

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD FORMADORA DE
PORO DE DIFERENTES δ -ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*”.**

23

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

SILVIA TENORIO SALGADO

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2000



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.

DEDICATORIAS.

A mis padres por el amor incondicional que me han dado durante todo este tiempo.

A Ernesto por todo el cariño que me ha dado y por todo lo que hemos compartido.

A mis abuelos y a la memoria de mis abuelos.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco profundamente a la Dra. Alejandra Bravo por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por haber dirigido este trabajo y por sus atinados consejos que me han ayudado a crecer profesionalmente.

Agradezco a la Dra. Alejandra Bravo, a la Dra. Gloria Saab, al Dr. Armando Gómez Puyou, al Dr. Lourival Possani y al Dr. Omar Pantoja por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Peña y a su técnico Jorge Ramírez por el apoyo técnico que me brindaron.

A Jorge y a Laura por todo el apoyo que brindaron para la realización de este trabajo y principalmente por su amistad.

A todos mis compañeros de laboratorio, Polo, Raúl, Maru, Lupe.

A María Luisa, Juan, Osvaldo, Isabel y Martín.

Al Dr. Alberto Darszon y a todo su grupo de trabajo por las incontables veces que me brindaron ayuda.

A Sergio Blancas y a Alejandro Uribe.

Y por último quiero agradecer enormemente a mis amigas, Teresa y Esmeralda por su gran amistad.

CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Introducción	2
El genero <i>Bacillus</i>	2
Las δ -endotoxinas	3
Estructura tridimensional de las δ -endotoxinas	4
Bloques conservados	5
Intestino de los artrópodos	8
Diferencias en el lumen intestinal de lepidópteros, dípteros y coleópteros	9
Mecanismo de acción de las toxinas Cry	10
Solubilización	10
Activación	11
Unión de la toxina al receptor	12
Oligomerización	14
Inserción a la membrana	14
Actividad formadora de poro	16
Análisis filogenético	17
3. Hipótesis	21
4. Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
5. Materiales y métodos	22
Cepas bacterianas	22
Condiciones de crecimiento	22
Purificación y activación de las toxinas	22
Purificación de los cristales	22
Solubilización	23
Activación	23
Insectos empleados	23
Purificación de vesículas de la mirovellocidad apical del epitelio del intestino medio	24
Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry	25
Actividad enzimática de la aminopeptidasa	25
Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina	25
Actividad de la citocromo C oxidasa	26

Determinación del potencial de membrana	26
Actividad formadora de poro	27
6. Resultados y discusión	28
Purificación de VMMA de intestino medio de el lepidóptero <i>M. sexta</i> y el coleóptero <i>T. molitor</i>	28
Efecto del pH en el espectro de emisión del colorante diS-C3(5)	31
Efecto del pH en la calibración con valinomicina en las VMMA de <i>M. sexta</i> y <i>T. molitor</i>	32
Cambios del potencial de reposo de la membrana dependientes del pH	33
Efecto del pH en la actividad formadora de poro De las toxinas Cry1A	37
Selectividad iónica de la toxina Cry1Ac en función del pH	41
Ensayos de unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en VMMA de <i>M. sexta</i>	43
7. Conclusiones	45
8. Apéndice	46
9. Referencias	47

ABREVIATURAS

CHES	2-[N-Ciclohexilamino]-ácido ethanosulfónico
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido ethilenediaminotetraacético
EGTA	Ácido ethil glicol-bis(b-aminoethyl ether N,N,N',N'-tetra acético
E_{K^+}	Potencial de equilibrio del potasio
E_m	Potencial de reposo de la membrana
HEPES	N-[2-Hidroxiethyl] piperazina-N'[2-ácido ethanosulfónico]
MES	2-[N-Morfolino] ácido ethanosulfónico
VMMA	Vesículas de membrana de microvelocidad apical

1. RESUMEN

Las proteínas Cry son producidas por *Bacillus thuringiensis* como cristales insolubles durante la esporulación. Estas proteínas son tóxicas a las larvas de varios ordenes de insectos. Cuando el cristal es ingerido por la larva susceptible se solubiliza liberando la protoxina y se procesa a toxina. La toxina se une al receptor y posteriormente forma un poro, provocando el hinchamiento de la célula y finalmente la citólisis.

