Environ Microbiol, 1985. **50**: p. 737-742.
4. Angst, B.D., Marcozzi, C., and Magee, A.I., *The cadherin superfamily: diversity in form and function*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 4): p. 629-41.
5. Aroian, R. and van der Goot, F.G., *Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs)*. Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(1): p. 57-61.
6. Aronson, A.I., Geng, C., and Wu, L., *Aggregation of Bacillus thuringiensis CryIA toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(6): p. 2503-7.
7. Aronson, A.I., Wu, D., and Zhang, C., *Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a Bacillus thuringiensis protoxin gene*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4059-65.
8. Atzumi, S., Mizuno, E., Hara, H., Nakanishi, K., Kitami, M., Miura, N., Tabunoki, H., Watanabe, A. and Sato, R., *Location of the Bombyx mori aminopeptidase N type binding site on Bacillus thuringiensis CryIAa toxin* Appl Environ Microbiol, 2005. **71**: p. 3966-3977.
9. Bechtel, D.B.a.B., L.A., *Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in Bacillus thuringiensis*. J Bacteriol, 1976. **127**: p. 1472-1481.
10. Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J. and Li, J., *Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications*. J Mol Biol, 2005. **348**: p. 363-382.
11. Boonserm, P., et al., *Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from Bacillus thuringiensis at a 2.8-angstrom resolution*. J Bacteriol, 2006. **188**(9): p. 3391-401.
12. Bravo, A., *Phylogenetic relationships of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin family proteins and their functional domains*. J Bacteriol, 1997. **179**(9): p. 2793-801.
13. Bravo, A., Gomez, I., Miranda, R., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Zhuang, M., Sarjeet, S.G., Soberón, M., *Oligomerization triggers binding of a Bacillus thuringiensis*

- CryIA pore-forming toxin to a second receptor leading to insertion into membrane microdomains*. Biochem Biophys Acta, 2004. **1667**(1): p. 38-46.
14. Bravo, A., Jansens, S. and Peferoen, M., *Immunocytochemical localization of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins in intoxicated insects*. J. Invertebr. Pathol, 1992. **60**: p. 237-247.
 15. Bravo, A., et al., *N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the Bacillus thuringiensis CryIAc insecticidal toxin*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 23985-7.
 16. Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S.V., *Coiled coils: a highly versatile protein folding motif*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(2): p. 82-8.
 17. Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J. and Derbyshire, D.J., *N-Acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a Bacillus thuringiensis insecticidal toxin*. J Mol Biol, 1999. **278**: p. 1011-1022.
 18. Chen, J., et al., *Comparison of the localization of Bacillus thuringiensis CryIA delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, Manduca sexta*. Cell Tissue Res, 2005. **321**(1): p. 123-9.
 19. Chiron, M.F., Fryling, C.M., and FitzGerald, D.J., *Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver*. J Biol Chem, 1994. **269**(27): p. 18167-76.
 20. Cohen, C.a.P., D.A., *A conserved C-terminal assembly region in paramyosin and myosin rods*. J Struct Biol, 1998. **122**: p. 180-187.
 21. Crickmore, N., et al., *Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 807-13.
 22. de Maagd, R.A., Bakker, P.L., Masson, L., Adang, M.J., Sangadala, W., Stickema, W. and Bosch, D., *Domain III of the Bacillus thuringiensis delta-endotoxin CryIAc is involved in binding to Manduca sexta brush border membranes and to its purified aminopeptidase N*. Mol Microbiol, 1999. **31**: p. 463-471.
 23. de Maagd, R.A., et al., *Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria*. Annu Rev Genet, 2003. **37**: p. 409-33.
 24. Derbyshire, D.J., Ellar, D.J. and Li, J. , *Crystalization of the Bacillus thuringiensis toxin CryIAc and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**: p. 1938-1944.
 25. Dorsch, J.A., et al., *CryIA toxins of Bacillus thuringiensis bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R(1) in Manduca sexta*:

- involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem Mol Biol, 2002. **32**(9): p. 1025-36.
26. Fernández, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A. and Soberón, M., *A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in Aedes aegypti larvae*. Biochem Journal, 2006. **394**: p. 45594-45602.
 27. Fernandez, N.J. and Kidney, B.A., *Alkaline phosphatase: beyond the liver*. Vet Clin Pathol, 2007. **36**(3): p. 223-33.
 28. Forcada, C., et al., *Resistance to Bacillus thuringiensis CryIAc toxin in three strains of Heliothis virescens: proteolytic and SEM study of the larval midgut*. Arch Insect Biochem Physiol, 1999. **42**(1): p. 51-63.
 29. Gahan, L.J., Gould, F. And Heckel, D.G., *Identification of a gene associated with Bt resistance in Heliothis virescens*. Science, 2001. **293**: p. 857-860.
 30. Galitsky, N., et al., *Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of Bacillus thuringiensis*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 8): p. 1101-9.
 31. Gazit, E., et al., *The alpha-5 segment of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin: in vitro activity, ion channel formation and molecular modelling*. Biochem J, 1994. **304** (Pt 3): p. 895-902.
 32. Gilbert, R.J., et al., *Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of Streptococcus pneumoniae*. Cell, 1999. **97**(5): p. 647-55.
 33. Gill, M.a.E., D, *Tansgenic Drosophila reveals a functional in vivo receptor for the Bacillus thuringiensis toxin CryIAc*. Insect Biochem Mol Biol, 2002. **11**: p. 619-625.
 34. Gómez, I., Arenas, I., Benitez, I., Miranda-Ríos, J., Becerril, B., Grande, R., Almagro, J.C., Bravo, A. and Soberón, M., *Specific epitopes of domains II and III of Bacillus thuringiensis CryIAb toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in Manduca sexta*. The Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(45): p. 34032-34039.
 35. Gomez, I., Dean, D. H., Bravo, A. and Soberon, M., *Molecular basis for Bacillus thuringiensis CryIAb toxin specificity: two structural determinants in the Manduca sexta Bt-R1 receptor interact with loops alpha-8 and 2 in domain II of CyIAb toxin*. Biochemistry, 2003. **42**(35): p. 10482-9.
 36. Gomez, I., et al., *Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope (869)HITDTNKK(876) in Manduca sexta Bt-R(1) receptor with loop 2 of domain II of Bacillus thuringiensis CryIA toxins*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 30137-43.

37. Gomez, I., et al., *Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in Bacillus thuringiensis CryIA toxin interaction using phage display*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 28906-12.
38. Gomez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., *Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of Bacillus thuringiensis CryIAb toxin*. FEBS Lett, 2002. **513**: p. 242-246.
39. Griffiths, J.S., Huffman, D.I., Whitacre, J.L., Barrows, B.D., Marroquin, L.D., Muller, R., Brown, J.R., Hennet, T., Esko, J.D. and Aroian R.V, *Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 45594-45602.
40. Grochulski, P., et al., *Bacillus thuringiensis CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation*. J Mol Biol, 1995. **254**(3): p. 447-64.
41. Hara, H., et al., *A cadherin-like protein functions as a receptor for Bacillus thuringiensis CryIAa and CryIAc toxins on midgut epithelial cells of Bombyx mori larvae*. FEBS Lett, 2003. **538**(1-3): p. 29-34.
42. Herrero, S., et al., *Bacillus thuringiensis CryICa-resistant Spodoptera exigua lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes*. BMC Genomics, 2005. **6**: p. 96.
43. Herrero, S., et al., *Mutations in the Bacillus thuringiensis CryICa toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards Spodoptera exigua larvae*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 3): p. 507-13.
44. Herrmann, H., et al., *Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins*. J Mol Biol, 1999. **286**(5): p. 1403-20.
45. Hodgman, T.C. and Ellar, D.J., *Models for the structure and function of the Bacillus thuringiensis delta-endotoxins determined by compilational analysis*. DNA Seq, 1990. **1**(2): p. 97-106.
46. Hofman, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. And Van Mellaert, H. , *Specificity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts*. Proc Natl Acad Sci USA, 1988. **85**: p. 7844-7848.
47. Hossain, D.M., et al., *Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of Bombyx mori, that binds to CryIA toxins*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(8): p. 4604-12.

