



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la oligomerización de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Violeta Matus Acuña

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Alejandra Bravo de la Parra (IBT)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Gloria Saab Rincón (IBT)
Dr. Daniel G. Segura González (IBT)

MÉXICO, D. F. Marzo 2014



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.

A Jaime, Leonor, Ulises y Gustavo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Alejandra Bravo por su guía, comprensión y eterna paciencia, siempre admiraré el amor y la dedicación con la que hace su trabajo todos los días.

Al doctor Mario por los consejos, ideas, sugerencias y por dejarme trabajar en su laboratorio, de verdad ha sido una muy buena experiencia en mi vida trabajar con ustedes.

A la Dra. Gloria Saab y el Dr. Daniel Segura que formaron parte de mi comité tutorial, y que sin duda fueron de gran ayuda para la realización de este trabajo, por sus consejos y críticas y también gracias por el apoyo en cada seminario.

A el Dr. Lorenzo Segovia, Dra. Rosana Sánchez, Dr. Gerardo Corzo, Dra. Nina Pastor y Dr. Iván Druncker por el tiempo que le dedicaron a leer esta tesis, aportar comentarios y críticas que hicieron de esta tesis un mejor trabajo.

También quiero agradecer a la Dra. Claudia Rodríguez por sus enseñanzas en el inicio de este proyecto, las cuales me ayudaron mucho en momentos críticos, gracias por tener tiempo de estar ahí cuando no sabía a donde ir.

A los compañeros de laboratorio, por todas las cosas que le hicieron a este trabajo, por las risas, los pasteles, los desayunos que me salvaron en muchas ocasiones de una gastritis. A Jazmín por tenerme paciencia en esos tiempos en que compartíamos lugar, gracias por la historia, las risas, el apoyo, a Emiliano por siempre tener las palabras para sacar una sonrisa, por los comentarios y los momentos compartidos, a Josué por el Bullying (no es cierto) por el apoyo y la amistad, a Bivi por siempre ser tan noble, A Leivi por los consejos, a Dianita por la buena vibra, a Daniela por las risas, a Meztli por el café de la mañana y por siempre prestarme azúcar, a Fer por esa sinceridad que mata, a Zefe por esa calma que brinda paz, a Gretel por los comentarios de todos los días que hacían más ameno el lugar, a Fran por el apoyo, a Arlen y Sabino, por la nueva sangre que traen al laboratorio.

También agradezco a Blanca por siempre ser tan linda y brindarme su ayuda cuando lo solicité, A Jorge por sus sabios consejos, a Carlos por los comentarios, a Isa por su sabiduría, a Don Sergio por sus “buenas manos” en los geles de acrilamida, a Xochil y a Don Raúl, por arreglar el piso de mi lugar.

Una especial dedicatoria a mis compañeros del instituto que hicieron de este un viaje inolvidable. Carol como resumir todos los momentos en una renglón, creo que solo diré muchas gracias, siempre serás parte de mi. Israim nunca es lo mismo sin ti, sin tu chispa sin

tu sonrisa. Paul gracias por los consejos, las pláticas, las risas, por todo. Leidy fue un gusto conocerte como compañera en el laboratorio pero es un placer tenerte como amiga. Jorge es grato tener a alguien que sabes que le puedes contar todo y nunca se atreverá a juzgarte, y lo mejor de todo, siempre tendrá un comentario positivo.

A Ixchel, que aunque estés en la helada Canadá estas aquí conmigo siempre.

Irene y Jazmín, son pocos los momentos que nos vemos, pero muy valiosos, hay un pedazo de mi corazón que esta con ustedes siempre.

Estaban que estas perdido en alta mar, tu rostro es lejano pero tu presencia siempre es clara.

Y en especial un agradecimiento a mi familia, a mis padres Jaime y Leonor que se que dieron todo por mi hermano y por mi, y solo espero poder lograr un poco de lo que ellos han logrado. A Ulises por ser mi amigo de toda la vida, por los regaños, los consejos, las risas, por estar siempre de mi lado. Y a Dianita la nueve integrante que hace a mi hermano muy feliz y solo por eso le estaré agradecida toda la vida.

Y finalmente le quiero dedicar unas palabras a Gustavo, mi compañero de viaje que le ha puesto color a los días, sabor a las noches, y locura a los sueños :

“Quiero que sepa sin embargo que todas las noches que he dormido a tu lado, incluso las discusiones más inútiles, siempre fueron algo espléndido y esas difíciles palabras que siempre temí decir pueden decirse ahora: te amo.” Charles Bukowski.

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
MOLECULAR DEL INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM, DIRIGIDO
POR LA DRA. ALEJANDRA BRAVO,
FINANCIADO POR LAS BECAS CONACyT Y
DGAPA IN20113.**

Tabla de contenido

| | | |
|----|--|----|
| 1. | Resumen | 1 |
| 2. | Introducción. | 3 |
| | • Importancia del estudio de las toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 3 |
| | • <i>Bacillus thuriengiensis</i> | 4 |
| | • Toxinas Cry | 5 |
| | • Modelos del mecanismo de acción de las toxinas Cry. | 8 |
| | ○ Modelo de formación de poro. | 8 |
| | ○ Modelo de señalización intracelular. | 9 |
| | • Solubilización y activación de la protoxina | 11 |
| | • Unión a receptores | 13 |
| | • Oligomerización y formación de poro de las toxinas Cry de tres dominios | 14 |
| | ○ Inserción en la membrana | 14 |
| | ○ Oligomerización | 16 |
| | ○ Estructura tridimensional del oligómero | 17 |
| 3. | Antecedentes | 21 |
| | • Hélices involucradas en la oligomerización | 21 |
| | • Modelo de dinámica molecular del pre-poro de Cry4Ba | 27 |
| | • Modelo del pre poro de la toxina Cry1Ab basado en el cristal de la toxina Cry4Ba | 30 |
| 4. | Justificación. | 32 |
| 5. | Hipótesis. | 32 |
| 6. | Objetivo. | 32 |
| | • Metas para conseguir el objetivo. | 32 |
| 7. | Materiales y métodos. | 33 |
| | • Cepas utilizadas. | 33 |
| | • Medios utilizados. | 33 |
| | • Construcción de mutantes del dominio I de Cry1Ab. | 35 |
| | ○ Mutagénesis sitio dirigida del DNA de la proteína Cry1Ab expresadas en células de <i>E. Coli</i> | 35 |
| | ○ Transformación de <i>Bacillus thuringiensis</i> . | 37 |
| | • Solubilización de cristales de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I. | 39 |
| | • Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford. | 39 |
| | • Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE | 39 |
| | • Bioensayos con las mutantes del dominio I. | 39 |
| | • Activación con tripsina. | 40 |
| | • Purificación del anticuerpo scFv73. | 40 |
| | • Preparación de jugo gástrico de las larvas de <i>Manduca sexta</i> de tercer instar. | 41 |
| | • Extracción de intestinos. | 41 |

| | |
|---|----|
| • Extracción de vesículas de la microvellosidad apical de <i>Manduca sexta</i> (BBMV) | 41 |
| • Oligomerización de Cry1Ab en vesículas de la microvellosidad aplica de <i>Manduca sexta</i> | 42 |
| 8. Resultados y discusión. | 43 |
| • Solubilización y activación de las proteínas Cry1Ab mutantes. | 43 |
| • Determinación de la dosis letal media de la toxina silvestre y de las mutantes | 45 |
| • Análisis de los fenotipos de las 7 mutantes de la proteína Cry1Ab. | 48 |
| • Oligomerización | 55 |
| ○ Oligomerización de la protoxina Cry1Ab con BBMV de <i>Manduca sexta</i> | 57 |
| ○ Oligomerización de la toxina activada con tripsina con BBMV de <i>Manduca sexta</i> | 59 |
| 9. Conclusiones. | 63 |
| 10. Perspectivas | 65 |
| 12. Bibliografía | 67 |
| 13. Anexos | 72 |
| • Anexo 1. Espectrograma de las secuencias de cada una de las mutantes producidas en este trabajo en la proteína Cry1Ab | 72 |

Abreviaturas

| | |
|--------------------------|---|
| AC | Adenilato ciclasa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ALP | Alcalinofosfatasa |
| AMPc | Adenosin monofosfato cíclico |
| APN | Aminopeptidasa |
| ATP | Trisfosfato de adenosina |
| BBMV | Vesículas de la membrana de la microvellosidad apical del intestino |
| BHI | Infusión cerebro corazón |
| Bt | <i>Bacillus thuringiensis</i> |
| CAD | Caderina |
| D.O₆₀₀ | Densidad óptica a 600 nm |
| Cry 3D | Cry de 3 dominios |
| FSK | Adenilato ciclasa membrana |
| GPI | Glicosilfosfatidilinositol |
| kDa | Kilodaltones |
| LB | Medio Luria-Bertani. |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa. |
| PKA | Fosfocinasa A |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetanosulfonilo. |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio. |

1. Resumen

Las toxinas Cry son proteínas producidas por la bacteria Gram positiva, *Bacillus thuringiensis* (Bt) en fase de esporulación. Estas proteínas son toxinas formadoras de poro, que tienen una actividad tóxica para diferentes especies de insectos y nemátodos. El mecanismo por el cual las toxinas Cry ejercen su actividad tóxica no se ha comprendido del todo.

En nuestro grupo se propone que el mecanismo de acción de la toxina Cry está mediado por un homo-oligómero de toxina. El mecanismo inicia una vez que la larva del insecto ingiere a la bacteria que produce la toxina, esta toxina se solubiliza en el ambiente alcalino de la larva, y posteriormente se activa debido a la acción de las proteasas que están presentes en el intestino de las larvas. La toxina activada, es entonces capaz de interactuar con tres receptores de las células epiteliales de las larvas: una aminopeptidasa (APN), una alcalino fosfatasa (ALP), y un receptor tipo cadherina (CAD). Posteriormente varios monómeros de la toxina activada se asocian para formar un homo-oligómero. Éste se inserta en la membrana, generando un poro iónico (formación de poro), lo que produce un desbalance osmótico e induce la ruptura del intestino.

Dentro de este mecanismo, uno de las etapas que no se ha descrito claramente es el proceso de oligomerización y formación de poro. Hasta la fecha se han caracterizado varias estructuras oligoméricas obtenidas de diferentes protocolos, que varían según si se parte de toxina o protoxina, el tipo de membrana usada, temperatura de incubación, etc, lo que ha dificultado la interpretación de estos experimentos. Así mismo, debido a la dificultad del estudio de proteínas de membrana, la estructura tridimensional del oligómero funcional insertado a membrana de las toxinas Cry aún no se ha determinado con claridad, no obstante, se ha reportado la formación de tetrámeros y trímeros. Por otro lado, mediante mutagénesis sitio dirigida de la secuencia de las hélices del dominio I de las toxinas Cry, se ha podido establecer cuales son las hélices involucradas en la formación del oligómero y en la formación del poro. Concluyendo que el dominio I juega un papel importante en la formación del oligómero y en la inserción del poro lítico. Dentro de este dominio se han encontrado algunos residuos o regiones de mayor importancia, como es el caso de los residuos R99 y la Y107 en la hélice α_3 , que participan en la oligomerización de la toxina y diversos residuos de la hélice α_4 que participan en la inserción y formación del poro iónico.

Con el fin de comprender mejor el proceso de oligomerización en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab y determinar si existen otras hélices además de las hélices α_3 y α_4 que están involucradas en la construcción de la forma oligomérica de la toxinas, así como determinar que otros aminoácidos están participado en este proceso, en este trabajo se diseñaron varias mutantes en el dominio I.

Se construyeron tres mutantes en la hélice α_3 , dos mutantes en la hélice α_4 y dos mutantes en la hélice α_6 , encontrando que algunos de los residuos dentro de la hélice α_3 del dominio I, juegan

un papel primordial dentro de la formación del oligómero a diferencia de las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 6$, en donde se encontró que la hélice $\alpha 4$ podría estar involucrada en los procesos de formación de poro, para el caso de la hélice $\alpha 6$ se encontró que ninguno de los dos aminoácidos remplazados en la toxina Cry1Ab generaban una pérdida de toxicidad, lo que sugiere que esta hélice no participa en el proceso de oligomerización y formación de poro, sin embargo es necesario analizar más aminoácidos para tener una conclusión contundente respecto a el papel de esta hélice en el proceso de oligomerización y formación de poro.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en este trabajo propusimos que, en Cry1Ab, el residuo R99 de la hélice $\alpha 3$ interacciona con el residuo E101 de la hélice $\alpha 3$ de un monómero vecino. Cabe mencionar que en la estructura cristalográfica de Cry1Aa (que tiene una identidad en secuencia con Cry1Ab del 95% y en el dominio I tiene un 100% de identidad en secuencia), tanto el residuo R99 como E101 no están involucrados en puentes salinos. La sustitución de los aminoácidos R99 o de E101 en la toxina Cry1Ab silvestre afecta severamente tanto la toxicidad, como la oligomerización de la toxina. Para corroborar esta interacción se realizó una doble mutante donde el residuo R99 fue substituído por glutámico (E) y el residuo E101 por arginina (R). La doble mutante R99E-E101R recuperó toxicidad y la capacidad de oligomerización, sugiriendo que estos dos residuos interaccionan cuando se forma la estructura oligomérica de la toxina.

La oligomerización de la toxina Cry1Ab en este trabajo se realizó, *in vitro* en experimentos tipo Western blot en donde se incubó ya sea la protoxina Cry1Ab o la toxina Cry1Ab con membranas de la micro vellosidad del intestino de larvas de tercer instar de *Manduca sexta* y proteasas provenientes del jugo gástrico de la larva. En estos experimentos se observa que cuando se incubaba la protoxina, ésta oligomeriza formando una estructura que migra a un tamaño de 250 kDa en geles SDS-PAGE detectado con anticuerpos anti Cry1Ab, además de que se observa que estas estructuras son resistentes a la temperatura. Sin embargo cuando se incubaba la toxina se observa una estructura que migra a un tamaño de 200 kDa en geles SDS-PAGE, esta estructura no es resistente a temperaturas mayores de 60°C, estos datos nos sugirieron que dentro del mecanismo de toxicidad podrían estar involucradas más de una estructura oligomérica, así mismo nos señala que la protoxina podría también participar de manera importante induciendo la formación de una estructura oligomérica diferente.

2. Introducción.

- **Importancia del estudio de las toxinas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis***

El control de insectos plaga en la agricultura y de vectores de transmisión de enfermedades humanas, se ha realizado principalmente con la aplicación de insecticidas químicos. Sin embargo el uso indiscriminado de éstos ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental, y ha generado la selección de organismos altamente resistentes (Diabate *et al.*, 2002). Es por esto que se requieren nuevas estrategias para el control de plagas, como la utilización de bioinsecticidas que cumplan con las siguientes características:

- que sean derivados de materiales naturales como puede ser de animales, plantas o microorganismos como: bacterias, virus y hongos.
- específicos para los insectos blancos; de manera que no afecten la salud de animales superiores.
- que sean efectivos en pequeñas cantidades, y que se descompongan rápidamente (biodegradables), para favorecer que el tiempo de exposición sea corto y evitar problemas de selección de organismos resistentes y de contaminación del medio ambiente (EPA, 2010).

Los bioinsecticidas más usados comercialmente son las toxinas Cry producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), las cuales han se han utilizado tanto en la agricultura para el control de insectos plaga, como en el control de mosquitos vectores de transmisión de enfermedades.

Una clave importante que hizo que estas proteínas fueran tan atractivas para el control de plagas, es su alto grado de especificidad por su insecto blanco. Las propiedades tóxicas del cristal de las toxinas Cry producidas por *Bt* fueron descubiertas en 1901 en Japón por Shigetane Ishiwatari cuando se observó que esta bacteria era capaz de matar al gusano de seda (*Bombix mori*). Años más tarde *Bt* fue redescubierto en Alemania por Ernst Berliner en polillas de harina del mediterráneo cuando se encontraron esporas de *Bt* y cristales dentro de orugas de polilla de harina, muertas. Sin embargo se observó que el solo contacto entre los cristales y las orugas sanas, no producía ningún efecto, pero cuando las esporas con los cristales eran añadidos a su dieta (hojas) las orugas dejaban de alimentarse y morían. Posteriormente se aislaron cristales de varias cepas de *Bt* y las probó contra el lepidóptero *Ostrinia nubilalis* (barredor europeo del maíz), obteniendo resultados prometedores, que llevaron al desarrollo, en 1938, de Sporein, el primer insecticida comercial de *Bt*.

(Revisión por Sanahuja *et al.*, 2011). Desde entonces se han empleado diferentes técnicas biotecnológicas para el mejoramiento, producción y distribución de los bioinsecticidas constituidos por las toxinas Cry, componentes tóxicos del cristal de Bt. Dada su relevancia como bioinsecticida, resulta muy importante y atractivo entender el mecanismo de acción de las toxinas Cry.

- ***Bacillus thuringiensis***

Bt es una bacteria aerobia estricta, Gram-positiva, que pertenece a la familia *Bacillaceae*. Esta familia incluye seis especies: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* (Rasko et al., 2005). De las cuales *B. thuringiensis* se distingue porque contiene un megaplasmido con la información para la síntesis de proteínas insecticidas que se producen formando un cristal paraesporal. Este cristal está compuesto de toxinas Cry y algunas veces también toxinas Cyt con capacidad insecticida. El ciclo de vida de *B. thuringiensis* involucra dos fases: una fase vegetativa y una fase de esporulación. En la fase vegetativa, las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 minutos. En la fase de esporulación, se da lugar a la diferenciación de bacteria a espora y se presenta cuando la bacteria crece bajo limitación de nutrientes. La esporulación consta de siete fases. En la fase I se induce la formación del filamento axial y ocho horas después de crecimiento, la bacteria entra en la fase II, que se distingue por la formación del septo espora de división asimétrica que involucra mesosomas. La fase III inicia a la novena hora, donde ocurren cambios a nivel membranal y citoplásmico para la formación de la espora, y también inicia la síntesis del cristal insecticida. A las doce horas, se forma el exosporio, la pared celular primordial, la corteza y las capas de protección de la espora como se observa en la figura 1 (fases IV a la VI). En la fase VII, ocurre la maduración de la espora y la síntesis de enzimas líticas que liberan a los cristales insecticidas y a las esporas (Bechtel et al., 1976).

El cristal paraesporal que se produce durante la fase de esporulación de *B. thuringiensis* está formado por una o varias proteínas con capacidad insecticida, llamadas δ -endotoxinas Cry y Cyt. Se han encontrado que estas proteínas tienen actividad tóxica contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajo), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios.



Figura 1. Microfotografía de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en fase IV de esporulación. De lado izquierdo se observa el cuerpo cristalino, y de lado derecho se observa la espora.

- **Toxinas Cry**

Las toxinas Cry son δ -endotoxinas que han sido clasificadas en base a la identidad de su secuencia. A la fecha se han secuenciado más de 500 genes *cry* que codifican para diferentes toxinas. Los genes *cry* secuenciados se han dividido en por lo menos cuatro familias proteínicas no relacionadas filogenéticamente: la familia de las toxinas Cry con tres dominios (3d), la familia de las toxinas Cry con actividad insecticida hacia mosquitos (Mtx), la familia de toxinas Cry tipo binario (Bin) y finalmente la familia de las toxinas Cyt (Bravo et al., 2011). Las toxinas Cry de 3 dominios son las más abundantes y se han sido clasificadas en 67 grupos proteínicos (Cry1-Cry67). Adicionalmente algunas cepas de *Bt* producen una toxina insecticida denominada VIP. Las toxinas VIP, a diferencia de las toxinas Cry, se producen durante la fase de crecimiento vegetativo. Hasta la fecha se han caracterizado tres toxinas VIP, que son: VIP1/VIP2, juntas actúan como una toxina binaria, y VIP 3 (Waren et al., 1997).

El grupo más abundante dentro de las toxinas Cry, es la familia de toxinas Cry 3d, dentro de este grupo se encuentra la toxina Cry1Ab, modelo de estudio en este trabajo, por lo tanto nos enfocaremos en esta familia de toxinas. La nomenclatura de las toxinas Cry 3d se designa de la siguiente manera: el primer carácter está dado por un número arábigo (1-62), este solo cambia si la identidad es menor al 45% (por ejemplo Cry1, Cry2, etc); el segundo carácter es una letra mayúscula (Cry1A, Cry1Ab, Cry1AC), la cual denota una identidad de secuencia que está entre 45 y 78 %; para las proteínas que tienen una identidad entre 78% y 95% se les asigna una letra minúscula adicional (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc), y finalmente para aquellas que presentan más de un 95% de identidad en secuencia se incluye un número arábigo al final de la nomenclatura (Cry1Aa1, CryAa2, etc). Las toxinas Cry 3d se producen como protoxinas con un tamaño de 130 o 70 kDa, y posteriormente se activan en el intestino de las larvas a toxinas de 60 kDa.

De la familia de toxinas Cry 3d se han resuelto 8 estructuras cristalográficas de toxinas activadas (Figura 2), a saber: Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry2Aa (Morse et al., 2001), Cry3Aa (Li et al., 1991), Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4Aa (Boonserm et al., 2006), Cry4Ba (Boonserm et al., 2005), Cry5Ba (Hui *et al.*, 2012), y Cry8Ea (Guo *et al.*, 2009) elucidado por cristalografía de rayos X.

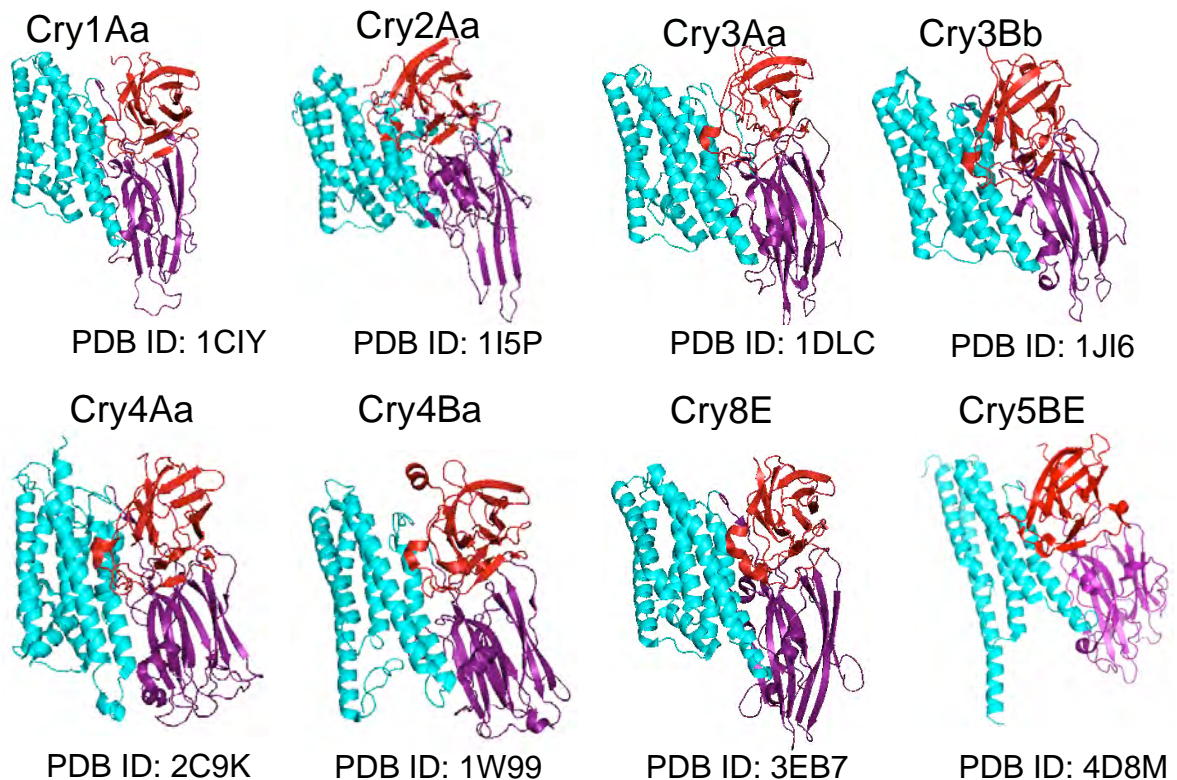


Figura 2. Estructura cristalográfica de las toxinas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry5Ba y Cry8Ea. Las hélices alfa en color azul pertenecen al dominio I, las hojas beta en color morado pertenecen al dominio II y las hojas beta en color rojo pertenecen al dominio III.

A pesar de tener poca identidad a nivel de secuencia primaria (17-40%) y tener especificidad por insectos diferentes (ver Tabla 1), se encontró que estas toxinas tienen una estructura terciaria similar compuesta por 3 dominios.

Tabla 1. Insectos blanco de las toxinas Cry de tres dominios cuya estructura se ha cristalizado (Soberón et al., 2011).

| Nombre al grupo que pertenecen | Nombre de la toxina | Especificidad |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Toxinas Cry de tres dominios. | Cry1Aa | Lepidópteros |
| | Cry2Aa | Dípteros y algunos lepidópteros. |
| | Cry3Aa | Coleópteros |
| | Cry3Bb | Coleópteros |
| | Cry4Aa | Dípteros |
| | Cry5Ba | Nematodos |
| | Cry8Ea | Coleópteros |

Cuyas características son las siguientes:

Dominio I, está formado por siete hélices alfa antiparalelas y anfipáticas ($\alpha 1$ - $\alpha 7$); las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$, están rodeando a la hélice $\alpha 5$ (la más hidrofóbica) (Figura 3). Este dominio comparte similitud estructural con otras toxinas formadoras de poro como la colicina la y N de *Escherichia coli*, así como con la toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae*. Hasta la fecha, se sabe que la hélice $\alpha 3$ está implicada en la oligomerización de la toxina Cry1Ab (Jimenez-Juarez, et al., 2007) y se propone que las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se insertan en la membrana y forman un poro (Kumar & Aronson, 1999).

