



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Análisis del fenotipo de dominancia negativa  
presentado por algunas mutantes de la  
hélice  $\alpha$ -4 de las toxinas Cry1A”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:**

**LUIS ENRIQUE ZAVALA ROMERO**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MARÍA ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Hoja de datos del jurado.**

### 1. Datos del alumno

Zavala  
Romero  
Luis Enrique  
55 33 08 76 93  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
404099808

### 2. Datos del tutor

Dra.  
María Alejandra  
Bravo  
de la Parra

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
José Luis  
Puente  
García

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.  
Claudia  
Rodríguez  
Almazán

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Lorenzo  
Segovia  
Forcella.

### 6. Datos del sinodal 4

Dr.  
Enrique  
Merino  
Pérez.

### 7. Datos del trabajo escrito

Análisis del fenotipo de dominancia negativa presentado por algunas mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de las toxinas Cry1A.  
94 p  
2010



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Análisis del fenotipo de dominancia negativa presentado por algunas mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de las toxinas Cry1A**

realizado por **Zavala Romero Luis Enrique** con número de cuenta **4-0409980-8** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. José Luis Puente García

Propietario Dra. Claudia Rodríguez Almazán

Propietario Dra. María Alejandra Bravo De la Parra  
Tutora

Suplente Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Suplente Dr. Enrique Merino Pérez

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 26 de mayo de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del **Instituto de Biotecnología** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, bajo la dirección de la **Dra. María Alejandra Bravo de la Parra**.

***Dedico este trabajo:***

*A mi madre, la Sra. María Concepción Romero y a mi padre, el Sr. Telésforo Zavala. Ambos son un gran ejemplo a seguir para mí y me han enseñado, con base en sus acciones, a ser perseverante, a fijarme nuevas metas y a cumplir con mis objetivos. Muchas gracias por todas las enseñanzas, los consejos y sobre todo por brindarme su cariño y apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida. Sin su respaldo nunca hubiera podido alcanzar esta meta. Los quiero mucho.*

*A mis hermanos: Victor, José, Jorge y Cecilia, de quienes siempre estoy aprendiendo tantas cosas buenas. Son uno de mis principales motores para seguir adelante y les agradezco por estar siempre a mi lado y brindarme su cariño en todo momento. Saben que los aprecio mucho.*

## **Agradezco:**

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y a sus dependencias, la Facultad de Ciencias y el Instituto de Biotecnología, por haberme brindado, la preparación académica, formación, espacio y los recursos necesarios para poder llevar a cavo este trabajo.*

*A la Dra. Alejandra Bravo, por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y por haber dedicado parte de su tiempo para el desarrollo y conclusión de esta tesis. La admiro mucho y es un ejemplo a seguir para mí.*

*Al Dr. Mario Soberón por sus sugerencias y aportes durante el desarrollo de este trabajo.*

*A mi familia: mis padres Telésforo Zavala y María Concepción Romero, a mis hermanos, Victor, José, Jorge y Cecilia. Gracias por brindarme su apoyo y cariño en todo momento. Son lo maspreciado que tengo en la vida y los quiero mucho.*

*Al Dr. José Luis Puente por dedicar parte de su tiempo para la coordinación del taller “La Biología a partir de las Biomoléculas” de la Facultad de Ciencias.*

*A la Dra. Claudia Rodríguez, por sus consejos, amistad y la ayuda brindada en la parte experimental necesaria para la conclusión de esta tesis. A la Dra. Claudia Pérez, por su amistad, paciencia y ambiente cordial durante la enseñanza de las diferentes técnicas de trabajo en el laboratorio. A la Dra. Nuria Jiménez por sus enseñanzas.*

*A las Dra. Liliana Pardo e Isabel Gómez por sus sugerencias y ayuda en la parte experimental.*

*A los integrantes del comité para la revisión de esta tesis: Dra. Alejandra Bravo, Dr. José Luis Puente, Dra. Claudia Rodríguez, Dr. Lorenzo Segovia y Dr. Enrique Merino, por sus valiosos comentarios.*

*Agradezco también a mis compañeros y amigos del laboratorio: En especial a Ramiro y Raquel por brindarse su amistad, buenos consejos y ánimos a lo largo de esta etapa de mi vida. A Josué, Daniela, Nato, Emiliano, Ángeles, Iván, Leivi, Sabino, Gladys, Biviana y Esmeralda, por los todos los buenos momentos compartidos.*

*A mis amigos de la Facultad de Ciencias: Lucero, Ana, Raúl y Marco, de quienes aprendí a tomar las cosas con tranquilidad. Gracias por los innumerables momentos agradables que pasamos juntos.*

*A Sergio, Jorge, Lizbeth y Graciela, por el apoyo técnico y administrativo proporcionado a lo largo de la realización de este trabajo.*

# ÍNDICE

## ÍNDICE DE FIGURAS

## ÍNDICE DE TABLAS

## ABREVIATURAS

## RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	1
1.2. Características de las toxinas producidas por <i>B. thuringiensis</i> .	1
1.3. Clasificación y nomenclatura de las $\delta$ -endotoxinas de <i>B. thuringiensis</i> .	3
1.4. Estructura de las proteínas Cry.	5
1.5. Mecanismo de acción de las proteínas Cry.	7
1.5.1. Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.	8
1.5.2. Unión al receptor.	9
1.5.3. Formación del preporo oligomérico.	11
1.5.4. Inserción en la membrana.	12
1.5.4.1. Modelos de inserción de la toxina en la membrana.	13
1.5.5. Citólisis.	14
<b>2. ANTECEDENTES PARTICULARES.</b>	<b>15</b>
2.1. Papel de las hélices $\alpha$ -3 y $\alpha$ -4 en el mecanismo de acción de las toxinas Cry.	15
2.1.1. Hélice $\alpha$ -4.	15
2.1.2. Hélice $\alpha$ -3.	18
2.2. Fenotipo de dominancia negativa presentado en la toxina del ántrax.	20

<b>3. JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS.</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS.</b>	<b>23</b>
5.1. Objetivos generales.	23
5.2. Objetivos particulares.	23
<b>6. MATERIALES.</b>	<b>24</b>
6.1. Cepas utilizadas.	24
6.2. Medios de cultivo.	24
<b>7. MÉTODOS.</b>	<b>27</b>
7.1. Purificación de las protoxinas Cry1Aa clonadas en <i>E. coli</i> .	27
7.2. Construcción de mutantes sitio dirigidas dentro del dominio I de la toxina Cry1Ab. Estrategia general.	27
7.2.1. Fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos.	29
7.2.2. Reacción de PCR mutagénico.	30
7.2.3. Transformación de las células electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5α.	30
7.2.4. Secuenciación.	31
7.2.5. Transformación de las células competentes de Ca <sup>2+</sup> de <i>E. coli</i> , SC110.	31
7.2.6. Transformación de las células de <i>B. thuringiensis</i> 407-.	32
7.3. Purificación de los cristales de la protoxina Cry1Ab silvestre y de las protoxinas mutantes del dominio I, expresadas en <i>B.thuringiensis</i> .	32
7.4. Cuantificación de la proteína.	33
7.5. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	33

7.6. Solubilización de la protoxina purificada y expresada en <i>E. coli</i> .	34
7.7. Solubilización de la protoxina purificada y expresada en <i>B.thuringiensis</i> .	34
7.8. Bioensayos sobre larvas de <i>M. sexta</i> .	35
7.9. Activación de la protoxina mediante proteólisis con tripsina.	35
7.10. Purificación del anticuerpo scFv73.	36
7.11. Ensayo de unión de la toxina al receptor caderina.	36
7.12. Oligomerización de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes de la hélice $\alpha$ -4.	37
7.13. Western Blot.	38
7.14. Ensayos de dominancia negativa.	38
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>40</b>
8.1. Mutantes sencillas de las hélices $\alpha$ -3 y $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Aa, expresadas en <i>E. coli</i> .	40
8.1.1. Análisis de la oligomerización y unión al receptor caderina de las mutantes de la toxina Cry1Aa clonadas en <i>E. coli</i> .	40
8.1.2. Análisis de la solubilización, activación y formación del oligómero de la toxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de <i>E. coli</i> .	41
8.1.2.1. Purificación de las protoxinas Cry1Aa.	41
8.1.2.2. Solubilización de la protoxina Cry1Aa silvestre.	42
8.1.2.3. Activación de la protoxina Cry1Aa silvestre.	43
8.1.2.4. Análisis de la formación de oligómero de la protoxina Cry1Aa silvestre.	45
8.1.3. Análisis de la solubilización, activación y formación del oligómero de las toxinas mutantes Cry1Aa purificadas a partir de <i>E. coli</i> .	47
8.1.3.1. Purificación de las protoxinas Cry1Aa mutantes.	47
8.1.3.2. Solubilización de las protoxinas Cry1Aa mutantes.	48

8.1.3.3. Activación de las protoxinas Cry1Aa mutantes.	48
8.1.3.4. Análisis de la formación del oligómero de las toxinas Cry1Aa mutantes.	50
8.2. Mutantes sencillas de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, expresadas y purificadas a partir de cultivos de <i>B. thuringiensis</i> .	52
8.2.1. Construcción de las mutantes dentro de la hélice $\alpha$ -4.	52
8.2.2. Purificación de las protoxinas mutantes de la hélice $\alpha$ -4, a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	53
8.2.3. Solubilización de las protoxinas mutantes de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	53
8.2.4. Análisis de la toxicidad de las protoxinas mutantes de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	54
8.2.5. Activación de las protoxinas mutantes de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	55
8.2.6. Análisis de la unión al receptor caderina de las mutantes no tóxicas de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de <i>B.thuringiensis</i> .	57
8.2.7. Análisis de la formación del oligómero de las mutantes de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	58
8.2.8. Análisis del fenotipo de dominancia negativa de las mutantes no tóxicas de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de <i>B.thuringiensis</i> .	61
8.3. Mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, expresadas y purificadas a partir de cultivos de <i>B. thuringiensis</i> .	64
8.3.1. Construcción y purificación de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cy1Ab.	64
8.3.2. Análisis de la toxicidad de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	65
8.3.3. Análisis de la solubilización, activación y formación del oligómero de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.	65
8.3.4. Análisis del fenotipo de dominancia negativa de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.	67

<b>9. CONCLUSIONES GENERALES.</b>	<b>73</b>
<b>10. ANEXOS.</b>	<b>74</b>
I. QuickChange® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).	74
II. Purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos en medio LB líquido.	74
III. Preparación de las células electro competentes de <i>E.coli</i> DH5α.	75
IV. Preparación de las células competentes de Ca <sup>2+</sup> de <i>E.coli</i> SC110.	76
V. Preparación de las células electrocompetentes de <i>B. thuringiensis</i> .	76
VI. Purificación de oligonucleótidos por PAGE.	77
VII. Preparación de los liposomas o PC-SUV (Small Unilamellar Vesicles of Phospatidyl Choline).	78
VIII. Método de obtención del jugo gástrico de <i>M. sexta</i> .	79
IX. Métodos de purificación de las toxinas Cry1A clonadas en <i>E.coli</i> y expresadas en cuerpos de inclusión dentro del citoplasma celular.	79
X. Artículo científico.	82
<b>10. REFERENCIAS.</b>	<b>89</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microfotografía de una cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopio electrónico de transmisión.	1
<b>Figura 2.</b> Estructura tridimensional de algunas proteínas insecticidas producidas por <i>B.thuringiensis</i> .	3
<b>Figura 3.</b> Filograma de identidad entre las secuencias Cry.	4
<b>Figura 4.</b> Estructura primaria y terciaria de las toxinas Cry.	6
<b>Figura 5.</b> Representación esquematizada del modo de acción propuesto en nuestro laboratorio para las toxinas Cry1A.	8
<b>Figura 6.</b> Longitud relativa de las protoxinas Cry y posición de los sitios de corte por las proteasas.	9
<b>Figura 7.</b> Moléculas receptoras de las proteínas Cry1A.	10
<b>Figura 8.</b> Modelos de inserción de las toxinas Cry en la membrana del intestino medio de los insectos susceptibles.	13
<b>Figura 9.</b> A) Conductancia en bicapas lipídicas planas de la toxina mutante D136C. B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de algunas de las toxinas Cry1.	16
<b>Figura 10.</b> Efecto de las mutaciones puntuales en los residuos de la hélice $\alpha$ -4 sobre la actividad de poro de la toxina.	17
<b>Figura 11.</b> Coiled-coils putativos en las toxinas Cry1Ab.	19
<b>Figura 12.</b> Análisis de la formación del oligómero de algunas mutantes de la toxina Cry1Ab mediante Western Blot.	20
<b>Figura 13.</b> Mecanismo de acción de la toxina del ántrax.	21
<b>Figura 14.</b> Vector pHT315Ab de aproximadamente 11.5 kB.	28
<b>Figura 15.</b> Estrategia general para la obtención de proteínas mutantes de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab expresadas en <i>B. thuringiensis</i> .	29
<b>Figura 16.</b> A) Lista de toxinas mutantes no tóxicas Cry1A clonadas en <i>E. coli</i> proporcionadas por Luke Masson. B) Plásmido pMP que contiene el gen completo para la protoxina Cry1Aa y la resistencia a ampicilina.	40

<b>Figura 17.</b> Rendimiento cualitativo de los protocolos de purificación de la protoxina Cry1Aa silvestre expresada en <i>E. coli</i> .	42
<b>Figura 18.</b> Solubilización de la protoxina Cry1Aa silvestre expresada y purificada a partir de <i>E. coli</i> .	43
<b>Figura 19.</b> Activación mediante digestión con tripsina de la toxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de <i>E. coli</i> .	44
<b>Figura 20.</b> Análisis de la formación de oligómero de la toxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de <i>E. coli</i> .	46
<b>Figura 21.</b> Protoxina soluble de las mutantes T143D y D136N purificadas a partir de <i>E.coli</i> .	48
<b>Figura 22.</b> Curva de activación mediante digestión con tripsina de la protoxina mutante T143D purificada a partir de <i>E. coli</i> .	49
<b>Figura 23.</b> Análisis de la oligomerización de las mutantes Cry1Aa no tóxicas D136N y T143D, purificadas a partir de <i>E.coli</i> .	51
<b>Figura 24.</b> Solubilización de las protoxinas mutantes de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	54
<b>Figura 25.</b> Activación mediante digestión con tripsina de las toxinas mutantes de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	56
<b>Figura 26.</b> Análisis de unión de las mutantes no tóxicas de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, al receptor caderina (repetido 7 a 12).	58
<b>Figura 27.</b> Análisis de la formación del oligómero de las mutantes de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	59
<b>Figura 28.</b> Análisis del fenotipo de dominancia negativa para las mutantes sencillas de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab sobre larvas de <i>M. sexta</i> .	63
<b>Figura 29.</b> Análisis de la solubilización y activación de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.	66
<b>Figura 30.</b> Análisis de la formación del oligómero de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	67
<b>Figura 31.</b> Análisis del fenotipo de dominancia negativa para las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, sobre larvas de <i>M. sexta</i> .	69
<b>Figura 32.</b> Efecto de dominancia negativa de la mutante doble de la toxina Cry1Ab, D136N+T143D, abatiendo el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab silvestre sobre larvas de <i>M. sexta</i> .	70

**Figura 33.** Representación esquematizada del fenómeno putativo de hetero-oligomerización y los posibles mecanismos por los cuales están afectados los hetero-oligómeros. 71

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos mutagénicos diseñados para la construcción de las mutantes de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.	27
<b>Tabla 2.</b> Reacción de fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos con la enzima T4PNK.	29
<b>Tabla 3.</b> Reacción de PCR mutagénico utilizando el QuickChange® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene.	30
<b>Tabla 4.</b> Parámetros de ciclaje térmico para la reacción de PCR mutagénico de las mutantes de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.	30
<b>Tabla 5.</b> Reactivos utilizados para la elaboración de los geles de SDS-PAGE.	34
<b>Tabla 6.</b> Reacción de oligomerización de las mutantes de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.	37
<b>Tabla 7.</b> Relación de las mezclas de protoxina silvestre y protoxina mutante utilizadas durante el ensayo de dominancia negativa.	38
<b>Tabla 8.</b> LC <sub>50</sub> de las mutantes sencillas construidas dentro de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de <i>B. thuringiensis</i> .	55
<b>Tabla 9.</b> LC <sub>50</sub> de las mutantes dobles construidas dentro de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.	65
<b>Tabla 10.</b> Preparación del stock de acrilamida al 15% utilizado durante la purificación de los oligonucleótidos mediante PAGE.	78

## ABREVIATURAS

<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>Amp<sup>200</sup></b>	Ampicilina a una concentración final de 200 µg/ml
<b>APN</b>	Aminopeptidasa N
<b>BBMV's</b>	Vesículas de la microvellosidad apical del intestino medio de los insectos blanco.
<b>BHI</b>	Medio de infusión cerebro-corazón
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>Bt-R1</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> -receptor 1
<b>CADR</b>	Receptor caderina
<b>CDR</b>	Región determinante de complementariedad del anticuerpo
<b>DNTp</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetra-acético
<b>EF</b>	Factor del edema de la toxina del ántrax
<b>Eri<sup>15</sup></b>	Eritromicina a una concentración final de 15 µg/ml
<b>GCR</b>	Receptor glicoconjugado
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>HCT</b>	Medio mínimo de esporulación de hidrolizado de triptona caseína
<b>LC<sub>50</sub></b>	Concentración letal 50. Dosis de toxina administrada (en ng/cm <sup>2</sup> de dieta) con la cual se observa una mortalidad de 50% de los insectos durante un tiempo dado.
<b>LF</b>	Factor letal de la toxina del ántrax
<b>MTSES</b>	Etilsulfonato de metanetiosulfonato
<b>PA</b>	Antígeno protector de la toxina del ántrax
<b>PBS</b>	Buffer de fosfatos
<b>PC-SUV</b>	Vesículas unilamelares pequeñas de fosfatidilcolina
<b>PFT</b>	Toxinas formadoras de poro
<b>pKA</b>	Proteincinasa A, o dependiente de AMP cíclico
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PVDF</b>	Membrana de polivinilideno fluoruro
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>scFv73</b>	Anticuerpo que mimetiza el sitio de unión del Bt-R1 para las toxinas Cry1A
<b>SP</b>	Medio de esporulación para <i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>T4PNK</b>	Cinasa de polinucleótidos T4
<b>VIP</b>	Proteínas insecticidas vegetativas

## RESUMEN

Las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* son toxinas formadoras de poro con actividad insecticida muy específica. Su modo de acción involucra la unión secuencial a receptores situados sobre la membrana de las células del intestino medio de sus insectos blanco y la formación de oligómeros que se insertan en la membrana para formar un poro que rompe el equilibrio osmótico y lisa a las células intestinales, matando al insecto por inanición y septicemia.

Debido a que las toxinas Cry son biodegradables y a que muestran una enorme especificidad hacia sus insectos blanco, estas han sido ampliamente utilizadas en la industria agrícola para el control de los insectos plaga, ya sea expresadas en plantas transgénicas o esparcidas sobre los cultivos. Sin embargo, recientemente se ha discutido mucho sobre los posibles efectos que tienen estas proteínas sobre organismos no blanco, principalmente sobre aquellos que habitan en ecosistemas situados en las proximidades de los campos agrícolas.

Es muy importante conocer a nivel molecular cómo es que las toxinas Cry actúan para matar a sus organismos blanco, ya que esto nos puede permitir su mejoramiento o modificación a futuro, con el fin de obtener toxinas mas activas, abatir los eventos de resistencia de los insectos a las toxinas surgidos en el campo y también el diseño de estrategias efectivas para inhibir su toxicidad sobre organismos no blanco (en caso de que esto llegase a ser necesario).

En este trabajo se analizaron los aspectos de oligomerización y unión al receptor, de algunas mutantes puntuales dentro del dominio I de la toxina Cry1Ab, afectadas en la toxicidad y en la formación de poro. También se analizó la capacidad de estas mutantes para mostrar un fenotipo de dominancia negativa, inactivando y abatiendo la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre.

Ya que las toxinas Cry1Ab matan a sus organismos blanco mediante la formación de oligómeros con actividad de poro, y que algunos aminoácidos situados dentro de la hélice  $\alpha$ -4 son muy importantes para la actividad de poro y toxicidad, nosotros realizamos algunas mutaciones puntuales dentro de la hélice  $\alpha$ -4 y expresamos por separado a las mutantes obtenidas en la cepa acristalífera de *B. thuringiensis*, Bt 407-, obteniendo de esta forma las siguientes 6 mutantes: 1) E129K, 2)D136N, 3)T143D, 4)T143N, 5) E129K+D136N y 6)D136N+T143D.

Todas las mutantes construidas se expresaron en forma de cristales proteicos bipiramidales parasporales, similares a los de la toxina Cry1Ab silvestre, indicando que las mutaciones no afectaron la estabilidad estructural de la toxina, a excepción de la mutante T143N que no produjo toxina. Posteriormente purificamos las mutantes a partir de cultivos de *B. thuringiensis* y analizamos los siguientes aspectos:

- Toxicidad hacia larvas de *Manduca sexta* mediante bioensayos.
- Solubilización de la protoxina en buffers alcalinos y reductores.
- Activación de la toxina mediante digestión proteolítica con tripsina.
- Afinidad de unión al receptor caderina mediante el ensayo de ELISA (solo para el caso de las mutantes E129K y T143D).
- Formación de la estructura oligomérica.

De los ensayos anteriores obtuvimos que la mayoría de las mutantes se vieron severamente afectadas en la toxicidad hacia larvas de *M. sexta*, pero al mismo tiempo, todas ellas se solubilizaron, activaron, unieron al receptor caderina (E129K y T143D) y formaron estructuras oligoméricas de manera similar a como lo hace la toxina Cry1Ab silvestre. Estos resultados nos permitieron proponer que la pérdida de toxicidad de estas mutantes se debía principalmente a que las estructuras oligoméricas formadas por dichas mutantes estaban afectadas en la actividad de poro.

Dado que contábamos con toxinas mutantes capaces de formar oligómeros sin actividad de poro, posteriormente evaluamos su capacidad para mostrar un fenotipo de dominancia negativa sobre la toxina Cry1Ab silvestre, abatiendo su toxicidad.

Las mutantes dobles E129K+D136N y D136N+T143D fueron las que mostraron en mayor medida el fenotipo de dominancia negativa, al abatir de un 70 al 100% de la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre sobre las larvas de *M. sexta*. El abatimiento de la toxicidad se observó aun al suministrar una mezcla de 5ng/cm<sup>2</sup> de toxina silvestre mas 1.25 ng/cm<sup>2</sup> de toxina mutante (relación en peso de 1:0.25 de toxina silvestre:mutante) sobre la dieta de las larvas de *M. sexta*.

Proponemos que el fenotipo de dominancia negativa observado en las toxinas Cry1Ab se debe a que los monómeros con mutaciones puntuales en la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab son capaces de oligomerizar *in vivo* junto con los monómeros de la toxina Cry1Ab silvestre, formando así hetero-oligómeros de toxina silvestre-mutante que pierden la actividad de poro y, por lo tanto, su toxicidad hacia larvas de *M. sexta*.

La importancia de haber observado el fenotipo de dominancia negativa en la toxina Cry1Ab radica en que esto constituye una evidencia más que apoya el mecanismo de acción propuesto en nuestro laboratorio para las toxinas Cry, en el cual se propone que la formación *in vivo* de estructuras oligoméricas funcionales (con actividad de poro), es un paso necesario para que estas toxinas puedan ejercer sus efectos tóxicos sobre los insectos blanco.

Finalmente, cabe la posibilidad de que las toxinas mutantes construidas en este trabajo se puedan utilizar como una especie de “antitoxinas” que ayuden a inhibir los efectos dañinos sobre organismos no blanco causados por las toxinas Cry1Ab utilizadas en la industria agrícola (en el caso que esto llegase a presentarse). Dichas toxinas serían una herramienta muy útil ya que podrían ser aplicadas de manera local en ecosistemas particulares, como por ejemplo en ecosistemas acuáticos o terrestres ubicados en regiones aledañas a las áreas de actividad agrícola intensa.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Características generales de *Bacillus thuringiensis*.

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram-positiva ubicua; se ha aislado de diversas partes como el suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos y telarañas [1]. Es aerobia estricta y está relacionada con *B. cereus* y *B. anthracis* [2] (Fig. 1). Presenta dos fases principales durante su ciclo de vida:

**1) Fase de crecimiento vegetativo:** Las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 minutos, dependiendo del medio de cultivo.

**2) Fase de esporulación:** Es una etapa de diferenciación de bacteria a espora que consta de siete estadios y comienza cuando la bacteria crece en un medio con una cantidad limitada de nutrientes [3]. Durante esta fase, Bt produce cristales parasporales dentro de la célula madre con propiedades insecticidas. Dichos cristales son de naturaleza proteica (se estima que hasta el 30% de la proteína celular puede estar contenida en estas inclusiones) y están compuestos en su mayoría de una o más proteínas cristalinas (Cry) y citolíticas (Cyt), también llamadas  $\delta$ -endotoxinas.



**Figura 1. Microfotografía de una cepa de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión.** Se observa la espora elíptica (1) y el cristal proteico parasporal con forma bipiramidal (2).

## 1.2. Características de las toxinas producidas por *B.thuringiensis*.

Existen dos tipos de  $\delta$ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt (Fig. 2). A la fecha se han clonado y secuenciado aproximadamente 400 genes *cry* diferentes, clasificados en 55 grupos, y 25 genes *cyt* diferentes, clasificados en 2 grupos [4].

Estas toxinas son altamente específicas hacia sus insectos blanco, inocuas para los humanos, vertebrados y plantas. Se han encontrado  $\delta$ -endotoxinas activas contra lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros, nemátodos, gusanos planos y protozoarios [1]. Estas características, aunadas al hecho de que son completamente biodegradables, hacen que Bt constituya una alternativa viable para el control de insectos plaga en la agricultura y de algunos vectores

que transmiten enfermedades humanas con gran importancia médica, como en el caso del mosquito transmisor del dengue (*Aedes aegypti*) [5].

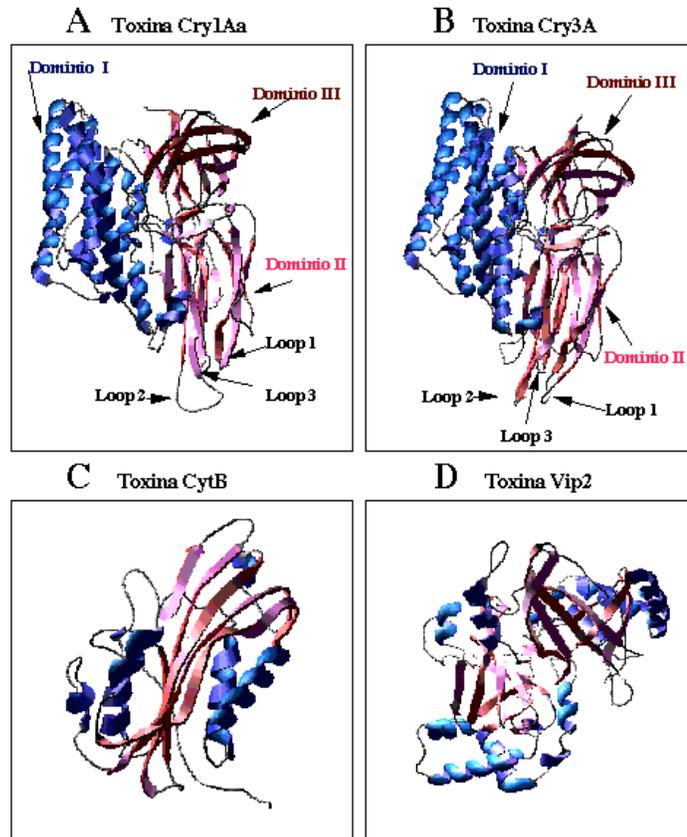
La definición de proteínas Cry es cualquier proteína parasporal de Bt que muestre un efecto tóxico verificable experimentalmente hacia algún organismo, o bien, cualquier proteína que muestre similitud significativa en la secuencia respecto a las proteínas Cry conocidas [4].

Las proteínas Cyt denotan a las proteínas parasporales de Bt que muestren actividad hemolítica, o bien, proteínas que presenten similitud significativa con la secuencia de las proteínas Cyt conocidas [4]. Se ha reportado que las proteínas Cyt potencian sinérgicamente la actividad de las proteínas Cry en las cepas de Bt que matan insectos dípteros. Además se ha visto que abaten la resistencia mostrada por algunos mosquitos hacia las toxinas Cry11 y Cry4. Un reporte reciente propone que la toxina Cyt1Ac puede funcionar como receptor para estas toxinas Cry dentro del intestino de los mosquitos [6].

Las toxinas Cry y Cyt de Bt pertenecen a una clase de toxinas bacterianas conocidas como toxinas formadoras de poro (PFT), las cuales son secretadas como proteínas solubles al agua, llevando a cabo cambios conformacionales para poder insertarse en las membranas celulares de su huésped [7]. Hay dos grupos principales de PFT:

- a) **las toxinas  $\alpha$ -hélice:** en las cuales las regiones de  $\alpha$ -hélice forman el poro transmembranal. Agrupan a toxinas como las colicinas, la exotoxina A, la toxina de la difteria y las toxinas Cry de tres dominios [7].
- b) **las toxinas  $\beta$ -barril:** las cuales se insertan dentro de la membrana mediante la formación de un  $\beta$ -barril compuesto por asas de láminas beta de cada monómero. Comprenden a toxinas como la aerolisina, la  $\alpha$ -hemolisina, la del ántrax, y también a toxinas dependientes de colesterol como la perfingolisina O y las toxinas Cyt [7].

Además de las  $\delta$ -endotoxinas, *Bt* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a sus blancos con mayor eficiencia. Entre estos factores de virulencia se encuentran: fosfolipasas [8], proteasas [9], quitinasas,  $\alpha$ -exotoxinas o exotoxinas termolábiles [10], las  $\beta$ -exotoxinas que son tóxicas para mamíferos [11], ya que funcionan como análogos de ATP [12], y las proteínas VIP, que son proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento y son secretadas al medio extracelular [13]. Las proteínas VIP se han cristalizado y contienen un dominio semejante al sitio activo de proteínas con actividad de ribosilación de ADP (Fig. 2D). Se propone que estos factores ayudan a la bacteria durante la infección del insecto y en algunos casos se ha reportado que la mezcla de esporas-cristales mata de forma mucho más eficiente que los cristales por sí solos.



**Figura 2. Estructura tridimensional de algunas proteínas insecticidas producidas por *B.thuringiensis*.** A)Toxina Cry1Aa, B)Toxina Cry3A, C)Toxina CytB, D)Toxina Vip2.

### 1.3. Clasificación y nomenclatura de las $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*.

A la fecha, las proteínas Cry están agrupadas en 55 grupos y por lo menos 100 subgrupos con aproximadamente 400 miembros, y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. La lista actualizada con los miembros de las proteínas Cry se puede encontrar en la siguiente dirección de internet:

[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)

Cada grupo muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos. Se ha sugerido que la gran diversidad de los genes *cry* se generó, en parte, por la coevolución de estos genes con las diferentes especies de insectos blanco. Esto sugiere que en la naturaleza podría haber una distribución de los genes *cry* directamente relacionada con la distribución de diferentes especies de insectos [14].

La figura 3 muestra un filograma de las toxinas Cry descritas a la fecha. Las líneas verticales presentes en la figura representan los límites de identidad que marcan las diferentes categorías en la nomenclatura. El número arábigo se designa con la primera fila que corresponde hasta **45 % de identidad**. La segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de **45 a 78 %**. La tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de **78 a 95 %**. La última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando **más de 95 %** de identidad [4].



Mediante la comparación filogenética, se ha sugerido que el dominio I y II coevolucionaron, mientras que el dominio III evolucionó de forma independiente [14]. Dicha evolución independiente de los dominios estructurales y el intercambio del dominio III entre diferentes toxinas ha generado proteínas con modos de acción similares pero con especificidades diferentes [14, 15].

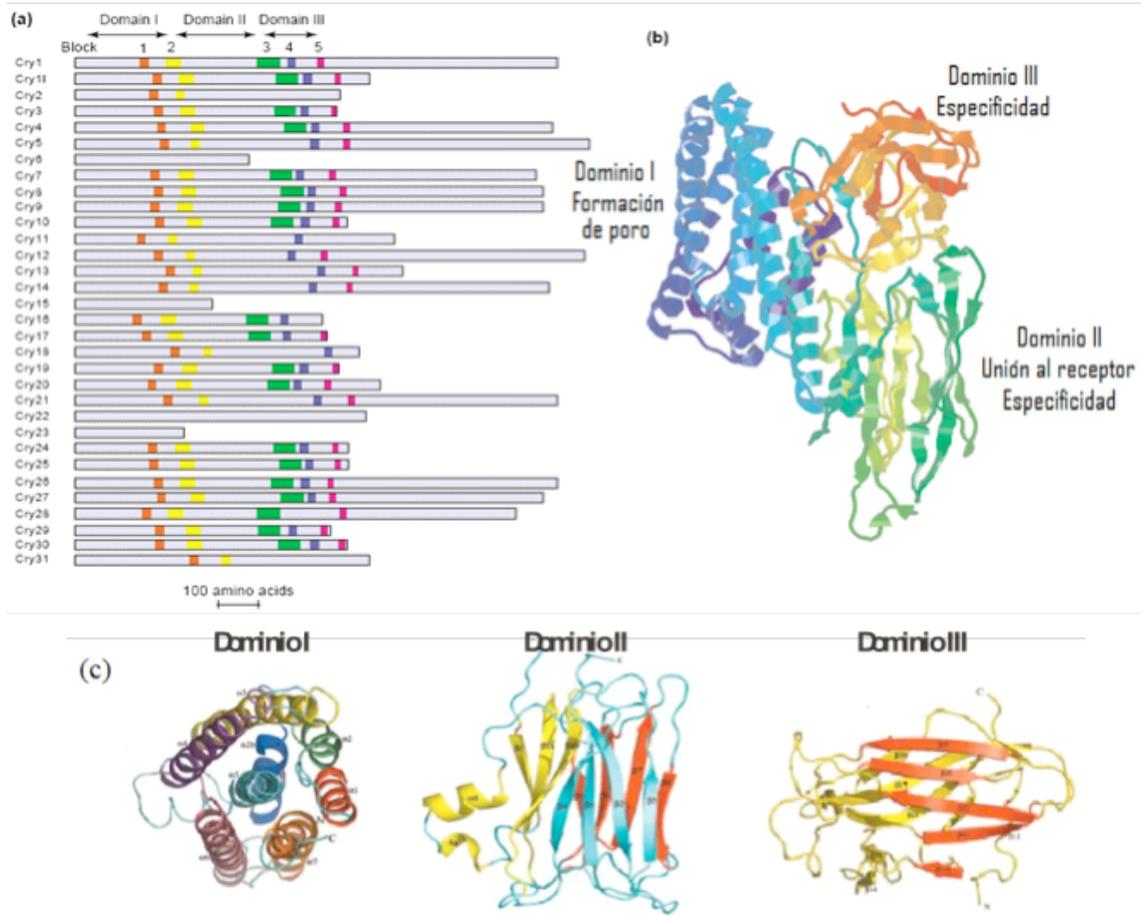
#### 1.4. Estructura de las proteínas Cry.

Los miembros de la familia de proteínas Cry de tres dominios comprenden el grupo más grande de proteínas Cry y son moléculas globulares que contienen tres dominios estructurales unidos por enlaces sencillos. Una característica particular de los miembros de esta familia es la presencia de protoxinas con dos longitudes diferentes. Un grupo mayoritario de protoxinas es de aproximadamente el doble de largo en comparación con el resto de las protoxinas (Fig. 4a). La extensión C-terminal encontrada en las protoxinas más largas es dispensable para la toxicidad y se cree que juega un papel en la formación de los cuerpos de inclusión dentro de las bacterias [15]. Esta región C-terminal es procesada por las proteasas del intestino de la larva, originando con esto a las toxinas de aproximadamente 60 kDa en todas las toxinas Cry de tres dominios.

La mayoría de las toxinas Cry tienen 5 bloques altamente conservados [4] que se localizan entre las regiones de contacto entre los tres dominios o en regiones internas de los dominios I y III, por lo que se ha propuesto que las toxinas Cry que contienen estas regiones conservadas tienen estructuras tridimensionales conservadas y mecanismos de acción semejantes [15] (Fig. 4).

