



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SELECCION DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS  
(sc Fv) CAPACES DE UNIRSE A LA  $\delta$ -ENDOTOXINA  
Cry 1 Ab DE *Bacillus thuringiensis* MEDIANTE  
PHAGE DISPLAY

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

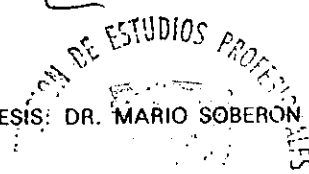
B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARTIN PERALTA GIL



DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO SOBERON CHAVEZ.



1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

26 8331



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Selección de fragmentos de anticuerpos (scFv) capaces de unirse a la  $\delta$ -endotoxina CryIAb de Bacillus thuringiensis mediante phage display

realizado por Martin Peralta Gil

con número de cuenta 8426753-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Mario Soberón Chavez

*Mario Soberón*

Propietario

Dr. Karen Manoutcharian Airapetian

*Karen*

Propietario

Dra. Patricia Ramos Morales

Suplente

M. en C. Rosa Elena Sarmiento Silva

FACULTAD DE CIENCIAS

Suplente

Biólogo David Garciadiego Cázares

U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*Edna María Suárez Díaz*

Dra. Edna María Suárez Díaz DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA



**A la memoria de mi padre:  
Salvador Peralta Balderas.**

**A mi madre: María de la Luz  
Gil Lica, por su gran apoyo  
y cariño.**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Patricia Ramos Morales, al Dr. Karen Manoutcharian Airapetian, a la M. en C. Rosa Elena Sarmiento Silva, al Biól. David Garcíadiago Cázares y por supuesto al Dr. Mario Soberón Chávez, por sus comentarios y sugerencias para el mejoramiento de la misma.

Quiero agradecer profundamente al Dr. Mario Soberón Chávez y a la Dra. Alejandra Bravo de la Parra, por lo que me han enseñado, por su atención y su paciencia.

A toda mi familia por sus consejos, cariño y comprensión.

A mis amigos que siempre me han tomado en cuenta.

A Eligio Linares y su familia por hacerme participe de ellos.

A mi hija Annett Marianne por llenarme tanto de ilusión.

A mi hermana Juanita por su gran apoyo.

El presente trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Alejandra Bravo de la Parra y el Dr. Mario Soberón Chávez, en el Departamento de Biología Molecular de Plantas, del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
-endotoxinas (Cry).....	2
Modo de acción de las toxinas Cry.....	3
estructura terciaria.....	3
Epitopos conservados.....	6
Expresión de polipéptidos en fagos filamentosos (phage display).....	8
Ciclo de infección del fago M13.....	10
Fago M13.....	10
Fago M13 como vector.....	12
Fagémido pHEN1.....	12
Inserción genética con las proteínas III y VIII del fago M13.....	14
Técnica de Phage display.....	15
Aplicaciones.....	15
Construcción de la biblioteca sintética de fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv).....	18
estructura de los anticuerpos.....	18
Construcción de la biblioteca.....	18
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	22
Reactivos.....	22
-endotoxina Cry1Ab (antígeno).....	22
Biblioteca.....	23
Preparación: solubilización y tripsinación de la -endotoxina Cry1Ab.....	23
Recuento de los controles (anti-MBP y pHEN1).....	24
Reparación de partículas del fago ayudador VCS-M13.....	25
.- Crecimiento de la biblioteca.....	25
.- Preparación de partículas del fagémido (pHEN1).....	26
.- Obtención de fagos mediante rondas de selección.....	26
.- ELISA policlonal.....	27
.- ELISA monoclonal de fagos aislados.....	27
.- Almacenamiento de una fuente secundaria a partir de la biblioteca original.....	28

RESULTADOS.....	29
Implementación de la técnica de phage display.....	29
Purificación del antígeno Cry1Ab.....	31
Purificación de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1D y Cry11B.....	31
Aislamiento de fagos mediante phage display, que sean capaces de reconocer al antígeno Cry1Ab.....	33
Estudio por medio de ELISA de los fagos seleccionados.....	36
ELISA policlonal.....	36
ELISA monoclonal.....	38
Variabilidad de los fagos que reconocen a la proteína Cry1Ab....	40
DISCUSION.....	42
CONCLUSIONES.....	44
PERSPECTIVAS.....	45
APENDICE.....	47
Medios de cultivo.....	47
Soluciones.....	48
Geles.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	50



## RESUMEN

Los cristales producidos por *Bacillus thuringiensis* se encuentran conformados por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas que exhiben actividad tóxica contra las larvas de insectos plaga en cultivos agrícolas importantes. Al ser ingeridos los cristales por las larvas, estos son procesados en el intestino medio del organismo hasta producir la forma tóxica de la proteína, que se une al receptor localizado en las microvellocidades de las células columnares del intestino medio. En este sentido han sido pocos los receptores identificados para este tipo de proteínas, por tal razón no se tiene un completo conocimiento de cómo puede ser la interacción toxina receptor y cuáles son los posibles sitios dentro del receptor que interactúen con las toxinas.

El interés por conocer más acerca de este mecanismo de interacción ha llevado al planteamiento de este proyecto para aislar fragmentos de anticuerpos (scFv) que interactúen específicamente con la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ab de una forma análoga a su receptor natural. Dichos fragmentos o polipéptidos se encuentran expresados como proteínas híbridas (scFv-pIII) en la superficie del fago filamentoso M13.

Por esta razón se ha implementado la técnica del phage display, logrando la amplificación de fagos específicos contra la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ab durante ocho rondas de selección, partiendo de una biblioteca de fragmentos scFv expresada en fagos filamentosos del tipo M13, la cual cuenta con una viabilidad de  $1 \times 10^8$  clonas. Ensayos realizados de ELISA policlonal y ELISA monoclonal demuestran el enriquecimiento de los fagos específicos contra el antígeno utilizado. El reconocimiento de los fagos de la octava ronda se puede encontrar en cualquier región expuesta de sus dominios.

Para identificar la variabilidad existente entre los fagos de la octava ronda, se montaron ensayos de ELISA utilizando 95 clonas contra diferentes antígenos (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1D y Cry11B), la identidad de estas toxinas con respecto a la toxina Cry1Ab corresponde al 89%, 80%, 50% y 15% respectivamente. Estos estudios permiten reconocer al menos cinco tipos diferentes de fagos, presentes en las 95 clonas seleccionadas. De esta manera se pueden aislar fragmentos scFv que estén reconociendo regiones conservadas entre las toxinas o regiones específicas de algún dominio determinado.

## INTRODUCCION

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria entomopatógena formadora de esporas y de cristales paraesporales que se encuentran compuestos por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas. Durante la mayor parte de este siglo ésta ha sido tema de investigación gracias a la actividad tóxica de sus proteínas contra diferentes ordenes de insectos plaga, que afectan cultivos de importancia alimenticia y económica para el ser humano, tales como: maíz, papa, pepino, alfalfa, chícharo, col, uva, tomate, tabaco, algodón, seda, etc.

Las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* hacen de ésta una de las alternativas más viables para ser usada como biopesticida por su fácil manipulación, alta especificidad hacia los insectos blanco, y además por tratarse de un microorganismo cuyo uso como bioinsecticida no representa peligro aparente hacia el medio ambiente. Un uso más amplio de este bioinsecticida requiere de un conocimiento mayor sobre cómo actúan estas toxinas, así como las bases de la especificidad, de tal manera que fenómenos como el espectro de acción y la resistencia puedan ser abordados con inteligencia. Nuestro interés por conocer más acerca del posible mecanismo de interacción entre las  $\delta$ -endotoxinas con su receptor, ha llevado en primera instancia a tratar de implementar la técnica de phage display, la cual permita aislar polipéptidos que se unan a este tipo de toxinas. Se considera que puede ser una manera interesante de conocer, en un futuro, cuales son los sitios de interacción proteína-receptor, con el fin de poder plantear estrategias para su manipulación y optimización.

### $\delta$ -endotoxinas (Cry).

Los cristales de *Bacillus thuringiensis* formados durante la fase estacionaria se encuentran constituidos por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas, tóxicas contra insectos (lepidópteros, dípteros, coleópteros, etc.) y algunos otros organismos, por esta razón se ha utilizado como control biológico de plagas. Las  $\delta$ -endotoxinas se dividen en dos tipos: toxinas Cry y toxinas Cyt que presentan pesos moleculares de 65-138 kDa y 28 kDa respectivamente (Pietrantonio y Gill, 1996).

En cuanto a la clasificación de las toxinas Cry, se han identificado 22 clases, la clase mayoritaria corresponde a las proteínas del tipo Cry1 con 26 holotipos representativos (Crickmore *et al.*, 1995).

## Modo de acción de las toxinas Cry.

Su modo de acción inicia cuando las larvas de los insectos ingieren la mezcla de esporas-cristales, éstas llegan hasta el intestino medio de la larva, donde los cristales son solubilizados para liberar una protoxina (130-138 kDa) que sufre un procesamiento proteolítico. El procesamiento consiste en la degradación de una gran parte de la región carboxilo terminal (500 residuos de aminoácido) y otra menor parte de la región amino terminal (28 residuos de aminoácido), quedando así el fragmento tóxico o la toxina activa con un peso de 55-65 kDa (Rajamohan *et al.*, 1998) (Figura 1).

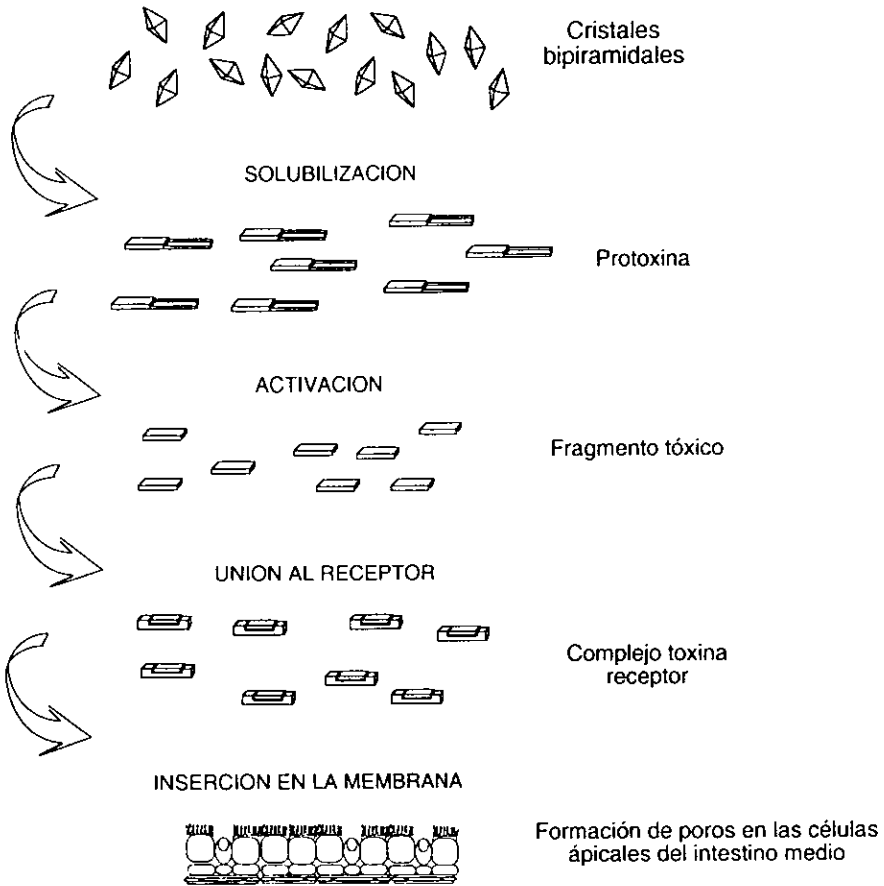
La toxina activada se une a receptores específicos, localizados en las microvelocidades de la células columnares del intestino medio de las larvas de los insectos blanco (Van Rie *et al.*, 1989; 1990; Kyong *et al.*, 1992; Aranda *et al.*, 1996). Se ha sugerido que una vez que la toxina ha tenido contacto con su receptor (complejo toxina-receptor) ésta debe sufrir cambios conformacionales, los cuales le permitirán penetrar en la membrana de una manera irreversible para crear poros no selectivos que ocasionarán la muerte de las larvas (Uemura *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 1993; Knowles *et al.*, 1994; Lorence *et al.*, 1995; Ellar, 1997).

Durante los últimos años se ha obtenido poca información sobre algunos receptores pertenecientes a las toxinas Cry1: para la proteína Cry1Aa y Cry1Ac se ha identificado una aminopeptidasa N (120 kDa) como receptor en *Bombyx mori* y *Manduca sexta* respectivamente (Knight *et al.*, 1994; Gill *et al.*, 1995); en cuanto a la toxina Cry1Ab se ha identificado a una caderina (210 kDa) como receptor en *Manduca sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1995; Keeton y Bulla 1997).

## Estructura terciaria.

En la actualidad se han publicado las estructuras terciarias de dos  $\delta$ -endotoxinas Cry (Cry3A y Cry1Aa) específicas para coleópteros y lepidópteros respectivamente (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995). A pesar de que a nivel de la estructura primaria sólo comparten el 36% de identidad, ambas proteínas presentan estructuras globulares similares conformadas por tres dominios, cada uno con características diferentes (Grochulski *et al.*, 1995) (Figura 2). El dominio I se encuentra conformado por siete  $\alpha$  hélices, diferentes evidencias indican que la  $\alpha$  hélice central ( $\alpha$ -5) participa directamente en la formación del poro (Aronson *et al.*,

## Modo de acción de las $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*



**Figura 1.** Los cristales formados por *Bacillus thuringiensis* producen protoxinas inactivas (165 KDa-170 KDa) al ser solubilizados en el intestino medio de los insectos, la activación y formación del fragmento tóxico se lleva a cabo mediante la acción que ejercen las proteasas del intestino medio sobre la protoxina. El siguiente evento consiste en el reconocimiento de la toxina activa con su receptor, provocando la formación de poros en las células columnares del intestino medio.