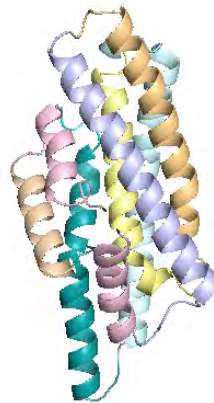


Figura 3. Hélices que conforman el dominio I de la toxina Cry1Ab. En café: la hélice $\alpha 1$, en rosa: la hélice $\alpha 2$, en morado: la hélice $\alpha 3$, en Naranja la hélice $\alpha 4$, en Amarillo: la hélice $\alpha 5$, en verde claro: la hélice $\alpha 6$ y en verde oscuro la hélice $\alpha 7$.

El dominio II es un prisma beta formado por 3 láminas β -plegadas antiparalelas empacadas alrededor de un núcleo hidrofóbico exhibiendo en los extremos tres asas fundamentales involucradas en el reconocimiento de receptores (Figura 4). Estructuralmente, el dominio II es el más variable. Dada esta variabilidad se cree que este dominio es un determinante importante de la especificidad de las toxinas (Boonserman et al., 2005).

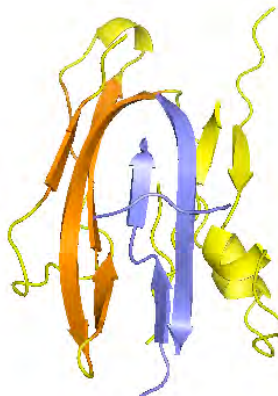


Figura 4. Láminas β -plegadas que forman el dominio II de la toxina Cry1Aa. En Amarillos la hoja β -1, en azul la hoja β -2 y en amarillo la hoja β -3.

El dominio III está formado por 2 láminas β -plegadas antiparalelas que forman un sándwich beta (Figura 5). Este dominio muestra menos variabilidad estructural que el dominio II, pero al igual que éste, está implicado en la especificidad de la toxina al insecto (Bravo *et al.*, 2007).

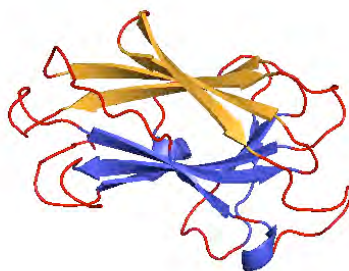


Figura 5. Láminas β -plegadas que forman el dominio III de la toxina Cry1Aa. En Naranja la hoja β -1, en azul la hoja β -2 .

- **Modelos del mecanismo de acción de las toxinas Cry.**

- **Modelo Bravo-Soberón**

El modelo del mecanismo de toxicidad de estas toxinas se sustenta en estudios realizados, principalmente, con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, y larvas de *M. sexta*. De acuerdo a este modelo, el mecanismo de toxicidad inicia cuando el cristal producido por la bacteria *Bt* es ingerido por el insecto blanco. Este cristal se solubiliza por el medio alcalino presente en el intestino del insecto. Existen dos tipos de proteínas Cry 3d una largas que tienen un tamaño de 130 kDa y unas cortas con un tamaño de 70 kDa. Por acción de proteasas, ambas proteínas son cortadas liberando un fragmento tóxico de 60 kDa que tiene actividad contra diferentes insectos. En ensayos de unión, se ha observado que tanto el monómero de 60 kDa (toxina activa) de Cry1Ab como el de Cry1Ac se une con baja afinidad ($Kd = 100$ nM) a dos proteínas ancladas por GPI (glicosilfosfatidilinositol) a la membrana del intestino de la larva: Alcalinofosfatasa (ALP) y Aminopetidasa APN (ampliamente distribuidos en la membrana de la larva del insecto *Helicoverpa armigera* sensible a la toxina Cry1Ac; Upadhyay & Singh, 2011). La unión está mediada por el asa 3 del dominio II y la hebra β 16 del dominio III. Esto nos hace pensar que esta interacción tiene como función concentrar la toxina en la membrana de la microvellosidad apical del intestino de la larva para favorecer la interacción con un segundo receptor, el receptor tipo CAD.

Así mismo se ha encontrado que la forma activa (60 kDa) de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac tiene una alta afinidad ($Kd = 1$ nM) por el receptor tipo caderina CAD, y presenta tres sitios de interacción: las asas 2 y 3, y la hélice α 8 del Dominio II (Arenas *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2009).

También se ha propuesto que esta unión a CAD genera un cambio conformacional en la toxina, que favorece un corte proteolítico adicional que elimina la hélice α_1 , promoviendo la agregación de los monómeros de la toxina para formar una estructura oligomérica que se inserta en la membrana de la microvellosidad del intestino de la larva del insecto (Bravo *et al.*, 2004).

En nuestro grupo se ha logrado purificar estructuras oligoméricas de la toxina Cry1Ab, que tienen un peso de 250 kDa, las cuales se ha visto que incrementan 100 veces su afinidad ($Kd = 0.75$ nm) por los dos receptores: ALP y APN, a través del asa 2 del dominio II (Bravo *et al.*, 2004). Se cree que estas interacciones promueven la inserción del oligómero a la membrana y llevan a la formación de un poro, que permite el paso indiscriminado de iones, desestabilizando el potencial de membrana y provocando la muerte de las células del intestino de las larvas del insecto blanco.

El modelo del mecanismo se ilustra en la figura 6, fue llamado de “ping pong” porque el mecanismo va de la unión de la toxina monomérica a los receptores APN y ALP, a la unión a CAD y, nuevamente, a la unión de la toxina (ahora oligomérica) a los receptores APN y ALP para la inserción en la membrana de la microvellosidad de las larvas del insecto blanco (Pacheco *et al.*, 2009) (Arenas *et al.*, 2010).

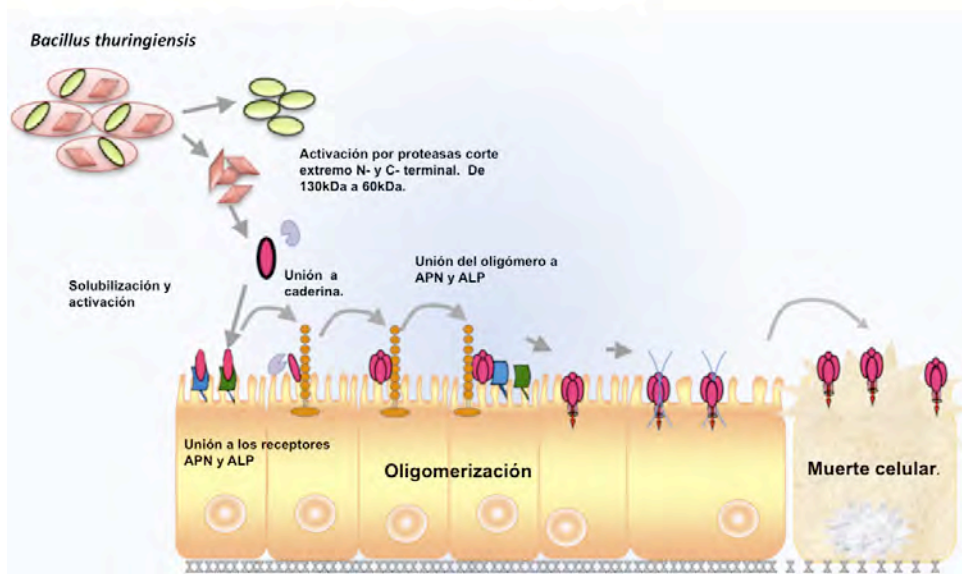


Figura 6. Modelo del mecanismo de acción de las toxinas Cry Bravo-Soberón. (Pacheco *et al.*, 2009)

o **Modelo de señalización intracelular.**

Este modelo, ilustrado en la figura 7, propone que la interacción de la toxina Cry1Ab con el receptor CAD genera una cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} que culmina en la muerte del organismo hospedero. Para poder determinar esto Zhang, *et al.*, en el 2006 expresaron el receptor CAD de *M. sexta* en células H5 (línea celular de ovario de *Trichoplusia ni*) con el receptor

CAD de *M. sexta*, observando que después de 40 minutos de que era añadida una concentración de toxina Cry1Ab a las células, estas aumentaba drásticamente de tamaño. Así mismo observaron que estas células presentaban deformación en las membranas, que daba como resultado un aumento en la permeabilidad de la membrana, hinchamiento de las células y lisis celular.

Inicialmente para determinar si el mecanismo de muerte dependía de la formación de poro, ellos analizaron el efecto de osmoprotectores tales como glucosa, sacarosa y rafinosa, moléculas que se difunden \rightleftharpoons dentro de la célula debido a la diferencia de concentraciones dentro y fuera ella, estas moléculas pueden obstruir la permeabilidad del poro sólo si su tamaño molecular es mayor al del canal iónico. Ellos encontraron que la rafinosa era capaz de evitar el hinchamiento celular después de la adición de la toxina. En el caso de la sacarosa, esta solo fue capaz de hacerlo parcialmente, mientras que no se observó un efecto para el caso de la glucosa. En las células tratadas con rafinosa, ésta fue capaz de evitar el hinchamiento celular así como deformaciones en la membrana, pero esto no evitó la muerte celular. Con esto ellos concluyeron que el mecanismo de muerte era independiente de la formación de poro (Zhang *et al.*, 2010). Sin embargo el experimento correcto para poder demostrar que la muerte celular es independiente de la formación de poro sería utilizar una mutante que no forme poro y sea capaz de unirse a los receptores, ya que se sabe que el flujo de iones, específicamente Ca^{2+} y K^{+} puede desencadenar respuestas intracelulares.

Así mismo proponen que el Mg^{2+} estaba involucrado en la toxicidad de la toxina Cry1Ab, debido a que cuando se utilizaban diferentes queladores de iones, en específico de calcio (EGTA) y magnesio (EDTA), observaron que el quelador de magnesio EDTA fue capaz de inhibir las respuestas celulares de hinchamiento y deformación en la membrana así como de la muerte celular por completo. Por lo tanto Zhang *et al.* (2010) propusieron una cascada de señalización dependiente de AMPc que era inducida por la toxina, involucrando la activación de una proteína G, la adenilato ciclasa (AC) así como la fosfocinasa A (PKA).

Para evaluar el papel de estos dos metabolitos se evaluó el efecto del inhibidor NF449, antagonista de la proteína G. Este inhibidor causó la disminución del 50% de la toxicidad. Sin embargo otro inhibidor de esta proteína (NF023) no presentó ningún efecto sobre la toxicidad. Así mismo se evaluaron dos inhibidores de PKA; H89 y PKA14-22-amida. Ambos inhibieron la muerte celular indicando que la inhibición de PKA evita la acción de la toxina. No obstante, cuando se evaluó un análogo del AMPc (pCPT-cAMP), éste no indujo la muerte celular. Así mismo después de probar un activador de la adenilato ciclasa membranal (FSK) se observó un incremento en los niveles de AMPc intracelular, pero esto no ocasionó la muerte de las células (Zhang *et al.*, 2010).

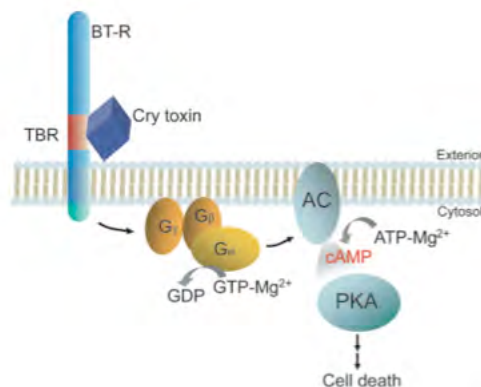


Figura 7. Modelo del mecanismo de acción de las toxinas Cry basado en la señalización intracelular propuesto por Zhang *et al.*, 2010.

Este modelo nos indica que probablemente existe una respuesta celular al contacto de la toxina, pero que estas señales no son suficientes para explicar el mecanismo de acción de ésta, ya que en el caso de los osmoprotectores ellos observan que el hinchamiento de la célula no está relacionado con la mortalidad de la célula. Sin embargo no analizan el papel del poro que forma la toxina o qué tipo de respuesta puede desencadenar la formación de éste, así como el papel de otros receptores. Así mismo queda en duda el papel de la adenilato ciclasa, ya que en uno de sus inhibidores no se observó respuesta, así como en el caso del AMPc, en el que no se observa una correlación clara entre el aumento de este metabolito y la muerte celular.

Finalmente es importante destacar el papel de las toxinas Cry1AbMod descritas anteriormente que son capaces de oligomerizar en ausencia de receptores así como matar organismos que desarrollaron resistencia a las toxinas Cry porque presentan mutaciones en el gen de CAD. Por otro lado existen mutantes en la toxina Cry1Ab como la R99E que no son capaces de oligomerizar y no son tóxicas para las larvas, pero que se ha demostrado que no tienen afectada la interacción con los receptores hasta ahora descritos, lo que sugiere que el modelo de mecanismo de acción de las toxinas Cry es más complejo que la activación de una cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} .

- **Solubilización y activación de la protoxina.**

Bt es una bacteria que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales de crecimiento, la fase de crecimiento vegetativo y una fase de esporulación, en donde además de la espora esta bacteria produce un cuerpo cristalino que contiene a las proteínas Cry. Las proteínas Cry de tres dominios se encuentran dentro del cristal como protoxinas con un tamaño de 130 kDa o 70 kDa dependiendo de la toxina.

Estas protoxinas suelen ser solubles a pHs altos, alrededor de 10.5 o más, pH al que se encuentra el lumen intestinal de lepidópteros y dípteros. Sin embargo existen algunas toxinas como la toxina Cry1Ba y Cry7Aa que sólo son activas contra coleópteros (estos insectos presentan un pH

ligeramente ácido) después de ser solubilizadas *in vitro* a pHs alcalinos, este dato sugiere que dentro del mecanismo de acción es necesaria la solubilización para la actividad toxica (de Maagd et al., 2001).

Se sabe además que estas proteínas requieren cortes proteolíticos por algunas proteasas endógenas del insecto blanco que activan a la toxina. Para el caso de las toxinas Cry de 130 kDa se ha propuesto que el corte inicia en el extremo carboxilo terminal, produciendo cortes de 10 kDa, así hasta alrededor de 600 aminoácidos, después se corta el extremo amino terminal, removiendo los primeros 20 a 55 aminoácidos según la toxina que corresponde, dejando una toxina activa de aproximadamente de 60 kDa que presenta una estructura de tres dominios como se observa en la figura 2. (Bravo et al., 2002). Para el caso de las toxinas de 70 kDa la activación proteolítica involucra la proteólisis de 25 a 60 residuos en el extremo N-terminal, dejando un toxina con un peso aproximado de 60 kDa.

Se ha observado que en lepidópteros y dípteros las proteasas más abundantes son serin proteasas, en cambio en los coleópteros se ha visto que las más abundantes son cisteína y aspartico proteasas (Terra et al., 1994). Sin embargo no es claro cuales son las proteasas que participan en la activación de las toxinas Cry. Se ha propuesto que serin proteasas como tripsina, quimiotripsina y elastasa, que participan en el proceso de digestión de los insectos, también están involucradas en el procesamiento proteolítico de estas toxinas. En el caso específico de *Choristoneura fumiferana*, se reportó que una enzima tipo tripsina participa en la activación de la toxina Cry1Ac (Milne et al., 1993). También en *Plodia interpunctella* se describió la participación de enzimas con actividad tipo tripsina y quimiotripsina en la activación de Cry1Ac (Oppert et al., 1998).

Otra propuesta es que las proteasas endógenas de *Bt* podrían estar involucradas en la activación de las toxinas Cry. Esta hipótesis se basa en el hecho de que su esporulación está asociada con una gran producción de proteasas. Para validar esta propuesta en un trabajo se analizó la producción de proteasa intracelulares de dos cepas de *Bt var kurstaki*, LB1 y HD251, encontrando que mientras LB1 producía una banda de 68 kDa correspondiente a la toxina activa, en HD251 no estaba presente, ya que produjo menos del 10% de la actividad proteolítica encontrada en LB1. También demostraron que esto se debió a que en LB1 la síntesis de proteasas incrementaba conforme las células esporulaban mientras que en HD25 la actividad aparecía mucho después de la etapa de esporulación (Andrews et al., 2001).

Por otra parte, aunque la activación descrita anteriormente para cada grupo de protoxinas engloba los pasos generales del procesamiento, es importante mencionar que pueden presentarse variaciones en los cortes, lo cual dependerá de la composición de las proteasas presentes en el jugo gástrico, así como de su actividad enzimática y su especificidad.

Además se ha observado que una deficiencia en las proteasas que activan la toxina genera resistencia en algunos insectos (Oppert et al., 1994), demostrando así la importancia de la activación de la toxina en la actividad tóxica de estas proteínas.

○ **Unión a receptores.**

Dentro del mecanismo de toxicidad uno de los pasos primordiales dentro de éste, es la interacción de la toxina activada con diversos receptores. Se han descrito un gran número de ellos para las toxinas Cry.

Inicialmente se realizaron ensayos de competencia utilizando vesículas de vellosidad de la membrana apical (BBMV por sus siglas en inglés) de los lepidópteros *Manduca sexta* y *Pieris brassicae*. En este trabajo se demostró que las toxinas Cry1Ab y Cry1Ba se unieron específicamente a las VVMA de *P. brassicae*, pero solo Cry1Ab se unió a las VVMA de *M. sexta*. Aunque ambas toxinas mataron a larvas de *P. brassicae*, solo Cry1Ab mató a larvas de *M. sexta*, por lo que se demostró que existe una correlación directa entre la unión y la toxicidad (Hofmann et al., 1988) (Van Rie et al., 1989).

Respecto a la identificación de los receptores de las toxinas Cry se ha visto una gran diversidad de receptores como se observa en la tabla 2. Los mejor caracterizados en lepidópteros son la APN, las proteínas tipo CAD y las alcalino fosfatasas (ALP) (Jurat-Fuentes et al., 2004). Otro grupo de receptores incluyen un glicoconjugado de 270 kDa (Valatis et al., 2001), una proteína de 252 kDa (Hossain, et al., 2004), una α -amilasa, β -glucosidasa, la ADAM-3 metaloproteasa, así como el transportador ABC-C2, los cuales pudieran jugar un papel importante como receptores en insectos (Pigott & Ellar, 2007; Tanaka et al., 2013). Adicionalmente, se propuso que los glicolípidos también funcionan como sitios de unión de las toxinas Cry (Griffitts et al., 2003). Si embargo, solo se ha demostrado la funcionalidad de la ALP, APN y CAD como receptores de las toxinas Cry.

Tabla 2. Moléculas de unión a toxinas Cry.

| Proteína de unión | Organismo en el que se identificó | Toxina a la que se une |
|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Cadherina | <i>Manduca sexta</i> | Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac |
| | <i>Heliothis virescens</i> | Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac |
| | <i>Ostria nubialis</i> | Cry1Ab |
| | <i>Helicoverpa armígera</i> | Cry1Ac |
| | <i>Bombyx mori</i> | Cry1Aa |
| | <i>Pectinophora gossypiella</i> | Cry1Aa |
| | <i>Limantria dispar</i> | Cry1A |
| | <i>Anopheles gambiae</i> | Cry4Ba |
| | <i>Aedes aegypti</i> | Cry11Aa |
| | <i>Tenebrio molitor</i> | Cry3Aa |
| <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> | Cry3Aa | |
| APN | <i>Manduca sexta</i> | Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ab5 y Cry1Aa |
| | <i>Bombyx mori</i> | Cry1Aa y Cry1Ab |
| | <i>Helicoverpa armígera</i> | Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac |
| | <i>Heliothis virescens</i> | Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa |
| | <i>Limantria dispar</i> | Cry1Ac |

| | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | <i>Plutella xylostella</i> | Cry1A y Cry1Ab |
| | <i>Spodoptera litura</i> | Cry1Ca |
| | <i>Epiphyas postvittana</i> | Cry1Aa y Cry1Ba |
| | <i>Aedes aegypti</i> | Cry11Aa y Cry4Ba |
| | <i>Anopheles quadrimaculatus</i> | Cry11Ba |
| | <i>Anopheles gambiae</i> | Cry11Ba |
| ALP | <i>Manduca sexta</i> | Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac |
| | <i>Helicoverpa armigera</i> | Cry1Aa y Cry1Ac |
| | <i>Heliiothis virescens</i> | Cry1Ac |
| | <i>Aedes aegypti</i> | Cry4Ba y Cry11Aa |
| | <i>Anthonomus grandis</i> | Cry8Ka5 |
| | <i>Tenebrio molitor</i> | Cry3Aa |
| ABBC2 | <i>Bombyx mori</i> [†] | Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac |
| BTR-270 | <i>Limantria dispar</i> | Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba y Cry1Ac |
| P252 | <i>Bombyx mori</i> | Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac |
| α-amilasa | <i>Anopheles albimanus</i> | Cry4Ba y Cry11Aa |
| β-glucosidasa | <i>Popillia japonica</i> | Cry8Da |
| ADAM-3 | <i>Leptinotarsa decemlineata</i> | Cry3Aa |
| Glicolípidos * | <i>Manduca sexta</i> | Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac |
| | <i>Caenorhabditis elegans</i> | Cry5Ba |

Proteínas y otras moléculas (*) a las que se unen las toxinas Cry en insectos lepidópteros (negro), dípteros (azul), coleópteros (verde) y nematodos (naranja). [†] El ABCC2 de B. Mori se sobre expresó en células sf9.

- **Oligomerización y formación de poro de las toxinas Cry de tres dominios.**

- Inserción en la membrana.

Se han reportado varios modelos de inserción de la toxina Cry1A los cuales plantean que sólo cierta parte de del dominio I se inserta en las BBMV. El primer modelo en proponerse fue denominado modelo de la navaja, en el que se sugiere que las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ se insertan dentro de la membrana, alejadas del resto de la proteína, que permanece sobre la membrana (Hodgman & Ellar, 1990). Con la aparición de nuevos datos experimentales surgió el modelo del paraguas en el que se propone que sólo se insertan las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$, quedando el resto de la toxina esparcida sobre la superficie de la membrana: este modelo fue propuesto utilizando péptidos sintéticos de cada una de las siete hélices que conforman el dominio I, determinando cada una de las afinidades relativas de estas siete hélices hacia una bicapa lipídica, y estableciendo cuál de las hélices tiene una mayor tendencia a orientarse transmembranalmente e insertarse en la bicapa. Utilizando espectroscopía de fluorescencia, se demostró que las hélices que componen el dominio I (a excepción de la hélice $\alpha 1$) tienen una alta afinidad de asociarse a la bicapa. Así mismo se demostró que las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ tienen la habilidad de auto ensamblarse dentro de las bicapas fosfolípicas e insertarse dentro de éstas como una horquilla de manera antiparalela, como se observa en la figura 8 (Gazit et al., 1998).

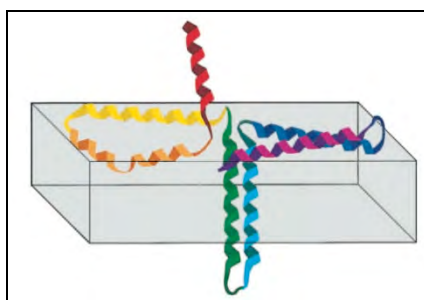


Figura 8. Representación esquemática del modelo propuesto de la interacción de las δ -endotoxinas con las membranas fosfolípicas. Rojo, hélice α ; Café, hélice α_2 ; Amarilla, hélice α_3 ; Verde, hélice α_4 ; Azul claro, hélice α_5 ; Azul fuerte, hélice α_6 ; Morada, hélice α_7 (Gazit *et al.*, 1998).

En 1997 Schwartz *et al.* aprovecharon la ausencia de cisteínas dentro de la estructura primaria de la toxina Cry1Aa para diseñar varias dobles mutantes sitio dirigidas (cambio por C) en diferentes hélices del dominio I, de manera a generar mutantes de la toxina Cry1Aa en las que se selectivamente se favorece la formación de enlaces disulfuro entre diferentes hélices de la toxina, bajo condiciones oxidantes. Los enlaces disulfuro que se diseñaron fueron entre: las hélices α_3 - α_4 (MP159), la horquilla de las hélices α_3 - α_4 (MP169), entre las hélices α_5 y α_6 (MP178), entre la hélice α_5 y la horquilla de la hélice α_7 (MP206) y finalmente entre la hélice α_7 con el dominio II (MP186). Estos enlaces se ilustran en la figura 9.

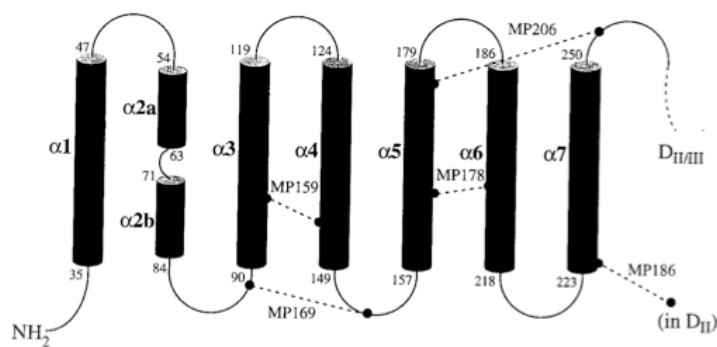


Figura 9. Ilustración de los enlaces disulfuros construidos para determinar la flexibilidad de la toxina Cry1Aa.