**Dominio I:** está situado hacia el extremo N-terminal de la toxina, está constituido por un grupo de 7  $\alpha$ -hélices antiparalelas y anfipáticas, seis de las cuales forman un ramillete que rodea a la hélice  $\alpha$ -5, la cual corresponde a la primera de las 5 regiones conservadas. Exceptuando a las hélices  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2a y  $\alpha$ 2b, las  $\alpha$ -hélices restantes tienen una longitud de más de 30 Å, por lo cual son de tamaño suficiente para atravesar la membrana. Este dominio es responsable de la inserción en la membrana y de la formación del poro (Fig. 4b, 4c).

**Dominio II:** es el dominio menos conservado en secuencia y estructura terciaria entre las toxinas Cry de 3 dominios. Está formado por tres láminas  $\beta$  plegadas y por tres asas expuestas. En las asas de estas láminas  $\beta$  se observa la mayor diferencia estructural y estas juegan un papel fundamental en la especificidad de la toxina [16], debido a que dichas asas interactúan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio [17] (Fig. 4b y 4c).



**Figura 4. Estructura primaria y terciaria de las toxinas Cry.** a) Longitud relativa de algunas protoxinas Cry en las cuales se señalan los cinco bloques conservados, si es que los presentan [11, 15]. b) Estructura terciaria de la toxina Cry1Aa activada, mostrando los tres dominios estructurales. El dominio I (en azul) está involucrado en la inserción en la membrana y la formación del poro. El dominio II (en verde) y el III (en naranja-amarillo) participan en el reconocimiento del receptor [15] y en la unión a la membrana del insecto blanco. c) Dominios funcionales de las toxinas Cry mostrados por separado.

**Dominio III:** está formado por dos láminas  $\beta$  plegadas antiparalelas. La lámina exterior es accesible al solvente y la interior se encuentra de cara a los otros dominios (Fig. 4b y 4c). Se ha propuesto que este dominio protege a la toxina de la acción proteolítica de las enzimas digestivas [18] y que la interacción entre los dominios I y III es importante para la estabilidad e integridad de la protoxina [19]. También está involucrado en la especificidad de la toxina, ya que el intercambio del dominio III entre diferentes toxinas provoca cambios en su especificidad [20]. Además, dicho dominio muestra similitudes estructurales con otras proteínas de unión a carbohidratos como es el dominio de la 1,4- $\beta$ -glucanasa C, la galactosa oxidasa, la sialidasa, la  $\beta$ -glucuronidasa y el dominio de unión a los carbohidratos de la Xylanasa U y de la  $\beta$ -galactosidasa, sugiriendo así que los motivos con carbohidratos pueden jugar un papel muy importante en el modo de acción y unión al receptor de las toxinas Cry de tres dominios [21].

A la fecha se han resuelto las estructuras terciarias de seis diferentes proteínas Cry de tres dominios por cristalografía de rayos X: Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa y Cry4Ba [19, 22–26]. Cuando se comparan sus secuencias, estas toxinas sólo comparten aproximadamente un 10% de identidad; sin embargo, a nivel de estructura terciaria se observa un sorprendente parecido entre ellas [27].

### **1.5. Mecanismo de acción de las proteínas Cry.**

El modo de acción de las toxinas Cry ha sido caracterizado principalmente en insectos Lepidópteros. Está ampliamente aceptado que el modo de acción primaria de las toxinas Cry es mediante la lisis de las células epiteliales del intestino medio del insecto blanco, debido a la formación de poros en la membrana celular apical de las microvellosidades de las células del intestino de la larva [5, 15, 28].

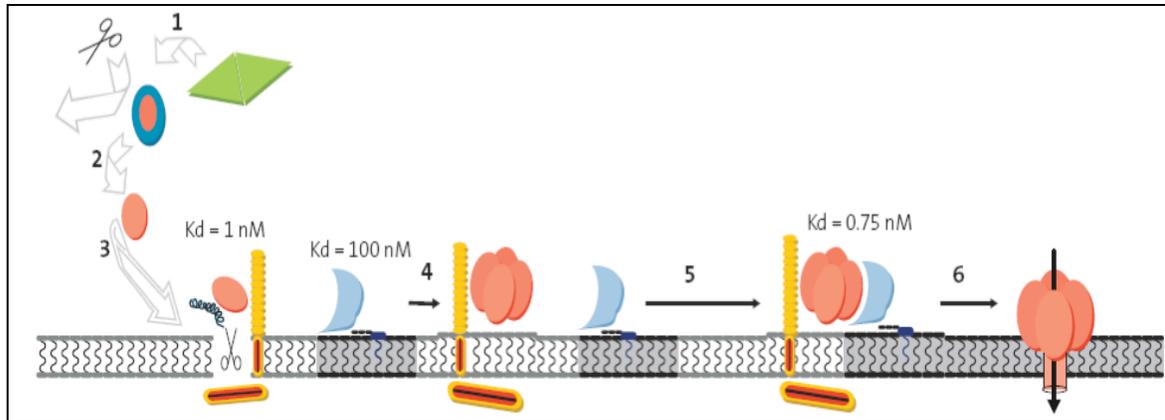
Recientemente se ha sugerido que la toxicidad puede estar relacionada con la muerte celular mediada por protein cinasa A (pKA), la cual es iniciada después de la unión de la toxina al receptor caderina [29]. Sin embargo en nuestro laboratorio se ha demostrado que esto no es del todo correcto, ya que existen toxinas Cry1A mutantes que no requieren de la interacción con el receptor caderina para matar al insecto y que son capaces de formar poros en la membrana celular del huésped, mediante la formación de estructuras oligoméricas. Además, estas mutantes son capaces de matar a insectos resistentes a la toxina Cry, los cuales carecen del receptor caderina debido a una mutación en su genoma [30].

Un tercer modelo de acción sugiere que después de la disrupción de la membrana ocasionada por las toxinas Cry, se requiere de otras bacterias para causar la muerte del insecto por septicemia [31].

El mecanismo de acción propuesto en nuestro laboratorio para las toxinas Cry se divide en varios pasos principales: solubilización del cristal, procesamiento de la protoxina, unión secuencial a diferentes receptores, formación del preporo oligomérico, inserción en la membrana, formación del poro y citólisis (Fig. 5).

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de Bt son: parálisis casi inmediata de la motilidad del intestino y después de 1 ó 2 días la detención de la ingesta, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte por inanición y septicemia [32].

Los estudios histopatológicos han mostrado que las células columnares del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente y en particular la microvellosidad apical, la cual se destruye en su totalidad [33, 34]. Los efectos en el otro tipo de células de las que está constituido el intestino medio de los lepidópteros, las células caliciformes, son más lentos, pero en este caso también se ha observado citólisis [35, 36].



**Figura 5: Representación esquematizada del modo de acción propuesto en nuestro laboratorio para las toxinas Cry1A.** Una vez que la larva del insecto susceptible ingiere el cristal proteico, este se solubiliza en el ambiente alcalino y reductor del intestino de la larva, liberando a la protoxina con un tamaño de 130 kDa (1). La protoxina es procesada por algunas proteasas específicas presentes en el jugo gástrico del intestino del insecto, liberando el fragmento tóxico de 60 kDa (2). La toxina se une a un primer receptor, que es una proteína parecida a la caderina, situado sobre la membrana de la célula blanco (3). Esta unión favorece un cambio conformacional en la toxina, el corte de la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I de la toxina (3) y la formación del oligómero prepórico de 250 kDa (4).

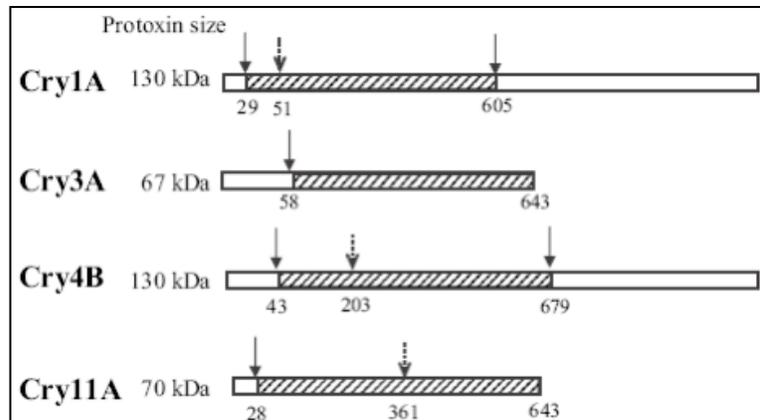
El oligómero adquiere una mayor afinidad de unión hacia un segundo receptor (que en *M.sexata* pueden ser la APN o la ALP ancladas a la membrana por GPI) situado en las balsas lipídicas membranales (5). La unión al segundo receptor ocasiona cambios conformacionales en el oligómero que facilitan su inserción en la membrana, la formación del canal iónico lítico y la disrupción del potencial de membrana (6), ocasionando en última instancia la muerte del insecto por inanición y septicemia [37].

### 1.5.1. Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.

Los cristales producidos por Bt se solubilizan a pH alcalino liberando a la "protoxina" [38]. Además, también se requiere un medio ambiente reductor para romper los puentes disulfuro que son abundantes en la mitad C-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa [39].

La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos liberando el fragmento tóxico de 60 a 70 kDa resistente a las proteasas.

Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas Cry se da por el corte de un péptido N-terminal (25-30 residuos de aminoácidos en las toxinas Cry1, 58 residuos para la Cry3a y 49 para la Cry2Aa) y de aproximadamente la mitad de la proteína restante en el lado C-terminal en el caso de las protoxinas Cry más largas. La posición del sitio de procesamiento en el extremo C-terminal no es constante [40-42]. La figura 6 muestra una representación esquemática de la estructura de algunas protoxinas Cry y sus sitios correspondientes de corte proteolítico.



**Figura 6. Longitud relativa de las protoxinas Cry y posición de los sitios de corte por las proteasas [37].** Las flechas muestran los sitios de corte en la porción amino y carboxilo terminales de la toxina activada. Las flechas punteadas muestran los sitios intramoleculares de corte. El corte de la Cry1A en el residuo 51 ocasiona la pérdida de la hélice  $\alpha$ -1 y la formación del prepro. El procesamiento de la Cry4B da como resultado dos fragmentos de 18 y 46 kDa mientras que el de la Cry11A resulta en dos fragmentos de 34 y 32 kDa.

### 1.5.2. Unión al receptor.

Después de ser activadas, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad apical de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles. La unión a estos sitios es muy específica y es una etapa determinante en la toxicidad [43].

Los estudios de competencia homóloga han mostrado que la cinética de unión de las toxinas Cry a las BBMVs de los insectos susceptibles es bifásica, compuesta de un paso reversible y otro irreversible [43, 44]. La interacción inicial entre la toxina y su sitio de unión (unión reversible) es necesario para la toxicidad pero no es suficiente. Los eventos posteriores tales como la unión irreversible y la inserción en la membrana parecen estar más correlacionados con la toxicidad.

Algunas mutaciones en la toxina afectan la etapa inicial de la interacción con el receptor (unión reversible), produciendo proteínas con menor afinidad y con menor toxicidad. Otras mutaciones causan cambios en la segunda etapa de la interacción con el receptor (la unión irreversible), conduciendo también a una baja o pérdida de la toxicidad [45, 46].

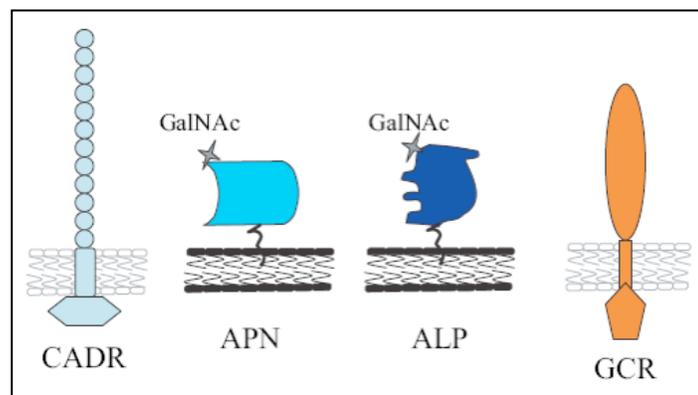
La mutagénesis del dominio II ha generado toxinas con mejores parámetros de unión que resultaron ser más tóxicas. Se ha determinado que las cuatro regiones prominentes en esta interacción con el dominio II son: el asa de la  $\alpha$ -hélice 8 y el asa 1 (entre  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3), 2 (entre  $\beta$ 6 y  $\beta$ 7) y 3 (entre  $\beta$ 10 y  $\beta$ 11). El dominio III también participa en la determinación de la especificidad y se ha visto que el intercambio del dominio III entre diferentes toxinas puede generar un cambio en la especificidad de las toxinas hacia sus insectos blanco.

Por otra parte, se ha encontrado que para la mayoría de las toxinas Cry1 estudiadas, las moléculas a las que se unen con alta afinidad son glicoproteínas de entre 63 y 220 kDa

[47–49]. Se propone que la interacción inicial es la existente entre la toxina y el carbohidrato del receptor, mientras que la unión irreversible se asocia con una interacción proteína-proteína y la inserción en la membrana.

A la fecha se han descrito cuatro proteínas diferentes de unión para las toxinas Cry1A en diferentes insectos lepidópteros: 1) una proteína parecida a la caderina (CADR), 2) una aminopeptidasa-N (APN) anclada a glicosilfosfatidil inositol (GPI), 3) una alcalinofosfatasa (ALP) anclada a GPI y 4) un glicoconjugado de 270 kDa [50–53]. La figura 7 muestra una representación de los cuatro tipos de moléculas receptoras putativas caracterizadas hasta la fecha para las toxinas Cry1A.

El papel de la interacción con la toxina con los receptores ha sido particularmente bien descrito en *Manduca sexta*. En este insecto se han descrito como receptores a dos proteínas de unión a la toxina Cry1A: una proteína caderina (CADR, también conocida como Bt-R1) y una APN anclada a GPI. Las caderinas son proteínas transmembranales con un dominio citoplásmico y un dominio extracelular con varias repeticiones de caderina. El ectodominio contiene sitios de unión a calcio, secuencias de interacción con la integrina y secuencias de unión a la caderina. Experimentos de unión en tiempo real muestran que la afinidad de unión de las toxinas monoméricas Cry1A con el receptor Bt-R1 está en orden de 1 nM [50], mientras que con la APN está en el orden de 100 nM [44].



**Figura 7. Moléculas receptoras de las proteínas Cry1A** [37]. CADR: receptor caderina, APN: aminopeptidasa N, ALP: fosfatasa alcalina y GCR: receptor glicoconjugado de 270 kDa.

La interacción de las toxinas Cry1A con el receptor Bt-R1 es muy compleja e involucra por lo menos a tres epítopos de unión dentro de las dos moléculas. Usando una librería sintética de anticuerpos de fagos, Gómez *et al.* (2001, 2002a) caracterizaron el anticuerpo scFv73 el cual se une al asa 2 del dominio II (asa  $\beta 6$ -  $\beta 7$ ) de las toxinas Cry1A. Dicho anticuerpo inhibe la unión de las toxinas Cry1A hacia el Bt-R1, pero no así hacia la APN. El análisis de la secuencia de la región CDR3H del scFv73 condujo a la identificación de un epítipo de 8 aminoácidos dentro de la repetición CADR 7 dentro del Bt-R1 (869 HITDTNNK 876) el cual está involucrado en la unión de la toxina hacia el asa 2 del dominio II de las

toxinas Cry1A [54, 55]. Además, se ha identificado otro epítipo de unión en la repetición CADR 11 dentro del Bt-R1 (1331 IPLPASILTVTV 1342) el cual interactúa con el asa  $\alpha$ 8 del dominio II (asa  $\alpha$ 8a-  $\alpha$ 8b) y el asa 2 de la toxina Cry1Ab [56]. Finalmente, una tercera región involucrada en la interacción con la toxina Cry1Ab se encuentra dentro de la repetición CADR 12 del Bt-R1 (residuos 1363-1464) [57], la cual se une al asa 3 de la toxina Cry1Ab.

Basados en el uso de anticuerpos monoclonales que compiten la unión de Cry1A con la APN de *Bombix mori*, los epítopos interactuantes Cry1Aa-APN han sido recientemente mapeados dentro de los residuos de la  $\beta$ 16 (508 STLRVN 513) y de la  $\beta$ 22 (582 VFVLSAHV 589), ambas localizadas en el dominio III [58].

Cabe destacar que el mecanismo más frecuente de la resistencia hacia las toxinas Cry involucra cambios en su unión al los receptores [59].

### 1.5.3. Formación del prepore oligomérico.

Algunas toxinas PFT forman una estructura oligomérica antes de su inserción en la membrana. En el caso de la toxina Cry1Ab, la unión de esta toxina al Bt-R1 de *M. sexta* promueve un corte proteolítico adicional en el extremo N-terminal de la toxina, eliminando la hélice  $\alpha$ -1 y facilitando la formación de una estructura oligomérica pre-pore la cual es importante para la inserción dentro de la membrana y para la toxicidad [60, 61].

La incubación *in vitro* de la protoxina Cry1Ab junto con el anticuerpo de cadena simple scFv73, que mimetiza al receptor CADR, o con los péptidos de unión a la toxina del receptor Bt-R1 (repeticiones CADR 7, CADR11 y CADR12), y el tratamiento con el jugo gástrico de *M. sexta*, dan como resultado preparaciones de toxina con la formación de un oligómero de 250 kDa que carece de la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I [56, 60]. Se ha reportado que las estructuras oligoméricas de Cry1Ab y Cry1Ac incrementan su afinidad de unión hacia el receptor APN en 100 a 200 veces en comparación con el monómero, mostrando una constante de disociación aparente de 0.75 nM [56, 62]. El oligómero en contraste con el monómero de 60 kDa, es competente para su inserción en la membrana, como se observó en experimentos basados en la medición de la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano de la toxina Cry1Ab, y también mediante el análisis de la permeabilidad en membranas, usando bicapas lipídicas sintéticas planas [61].

La actividad de pore de la estructura oligomérica de la toxina Cry1Ab analizada en bicapas lipídicas sintéticas planas reveló diferentes características cinéticas en relación a la actividad de pore de la toxina monomérica Cry1Ab, como son:

- 1) Al utilizar preparaciones puras de toxina en su forma oligomérica se requirió de una menor cantidad de toxina para observar la formación de pore (hasta 20 veces menor), en relación a la gran cantidad de toxina Cry1Ab monomérica necesaria para observar la formación de pore (>100 nM).

2) Las cinéticas fueron diferentes ya que la Cry1Ab oligomerizada mostró canales estables que tienen una gran probabilidad de apertura, en contraste con la toxina monomérica que muestra patrones inestables de apertura [61].

La formación de estructuras oligoméricas Cry ha sido demostrada para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa y Cry3 [60, 61, 63, 64]. En todos los casos, las muestras de toxinas Cry que contienen estructuras oligoméricas se correlacionan con una gran actividad de poro, en contraste con las muestras monoméricas que muestran una actividad deficiente de formación de poro, apoyando la hipótesis de que la formación del oligómero es un paso necesario dentro del mecanismo de acción de las toxinas Cry [37].

#### **1.5.4. Inserción en la membrana.**

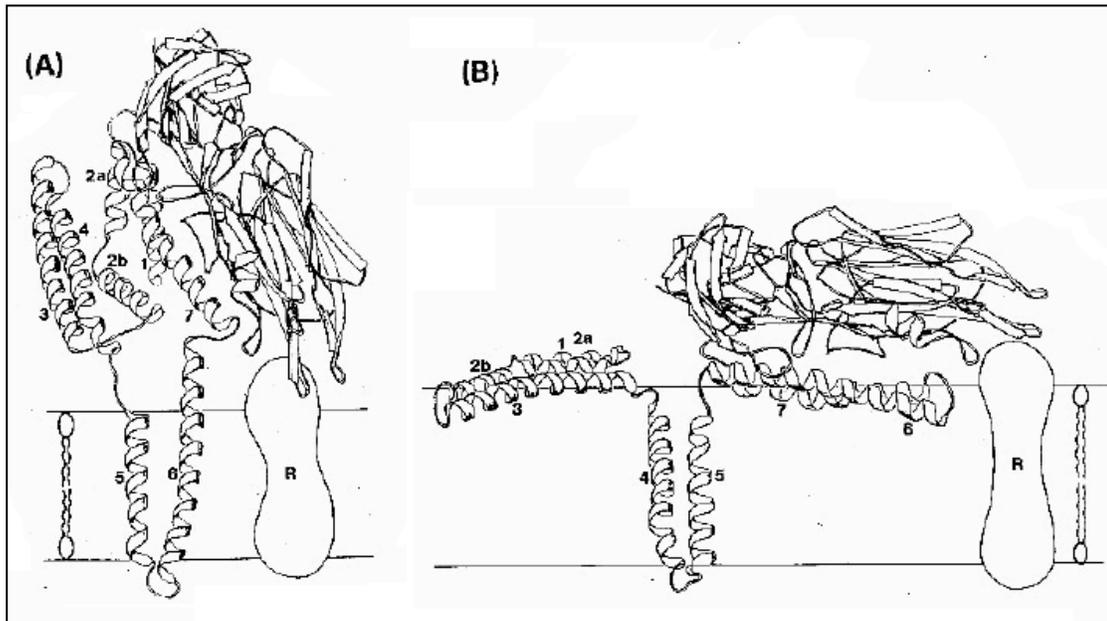
Se ha reportado que las toxinas Cry en forma de oligómero se insertan en microdominios de membrana conocidos como balsas lipídicas o “lipid-rafts” y se ha encontrado que la integridad de esos microdominios es esencial para la actividad de formación de poro *in vitro* de la toxina Cry1Ab [65]. El receptor Bt-R1 está localizado dentro de la membrana soluble, en contraste con los receptores APN y ALP, los cuales están unidos a la membrana mediante GPI y están posicionados preferencialmente dentro de las balsas lipídicas [65].

Otras toxinas formadoras de poro también interactúan con receptores localizados dentro de las balsas lipídicas y se ha visto que dicha interacción es un paso clave para la oligomerización e inserción dentro de la membrana de diversas PFT [66]. Se ha propuesto que algunas PFT pueden desplegarse parcialmente para facilitar la inserción en la membrana y la formación del canal. En el caso de las PFT activas contra células de mamíferos, el desplegamiento es ocasionado por el pH ácido [7] presente en la superficie membranal (que presenta un pH ácido que puede ser hasta de 2 unidades menor respecto al pH extracelular [7]) y dentro de los compartimentos ácidos membranales, después de que se lleva a cabo la internalización celular de las toxinas.

El análisis de desplegamiento de la estructura de las toxinas Cry1Ab a diferentes pH demostró que las toxinas Cry están muy compactas en pHs ácidos y se despliegan parcialmente en pHs alcalinos [67]. Interesantemente los insectos lepidópteros y dípteros muestran un pH básico (de hasta pH 11) en el lumen del intestino medio [68]. Además se ha reportado que existe un cambio conformacional después de la interacción del oligómero con la APN, el cual facilita la inserción en la membrana [62]. En el oligómero insertado en la membrana, solo el dominio I está protegido de la desnaturalización por calor, sugiriendo que este puede estar insertado dentro de la membrana en contraste con los dominios II y III que quedarían fuera de la membrana [67].

#### 1.5.4.1. Modelos de inserción de la toxina en la membrana.

Con base en el conocimiento que se tiene acerca de la inserción de otras toxinas bacterianas formadoras de poro [69, 70] se han propuesto dos modelos posibles de la inserción de las toxinas Cry en la membrana (Fig. 8). Un primer modelo (modelo del abrecartas) propone que las  $\alpha$ -hélices 5 y 6 se insertan en la membrana como consecuencia de un cambio conformacional disparado por el receptor, sin mayor participación de las hélices y dominios restantes. El otro modelo (modelo de sombrilla) plantea que después de la unión con el receptor, se inserta en la membrana la región de la toxina compuesta por las hélices  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5, mientras que el resto de las hélices se aplanan sobre la superficie de la bicapa lipídica exponiendo hacia ella su cara hidrofóbica, quedando la molécula en forma parecida a una sombrilla [39].



**Figura 8. Modelos de inserción de las toxinas Cry en la membrana del intestino medio de los insectos susceptibles [39]. A) Modelo del abrecartas y B) modelo de sombrilla.**

Mediante mutaciones puntuales por residuos de cisteína en el dominio I de la toxina Cry1Aa, con el fin de formar puentes disulfuro artificiales entre algunas hélices del dominio I y así restringir el movimiento de la hélice  $\alpha$ -5, se observó que a diferencia de la proteína silvestre, las mutantes fueron capaces de formar poros solamente en presencia de un agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol) que rompe los puentes disulfuro, lo que puso de manifiesto la necesidad de que las hélices  $\alpha$ 4 y  $\alpha$ 5 conserven flexibilidad en su estructura para una inserción y formación eficiente del poro [71]. En este mismo estudio se demostró que un prerequisite para la formación del canal es la separación del dominio I del resto de la molécula, ya que la mutante con un puente disulfuro en la interfase dominio I-II fue incapaz de formar canales en su estado oxidado.

Además, se han aislado algunas mutantes en el dominio I afectadas en la unión irreversible y se propone que estas mutantes son incapaces de insertarse en la membrana, ya que involucran la introducción de una carga negativa (A92D) [72], o bien, la eliminación de una carga positiva (R93) [73]. Ambas mutantes se localizan en la cara inferior del dominio I que está expuesto hacia la membrana y se propone que estos cambios evitarían la interacción con la membrana, quien tiene carga negativa.

#### **1.5.5. Citólisis.**

Se ha propuesto que las proteínas Cry causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH y por citólisis osmótica [74].

Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto causa a su vez que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen intestinal y el citoplasma. Se considera que el efecto más devastador de este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que esto interfiere con el metabolismo celular normal, que tiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células columnares y caliciformes se destruyen, las esporas de *Bt* tienen acceso a la hemolinfa, medio en el que proliferan. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y de la proliferación de las bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia [45].

## 2. ANTECEDENTES PARTICULARES.

### 2.1. Papel de las hélices $\alpha$ -3 y $\alpha$ -4 en el mecanismo de acción de las toxinas Cry.

En experimentos de desplegamiento parcial del oligómero de la toxina Cry1Ab en presencia de diferentes molaridades de urea y la posterior proteólisis con proteinasa K, se encontró que algunas de las hélices del dominio I de la toxina Cry1Ab podrían estar involucradas en la interacción monómero-monómero dentro de la estructura oligomérica y en la inserción del oligómero en la membrana [67].

#### 2.1.1. Hélice $\alpha$ -4.

Para entender el papel que tiene la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I dentro del mecanismo de acción de las toxinas Cry1A, en trabajos previos se han aislado algunas mutantes puntuales en las cuales se sustituyeron los residuos de aminoácidos cargados que no estuvieran involucrados en la formación de puentes salinos dentro de esta hélice en la toxina Cry1Aa, por un aminoácido neutral, o bien, por uno de carga opuesta (posiciones R127, E129, R131, D136) y se evaluaron los efectos de dichas mutaciones sobre algunos parámetros de la toxina como: la unión a BBMV, la permeabilidad a diferentes solutos en bicapas lipídicas o en BBMVs, mediante light-scattering y su toxicidad sobre larvas de *M.sexta* y *Plutella xylostella* [75, 76].

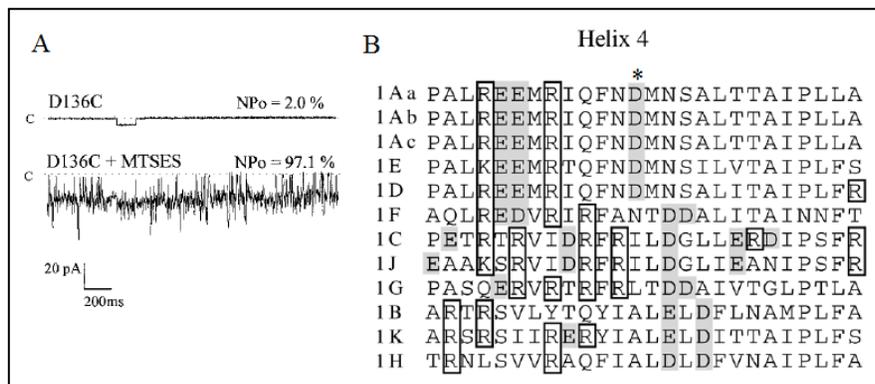
Cabe mencionar que en dichos trabajos solo se sustituyeron los residuos cargados debido a que se ha visto que los aminoácidos cargados juegan un papel muy importante en la regulación de muchos de los canales iónicos para el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y para algunos nucleótidos.

De estos trabajos se encontró que la mayoría de las mutantes no tóxicas dentro de la hélice  $\alpha$ -4 (E129K, R131Q, R131D, D136N, D136C) presentan defectos en la formación y/o actividad de poro ya que perdieron la conductancia en bicapas lipídicas planas. Además, ninguna de las mutantes no tóxicas mostró alteraciones en los patrones de disociación de las BBMVs (medido por resonancia de plasmones superficiales, BIACORE), sugiriendo que dichas mutantes, al igual que la toxina silvestre, fueron capaces de interactuar con los receptores presentes en la membrana de las BBMVs [75].

Debido a que la mutante R131H siguió siendo tóxica sobre las larvas de *M. sexta* (aunque a un nivel menor que la toxina silvestre) y a que formó poros con menor tamaño y con una permeabilidad diferencial hacia ciertos solutos con diferentes cargas y tamaños (como la sacarosa, la rafinosa, el gluconato de potasio, y el N-metil-D-glucamina-HCl), se sugiere que la hélice  $\alpha$ -4 es importante en la formación del poro y/o en la determinación de sus propiedades y arquitectura [76].

Las mutantes T142D y T143D, que si bien no son residuos cargados, también mostraron un efecto de pérdida de toxicidad y de formación de poro [76].

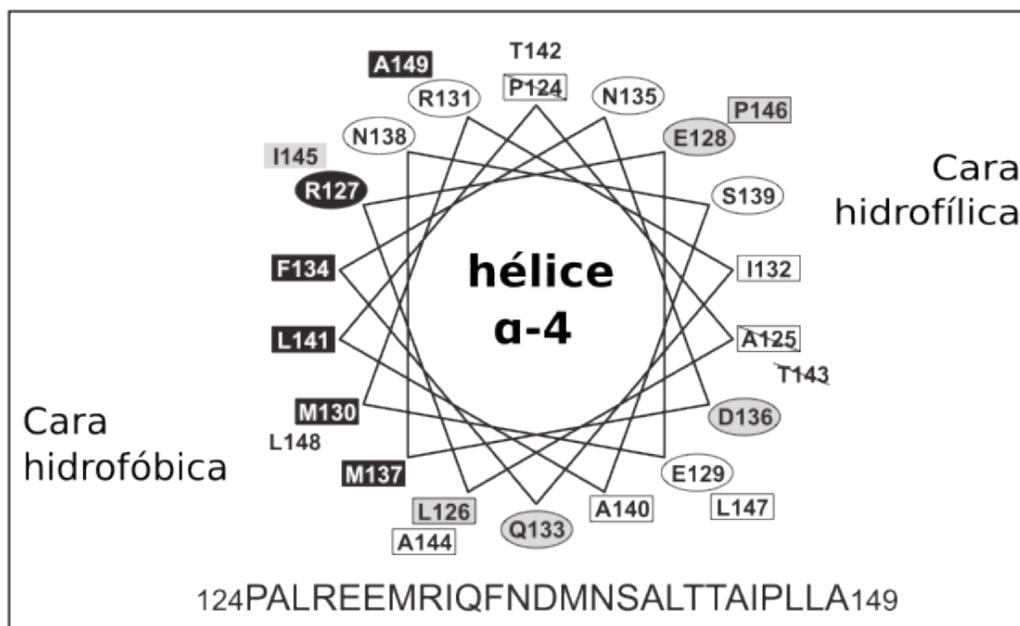
En el caso de la mutante no tóxica D136C, que perdió la capacidad de formación de poro, se demostró que si se reconstituye la carga negativa de este residuo utilizando MTSES (reactivo con carga negativa que reacciona con los grupos tiol presentes en la cisteína confiriéndoles una carga negativa), se regenera la capacidad de dicha mutante para formar poros en membranas lipídicas artificiales (Fig. 9A). Este dato junto con la conservación de dicho residuo en la misma posición (o bien a dos posiciones de distancia) entre las diferentes toxinas Cry1 (Fig. 9B) sugiere que este residuo en la hélice  $\alpha$ -4 está orientado hacia el lumen del poro iónico formado por la toxina y que dicho residuo podría jugar un papel importante en la regulación del paso de los iones a través del canal [75].



**Figura 9. A) Conductancia en bicapas lipídicas planas de la toxina mutante D136C.** Se observa que al agregar el compuesto MTSES se restablece la conductancia de dicha mutante en las bicapas lipídicas planas. La probabilidad de apertura del canal se muestra en la parte superior. **B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de algunas de las toxinas Cry1.** Se observa que el residuo de aspártico (marcado con un asterisco en la parte superior) se encuentra muy conservado entre varias de las toxinas Cry1. Figuras tomadas y modificadas de Masson L, *et al.*, 1999.

Recientemente Girard y colaboradores (2008) realizaron una mutagénesis puntual extensiva de la hélice  $\alpha$ -4, sustituyendo cada uno de sus residuos por cisteína para evaluar su papel en la determinación de las propiedades del poro (como formación de poro y permeabilidad a distintos solutos) y en la toxicidad sobre larvas de *M. sexta*. Los parámetros anteriores se evaluaron mediante experimentos de SCAM (Substituted Cysteine Accessibility Mutagenesis), light-scattering con BBMV de *M. sexta* y bioensayos con larvas de este mismo insecto.

Observaron que en la mayoría de las mutantes aisladas se afectó la toxicidad y la habilidad de formación poro. En general, las mutaciones dentro de muchos de los residuos localizados hacia la cara hidrofóbica de la hélice  $\alpha$ -4 influyeron muy poco en la actividad de la toxina (posiciones R127, M130, F134, M137, L141, I145 y A149) mientras que las mutaciones en muchos de los residuos situados en lado hidrofílico de la hélice  $\alpha$ -4 afectaron en diferentes grados la toxicidad (R131, N135, A144 y L147, entre las más afectadas) y la actividad de poro de las toxinas (R131, I132, Q133, N135, N138, S139, A140, T142, A144 y L147, entre las más afectadas) (Fig. 10).



**Figura 10. Efecto de las mutaciones puntuales en los residuos de la hélice  $\alpha$ -4 sobre la actividad de poro de la toxina.** Los aminoácidos polares se muestran en óvalos (situados hacia la parte hidrofílica de la hélice) y los no polares en cuadros (situados hacia la parte hidrofóbica de la hélice). El efecto de la sustitución de cada uno de los residuos por cisteína, sobre la habilidad para formar poros se muestra mediante los diferentes colores. En negro se muestran las mutantes con una actividad de formación de poro similar a la de la toxina silvestre. En blanco se muestran los residuos sobre los cuales las mutaciones afectaron severamente la actividad de formación de poro. En gris se muestran aquellas mutantes que se afectaron en un grado intermedio. Los residuos con una línea diagonal no fueron mutados ni analizados. Modificado de Girard *et al.*, 2008.

Cabe mencionar que para muchas de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 y de la  $\alpha$ -3 afectadas en toxicidad reportadas en trabajos previos [75–78] no se evaluaron aspectos como la unión a los receptores caderina o APN, la formación de oligómero, ni la inserción en la membrana del oligómero, por lo que para varias de ellas hace falta dicho análisis para poder entender claramente el papel que tienen estas hélices dentro del mecanismo de acción de la toxina, particularmente en los procesos de oligomerización e inserción en la membrana.

El encontrar el paso preciso dentro del mecanismo de acción en el cual están afectadas las mutantes no tóxicas nos ayudará a comprender mejor dicho mecanismo, y posiblemente en el diseño de nuevas toxinas con mayor toxicidad, las cuales podrán ayudar a resolver los casos de resistencia de los insectos blanco hacia las toxinas surgidos en el campo.