## Estructura tridimensional de las $\delta$ -endotoxinas Cry3a y Cry1Aa.

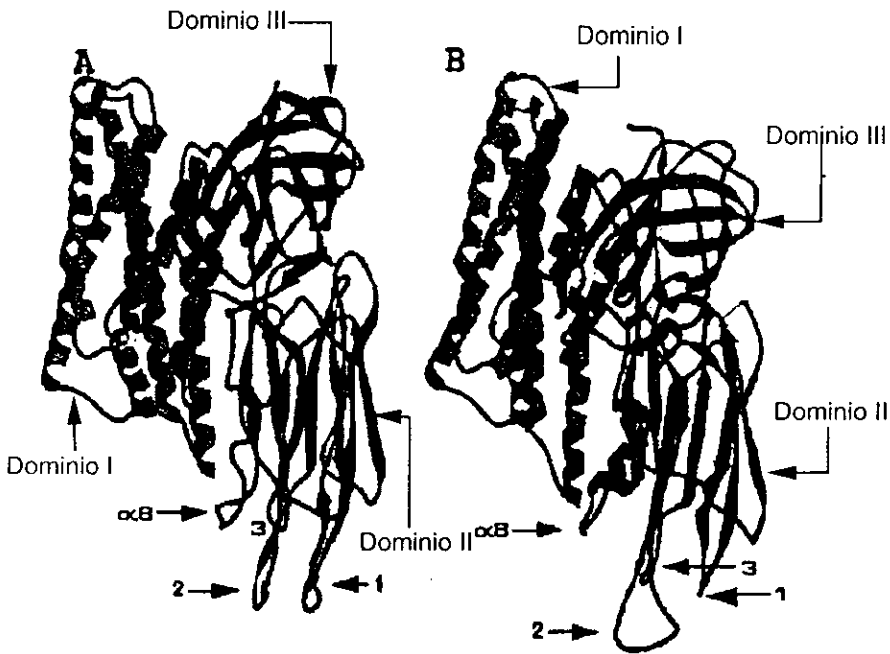


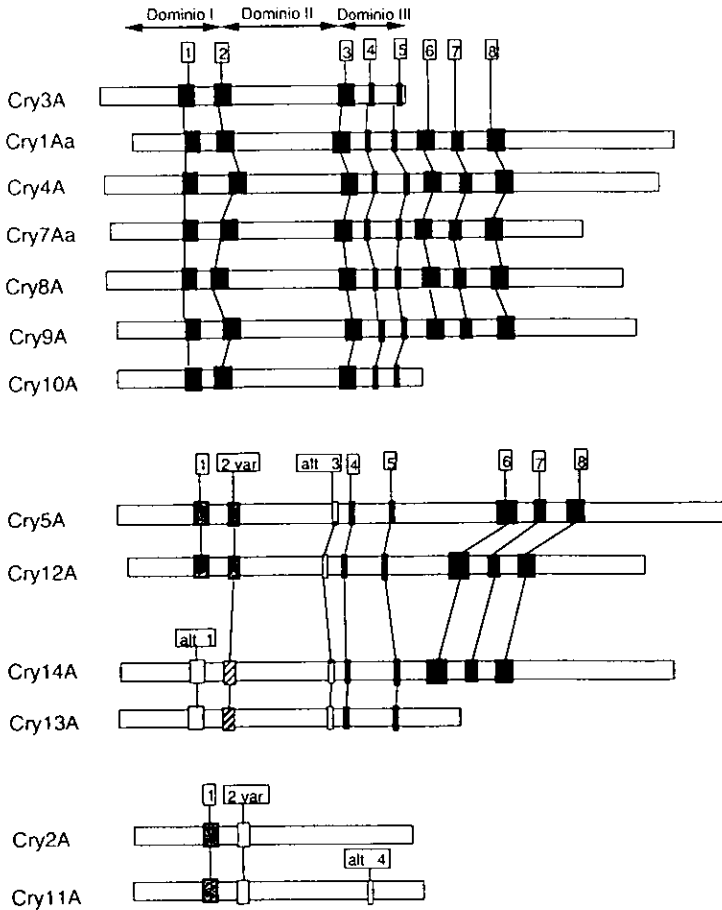
Figura 2. Estructuras tridimensionales en forma de listones de las proteínas Cry3A (A) y Cry1Aa (B) que muestra los tres dominios que las componen. El dominio I se encuentra conformado por seis  $\alpha$ -hélices anipáticas que rodean a la hélice  $\alpha$ -5 (hidrofóbica). El dominio II es el más variable de los tres y está formado por tres láminas  $\beta$ -plegadas antiparalelas que terminan en asas (1, 2, 3 y  $\alpha$ -8). El dominio III tiene una estructura de  $\beta$ -sandwich con una topología típica de doble hélice  $\beta$ .

1995). El dominio II consiste de 3 hojas  $\beta$  anti-paralelas, responsables de la formación de tres asas que intervienen en el reconocimiento de la toxina a su receptor. Al respecto Lu *et al.*, en 1994, construyó mutantes en el asa 2 (A3 ,D3) de la toxina Cry1Aa que muestran pérdida de la toxicidad; Rajamohan *et al.*, en 1996 ha construido mutantes en el asa 2 del dominio II de la toxina Cry1Ab que no se unen a su receptor; Smedley y Ellar en 1996 han desarrollado estudios similares con la toxina Cry1Ac y en ese mismo año Wu y Dean trabajaron con las tres asas del dominio II de la  $\delta$ -endotoxina Cry3A (Rajamohan *et al.*, 1995; 1996a; 1996b; 1996c). El dominio III es un  $\beta$ -sandwich de dos hojas anti-paralelas, posiblemente le confiere estabilidad a la proteína, aunque también existen evidencias de que al cambiar el dominio III a otras toxinas se cambia la especificidad de las mismas, por este motivo pudiera tomar parte en la interacción con el receptor (Kyond *et al.*, 1995; Wolfersberger *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 1996; Maagd *et al.*, 1996).

### **Bloques conservados.**

Alineamientos entre múltiples toxinas Cry, han demostrado que los dominios I y III son los más conservados, siendo el dominio II el más variable de los tres. De estos estudios se concluye que existen cinco regiones conservadas comunes entre estas proteínas, dos de esas regiones se encuentran en el dominio I y tres en el dominio III (Höfte y Whiteley, 1989; Knowles, 1994) (Figura 3). Posteriormente se encontró que existen otras tres regiones conservadas en el extremo carboxilo terminal, el cual es procesado y no forma parte del fragmento tóxico. Con éste tipo de análisis se ha permitido distinguir tres subgrupos de proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 1995). El primer subgrupo está integrado por las clases Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9 y Cry10, estas proteínas se caracterizan por tener los cinco bloques conservados, inicialmente citados. Un segundo subgrupo está formado por las clases Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14, su característica principal es tener regiones homólogas a los bloques típicos 1, 2, 4, y 5. Dentro de estos dos subgrupos se encuentran toxinas de más de 70 kDa , que poseen además los bloques 6, 7, y 8. El tercer subgrupo está integrado por las clases Cry2 y Cry11, estas toxinas poseen el bloque conservado 1 y presentan una variante del bloque 2, pero carecen de los bloques 3, 4, y 5.

## Bloques conservados



**Figura 3. Representación esquemática de los bloques conservados (1-5) presentes en las toxinas de la familia Cry.** Las regiones señaladas como "1 alt" y "3alt" son posibles bloques alternativos 1 y 3. Las regiones marcadas como "2 var" son posibles variantes de ese bloque. El color negro de los bloques indica alta homología, mientras que el gris indica una mayor variabilidad en esa región. Los rectángulos blancos son posibles secuencias alternativas con ligera o sin homología de los bloques canónicos. Los dominios de la toxinas Cry3Aa y Cry1Aa se encuentran representados por flechas en la parte superior de' esquema.

Tomando en cuenta la tendencia de la conservación de los bloques y la similitud en estructuras terciarias entre dos toxinas (Cry1Aa y Cry3a) que afectan organismos diferentes, se puede suponer que las toxinas de cada grupo compartan la misma estructura tridimensional y que el modo de acción sea semejante.

En un estudio más detallado de las  $\delta$ -endotoxinas se demostró, mediante un análisis filogenético entre 42 proteínas pertenecientes a las toxinas Cry, que los dominios I y II de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac se encuentran estrechamente relacionados, no sucediendo lo mismo con el dominio III (Bravo, 1997). A pesar de la gran identidad en las secuencias nucleotídicas entre los dominios I y II (99 % y 98% de identidad respectivamente), estas dos toxinas se unen a receptores diferentes en el intestino medio de *Manduca sexta*, Cry1Ab se une a una caderina, mientras que Cry1Ac, se une a una aminopeptidasa N (Knight *et al.*, 1994; 1995; Vadlamudi *et al.*, 1995) (Figura 4).

### **Expresión de polipéptidos en fagos filamentosos (phage display).**

La expresión de polipéptidos al azar en la superficie de fagos filamentosos (phage display) ha revolucionado el aislamiento de epítopes contra blancos de interés. Originalmente fue denominado "fago fusionado" por George Smith en 1985, mediante la inserción de un fragmento de ADN externo en el amino terminal del gene III del genoma de un fago filamentosos (f1). Por otra parte Huse y colaboradores en el año 1989 clonaron un repertorio de anticuerpos en el fago  $\lambda$ , este sistema les permitió la expresión de  $1 \times 10^6$  clonas; mientras que el phage display les permitía aumentar el número de clonas, desde  $10^7$  hasta  $10^{13}$ . Estos resultados les había permitido aumentar el número de variantes o clonas, superando las obtenidas mediante la tecnología del hibridoma convencional ( $10^3$ - $10^4$ ) (Smith, 1991; 1992).



## Alineamiento de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac

1Ac. domI	TPIDISLSL TQLLSEFVP GAGFVLGLVD IINGIFGPSQ WDAFLVQIEQ	49
1Ab. domI	YTPIDISLSL TQLLSEFVP GAGFVLGLVD IINGIFGPSQ WDAFLVQIEQ	50
Consensus	TPIDISLSL TQLLSEFVP GAGFVLGLVD IINGIFGPSQ WDAFLVQIEQ	50
1Ac. domI	LINQRIEEFA RNQAIRLEG LSNLYQIYAE SFREWEADPT NPALREEMRI	99
1Ab. domI	LINQRIEEFA RNQAIRLEG LSNLYQIYAE SFREWEADPT NPALREEMRI	100
Consensus	LINQRIEEFA RNQAIRLEG LSNLYQIYAE SFREWEADPT NPALREEMRI	100
1Ac. domI	QFNDMNSALT TAIPLFAVQN YQVPLLSVYV QAANLHLSVL RDVSVFGQRW	149
1Ab. domI	QFNDMNSALT TAIPLFAVQN YQVPLLSVYV QAANLHLSVL RDVSVFGQRW	150
Consensus	QFNDMNSALT TAIPLFAVQN YQVPLLSVYV QAANLHLSVL RDVSVFGQRW	150
1Ac. domI	GFDAATINSR YNDLTRLIGN YTD AVRWYN TGLERVWGPD SRDWRYNQF	199
1Ab. domI	GFDAATINSR YNDLTRLIGN YTD AVRWYN TGLERVWGPD SRDWRYNQF	200
Consensus	GFDAATINSR YNDLTRLIGN YTD AVRWYN TGLERVWGPD SRDWRYNQF	200
1Ac. domI	RRELTIVLD IVALFPNYDS	219
1Ab. domI	RRELTIVLD IVALFPNYDS R	221
Consensus	RRELTIVLD IVALFPNYDS	221
1Ab. domII	REIYTNPVLE NFDGSRGSA QGIEG SIRSP HLMDLNSIT IYDADRQEN	50
1Ac. domII	REIYTNPVLE NFDGSRGSA QGIEG SIRSP HLMDLNSIT IYDADRQEN	50
Consensus	REIYTNPVLE NFDGSRGSA QGIEG SIRSP HLMDLNSIT IYDADRQEN	50
1Ab. domII	YVSGHQTMAS PVGFSGPEET FPLYGTMGNA APOORIVAOI GQGVYRTLSS	100
1Ac. domII	YVSGHQTMAS PVGFSGPEET FPLYGTMGNA APOORIVAOI GQGVYRTLSS	100
Consensus	YVSGHQTMAS PVGFSGPEET FPLYGTMGNA APOORIVAOI GQGVYRTLSS	100
1Ab. domII	TLYRRPFNIG INHQQLSVLD GTEFAYGTSS NLPSAVYRKS GTVDSLDEIP	150
1Ac. domII	TLYRRPFNIG INHQQLSVLD GTEFAYGTSS NLPSAVYRKS GTVDSLDEIP	150
Consensus	TLYRRPFNIG INHQQLSVLD GTEFAYGTSS NLPSAVYRKS GTVDSLDEIP	150
1Ab. domII	PQNNNVPPRO GFSHRLSHVS MFRSGFSNSS VSIIRAPMFS WIHRSAEFI	198
1Ac. domII	PQNNNVPPRO GFSHRLSHVS MFRSGFSNSS VSIIRAPMFS WIHRSAEFI	198
Consensus	PQNNNVPPRO GFSHRLSHVS MFRSGFSNSS VSIIRAPMFS WIHRSAEFI	198
1Ac. domIII	NIIASDSITQ IPAVKGNF NG SVISGPG FTGGD VRRN SGNNTQNRG	49
1Ab. domIII	NIISSGIIQD IPLTKSTNLE SGF SVVKGPG FTGGD LRRT SFGDITSLRV	50
Consensus	NIIIS IITQ IPI K L K E V GPG FTGGD R L S E D ... B	50
1Ac. domIII	YEVPTHFPS TSYRVRVR YASVPIHLN VNWGNSSEFS NTPVATATSL	99
1Ab. domIII	NETAPL ---- SYRVRVR YASVPIHLN VNWGNSSEFS NTPVATATSL	95
Consensus	E P S RYRVR R YASVPIHLN VNWGNSSEFS NTPVATATSL	100
1Ac. domIII	DNLQSDDF GYFESANAFT SSLGNI-VGV RNFSGTACVLE DR	139
1Ab. domIII	SNLQSSSEFT VGHITPFNFS NGSSVFTLSA HFNSSGNEVY DR	139
Consensus	NLQSS E ... E ... E ... V DR	144

Figura 4. Alineamiento por dominios de las toxinas Cry1Ac y Cry1Ab. Los receptores para estas dos toxinas corresponden a una aminopeptidasa N (120 KDa) y a una caderina (210 KDa), respectivamente. El dominio I presenta una identidad del 98%, la identidad en el dominio II es del 99%, mientras que el dominio III es de solo un 38%.

## Ciclo de infección del fago M13.

El bacteriófago M13 pertenece a la clase de fagos filamentosos denominados Ff, la cual incluye a las cepas f1, fd, y M13. El ciclo inicia con el reconocimiento del fago mediante el amino terminal de la proteína III al pili (factor F') de la bacteria macho F<sup>+</sup> (*E. coli*), mientras que el ADN de cadena sencilla (cadena +) penetra a la célula (Gramatikoff *et al.*, 1994; Malmberg, *et al.*, 1997) (Figura 5). La replicación del ADN del fago ocurre en tres fases principales, en todas ellas participa la región intergénica (IG). En la primera, la ARN polimerasa y la maquinaria de síntesis del ADN del hospedero interactúan con la cadena más (+) para crear una cadena doble de ADN o forma replicativa (RF), al sintetizar la cadena menos (-). Esta molécula inicial de doble cadena sirve como templado para la transcripción y síntesis de las diez proteínas del fago (pI-pX). Después de producirse múltiples moléculas RF el siguiente evento consiste en la unión de la proteína V a las cadenas + (complejo pV/csADN), de esta forma el complejo no puede ser utilizado como templado para la síntesis de la cadena menos. Posteriormente este complejo es empaquetado para la formación de un virión que posteriormente será liberado sin lisis a la célula (Model y Russell, 1988).