Las proteínas Cry están formadas por tres dominios funcionales. El dominio I está formado por 7 α -hélices y tiene la actividad formadora de poro. El dominio II está constituido por tres hojas β -antiparalelas, está involucrado en el reconocimiento y unión al receptor. El dominio III comprende un β -sandwich, se propone que le da estabilidad a la toxina e interviene en el reconocimiento del receptor.

Las proteínas Cry son tóxicas a varios ordenes de insectos, como lepidópteros, coleópteros y dípteros. Cada orden posee diferentes características en el lumen intestinal, desde pH, tipos celulares y composición fosfolipídica de las membranas del epitelio intestinal. En los lepidópteros el pH del lumen intestinal es alcalino mientras que en los coleópteros es ácido.

Por otro lado el análisis evolutivo de los dominios estructurales de las diferentes proteínas Cry mostró que existen diferencias importantes en el dominio I, que correlacionan con la especificidad de las toxinas. Con base en las diferencias en el lumen intestinal de los diferentes ordenes de insectos y la divergencia en el análisis evolutivo de los dominios I se sugiere que cada dominio I se seleccionó por actuar en diferentes condiciones intestinales. Por esto estamos interesados en estudiar la actividad formadora de poro de las diferentes toxinas Cry con relación al pH.

La actividad formadora de poro se analizó midiendo los cambios de potencial de membrana provocados por la toxina en vesículas de microvelocidad de membrana apical de intestino medio (VMMA) del lepidóptero *M. sexta* y el coleóptero *T. molitor*.

En este trabajo se encontró que la actividad de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac fue muy baja en VMMA del lepidóptero *Manduca sexta* cuando se ensayaron a pH 8. Al ensayar estas toxinas a pH 10 se observó que la actividad aumentó de 5 a 25 veces. El aumento de la actividad de las toxinas Cry al aumentar el pH extravesicular correlaciona con el pH que se encuentra en el lumen intestinal de *M. sexta*. También se observó que el pH no modifica la selectividad iónica de la toxina Cry1Ac en membranas de *M. sexta*. En VMMA del coleóptero *Tenebrio molitor*, un insecto con un pH de 5 en el lumen intestinal, resultados preliminares mostraron que la toxina Cry3A tiene mayor actividad a pH 4.5 mientras que a pH 8 y 10 la actividad es nula.

Por otro lado, este trabajo nos permitió profundizar en la caracterización de las membranas del epitelio intestinal ya que los resultados obtenidos indican que el potencial de membrana de las VMMA de *M. sexta* y de *T. molitor* es dependiente del pH cuando existe un gradiente a través de la membrana.

2. INTRODUCCION

El Género *Bacillus*.

El género *Bacillus* está constituido por bacterias gram positivas, aeróbicas y capaces de esporular. Este género ha recibido mucha atención en el ámbito comercial y en la investigación, ya que la mayoría de las bacterias que lo conforman son patógenos de insectos. Dentro de este género se encuentra un grupo de bacterias que produce y acumula en el citoplasma uno ó varios cristales paraesporales, *Bacillus popilliae*, *B. larvae*, *B. sphaericus* y *B. thuringiensis*. (Ellar, 1990). Se ha comprobado que los cuerpos paraesporales de las últimas dos especies son insecticidas, por lo que son las bacterias que con mayor frecuencia se utilizan para la formulación de bioinsecticidas. *B. thuringiensis* ha sido el que mayor atención ha recibido, ya que posee una alta especificidad biológica y produce toxinas activas a diferentes ordenes de insectos, tales como lepidópteros, coleópteros y dípteros. En los últimos años se han aislado cepas tóxicas a himenópteros, homópteros, malofaga y ortóptera. También se han encontrado cepas tóxicas a diferentes fila como nemátodos, protozoarios y ácaros (Rajamohan *et al*, 1998, Schnepf *et al*, 1998). *B. thuringiensis* no afecta a otros insectos que estén fuera de su espectro de actividad, como las abejas y entomófagos, tampoco se ha observado envenenamiento en invertebrados ni en otros vertebrados, incluyendo al hombre; no induce la proliferación de plagas secundarias y permanecen poco tiempo en el ambiente. Además, las proteínas que conforman la inclusión paraesporal de *B. thuringiensis* representan un sistema interesante para estudiar la relación estructura-función de estas proteínas y entender el mecanismo de acción. Esto podría sentar las bases para en un futuro diseñar mejores insecticidas, más eficientes y con un espectro de actividad más amplio (Feitelson *et al.*, 1992., Krieg y Miltenberger, 1984)

