



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

SELECCIÓN DE PÉPTIDOS QUE UNEN RECEPTORES DE
LAS TOXINAS Cry1A DE *Bacillus thuringiensis*
EMPLEANDO LA TECNOLOGÍA DE DESPLIEGUE EN FAGOS

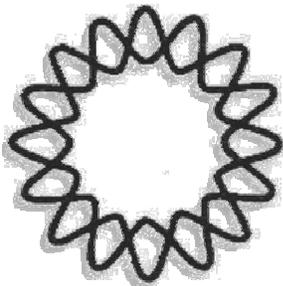
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

L. BIOT. MARÍA TERESA DE JESÚS MARTÍNEZ ESTRADA

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Isabel Gómez Gómez



CUERNAVACA, MORELOS

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradezco:

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dr. Gerardo Corzo y Dr. Ricardo Grande.

A las integrantes del jurado de examen: Dra. Susana López, Dra. Norma A. Valdez, Dra. Alicia González, Dra. Susana Castro.

A los titulares del laboratorio 18: Dr. Mario Soberón y Dra. Alejandra Bravo

A la directora de esta tesis: Dra. Isabel Gómez.

A CONACYT, por la beca 199745.

**El trabajo aquí presentado se realizó en
el Departamento de Microbiología Molecular del
Instituto de Biotecnología de la UNAM
bajo la dirección de la Dra. Isabel Gómez.**

CONTENIDO

	<i>Página</i>
Índice de tablas.....	iv
Índice de figuras.....	v
Abreviaturas.....	vii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES GENERALES	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	4
MECANISMO DE ACCIÓN.....	6
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	
ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS Cry.....	8
PROTEÍNAS DE UNIÓN PARA LAS TOXINAS Cry1: RECEPTORES.....	12
DESPLIEGUE EN FAGOS.....	14
DESPLIEGUE EN BACTERIAS.....	16
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19

	<i>Página</i>
MATERIALES Y MÉTODOS	
CEPAS UTILIZADAS.....	20
PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CRISTALES DE LA TOXINA Cry1Aa.....	20
PURIFICACIÓN DE scFv73.....	21
ACTIVACIÓN DE LOS CRISTALES DE LA TOXINA Cry1Aa.....	22
Solubilización y activación para la obtención de monómero...	22
Solubilización y activación para la obtención de oligómero.....	22
MARCAJE DEL MONÓMERO DE LA TOXINA Cry1Aa CON BIOTINA.....	23
PREPARACIÓN DE VESÍCULAS (VMMA) DE <i>Manduca sexta</i>	24
Extracción de tejido.....	24
Purificación de VMMA.....	24
Determinación de la actividad específica de aminopeptidasa	25
Determinación de la actividad específica de fosfatasa alcalina	25
LIBERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANCLADAS POR GPI CON PI-PLC.....	26
ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE LA TOXINA Cry1Aa A SUS RECEPTORES.....	26
Ensayo de unión de ligando.....	26
ELISA.....	26
SELECCIÓN DE PÉPTIDOS LINEALES: Ph.D.-12 TM	27
Amplificación y titulación de fagos.....	29
ELISA.....	29
SELECCIÓN DE PÉPTIDOS ESTRUCTURADOS: FliTrx TM	30
Western blotting.....	31
ELISA.....	32
RESULTADOS	
PRODUCCIÓN Y ACTIVACIÓN DE LA TOXINA Cry1Aa.....	33
PURIFICACIÓN DE VESÍCULAS DE <i>Manduca sexta</i>	35
LIBERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANCLADAS POR GPI EN LAS VMMA MEDIANTE TRATAMIENTO CON PI-PLC Y ANÁLISIS DE UNIÓN DE LA TOXINA Cry1Aa.....	37

	<i>Página</i>
SELECCIÓN DE PÉPTIDOS QUE RECONOCEN APN O ALP DE <i>M. sexta</i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE DESPLIEGUE EN FAGOS.....	40
Selección de péptidos lineales: Ph.D.-12™.....	40
Selección de péptidos estructurados: FliTrx™.....	43
 DISCUSIÓN.....	 51
 CONCLUSIONES.....	 60
 PERSPECTIVAS.....	 61
 BIBLIOGRAFÍA.....	 62

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla</i>	<i>Página</i>
1. Actividad específica de APN y ALP en las vesículas y homogenado inicial.....	36
2. Actividad específica de APN y ALP en las fracciones obtenidas al tratar las VMMA con PI-PLC.....	37
3. Secuencia de clonas FliTrx™ seleccionadas.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
1. Microfotografía electrónica de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> berliner 1715 durante la esporulación (Agaisse y Lereclus, 1995).....	4
2. Modelo de acción secuencial de las toxinas Cry (Bravo <i>et al.</i> , 2004b)	7
3. Estructura tridimensional de las toxinas Cry1Aa y Cry3A (Schnepf <i>et al.</i> , 1998).....	8
4. Dominios I, II y III de la toxina Cry1Aa (Grochulski <i>et al.</i> , 1995).....	9
5. Procedimiento de selección de péptidos desplegados en fagos (New England BioLabs Inc.).....	15
6. Despliegue del péptido de fusión FliTrx™ (Invitrogen).....	17
7. Regulación de la expresión de los péptidos de fusión en pFliTrx™.....	18
8. Cristales y monómero de la toxina Cry1Aa.....	34
9. Activación de cristales de la toxina Cry1Aa en presencia del anticuerpo scFv73 y su purificación por cromatografía de exclusión molecular.....	35
10. VMMA de <i>M. sexta</i>	36
11. Proteínas de las VMMA tratadas con PI-PLC.....	38
12. Ensayo de unión de ligando con la toxina Cry1Aa.....	38
13. Unión del monómero Cry1Aa al sobrenadante y a VMMA en ELISA....	39
14. Unión de la toxina Cry1Aa como monómero y oligómero a las proteínas presentes en VMMA y sobrenadante en un ensayo de ELISA.....	39

	<i>Página</i>
15. ELISA monoclonal retando los fagos de la 4 ^a ronda de selección contra el sobrenadante y contra los pozos vacíos, solo bloqueados	41
16. Unión de las clonas Ph13 y Ph14 al sobrenadante y al monómero de la toxina Cry1Aa, en ELISA.....	42
17. Unión de 3 rondas de selección de fagos contra sobrenadante en ELISA.....	42
18. Unión de 9 clonas de fagos de la ronda 2 de selección en un ensayo de ELISA contra el sobrenadante, Cry1Aa y los pozos solo bloqueados.....	43
19. Detección de la proteína de fusión que contiene el dodecapéptido al azar en diferentes fases del cultivo inducido.....	44
20. Enriquecimiento en el número de células eluidas en la selección de la biblioteca FliTrx TM contra sobrenadante, expresado como porcentaje del número de células de entrada.....	45
21. Ensayo de ELISA policlonal evaluando las 4 rondas de selección de la biblioteca FliTrx TM contra el sobrenadante.....	45
22. Ensayo de ELISA policlonal evaluando la nueva tercera ronda de selección (3*) de la biblioteca FliTrx TM contra el sobrenadante.....	46
23. Expresión de la proteína de fusión con el dodecapéptido en la biblioteca FliTrx TM no seleccionada y después de 4 rondas de selección.....	47
24. Detección de la fusión FliC-TrxA en 52 clonas de la segunda ronda de selección.....	47
25. Unión de clonas de la Ronda 2 al sobrenadante en ELISA.....	48
26. Unión de clonas de las Rondas 2 y 3* al sobrenadante en ELISA.....	48
27. Unión en ELISA de 9 clonas seleccionadas.....	50

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucléico
ALP	Fosfatasa alcalina
APN	Aminopeptidasa N
Bm-APN1	APN1 de <i>Bombix mori</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DRM	Membranas resistentes a detergentes
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
ELISA	Ensayo enzimático inmunoabsorbente
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEPES	Ácido <i>N</i> -[2-Hidroxietil] piperazina- <i>N'</i> -[2-etanosulfónico]
IPTG	Isopropil tio-galactósido
LB	Luria Bertani
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina
PEG	Polietilenglicol

PI-PLC	Fosfatidilinositol-fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
SRP	Resonancia de plasmones superficiales
TBS	Solución amortiguadora de Tris salina
ufp	Unidades formadoras de placa
VMMA	Vesículas de membrana de la microvellosidad apical
XGal	5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Tres proteínas se han identificado como proteínas de unión a las toxinas Cry1A de Bt: una proteína tipo caderina (Bt-R₁), aminopeptidasa N (APN) y fosfatasa alcalina (ALP); estas dos últimas, unidas a la membrana celular por un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Un modelo de acción secuencial propone que el monómero de la toxina se une al receptor Bt-R₁ promoviendo la oligomerización de la toxina, lo cual resulta en un cambio en la afinidad de ésta por una proteína anclada por GPI. Pero, ¿cómo interactúa el oligómero con esta proteína?

Para entender la interacción del oligómero con APN o ALP, y para evaluar su papel como receptores, empleamos la metodología de despliegue en fagos. El objetivo de nuestro trabajo fue seleccionar péptidos que reconocieran específicamente APN o ALP.

Primero, tratamos vesículas de la microvellosidad apical (VMMA) de *M. sexta* con fosfolipasa C (PI-PLC) para liberar las proteínas unidas por un ancla de GPI; y corroboramos la presencia de APN y ALP al medir sus actividades enzimáticas en el extracto soluble recuperado. Al analizar la unión de las dos estructuras de la toxina Cry1Aa (monómero y oligómero) en ensayos de unión de ligando en condiciones desnaturizantes y en ensayos de ELISA, notamos que el oligómero unió preferencialmente a las proteínas del extracto enriquecido en APN y ALP.

Tamizamos 2 bibliotecas comerciales de dodecapéptidos aleatorios contra el extracto enriquecido en APN y ALP: péptidos lineales desplegados en la superficie del bacteriófago M13, y péptidos estructurados en la superficie de *E. coli*.

De la primera biblioteca, seleccionamos algunas clonas, pero ninguna de ellas fue específica contra nuestras proteínas de interés. Por otra parte, aislamos 9 clonas de la biblioteca de péptidos estructurados, las cuales unieron específicamente a las proteínas ancladas por GPI. Además, cuando estas 9 clonas se ensayaron contra los receptores purificados, unieron preferencialmente a la proteína ALP. Posteriormente, determinaremos si los péptidos seleccionados inhiben la interacción toxina-receptor.

SUMMARY

Three proteins have been identified as Bt-Cry1A binding proteins: a cadherin-like protein (Bt-R₁), aminopeptidase N (APN) and alkaline phosphatase (ALP); the last two are linked to the cell membrane by a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor. A sequential model of action proposes that the monomeric structure of the toxin binds Bt-R₁ promoting toxin oligomerization, resulting in a change in toxin affinity to a GPI-anchored protein. But, how does the oligomer interact with this protein?

To understand the interaction of the oligomeric structure with APN or ALP and to assess their role as receptors we used the phage display technology. The focus of our research was to select peptides that specifically recognize APN or ALP.

Firstly, brush border membrane vesicles (BBMV) from *M. sexta* were treated with phospholipase C (PI-PLC) releasing the GPI-anchored proteins; and we corroborated the existence of APN and ALP in the soluble extract by measuring their enzymatic activities. When we examined the interaction of both Cry1Aa structures (monomer and oligomer) by ligand blotting (denaturing conditions) and ELISA assays, the oligomer showed a preferential binding to the APN and ALP extract.

Two commercial libraries of random dodecapeptides were panned against the extract enriched in APN and ALP: lineal peptides displayed on the coat of the bacteriophage M13, and constrained peptides on the surface of *E. coli*.

From the first library, we selected some clones; however, any of them was specific against the proteins of our interest. On the other hand, we were able to select 9 clones from the constrained library, which specifically bound the GPI anchored proteins. In addition, when these 9 clones were tested against the purified receptors, they preferentially bound the purified ALP protein. Later, we will determine whether the selected peptides inhibit the toxin-receptor interaction.

INTRODUCCIÓN

La existencia de enormes poblaciones de insectos, debido a que se presentan las condiciones propicias para su proliferación masiva y la falta de un control natural, originan plagas con efectos nocivos para cultivos agrícolas, forestales y aún más, para el humano, por ser vectores de transmisión de enfermedades.

Con el objeto de controlar tales poblaciones de insectos nocivos, se han utilizado los insecticidas químicos. En 1955 se emprendió el Programa Global para la Erradicación de la Malaria basado en el control de vectores usando enormes cantidades de DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) en todo el mundo. Este programa tuvo su momento cumbre entre 1961-1962 resultando en una dramática reducción en la incidencia de la malaria. Sin embargo, en los años subsecuentes el problema se recrudeció; la población de vectores se recuperó debido a la resistencia de *Anopheles* al DDT, pero también a la pérdida de selectividad de éste, afectando poblaciones que no eran su blanco (incluyendo competidores, depredadores y patógenos del mosquito) y pronto se revirtió el éxito inicial (Regis *et al.*, 2000). Experiencias como ésta, han propiciado que se realicen investigaciones que tienden a examinar métodos alternativos de control de plagas.

Una de las alternativas más promisorias a ser utilizadas en el control de las poblaciones de insectos plaga son los organismos entomopatógenos. De éstos, los más utilizados son las bacterias, pertenecientes en su gran mayoría a las familias Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae y Micrococcaceae. Dentro de la familia Bacillaceae se encuentra la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) a partir de la cual se han desarrollado los bioinsecticidas más exitosos, de tal manera que, en la actualidad Bt es el agente biológico más ampliamente utilizado para el control de plagas agrícolas, forestales y de insectos vectores de enfermedades humanas. En 1995, sus ventas mundiales fueron por 90 millones de dólares, representando el 2% del mercado total de insecticidas y para 1998 había cerca de 200 productos de Bt registrados en Estados Unidos (Schnepf *et al.*, 1998).

ANTECEDENTES GENERALES

Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta cuya principal característica es la síntesis de un cristal proteico durante la fase de esporulación de su ciclo de vida, el cual es selectivamente tóxico contra diferentes órdenes de insectos y otros organismos como nemátodos, protozoarios y ácaros. Las proteínas insecticidas que sintetiza Bt se acumulan en la célula madre como una inclusión citoplasmática cristalina de aproximadamente 1 μ m, y pueden representar más del 25% del peso seco de las células esporuladas (Figura 1). Son precisamente sus características entomopatogénicas las que lo distinguen de otros miembros del grupo de *Bacillus cereus* del cual forma parte (Schnepf *et al.*, 1998; Agaisse y Lereclus, 1995).

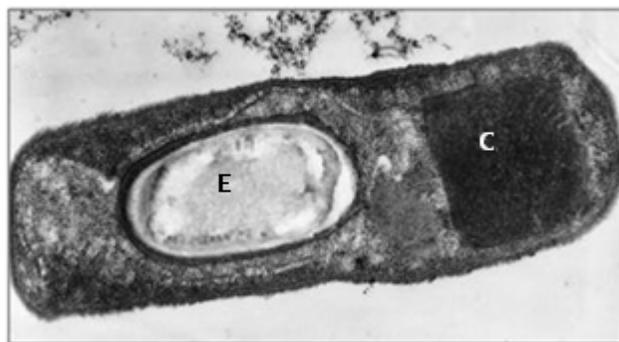


Figura 1. Microfotografía electrónica de *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* berliner 1715 durante la esporulación. E: Espora; C: cristal insecticida (Agaisse y Lereclus, 1995).

En diversas ocasiones se han emprendido programas para identificar nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis*, logrando aislarlas de diferentes ambientes que van desde hojas, insectos, productos en polvo almacenados, y aún del suelo. Al estudiarlas se ha encontrado que las cepas tienen genomas que varían en tamaño de 2.4 a 5.7 millones de

pb, pero además, la mayoría de ellas contienen elementos extracromosomales circulares o lineares. Se sabe que las proteínas que forman el cristal tóxico de Bt son codificadas por genes que están contenidos en grandes plásmidos (Schnepf *et al.*, 1998).

Muchos genes de las toxinas se han aislado y secuenciado. En 1989, Höfte y Whiteley propusieron una nomenclatura para clasificar las toxinas que hasta entonces se conocían bajo el nombre de los genes *cry* y *cyt*. Actualmente, las proteínas Cry comprenden 40 subgrupos con más de 200 miembros, y su nomenclatura se basa en la identidad de la secuencia primaria entre las diferentes secuencias proteicas (Bravo *et al.*, 2004a).

Las proteínas reciben el nombre Cry o Cyt y cuatro categorías jerárquicas que consisten de números, letras mayúsculas, minúsculas y números, que se asignan dependiendo de la identidad que sus secuencias manifiesten con otras proteínas Cry o Cyt. Si una proteína comparte menos del 45% de identidad con las existentes, se le asigna un número diferente. Las letras mayúsculas distinguen entre proteínas que comparten más del 45% de identidad, pero menos del 78%; mientras que las letras minúsculas diferencian proteínas con más del 78% de identidad, pero menos del 95%. La última categoría es un número que se emplea cuando dos proteínas muestran más del 95% de homología sin ser totalmente idénticas (Bravo *et al.*, 2004a).

A diferencia de los insecticidas químicos, que a lo largo de su uso se han acumulado en el ambiente y han exterminado fauna blanco y benéfica, los pesticidas basados en Bt son altamente específicos para matar la especie blanco y son inocuos contra mamíferos, plantas, vertebrados e insectos benéficos, además de ser completamente biodegradables. Aunado a esto, sólo hay registro de un caso de desarrollo de resistencia en campo en los 40 años que lleva su aplicación (Ferre y Van Rie, 2002).

Los mecanismos de resistencia a Bt se han analizado en varias poblaciones de insectos seleccionadas bajo condiciones de laboratorio, siendo el mecanismo más frecuente la pérdida de unión de la toxina a su receptor. En estos casos, la resistencia se debe principalmente a mutaciones recesivas en el insecto, existiendo resistencia cruzada entre un par de toxinas Cry sólo cuando comparten el sitio de unión al receptor. El conocimiento obtenido ha permitido el diseño de estrategias para el manejo de la

resistencia que incluyen la combinación racional de toxinas y el establecimiento de refugios (áreas libres de toxina que mantienen la población de insectos susceptibles) en proximidad con zonas sometidas al efecto de Bt (Bravo *et al.*, 2004a; Ferre y Van Rie, 2002).

MECANISMO DE ACCIÓN

Se han propuesto dos modelos del mecanismo de acción de las toxinas Cry, que al igual que otras toxinas bacterianas, involucra varios pasos.

Para la mayoría de los lepidópteros, cuando un insecto blanco ingiere el cristal proteico, éste se disuelve debido al pH alcalino y las condiciones reductoras del intestino liberando las protoxinas. Una subsecuente digestión con proteasas libera a las toxinas activas (monoméricas), que son capaces de unirse a los receptores presentes en el epitelio del intestino medio del insecto (Schnepf *et al.* 1998).

En el modelo de acción secuencial, descrito por Bravo *et al.* (2004b) en el lepidóptero *Manduca sexta*, se requiere la formación de un oligómero de la toxina para que suceda la inserción de ésta en la membrana.

Según este modelo, la toxina monomérica Cry1Ab se une a una proteína tipo caderina (Bt-R₁), para la cual tiene una afinidad de unión de 1nM. Esta interacción promueve la eliminación de la hélice α -1 y la formación del oligómero, el cual cambia su afinidad por una proteína anclada por glicosilfosfatidil inositol (GPI) en microdominios de membranas resistentes a detergentes (DRM): la aminopeptidasa N (APN; Bravo *et al.*, 2004b; Gómez *et al.*, 2006). Esta segunda interacción promueve la migración de la toxina y la formación de poros en microdominios DRM que derivan en lisis celular y muerte del insecto (Figura 2). Este modelo propone la participación de ambos receptores en una interacción secuencial con diferentes estructuras de la toxina (Bravo *et al.*, 2004b).

El segundo modelo propone que cuando las toxinas Cry interaccionan con el receptor caderina, se activan vías de señalización intracelular que provocan la muerte del insecto en una serie de eventos que prescinden de la oligomerización y la formación de poros líticos. Sin embargo, este modelo alternativo se propuso con base en el efecto de

la toxina Cry1Ab sobre una línea celular de *Tricoplusia ni* que expresa la caderina de *M. sexta*, no sobre larvas del insecto (Zhang *et al.*, 2006).

Aunque estos dos modelos difieren en la entidad tóxica capaz de provocar la muerte celular, en ambos la interacción de la toxina con los receptores intestinales es un paso clave, determinante de la toxicidad y especificidad.