## Fago M13

El virión se encuentra constituido por una cápside que encierra una cadena sencilla de ADN circular (cadena +) de 6407 pares de bases. Su genoma codifica 10 proteínas, de las cuales cinco son proteínas estructurales del virión (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX), tres se requieren para la síntesis del ADN (pII, pV y pX) y dos interactúan en las funciones de ensamble (pI y pIV) (Fig 5). La región intergénica (IG) no contiene secuencias codificantes pero contiene secuencias importantes para que se lleve a cabo la síntesis de ADN (origen + y origen -), la iniciación de la formación de la cápside y la terminación de la síntesis de ARN.

La cápside del fago se encuentra conformada aproximadamente por 2710 copias de la proteína VIII. En uno de los extremos del virión se encuentran cinco copias de cada una de las proteínas minoritarias pVI y pIII, ésta última es la responsable del reconocimiento del F' pili en *E. coli* para iniciar la infección (Gramatikoff *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1981). En el otro extremo del fago se encuentran las proteínas minoritarias pVII y pIX, esta parte del virión es la última en penetrar a la célula durante la infección y la primera en emerger durante la morfogénesis.



### Fago M13 como vector.

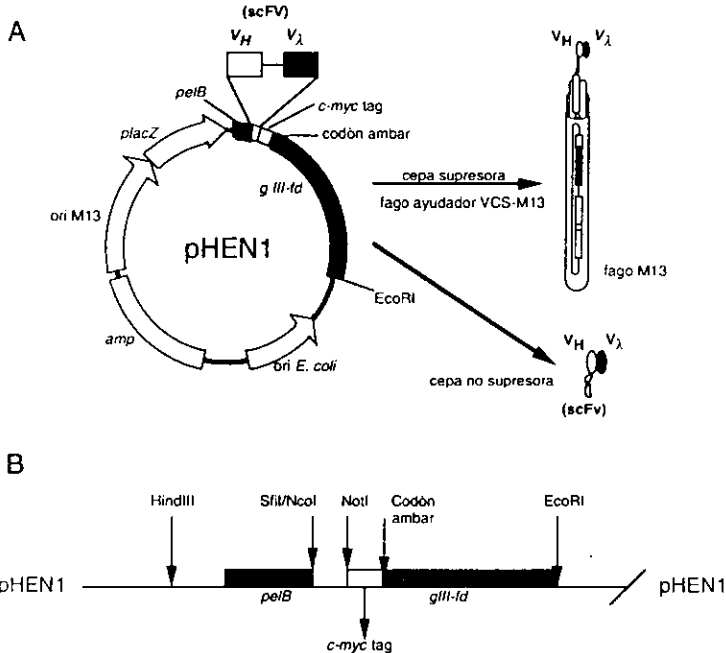
- El fago filamentoso M13 es en general un vector atractivo para la expresión de péptidos en su superficie, debido a que cuenta con características interesantes, tales como:
- Una estructura bien conocida.
- El procesamiento de las proteínas de su cápside es bien entendido.
- Su genoma es pequeño y expandible.
- Se conoce su secuencia genómica.
- El virión es físicamente resistente al calor, frío, urea, pH bajo y salinidad alta.
- Es fácil de secuenciar.
- Permite la clonación de casetes de resistencia.
- Es sencillo de cultivar y almacenar.
- Produce de 100-1000 viriones M13 por célula.
- No lisa las células, es fácil de cosechar y concentrar.
- Se pueden insertar genes extra dentro de su genoma y permanecer de una manera estable.

Todas las características anteriores han hecho posible la expresión de proteínas, dominios de proteínas y péptidos en la superficie del fago M13, iniciándose con la clonación del gene externo (polipéptido) en el extremo 5' del gen III, de esta manera la fusión le permite al fago exponer la proteína híbrida en el exterior de su cápside (Smith, 1985; Kruif *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1996; Wirsching *et al.*, 1997) .

### Fagémido pHEN1.

El fagémido pHEN1 (4522 pb) es un vector que cuenta con dos orígenes de replicación, provenientes del fago M13 y *Escherichia coli*, se construyó a partir del plásmido pUC119 (Hoogenboom *et al.*, 1991). Este vector permite la clonación de polipéptidos y su expresión en la cápside del fago filamentoso M13 en forma de una proteína híbrida (péptido-pIII) siempre y cuando el hospedero sea una cepa de *Escherichia coli* supresora (TG1). El proceso se puede llevar a cabo gracias a que la cepa TG1 reconoce el codón ámbar (situado entre el gene externo y el gene de la pIII) como si fuera el codón que codifica a una glicina; en el caso de una cepa no supresora de *Escherichia coli* (HB2151) los péptidos son secretados en su forma soluble ya que el codón de paro sí es respetado y por lo tanto el péptido clonado es liberado (Figura 6).

## Fagémido ρHEN1



**Figura 6. Despliegue de péptidos (scFv) en la proteína III (pIII) utilizando un fagémido como vector. (A)** Para el despliegue en el gen III (*gIII-fd*), los fagémidos como el  $\rho$ HEN1 dan como resultado de 0-3 copias de la fusión péptido-pIII. Los fragmentos de anticuerpo están representados por un óvalo blanco (región variable de la cadena pesada) y un óvalo negro (región variable de la cadena ligera  $\lambda$ ); los genes se encuentran representados por un rectángulo oscuro (cadena pesada  $V_H$ ) y un rectángulo claro (cadena ligera  $V_\lambda$ ). **(B)** Representación esquemática de un fragmento del fagémido  $\rho$ HEN1, donde se presentan los sitios de restricción usados comúnmente (SfiI/NcoI y NotI) para la clonación de péptidos (scFv); también se encuentran los genes importantes para que pueda ser expresada la proteína híbrida scFv-pIII: *gIII-fd*, *genIII* del fago filamentososo fd; *placZ*, promotor lacZ; *amp*, gen de resistencia a ampicilina; *peIB*, secuencia líder *c-myc* tag, gen que codifica para el péptido myc reconocido por el anticuerpo monoclonal 9E10;  $V_H$ , región variable de la cadena pesada;  $V_\lambda$ , región variable de la cadena ligera  $\lambda$ .

Entre sus características importantes se encuentran: un casete de resistencia a ampicilina (amp), un promotor Lac Z (*PlacZ*), una secuencia líder (*peIB*) que se encarga de dirigir a la proteína hacia el espacio periplásmico. Los sitios de restricción Sfil o Ncol, y NotI, son usados para clonar el repertorio génico de los péptidos (Armstrong *et al.*, 1996).

Se replica como doble cadena cuando se encuentra en *Escherichia coli* y cuando se adiciona un fago ayudador (VSC-M13) es encapsulado en una partícula viral debido a que la proteína II del fago ayudador reconoce el sitio de replicación para fago M13 (*oriM13*), de esta forma el proceso termina en el encapsulamiento del material genético en su forma de cadena sencilla.

### Fusión genética con las proteínas III y VIII del fago M13.

Cuando se fusionan polipéptidos a la proteína III del fago M13, solamente se expresan de 1 a 3 copias de la proteína híbrida (polipéptido-pIII) por fago. Esto se debe a que este tipo de vectores (fagémidos) no cuentan con el material genético suficiente como para desarrollar un fago completo, por ello se requiere de una infección con el fago ayudador VCS-M13 (Marks, 1991; Jupin y Gronembom, 1995). La proteína III del fago ayudador compete con la proteína híbrida del fagémido en la incorporación de las partículas del virión; otra de las opciones que se han tomado para aumentar la expresión de las proteínas fusionadas, es utilizar un fago ayudador deficiente o mutado en el gen III (*g3p*) (Mazari *et al.*, 1997). McCafferty y colaboradores en el año 1990, demostraron la fusión de un fragmento de anticuerpo (scFv) anti-lisozima con la proteína III, esta fusión scFv-pIII permitía la unión del fago con la lisozima.

Para fusiones con la proteína VIII, en fagos o fagémidos, la expresión de más copias pertenecientes a las proteínas híbridas se hace presente, por encima de 24 moléculas por fago (Garrard y Zhukousky, 1992). El resultado de la expresión multivalente (péptido-pVIII) en el fago puede proporcionar gran capacidad de unión, y teóricamente puede ayudar a retener fagos con baja afinidad, la discriminación entre fagos con diferentes afinidades puede ser más difícil en expresiones multivalentes (Wells y Lowman, 1992). Por esta razón los fragmentos aislados a partir del repertorio de genes expresados en fusiones con la proteína VIII cuentan con constantes de afinidad muy bajas y especificidades pobres contra los antígenos.

## Técnica de Phage display.

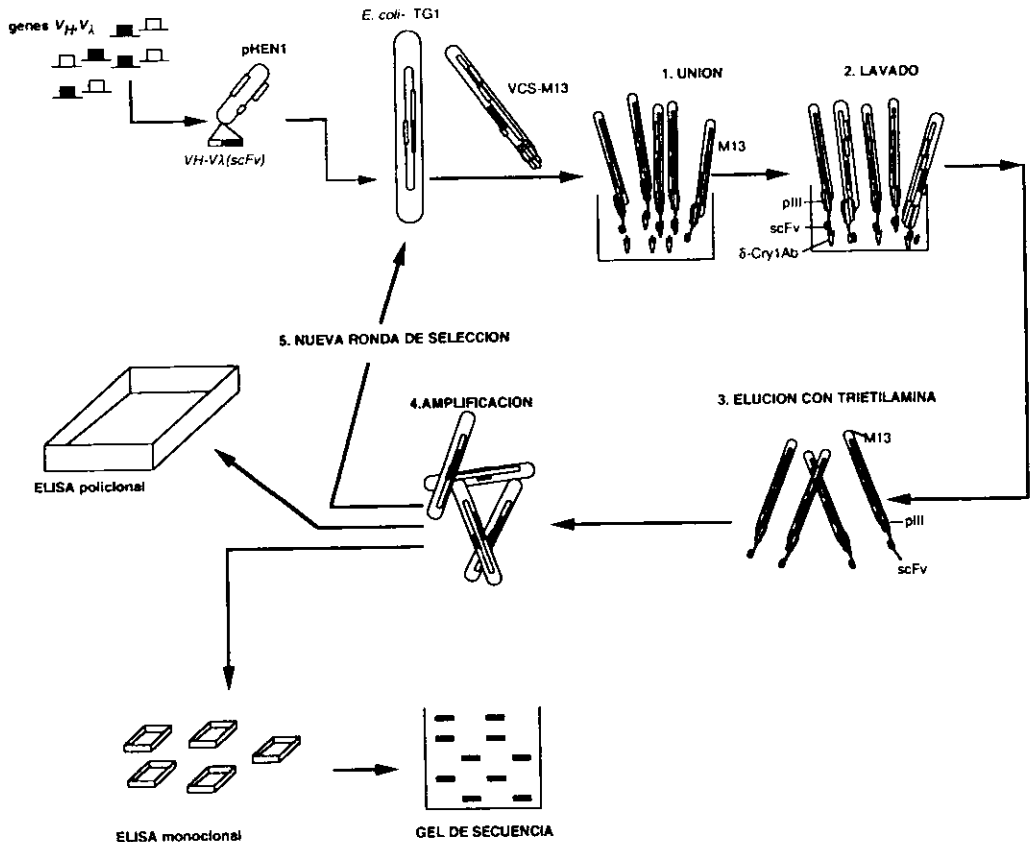
Los polipéptidos expresados en la superficie de fagos filamentosos, específicos para un cierto antígeno, pueden ser separados de aquellos fagos que no se unan por afinidad a una columna (inmuntubo) (Figura 7). Las mezclas de fagos que expresan diferentes afinidades antigénicas, pueden ser seleccionadas mediante el uso de un antígeno específico acoplado a la columna (paso 1 de la figura 7), los fagos que no se unen pueden ser eliminados mediante lavados (paso 2), mientras que los que si se unieron pueden ser eluidos con el tratamiento de un ácido o un álcali (paso 3). La capacidad de unión de los fagos unidos a una columna sólida cubierta con el antígeno depende de la afinidad de cada molécula. La amplificación de los fagos seleccionados se puede lograr infectando bacterias de *Escherichia coli* (paso 4), de esta manera, los fagos se pueden emplear para una nueva ronda de selección. Cuando el enriquecimiento es bajo, pueden producirse múltiples rondas de selección para el aislamiento de fagos específicos que cuentan con la secuencia de ADN que codifica la proteína híbrida (paso 5) (Thompson *et al.*, 1996; Hoogenboom, 1997).

El análisis de la unión se simplifica por la inserción de un codón ámbar entre el gene externo y el gene III (Figura 6). Por esta vía se pueden obtener péptidos solubles cuando se utiliza una cepa no supresora (HB2151) o se pueden obtener los fagos que expresan a la proteína híbrida al utilizar una cepa supresora de *Escherichia coli* (TG1).

## Aplicaciones.

Múltiples aplicaciones se han podido determinar utilizando el despliegue de péptidos en fagos. Por ejemplo, Mazari en 1997 expresó en fagos filamentosos la toxina Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis*, así como el dominio II y algunos fragmentos más de la misma proteína. Las proteínas híbridas que presentaron un plegamiento correcto pudieron ser aisladas por su capacidad para unirse a un antígeno de una manera natural, ya que estas características de unión pueden ser alteradas por el nivel de expresión y estabilidad de la proteína desplegada. En 1998 Kasman y colaboradores expresaron la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en dos vectores para el phage display, el primero es un fagémido que puede ser empaquetado en un fago f1 y el segundo se trata de un fago fUSE5. McCafferty, Bass y Barbas han realizado trabajos similares con proteínas diferentes (Bass *et al.*, 1990; McCafferty *et al.*, 1990; Barbas III *et al.*, 1993 ).

## Phage display



**Figura 7. Phage display:** es una técnica que puede ser utilizada para la obtención de péptidos (scFv) específicos contra un antígeno determinado, los cuales son expresados en fagos filamentosos del tipo M13, a partir de una biblioteca ( $> 10^8$  clonas diferentes) clonada en el fagémido pHEN1-V $\lambda$ 3 y expresada en la cepa TG1 de *Escherichia coli*. El fago ayudador VCS-M13 es importante para el rescate de las partículas de fago M13, el primer paso (1) consiste en exponer a los fagos rescatados sobre una columna (inmuntubo) que contiene el antígeno de interés  $\delta$ -endotoxina Cry1Ab. Las partículas de fagos que no se unan a la toxina, serán eliminados mediante lavados (2), obteniendo de esta forma solamente los fagos afines a la toxina. 3) La trietilamina es un compuesto con un pH extremadamente básico que permite eluir los fagos que se unieron al antígeno, 4) con los fagos eluidos se transfectan células de *E. coli* para su consecuente amplificación, el objetivo principal con este paso es amplificar los fagos que tengan más afinidad por el antígeno y eliminar de esta manera los menos afines siguiendo otra ronda de selección (5). Durante el punto número 4 (amplificación) los fagémidos correspondientes a cada ronda de selección pueden ser analizados mediante el ensayo de ELISA policlonal y ELISA monoclonal, los fagémidos seleccionados mediante este ensayo serán sometidos a un análisis de secuencia.