B. thuringiensis es un microorganismo ubicuo ya que se ha encontrado en diferentes regiones del mundo y en diferentes ecosistemas (Martin *et al.* 1989). *B. thuringiensis* es considerada como una bacteria del suelo, que también se ha aislado de restos de productos almacenados y hojas de plantas, charcos y arroyos. La característica compartida por todos estos ambientes es que son sitios en donde las larvas de los insectos se

alimentan; y obviamente, también se ha aislado de insectos muertos (Aronson, 1993). Esta bacteria también se ha aislado de sitios extraños como nidos y heces de pájaros y de murciélagos (Berhard *et al.* 1997). De hecho se propone que ha existido una coevolución de la interacción entre *B. thuringiensis* y los insectos susceptibles (Fietelson *et al.*, 1992).

LAS δ -ENDOTOXINAS

B. thuringiensis produce una gran variedad de toxinas. Las α -exotoxinas o exotoxinas termolábiles y que probablemente son lectinas tipo C. Las β -exotoxinas, que son toxinas que funcionan como análogos del ATP y las δ -endotoxinas, proteínas que se acumulan en un cristal (Fig. 1). Dicho cristal puede estar formado por una o más cadenas polipeptídicas. El peso molecular de estos polipéptidos varía de entre 28 y 130 kDa (Faust y Bulla, 1982; Whiteley y Schnepf, 1986).



**Figura 1. Fotomicrografía electrónica de un esporangio de *B. thuringiensis*.
E= espora, C= cristal.**

Las δ -endotoxinas forman dos familias multigénicas, las toxinas Cry y las toxinas Cyt (Höfte y Whiteley, 1989., Knowles *et al.*, 1994), las cuales representan dos grupos muy diferentes ya que no comparten similitud a nivel de secuencia primaria y poseen una estructura terciaria completamente diferente. Recientemente se identificó un nuevo tipo de proteínas insecticidas que *B. thuringiensis* produce en la fase vegetativa del cultivo y se denominan proteínas Vip (proteínas insecticidas de la fase vegetativa). Estas proteínas no comparten similitud con las δ -endotoxinas y son tóxicas a varios lepidópteros y coleópteros (Yu *et al.*, 1997).

Se sabe que en la mayoría de los casos los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* están formados por más de una toxina, algunas veces tóxicas a más de un insecto (Ellar, 1990). También se han encontrado cepas que poseen más de un cristal paraesporal.

Höfte y Whiteley (1989) propusieron una clasificación para las proteínas Cry que hasta ese momento se conocían, agrupándolas en cuatro clases de acuerdo a su especificidad. Las toxinas CryI activas en lepidópteros, las toxinas CryII que son proteínas de menor tamaño y específicas para lepidópteros y dípteros, las toxinas CryIII activas en coleópteros y las toxinas CryIV específicas para dípteros. Con esta clasificación se presentaron varios problemas al tratar de integrar toxinas raras, como aquellas que tenían especificidad doble (lepidópteros y coleópteros) o que presentaban alta similitud en secuencia y actividad contra diferentes ordenes de insectos. En 1993 surgió una nueva clasificación para las proteínas Cry tomando en cuenta la identidad de la estructura primaria, en la que las 174 secuencias Cry reportadas a la fecha quedan agrupadas en 30 familias y se incluyeron dos familias de toxinas Cyt (Crickmore *et al.*, 1998).

La mayoría de los genes que codifican para las toxinas Cry se encuentran en plásmidos (González, *et al.*, 1981., Jarret, 1985), incluyendo plásmidos conjugativos (Schnepf, *et al.*, 1998), muchas veces asociados con elementos genéticos móviles, aunque también hay excepciones tales como los genes *cry* que se encuentran integrados al cromosoma (Jarrett, 1985).

Estructura tridimensional de las δ -endotoxinas

Hasta el momento se ha resuelto la estructura tridimensional de tres δ -endotoxinas. Dos proteínas Cry y una toxina Cyt (Fig. 2). Las proteínas Cry que se han resuelto son; la toxina Cry1Aa activa en lepidópteros, (Groculski *et al.*, 1995) y la toxina Cry3A (Li *et al.*, 1991) activa en coleópteros. La identidad compartida en la secuencia de aminoácidos de la toxina Cry1Aa y la toxina Cry3A es del 36% (Schnepf *et al.*, 1998). También se resolvió la estructura tridimensional de la toxina Cyt2A, una toxina completamente diferente que se encuentra en cepas de *B. thuringiensis* tóxicas a dípteros (Fig.2).