48. Hua, G., Jurat-Fuentes, J.L., and Adang, M.J., *Fluorescent-based assays establish Manduca sexta Bt-R(1a) cadherin as a receptor for multiple Bacillus thuringiensis CryIA toxins in Drosophila S2 cells*. Insect Biochem Mol Biol, 2004. **34**(3): p. 193-202.
49. Jenkins, J.L., Lee, M.K., Valaitis, A.P, Curtiss, A. and Dean, D.H., *Bivalent sequential binding model of a Bacillus thuringiensis toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 14423-14431.
50. Jhonson, K.A., *Pathway of the microtubule-dynein: a comparison with actomyosin*. Annu Rev Biophys 1985. **14**: p. 161-188.
51. Jurat-Fuentes, J.L. and Adang, M.J., *Cry toxin mode of action in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae*. J Invertebr Pathol, 2006. **92**(3): p. 166-71.
52. Jurat-Fuentes, J.L. and Adang, M.J., *The Heliothis virescens cadherin protein expressed in Drosophila S2 cells functions as a receptor for Bacillus thuringiensis CryIA but not CryIFa toxins*. Biochemistry, 2006. **45**(32): p. 9688-95.
53. Jurat-Fuentes, J.L. and Adang, M.J., *Characterization of a CryIAC-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae*. Eur J Biochem, 2004. **271**(15): p. 3127-35.
54. Keller, M., et al., *Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of Spodoptera littoralis to CryIC*. Insect Biochem Mol Biol, 1996. **26**(4): p. 365-73.
55. Knowles, B.H.a.E., D.J, *Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of Bacillus thuringiensis δ -endotoxin with different insect specificity*. Biochim Biophys Acta, 1987. **924**: p. 509-518.
56. Kozielski, F., *The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility*. J Cell Biol, 1997. **140**: p. 1407-1416.
57. Kumar, A.S. and Aronson, A.I., *Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a Bacillus thuringiensis delta-endotoxin*. J Bacteriol, 1999. **181**(19): p. 6103-7.
58. Kumar, N.S. and Venkateswerlu, G., *Involvement of an endogenous metalloprotease in the activation of protoxin in Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*. Biochem Mol Biol Int, 1997. **42**(5): p. 901-8.
59. Lee, M.K., Rahamojan, F., Jenkins, J.L., Curtiss, A.S. and Dean, D.H., *Role of two arginine residues in domain II loop 2 of CryIAb and CryIAC Bacillus thuringiensis delta-endotoxin in toxicity and binding to Manduca sexta and Limantria dispar aminipeptidase N*. Mol Microbiol, 2000. **38**: p. 289-298.

60. Lee, M.K., Young, B.A. and Dean, D.H., *Domain III exchanges of Bacillus thuringiensis CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**: p. 306-312.
61. Lekstrom-Himes, J.a.X., K.G., *Biological role of CCAA/enhancer-binding protein family of transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 28545-28548.
62. Li, J.D., Carroll, J., and Ellar, D.J., *Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis at 2.5 A resolution*. Nature, 1991. **353**(6347): p. 815-21.
63. Liang, Y., Patel, S.S., and Dean, D.H, *Irreversible binding Kinetics of Bacillus thuringiensis CryIA delta-endotoxins to gipsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 24719-24724.
64. Lilien, J., Balsamo, J., *The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin*. Curr Opin Microbiol, 2005. **17**(5): p. 459-465.
65. Lorence, A., et al., *Delta-endotoxins induce cation channels in Spodoptera frugiperda brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers*. FEBS Lett, 1995. **360**(3): p. 217-22.
66. Luo, K., et al., *The Heliothis virescens 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific Bacillus thuringiensis CryIA delta-endotoxin binding and pore formation*. Insect Biochem Mol Biol, 1997. **27**(8-9): p. 735-43.
67. Masson, L., Tabashnik, B.E., Liu, Y., Brousseau, R. and Schwartz, J., *Helix 4 of the Bacillus thuringiensis CryIAa toxin lines the lumen of the ion channel*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(45): p. 31996-32000.
68. McNall, R.J.a.A., M.J., *Identification of novel Bacillus thuringiensis CryIAc binding proteins in Manduca sexta midgut through proteomic analysis*. Insect Biochem Mol Biol, 2003. **33**: p. 999-1010.
69. Melton, J.A., et al., *The identification and structure of the membrane-spanning domain of the Clostridium septicum alpha toxin*. J Biol Chem, 2004.
70. Milne, R., Kaplan, H., 1993, *Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (Choristoneura fumiferana) responsible for the activation of delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem Mol Biol, 1993. **23**: p. 663-673.
71. Miranda, R., Zamudio, F.Z., and Bravo, A., *Processing of CryIAb delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis by Manduca sexta and Spodoptera frugiperda midgut proteases: role*