En otras investigaciones se han aislado péptidos específicos contra los vasos de tumores cancerosos, a dichos péptidos se les pudo acoplar drogas anticancerígenas (desoxirrubicina) con el fin de utilizarlas como tratamiento terapéutico (Pasqualini y Ruoslahti, 1996; Arap *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 1998). Otras bibliotecas han sido expresadas en fagos para identificar polipéptidos contra células completas (Palmer *et al.*, 1997), receptores purificados (Clark *et al.*, 1997), o anticuerpos neutralizadores de ligandos, mismos que son utilizados como agentes para tratamiento de enfermedades incluyendo el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA-virus VIH-1) (Srikantan *et al.*, 1994; Zhong *et al.*, 1994). También se han seleccionado péptidos capaces de tener actividad catalítica de  $\beta$ -lactamasa (Soumillion *et al.*, 1994).

La expresión de cadenas de anticuerpos (scFv y Fab) puede ser la aplicación más revolucionaria de la tecnología de tal manera que se pueden obtener directamente secuencias de anticuerpos contra antígenos muy diversos (McCafferty, 1990; Clackson *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1991; 1992; 1993; Barbas III *et al.*, 1993; Griffiths *et al.*, 1993; 1994).

Los ligandos identificados de esta forma pueden interactuar de manera natural con el(los) sitio(s) de unión en la molécula blanco (antígeno), esta característica ha proporcionado el estudio de la interacción proteína-proteína en una variedad de contextos (Hawkins *et al.*, 1992; Barbas III *et al.*, 1994; Amersdorfer *et al.*, 1997). El incremento de las afinidades de los ligandos ha sido posible gracias a las bibliotecas creadas con mutaciones al azar, o por la mutagénesis directa en regiones específicas de los péptidos (Yang *et al.*, 1995; Vaughan *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1996; Chowdhury *et al.*, 1998).

## Construcción de la biblioteca sintética de fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv).

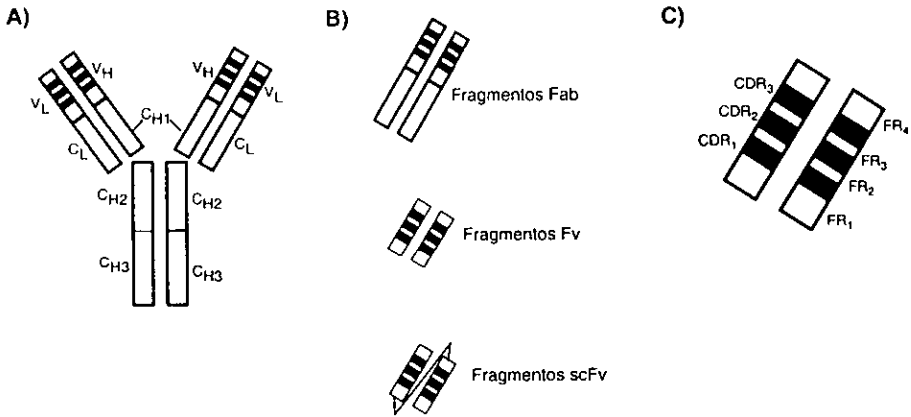
### Estructura de los anticuerpos.

Un anticuerpo se encuentra compuesto por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena ligera (L) está compuesta de un dominio variable N-terminal ( $V_L$ ) y un dominio constante ( $C_L$ ), el dominio variable puede ser de dos tipos:  $V_{\kappa}$  o  $V_{\lambda}$ . Cada cadena pesada (H) se constituye de un dominio variable N-terminal ( $V_H$ ), tres dominios constantes ( $C_{H1-3}$ ) y una región bisagra (Figura 8). Los dominios variables ( $V_H$ ,  $V_L$ ) consisten de cuatro regiones con secuencias relativamente conservadas llamadas regiones estructurales ( $FR_1$ ,  $FR_2$ ,  $FR_3$  y  $FR_4$ ), las cuales separan tres regiones con secuencias hipervariables denominadas regiones determinantes de complementaridad ( $CDR_{1-3}$ ), ver figura 9. Los CDR están representadas por asas que contienen muchos de los residuos de unión a los antígenos. El fragmento más pequeño de unión a un antígeno es el fragmento variable (Fv), el cual consiste de las dos regiones variables de los dominios ligeros y pesados ( $V_L$ ,  $V_H$ ), la unión de dos fragmentos Fv mediante un péptido de enlace dan origen a un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) (Figura 8). El fragmento Fab consiste de los dominios  $V_H$ - $C_{H1}$  y  $V_L$ - $C_L$  unidos covalentemente por un enlace disulfuro (Winter y Milstein, 1991; Chester y Hawkins 1995).

### Construcción de la biblioteca.

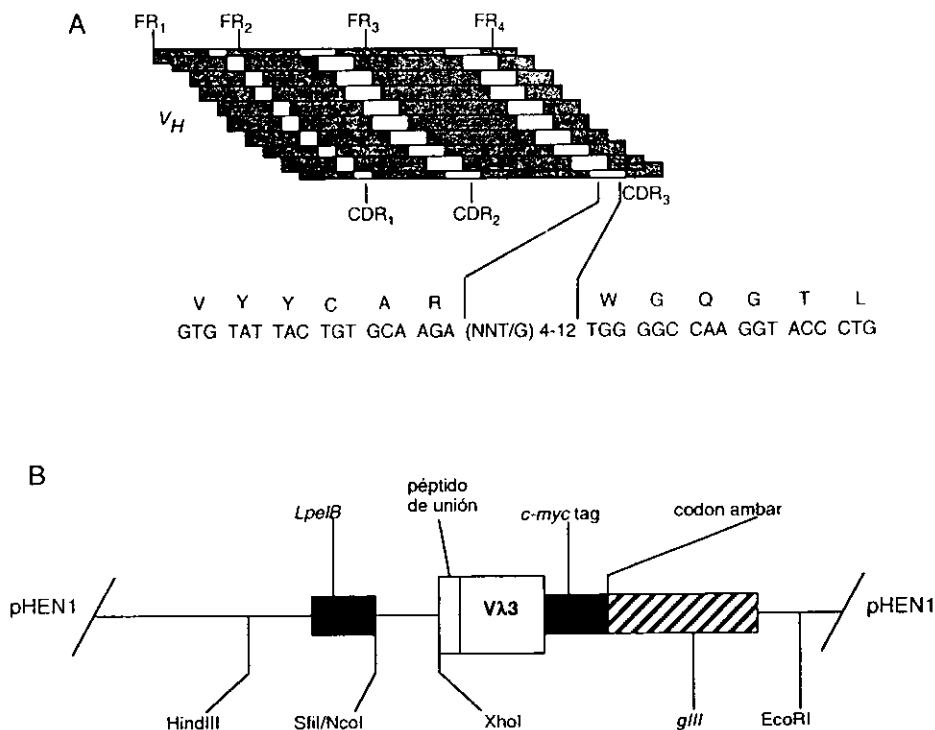
Actualmente, en nuestro laboratorio contamos con una biblioteca de anticuerpos humanos denominada biblioteca sintética de fragmentos variables de cadena sencilla (Synthetic scFv Library), la cual se construyó utilizando oligonucleótidos que introducen secuencias al azar que varían en una longitud de 4 a 14 residuos de aminoácidos en la región determinante de complementaridad 3, correspondiente a la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ - $CDR_3$ ) (Figura 9A). Todos los segmentos rearrreglados  $V_H$  provienen de 49 líneas germinales amplificadas por Hoogenboom y Winter en 1992. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cada familia de los segmentos rearrreglados ( $V_H$ ), se amplificó individualmente utilizando oligonucleótidos específicos, el producto se digirió con las enzimas NcoI y Sall para ser clonados en el fagémido pHEN1- $V_{\lambda_3}$ , previamente digerido con NcoI-XhoI (Figura 9B). La biblioteca de fragmentos de anticuerpos scFv mayor a  $10^8$  clonas diferentes se rescató utilizando el fago ayudador VCS-M13 (Nissim *et al.*, 1994).

## Estructura de los anticuerpos



**Figura 8. Diagrama que muestra los componentes principales de un anticuerpo:** **A)** Los anticuerpos se componen de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Cada una de las cadenas pesadas (H) se encuentra formada por tres regiones constantes ( $C_{H1-3}$ ) y una región variable ( $V_H$ ), las cadenas ligeras presentan una región constante ( $C_L$ ) y una región variable ( $V_L$ ). **B) Fragmentos de anticuerpos:** El fragmento Fab se encuentra constituido por una cadena ligera ( $C_L-V_L$ ) y una parte de la cadena pesada ( $C_{H1}-V_H$ ), los fragmentos variables (Fv) cuentan con tres regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad ( $CDR_{1-3}$ ). El fragmento variable de cadena sencilla (scFv) está representado por dos fragmentos variables ( $V_H-V_L$ ) unidos por un péptido. **C) Fragmentos variables:** se componen de las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera, y presentan tres regiones determinantes de complementariedad ( $CDR_{1-3}$ ), separadas por las regiones estructurales ( $FR_{1-4}$ ).

## Biblioteca sintética humana



**Figura 9. Construcción de la biblioteca sintética humana (synthetic scFv library).** (A) Los sitios de unión a un antígeno se localizan tanto en las regiones variables de las cadenas pesadas ( $V_H$ ) como en la regiones variables de las cadenas ligeras ( $V_{\lambda 3}$ ). Las tres regiones hipervariables se encuentran representadas como aspas, denominadas Regiones Determinantes de Complementaridad ( $CDR_{1,3}$ ), separadas cada una de ellas por Regiones Estructurales ( $FR_{1,4}$ ). El repertorio de genes variables de las cadenas pesadas ( $>10^8$  clonas diferentes) fue construido a partir de 49 líneas germinales de los segmentos  $V_H$  amplificados en Hoogenboom y Winter (1992), con secuencias al azar de 4 a 12 residuos de aminoácido dentro del  $CDR_3$ . (B) **Vector de expresión pHEN1- $V_{\lambda 3}$ .** El repertorio de genes correspondiente a las regiones variables de la cadena pesada (genes  $V_H$ ) fue clonado como fragmentos NcoI-Sall, dentro de los sitios NcoI-XhoI del vector. Significado de las siglas representadas en este esquema: *LpelB*, secuencia líder pelB; péptido de unión entre la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) y la región variable de la cadena ligera ( $V_{\lambda 3}$ );  $V_{\lambda 3}$ , región variable de la cadena ligera  $\lambda$ ; *c-myc tag*, gene que codifica al péptido myc que puede ser reconocido por el anticuerpo monoclonal 9E10; *gIII*, gene que codifica para la proteína III del fago fd.

## **OBJETIVO**

A partir de una biblioteca sintética de anticuerpos humanos (scFv), seleccionar péptidos por medio de phage display que se unan específicamente a la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ab de una manera similar a su receptor natural.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Mediante la implementación de la técnica del phage display aislar fagos que interaccionen de manera específica con la toxina Cry1Ab.

Caracterizar los fragmentos de anticuerpo (scFv) obtenidos contra diferentes toxinas de la familia Cry1 (Cry1Aa, cry1Ac, y Cry1AD).

## MATERIALES Y METODOS

### CEPAS:

*Escherichia coli* TG1, cepa supresora (K12, D (*lac-pro*), *sup E*, *thi*, *hsd* D5/F' *tra* D36, *pro* A+B<sup>+</sup>, *lac* I<sup>q</sup>, *lac* ZDM15) para propagación de partículas de fago.

*Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*/HD-1 contiene el plásmido pHT409 con resistencia a eritromicina, el cual produce la toxina Cry1Aa específica para el gusano de seda (*Bombyx mori*).

*Bacillus thuringiensis* variedad *berliner*/1715 contiene clonado el gene que codifica la toxina Cry1Ab en el plásmido pHCC, infecta a diferentes lepidópteros, entre ellos al gusano cornudo del tabaco (*Manduca sexta*).

*Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*/HD-73 produce la toxina Cry1Ac y su insecto blanco es el gusano del fruto (*Heliothis virescens*).

*Bacillus thuringiensis* variedad *aizawai*/HD-68 produce a la toxina Cry1D y tiene como insectos blanco a los lepidópteros *Manduca sexta* y *Spodoptera frugiperda*.

*Bacillus thuringiensis* variedad *jegathesan*/367 produce a la toxina Cry11B.

### $\delta$ -endotoxina Cry1Ab (antígeno).

La proteína Cry1Ab es producida por la cepa de *Bacillus thuringiensis* variedad *berliner*/1715 y pertenece a la clase de las  $\delta$ -endotoxinas Cry1, las cuales son tóxicas para lepidópteros principalmente. La protoxina de aproximadamente 135 kDa es solubilizada a un pH muy alcalino (10.2), mientras que la toxina activa de 65 kDa es tripsinada a un pH ácido de 8.5. Se expresa en forma de cristales en cepas de *Bacillus thuringiensis*, y se encuentra clonada en el vector pHCC.

## **Biblioteca:**

La biblioteca utilizada para este proyecto recibe el nombre de Biblioteca sintética de fragmentos variables de cadena sencilla (Synthetic scFv Library), fue proporcionada por el Centro Cambridge (Cambridge Centre for Protein Engineering) y cuenta con un diverso repertorio de genes  $V_H$  rearrreglados *in vitro*, con una longitud al azar de 4 a 12 residuos de aminoácidos en la cadena pesada  $V_H$ -CDR<sub>3</sub>. Los genes  $V_H$  rearrreglados se clonaron en el fagémido pHEN1-V $\lambda_3$ . Al rescatar la biblioteca con el fago ayudador VCS-M13 se obtuvo un repertorio de 10<sup>8</sup> clonas (Nissim *et al.*, 1994).

Antes de utilizar la biblioteca, se trató de implementar la técnica del phage display mediante el uso de controles positivos (anti-MBP) y negativos (pHEN1) aislados a partir de la misma biblioteca. Este procedimiento se realizó con la finalidad de conocer y trabajar con esta nueva técnica, y de aprender el manejo y titulación de fagos; así mismo conservaríamos nuestra biblioteca (scFv) sin ponerla en riesgo de contaminación.