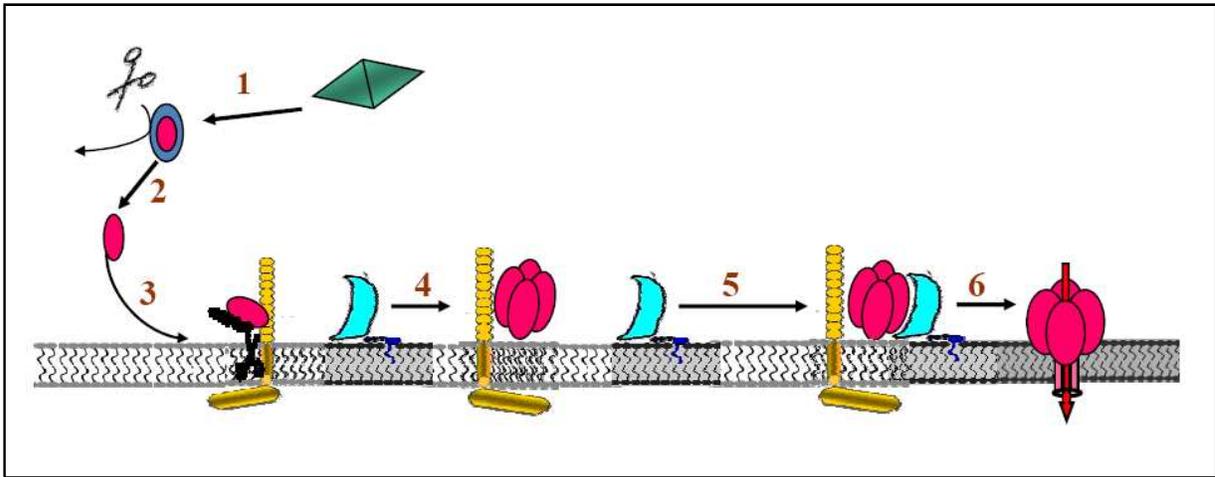


Figura 2. Modelo de acción secuencial de las toxinas Cry. (1) Solubilización del cristal; (2) activación proteolítica de la protoxina; (3) unión de monómero al receptor Bt-R₁ y corte de la hélice α -1; (4) formación del oligómero; (5) unión del oligómero a APN y migración a DRM; (6) formación de poros en DRM (Bravo *et al.*, 2004b).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS Cry

Las toxinas Cry son producidas por Bt en forma de protoxinas que pueden diferenciarse por su longitud. El grupo mayoritario está formado por protoxinas de aproximadamente 130-70kDa, el doble del tamaño de la mayoría de las toxinas. El alineamiento de sus secuencias proteicas revela la presencia de 5 bloques conservados identificados por Höfte y Whiteley (1989), aunque algunos de los bloques están ausentes en ciertos subgrupos (Bravo *et al.*, 2004a).

Las estructuras de varios miembros de la familia han provisto evidencia sobre la función de la toxina y han ayudado a explicar las diferencias en especificidad y toxicidad. A la fecha, se ha determinado por difracción de rayos X la estructura tridimensional de las toxinas Cry3A, Cry1Aa, Cry3Bb1, Cry4Ba y Cry4Aa al igual que de la protoxina Cry2Aa, revelando que estas proteínas están organizadas en 3 dominios estructurales distinguibles entre sí (Figura 3; Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995; Galitzky 2001; Boonserm *et al.*, 2005; Morse *et al.*, 2001; Boonserm *et al.*, 2006).

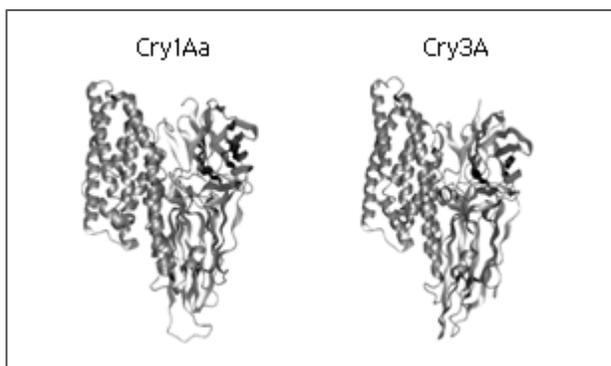


Figura 3. Estructura tridimensional de las toxinas Cry1Aa y Cry3A (Schnepf *et al.*, 1998).

De forma general, el dominio I de estas toxinas está formado por 7 hélices α y se ha implicado en la formación del poro iónico (Figura 4). Seis de las hélices rodean a la hélice α -5, que es la más hidrofóbica, el resto de ellas son anfipáticas y lo suficientemente largas para atravesar la región hidrofóbica de una membrana bilaminar (Bravo *et al.*, 2004a; Grochulsky *et al.*, 1995).

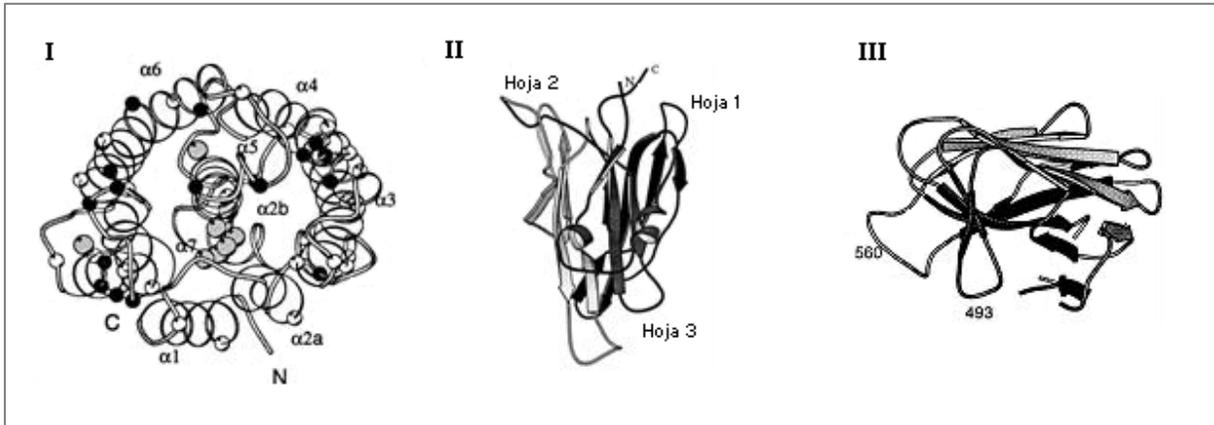


Figura 4. Dominios I, II y III de la toxina Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995).

El dominio II está constituido de tres hojas β antiparalelas unidas entre sí por asas expuestas que constituyen las regiones hipervariables entre las diferentes toxinas Cry. Las variaciones en tamaño, orientación y secuencia han llevado a una sustitución extensiva de los residuos de estas regiones en diferentes toxinas. Diferentes estudios de mutagénesis sitio-dirigida en las toxinas Cry1A mostraron que las regiones expuestas, correspondientes con las asas α -8, 2, y 3 de este dominio, están involucradas en el reconocimiento con su receptor y son responsables de la especificidad (Rajamohan *et al.*, 1996a, 1996b; Jenkins *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000, 2001). Por el contrario, el asa 1 parece no jugar un papel importante en la unión al receptor en las toxinas Cry1A, aunque sí es significativa para otras toxinas, como la Cry3A (Wu y Dean, 1996).

En la toxina Cry1Ab, el asa 2 mostró ser importante en la interacción con vesículas de la microvellosidad apical (VMMA) de *Manduca sexta*. Cambios en los residuos R368-R369 de esta asa, indicaron su importancia en la unión reversible (a receptor) en VMMA y su papel en la toxicidad. También se demostró en un experimento de resonancia de

plasmones superficiales (SPR) que estas mutantes no unen al receptor APN purificado (Rajamohan *et al.*, 1996b; Lee *et al.*, 2000).

Respecto a las asas $\alpha 8$ y 3, se han descrito mutaciones en algunos residuos en las toxinas Cry1A que afectan la unión reversible a VMMA o al receptor APN purificado (Rajamohan *et al.*, 1996a, Lee *et al.*, 2001).

Aunque los residuos de las asas están ampliamente implicados en la unión con los receptores, las interacciones funcionales de residuos individuales difieren significativamente entre insectos blanco y sus receptores. Por ejemplo, la mutación F371A (asa 2) en Cry1Ab disminuyó la toxicidad a *M. sexta* afectando la unión irreversible, pero la misma mutante no afectó ni la toxicidad ni la unión en *Heliothis virescens* (Rajamohan *et al.*, 1996b).

En la toxina Cry1Ab las sustituciones N372A y N372G (asa 2) incrementan la toxicidad hacia larvas del lepidóptero *Lymantria dispar* hasta 8 veces, aumentando también la afinidad hacia VMMA hasta 4 veces. Sin embargo, la delección de este residuo del asa dos, N372, redujo sustancialmente la toxicidad y la afinidad de unión más de 20 veces, sugiriendo su papel en la unión a su receptor. Al reducir la cadena lateral del residuo 372 podría permitirse un contacto más estrecho con el receptor, incrementando su afinidad por él. No obstante, la reducción de la toxicidad por la remoción del mismo residuo podría implicar una alteración local en la conformación del asa que evitaría la interacción con el sitio de unión en su receptor (Rajamohan *et al.*, 1996c).

Recientemente, se diseñó una mutante de la toxina Cry1Aa, naturalmente tóxica contra lepidópteros, que cambió su especificidad hacia el mosquito *Culex pipiens* (díptero) eliminando al mismo tiempo su toxicidad hacia su blanco natural. Esto se logró mediante delecciones y sustituciones de los residuos de las asas del dominio II de la toxina (Liu y Dean, 2006).

Finalmente, el dominio III de las toxinas está compuesto de 2 hojas β en un arreglo de emparedado y hay evidencias que indican que también está relacionado con la especificidad y unión con el receptor (Boonserm *et al.*, 2005). El intercambio de este dominio entre las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac mostró que el dominio III de Cry1Ac está involucrado en el reconocimiento del receptor APN. La interacción de éste en la toxina Cry1Ac y APN se caracterizó como dependiente del azúcar *N*-acetilgalactosamina

(GalNAc) presente en el receptor. Un análisis posterior mediante mutagénesis identificó los residuos Q509-N510-R511 N506 y Y513 como el epítipo para el reconocimiento del azúcar (Burton *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). La sustitución ⁵⁰⁹QNR-AAA⁵¹¹ en la toxina Cry1Ac mostró una reducción de 10 y 22 veces en su unión con VMMA, pero solo 2 y 4 veces redujo su toxicidad contra los lepidópteros *M. sexta* y *H. virescens*. Esta pérdida de afinidad respecto a la toxicidad sugiere que la interacción entre el dominio III de Cry1Ac y GalNAc de APN podría no ser crítica para la toxicidad (Lee *et al.*, 1999).

Otro ejemplo del intercambio del dominio III asociado con cambios en la especificidad por el insecto blanco, se demostró con una proteína híbrida que contenía los dominios I y II de la toxina Cry1Ab y el dominio III de Cry1C, resultando en una proteína con toxicidad aumentada hacia *Spodoptera sp.* (de Maagd *et al.*, 2000).

Mutaciones en residuos de los dominios II (Q374A y T440A) y III (⁵⁴¹STGV-AAAA⁵⁴⁴) de la toxina Cry1Ca afectan la toxicidad contra larvas de *Spodoptera exigua*, mientras que mantienen su actividad contra *M. sexta*, confirmando el papel de estas regiones en la especificidad (Herrero *et al.*, 2004).

Un análisis de competencia *in vitro* de la interacción de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab a su receptor (mediante experimentos de unión a ligando y empleando vesículas de *M. sexta*), con péptidos sintéticos correspondientes a las asas del dominio II, indicó que las asas 2 y 3 de la toxina Cry1Ab son importantes para el reconocimiento con dicho receptor (Gómez *et al.*, 2002a).

Con el fin de localizar el sitio de unión de la APN1 de *B. mori* (Bm-APN1) en la toxina Cry1Aa, Atsumi *et al.* produjeron anticuerpos contra la toxina que compitieran la unión con Bm-APN1 e investigaron la localización de los epítopos reconocidos por estos anticuerpos. El epítipo que identificaron para el anticuerpo que inhibe la interacción de Cry1Aa con Bm-APN1 consiste de los residuos 508-513 y 582-589, los cuales corresponden a las láminas β -16 y β -22 en el dominio III de la toxina, (Atsumi *et al.*, 2005).

La identificación de los epítopos involucrados en la interacción toxina-receptor provee datos acerca de las bases moleculares de la especificidad de las toxinas y puede ayudar al desarrollo de estrategias para diseñar toxinas que rebasen el problema de la resistencia por mutaciones puntuales en su receptor (Bravo *et al.*, 2004a).

PROTEÍNAS DE UNIÓN PARA LAS TOXINAS Cry1: RECEPTORES

La interacción de las toxinas Cry con proteínas localizadas en el intestino de los insectos blanco es un factor clave en la especificidad de estas toxinas, pues se han reportado varios casos en los que el desarrollo de resistencia en los insectos se encuentra directamente relacionado con defectos en dichas interacciones. Esta es la razón por la que diversos grupos dedican un gran esfuerzo a identificar y describir cómo ocurren estos procesos (Ferré y Van Rie, 2002).

A la fecha se han reportado caderinas, aminopeptidas y fosfatasas alcalinas como moléculas que unen a las toxinas Cry en diferentes especies de insectos (Pigott y Ellar, 2007). De estas moléculas, las caderinas juegan un papel muy importante en la activación y oligomerización de las toxinas Cry1A (Gómez *et al.*, 2002b). Una mutación debida a la inserción mediada por un retrotransposón en la caderina de *Heliothis virescens*, resultó en la resistencia de estos insectos (Gahan *et al.*, 2001). Por otro lado, la expresión de la caderina de *Bombix mori* (Bt-R₁₇₅) en una línea celular de *Spodoptera frugiperda* les confirió sensibilidad a la acción de la toxina Cry1Aa (Nagamatsu *et al.*, 1999).

Los sitios de interacción entre las caderinas de *B. mori*, *M. sexta* y *H. virescens* y diferentes toxinas Cry1A se han identificado y caracterizado mediante diferentes estrategias *in vitro*. En el caso de *B. mori*, la toxina Cry1Aa se une a una región que involucra los aminoácidos 1108-1464 en este receptor (Bt-R₁₇₅), mientras que en el receptor Bt-R₁ de *M. sexta* se han mapeado los aminoácidos 865-875 (sitio 1), 1331-1342 (sitio 2) y 1363-1464 (sitio 3) en los ectodominios 7, 11 y 12, como regiones con las cuales interactúan 3 asas del dominio II de las toxinas Cry1A (Gómez *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2004). En *H. virescens*, las regiones de unión al receptor y aminoácidos identificados en el receptor tipo caderina, se empalman con las observadas en *B. mori* y *M. sexta* (Xie *et al.*, 2005).

Para las aminopeptidasas (APN), las cuales se encuentran ancladas a la membrana a través de un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI; Garczynski y Adang, 1995), se reportó que su incorporación (APN de *M. sexta*) en vesículas de fosfolípidos aumentó la unión de

la toxina Cry1Ac en 35%, respecto a la unión en ausencia del receptor. Además, la misma toxina formó poros en las vesículas lipídicas con el receptor incorporado a una concentración 1000 veces menor que en ausencia del receptor. Sin embargo, no se pudo establecer inequívocamente el papel de la APN como receptor e implicarlo en la formación de poro, ya que la preparación de APN también contenía fosfatasa alcalina (ALP) y reportaron incluso una disminución en la actividad de ésta por la interacción con la toxina (Sangadala *et al.*, 1994).

El silenciamiento del gene que codifica la APN de *Spodoptera litura* indicó que una reducción en la expresión del receptor en el intestino del insecto, correlaciona con la resistencia al efecto de la toxina Cry1C (Rajagopal *et al.*, 2002). En otro reporte, la expresión de la APN (MsAPN1) en *Drosophila melanogaster* (naturalmente insensible al efecto de las toxinas Cry1A) resultó en larvas del insectos susceptibles a la toxina Cry1Ac. Estos resultados implican directamente a la APN como receptor de las proteínas Cry1 (Gill y Ellar, 2002).

Un análisis de proteómica de las proteínas presentes en vesículas de *M. sexta* indicó que la toxina Cry1Ac se une a una proteína de 65kDa, también anclada por GPI a la membrana, descrita como una fosfatasa alcalina (McNall y Adang, 2003). Niveles reducidos de ALP se han asociado con la resistencia de larvas de *H. virescens* a la toxina Cry1Ac (Jurat-Fuentes y Adang, 2004). Finalmente, en el díptero *Aedes aegypti* se demostró que una proteína con actividad de ALP, anclada por GPI al igual que las ALP reportadas en lepidópteros, es capaz de unir a la toxina Cry11Aa (Fernández *et al.*, 2006).

A pesar de los esfuerzos realizados en identificar a los receptores funcionales de las proteínas Cry, aún no se conoce totalmente su naturaleza y de los que actualmente se encuentran reportados (exceptuando a las caderinas) no se ha descrito su función en el mecanismo de toxicidad.

Uno de los modelos mejor descritos es el de las proteínas Cry1A con toxicidad contra lepidópteros, en la oruga del tabaco *M. sexta* es un modelo de estudio de la acción de las toxinas Cry en lepidópteros.

DESPLIEGUE EN FAGOS

Para identificar el papel que tienen diferentes regiones de las toxinas Cry1 en la toxicidad, se ha realizado mutagénesis sitio-dirigida y se han intercambiado sus dominios. Esto ha permitido describir residuos clave en la interacción con los receptores; sin embargo, para los estudios de interacción hasta ahora se han empleado toxinas activadas como monómero y no se ha realizado ningún tipo de estudio con el oligómero.

Una metodología que ha ganado popularidad en la caracterización de epítopes, que permite estudiar e identificar regiones involucradas en interacción sin comprometer la estructura de la proteína de interés, es la metodología de despliegue en fagos descrita por Smith en 1985. Con esta tecnología es posible seleccionar ligandos específicos para una proteína inmovilizada a partir de una enorme población de moléculas diferentes.

Los fagos son virus que infectan células bacterianas y muchos de los vectores que se han usado en la investigación de ADN recombinante son fagos, los cuales infectan al huésped estándar, la bacteria *Escherichia coli*.

Una característica de los vectores de ADN, incluyendo a los fagos, es que se les puede insertar un segmento de ADN “extraño” que es replicado cuando el vector lo hace. En los vectores de expresión, que incluyen a los vectores de despliegue en fagos, el ADN “extraño” es transcrito y traducido en una proteína. En el despliegue en fagos la secuencia proteica extraña está genéticamente fusionada a la secuencia de aminoácidos de alguna de las proteínas de la cubierta viral, produciendo una proteína híbrida. Ésta se incorpora en las partículas virales (viriones) en cuanto son liberados de la célula, de tal forma que el péptido extraño se despliega en la superficie externa (Smith y Petrenko, 1997).

Una biblioteca de despliegue en fagos es una mezcla heterogénea de fagos, cada uno llevando un inserto de ADN diferente, y por lo tanto, desplegando diferentes péptidos o proteínas en su superficie. Cada péptido en la biblioteca puede replicarse, puesto que cuando el fago al cual está unido infecta una célula bacteriana nueva, se multiplica para producir una progenie idéntica o clona (Smith y Petrenko, 1997).

Para “capturar” fagos desplegando péptidos o proteínas a partir de bibliotecas, en un proceso también llamado tamizado o selección, convencionalmente se utiliza una

aplicación de la purificación por afinidad, en la cual un receptor inmovilizado se usa para retener ligandos específicos a partir de una mezcla compleja (Figura 5). Los fagos capturados son amplificados infectando células frescas para producir una gran cantidad de ellos, que a su vez pueden servir para hacer otra ronda de purificación por afinidad. Eventualmente, los fagos capturados se estudian individualmente al secuenciar el ADN viral y deducir los aminoácidos del péptido desplegado (Smith y Petrenko, 1997).

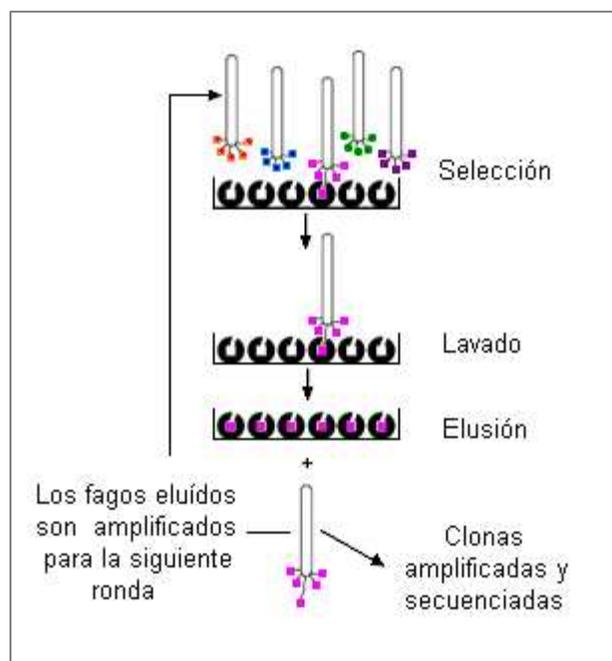


Figura 5. Procedimiento de selección de péptidos desplegados en fagos (New England BioLabs Inc.)