El análisis de la estructura tridimensional de las proteínas Cry1Aa y Cry3A, reveló que existe una alta conservación entre la estructura de estas proteínas. Ambas proteínas están organizadas de forma similar, por tres dominios funcionales. La similitud en estructura tridimensional entre las proteínas Cry1Aa y Cry3A es tan alta que los dominios pueden

superponerse (Schnepf *et al.*, 1998). El dominio I, que abarca de los residuos 33 al 253 para la toxina Cry1Aa y del 63 al 290 para Cry3A en el extremo amino terminal, está formado por 7 α -hélices antiparalelas con la α -hélice 5 en el centro rodeada por las seis restantes (Fig. 3). Las α -hélices que componen este dominio tienen un carácter anfipático. Las α -hélices 3 a la 7 tienen un tamaño de 30Å, siendo la α -hélice 6 la de mayor longitud con 40Å. Este dominio se propone que está involucrado en la formación del poro en la membrana de las células epiteliales de los insectos blanco (Bravo, 1997, Li *et al.*, 1991, Wu y Aronson, 1992).

El dominio II está formado por los residuos 265 al 461 para la proteína Cry1Aa y por los residuos 291 a 500 para la toxina Cry3A. Este dominio está constituido por tres hojas β -antiparalelas y se propone que lleva a cabo el reconocimiento y la unión al receptor.

El dominio III comprende de los residuos 463 a 609 para la toxina Cry1Aa y del 501 al 644 para la toxina Cry3A y está constituido por una estructura del tipo β -sandwich. La función de este dominio todavía no está bien dilucidada, pero se propone que le da estabilidad a la toxina (Grochulski *et al.*, 1995, Li *et al.*, 1991) y también interviene en el reconocimiento al receptor (Burton, 1999, de Maagd, 1999, Lee *et al.*, 1999).

Las toxinas Cyt no comparten homología a nivel de estructura primaria con las toxinas Cry ni a nivel de la estructura terciaria (Li *et al.*, 1996) (Fig. 2). La estructura tridimensional está formada solamente por un dominio, compuesto por dos α -hélices externas rodeando una estructura formada por hojas β . Se propone que esta toxina también actúa a nivel de membrana mediante la formación de poro. A diferencia de las toxinas Cry, no se ha reportado ningun receptor para las proteínas Cyt (Schnepf, 1998).

Bloques conservados

Höfte y Whiteley (1989) encontraron en la secuencia de aminoácidos que corresponden a las toxinas Cry, cinco bloques conservados los cuales están separados por secuencias altamente variables de diversos tamaños. Estos bloques se localizan en regiones estructurales importantes, dentro de los dominios individuales o en áreas de contacto entre dominios. El primer bloque comprende la α -hélice 5 y se encuentra en el dominio I. El segundo bloque incluye la mitad carboxilo terminal de la α -hélice 6 toda la α -hélice 7 y la primera hoja β del dominio II. El tercer bloque está formado por la última parte de la hoja

β 11 que forma puentes de hidrógeno con la β 1, en el dominio II. El cuarto bloque corresponde a la hoja β -17 del dominio III y el último bloque está formado por la β -23 del dominio III que corresponde a la parte carboxilo terminal de la proteína. Schnepf *et al* (1998) reportaron que además de estos bloques se encuentran 3 regiones más, localizadas en el extremo carboxilo terminal de la protoxina. Clasificando a las proteínas Cry en tres subgrupos:

El primer subgrupo está compuesto por las proteínas Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9 y Cry10. Estas proteínas presentan los cinco bloques conservados en el extremo carboxilo terminal.

En el segundo subgrupo se encuentran las toxinas Cry5, Cry12 a Cry14 y Cry21 las cuales sólo presentan los bloques homólogos número 1, 2, 4 y 5 mientras que el bloque 3 no se encuentra. Las toxinas de más de 70 kDa poseen tres bloques más 6, 7 y 8, los cuales se localizan en el extremo carboxilo terminal de la protoxina.

El tercer subgrupo está formado por las toxinas Cry2, Cry11 y Cry18 y presentan únicamente el bloque 1 y una variable del bloque 2 pero los otros bloques se encuentran ausentes.