### **Control positivo:**

*E. coli* TG1 infectada con fagos anti-MBP: está representado por el fagémido pHEN1, el cual tiene clonado el gene que codifica para el péptido que reconoce a la proteína de unión a maltosa (anti-MBP) y es una clona seleccionada a partir de la Synthetic scFv Library (Nissim *et al.*, 1994).

### **Control negativo:**

TG1 infectada solamente con el fago que contiene el ADN del fagémido pHEN1: se caracteriza principalmente por expresar proteínas *ill* silvestres.

### **Purificación: solubilización y tripsinación de la $\delta$ -endotoxina Cry1Ab.**

La cepa de *Bacillus thuringiensis* variedad *berliner*/1715 se transformó con el plásmido pHCPP que contiene el gene que codifica la proteína Cry1Ab. Para la purificación de esta proteína es necesario inocular la cepa en 250 ml de un medio de cultivo SP, durante 72 horas en agitación a 30°C, hasta que llegue a la fase estacionaria donde las bacterias empiezan a esporular y a producir los cristales. Estos son separados por gradiente

discontinuo de sacarosa (84%, 79%, 72% y 67%), las bandas del gradiente que contienen a los cristales son aisladas y sometidas a lavados hasta lograr obtener una pastilla limpia de sacarosa. La pastilla (cristales), es solubilizada en amortiguador de carbonatos (pH 10.2/0.2% de  $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor) en agitación durante 2 horas a 37°C. Después de la solubilización se verifica que la protoxina tenga el peso adecuado (130 kDa) en un gel de acrilamida al 10%. El siguiente paso consiste en tripsinar la protoxina (1 mg de tripsina/ml en 1 mM HCL) usando una relación de 1:50 (1 mg de tripsina por cada 50 mg de proteína) durante 2 horas en agitación a 37°C. Transcurrido el tiempo se detiene la digestión adhiriendo 1 mM de PMSF como inactivador de la tripsina, y se observó el peso (65 kDa) de la toxina en un gel de acrilamida al 10%.

Para la obtención de una mayor cantidad de proteína procedimos a inocular 10 litros crecer un medio de cultivo SP de en la planta piloto del Instituto de Biotecnología, ajustado a las mismas condiciones de temperatura, agitación, incluyendo esta vez el ajuste del pH a 7.0.

La toxina se purificó en una columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose) equilibrada con TRIS-HCl pH 8.5, la proteína utilizada también se encontraba en el mismo amortiguador. Después de que se carga la toxina en la columna de intercambio iónico, un gradiente de NaCl (50-200 mM) es utilizado para la consecuente elusión de la proteína, cabe destacar que en estas condiciones la toxina eluye a una concentración de 135 mM de NaCl sin peligro de precipitarse.

### **Crecimiento de los controles (anti-MBP y pHEN1).**

A partir de los gliceroleros proporcionados por el Centro Cambridge se platan las cepas en medio mínimo (MM), una vez que se han obtenido colonias frescas se inocula un medio de cultivo 2xTY que contenga 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 1% de glucosa, se deja incubando toda la noche en agitación a 37 °C y 270 rpm. Se diluyen los cultivos 1:100 con 2xTY conteniendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 1% de glucosa y se rescatan los fagémidos siguiendo los incisos A y B de la metodología descrita en este trabajo.



## Preparación de partículas del fago ayudador VCS-M13.

Infectar 200  $\mu$ l de *E. coli* TG1 a una D.O. de 0.2 con 10  $\mu$ l de diluciones seriadas de fago ayudador (procurando obtener placas separadas en las diluciones,  $1 \times 10^0$ - $1 \times 10^{-12}$ ) a 37°C sin agitación, durante 30 min. Agregar 3 ml de agar TYE a 42°C y verterlas en cajas que contienen medio 2xTY e incubar toda la noche a 37°C. Durante el siguiente día seleccionar una placa e infectar un cultivo (3-4 ml) de *E. coli* TG1 en fase exponencial, crecerlo durante 2 hr a 37 °C en movimiento. Inocular 500 ml de 2xTY conteniendo 60  $\mu$ g/ml de kanamicina y crecerlo durante 8-16 hr. Centrifugar a 10,800 g durante 15 minutos para bajar las células y agregar al sobrenadante 1/4 de volumen de PEG/NaCl (20% polietilenglicol 6000-2.5 M NaCl) e incubar por un mínimo de 30 minutos en hielo, posteriormente centrifugar por 15 minutos a 10,800 g. Resuspender el botón en 2 ml de amortiguador TE y esterilizarlo en un filtro de 0.45  $\mu$ m. Por último se titula el fago y se refrigeran alícuotas a 4 °C con  $1 \times 10^{12}$  u.f.p./ml aproximadamente.

### A- Crecimiento de la biblioteca.

La biblioteca de fragmentos scFv, se encuentra clonada en el fagémido PHEN1 y se expresa en la cepa supresora de *Escherichia coli* (TG1). Para la amplificación y rescate de la biblioteca (en forma de fagos M13) se toman 50  $\mu$ l del concentrado bacterial de la biblioteca (cerca de  $5 \times 10^8$  clones) para inocular 50 ml 2xTY conteniendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 1% de glucosa (2xTY-amp-gluc). El cultivo se incuba aproximadamente por 2 horas a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Se infectan 10 ml de ese cultivo adhiriendo fago ayudador VCS-M13 en una proporción de 1:20 (número de células bacteriales: partículas de fago ayudador, tomando en cuenta que 1 DO bacteriana a 600 nm =  $8 \times 10^8$  bacterias/ml), posteriormente se incubó sin agitación a 37°C por 30 minutos. Las células infectadas se rescatan del medio, al centrifugar el cultivo a 3,300 g por 10 minutos. Se adicionaron 300 ml de medio 2xTY a la pastilla de células conteniendo además 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 25  $\mu$ g/ml de kanamicina (2xTY-amp-kan) y se incubó a 30°C en agitación durante toda la noche.

## B- Preparación de partículas del fagémido (pHEN1)

Como las partículas de fagos producidas no lisan las células bacterianas, se centrifuga el cultivo de la noche anterior (300 ml de 2xTY-amp-kan) a una velocidad de 10,800 g por 10 minutos. Al volumen del sobrenadante se le agrega 1/5 de polietilenglicol-cloruro de sodio (20% PEG 6000/NaCl 2.5 M), se mezcla bien y se deja incubando por una hora a 4°C. Los fagos precipitados se recuperan centrifugando a una velocidad de 3,300 g por 30 minutos, el botón (fagos precipitados) se resuspende en 2 ml de amortiguador (PBS) y se centrifuga a 3,300 g por 10 minutos para eliminar posibles restos bacterianos. Se almacena a 4°C por un corto período o a -70°C por un período largo en PBS 15% de glicerol. Este procedimiento produce  $1-5 \times 10^{13}$  unidades formadoras de placas (u.f.p.)

## C- Obtención de fagos mediante rondas de selección.

Los fagos que expresan la biblioteca de anticuerpos se seleccionaron mediante ocho rondas, usando el mismo antígeno ( $\delta$ -endotoxina Cry1Ab) a la misma concentración (100  $\mu$  g/ml en PBS).

Para la selección se usaron inmunotubos de 75mm x 12 mm (Nunc;Maxisorp; Cat. No. 4-44202) cubiertos con 4 mililitros de la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ab (100  $\mu$ g/ml) en PBS por toda la noche a temperatura ambiente. Después se lava tres veces con PBS, y el tubo se incuba por dos horas a 37°C con 2% de leche (carnation) en PBS (LPBS 2%) como bloqueador para evitar la unión inespecífica de los fagos. Se repite nuevamente el lavado y se adicionan 4 ml de LPBS 2% con partículas de fagos ( $10^{12}$  a  $10^{13}$  u.f.p.), incubándolos 30 minutos a temperatura ambiente sobre una plataforma rotatoria que invierte sistemáticamente el tubo, posteriormente se deja 90 minutos sobre la mesa a temperatura ambiente. Se lavan 20 veces los tubos con PBS, tween 20 a 0.1% (v/v) y 20 veces con PBS (cada paso de lavado se realiza agregando amortiguador y desechándolo inmediatamente). Las partículas de fago unidas se eluyen del tubo adicionando 1 ml de trietilamina 100 mM (700  $\mu$ l de trietilamina (7.18 M) en 50 ml de agua), invirtiendo el tubo usando una tabla rotatoria por 10 minutos. El fago eluido es rápidamente neutralizado con 0.5 ml de Tris-HCl 1.0 M (pH 7.4). Los fagos se almacenan a 4°C (1.5 ml), posteriormente se utilizan para infectar 9 ml de un cultivo (2xTY) de *Escherichia coli* TG1 en fase exponencial y se platan en cajas con TYE conteniendo 100  $\mu$ g de ampicilina y 1% de glucosa .

#### **D- ELISA policlonal.**

La mezcla de fago policlonal, producida por repropagación de la biblioteca después de cada ronda de selección, se analizó por unión al antígeno  $\delta$ -endotoxina Cry1Ab y a otro antígeno control mediante ELISA.

Las placas de ELISA (NUNC, Brand-Products) se cubren con la toxina a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS, después de tres lavados con PBS se bloquea con LPBS 2% y se agregan 10  $\mu\text{l}$  de fago (correspondiente a cada ronda de selección) precipitado con PEG (cerca de  $10^{10}$  u.f.p.). Posteriormente se usa un anticuerpo anti-M13 (Aldrich) conjugado con peroxidasa y como sustrato 3'3'5'5'tetrametilbencidina (TMB-Aldrich) acompañado de 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% (Sigma) para su detección. Las reacciones se detienen después de 10 minutos al agregar  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , inmediatamente se lee a una absorbancia de 450nm ( $A_{450\text{nm}}$ )

#### **E- ELISA monoclonal de fagos aislados.**

En esta parte del proyecto se analizarán los fagos correspondientes a cuatro rondas de selección, tomándose para su análisis 95 colonias al azar de cada una de las rondas. Para el experimento se utilizan cajas de ELISA donde se inocularon las 95 colonias de cada ronda, cada colonia se inocula en 100  $\mu\text{l}$  de medio 2xTY-amp-gluc, a partir de ese cultivo se toma un pequeño inóculo de 2  $\mu\text{l}$  para ser transferido a una segunda caja de ELISA que contiene 200  $\mu\text{l}$  de medio 2xTY-amp-gluc. Para rescatar el fago de las colonias individuales se adiciona fago ayudador VCS-M13 ( $1 \times 10^9$  u.f.p.) y por último se le realiza a los fagos obtenidos (monoclonales) la prueba de ELISA contra la proteína Cry1Ab.

**F- Almacenamiento de una fuente secundaria a partir de la biblioteca original.**

Regresando al inciso A, tomamos los 40 ml del crecimiento bacteriano restante (2xTY-amp-gluc) y los utilizamos para desarrollar una fuente secundaria de nuestra biblioteca. Se centrifugan los 40 ml a 3300 g por 10 min para bajar las células, inmediatamente se resuspende el botón celular en 1ml de medio 2xTY. Este se dispersa sobre una caja Nunc Bio-Assay (Nunc, Brand-Products) la cual contenía medio sólido (TYE-amp-gluc) dejándose crecer durante toda la noche a 37°C. Al siguiente día se agregaron 2 ml de medio 2XTY, 15% de glicerol a la caja Nunc Bio-Assay y se recogen las células bacterianas con una espátula de vidrio. Por último se almacena a -70°C la fuente secundaria de la biblioteca que contiene por cada 50 µl alrededor de  $1 \times 10^8$  bacterias.

## RESULTADOS

### Implementación de la técnica de phage display.

Con esta técnica podemos separar fagos del tipo M13 que están expresando polipéptidos (scFv) fusionados a la proteína III. Para efectuar esta prueba fue necesario mezclar el control positivo anti-MBP (aislado a partir de la biblioteca) con el fagémido pHEN1 (control negativo) en una relación 1:100. El detalle de la técnica utilizada se encuentra en la sección de metodología, y es la misma que se utilizó posteriormente para trabajar con la biblioteca.

Se procuró que el título de fagos, correspondiente a la mezcla de los controles, estuviera entre  $1 \times 10^{12}$  y  $1 \times 10^{13}$ , ya que es un título necesario que puede permitir la saturación efectiva del antígeno pegado. Se realizaron tres rondas de selección usando como antígeno a la proteína de unión a maltosa (New England Biolabs) en una concentración de  $100 \mu\text{g/ml}$  (Figura 10).

La figura 10 muestra un ensayo de ELISA policlonal, al cual se sometieron los fagos resultantes de cada ronda de selección, mismos que cuentan con diferentes afinidades hacia el antígeno utilizado (anti-MBP). El objetivo principal es identificar si se presenta un incremento gradual en la absorbancia (450nm) partiendo de la primera ronda hasta la tercera.

Estos resultados muestran que la amplificación de los fagos usados como control positivo llegaban rápidamente a su saturación, sin mostrarse gran diferencia entre las absorbancias de la primera ronda hasta la tercera. Posiblemente debíamos de haber mezclado una proporción mayor a la utilizada inicialmente entre el control positivo (anti-MBP) y el control negativo (pHEN1). En el control negativo que no debería presentar absorbancia, se puede identificar una absorbancia inferior a las tres rondas posiblemente porque existan fagos que se estén uniendo con afinidades bajas o de manera inespecífica.

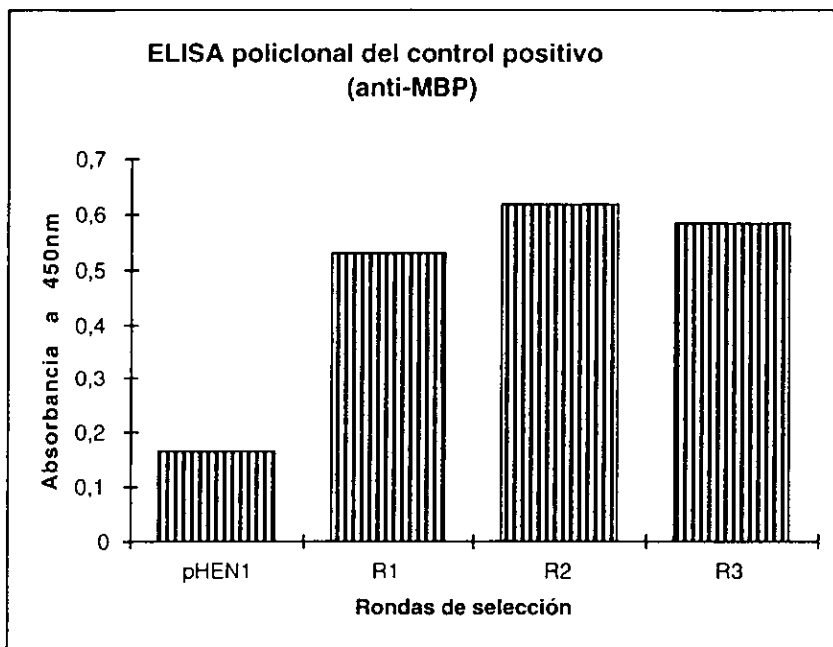


Figura 10. Análisis de unión del fago anti-MBP, mediante ensayo de ELISA policlonal realizada a tres rondas de selección. El fago se identificó con un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa, el substrato utilizado fue tetrametil bencidina (TMB) y se leyó a una absorbancia de 450nm.