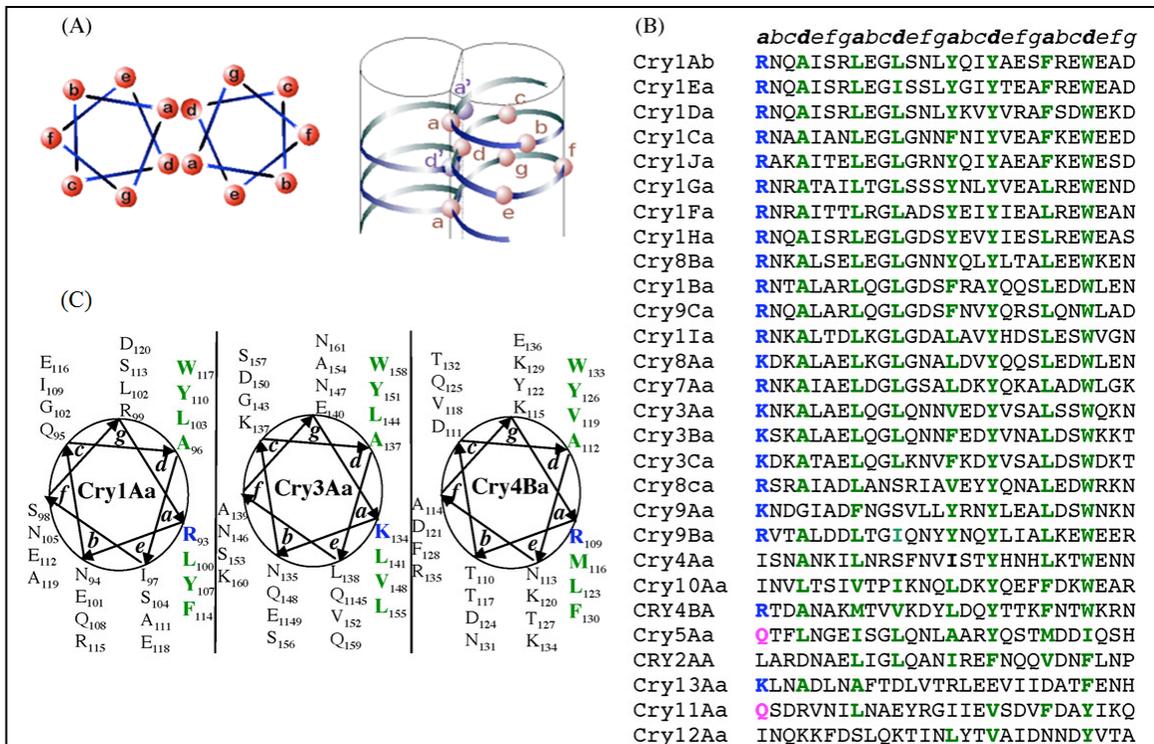
### 2.1.2. Hélice $\alpha$ -3.

En cuanto a la hélice  $\alpha$ -3, Vachon *et al.* (2002) reportaron que la mayoría de las mutantes aisladas mediante la sustitución de los residuos cargados, que no participan en la formación de los puentes salinos, por un aminoácido de carga opuesta o neutral (E101C, E101K, E101Q, E116Q, E116C, E116K, E118Q, E118C, E118K) no presentaron mayores cambios en la toxicidad ni en su permeabilidad a diferentes solutos dentro de bicapas lipídicas, pero mostraron una disminución en la velocidad de formación de poro en las BBMV's (E101C, E101K, E116K y E118C, entre las más afectadas), indicando que esta hélice juega un papel importante en la integración del poro en la membrana. Sólo las mutaciones en la posición R99 (R99E, R99C, R99Y) perdieron por completo la actividad de poro.

En el 2007 Jiménez-Juárez *et al.*, propusieron que la hélice  $\alpha$ -3 del dominio I (particularmente los residuos R99 y Y107) participan en el proceso de oligomerización de la toxina mediante la formación de estructuras de tipo coiled-coils o zippers de leucinas, debido a que dicha hélice (junto con la hélice  $\alpha$ -6) presenta grandes probabilidades de formar ese tipo de estructuras [79].

Los coiled-coils están presentes en más de 300 proteínas y participan en procesos como: unión a ADN, unión proteína-proteína, oligomerización, regulación de la transcripción genética, contracción muscular, transporte vesicular y entrada de virus. Están formados por dos a cinco hélices anfipáticas que se enrollan unas sobre otras generando un súper enrollamiento [80] y presentan una secuencia primaria que consiste de una héptada de residuos de aminoácidos que se repiten periódicamente, denotados por las posiciones *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* y *g*, en la cual hay residuos no polares en las posiciones *a* y *d*, y residuos polares en las posiciones *g* y *e* (fig. 11A). Esta distribución de los residuos de aminoácidos no polares en las posiciones *a* y *d*, y polares en *g* y *e*, se correlaciona con un alineamiento y orientación correctos, y con la selectividad y estabilidad presentados por los coiled-coils. Además, un puente salino dentro de la hélice alfa que forma el coiled-coil estabiliza la estructura y es muy importante durante el comienzo del zipper de leucina.

Partiendo de lo anterior, Jiménez-Juárez *et al.*, en 2007 aislaron algunas mutantes de la toxina Cry1Ab en las posiciones *a*, *d* y *g* de los coiled-coils predichos para la hélice  $\alpha$ -3, y a diferencia de los trabajos previos con mutantes dentro de esta hélice, además de analizar la toxicidad sobre larvas de *M. sexta* y formación de poro, también analizaron la capacidad de las mutantes aisladas para formar la estructura oligomérica, así como la interacción de estas mutantes con el receptor caderina.



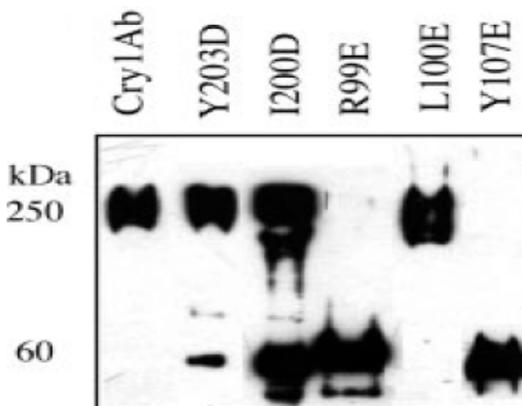
**Figura 11. Coiled-coils putativos en las toxinas Cry1Ab.**

A) Representación de la estructura de los coiled-coils y las posiciones a, b, c, d, e, f y g dentro de dicha estructura.

B) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a la hélice  $\alpha$ -3 de diferentes toxinas Cry. Las letras en verde corresponden a los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, en azul se muestran los residuos cargados positivamente y en rosa los aminoácidos polares.

C) Representación de las estructuras de los coiled-coils putativos para la hélice  $\alpha$ -3 de algunas toxinas Cry y ubicación de los residuos de aminoácidos en las héptadas de residuos (a, b, c, d, e, f y g) dentro del coiled-coil. Se observa que los residuos de los aminoácidos situados en las posiciones a y d de los coiled coils predichos están muy conservados entre las diferentes toxinas [81].

En dicho trabajo se encontró que las mutantes no tóxicas R99E y Y107E en las posiciones g y a de los coiled-coils, respectivamente, no podían formar estructuras oligoméricas estables de 250 kDa (Fig. 12) y que aunque su capacidad de unión al receptor caderina no se afectó, sí perdieron la actividad de formación de poro en bicapas lipídicas, lo cual aportó evidencias de que esta hélice estaba involucrada en el mecanismo de oligomerización de las toxinas Cry1A y al mismo tiempo reafirmó el hecho de que el oligómero es un intermediario obligado en el proceso de intoxicación de la toxina Cry1Ab y que la unión al receptor caderina no es suficiente por sí misma para causar la muerte del insecto [79].



**Figura 12. Análisis de la formación del oligómero de algunas mutantes de la toxina Cry1Ab mediante Western Blot.** Se observa que las mutantes R99E y Y107E dentro de la hélice  $\alpha$ -3 no son capaces de formar la estructura oligomérica prepórica estable de 250 kDa, a diferencia de como lo hace la toxina Cry1Ab silvestre. Modificado de Jiménez-Juárez et al., 2007.

Así, las posiciones *a*, *d* y *g* dentro del coiled-coil predicho para la hélice  $\alpha$ -3 podrían jugar un papel muy importante en las interacciones proteína-proteína del oligómero formado por las toxinas Cry1A, debido a que las toxinas Cry1Ab mutadas en dichas posiciones presentan estructuras oligoméricas muy inestables y pérdida de la toxicidad hacia larvas de *M. sexta* [79].

## 2.2. Fenotipo de dominancia negativa presentado en la toxina del ántrax.

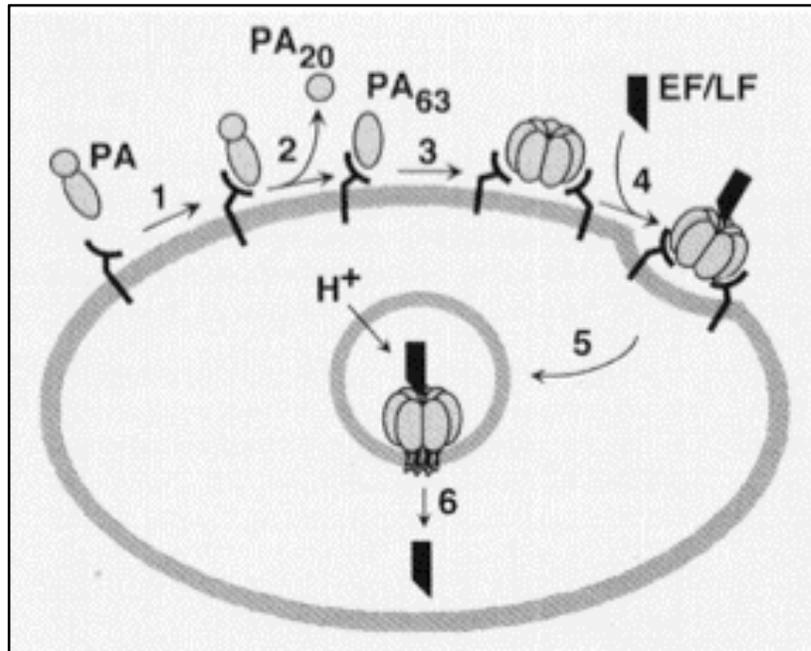
La toxina del ántrax tiene un mecanismo de acción muy similar al de las toxinas Cry de tres dominios. Esta toxina es procesada enzimáticamente después de unirse a su receptor, induciendo con esto la oligomerización y la formación de un heptámero que se inserta en la membrana celular formando un poro por donde pasan los factores tóxicos hacia el citoplasma celular (Fig.13).

Sellman *et al.*, y Singh *et al.* [82, 83], trabajando con la toxina del ántrax, mostraron que es posible convertir alguna de las subunidades de una proteína oligomérica, en un potente inhibidor de la acción de la toxina mediante la introducción de algunas mutaciones en dicha subunidad, siendo en este caso el antígeno protector del ántrax (PA) el blanco de estas mutaciones.

Estos autores obtuvieron algunas mutantes del PA del ántrax (mutante doble, mutante deletada y mutantes simples F427A o D425K) capaces de unirse al receptor y formar oligómeros, pero afectadas en la actividad de formación del poro, en la inserción en la membrana y en la translocación mediada por oligómero del factor del edema (EF) y del factor letal (LF), hacia el citoplasma celular. Posteriormente, para ver si estos PA mutantes presentaban el fenotipo de dominancia negativa sobre la toxina silvestre del ántrax, hicieron mezclas de monómeros silvestres del PA con monómeros mutados del PA (en relación 1:1 o aún en relación 1:0.25) obteniendo así hetero-oligómeros no tóxicos, debido a que los

monómeros mutantes presentes en dichos hetero-oligómeros interferían con la translocación del factor letal y del factor del edema, hacia el citoplasma celular.

Estos resultados en conjunto con los obtenidos en otras toxinas muestran que cabe la posibilidad de obtener diferentes formas dominantes negativas en otros factores de virulencia que involucran procesos de oligomerización dentro de su mecanismo de acción, como en el caso de las neurotoxinas botulínicas [84], y de las toxinas Cry de tres dominios, entre otras.



**Figura 13. Mecanismo de acción de la toxina del ántrax.** 1) El antígeno protector de la toxina del ántrax (PA) se une a su receptor situado en la superficie de la célula blanco. 2) Algunas proteasas del tipo de la furina cortan el PA, eliminando un segmento de 20 kDa en el lado N-terminal (PA20). 3) El PA63 unido al receptor oligomeriza para formar un preporo heptamérico. 4) El factor letal (LF: metaloproteasa dependiente de zinc) y/o el factor del edema (EF: adenilato ciclasa dependiente de calmodulina) se unen al preporo. 5) El complejo preporo-LF/EF es llevado hacia el interior celular mediante endocitosis mediada por el receptor, hasta situarse dentro de un endosoma, en donde, 6) la disminución en el pH hace que el preporo se inserte en la membrana endosomal, forme el poro y pueda translocar el LF y/o el EF hacia el citosol. (Tomado de Sellman BR, Mourez RM y Collier RJ, 2001).

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Las toxinas Cry son ampliamente utilizadas para control biológico de insectos plaga de cultivos agrícolas. Mucho se ha discutido sobre su inocuidad hacia mamíferos y otros animales como aves y peces. Sin embargo existen algunos reportes que mencionan que las toxinas Cry podrían ser tóxicas a otros insectos no plaga u otros organismos acuáticos como las esponjas marinas [85–87]. El conocer cómo es que las toxinas Cry pueden matar a sus organismos blanco a un nivel molecular, nos puede permitir el mejoramiento de estas toxinas y el diseño de estrategias para inhibir su toxicidad (en el caso de que esto fuera necesario), tal es el caso de la creación de mutantes dominantes negativas de las toxinas Cry, las cuales en un momento dado se podrían utilizar para evitar el daño de las toxinas Cry a otros organismos en ecosistemas muy particulares, como por ejemplo en sistemas marinos, como una manera de inactivar la toxicidad de las toxinas Cry.

### **4. HIPÓTESIS.**

Las proteínas Cry1A son toxinas formadoras de poro que requieren oligomerizar para ser funcionales. Así, las mutantes de las toxinas Cry1A afectadas en la formación de poro, pero capaces de formar oligómeros, tendrán un fenotipo dominante negativo que permitirá inactivar la toxicidad de las toxinas Cry1A silvestres al formar con ellas hetero-oligómeros no funcionales.

## 5. OBJETIVOS.

### 5.1. Objetivos generales.

1. Analizar la formación de oligómeros y la unión al receptor de algunas mutantes del dominio I de la toxina Cry1A afectadas en toxicidad y formación de poro.
2. Analizar si las mutantes de la toxina Cry1A, afectadas en la formación de poro, pueden tener un fenotipo de dominancia negativa que inactive la toxicidad de la toxina Cry1A silvestre.

### 5.2. Objetivos particulares.

1. Construir algunas mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, expresarlas en la cepa acristalífera de *Bacillus thuringiensis* (Bt 407) y purificarlas a partir de dicha cepa bacteriana.
2. Analizar el efecto tóxico de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab sobre larvas de *Manduca sexta* del primer instar de desarrollo, mediante bioensayos.
3. Comparar la activación enzimática de las proteínas mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, mediante tratamiento proteolítico, con respecto a la activación de la toxina Cry1Ab silvestre.
4. Analizar la unión al receptor caderina de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab mediante el ensayo de ELISA.
5. Analizar la formación de oligómeros de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.
6. Analizar la capacidad de las mutantes construidas para presentar un fenotipo de dominancia negativa, inactivando el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab sobre larvas de *M. sexta*.

## 6. MATERIALES.

### 6.1. Cepas utilizadas.

\***Bt-407<sup>+</sup> Cry1Ab**: Cepa de *B. thuringiensis* que contiene el plásmido pHT315Ab que expresa la protoxina Cry1Ab (confiere resistencia a eritromicina cuando se clona en Bt)

\***Bt-407<sup>-</sup>**: Es una cepa acristalífera de *B. thuringiensis*, derivada de la línea silvestre de *B.thuringiensis* 407+, que no contiene plásmido alguno que exprese a la proteína Cry, por lo que no produce cristal proteico.

\***DH5 $\alpha$** : Cepa competente de *E. coli*, utilizada en este trabajo para replicar los plásmidos pHT315Ab.

*Genotipo*: F- $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda$ <sup>-</sup> (Invitrogen).

\***SC110**: Cepa de *E.coli* que carece de las metilasas Dam y Dcm, las cuales se encuentran presentes en muchas líneas de *E. coli*. La metilasa Dam reconoce la secuencia GATC en el ADN y metila el residuo de adenina en la posición N-6. Dcm reconoce la secuencia CCAGG en el ADN y metila el residuo de citosina en la posición C-5. Esta cepa también carece de endonucleasa (*endA*), por lo que mejora el rendimiento y calidad de la extracción de ADN .

*Genotipo*: *rpsL* (Strr) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44*  $\Delta$ (*lac-proAB*) [F' *traD36 proABlacIqZ* $\Delta$ M15]. (Los genes enlistados representan alelos mutantes, los genes en el episoma F' son silvestres) (Stratagene).

### 6.2. Medios de cultivo.

#### **Medio LB (Luria-Bertani)**

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

Aforar a 1 litro con agua destilada y ajustar el pH a 7 con NaOH 5M. Para el medio sólido, agregar el agar al final. Esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq y una vez frío el medio, agregar el antibiótico correspondiente (ampicilina a una concentración final de 200  $\mu$ g/ml (LBamp<sup>200</sup>) o bien, eritromicina a una concentración final de 15  $\mu$ g/ml (LBEri<sup>15</sup>).

**Medio TB "Terrific Broth"**

Bacto-triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol concentrado	4 ml

Aforar a 900 ml con agua destilada. Esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq y una vez frío el medio, agregar 90 ml de la solución de sales de fosfatos y ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml (TBamp<sup>100</sup>).

Solución de sales de fosfatos

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.56 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.3 g

Aforar a 100ml con agua destilada y esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq.

**Medio de esporulación HCT (de hidrolizado de triptona caseína)**

Bacto-triptona	2.5 g
Bacto-casaminoácidos	1 g
Bacto-agar	7.5 g

Aforar a 446 mililitros con agua destilada. Después, ajustar el pH a 7.25 con KOH 5M. En el caso del medio sólido agregar el agar al final. Esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq. Una vez frío el medio, agregar las siguientes soluciones previamente esterilizadas.

Solución I	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.8 g	Disolver en 100ml de agua destilada Agregar 25ml
Solución II	MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1.23 g	Disolver en 100 ml de agua destilada Agregar 0.5 ml
	MnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	0.017 g	
	ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.14 g	
Solución III	FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.2 g	Disolver en 100 ml de agua destilada Agregar 5 ml
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N	10 ml	
Solución IV	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.47 g	Disolver en 100 ml de agua destilada Agregar 15 ml
Glucosa al 10% p/v			Agregar 15 ml

Por último, agregar eritromicina a una concentración final de 15 µg/ml (HCTEri<sup>15</sup>) en el caso de ser necesario.

**Medio BHI (Brain Heart Infusion)**

Bacto-BHI dihidratado	37 g
-----------------------	------

Aforar a 1L con agua destilada. Esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq

**Medio SOB**

Bacto-triptona	20 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g
KCl	186 mg
Bacto-agar	15 g

Aforara a 1L con agua desionizada y ajustar el pH a 7 con NaOH 5M. Esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq. Una vez estéril y frío, adicionar 10ml de MgCl<sub>2</sub> 1M ó MgSO<sub>4</sub> 1M estéril.

**Medio SOC**

Adicional 50ml de glucosa al 50% p/v por cada litro de medio SOB.

**YENB**

Bacto-Extracto de levadura	7.5 g
Bacto-Nutrient Broth	8 g

Aforar a 1L con agua desionizada. Esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq.

## 7. MÉTODOS.

### 7.1. Purificación de las protoxinas Cry1Aa clonadas en *E. coli*.

Para la purificación de las protoxinas Cry1Aa clonadas en *E. coli* y expresadas como cuerpos de inclusión citoplasmáticos, se siguieron 3 protocolos de purificación diferentes (ver Anexo IX). Una vez obtenida la protoxina se cuantificó la concentración proteica total mediante el método de Bradford y se verificó la integridad de la protoxina mediante SDS-PAGE.

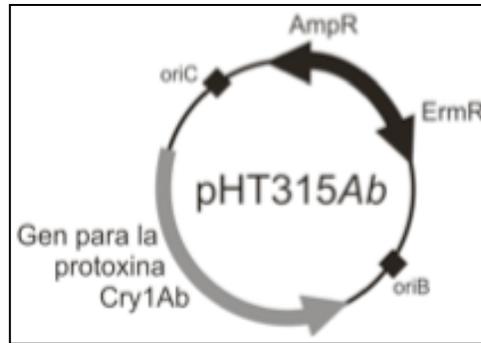
### 7.2. Construcción de mutantes sitio dirigidas dentro del dominio I de la toxina Cry1Ab. Estrategia general.

Se realizaron mutaciones sitio dirigidas sencillas y dobles de algunos aminoácidos de la hélice  $\alpha$ -4 situados putativamente hacia el lumen del poro, según lo reportado por Masson *et al.* (1999) para la toxina Cry1Aa. Para esto, se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes a cada una de las mutantes en el contexto de la toxina Cry1Ab. Los oligonucleótidos para la mutagénesis de la región  $\alpha$ -4 del dominio I fueron diseñados a partir de la secuencia del gen de la protoxina cristalina entomocida de *B. thuringiensis* Cry1Ab1, con número de acceso M13898, y fueron sintetizados en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

**Tabla 1. Oligonucleótidos mutagénicos diseñados para la construcción de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.** En negrita se señala la posición en la cual se realizó el cambio de aminoácido correspondiente a cada mutante.

Mutación	Secuencia del oligonucleótido mutagénico
<b>E129K</b>	5´-CTA ATC CAG CAT TAA GAG AAA AAA TGC GTA TTC AAT TCA ATG AC-3´
<b>D136N</b>	5´-GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT AAT ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC-3´
<b>T143D</b>	5´-CAT GAA CAG TGC CCT TAC AGA TGC TAT TCC TCT TTT TGC AGT TC-3´
<b>T143N</b>	5´-CAT GAA CAG TGC CCT TAC AAA TGC TAT TCC TCT TTT TGC AGT TC-3´

Para la construcción de las mutantes simples y dobles mediante PCR mutagénico (Fig. 15) se utilizó el equipo comercial de mutagénesis dirigida QuickChange® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene (ver Anexo I), para lo cual se usaron como primers los oligonucleótidos mutagénicos purificados por PAGE (ver Anexo VI) y fosforilados, y como templado se usó al plásmido pHT315Ab [88]. Este plásmido contiene la secuencia completa que codifica para la protoxina Cry1Ab1 [40] (con número de acceso M13898 [4]), bajo los promotores P1 y P2 de *B. thuringiensis* y como marcador de selección confiere resistencia a ampicilina a las células de *E. coli* y a eritromicina a las células de *B. thuringiensis* transformadas con él (Fig. 14).



**Figura 14. Vector pHT315Ab de aproximadamente 11.5 kB.**

Posteriormente, se transformaron las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  con 2 $\mu$ l del producto del PCR mutagénico previamente digerido con la enzima Dpn I, que digiere el ADN metilado usado como templado. Se seleccionaron 5 colonias aisladas por mutante, a partir de cada una de las cuales se purificó el ADN plasmídico mediante el Wizard® Plus SV Minipreps ADN Purification System de Promega (ver Anexo II) y se verificó que alguna de ellas hubiera incorporado la mutación deseada mediante secuenciación del ADN plasmídico en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

**Transformación en *B. thuringiensis*.** El ADN plasmídico aislado a partir de las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y que contenía la mutación puntual deseada fue utilizado para transformar a las cepas quimiocompetentes de *E. coli* SC110, con el fin de obtener una mayor cantidad de ADN plasmídico mutado, no metilado y facilitar con ello el subsecuente proceso de transformación en *B. thuringiensis*. Las células transformadas de *E. coli* SC110 se platearon en cajas de LBamp<sup>200</sup> sólido para obtener colonias aisladas.

Se seleccionó una colonia aislada de las cepas de *E. coli* SC110 transformadas y se purificó de nuevo el ADN plasmídico, el cual se utilizó para transformar la cepa acristalífera de *B. thuringiensis* (*Bt* 407<sup>-</sup>). Las cepas transformadas de *Bt* fueron crecidas hasta esporulación en medio HCTEri<sup>15</sup> sólido, por aproximadamente 48-72 horas, después de lo cual se verificó la producción del cristal proteico con ayuda del microscopio óptico y la expresión e integridad de la protoxina mediante SDS-PAGE.

Los cristales proteicos de la toxina Cry1Ab se purificaron mediante gradiente discontinuo de sacarosa, como se explica más adelante.

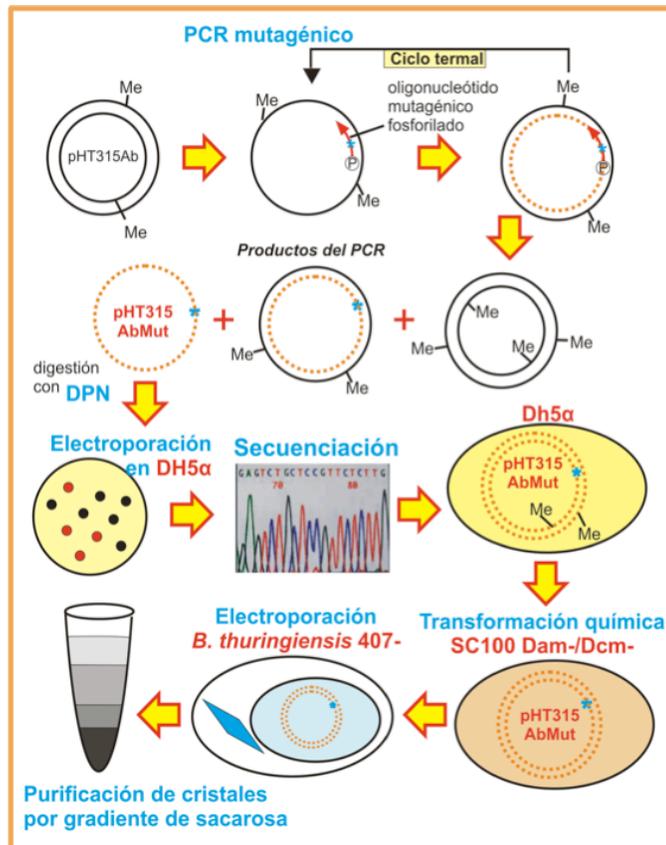


Figura 15. Estrategia general para la obtención de proteínas mutantes de la hélice α-4 de la toxina Cry1Ab expresadas en *B. thuringiensis*.

### 7.2.1. Fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos.

Para la fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos se utilizó la enzima T4PNK (Fermentas) y se partió de una cantidad de 300 picomolas de oligonucleótido previamente purificado por PAGE (ver anexo VI). La mezcla de reacción en un volumen final de 50µl fue la siguiente.

Tabla 2. Reacción de fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos con la enzima T4PNK.

Fosforilación de los oligonucleótidos. Mezcla de reacción (50µl volumen final)	
H <sub>2</sub> O miliQ	Aforar a 50µl
Buffer A para la T4PNK (10x)	5µl
Oligonucleótido mutagénico purificado (anexo VI)	300pmol
Enzima T4PNK	1µl (10 U/µl)

En un tubo eppendorf, los componentes se agregaron y mezclaron suavemente con ayuda de la micropipeta, se dio un breve “spin”, se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos y finalmente se paró la reacción inactivando a la enzima por choque térmico, incubando 20 minutos a 60°C.

### 7.2.2. Reacción de PCR mutagénico.

La reacción del PCR mutagénico se realizó utilizando el QuickChange® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene. La mezcla de reacción para un volumen final de 25µl fue la siguiente.

**Tabla 3. Reacción de PCR mutagénico utilizando el QuickChange® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene.**

PCR mutagénico Mezcla de reacción (25µl volumen final)	
H <sub>2</sub> O miliQ	Aforar a 25µl
Buffer de reacción (10x)	2.5µl
Quick solution	0.75µl
dNTP mix	1µl
ds-ADN templado (plásmido pHT315Ab)	100ng
Oligonucleótido mutagénico fosforilado	125ng
Mezcla enzimática Quick Change®	1µl (2.5 U/µl)

**Tabla 4. Parámetros de ciclaje térmico para la reacción de PCR mutagénico de las mutantes de la hélice α-4 de la toxina Cry1Ab.**

PCR mutagénico Parámetros de ciclaje térmico			
Segmento	Ciclos	Temp.	Duración
I	1	95°C	1 min
II	35	95°C	1 min
		55°C	1 min
		65°C	15 min
III	1	65°C	7 min
IV	1	4°C	2 min

Para eliminar el ADN plasmídico metilado utilizado como templado, se agregó 1µl (10 U/µl) de la enzima de restricción Dpn I por cada 25µl del producto de PCR y se incubó la mezcla a 37°C durante 1 hora.

### 7.2.3. Transformación de las células electrocompetentes de *E. coli* DH5α.

En esterilidad, se tomó una alícuota de de las células electrocompetentes de *E.coli* (ver preparación en anexo III) y se incubaron en hielo hasta descongelarse. Se tomaron 2µl del producto del PCR mutagénico, previamente digerido con la enzima Dpn I, se mezcló muy bien y se transfirió a una cubeta de electroporación fría de 0.1cm (Gene Pulser® Cuvette de Bio-Rad). Se electroporó a 400Ω, 25µF y 1.6 V en el equipo Gene Pulser™ de Bio-Rad.

Para la recuperación, las células electroporadas se resuspendieron en 1ml de medio LB. Se incubó durante 1h a 37 °C y 250rpm.

Una vez recuperadas las células del choque eléctrico, se plaquearon 100µl de la suspensión celular sobre una caja de LB<sup>Eri</sup><sup>15</sup> sólido con ayuda de un asa metálica. Finalmente, las cajas se incubaron a 30°C durante 12h para obtener colonias celulares aisladas.

#### **7.2.4. Secuenciación.**

Para la secuenciación se tomaron 5 colonias aisladas por cada mutante construida, a partir de las cuales se purificó el ADN plasmídico mediante el Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega y se mandó a secuenciar en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, para verificar que el plásmido pHT315Ab de alguna de dichas colonias hubiera incorporado la mutación puntual o doble deseada.

El oligonucleótido utilizado para la secuenciación de todas las mutantes, el cual se une en el ATG que codifica para la metionina inicial del gen de la Protoxina Cry1Ab1 (número de acceso M13898), posee la siguiente secuencia: **5´-GTA ACC CAT GGA TGA TAA CAA TCC GAA C -3´**

#### **7.2.5. Transformación de las células competentes de Ca<sup>2+</sup>, *E. coli* SC110.**

En esterilidad, se tomó una alícuota de de las células de *E. coli* competentes de Ca<sup>2+</sup> SC110 (ver preparación en anexo IV), se incubaron en hielo hasta descongelarse y se les agregaron 15µl (1000ng aproximadamente) del ADN plasmídico pHT315Ab mutante (pHT315Abmut) correspondiente.

Se incubó la mezcla anterior durante 30 minutos en hielo y una vez pasado ese tiempo se le aplicó un choque de calor a 42°C por dos minutos con agitación fuerte en un Thermomixer 5436 de Brinkmann Instruments, Inc.

Las células se incubaron de nuevo en hielo durante 5 minutos y para la recuperación se les agregó 800µl de medio LB y se incubaron a 37°C con agitación durante 1 hora más.

Una vez recuperadas, las células fueron centrifugadas a 10,000 rpm a temperatura ambiente durante 1 minuto, y se eliminaron 900µl del sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en el resto del sobrenadante y esta suspensión se sembró en medio LB<sup>Amp</sup><sup>200</sup> sólido. Se incubó a 37°C durante 8-12h.

Finalmente, se recuperó una de las colonias aisladas transformadas con el plásmido pHT315Abmut correspondiente, para la posterior purificación del ADN plasmídico no metilado mediante el equipo comercial antes mencionado.

### **7.2.6. Transformación de las células de *B. thuringiensis* 407-**

En condiciones de esterilidad, a 350µl de las células electrocompetentes de *B.thuringiensis*, *Bt* 407- (ver preparación en anexo V), se les agregaron 15µl (aproximadamente 1000ng) del plásmido pHT315Abmut no metilado, purificado a partir de las cepas de *E. coli* SC110. La mezcla anterior se incubó en hielo por 5 minutos y se transfirió a una cubeta para electroporación fría de 0.4 cm (Gene Pulser® Cuvette de Bio-Rad) y se electroporó a 1000Ω, 25µF y 2.5V, utilizando el Gene Pulser™ de Bio-Rad.

La cubeta con la suspensión celular se incubó en hielo durante 5 minutos, la suspensión celular se transfirió a tubos falcon estériles de 15 ml y para la recuperación se agregaron 700µl de medio BHI. Se incubó a 30°C y 250 rpm durante 1h.

Una vez recuperadas las células del choque eléctrico, se plaquearon 20µl de la suspensión celular sobre una caja de LB<sup>Eri</sup><sup>15</sup> y se incubó a 30°C durante 12h para obtener colonias aisladas transformadas con el plásmido pHT315Abmut correspondiente a cada una de las mutantes.

### **7.3. Purificación de los cristales de la protoxina Cry1Ab silvestre y de las protoxinas mutantes del dominio I, expresadas en *B.thuringiensis*.**

Para la purificación de los cristales producidos por las cepas de *B. thuringiensis* transformadas con el plásmido pHT315Abmut, correspondiente a cada una de las mutantes, o el pHT315Ab correspondiente a la toxina silvestre, se hizo lo siguiente:

\*Las células de *Bt* transformadas se crecieron en LB<sup>Eri</sup><sup>15</sup> sólido durante 12 horas a 30°C.

\*A partir del cultivo anterior se inocularon 5 cajas de HC<sup>Eri</sup><sup>15</sup> sólido, las cuales se incubaron a 30°C durante aproximadamente 48 a 76 horas, hasta que la mayoría de las células entraran a la fase de esporulación y se observara la producción del cristal proteico parasporal al microscopio óptico.

\*El cultivo anterior se recuperó con ayuda de un asa bacteriológica, se resuspendió en 30 ml de 0.3 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH8. Se centrifugó 10 min a 10,000 rpm y 4°C. La pastilla se resuspendió y se lavó de nuevo en 30 ml del mismo buffer, y se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores. Se repitió este lavado 3 veces y se eliminó el sobrenadante.

\*En el último lavado, la pastilla se resuspendió en 5 ml de buffer TTN (10 mM Tris, 300 mM NaCl, Tritón x-100 al 1% v/v, pH 8). Para obtener más cristales, la muestra se sonicó dando 3 pulsos de 2 minutos al 60% de intensidad con intervalos de 1 min entre cada pulso.

\*Posteriormente, se hicieron los gradientes discontinuos de sacarosa agregando 6 ml de una solución de sacarosa al 84%, en el fondo del tubo, y después se colocaron lentamente 6 ml de las soluciones de sacarosa al 79, 72 y 69%. Dichas soluciones previamente se suplementaron con tritón 0.01% v/v, tris 50 mM y NaCl 10 mM. En seguida se agregaron 2 ml de la suspensión celular sonicada obtenida en el paso anterior y se ultracentrifugaron a 23,000 rpm durante 20 minutos a 15°C, en un rotor de ángulo libre SW28 y una ultracentrífuga Beckman L-80.

\*Se recuperaron las fracciones F1 a F3 (superior a inferior respectivamente) y la interface entre las fracciones F1 y F2: I1, y se observaron al microscopio para recuperar la(s) fracción(es) que contenga(n) a los cristales más puros. Generalmente las fracciones de la parte superior contenían los cristales más limpios.

\*Para eliminar la sacarosa, cada una de las fracciones se lavaron por separado con 30 ml de H<sub>2</sub>O miliQ + tritón x-100 al 0.01% v/v, se centrifugó a 10,000 rpm, a 4°C, durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. La muestra se lavó 3 veces de esta forma.

\*Finalmente, la pastilla se resuspendió en Tris 50 mM pH 8, PMSF 1 mM y los cristales se guardaron a 4°C, hasta su uso.

#### **7.4. Cuantificación de la proteína.**

En un tubo se colocaron 795µl de agua destilada y 5µl de la muestra a cuantificar. La muestra se homogenizó mediante agitación y se le agregaron 200µl del reactivo de Bradford 5x (Bio-Rad). Se incubó durante 5 min y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultraspec II) a una  $\lambda$  de 595 nm. Para obtener el valor de concentración proteica, el valor de absorbancia se interpoló a una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) que abarca un rango de concentraciones de 1 a 10 µg/ml,

#### **7.5. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

Para el análisis de las proteínas Cry1Ab purificadas se utilizó la electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para esto, se prepararon geles de poliacrilamida al 10 u 8%, con un gel concentrador al 5%, como se describe por Laemmli [89]. Se utilizaron como estándares los marcadores de peso molecular de Bio-Rad.