Las δ -endotoxinas Cyt1, Cyt2, Cry6, Cry15 y Cry22 no presentan homología con ningún bloque observado en los otros grupos de toxinas.

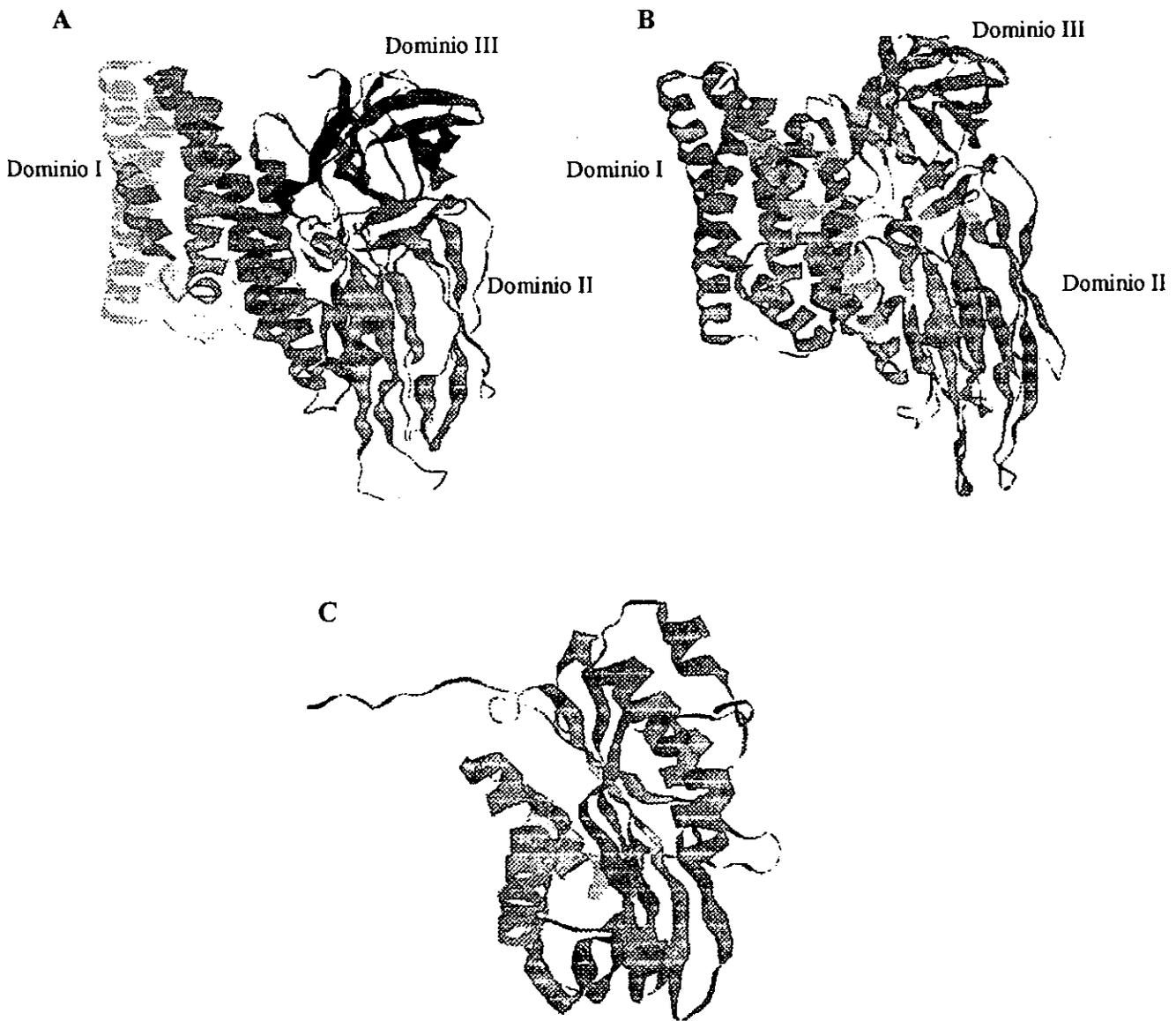


Figura 2. Estructura terciaria de tres δ - endotoxinas. A) Cry1Aa, B) Cry3A y C) Cyt2A. Las toxinas Cry1Aa y Cry3Aa presentan una similitud alta en su estructura, ambas están formadas por tres dominios estructurales. El dominio I posee 7 α -hélices, el dominio II está formado por 3 hojas β y el dominio III es un β -sandwich. El análisis estructural de la toxina Cyt2A mostró una estructura completamente diferente a la de las proteínas Cry. La toxina Cyt2A está formada por un solo dominio, compuesto por un par de horquillas de α -hélices rodeando una estructura de hojas β . Tomado del Protein Data Bank.



Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína Cry1Aa. El dominio I esta formado por 7 α -hélices y la α -hélice 5 esta rodeada por las 6 restantes. Tomado de Gazit et al, 1998

Intestino de los artrópodos

El organo blanco de las toxinas Cry es el intestino medio de las larvas de los insectos. El intestino de los artrópodos está dividido en tres secciones, intestino anterior, intestino medio e intestino posterior (Barnes, 1985). El epitelio del intestino anterior y el posterior están cubiertos con quitina. El intestino anterior tiene las funciones de ingestión, trituración y almacenamiento del alimento. El intestino medio es la región en donde se producen las enzimas digestivas, se realiza la digestión y la absorción de los nutrimentos, mientras que el intestino posterior se encarga de la absorción del agua y la formación de las heces.

Los insectos que más se han estudiado son los lepidópteros, esto se ha debido a su gran tamaño en comparación con los otros ordenes de insectos y a que una gran cantidad de estos insectos son plagas de importancia agrícola.

Diferencias en el lumen intestinal de lepidópteros, coleópteros y dípteros.- El intestino presenta varias modificaciones dentro de los diferentes ordenes de insectos de acuerdo a la dieta y modo de alimentación, presentando diferentes características y tipos celulares para cada orden. Una característica común dentro de los lepidópteros, coleópteros y dípteros es que el intestino medio en el estadio de larva está revestido por una matriz peritrófica en la cara luminal; esta matriz está formada principalmente de proteínas, quitina y azúcares. Enseguida de la matriz peritrófica se encuentra el tejido intestinal que en el caso de los lepidópteros está formado por dos tipos celulares: las células columnares que presentan una superficie apical con microvellocidades y están involucradas en la absorción de los nutrimentos. El segundo tipo celular son las células goblet que presentan una enorme cavidad vacuolar unida a la superficie apical a través de una válvula (Sacchini y Wolfesberger, 1996). El pH del intestino medio en este orden de insectos es alcalino de 8 a 12, mientras que los dípteros poseen un pH igual de alcalino, pero sólo presentan células columnares; y los coleópteros al igual que los dípteros solo presentan células columnares, pero tienen un pH ácido de 4-7 (Clements, 1992., Rajamohan *et al.*, 1998., Sicchini y Wolfesberger, 1996). También la composición fosfolipídica de las membranas y el ion de importancia dentro del epitelio son diferentes para cada orden (Tabla I).

TABLA I. DIFERENCIAS EN EL LUMEN INTESTINAL DE LEPIDÓPTEROS, DÍPTEROS Y COLEÓPTEROS.				
	pH	ION EN MAYOR CONCENTRACIÓN	TIPO CELULAR	LÍPIDOS
LEPIDÓPTEROS	8-12	K+	COLUMNARES Y GOBLET	PC 59% PE 38% PS 3%
DÍPTEROS	9-12	Na+	COLUMNARES	PC 29% PE 50% PS 4% O 17%
COLEÓPTEROS	4-7	?	COLUMNARES	PC 45% PE 43% O 12%

(PC) FOSFATIDIL COLINA, (PE) FOSFATIDIL ETANOLAMINA, (PS) FOSFATIDIL SERINA, (O) OTROS. Datos tomados de: Fast (1966), Jenkin (1976), Clements (1992), Sacchini y Wolfesberger (1996), Rajamohan (1998),

Mecanismo de acción de las toxinas Cry.

El mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha estudiado principalmente en lepidópteros, pero al encontrar una similitud alta entre las estructuras de las toxinas Cry1Aa y Cry3A, una toxina específica para lepidópteros y la otra tóxica a coleópteros, se propone que el mecanismo de acción pudiera ser similar (Knowles, 1994, Schnepf *et al.*, 1998).