## Purificación del antígeno Cry1Ab.

Durante el tiempo que se tardó en implementar la técnica del phage display, simultáneamente se purificó la proteína (Cry1Ab) que se utilizaría como antígeno para la obtención de fagos a partir de la biblioteca de anticuerpos humanos.

Se procedió a realizar un medio de cultivo SP de 10 litros de la cepa de *Bacillus thuringiensis* que expresa a la toxina Cry1Ab. El crecimiento del cultivo se llevó a cabo en la planta piloto del Instituto de Biotecnología, controlándose condiciones como: la agitación, temperatura (30°C), pH (7.0) y el tiempo de incubación a 72 horas. Una vez terminado el tiempo de incubación se procedió a la purificación de la toxina (ver detalle en la metodología) y a su identificación con marcadores de alto peso molecular en geles de acrilamida al 10%.

En la figura 11 se puede identificar en el primer carril el marcador de alto peso molecular (MAP); el segundo carril representa una muestra proveniente directamente del medio de cultivo de 10 litros; en el tercer carril se observan los cristales purificados mediante gradientes de sacarosa; el cuarto carril contiene la muestra de cristales solubilizados; la tripsinación de la proteína solubilizada está en el carril número cinco; y en el carril número seis se puede observar a la toxina Cry1Ab purificada mediante una columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose).

## Purificación de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1D y Cry11B.

La purificación de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1D y Cry11B partió de cultivos de 250 ml, obteniéndose cantidades importantes de proteína. Al momento de pasarlas por la columna de intercambio iónico se detectó que estas proteínas eluyen a concentraciones de NaCl diferentes, el gradiente formado por el NaCl en la columna ocasiona cambios en la fuerza iónica que provoca diferentes interacciones entre las toxinas tratadas: Cry1Aa y Cry1Ab eluyen a 115 mM NaCl, mientras que la proteína Cry1Ac eluye a 150 mM de NaCl, por último la Cry1AD eluye ~130 mM-150 mM. El procesamiento de la toxina Cry11B es un poco diferente a las demás, ya que solamente se puede digerir con quimiotripsina.

## Purificación de la $\delta$ -endotoxina Cry1Ab

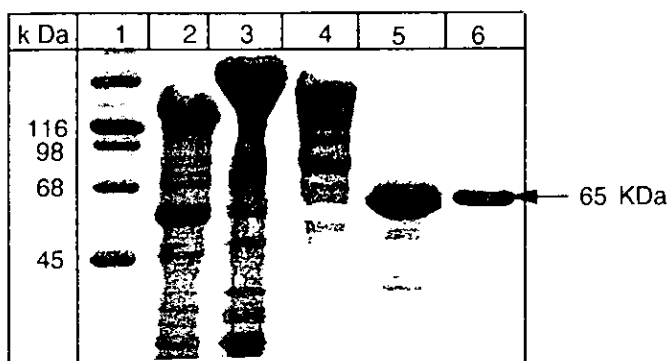


Fig. 11. Muestras del proceso de purificación de la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ab en gel PAGE/SDS 10% acrilamida. 1) marcador de alto peso molecular, 2) proteína total a partir de un medio de cultivo (SP) de *Bacillus thuringiensis*, 3) purificación mediante gradiente de sacarosa de los cristales endosporales de *Bacillus thuringiensis*, 4) solubilización de los cristales endosporales utilizando amortiguador de carbonatos, 5) Tripsinación de la muestra solubilizada utilizando 1 mg de tripsina por cada 50 mg de proteína, 6) muestra de la toxina tripsinada y pasada por columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharosa).



En la figura 12 se observa en el carril número 1 al marcador de alto peso molecular (MAP); los carriles número 2 y 3 contienen las muestras de la toxina Cry1Aa, tripsinada y purificada por columna respectivamente; los carriles 4 y 5 presentan a la toxina Cry1Ac, tripsinada y purificada; en los carriles 6 y 7 se observan muestras de la toxina Cry1D, tripsinada y purificada por columna; y por último el carril 8 contiene a la toxina Cry11B, quimiotripsinada.

### **Aislamiento de fagos mediante phage display, que sean capaces de reconocer al antígeno Cry1Ab.**

La biblioteca humana denominada synthetic scFv Library, cuenta con un diverso repertorio de genes  $V_H$  rearrreglados *in vitro*, con una longitud al azar de 4 a 12 residuos de aminoácidos en la cadena pesada  $V_H$ -CDR<sub>3</sub>. El rearrreglo de los genes  $V_H$  fue apareado con los genes de la cadena ligera  $V_{\lambda 3}$  y clonados en el fagémido pHEN1 con un repertorio mayor a  $10^8$  clonas diferentes. La construcción en este fagémido permite la fusión del fragmentos scFv con la proteína minoritaria III del fago M13, de esta forma la presencia del fago ayudador permite la exposición de la proteína híbrida en la cápside del bacteriófago (Nissim, et al. 1994).

Las partículas de fagémidos fueron rescatadas de la biblioteca por infección de fago ayudador (VCS-M13) y la precipitación se efectuó con polietilenglicol (PEG). El protocolo utilizado permitió obtener títulos mayores de  $1-5 \times 10^{13}$  unidades formadoras de placas (u.f.p.).

Los fagos fueron seleccionados al pasarlos por un inmunotubo que contenía una concentración adecuada del antígeno inmobilizado Cry1Ab ( $100\mu\text{g/ml}$ ), los fagos que se unieron a la proteína se eluyeron con trietilamina para amplificarlos infectando *Escherichia coli* (TG1) y así rescatar nuevamente parte de la biblioteca con el fago ayudador. Las partículas virales producidas se sometieron a una segunda ronda de purificación por afinidad; este procedimiento se realizó durante ocho rondas de selección. Las titulaciones de los fagos (entrada y salida) correspondientes a cada ronda de selección se encuentran en la tabla 1.

## Purificación de $\delta$ -endotoxinas Cry1

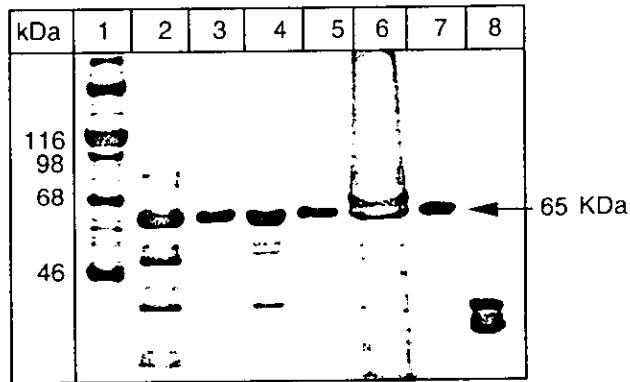


Figura 12. **Proteólisis y purificación por columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharosa), de algunas  $\delta$ -endotoxinas de la familia Cry1 correspondientes a *Bacillus thuringiensis*.** PAGE/SDS 10% acrilamida. Varias subespecies de *Bacillus thuringiensis* se utilizaron como sigue: A) *kurstaki*/HD-1 (Cry1Aa), carril 2 y 3 tripsinada y purificada por columna respectivamente; B) *kurstaki*/HD-73 (Cry1Ac), carril 4 y 5 tripsinada y purificada por columna; C) *aizawai*/HD-68 (Cry1D), carril 6 y 7 tripsinada y purificada por columna; D) *jegathesan*/367 (Cry11B), quimiotripsinada; en el carril número 1 se encuentra el marcador de alto peso molecular.

## Titulación de los fagos durante el phage display

entrada $1 \times 10^{13}$	salida
1a ronda	$1.75 \times 10^6$
2a ronda	$1.6 \times 10^4$
3a ronda	$8.85 \times 10^7$
4a ronda	$2.25 \times 10^7$
5a ronda	$5 \times 10^4$
6a ronda	$4 \times 10^6$
7a ronda	$1.69 \times 10^7$
8a ronda	$2 \times 10^7$

Tabla 1. En cada una de las rondas siempre se puso especial cuidado para agregar una entrada de  $1 \times 10^{13}$  unidades formadoras de placas. Los datos de la salida representan la cantidad de fagos que se unen al antígeno y que se eluyeron con trietilamina, este compuesto permite despegar todos los fagos que se unen con mucho mayor fuerza a la toxina.

Durante las primeras cuatro rondas se utilizó la proteína Cry1Ab que presentaba algunas proteínas contaminantes, a diferencia de la utilizada en las cuatro rondas posteriores. Posiblemente el hecho de cambiar la proteína provocó que la salida de la quinta ronda disminuyera en comparación de la cuarta ronda, la consecuencia sería que al quitar más contaminantes estaríamos eliminando fagos que no se pegaran al antígeno (Cry1Ab). Con respecto a la sexta y séptima ronda, la cantidad de fago pegado al antígeno aumentó, logrando estabilizarse en la octava ronda. El hecho de presentar un aumento y estabilización en el título de salida de las últimas cuatro rondas, estaría significando que ya está llegando al punto de la saturación.

## Estudio por medio de ELISA de los fagos seleccionados.

### ELISA POLICLONAL

Una vez que se realizaron las rondas de selección y se purificaron los fagos eluidos, se procedió a realizar este tipo de ensayos (ELISA policlonal) que permitieron determinar si existe enriquecimiento en cada una de las rondas efectuadas. Los fagos eluidos correspondientes a cada ronda se encuentran representando vectores portadores de diferentes epítopes que reconocen a la toxina Cry1Ab en regiones específicas de sus diferentes dominios.

Estas mezclas de fago policlonal producido por repropagación de la biblioteca, después de siete rondas de selección se analizaron mediante una prueba de ELISA, estudiándose cada una de ellas por unión al antígeno usado (Cry1Ab con una concentración de  $100\mu\text{g/ml}$ ). Para lograrlo se requirió del fago precipitado con PEG ( $1 \times 10^{10}$  u.f.p.), más una dilución apropiada del anticuerpo anti-M13 acoplado a peroxidasa (1:1000), posteriormente se agregó la tetrametilbencidina (TMB) como sustrato para la peroxidasa. Por último se paró la reacción después de 10 minutos al agregar  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , las lecturas se realizaron a 450 nm.

De acuerdo a los datos de la Figura 13 del ELISA policlonal, se observan dos controles negativos: los fagos que contienen el ADN del fagémido pHEN1 silvestre que no está expresando la proteína híbrida; y la proteína de unión a maltosa (MBP) utilizada como antígeno más el fago de la ronda 6. Por otra parte se encuentra la biblioteca y siete rondas de selección.

El primer control negativo revela que el fago silvestre no se pega a la proteína Cry1Ab si no se tiene el fragmento scFv, el segundo control negativo demuestra que el fago de la sexta ronda no se pega a un antígeno diferente como lo es el caso de la proteína MBP. En cuanto a las rondas de selección se observa que a partir de la quinta ronda comienza un aumento progresivo en la absorbancia, debida posiblemente a que las condiciones de astringencia (lavados, concentración de sales y de tritón, etc.) utilizadas durante la técnica fueron muy extremas. Por lo tanto durante las primeras rondas solamente los fagos más afines fueron los que se pegaron, permitiéndose la amplificación de éstos durante las tres últimas rondas de selección (5, 6 y 7).

### Ensayo de ELISA policlonal contra la toxina Cry1Ab

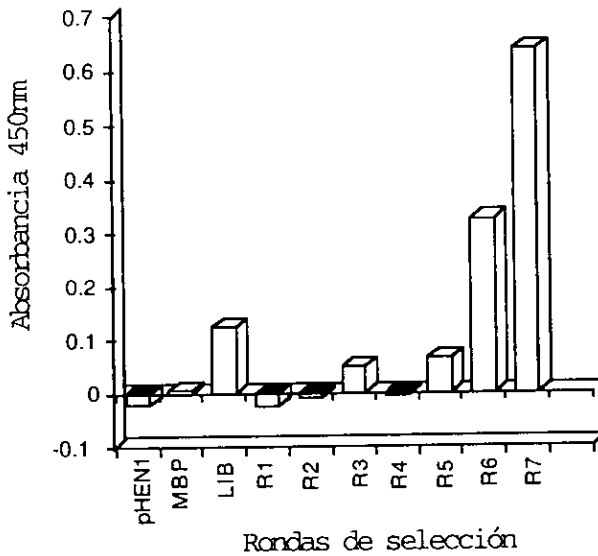


Figura 13. ELISA policlonal de siete rondas de selección contra absorbancia a 450nm. pertenecientes a fagos que se unen a la toxina Cry1Ab inmobilizada. La unión de los fagos se detectó mediante un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa. El fagémido pHEN1 y la proteína de unión a maltosa (MBP) se usaron como controles negativos.

## ELISA MONOCLONAL

Cada ronda de selección cuenta con una variabilidad de fagos que se hace menos diversa a medida que se realizan más rondas de selección. La ELISA monoclonal permite aislar fagos de cada ronda de selección, la idea principal es picar colonias y crecerlas en cajas de ELISA para que de ahí se pueda amplificar, purificar y precipitar fagos que se expresen de una sola colonia, independientemente de la ronda de selección a que corresponda.

Especialmente en esta parte del proyecto se analizaron fagos de cuatro rondas de selección (2a, 4a, 6a, y 8a), tomándose para su análisis 95 colonias al azar de cada una de las rondas. Para el experimento se utilizaron cajas de ELISA para inocular las 95 colonias de cada ronda, cada colonia fue inoculada en 100  $\mu$ l de medio 2xTY conteniendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 1% de glucosa, a partir de este cultivo se tomó un pequeño inóculo (2 ml) para transferirlo a una segunda caja de ELISA que contenía 200 ml de medio 2xTY con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 1% de glucosa. Para rescatar el fago de las colonias individuales se adicionó fago ayudador (VCS-M13) con un título de  $1 \times 10^9$  u.f.p. y por último a los fagos rescatados (monoclonales) se les realizó la prueba de ELISA.

En la figura 14 se expresa el porcentaje de colonias positivas por ronda de selección, demostrándose claramente el incremento de colonias positivas con respecto a la ronda. Durante la segunda ronda, de las 95 colonias seleccionadas al azar solamente el 1% corresponde a colonias positivas, en la cuarta ronda las colonias positivas corresponden al 5%; mientras que para las rondas seis y ocho el porcentaje aumentó favorablemente (55% y 90% respectivamente). Por lo tanto se puede mencionar que sí se efectuó un enriquecimiento real durante las ocho rondas de selección. Estos resultados comprueban que la amplificación de los fagos afines a la toxina Cry1Ab se llevó a cabo.