La mutante MP186 que une la hélice α_7 del dominio I con el dominio II no presenta actividad de formación de poro, medido como su capacidad de formar canales permeables a cationes principalmente. Determinado en BBMV de *M. sexta* mediante ensayos de conductancia en bicapas planas. Sin embargo la mutante MP186 recupera su actividad de poro cuando es pre-tratada con una solución que contiene β -mercaptoetanol, con esto ellos concluyen que se requiere que el

dominio I tenga flexibilidad y pueda separarse del dominio II para poder insertarse en la membrana y formar un poro funcional (Schwartz *et al.*, 1997).

Por otro lado, el resto de las dobles mutantes realizadas en las hélices del dominio I, que forman puentes disulfuro entre: las hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ (MP159), la horquilla de las hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ (MP169), las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ (MP178), entre la hélice $\alpha 5$ y la horquilla de la hélice $\alpha 7$ (MP206), pierden actividad de formación de poro, y ésta se restablece si las toxinas son pre-tratadas con 0.02% de β -mercaptoetanol. Demostrando así que se requiere flexibilidad en cada una de estas hélices para poder insertarse y formar el poro.

Es importante resaltar que la formación de puentes disulfuros entre cada una de las hélices mutagenizadas restringe la movilidad de las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$. Esto apoya el modelo del paraguas que propone que durante el proceso de formación del poro es necesario que se inserten estas dos hélices ($\alpha 4$ y $\alpha 5$) en la membrana. Sería interesante diseñar un enlace disulfuro entre estas dos horquillas $\alpha 4$ y $\alpha 5$ y ver la actividad tóxica, así como la formación de poro.

Así mismo se ha propuesto que el monómero de la toxina se inserta por completo en la membrana. Este modelo está fundamentado en un trabajo en donde se utilizó la estrategia previamente descrita de la formación de puentes disulfuro, para este trabajo se construyeron 4 dobles mutantes que unían: la hélice $\alpha 3$ con la $\alpha 4$ (SS1), la $\alpha 5$ con la $\alpha 6$ (SS2), la $\alpha 5$ con la $\alpha 7$ (SS3) y al $\alpha 7$ con el dominio II (SS4). Se probó su toxicidad hacia larvas de *B. mori* y hacia larvas de *M. sexta*, así como la formación de poros iónicos mediante la técnica de "corriente de corto circuito con voltaje mantenido" utilizando fragmentos del intestino del insecto, encontrándose que sólo la SS1 perdía actividad tóxica así como la formación de poro, sin embargo esto se debía a la mutación del aminoácido R99 en la hélice $\alpha 3$, en donde previamente se ha visto que el remplazo de este residuo afecta severamente la toxicidad, ya que impide la oligomerización y la formación de poro (Vachon *et al.*, 2001). Sin embargo el resto de las mutantes no presentaron una disminución significativa de la toxicidad ni de la formación de poro, además de que no se veían diferencias cuando se añadía β -mercaptoetanol. Por tanto concluyeron que la formación del poro no se veía afectada por la restricción en el dominio I (Alzate *et al.*, 2006). Sin embargo ellos no consideran el ambiente reductor que se encuentra dentro del intestino de las larvas de insectos, que podría romper los enlaces disulfuro, y por lo tanto permitir el movimiento entre las hélices necesario para la formación del oligómero e inserción en la membrana. Por lo que podemos decir que estos datos no son conclusivos.

- Oligomerización

Como se mencionó anteriormente, se propone que las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ del dominio I se inserta en la membrana, sin embargo no se ha determinado cuantos monómeros se asocian para formar el oligómero y el canal iónico. Con la finalidad de determinar cual es la estructura de los posibles oligómeros se realizan ensayos tipo western blot, en donde se incubaba a la toxina con

vesículas de la membrana de intestino del insecto blanco para observar que estructuras de alto peso molecular se forman, con la idea de poder correlacionar la presencia de estructuras de alto peso molecular con la toxicidad, así como determinar el número de monómeros asociados, de acuerdo a el tamaño de la estructura observada (Aronson et al., 1999).

La formación de oligómero ha sido ampliamente estudiada en nuestro laboratorio, en donde se ha descrito una estructura oligomérica de 250 kDa analizada en ensayos tipo Western blot. Esta estructura tiene una actividad de poro probada en bicapas planas. Por el tamaño de la banda (250 kDa) se sugirió que la toxina se podría arreglar mediante la asociación de cuatro monómeros de la toxina (de 60 kDa cada una). Los protocolos para observar el oligómero en ensayos tipo western blot son muy diversos, así como los resultados obtenido a partir de estos experimentos como se observa en la tabla 3. Los resultados dependen si en la incubación se utilizó: protoxina o toxina activada, el tipo de membranas utilizadas: vesículas del intestino del insecto, liposomas, el tiempo de incubación: 15 min a dos horas, y la temperatura de incubación que varía de 25 a 37°C.

Tabla 3. Protocolos que se han utilizado para estudiar las estructuras oligoméricas de las toxinas Cry.

| Proteína que se uso Protoxina/Toxina | Tipo de membrana Vesículas de intestino de insecto/Liposomas | Tiempo y temperatura de incubación | Tiempo y temperatura antes de cargar el gel SDS-PAGE | Tamaño del alto peso molecular | Referencia. |
|--|---|------------------------------------|--|--------------------------------|----------------------|
| Toxina activada Cry1Ac con tripsina | Vesículas de intestino de <i>M. sexta</i> | 90 min a 37°C | 5 min a 90°C 5 min a 65°C | 200 kDa 250 kDa | Aronson et al., 1999 |
| Protoxina Cry1Ab | En solución (pH 10.5) con jugo gástrico y receptor heterólogo CAD | 90 min a 37°C | 5 min a 90°C | 250 kDa | Gómez et al., 2006 |
| Protoxina Cry1Ab | Con liposomas (pH 10.5) con jugo gástrico y receptor heterólogo CAD | 90 min a 37°C | 5 min a 90°C | 250 kDa | Gómez et al., 2006 |
| Toxina activada Cry1Aa con tripsina | Vesículas de intestino de <i>B. mori</i> | 120 min a 23°C | 5 min a 60°C | 220 kDa | Ihara e Himeno 2009 |
| Toxina activada Cry1Aa con tripsina | Vesículas de intestino de <i>B. mori</i> | 15-120 min a 37°C | 5 min a 60°C | 200 kDa | Obata et al., 2009 |

- o Estructura tridimensional del oligómero.

Debido a la dificultad en observar las estructuras oligoméricas en ensayos tipo Western blot, se han desarrollado otras estrategias para poder observar cuantos monómeros podrían estar involucrados en la formación del oligómero. Uno de ellos realizado por Groulx *et al.*, 2011 reportaron la presencia de formaciones tetraméricas en membranas sintéticas analizando mutaciones de

cisteína única marcada con colorantes fluorescentes. Estas mutantes se localizan en aminoácidos que forman parte de las asas entre la hélice α_1 y α_2 , así como entre las hélices α_3 y α_4 del dominio I de la toxina Cry1Aa. Posteriormente, utilizando fotoblanqueo se observó el patrón de unión de cada uno de los monómeros a las bicapas planas, observando que existían conformaciones diméricas, triméricas y tetraméricas, siendo las últimas las más abundantes (Groulx et al., 2011).

Sin embargo datos de cristalización en dos dimensiones y análisis por microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa han mostrado la presencia de formaciones triméricas con las toxinas Cry1AbMod y Cry4Ba (Munoz-Garay et al., 2009), (Ounjai et al., 2007).

En el 2007 Ounjai et al. observó con microscopía electrónica de cristales de dos dimensiones en tinción negativa dos conformaciones triméricas de la toxina Cry4Ba, una denominada como estructura tipo molino y otra que fue denominada estructura tipo propela como se observa en la figura 10. Estas dos conformaciones se obtuvieron en diferentes superficies cargadas. Este reporte es una de las evidencias que soportan que el oligómero podría tener una conformación trimérica.

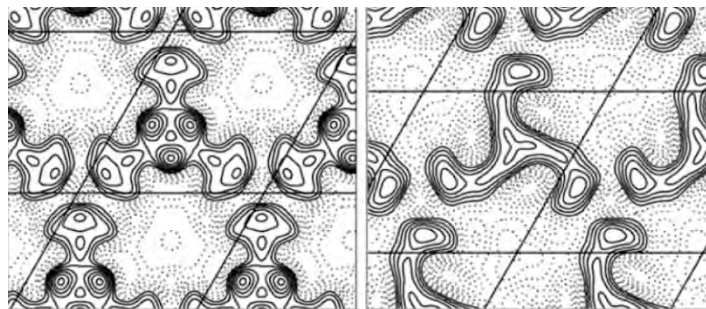


Figura 10. Estructuras triméricas de la toxina Cry4Ba. De lado izquierdo estructura tipo molino, de lado derecho: estructura tipo propela (Ounjai et al., 2007)

Dentro del mecanismo de acción de las toxinas Cry, en nuestro laboratorio se propone que el corte de la hélice α_1 facilita la oligomerización, esto debido a que cuando se analizó la secuencia amino terminal del oligómero de 250 kDa activo en bicapas planas, se vio que carecía de los primeros 58 aminoácidos en el extremo N-terminal, que incluye la hélice α_1 y parte de la hélice α_2 (Gómez et al., 2012). Así mismo en un reporte del 2012 de Almazán-Rodríguez et al. observaron que la toxina Cry4Ba tiene la característica de no depender de la unión a CAD para la formación del oligómero, además de que se sabe que el extremo N-terminal de esta toxina es muy sensible a la proteólisis, ya que cuando se reportó la estructura cristalográfica de esta toxina se especificó que cuando se purificó para obtener el cristal está había sufrido un corte proteolítico extra y carecía de la hélice α_1 y una parte de la α_2 (Boonserm et al., 2005).

En nuestro grupo de trabajo en el 2009 se observó un arreglo trimérico para la toxina Cry1AbMod, utilizando tinción negativa con microscopía electrónica, como se muestra en la figura 11.

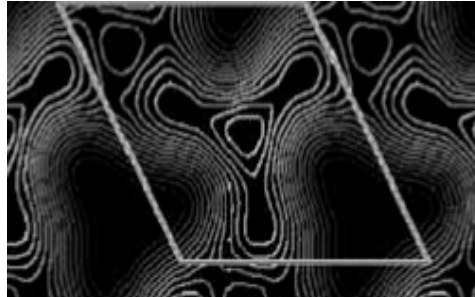


Figura 11. Arreglo trimérico de Cry1AbMod (Muñoz *et al.*, 2009).

Esta toxina fue modificada de tal manera que fue eliminada la hélice $\alpha 1$ y parte de la hélice $\alpha 2$ por ingeniería genética, considerando que esta región se eliminaba por proteólisis cuando la toxina interactuaba con el receptor tipo CAD. Esto resultó en que la toxina Cry1AbMod es capaz de formar oligómeros e insertarse en la membrana sin necesidad del receptor CAD y por lo tanto es posible obtener estructuras oligoméricas en presencia solamente de membranas lipídicas y proteasas (Muñoz *et al.*, 2009).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, cuando se resolvió la estructura cristalográfica de la toxina Cry4Ba, el cristal 3D se formó de una proteína truncada que carecía de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Este cristal presentó un arreglo trimérico como se observa en la figura 12. Las interacciones que se identifican dentro de este arreglo se establecen principalmente por la hélice $\alpha 3$, en donde el extremo N-terminal de esta hélice interactúa con las otras hélices $\alpha 3$ de monómeros adyacentes, en la parte media interactúa con la hélice $\alpha 4$ y en el extremo C-terminal interactúa con la hélice $\alpha 6$ de un monómero vecino (Boonserm *et al.*, 2005). Esto resultó muy interesante ya que esta estructura cristalográfica es diferente a las otras toxinas que se han cristalizado hasta a fecha, lo que nos hace pensar que esta pudiera ser la conformación del oligómero que se está formando en las toxinas Cry de tres dominios.

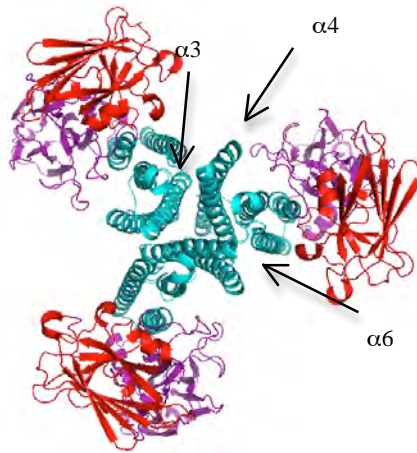


Figura 12. Arreglo trimérico formado por la toxina Cry4Ba que carece de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$. En color verde se observa la hélice $\alpha 3$, en azul la hélice $\alpha 6$ y en morado la hélice $\alpha 4$ (Boonserm *et al.*, 2005)

3. Antecedentes

- **Hélices involucradas en la oligomerización y formación de poro.**

Hasta la fecha se sabe que la hélice $\alpha 3$ y $\alpha 4$ están involucrados en diversos procesos dentro de la oligomerización y formación de poro.

En el 2001 Vachon *et al.* reemplazo los aminoácidos cargados dentro la hélice $\alpha 3$ para poder determinar el papel de esta hélice en la toxicidad, así como en la formación de poro. Dentro de esta hélice existen nueve aminoácidos cargados, de los cuales cuatro de ellos están involucrados en puentes salinos dentro de la toxina Cry1Aa: E90, R93, E112 y R115. Por lo tanto se evitó reemplazar estos aminoácidos para no desestabilizar la estructura de la toxina. Los otros cinco; E101, E116, E118, D120 y R99, se reemplazaron: E101 por K, Q, C, E116 por K, Q, E118 por K, Q, C, D120 por K, Q, C y R99 por C, E, Y.

En bioensayos usando larvas neonatas de *M. sexta* ellos observaron que a la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ (corresponde a 111 ng/cm^2 en bioensayos en donde la toxina es adicionada a la superficie de la dieta) las mutantes R99E, R99C y R99Y presentaron 5, 3 y 3% de mortalidad respectivamente y la mutante E101K presentó 4% de mortalidad con respecto al 100% de mortalidad que presentó la toxina Cry1Aa silvestre. El resto de las mutantes presentaban un fenotipo como la toxina silvestre. Así mismo ellos determinaron mediante ensayos de dispersión de la luz, la formación de poro de las diferentes mutantes de la toxina Cry1Aa. Esta técnica consiste en medir los cambios en la dispersión de la luz en un mezcla de reacción que contiene vesículas de *M. sexta* en un medio hipertónico de KCl. La solución de KCl provoca la salida de agua de las vesículas, y por lo tanto estas disminuyen de tamaño, aumentando la dispersión de la luz. Si una de las proteínas mutante es capaz de formar poros iónicos en la membrana, entonces esta permite el paso de iones y agua, aumentando la permeabilidad de la membrana, lo que permite a las vesículas recuperar su volumen a una fracción de su volumen original, resultando en una disminución de la dispersión de la luz. Ellos realizaron este experimento a dos pHs diferentes: 7.5 y 10.5, observando que en las dos condiciones todas las mutantes del aminoácido R99 disminuyeron drásticamente la formación de poro. En el caso de la mutante E101K esto sólo se observó en el pH de 10.5, ya que en el caso del pH de 7.5 la disminución fue menor. Esto sugirió una estabilidad menor del poro observado para esa mutante, sin embargo en este trabajo ellos no analizan la formación de oligómero de la mutantes construidas (Vachon *et al.*, 2002).

Así mismo en el 2007, Jiménez-Juárez *et al.* realizaron un análisis en la toxina Cry1Ab para determinar cuales eran las regiones dentro del dominio I que podrían inhibir la formación del oligómero, diseñando péptidos sintéticos de cada una de las 7 hélices que conforman el dominio I. Estos péptidos se añadieron a una solución del monómero de protoxina de Cry1Ab en ensayos de oligomerización con CAD y jugo gástrico de la larva, observando que sólo el péptido que corresponde a la hélices $\alpha 3$ inhibía la formación de oligómero (figura 13).

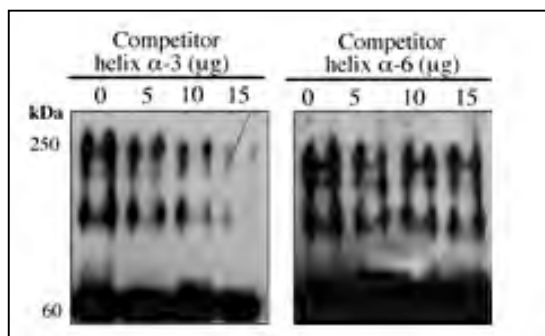


Figura 13. Competencia *in vitro* de la formación de las estructuras oligoméricas de Cry1Ab por péptidos sintéticos correspondientes a diferentes hélices del dominio I (Jiménez-Juárez *et al.*, 2007). La protoxina de Cry1Ab y cada una de las mutantes fueron activadas con proteasas de jugo gástrico de *M. sexta* en presencia de liposomas de fosfatidilcolina, y el anticuerpo scFv73. Se recuperaron los pellets membranales por centrifugación y la toxina se detectó con Western blot usando un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab. La estructura oligomérica de 250 kDa de la toxina Cry1Ab se inserta en el pellet membranar,

Posteriormente realizando mutaciones puntuales en diferentes residuos (de la hélice $\alpha 3$) en la proteína Cry1A, se observó que el cambio de los residuos R99 y Y107, genera la pérdida de toxicidad y de oligomerización, sin perder capacidad de unión a los receptores de la membrana. Este dato es congruente con el reporte previo en donde el cambio del residuo cargado positivamente R99 de Cry1Ac, pierde toxicidad y formación de poro (Vachon *et al.*, 2004).

En la tabla 4 se hace un resumen de las mutaciones que se ha reportado para la hélice $\alpha 3$, en diferentes toxinas que incluye datos de toxicidad, formación de poro y oligomerización.

Tabla 4. Resumen de los aminoácidos de la hélice $\alpha 3$ que al ser reemplazados pierden actividad tóxica.

| Toxina | Aminoácido | Reemplaza do por: | Toxicidad | Formación de poro. | Oligomerización | Referencia |
|--------|------------|-------------------|------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Cry1Aa | R99 | C | Abatida | Abatida | ND | Vachon et al., 2001 |
| | | E | Abatida | Abatida | ND | Vachon et al., 2001 |
| | | Y | Abatida | Abatida | ND | Vachon et al., 2001 |
| Cry1Ac | | E | Abatida | Abatida | ND | Alzate et al., 2006 |
| Cry1Ab | | E | Abatida | Abatida | No forma estructuras oligoméricas | Jimenez-Juárez et al., 2007 |
| Cry1Aa | E101 | K | Disminuida | Disminuida | ND | Vachon et al., 2001 |
| Cry1Ab | Y107 | E | Abatida | Abatida | No forma estructuras oligoméricas | Jimenez-Juárez et al., 2007 |

Para el caso de la Hélice $\alpha 4$, en 1999, Masson *et al.* utilizando la toxina Cry1Aa y 8 mutantes de la hélice $\alpha 4$; (R127E, R127N, E129K, R131D, R131Q, D136N, D136C y N138C) observaron que las mutantes E129K, R131 (D y Q) y D1236 (N y C) pierden por completo la toxicidad hacia larvas de *Plutella xylostella*, lo que no sucede con las mutantes R127 (E y N) y N138C, que mantienen un fenotipo similar a la toxina Cry1Aa silvestre.

Para ver si la pérdida de toxicidad estaba relacionada con la disminución en la actividad de poro iónico, se realizaron ensayos de conductancia en bicapas lipídicas. A diferencia del ensayo de dispersión de luz descrito anteriormente que sirve para determinar la formación de poro, el ensayo realizado en este reporte permite ver el paso de corriente de un solo poro. Con esta técnica se puede comparar el paso de corriente de la proteína silvestre con el de las proteínas mutantes. Observando que las mutantes que estaban afectadas en toxicidad también estaban afectadas en la conductancia del poro iónico.

Así mismo analizaron la unión de cada una de las mutantes a las vesículas de *P. xylostella*, para así descartar una posible pérdida de toxicidad por una disminución de afinidad hacia los receptores. En todos los casos las mutantes tenían una cinética de unión muy similar a la toxina silvestre. Aprovechando la ausencia de cisteínas dentro de la toxina de Cry1Aa, utilizaron la mutante D136C que no forma poro y no es tóxica. Ellos observaron que al adicionar un reactivo que se une específicamente a las cisteínas (MTSES) y que regenera la carga negativa, se restablecía la conductancia de la mutante D136C. Ellos concluyen que este reactivo es accesible al lumen del poro, permitiendo así que reaccione con la cisteína y de esta manera restableciera la carga negativa dentro del lumen. Debido a que la mutante E129K perdió toxicidad y se encuentra muy cerca de D136C, ellos concluyen que estos dos residuos van hacia el lumen del poro, pero existen otros residuos, como el residuo R131, que están involucrados en otros procesos, debido a que pierden toxicidad pero no están cerca de la región que se propone que esta involucrada en la permeabilidad del poro (Masson *et al.*, 1999).

En 2008 Girard *et al.* realizaron mutaciones en cada uno de los 26 aminoácidos que conforman la hélice $\alpha 4$ de la toxina Cry1Aa y los cambiaron por cisteína. Tres de ellos, la P124, A125 y L145 no se lograron obtener, y la mutante T143C se produjo en pocas cantidades, por lo que se eliminó de los análisis posteriores. En este trabajo se evaluó la toxicidad de cada una de las mutantes contra *M. sexta*, resultando que las mutantes R127C, M130C, M137C, S139C, L141C, I145C y A149C mantuvieron una toxicidad similar a la toxina silvestre, y las mutantes I132C, F134C mantuvieron una toxicidad menor. Las mutantes que a 2 $\mu\text{g/ml}$ (111 ng/cm^2) disminuían la toxicidad a menos del 25% fueron: L126C, R131C, Q133C, N135C, N138C, A140C, T142C, A144C, P146C, Y L147C.

Así mismo utilizando ensayos de dispersión de luz encontraron que las diez toxinas que disminuyeron más del 25% la toxicidad no tenían actividad de formación de poro (Girard *et al.*, 2008).

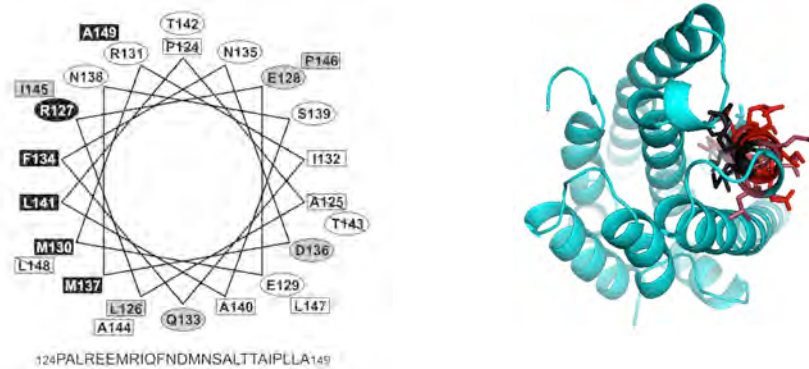


Figura 14. Mutagénesis de residuos de la hélice $\alpha 4$ de la toxina Cry1Aa. En círculos: aminoácidos polares, en cuadrados: aminoácidos no polares. En blanco: aminoácidos que al ser reemplazados por cisteínas perdieron toxicidad y formación de poro, en negro: aminoácidos que al ser reemplazados por cisteínas presentaba un fenotipo idéntico al proteína silvestre. En gris los aminoácidos que al ser reemplazados por cisteínas presentaban una ligera pérdida de toxicidad y de formación de poro. De lado derecho esquema en 3D de la ubicación de los aminoácidos en la hélice $\alpha 4$ En rojo aminoácidos que perdieron la toxicidad, así como la formación de poro, en negro aminoácidos que al ser reemplazados presentaban un fenotipo idéntico al de la proteína silvestre (Girard *et al.*, 2008).

En la figura 14 se observa un resumen de las propiedades formadoras de poro de cada una de las mutantes realizadas. Los aminoácidos polares están en círculos, y los no polares están en cuadrados. El efecto del cambio del residuo original por un residuo de cisteína en la habilidad de formación de poro en la toxina Cry1Aa está indicado en la figura por el color de los círculos y los cuadrados. Residuos en negro, corresponden a las mutantes que retienen una actividad como la toxina silvestre: los que están en blanco, corresponden a mutantes que tienen una actividad muy baja y los que están en gris, corresponden a las mutantes que retienen un actividad intermedia. Los que tienen una línea cruzada no se lograron obtener.

Cabe destacar en esta figura que la sustitución de aminoácidos cargados dentro de la hélice $\alpha 4$ disminuye severamente la toxicidad de las toxinas Cry1Aa, mientras que mutaciones localizados en los residuos hidrofóbicos que dan hacia el otro lado de la hélice tienen muy poco o casi nulo efecto en la actividad tóxica (Masson *et al.*, 1999; Girard *et al.*, 2008) sugiriendo que la hélice $\alpha 4$ esta involucrada en la formación del poro, específicamente los residuos de la cara hidrofílica, además que un grupo de ellos se localiza en el lumen del poro cuando la toxina se inserta en la membrana.