Una vez que el cristal paraesporal de *B. thuringiensis* es ingerido por una larva susceptible, este se solubiliza por el pH alcalino y las condiciones reductoras del intestino medio, liberando la protoxina. La protoxina es activada proteolíticamente por las proteasas intrínsecas, quedando un fragmento resistente a proteasas denominado toxina. La toxina se une con alta afinidad a un receptor específico, que se encuentra en la microvellosidad de las células epiteliales del intestino medio. Posteriormente la toxina se inserta irreversiblemente a la membrana plasmática y forma un poro por el cual pasan iones y agua provocando el hinchamiento de las células y finalmente la citólisis (Schnepf *et al.*, 1998).

Solubilización.- La mayoría de las protoxinas específicas para lepidópteros se solubilizan en pH alcalino y bajo condiciones reductoras del intestino del insecto. En algunos casos se ha observado que el grado de toxicidad y resistencia a las proteínas Cry se deben a una solubilización deficiente (Rajamohan *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998)

La insolubilidad de las δ -endotoxinas se debe parcialmente a los puentes disulfuro (Knowles, 1994). En las proteínas Cry de 130 KDa, la mayor parte de los residuos de cisteína se encuentran en los primeros aminoácidos del extremo amino terminal y en el extremo carboxilo terminal de la molécula, estos extremos son removidos en el procesamiento proteolítico de la protoxina (Höfte y Whiteley, 1989).

La mayoría de las larvas de lepidópteros, dípteros y algunos coleópteros tienen un pH extremadamente alcalino y condiciones reductoras en el lumen intestinal, características indispensables para la solubilización de las δ -endotoxinas (Aronson *et al.*, 1991).

Las proteínas Cry con peso molecular de 70 KDa, tales como las toxinas Cry3 tóxicas para coleópteros, quienes presentan un pH ligeramente ácido en el lumen intestinal, no poseen el extremo carboxilo terminal rico en cisteínas, que poseen las proteínas de 130 KDa, sin embargo, siguen formando cristales. En estos casos el empaquetamiento del cristal se da principalmente por la presencia de puentes salinos (Li *et al.*, 1991) Estas proteínas se solubilizan en condiciones de pH muy extremo ya sea mayor de pH 10 ó menor de pH 4 lo

cual resulta paradójico ya que la mayoría de las larvas de coleópteros no presentan esas condiciones de pH en el lumen intestinal (Koller *et al*, 1992). Esto sugiere que podrían existir otras condiciones, además del pH, involucradas en la solubilización de las toxinas Cry en el intestino de los coleópteros (Knowles, 1994).

Activación.- Después de la solubilización hay un procesamiento proteolítico de la protoxina el cual se lleva a cabo por las proteasas que se encuentran en el lumen intestinal de los diferentes insectos blanco.

La mayoría de las proteasas digestivas presentan su actividad máxima dentro de los rangos de pH en el que van a funcionar. En el caso de los lepidópteros que poseen un intestino medio con un pH alcalino, se encuentran proteasas del tipo de las serina-proteasas como la tripsina, quimiotripsina y la elastasa. Estas enzimas son activas en condiciones alcalinas, mientras que las enzimas del tipo cisteína-proteasas no se encuentran en lepidópteros ya que son activas en medios con pH ácido. Sin embargo, en el ambiente ácido del intestino medio de los coleópteros, predominan las cisteína-proteasas. Confirmando esto, se ha observado que en los coleópteros que poseen un pH intestinal alcalino, no se encuentran cisteína-proteasas (Johnson y Felton, 1996).

En las proteínas Cry con peso molecular de los 130 a 140 KDa, como las toxinas Cry1, el corte proteolítico es de aproximadamente 500 residuos en el extremo carboxilo terminal, mientras que en el extremo amino terminal el corte es de aproximadamente 28 aminoácidos. Este procesamiento produce un fragmento resistente a proteasas de 65 a 55 KDa denominado la toxina. El extremo carboxilo terminal se corta secuencialmente en fragmentos de 10 a 35 KDa los cuales son degradados a péptidos más pequeños (Chestukhina *et al*, 1982 y Choma *et al*, 1990).

Existen evidencias que sugieren que las toxinas Cry de 70 KDa pudieran ser formas truncadas de las toxinas de 130 a 140 KDa. *In vitro* algunas proteínas Cry de 70 KDa sufren un procesamiento mayor en el extremo amino terminal que las proteínas Cry1 (Knowles 1994).

Las toxinas Cyt1A de 27 KDa presentan actividad citolítica como protoxina pero después del procesamiento proteolítico a un péptido de 25 KDa su actividad aumenta (Chilcott y Ellar, 1988), a diferencia de la toxina Cyt2A la cual es completamente inactiva antes del procesamiento proteolítico (Knowles *et al*, 1992).