Muchos de los trabajos con despliegue en fagos se hacen con fagos filamentosos, como M13. Estos fagos semejan bastones flexibles de aproximadamente $1\mu\text{m}$ de longitud y 6nm de diámetro, compuestos principalmente (87% de su masa) de la proteína de cubierta pVIII, que envuelve al ADN viral de cadena sencilla. En un extremo de la partícula se encuentran cinco copias de las proteínas menores de cubierta pIII y pVI, y en el otro extremo pVII y pIX (Smith y Petrenko, 1997).

Para iniciar la infección viral es necesario que interaccionen el extremo N-terminal de pIII y el pilus F de *E. coli* (Smith y Petrenko, 1997). No obstante, en muchos reportes de despliegue en M13 los péptidos se fusionan al extremo N-terminal de las

proteínas pIII o pVIII. De esta forma, los péptidos desplegados tienen un extremo libre que les proporciona suficiente flexibilidad, similar a la de los péptidos libres en solución. Con la finalidad de disminuir la entropía de los péptidos desplegados e incrementar su afinidad a una molécula blanco, se han construido algunas bibliotecas estructuradas en las cuales los péptidos están flanqueados por cisteínas para la formación de un puente disulfuro (Luzzago *et al.*, 1993).

DESPLIEGUE EN BACTERIAS

Una metodología derivada del despliegue en fagos es la que se efectúa en bacterias. En 1995, Lu *et al.* crearon un sistema de despliegue de una biblioteca de péptidos aleatorios en flagelo bacteriano.

El filamento flagelar de las bacterias es una estructura helicoidal compuesta de subunidades de flagelina. Varias especies bacterianas presentan homología en sus regiones N- y C-terminal de sus respectivas flagelinas, no siendo así en la región central. Al eliminar varias porciones en la región central del gen de la flagelina de *Escherichia coli* K12 se han obtenido proteínas más pequeñas capaces de polimerizar adecuadamente y conservar, en mayor o menor grado, su función motriz, poniendo al descubierto el dominio no esencial que está expuesto al solvente (Kuwajima, 1988).

Lu *et al.* (1995) hicieron una construcción funcional de flagelina y tiorredoxina que posibilitó el despliegue de péptidos en la superficie de *E. coli* en un contexto estructural bien definido. Sustituyeron la región no esencial de la flagelina de *E. coli* (*fliC*) por una tiorredoxina, también de *E. coli* (*trxA*).

La tiorredoxina de *E. coli* (Trx) es una proteína de 11.7 kDa formada por 108 aminoácidos cuyo sitio activo tiene la secuencia -CGPC-. Las dos cisteínas involucradas en la formación del puente disulfuro forman una pequeña protuberancia o asa en la superficie de la proteína. Cuando Lu *et al.*, (1995) insertaron péptidos aleatorios en el sitio activo de la tiorredoxina para la construcción de la biblioteca, las cisteínas de ambos extremos se encargaron de limitar la conformación de los mismos sin alterar la estructura de la tiorredoxina.

De esta forma, los autores consiguieron exponer los péptidos en el exterior de la célula en un contexto estructural definido y utilizarlos en rondas de selección como en el sistema de despliegue en fagos. Actualmente, esta biblioteca es comercial (FliTrx™, Invitrogen), tiene una complejidad de 1.77×10^8 clonas primarias y se ha utilizado desde entonces para descifrar algunas interacciones de proteínas (Figura 6).

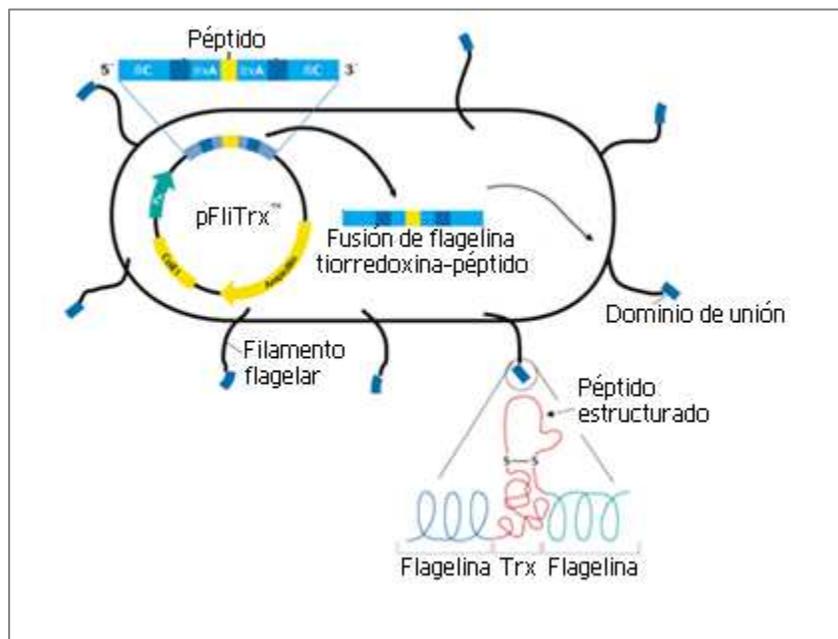


Figura 6. Despliegue del péptido de fusión FliTrx™ (Invitrogen)

Para evitar rearrreglos en las fusiones de péptidos y dirigir el despliegue, la expresión de la biblioteca está regulada. El plásmido utilizado para crear las fusiones de péptidos (pFliTrx™) utiliza el promotor P_L del bacteriófago λ . El represor cI del bacteriófago λ se une al operador del promotor P_L y controla el nivel de transcripción de su promotor (Figura 7).

La expresión del represor también está regulada pues en las células de *E. coli* (GI826) en las que se propaga pFliTrx™, el gen del represor cI se encuentra bajo el control del promotor trp . El represor trp regula la expresión de cI , ya que cuando las células son crecidas en un medio libre de triptófano entonces el gen del represor cI se transcribe, y la proteína represora se une al promotor P_L evitando la transcripción

(Figura 7a). La expresión se induce agregando triptófano al medio, lo cual evita la síntesis del represor λcI y permite la transcripción bajo el promotor P_L (Figura 7b; Lu *et al.*, 1995).

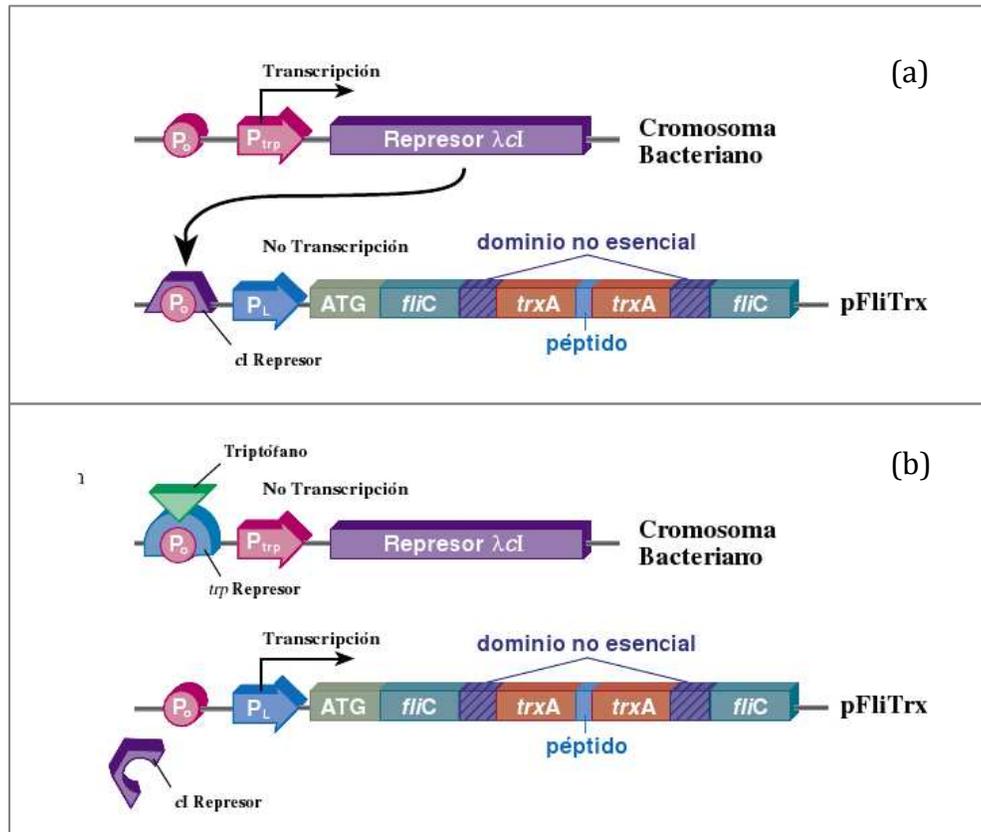


Figura 7. Regulación de la expresión de los péptidos de fusión en pFliTrx™. (a) Ausencia de triptófano en el medio previene la transcripción; (b) Triptófano en el medio induce la transcripción (Invitrogen).

HIPÓTESIS

A partir de una colección de péptidos desplegados en fagos y bacterias es posible recuperar moléculas que reconozcan específicamente los receptores APN o ALP de *Manduca sexta*

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar péptidos con la capacidad de unir específicamente a los receptores que se encuentran unidos a la microvellosidad intestinal de *Manduca sexta* por medio de un ancla de GPI: APN y ALP.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener un extracto de proteínas ancladas por GPI enriquecido en las proteínas APN y ALP, a partir de VMMA de *M. sexta*.
- Analizar la unión del monómero y el oligómero de la toxina Cry1Aa a los receptores presentes en el extracto (APN y ALP).
- Seleccionar péptidos lineales que reconozcan a los receptores presentes en el extracto (APN y ALP) mediante la metodología de despliegue en fagos.
- Seleccionar péptidos estructurados, provenientes una biblioteca de péptidos desplegada en bacterias, que reconozcan a los receptores del extracto (APN y ALP).
- Caracterizar la especificidad de los péptidos seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS UTILIZADAS

Se empleó la cepa acristalífera 407*cry-* de Bt, transformada con el plásmido pHT409 que tiene el gen *cry1Aa* (Lereclus *et al.*, 1989), para la producción de cristales de la toxina Cry1Aa.

Para producir el anticuerpo scFv73 se utilizó la cepa *E. coli* TG1 transformada con el vector pSyn que tiene clonado el gen que codifica para dicho fragmento (Gómez *et al.*, 2001).

Se utilizaron cepas comerciales para el trabajo con las bibliotecas de péptidos. La cepa de *E. coli* ER2738 (New England BioLabs) fue la cepa F⁺ que se usó para la amplificación y titulación de fagos de la biblioteca de péptidos lineales. La biblioteca de péptidos estructurados se adquirió transformada en la cepa de *E. coli* GI826 (Invitrogen), misma en la que se expresó la proteína de fusión para su despliegue.

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CRISTALES DE LA TOXINA Cry1Aa

La cepa de Bt se creció en medio de esporulación SP (caldo nutritivo 0.8%, MgSO₄•7H₂O 0.025%, KCl 0.1%, MnCl₂•4H₂O 10 μM, pH 7, complementado con Fe₂(SO₄)•7H₂O 263 μM, CaCl₂ 0.5mM) con eritromicina 10 μg/ml, a 30°C y 200 rpm. Una vez alcanzada la esporulación del cultivo, a las 72 horas aproximadamente, se recuperó la mezcla de esporas y cristales de la toxina centrifugando a 10,000 rpm por 10 minutos. La pastilla obtenida (mezcla de espора-cristal) se lavó primero 3 veces en NaCl 0.3M, EDTA 0.01M, pH 8, y luego otras 3 veces en PMSF 1mM.

Los cristales de las esporas se separaron mediante un gradiente discontinuo de sacarosa. La pastilla lavada se resuspendió en amortiguador TTN (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, Tritón X-100 1%, pH 7.2) para sonicarse 3 veces con pulsos de 50 segundos a 20

watts. Al mismo tiempo, en tubos de policarbonato se preparó el gradiente discontinuo de sacarosa que contenía 6 ml de cada una de 4 soluciones de sacarosa al 84, 79, 72 y 67% (w/v) en Tritón X-100 0.01%, NaCl 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8. La muestra sonicada se cargó al gradiente y se centrifugó a 23,000 rpm por 20 minutos a 15°C en una ultracentrífuga Beckman con el rotor SW28.

Al término de la centrifugación las fracciones superiores del gradiente se recuperaron. La sacarosa se eliminó lavando los cristales 3 veces con Tritón X-100 al 0.01%, centrifugando a 10,000 rpm por 10 minutos. Al final, la pastilla de cristales se resuspendió en Tris 50 mM pH 8, PMSF 1mM y se conservaron a 4°C. Para confirmar la presencia de cristales, las fracciones recuperadas se observaron al microscopio óptico.

La concentración de proteína de los cristales purificados se determinó empleando el método de Bradford (Sigma) utilizando albúmina bovina como estándar. La protoxina que forma los cristales se verificó mediante electroforesis en geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10%.

PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO scFv73

La cepa se creció a 37°C en medio 2xTY (bactotripton 1.6%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%) con ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 0.1%; una vez alcanzada una densidad óptica de 0.7 a 600 nm se realizó la inducción adicionando IPTG 0.5 mM al cultivo y se dejó crecer por 4 horas a 25°C en agitación de 200 rpm.

El fragmento scFv73 se colectó del periplasma. El extracto soluble periplasmático se obtuvo al dar un choque osmótico a 4°C al paquete celular, resuspendiéndolo en la solución de lisis que contiene sacarosa 200 mg/ml, EDTA 1 mM, Tris-HCl 300 mM pH 8. El cultivo se centrifugó y se resuspendió en una solución de MgSO₄ 5 mM, tras lo cual se incubó 20 minutos en hielo. Después de centrifugar, el sobrenadante se dializó 12 horas en PBS. El fragmento scFv73 está fusionado a una etiqueta de histidinas por lo que se purificó empleando una columna de níquel-agarosa. La columna se lavó con PBS y se equilibró con imidazol 20 mM. El scFv73 se incorporó a la fase móvil de la columna, se lavó con imidazol 35 mM, y se eluyó con 2 ml de imidazol 250 mM, NaN₃ 0.2% en PBS.

ACTIVACIÓN DE LOS CRISTALES DE LA TOXINA Cry1Aa

Solubilización y activación para la obtención de monómero

Para eliminar el amortiguador en que se encontraban los cristales, 1mg de proteína se centrifugó y la pastilla se resuspendió en la solución de solubilización preparada con NaHCO₃ 50mM pH 10.5 y β-mercaptoetanol 0.02%. Se incubó durante 2 horas a 37°C en agitación suave y luego se centrifugó a 10,000 rpm 10 minutos. La protoxina soluble en el sobrenadante se recuperó y se determinó su concentración de proteína por el método de Bradford.

La protoxina se activó proteolíticamente con jugo gástrico de *M. sexta*, el cual se obtiene al centrifugar a 10,000 rpm 5 minutos el contenido intestinal de larvas de tercer estadio. El pH de la protoxina solubilizada se ajustó agregando 250 µl de Tris-HCl 1 M pH 8 por cada mililitro de protoxina, y luego se añadieron 2 µl de jugo gástrico. La reacción se incubó 2 horas a 37°C en agitación suave, y la proteólisis se detuvo con PMSF 1 mM. La mezcla de reacción se centrifugó a 10,000 rpm y se recuperó la toxina activada en conformación de monómero en el sobrenadante. Se determinó la concentración de la toxina activada por el método de Bradford y se analizó en SDS-PAGE al 9% su procesamiento proteolítico.

Solubilización y activación para la obtención de oligómero

Para la producción de oligómero se tomaron 50 µg de cristales de la toxina y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos para eliminar el amortiguador. La pastilla se resuspendió con el anticuerpo scFv73 en una relación 1:4 (p/p) y se añadieron 50 µl de solución de solubilización (NaHCO₃ 50mM pH 10.5, β-mercaptoetanol 0.02%). A la mezcla se agregó 0.5-1% (1-2 µl) de jugo gástrico de *M. sexta*. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación suave. Para detener la reacción proteolítica se adicionó PMSF a una concentración final 1 mM. Se centrifugó durante 15 minutos a 14,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. La proteína soluble obtenida se analizó mediante un experimento tipo Western blot.

Las proteínas solubles se separaron en SDS-PAGE al 8% y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) a 345 mA por 45 minutos. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS con Tween 20 al 0.1%, durante 1 hora. Se le realizaron varios lavados empleando PBS, Tween 20 0.1%.

La membrana se incubó 1 hora con el anticuerpo primario, Anti-Cry1Ab policlonal de conejo, en una dilución 1:50,000. Se lavó varias veces con PBS, Tween 20 0.1% y se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Anti-rabbit IgG-HRP, ECL™) en una dilución 1:10,000. Se lavó nuevamente la membrana y se reveló con el sustrato de la peroxidasa Luminol (PIERCE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El oligómero de la toxina se purificó por medio de una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 acoplada a FPLC (Gómez *et al.*, 2002b). Las fracciones colectadas de la cromatografía se analizaron por Western blot siguiendo el mismo procedimiento arriba descrito.

MARCAJE DEL MONÓMERO DE LA TOXINA Cry1Aa CON BIOTINA

La mezcla de reacción se preparó con 40 µl de biotina (Amersham) por miligramo del monómero de la toxina, y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Para separar la biotina que no se unió a la toxina, se empleó una columna de exclusión de peso molecular de Sephadex G25 previamente lavada con PBS. Se cargó la muestra y se eluyó la toxina centrifugando la columna durante 2 minutos a 2,000 rpm.

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford y se verificó el marcaje de la toxina con biotina mediante un ensayo tipo Western blot. Para esto, una muestra de la toxina biotinada se separó en SDS-PAGE al 9% y se electrotransfirió a 345 mA por 45 minutos sobre una membrana de nitrocelulosa ECL. La membrana se incubó con PBS, Tween 20 2% y luego se lavó en PBS, Tween 20 0.1%. Se incubó una hora con estreptavidina peroxidada (ECL™) 1:4000 en PBS, Tween 20 0.1% y, para eliminar la estreptavidina no unida, se lavó nuevamente en PBS, Tween 20 0.1% y

PBS. Finalmente la membrana se incubó y reveló con el sustrato Luminol (PIERCE) de la peroxidasa (HRP).

PREPARACIÓN DE VESÍCULAS (VMMA) DE *Manduca sexta*

Extracción de tejido

Las larvas de tercer estadio de *M. sexta* que se utilizaron para recuperar tejido fueron criadas en el insectario del laboratorio. Para extraer el intestino medio, las larvas se mantuvieron en hielo durante 15 minutos y luego se fijaron con alfileres entomológicos a una tabla de disección. Haciendo un corte longitudinal en la región media de la larva, a 3 segmentos de cada uno de sus extremos, se extrajo el intestino medio y se retiró su contenido. El tejido recuperado se enjuagó en una solución fría de D-manitol 300 mM, EGTA 5 mM, PMSF 0.5 mM, Tris-HCl 17 mM, y DTT 2, pH 7.4, y luego se almacenó a -70°C hasta su uso.

Purificación de VMMA

Para purificar vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) del intestino medio, el tejido se descongeló en hielo, mientras tanto, se preparó y enfrió la solución I: D-manitol 300 mM, Tris-HCl 17mM, EGTA 5mM, DTT 2mM, HEPES 10mM, EDTA 1mM, PMSF 0.1mM, leupeptina (metanol) 100 µg/ml, pepstatina (etanol) 100 µg/ml y neomicina 600 µg/mg.

Una vez descongelado el tejido, 3 g de éste se colocaron en un homogenizador de vidrio estéril inmerso en hielo, y se diluyó 1:10 (p/v) con la solución fría I. El émbolo estéril de teflón del homogenizador se colocó y se dieron 9 golpes a 2250 rpm. Lentamente se agregó un volumen igual de una solución de MgCl₂ 24 mM y se colocó en hielo durante 15 minutos, mezclando ocasionalmente.