### ELISA monoclonal contra la toxina Cry1Ab

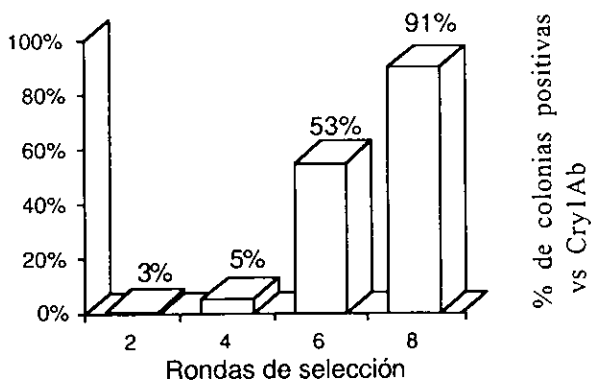


Figura 14. Porcentaje de colonias positivas que reconocen a la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ab correspondiente a cuatro rondas de selección. Los fagos pertenecientes a cada colonia se rescataron a partir de *Escherichia coli* TG1 utilizando fago ayudador VCS-M13. El ensayo de ELISA se reveló con el anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa y se usó como sustrato tetrametil bencidina (TMB) más  $H_2O_2$  al 30%. En la ronda 2 solamente el 3% corresponde a colonias positivas, la ronda cuatro presenta el 5%, mientras que las rondas 6 y 7 incrementaron su porcentaje al 53% y 91% respectivamente.

## Variabilidad de los fagos que reconocen a la proteína Cry1Ab.

De esta manera identificamos colonias portadoras de epítopes monoclonales capaces de reconocer a la toxina completa Cry1Ab. Con el fin de conocer la variabilidad existente en esos anticuerpos monoclonales, procedimos a determinar si esos péptidos eran capaces de reconocer otras toxinas de la familia Cry1, como: Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1D y Cry11B como control negativo. Al igual que Cry1Ab las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac son tóxicas para *Manduca Sexta*, la toxina Cry1D es tóxica para un lepidóptero diferente (*Spodoptera frugiperda*), mientras que la Cry11B es tóxica para dípteros.

Para tal efecto seleccionamos 95 colonias monoclonales que reconocen a la toxina Cry1Ab, rescatamos el fago de cada una de ellas y los analizamos por medio de ELISA contra diferentes toxinas de la familia Cry1. Encontramos que al menos existen cinco tipos de péptidos capaces de reconocer a la toxina Cry1Ab. Los porcentajes en los que se encontraron estos péptidos se localizan en la primera columna del lado izquierdo de la tabla número 2, mientras que los porcentajes de identidad de cada una de las toxinas con respecto a la proteína Cry1Ab se encuentran entre parentesis.

Tabla 2. Reconocimiento de diferentes proteínas Cry, por ELISA de 95 colonias portadoras de fagémidos, que unen a la toxina Cry1Ab.

% clonas	Cry1Ab (100%)	Cry1Aa (89%)	Cry1Ac (80%)	Cry1D (50%)	Cry11A (15%)
74%	+	+	+	+	-
15%	+	+	+	-	-
4%	+	+	-	-	-
5%	+	+	+	+	+
1%	+	+	+	-	+



Los signos positivos estan representando a los anticuerpos que reconocen esas toxinas, mientras que los signos negativos representan a los que no reconocen.

De acuerdo a los resultados se observa que el 100% de los fagos reconocen a la toxina con mayor porcentaje de identidad (Cry1Aa-89%). El 95% de los fagos reconocen a la proteína Cry1Ac, el 79% de los fagos reconoce a la proteína Cry1D, la cual comparte un 50% de identidad con la Cry1Ab; y por último solamente un 6% de los fagos reconocen la Cry11B (con un 15% de identidad). Los alineamientos realizados con las proteínas Cry1 muestran que existen regiones conservadas entre ellas, es lógico esperar que mayor número de fagos (específicos contra Cry1Ab) reconozcan a la proteína con un mayor porcentaje de identidad (Cry1Aa), y que un menor número de ellos reconozcan a la toxina de menor identidad (Cry11B).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## DISCUSION

El despliegue de péptidos en fagos filamentosos (Phage display) es una tecnología que ha venido a revolucionar las formas de aislar epítopes contra un antígeno determinado. En este proyecto se ha logrado implementar esta técnica (phage display) para la obtención de fragmentos scFv capaces de reconocer a la toxina Cry1Ab, e incluso otras proteínas de la misma familia. Los fragmentos de anticuerpos (scFv) provenientes de la biblioteca de anticuerpos humanos son expresados en fagos filamentosos del tipo M13.

Utilizando la misma biblioteca, Nissim en 1994 logró aislar fragmentos scFv específicos contra 18 antígenos diferentes, incluyendo la proteína intracelular (p53), el factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ), la proteína de unión a maltosa (MBP), etc. Utilizando directamente los fagos aislados de las rondas de selección y los fragmentos scFv solubles logró identificar mediante Western blots las clonas específicas para los antígenos citados. Posteriormente secuenció el fragmento scFv de las clonas monoclonales seleccionadas, encontrándose que por lo menos existían dos tipos de epítopes diferentes que reconocían a un mismo antígeno, en otros casos como en la MBP se identificaron hasta cinco epítopes diferentes. En general las secuencias correspondientes al CDR3 de los fagos identificados presentan un número variable de r.a.a. que va de 4 a 12 r.a.a. Estos resultados demuestran que sí es posible aislar polipéptidos (scFv) expresados en los fagos.

Con el uso de esta biblioteca y mediante el uso de este sistema de phage display logramos amplificar fagos purificados por afinidad, contra la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ab. Debido a las condiciones experimentales implementadas, fue necesario realizar ocho rondas de selección para lograr el enriquecimiento específico de fagos contra la toxina.

El análisis de los fagos mediante ELISA policlonal de siete rondas de selección, reveló un incremento gradual en la absorbancia a partir de la quinta ronda, hasta lograr la estabilización en la séptima. Al analizar colonias individuales mediante ELISA monoclonal, se confirmó que efectivamente existía enriquecimiento de fagos contra la toxina Cry1Ab.

Hasta este momento solamente se contaba con fagos que se unen a la toxina en cualquiera de sus dominios, y para darnos una idea de su diversidad, se procedió a realizar ensayos de ELISA contra otras proteínas de la familia Cry1 (Cry1Aa, Cry1Ac y Cry1D), además de utilizar a la toxina

cry11B como control negativo. Las  $\delta$ -endotoxinas de la familia Cry1 (incluyendo también a la Cry1Ab) cuentan con características comunes, tales como: presentan su mayor identidad en el dominio I que posiblemente tenga un origen común (Bravo, 1996), tienen las cinco regiones conservadas descritas por Hofte y Whiteley en 1989 y por último todas matan a *Manduca sexta*, el cual es el insecto blanco de la toxina Cry1Ab.

A partir de los alineamientos realizados entre estas cinco proteínas se podría inferir qué regiones de las toxinas están involucradas en el reconocimiento de las 95 clonas seleccionadas (Tabla I). Del 74% de las clonas positivas, la mayor parte se podría estar pegando al dominio I y a las cinco regiones conservadas, sin descartar la unión a otras regiones comunes entre ellas. El 15% corresponde a las clonas que solamente reconocen regiones específicas de las  $\delta$ -endotoxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, posiblemente gran parte de ese porcentaje se este uniendo al dominio I que representa casi un 100% de identidad entre dichas proteínas. El 4% que se une a las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa podrían estar reconociendo los dominios I y III que cuentan con una identidad del 98% y 100% respectivamente. Para este caso resulta interesante mencionar que el dominio I y II de la Cry1Ac son casi el 100% idénticos con respecto a la Cry1Ab, por lo tanto las clonas que estan representando el 4% de la Tabla I estarían reconociendo al dominio III de las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa. Por último un 5% de las clonas reconoce a todas las toxinas, incluyendo la Cry11B, mientras que un 1% no reconoce a la toxina Cry1D.

## CONCLUSIONES

Los ensayos de ELISA policlonal y ELISA monoclonal muestran enriquecimiento de los fagos que reconocen a la toxina Cry1Ab.

El análisis de ELISA contra diferentes proteínas Cry (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1D y Cry11B), correspondiente a 95 clonas, permite distinguir la variabilidad existente entre esas clonas seleccionadas, de los cuales por lo menos existen cinco tipos diferentes de fagos.

El 4% de los fagos que se unen a las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa, correspondientes a las 95 clonas seleccionadas, son candidatos a reconocer el dominio tres de la toxina Cry1Ab.

## PERSPECTIVAS

Como otra manera de estudiar la variabilidad de los péptidos seleccionados se procederá a realizar PCR de diferentes colonias, utilizando oligonucleótidos que permitan la amplificación de los fragmentos variables (scFv). Posteriormente los fragmentos amplificados serán digeridos con la enzima BstNI que permitirá observar un patrón de restricción específico para cada fragmento y así discriminar entre las colonias que tengan patrones diferentes.

Una vez seleccionados los fagos monoclonales, produciremos anticuerpos solubles, a partir de la transfección en una cepa no supresora HB2151 (*E. coli*), que cuenta con la característica de reconocer el codón de paro que se encuentra entre el anticuerpo (scFv) y la proteína III del fago. Los anticuerpos solubles serán utilizados para la elaboración de Western blot con el fin de comprobar si efectivamente los anticuerpos interactúan con las diferentes proteínas Cry1.

En nuestra búsqueda por el entendimiento de la interacción toxina-receptor, una de las siguientes metas importantes será tratar de seleccionar anticuerpos monoclonales que interactúen con regiones específicamente del dominio II y con el dominio III de la toxina Cry1Ab. Para obtener los fagos específicos contra el dominio II usaremos como antígeno a la mutante en el asa 2 (F371A) correspondiente al dominio II de la toxina Cry1Ab, la cual está afectada en su unión al receptor (Rajamohan, 1995). El dominio II es importante porque interactúa directamente con el receptor, siendo el asa 2 de este dominio (368RRPFNIGI375) la región principal de contacto con el receptor. La toxina Cry1Ac se utilizará como antígeno para obtener los fagos que reconozcan específicamente el dominio III de la toxina Cry1Ab. Este dominio es interesante desde el punto de vista de la especificidad, por tal razón hemos propuesto aislar péptidos específicos para este dominio mediante phage display.

Si existen en nuestra biblioteca fragmentos capaces de reconocer las regiones mencionadas, éstos podrán ser seleccionados; aunque no se deja de reconocer que las posibilidades de éxito de esta parte del proyecto dependerán de su presencia en la biblioteca. En caso de no aislar anticuerpos contra esta región, intentaremos identificar los anticuerpos que puedan neutralizar la actividad tóxica de la toxina. Esta alternativa será útil para identificar regiones nuevas en la toxina importantes para su actividad formadora de poro.

En el caso de aislar polipéptidos que sean capaces de reconocer al dominio II y dominio III de la toxina Cry1Ab, realizaremos ensayos de competencia, los que sean capaces de neutralizar la unión de la toxina con el receptor serán los mejores candidatos. Posteriormente se determinará si los péptidos elegidos inhiben la formación del poro, utilizando membranas que contengan el receptor (vesículas de *Manduca sexta*) y membranas que no lo contengan (vesículas de *Spodoptera frugiperda*).

Por último, la secuencia de los péptidos que afecten la unión al receptor se alinearán con la secuencia de las dos proteínas de *Manduca sexta* que se sabe interaccionan con esta proteína. También se debe tener en cuenta que la secuencia de los péptidos seleccionados puede no ser 100% idéntica. Los epítopes que neutralicen la unión de la toxina a su receptor serán los mejores candidatos para representar los sitios de interacción del receptor con la proteína Cry1Ab. Estos péptidos podrán ser una manera efectiva de inactivar a la toxina.

## APENDICE

### Medios de cultivo:

#### Medio mínimo (MM):

Para 1 litro: 6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g de NaCl, más 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; la mezcla de estos reactivos corresponde a lo que son las sales del medio mínimo, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza. Posteriormente se agregan los siguientes reactivos previamente estériles:  $\text{CaCl}_2$  0.1 ml (1M),  $\text{MgSO}_4$  2 ml (1M), glucosa al 20% (10 ml) más 100  $\mu$  l de vitamina B1.

#### Medio SP:

Por 250 ml: 2.0 g de caldo nutritivo, 0.0625 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g de KCl, 250  $\mu$ l de una solución A. Disolver en 180 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  Mili-Q (MQ), ajustar el pH a 7.0 con NaOH y aforar a 250 ml con  $\text{H}_2\text{O}$ , esterilizar a 120°C (1.05  $\text{Kg}/\text{cm}^2$ ) durante 20 minutos. Dejar enfriar aproximadamente a 35°C y agregar 500  $\mu$ l de la solución B, más 250  $\mu$ l de la solución C y por último agregar 7.5  $\mu$ g/ml de eritromicina.

#### Medio 2xTY:

Por litro: 16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de Na Cl.

#### Medio TYE:

Por litro: 15 g de bacto-agar, 8 g de NaCl, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura.

Medio TYE 0.7%: Medio TYE más 0.7% de bacto-agar. Esterilizar.

#### Cajas 2xTY, TYE o SP:

Medio (2xTY, TYE ó SP) más 15 g/l de agar, secar las cajas por 15 minutos en campana de flujo continuo y almacenarlas a 4°C.

NOTA: todos los medios de cultivo se esterilizan a 120°C (1.05  $\text{Kg}/\text{cm}^2$ ) durante 20 minutos, almacenándose a temperatura ambiente.

## Soluciones:

Solución A: 0.198 g de  $MnCl_2$  en 100 ml de  $H_2O$  Mili-Q.

Solución B: 1.83 g de  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  en 50 ml de  $H_2SO_4$  1N (1.4 ml  $H_2SO_4$ ).

Solución C: 4.90 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  en 50 ml de  $H_2O$  Mili-Q.

NOTA: estas tres soluciones se esterilizan a  $120^\circ C$  ( $1.05 \text{ Kg/cm}^2$ ) durante 20 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

## Amortiguador de carbonatos:

$Na_2CO_3$  5.5 g/100ml.

$NaHCO_3$  4.2 g/100ml.

Disolver la solución B en 50 ml de  $H_2O$ -MQ, agregar aproximadamente 4.4 ml o más de la solución A para llevar a un pH 10.2 (si se satura subirlo con NaOH y aforar a 100 ml), esta solución estará a 5X.

2% LPBS: solución PBS más 2% de leche descremada (Carnation).