Los geles se corrieron a 10 mA hasta que las muestras se alinearon en el frente de corrida y a partir de ese punto se aplicó una corriente de 20 mA, hasta que el frente de corrida de las muestras salió del gel.

Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie (Bio-Rad).

**Tabla 5. Reactivos utilizados para la elaboración de los geles de SDS-PAGE.**

	Gel de acrilamida		
	gel concentrador (2 ml)	gel separador 8% (5ml)	gel separador 10% (5ml)
H <sub>2</sub> O miliQ	1.4 ml	2.3 ml	2 ml
acrilamida:bisacrilamida (37:1) al 30%	330 µl	1.3 ml	1.7 ml
Tris 1M pH 6.8	250 µl	--	--
Tris 1.5M pH 8.8	–	1.3 ml	
SDS 10%	20 µl	50 µl	
APS 10%	20 µl	50 µl	
TEMED	2 µl	3 µl	2 µl

### **7.6. Solubilización de la protoxina purificada y expresada en *E.coli*.**

Una porción de la pastilla de los cuerpos de inclusión que contenían a la protoxina Cry1Aa silvestre, purificados a partir de *E.coli* (ver protocolo 1 del anexo IX), fueron solubilizados en tres condiciones diferentes de pH: 10.5, 11 y 11.5. Para esto se tomaron aproximadamente 500 mg del pellet con la protoxina y se disolvieron en 1 ml del buffer carbonatos 0.1 M, 10 mM de DTT, ajustado al pH correspondiente. Posteriormente las mezclas de incubaron por 2 horas a 37 °C y agitación constante en un Thermomixer.

Las mezclas se centrifugaron durante 10 minutos a 10 000 rpm y 4°C, después de lo cual se recuperó el sobrenadante que contenía a la protoxina solubilizada, se determinó la concentración proteica total por el método de Bradford y se verificó la integridad de la protoxina por SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10%.

### **7.7. Solubilización de la protoxina purificada y expresada en *B.thuringiensis*.**

Los cristales de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes, purificados mediante gradiente discontinuo de sacarosa, fueron solubilizados en buffer carbonatos 0.1 M para lo cual:

Se centrifugaron 500µg de los cristales proteicos durante 10 minutos a 14 000rpm.

El pellet con los cristales se resuspendió en 200µl de buffer carbonatos pH10.5 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M, NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M), β-mercaptoetanol al 0.05% v/v final y se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación suave en un Thermomixer.

La mezcla anterior se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 10 000 rpm y 4°C. Se recuperó el sobrenadante, el cual contenía a la protoxina solubilizada y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford.

## 7.8. Bioensayos sobre larvas de *M. sexta*.

Para determinar el efecto tóxico de las toxinas mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 que se construyeron, se realizaron bioensayos en los cuales se emplearon diferentes dosis de protoxina soluble o en forma de cristales proteicos, purificados a partir de *B. thuringiensis* (1 ng/cm<sup>2</sup>, 2 ng/cm<sup>2</sup>, 5 ng/cm<sup>2</sup>, 100 ng/cm<sup>2</sup>, 1000 ng/cm<sup>2</sup> y 2000 ng/cm<sup>2</sup>).

Las unidades de las dosis (ng/cm<sup>2</sup>) representan a los nanogramos de toxina con los que se infecta cada centímetro cuadrado de la superficie de la dieta del insecto.

Los bioensayos se realizaron en placas de plástico Corning® (ver figura 32), con 24 pozos de 2cm<sup>2</sup> (una placa por dosis de protoxina), cada uno de los cuales se llenaron con dieta artificial hasta aproximadamente la mitad del pozo. Una vez que la dieta estaba seca, se depositó la dosis correspondiente de protoxina sobre la superficie de la dieta en cada pozo y las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con el fin de que el buffer con el que se administro la protoxina se evaporara.

Posteriormente se colocó una larva de *M. sexta* del 1er instar de desarrollo en cada pozo y la caja se selló por completo con plástico film (reynolds®). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente y con un fotoperiodo de luz-obscuridad de 16:8 horas, durante 7 días, después de los cuales se cuantificó y registró la mortalidad en cada una de las cajas.

Los bioensayos se hicieron por separado para cada una de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.

La concentración letal media (LC<sub>50</sub>), dosis a la cual se observa una mortalidad del 50% de las larvas después un periodo de 7 días, se estimó utilizando el análisis de Probit (Polo-PCLeOra Software)

## 7.9. Activación de la protoxina mediante proteólisis con tripsina.

1) La activación de la protoxina Cry1Aa purificada a partir de *E.coli* y solubilizada a pH 10.5 se realizó en tres condiciones diferentes:

- a) incubando durante 1h en una relación 1:20 de tripsina-protoxina,
- b) incubando durante 1h en una relación 1:50 de tripsina-protoxina,
- c) incubando durante 2h en una relación 1:20 de tripsina-protoxina,

para lo cual, se tomó 1 mg de protoxina solubilizada y se le agregaron 50 $\mu$ l de buffer tris-HCl 1 M, pH 7.4, para ajustar el pH a 8.5 aproximadamente, en el cual la tripsina tiene una actividad óptima.

Posteriormente se agregó la tripsina y se incubó a 37°C con agitación constante en un Thermomixer, en las condiciones a), b) y c), mencionadas anteriormente. Una vez pasado el tiempo de incubación, la tripsina se inactivó agregando PMSF a una concentración final de 1mM. La muestra del tripsinado se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 rpm y 4°C, y se recuperó el sobrenadante que contenía soluble a la toxina de 60 kDa. La concentración

proteica total del sobrenadante se cuantificó por el método de Bradford y se verificó la efectividad de la activación de la protoxina mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10%.

**2)** Para la activación de la protoxina Cry1Ab purificada a partir de *B. thuringiensis* se hizo lo siguiente:

Se tomaron 300µg de protoxina solubilizada y se agregó 1 volumen de buffer tris-HCl 1M, pH 7.4, por cada volumen de la protoxina solubilizada, con el fin de ajustar el pH a aproximadamente 8 u 8.5.

A la mezcla anterior se le agregó la tripsina en una relación en peso de 1:20, tripsina:proteína, y se incubó durante 90 minutos a 37°C con agitación suave en un Thermomixer. La actividad de la enzima fue detenida con PMSF a una concentración final de 1 mM, después de lo cual la mezcla se centrifugó durante 10 min a 14 000 rpm y 4°C.

Se recuperó el sobrenadante que contenía a la toxina soluble, se cuantificó la concentración proteica por el método de Bradford y se verificó la efectividad de la activación mediante SDS-PAGE.

### **7.10. Purificación del anticuerpo scFv73.**

El anticuerpo scfv73 fue purificado a partir de las células de *E.coli* mediante una columna de nickel-agarosa, como se ha descrito previamente [60].

### **7.11. Ensayo de unión de la toxina al receptor caderina.**

Los experimentos de unión de la toxina al 1er receptor caderina se realizaron mediante ensayos de ELISA. Se fijó el fragmento del receptor caderina con los repetidos del 7 a 12 (CADR7-12, que mimetiza al receptor) a la placa para el ensayo de ELISA y posteriormente se unió a este el fragmento tóxico de 60 kDa correspondiente a la toxina silvestre, o bien, a cada una de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 construidas. Después, se unió el anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab a la toxina y, finalmente, la unión de la toxina al fragmento CADR7-12 se reveló mediante un anticuerpo anti-IgG acoplado a peroxidasa. Para lo cual:

Se vertieron 100µl de una solución a 10 µg/ml del fragmento del receptor caderina CADR7-12 en cada pozo de la placa para el ELISA y se incubó durante toda la noche a 4°C, después de lo cual se lavó 3 veces con PBS y se agregaron 200µl de leche descremada al 2% p/v en PBS. Se incubó durante 2 horas a 37°C y se lavó de nuevo 3 veces con PBS.

Se agregó 5 nM de toxina en 100µl de buffer y se incubó durante 1 hora a 37°C, después de lo cual, se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.1% y 2 veces más con PBS.

Se agregaron 100µl del anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab 1:5000 en PBS-Tween 0.1% y se incubó durante 1 hora a 37°C, para posteriormente lavar 3 veces con PBS-Tween 0.1% y 2 veces con PBS.

Se agregaron 100µl del anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa en una relación 1:5000 en PBS-Tween 0.1% y se incubó durante 1 hora a 37°C, después de lo cual se lavó como en el paso anterior.

Para revelar se adicionaron 100µl de una solución 3 mM de OPD mas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.05% en PBS 100 mM, pH5 y se incubó durante 5 minutos.

Finalmente se detuvo la reacción de la enzima agregando 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Los ensayos de unión se hicieron por triplicado para la toxina silvestre y para cada una de las toxinas mutantes sencillas de la hélice α-4.

## 7.12. Oligomerización de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes de la hélice α-4.

Para los ensayos de oligomerización se partió de 2.4 a 7.2µg de protoxina solubilizada (en el caso de la protoxina purificada a partir de *E.coli*), o bien, de 2µg de cristales proteicos (para el caso de la protoxina purificada a partir de *B. thuringiensis*) y el ensayo se realizo en un volumen final de 50µl:

**Tabla 6. Reacción de oligomerización de las mutantes de la hélice α-4 de la toxina Cry1Ab.**

Oligomerización Mezcla de reacción (50 µl de volumen final)		
prototoxina purificada a partir de	<i>E. coli</i>	<i>B. thuringiensis</i>
prototoxina soluble	2.4 a 7.2 µg	
prototoxina en cristales proteicos		2 µg
anticuerpo ScFv73	relación 1:1 (proteína total : anticuerpo)	relación 1:4 (prototoxina: anticuerpo)
liposomas (ver anexo VII)	3 µl del stock	6 µl del stock
buffer carbonatos 0.5M	0.1 M final	0.1 M final
jugo gástrico de <i>M. sexta</i> (ver anexo VIII)	2% v/v final	2% v/v final
H <sub>2</sub> O miliQ	aforar a 50 µl final	aforar a 50 µl final

La mezcla anterior se incubó durante 1 hora a 37°C, con agitación suave en un Thermomixer, después de lo cual se detuvo la actividad de las enzimas del jugo gástrico agregando PMSF a una concentración final de 1 mM.

Posteriormente se ultracentrifugó durante 1 hora a 90 000 rpm y 4°C en una ultracentrífuga OPTIMA™(Beckman) utilizando el rotor TLA 100. El pellet y el sobrenadante se separaron con ayuda de una micropipeta.

El pellet se resuspendió en 20µl de PBS 1x, se corrieron las muestras en un gel desnaturizante de acrilamida al 8% (SDS-PAGE) y se realizó el Western Blot utilizando un anticuerpo policlonal Anti-Cry1Ab, para observar la presencia o ausencia de la banda de 250 kDa, correspondiente a la forma oligomérica de la toxina Cry1Ab.

### 7.13. Western Blot.

Las muestras se separaron por SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 8%, aplicando una corriente de 10 mA durante aproximadamente 30 minutos y 20 mA durante 2 horas.

Posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de Polivinilidenofluoruro (Milipore, Inmovilon™-P, Transfer Membranas, USA) a 350 mA durante 1 hora en una cámara de transferencia (TE22, Hoefer Scientific Instruments), a temperatura ambiente.

La membrana se bloqueó durante 90 minutos con PBS-Tween 20 al 0.05%, con leche descremada al 5%, después de lo cual se lavó dos veces con agua estéril y dos veces con PBS-Tween 20 al 0.05%.

Se incubó con el anticuerpo primario policlonal (anti Cry1Ab en una relación de 1:30,000) durante 90 minutos, se lavó dos veces con agua estéril y dos veces con PBS-Tween 20 al 0.05%.

Para inmunodetectar a las proteínas, se incubó durante 1h con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (en una relación de 1: 45 000).

Para revelar con los reactivos luminiscentes, la membrana fue incubada durante un minuto con el sustrato del Kit Super Signal (Super Signal® chemiluminescent substrate, Pierce) y la señal emitida se detectó con una película fotográfica para quimioluminiscencia (Hiperfilm™, Amsterdam Biosciences).

### 7.14. Ensayos de dominancia negativa.

Para observar si las mutantes construidas de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab podrían presentar un fenotipo de dominancia negativa, se hicieron diferentes mezclas de protoxina (soluble o en cristales proteicos) Cy1Ab silvestre (5ng/cm<sup>2</sup>) junto con la protoxina correspondiente a cada una de las mutantes construidas en la hélice  $\alpha$ -4, en las siguientes relaciones de protoxina silvestre-protoxina mutante: 1) 1:0.25, 2) 1:1 y 3) 1:10.

De esta manera, para cada mutante tendríamos 3 diferentes mezclas de protoxina silvestre-protoxina mutante:

**Tabla 7. Relación de las mezclas de protoxina silvestre y protoxina mutante utilizadas durante el ensayo de dominancia negativa.**

Relación de la mezcla	Protoxina silvestre	Protoxina mutante
1 : 0.25	5 ng	1.25 ng
1 : 1	5 ng	5 ng
1 : 10	5 ng	50 ng

Posteriormente, cada una de las mezclas de toxina fueron administradas sobre la dieta artificial de las larvas contenida en cada uno de los 24 pozos (de 2cm<sup>2</sup> cada uno) de las placas de plástico (Cell Wells, Corning®), de manera similar a como se realizó en los bioensayos, administrando la misma dosis en todos y cada uno de los 24 pozos de las placas de plástico.

Las placas de plástico se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para que el buffer con el que se administró la protoxina se evaporara y posteriormente se colocó una larva de *M. sexta* del 1er instar de desarrollo en cada pozo y la caja se selló por completo con plástico film (reynolds®). Se incubaron a temperatura ambiente y un fotoperiodo de luz-obscuridad de 16:8 horas, durante 7 días, después de los cuales se cuantificó y registró la mortalidad en cada una de las cajas.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

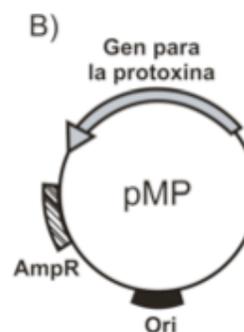
### 8.1. Mutantes sencillas de las hélices $\alpha$ -3 y $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Aa, expresadas en *E. coli*.

#### 8.1.1. Análisis de la oligomerización y unión al receptor caderina de las mutantes de la toxina Cry1Aa clonadas en *E. coli*.

Para analizar el papel que juegan la hélice  $\alpha$ -3 y particularmente la  $\alpha$ -4 dentro de los procesos de unión al receptor caderina, oligomerización y formación de poro de las toxinas Cry1A, comenzamos a trabajar con algunas toxinas Cry1Aa mutantes no tóxicas, clonadas en *E. coli* y expresadas como cuerpos de inclusión (Fig. 16 A)

Las diferentes cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pMP (Fig. 16B), el cual contiene al gen que codifica para la protoxina Cry1Aa silvestre, o bien, al gen para cada una de las protoxinas mutantes Cry1Aa y con un marcador de selección de resistencia a ampicilina, fueron generosamente proporcionadas por el Dr. Luke Masson del Instituto de Investigación Biotecnológica de Montreal, Canadá [75, 90]

Hélice	Residuo	Cambio	Toxicidad	Actividad de poro (pH 10.5)
A) $\alpha$ -3	R99 →	E	-	-
		T	/	/
		Y	-	-
	E118 →	C	-	3 / 4 wt
$\alpha$ -4	E129 →	C	-	-
		K	-	-
	R131 →	D	-	-
		E	1/6 wt	-
		H	-	wt
		Q	1/6 wt	-
	D136 →	C	-	1/3 wt
		N	-	1/8 wt
		Y	-	-
	T142 →	C	/	/
D		-	-	
T143 →	C	/	/	
	D	-	-	



**Figura 16. A) Lista de toxinas mutantes no tóxicas Cry1A clonadas en *E. coli* proporcionadas por Luke Masson.** Se muestran la posición del aminoácido y el residuo por el cual se hizo la mutación de sustitución. Las líneas diagonales son aquellos datos no determinados o no reportados previamente en la literatura. Las fracciones representan a la proporción de toxicidad o actividad de poro reportadas para esas mutantes respecto a la toxicidad y actividad de poro de la toxina silvestre (wt). Los guiones representan la pérdida de toxicidad o de actividad de poro. Datos recopilados de Vachon *et al.*, 2001, 2004 y Masson *et al.*, 1999. Panel **B) Plásmido pMP que contiene el gen completo para la protoxina Cry1Aa y la resistencia a ampicilina.** Modificado de Masson *et al.*, 1989.

Cabe aclarar que las toxinas con las diferentes mutaciones puntuales dentro de la hélice  $\alpha$ -3 y  $\alpha$ 4 fueron elegidas para el análisis debido a que previamente se había reportado que estas mutaciones en la toxina ocasionaban la pérdida de la actividad de poro y/o de la toxicidad [75–77] (Fig.16 A). Pero en estas mutantes no se han analizado aspectos como unión al receptor caderina, formación del oligómero y en algunas, la actividad de poro en bicapas lipídicas.

## **8.1.2. Análisis de la solubilización, activación y formación del oligómero de la toxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E. coli*.**

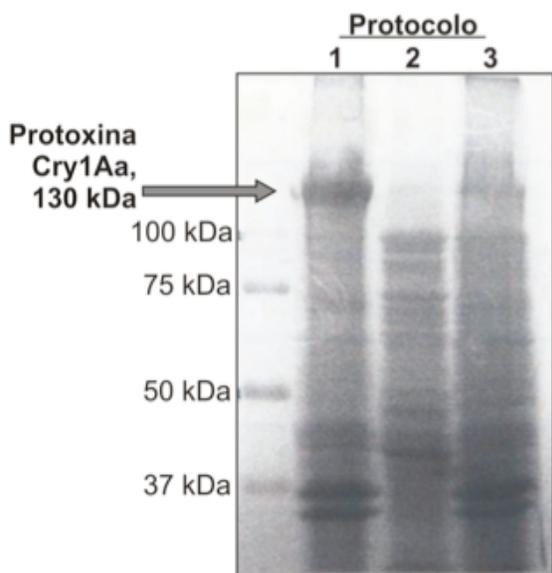
### **8.1.2.1. Purificación de las protoxinas Cry1Aa.**

#### ***Obtención del protocolo de purificación***

Con el fin de encontrar un protocolo de purificación de la protoxina Cry1Aa expresada en *E.coli* que nos diera buenos rendimientos de protoxina pura, y el cual utilizaríamos posteriormente para la purificación de las diferentes toxinas Cry1Aa mutantes proporcionadas, decidimos probar tres protocolos diferentes de purificación (ver anexo IX) para lo cual sólo utilizamos la cepa de *E.coli* transformada con el gen que codifica para la protoxina Cry1Aa silvestre.

Una vez que la toxina Cry1Aa silvestre fue purificada mediante cada uno de los tres protocolos, se cuantificó la concentración proteica total obtenida mediante el método de Bradford y se verificó la integridad y cantidad relativa de la protoxina mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10%, como se menciona en materiales y métodos. De lo anterior observamos que el protocolo con el cual obtuvimos una mayor cantidad de protoxina Cry1Aa silvestre fue el protocolo número 1 (Fig. 17).

Cabe mencionar que aunque la protoxina Cry1Aa silvestre purificada mediante el protocolo 1 no estaba completamente pura, como se puede observar por la presencia de un gran número de bandas de menor tamaño a los 130 kDa, sí estaba presente en mayor cantidad respecto a otras bandas proteicas no correspondientes a la protoxina. Por esta razón, y por la casi nula cantidad de protoxina obtenida con los protocolos 2 y 3 de purificación de la protoxina, fue que decidimos utilizar el protocolo 1 para la posterior purificación de las protoxinas mutantes Cry1Aa expresadas en *E. coli*, como se verá más adelante.



**Figura 17. Rendimiento cualitativo de los protocolos de purificación de la protoxina Cry1Aa silvestre expresada en *E. coli*.** Se cargaron 20 µg/carril de proteína total de la protoxina purificada en cada uno de los 3 diferentes protocolos de purificación, en un gel desnaturalizante de acrilamida al 10% y se tiñó con azul de coomassie. El protocolo número 1 fue aquel con el cual se pudo obtener una mayor cantidad de protoxina, como se puede observar por el grosor relativo de la banda de aproximadamente 130 kDa, correspondiente a la protoxina. Con los protocolos 2 y 3 obtuvimos una muy baja o nula, cantidad de protoxina.

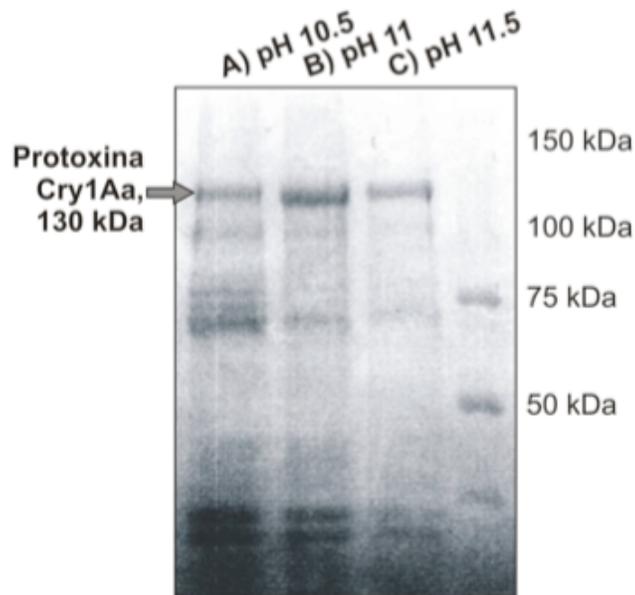
#### 8.1.2.2. Solubilización de la protoxina Cry1Aa silvestre.

Una vez que teníamos purificada la protoxina Cry1Aa silvestre decidimos hacer las pruebas de solubilización y activación mediante procesamiento enzimático con tripsina, para obtener las condiciones en las cuales se solubilizaba y activaba con mayor efectividad. El paso de solubilización también nos serviría para eliminar a varias de las proteínas “contaminantes” no correspondientes a la banda de 130 kDa de la protoxina, las cuales no podrían solubilizarse a pH alcalinos.

El ensayo de solubilización de la protoxina consiste en incubar a la protoxina en un buffer alcalino y reductor a una temperatura de 37°C con el fin de reproducir el paso de solubilización *in vivo* de la protoxina bajo las condiciones alcalinas y reductoras presentes dentro del intestino de las larvas de *M. sexta*.

Así, la protoxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E. coli* fue solubilizada en tres condiciones distintas de pH: 10.5, 11 y 11.5 (ver materiales y métodos), después de lo cual se cuantificó la proteína solubilizada mediante el método de Bradford y se verificó la integridad de la protoxina mediante SDS-PAGE en un gel desnaturalizante de acrilamida al 10% (Fig. 18).

De lo anterior encontramos que la protoxina se solubilizó de manera muy similar en las tres condiciones diferentes de pH, obteniendo rendimientos similares de protoxina soluble. Debido a que en el laboratorio ya se tenían estandarizadas las condiciones para trabajar con protoxina solubilizada a pH 10.5, y ya que este es el pH del presente dentro del lumen del intestino de las larvas de *M. sexta*, fue entonces que decidimos hacer las posteriores solubilizaciones de la protoxina a ese pH.



**Figura 18. Solubilización de la protoxina Cry1Aa silvestre expresada y purificada a partir de *E. coli*.** La protoxina Cry1Aa silvestre expresada en cuerpos de inclusión fue purificada a partir de cultivos de *E. coli* mediante el protocolo 1. Posteriormente se solubilizó en buffer carbonatos 0.1M, 10mM de DTT, ajustado a pH: 10.5 (A), 11 (B) y 11.5 (C). La concentración proteica de las muestras se cuantificó por el método de Bradford y se verificó la efectividad de la purificación y solubilización mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10%, que finalmente se tiñó con azul de Coomassie.

Como se observa por las bandas correspondientes a los 130 kDa, la protoxina se solubilizó de manera similar en las tres condiciones de pH evaluadas. En todos los casos se cargó la misma cantidad proteica en el gel (10 µg/carril).

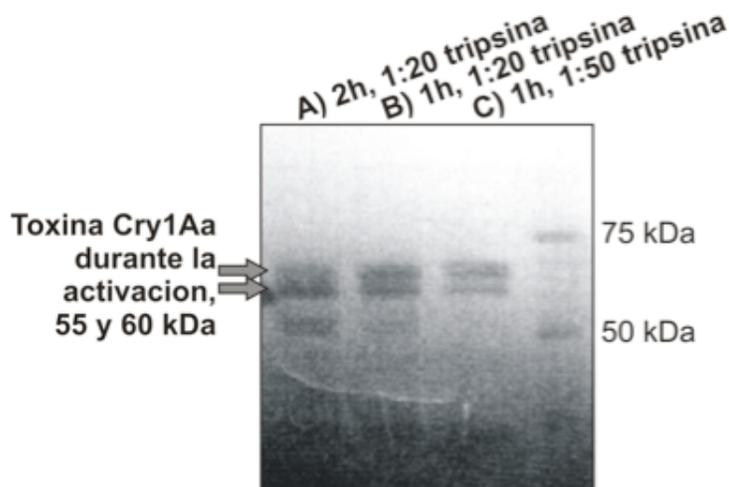
### 8.1.2.3. Activación de la protoxina Cry1Aa silvestre.

El ensayo de activación de la toxina *in vitro* consiste en incubar a la protoxina en un buffer alcalino en presencia tripsina, la cual es una enzima que realiza algunos cortes en los extremos N- y C-terminal de la protoxina liberando al fragmento tóxico de aproximadamente 60 kDa. Esto se hace para mimetizar el efecto de corte que ejercerían las proteasas intestinales del insecto sobre la protoxina solubilizada.

Con el fin de analizar si la protoxina Cry1Aa silvestre era activada correctamente por la tripsina y al mismo tiempo encontrar las condiciones óptimas de activación de la protoxina solubilizada a pH 10.5, decidimos realizar la activación con tripsina en tres condiciones diferentes (ver materiales y métodos):

- \*Incubando durante 2h en una relación 1:20 de tripsina-proteína
- \*Incubando durante 1h en una relación 1:20 de tripsina-proteína
- \*Incubando durante 1h en una relación 1:50 de tripsina-proteína

Posteriormente se cuantificó la concentración proteica total de la muestra que contenía al fragmento tóxico de 60 kDa mediante el método de Bradford y se verificó la efectividad de la activación mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10% (Fig. 19).



**Figura 19. Activación mediante digestión con tripsina de la toxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E. coli*.** La protoxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de cultivos de *E. coli* y solubilizada en buffer carbonatos 0.1M, 10mM de DTT, pH10.5, fue activada incubando con tripsina en tres condiciones diferentes:

A) Incubando durante 2h en una relación 1:20 de tripsina-proteína, B) durante 1h en una relación 1:20, y C) durante 1h en una relación 1:50.

La concentración proteica de las muestras activadas se cuantificó por el método de Bradford y se verificó la efectividad del proceso de activación mediante SDS-PAGE, en un gel de acrilamida al 10%, que finalmente se tiñó con azul de Coomassie.

Como se observa, en las tres condiciones de activación probadas se liberaron fragmentos de aproximadamente 60 kDa, los cuales corresponden al tamaño esperado de la toxina activada. En todos los casos se cargó la misma cantidad proteica en el gel (5 µg/carril).

Como se puede observar en la figura 19, en general, en las tres condiciones probadas, la activación de la protoxina Cry1Aa mediante digestión con tripsina liberó el fragmento tóxico con la misma efectividad, al mismo tiempo que se eliminaron muchas de las proteínas “contaminantes” (no pertenecientes al fragmento de la toxina de aproximadamente 60 kDa) debido a la acción de corte de la tripsina. Así, se estableció que la condición que utilizaríamos para las activaciones posteriores de las protoxinas mutantes sería incubando durante 1 hora en una relación 1:20 de tripsina-proteína.

Lo anterior también indicaba que la proteína Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E.coli* se estaba comportando de manera similar a las protoxinas expresadas y purificadas a partir de *B. thuringiensis*, lo cual nos dio la pauta para comenzar a establecer las condiciones del ensayo de oligomerización *in vitro* de la toxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E.coli*.

#### 8.1.2.4. Análisis de la formación de oligómero de la protoxina Cry1Aa silvestre.

Los ensayos para el análisis de la formación *in vitro* del oligómero de las toxinas Cry1A consisten en incubar a la protoxina Cry1A bajo ciertas condiciones que mimetizan a aquellas condiciones presentes en el intestino medio de los insectos susceptibles a dichas toxinas, con el fin de favorecer la formación de la estructura oligomérica prepóro de la toxina propuesta por nuestro laboratorio, de aproximadamente 250 kDa. Así, la protoxina se incubó a 37°C en presencia de:

**\*Un buffer de solubilización alcalino y reductor:** buffer carbonatos con  $\beta$ -mercaptoetanol, que mimetiza el ambiente alcalino y reductor del intestino del insecto.

**\*Jugo gástrico obtenido de las larvas de *M. sexta*:** que contiene a las proteasas específicas que procesan a la protoxina soluble, liberando el fragmento tóxico de 60 kDa.

**\*El anticuerpo ScFv73:** que mimetiza al receptor caderina, ya que contiene los epítopes de unión a dicho receptor y su unión a la toxina favorece el corte de la hélice  $\alpha$ 1 del dominio I de la toxina y la formación de la estructura oligomérica prepórica.

**\*Liposomas:** que juegan un papel parecido a lo que haría la membrana de las células intestinales del insecto, proporcionando un ambiente hidrofóbico en donde se pueda insertar la forma oligomérica de la toxina.

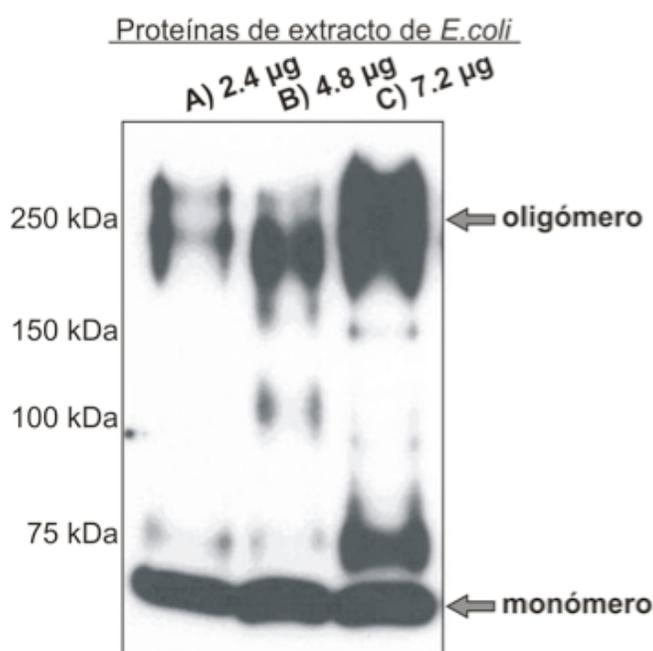
Con el fin de observar si es que algunas de las proteínas “contaminantes” presentes en las preparaciones de la toxina Cry1Ab purificada a partir de *E.coli* podrían intervenir con el proceso de oligomerización, decidimos realizar los ensayos de oligomerización *in vitro* de dicha protoxina.

Debido a que durante los ensayos de oligomerización *in vitro* de las toxinas Cry1A se requiere de una cantidad muy baja de protoxina (en el orden de  $\mu$ g) y a que las condiciones usadas durante dicho ensayo (como son la solubilización proteica a pHs alcalinos y el procesamiento específico por proteasas del jugo gástrico del insecto, ver materiales y métodos) nos permitirían eliminar a muchas de las proteínas “contaminantes” producidas por *E.coli*, fue que decidimos comenzar a montar las condiciones para los ensayos de oligomerización *in vitro* de la toxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E.coli*. El establecer estas condiciones nos serviría posteriormente para los ensayos de oligomerización de las toxinas mutantes Cry1Aa purificadas, como se menciona más adelante.

Los ensayos de oligomerización se realizaron en un volumen final de 50 $\mu$ l, como se menciona en materiales y métodos, incubando diferentes cantidades de la protoxina silvestre Cry1Aa solubilizada a pH 10.5 (2.4  $\mu$ g, 4.8  $\mu$ g y 7.2  $\mu$ g). Posteriormente, la mezcla anterior se ultracentrifugó para obtener pellets membranales constituidos de los liposomas, sobre los cuales se debería de haber insertado la forma oligomérica de la toxina, y dichas muestras se corrieron en un gel desnaturante de acrilamida al 8% (SDS-PAGE). Las proteínas fueron

electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y se visualizó la presencia de la estructura oligomérica mediante Western Blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab (ver materiales y métodos)..

Del análisis anterior, obtuvimos que la estructura oligomérica de la toxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E.coli* se formó sin problema alguno, como se observa por la banda de aproximadamente 250 kDa detectada mediante el Western Blot (Fig. 20). Este resultado, junto con el hecho de que ya habíamos estandarizado las condiciones de purificación, solubilización y activación mediante digestión con tripsina de la toxina Cry1Aa silvestre, nos dio la pauta para comenzar con el análisis de dichos procesos para el caso de las proteínas mutantes Cry1Aa no tóxicas que nos fueron proporcionadas (Fig. 16A).



**Figura 20. Análisis de la formación de oligómero de la toxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E. coli*.** La estructura oligomérica de la protoxina fue producida mediante la incubación de diferentes concentraciones de protoxina solubilizada (A: 2.4 µg, B: 4.8 µg y C: 7.2 µg) con el anticuerpo scFv73 (que mimetiza al receptor caderina) y 2% de jugo gástrico obtenido de las larvas de *M. sexta*, en presencia de liposomas (o PC-SUV: vesículas unilamelares pequeñas de fosfatidilcolina). Los pellets membranales fueron recobrados mediante ultracentrifugación y las muestras fueron corridas en un gel desnaturante de acrilamida al 8% (SDS-PAGE), electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y detectadas mediante Western Blot, usando un anticuerpo policlonal Anti Cry1Ab.

Al parecer no hubo interferencia alguna de las proteínas “contaminantes” sobre la oligomerización de la proteína Cry1Aa purificada a partir de *E.coli*, como se observa por la presencia de la banda con un peso aproximado de 250 kDa, correspondiente a la estructura oligomérica de la toxina Cry1Aa.

### **8.1.3. Análisis de la solubilización, activación y formación del oligómero de las toxinas mutantes Cry1Aa purificadas a partir de *E.coli*.**

#### **8.1.3.1. Purificación de las protoxinas Cry1Aa mutantes.**

Una vez que confirmamos que el protocolo número 1 fue aquel con el cual obteníamos una mayor cantidad de protoxina Cry1Aa silvestre, elegimos comenzar con la purificación de algunas de las protoxinas mutantes Cry1Aa expresadas en *E. coli* (D136N y T143D) utilizando dicho protocolo (ver métodos, y anexo IX). Elegimos comenzar a trabajar con estas mutantes debido a que en reportes previos se había visto que presentan la pérdida casi total de actividad de poro y de toxicidad [75, 76]. Además, ambos residuos se encuentran muy próximos y situados hacia el mismo lado de la hélice  $\alpha$ -4 (Fig. 10), por lo que se nos hacía interesante averiguar si la pérdida de la toxicidad de las mutantes en esos residuos, podría deberse a algún defecto en la solubilización, activación de la toxina, formación de la estructura oligomérica o en la unión al receptor caderina. Nuestra hipótesis inicial a ese respecto era que dichas mutantes (D136N y T143D) presentarían defectos en la oligomerización y que debido a eso perdían la actividad de poro y la toxicidad, pero, como se verá más adelante, encontramos resultados un tanto contradictorios.

Al purificar las protoxinas mutantes Cry1Aa (D136N y T143D), obtuvimos una cantidad sumamente pequeña en relación a la gran cantidad de proteínas con pesos no correspondientes a los 130 kDa. Esto quizá se debía a que las mutaciones estaban interfiriendo de alguna manera con su expresión en *E. coli* o con su estabilidad, como se ha reportado anteriormente para el caso de algunas otras toxinas mutantes Cry1 expresadas en *E. coli* [76, 77, 90]. Así, pensamos que posiblemente la expresión de dichas mutantes era muy poca desde un inicio y que la cantidad de protoxina disminuía aún más debido a su inestabilidad o a que estaban siendo degradadas por algunas proteasas presentes en *E. coli*.