Transcurrido este tiempo, el homogenado de intestino se centrifugó a 4,500 rpm por 15 minutos a 4°C en un rotor Beckman JA-20 de ángulo fijo. El sobrenadante se

recuperó en un tubo estéril y se volvió a centrifugar en el mismo equipo, a 16,000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

La pastilla obtenida se resuspendió en la mitad del volumen de la solución fría I y la mitad del volumen de la solución de MgCl₂. Se repitieron los dos pasos de centrifugación (a 4,500 y 16,000 rpm) recuperando primero el sobrenadante y luego la pastilla, que al final se resuspendió en la solución fría I diluida con agua desionizada 1:1.

Finalmente la muestra se colocó en otro homogenizador de vidrio estéril y se dieron 3 golpes a 2250 rpm usando un émbolo también estéril.

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry Modificado (Dc Protein Assay, Bio-Rad) empleando albúmina bovina como estándar. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 9% y se visualizaron con una tinción con coomassie.

Determinación de la actividad específica de aminopeptidasa (APN)

La actividad específica de APN se determinó utilizando el sustrato L-leucina-*p*-nitroanilida. Durante algunos minutos se siguió la cinética de la reacción de 3 µg de VMMA o de 10 µg de homogenado inicial de intestino con L-leucina-*p*-nitroanilida 1 mM en Tris-HCl 200 mM pH 8.0 y NaCl 250 mM, midiendo la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 650).

Determinación de la actividad específica de fosfatasa alcalina (ALP)

El sustrato *p*-nitrofenol fosfato de ALP se empleó para determinar la actividad específica en las VMMA y en el homogenado inicial. Se hicieron reaccionar 20 µg de muestra con su sustrato *p*-nitrofenol fosfato a una concentración de 1 mg/ml en una solución de MgCl₂ 0.5 mM y Tris-HCl 100 mM pH 9.5, durante 15 minutos. La reacción se detuvo agregando EDTA en una concentración final de 125 mM, y se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 650).

LIBERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANCLADAS POR GPI CON PI-PLC

Se resuspendieron 2 mg/ml de VMMA de *M. sexta* en PBS. La enzima fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC, Sigma) se añadió en una concentración de 2 U/ml y se incubó durante 2 horas a 30°C con agitación suave.

La mezcla de reacción se ultracentrifugó a 70,000 rpm (Rotor MLA 80) por 20 minutos a 4°C y se separaron las dos fracciones resultantes: el sobrenadante y la pastilla. La concentración de proteína en ambas fracciones se determinó utilizando el método de Lowry Modificado (Dc Protein Assay, Bio-Rad).

ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE LA TOXINA Cry1Aa A SUS RECEPTORES

Ensayo de unión de ligando

Una muestra de 6 µg de proteína de VMMA se separó mediante SDS-PAGE al 9% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa ECL en una cámara de electrotransferencia a 345 mA por 45 minutos.

Después de la transferencia, la membrana se lavó con PBS, Tween 20 0.1%, se bloqueó con PBS, Tween 20 0.1%, BSA 1% y luego se incubó durante 2 horas con 10 nM de toxina Cry1Aa biotinada en una solución de PBS, BSA 0.2%, Tween 20 0.1%. La toxina que no se unió a las proteínas de la membrana se eliminó lavando repetidas ocasiones con PBS, Tween 20 0.1%.

Para detectar la toxina unida, la membrana se incubó con estreptavidina-HRP 1:3000 (v/v) en PBS, Tween 20 0.1% durante 1 hora y se reveló, luego de varios lavados, usando quimioluminiscencia (Luminol, PIERCE).

ELISA

La proteína blanco en PBS (VMMA o sobrenadante) se inmovilizó en la caja de ELISA (MaxiSorp Nunc) durante 12 horas a 4°C en concentraciones de 5 ó 10 µg/ml (100

μl/pozo). Los pozos se bloquearon con PBS, Tween 20 0.1%, leche descremada 2%, 2 horas a 37°C y después se lavaron con PBS, Tween 20 0.1%.

La toxina, en cualquiera de sus dos conformaciones (monómero u oligómero), se incubó con la proteína inmovilizada durante 1 hora en PBS, Tween 20 0.1%. Luego de lavar la toxina no unida con la misma solución, la placa se incubó con un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Cry1Ab (que reconoce también a Cry1Aa) en una dilución 1:10,000. Después de 1 hora y de lavar la placa 5 veces con PBS, Tween 20 0.1%, se incubó 1 hora más con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Anti-rabbit IgG-HRP, ECL™) en una dilución 1:5,000. La unión se reveló utilizando el sustrato de la peroxidasa *o*-Fenilendiamina (OPD, SIGMA). Los valores de absorbancia a 490 nm se obtuvieron con un lector de cajas de ELISA (Emax® Molecular Devices).

SELECCIÓN DE PÉPTIDOS LINEALES: Ph.D.-12™

La biblioteca de despliegue en fagos Ph.D.-12™ (New England BioLabs) es una biblioteca de dodecámeros aleatorios fusionados en el extremo N-terminal de la proteína pIII del fago M13, de tal forma que el primer residuo de la proteína madura es el primero del dodecámero. El péptido es seguido de una secuencia espaciadora (GGGS) y luego se encuentran los residuos de la proteína pIII. La biblioteca consta de $\sim 2.7 \times 10^9$ secuencias y, según información del proveedor, 10 μl de la biblioteca original contienen ~ 55 copias de cada una de ellas.

Debido a que esta biblioteca se deriva de un vector de clonación M13mp19, que tiene el gene *lacZα*, las placas de fagos son azules cuando se crecen en un medio que contiene IPTG y XGal con una cepa bacteriana apta para α-complementación, mientras que los fagos filamentosos silvestres producen placas blancas cuando se crecen en el mismo medio.

En un primer experimento de selección, 1 ml del sobrenadante 0.15mg/ml (obtenido al rasurar VMMA de *M. sexta* con PI-PLC) se inmovilizó en inmunotubos (Nalge Nunc) de 5ml a 4°C por 12 horas. Después de decantar la proteína no inmovilizada, los

tubos se incubaron con solución de bloqueo (NaHCO_3 0.1 M pH 8.6, BSA 5 mg/ml, NaN_3 0.02%) durante 1 hora a 4°C.

El procedimiento de selección se hizo siguiendo las recomendaciones generales del fabricante. Con las proteínas inmovilizadas en un inmunotubo se incubaron 1.5×10^{11} ufp/ml en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM), Tween 20 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizaron 6 lavados usando TBS con Tween 20 0.1% para las rondas 1-3 y Tween 20 0.5% para las rondas 4 y 5. Los fagos unidos se eluyeron con una solución de Glicina-HCl 0.2 M pH 2.2, BSA 1 mg/ml que se neutralizó luego de 8 minutos con Tris-HCl 1M pH 9.1.

En el segundo experimento de selección, 67 μg del sobrenadante se inmovilizaron en un pozo de caja de ELISA (MaxiSorp Nunc). En la ronda 1, la biblioteca de fagos (1.5×10^{11} ufp) se preincubó en 100 μl de TBS-Tween 20 0.2% y BSA 0.2% antes de exponerla al antígeno durante 1 hora, tras la cual se recuperó la biblioteca no seleccionada y se eliminaron los fagos no unidos lavando el pozo 10 veces con TBS-Tween 20 0.2%.

Los fagos unidos se eluyeron primero con glicina-HCl pH 2.2 por 10 minutos. Inmediatamente después de recuperarlos del pozo, el pH se ajustó con Tris-HCl pH 9.1. Para la elusión con células en el pozo, el pH se neutralizó y se agregaron 100 μl de un cultivo de *E. coli* ER2738 OD_{600} 0.6, crecido en medio LB (bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%), tetraciclina 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después de incubar durante 30 minutos a 37°C el cultivo se recuperó y posteriormente se amplificó.

En las rondas 2 y 3, los fagos (4×10^{10} ufp) se preincubaron con TBS-Tween 20 0.5%, BSA 0.2% y luego se incubaron 1 hora con el antígeno (67 μg del sobrenadante). Los pozos se lavaron 15 y 20 veces con TBS-Tween 0.5%. Al igual que en la ronda 1, los fagos unidos se eluyeron primero con glicina-HCl pH 2.2 y luego con un cultivo de *E. coli* ER2738 OD_{600} 0.6 durante 30 minutos.

A partir de unidades formadoras de placa (ufp) en caja de Petri se separaron clonas y se amplificaron para su análisis. Para recuperar el ADN se empleó el paquete de purificación QIAprep® Spin M13 Kit (QIAGEN). La Unidad de Síntesis y Secuenciación (IBT-UNAM) efectuó la secuenciación utilizando el oligonucleótido directo -96 gIII 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' (New England BioLabs).

Amplificación y titulación de fagos

La amplificación de los fagos eluidos de la selección o de clonas aisladas, se realizó infectando cultivos de *E. coli* ER2738 en medio LB, tetraciclina 20µg/ml en fase temprana ($OD_{600} < 0.01$), los cuales se crecieron posterior a la infección durante 4.5-5 horas a 37°C con agitación de 250 rpm. Dado que M13 es un fago no-lítico, la purificación de los fagos se logró eliminando primero las células por centrifugación durante 10 minutos y precipitando del sobrenadante los fagos. Al sobrenadante recuperado se adicionó 1/6 de su volumen de una solución de polietilenglicol (PEG) 8000 20% (w/v), NaCl 2.5M y se incubó a 4°C por 12 horas en tubos de centrífuga de 50 ml. Los fagos se recuperaron al centrifugar a 10,000 rpm 15 minutos a 4°C; el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en TBS. Esta suspensión de fagos se centrifugó 5 minutos para eliminar las células residuales y luego de una segunda precipitación con PEG-NaCl en hielo por 1 hora, los fagos se resuspendieron nuevamente en TBS.

Para calcular el número de fagos eluidos o amplificados, se titularon diferentes diluciones de los fagos por ufp. Con 10 µl de una dilución de fagos se infectaron 200 µl de un cultivo de *E. coli* OD_{600} 0.5 durante 3-4 minutos. Al cabo de éstos, las células se transfirieron a un tubo con 3ml de Top-Agarosa (bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1%, agarosa 0.7%) precalentada a 45°C y rápidamente luego de agitar en vortex, la mezcla se vertió en una caja de Petri con medio LB, IPTG 0.21 mM, XGal 40 µg/ml. Una vez sólida la superficie de las cajas, se invirtieron e incubaron a 37°C durante 12 horas. Las cajas de Petri con menos de 100 ufp se utilizaron para contar las placas azules y calcular el número de fagos a partir del factor de dilución.

ELISA

La unión de los fagos a las proteínas del sobrenadante y a la toxina Cry1Aa se analizó en ensayos de ELISA monoclonal y policlonal. La proteína blanco se fijó a la placa (MaxiSorp Nunc) en PBS durante 12 horas a 4°C, en concentraciones de 1-10 µg/ml

(según se indica en los resultados). Para bloquear, la placa se incubó 1 hora a 4°C con una solución de BSA (NaHCO₃ 0.1 M pH 8.6, BSA 5 mg/ml, NaN₃ 0.02%). Luego, se lavó 5 veces con TBS, Tween 20 0.1%. El resto de los lavados de la placa se hicieron en la misma forma, y en la incubación de los fagos y los anticuerpos se utilizó la misma solución de TBS, Tween 20 0.1%.

Después del bloqueo, los fagos se incubaron con la proteína inmovilizada durante 1 hora a temperatura ambiente, se utilizó un anticuerpo primario de ratón Anti-M13 (Amersham) y posteriormente un secundario acoplado a peroxidasa (Anti-mouse-HRP, Sigma), lo que permitió la detección con el sustrato OPD de la peroxidasa. Las lecturas de absorbancia a 490 nm se realizaron empleando un lector de cajas de ELISA (Emax® Molecular Devices).

SELECCIÓN DE PÉPTIDOS ESTRUCTURADOS: FliTrx™

La selección de péptidos estructurados se realizó empleando la biblioteca FliTrx™ (Invitrogen, cat. K1125-01, versión A) que despliega péptidos aleatorios en la superficie de *E. coli*. Esta biblioteca tiene una complejidad de 1.77x10⁸ clonas primarias.

Se empleó el protocolo básico de selección descrito por el fabricante. Un vial de la biblioteca FliTrx™ se descongeló para amplificarla, creciendo el cultivo hasta la saturación en medio IMC (sales M9 1X, casaminoácidos 0.2%, glucosa 0.5%, MgCl₂ 1mM) con ampicilina 100 µg/ml. De éste, se tomaron 1x10¹⁰ células para iniciar el cultivo inducido en 50 ml de IMC, ampicilina 100 µg/ml y triptófano 100 µg/ml que se creció por 6 horas a 25°C en agitación a 225 rpm.

Los inmunotubos (Nalge Nunc de 5 ml), con las proteínas blanco inmovilizadas previamente por 12 horas a 4°C, se bloquearon con una solución de leche descremada al 1% y NaCl 150 mM en medio IMC. Llegado el momento de realizar la selección, el cultivo inducido de la biblioteca se ajustó a con leche 1% y NaCl 150 mM.

Durante la selección, cada inmunotubo se lavó con el mismo medio de cultivo (IMC) y las células se eluyeron mecánicamente en el vortex por 30 segundos. Las células eluidas se titularon, haciendo diluciones y contando las unidades formadoras de colonia

en cajas de Petri. Las demás células se amplificaron toda la noche a 30°C en medio IMC para la siguiente ronda de selección.

De las clonas específicas se obtuvo la secuencia del péptido desplegado. Para esto, con una colonia se inocularon 2 ml de medio RM (sales M9 1X, casaminoácidos 2%, glicerol 1%, MgCl₂ 1mM), ampicilina 100 µg/ml y se crecieron a 30°C durante 12 horas. El paquete celular se obtuvo por centrifugación y el ADN se extrajo utilizando el paquete de purificación Wizard® *Plus* SV minipreps DNA purification system (Promega).

La secuenciación se encomendó a la Unidad de Síntesis y Secuenciación (IBT-UNAM) que empleó el oligonucleótido directo FliTrx™ Forward Sequencing 5'-ATTCACCTGACTGACGAC-3' (Invitrogen).

Las secuencias nucleotídicas que resultaron se tradujeron y los péptidos se analizaron con el programa ClustalW intentando alinear sus secuencias y generar un consenso.

Western blotting

Las proteínas de 10⁷-10⁸ células de la biblioteca o de clonas se separaron mediante SDS-PAGE al 12%, para luego ser electrotransferidas por 45 minutos a 345 mA a una membrana PVDF (Millipore). La membrana se bloqueó 1.5 horas con una solución de PBS, leche descremada 5%, Tween 20 0.1%; en seguida, se lavó 5 veces con PBS, Tween 20 0.1% (solución de lavado). El anticuerpo primario, Anti-Thio™ (Invitrogen), se diluyó 1:5000 en PBS, Tween 20 0.1% y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con la membrana.

Después de 5 lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario Anti-mouse-HRP (Sigma) durante 1 hora. La membrana se lavó 5 veces con la solución de lavado y 2 veces más con PBS solamente. La unión se reveló usando quimioluminiscencia (Luminol, PIERCE).

ELISA

La proteína blanco se inmovilizó por 12 horas a 4°C en PBS, en concentraciones que fueron de 1 a 15 µg en 100 µl. Se bloqueó con una solución de IMC, leche descremada 1%, NaCl 150 mM y ampicilina 100 µg/ml, por al menos 1 hora a temperatura ambiente.

Las rondas de selección o las clonas se amplificaron hasta la saturación durante 15 horas a 30°C, y de ese cultivo se tomaron 2×10^8 células/ml para iniciar la inducción en medio IMC, ampicilina 100 µg/ml, triptófano 100 µg/ml. Una vez completa la inducción, los cultivos se complementaron con leche descremada 1%, NaCl 150 mM y se realizó la unión de las células a las proteínas inmovilizadas durante 1 hora. Se usó medio IMC con ampicilina 100µg/ml para lavar las placas 3 veces después de la unión, pero los lavados posteriores se hicieron con PBS, Tween 20 0.1%.

El anticuerpo primario Anti-Thio™ (Invitrogen), que reconoce la tiorredoxina, se empleó en una relación 1:500 en PBS, Tween 20 0.1%, y se incubó durante 1 hora. Después de 5 lavados, un anticuerpo secundario Anti-mouse-HRP (Sigma) permitió la detección con el sustrato OPD. Empleando un lector de cajas de ELISA (Emax® Molecular Devices) se tomaron las lecturas de absorbancia a 490 nm.

RESULTADOS

Se han utilizado diferentes estrategias para estudiar y determinar las interacciones de las toxinas Cry de Bt con las proteínas presentes en el intestino de los insectos susceptibles. Entre las estrategias más utilizadas se encuentra el uso de vesículas de la microvellosidad intestinal (VMMA) con toxinas marcadas con biotina o radioactividad (ensayos de unión tipo Bosch).

Por otro lado, los experimentos de unión de ligando, en los que las proteínas se separan mediante electroforesis en geles de acrilamida desnaturizantes y luego son transferidas a membranas de nitrocelulosa, han permitido identificar dominios funcionales en las toxinas Cry, además de algunas proteínas que pueden funcionar como receptores.

Los datos generados ilustran la complejidad en la especificidad de las toxinas Cry en cuanto a sus propiedades de unión con sus receptores. Sin embargo, el patrón general indica que los dominios II y III son los responsables de las interacciones con receptores dentro del mecanismo de toxicidad con las toxinas Cry.

En el presente trabajo empleamos la técnica de despliegue en fagos para aislar a partir de bibliotecas de péptidos lineales o estructurados, péptidos con capacidad de unión a los receptores anclados por GPI: APN y ALP.

PURIFICACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LA TOXINA Cry1Aa

Para los análisis de unión con los receptores APN y ALP, inicialmente toxina Cry1Aa se activó tanto en su forma monomérica como de oligómero. Para esto, se produjeron cristales de la toxina a partir de la cepa de *B. thuringiensis* y posteriormente se purificaron como se describe en los Materiales y Métodos. El análisis de las fracciones purificadas en un gel de acrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

reveló una banda de 130 kDa correspondiente al peso molecular de la protoxina de Cry1Aa (Figura 8a).

El proceso de activación incluye la solubilización de los cristales para recuperar la protoxina soluble, que después de un tratamiento proteolítico con jugo gástrico de *M. sexta* genera el monómero de la toxina. El procesamiento proteolítico se analizó en SDS-PAGE al 9%, donde observamos una banda de 65 kDa propia de la toxina activa (Figura 8b).

Una vez activada la toxina, el monómero se marcó con biotina con el propósito de poder detectarlo con estreptavidina acoplada a peroxidasa en ensayos de unión de ligando. La marca de esta toxina se verificó en un ensayo tipo Western blot (Figura 8c).

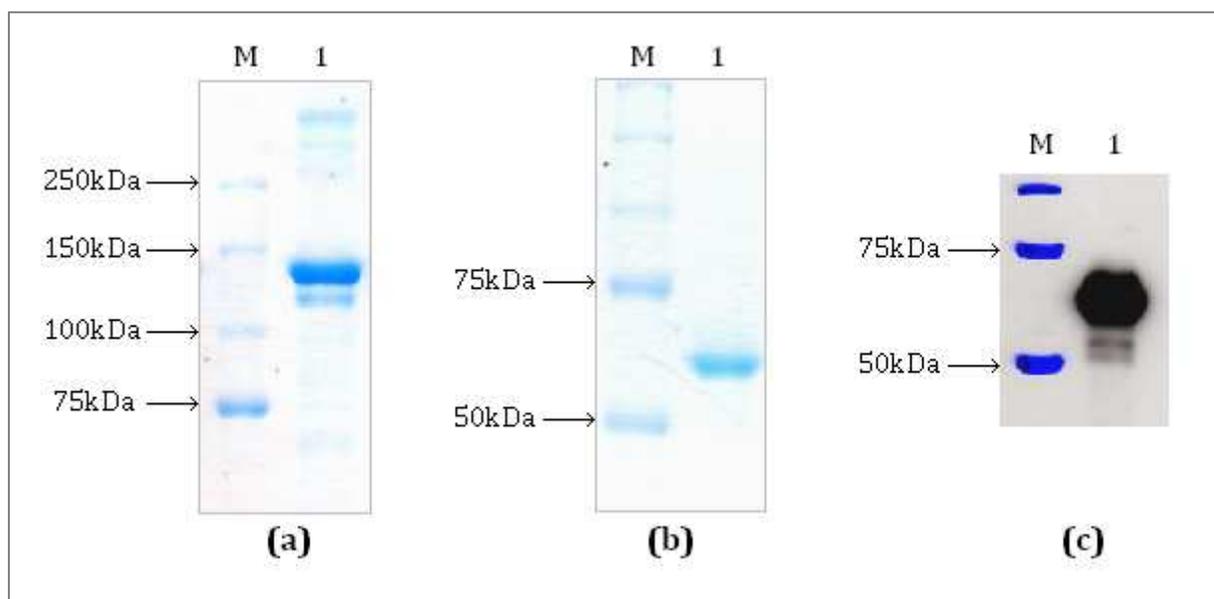


Figura 8. Cristales y monómero de la toxina Cry1Aa. M: marcador de peso molecular; **(a)** SDS-PAGE 10% 1: protoxina de Cry1Aa (3µg), tinción con coomassie; **(b)** SDS-PAGE 9% 1: monómero de Cry1Aa (2µg), tinción con coomassie; **(c)** Western blot 1: Cry1Aa-biotina, revelado con estreptavidina acoplada a peroxidasa.