PBS: 5.84 g NaCl, 4.72 g  $Na_2HPO_4$  y 2.64 g  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , pH 7.2 en 1 litro, esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

PMSF: 174.2 mg en 10 ml de isopropanol.

TE: EDTA 1 mM , Tris-HCl 100 mM , ajustar pH a 7.5.

Tetrametilbencidina:  $100 \mu\text{g/ml}$  en 100 mM de acetato de sodio, pH 6.0.



Trietilamina 100 mM: 700  $\mu$  l de trietilamina (7.18 M) en 50 ml H<sub>2</sub>O.

Tripsina 10 mg/ml: 0.01g de tripsina en 1 ml de HCl 1 mM más CaCl<sub>2</sub> 20 mM.

### Geles:

Gel de poliacrilamida al 10% (1 gel) :

Gel separador: 1.65 ml de bisacrilamida 30%/0.8%, 1.25 ml Tris-HCl (1 M pH 8.8), 2 ml H<sub>2</sub>O, 50  $\mu$ l de SDS 10%, 50  $\mu$ l de persulfato de amonio 10%, y 2  $\mu$ l de TEMED.

Gel concentrador: 330  $\mu$ l de bisacrilamida 30%/0.8%, 250  $\mu$ l de Tris-HCl (1 M pH 6.8), 1.4 ml de H<sub>2</sub>O, 20  $\mu$ l de SDS 10%, 20  $\mu$ l de persulfato de amonio 10% y por último 2  $\mu$ l de TEMED.

## BIBLIOGRAFIA

- Amersdorfer P., C. Wong, S. Chen, T. Smith, S. Deshpande, R. Sheridan, R. Finnern y J. D. Marks. (1997). Molecular Characterization of murine humoral immune response to botulinum neurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries. *Infection and Immunity*. **65** (9): 3743-3752.
- Aranda, E., J. Sanchez, M. Peferoen, L. Güereca and A. Bravo. (1996). Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. of Invertebrate Pathology*. **68**: 203 -212.
- Arap W. R. Pasqualini y E. Ruoslahti. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*. **279**: 377-380.
- Armstrong N., N. B. Adey, S. J. McConnell y B. K. Kay. (1996). Vectors for phage display. En Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual (B. K. Kay, J. Winter y J. McCafferty). Academic press. San Diego California. p.p. 35-53.
- Aronson A. I., D. Wu y Ch. Zhang. (1995). Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol*. **177** (14): 4059-4065.
- Barbas III C.F., W. Amberg, A. Simoncsits, T.M. Jones y R.A. Lerner. (1993). Selection of human anti-hapten antibodies from semisynthetic libraries. *Gene*. **137**: 57-62.
- Barbas III C. F., D. Hu, N. Dunlop, L. Sawyer, D. Cababa, R. M. hendry, P. L. Nara y D. R. Burton. (1994). *In vitro* evolution of a neutralizing humarr antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc. natl. Acad. Sci*. **91**: 3809-3813.
- Bass S., R. Greene y J. A. Wells. (1990). Hormone phage: an enrichment method for variantproteins with altered binding properties. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*. **8**: 309-314.
- Bravo, A. (1997). Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol*. **179** (9): 2793-2801.

- Chester K. A. y R. E. Hawkins. (1995). Clinical issues in antibody desing. *TIBTECH*. **13**: 294-300.
- Chowdhury P.S., J. L. Viner, R. Beers e I. Pastan. (1998). Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 669-674.
- Clackson T. H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths y G. Winter. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*. **352**: 624-628.
- Clark M.A., N. J. Hawkins, A. Papaioannou, R. J. Fiddes y R. L. Ward. (1997). Isolation of human anti-*c-erbB-2* Fabs from a lymph node-derived phage display library. *Clin Exp. Immunol.* **109**: 166-174.
- Crickmore N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, B. Lambert, D. Lereclus, C. Gawron-Burke, D. H. Dean. (1995). "In Society for invertebrate pathology 28th annual meeting abstracts": p. 14, Ithica, USA.
- Dean D. H., F. Rajamohan, M. K. Lee, S.- J. Wu, X. J. Chen, E. Alcantara y S. R. Hussain. (1996). Probing mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis - a minireview. *Gene*. **179**: 111-117.
- Ellar D. J. (1997). The structure and function of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins and prospects for biopesticide improvement. *BCPC Symposium proceedings*. (68): 83-100.
- Garrard L.J. y E. A. Zhukovsky. (1992). Antibody expression in bacteriophage systems: the future of monoclonal antibodies. *Curr. Opinion Biotech.* **3**: 474-480.
- Gill S. S., E. A. Cowlws y V. Francis. (1995). Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* **270** (45): 27277-27282.
- Gramatikoff K., O. Georgiev y W. Schaffner. (1994). Direct interaction rescue, a novel filamentous phage technique to study protein-protein interactions. *Nucleic Acids research*. **22** (25): 5761-5762.

- Grant R. A., T. Ch. Lin, W. Konigsberg y R. E. Webster. (1981). Structure of the filamentous bacteriophage fl. *J. Bacteriol. Chem.* **256** (1): 539-546.
- Griffiths A., M. Malmqvist, J. D. Marks, J. M. Bye, M. J. Embleton, J. McCafferty, M. Baier, K. P. Hollinger, B. D. Gorick, N. C. H. Jones, H. R. Hoogenboom y G. Winter. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* **12** (2): 725-734.
- Griffiths A., S. C. Williams, O. Hartley, I. M. Tomlinson, P. Waterhouse, W. L. Crosby, R. E. Kontermann, P. T. Jones, N. M. Low, T. J. Allison, T. D. Prospero, H. R. Hoogenboom, A. Nissim, J. P. L. Cox, J. L. Harrison, M. Zaccolo, E. Gherardi y G. Winter. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* **13** (14): 3245-3260.
- Grochulski P., L. Masson, S. Borisova, M. P. Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau y M. Cygler. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**: 447-464.
- Hawkins R. E., S. J. Russell y G. Winter. (1992). Selection of phage antibodies by binding affinity: mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* **226**: 889-896.
- Höfte, H. y H. R. Whiteley. (1989). Insecticidal Crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews.* **53** (2): 242-255.
- Hoogenboom H. R., A. Griffiths, K. S. Johnson, D. J. Chiswell, P. Hudson y G. Winter. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucl. Acids res.* **19**(15): 4133-4137.
- Hoogenboom H. R. (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *TIBTECH.* **15**: 62-70.
- Huse W. D., L. Sastry, S. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovic y R. A. Lerner. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science.* **246**: 1275-1281.

- Jupin I. y B. Gronenborn. (1995). Abundant, easy and reproducible production of single-stranded DNA from phagemids using helper phage-infected competent cells. *Nucl. Acids res.* **23** (3): 535-536.
- Kasman L.M., A.A. Lukowiak, S. F. Garczynski, R. J. Mcnall, P. Youngman y M. J. Adang. (1998). Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (8): 2995-3003.
- Keeton T. P. y L. A. Bulla Jr. (1997). Ligand specificity and affinity of BT-R<sub>1</sub>, the *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (9): 3419-3425.
- Knight, P. J. K., N. Crickmore y D. J. Ellar. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11** (3): 429-436.
- Knight, P. J. K., B. H. Knowles y D. Ellar. (1995). Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. Bacteriol. Chem.* **270** (30): 17765-17770.
- Knowles, B. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxin. *Advances in Insect Physiology.* **24**: 275-308.
- Kruif J., E. Boel y T. Logtenberg. (1995). Selection and application of Human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J. Mol. Biol.* **248**: 97-105.
- Lee M. K., R. E. Milne, A. Z. Ge y D. H. Dean. (1992). Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *J. Mol. Biochem.* **267** (5): 3115-3121.
- Lee M. K., B.A. Young y D.H. Dean. (1995). Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different Gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216** (1). 306-312.
- Li, J., J. Carol y D.J. Ellar. (1991). Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* **353**: 815-821.

Lorence A., A. Darszon, C. Díaz, A. Liévano, R. Quintero y A. Bravo. (1995).  $\delta$ -Endotoxin introduce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **360**: 217-222.

Lu H., F. Rajamohan y D. H. Dean. (1994). Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* **176** (17): 5554-5559.

Maagd R. A., S. G. Kwa, H. van der Klei, T. Tamamoto, B. Schipper, J. M. Vlak, W. J. Stiekema y D. Bosch. (1996). Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (5): 1537-1543.

Malmborg A., E. Söderlind, L. Frost y C. A. K. Borrebaeck. (1997). Selective phage infection mediated by epitope expression on F pilus. *J. Mol. Biol.* **273**: 544-441.

Marks J.D., H. R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A. D. Griffiths y G. Winter. (1991). By-passing Immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**: 581-597.

Marks J. D. A. D. Griffiths, M. Malmqvist, T. P. Clackson, J. M. Bye y G. Winter. (1992). By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology.* **10**: 779-783.

Marks J. D., W. H. Ouwehand, J. M. Bye, R. Finnern, B. D. Gorick, D. Voak, S. J. Thorpe, N. C. Hughes-Jones y G. Winter. (1993). Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library. *BioTechnology.* **11**:1145-1148.

Mazari R., P. Edomi, R. K. Bhatnagar, S. Ahmad, A. Selvapandiyan y A. Bradbury. (1997). Phage display of *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin. *FEBS Lett.* **411**: 27-31.

McCafferty J., A. D. Griffiths, G. Winter y D. J. Chiswell. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* **348**: 552-554.

Model P. y M. Russel. (1988). Filamentous bacteriophage. En *The bacteriophages* (R. Calendar). Plenum publishing Corporation. The Rockefeller University. New York. 2: 375-454

Nissim A., H. R. Hoogenboom, I. M. Tomlinson, G. Flynn, C. Midgley, D. Lane y G. Winter. 1994. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* 13 (3): 692-698.

Palmer D. B., A. J. T. George George y M.A. Ritter. (1997). Selection of antibodies to cell surface determinants on mouse thymic epithelial cells using a phage display library. *Immunology.* 91: 473-478.

Pasqualini R. y E. Ruoslahti. (1996). Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature.* 380: 364-366.

Pietrantonio, P.V. y S.S. Gill. (1996). *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action on the insect midgut. En *Biology of the insect midgut* (M. J. Lehane y P.F. Billingsley). Chapman & Hall, London. p.p. 345-372.

Rajamohan F., E. Alcantara, M. K. Lee, X. J. Chen, A. Curtiss y D. H. Dean. (1995). Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb  $\delta$ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 177 (9): 2276-2282.

Rajamohan, F., J. A. Cotrill, F. Gould y D. H. Dean. (1996). Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIA(b)  $\delta$ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biological Chem.* 271 (5): 2390-2396.

Rajamohan F., S-R. A. Hussain, J. A. Cotrill, F. Gould y D. H. Dean. (1996). Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb  $\delta$ -endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J. Biol. Chem.* 271 (41): 25220-25226.

Rajamohan F., O. Alzate, J. A. Cotrill, A. Curtiss y D. H. Dean. (1996). Protein engineering of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity and toward gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14338-14343.

Rajamohan F., M. K. Lee y D. H. Dean. (1998). *Bacillus thuringiensis* Insecticidal proteins: molecular lode of action. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 60: 1-27.

Schwartz J. L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau y E. Rosseau. (1993). Lepidopteran-specific crystal from *Bacillus thuringiensis* form cation-and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membrane Biol.* **132**: 53-62.

Smedley D.P. y D.J. Ellar. (1996). Mutagenesis of tree surface exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology.* **142**:1617 -1624.

Smith G.P. (1985). Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* **228**: 1315-1316.

Smith G.P. (1991). Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Current Opinon in Biotechnology.* **2**:668-673.

Smith G.P. (1992). Surface display and peptide libraries. *Gene.* **128** (1): 1-2.

Soumillion P. L., L. Jespers, M. Bouchet, J. M.-Brynaert, G. Winter y J. Fastrez. (1994). Selection of  $\beta$ -lactamase on filamentous bacteriophage by catalitic activity. *J. Mol. Biol.* **237**: 415-422.

Srikantan V. B. Wang, M.A. Satre, K.E. Ugen, K. Dang, F. Scales, A. P. Godillot, W. V. Williams y D. B. Weiner. (1994). Cloning and biological characterization of human single-chain Fv fragments that mediate neutralization of HIV-1. *AIDS.* **8**: 1525-1532.

Thompson J., T. Pope, J.S. Tung, Ch. Chan, G. Hollis, G. Mark y K. S. Johnson. (1996). Affinity maturation of a high-affinity human monoclonal antibody against the third hypervariable loop of human immunodeficiency virus: use of phage display to improve affinity and broaden strain reactivity. *J. Mol. Biol.* **256**: 77-88.

Uemura T., H. Ihara, A. Wadano y M. Himeno. (1992). Fluorometric assay of potential change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* . *Biosci. Biotech. Biochem.* **56** (12): 1976-1979.



- Vadlamudi R.K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji y L. A. Bulla Jr. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biological Chem.* **270** (10): 5490-5494.
- Van Rie J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. V. Mellaert. (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**: 239-247.
- Van Rie J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. V. Mellaert. (1990). Receptors on the border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *App. Environ. Microbiol.* **56** (5): 1378-1385.
- Vaughan T. J., A. J. Williams, K. Pritchard, J. K. Osboun, A. R. Pope, J. C. Earnshaw, J. McCafferty, R. A. Hodits, J. Wilton y K. S. Johnson. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnology.* **14**: 309-314.
- Vaughan T.J., J. K. Osbourn y P. R. Tempest. (1998). Human antibodies by design, *Nature Biotechnology.* **16**: 535-539.
- Ward R.L., M.A. Clark, J. Lees y N.J. Hawkins. (1996). Retrieval of human antibodies from phage-display libraries using enzymatic cleavage. *J. Immunol. Methods.* **189**: 73-82.
- Wells J.A. y H. B. Lowman. (1992). Rapid evolution of peptide and protein binding properties in vitro. *Curr. Opinon Biotech.* **3**: 355-362.
- Winter G. y C. Milstein. (1991). Man-made antibodies. *Nature.* **349**: 293-298.
- Wirsching F., T. Opitz, R. Dietrich y A. Schwienhorst. (1997). Display of functional thrombin inhibitor hirudin on the surface of phage M13. *Gene.* **204**: 177-184.
- Wolfersberger M. G., X. J. Chen y D. H. Dean. (1996). Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombix mori* midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1): 279-282.

Wu S. J. y D. H. Dean. (1996). Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII $\delta$ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* **255**: 628-640.

Yang W. P., K. green. S. P. Sweeney, A. T. Briones, D. R. Burton y C. Barbas III. (1995). CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent Human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* **254**: 392-403.

Zhong G. G. P. Smith. J. Berry y R. C. Brunham. (1994). Conformational mimicry of a chlamydial neutralization epitope on filamentous phage. *J. Biol. Chem.* **269** (39): 24183-24188.