- in protoxin activation and toxin inactivation*. Insect Biochem Mol Biol, 2001. **31**(12): p. 1155-63.
72. Morse, R.J., Yamamoto, T., and Stroud, R.M., *Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope*. Structure (Camb), 2001. **9**(5): p. 409-17.
73. Muga, A., et al., *pH-dependent stability and membrane interaction of the pore-forming domain of colicin A*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1553-7.
74. Munoz-Garay, C., Sánchez, J., Darzon, A., de Maagd, R.A., Bakker, P., Soberón, M. and Bravo, A., *Permeability changes of Manduca sexta midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different Cry toxins*. J Membrane Biol, 2006. **212**: p. 61-68.
75. Nagamatsu, Y., Koike, T., Sasaki, K., Yoshimoto, A. And Furukawa, Y, *The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic activity of the Bacillus thuringiensis insecticidal CryIAa toxin*. FEBS Lett, 1999. **460**: p. 385-390.
76. Nagamatsu, Y., et al., *Cloning, sequencing, and expression of the Bombyx mori receptor for Bacillus thuringiensis insecticidal CryIA(a) toxin*. Biosci Biotechnol Biochem, 1998. **62**(4): p. 727-34.
77. Nagamatsu, Y., et al., *Identification of Bombyx mori midgut receptor for Bacillus thuringiensis insecticidal CryIA(a) toxin*. Biosci Biotechnol Biochem, 1998. **62**(4): p. 718-26.
78. Oppert, B., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Johnson, D., McGaughey, W.H, *Proteinase-mediated insect resistance to Bacillus thuringiensis toxins*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 23473-23476.
79. Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D., Upton, S.J., McGaughey, W.H, *Luminal proteases from Plodia interpunctella and the hydrolysis of Bacillus thuringiensis CryIAC protoxin*. Insect Biochem Mol Biol, 1996. **26**: p. 571-583.
80. Ounjai, P., Unger, V.M., Sigworth, F.J. and Angsuthanasombat, Ch., *Two conformational states of the membrane-associated Bacillus thuringiensis Cry4Ba delta-endotoxin complex revealed by electron crystallography: implications for toxin-pore formation*. Biochemical and Biophysical Research communication, 2007. **361**: p. 890-895.
81. Pardo-Lopez, L., et al., *Structural and functional analysis of the pre-pore and membrane-inserted pore of CryIAb toxin*. J Invertebr Pathol, 2006. **92**(3): p. 172-7.
82. Parker, M.W. and Feil, S.C., *Pore-forming protein toxins: from structure to function*. Prog Biophys Mol Biol, 2005. **88**(1): p. 91-142.

83. Parker, M.W. and Pattus, F., *Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(10): p. 391-5.
84. Pelletier, J.N., Arndt, K.M., Plückthun, A. and Michnick, S.W., *An in vivo library-versus-library selection of optimized protein-protein interactions*. Nature, 1999. **17**: p. 683-690.
85. Pigott, C.R. and Ellar, D.J., *Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity*. Microbiol Mol Biol Rev, 2007. **71**(2): p. 255-81.
86. Poklar, N., et al., *pH and temperature-induced molten globule-like denatured states of equinatoxin II: a study by UV-melting, DSC, far- and near-UV CD spectroscopy, and ANS fluorescence*. Biochemistry, 1997. **36**(47): p. 14345-52.
87. Rajagopal, R., et al., *Silencing of midgut aminopeptidase N of Spodoptera litura by double-stranded RNA establishes its role as Bacillus thuringiensis toxin receptor*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 46849-51.
88. Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S. and Ravel, J., *Genomics of the Bacillus cereus group of organisms*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**: p. 303-329.
89. Rausell, C., et al., *Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the Bacillus thuringiensis Cry3 toxins in membranes of Leptinotarsa decemlineata (Say)*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1660**(1-2): p. 99-105.
90. Rausell, C., et al., *Tryptophan spectroscopy studies in black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of CryIAb toxin from Bacillus thuringiensis is the membrane-insertion intermediate*. Biochemistry, 2004. **43**(1): p. 166-74.
91. Rausell, C., Pardo-López, L., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Morera, C. Soberón, M. and Braavo, A., *Unfolding events in the water-soluble monomeric CryIAb toxin during transition to oligomeric pre-pore and membrane inserted pore channel*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(53): p. 55168-55175.
92. Sangadala, S., et al., *A mixture of Manduca sexta aminopeptidase and phosphatase enhances Bacillus thuringiensis insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)-K⁺ efflux in vitro*. J Biol Chem, 1994. **269**(13): p. 10088-92.
93. Sangadala, S., Walters, F.S., English, L.H. and Adang, J.M., *A mixture of Manduca sexta aminopeptidase and phosphatase enhances Bacillus thuringiensis insecticidal CryIAc toxin binding and Rb86-K⁺ efflux in vitro*. The Journal of Biological Chemistry, 1994. **13**: p. 10088-10092.
94. Schnepf, E., et al., *Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 775-806.