En un trabajo posterior se demostró que las mutantes en la hélice $\alpha 4$ (E129K, N135C, D136N, A140K, T142C y T143D) son capaces de formar un oligómero, pero esta estructura no se inserta en la membrana, por lo que estas mutantes están afectadas en su actividad de formación de poro. En la figura 15, se muestra que el oligómero esta presente en el sobrenadante pero no en el pellet membranar (Rodriguez-Almazan *et al.*, 2009).

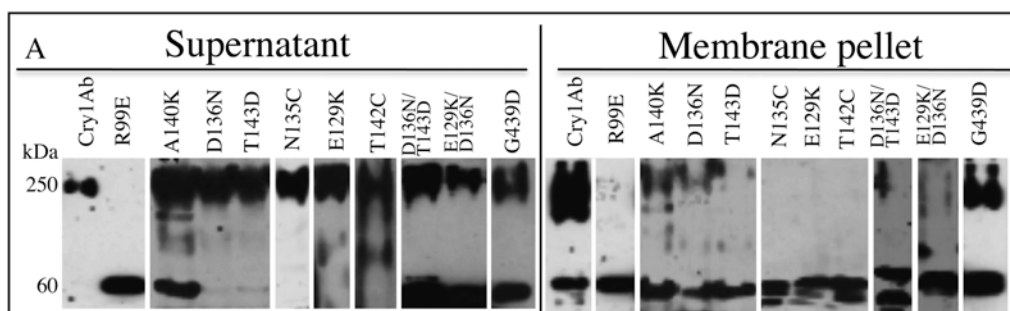


Figura 15. Oligomerización de las mutantes dentro de la hélice $\alpha 4$ de la protoxina Cry1Ab.

La protoxina de Cry1Ab y cada una de las mutantes fueron activadas con proteasas de jugo gástrico de *M. sexta* en presencia de liposomas de fosfatidilcolina, y el anticuerpo scFv73. Se recuperaron los pellets membranales por centrifugación y la toxina se detectó con Western blot usando un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab tanto en el sobrenadante como en el pellet. La estructura ologomérica de 250 kDa de la toxina Cry1Ab se inserta en el pellet membranal, en contraste con las mutantes de la hélice $\alpha 4$, que permanecen en la fracción soluble. La mutante R99 localizada en la hélice $\alpha 3$ por otro lado no forma estructuras oligoméricas (Rodríguez-Almazan *et al.*, 2009).

En la tabla 5 se hace un resumen de la mutaciones que se ha reportado para la hélice $\alpha 4$, en diferentes toxinas que incluye datos de toxicidad, formación de poro y oligomerización.

Tabla 5. Resumen de los aminoácidos dentro de la hélice alfa tres que al ser remplazados pierden actividad tóxica.

| Toxina | Aminoácido | Cambio | Toxicidad | Formación de poro. | Oligómero | Insecto probado | Referencia |
|---------|------------|-------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| Cry1Ac | Q133 | R | Abatida | ND | ND | <i>M. sexta</i> y <i>H. virescens</i> | Kumar y Aronson 1999 |
| | I132 | S L V | Abatida | ND | ND | <i>M. sexta</i> y <i>H. virescens</i> | Kumar y Aronson 1999 |
| | R131 | L | Disminuida | ND | ND | <i>M. sexta</i> y <i>H. virescens</i> | Kumar y Aronson 1999 |
| Cry1Aa | R131 | D Q | Abatida | Abatida | ND | <i>P. xylostella</i> | Masson et al, 1999 |
| | E129 | K | Abatida | Abatida | ND | <i>P. xylostella</i> | Masson et al, 1999 |
| | D136 | N C | Abatida | Abatida | ND | <i>P. xylostella</i> | Masson et al, 1999 |
| Cry1Ac1 | N135 | Q | Abatida | Abatida | No forma estructuras oligoméricas | <i>M. sexta</i> | Tigue et al., 2001 |
| Cry1Aa | R127 | E N | Ligeramente disminuida | Ligeramente disminuida | ND | <i>M. sexta</i> | Vachon et al., 2004 |
| | E128 | C | Ligeramente | Disminuida | ND | <i>M. sexta</i> | Vachon et |

| | | | | | | | |
|---------------|------|-------------|------------------------|------------------------|--|-----------------|--------------------------------|
| | | | disminuida | | | | al., 2004 |
| | E129 | C K | Abatida Abatida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Vachon et al., 2004 |
| | R131 | D | Abatida | Ligeramente disminuida | ND | <i>M. sexta</i> | Vachon et al., 2004 |
| | | E | Ligeramente disminuida | | | | |
| | | H | Abatida | | | | |
| | | Q | Ligeramente disminuida | | | | |
| | D136 | C N Y | Abatida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Vachon et al., 2004 |
| | T142 | D | Abatida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Vachon et al., 2004 |
| | T143 | GD | Abatida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Vachon et al., 2004 |
| Cry1Aa | L126 | C | Disminuida | Disminuida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | R131 | C | Disminuida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | I132 | C | Ligeramente disminuida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | Q133 | C | Disminuida | Disminuida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | N135 | C | Abatida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | N138 | C | Disminuida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | A140 | C | Disminuida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | T142 | C | Disminuida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | A144 | C | Abatida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | P146 | C | Abatida | Disminuida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| | L147 | C | Abatida | Abatida | ND | <i>M. sexta</i> | Girard et al., 2008 |
| Cry1Ab | E129 | K | Abatida | ND | Si forma estructuras oligoméricas pero estas no se insertan. | <i>M sexta</i> | Rodríguez-Almazán et al., 2009 |
| | N135 | C | Ligeramente disminuida | ND | Si forma estructuras oligoméricas pero estas no se insertan. | <i>M sexta</i> | Rodríguez-Almazán et al., 2009 |
| | D136 | N | Ligeramente disminuida | ND | Si forma estructuras oligoméricas pero estas no se insertan. | <i>M. sexta</i> | Rodríguez-Almazán et al., 2009 |

| | | | | | | | |
|--|------|---|------------------------|----|--|-----------------|--------------------------------|
| | T142 | C | Ligeramente disminuida | ND | Si forma estructuras oligoméricas pero estas no se insertan. | <i>M. sexta</i> | Rodríguez-Almazán et al., 2009 |
| | T143 | D | Abatida | ND | Si forma estructuras oligoméricas pero estas no se insertan. | <i>M. sexta</i> | Rodríguez-Almazán et al., 2009 |

- **Modelo de dinámica molecular del pre-poro de Cry4Ba.**

Taveecharoenkool et al. (2010) propuso un modelo tridimensional del pre-poro de la toxina Cry4Aa, utilizando como patrón la estructura cristalográfica tridimensional de la toxina Cry4Ba. Combinando técnicas de dinámica molecular, propone que la toxina Cy4Aa forma un pre-poro trimérico que posteriormente se inserta en la membrana a través de las hélices α_4 y α_5 . En este modelo se identificaron los aminoácidos dentro del dominio I que interaccionan para estabilizar el oligómero; estos aminoácidos pertenecen a las hélices α_3 , α_4 , y α_6 . Debido a que la dinámica molecular es una técnica que se basa en el modelamiento de la estructura molecular de cada uno de los aminoácidos dentro de la proteína durante cambios de temperatura en función del tiempo, se pueden identificar cuáles son los aminoácidos que permanecen al centro del trímero durante estas fluctuaciones, logrando dividir a los aminoácidos en dos grupos, aquellos residuos que permanecen el 100% del tiempo dentro de la zona de contacto, los cuales teóricamente son los más importantes para mantener este arreglo trimérico, y otros que entran y salen, los cuales tienen un papel secundario en la estabilidad del oligómero.

Para poder identificar a los aminoácidos propuestos por Taveecharoenkool et al. (2010) en Cry4Aa que interaccionan en la interface del trímero y encontrar los que corresponden en la toxina Cry1Aa, se realizó alineamiento de la secuencias de las toxinas Cry1Aa, Cry4Aa y Cry4Ba. Como se puede observar en la figura 16, la secuencia de aminoácidos no está muy conservada entre estas toxinas; sin embargo, se conservan ciertas regiones que permiten el alineamiento. Dado que las estructuras tridimensionales de estas dos proteínas está resuelta, se pueden identificar estructuralmente los aminoácidos correspondientes en la toxina Cry1Ab como se muestra en las figuras 17-19.

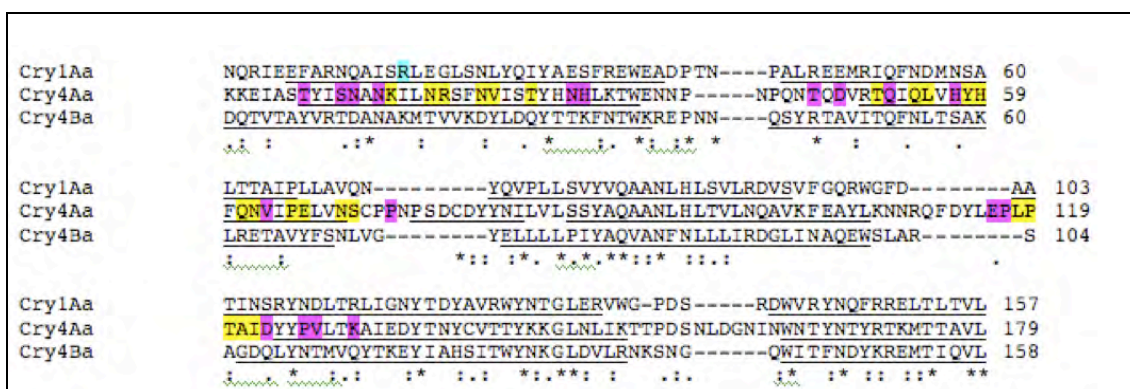


Figura 16. Alineamiento de la secuencias de Cry1Ab, Cry4Aa y Cry4Ba. Los aminoácidos subrayados corresponden a cada una de las estructuras de las hélices $\alpha 3$ a la $\alpha 6$.

Amarillo; aminoácidos principales en la interacción entre monómeros, Morado; son los aminoácidos propuestos en el modelo como de papel secundario en la interacción entre monómeros. En azul; Arginina mutagenizada previamente, cuya mutación resulta en la pérdida de oligomerización y de toxicidad.

Símbolos en el alineamiento; .Comparte misma polaridad, :Dos de los tres aminoácidos están conservados, *Aminoácidos conservados.

Una de las hélices más importantes dentro del modelo de dinámica molecular con la toxina Cry4Aa fue la hélice $\alpha 3$. En la figura 17 se muestra de lado izquierdo la ubicación espacial de los aminoácidos que pertenecen a la hélice $\alpha 3$ de la toxina Cry1A, y los correspondientes en la toxina Cry4A de lado derecho. En el presente trabajo de maestría se seleccionaron los aminoácidos de la proteína Cry1Ab: Q95, G102 y E101K para introducir mutaciones puntuales.

Dentro de la hélice $\alpha 3$, como ya se mencionó anteriormente, se han realizado varias mutantes las cuales se indican en la tabla 4 . Las mutantes de color azul son aquellas que se realizaron en nuestro grupo de trabajo y en ambas se disminuyó severamente la toxicidad y la oligomerización. También se mutagenizaron los residuos L103, Y110 y R93, las cuales no pudieron ser estudiadas por que su producción y estabilidad fueron muy bajas, sugiriendo que estos aminoácidos (L103, Y110 y R93) sirven para estabilizar la estructura del monómero.

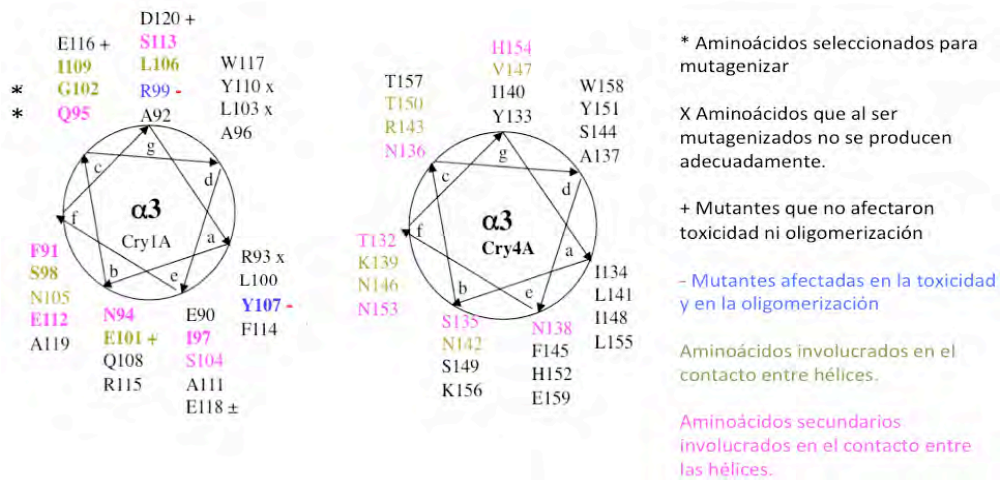


Figura 17. Identificación de los aminoácidos dentro de la hélice α_3 de Cr4Aa del modelo de dinámica molecular en la toxina cry1Ab.

La hélice α_4 ha sido la más estudiada, debido a que se han remplazado cada uno de los aminoácidos por separado que conforman esta hélice en la toxina Cry1Aa. Es importante mencionar que algunas de los aminoácidos remplazados se localizan en el lado posterior a la región involucrada en la formación del lumen del poro, y que sin embargo resultan en la pérdida de la toxicidad y de la formación de poro, como los residuos R131 y N138. En ambos aminoácidos los resultados son muy variables como se observa en la tabla 5. La controversia en estos resultados depende de las toxinas empleadas, así como del insecto. Sin embargo estos datos nos sugieren que posiblemente estos dos residuos podrían estar involucrados en alguno de los procesos dentro de la formación del oligómero (Figura 18). Es por esto se decidió trabajar con estos dos aminoácidos.

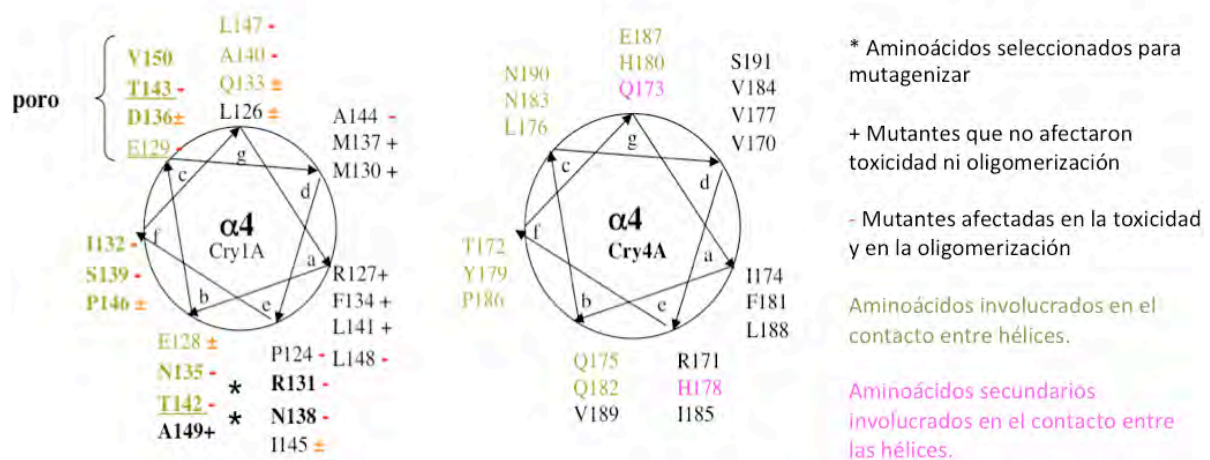


Figura 18 Identificación de los aminoácidos dentro de la hélice α_4 de Cr4Aa del modelo de dinámica molecular en la toxina cry1Ab.

La hélice α_6 ha sido la menos estudiada. Para está hélice se escogió cambiar la T188 y la S191 (Figura 19) por ser los residuos que se encuentran en el lado N-terminal de la hélice y que en el caso de la toxina Cry4Ba están involucrados en la interacción con la hélice α_3 .

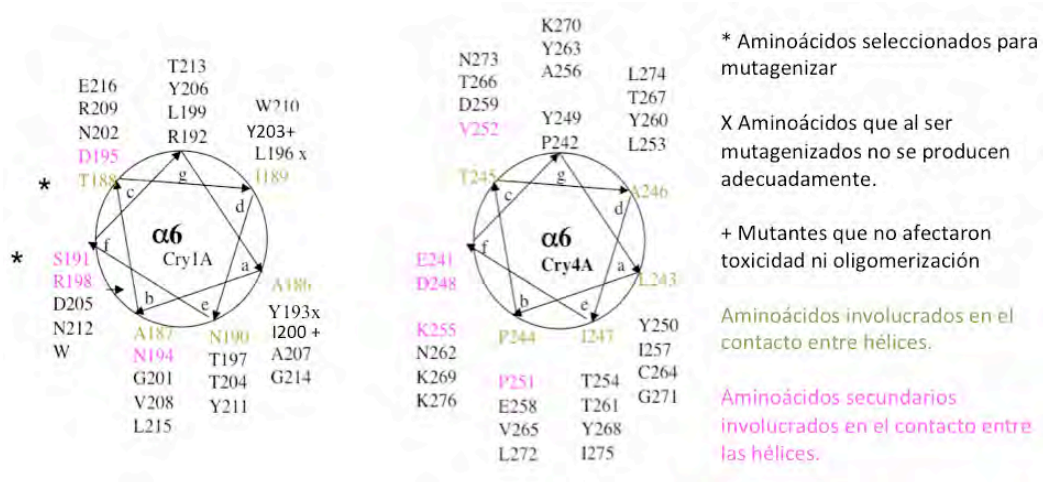


Figura 19. Identificación de los aminoácidos dentro de la hélice α_6 de Cr4Aa del modelo de dinámica molecular en la toxina cry1Ab.

- **Modelo del pre poro de la toxina Cry1Ab basado en el cristal de la toxina Cry4Ba**

Adicionalmente se sabía que dentro de la toxina Cry1Ab, uno de los aminoácidos de mayor importancia en la hélice α_3 , es el residuo R99, entonces decidimos construir un modelo del trímero de la toxina Cry1Ab a partir de la estructura cristalográfica del trímero en solución previamente reportada de Cry4Ba, esto lo realizamos en colaboración con el Dr. Alfredo Torres del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, el modelo se muestra en la figura 20. Esto con la finalidad de identificar cual eran los aminoácidos que estaba alrededor del aminoácido R99 y así poder determinar si había alguna región dentro de esta hélice que jugara un papel primordial en la interacción con otros monómeros que forman el oligómero.

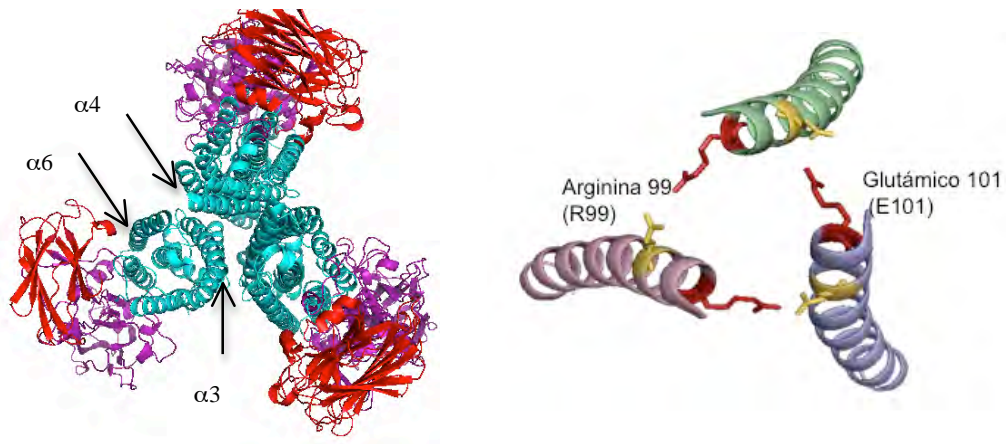


Figura 20. Modelo tridimensional del trímero de Cry1Ab. Realizado por el Dr. Alfredo Torres del Instituto de Fisiología Celular de UNAM.

Dentro de este modelo encontramos que el residuo más cercano a R99 dentro de la toxina Cry1Ab, es el E101 como se muestra en la figura 20, éste se encuentra a una distancia de 4.5 Å. Lo que sugiere que podría estar formando un puente salino. Para corroborar la predicción del modelo, se va a reemplazar el aminoácido E101 por K, así como se realizó la mutación complementaria, esto es reemplazar R99 por E y E101 por R.

4. Justificación.

El estudio del modo de acción de las toxinas Cry nos permite contestar preguntas fundamentales en biología, para poder entender el paso de inserción de la toxina en la membrana, esto es, cómo es que estas toxinas pasan de un estado estable en solución a otro estado estable en un medio no polar, como lo es la membrana lipídica. Para esto es necesario entender la interacción entre la hélice $\alpha 3$ de la toxina Cry1Ab con otras hélices, como las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 6$ del dominio I, así como determinar algunos de los aminoácidos esenciales dentro de estas hélices que están involucradas en el proceso de oligomerización. Por otro lado conocer a detalle el mecanismo de acción de las toxinas Cry, incluyendo las bases moleculares de la interacción proteína-proteína, representa un potencial biotecnológico que podría, finalmente, proponer cambios para mejorar su actividad y así optimizar su aplicación en el control biológico de insectos,

5. Hipótesis.

Las hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 6$ del dominio I, en la toxina Cry1Ab están involucradas en la formación del oligómero necesario para la formación del poro lítico y la toxicidad en larvas de *M. sexta*.

6. Objetivo.

- ❖ Identificar los aminoácidos involucrados en la oligomerización de la toxina Cry1Ab.

Metas para conseguir el objetivo.

- ❖ Identificar los aminoácidos sugeridos por Taveecharoenkool et al. 2011, en Cry4Aa correspondientes en la toxina Cry1Ab, que pudieran estar involucrados en oligomerización de esta toxina.
- ❖ Reemplazar mediante mutagénesis sitio-dirigida a los aminoácidos identificados en cada una de las hélices.
- ❖ Analizar la toxicidad de estas mutantes.
- ❖ Determinar si existe correlación entre la toxicidad de las mutantes y la formación del oligómero

7. Materiales y métodos.

- **Cepas utilizadas.**

Tabla 6. Cepas y oligonucleótidos utilizadas en este trabajo.

| Cepa | | Característica | |
|---|----------|---|------|
| <i>E. coli</i> XL1Blue y <i>E. coli</i> Dh5α | | Cepas utilizadas para expresar plásmidos pBSKSIAB (resistente a ampicilina y eritromicina) que contiene un fragmento de la toxina Cry1Ab; y el plásmido pHT315 –Cry1Ab (resistente a eritromicina y ampicilina) que contiene todo el gene de la protoxina Cry1Ab. | |
| TG1 de <i>E. coli</i> | | Cepa de expresión que produce la proteína ScFv73. | |
| Bt.407 | | Cepa acristalífera de <i>Bt</i> que sirve de receptor para expresar las protoxinas Cry mutantes. | |
| Bt-407 Cry1Ab | | Cepa de <i>Bt</i> que contiene el plásmido pHT315-1Ab que expresa la protoxina Cry1Ab silvestre (resistente a eritromicina). | |
| Nombre | Longitud | Secuencia | %GC |
| Alfa2d | 30 | CAA GCT AGC TTG GTT CCC GGT GCT GGA TTT | 53.3 |
| Alfa3d | 32 | CAA GCT AGC TTG AGA ATTA GAA TTC GCT AG | 40.6 |
| Alfa6r | 31 | TTA GGT TAA TCC CCA TAC ACG CTC TAA TCC C | 45.2 |
| Alfa7r | 39 | TTA GGT ACC TAA ACT ATC ATA GTT CGG AAA TAG AGA AAC | 33.3 |

1. Medios utilizados.

LB (Luria-Bertani)

| | |
|----------------------------|------|
| Bacto peptona | 10 g |
| Bacto-extracto de levadura | 5 g |
| NaCl | 10 g |

Bacto-agar 15 g

Aforar a un litro de agua destilada y ajustar el pH a 7 con NaOH. En caso de requerirse sólido, agregar el agar al 15% final. Esterilizar durante 20 minutos a 15 lb/in². Una vez esterilizado, agregar el antibiótico (ampicilina 100 µg/ml o eritromicina 10 µg/ml).

HCT

Bacto-triptona 2.5 g

Casaminoácidos 1.0 g

Bacto-agar 7.5 g

Aforar a 446 mililitros con agua destilada. Después ajustar el pH a 7.5 con KOH. Si se requiere sólido, agregar el agar al 15% al final. Esterilizar 20 minutos a 15 lb/in². Una vez frío el medio agregar las siguientes soluciones previamente esterilizadas.

Tabla 7. Composición de las soluciones del medio HCT.

| Solución | Compuesto | Preparación | Cantidad requerida para preparar 500mL de HCT |
|-----------------------|--|--|--|
| Solución 1 | KH ₂ PO ₄ | 6.8 g disolver en 100 mL de agua destilada. | Agregar 25 mL |
| Solución 2 | MgSO ₄ 7H ₂ O MnSO ₄ H ₂ O ZnSO ₄ 7H ₂ O | 1.23 g 0.01619 g 0.14 g disolver en 100 mL de agua destilada. | Agregar 0.5 mL |
| Solución 3 | FeSO ₄ 7H ₂ O H ₂ SO ₄ 1N | 0.2 g 10 mL disolver en 100 mL de agua destilada. | Agregar 5 mL |
| Solución 4. | CaCl ₂ 2H ₂ O | 1.47 g disolver en 100 mL de agua destilada. | Agregar 5 mL |
| Glucosa al 10% | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 10 g disolver en 100 mL de agua destilada. | Agregar 15 mL |

Se requiere adicionar eritromicina 10 µg/mL final.