Al mismo tiempo, se activó la toxina Cry1Aa en presencia del anticuerpo scFv73 para obtener la forma oligomérica de Cry1Aa con peso molecular de 250 kDa. Este anticuerpo mimetiza al receptor natural tipo caderina Bt-R₁ de *M. sexta*, que al interactuar con la toxina permite el corte de la hélice α -1 y la consecuente formación del oligómero (Gómez *et al.*, 2002b).

Una muestra de la toxina activada de esta forma se analizó mediante Western blot y se confirmó la presencia del oligómero. La separación de éste de la mezcla de reacción se hizo mediante una columna de exclusión de peso molecular, y las fracciones recuperadas también se analizaron en un Western blot. (Figura 9). En los carriles 3 al 8 (fracciones 10-15) se detectaron bandas con el peso molecular del oligómero, mientras que en los carriles 10 al 12 se observa la banda correspondiente al monómero.

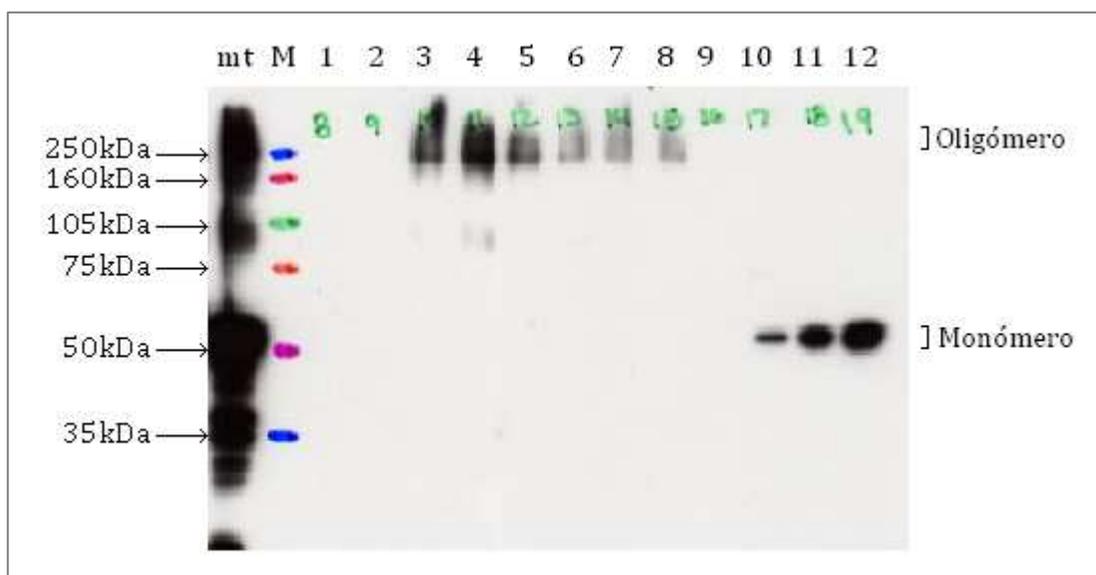


Figura 9. Activación de cristales de la toxina Cry1Aa en presencia del anticuerpo scFv73 y su purificación por cromatografía de exclusión molecular. M: marcador de peso molecular; mt: mezcla total (toxina, scFv73, jugo gástrico); 1-12: Fracciones colectadas.

PURIFICACIÓN DE VESÍCULAS DE *Manduca sexta*

Para analizar el papel de la aminopeptidasa N (APN) y la fosfatasa alcalina (ALP) como proteínas de unión a la toxina Cry1A, se purificaron vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) del intestino medio de larvas del tercer estadio mediante precipitación diferencial con $MgCl_2$ (Wolfersberger *et al.*, 1987).

Se determinó la actividad específica de APN y ALP (empleando los sustratos L-leucina-p-nitroanilida y p-nitrofenol fosfato respectivamente) a las VMMA y al homogenado inicial (Tabla 1). Esto se hizo con el objetivo de calcular el enriquecimiento

de las proteínas propias de la microvellosidad en las vesículas purificadas, respecto al homogenado inicial de intestino.

Tabla 1. Actividad específica de APN y ALP en las vesículas y homogenado inicial

Muestra	ALP (nmol/min μ g)	Enriquecimiento ALP	APN (U/min μ g)	Enriquecimiento APN
Homogenado	0.120	7.39	69.584	9.42
VMMA	0.887		655.792	

Finalmente, se corrió una muestra de las VMMA purificadas en SDS-PAGE 9%, en el que se observa la gran variedad de proteínas que las componen mediante una tinción con coomassie (Figura 10).

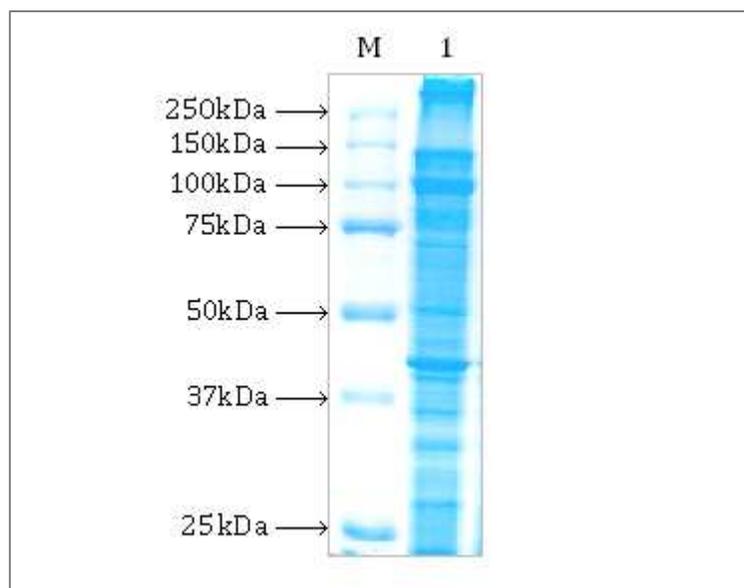


Figura 10. VMMA de *M. sexta*. SDS-PAGE 9%, M: marcador de peso molecular; 1: vesículas (40 μ g).

LIBERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANCLADAS POR GPI EN LAS VMMA MEDIANTE TRATAMIENTO CON PI-PLC Y ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE LA TOXINA Cry1Aa

La aminopeptidasa-N, una proteína de 120 kDa, y la fosfatasa alcalina de 65 kDa, están unidas a la membrana de la microvellosidad por un ancla de glicosilfosfatidil inositol (GPI), por lo que para liberar estas dos proteínas de las VMMA, tratamos éstas con fosfolipasa C (PI-PLC), una fosfodiesterasa que corta el ancla de GPI.

Después del tratamiento de las VMMA con PI-PLC se ultracentrifugó la mezcla de reacción y se recuperaron dos fracciones: la pastilla y el sobrenadante, a las cuales determinamos actividad específica de las 2 enzimas (Tabla 2). También se corrieron estas fracciones en un gel de acrilamida y después de la tinción con coomassie se observaron bandas correspondientes al peso molecular de la APN y ALP principalmente en la fracción soluble, además de otras proteínas (Figura 11).

Tabla 2. Actividad específica de APN y ALP en las fracciones obtenidas al tratar las VMMA con PI-PLC.

Muestra	ALP (nmol/min µg)	APN (U/min µg)
Sobrenadante	1.486	593
Pastilla	0.255	1114.173

Antes de emplear este sobrenadante como fuente de las proteínas blanco o antígeno en la selección con las bibliotecas de péptidos, se examinaron las proteínas presentes en el sobrenadante de las VMMA tratadas con PI-PLC por su capacidad de unir la toxina Cry1Aa. La interacción se analizó en condiciones desnaturalizantes con un experimento de unión a ligando y en condiciones nativas mediante ELISA.

En el experimento de unión a ligando, las proteínas luego de ser separadas en un gel de acrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, se detectaron con la toxina previamente marcada con biotina. En el sobrenadante de las VMMA tratadas con PI-PLC se observó la presencia de dos proteínas principales con pesos moleculares correspondientes con los reportados para APN (120kDa) y ALP (65kDa). Aunque se

encontró una fracción de ellas que no fue liberada y quedó en la pastilla, se confirmó su presencia en el sobrenadante (Figura 12).

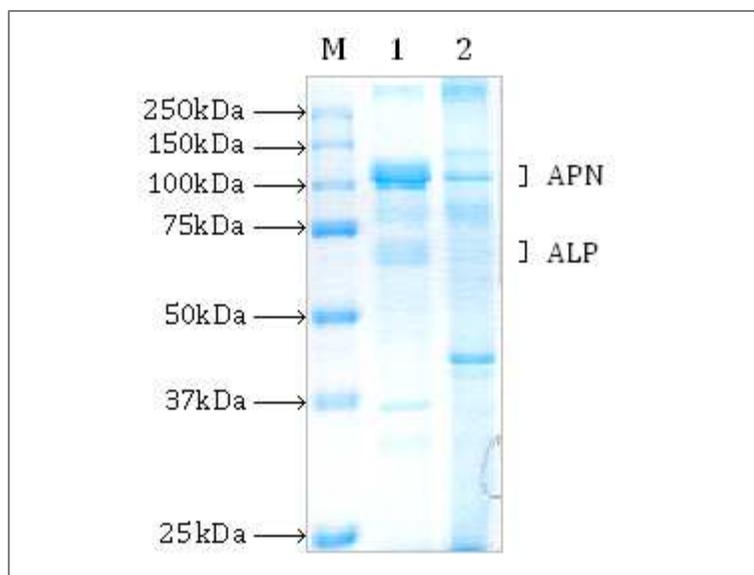


Figura 11. Proteínas de las VMMA tratadas con PI-PLC. SDS-PAGE 9%, M: marcador de peso molecular; 1: sobrenadante (6.3 μg); 2: pastilla (7.6 μg). Tinción con coomassie.

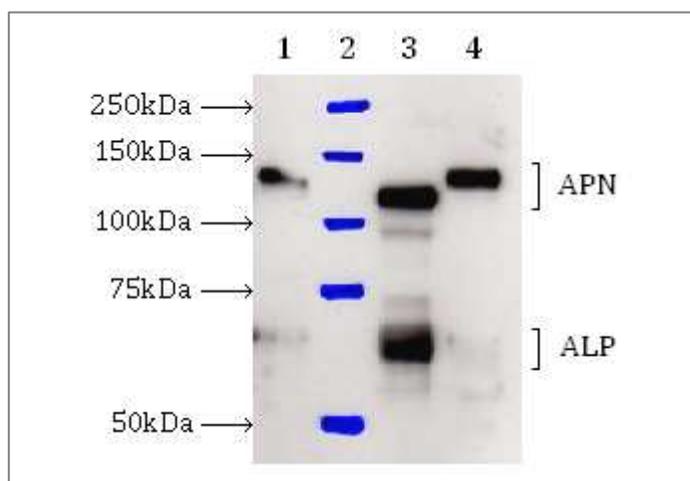


Figura 12. Ensayo de unión de ligando con la toxina Cry1Aa. 1: VMMA (6.3 μg), 2: marcador de peso molecular, 3: sobrenadante (6.3 μg), 4: pastilla (6.6 μg);

A continuación se analizó la interacción de las proteínas del sobrenadante y de las VMMA en un ensayo de ELISA. Empleamos 3 concentraciones del monómero de la toxina y los datos se presentan en la Figura 13.

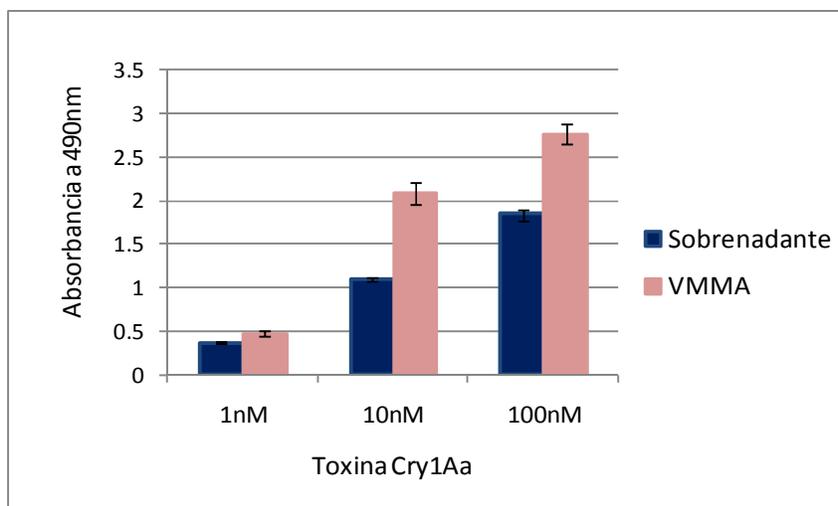


Figura 13. Unión del monómero Cry1Aa al sobrenadante y a VMMA (10 μ g/ml) en un ensayo de ELISA.

Para comparar la unión de la toxina en sus formas de monómero y oligómero a las proteínas presentes en las VMMA y en el sobrenadante, se realizó un ensayo de ELISA en el que se utilizó 0.46 nM de la toxina Cry1Aa en cada conformación.

Si bien no se puede considerar la concentración de proteínas de las VMMA equivalente al sobrenadante, este experimento nos da información acerca de la unión diferencial de ambas formas de la toxina a sus receptores, y confirma la validez del uso del sobrenadante en los experimentos de selección de este trabajo (Figura 14).

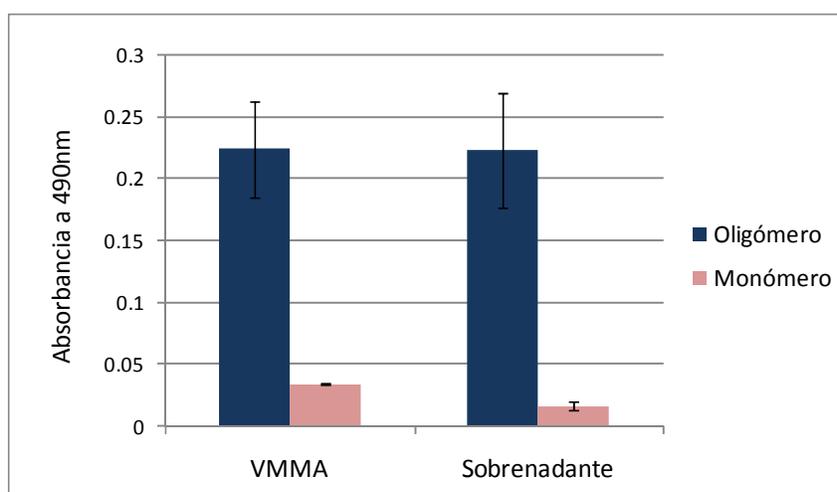


Figura 14. Unión de la toxina Cry1Aa como monómero y oligómero, ambos 0.46nM, a las proteínas presentes en VMMA y sobrenadante (5 μ g/ml) en un ensayo de ELISA.

SELECCIÓN DE PÉPTIDOS QUE RECONOCEN APN O ALP DE *M. sexta* MEDIANTE LA TÉCNICA DE DESPLIEGUE EN FAGOS

El uso de tecnologías de despliegue en bacteriófagos y bacterias, combinado con metodologías de selección *in vitro*, han transformado el modo de generar y manipular ligandos. Una aplicación de esta metodología permite la selección de ligandos con capacidad de inhibir interacciones proteína-proteína. Nosotros contamos con 2 bibliotecas de péptidos: Ph.D.-12™ (New England) y FliTrx™ (Invitrogen) a partir de las cuales nos propusimos recuperar péptidos que unieran a las proteínas ancladas por GPI que enriquecimos una vez que tratamos las VMMA con PI-PLC, y que tuvieran la capacidad de inhibir la interacción con el oligómero de la toxina Cry1Aa.

Selección de péptidos lineales: Ph.D.-12™

La biblioteca comercial Ph.D.-12™ (New England BioLabs) despliega dodecámeros aleatorios lineales fusionados a proteína pIII del fago M13. Como se describió en Materiales y Métodos consta de $\sim 2.7 \times 10^9$ secuencias primarias, y según la información del fabricante, la secuenciación de clonas de la biblioteca original reveló una gran diversidad de secuencias sin sesgos.

La selección de péptidos lineales de esta biblioteca se realizó contra el sobrenadante obtenido al rasurar VMMA de *M. sexta* con PI-PLC. En un primer experimento diseñado con 5 rondas de selección, se inmovilizaron 150 μg de proteína por inmunotubo. Los fagos que no se unieron a las proteínas inmovilizadas se lavaron con TBS, 0.1% de Tween 20 hasta la ronda 3 y con TBS, 0.5% de Tween20 en las rondas 4 y 5. Los fagos unidos se eluyeron con glicina-HCl 0.2 M pH 2.2 y se cuantificaron contando unidades formadoras de placa. Después de 5 rondas, la fracción de fagos eluidos (la cual se calculó como el número de fagos eluidos entre el número de fagos de entrada) se incrementó de 10^{-9} en la primera ronda a 10^{-7} y 10^{-6} en las rondas 4 y 5.

Debido a la posibilidad de que en la quinta ronda se encontrara menor diversidad de clonas por el enriquecimiento preferencial de las más afines, se tomaron 54 clonas al

azar de la cuarta ronda para analizar en un ensayo de ELISA su capacidad de unión a las proteínas del sobrenadante, considerando fagos positivos a aquellos cuya unión al sobrenadante mostró un valor de absorbancia superior a 0.3 y con una proporción de las señales del blanco sobre el fondo mayor a 2 (Figura 15).

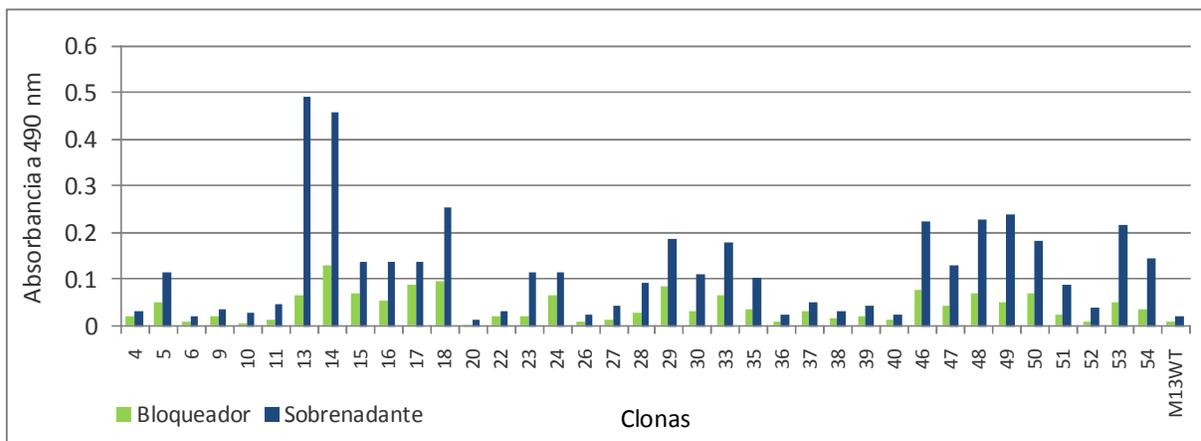


Figura 15. ELISA monoclonal retando los fagos de la 4^a ronda de selección contra el sobrenadante (10 μ g/ml) y contra los pozos vacíos, solo bloqueados (10¹⁰ ufp).

A partir de estos datos consideramos solamente a las clonas Ph13 y Ph14 para efectuar un ensayo de ELISA en el cual se examinó el reconocimiento específico de estos fagos a las proteínas de interés (Figura 16).

En este experimento incluimos a la toxina Cry1Aa porque esta toxina se emplearía posteriormente como competidor en la unión de los fagos al sobrenadante, o bien, se competiría la unión de la toxina a las proteínas del sobrenadante con los fagos. El ensayo de ELISA mostró la unión de Ph13 y Ph14 a las proteínas del sobrenadante en una proporción menor a la unión a la toxina, manifestando su inespecificidad y descartándolas para cualquier ensayo de competencia.