95. Schwartz, J.L., et al., *Restriction of intramolecular movements within the CryIAa toxin molecule of Bacillus thuringiensis through disulfide bond engineering*. FEBS Lett, 1997. **410**(2-3): p. 397-402.
96. Schwartz, J.L., et al., *Ion channels formed in planar lipid bilayers by Bacillus thuringiensis toxins in the presence of Manduca sexta midgut receptors*. FEBS Lett, 1997. **412**(2): p. 270-6.
97. Slatin, S.L., Abrams, C.K., and English, L., *Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **169**(2): p. 765-72.
98. Soberon, M., Pardo-López, L, López, I., Gómez, I., Tabashnik, B.E. and Bravo, A, *Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance*. Science, 2007. **318**: p. 1640-1642.
99. Stephens, E., et al., *The N-linked oligosaccharides of aminopeptidase N from Manduca sexta: site localization and identification of novel N-glycan structures*. Eur J Biochem, 2004. **271**(21): p. 4241-58.
100. Sutton, R.B., *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 resolution* Nature, 1998. **395**: p. 347-353.
101. Tigue, N.J., Jacoby, J., and Ellar, D.J., *The alpha-helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of CryIAc1 and CryIAb5 Bacillus thuringiensis toxins*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(12): p. 5715-20.
102. Tilley, S.J. and Saibil, H.R., *The mechanism of pore formation by bacterial toxins*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(2): p. 230-6.
103. Tomimoto, K., Hayakawa, T., and Hori, H. , *Pronase digestion of brush border membrane-bound CryIAa shows that almost the whole activated CryIAa molecule penetrates into the membrane* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2006. **144**: p. 413-422.
104. Vachon, V., Préfontaine, G., Coux, F., Rang, C., Marceau, L., Masson, L., Brousseau, R., Frutos, R., Schwartz, J-L and Laprade, R., *Role of helix 3 in pore formation by the Bacillus thuringiensis insecticidal toxin CryIAa*. Biochemistry, 2002. **41**: p. 6178-6184.
105. Vadlamudi, R.K., Ji, T.H., and Bulla, L.A., Jr., *A specific binding protein from Manduca sexta for the insecticidal toxin of Bacillus thuringiensis subsp. berliner*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12334-40.
106. Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, T.H., and Bulla, L.A, *Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of Bacillus thuringiensis*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 5490-5494.

107. Valaitis, A.P., et al., *Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds Bacillus thuringiensis CryIA toxins with high affinity*. Arch Insect Biochem Physiol, 2001. **46**(4): p. 186-200.
108. Valeva, A., et al., *Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin*. Embo J, 1996. **15**(8): p. 1857-64.
109. Van Rie, J., et al., *Specificity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects*. Eur J Biochem, 1989. **186**(1-2): p. 239-47.
110. Vie, V., et al., *Lipid-induced pore formation of the Bacillus thuringiensis CryIAa insecticidal toxin*. J Membr Biol, 2001. **180**(3): p. 195-203.
111. Walters, F.S., et al., *Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **196**(2): p. 921-6.
112. Wang, G.R., Wu, K.M., Liang, G.M. and Guo, Y.Y., *Gene cloning and expression of cadherin in midgut of Helicoverpa armigera and its CryIA binding region*. Sci China Ser C, 2005. **48**: p. 346-356.
113. Wang, P., Zhang, X., and Zhang, J., *Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, Trichoplusia ni*. Insect Biochem Mol Biol, 2005. **35**(6): p. 611-20.
114. Wolfersberger, M.G., *The toxicity of two Bacillus thuringiensis delta-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins*. Experientia, 1990. **46**(5): p. 475-7.
115. Wu, D. and Aronson, A.I., *Localized mutagenesis defines regions of the Bacillus thuringiensis delta-endotoxin involved in toxicity and specificity*. J Biol Chem, 1992. **267**(4): p. 2311-7.
116. Wu, D.a.A., A.I., *Localized mutagenesis defines regions of the Bacillus thuringiensis delta-endotoxin involved in toxicity and specificity*. The Journal of Biological Chemistry, 1992. **274**(4): p. 2311-2317.
117. Xie, R., Zhuang, M., Ross, L.S., Gómez, I., Oltean, D.I., Bravo, A., Soberón, M. and Gill, S.S., *Single aminoacids mutations in the cadherin receptor from Heliothis virescens affect its toxin binding ability to CryIA toxins*. J Biol Chem, 2005. **280**: p. 8416-8425.
118. Yau, W.M., et al., *The preference of tryptophan for membrane interfaces*. Biochemistry, 1998. **37**(42): p. 14713-8.

119. Zhan, H., et al., *Dynamic transitions of the transmembrane domain of diphtheria toxin: disulfide trapping and fluorescence proximity studies*. *Biochemistry*, 1994. **33**(37): p. 11254-63.
120. Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussing, R and Bulla, L.A, *A mechanism of cell death involving an adenylylcyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006. **103**(26): p. 9897-9902.