2X-TY

| | |
|----------------------|------|
| Triptona | 16 g |
| Extracto de levadura | 10 g |
| NaCl | 5 g |

Aforar a un litro con agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH. Esterilizar durante 20 minutos a 15 lb/in².

BHI (Brainheart infusión)

Bacto-BHI di hidratado 37 g

Aforar a un litro con agua destilada. Esterilizar durante 20 minutos a 15 lb/in².

- **Construcción de mutantes del dominio I de Cry1Ab.**

- Mutagénesis sitio dirigida de la proteína Cry1Ab expresadas en células de *E. coli*

Se reemplazó cada uno de los aminoácidos seleccionados anteriormente en la proteína de Cry1Ab para poder estudiar el papel de cada uno de ellos en la toxicidad. Para esto, se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes para cada mutante (Tabla 8). Para la construcción de las mutantes se utilizó el vector pHT315 que contiene el gen Cry1Ab y un paquete comercial de mutagénesis dirigida (QuikChange XL MultiSite-Directed Mutagenesis kit, Stratagene). El principio de esta técnica consiste en clonar un gen de la proteína de interés en un plásmido y usarlo para transformar una cepa Dam⁺ de *E. coli*. De esta cepa se purifica el plásmido y se adiciona a una reacción de PCR con un oligonucleótido de un tamaño entre 35 a 45 pares de bases. El oligo se diseña de tal manera que la mutación debe estar en medio del oligo. El producto de PCR será una mezcla de una cadena de DNA metilada y otra sin metilar. A continuación, la cadena metilada se elimina al tratar el producto de PCR con una endonucleasa DpnI (G^{me}A↓TC). Las muescas de la cadena sencilla final se reparan al transformar el plásmido en la cepa XLI Blue o DH5α de *E. coli* (Figura 21).



Figura 21. Esquema del protocolo de la mutagénesis sitio dirigida.

Las mutantes diseñadas en la toxina Cry1Ab fueron las siguientes: Q95A, G102A, R131A, R131C, N138A, T188A, S191A y E101K y la doble mutante R99E-E101R. Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para cada una de las mutantes.

| Aminoácido-Cambio | Secuencia del oligonucleótido mutagénico. | Tamaño |
|-------------------|---|--------|
| Q95A | tagaagaattcgctaggaacgcagccatttctagattagaag | 42pb |
| E101K | ggaaccaagccatttctagattaagggactaagcaatc | 39pb |
| G102A | caagccatttctagattagaagcactaagcaatctttatcaaatttacg | 49pb |
| R131A | ccagcattaagagaagagatgccattcaattcaatgacatg | 42pb |
| R131C | gagatgtgtattcaattcaat | 18 pb |
| N138A | gtattcaattcaatgacatggccagtgactacaacc | 38pb |
| T188A | gattcgatgccgcgccatcaatagtcgtataatg | 36pb |
| S191A | gatgccgactatcaatgccgtataatgatttaactagg | 42pb |
| R99E-E101R | ccaagccatttctgaattacgggactaagcaatctttatc | 40pb |

Las condiciones de mutagénesis usadas fueron:

Tabla 9 Concentración de los componentes utilizados en la mutagénesis sitio dirigida de Cry1Ab.

| Componente | Cantidad adicionada |
|--|---------------------|
| 10X Buffer de reacción Quick change ® | 2.5 µL |
| Agua Milli-Q para un volumen final de 25 µL | X µL |
| Solución Quick | 0.75 µL |
| Templado de DNA del gen de la toxina Cry1Ab (doble cadena) | X µL (100 ng) |
| Cebadores mutagénicos (100 ng) | X µL |
| Mezcla dNTP´s | 1 µL |
| Enzima Quick change | 1 µL |

Las condiciones del ciclo de la reacción de PCR fueron las que se ilustran en la tabla 10.

Tabla 10 Condiciones de la reacción mutagénica para la toxina Cry1Ab.

| Segmento | Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|----------|--------|-------------|----------------------|
| 1 | 1 | 95°C | 1 min |
| 2 | 30 | 95°C | 1 min |
| | | 55°C | 1 min |
| | | 65°C | 3 min/kb de plásmido |
| 3 | 1 | 65°C | 7 min |

Después de tratar la reacción de PCR con la DpnI, se pasó la reacción de PCR por columnas de QIAGEN para purificar plásmido, y el producto se resuspendió en 20 μ L de agua estéril. Se mezclaron los 20 μ L con 50 μ L de células *E. coli* electrocompetentes. La mezcla se transfirió a celdas de 0.2 cm y se les aplicó un choque eléctrico (2.5 V, 200 Ω , 25 μ F). Estas células fueron recuperadas en medio Lb por 1 h a 37°C con agitación. Las mutantes se seleccionaron en Lb ampicilina, se aisló el plásmido con un paquete comercial de PROMEGA, y una vez purificado éste, se mando secuenciar a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

o **Transformación de *Bacillus thuringiensis*.**

Una vez confirmada la mutación por la secuenciación del plásmido, se creció la cepa de Bt407 en medio BHI por 12 h a 30°C. De este cultivo se tomó 1 mL y se inoculó 100 mL de medio BHI y estéril, se incubaron aproximadamente 5 h a 30°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6 de absorbancia. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4°C, y la pastilla obtenida se resuspendió cuidadosamente en 30 mL de agua estéril. Esto se repitió dos veces más, y finalmente se resuspendió la pastilla en 1 mL de polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de 3600. Para la transformación, se mezclaron 250 μ L de células en PEG con 20 μ L de la reacción de PCR purificada, en celdas de 0.4 cm. Estas se incubaron en hielo por 5 min y después fueron electroporadas (1000 Ω , 2.5 V, 25 μ F). Las células electroporadas se recuperaron en medio BHI a 30°C por 1 hora con agitación, y las colonias se seleccionaron en Lb suplementada con 10 μ g/mL de eritromicina.

Para verificar la mutación en *Bt* se realizó un PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos del gen Cry1Ab que abarcan las hélices $\alpha 2$ a la $\alpha 7$ (alfa2d y alfa7r) del dominio I de la toxina Cry1Ab. Para el PCR en colonia se crecen las células de *Bt* aproximadamente 5 h a 30°C, en cajas de LB suplementada con eritromicina 10 μ g/mL. De esa caja se raspa un poco de cultivo y se resuspende en 100 μ L de agua estéril. Esta mezcla se congela a -70°C por 30 min y finalmente se

hierva 10 min. Esta mezcla se centrifuga 10 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente, y el sobrenadante es el que se utiliza como templado. Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de el PCR en colonia de *Bt*

| Componente | Cantidad |
|--------------------|------------------------|
| Templado | 2 μ L |
| Buffer 10 X | 2.5 μ L |
| Magnesio 25 mM | 1.5 μ L |
| dNTP's (10 mM) | 0.5 μ L |
| Oligos (F/R) 50 pM | X μ L |
| Taq | 0.2 μ L |
| Agua | Completar a 25 μ L |

Condiciones de la reacción de PCR

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados en la PCR de colonia de las mutantes Cry1Ab obtenidas.

| Segmento | Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|----------|--------|-------------|--------|
| 1 | 1 | 94°C | 5 min |
| 2 | 30 | 94°C | 30 s |
| | | 55°C | 30 s |
| | | 72°C | 1 min |
| 3 | 1 | 72°C | 10 min |

El producto de PCR se observó en un gel de agarosa al 1% y se purificó la banda del tamaño esperado con un paquete comercial de QIAGEN. Con oligonucleótidos de la hélice α 2 (alfa2d) se mandó secuenciar el producto de PCR a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Una vez confirmada la mutación dentro del gen Cry1Ab, se creció un cultivo en cajas de HCT sólido, se dejó 72 h y se verificó la producción de cristal al microscopio óptico y la expresión de proteína en gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie.

- **Solubilización de cristales de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I.**

Para la purificación de cristales, la cepa de Cry1Ab silvestre y mutantes del dominio I se crecieron en 5 cajas de medio HCT sólido suplementado con 10 µg/mL de eritromicina a 30°C durante 72 h aproximadamente, hasta alcanzar la fase de esporulación, verificando la esporulación y la producción de cristal al microscopio óptico con contraste de fases. Se recuperó el paquete celular centrifugando 10 minutos a 10,000 rpm. Después se resuspendieron las células en 30 mL de EDTA 0.01 mM, NaCl 0.3 M más PMSF 1 mM y se centrifugó 10 min a 10,000 rpm a 4°C. Estos lavados se repitieron 2 veces más, y al final se resuspendió el pellet en 10 mL de PMSF 1 mM en agua y se sonicó dando 3 pulsos de un minuto (a 20 W) con un minuto de descanso de 4°C entre cada sonicación.

Se tomaron 500 µl de la suspensión anterior y se centrifugó 10 min a 13,200 rpm a 4°C. El pellet se resuspendió en 500 µl buffer de carbonatos NaHCO₃/Na₂CO₃ 0.05 mM pH 10.5 más β-mercaptoetanol al 0.02%. Se incubó 1 h, 37°C a 300 rpm. Finalmente se centrifugó 10 min a 13,200 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificó proteína por el método de Bradford utilizando BSA como estándar, y se corrió 10 µg de proteína en un gel de SDS-PAGE al 12% de acrilamida para verificar la presencia de la protoxina (130 kDa).

- **Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.**

En un tubo se colocaron 795 µl de PBS y 5 µl de la muestra. Se agitó para homogenizar la muestra y se agregaron 200 µl de reactivo de Bradford de BioRad. Después de incubar 5 min, se realizó la lectura de proteína en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultraspeell) midiendo a una longitud de onda de absorbancia de 595 nm. El valor de absorbancia fue interpolado a una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) que abarca un rango de concentraciones de 1 a 10 µg/ml, para poder obtener el valor de concentración de proteína.

- **Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE**

Para el análisis de las proteínas purificadas se utilizó electroforesis en geles desnaturalizantes. Para esto se prepararon geles al 10 ó 12 % de acrilamida, tal como se describe por Laemmli *et al.* (1970). Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Biorad).

- **Bioensayos con las mutantes del dominio I.**

Se evaluaron diferentes concentraciones desde 0 hasta 2,000 ng/cm². La cantidad de toxina en 35 µL fue agregada sobre la superficie de la dieta. Se utilizaron larvas de *Manduca sexta* de primer instar. Los ensayos se realizaron por triplicado en placas de 24 pozos en los que se colocó una larva por cada pozo, y se utilizó una placa de 24 pozos por concentración de toxina, analizando un mínimo de cinco concentraciones diferentes. Las placas se incubaron a temperatura

ambiente y después de siete días, se cuantificó la mortalidad en cada mutante, y se determinó la concentración a la que mata el 50 % de la población usando el programa Probit (LeOra).

- **Activación con tripsina.**

A 10 µg de protoxina soluble se le adicionó tripsina a una razón de 1:50 tripsina: proteína, incubando 1 h a 37°C con agitación suave. La reacción se detuvo con PMSF 1 mM, y por último se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante, y se cuantificó la proteína por el método de Bradford. Finalmente se corrió un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida para verificar el producto de la tripsinación (toxina 60 kDa).

- **Purificación del anticuerpo scFv73.**

La cepa TG1 de *E. coli* que expresa el anticuerpo scFv73, se inoculó en 50 ml de medio 2xTY suplementado con glucosa al 2% y ampicilina (50 µg/mL). Se inoculó toda la noche a 37°C y 200 rpm. Posteriormente, 5 ml del pre inóculo se agregaron a 500 ml de medio 2xTY previamente suplementado con ampicilina 100 µg/mL y glucosa (0.1%). Se incubó a 37°C y 200 rpm durante dos horas hasta alcanzar una DO de 0.7. Después, el cultivo se indujo con IPTG (0.5 mM) se incubó a 30°C y 200 rpm durante 5 horas. Los cultivos se recuperaron centrifugando 15 min a 5,000 rpm. A continuación, el paquete celular se resuspendió en 15 ml de buffer PPB, se incubó en hielo durante 20 min y se centrifugó 15 min a 5,000 rpm. Posteriormente el sobrenadante se recuperó y el pellet se resuspendió en 15 mL de MgSO₄ 5 mM, incubándolo en hielo durante 20 min. En seguida el pellet resuspendido y el sobrenadante se centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 min, recuperando únicamente el sobrenadante. Finalmente se dializó 5 mL del sobrenadante en membranas de celulosa Cellu Sep con un corte de 12 kDa a 14 kDa, en 1 L de buffer PBS por una hora a 4°C. Se hicieron dos cambios más de 1 L de buffer PBS nuevo y finalmente se dejó toda la noche en 1 L de buffer PBS; se recuperó y filtró (membrana de 0.45 µm).

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

Buffer PPB:

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Sacarosa | 13.5 g |
| EDTA (stock 0.5M) | 135 µL |
| Tris-HCL pH 8 (1M) | 2 mL |
| Aforar a 67.5 mL de agua estéril. | |

Buffer PBS

| | |
|---|--------|
| NaCl | 8.5 g |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.38 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.02 g |
| Aforar a 1 L y ajustar el pH a 7.2 con NaOH | |

- **Preparación de jugo gástrico de larvas de *M. sexta* de tercer instar. .**

Se disectó el intestino medio de larvas de *M. sexta* de 3^{er} instar. Para esto se inmovizaron las larvas colocándolas en hielo durante 15 min. Posteriormente se fijaron las larvas en una base de unicel con alfileres por cada uno de sus extremos, y se cortaron los primeros tres segmentos cefálicos y los dos segmentos caudales con un corte transversal. En seguida se realizó un corte longitudinal en la región dorsal y se separó el intestino de la cutícula. Con unas pinzas de punta plana se extrajo el intestino, y el contenido se vació en un tubo eppendorf estéril, el cual se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, y finalmente se almacenó el sobrenadante para ser utilizado como jugo gástrico.

- **Extracción de intestinos de larvas de *M. sexta* de tercer instar. .**

Extraer alrededor de 3 g de intestino de *M. sexta*, aproximadamente 100 larvas de cuarto estadio larvario, durante la extracción de los intestinos mantenerlos todo el tiempo en hielo seco, para evitar la degradación de las proteínas.

Se duermen las larvas colocándolas en hielo durante 15 min, se fijan las larvas en una base de unicel con alfileres por cada uno de sus extremos, y se cortan los primeros tres segmentos cefálicos y los dos segmentos caudales con un corte transversal. En seguida se realiza un corte longitudinal en la región dorsal y se separa el intestino de la cutícula. Se vacía el contenido intestinal y lavar exhaustivamente con la solución I. El intestino limpio se coloca en un tubo Eppendorf en hielo seco.

Solución I.

| | |
|-----------------------------|--------|
| Manitol | 300 mM |
| Tris-HCl | 17 mM |
| EGTA | 5 mM |
| DTT | 2 mM |
| PMSF | 0,5 mM |
| Ajustar el pH a 7.4 con KOH | |

- **Obtención de vesículas de la microvellosidad apical de *M. sexta* (BBMV)**

Descongelar los intestinos sobre una palangana con hielo, y colocar la muestra en un homogeneizador de vidrio estéril inmerso en hielo. Diluir 1:10 p/v con la solución I fría. Colocar el émbolo de teflón del homogeneizador estéril en un taladro Black and Decker U-114 tipo FV.4. A continuación, a una velocidad de 2,250 rpm el émbolo se va hundiendo poco a poco hasta llegar al fondo del tubo y luego se saca lentamente. Esto se repite nueve veces.

Agregar un volumen igual de una solución 24 mM de MgCl₂ frío, agitar suavemente y colocar en hielo 15 min. Centrifugar a 2,500 g (4,500 rpm) durante 15 min a 4°C en un rotor Beckman (descartar la pastilla). Cambiar el sobrenadante a otro tubo estéril, centrifugar a 30,000 g (16,000

rpm) durante 30 min a 4°C usando el equipo antes descrito, y descartar el sobrenadante. Resuspender la pastilla en medio volumen de la solución I frío y medio volumen de MgCl₂ 24 mM. Volver a centrifugar a 2,500 g durante 15 min a 4°C, recuperar la pastilla únicamente en solución II y volver a centrifugar a 30,000 g durante 30 min a 4°C. Resuspender la segunda pastilla obtenida al centrifugar a 30,000 g en la solución II fría, diluida con agua desionizada, y dar 3 golpes a 2,250 rpm en el homogenizador como se describió anteriormente.

Solución II

| | |
|-------------------|--------|
| Manitol | 300 mM |
| TRIS-HCl | 17 mM |
| CaCl ₂ | 1 mM |

- **Oligomerización de Cry1Ab en vesículas de la microvellosida apical de *M.***

sexta

Se incuba 500 ng de la protoxina soluble o toxina de Cry1Ab activada previamente con tripsina con 10 µg de las vesículas de membrana de *M. sexta* en 50 µl de buffer carbonatos pH 10.5 durante 1h a 37°C. Los 50 µL se centrifugan en una ultracentrífuga a 50,000 rpm por 30 min a 10°C. El pellet se lava con 100 µL de PBS 1X, se vuelve a centrifugar 60,000 rpm por 25 min a 10°C y el pellet se resuspende en 25 µL de PBS, al cual se le añade mezcla lítica y se calienta a 50°C durante 5 min. Esta mezcla se corre en un gel SDS-PAGE al 8% y se transfiere a una membrana de PVDF Immobilon ® MILLIPORE 1h, 350 mA a temperatura ambiente. Posteriormente se coloca la membrana en PBS más Tween 20 al 0.1% con 5% de leche Svelty light. Una vez transcurrido el tiempo se lava tres veces la membrana con PBS más Tween 20 al 0.1% por 5 min a temperatura ambiente. Luego, se adiciona anticuerpo policlonal anti Cry1Ab 1:20,000. Se incuba 1h a temperatura ambiente con agitación. Pasado el tiempo de incubación, se lava la membrana nuevamente con PBS Tween 20 al 0.1%, luego se le adiciona anticuerpo IgG acoplado a peroxidasa anti ratón 1:20,000, y se incuba 1 h con agitación a temperatura ambiente. Se lava 3 veces con PBS Tween 0.1% y finalmente se revela adicionando Luminol Inmunocruz ® Santa Cruz.

8. Resultados y discusión.

- **Solubilización y activación de las proteínas Cry1Ab mutantes.**

El dominio I de la toxina Cry1Ab participa en los procesos de formación de poro y en la oligomerización, pero hasta la fecha no se conoce con claridad el papel que desempeñan cada una de las hélices que conforman este dominio. En este trabajo nos interesa estudiar principalmente el papel de las hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 6$, para lo cual se construyeron mutantes en cada una de estas hélices. Las mutantes que propusimos realizar en este trabajo fueron: Q95A, G102A, E101K y R99E-E101R en la hélice $\alpha 3$; R131A, R131C y N138A en la hélice $\alpha 4$ y finalmente S191 y T188A en la hélice $\alpha 6$ (Tabla 13). Cada mutante se obtuvo en *E. coli* XL1 blue utilizando el plásmido pHT315, y luego se transformó en cepas de *Bt407* acristalífera (que no producen cristales). Como controles, se utilizaron las mutantes R99E y E129K de la toxina Cry1Ab, obtenidas en trabajos previos, que están afectadas en el proceso de oligomerización y formación de poro, respectivamente. Cabe aclarar que ambas mutantes perdieron su toxicidad hacia larvas de *M. sexta* a dosis de 2,000 ng/cm², la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre es de 2 ng/cm².

Tabla 13. Resumen de las mutantes realizadas en la toxina Cry1Ab.

| Hélice | Mutante realizada |
|------------|--------------------------------|
| $\alpha 3$ | Q95A, G102A, E101K, R99E-E101R |
| $\alpha 4$ | N138A, R131A, R131C |
| $\alpha 6$ | T188A, S191A |

Las protoxinas producidas con la mutación de nuestro interés, se solubilizaron en un buffer carbonatos a pH 10.5 y posteriormente se activaron con tripsina. En las figuras 22 y 23 se muestra la solubilización y la activación de la toxina silvestre Cry1Ab y 7 de las mutantes que se realizaron con excepción de las mutantes S191A y R131A, la primera no es estable, y la segunda tiene un fenotipo idéntico a R131A por lo que no se siguió trabajando con ella. La protoxina solubilizada de Cry1Ab y las mutantes se observan como una la banda de 130 kDa. La mutante Q95A produjo menor cantidad de protoxina.

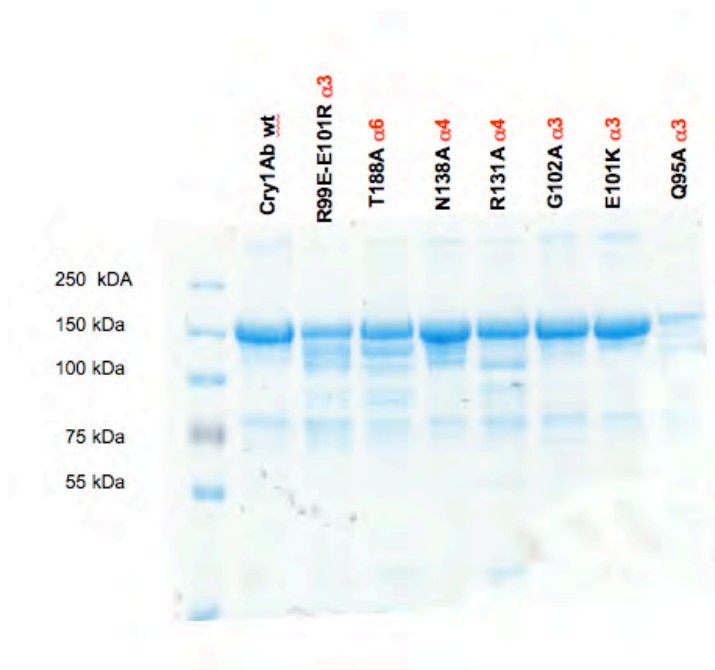


Figura 22. Solubilización de Cry1Ab y las mutantes .

Cuando la toxina se activa con tripsina se corta parte del extremo N- y C- terminal, para dejar una proteína con un peso final de 60 kDa. En la figura 23 se observa la banda activada de la toxina Cry1Ab, y de las mutantes: Q95A, G102A, R131A, N138A, T188A, R99E, E101K y R99E-E101R. La activación con tripsina muestra una banda mayoritaria de ~60 kDa y no se observa protoxina de 130 kDa. Todas las mutantes presentan un activación idéntica a la toxina Cry1Ab silvestre incluyendo a la mutante Q95A. Estos datos indican que la mutación no afectó la estructura de la toxina, ya que cuando se afecta la estructura de la proteína por el cambio introducido, las proteínas mutantes se vuelven muy sensibles a degradación con proteasas.

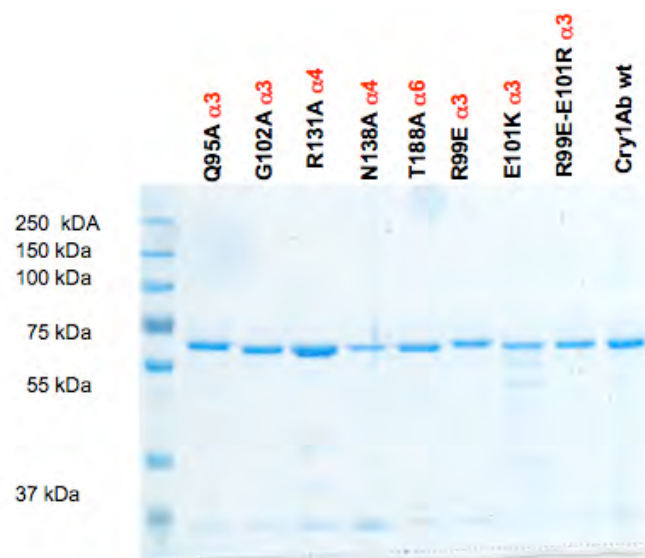


Figura 23. Activación con tripsina de Cry1Ab y las mutantes.

- **Determinación de la dosis letal media de la toxina silvestre y de las mutante.**

Los bioensayos se realizan incubando protoxina de Cry1Ab solubilizada en buffer de carbonatos a pH 10.5 . La proteína se cuantificó por el método de Bradford. Para poder determinar la dosis letal media (DL₅₀) se realizó una curva dosis respuesta usando diferentes dosis de protoxina. Nosotros utilizamos las siguientes dosis; 0 ng/cm², 1 ng/cm², 2 ng/cm² , 5 ng/cm², 10 ng/cm², 100 ng/cm² y 500 ng/cm² y 2,000 ng/cm² de protoxina soluble, para las mutantes en las que no se observó letalidad (R99E y E101K) a 2,000 ng/cm² también se probó una dosis de 5,000 ng/cm². En la tabla 14 podemos observar la DL₅₀ de la proteína Cry1Ab silvestre y de las 7 mutantes del dominio I.