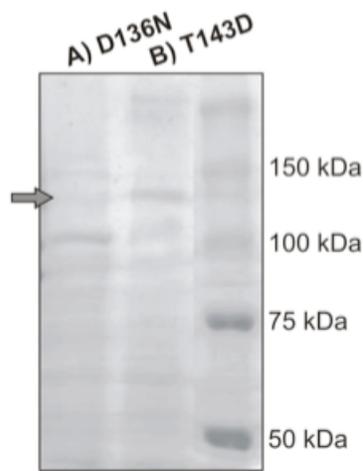
Aún con la poca cantidad de proteína obtenida durante la purificación de las protoxinas mutantes (D136N y T143D), la presencia de proteínas no correspondientes a la protoxina, y debido a que para los ensayos de oligomerización *in vitro* de las toxinas Cry1A se requieren cantidades muy pequeñas de protoxina (en el orden de  $\mu$ g) y a que las condiciones usadas durante dicho ensayo (ver materiales y métodos) nos permitirían eliminar a muchas de las proteínas “contaminantes”, como lo observamos en el caso de la proteína Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E. coli*, fue entonces que decidimos comenzar con los ensayos de solubilización, activación de la toxina mediante digestión con tripsina y oligomerización *in vitro* para estas mutantes no tóxicas.

### 8.1.3.2. Solubilización de las protoxinas Cry1Aa mutantes.

Con el fin de observar si las protoxinas mutantes D136N y T143D purificadas a partir de *E. coli* se solubilizaban correctamente, una vez que purificamos la protoxina de las mutantes D136N y T143D, solubilizamos la protoxina en el buffer alcalino y reductor de carbonatos 0.1 M, 10 mM de DTT, pH 10.5 (como se menciona en materiales y métodos para la protoxina Cry1Aa silvestre purificada a partir de *E. coli*). Posteriormente se determinó la concentración proteica total del sobrenadante que contenía a la protoxina solubilizada, mediante el método de Bradford y se verificó la efectividad de la solubilización mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10% (Fig. 21).

**Figura 21. Protoxina soluble de las mutantes T143D y D136N purificadas a partir de *E. coli*.** Las protoxinas se purificaron mediante el protocolo 1 (anexo IX) y se solubilizaron en buffer carbonatos 0.1 M, 10 mM DTT, pH 10.5. Posteriormente se cargaron 10 µg/carril de proteína total de la muestra que contenía a la protoxina solubilizada, en un gel desnaturante de acrilamida al 10 %.

Se obtuvo una cantidad muy baja de protoxina para las mutantes D136N (A) y T143D (B) en la muestra del solubilizado, como se puede ver por las bandas correspondientes a la protoxina, con un peso aproximado de 130 kDa (señalada mediante una flecha).



Para el caso de las mutantes D136N y T143D purificadas a partir de *E. coli*, encontramos que después del paso de solubilización de la protoxina, obteníamos cantidades sumamente bajas o nulas de protoxina soluble (Fig. 21), lo cual era de esperarse, ya que para la solubilización estábamos partiendo de cantidades iniciales muy bajas de protoxina no solubilizada debido a que su expresión fue muy pobre en *E. coli*.

Sin embargo, aun con la poca cantidad de protoxina solubilizada con la que contábamos, procedimos a realizar los ensayos de oligomerización de estas mutantes ya que, como se mencionó anteriormente, sólo se requiere de una pequeña cantidad de protoxina soluble para realizar dichos ensayos.

### 8.1.3.3. Activación de las protoxinas Cry1Aa mutantes purificadas a partir de *E. coli*.

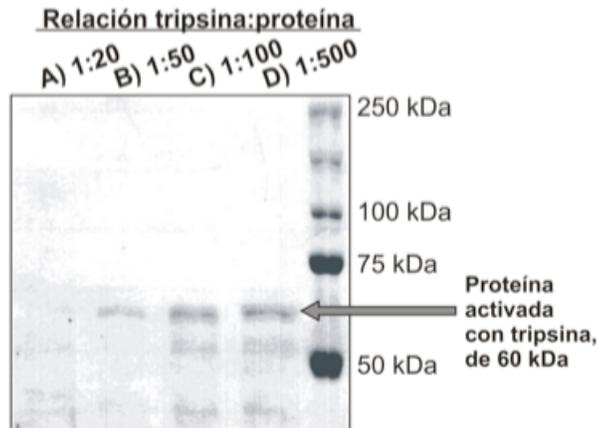
Antes de realizar los ensayos de oligomerización decidimos ver si las mutantes D136N y T143D se procesaban correctamente por la tripsina, liberando el fragmento tóxico de 60 kDa.

Al hacer las activaciones de las protoxinas solubles de las mutantes, incubando con tripsina durante 1 hora, en una relación en peso de 1:20 de tripsina-protoxina (ver materiales

y métodos), nos dimos cuenta que, si bien las proteínas sí estaban liberando el fragmento tóxico de 60 kDa, ambas proteínas eran muy susceptibles a la degradación enzimática.

Por esto decidimos hacer una curva de digestión con tripsina de ambas mutantes en las cuales agregamos la tripsina en diferentes relaciones 1:20, 1:50, 1:100 y 1:500, e incubamos durante 1 hora, para posteriormente cuantificar la concentración proteica total y verificar mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10% la eficiencia de la activación.

De lo anterior observamos que las toxinas eran muy susceptibles a ser degradadas por la acción enzimática de la tripsina (Fig. 22). Este resultado parecía indicar que estábamos obteniendo una cantidad muy pequeña de protoxina en la purificación debido a que quizá las protoxinas mutantes estaban siendo degradadas por la acción de algunas proteasas producidas por *E.coli*, las cuales tenían un gran tiempo para actuar sobre las protoxinas, ya que el tiempo de crecimiento del cultivo bacteriano para la purificación de la toxina era demasiado largo (48 horas, protocolo 1 del anexo IX).



**Figura 22. Curva de activación mediante digestión con tripsina de la protoxina mutante T143D purificada a partir de *E. coli*.** La protoxina mutante solubilizada en buffer carbonatos pH10.5 fue activada mediante digestión con tripsina, agregando diferentes cantidades de tripsina en relación a la cantidad de protoxina (A. Relación 1:20, B. 1:50, C. 1:100 y D. 1:500), posteriormente la eficiencia de la activación se verificó mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10%, que se tiñó con azul de Coomassie.

Se observa una cantidad muy pequeña de proteína, pero aún así se puede notar que la protoxina es procesada liberando el fragmento tóxico de 60 kDa, el cual es degradado a mayores cantidades de tripsina (Relación 1:20 y 1:50). La curva de activación de la mutante D136N muestra un patrón de degradación similar al presentado por la mutante T143D, por lo cual no se incluyó la imagen.

#### 8.1.3.4. Análisis de la formación del oligómero de las toxinas Cry1Aa mutantes.

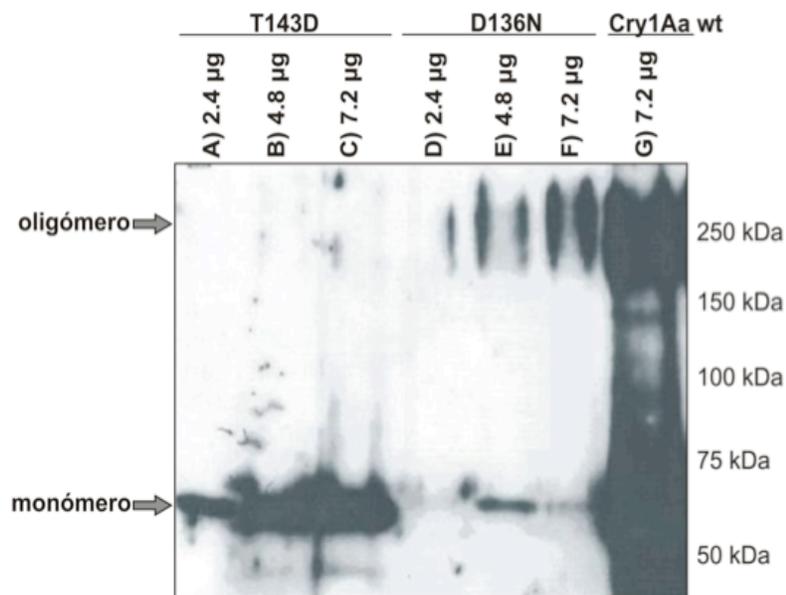
Con el fin de observar si la mutación en algunos de los residuos dentro de la hélice  $\alpha$ -4 tenía algún efecto sobre la formación de la estructura oligomérica prepórica reportada en nuestro laboratorio, decidimos realizar los ensayos de oligomerización con las mutantes D136N y T143D. Este ensayo también sería de gran importancia para el establecimiento de alguno de los objetivos propuestos en relación a lo del fenotipo de dominancia negativa, como se explicará más adelante.

Los residuos en las posiciones D136 (mutante D136N) y T143 (mutante T143D) son de particular importancia para esclarecer el papel que juega la hélice  $\alpha$ -4 en el mecanismo de acción de las toxinas Cry debido a que, como se mencionó anteriormente, las mutaciones en estas posiciones causan efectos muy drásticos en la toxicidad [75, 76, 78]. Además se ha reportado que el lado de la hélice  $\alpha$ -4 en el cual se sitúan estos residuos supuestamente se encuentra mirando hacia el lumen del canal iónico formado por el oligómero de la toxina [75].

Los ensayos de oligomerización se realizaron bajo las condiciones mencionadas anteriormente para la toxina Cry1Aa silvestre (ver materiales y métodos), incubando diferentes cantidades de las protoxinas mutantes D136N y T143D (2.4  $\mu$ g, 4.8  $\mu$ g y 7.2  $\mu$ g) en el buffer de solubilización, junto con el jugo gástrico de *M. sexta*, el anticuerpo ScFv73 y los liposomas. Como control positivo de oligomerización se incluyó a la toxina Cry1Aa silvestre (7.2  $\mu$ g).

Como se muestra en la figura 23, en el ensayo de oligomerización sí fuimos capaces de observar la estructura oligomérica de la mutante no tóxica D136N, aunque dicha estructura la observamos sólo al sobreexponer los films del Western Blot. Por el contrario no observamos la estructura oligomérica para el caso de la mutante no tóxica T143D.

Estos resultados fueron contrarios a los esperados debido a que nosotros suponíamos que si ambos residuos se encontraban muy cercanos uno respecto a otro dentro de la hélice  $\alpha$ -4 y situados hacia el mismo lado de la hélice, ambas posiciones tendrían que arrojar resultados similares en el análisis de la formación del oligómero. Respecto a lo anterior, nosotros pensamos que un factor que pudo haber influido en este resultado fueron las bajas o casi nulas concentraciones de protoxina de las cuales partimos para hacer los experimentos de oligomerización y la gran cantidad de proteínas contaminantes que pudieran estar interfiriendo de alguna manera con los ensayos realizados. Es importante recordar que para el ensayo de oligomerización se requiere tener protoxina soluble de 130 kDa, ya que con la toxina activada de 60 kDa se tiene una eficiencia extremadamente baja en la obtención de oligómero *in vitro*.



**Figura 23. Análisis de la oligomerización de las mutantes Cry1Aa no tóxicas D136N y T143D, purificadas a partir de *E.coli*.** El ensayo de oligomerización se realizó de la misma forma que para la toxina Cry1Aa silvestre, como se describe en la Fig. 20.

La mutante no tóxica D136N (D: 2.4 µg de protoxina solubilizada a pH 10.5, E: 4.8 µg y F: 7.2 µg) formó la estructura oligomérica. Por el contrario, la mutante no tóxica T143D (A: 2.4 µg de protoxina solubilizada a pH 10.5, B: 4.8 µg y C: 7.2 µg) no formó la estructura oligomérica y la mayor parte de la toxina se quedó en la forma de monómero como se ve por la presencia de las bandas con un peso aproximado de 60 kDa. Como control positivo se incluyó a la toxina Cry1Aa silvestre (G: 7.2 µg de protoxina solubilizada a pH 10.5).

Así, antes de proseguir con el análisis de las demás mutantes dentro de las hélices  $\alpha$ -3 y  $\alpha$ -4 proporcionadas, y debido a factores como: la obtención de resultados aparentemente contradictorios en el análisis de la formación del oligómero de las mutantes anteriores, los problemas de baja expresión e impureza de las muestras proteicas utilizadas durante los ensayos, y la dificultad del proceso de purificación de la protoxina contenida en los cuerpos de inclusión citoplasmática de *E. coli*, fue entonces que decidimos construir de nuevo algunas de las mutantes dentro de la hélice  $\alpha$ -4 y expresar dichas proteínas en *B.thuringiensis*. En este sistema tendríamos las ventajas de que en él se expresan de manera natural las toxinas Cry formando cristales de inclusión paraesporales que son muy fáciles de purificar y que, gracias a la experiencia obtenida en nuestro laboratorio, ya contábamos con algunas técnicas estandarizadas para la producción, purificación y análisis de los diferentes aspectos del mecanismo de acción las toxinas Cry1A.

## **8.2. Mutantes sencillas de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, expresadas y purificadas a partir de cultivos de *B. thuringiensis*.**

### **8.2.1. Construcción de las mutantes dentro de la hélice $\alpha$ -4.**

Para la construcción de las nuevas mutantes decidimos centrarnos en la mutagénesis de residuos situados sólo dentro de la hélice  $\alpha$ -4, particularmente los residuos en las posiciones E129, D136 y T143 que son de singular importancia para esclarecer el papel de la hélice  $\alpha$ -4 dentro de los procesos de oligomerización y formación del poro, debido a que trabajos previos de mutagénesis sobre estos residuos tuvieron efectos severos sobre la toxicidad y actividad de poro de las toxinas Cry1A (ver sección de antecedentes particulares).

Estos residuos se encuentran situados en la misma cara hidrofílica de la hélice  $\alpha$ -4 y se ha postulado previamente que se sitúan hacia el lado luminal del poro formado por las toxinas Cry1A, por lo que podrían estar jugando un papel importante en la regulación del flujo de los iones a través del poro formado por dicha estructura [75], o bien, en la formación e integración del poro en la membrana plasmática de las células intestinales del huésped [76, 78].

Como se menciona en materiales y métodos, la construcción de las mutantes dentro de la hélice  $\alpha$ -4 se realizó mediante PCR mutagénico, utilizando el estuche comercial Quick Change® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Para dicho PCR se tomó como templado directamente al plásmido pHT315Ab, y como primers utilizamos a los oligonucleótidos mutagénicos respectivos a cada mutante (Tabla 1). Cabe destacar que el utilizar de forma directa el plásmido pHT315Ab como ADN templado durante el PCR nos facilitó en gran manera el proceso de construcción de las mutantes. El gen para la toxina Cry1Ab es similar en un 95% al de la toxina Cry1Aa y en particular, la hélice  $\alpha$ -4 está conservada en ambas toxinas.

Los procedimientos de Biología molecular se realizaron en las cepas DH5 $\alpha$  de *E. coli*.

Una vez que se verificó mediante secuenciación que las mutaciones fueron incorporadas en el gen de la protoxina Cry1Ab contenido en el plásmido pHT315Ab, dicho ADN plasmídico fue purificado y utilizado para transformar la cepa de *E. coli* SC110, con el fin de obtener mayores cantidades del plásmido en su forma no metilada y facilitar con esto la transformación posterior de la cepa acristalífera de *B. thuringiensis*, Bt 407<sup>-</sup>, con dicho plásmido.

### **8.2.2. Purificación de las protoxinas mutantes de la hélice $\alpha$ -4, a partir de *B. thuringiensis*.**

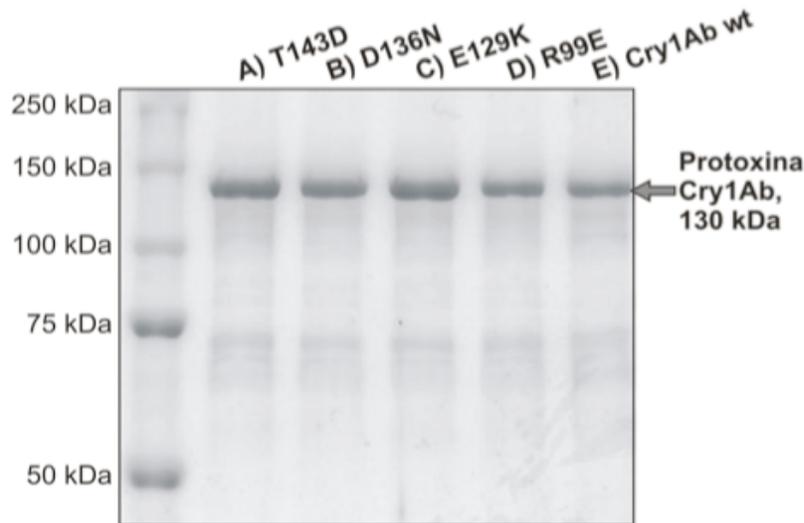
Una vez que logramos transformar a las cepas de Bt 407 con los genes de las diferentes protoxinas con mutaciones dentro de la hélice  $\alpha$ -4: E129K, D136N, T143D y T143N (ver materiales y métodos), procedimos a la producción y purificación de las protoxinas de cada una de las mutantes a partir de cultivos de *B. thuringiensis*, mediante la técnica de gradiente discontinuo de sacarosa (ver materiales y métodos). Al final de la purificación tomamos la fase F3 del gradiente de sacarosa para los análisis posteriores de toxicidad, unión al receptor caderina, solubilización, activación y oligomerización de las toxinas mutantes.

### **8.2.3. Solubilización de las protoxinas mutantes de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.**

Para la solubilización de la protoxina, la fase proteica F3 obtenida mediante la purificación por gradiente discontinuo de sacarosa (que contiene a los cristales de protoxina puros), fue solubilizada en buffer alcalino y reductor de carbonatos 0.1M, 0.05% de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 10.5, como se menciona en materiales y métodos. Posteriormente cuantificamos la concentración total de proteína y verificamos la efectividad de la solubilización e integridad de las protoxinas mediante SDS-PAGE, en un gel de acrilamida al 10% (fig. 24). Durante los procesos de purificación y solubilización incluimos a la protoxina Cry1Ab silvestre y a la mutante no tóxica Cry1Ab R99E (previamente caracterizada) [79], las cuales nos servirían como controles en los ensayos posteriores. Es importante recordar que la mutante R99E está severamente afectada en toxicidad debido a que es incapaz de oligomerizar. Así, esta mutante nos servirá como control negativo en los experimentos de oligomerización.

Como se puede ver en la figura 24, todas las mutantes construidas de la hélice  $\alpha$ -4, producidas y purificadas a partir de cultivos de *B. thuringiensis*, se expresaron de manera eficiente y los procesos de purificación y solubilización nos dieron muy buenos rendimientos de protoxina soluble, a diferencia de lo observado con las protoxinas mutantes purificadas a partir de *E.coli* (Fig. 21). Esto nos indicaba, además, que las diferentes mutaciones realizadas dentro de la hélice  $\alpha$ -4, no estaban interfiriendo con la expresión, ni con la estabilidad de las protoxinas, al ser expresadas en *B. thuringiensis*. Caso contrario a lo que se ha observado al mutar residuos situados dentro de los dominios II y III de la toxina y más aún al mutar residuos de la hélice  $\alpha$ -3 del dominio I como se ha reportado previamente [79], o como también nosotros lo observamos para el caso de la mutante construida en la hélice  $\alpha$ -4, T143N, cuyos niveles de expresión sólo pudieron ser detectados mediante Western Blot.

Así, la abundancia y pureza de los cristales de protoxina obtenidos nos facilitarían en gran medida la realización de los análisis posteriores de activación y formación *in vitro* del oligómero de las protoxinas mutantes construidas.



**Figura 24. Solubilización de las protoxinas mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.** Las protoxinas mutantes fueron expresadas en cepas de *B. thuringiensis* y posteriormente fueron purificadas mediante la técnica de gradiente discontinuo de sacarosa. Finalmente se solubilizaron en buffer carbonatos 0.1M, 0.05% de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH10.5. La concentración proteica de las muestras se cuantificó por el método de Bradford y se verificó la efectividad de la purificación y solubilización mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10%, que finalmente se tiñó con azul de Coomassie.

Como se observa por las bandas correspondientes a los 130 kDa, hubo una buena expresión de la protoxina y gran efectividad de la solubilización en todas las protoxinas mutantes Cry1Ab construidas. A) protoxina mutante Cry1Ab T143D, B) D136N, C) E129K, D) R99E y E) protoxina Cry1Ab silvestre. En todos los casos se cargó la misma cantidad proteica en el gel (2 $\mu$ g/carril).

Cabe mencionar que la mutante T143N no se incluyó en los ensayos posteriores debido a los niveles sumamente bajos de expresión de la protoxina. Este resultado concuerda con el reportado recientemente en el 2008 por Girard *et al.*, en el que la mutante T143C, en esta misma posición, también se produjo en niveles muy bajos de protoxina.

#### **8.2.4. Análisis de la toxicidad de las protoxinas mutantes de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.**

En nuestro laboratorio utilizamos al insecto lepidóptero *Manduca sexta* como principal modelo de estudio para analizar los diferentes aspectos del modo de acción de las toxinas Cry1A. El análisis del efecto tóxico ejercido por una cierta toxina sobre las larvas de *M. sexta* se hace mediante los bioensayos (ver materiales y métodos).

Con el fin de comprobar si las toxinas mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 que construimos (E129K, D136N y T143D), previamente reportadas como no tóxicas [75, 76], seguían mostrando un fenotipo de pérdida de toxicidad aún en las condiciones que utilizamos

nosotros para su producción y purificación a partir de cultivos de *B. thuringiensis*, fue entonces que decidimos realizar los bioensayos para estas mutantes.

Como se menciona en materiales y métodos, las dosis utilizadas para los bioensayos de cada mutante fueron las siguientes: 1 ng/cm<sup>2</sup>, 2 ng/cm<sup>2</sup>, 5 ng/cm<sup>2</sup>, 100 ng/cm<sup>2</sup>, 1000 ng/cm<sup>2</sup> y 2000 ng/cm<sup>2</sup>. Las unidades de las dosis (ng/cm<sup>2</sup>) representan a los nanogramos de toxina con los que se infecta cada centímetro cuadrado de la superficie de la dieta del insecto. En este caso se administró la protoxina en forma de cristales proteicos.

Una vez finalizados los bioensayos, contabilizamos el porcentaje de mortalidad y obtuvimos la LC<sub>50</sub>, utilizando el programa Probit POLO PC LeOra CA.

**Tabla 8. LC<sub>50</sub> de las mutantes sencillas construidas dentro de la hélice α-4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.**

Mutante (hélice α-4)	LC <sub>50</sub>
E129K	>2000 ng/cm <sup>2</sup>
D136N	100 ng/cm <sup>2</sup>
T143D	>2000 ng/cm <sup>2</sup>
Wt	5 ng/cm <sup>2</sup>

Como se observa en la tabla 8, las mutantes E129K y T143D no ejercieron efecto tóxico alguno sobre las larvas de *M. sexta*, lo cual concuerda con los resultados obtenidos con proteínas expresadas y purificadas a partir de *E. coli* [75, 76]. La toxina D136N mostró baja toxicidad, con una LC<sub>50</sub> 20 veces mayor respecto a la LC<sub>50</sub> de la toxina Cry1Ab silvestre.

Al confirmar que las mutantes E129K, D136N y T143D estaban afectadas en su toxicidad hacia larvas de *M. sexta* (la D136N afectada en menor grado), decidimos proseguir con los análisis de activación, unión al receptor caderina y oligomerización de dichas mutantes.

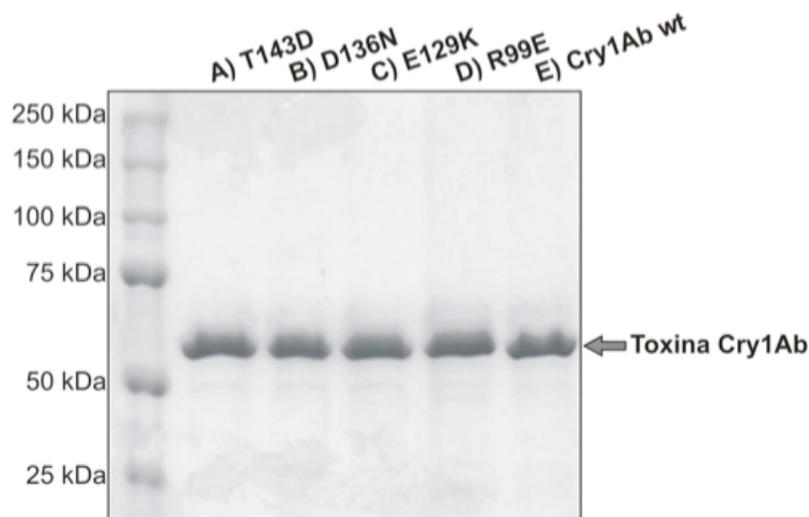
### **8.2.5. Activación de las protoxinas mutantes de la hélice α-4, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.**

Una vez que purificamos y solubilizamos las protoxinas mutantes no tóxicas a partir de cultivos de *B. thuringiensis*, hicimos las activaciones de la toxina mediante digestión proteolítica con tripsina de las protoxinas. Esto lo hicimos con el fin de analizar si las mutaciones construidas en los residuos de la hélice α-4 tendrían algún efecto sobre el proceso de activación de las toxinas o sobre su susceptibilidad a la degradación por proteasas.

Las reacciones de activación de las protoxinas mutantes purificadas a partir de *B.thuringiensis* se hicieron incubando a las protoxinas en su forma soluble junto con la enzima tripsina en una relación 1:20 de tripsina-protoxina, durante 90 minutos a 37°C, como se menciona en materiales y métodos. Posteriormente se cuantificó la concentración proteica

de las muestras y verificó la efectividad del proceso de activación mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10% (Fig. 25).

Todas las mutantes construidas se procesaron enzimáticamente de forma similar a la toxina Cry1Ab silvestre, liberando un fragmento de 60 kDa que corresponde al tamaño esperado para el monómero de la toxina. Estos datos nos estaban indicando que las mutaciones realizadas dentro de los residuos de la hélice  $\alpha$ -4 no estaban afectando la estabilidad estructural, ni la susceptibilidad a la degradación enzimática de las mutantes construidas.



**Figura 25. Activación mediante digestión con tripsina de las toxinas mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.** Las protoxinas mutantes Cry1Ab purificadas a partir de *B. thuringiensis* y solubilizadas en buffer carbonatos 0.1M, 0.05% de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH10.5, fueron activadas mediante incubación con tripsina durante 1 hora (en una relación 1:20 de tripsina-protoxina). La concentración proteica de las muestras se cuantificó por el método Bradford y se verificó la efectividad del proceso de activación mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10%, cargando en todos los casos la misma cantidad proteica en el gel (3  $\mu$ g/carril).

Todas las protoxinas mutantes Cry1Ab construidas se procesaron enzimáticamente de manera similar a como lo hace la toxina silvestre, liberando un fragmento de aproximadamente 60 kDa, que corresponde a la forma monomérica de las toxinas Cry1A. A) toxina mutante Cry1Ab T143D, B) D136N, C) E129K, D) R99E y E) toxina Cry1Ab silvestre.

Una vez que observamos que las mutantes no tóxicas construidas se estaban solubilizando y procesando enzimáticamente de forma correcta, procedimos a hacer los análisis de unión al receptor caderina y de formación del oligómero de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 construidas.

### **8.2.6. Análisis de la unión al receptor caderina de las mutantes no tóxicas de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.**

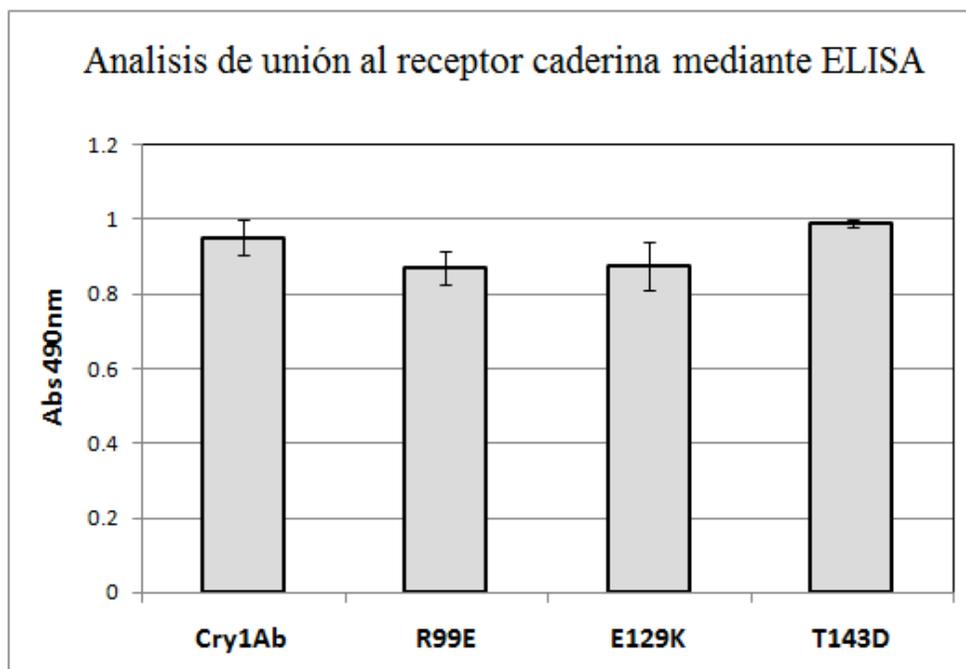
El receptor caderina, Bt-R<sub>1</sub>, se encuentra de manera natural en la superficie de la membrana de las microvellosidades apicales del intestino medio de los insectos susceptibles a las toxinas Cry1A.

Como se mencionó anteriormente, se ha postulado que la unión de la toxina a este receptor es un paso necesario para que las toxinas puedan ejercer su efecto tóxico, ya que esta unión facilita el proceso de corte de la hélice  $\alpha$ -1 de la toxina y la subsecuente oligomerización de la toxina para formar el oligómero de 250 kDa.

En nuestro laboratorio se han clonado, expresado y purificado fragmentos de este receptor a partir de cepas de *E.coli*, los cuales se han utilizado para hacer los ensayos de unión *in vitro* con la toxina.

Para analizar la afinidad de unión de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 al receptor caderina, realizamos ensayos de unión del monómero de 60 kDa de las mutantes E129K y T143D al fragmento del receptor caderina que contiene las repeticiones CR7 a CR12 de dicho receptor. Cabe mencionar que esta es la región de la caderina que interacciona con la toxina Cry1Ab. Estos ensayos se hicieron mediante la técnica de ELISA, como se menciona en materiales y métodos. En este ensayo no incluimos a la toxina mutante D136N ya que esta seguía mostrando aún un efecto tóxico, en comparación con las toxinas mutantes E129K y T143D que presentaron toxicidad nula.

Todas las mutantes se unieron al fragmento del receptor caderina de forma similar a como lo hizo la toxina Cry1Ab silvestre (Fig. 26). Cabe destacar que se observaron algunas pequeñas variaciones en la afinidad de unión de las toxinas al receptor, lo cual pudiera deberse a algunos errores en la cuantificación de las proteínas utilizadas para el ensayo. Aun así, la afinidad de unión de el monómero de las toxinas mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 fue significativamente similar a la mostrada por toxina silvestre (Fig. 26).



**Figura 26. Análisis de unión de las mutantes no tóxicas de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, al receptor caderina (repetido 7 a 12).** El ensayo de unión al receptor caderina se realizó mediante ELISA, como se menciona en materiales y métodos.

Se fijó el fragmento del receptor caderina con los repetidos del 7 a 12 (CADR 7-12, que mimetiza al receptor) a la placa para el ELISA y posteriormente se unió a este el fragmento tóxico de 60 kDa correspondiente a la toxina silvestre, o bien, a cada una de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 construidas. Después, se unió el anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab a la toxina y, finalmente, la unión de la toxina al fragmento CADR7-12 se reveló mediante un anticuerpo anti-IgG acoplado a peroxidasa.

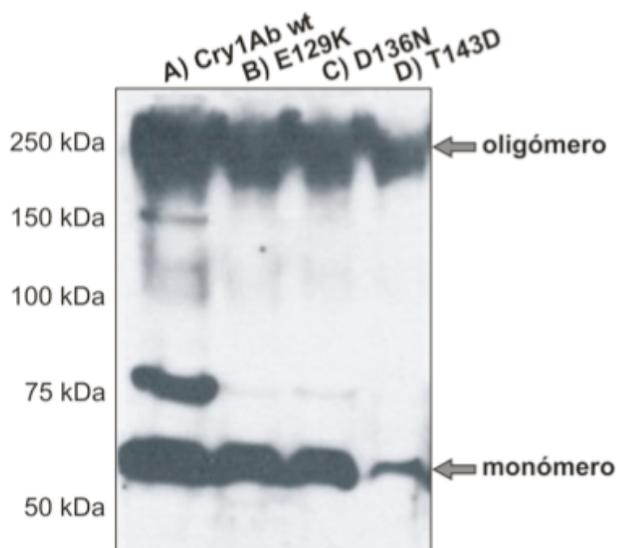
Como se puede observar, tanto la mutante E129K, como la T143D se unieron con una afinidad similar al fragmento del receptor Bt-R<sub>1</sub> (repetido 7-12).

### 8.2.7. Análisis de la formación del oligómero de las mutantes de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.

Como se mencionó anteriormente, las mutantes E129K, D136N y T143D se han reportado previamente como no tóxicas, pero no se han analizado aspectos de estas mutantes como su unión al receptor caderina, la formación del oligómero de 250 kDa y la inserción en la membrana plasmática.

Con el fin de analizar el papel que juega la hélice  $\alpha$ -4 dentro del proceso de oligomerización, decidimos evaluar la capacidad de formación de la estructura oligomérica prepórica de 250 kDa reportada en nuestro laboratorio, para cada una de las mutantes construidas sobre los residuos de la hélice  $\alpha$ -4 (mutantes E129K, D136N y T143D).

Los ensayos de oligomerización se realizaron bajo las condiciones mencionadas en la sección de materiales y métodos, en un volumen final de 50µl, para lo cual se incubaron por separado 2µg de cristales purificados de las mutantes E129K D136N y T143D en buffer de solubilización alcalino y reductor, en presencia del jugo gástrico de *M. sexta*, del anticuerpo scFv73 (que mimetiza al receptor caderina) y de los liposomas (o PC-SUV: vesículas unilamelares pequeñas de fosfatidilcolina). Como control positivo se incluyó a la toxina Cry1Ab silvestre (7.2 µg) (Fig. 27). Como se puede observar en la figura 27, todas las mutantes no tóxicas construidas dentro de la hélice α-4 (E129K, D136N y T143D) fueron capaces de formar oligómeros estables de 250 kDa tal y como lo hizo la toxina Cry1Ab silvestre (Fig. 27 A).



**Figura 27. Análisis de la formación del oligómero de las mutantes de la hélice α-4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.** La estructura oligomérica de las toxinas fue producida mediante la incubación de 2µg de cristales puros de protoxina (fase F3 del gradiente discontinuo de sacarosa) en buffer carbonatos 0.1M, 0.2% de β-mercaptoetanol, pH 10.5, con el anticuerpo scFv73, en una relación en masa de 1:4 (protoxina-anticuerpo), jugo gástrico de larvas de *M sexta*, a una concentración final en volumen de 2% y liposomas, durante 1H a 37 °C, con agitación suave. Los pellets membranales con el oligómero de la toxina fueron recuperados mediante ultracentrifugación a 90 000 rpm y las muestras fueron separadas mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 8%, electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y detectadas mediante Western Blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab.

Las mutantes de la hélice α-4 de la toxina Cry1Ab: E129K, D136N y T143D (B, C y D, respectivamente) forman estructuras oligoméricas de 250 kDa, de manera similar a como lo hizo la toxina Cry1Ab silvestre (A).