Se diseñó una segunda estrategia de selección en pozo de ELISA con 3 rondas solamente. En esta ocasión se inmovilizaron 67 μ g de proteína y se eliminaron los fagos inespecíficos lavando exhaustivamente el pozo, nuevamente en presencia de Tween 20 en concentraciones de 0.2 a 0.5%. Además, los fagos unidos se eluyeron con glicina-HCl y luego con células de *E. coli*, intentando con esto recuperar aquellas clonas que por sus propiedades de unión no fueran eluidas con la glicina-HCl.

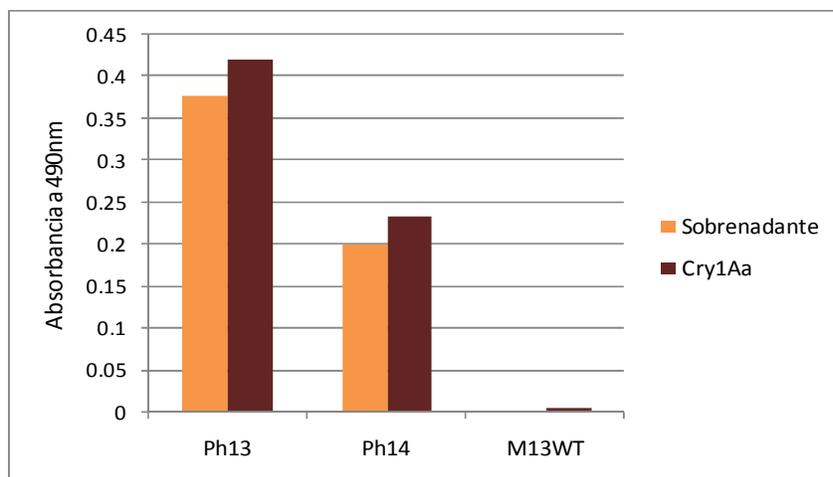


Figura 16. Unión de las clonas Ph13 y Ph14 al sobrenadante y al monómero de la toxina Cry1Aa, en ELISA (proteína 1µg/ml; 10^{11} pfu).

En las 3 rondas se titularon los fagos recuperados de la elusión con glicina-HCl y se calculó la fracción de fagos eluidos (fagos de entrada/fagos de salida) cuyo valor se mantuvo en una fracción de recuperación de 10^{-6} . Sin embargo, al comparar la unión de fagos de la biblioteca original no seleccionada y de las rondas, a las proteínas del sobrenadante, al bloqueador y a la toxina Cry1Aa en un ensayo de ELISA (Figura 17), notamos en la ronda 3 una unión preferencial de los fagos a las proteínas del sobrenadante; sin embargo, una fracción de ellos reconoció también a la toxina Cry1Aa.

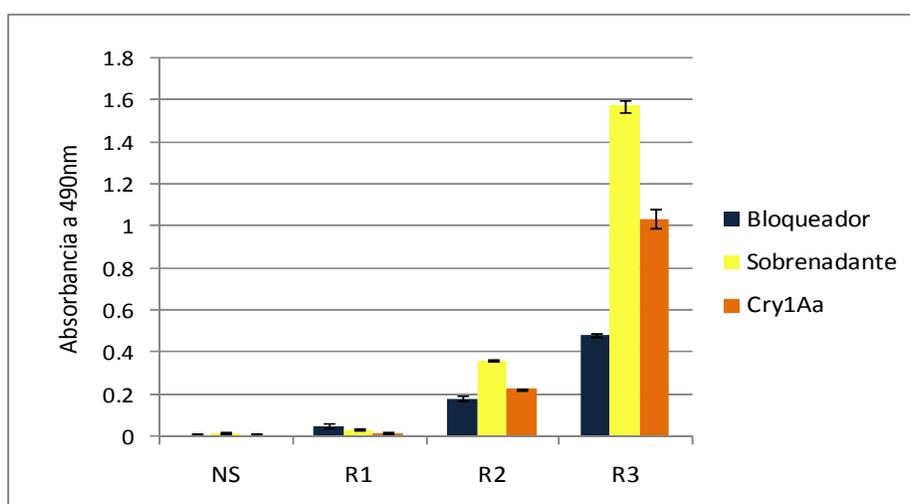


Figura 17. Unión de 3 rondas de selección de fagos contra sobrenadante en ELISA. NS: biblioteca no seleccionada; R1: ronda 1; R2: ronda 2; R3: ronda 3 (proteína 5µg/ml; 10^{10} pfu).

De la titulación de los fagos amplificados a partir de la ronda 3 surgió una observación importante, al hallar placas de fagos blancas en mayor proporción de las esperadas, que son azules. A pesar de esto, se separaron 14 clonas azules de cada una de las rondas 2 y 3, mismas que se probaron en cuanto a su capacidad de unión al sobrenadante y a la toxina Cry1Aa mediante ELISA. El resultado de este ensayo expuso que las clonas seleccionadas unían de forma similar a ambas proteínas, denotando su carácter inespecífico. La figura 18 muestra 9 de las 28 clonas probadas.

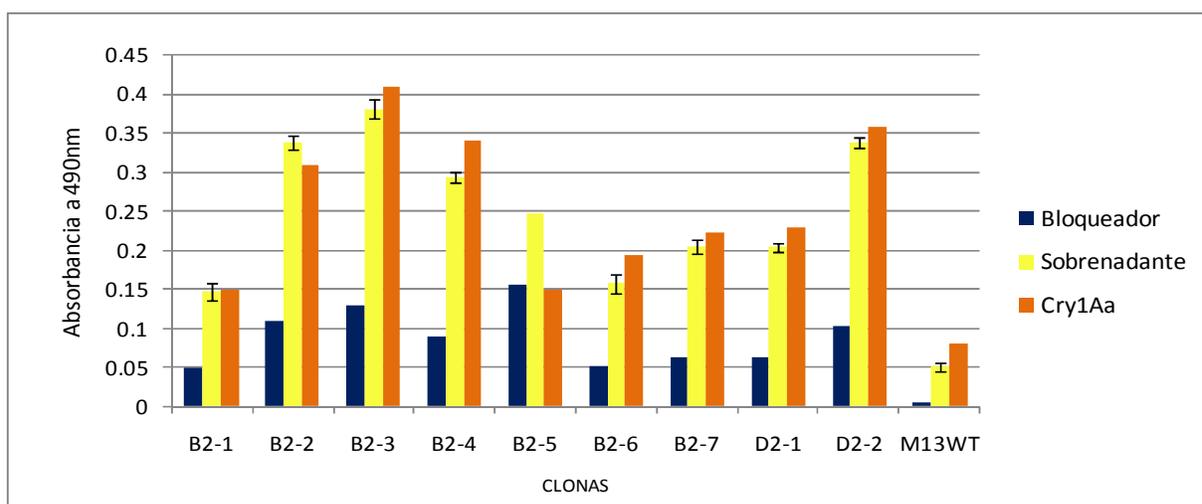


Figura 18. Unión de 9 clonas de fagos de la ronda 2 de selección en un ensayo de ELISA contra el sobrenadante, Cry1Aa y los pozos solo bloqueados (proteína: 5µg/ml, 10¹¹ pfu).

Selección de péptidos estructurados: FliTrx™

Al mismo tiempo llevamos a cabo la selección de péptidos estructurados utilizando la biblioteca FliTrx™ (Invitrogen), la cual despliega dodecapéptidos en el asa del sitio activo de la tiorredoxina y tiene una diversidad de $\sim 1.77 \times 10^8$ clonas primarias.

Antes de realizar el proceso de selección y siguiendo una recomendación del fabricante, se examinó el despliegue de la proteína de fusión FliC-TrxA (flagelina-tiorredoxina-dodecapéptido) en diferentes etapas de crecimiento del cultivo, posterior a su inducción con triptofano: en la fase logarítmica, al inicio de la fase estacionaria y en saturación. En un ensayo tipo Western blot (Figura 19) se corroboró el despliegue

empleando la biblioteca original no seleccionada y detectando la fusión con un anticuerpo anti-tiorredoxina (Anti-Thio™, Invitrogen). El resultado de este experimento demostró la expresión de una proteína de aprox. 63kDa correspondiente con el peso esperado de la fusión, por lo que se procedió con la selección.

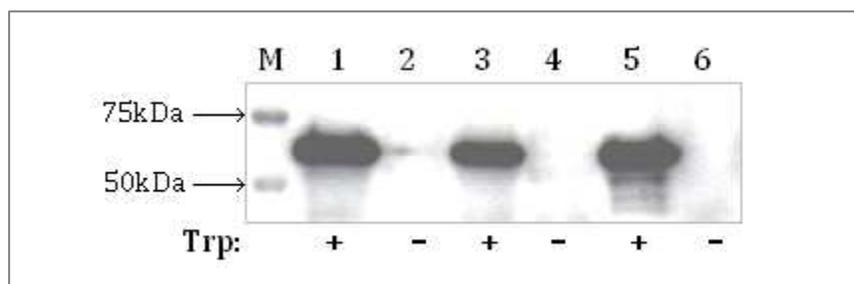


Figura 19. Detección de la proteína de fusión que contiene el dodecapéptido al azar en diferentes fases del cultivo inducido. M: marcador de peso molecular; 1-2: OD₆₀₀ 0.6; 3-4: OD₆₀₀ 1.5; 5-6: OD₆₀₀ 3.3; (+) cultivo inducido con Trp; (-) cultivo no inducido.

Una vez amplificada e inducida, la biblioteca FliTrx™ se utilizó para seleccionar péptidos capaces de unir a las proteínas del sobrenadante de las VMMA tratadas con PI-PLC, entre las cuales previamente demostramos la presencia de las proteínas receptoras de las toxinas Cry1A de nuestro interés: APN y ALP.

La selección de los péptidos se efectuó inmovilizando en inmunotubos las proteínas APN y ALP del sobrenadante, 150 µg para las 3 primeras rondas y 100 µg para la ronda 4.

Con la finalidad de monitorear el enriquecimiento de clonas positivas durante el proceso, se registraron los títulos de entrada y de salida, es decir el número de células empleadas en la selección y las eluidas. Al relacionar ambos datos, el resultado se expresó como porcentaje de células recuperadas (Figura 20).

Para confirmar este dato positivo de enriquecimiento calculado por recuperación de células en la elusión, se hizo un ELISA policlonal fijando 15µg/pozo de proteínas del sobrenadante a la placa (Figura 21). El resultado de este ensayo policlonal indicó una marcada disminución de la unión de las clonas de la tercera y cuarta ronda, aún por debajo de la unión de la biblioteca no seleccionada. Esto podría sugerir que hacia las

últimas rondas se enriquecieron clonas que no expresaban la proteína de fusión o bien clonas con péptidos de baja afinidad por las proteínas blanco.

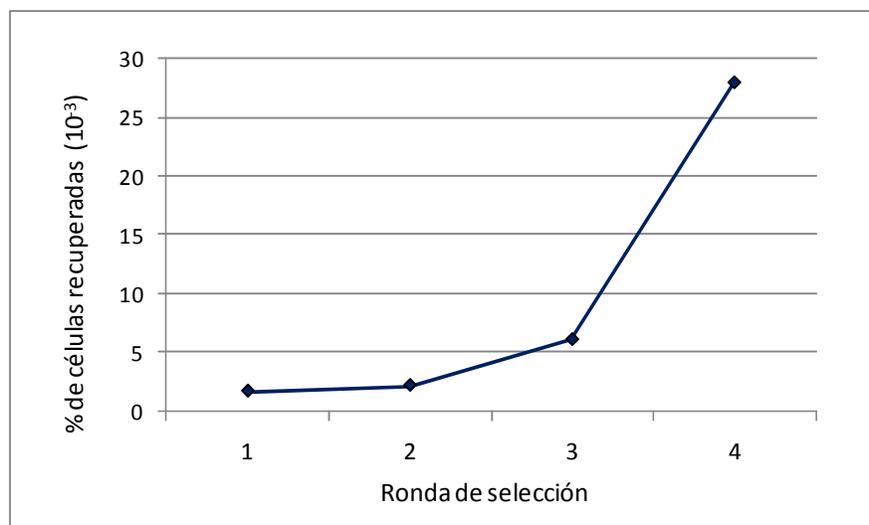


Figura 20. Enriquecimiento en el número de células eluidas en la selección de la biblioteca FliTrx™ contra sobrenadante, expresado como porcentaje del número de células de entrada.

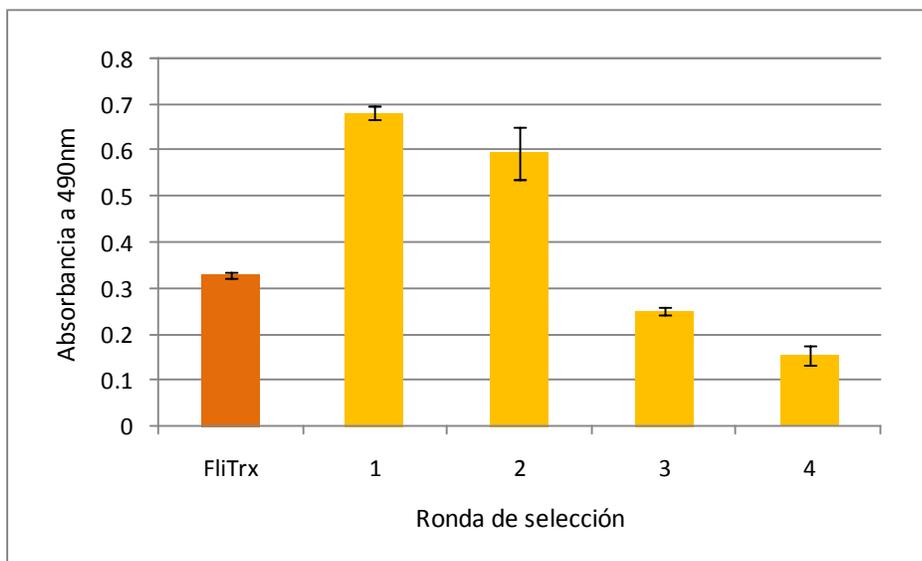


Figura 21. Ensayo de ELISA policlonal evaluando las 4 rondas de selección de la biblioteca FliTrx™ contra el sobrenadante.

Este resultado nos hizo repetir la tercera ronda intentando recuperar mejores clonas. Esta vez, se fijaron 75 μ g de proteínas del sobrenadante y se aumentó la

astringencia de la selección duplicando el número de lavados después de incubar la biblioteca en el inmunotubo.

Con base en el número de células eluidas, el enriquecimiento que se calculó para esta nueva ronda superó 3 veces al de la tercera ronda original, con porcentajes de recuperación de 18.5% versus 6.1%, principalmente debido a que se duplicó el tiempo de la elusión mecánica en el vórtex.

Nuevamente, se examinó la afinidad de las clonas seleccionadas por el sobrenadante mediante un ELISA policlonal (Figura 22), encontrando un descenso en la unión en la tercera ronda al igual que en la selección original.

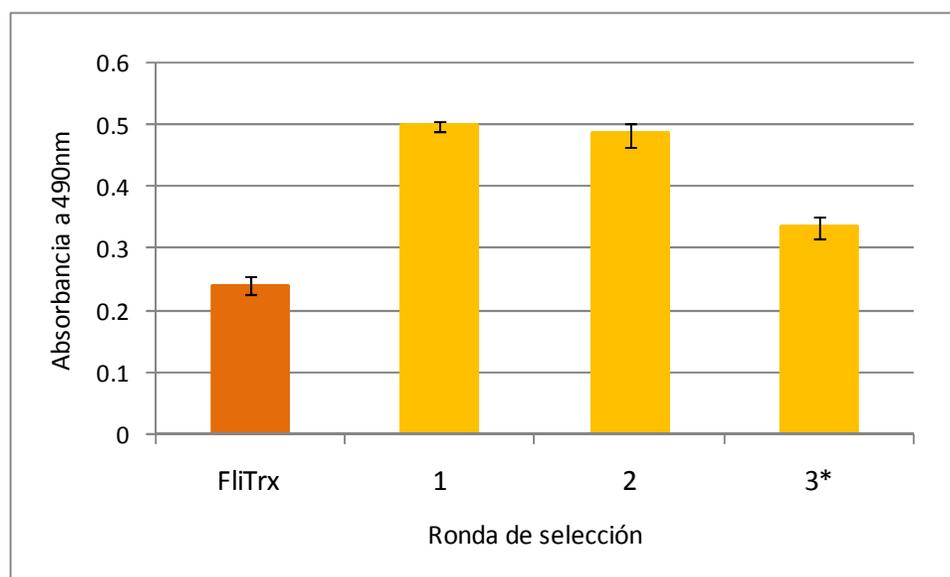


Figura 22. Ensayo de ELISA policlonal evaluando la nueva tercera ronda de selección (3*) de la biblioteca FliTrx™ contra el sobrenadante.

La respuesta a este fenómeno, en el cual el enriquecimiento es positivo pero la afinidad de las clonas disminuye, se encontró al analizar el proceso de selección. Al verificar en Western blot (Figura 23) el despliegue policlonal de la proteína de fusión en las 4 rondas de la primera selección, se observó una pérdida de señal conforme lo hizo la unión del ELISA (Figura 21). Esto indicó que hacia el final del proceso (cuarta ronda) se enriquecieron clonas que no expresan la proteína de fusión FliC-TrxA, la cual se detecta con el mismo anticuerpo en ambos ensayos.

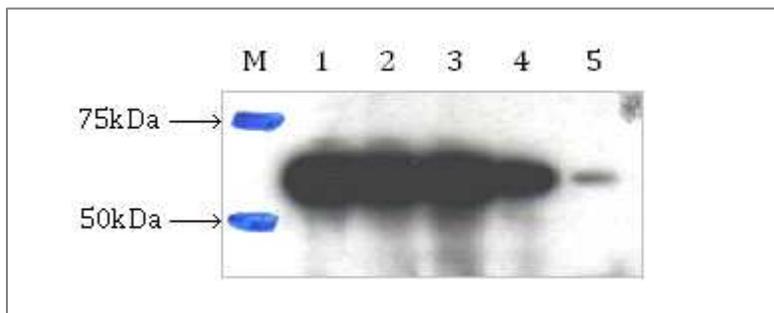


Figura 23. Expresión de la proteína de fusión con el dodecapéptido en la biblioteca FliTrx™ no seleccionada y después de 4 rondas de selección. M: marcador de peso molecular; 1: FliTrx™ no seleccionada; 2: Ronda1; 3: Ronda 2; 4: Ronda 3; 5: Ronda 4. (Mismo número de células)

La expresión de la proteína de fusión se analizó en un ensayo tipo Western blot luego de inducir las, ahora en formato monoclonal, tomando al azar 52 clones de la segunda ronda, en la cual la expresión fue apreciable y la unión a las proteínas del sobrenadante fue la máxima. Las clones de esta ronda unieron en el ELISA policlonal a la proteína blanco correctamente, no obstante se encontró que el 46% de las clones analizadas no expresaron la proteína de fusión (Figura 24).

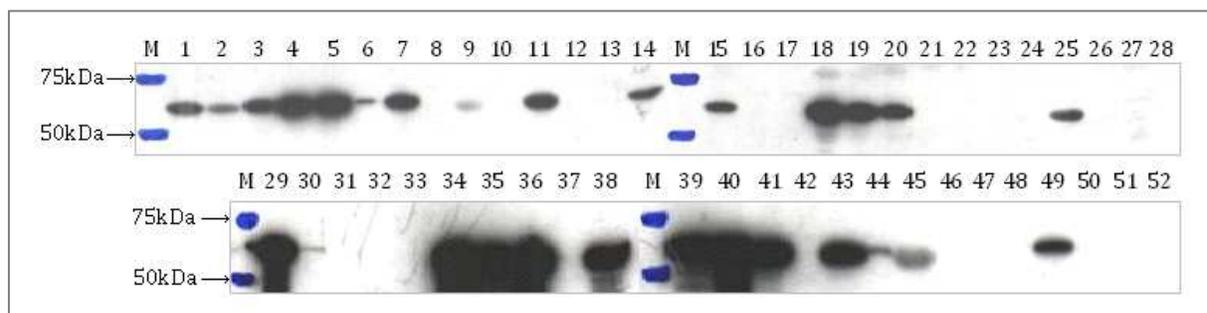


Figura 24. Detección de la fusión FliC-TrxA en 52 clones de la segunda ronda de selección. M: marcador de peso molecular; 1-52: clones FliTrx1-52.

Las clones positivas en cuanto a expresión de la fusión, se aislaron y examinaron entonces en cuanto a su capacidad de unir al sobrenadante mediante un ELISA, y se encontraron tres clones con valores de absorbancia superior a 1: las clones denominadas Z4, Z5 y Z38 (Figura 25). De forma general, todas las clones que se ensayaron tuvieron un valor despreciable de unión al bloqueador que se usó durante la selección.