Tabla 14. Bioensayo de la toxina Cry1Ab silvestre y las seis mutantes del dominio I.

| NOMBRE | Dosis letal media (DL50) (ng/cm2) | DISMINUCIÓN DE LA TOXICIDAD (Veces) |
|------------------|--------------------------------------|---|
| Cry1Ab wt | 2.4 (1.5-3.2) | - |
| Q95A | 1.9 (1.3-4.2) | - |
| R99E | >10,000 | >5,000 |
| E101K | >10,000 | >5,000 |
| G102A | 56.4 (34.2-85.6) | 23 |
| R131A | 3 (1.8-5) | - |
| N138A | 524.4 (411-679.8) | 278 |

| | | |
|-------------------|---------------------|----|
| T188A | 2.6 (1.2-6.3) | - |
| R99E-E101R | 278.6 (218.7-362.5) | 91 |

De la tabla 14 se observa que la mutante E101K pierde la toxicidad hacia larvas de *M. sexta*, y en el caso de las mutantes G102A y N138A, se disminuye 23 y 278 veces la toxicidad, respectivamente. El resto de las mutantes sencillas mantuvo una toxicidad similar a la de la proteína Cry1Ab silvestre. Dentro de la hélice $\alpha 3$ la mutante G102A perdió 23 veces la toxicidad. La sustitución del aminoácido no afectó de manera significativa la actividad de la toxina, ya que se cambió de un aminoácido no polar pequeño a otro con las mismas características. Sería interesante reemplazar este residuo por un aminoácido más grande como Isoleucina, o por un aminoácido cargado.

La doble mutante R99E-E101R recuperó parcialmente la toxicidad hacia las larvas de *M. sexta*. Esto resultó bastante interesante considerando que las mutantes sencillas, R99E y E101K no matan ni a una dosis de 5000 ng/cm², sin embargo la doble mutante R99E-E101R es capaz de matar a dosis de 200ng/cm² y a una dosis de 5000ng/cm² mata el 100% de las larvas. Esto sugiere que existe una interacción entre estos dos aminoácidos. El hecho de que no se restablezca por completo la toxicidad puede deberse a una desestabilidad por el cambio del aminoácido original dentro de la hélice, que evita el plegamiento adecuado de la toxina, y por lo tanto no se den las interacciones adecuadas que llevan a la formación eficiente del oligómero.

En el modelo obtenido por el Dr. Alfonso Torres, se observa que la mutante R99 está enfrente del residuo E101, pero de la hélice $\alpha 3$ de un monómero diferente. Cuando se observan sólo los aminoácidos R99 y E101, en el modelo de la toxina Cry1Ab, se observa que están a lados opuestos dentro de la hélice; sin embargo dentro del trímero están viendo una frente la otra. Esto sugiere la formación de un puente salino entre los dos residuos, como se observa en la figura 24.

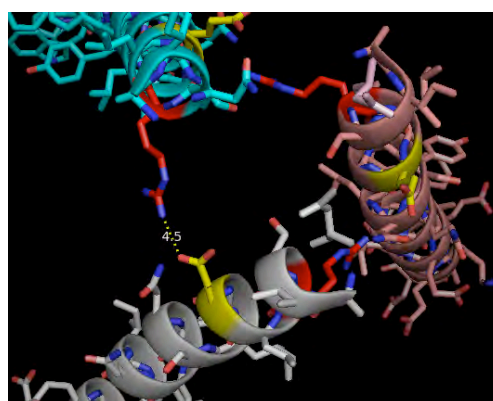
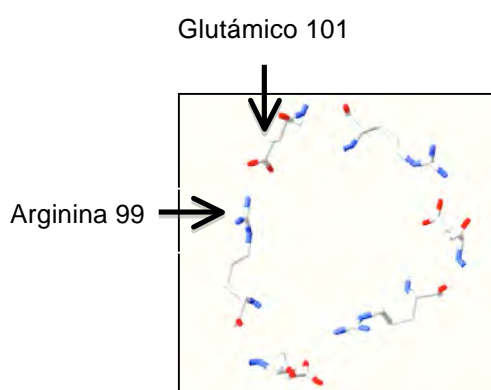


Figura 24. Aminoácidos al centro de la interacción del modelo 3D trimerico de Cry1Ab. De lado izquierdo se muestra la interacción entre glutamato 101 y arginina 99. De lado derecho, en rojo la arginina, en amarillo el glutamato, la línea punteada es la distancia entre estos aminoácido en Å.

La estrategia de realizar la mutación complementaria de aminoácidos cargados como los residuos R99E y E101R de Cry1Ab, para demostrar el papel de un puente salino fue utilizada previamente para observar la interacción entre el dominio CDBHD (dominio homólogo de unión a AMPc por sus siglas en inglés) y el dominio eag en canal de K⁺ KCHN voltaje dependiente. Los canales KCNH son canales de K⁺ voltaje dependientes que regulan la excitabilidad eléctrica del corazón y de las células nerviosas. Estos canales están conformados por un dominio transmembranal que se observa en color gris en la figura 25, un extremo N-terminal eag intracelular que se muestra de color verde, C-linkers que se muestran en naranja y dominios CNBHD que se observan en azul. El puente salino formado entre los dos dominios esta conformado por la R54 del dominio EAG y el D642 en el dominio CNBHD. Las mutantes sencillas disminuyen la activación durante la diferencia de voltaje a +50mV, mientras que la doble mutante R54D-D642R restablece la activación del canal, como se observa en la figura 22c (Haitin et al., 2013).

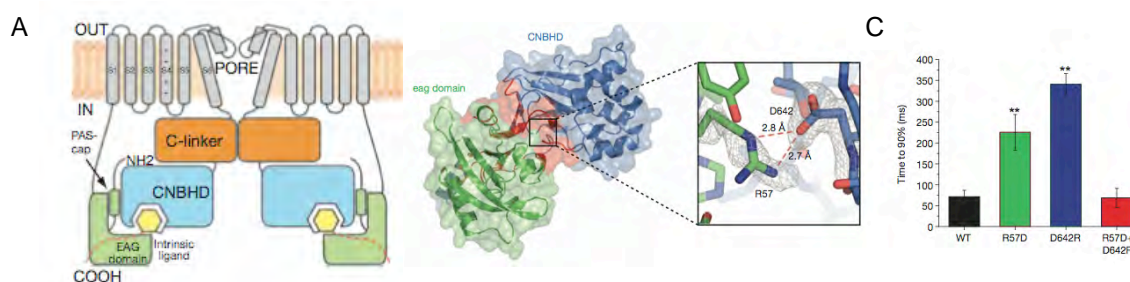


Figura 25. Formación de puente salinos en los canales KCNH. **A)** Estructura de los canales KCNH regulados por el dominio eag. **B)** Puente salino entre el dominio eag y el CNBHD **C)** Tiempo necesario para observar el 90% de la corriente a la máxima amplitud.

El cambio de N por A en el aminoácido 138 dentro de la hélice $\alpha 4$ también afectó la toxicidad de la toxina Cry1Ab, disminuyéndola 278 veces. La disminución de la toxicidad y formación de poro de este aminoácido al ser mutagenizado por una C ya se había reportado previamente por Girard *et al.*, en el 2008 en la toxina Cry1Aa, que tiene una identidad en secuencia del 95% con la toxina Cry1Ab y que en el dominio I son exactamente iguales. En sus resultados ellos no reportan la DL₅₀, si no que reportan que a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lo cual corresponde a una dosis de 111 ng/cm^2), esta mutante presenta

un 19% de mortalidad con respecto al 95% de mortalidad que presenta la toxina silvestre. También indican que a una concentración mayor de 25 µg/mL que corresponde a 1.4 µg/cm² esta mutante presenta un 100% de mortalidad, concluyendo que esta mutación disminuye ligeramente la toxicidad. Estos resultados son similares a nuestros resultados en donde la mutante N138A disminuyó 278 veces la toxicidad.

Con respecto al cambio del aminoácido R131 por A, no se observó ningún cambio en la actividad tóxica con respecto a la toxina Cry1Ab silvestre. Sin embargo Girard *et al.* en el 2008 cambió este aminoácido por C en la toxina Cry1Aa y encontró que se perdía por completo la toxicidad hacia larvas de *M. sexta*, así como la formación de poro. Así mismo cuando se mutagenizó R131C en Cry1Ac1 ésta dio un fenotipo similar a la toxina silvestre. Las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac tienen una identidad en secuencia del 88%, sin embargo en el dominio I son exactamente iguales (Kumar & Aronson, 1999). Para el caso de la mutante realizada en este proyecto, el cambio del aminoácido R131 por A no afectó la toxicidad hacia las larvas de *Manduca sexta*, lo que indica que este aminoácido no juega un papel dentro del mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab

- **Análisis de los fenotipos de las 7 mutantes de Cry1Ab.**

En el modelo de dinámica molecular previamente citado (Taveecharoenkool et al., 2010) los aminoácidos involucrados en la interacción de los monómeros se dividen en dos grupos: el primer grupo, aquellos aminoácidos que permanecían el 100% del tiempo dentro de la zona de interacción que se ilustra en la figura 26 y los de menor importancia (segundo grupo), que permanecían alrededor de un 80% dentro de la zona de interacción

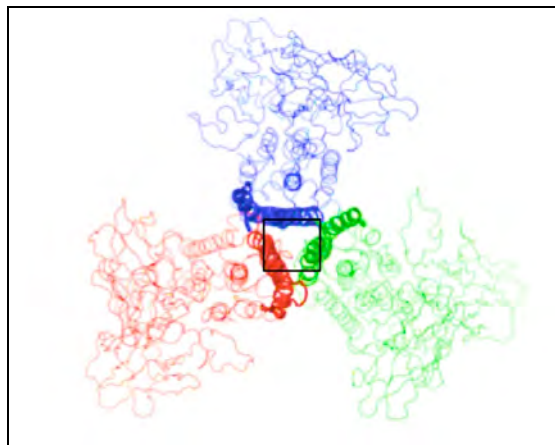


Figura 26: Imagen de la zona de interacción de los monómeros de la toxina Cry4Aa en el modelo de dinámica molecular. El recuadro negro representa la zona de interacción que Taveecharoenkool et al., 2010 establecieron para ver que aminoácidos eran de mayor importancia en la interacción de los monómeros.

Taveecharoenkool et al., 2010 determinó que los aminoácidos involucrados en la formación del oligómero en la hélice α_3 de la toxina Cry4Aa son; K139, N142, R143, N146, V147, T150. Cabe

destacar que de los aminoácidos indicados en la hélice $\alpha 3$ de la toxina Cry4Aa se observa una mayor proporción de aminoácidos polares. De acuerdo al alineamiento de secuencia de aminoácidos de Cry4Aa y Cry1Ab que nosotros realizamos, observamos que en la hélice $\alpha 3$ equivalente de la toxina Cry1Ab los aminoácidos correspondientes son: S98, E101, G102, N105, L106 y I109 (Figura. 27).

Así mismo dentro de esta hélice la mayoría de los aminoácidos son polares e incluso varios son cargados, sugiriendo que la interacción que se da entre las hélices $\alpha 3$ de monómeros adyacentes se debe a fuerzas hidrofílicas: como puentes de hidrógeno y puentes salinos tanto de la toxina Cry4Aa como de la toxina Cry1Ab.

G102 y E101 están dentro del primer grupo de aminoácidos en la toxina Cry1Ab. En este trabajo se observa que el cambio de estos aminoácidos genera la pérdida de toxicidad hacia larvas de *M. sexta*. La importancia del residuo E101 ya había sido reportado previamente en donde se reportó que el cambio de éste por Cys y Gln en la toxina Cry1Aa provoca la disminución de la toxicidad hacia larvas de *M. sexta* y se abate por completo cuando es remplazado por Lys (Vachon *et al.*, 2002).

De los aminoácidos que se señalaron como los involucrados en la formación oligomérica en la toxina Cry1Ab se ha reportado que el cambio del N105 en la toxina Cry1Ac1 por Val y Phe no provoca cambios en la toxicidad hacia larvas de *P. xylostella* (Tigue *et al.*, 2001).

Un aminoácido que ha sido estudiado ampliamente en la hélice $\alpha 3$ de varias toxinas es el aminoácido R99 (Alzate *et al.*, 2006; Jimenez-Juarez *et al.*, 2007; Vachon *et al.*, 2002). Todos los cambios que se han realizado en este aminoácido generan la pérdida de la toxicidad. Este aminoácido no se destacó dentro de los importantes en la formación oligomérica, sin embargo este aminoácido se encuentra muy cerca de la región señalada.

La doble mutante R99E-E101R pertenece a la hélice $\alpha 3$, esta mutante recuperó la toxicidad, lo que resultó muy interesante, ya que las mutantes sencillas R99E y E101K pierden de manera drástica la actividad tóxica hacia las larvas de *M. sexta*. En el modelo de Tavecharoenkool *et al.*, 2010 se predice que la hélice $\alpha 3$ de la toxina Cry4Aa interacciona con otra hélice $\alpha 3$ de un monómero vecino de la misma toxina para formar el oligómero, así mismo en el modelo realizado por el Doctor Alfredo Torres con la toxina Cry1Ab se observó que el aminoácido R99 está interaccionando con el E101K pero de un monómero vecino, esto corrobora con los datos experimentales de la doble mutante, en donde el cambio de R99 por un aminoácido con carga opuesta (E) provoca la pérdida de toxicidad, pero si se restablece la interacción con un aminoácido de carga complementaria en la hélice vecina se ve una recuperación de la toxicidad.

La pérdida de toxicidad de las mutantes G102A, R99E y E101K y la recuperación de la doble mutante R99E-E101R dentro de la hélice $\alpha 3$ sugieren un papel importante de esta hélice en la formación del oligómero, para poder conocer más sobre el papel de esta hélice se tienen que

estudiar el resto de los aminoácidos identificados por Taveecharoenkool et al., 2010 en la toxina Cry1Ab y así mismo corroborar el modelo.

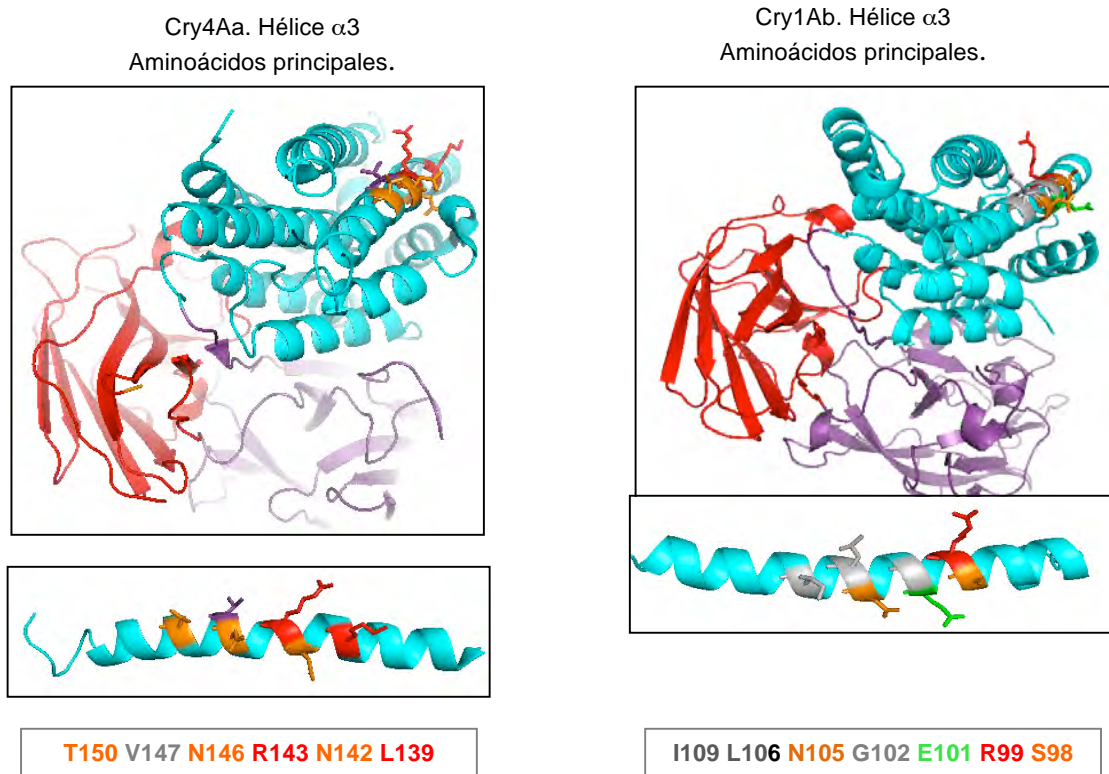


Figura 27. Ubicación espacial de los aminoácidos que permanecen el 100% del tiempo dentro de la zona de contacto dentro de la hélice $\alpha 3$ en el modelo 3D de Cry4Aa y Cry1Ab. Naranja: Aminoácidos polares, Rojo: Aminoácidos cargados positivamente, Verde: Aminoácidos cargados negativamente y Gris: Aminoácidos no polares.

En los aminoácidos que pertenecen al segundo grupo de la hélice $\alpha 3$, existe una mayor variación con relación a las características polares de los aminoácidos reportados como los más importantes como se muestra en la figura 28. Dentro de este grupo se encuentra el residuo Q95 que se reemplazó por A en este proyecto. EL cambio del aminoácido Q95 por Ala en la toxina Cry1Ab no afecta la toxicidad hacia las larvas de *M. sexta* lo que nos indica que este aminoácidos no esta involucrado en el mecanismo de acción de la toxina. Lo que sugiere que este segundo grupo de aminoácidos no tenga un papel relevante en la formación del oligómero..

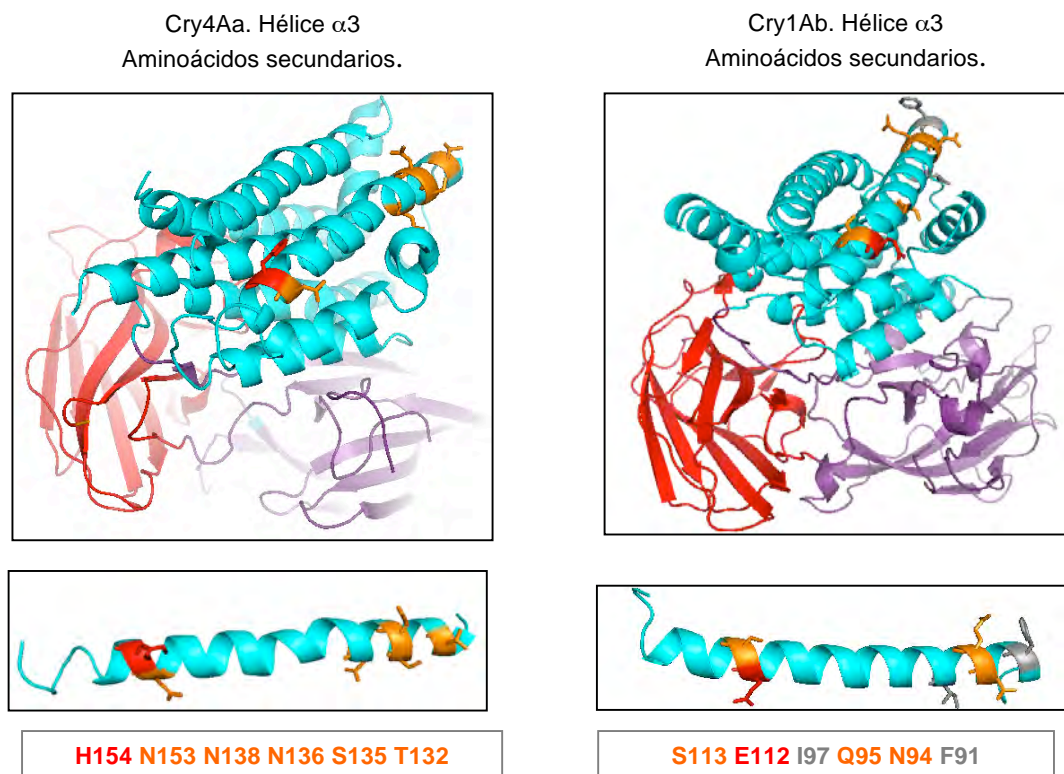


Figura 28. Ubicación espacial de los aminoácidos que permanecen el 80% del tiempo dentro de la zona de contacto dentro de la hélice $\alpha 3$ en Cry4Aa y Cry1Ab. Naranja: Aminoácidos polares, Rojo: Aminoácidos cargados positivamente, Verde: Aminoácidos cargados negativamente y Gris: Aminoácidos no polares.

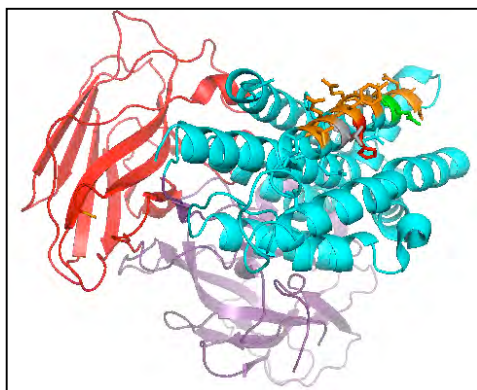
La hélice $\alpha 4$, como se mencionó anteriormente, se ha mutagenizado por completo en la toxina Cry1Aa (Laprade, 2010). Los aminoácidos identificados en Cry4Aa involucrados en la interacción de los monómeros para la formación del oligómero por Tavecharenkool *et al.* 2010 son T172, Q175, L176, Y179, H180, Q182, N183, P186, E187, N190, S191, que en Cry1Ab les corresponde I132, N135, D136, S139, A140, T142, T143, P146, L147, V150, Q152 (Figura 29). Estos datos teóricos coinciden con lo reportado por Girard *et al.* en el 2008, a excepción del aminoácido T143, en el cual el cambio de este aminoácidos por Cys no produce un efecto en la toxicidad o formación de poro. Los residuos V150 y Q152 se encuentran en el extremo de la hélice $\alpha 4$, estos aminoácidos no han sido mutagenizados anteriormente, en el resto de los aminoácidos antes mencionados el cambio del aminoácido original por cisteína conlleva a la pérdida de la toxicidad y formación de poro. Sin embargo Rodríguez-Almazán *et al.* en el 2010 en la toxina Cry1Ab reportaron, que las mutantes D136N, N135C y A140K mantienen una toxicidad similar a la toxina silvestre y que la mutante T142 sólo reduce alrededor de 30 veces la toxicidad. En ese mismo reporte ellos observan que las mutantes E129K y T143D perdían por completo la toxicidad hacia larvas de *M. sexta*.

Cabe resaltar que mutaciones en estos residuos (E129K y T143D) generan fenotipos de dominancia negativa. Esto significa que son mutantes capaces de formar oligómero, pero éstos no son capaces de insertarse dentro de la membrana, induciendo así la pérdida de la toxicidad de la toxina silvestre cuando se hacen mezclas entre toxina mutante y silvestre. Estos datos sugieren que estos residuos dentro de la hélice $\alpha 4$ no están directamente involucrados en la oligomerización, ya que estas mutantes si forman oligómero; sin embargo están afectados en formación de poro ya que no se insertan en los liposomas.

El aminoácido N135 fue reportado en 1998 por Cooper *et al.*, en la toxina Cry1Ac, en donde observaron que en cambio del aminoácido N135 por Q no es tóxica ni a 200 ng/cm² en larvas de *M. sexta* (Cooper *et al.*, 1998). En un trabajo posterior en el 2001 indican que este residuo está involucrado en la oligomerización de la toxina Cry1Ac1 y la toxina Cry1Ab5 (Tigue *et al.*, 2001).

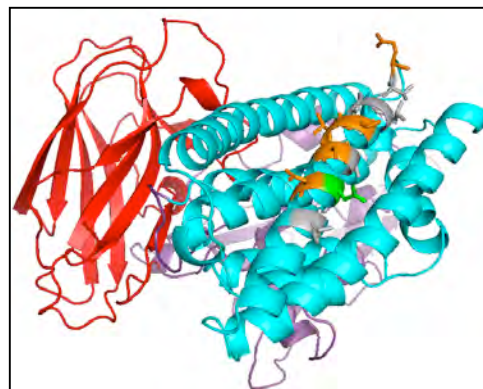
A pesar de que los datos de toxicidad de los diferentes aminoácidos remplazados cambian cuando se utilizan diferentes toxinas y diferentes organismos, se puede observar que existen una buena correlación entre los aminoácidos predichos en el modelo como importantes en la interacción de los monómeros para la formación del oligómero y formación y los datos experimentales obtenidos hasta la fecha.

Cry4Aa. Hélice $\alpha 4$
Aminoácidos principales.



T172 Q175 L176 Y179 H180 Q182 N183
P186 E187 N190 S191

Cry1Ab. Hélice $\alpha 4$
Aminoácidos principales.



I132 N135 D136 S139 A140 T142 T143 P146
L147 V150 Q152

Figura 29. Ubicación espacial de los aminoácidos que permanecen el 100% del tiempo dentro de la zona de contacto dentro de la hélice $\alpha 4$ en Cry1Ab y Cry4Aa. En naranja: los aminoácidos polares, gris: los no polares, rojo: cargados positivamente, verde: cargados negativamente.

Los aminoácidos del primer grupo en la hélice $\alpha 4$ exhiben un mayor porcentaje de aminoácidos cargados y polares, lo que no pasa en los residuos del segundo grupo que presentan una mayor variación en cuanto a polaridad como se ilustran en la figura 30. En este caso los aminoácidos dentro del modelo de dinámica molecular en la toxina Cry4Aa fueron T167 D169 Q173 H178 V189, en Cry1Ab le corresponden; R127 E129 Q133 N138 y A149. Los aminoácidos R127 Q133 y E129K han sido analizados en trabajos previos. El cambio del residuo R127 no afecta la toxicidad o formación de poro en la toxina Cry1Ab cuando es cambiado por Cys. El segundo residuo Q133 cuando se remplazo por Cys en la toxina Cry1Ac1 y se probó su toxicidad hacia larvas de *P. xylostella*, dio un fenotipo similar a la toxina silvestre. Sin embargo, cuando éste mismo aminoácido se probó en Cry1Ab en larvas de *M. sexta* se vio una ligera reducción de la toxicidad así como en la formación de poro. Finalmente el cambio del residuo E129 en Cry1A, Cry1Ab y Cry1Ac resulta en una proteína severamente afectada en su toxicidad así como en la formación de poro (Girard *et al.*, 2008; Masson *et al.*, 1999; Rodriguez-Almazan *et al.*, 2009).