Los resultados obtenidos de que las mutantes no tóxicas de la hélice α-4 en las posiciones E129 (mutante E129K), D136 (mutante D136N) y T143 (mutantes T143D) se solubilizaron y activaron correctamente, que fueron capaces de unirse al receptor caderina y de formar estructuras oligoméricas estables de 250 kDa, en conjunto con los reportes previos de pérdida de toxicidad y de la conductancia en bicapas lipidicas planas para dichas mutantes [75, 76, 78], nos llevaron a concluir que la pérdida de toxicidad de estas mutantes

se debe a que las estructuras oligoméricas correspondientes a esas mutantes perdieron la actividad de formación de poro, apoyando lo reportado previamente por Masson *et al.*, (1999) y Vachon *et al.*, (2002 y 2004).

Otras alternativas menos probables que pudieran explicar el efecto no tóxico de dichas mutantes, dentro de la línea del modo de acción propuesto en nuestro laboratorio para las toxinas Cry1A (Fig. 5), sería que dichas mutantes no fueran capaces de escindir del receptor caderina (o lo hicieran de una manera más lenta, respecto a como lo hace la toxina silvestre) o bien, que no fueran capaces de unirse a los receptores secundarios aminopeptidasa N y fosfatasa alcalina. Lo anterior es poco viable debido a que nuestras mutantes se localizan dentro del dominio I y se ha visto que los dominios II y III son los que juegan un papel realmente importante en la unión a los receptores aminopeptidasa y fosfatasa alcalina.

Para el caso de la mutante D136N podríamos pensar que la estructura oligomérica de 250 kDa es capaz de insertarse en la membrana y quizá la mutación en esta posición estaría afectando las propiedades de permeabilidad de la estructura oligomérica; esto explica el abatimiento en la toxicidad y también concuerda con los resultados obtenidos previamente por Masson *et al.*, en 1999, en experimentos de permeabilidad sobre bicapas lipídicas, en los cuales se observó que la permeabilidad de una mutante en esta posición (D136C) se podía recuperar al restablecer la carga negativa en esa posición mediante la adición de un pequeño compuesto que es capaz de reaccionar con los grupos tiol presentes en la cisteína confiriéndoles una carga negativa.

En el caso de la mutante E129K podríamos pensar que sucedería lo mismo que para la mutante D136 debido a que se encuentra situada hacia la misma cara de la hélice  $\alpha$ -4 y a que ambos residuos poseen una carga negativa. Así, dado que ambas mutantes no tóxicas son capaces de formar oligómeros y a que ambos residuos están situados putativamente hacia el lado luminal de la estructura oligomérica formada por las toxinas Cry1A [75], podríamos pensar que el efecto de pérdida de toxicidad observado al mutar estas posiciones se debería a que se están afectando las cargas negativas de estos dos residuos, los cuales, de estar situados realmente hacia el lumen del poro formado por el oligómero, jugarían un papel muy importante en la permeabilidad y en la regulación del movimiento de los iones a través del poro formado por la estructura oligomérica de las toxinas Cry1A.

Para el caso de la mutante no tóxica T143D, en la cual se está introduciendo una carga negativa en una zona de la hélice  $\alpha$ -4 normalmente desprovista de ellas. El residuo en posición T143 se encuentra muy cerca del asa formada por las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5, el cual, junto con las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 (o al menos una parte de ellas), ha sido propuesto como la zona que se inserta en la membrana plasmática del huésped. De esta forma, nosotros pensamos que el efecto de pérdida de toxicidad mostrada por esta mutante probablemente se debe a que la carga negativa insertada en una región normalmente desprovista de ella estuviera interfiriendo con la inserción adecuada del oligómero en la membrana plasmática del huésped.

Respecto a lo anterior, nosotros pensamos que es necesario realizar un análisis más detallado de la inserción de la estructura oligomérica de las toxinas mutantes aquí mencionadas con el fin de analizar si los residuos situados en estas posiciones de la hélice  $\alpha$ -4 tienen una mayor importancia en el proceso de integración de la estructura oligomérica en la membrana, o bien, en el control de las propiedades de permeabilidad del oligómero.

### **8.2.8. Análisis del fenotipo de dominancia negativa de las mutantes no tóxicas de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de *B.thuringiensis*.**

El fenotipo de dominancia negativa en proteínas que actúan como dímeros o complejos multiméricos, consiste en la capacidad que tiene una proteína mutante, que ha perdido su función, de inhibir la actividad general de la proteína silvestre al ser coadministrada en cantidades equivalentes o aún en menores proporciones, respecto a la cantidad de la proteína silvestre.

Como se mencionó en la parte de antecedentes particulares de esta tesis, previamente se ha reportado que algunas toxinas que involucran procesos de oligomerización dentro de su mecanismo de acción (como en el caso de la toxina del ántrax), son buenas candidatas para presentar un fenotipo de dominancia negativa. En estos casos, para observar dicho fenotipo se deben aislar algunas mutantes de las formas monoméricas de las toxinas, que no interfieran con el proceso de oligomerización de las toxinas, pero que si afectan a las funciones principales de la forma oligomérica de la toxina (inserción del oligómero en la membrana, translocación de algún factor tóxico, formación de canales iónicos, etc.). Así, los monómeros mutantes aislados presentarían un efecto de dominancia negativa sobre los monómeros silvestres de la toxina si al hacer una mezcla de ambas formas en relaciones de cantidad equivalentes, o aún en cantidades menores de la forma mutante respecto a la silvestre, pudieran formar hetero-oligómeros no funcionales (conformados por monómeros silvestres y mutantes), que causarían en última instancia el abatimiento de la actividad y de la toxicidad de la forma silvestre de la toxina.

Debido a que nosotros contábamos con las mutantes no tóxicas de la hélice  $\alpha$ -4 (E129K, D136N y T143D), las cuales forman estructuras oligoméricas de 250 kDa, pero que no muestran actividad de formación de poro (quizá debido a defectos en su inserción dentro de la membrana y/o en la permeabilidad del oligómero), fue entonces que decidimos ver si estas mutantes podrían presentar un fenotipo de dominancia negativa sobre la toxina Cry1Ab silvestre, abatiendo su efecto tóxico sobre las larvas de *M. sexta*.

Cabe destacar que la importancia de que pudiéramos observar que alguna de las mutantes que construimos presentara el fenotipo de dominancia negativa abatiendo efecto tóxico de la Cry1Ab silvestre mediante la formación de hetero-oligómeros *in vivo*, estaría apoyando fuertemente la hipótesis propuesta en nuestro laboratorio de que la toxina lleva a cabo un proceso de oligomerización *in vivo* y que la formación de una estructura oligomérica funcional de las toxinas Cry de tres dominios (particularmente las toxinas Cry1A) es necesaria para que puedan ejercer sus efectos tóxicos *in vivo*.

Así, con el fin de observar si alguna de las mutantes Cry1Ab de la hélice  $\alpha$ -4 que construimos (E129K y T143D) pudiera presentar el fenotipo de dominancia negativa, abatiendo el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab silvestre, decidimos hacer un ensayo de dominancia negativa, para lo cual alimentamos a grupos de 24 larvas de *M. sexta* del 1er instar de desarrollo con mezclas de protoxina silvestre-protoxina mutante en diferentes relaciones (1:0.25, 1:1 y 1:10), fijando la dosis de la protoxina silvestre en 5 ng/cm<sup>2</sup> por cada larva, como se menciona en la parte de materiales y métodos, y después de 7 días cuantificamos el porcentaje de mortalidad de las larvas.

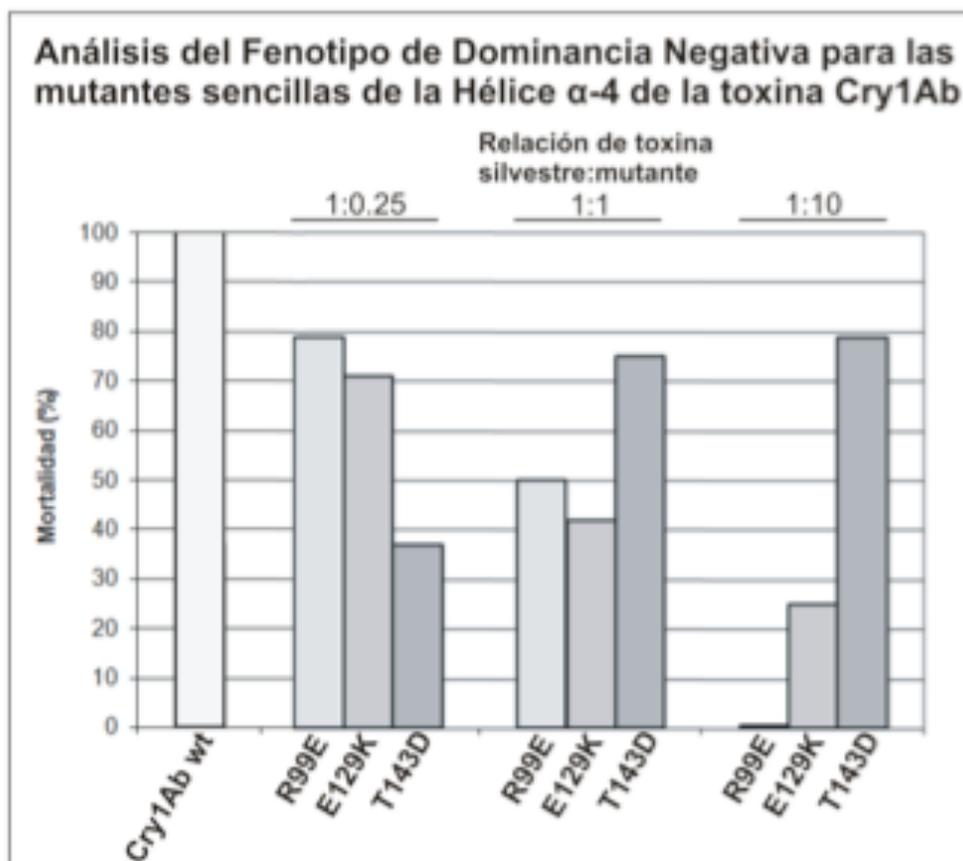
En estos ensayos también incluimos como control a la mutante no tóxica R99E, la cual es incapaz de formar estructuras oligoméricas estables.

Posteriormente, los valores de mortalidad obtenidos en las mezclas fueron normalizados con los valores de mortalidad observados al administrar sólo 5 ng/cm<sup>2</sup> de la toxina silvestre y se graficaron como se muestra en la figura 28.

Al comparar la mortalidad de las larvas alimentadas con las mezclas de toxina silvestre-mutante, respecto a la observada en las que fueron alimentadas solamente con toxina Cry1Ab silvestre, observamos que la mutante T143D abatió de un 20% a 60% la toxicidad de la toxina silvestre, (Fig. 28).

Sólo se observó un abatimiento del 100% del efecto tóxico de la toxina Cry1Ab silvestre en el caso de la mezcla con la mutante R99E en la relación de 1:10 (silvestre-mutante), y en un menor grado para la toxina E129K (~75%), lo cual pensamos que se debió a que hubo una competencia por los receptores entre la toxina silvestre y la mutante, en donde la gran cantidad de toxina mutante administrada favoreció, por probabilidad, la interacción de la mutante con los receptores para las toxinas Cry1A situados en el intestino de las larvas de *M. sexta*, impidiendo de esta forma la interacción y acción de la toxina Cry1Ab silvestre (Fig. 28).

Proponemos que el efecto en la disminución en la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre por parte de las mutantes E129K y T143D no fue tan severo debido tal vez a que, en el caso de que el fenómeno de hetero-oligomerización *in vivo* estuviera sucediendo realmente, las mutaciones en las posiciones E129 y T143 podrían no afectar en gran medida las propiedades tóxicas de los hetero-oligómeros de toxina mutante-silvestre, por lo que dichos oligómeros podrían seguir siendo capaces, aunque de manera un poco menos eficiente, de formar poros en las membranas de las células intestinales de las larvas de *M. sexta*.



**Figura 28. Análisis del fenotipo de dominancia negativa para las mutantes sencillas de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, sobre larvas de *M. sexta*.** Grupos de 24 larvas de *M. sexta* del 1er instar de desarrollo, se alimentaron con mezclas de cristales de protoxina Cry1Ab silvestre y protoxina de la mutante correspondiente, en relación en masa de 1:0.25, 1:1 y 1:10, fijando la dosis de la protoxina silvestre en 5ng/cm<sup>2</sup> (ver materiales y métodos). Después de 7 días se cuantificó el porcentaje de mortalidad de las larvas alimentadas con las mezclas de protoxina y dicha mortalidad se comparó con la observada en las larvas alimentadas solamente con protoxina silvestre (5ng/cm<sup>2</sup>).

Como se puede observar, las toxinas mutantes sí fueron capaces de inhibir en cierto grado la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre hacia larvas de *M. sexta*, pero aún así, las mutantes E129K y T143D parecen no mostrar el fenotipo de dominancia negativa.

En el caso de la mutante R99E se observa un fenotipo de competencia, ya que solo cuando la mutante R99E está en exceso se abate la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre, por lo que podría ser que la R99E está compitiendo por el receptor caderina.

Otro de los factores que pudieron influir en los resultados del ensayo de dominancia negativa tal vez fue el hecho de que las protoxinas se administraron en forma de cristales proteicos puros, en los cuales la cuantificación proteica realizada por el método de Bradford pudiera no ser tan exacta debido a que el reactivo solo puede acceder a las proteínas situadas en la periferia del cristal de la protoxina. Esto es de gran importancia, debido a que pequeños errores en la cuantificación proteica podrían significar una gran diferencia en los resultados, ya que para el ensayo de dominancia negativa las protoxinas se administran en

concentraciones dentro del orden de nanogramos. Por esta razón, como se menciona mas adelante, el ensayo posterior de dominancia negativa se realizo administrando protoxina en su forma soluble, con la cual se puede tener una cuantificación mas exacta de la proteína agregada durante el ensayo.

Aunque las mutantes E129K y T143D no mostraron un claro fenotipo de dominancia negativa, el efecto de inhibición de la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre mostrado por estas mutantes (aunque en bajo nivel), junto con algunos reportes previos para otras toxinas [82, 83] (en los cuales se menciona que las formas dominantes negativas pueden ser mutantes con modificaciones más severas en las toxinas como: dobles o múltiples mutaciones y hasta deleciones), nos alentaron a construir algunas mutantes dobles en las posiciones previamente mutadas (E129, D136 y T143) con el fin de analizar si la modificación de un par de los residuos situados en estas posiciones podría abatir de manera más severa el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab sobre las larvas de *M. sexta*, en un nuevo ensayo de dominancia negativa.

Las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab que construimos para su análisis posterior en un ensayo de dominancia negativa fueron las siguientes: **E129K+D136N y D136N+T143D.**

### **8.3. Mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, expresadas y purificadas a partir de cultivos de *B. thuringiensis*.**

#### **8.3.1. Construcción y purificación de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cy1Ab.**

La construcción de las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab (E129K +D136N y D136N+T143D) se realizó de manera similar a como se construyeron las mutantes simples E129K, D136N y T143D, mediante PCR mutagénico, utilizando el equipo comercial Quick Change® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene (ver materiales y métodos). En esta ocasión utilizamos los plásmidos anteriormente obtenidos en la construcción de las mutantes sencillas, los cuales ya habían incorporado previamente una de las mutaciones puntuales en el gen de la protoxina (pHT315Ab-*mut*) y como primer al oligonucleótido mutagénico que correspondiese, según el caso, para incorporar la mutación en la segunda posición.

El proceso de transformación con el gen de las toxinas mutantes dobles en *B. thuringiensis*, así como el de la purificación a partir de dicha cepa, fue el mismo que se siguió para el caso de las mutantes sencillas la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab (ver materiales y métodos).

### 8.3.2. Análisis de la toxicidad de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.

Con el fin de observar el efecto tóxico las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab que construimos (E129K+D136N y D136N+T143D) sobre las larvas de *M. sexta* (nuestro organismo modelo), realizamos los bioensayos, utilizando varias dosis de protoxina soluble de cada una de las mutantes por separado, de manera similar a como se realizó con las mutantes sencillas: 1ng/cm<sup>2</sup>, 2ng/cm<sup>2</sup>, 5ng/cm<sup>2</sup>, 100ng/cm<sup>2</sup>, 1000ng/cm<sup>2</sup> y 2000ng/cm<sup>2</sup> (ver materiales y métodos).

Una vez finalizados los bioensayos contabilizamos el porcentaje de mortalidad y obtuvimos la LC<sub>50</sub> de cada mutante doble de la hélice  $\alpha$ -4.

**Tabla 9. LC<sub>50</sub> de las mutantes dobles construidas dentro de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.**

Mutante	LC <sub>50</sub>
E129K+D136N	>2000 ng/cm <sup>2</sup>
D136N+T143D	>2000 ng/cm <sup>2</sup>
Cry1Ab	2 ng/cm <sup>2</sup>

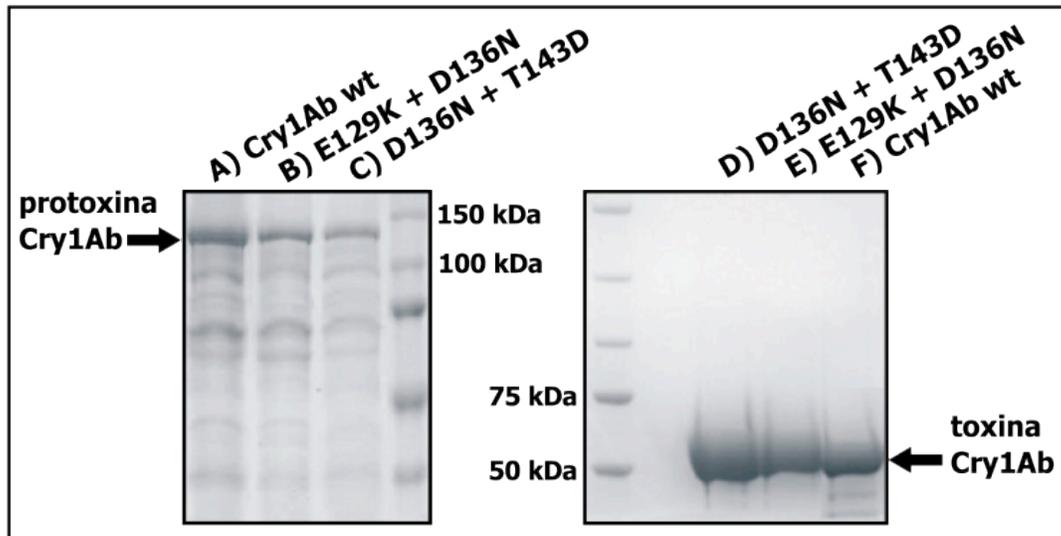
Como se observa en la tabla anterior, las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab perdieron por completo la capacidad para matar a las larvas de *M. sexta* aún a dosis tan altas como la de 2000 ng/cm<sup>2</sup> de protoxina soluble. Este resultado concuerda con la pérdida de toxicidad observada para el caso de las mutantes sencillas en las mismas posiciones: E129K, D136N y T143D.

### 8.3.3. Análisis de la solubilización, activación y formación del oligómero de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.

Una vez que se purificaron los cristales proteicos de las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab (E129K+D136N y D136N+T143D), éstos se solubilizaron y activaron en las condiciones mencionadas con anterioridad para el caso de las mutantes sencillas purificadas a partir de *B. thuringiensis*.

La sustitución de dos de los residuos en ambas mutantes dobles construidas no afectó los procesos de solubilización de la protoxina, ni de activación de la toxina, como se muestra en la figura 29.

Cabe destacar que la mutantes dobles que construimos se expresaron de forma abundante en *B. thuringiensis*, a diferencia de lo obtenido en otros trabajos en los cuales se reporta la construcción de mutantes dobles dentro de esta misma hélice de las toxinas Cry1A [91]. De igual forma, ninguna de las mutantes dobles que construimos fue susceptible a ser degradada por la acción enzimática de la tripsina (Fig. 29).



**Figura 29. Análisis de la solubilización y activación de las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab.** Los cristales de las protoxinas expresadas en *B. thuringiensis* y purificados a partir de dicha cepa mediante gradiente discontinuo de sacarosa, fueron solubilizados en buffer carbonatos, 0.05% de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 10.5. Posteriormente, las protoxinas solubles fueron activadas mediante su incubación con tripsina (en una relación en masa de 1:20 de tripsina-protoxina).

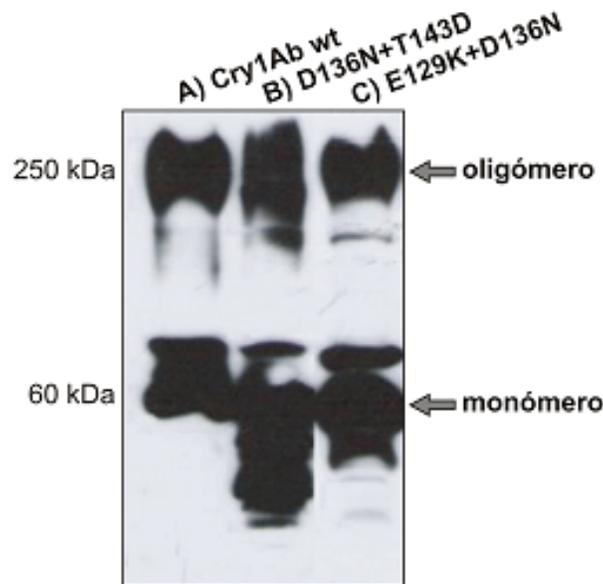
La concentración proteica de las muestras se cuantificó por el método de Bradford y la efectividad de los procesos de solubilización y activación se verificó mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10%, que se tiñó con azul de Coomassie.

A-C protoxinas solubilizadas: A) Cry1Ab silvestre, B) mutante doble E129K+D136N y C) mutante doble D136N+T143D. D-F toxinas activadas: D) mutante doble D136N+T143D, E) mutante doble E129K+D136N y F) Cry1Ab silvestre.

Ambas mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 se solubilizaron y activaron de manera similar a como se observa en el caso de la toxina Cry1Ab silvestre.

Ya que las mutaciones dobles dentro de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab no afectaron los procesos de solubilización y activación (Fig. 29), procedimos a hacer el análisis de formación de la estructura oligomérica de 250 kDa para estas mutantes (Fig. 30). El ensayo de oligomerización *in vitro* se realizó en condiciones similares a las utilizadas para el mismo ensayo con las mutantes sencillas E129K, D136N y T143D, purificadas a partir de *B. thuringiensis* (ver materiales y métodos).

Como se observa en la figura 30, las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 fueron capaces de formar estructuras oligoméricas estables de 250 kDa. Esto nos dio la pauta para comenzar a analizar si estas mutantes podrían presentar el fenotipo de dominancia negativa, abatiendo la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre.



**Figura 30. Análisis de la formación del oligómero de las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, purificadas a partir de *B. thuringiensis*.** La estructura oligomérica de las toxinas fue producida mediante la incubación de 2 $\mu$ g de cristales puros de protoxina (fase F3 del gradiente discontinuo de sacarosa) en un buffer carbonatos 0.1M, 0.2% de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 10.5, con el anticuerpo scFv73, en una relación en masa de 1:4 (protoxina-anticuerpo), jugo gástrico de larvas de *M sexta* a una concentración final en volumen de 2% y liposomas, durante 1H a 37 °C, con agitación suave. Los pellets membranales con el oligómero de la toxina fueron recuperados mediante ultracentrifugación a 90 000 rpm y las muestras fueron separadas mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 8%, electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y detectadas mediante Western Blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab.

Las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4: D136N+T143D y E129K+D136N (B y C, respectivamente) fueron capaces de formar estructuras oligoméricas de 250 kDa, de forma similar a como lo hizo la toxina Cry1Ab silvestre (A).

#### 8.3.4. Análisis del fenotipo de dominancia negativa de las mutantes dobles de la hélice $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab

Una vez que observamos que las mutantes dobles no tóxicas E129K+D136N y D136N+T143D eran capaces de solubilizarse, activarse y formar oligómeros de forma similar a la toxina Cry1Ab silvestre; y partiendo de la premisa de que si las mutaciones sencillas en las posiciones E129, D136 y T143 no afectaron la unión al receptor caderina, las mutaciones dobles no afectarían tampoco dicha unión, decidimos entonces hacer el ensayo de dominancia negativa con las mutantes dobles, con el fin de analizar si podrían abatir el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab silvestre al ser coadministradas con dicha toxina sobre larvas de *M. sexta*.

Los ensayos de dominancia negativa con las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab se hicieron de manera similar a como se realizaron estos mismos ensayos para el caso de las mutantes sencillas E19K y T143D. Sin embargo, cabe destacar que en este caso utilizamos protoxina en su forma soluble, en vez de protoxina cristal. Este cambio se incluyó debido a que la protoxina en su forma soluble se puede cuantificar de manera más

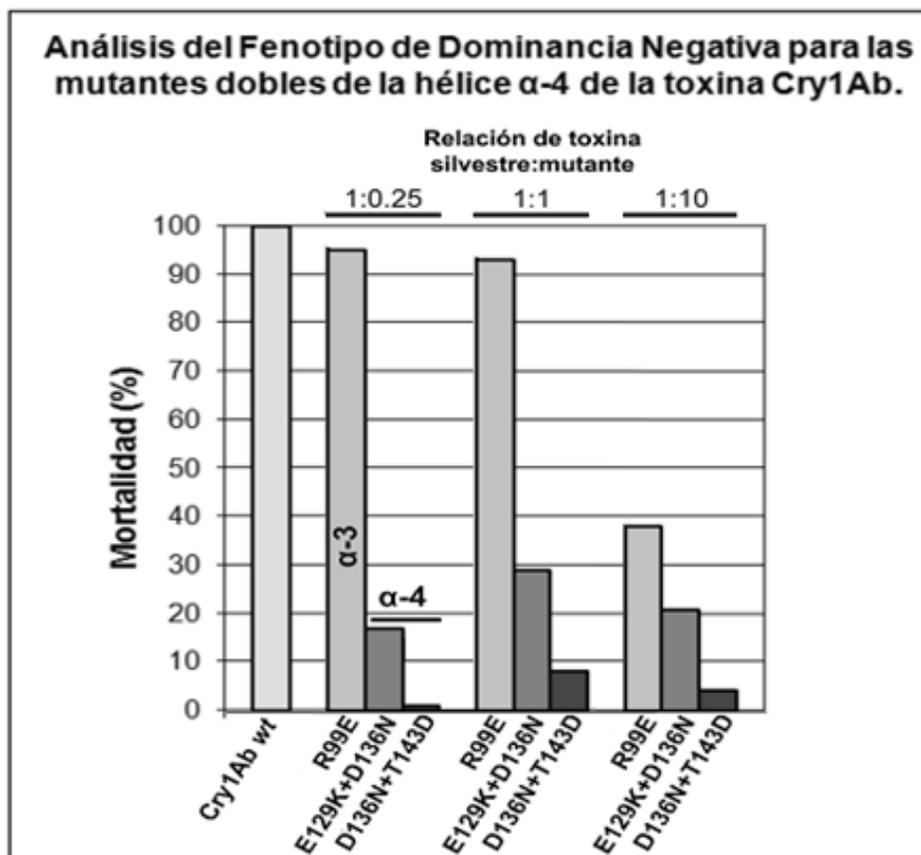
exacta mediante la reacción de Bradford y esto nos brindaría un mayor control en cuanto a las cantidades de protoxina aplicadas durante el ensayo de dominancia negativa.

De manera breve: se alimentaron grupos de 24 larvas de *M. sexta* del 1er instar de desarrollo con una mezcla de protoxina soluble Cr1Ab silvestre y protoxina soluble de cada mutante doble de la hélice  $\alpha$ -4. De esta forma, se evaluó el efecto de varias mezclas de toxina en relaciones diferentes de protoxina silvestre-mutante (1:0.25, 1:1 y 1:10), fijando la dosis de la toxina silvestre en 5ng/cm<sup>2</sup> (ver materiales y métodos). Finalmente, después de 7 días se evaluó la mortalidad de las larvas alimentadas con cada una de las mezclas de protoxinas y dicha mortalidad se comparó y estandarizó con la mortalidad observada en un grupo de larvas alimentadas solamente con 5ng/cm<sup>2</sup> de la protoxina soluble Cry1Ab silvestre. La mortalidad se graficó como se muestra en la figura 31.

Como se puede observar en la figura 31, ambas mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab (E129K+D136N y D136N+T143D) mostraron un fenotipo de dominancia negativa *in vivo*, al inhibir casi por completo el efecto tóxico ejercido por la toxina Cry1Ab hacia las larvas de *M. sexta*. Dicho efecto de inhibición de la toxicidad fue muy severo debido a que al mezclar 5ng/cm<sup>2</sup> de la toxina silvestre con una menor cantidad de alguna de las mutantes dobles, el porcentaje de mortalidad de las larvas bajó a niveles de 30% al 0%, en comparación con el 100% de mortalidad observado al administrar a la toxina Cry1Ab silvestre por si sola, a una dosis de 5ng/cm<sup>2</sup> (Fig. 32).

Uno de los controles que incluimos en este ensayo de dominancia negativa fue la mutante no tóxica de la hélice  $\alpha$ -3 del dominio I de la toxina Cry1Ab, R99E, la cual es incapaz de formar estructuras oligoméricas estables de 250 kDa [79], en la cual solo esperaríamos un abatimiento de la toxicidad al administrar cantidades elevadas de la mutante R99E en relación a la cantidad de toxina Cry1Ab silvestre, debido a un fenómeno de competición por el primer receptor caderina. Así, en este caso, y como se esperaba, solamente se observó una inhibición de la toxicidad en la mezcla de protoxinas silvestre-mutante (wt-R99E) en relación 1:10. Además, dicha inhibición no fue tan severa como en el caso de las mezclas de la toxina silvestre con las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 (Fig. 31).

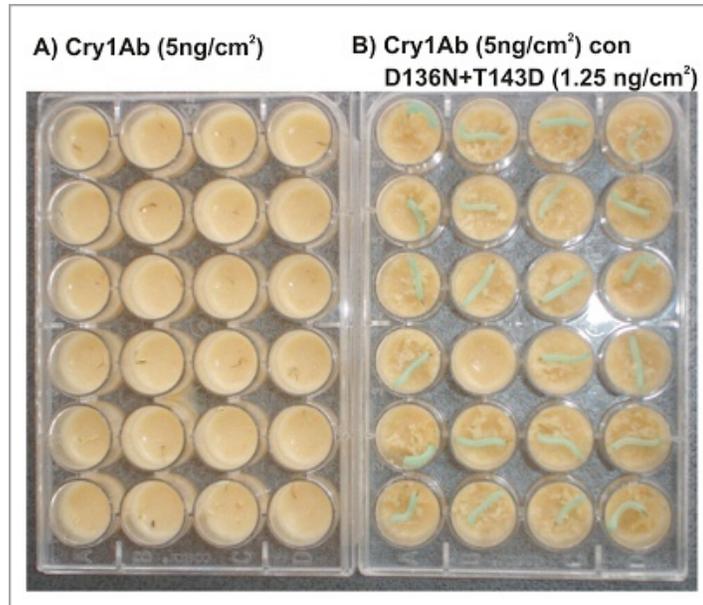
Nosotros pensamos que este efecto quizá se debe a que a mayores concentraciones de la mutante R99E se pudiera presentar un fenómeno de competición por los receptores presentes la superficie de las células del intestino medio de las larvas de *M. sexta*, en donde las mayores cantidades de la mutante no tóxica R99E tendrían una mayor probabilidad de interacción con el primer receptor caderina evitando que la toxina Cry1Ab silvestre pudiera interactuar con dicho receptor y ejercer sus efectos tóxicos. Además, debido a que la mutante R99E es incapaz de formar oligómeros de manera eficiente y, siguiendo el modelo de acción propuesto en nuestro laboratorio para las toxinas Cry1A (Fig. 5), *in vivo* esta toxina tendería a quedarse unida al receptor caderina en la forma monomérica (ya que la forma monomérica de la toxina es sumamente afín al receptor caderina).



**Figura 31. Análisis del fenotipo de dominancia negativa para las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, sobre larvas de *M. sexta*.** Se hicieron mezclas de la protoxina soluble silvestre junto con la protoxina soluble de cada mutante doble, para lo cual se fijó la concentración de la protoxina silvestre ( $5\text{ng}/\text{cm}^2$ ) y se variaron las cantidades de la protoxina de la mutante doble en cuestión a  $1.25\text{ng}/\text{cm}^2$ ,  $5\text{ng}/\text{cm}^2$  y  $50\text{ng}/\text{cm}^2$  (relaciones 1:0.25, 1:1 y 1:10, respectivamente). Obteniendo así 3 mezclas diferentes por cada mutante doble. Cada una de las mezclas fue administrada a la dieta de 1 grupo de 24 larvas de *M. sexta* del 1er instar de desarrollo. De esta forma, se probaron 6 mezclas diferentes obtenidas, en 6 grupos de 24 larvas cada uno. Después de 7 días se cuantificó el porcentaje de mortalidad de las larvas alimentadas con cada una de las mezclas de protoxina silvestre-mutante y se comparó con la mortalidad observada en las larvas alimentadas solo con  $5\text{ng}/\text{cm}^2$  de la protoxina silvestre. En el ensayo también se analizó el efecto de una mutante sencilla no tóxica (R99E, de la hélice  $\alpha$ -3), con fines comparativos.

El efecto tóxico de la toxina Cry1Ab silvestre sobre las larvas de *M. sexta* fue abatido al mezclar a la toxina silvestre con cada una de las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4, en cualquiera de las tres relaciones probadas (1:0.25, 1:1 y 1:10). Dicho abatimiento de la toxicidad se observó aún al administrar pequeñas cantidades de cada una de las mutantes dobles en las mezclas (relación 1:0.25). Esto muestra claramente que hubo un efecto de dominancia negativa de las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, abatiendo *in vivo* el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab silvestre sobre las larvas de *M. sexta*.

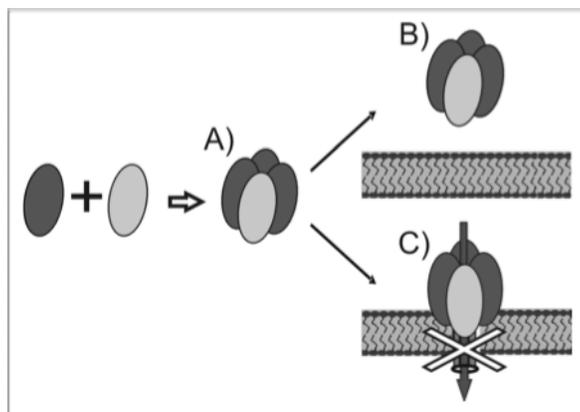
Por el contrario, la mutante no tóxica R99E abatió la toxicidad sólo al ser administrada en mayores cantidades en las mezclas (relación 1:10).



**Figura 32. Efecto de dominancia negativa de la mutante doble de la toxina Cry1Ab, D136N+T143D, abatiendo el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab silvestre sobre larvas de *M. sexta*.** Como se mencionó anteriormente, los grupos de 24 larvas de *M. sexta* fueron alimentados con mezclas de protoxina soluble Cry1Ab silvestre mas la protoxina de alguna de las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 (panel B), o bien, solo con la protoxina soluble Cry1Ab silvestre. Después de 7 días se cuantificó la mortalidad de cada grupo de larvas.

Como se puede observar en la fotografía, al administrar la toxina Cry1Ab silvestre a una dosis de  $5\text{ng/cm}^2$  el 100% de las larvas murieron después de 7 días (panel A). Por el contrario, este efecto tóxico se abatió por completo al administrar una mezcla de  $5\text{ng/cm}^2$  de la toxina Cry1Ab junto con una menor cantidad ( $1.25\text{ng/cm}^2$ ) de la mutante doble de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, D136N+T143D, (Panel B).

El haber observado que las mutantes dobles no tóxicas de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab presentan un fenotipo de dominancia negativa sobre la actividad tóxica de la Cry1Ab silvestre, y siguiendo la pauta del mecanismo de acción de las toxinas Cry1Ab propuesto en nuestro laboratorio (Fig. 5), sugiere que el fenómeno de dominancia negativa se debe a que las mutantes dobles E129K+D136N y D136N+T143D fueron capaces de formar hetero-oligómeros no funcionales *in vivo* (en el interior de las larvas de *M. sexta*), los cuales estarían compuestos de varios monómeros de toxina silvestre junto con uno o pocos monómeros de toxina mutante (Fig. 33A). Pensamos además que dichos hetero-oligómeros serían capaces de unirse al primer y segundo receptor de manera similar a como lo hace la toxina Cry1Ab silvestre, pero estarían afectados en la formación de poro, lo cual pudiera deberse a que los monómeros mutantes dentro del hetero-oligómero afectarían la capacidad de inserción correcta del hetero-oligómero dentro de la membrana (Fig. 33B), la permeabilidad del poro (Fig. 33C), o ambas propiedades.