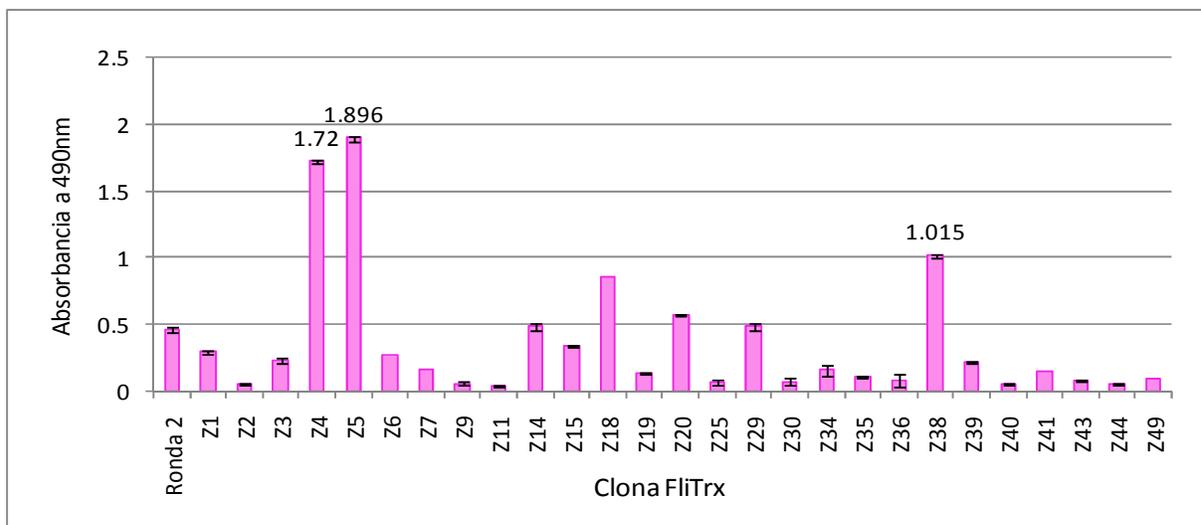


Figura 25. Unión de clonas de la Ronda 2 al sobrenadante en ELISA.

De la misma forma, en un ensayo de ELISA se probaron 48 clonas más de la ronda 2 y 48 de la ronda 3* en busca de otras clonas que unieran específicamente al sobrenadante. En esta ocasión las clonas se amplificaron e indujeron en caja de cultivo de 96 pozos, por lo que no se hizo la cuantificación de células de los cultivos inducidos. La Figura 26 muestran sólo aquellas que obtuvieron valores de absorbancia significativos, y el valor escrito de las que fueron seleccionadas: A2, B2, C9, E5, E10, G1 y H5.

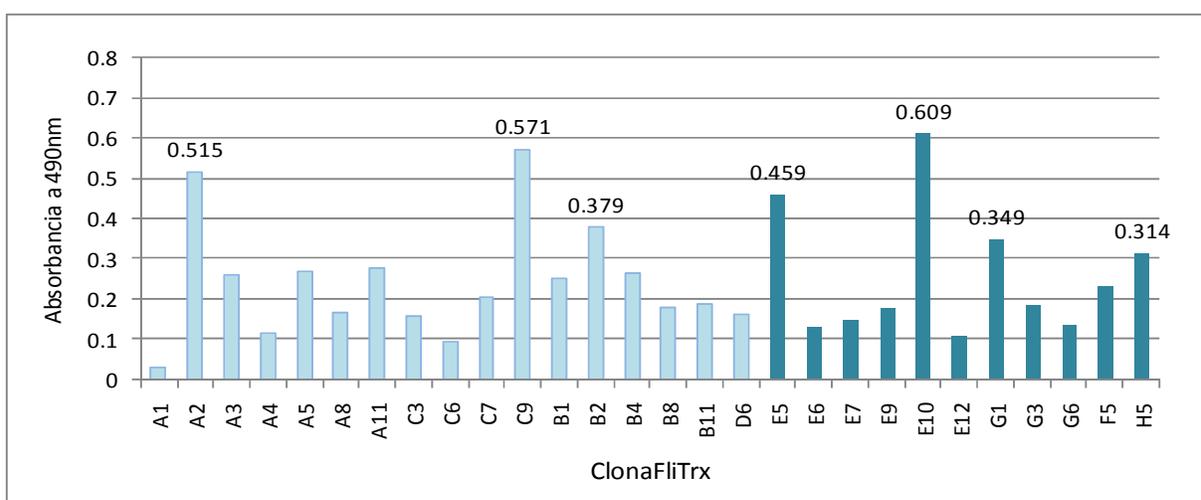


Figura 26. Unión de clonas de las Rondas 2 y 3* al sobrenadante en ELISA. Clonas de la ronda 2: A-D; clonas de la ronda 3: E-H.

A pesar de la escasa probabilidad de encontrar alguna clona enriquecida por tratarse de clonas de las primeras rondas de selección, se obtuvieron las secuencias de los péptidos para evitar trabajar posteriormente con clonas repetidas. Se purificó el ADN plasmídico de las 10 clonas seleccionadas y se secuenció con el oligonucleótido cebador directo FliTrx™ Forward Sequencing (5'-ATTACCTGACTGACGAC-3', Invitrogen). Se obtuvieron 9 secuencias correctas que codificaron para dodecapéptidos diferentes (Tabla 3), entre las cuales no se encontró una secuencia consenso cuando se examinaron con el programa ClustalW.

Antes de diseñar ensayos de competencia con la toxina Cry1Aa (en su conformación de oligómero) por la unión a los receptores APN y ALP, empleando las clonas que se aislaron, se realizó un ensayo de especificidad en ELISA, ya que previamente los péptidos que se seleccionaron de la biblioteca de fagos reconocieron de manera inespecífica tanto a la toxina Cry1Aa como a las proteínas presentes en el sobrenadante haciendo imposible cualquier caracterización de los mismos.

Tabla 3. Secuencia de clonas FliTrx™ seleccionadas

Clona (Ronda)	Secuencia
A2 (R2)	C G P R S S A A P V G A D N K G P C
B2 (R2)	C G P V G Q P P E L L Q L N N G P C
C9 (R2)	C G P A V S L I R P I E R H M G P C
G1 (R3)	C G P E A K T S T L V A V E V G P C
H5 (R3)	C G P P M G G E A P A K A L G G P C
E5 (R3)	C G P S R V H S G D M G G R H G P C
Z5 (R2)	C G P G R G V G P G P G P D K G P C
Z38 (R2)	C G P R E V I A A R A R D N I G P C
Z4 (R2)	C G P K P A G G R V P V R V A G P C

En este experimento se ensayó la unión de las clonas a la toxina Cry1Aa, al sobrenadante y a los receptores APN y ALP purificados (los cuales fueron gentilmente donados por un estudiante de doctorado de nuestro grupo). Los resultados se presentan en la Figura 27, en la que es posible apreciar que ninguna de las clonas reconoció a la toxina Cry1Aa, y todas ellas unieron al sobrenadante, el cual utilizamos para su selección.

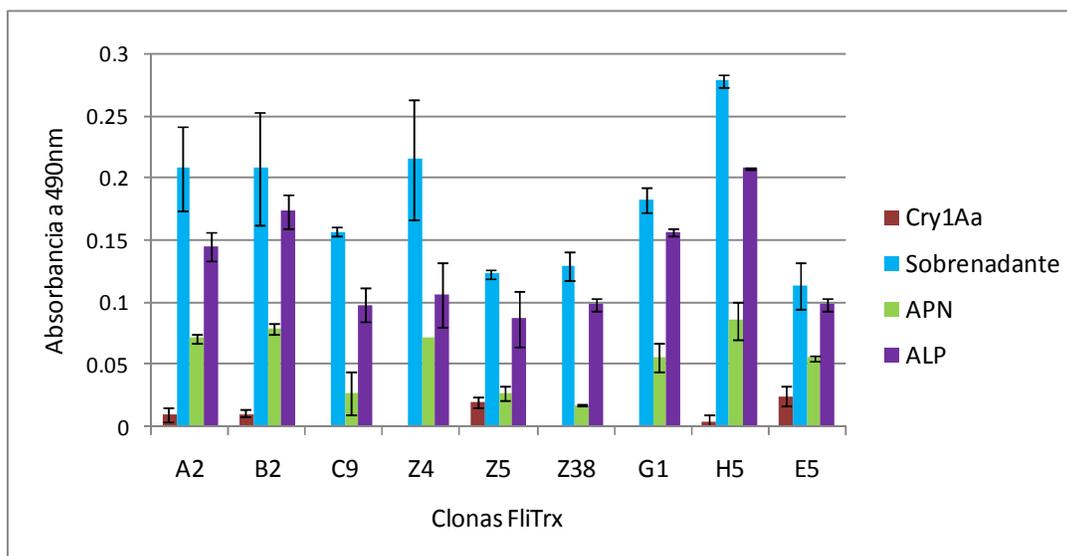


Figura 27. Unión en ELISA de 9 clonas seleccionadas (proteína: $1\mu\text{g/ml}$; $\sim 1.4 \times 10^9$ cels/ml).

También se observa que todas las clonas unen a la fosfatasa alcalina mejor que a la aminopeptidasa. Por ejemplo la unión de C9 y Z38 a ALP fue 3.6 y 5.6 veces mayor que la unión a APN, mientras que la unión de Z4 fue apenas 1.4 veces mayor para ALP.

Estos resultados nos dejan un conjunto de péptidos con interesantes posibilidades de competir la unión entre el oligómero de las toxinas Cry1A con el receptor ALP de *Manduca sexta*. De lograrlo, tales péptidos estarían sugiriendo el epítipo de la toxina en esta interacción.

DISCUSIÓN

Uno de los principales determinantes de especificidad de las toxinas Cry producidas por Bt es su interacción con receptores específicos presentes en el intestino medio de los insectos susceptibles (Jenkins y Dean, 2000). La identificación y caracterización de estos receptores es fundamental en la investigación referente al mecanismo de acción de estas toxinas y lo es también en el mecanismo molecular de resistencia a las toxinas Cry por parte de los insectos. Aún cuando numerosos estudios se han realizado aplicando diferentes tecnologías y metodologías, la identificación de los receptores funcionales de las toxinas Cry en el intestino de los insectos blanco todavía es incompleta (Pigott y Ellar, 2007).

En el caso de las toxinas Cry1A de *Bacillus thuringiensis* (Bt) se han identificado varias proteínas de unión en el epitelio intestinal de sus lepidópteros blanco, a las cuales nos referimos comúnmente como receptores. Estas proteínas incluyen a la aminopeptidasa N (APN), la fosfatasa alcalina (ALP) y una proteína tipo caderina (Pigott y Ellar, 2007).

El papel que desempeñan estas proteínas en el mecanismo de toxicidad se ha relacionado con la especificidad de las toxinas y la susceptibilidad de sus insectos blanco. A este respecto, la caderina de los lepidópteros no sólo se ha implicado como receptor por su correlación con cepas resistentes (Gahan *et al.*, 2001), sino porque la interacción entre la caderina de *Manduca sexta* (Bt-R₁) y las toxinas Cry1A está finamente caracterizada (Gómez *et al.*, 2002a, 2003; Hua *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005).

Acercas de los otros 2 receptores, desde 1994 un reporte de Sangadala *et al.* mostró que una mezcla de APN y ALP de *M. sexta* era capaz de aumentar en 35% la unión de la toxina Cry1Ac cuando se reconstituían en vesículas de fosfolípidos, reportando incluso una disminución en la actividad de la ALP por la interacción con la toxina. Posteriormente se volvieron a identificar APN y ALP en un análisis de proteómica de las proteínas de *M. sexta* que eran capaces de unir a Cry1Ac (McNall y Adang, 2003), y más

tarde se asoció la resistencia a Cry1Ac en una línea en *H. virescens* con niveles reducidos de ALP (Jurat-Fuentes y Adang, 2004).

Aunque hay más datos que refuerzan el papel de APN como receptor, los detalles de su interacción con las toxinas se conocen poco. Al principio de nuestro trabajo, sabíamos que el dominio III de las toxinas Cry1A era señalado fuertemente como responsable de la interacción con APN. En la toxina Cry1Aa, la unión a la APN de *Bombix mori* se había explicado por medio de las láminas $\beta 16$ y $\beta 22$ de su dominio III (Atsumi *et al.* 2005), y en un caso particular, la interacción de la toxina Cry1Ac con un motivo *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) de APN de *M. sexta*, apuntó a una cavidad presente también en el dominio III de la toxina (Lee *et al.*, 1999; Derbyshire *et al.*, 2001). Posteriormente, la lámina $\beta 16$ de la toxina Cry1Ab también se involucró en la interacción con APN de *M. sexta* (Gómez *et al.*, 2006).

Desafortunadamente la investigación en lepidópteros tocante a ALP es aún más limitada que la realizada con caderina o APN, y a pesar de que se sabe que une a las toxinas Cry1A, su papel como receptor funcional en la susceptibilidad de *M. sexta* a las toxinas aún no se esclarece.

Actualmente se propone un modelo de participación secuencial de las proteínas que unen a las toxinas Cry1A, en el cual se requiere la formación de un oligómero promovido por una primera interacción con caderina, para que suceda la inserción de la toxina en la membrana. Una vez formado, el oligómero es capaz de interactuar con proteínas localizadas en los microdominios de la membrana (lipid rafts) para insertarse. El modelo plantea que la segunda interacción de la toxina ocurre a través de APN (Bravo *et al.*, 2004b; Gómez *et al.*, 2006); no obstante, los microdominios de la membrana son regiones en las que también se localiza la ALP (Zhuang *et al.*, 2002), lo cual abre la posibilidad de la participación funcional de ALP en este modelo.

El presente trabajo se enfocó en la segunda interacción de la toxina Cry1Aa: la del oligómero con alguno de los receptores APN o ALP, en el contexto de *M. sexta*. A partir de dos bibliotecas comerciales que despliegan dodecapéptidos aleatorios, se diseñó una estrategia para aislar péptidos capaces de unir al receptor y de interferir su unión con la toxina, es decir, capaces de mimetizar algún epítipo en la toxina.

Una de las bibliotecas adquiridas despliega péptidos no estructurados en el fago M13 (Ph.D.-12™, New England BioLabs) y la otra despliega péptidos estructurados entre un par de cisteínas en la superficie de células de *E. coli* (FliTrx™, Invitrogen), pero ambas tienen como base la metodología descrita por Smith en 1985. En esta técnica, se fusionan secuencias de ADN que codifican para una biblioteca de péptidos en alguno de los genes que codifican para las proteínas de la cubierta de un bacteriófago. Cuando los fagos se ensamblan, exponen la proteína fusionada en su superficie, llamándose por esto péptidos desplegados en fagos.

En una variación de la metodología de Smith (1985), Lu *et al.* (1995) diseñaron un sistema en *E. coli*, en el cual el despliegue de los péptidos se realizó por medio de una proteína de fusión que incluye al péptido aleatorio, tiorredoxina y flagelina. La tiorredoxina ofrece la plataforma de su sitio activo para que el péptido se despliegue en forma de asa, mientras que la flagelina permite el correcto ensamble y la presentación en la superficie celular bacteriana. En estos sistemas, la mayor ventaja es la asociación entre el péptido y la secuencia de ADN que lo codifica.

Para realizar la selección de los péptidos requerimos inicialmente de los receptores APN y ALP de *M. sexta* como antígeno para inmovilizar. En este lepidóptero APN y ALP son proteínas de 120 y 65kDa, respectivamente y ambas están unidas a la membrana por un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI; Garczynski y Adang, 1995; McNall y Adang, 2003). Por esto, la primera parte de nuestra estrategia consistió en recuperar las proteínas ancladas por GPI a la microvellosidad intestinal de larvas de *M. sexta* y, mediante un tratamiento con fosfolipasa C (PI-PLC), obtenerlas de manera soluble. Al emplear esta fracción de proteínas reducimos el universo de proteínas blanco y también la posibilidad de recuperar péptidos contra otras proteínas, incluida la caderina. McNall y Adang (2003) en un trabajo con lepidópteros y Fernández *et al.* (2006) con dípteros, utilizaron precisamente esta fracción del proteoma para identificar posibles receptores para las toxinas Cry1Ac y Cry11Aa, respectivamente.

En el sobrenadante que recuperamos luego del tratamiento de VMMA con PI-PLC, se encontró una gran diversidad de proteínas (Figura 11), por lo que para dar seguimiento a las proteínas de nuestro interés se calculó el porcentaje de liberación de la actividad de APN y ALP al sobrenadante, midiendo las actividades específicas de ambas

enzimas. Obtuvimos un sobrenadante con el 35% de la actividad de APN y el 85% de la actividad de ALP, y como puede observarse en la Tabla 2 el resto de la actividad quedó en la pastilla de VMMA. En 1995, Knight *et al.* reportaron la liberación del $16\pm 0.4\%$ de la actividad total de APN y del $83.5\pm 2.6\%$ de la actividad de ALP al sobrenadante también a partir de VMMA de *M. sexta*, argumentando que sólo una porción de las enzimas se encontraban unidas a la membrana por medio de este tipo de anclaje.

También dimos seguimiento a ambos receptores mediante experimentos de unión de ligando con la toxina Cry1Aa, una metodología ya estandarizada para identificar a las proteínas que unen a las toxinas Cry por su peso molecular (Gómez *et al.*, 2001). Como se muestra en la Figura 12, la unión de la toxina fue preferente por dos proteínas en el sobrenadante, con pesos similares a los ya reportados para APN (120kDa) y ALP (65kDa); aunque cabe notar que en SDS-PAGE, la migración de la APN en el sobrenadante difiere de la banda que se observa en las VMMA o la pastilla debido al corte del ancla de GPI (McNall y Adang, 2003).

Como siguiente paso, unimos la toxina Cry1Aa a las proteínas del sobrenadante y a las VMMA en su forma nativa en un ensayo de ELISA. Los resultados nos indicaron que la exposición de los epítopes en los receptores inmovilizados era correcta, pues la toxina se unió exitosamente. Esto nos dio la certeza de inmovilizar en las mismas condiciones las proteínas del sobrenadante para la selección de los péptidos. Pero los resultados de los ensayos de ELISA dieron más información que esto.

Encontramos que la unión del monómero a las VMMA fue mayor que al sobrenadante, como se observa en las Figuras 13 y 14, lo cual no fue sorprendente ya que en las VMMA se encuentra al menos otro receptor para la toxina: la caderina. Este receptor, que no está anclado por GPI, tiene una alta afinidad por el monómero de la toxina Cry1Ab, que es casi 100 veces mayor que la afinidad calculada entre el monómero de Cry1Ac y una mezcla de APN y ALP (Vadlamudi *et al.*, 1993; Sangadala *et al.*, 1994). Estos datos son respaldados por experimentos de co-precipitación en los cuales se encontró que el receptor caderina de *M. sexta* interaccionó preferencialmente con el monómero de la toxina Cry1Ab, no así con el oligómero (Bravo *et al.*, 2004b). Por su parte, la unión del oligómero fue casi igual para las VMMA y el sobrenadante (Figura 14).

Desafortunadamente en ambas fracciones se encuentran receptores para el oligómero y no medimos la concentración real de cada uno de los ellos para un análisis cuantitativo.

Quizá la diferencia más notoria y relevante para nuestro estudio se encontró entre las uniones del oligómero y el monómero. El oligómero sobrepasó casi 10 veces la unión del monómero al sobrenadante (Figura 14). Este último dato coincide con una determinación previa de la unión de monómero y oligómero de Cry1Ab a un extracto rico en APN. Mediante un ensayo de ELISA competitivo Bravo *et al.* (2004b) calcularon una K_D aparente de 165nM para el monómero contra un valor de 0.75nM para el oligómero, evidenciando la mayor afinidad que tiene el oligómero por las proteínas presentes en ese extracto. Además, en un experimento de co-precipitación con el oligómero de Cry1Ab se demostró la interacción de esa conformación de la toxina con el receptor APN preferencialmente sobre la caderina (Bravo *et al.*, 2004b).

Los resultados obtenidos del análisis al sobrenadante nos permitieron concluir que contábamos con un grupo de proteínas que unían preferencialmente al oligómero, y que entre ellas estaban incluidos los receptores APN y ALP. Sobre esta fracción del proteoma se realizó entonces la selección de péptidos.

La biblioteca Ph.D.-12TM de péptidos no estructurados se ha utilizado en varios ámbitos satisfactoriamente. En el campo de *Bacillus thuringiensis*, a partir de la misma biblioteca, Fernández *et al.* (2006) identificaron un péptido capaz de unir al receptor de la toxina Cry11Aa en *Aedes aegypti* y de interferir la interacción de la toxina al receptor. En nuestro trabajo, diseñamos dos experimentos secuenciales con esta biblioteca, obteniendo resultados negativos.