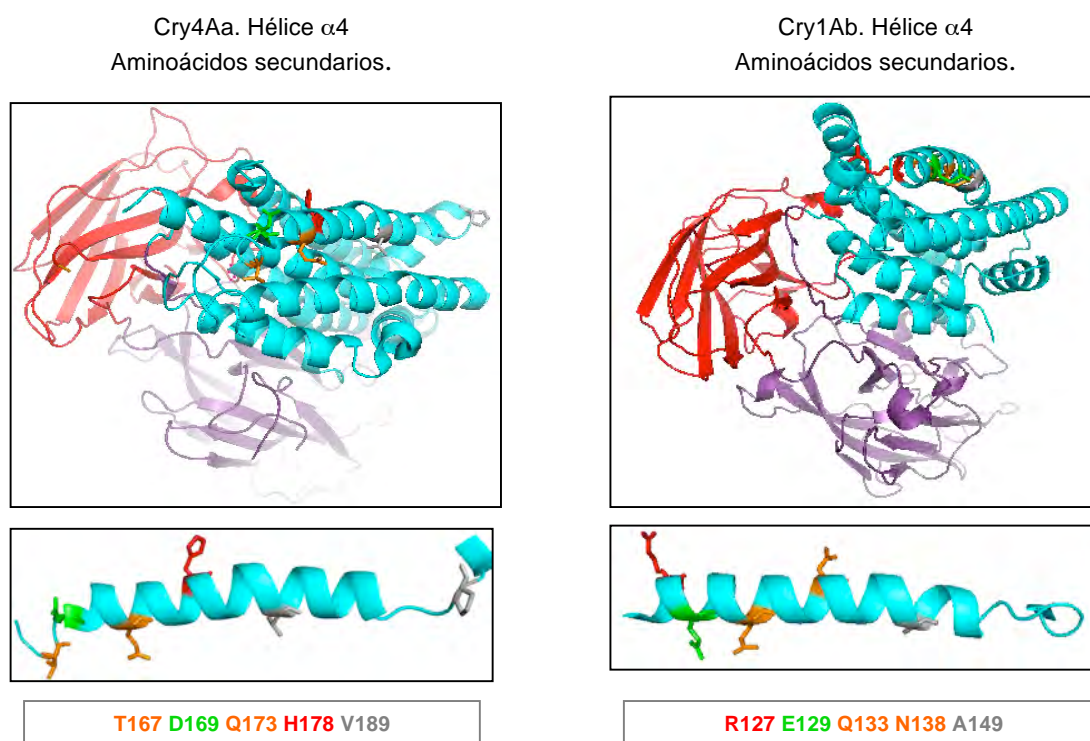


Figura 30. Ubicación espacial de los aminoácidos que permanecen el 80% del tiempo dentro de la zona de contacto dentro de la hélice $\alpha 4$ en Cry1Ab y Cry4Aa. En naranja: los aminoácidos polares, gris: los no polares, rojo: cargados positivamente, verde: cargados negativamente.

Los dos aminoácidos seleccionados en este trabajo fueron R131 y N138. el primero no se encuentra dentro de ninguno de los aminoácidos ubicados en la zona de interacción en el modelo de dinámica molecular en la toxina Cry4Aa, y el segundo se encuentra dentro de los aminoácidos secundarios. Estos aminoácidos se seleccionaron por estar lejos de la zona reportada como región que ve hacía el lumen del poro, y que a pesar de eso perdían toxicidad y formación de poro según lo reportado por Girard *et al.* en el 2008. De estos dos aminoácidos N138 fue el residuo que al ser mutado generó una disminución de 278 veces la toxicidad, sugiriendo un papel secundario en las interacciones que forman el oligómero.

En el caso del aminoácido R131 no se observó ningún efecto al ser mutado por alanina o por cisteína (dato no mostrado). Esto fue sorprendente ya que el grupo de Laprade había reportado que la mutante R131C en Cry1Aa si estaba afectada en toxicidad, así como en formación de poro. Nosotros checamos la secuencia de esta mutante y estamos seguros que es el único cambio dentro de la secuencia de la toxina, por lo que concluimos que en la toxina Cry1Ab este cambio no afecta ni a la toxicidad, ni a la oligomerización.

Finalmente la hélice $\alpha 6$ del dominio I es la menos estudiada en todas las toxinas Cry. En este caso se observa en la figura 31 que los residuos de la toxina Cry4Aa están dentro del asa que conecta la hélice $\alpha 5$ con la hélice $\alpha 6$. Esta asa en la toxina Cry1Ab es mucho más pequeña, por lo tanto, identificar los aminoácidos correspondientes de la toxina Cry4Aa en Cry1Ab es complicado. Los dos aminoácidos seleccionados en este trabajo a remplazar están dentro del primer grupo de aminoácidos seleccionados en la toxina Cry4Ba, pero debido a que en esta ocasión la estructura difiere mucho entre las dos toxinas, no se pueden hacer generalizaciones respecto a cuál es el papel de los residuos que se encuentran en esta zona. Sin embargo sí es importante mencionar que se han hecho algunos trabajos mutagenizando residuos dentro de esta hélice en Cry1Ac, en la parte media, y no se ha obtenido ninguna mutante que pierda la toxicidad (Aronson et al., 1995). Así mismo dentro del laboratorio se han remplazados los residuos I200 y Y203 en la hélice $\alpha 6$, sin obtener ninguna mutante afectada en la toxicidad. En este trabajo mostramos que la mutación del residuo S191 perdió la estabilidad estructural del monómero y en el caso de T188 no se observaron cambios en el fenotipo de toxicidad al se remplazados por Ala, por lo que concluimos que este residuo no está involucrado en la formación del oligómero.

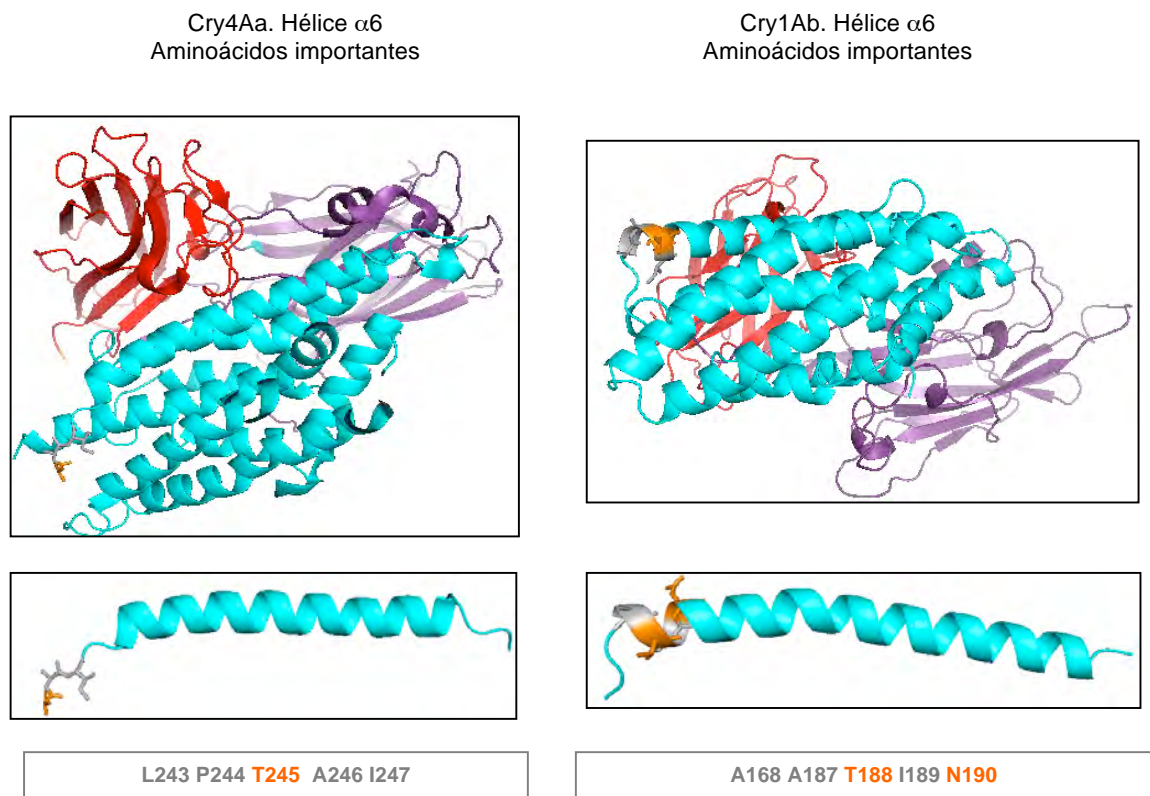


Figura 31. Ubicación espacial de los aminoácidos dentro de la hélice $\alpha 6$ en Cry1Ab y Cry4Aa. Naranja; aminoácidos polares, Gris; Aminoácidos no polares.

El aminoácido alanina es un aminoácido pequeño no polar, que es utilizado ampliamente en la mutagénesis dirigida de proteínas debido a que en la mayoría de los casos elimina las características del residuo por el que fue cambiado sin afectar demasiado la estructura, lo que permite tener una mutante que en la mayoría de los casos no compromete la estabilidad de la proteína. Sin embargo por ser de tamaño pequeño, le permite fácilmente a la proteína reajustar ciertas interacciones que no le benefician al introducir la mutación. Por lo tanto si se busca observar un fenotipo más drástico sería interesante diseñar la mutagénesis de los aminoácidos anteriormente identificados, cambiando drásticamente sus propiedades de polaridad y tamaño.

- **Oligomerización**

Una vez que la toxina se ha unido a la membrana de la microvellosidad del intestino de larvas de *M. sexta*, se propone que la interacción con el receptor CAD induce un cambio conformacional que permite la remoción de la hélice $\alpha 1$, llevando a la formación de una estructura oligomérica y posteriormente a la formación de un poro lítico. La estructura del oligómero así como el proceso por el que sucede esto, sigue siendo un tema controversial. Existen varios métodos

experimentales para poder determinar la estructura oligomérica. En nuestro laboratorio, la estructura oligomérica se ha observado en ensayos tipo Western blot utilizando la toxina, o la protoxina incubando con vesículas de la microvollosidad apical (BBMV por sus siglas en ingles) de *M. sexta* de tercer instar.

Para corroborar que la protoxina no forma agregados en el medio de incubación de los ensayos de oligomerización. Se incubó la protoxina de cada una de las mutantes y de la proteína Cry1Ab silvestre 1h a 37°C en el buffer carbonatos pH 10.5 con 0.2% de β -mercaptoetanol, se ultra centrifugó 30 min a 50000rpm, y se volvió a centrifugar 35 min a 60000 rpm (como se hace en los ensayo de oligomerización). Posteriormente esta mezcla se corrió en un gel SDS-PAGE al 10%, se transfirió a una membrana de PDVF y se reveló el Western blot con un anticuerpo policlonal anti Cry1Ab. Como se observa en la figura 32, la protoxina soluble no es capaz de formar agregados de alto peso molecular en las condiciones de oligomerización utilizadas.

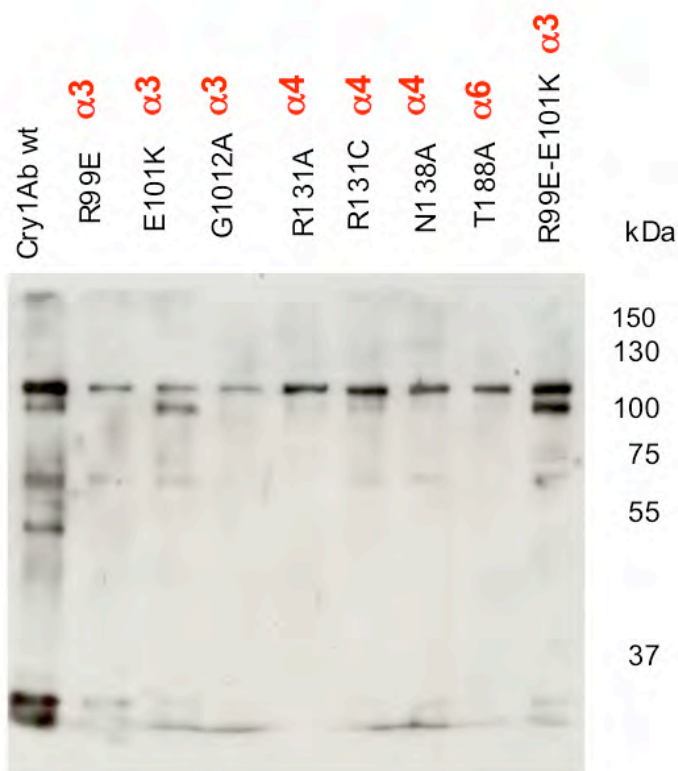


Figura 32. Western blot de la protoxina Cry1A y las mutantes solubles, incubada 1h a 37°C en buffer carbonatos pH 10.5 más β-mercaptoetanol.

Oligomerización de la protoxina Cry1Ab con BBMV de *M. sexta*

La oligomerización realizada incubando la protoxina de Cry1Ab silvestre con BBMV más tripsina se observa en la figura 33. En este experimento la activación de la toxina con tripsina se realiza al mismo tiempo en el que se incuba con las BBMV de *M. sexta*, de manera que el corte de la proteína de 130 a 60 kDa y la interacción con los receptores se da simultáneamente. En este experimento nos interesó observar cuales estructuras se insertan a la membrana, por lo tanto toda la mezcla de incubación se ultra centrifugó 30 min a 50000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla membranal se resuspendió en 100µl de buffer PBS pH 7.4, esta solución se volvió a centrifugar 35 min a 60000 rpm, se volvió a desechar el sobrenadante y la pastilla membranal se resuspendió en 30 µl de buffer PBS pH 7.4.

En este ensayo observamos que las estructuras oligoméricas insertadas en las BBMV varían dependiendo de la temperatura a la cual se calienta la mezcla en presencia de SDS previo a ser corrida en un gel SDS-PAGE al 8%.

A temperaturas entre 30°C y 60°C se observan estructuras entre los pesos moleculares de 150 a 250 kDa. Las estructuras que tienen un peso molecular de 150 a 200 kDa se desensamblan a temperaturas superiores de 70°C. Este dato concuerda con aquellas estructuras oligoméricas observadas con toxina activada incubada con BBMV de *B. mori* que tienen un tamaño de 200 kDa (Ihara & Himeno, 2008; Obata *et al.*, 2009). Este efecto no sucede con las estructuras de peso molecular superior a 250 kDa, en donde se observa una disminución de la cantidad de proteína pero sin desaparecer por completo.

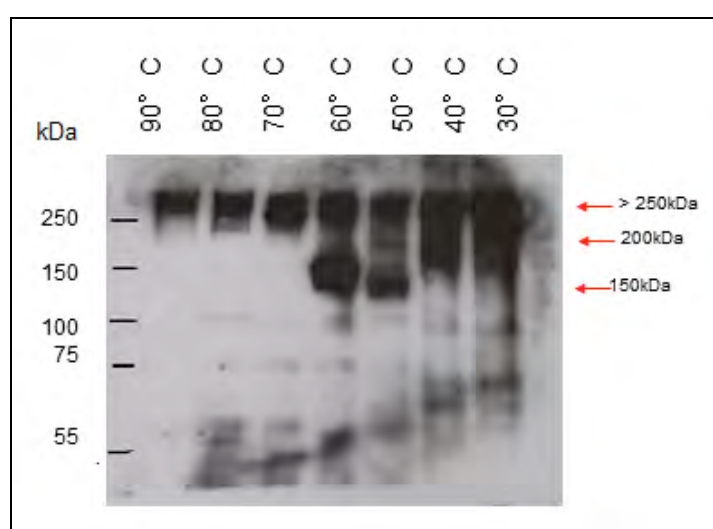


Figura 33. Ensayo de la oligomerización de la protoxina Cry1Ab incubado 1h a 37°C a pH 10.5 con 20µg BBMV de *M. sexta* de tercer instar aisladas en ausencia de inhibidores de proteasas y calentadas a diferentes temperaturas en mezcla lítica de Laemmli. De izquierda a derecha; 90°C, 80°C, 70°C, 60°C, 50°C, 40°C, 30°C. eL gel se transfirió a membranas de PDVF y se reveló en Western blot con anticuerpo anti Cry1Ab.

Para analizar las estructuras oligoméricas en las mutantes se decidió probarlas a una temperatura de 40°C con el objetivo de visualizar las dos estructuras de alto peso molecular (150-250 kDa) observadas en la protoxina Cry1Ab, las condiciones usadas fueron las mismas que en el ensayo anterior.

Cuando se analizó la oligomerización de la protoxina de las mutantes en presencia de BBMV de *M. sexta* a 40°C todas las mutantes (Q95A, G102A, R131A, N138A, T188A, R99E, E101K) así como la toxina Cry1Ab silvestre presentan una banda de alto peso molecular >250kD. Sin embargo, las bandas de 200 a 100 kDa no se encuentran en las dos mutantes que pierden por completo la toxicidad: R99E y E101K (Figura 34). Sin embargo, las otras dos mutantes que disminuyeron parcialmente la toxicidad, la G102A y la N138A, presentan todas las banda tanto de 150 kDa como las de más de 200 kDa.

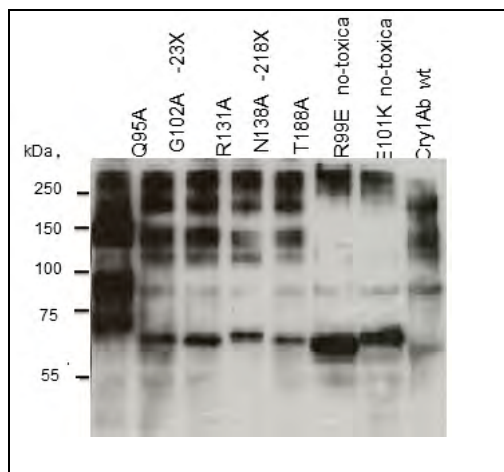


Figura 34. Ensayo tipo Western blot, revelado con anti Cry1Ab, de oligomerización de las protoxinaa de las 7 mutantes de Cry1Ab incubadas con vesículas de *M. sexta* 1 h a 37°C a pH 10.5 e incubadas posteriormente con mezcla lítica a 37°C durante 5 minutos.

Para poder profundizar más sobre la oligomerización de toxina R99E (que pierde por completo la toxicidad), se estudio el oligómero de está toxina a diferentes temperaturas (figura 35). Aquí podemos observar que presenta una forma oligomérica con un peso molecular de alrededor de 250 kDa a 30°C, pero esta estructura es muy poco estable, y disminuye drásticamente su presencia a temperaturas mayores, donde sólo se observa la forma monómerica. Esto explica por qué en la figura 35, en donde se observa las formaciones oligoméricas de las diferentes mutantes a 40°C todavía existe una forma de la mutante R99E con un peso molecular a 250 kDa, Estos datos

sugieren que el oligómero formado por la mutante R99E es inestable y por lo tanto mucho más sensible a la temperatura.

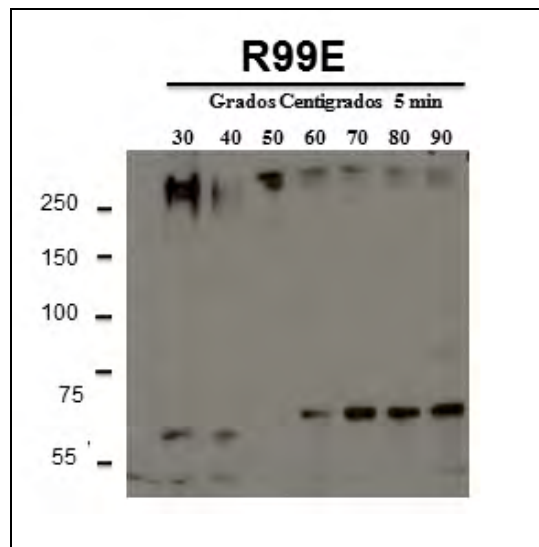


Figura 35. Ensayo tipo Western blot, revelado con anti-Cry1Ab, de la toxina Cry1Ab R99E incubada con vesículas de *M. sexta* 1hr a 37°C a pH 10.5. Incubada posteriormente con mezcla lítica a 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C y 90°C durante 5 minutos.

Oligomerización de la toxina activada con tripsina con BBMV de *M. sexta*

Así mismo se analizó la formación de oligómeros a partir de la toxina Cry1Ab previamente activada con tripsina (1:50) a diferentes temperaturas. La toxina activada se incubó con 20 µg de proteínas de BBMV durante 1 h a 37°C como se observa en la figura 32, al igual que en el ensayo de oligomerización con protoxina, en este ensayo se ultra centrifugó dos veces como se mencionó anteriormente para poder observar las estructuras oligómeras insertadas en las BBMV. Posteriormente se la adicionó mezcla lítica y se calentó a 30°, 40°, 50°, 60°, 70° y 90°C por cinco minutos antes de cargarse en el gel SDS-PAGE al 8%. En la figura 35, observamos que a bajas temperaturas se da la formación de estructuras oligoméricas de 100 a 200 kDa, las cuales se empiezan a desensamblar a 50°C, desapareciendo por completo a 70°C, en donde después de 70°C se observa solo la forma monómerica.

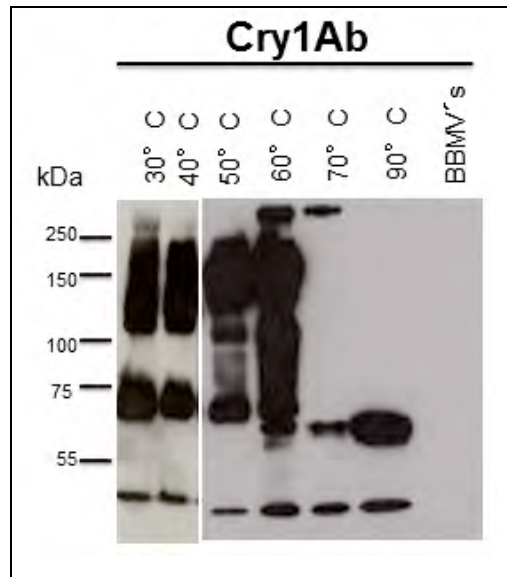


Figura 36. Ensayo de la oligomerización de la toxina Cry1Ab previamente activada con tripsina (1:50) incubado 1h a 37°C a pH 10.5 con 20 µg BBMV de *M. sexta* de tercer instar purificada en ausencia de inhibidores de proteasas e incubadas posteriormente a diferentes temperaturas de derecha a izquierda; 90°C, 70°C, 60°C, 50°C, 40°C, 30°C. La imagen vienen de dos geles independientes, pero con la misma cantidad de proteína y revelados de la misma manera, utilizando un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab.

Posteriormente, se estudió la formación de oligómero de cada una de las mutantes utilizando la toxina activada con tripsina (1:50) en las mismas condiciones que los ensayos anteriores. En este ensayo sólo se observaron dos bandas como en el caso de la oligomerización de toxina silvestre a diferentes temperaturas, una a 200 kDa y otra alrededor de 150 kDa (Figura 37).

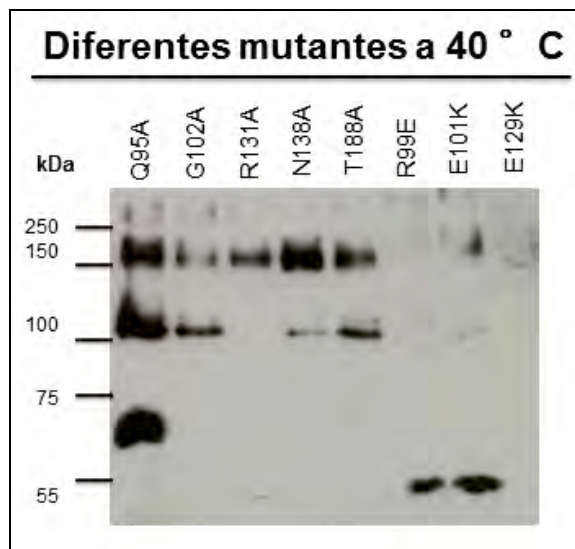


Figura 37. Ensayo tipo Western blot de la oligomerización de las toxinas mutantes de Cry1Ab previamente activadas con tripsina (1:50) incubadas 1h a 37°C a pH 10.5 con 20 µg BBMV de *M. sexta* de tercer instar y finalmente calentadas a 40°C durante 5 min.

En este ensayo no se observan bandas de alto peso molecular de las mutantes R99E y E101K así como del control de la toxina E129K la cual ya se había reportado que era capaz de formar oligómeros, pero estos permanecen en solución y no son capaces de insertarse en la membrana (Rodriguez-Almazan *et al.*, 2010). Utilizamos esta mutante E129K, como control en este experimento ya que en los ensayos anteriores no vimos que la formación de oligómero de la mutante N138A se viera disminuida. Entonces pensamos que esta mutante posiblemente también estaba involucrada en la inserción del poro, y por lo tanto tendría un fenotipo similar, sin embargo no fue así, La mutante N138A de la hélice $\alpha 4$ que esta afectada 278 veces en la toxicidad hacía las larvas de *M. sexta*, presenta las mismas estructuras que la toxina silvestre, tanto las de bajo peso molecular (150-200 kDa) como las de alto peso molecular (250 kDa). Faltaría analizar la actividad de formación de poro de esta mutante para confirmar si estos oligómeros inducen la formación de canales similares a los de la toxina silvestre.