**Figura 33. Representación esquematizada del fenómeno putativo de hetero-oligomerización y los posibles mecanismos por los cuales están afectados los hetero-oligómeros.** Los hetero-oligómeros formados (A) no podrían presentar actividad de poro debido a: su incapacidad para insertarse en la membrana plasmática (B), y/o a la pérdida de la permeabilidad del poro en las bicapas lipídicas (C).

En el caso de que los hetero-oligómeros no pudieran insertarse de manera correcta en la membrana, quizá además tenderían a quedarse unidos al segundo receptor (fosfatasa alcalina o aminopeptidasa-N) o escindirse de él de forma ineficiente con lo que podrían también presentar un fenómeno de competencia por el segundo receptor acaparando la disponibilidad del segundo receptor e impidiendo la unión al segundo receptor de los homo-oligómeros silvestres y por lo tanto también impidiendo su inserción y formación de poro en las membranas de las células del intestino medio de las larvas de *M. sexta*. Aunque esto aún constituye sólo una hipótesis más, de ser cierta, esto nos podría explicar el hecho observado durante el ensayo de dominancia negativa de que muy bajas cantidades de las toxinas mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab, particularmente de la mutante D136N+T143D, fueron suficientes para inhibir casi en un 100% el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab silvestre. Esta hipótesis también podría verse reforzada para el caso de la mutante doble D136N+T143D debido a que previamente se ha reportado que las mutaciones en la posición T143D tienen un efecto severo en la inserción en la membrana y formación de poro de la toxina y a que la posición que ocupa dentro de la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I se ha propuesto como uno de los primeros residuos en interactuar con la membrana plasmática durante la inserción (como se propone por el “modelo de sombrilla” de inserción de la toxina en la membrana).

Para el caso de la toxina doble mutante E129K+D136N pensamos que el efecto de abatimiento de la toxicidad quizá podría deberse en gran parte a que los hetero-oligómeros formados sí podrían ser capaces de insertarse en la membrana plasmática pero que tendrían algún defecto en la permeabilidad de la forma oligomérica en la membrana plasmática (Fig. 33C). Esto lo proponemos en base a que ambos residuos se encuentran situados en el mismo lado hidrofílico de la hélice  $\alpha$ -4 [78], el cual está situado putativamente hacia el lumen del poro formado por la estructura oligomérica de las toxinas Cry1A [75] (ver antecedentes particulares de esta tesis). Además, ambos residuos poseen una carga negativa, las cuales son muy importantes en la regulación de la permeabilidad de muchos canales iónicos, de tal

forma que al afectar dicha carga se puede afectar la permeabilidad. Otro de los aspectos que apoyan ésta hipótesis es que ambos residuos se encuentran en la parte media (D136N) y superior (E129K) del hairpin formado por las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5, el cual se ha propuesto como la parte de la toxina que se inserta dentro de la membrana para formar el canal iónico por lo que no tenderían a interactuar en primera instancia con la membrana plasmática de las células intestinales blanco.

Aunque las evidencias aquí obtenidas apuntan a un fenómeno de hetero-oligomerización *in vivo*, aún hace falta realizar más estudios que nos pudieran brindar mayor información sobre en qué paso dentro del mecanismo de acción están afectados los hetero-oligómeros aquí propuestos (como evaluar su conductancia en bicapas lipídicas, unión al segundo receptor, etc.). Así, este tipo de experimentos nos ayudaría a ir definiendo poco a poco el papel que juega la hélice  $\alpha$ -4 dentro del mecanismo de acción de las toxinas Cry de tres dominios.

De esta manera, el fenómeno de dominancia negativa mostrada por las mutantes dobles de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab constituye una evidencia importante más que apoya el mecanismo de acción propuesto en nuestro laboratorio para las toxinas Cry de tres dominios, en donde la formación de una estructura oligomérica con actividad de formación de poro es muy importante para que las toxinas Cry de tres dominios puedan ejercer sus efecto tóxicos *in vivo*.

Ya que algunas de las mutantes de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab presentan el fenotipo de dominancia negativa abatiendo la actividad de la toxina Cry1Ab silvestre, estas mutantes se podrían ocupar en un momento dado como antitoxinas y aplicarse en ecosistemas particulares (por ejemplo en ecosistemas acuáticos, ver Anexo X) , con el fin de proteger a organismos no blanco de los posibles efectos dañinos de la toxina Cry1Ab.

Dadas las similitudes en estructura y en el mecanismo de acción de las diversas proteínas Cry de tres dominios, se puede esperar que otros miembros de esta familia de proteínas puedan presentar el fenotipo de dominancia negativa.

## 9. CONCLUSIONES GENERALES.

En el presente trabajo se construyeron y expresaron en la bacteria *Bacillus thuringiensis* varias toxinas Cry1Ab con mutaciones puntuales sencillas y dobles, situadas dentro de la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de la estructura terciaria de la toxina.

Las mutantes sencillas construidas fueron las siguientes: E129K, D136N, T143D y T143N. Las mutantes dobles fueron la E129K+T143D y la D136N+T143D. Todas las mutantes produjeron proteínas en forma de inclusiones cristalinas paraesporales en *B.thuringiensis*, a excepción de la T143N, que no expresó la toxina.

Las mutantes aisladas de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry1Ab no mostraron defectos en los procesos de solubilización de la protoxina, activación enzimática de la toxina, unión al receptor caderina (analizada solo para la E129K y la T143D) y formación de la estructura oligomérica, pero sí se afectaron severamente en la toxicidad hacia larvas de *Manduca sexta*, por lo que evaluamos la capacidad de dichas mutantes para presentar un fenotipo de dominancia negativa y abatir con ello el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab silvestre sobre las larvas de *M. sexta*.

Al examinar el fenotipo de dominancia negativa, las mutantes dobles E129K+D136N y D136N+T143D abatieron de un 70% al 100% de la actividad tóxica presentada por la toxina Cry1Ab silvestre, aún al ser coadministradas en una relación en masa de 1:0.25 (toxina silvestre:toxina mutante) sobre la dieta de las larvas de *M. sexta*. Por el contrario, las mutantes sencillas E129K y T143D mostraron un abatimiento ligero de la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre.

El haber observado el fenotipo de dominancia negativa en algunas mutantes de la toxina Cry1Ab constituye una evidencia más que apoya la hipótesis de que las toxinas Cry1A requieren de la formación de un oligómero con actividad de poro para ejercer sus efectos tóxicos.

Cabe la posibilidad de que las toxinas Cry1A mutantes que muestran un fenotipo de dominancia negativa puedan ser utilizadas como una especie de “antitoxinas” capaces de contrarrestar los efectos nocivos sobre organismos no blanco de las toxinas Cry1A utilizadas de manera industrial (en el caso de que se llegase a observar dicho fenómeno), como por ejemplo en ecosistemas acuáticos aledaños a zonas con cultivos agrícolas transgénicos que expresan a las toxinas Cry.

Dada las similitudes en estructura terciaria y en el mecanismo de acción, se puede esperar que otros miembros de la familia de proteínas Cry de tres dominios presenten también el fenotipo de dominancia negativa.

## 10. ANEXOS

### I. QuickChange® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Consiste en tres grandes pasos.

En primer lugar se usa un procedimiento de ciclaje térmico para llevar a cabo múltiples rondas de síntesis de la hebra mutante. Algunos de los componentes de la reacción térmica cíclica incluyen a el ADN súper enrollado de doble hebra, uno o más primers de oligonucleótidos los cuales contienen las mutaciones deseadas y la mezcla enzimática que contiene a la ADN polimerasa *PfuTurbo*®.

Primero, el ADN templado es desnaturalizado y los primers mutagénicos son alineados. Posteriormente la ADN polimerasa extiende los primers mutagénicos con gran fidelidad y sin desplazamiento del primer generando moléculas de doble hebra de ADN con una de las hebras conteniendo la mutación deseada y los nicks, los cuales son sellados por algunos componentes de la mezcla enzimática.

Luego, los productos de la reacción térmica cíclica son tratados con la enzima de restricción *Dpn I* que posee actividad de endonucleasa específica para ADN metilado y hemimetilado (cuya secuencia blanco es: 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'), con el fin de digerir el ADN parental usado como templado. Dado que el ADN aislado de muchas de las líneas de *E. coli* está metilado por Dam, es susceptible de ser digerido por la *Dpn I*.

Finalmente, la mezcla de reacción, enriquecida en múltiples hebras simples de ADN con la mutación correspondiente es transformada en células electro competentes de *E. coli* (en este caso la cepa **DH5α**), en las cuales el ADN monohebra mutado, cerrado y circular es convertido en su forma dúplex de manera *in vivo*.

### II. Purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos en medio LB líquido.

La purificación del ADN plasmídico de las cepas de *E.coli* transformadas con el plásmido pHT315Abmut (DH5α ó SC110) se realizó utilizando el Wizard® Plus SV Minipreps ADN Purification System de Promega que brevemente consiste en lo siguiente.

Se tomó una colonia aislada de la placa de cultivo y se inocularon 10ml de medio LBamp<sup>100</sup> con ella. Se creció el cultivo a 37°C y 250rpm durante 8-12 horas. Después se centrifugó el cultivo durante 10 minutos para concentrar las células, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 250µl de la solución de resuspensión celular.

Se agregaron 250µl de la solución de lisis celular y se mezcló invirtiendo el tubo cuatro veces.

Posteriormente se agregaron 10µl de la solución con la proteasa alcalina y se mezcló por inversión del tubo. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, después de los cuales se agregaron 350µl de solución de neutralización y se mezcló de nuevo por inversión del tubo. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos.

Se insertó la columna en el tubo colector y se depositó la mezcla obtenida en el paso anterior dentro de la columna. Se centrifugó a temperatura ambiente por 1 minuto, después de lo cual se eliminó el sobrenadante y se reinsertó la columna en el tubo colector.

Para lavar, se agregaron 750µl de la solución de lavado. Se centrifugó durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante y se reinsertó la columna en el tubo colector para centrifugar de nuevo durante 2 minutos más.

Para eluir el ADN plasmídico de la columna, se transfirió la columna a un tubo eppendorf limpio de 1.5ml y se agregaron 25µl de agua libre de nucleasas sobre la columna.

Por último, se centrifugó una vez más durante 1 minuto, se retiró la columna del tubo y se almacenó el ADN plasmídico a -20°C.

\*Todos los pasos de centrifugación se realizaron a 13000rpm y temperatura ambiente.

**\*Solución de resuspensión celular:** 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM EDTA

**\*Solución de lisis celular:** 0.2M NaOH, 1% SDS

**\*Solución de neutralización:** 4.09M de hidrocloreto de guanidina, 0.759M de acetato de potasio, 2.12M de ácido acético glacial; pH4.2

**\*Solución de lavado:** Acetato de potasio 80mM, Tris-HCl 8.3mM (pH 7.5), EDTA 40µM, etanol al 60%

### **III. Preparación de las células electro competentes de *E.coli* DH5a.**

En condiciones de esterilidad:

Se creció un cultivo fresco de las células en 20ml de medio líquido YENB.

Se inoculó 1L de medio YENB líquido fresco y estéril con 10ml del cultivo anterior y se crecieron las células a 37°C y 250rpm hasta que alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 0.6.

El cultivo anterior se incubó durante 5 minutos en hielo y se transfirió a 4 botellas de plástico estériles frías de 250ml, para posteriormente centrifugar a 4000rpm y 4°C en un rotor de ángulo libre JS7.5 en una centrifuga Beckman J2-HS.

Se eliminó por completo el sobrenadante, se lavó el pellet en 100ml de agua estéril fría y se centrifugó una vez más en las condiciones mencionadas anteriormente. Se eliminó de nuevo el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 20ml de glicerol estéril frío al 10% y se centrifugó en las condiciones anteriores.

Finalmente las células fueron resuspendidas en 2 a 3ml de glicerol estéril frío al 10% y se hicieron alícuotas de 40µl que fueron colocadas en tubos eppendorf estériles de 0.5ml.

Las alícuotas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

#### **IV. Preparación de las células competentes de Ca<sup>2+</sup> de *E.coli* SC110.**

En condiciones de esterilidad:

Se puso un precultivo de la cepa de *E.coli* SC110 en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C y 250rpm durante 8-12h.

Se inocularon 100ml de medio LB con 2ml del precultivo anterior y se incubó a 37°C y 250rpm hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0.6 (aproximadamente 2 horas).

El cultivo celular se incubó en hielo durante 5 minutos y se distribuyó el cultivo en 2 tubos falcon estériles fríos de 50ml.

Se centrifugó a 3000rpm y 4°C durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 10ml de buffer CaCl<sub>2</sub> 100mM, 15% v/v de glicerol estéril frío y la suspensión celular se incubó durante 30 minutos en hielo.

La suspensión celular se centrifugó una vez más en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2ml del buffer anterior mas 180µl de DMSO.

Finalmente, se hicieron alícuotas de 200µl de la suspensión celular anterior en tubos eppendorf estériles de 1.5ml y se guardaron a -70°C hasta su uso.

#### **V. Preparación de las células electrocompetentes de *B.thuringiensis*.**

En condiciones de esterilidad:

Se creció la cepa 407<sup>-</sup> de *B. thuringiensis* en una caja de LB sólido a 30°C por 12h.

Se tomó una azada grande del cultivo anterior y se inocularon 100ml de medio BHI estéril con ella. El cultivo se incubó a 30°C y 250rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.6.

Posteriormente, el cultivo fue transferido a 2 tubos falcon estériles fríos de 50ml y se centrifugó a 5000rpm y 4°C por 5 minutos. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50ml de buffer EB frío y estéril.

La suspensión celular se centrifugó de nuevo en las condiciones antes mencionadas y se eliminó de nuevo el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 3ml del buffer EB estéril frío y con esta suspensión se hicieron alícuotas de 350µl en tubos eppendorf estériles de 1.5ml.

Las alícuotas se guardaron a -70°C hasta su uso.

**Buffer EB:** 0.625M de sacarosa, 1mM de MgCl<sub>2</sub>. Disolver en agua destilada y esterilizar durante 20 min a 15 lb/p.

## **VI. Purificación de oligonucleótidos por PAGE.**

Protocolo proporcionado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Preparar un gel de acrilamida mezclando 15 ml de la solución stock (tabla 10), 120µl de persulfato de amonio al 10% y 15µl de TEMED en una cámara de electroforesis tipo "Tall mighty" con separadores de 1.5mm y peine de 5 pozos del mismo grosor. Cada pozo debe tener un ancho y altura de 13mm. El proceso de gelificación toma aproximadamente 5 a 10 min.

**NOTA: Para oligos de longitudes mayores a 45 nucleótidos la concentración de la acrilamida deberá ser de 12% y para oligos mayores de 65 deberá ser de 10% conservando la proporción 19:1/acrilamida:bisacrilamida**

Precorrer el gel durante 15min a 350V, apagar la fuente de poder y lavar los pozos con el mismo buffer de corrida (TBE 1X) utilizando una jeringa de 5ml. Cargar 50µg de material (oligo crudo) por carril.

**NOTA: El volumen de muestra variará de acuerdo con la concentración del oligo, para cargar el gel se necesitan aprox. 50µl de oligo y 10µl de azul de bromofenol por carril.**

Correr el gel a 350V hasta que el azul de bromofenol empiece a salir por el borde inferior del gel (aproximadamente 1.5h).

Visualizar el gel sobre una placa de silica fluorescente (de las utilizadas en cromatografía en capa fina) con luz UV de onda corta (254nm) y cortar la banda correspondiente a la longitud del oligo (generalmente la banda de mayor concentración y de menor migración).

Colocar la banda en un tubo eppendorf de 1.5ml y agregar 1ml de agua miliQ estéril o hasta cubrir totalmente el trozo de gel. Incubar a 37°C durante 12h, de preferencia con agitación rotatoria.

Retirar el sobrenadante y concentrar la solución hasta 200µl aproximadamente en un Savant, calentando ligeramente (temperatura no mayor a los 40 grados), por un lapso aproximado de 2h.

Agregar 1ml de n-butanol y "vortexear" fuertemente durante 30 segundos. Centrifugar a 13000rpm durante 1 minuto. Eliminar la fase superior y repetir una vez más la extracción con n-butanol. En este punto solo debe quedar un pellet transparente.

Agregar 1ml de etanol absoluto (muy importante), agitar en vortex y centrifugar (3 minutos). Eliminar el sobrenadante por decantación.

Secar el pellet en Savant.

Disolver el pellet en 115µl de agua miliQ estéril y medir absorbancia a 260nm (tomar como referencia el agua miliQ que se usó para disolver). La dilución para medir absorbancia es de 5µl de oligo + 495µl de agua). El valor leído es multiplicarlo por 3.3 para obtener la concentración en µg/µl.

**Tabla 10. Preparación del stock de acrilamida al 15% utilizado durante la purificación de los oligonucleótidos mediante PAGE.**

<b>Stock de acrilamida al 15% y 7M de urea (100 ml de volumen final)</b>	
<b>acrilamida</b>	14.25 g
<b>bisacrilamida</b>	0.75 g
<b>urea</b>	42 g
<b>buffer TBE10X</b>	10 ml
<b>agua miliQ</b>	46 ml

Filtrar la solución para eliminar partículas insolubles

**\*Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 10x:** 0.9M Tris-borato, 0.02M EDTA, pH 8.3. Disolver en agua destilada.

## **VII. Preparación de los liposomas o PC-SUV (Small Unilamellar Vesicles of Phosphatidyl Choline).**

Para la preparación se disolvieron 40µl de L-α-Fosfatidilcolina de huevo de pollo (Avanti® Polar Lipids) en cloroformo, en una relación de volumen 1:1.

Los lípidos se esparcieron sobre la superficie interna de un matraz erlenmeyer de 10ml procurando la formación de una película lipídica adherida a la pared de vidrio mediante la evaporación lenta del solvente, aplicando una suave corriente de Nitrógeno en el fondo del matraz. Posteriormente, para eliminar por completo el solvente en condiciones no oxidativas, la película lipídica se secó al vacío durante 12 horas en un Speed Vac SVC100 (Savant).

Los lípidos se hidrataron aplicando 1.3ml de buffer CHES 10mM, NaCl 150mM , pH9, durante 5-10 minutos, girando suavemente el matraz, después de lo cual, se eliminó el oxígeno del matraz aplicando una corriente de Nitrógeno y se tapó. La mezcla se “vortexeó” brevemente 2 veces, hasta obtener una solución homogénea de vesículas multilaminares.

Para formar las SUV's, la mezcla anterior se sonicó dando pulsos de 1 minuto en un sonicador de baño maría (Branson 1200), con intervalos de 1 minuto entre cada pulso manteniendo la mezcla a 4°C. Esto se hizo hasta obtener una solución semitranslúcida (aproximadamente 3 pulsos).

Los liposomas se guardaron a 4°C en alícuotas de 1ml.

### **VIII. Método de obtención del jugo gástrico de *M. sexta*.**

Para extraer el jugo gástrico que de *M. sexta*, el cual contiene a las proteasas encargadas de procesar *in vivo* a las toxinas Cry1A y utilizado para los ensayos de oligomerización se hizo lo siguiente:

Se envolvieron las larvas de 4º instar de desarrollo de *M. sexta* en papel aluminio y se incubaron a 4°C en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se fijó cada larva a una tabla de disección por ambos extremos con ayuda de un par de alfileres y se hizo un corte longitudinal a lo largo de la línea media de la larva, excepto en los 3 segmentos finales de ambos extremos de la larva.

Se separó el intestino medio de las larvas y se vació el contenido de éste en un tubo falcon de 15 ml, estéril y frío.

Una vez que se colectó el jugo gástrico de todas las larvas, se centrifugó durante 10 minutos a 9000rpm y 4°C, después de lo cual, se recuperó el sobrenadante y se filtró con un filtro de 0.45 µm.

Posteriormente, se midió el pH para confirmar que estuviera en el rango aproximado de 10.5 y se hicieron alícuotas de 0.5 ml, las cuales se guardaron a -70°C hasta su uso.

### **IX. Métodos de purificación de las toxinas Cry1A clonadas en *E.coli* y expresadas en cuerpos de inclusión dentro del citoplasma celular.**

Para los tres protocolos de purificación de la toxina expresada en *E.coli* como cuerpos de inclusión, se partieron de 500 ml de cultivo celular, para lo cual:

#### **Protocolo 1 y 2**

Se crecieron las cepas en una placa de LBamp<sup>100</sup> sólido durante 8 horas a 37°C. Se tomó una azada grande del cultivo anterior y se inocularon 500ml de LBamp<sup>100</sup> líquido. El cultivo se incubó durante 48h a 37°C y 250 rpm, agregando una nueva dosis de Amp a una concentración final de 100µg/ml después de las primeras 24h de incubación.

Se partió de esta gran cantidad de cultivo celular líquido debido a que las cepas de *E.coli* expresaban a las protoxinas mutantes en cantidades sumamente bajas.

#### **Protocolo 1**

Para recuperar las células, se centrifugó el cultivo durante 20 minutos a 10 000 rpm y 4°C. El pellet celular se resuspendió en 20ml del buffer salino de fosfatos y la suspensión se centrifugó de nuevo en las condiciones antes mencionadas. El pellet se resuspendió en 10ml de buffer TES.

Para romper las células, la suspensión se congeló a -70°C durante 30 minutos, con ayuda de hielo seco. Posteriormente se agregó 1ml del stock de lisozima y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Se sonicó la muestra dando 5 pulsos al 100% de intensidad y 1 minuto de duración, con intervalos de 1 minuto de descanso durante los cuales se colocó la muestra en hielo.

La suspensión celular sonicada se centrifugó durante 30 minutos a 12 500 rpm y 4°C; el pellet se resuspendió en 10 ml de buffer TTN, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y se centrifugó durante 40 minutos a 12 500 rpm y 4°C. Este lavado con TTN se repitió dos veces más

El pellet se resuspendió en 10ml de PBS-acetona 5:1 v/v y se centrifugó durante 30 minutos a 13 000 rpm y 4°C. Este lavado se repitió una vez más.

El pellet se resuspendió en 10 ml de PBS y se centrifugó en las condiciones mencionadas anteriormente. Este lavado se repitió una vez más y se desechó el sobrenadante.

Finalmente, el pellet que contiene a la protoxina Cry1A se guardó a -20°C hasta su uso.

- \* **Buffer salino de fosfatos o PBS:** 10mM de fosfatos, 150mM de NaCl, pH 7.2
- \* **Buffer TES (Tris-EDTA-Sacarosa):** 25mM de Tris, 10mM de EDTA y 15% p/v de sacarosa, pH 8
- \* **Stock Lisozima:** 10mg/ml en 10mM de Tris-HCl pH 8.
- \* **Buffer TTN (Tris-Tritón-NaCl):** 20mM de Tris-HCl, 1% v/v de tritón X-100 y 1M de NaCl, pH 7.2.

## **Protocolo 2**

Este protocolo es una modificación que hicimos al protocolo utilizado por Masson *et al.*, 1989, para la purificación de la protoxina expresada en *E.coli*, debido a que en el laboratorio no se cuenta con la prensa francesa de presión, ni con la mezcla de Renografín-76:

Para recuperar la biomasa celular, se centrifugó el cultivo durante 20 minutos a 10000rpm y 4°C.

Para lavar las células, el pellet celular se resuspendió en 10ml de buffer fosfato de sodio 0.1M pH6 y la suspensión se centrifugó de nuevo en las condiciones antes mencionadas.

Para romper las células, el pellet obtenido en el paso anterior se resuspendió en 15ml del mismo buffer y se congeló a -70°C durante 30 minutos con ayuda de hielo seco. Posteriormente se agregó 1ml del stock de lisozima y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

La muestra se sonicó dando 5 pulsos al 100% de intensidad y 1 minuto de duración, con intervalos de 1 minuto de descanso durante los cuales se colocó la muestra en hielo.

Se centrifugó durante 15 minutos a 10 000 rpm y 4°C y el pellet se resuspendió en buffer de fosfato de sodio 0.1M, NaCl 0.1M, pH 6.

Se centrifugó de nuevo durante 15 minutos a 10 000 rpm y el pellet que contiene a la protoxina se guardó a 20°C hasta su uso.

**Stock Lisozima:** 10mg/ml en 10mM de Tris-HCl pH 8.

### Protocolo 3

Se crecieron las cepas en una placa de LBamp<sup>100</sup> sólido durante 12 horas a 37°C. De las células anteriores se tomó una colonia aislada y con ella se inocularon 4ml de medio TBamp<sup>100</sup> líquido y se crecieron durante 8 horas a 37°C y 250rpm

Con el cultivo anterior se inocularon 440 ml del medio TBamp<sup>100</sup> y se creció durante 48-60 horas a 37°C y 250rpm.

Para recuperar la biomasa celular, el cultivo se centrifugó durante 5min a 10 000 rpm y 4°C.

El pellet se resuspendió en 100ml de solución de lisis y a la suspensión se le agregaron 4 mg de lisozima. Se incubó durante 12h y 37°C con agitación lenta.

La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 10 000rpm y 4°C. El pellet se resuspendió en 30 ml de la solución de lavado I.

Se sonicó dando 6 pulsos de 1 minuto al 100% de intensidad, con descansos de 1 minuto durante los cuales se colocó la muestra en hielo. La mezcla anterior se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 10 000rpm y 4°C.

El pellet se resuspendió en 30 ml de la solución de lavado I y se centrifugó en las condiciones mencionadas anteriormente. Se hicieron 4 lavados como este.

El pellet se resuspendió en 30ml de la solución de lavado II y se centrifugó en las condiciones mencionadas anteriormente. Este lavado se repitió 3 veces más.

El pellet se resuspendió en 20ml de agua estéril con PMSF a una concentración final de 0.1mM y se centrifugó en las condiciones antes mencionadas. Se repitió una vez más este lavado.

El pellet con la protoxina se guardó a -20°C hasta su uso.

**Solución de lisis:** 50mM de Tris, 50mM de EDTA, Sacarosa al 15% p/v.

**Solución de lavado I:** 0.5M de NaCl

**Solución de lavado II:** 0.5M de NaCl, Tritón X-100 al 2% p/v.

## **X. Artículo científico:**

Los experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis contribuyeron con el desarrollo del siguiente artículo científico:

# Dominant Negative Mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Function as Anti-Toxins: Demonstration of the Role of Oligomerization in Toxicity

Claudia Rodríguez-Almazán<sup>1</sup>, Luis Enrique Zavala<sup>1</sup>, Carlos Muñoz-Garay<sup>1</sup>, Nuria Jiménez-Juárez<sup>1</sup>, Sabino Pacheco<sup>1</sup>, Luke Masson<sup>2</sup>, Mario Soberón<sup>1</sup>, Alejandra Bravo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos, Mexico, <sup>2</sup> Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada

## Abstract

**Background:** *Bacillus thuringiensis* Cry toxins, that are used worldwide in insect control, kill insects by a mechanism that depends on their ability to form oligomeric pores that insert into the insect-midgut cells. These toxins are being used worldwide in transgenic plants or spray to control insect pests in agriculture. However, a major concern has been the possible effects of these insecticidal proteins on non-target organisms mainly in ecosystems adjacent to agricultural fields.

**Methodology/Principal Findings:** We isolated and characterized 11 non-toxic mutants of Cry1Ab toxin affected in different steps of the mechanism of action namely binding to receptors, oligomerization and pore-formation. These mutant toxins were analyzed for their capacity to block wild type toxin activity, presenting a dominant negative phenotype. The dominant negative phenotype was analyzed at two levels, *in vivo* by toxicity bioassays against susceptible *Manduca sexta* larvae and *in vitro* by pore formation activity in black lipid bilayers. We demonstrate that some mutations located in helix  $\alpha$ -4 completely block the wild type toxin activity at sub-stoichiometric level confirming a dominant negative phenotype, thereby functioning as potent antitoxins.

**Conclusions/Significance:** This is the first reported case of a Cry toxin dominant inhibitor. These data demonstrate that oligomerization is a fundamental step in Cry toxin action and represent a potential mechanism to protect special ecosystems from the possible effect of Cry toxins on non-target organisms.

**Citation:** Rodríguez-Almazán C, Zavala LE, Muñoz-Garay C, Jiménez-Juárez N, Pacheco S, et al. (2009) Dominant Negative Mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Function as Anti-Toxins: Demonstration of the Role of Oligomerization in Toxicity. PLoS ONE 4(5): e5545. doi:10.1371/journal.pone.0005545

**Editor:** Ching-Hong Yang, University of Wisconsin-Milwaukee, United States of America

**Received:** March 10, 2009; **Accepted:** April 20, 2009; **Published:** May 14, 2009

**Copyright:** © 2009 Rodríguez-Almazán et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by CONACyT; DGAPA-UNAM; NIH 1R01 AI066014-01 and USDA 2207-35607-17780. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: bravo@ibt.unam.mx

## Introduction

*Bacillus thuringiensis* (Bt) bacteria produce crystal proteins (denominated also Cry toxins) that have insecticidal activity. One of the most successful applications of Cry proteins has been their expression in transgenic crops resulting in their effective protection from insect damage and lowering the use of chemical insecticides [1]. Extensive studies show that Cry toxins used in transgenic crops are safe to the environment and non-toxic to other organisms [2–4]. Nevertheless, there are still concerns related to the possible impact of by products from transgenic Bt crops as Bt-cotton and Bt-corn on non-target organisms in ecosystems adjacent to agricultural fields [5–9].

Pore-forming toxins are important virulent-factors in different diseases induced by several mammalian-pathogenic bacteria [10]. Based on an understanding of their mechanism of action, different strategies have been proposed to neutralize their action [11]. Among these strategies, the use of neutralizing antibodies that recognize toxin regions involved in receptor binding or the use of fragments of toxin-receptors were shown to efficiently protect the

cells from intoxication [12,13]. In addition, dominant negative (DN) inhibitors which are inactive mutant-toxins, able to form oligomer structures but affected in their pore formation activity, work as powerful inhibitors since they are able to co-assemble into hetero-oligomers together with the wild type toxin resulting in an effective inactivation of pore formation and toxicity [14–16].

Cry toxins produced by Bt are pore-forming toxins [1]. Their mechanism of action is complex and involves several steps. In the case of Lepidopteran-active Cry1A proteins, the binding to a primary receptor, the cadherin protein, induces the cleavage of an amino-terminal helix  $\alpha$ -1 leading to toxin oligomerization [17,18]. Then the Cry oligomer binds to a second receptor. Second receptors such as aminopeptidase N or alkaline phosphatase are anchored to the membrane by a glycosylphosphatidylinositol-anchor, and are localized within lipid rafts [18,19]. The oligomeric toxin inserts into the membrane forming ionic pores causing osmotic lysis of midgut epithelial cells and insect death [1,18].

Although it has been recognized for decades that Cry toxins exert their toxic effect by forming pores into the midgut cells of their target insect, recently an alternative and opposing model was

proposed. The alternative model proposed that after the monomeric Cry toxin binds cadherin, a  $Mg^{+2}$ -dependent adenylyl cyclase/PKA-signaling pathway is activated leading to cell death [20]. In this alternative model, neither oligomerization or pore formation are involved in Cry toxicity.

We hypothesized that mutants of Cry toxins affected in pore formation might work as DN inhibitors. The Domain I of Cry toxins is involved in pore formation [21–25]. In this work we analyzed several mutations in helix  $\alpha$ -4, in helix  $\alpha$ -3 or in domain II-loop 3. These mutants were affected in pore formation, toxin oligomerization and receptor binding, respectively. We found that DN phenotype is linked to mutations affected in pore formation but that are still able to form oligomeric structures with the wild type toxin resulting in a complete inhibition of its insecticidal activity.

The fact that DN mutations blocked toxicity of wild type Cry toxin, supports the concept that oligomerization is a fundamental step in Cry toxin mode of action in agreement with the pore formation model of Cry toxin action.

## Results

### Cry1Ab mutant characterization

We isolated and characterized Cry1Ab mutants affected at different steps of their mode of action, namely receptor binding, oligomerization and pore-formation to determine if any of them showed a DN phenotype. First, we constructed a Cry1Ab mutant G439D located in loop 3 of domain II. We selected this mutation since a similar mutant, previously characterized in another Cry toxin, the Cry1Ac [26], was shown to have reduced toxicity toward *M. sexta*, reduced binding to BBMV and because the loop 3 region is important for binding with cadherin receptor [26–28]. Secondly, we used a previously described Cry1Ab mutant R99E, located in helix  $\alpha$ -3 that showed impaired toxin oligomerization [21]. Finally, we constructed several point mutations in helix  $\alpha$ -4 of Cry1Ab such as E129K, N135C, D136N, A140K, T142C, T143D, and T143N, that in the context of Cry1Aa toxin showed to be affected in pore formation and toxicity [22,23]. We also constructed two double mutants, the D136N/T143D and E129K/D136N. Binding analysis with *P. xylostella* BBMV, were reported only for E129K and D136N mutants, revealing no effects on binding of these two mutants, and suggesting that loss of binding was not the reason for the loss of toxicity in these Cry1Aa mutants [25]. However, the characterization of these mutants was partial since the binding to *M. sexta* membranes, as well as the oligomerization process was not analyzed.

All of the Cry1Ab mutants analyzed in this work produce bipyramidal crystal inclusions similar to the wild type toxin with exception of mutant T143N that was not further analyzed. With the exception of two mutants, all other mutant toxins showed severe reductions in toxicity when tested against *M. sexta* larvae (Table 1). The two toxins that retain activity corresponds to mutants D136N and A140K, located in helix  $\alpha$ -4, that showed a reduction of two- and four-fold in their insecticidal toxicity when compared with the wild type toxin, respectively. The crystal inclusions produced by Cry1Ab mutants were purified and protoxins were activated with trypsin; all proteins produced a similar 60 kDa activated toxin fragment, indicating no major effects on toxin structure that would result in enhanced susceptibility to protease action (data not shown).

To determine if the Cry1Ab mutants had altered receptor binding, trypsin activated proteins were labeled with biotin and their binding to *M. sexta* BBMV was analyzed (Fig. 1). All mutants except G439D toxin, bound specifically to BBMV as shown in the

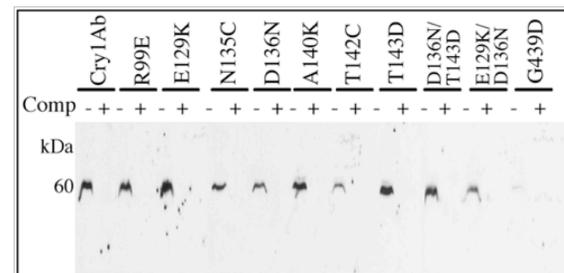
**Table 1.** Toxicity of wild type and mutated Cry1Ab toxins against *Manduca sexta* larvae.