En el primer experimento se registró la fracción de fagos eluidos como un indicador del enriquecimiento de clonas positivas, y se obtuvieron valores que aumentaron 3 órdenes de magnitud a lo largo de 5 rondas. Estas clonas no unían la superficie plástica y tampoco al agente bloqueador (BSA) por lo que se consideraron en algún momento positivas (Figura 15). No obstante al analizar las clonas en un ensayo de ELISA contra la toxina Cry1Aa, que posteriormente sería utilizada como su competidor, se reveló su inespecificidad. En la Figura 16 se observa sólo la unión de Ph13 y Ph14 al sobrenadante y la toxina, sin embargo otras clonas también se ensayaron obteniendo el mismo resultado (datos no mostrados). Estos resultados solo pusieron de manifiesto que

un enriquecimiento satisfactorio en los fagos recuperados no es sinónimo obligado de clonas positivas, específicas o de alta afinidad, como había sido reportado por de Bruin *et al.*, 1999.

Durante la segunda selección se hicieron modificaciones al proceso esperando que se reflejaran en clonas positivas. No obstante, los resultados no fueron mejores. En esta ocasión, la fracción de recuperación de los fagos se mantuvo a lo largo de las 3 rondas (quizá debido al lavado exhaustivo), por lo que se hizo un ELISA policlonal que nos diera información de las características de las clonas. Como lo muestra la Figura 17, más del 60% de los fagos unió inespecíficamente a la toxina, y al hacer un ensayo monoclonal este resultado se hizo más evidente (Figura 18).

Al amplificar la tercera ronda de esta selección se encontraron placas blancas de fagos. La explicación más común de su presencia sería que los fagos de la biblioteca se contaminaron durante la selección o la amplificación con fagos silvestres del ambiente. Ya que los péptidos se encuentran fusionados a la proteína pIII, la infectividad de los fagos de la biblioteca se ve ligeramente atenuada respecto a los fagos silvestres, por lo que aún niveles muy pequeños de fagos contaminantes resulta en su amplificación preferencial sobre los fagos de la biblioteca. Sin embargo, para hacer el ELISA monoclonal sólo seleccionamos placas azules, con el fenotipo de la biblioteca comercial, que además provenían también de la ronda 2.

Dado que en los dos experimentos de selección con la biblioteca Ph.D.-12TM sólo se obtuvieron clonas inespecíficas, puede ser probable que la secuencia de nuestro ligando específico no esté estadísticamente representado en esta biblioteca. Sustentando esta postura, la Figura 17 muestra que la biblioteca no seleccionada (que se recuperó después de la primera ronda) cuando se retó contra las proteínas blanco, se unió en una proporción similar a la unión del fago silvestre (Figura 16). En consecuencia, podemos asumir que la biblioteca Ph.D.-12TM no contiene clonas que unan específicamente y/o con alta afinidad a las proteínas APN y ALP.

A diferencia de las bibliotecas estructuradas con péptidos conformacionalmente limitados en una unión covalente por un puente disulfuro, las secuencias lineales de aminoácidos pueden unirse débilmente a su ligando debido a las distintas conformaciones que pueden adoptar los péptidos. En 2003, Huang *et al.* en un trabajo

para obtener péptidos inhibidores de la enzima ACE2, siguieron 2 estrategias al igual que en nuestro caso. Una de ellas incluía las bibliotecas de péptidos lineales Ph.D.-7 y Ph.D.-12 (New England BioLabs) con 7 y 12 residuos variables, respectivamente. Para la otra estrategia, construyeron 6 bibliotecas de péptidos estructurados desplegados también en el fago M13. Realizaron las selecciones bajo los mismos parámetros, incluso calcularon un enriquecimiento positivo al final de 3 rondas. Sin embargo en un ELISA monoclonal para la identificación de clonas que unieran ACE2, encontraron positivos al 32% de los fagos de las bibliotecas estructuradas y ninguno de las lineales. Nuestro caso podría ser similar al reportado y tratarse de un motivo que necesitara mantener cierta conformación para interactuar con su ligando.

Por esa posibilidad, parte de nuestra estrategia incluyó el uso de una biblioteca de péptidos estructurados desplegados en el flagelo de *E. coli* (FliTrx™), con la misma proteína blanco empleada para la selección con fagos.

Antes de iniciar el proceso de selección se comprobó la expresión de la proteína de fusión con el péptido mediante Western blot (Figura 19). La banda de ~63kDa en los cultivos inducidos corresponde al peso molecular reportado para la fusión FliC-TrxA (Xin *et al.*, 2004).

Durante el proceso de selección se dio seguimiento al enriquecimiento de células y a la unión policlonal en ELISA. A pesar del enriquecimiento positivo que se reportó como porcentaje de células recuperadas (Figura 20), los resultados del ELISA policlonal indicaron una disminución de la unión al sobrenadante en la tercera y cuarta ronda (Figura 21), y en una nueva tercera ronda (Figura 22). Este dato en principio sugería que las clonas que se habían seleccionado podrían tener baja afinidad; pero un análisis de Western blot del despliegue de la proteína de fusión con igual número de células/muestra (Figura 23), mostró que la señal obtenida en las diferentes rondas decaía acorde a la señal del ELISA. Esto reveló que hacia el final del proceso se habían seleccionado clonas que no expresan la proteína de fusión FliC-TrxA. Esta hipótesis se aclaró cuando se identificó desde la ronda 2 que el 46% de las clonas no expresaban la fusión, como lo muestra la Figura 24.

Ya que la fusión FliC-TrxA se encuentra codificada en el plásmido pFliTrx™, cuya presencia en la biblioteca le confiere resistencia a la ampicilina empleada en el medio de

propagación e inducción, según estos resultados algunas clonas de la biblioteca se pudieron haber transformado con plásmidos que no adoptaron o eliminaron el inserto de la biblioteca de péptidos. Sin embargo, para asegurar esto se debería extraer y analizar el plásmido de tales clonas. Cualquiera que fuera su origen, la existencia de algunas clonas que no expresaban la proteína FliC-TrxA desde las primeras rondas pudo resultar en el enriquecimiento de éstas sobre las que expresaban correctamente la fusión, por una ventaja en el consumo energético.

Cuando Lu *et al.* (1995) dieron a conocer la construcción de la biblioteca FliTrx™ tuvieron un problema de este tipo, algunas clonas que expresaban fimbrias en su superficie se unieron también a su antígeno y eventualmente se enriquecieron. Las fimbrias que *E. coli* utiliza para adherirse al epitelio intestinal se unen a carbohidratos complejos presentes en algunas glicoproteínas, por lo que resolvieron el problema utilizando α -metil manósido durante la selección y en los lavados. En nuestro trabajo, omitimos el uso de α -metil manósido y por ello es probable que se hayan enriquecido clonas fimbriadas sin proteína de fusión. Sabemos que las proteínas de nuestro interés APN o ALP se encuentran glicosiladas y al menos para la interacción de APN con toxina Cry1Ac esto es importante (Lee *et al.*, 1999), por lo que la presencia del α -metil manósido podría interferir en alguna interacción específica de los péptidos desplegados.

Dejando de lado las clonas que no expresaban la fusión, los ensayos de ELISA monoclonal con las clonas positivas en expresión de las rondas 2 y 3 (Figuras 25 y 26) nos permitieron aislar 9 clonas específicas para nuestro sobrenadante, que despliegan péptidos con secuencias diferentes.

Las secuencias de las clonas seleccionadas fueron analizadas con el programa ClustalW y comparadas con la toxina Cry1Aa. El alineamiento no mostró una secuencia consenso que nos diera indicios de que representan un mismo epítotope en la toxina. Sin embargo, cuando estas clonas se retaron contra los receptores APN y ALP purificados en un ensayo de ELISA (Figura 27) todas ellas unieron preferencialmente (aunque en diferentes proporciones) a ALP; y esto, sin que la unión por APN fuera despreciable en la mayoría de ellas.

La falta de una secuencia consenso no representa un problema ya que en muchos trabajos con esta biblioteca, la secuencia consenso ha surgido a partir del alineamiento

de varias decenas de secuencias. En uno de los casos, después de 5 rondas de selección y 100 clonas analizadas no se encontró una secuencia predominante; sin embargo, cuando se analizaron las características químicas de los aminoácidos, surgió un motivo predominante y funcional (Brown *et al.*, 2000).

Ya que 6 de las clonas provienen de la ronda 2, por el momento sólo se podría especular si nuestras clonas serían las que se hubieran enriquecido en rondas posteriores por su afinidad. Las rondas de selección enriquecen los péptidos más afines, pero también sabemos que es posible encontrar los aminoácidos críticos para una interacción aún desde las primeras rondas, con el posterior enriquecimiento de otros residuos estructuralmente importantes hacia las últimas rondas (Lombardi *et al.*, 1998).

De cualquier forma, la biblioteca FliTrxTM utiliza un despliegue multivalente en el que la proteína de fusión puede representar entre 10-20% de la proteína total de la célula. Además el paso de elusión de las células, que involucra un proceso físico de rompimiento de los flagelos, es independiente de la fuerza de unión del péptido, por lo que la afinidad de los péptidos seleccionados puede variar en un rango amplio, dependiendo de la capacidad de la célula para ensamblar la fusión FliC-TrxA en flagelos funcionales (Lu *et al.*, 1995). Por esta razón, el efecto de la valencia en la unión se elimina utilizando péptidos cíclicos o una fusión de la tiorredoxina con el péptido seleccionado.

La relevancia de los 9 péptidos estructurados se hará evidente sólo hasta que se realicen los ensayos de competencia con el oligómero de la toxina, que permitan discriminar las clonas que mimetizan la interacción toxina-receptor, de las que no. Una vez precisado esto, se analizarán las clonas positivas para asociar la secuencia del péptido con alguna región en la toxina.

CONCLUSIONES

- ◆ El tratamiento de las VMMA de *M. sexta* con fosfolipasa C nos permitió recuperar un extracto de las proteínas ancladas por GPI a la microvellosidad intestinal. En éste, demostramos el enriquecimiento de APN y ALP mediante ensayos de actividad enzimática y en experimentos de unión a ligando con la proteína Cry1Aa.
- ◆ Las proteínas ancladas por GPI de nuestro extracto unieron preferencialmente al oligómero respecto al monómero de la misma toxina, esto en condiciones nativas.
- ◆ Tamizamos una biblioteca comercial de péptidos lineales desplegados en el bacteriófago M13 (Ph.D.-12™) contra el extracto de proteínas ancladas por GPI, obteniendo (en dos estrategias de selección) clonas inespecíficas.
- ◆ Empleando el mismo extracto, tamizamos también una biblioteca comercial de péptidos estructurados desplegados en el flagelo bacteriano (FliTrx™), aislando finalmente 9 clonas específicas contra las proteínas ancladas por GPI que además unieron preferencialmente a la proteína ALP purificada.
- ◆ Las clonas seleccionadas son herramientas que nos permitirán estudiar la interacción del oligómero de las toxinas Cry1A con los receptores anclados por GPI: APN y ALP.

PERSPECTIVAS

- ◆ Caracterizar las clonas FliTrx™ en cuanto a su capacidad de competir la unión del oligómero de la toxina Cry1Aa con los receptores APN y ALP.
- ◆ Realizar ensayos de competencia *in vitro* con péptidos sintéticos estructurados, correspondientes a las clonas capaces de competir la unión antes mencionada.
- ◆ Caracterizar el efecto de los péptidos sintéticos en la toxicidad de la toxina Cry1Aa contra larvas de *Manduca sexta*.

BIBLIOGRAFÍA

- Agaisse, H. y D. Lereclus. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? J. Bacteriol. 177:6027-6032.
- Atsumi, S., E. Mizuno, H. Hara, K. Nakanishi, M. Kitami, N. Miura, H. Tabunoki, A. Watanabe y R. Sato. 2005. Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N Type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. Appl. Environ. Microbiol. 71(7):3966-3977.
- Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar y J. Li. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. J. Mol. Biol. 348(2):363-382.
- Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat y J. Lescar. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.8-Angstrom resolution. J. Bacteriol. Vol. 188. No. 9. 3391-3401.
- Bravo, A., S. S. Gill y M. Soberón. 2004a. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use. En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I., K. Iatrou y S. S. Gill (Eds.) ELSEVIER. © 2005 Elsevier BV, p.p. 175-206
- Bravo, A., I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. S. Gill y M. Soberón. 2004b. 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.
- Brown, C. K., R. A. Modzelewski, C. S. Johnson y M. K. K. Wong. 2000. A novel approach for the identification of unique tumor vasculature binding peptides using an *E. coli* peptide display library. Annals of Surgical Oncology. 7(10):743-749.
- Burton, S. L., D. J. Ellar, J. Li y D. J. Derbyshire. 1999. N-acetilgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. J. Mol. Biol. 287:1011-1022.
- de Bruin, R., K. Spelt, J. Mol, R. Koes y F. Quattrocchio. 1999. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. Nature Biotechnology. 17:397-399.
- de Maagd, R. A., M. Weemen-Hendriks, W. Stiekema y D. Bosch. 2000. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specific determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. Appl. Environ. Microbiol. 66:1559-1563.
- Derbyshire, D. J., D. J. Ellar y J. Li. 2001. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. Acta Crystallogr. Sect. D. 57:1938-1944.

- Fernández, L. E., K. G. Aimanova, S. S. Gill, A. Bravo y M. Soberón. 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal*. 394:77-84
- Ferre, J. y J. Van Rie. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Reviews*. 47:501-533.
- Gahan, L. J., F. Gould y D. H. Heckel. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*. 293:857-860.
- Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, G. Ghosh, J. R. Lutf, W. Pangborn y L. English. 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallografy*. 57:1101-1109.
- Garczynski, S. F. y M. J. Adang. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) δ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. *Insect Biochem Mol Biol* 25:409-415.
- Gill, M. y D. Ellar. 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Ins. Mol. Biol.* 11:619-625.
- Gómez, I., D. I. Oltean, S. S. Gill, A. Bravo y M. Soberón. 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J. Biol. Chem.* 276(31):28906-28912.
- Gómez, I., J. Miranda-Rios, E. Rudiño-Piñera, D. I. Oltean, S. S. Gill, A. Bravo y M. Soberón. 2002a. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope ⁸⁶⁹HITDTNNK⁸⁷⁶ in *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor with loop 2 of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* 277, 30137-30143.
- Gómez, I., J. Sánchez, R. Miranda, A. Bravo y M. Soberón. 2002b. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of hélix α -1 in domain and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett* 513:242-246.
- Gómez, I., D. H. Dean, A. Bravo y M. Soberón. 2003. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* BtR₁ receptor interact with loop alpha-8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin. *Biochemistry* 42(35):10482-10489.
- Gómez, I., I. Arenas, I. Benítez, J. Miranda-Ríos, B. Becerril, R. Grande, J. C. Almagro, A. Bravo y M. Soberón. 2006. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J. Mol. Biol.* 281(45):34032-34039.
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau y M. Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254:447-464.

- Herrero, S., J. González-Cabrera, J. Ferré, P. L. Bakker y R. A. de Maagd. 2004. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem. J.* 384(3):507-513.
- Höfte, P., y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Hua, G., J. L. Jurat-Fuentes y M. J. Adang. 2004. Bt-R_{1a} extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and toxicity. *J. Mol. Chem.* 279:28051-28056.
- Huang, L., D. J. Sexton, K. Skogerson, M. Devlin, R. Smith, I. Sanyal, T. Parry, R. Kent, J. Enright, Q-l. Wu, G. Conley, D. DeOliveira, L. Morganelli, M. Ducar, C. R. Wescott y R. C. Ladner. 2003. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 278(18):15532-15540.
- Jenkins, J. L. y D. H. Dean. 2000. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. *En: Genetic Engineering: principles and methods.* Setlow, K. (Ed.) Plenum Press, New York, vol. 22, p.p. 33-54.
- Jenkins, J. L., M. K. Lee, A. P. Valaitis, A. Curtiss y D. H. Dean. 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Mol. Chem.* 275:14423-14431.
- Jurat-Fuentes, J. L. y M. J. Adang. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* 271:3127-3135.
- Knight, P. J. K., B. H. Knowles y D. J. Ellar. 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. Biol. Chem.* 270(30):17765-17770.
- Kuwajima, G. 1988. Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170(7):3305-3309.
- Lee, M. K., T. H. You, F. L. Gould y D. H. Dean. 1999. Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4513-4520.
- Lee, M. K., F. Rajamohan, J. L. Jenkins, A. Curtiss y D. H. Dean. 2000. Role of two arginine residues in domain II, loop 2 of Cry1Ab and Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 38:289-298.
- Lee, M. K., J. L. Jenkins, T. H. You, A. Curtiss, J. J. Son, M. J. Adang y D. H. Dean. 2001. Mutations at the arginine residues in alpha 8 loop of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *FEBS Lett.* 497:108-112.
- Lereclus, D., O. Arantes, J. Chaufaux y M. M. Lecadet. 1989. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60:211-218.
- Li, J., J. Carroll y D. J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815-821.

- Liu, X. S. y D. H. Dean. 2006. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein Engineering Design and Selection*. 19(3):107-111.
- Lombardi, S. J., A. Truong, P. Spence, K. J. Rhodes y P. G. Jones. 1998. Structure-activity relationships of the K_vβ1 inactivation domain and its putative receptor probed using peptide analogs of voltage-gated potassium channel α- and β-subunits. *J. Biol. Chem.* 273(46):30092-30096.
- Lu, Z., K. S. Murray, V. Van Cleave, E. R. LaVallie, M. L. Stahl y J. M. McCoy. 1995. Expression of thioredoxin random peptide libraries on the *Escherichia coli* cell surface as functional fusions of flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions. *Biotechnology* 13:366-372.
- Luzzago, A., F. Felici, A. Tramontano, A. Pessi y R. Cortese. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* 128:51-57.
- McNall, R. J. y M. J. Adang. 2003. Identification of a novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33(10):999-1010.
- Morse, R. J., T. Yamamoto y R. M. Stroud. 2001. Structure of Cry2Aa suggest an unexpected receptor binding epitope. *Structure*. 9:409-417.
- Nagamatsu, Y., T. Koike, K. Sasakik, A. Yoshimoto y Y. Furukawa. 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action fo the *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin. *FEBS Lett.* 460:385-390.
- Pigott, C. R. y D. J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(2):255-281
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhotra y R. K. Bhatnagar. 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establisehes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.* 277:46849-46851.
- Rajamohan, F., S.-R.A. Hussain, J. A. Cotrill, F. Gould y D. H. Dean. 1996a. Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ab δ-endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran insects. *J. Biol. Chem.* 271:25220-25226.
- Rajamohan, F., J. A. Cotrill, F. Gould y D. H. Dean. 1996b. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ-endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 271:2390-2396.
- Rajamohan, F., O. Alzate, J. A. Cotrill, A. Curtiss y D. H. Dean. 1996c. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14338-14343.
- Regis, L., S. B. da Silva y M. A. V. Melo-Santos. 2000. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 95(1):207-210.

- Sangadala, S., F. S. Walters, L. H. English y M. J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+$ - K^+ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* 269:10088-10092.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler y H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):775-806.
- Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display antigens on the virion surface. *Science.* 228(4705):1315-1317.
- Smith G. P. y V. A. Petrenko. 1997. Phage Display. *Chem. Rev.* 97:391-410.
- Vadlamudi, R. K., T. H. Ji y A. Bulla Jr. 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* 268: 12334-12340.
- Wolfersberger, M., P. Lüthy, A. Maurer, P. Parenti, F. V. Sacchi, B. Giordana y G. M. Hanozet. 1987. Preparation of brush border membrane vesicles (BBMV) from larval Lepidopteran midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A:301-308.
- Wu, S.-J. y D. H. Dean. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII A δ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* 255:628-640.
- Xie, R., M. Zhuang, L. S. Ross, I. Gómez, D. I. Olteans, A. Bravo, M. Soberón y S. S. Gill. 2005. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affects its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* 280(9):8416-8425.
- Xin, Z.-T., C. Liu, B. Dong, Y.-P. Gao, N.-S. Shao, W. Liu, J. Zhang, J. Dong, S.-G. Ling, Y.-N. Xue. 2004. A subtractive fluorescence-activated cell-sorting strategy to identify mimotopes of HBV-preS protein from bacterial displayed peptide library. *J. Immunobiological Methods.* 293:13-21.
- Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, R. Taussig y L. A. Bulla, Jr. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *PNAS.* 103(26):9897-9902.
- Zhuang, M., D. I. Oltean, I. Gómez, A. K. Pullikuth, M. Soberón, A. Bravo y S. S. Gill. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Mol. Chem.* 277:13863-13872.