Por otro lado la mutante G102A de la hélice $\alpha 3$ que tiene disminuida la toxicidad 23 veces, sí presenta una disminución en las estructuras oligoméricas tanto en la banda de 200 kDa como en la de 100 kDa, lo que sugiere que pudiera estar afectada en la capacidad de formar oligómeros, sin embargo la banda de 250kDa que es más resistente a la temperatura y que se observa en los ensayos en donde se utiliza protoxina, si se observa con esta mutante.

La mutante E101K que perdió por completo la toxicidad así como la mutante R99E que previamente se había descrito que estaba afectada en oligomerización, no se observa ninguna de estas bandas, sugiriendo que estos dos aminoácidos esta completamente afectadas en la formación de oligómero y que por lo tanto son muy importante en la formación del oligómero.

Finalmente se analizó la formación de oligómeros de la doble mutante R99E-E101R, utilizando toxina activada con tripsina y BBMV de *M. sexta*. En la figura 38 observamos que las mutantes sencillas R99E y E101K pierden la capacidad de formar oligómeros ya que no se observa la formación de bandas de alto peso molecular insertadas en el pellet membranal de las BBMV de *M. sexta*. Sin embargo, en la doble mutante se observa una estructura de alrededor de 200 kDa similar a la estructura observada en la toxina Cry1Ab silvestre pero en menor cantidad. Esto es un dato muy interesante ya que esta mutante restablece parcialmente la toxicidad, y así mismo se ve restablecida la formación de oligómero, lo que nos confirma que estos dos aminoácidos, R99 y E101 son muy importantes en el proceso de oligomerización y es muy probable que dentro de este proceso estén formando un puente salino.

Nuevamente se realizó el ensayo utilizando la mutante N138A, la cual reduce 278 veces la toxicidad. Sin embargo, en este ensayo nos da un fenotipo similar al de la toxina silvestre.

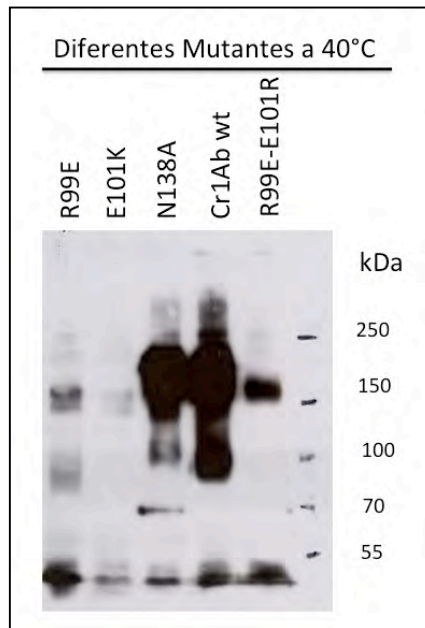


Figura 38. Ensayo tipo Western blot de la oligomerización de las toxinas mutantes de Cry1Ab previamente activadas con tripsina (1:50) incubadas 1h 37°C a pH 10.5 con 20 µg BBMV de *M. sexta* de tercer instar y finalmente calentadas a 40°C durante 5 min.

9. Conclusiones.

De las 7 mutantes simples de la toxina Cry1Ab analizadas, 3 mutantes de la hélice α_3 , 2 mutantes de la hélice α_4 y 2 mutantes hélice α_6 , sólo una mutante de la hélice α_3 perdió por completo la toxicidad, la mutante E101K. Dos mutantes disminuyeron la toxicidad: la mutante de la hélice α_3 (G102A) disminuyó 23 veces y la mutante de la hélice α_4 (N138A) disminuyo 278 veces. Del resto de los residuos que fueron cambiados en las hélices α_4 y α_6 no se observó un fenotipo al ser substituidos por alanina, indicando que estos aminiácidos no tienen un papel importante en en mecanismo de toxicidad de la toxina Cry1Ab.

Por otro lado la doble mutante R99E-E101R recuperó parcialmente la toxicidad hacía las larvas de *M. sexta*, lo que indica la importancia de estos dos aminoácidos en la toxicidad de Cry1Ab. Posiblemente la interacción se deba a la formación de un puente salino entre estos dos cuando se lleva a cabo la formación del oligómero.

Los residuos R99 y E101 son importantes en la oligomerización de Cry1Ab. La pérdida de toxicidad al mutagenizar los residuos R99 y E101, concuerda con el modelo de la estructura trimérica de Cry1Ab realizada por Alfredo Torres, en donde se puede ver que estos dos aminoácidos están interaccionando formando un puente salino, lo que refuerza la hipótesis de que el oligómero pudiera tener una conformación trimérica que posteriormente lleva a la formación del poro y el desbalance osmótico causante de la muerte celular.

La pérdida de toxicidad de las mutantes R99E y E101K correlaciona con la disminución de las estructuras oligoméricas observadas en los ensayos tipo Western blot tanto partiendo de toxina como de protoxina.

Para el caso de la mutante G102A, la disminución de la toxicidad correlaciona con la disminución de las formas oligoméricas partiendo de toxina, sin embargo la forma oligomérica de 250 kDa partiendo de protoxina no se ve disminuida. Esta forma (250 kDa) es más resistente a la temperatura y esto se podría verse reflejado en una interacción más fuerte entre los monómero, y que por lo tanto el papel de esta mutante no sea tan relevante.

Para el caso de la mutante N138A, no se observa disminución en ninguna de las formas oligoméricas. Pudiera ser que la mutación en este aminoácido resulte en la formación de un oligómero no funcional, o que este aminoácido esté involucrado en la permeabilidad del poro más que en la estructuración del oligómero. Esto se tiene que analizar experimentalmente.

Así mismo los resultados de las mutaciones en las diferentes hélices se ajustan bastante bien al modelo de dinámica molecular realizado para la toxina Cry4A (Tavecharoenkool *et al.*, 2010) a excepción de la hélice α_6 . Sin embargo esta hélice es la menos estudiada, y por lo tanto sería interesante hacer un análisis más amplio en esta región, así como de la horquilla que conecta la hélices α_5 con la α_6 .

Por otro lado partiendo de la protoxina de Cry1Ab, en los ensayos de oligomerización en BBMV se observan estructuras de pesos moleculares de 130 a 250 kDa, siendo las últimas las más abundantes y estables. Los oligómeros de 250 kDa son parcialmente resistentes a temperatura. Partiendo de toxina activada con tripsina se observan estructuras de pesos moleculares de 100-200 kDa, las cuales resultaron altamente sensibles a la temperatura. Datos experimentales del laboratorio apuntan a que ambas estructuras son importantes en el mecanismo de acción de las toxinas Cry (Gómez *et al.*, 2013). En este reporte ellos encontraron datos que sugieren que ambos oligómeros (200 kDa y 250 kDa) son importantes en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A. El oligómero que se forma a partir de toxina activada puede jugar un papel más importante en algunos insectos que en otros. El procesamiento de la toxina Cry por las enzimas proteolíticas y la velocidad de conversión de protoxina a toxina le podría permitir a la proteína Cry tener un rango de acción mayor hacia diferentes insectos blanco. Es aun necesario determinar la probabilidad de que la protoxina llegue íntegra al intestino de las larvas, para interactuar con caderina y formar un oligómero funcional, que sea capaz de jugar un papel importante en la toxicidad hacia el organismo blanco .

10. Perspectivas

Uno de los puntos importantes a continuar en este trabajo es realizar ensayos de formación de poro en bicapas planas de las mutantes que fueron afectadas en la toxicidad, así como de la doble mutante. En particular interesa la mutante N138A, la cual perdió toxicidad, pero esta pérdida no se refleja en una disminución en las estructuras oligoméricas observadas utilizando protoxina ó toxina activada en BBMV. Así mismo es importante analizar la sensibilidad a temperatura de los oligómeros formados por las diferentes mutantes, ya que un oligómero más inestable podría correlacionar con una disminución en la toxicidad. También sería importante medir la actividad de formación de poros iónicos de las diferentes mutantes y de la toxina silvestre, a fin de poder elucidar si no existen cambios en actividad de poro que podrían reflejar cambios en la estructuración de los oligómeros.

Para poder determinar la importancia de un posible puente salino R99-E101 en el mecanismo de oligomerización de las toxinas Cry de tres dominios sería atractivo realizar la mutagénesis de los aminoácidos R99E, E101K y R99E-E101R en otras toxinas Cry de tres dominios y observar los respectivos fenotipos en sus organismos blancos.

Así mismo sería muy interesante realizar un estudio más amplio en las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 6$, y hacer uso de técnicas más finas como FRET, que permiten analizar distancias moleculares, para estudiar la interacción de cada una de las hélices, así como la interacción de la toxina con la membrana y los cambios conformacionales que se producen durante la oligomerización.

11. Bibliografía

- Alzate, O., You, T., Claybon, M., Osorio, C., Curtiss, A., & Dean, D. H. (2006). Effects of disulfide bridges in domain I of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa delta-endotoxin on ion-channel formation in biological membranes. *Biochemistry*, 45(45), 13597-13605. doi: 10.1021/bi061474z
- Andrews R.E., B., M.M., Bulla, L.A, Protease activation of entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. . *Appl Environ Microbiol*, 1985. 50: p. 737-742.
- Arenas, I., Bravo, A., Soberon, M., & Gomez, I. (2010). Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem*, 285(17), 12497-12503. doi: 10.1074/jbc.M109.085266
- Aronson, A. (1995). The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. *Appl Environ Microbiol*, 61(11), 4057-4060.
- Aronson, A. I., Geng, C., & Wu, L. (1999). Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl Environ Microbiol*, 65(6), 2503-2507.
- Bechtel, D.B.a.B., L.A., (1976) Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol*. 127: p. 1472-1481
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., & Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol*, 348(2), 363-382. doi: 10.1016/j.jmb.2005.02.013
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., & Lescar, J. (2006). Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J Bacteriol*, 188(9), 3391-3401. doi: 10.1128/JB.188.9.3391-3401.2006
- Bravo, A., Sanchez, J., Kouskoura, T., & Crickmore, N. (2002). N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J Biol Chem*, 277(27), 23985-23987. doi: 10.1074/jbc.C200263200
- Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., . . . Soberon, M. (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(1), 38-46. doi: 10.1016/j.bbame.2004.08.013
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022
- Bravo, A., Likitvivanavog S, Gill SS, Soberón M. (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol.*, 41(7), 423-431. doi: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.

- de Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*, 17(4), 193-199.
- Diabate, A., Baldet, T., Chandre, F., Akoobeto, M., Guiguemde, T. R., Darriet, F., . . . Hougard, J. M. (2002). The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*, 67(6), 617-622.
- EPA, U. E. P. A. (2010). Febrero 2011
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., Pangborn, W., & English, L. (2001). Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 57(Pt 8), 1101-1109.
- Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M. S., & Shai, Y. (1998). The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21), 12289-12294.
- Girard, F., Vachon, V., Prefontaine, G., Marceau, L., Su, Y., Larouche, G., . . . Laprade, R. (2008). Cysteine scanning mutagenesis of alpha4, a putative pore-lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Appl Environ Microbiol*, 74(9), 2565-2572. doi: 10.1128/AEM.00094-08
- Gomez, I., Arenas, I., Benitez, I., Miranda-Rios, J., Becerril, B., Grande, R., . . . Soberon, M. (2006). Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J Biol Chem*, 281(45), 34032-34039. doi: 10.1074/jbc.M604721200
- Gómez I, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Matus V, Gill SS, Soberón M and Bravo A. 2013 *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile-proteins with multiple modes of action: Two distinct pre-pores are involved in toxicity. *Sometido a Biochemical J*.
- Griffiths, J.S., Huffman, D.I., Whitacre, J.L., Barrows, B.D., Marroquin, L.D., Muller, R., Brown, J.R., Hennet, T., Esko, J.D. and Aroian R.V, Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J Biol Chem*, 2003. 278: p. 45594-45602.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol*, 254(3), 447-464.
- Groulx, N., McGuire, H., Laprade, R., Schwartz, J. L., & Blunck, R. (2011). Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa reveals tetramerization. *J Biol Chem*, 286(49), 42274-42282. doi: 10.1074/jbc.M111.296103
- Haitin, Y., Carlson, A. E., & Zagotta, W. N. (2013). The structural mechanism of KCNH-channel regulation by the eag domain. *Nature*, 501(7467), 444-448. doi: 10.1038/nature12487

- Hodgman, T. C., & Ellar, D. J. (1990). Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins determined by compilational analysis. *DNA Seq*, 1(2), 97-106.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S., & Van Mellaert, H. (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(21), 7844-7848.
- Hossain, D.M., et al., Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(8): p. 4604-12.
- Hui, F., Scheib, U., Hu, Y., Sommer, R. J., Aroian, R. V., & Ghosh, P. (2012). Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B. *Biochemistry*, 51(49), 9911-9921. doi: 10.1021/bi301386q
- Ihara, H., & Himeno, M. (2008). Study of the irreversible binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to brush border membrane vesicles from *Bombyx mori* midgut. *J Invertebr Pathol*, 98(2), 177-183. doi: 10.1016/j.jip.2008.02.007
- Jimenez-Juarez, N., Munoz-Garay, C., Gomez, I., Saab-Rincon, G., Damian-Almazo, J. Y., Gill, S. S., . . . Bravo, A. (2007). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem*, 282(29), 21222-21229. doi: 10.1074/jbc.M701314200
- Jurat-Fuentes, J.L. and Adang, M.J., Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem*, 2004. 271(15): p. 3127-35.
- Kumar, A. S., & Aronson, A. I. (1999). Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *J Bacteriol*, 181(19), 6103-6107.
- Li, J. D., Carroll, J., & Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353(6347), 815-821. doi: 10.1038/353815a0
- Liang, Y., Patel, S. S., & Dean, D. H. (1995). Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J Biol Chem*, 270(42), 24719-24724.
- Masson, L., Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Brousseau, R., & Schwartz, J. L. (1999). Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J Biol Chem*, 274(45), 31996-32000.
- Milne, R., Kaplan, H., 1993, Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol*, 1993. 23: p. 663- 673.

- Morse, R. J., Yamamoto, T., & Stroud, R. M. (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*, 9(5), 409-417.
- Munoz-Garay, C., Portugal, L., Pardo-Lopez, L., Jimenez-Juarez, N., Arenas, I., Gomez, I., . . . Bravo, A. (2009). Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects. *Biochim Biophys Acta*, 1788(10), 2229-2237. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.06.014
- Obata, F., Kitami, M., Inoue, Y., Atsumi, S., Yoshizawa, Y., & Sato, R. (2009). Analysis of the region for receptor binding and triggering of oligomerization on Bacillus thuringiensis Cry1Aa toxin. *FEBS J*, 276(20), 5949-5959. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07275.x
- Oppert, B., Kramer, K. J., Johnson, D. E., MacIntosh, S. C., & McGaughey, W. H. (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a Bacillus thuringiensis resistant strain of Plodia interpunctella. *Biochem Biophys Res Commun*, 198(3), 940-947. doi: 10.1006/bbrc.1994.1134
- Ounjai, P., Unger, V. M., Sigworth, F. J., & Angsuthanasombat, C. (2007). Two conformational states of the membrane-associated Bacillus thuringiensis Cry4Ba delta-endotoxin complex revealed by electron crystallography: implications for toxin-pore formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 361(4), 890-895. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.086
- Pacheco, S., Gomez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodriguez-Almazan, C., Gill, S. S., . . . Soberon, M. (2009). Domain II loop 3 of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with Manduca sexta aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J Biol Chem*, 284(47), 32750-32757. doi: 10.1074/jbc.M109.024968
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(2), 255-281. doi: 10.1128/MMBR.00034-06
- Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S. and Ravel, J. (2005) Genomics of the Bacillus cereus group of organisms. *FEMS Microbiol Rev*. 29: p. 303-329.
- Rodriguez-Almazan, C., Zavala, L. E., Munoz-Garay, C., Jimenez-Juarez, N., Pacheco, S., Masson, L., . . . Bravo, A. (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
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T., and Christou, P. (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* 9: 283–300.
- Schnepf, E., et al.,(1998) Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. 62(3): p. 775-806.
- Tabashnik B. E., Huang F., Ghimire M. N., Leonard BR., Siegfried B. D., Rangasamy M.,. Yang, Y., Wu Y., Gahan L. J., Heckel D. G., Bravo A., Soberón M. 2011. Efficacy of

Genetically Modified Bt Toxins Against Insects with Different Mechanisms of Resistance. **Nature Biotechnol.** 29:1128-1131

- Tanaka, S., Miyamoto, K., Noda, H., Jurat-Fuentes, J. L., Yoshizawa, Y., Endo, H., & Sato, R. (2013). The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS J*, 280(8), 1782-1794. doi: 10.1111/febs.12200
- Taveecharoenkool, T., Angsuthanasombat, C., & Kanchanawarin, C. (2010). Combined molecular dynamics and continuum solvent studies of the pre-pore Cry4Aa trimer suggest its stability in solution and how it may form pore. *PMC Biophys*, 3(1), 10. doi: 10.1186/1757-5036-3-10
- Terra, W., Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109(1), 1-64 doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4
- Tigue, N. J., Jacoby, J., & Ellar, D. J. (2001). The alpha-helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol*, 67(12), 5715-5720. doi: 10.1128/AEM.67.12.5715-5720.2001
- Upadhyay, S. K., & Singh, P. K. (2011). Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnol Lett*, 33(10), 2027-2036. doi: 10.1007/s10529-011-0665-x
- Vachon, V., Prefontaine, G., Coux, F., Rang, C., Marceau, L., Masson, L., . . . Laprade, R. (2002). Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry*, 41(19), 6178-6184.
- Vachon, V., Prefontaine, G., Rang, C., Coux, F., Juteau, M., Schwartz, J. L., . . . Masson, L. (2004). Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl Environ Microbiol*, 70(10), 6123-6130. doi: 10.1128/AEM.70.10.6123-6130.2004
- Valaitis, A.P., et al., 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 Insect Biochem Physiol*, 2001. 46(4): p. 186-200.
- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D., & Van Mellaert, H. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur J Biochem*, 186(1-2), 239-247.
- Warren G.W. (1997), Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, In: Carozzi N.B., Koziel M., (eds.), *Advances in insect control, the role of transgenic plants*, Taylors & Francis Ltd., London, pp.109-121
- Wolfersberger, M. G. (1990). The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia*, 46(5), 475-477.

- Zhang, L., Huang, E., Lin, J., Gelbic, I., Zhang, Q., Guan, Y., . . . Guan, X. (2010). A novel mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain LLP29 isolated from the phylloplane of *Magnolia denudata*. *Microbiol Res*, 165(2), 133-141. doi: 10.1016/j.micres.2009.03.002

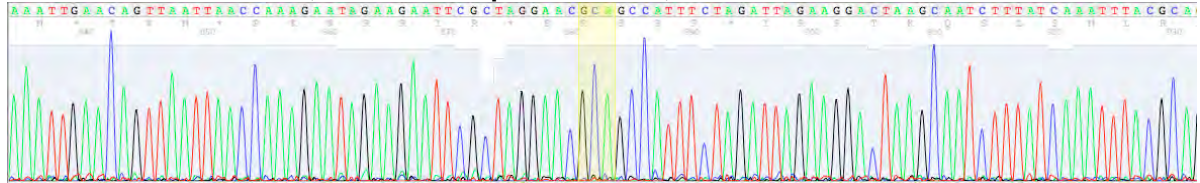
ANEXOS

**ANEXO I. Espectrograma de las secuencias de cada una de las
mutantes producidas en este trabajo enCry1Ab**

Secuencias de las mutantes:

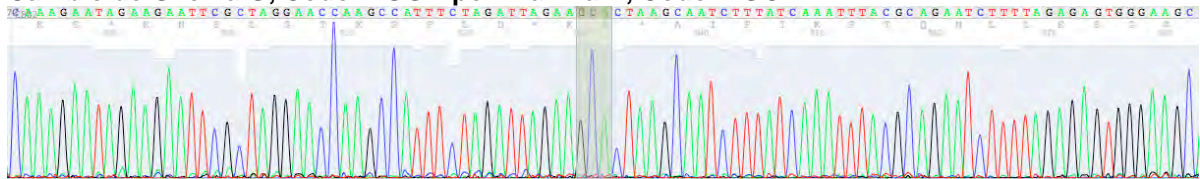
Q95A

Cambio de Glutamina Q, Codón: CAA por Alanina A, Codón: GCA



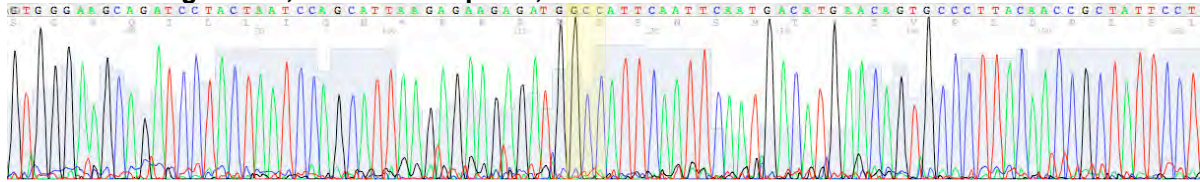
G102A

Cambio de Glicina G, Codón: GGA por Alanina A, Codón: GCA



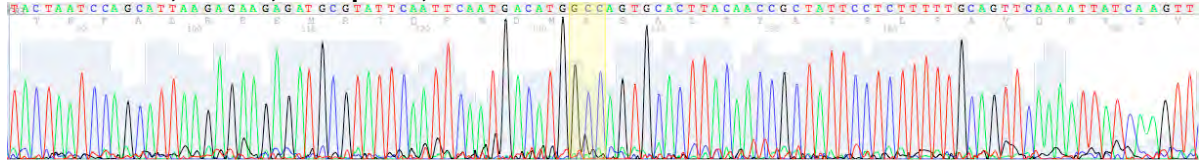
R131A

Cambio de Arginina R, Codón: CGT por A, Codón: GCC



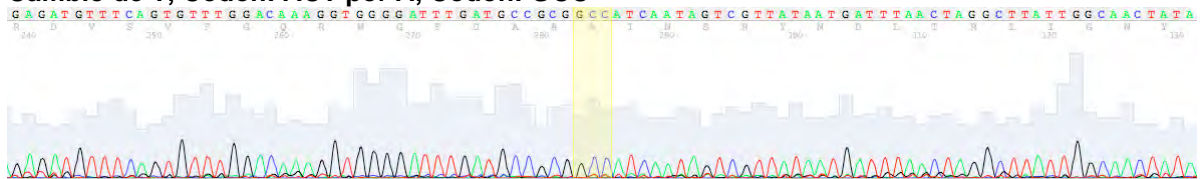
N138A

Cambio de N, Codón; AAC por A, codón GCC



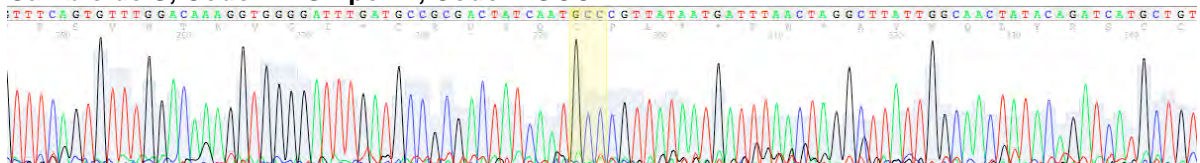
T188A

Cambio de T, Codón: ACT por A, Codón: GCC



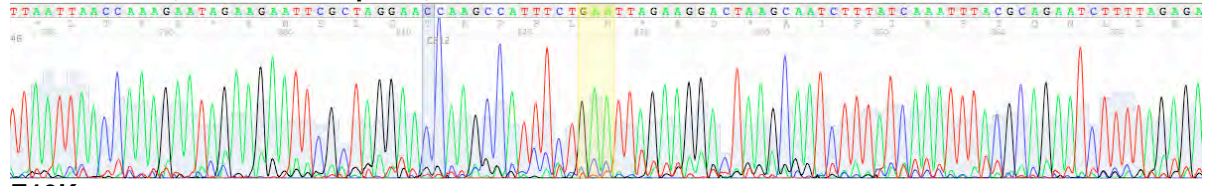
S191A

Cambio de S, Codón: AGT por A, Codón: GCC



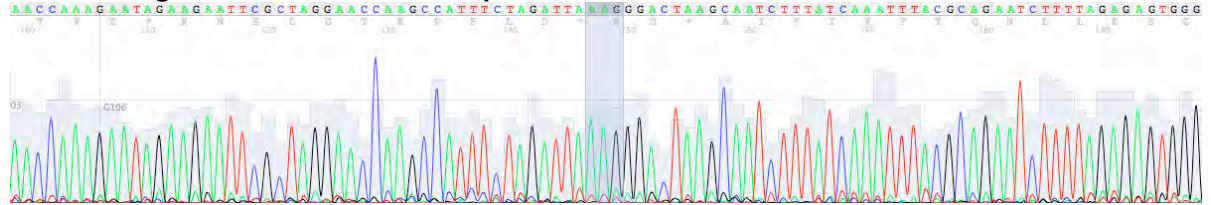
R99E

Cambió de R, Codón: AGA por E, Codón: GAA



E10K

Cambio de glutámico E, codón: GAA por K, codón: AAG



R99E-E101K

Cambio de Arginina R, codón: AGA por E codón: GAA y E codón: GAA por R codón: CGC