$\delta$ -endotoxin	LC <sub>50</sub> ng/cm <sup>2</sup> (95% fiducial limits)	Location of mutated residues
Wt Cry1Ab	1.3 (0.9–1.7)	
R99E	>2000	Helix $\alpha$ -3 of Domain I
E129K	>2000	Helix $\alpha$ -4 of Domain I
N135C	16.4 (10.9–22.7)	Helix $\alpha$ -4 of Domain I
D136N	2.8 (2.2–3.8)	Helix $\alpha$ -4 of Domain I
A140K	5.3 (2.8–8.2)	Helix $\alpha$ -4 of Domain I
T142C	34.9 (28.3–41.7)	Helix $\alpha$ -4 of Domain I
T143D	>2000	Helix $\alpha$ -4 of Domain I
D136N, T143D	>2000	Helix $\alpha$ -4 of Domain I
E129K, D136N	>2000	Helix $\alpha$ -4 of Domain I
G439D	>2000	Loop 3 of Domain II

doi:10.1371/journal.pone.0005545.t001

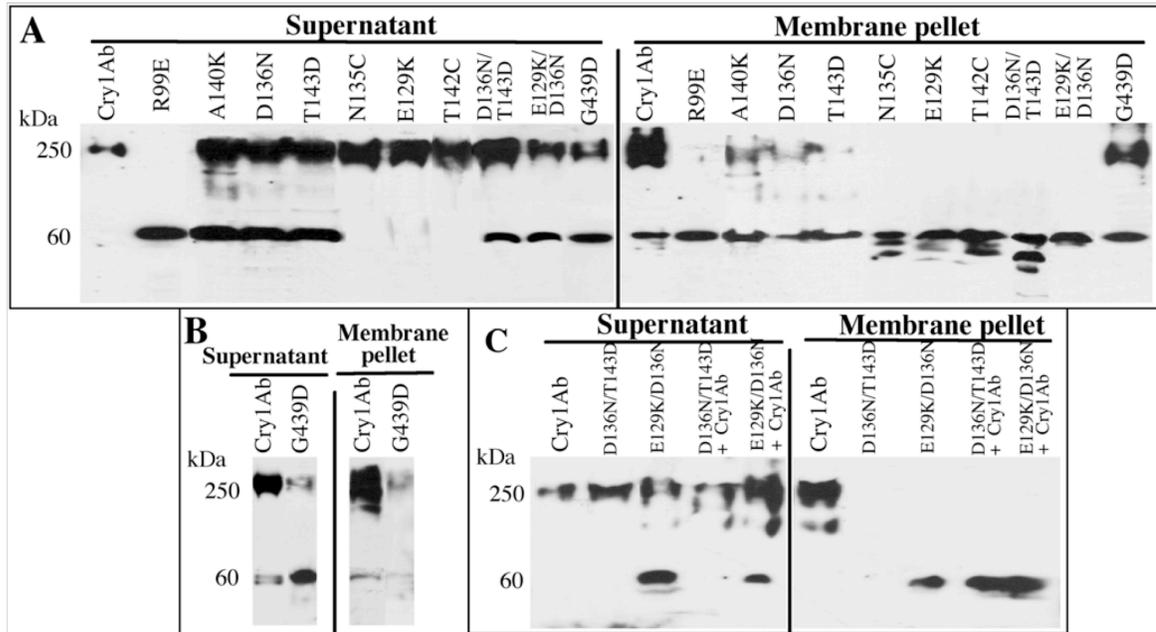
homologous binding competition assay. The exception was mutant G439D that showed reduced binding to BBMV as was previously reported in the context of Cry1Ac toxin [26]. Figure 1 shows that the rest of biotinylated toxins bind to BBMV membranes isolated from *M. sexta* larvae when assayed in the absence of competitor (lanes marked –). In contrast, in the presence of 500-fold molar excess of unlabeled toxin competitor (lanes marked +) the binding of biotinylated toxin is competed.

We then analyzed the ability of the mutant proteins to oligomerize. In this assay the Cry1Ab mutant-prototoxins were proteolytically activated with *M. sexta* midgut proteases in the presence SUV liposomes and the antibody scFv73 that mimics an epitope of the cadherin receptor that interacts with loop 2 of domain II [17,18,21]. The oligomeric structure was observed as a low mobility 250-kDa band in a Western blot assay using a specific anti-Cry1Ab antiserum. As shown in Figure 2, only mutant R99E, located in helix  $\alpha$ -3 was affected in oligomerization as previously reported [21]. The oligomeric structure of wild type Cry1Ab toxin was mainly found inserted into the membrane pellet, in contrast with the helix  $\alpha$ -4 mutants, that remained in the soluble fraction



**Figure 1.** Binding competition assays of Cry1Ab mutants to BBMV of *Manduca sexta* larvae. Binding of biotin labeled toxins was analyzed in the absence (lanes –) or in the presence (lanes +) of 500-fold molar excess of unlabeled toxin. The biotinylated toxins bound to the vesicles, were visualized with streptavidin-HRP conjugate. The Cry1Ab and all mutants located in domain I (helices  $\alpha$ -3 or  $\alpha$ -4) bound specifically to BBMV only mutant G439D was affected in binding to the *M. sexta* BBMV.

doi:10.1371/journal.pone.0005545.g001



**Figure 2. Oligomerization of Cry1Ab proteins.** Panel A, Cry1Ab and mutant protoxins were proteolytically activated with *M sexta* midgut proteases in the presence of SUV liposomes and scFv73 antibody. Membrane pellets were recovered by centrifugation and the toxin detected by Western blot using an anti-Cry1Ab antibody in the supernatant and in the membrane fraction. The oligomeric structure of 250-kDa of the Cry1Ab is observed inserted into the membrane pellet, in contrast with the helix  $\alpha$ -4 mutants, that remains in the soluble fraction. The mutant R99E, located in helix  $\alpha$ -3 did not form oligomeric structures. Panel B, Oligomerization of Cry1Ab and mutant G439D proteins performed as above but in the presence of the cadherin CR12 fragment instead of scFv73 antibody. Under these conditions the Cry1Ab wild type is observed inserted into the membrane and oligomerization of G439D mutant was severely reduced. Panel C, Oligomerization of the mixtures of 1:1 Cry1Ab: Mutant proteins performed as in Panel A. The oligomer of double mutants or in the 1:1 mixture of Cry1Ab with the double mutants is observed in the soluble fraction.

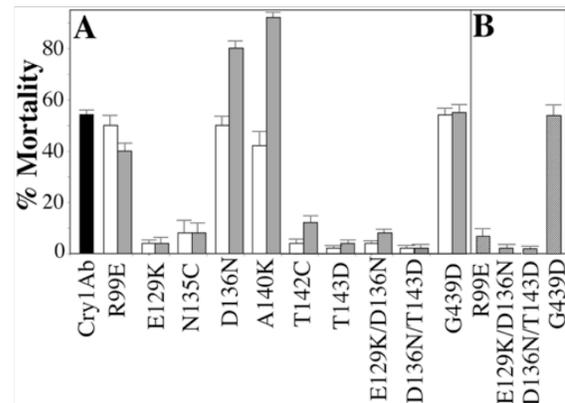
doi:10.1371/journal.pone.0005545.g002

suggesting that helix  $\alpha$ -4 mutants were affected in membrane insertion (Fig. 2A). Finally, the G439D mutant, located in domain II loop 3, also showed an oligomeric structure that was mainly found inserted into the membrane.

Since our oligomeric assay utilizes the scFv73 antibody that mimics the cadherin repeat 11 (CR11) region of the cadherin receptor which recognizes loop 2 in domain II and considering that the G439D mutation is located in a toxin region which interacts with a different region of the cadherin receptor, i.e. the CR12 fragment [28,29], we repeated the oligomerization assay of G439D using a purified CR12 fragment from cadherin receptor, instead of the scFv73 antibody. Under these conditions the oligomerization of the G439D mutant was severely reduced when compared with the wild type toxin (Fig 2B).

#### In vivo inhibition of toxin insecticidal activity

To compare the potency of the mutants as DN inhibitors, we tested their ability to inhibit the toxicity of Cry1Ab to *M. sexta* larvae. We fed the larvae with different mixtures of wild type and mutant toxins. We used an equimolar ratio (1:1) as well as a lower ratio (0.25:1 of mutant: wild type). Figure 3A shows that some mutants located in helix  $\alpha$ -4 completely blocked toxin action even at sub-stoichiometric ratios. Mutants D136N and A140K did not show DN phenotype because they were not severely affected in toxicity (Table 1), showing an increase in mortality when mixed with the wild type toxin at 1:1 ratio. The higher activity is due to the fact that we used 2 ng/cm<sup>2</sup> of each toxin, one being wild type



**Figure 3. In vivo analysis of the Dominant Negative phenotype of Cry1Ab mutants.** Panel A, Toxicity assays against *M sexta* larvae with Cry1Ab at 2 ng/cm<sup>2</sup> of diet (black bar) or with a mixture of the same concentration of Cry1Ab wild type with the mutant proteins at two different ratios, 0.25:1 mutant:wild type (white bars) or 1:1 (grey bars). Some mutants of helix  $\alpha$ -4 show a clear DN phenotype. Panel B, Toxicity assays against *M sexta* larvae as panel A but at 10:1 mutant:Cry1Ab ratio (dashed bars). R99E reduce toxicity of wild type under this condition in contrast mutant G439D did not affect toxicity of the wild type toxin.

doi:10.1371/journal.pone.0005545.g003

and the other being either the D136N or A140K mutant that showed reduced toxicity but remain active (Table 1). This mixture represents, therefore, the additive mortality of the two toxin proteins. In contrast, helix  $\alpha$ -3 R99A and domain II-loop 3 G439D mutants did not show a DN phenotype. The R99A mutant, showed a competition phenotype since only a high ratio of 10:1 reduced the toxicity of Cry1Ab. In contrast, the G439D mutant showed no effect on Cry1Ab toxicity even at a 10:1 ratio (Fig. 3B).

#### In vitro inhibition of toxin pore formation activity

To determine if pore formation inhibition by the DN mutants depends on the ability to form hybrid complexes with wild type toxin, we produced homo- and hetero-oligomers and measured their ability to form conductive ion channels in black lipid bilayers. Wild type Cry1Ab or the D136N/T143D and E129K/D136N double mutants were activated in the presence of SUV liposomes and scFv73 antibody as described above to produce oligomeric structures. The hetero-oligomers were prepared by mixing the DN mutants with the wild type in a 1:1 ratio during activation under similar conditions described above. We analyzed oligomer formation in the supernatant and pellet fractions, after centrifugation of the activation reaction to separate toxin inserted into liposomes from soluble proteins. Figure 2C shows that the 250-kDa oligomer was observed mainly in the pellet in the case of Cry1Ab. Nevertheless, in the case of the D136N/T143D and E129K/D136N double mutants or in the 1:1 mixture of Cry1Ab with the double mutants, the 250-kDa oligomers were observed in the soluble fraction (Fig 2C). The soluble and membrane pellet fractions of activation reactions were used to assay pore formation activity in black lipid bilayer system as described previously [21]. The results indicated that oligomers produced by the mutant toxins were severely affected in their pore formation activity when compared with wild type toxin. The hetero-oligomers formed by a mixture of wild type and mutant proteins were also inactive in pore formation. Figure 4A shows representative traces of the activity of Cry1Ab, the mutant E129K/D136N and the mixture of these two proteins in lipid bilayers. Similar data were obtained with the mutant D136N/T143D (data not shown). Current-voltage curves are presented in figure 4B, showing that only wild type Cry1Ab toxin has pore formation activity. These results are

consistent with the notion that DN mutants inactivate the wild type toxic action *in vivo* by forming inactive hetero-oligomers unable to insert into the membrane.

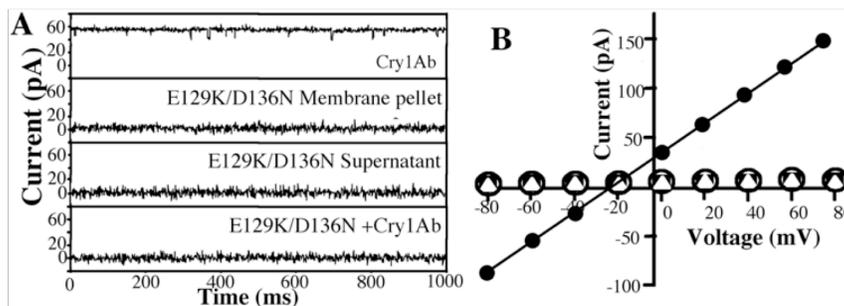
#### Discussion

The helix  $\alpha$ -4 mutations analyzed in this study do not impair toxin assembly in a pre-pore structure, but rather block an essential conformational transition of the assembled complex necessary for membrane insertion and pore formation. The helix  $\alpha$ -4 mutations that resulted in loss of toxin action act as DN anti-toxins blocking toxicity and pore formation of wild type toxin. These data strongly indicate that oligomerization and pore formation are necessary steps in the mode of action of Cry toxins. In contrast, the helix  $\alpha$ -3 R99A mutant that is affected in the process of oligomerization but retain binding capacities to membrane receptors, displayed competitive binding for the receptor at 10:1 ratio (mutant: wild type). Finally a mutant in domain II, G439D, with altered binding interaction with the BBMV and the cadherin receptor, did not compete with Cry1Ab for binding and neither showed a DN phenotype.

These data are similar to some reported mutants of the anthrax toxin; a mutant affected in its activation by furin, was unable to undergo oligomerization, yet still bound to, and competed receptor binding causing a competitive inhibition of toxin action only at high at 10:1 ratios [30,31]. In another report an anthrax mutant affected in toxin oligomerization did not show a DN phenotype since it was unable to form hetero-oligomers with the wild type toxin [32]. Finally, an anthrax mutant with altered receptor binding did not compete for receptor binding and neither affected wild type activity [32].

The molecular mechanism observed in DN phenotype involves toxin oligomerization between different Cry toxin-monomers forming hetero-oligomeric structures between mutant and wild type monomers. The hetero-oligomer that is formed with the double mutants and the wild type Cry1Ab toxin was severely affected in membrane insertion and pore formation activity suggesting a problem in the transition from pre-pore to pore as was previously proposed for anthrax DN mutants [16].

If the assembly of the Cry toxin oligomeric structure is a stochastic procedure, then at a 1:1 ratio the probability to have at least one subunit of the DN mutant in the resulting oligomeric-complex is high.



**Figure 4. In vitro analysis of the Dominant Negative phenotype of E129K/D136N mutant.** Pore formation activity of oligomeric structures obtained as described in figure 2C. Panel A, Representative ionic channel records in lipid bilayers of most common transitions induced by oligomer structures of Cry1Ab, E129K/D136N and a 1:1 mixture of Cry1Ab: E129K/D136N. The observed responses with wild type Cry1Ab showed stable channels with high open probability. No ionic channels were observed either for the double mutant E129K/D136N or for the 1:1 mixture of Cry1Ab with the double mutant. Records were obtained in 300:10 mM KCl (*cis:trans*), 10 mM CHES pH 9, at +60 mV. Panel B, Current/voltage (I/V) relationship of macroscopic currents induced by oligomers of Cry1Ab (●) and by oligomers produced from a 1:1 mixture of Cry1Ab and E129K/D136N (△). The activity of the E129K/D136N mutant was also analyzed in the two fractions obtained after activation, the membrane pellet (○), and supernatant fraction (■).  
doi:10.1371/journal.pone.0005545.g004

If one mutant monomer is enough to completely block the wild type toxin activity, then at 1:1 ratio an effective blockage of toxin action is expected. The fact that we found inhibition of wild type toxin activity at 0.25:1 ratio strongly indicates that a single mutant subunit is sufficient to inactivate the oligomer activity and that oligomerization is an important step in toxin action.

The data presented here provides unequivocal evidence that oligomerization is a key step in the mode of action of Cry1Ab and further supports that pore formation is an important event triggering insect cell death. These data support the pore-forming model of the mode of action of Cry toxins and contradict the model of cell death induced by the interaction with cadherin receptor and subsequent induction of signal transduction pathway.

Recent reports raised the concern that the Cry1A toxins may affect non-target organisms [5–9]. Nevertheless, Cry1A toxins used in transgenic plants have been extensively shown to be specific against target insects and safe to non-target organisms [2–4]. In any case the antitoxins of Cry1A described here could be used to inhibit toxicity of Cry toxins in special conditions like, for example, for attenuation of an accidental effect or a release of unregulated Cry toxin, since they offer an efficient alternative to neutralize and counter the Bt toxin action that would help protect potentially endangered organisms in a particular ecosystem.

## Materials and Methods

### Construction of Cry1Ab mutants

Mutants were produced by site-directed mutagenesis (Quick-Change, Stratagene, La Jolla, CA) using the pHT315Ab harboring *cry1Ab* gene. Appropriate oligonucleotides were synthesized for each mutant. Automated DNA sequencing at UNAM's facilities verified the single point mutations. Acrylamide Bt strain 407 was transformed with recombinant plasmids and selected in Luria broth at 30 °C supplemented with 10 µg ml<sup>-1</sup> erythromycin. For construction of double mutants we used pHT315Ab-D136N harboring a point mutation D136N as template to introduce additional point mutations as E129K or T143D.

### Cry1Ab toxin purification

Bt transformant strains were grown at 30°C in nutrient broth sporulation medium with erythromycin until complete sporulation. Crystal inclusions were observed under phase contrast microscopy and purified by sucrose gradients [33]. Crystals were solubilized in 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.2% β-mercaptoethanol, pH 10.5. The monomeric toxins were obtained by trypsin activation in a mass ratio of 1:20 (1 h, 37°C). Phenylmethylsulfonyl-fluoride (1 mM final concentration) was added to stop proteolysis. The oligomeric Cry1Ab structure was produced as described [17,21] by incubation with svFv73 antibody (1:4 toxin: antibody ratio) purified as described [17] or with CR12 cadherin fragment (1:1 ratio), purified as described [29,34] and 5% midgut juice from *M. sexta* larvae, in 100 µl of solubilization buffer for 1 h at 37°C in the presence of phosphatidylcholine-small unilamellar vesicles (PC-SUV) at 12 µM final concentration. The membrane fraction was separated by ultracentrifugation (30 min at 100,000×g) and the pellet was suspended in 20 µl of 10 mM CHES, 150 mM KCl, pH 9.

## References

- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, et al. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 775–806.
- Mendelson M, Kough J, Vaituzis Z, Matthews K (2003) Are Bt crops safe? *Nature Biotechnol* 21: 1003–1009.
- Chen M, Zhao JZ, Collins HL, Earle ED, Cao J, et al. (2008) A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. *PLoS ONE* 3: e2284.
- Romeis J, Meissle M, Bigler F (2006) Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnol* 24: 63–71.

### Western Blot of Cry1Ab toxin

Cry1Ab and mutant proteins incorporated into PC-SUV or that remained in the soluble fraction were boiled 5 min in Laemmli sample loading buffer, separated in SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membrane. The proteins were detected in Western blots as described [17,21] using polyclonal anti-Cry1Ab.

### Bioassays against *Manduca sexta* larvae

Soluble protoxins (from 0.1 to 2000 ng/cm<sup>2</sup>) were applied onto the diet surface of 24-well plates as described [17]. Protein was determined by the Bradford assay. Mortality was recorded after seven days and lethal concentration (LC<sub>50</sub>) estimated by Probit (Polo-PC LeOra Software). For DN assays different ratios of mutant: wild type (0.25:1, 1:1 and 10:1; w: w) were assayed. The concentration of wild type protoxin used in DN-bioassays was 2 ng of toxin per cm<sup>2</sup> of diet.

### Preparation of Brush Border Membrane Vesicles (BBMV)

*M. sexta* eggs were reared on artificial diet. BBMV from fourth instar *M. sexta* larvae were prepared as reported [35].

### Toxin binding assay

Binding assays were done with 10 µg BBMV protein and 5 nM biotinylated Cry1Ab toxins as described [21]. We used 500-fold excess of unlabeled toxins to compete binding. Unbound toxin was washed by centrifugation and resulting membrane pellet was boiled in Laemmli sample loading buffer, loaded onto SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and labeled-toxin bound to the vesicles, was visualized by incubating with streptavidin-HRP conjugate and developed with luminol as described [21].

### Pore forming activity of Cry1Ab toxins

Black lipid bilayers were made as reported [36] with Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DPPC) (Avanti Polar Lipids). Buffers 300 mM KCl, 10 mM CHES, pH 9 and 10 mM KCl, 10 mM CHES, pH 9 were added to the *cis* and *trans* compartments, respectively. Once a bilayer was formed, the membrane or soluble fractions containing the activated Cry1Ab toxins (wild type, mutant or mixture of wild type with mutant) were added to the *cis* compartment. Single-channel currents were recorded with a Dagan 3900A patch-clamp amplifier (Dagan Corp., Minneapolis, MN) as described [21]. Currents were filtered at 200 or 500 Hz, digitalized on-line at 1 or 2 kHz, and analyzed using a Digidata 1200 interface and Axotape and pClamp software (Axon Instruments, Foster City, CA).

### Acknowledgments

We thank J. Sánchez, J. Champagne and L. Cabrera, for technical assistance.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AB. Performed the experiments: CRA LEZ CMG NJJ SP. Analyzed the data: MS. Contributed reagents/materials/analysis tools: LM. Wrote the paper: LM MS AB.

5. Rosi-Marshall E, Tank JL, Royer TV, Whiles MR, Evans-White M, et al. (2007) Toxins in transgenic crop products may affect headwater stream ecosystems. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 16204–16208.
6. Kramarz PE, de Vaulleury A, Zygmunt PM, Verdun C (2007) Increase response to cadmium and *Bacillus thuringiensis* maize toxicity in the snail *Helix aspersa* infected by the nematode *Phanarhabditis hermaphrodita*. *Environ Toxicol Chem* 26: 73–79.
7. Zwahlen C, Hilbeck A, Howald R, Nentwig W (2003) Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Mol Ecol* 12: 1077–1086.
8. Bohn T, Primicerio R, Hessen DO, Traavik T (2008) Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-transgenic maize variety. *Arch Environ Contam Toxicol* 55: 584–592.
9. Douville M, Gagné F, André C, Blaise C (2009) Occurrence of the transgenic corn cry1Ab gene in freshwater mussels (*Elliptio complanata*) near corn fields: Evidence of exposure by bacterial ingestion. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 17–23.
10. Parker MW, Feil SC (2005) Pore forming protein toxins: from structure to function. *Progress Biophys Mol Biol* 88: 91–124.
11. Rainey GJ, Young JA (2004) Antitoxins: novel strategies to target agents of bioterrorism. *Nature Rev Microbiol* 2: 721–726.
12. Maynard JA, Maassen CB, Lappala SH, Brasky K, Patterson JL, et al. (2002) Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nature Biotechnol* 20: 597–601.
13. Scobie HM, Rainey GJ, Bradley KA, Young JA (2003) Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5170–5174.
14. Wai SN, Westermark M, Oscarsson J, Jass J, Maier E, et al. (2003) Characterization of dominantly negative mutant ClyA Cytotoxin proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 5491–5499.
15. Vinion-Dubiel A, McClain MS, Czajkowsky DM, Iwamoto H, Ye D, et al. (1999) A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin Vac A inhibits VacA-induced cell vacuolation. *J Biol Chem* 274: 37736–37742.
16. Sellman BR, Mourez M, Collier RJ (2001) Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax. *Science* 292: 695–697.
17. Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett* 513: 242–246.
18. Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez, et al. (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 1667: 38–46.
19. Zhuang M, Oltean DI, Gómez I, Pullikuth AK, Soberón M, et al. (2002) *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J Biol Chem* 277: 13863–13872.
20. Zhang X, Candas M, Griko NB, Taissing R, Bulla LA Jr (2006) A mechanism of cell death involving an adenyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9897–9902.
21. Jiménez-Juárez N, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saab-Rincón G, Damian-Alamazo JY, et al. (2007) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem* 282: 21222–21229.
22. Girard F, Vachon V, Préfontaine G, Marceau L, Su Y, et al. (2008) Cysteine scanning mutagenesis of  $\alpha$ -4 a putative pore lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Appl Environ Microbiol* 74: 2565–2572.
23. Vachon V, Préfontaine G, Rang C, Coux F, Juteau M, et al. (2004) Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl Environ Microbiol* 70: 6123–6130.
24. Wu D, Aronson AI (1992) Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin involved in toxicity and specificity. *J Biol Chem* 267: 2311–2317.
25. Masson I, Tabashnik BE, Liu YB, Brousseau R, Schwartz JL (1999) Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J Biol Chem* 274: 31996–32000.
26. Smedley DP, Ellar DJ (1996) Mutagenesis of three surfaced loops of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* 142: 1617–1624.
27. Rajamohan F, Hussain SA, Cottrill JA, Gould F, Dean DH (1996) Mutations at domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ab  $\delta$ -endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midgut. *J Biol Chem* 271: 25220–25226.
28. Xie R, Zhuang M, Ross LS, Gómez I, Oltean DI, et al. (2005) Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J Biol Chem* 280: 8416–8425.
29. Pacheco S, Gómez I, Gill SS, Bravo A, Soberón M (2009) Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. *Peptides* 30: 583–588.
30. Beauregard KE, Collier RJ, Swanson JA (2000) Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell Microbiol* 2: 251–258.
31. Singh Y, Chaudhary VK, Leppla SH (1989) A deleted variant of *Bacillus anthracis* protective antigen is non-toxic and blocks anthrax toxin action *in vivo*. *J Biol Chem* 264: 19103–19107.
32. Yan M, Collier RJ (2003) Characterization of dominant negative forms of anthrax protective antigen. *Mol Med* 9: 46–51.
33. Thomas WE, Ellar DJ (1983) *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Sci* 60: 181–197.
34. Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik B, et al. (2007) Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 318: 1640–1642.
35. Wolfersberger M, Luethy P, Maurer A, Parenti P, Sacchi FV, et al. (1987) Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp Biochem Physiol* 86A: 301–308.
36. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Westcott WC (1962) Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system. *Nature* 194: 979–980.

## 11.REFERENCIAS.

1. Feitelson J.S. 1993. **The *Bacillus thuringiensis* family tree.** In: L.Kim (ed) Advanced Engineered Pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. p63-71.
2. Helgason E, *et al.* 200). ***Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-One species on the basis of genetic evidence.** Appl. Environ. Microbiol. 66:2627-2630.
3. Bechtel DB, Bulla LA Jr. 1976. **Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*.** J. Bacteriol. 127:1472-1481.
4. Crickmore, N. *et al.* 1998. **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins.** Microbiol Mol Biol Rev. 807-813. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).
5. Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2005. ***Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use.** Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier BV. 175-206.
6. Pérez C, *et al.* 2005. ***Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor.** Proc Natl Acad Sci. 102:18303–18308.
7. Parker MW, Feil SC. 2005. **Pore-forming protein toxins: from structure to function.** Progr Biophys & Mol Biol. 88:91–142.
8. Zhang, MY, *et al.* et al. 1993. **Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis*: reduced expression of flagellin and phospholipases.** Infect. Immunol. 61: 4947-4954.
9. Lövgren A, *et al.* 1990. **Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*.** Mol. Microbiol. 4:2137-2146.
10. Schnepf HE, Whiteley HR. 1985. **Protein toxins of *Bacilli*.** 209-216 in: JA Hoch, P Setlow (ed). Molecular biology of microbial differentiation. American Society for Microbiology. Washintong DC.
11. Schnepf E, *et al.*1998. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** Microbiol Mol. Biol. Rev. 62:775-806.
12. Levinson BL. 1990. **High-performance liquid chromatography analysis of two beta-exotoxins produced by some *Bacillus thuringiensis* strains.** 115-136 in: LA Hickie, WL Fitch (ed), Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*. American Chemical Society, Washington DC.
13. Estruch JJ, *et al.* 1996. **Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 5389-5394.
14. Bravo A. 1997. **Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin family proteins and their functional domains.** J Bacteriol. 179:2793–2801.

15. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. 2001. **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world.** Trends in Genet.17:193–199.
16. Dean DH, *et al.* 1996. **Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis: a minireview.** Gene. 179: 111-117.
17. Bravo A, Jansens S, Peferoen M 1992. **Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects.** J. Invertebr. Pathol. 60: 237-247.
18. Dai SM, Gill SS. 1993. ***In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp, *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases.** Insect Biochem Mol Biol. 23:273–283.
19. Li J, Carrol J, Ellar DJ. 1991. **Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution.** Nature. 353:815–821.
20. Bosch D., *et al.*1994. **Recombinant *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins with new properties for resistance management.** Biotechnology.12:915–918.
21. de Maagd RA, *et al.* 2003. **Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria.** Ann Rev Genet. 37:409–433.
22. Grochulski P, *et al.* 1995. ***Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation.** J Mol Biol. 254:447–464.
23. Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM. 2001. **Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope.** Structure. 9:409–17.
24. Galitsky N, *et al.* 2001. **Structure of the insecticidal bacterial  $\delta$ -endotoxin CryBb1 of *Bacillus thuringiensis*.** Acta Cryst. D57:1101–1109.
25. Boonserm P, *et al.* 2005. **Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications.** J Mol Biol. 348:363–382.
26. Boonserm P, *et al.* 2006. **Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution.** J Bacteriol.188:3391–3401.
27. Miranda R, *et al.* 2002. **Mecanismo de acción de las toxinas Cry.** TIP. 5(1): 5-13.
28. Aronson AI, Shai Y. 2001. **Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action.** FEMS Microbiol Lett. 195:1–8.
29. Zhang X, *et al.* 2006. **A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*.** Proc Natl Acad Sci. 103:9897–9902.
30. Soberón M, *et al.*2007. **Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance.** Science. 318:1640-1641.
31. Broderinck NA, Raffa KF, Handelsman J. 2006. **Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity.** Proc. Natl. Acan. Sci. USA. 103:15196-15199.
32. Aronson AI, Beckman W, Dunn P. 1986. ***Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens.** Microbiol. Rev. 50: 1-24.

33. Ebersold HR, *et al.* 1978. **The action of the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study.** *Experientia.* 34:1672.
34. Percy J, Fast PG. 1983. ***Bacillus thuringiensis* cristal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells.** *J. Invertebr. Pathol.* 41:86-98.
35. Bravo A, *et al.* 1992. **Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes.** *J. Invertebr. Pathol.* 60:247-254.
36. Gupta BL, *et al.* 1985. **Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions and electrogenic K<sup>+</sup>-transporting ephitelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta* in vitro.** *J. Cell Sci.* 74:137-152.
37. Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.** *Toxicon.* 49:423-435.
38. Gringorten JL, *et al.* 1992. **Supression of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin activity by low alkaline pH.** *J. Invertebr. Pathol.* 60:47-52.
39. Knowles BH. 1994. **Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins.** *Advan. Insect Physiol.* 24:275-308.
40. Wabiko H, Raymond KC, Bulla AL Jr. 1986. ***Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis.** *DNA.* 5:305-314.
41. Martens JWM, *et al.* 1995. **Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b) protoxin.** *Mol Gen. Genet.* 247:482-487.
42. Strizhov N, *et al.* 1996. **Mapping of the entomocidal fragment of *Spodoptera*-specific *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C.** *Mol. Gen. Genet.* 253:11-19.
43. Van Rie J, *et al.* 1989. **Specificity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins.** *Eur. J. Biochem.* 186:239-247.
44. Jenkins JL, *et al.* 2000. **Bivalent secuential binding model of *Bacillus thuringiensis* toxin to Gypsy moth aminopeptidase N receptor.** *J. Biol. Chem.* 275:14423-14431.
45. Soberón, M. Bravo, A. 2001. ***Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas.** *In:* Martinez RE, Martinez RJE (ed). *Microbios.* UNAM.
46. Haider MZ, Ellar DJ. 1989. **Functional mapping of an entomocidal d-endotoxin. Single aminoacid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity on the protein.** *J. Mol. Biol.* 208:183-194.
47. Oddou P, Hartmann H, Geiser M. 1991. **Identification and characterization of *Heliotis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins.** *Eur. J. biochem.* 202:676-680.
48. Garczynski SF, Crim JW, Adang MJ. 1991. **Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin by protein blot analysis.** *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2816-2820.

49. Indrasith LS, Hori H. 1992. **Isolation and partial characterization of binding proteins for immobilized delta endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombix mori*, and the common cutworm, *Spodoptera lituria*.** Comp. Biochem. Physiol. 102:605-610.
50. Vadlamudi RK, *et al.* 1995. **Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*.** J Biol Chem. 270:5490–5494.
51. Knight P, Crickmore N, Ellar DJ. 1994. **The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N.** Mol Microbiol. 11:429–436.
52. Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2004. **Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae.** Eur J Biochem. 271:3127–3135.
53. Valaitis AP, *et al.* 2001. **Isolation and partial characterization of Gypsy moth BTR-270 an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity.** Arch Ins Biochem Physiol. 46:186–200.
54. Gómez I, *et al.* 2001. **Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display.** J Biol Chem. 276:28906–28912.
55. Gómez I, *et al.* 2002a. **Hydropathic complementarity determines interaction of epitope 869HITDTNKNK876 in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins.** J Biol Chem. 277:30137–30143.
56. Gómez I, *et al.* 2003. **Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: Two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops  $\alpha$ -8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin.** Biochem. 42:10482–10489.
57. Hua G, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2004. **Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* binding and cytotoxicity.** J Biol Chem. 279:28051–28056.
58. Atsumi S, *et al.* 2005. **Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type I binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin.** Appl Environ Microbiol. 71:3966–3977.
59. Ferré J, van Rie J. 2002. **Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*.** Annu Rev Entomol. 47:501–533.
60. Gómez I, *et al.* 2002b. **Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin.** FEBS Lett. 513:242–246.
61. Rausell C, *et al.* 2004a. **Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate.** Biochemistry. 43:166–174.
62. Pardo-Lopez L. *et al.* 2006. **Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-Acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion.** Biochem. 45:10329-10336.

63. Rausell C, *et al.* 2004c. **Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say).** *Biochem Biophys Acta.* 1660:99–105.
64. Munoz-Garay C, *et al.* 2006. **Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different Cry toxins.** *J Memb Biol.* 212:61-68.
65. Zhuang M, *et al.* 2002. ***Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation.** *J Biol Chem.* 277:13863–13872.
66. Cabiaux V, Wolff Ch, Ruyschaert JM. 1997. **Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxins virulence.** *Int J Biol Macromol.* 21:285–298.
67. Rausell C, *et al.* 2004b. **Unfolding events in the watersoluble monomeric Cry1Ab toxin during transition to oligomeric pre-pore and membrane inserted pore channel.** *J Biol Chem.* 279:55168–55175.
68. Dow JAT. 1992. **pH gradients in lepidopteran midgut.** *J Exp. Biol.* 172:355-375.
69. Li J. 1992. **Bacterial toxins.** *Curr Opin Struct. Biol.* 2:545-556.
70. Parker MW, Pathus F. 1993. **Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins.** *TIBS* 18:391-395.
71. Schwartz JL, *et al.* 1997. **Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering.** *FEBS Lett.* 410: 397-402.
72. Wu D, Aronson AI. 1992. **Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin involved in toxicity and specificity.** *J Biol Chem.* 267:2311-2317.
73. Hussain SR, Aronson AI, Dean DH. 1996. **Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 226:8-14.
74. Knowles BH, Ellar DJ. 1987. **Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity.** *Biochim. Biophys. Acta.* 924:509-518.
75. Masson L, *et al.* 1999. **Helix 4 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa Toxin Lines the Lumen of the ion Channel.** *J Biol Chem.* 274(45):31996-32000.
76. Vachon V. *et al.* 2004. **Helix 4 Mutants of the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Cry1Aa Display Altered Pore-Forming Abilities.** *Appl Environ Microbiol.* 70 (10): 6123-6130.
77. Vachon V, *et al.* 2002. **Role of Helix 3 in Pore Formation by the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Cry1Ab.** *Biochem.* 41:6178-6184.
78. Girard F, *et al.* 2008. **Cysteine Scanning Mutagenesis of  $\alpha$ 4, a Putative Pore-Lining Helix of the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Cry1Aa.** *Appl Environ Microbiol.* 74(9):2565-2572.

79. Jimenez-Juarez N, *et al.* 2007. ***Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae.** *J Biol Chem* 282(29):21222-21229.
80. Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov V. 2001. **Coiled coils: a highly versatile protein folding motif.** *Trends in Cell Biol.* 11(2).
81. Jimenez-Juarez,N, *et al.* 2008. **The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*.** *Peptides* 29:318-323.
82. Sellman BR, Mourez MR, Collier JR. 2001. **Dominant-negative mutants of a toxin subunit: An approach to therapy of anthrax.** *Science.* 292:695-697.
83. Singh Y, *et al.*2001. **A dominant Negative Mutant of *Bacillus anthracis* Protective Antigen Inhibits Anthrax Toxin Action in Vivo.** *J Biol Chem.* 276(25):22090-22094.
84. Rainey GJA, Young JAT. 2004. **Antitoxins: Novel Strategies to target agents of Bioterrorism.** *Nature Rev.* Vol.2:720-726.
85. Douville, F, *et al.* 2008. **Occurrence of the transgenic corn Cry1Ab gene in freshwater mussels (*Elliptio complanata*) near corn fields: Evidence of exposure by bacterial ingestion.** *Ecotox and Env Saf.* In press.
86. Cervino, JM, *et al.* 2006. **Identification of bacteria associated with a disease affecting the marine sponge *Iantella basta* in New Britain, Papua, New Guinea.** *Mar Ecol Prog Ser.* 324: 139-150.
87. Rosi-Marshall, EJ, *et al.* 2007. **Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems.** *PNAS.* 104 (41):16204-16208.
88. Arantes, O., & Lereclus, D. 1991. **Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*.** *Gene.* 108:115-19.
89. Laemli UK. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* 227:680-685.
90. Masson L, *et al.* 1989. **Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1.** *J. Biochem.* 269: 507-512.
91. Manoj KAS, Aronson AI. 1999. **Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin.** 181(19):6103-6107.