El procesamiento es un factor importante que puede contribuir a la determinación de la especificidad de las proteínas Cry. Se ha demostrado que la toxina Cry1C, que es tóxica

para lepidópteros, al ser activada con tripsina mata al lepidóptero *Pieris brassicae* y cuando esta misma toxina es activada con jugo gástrico del díptero *Aedes aegypti* la toxina mata a estos insectos (Haider y Ellar, 1989a, Abdul-Rauf y Ellar, 1999)

Unión de la toxina al receptor.- Los estudios de unión de las toxinas Cry a membranas de insectos se han realizado principalmente en lepidópteros y en pocas ocasiones en coleópteros. Se ha demostrado que las proteínas Cry atraviesan la matriz peritrófica y posteriormente se unen a la microvellocidad apical del epitelio intestinal (Bravo *et al*, 1992). Se sabe que existen sitios específicos de unión y de alta afinidad localizados en la microvellosidad apical de las células columnares del intestino medio de una gran cantidad de lepidópteros como *M. sexta* (Hofmann *et al*, 1988), *Bombix moris* (Yaoi *et al*, 1997), *Heliotis virescens* (Gill *et al*, 1995), *Plodia interpunctella* (Mohammed *et al*, 1996), *Spodoptera littoralis* (Sanchis y Ellar, 1993) y del coleóptero *Tenebrio molitor* (Belfiore *et al*, 1994), entre otros. Esto se ha demostrado *in vitro* mediante cinéticas de unión y ensayos de competencia utilizando toxinas Cry1 y Cry3 marcadas radioactivamente en VMMA de los diferentes insectos blanco.

Van-Rie *et al* (1989) analizaron la constante de disociación (Kd) de tres toxinas Cry1A, observando que esta se encuentra dentro del rango de nM para los dos lepidópteros *M. sexta* y *Heliotis virescens*:

	<i>M. sexta</i> Kd (nM)	<i>H.virescens</i> Kd (nM)
Cry1Aa	1.5	1.2
Cry1Ab	0.4	0.6
Cry1Ac	0.6	0.8

Algunos autores han podido relacionar la toxicidad de las proteínas Cry con la afinidad de la unión y la cantidad de sitios de unión. Van-Rie *et al* (1990) realizaron ensayos de unión con toxinas marcadas radioactivamente y con VMMA de una población resistente a la toxina Cry1Ab, del lepidóptero *Plodia interpunctella*, observando que en la población resistente había aumentado 50 veces la constante de disociación, en comparación con la población sensible a esta toxina mientras que había aumentado la sensibilidad a la toxina

Cry1C, para la cual habían observado un incremento en la concentración de los sitios de unión para esta toxina en las VMMA de este lepidóptero.

En contraste, existen reportes en donde la unión no correlaciona con la toxicidad tal es el caso del lepidóptero *Lymantria dispar* en donde la toxina con mayor afinidad fue menos tóxica en comparación con la toxina que presentó menor afinidad y que fue más activa (Wolfesberger, 1990). Posteriormente, Liang *et al* (1995) demostraron que la toxina con mayor afinidad presentaba unión reversible mientras que la toxina que tenía menor afinidad se unía irreversiblemente a la membrana. Mediante evidencias de este tipo se dedujo que el mecanismo de unión a la membrana comprende dos pasos: primero unión reversible y segundo unión irreversible (Schnepf *et al*, 1999).

Las proteínas de unión de las toxinas Cry en diferentes insectos se han identificado por análisis de "ligand blot", en este tipo de ensayos se separan las proteínas de membrana a través de un gel de poliacrilamida y después se transfieren a una membrana de nitrocelulosa la cual se incuba con la toxina. Para la mayoría de las proteínas Cry1A se ha observado que existen dos proteínas a las que se unen estas toxinas, una de 120 KDa y la otra de 210 KDa. En el caso del coleóptero *T. molitor* (Belfiore *et al*, 1994) se encontró una proteína de unión de 144 KDa para la toxina Cry3A; mientras que en membranas del díptero *Anopheles stephensi* se encontró una proteína de unión para la toxina Cry11A de 148 KDa y para el mosquito *Tipula oleracea* se observó una proteína de unión de 78 KDa para la misma toxina (Fendelman *et al.*, 1995)

Se ha reportado que la proteína de unión para las toxinas Cry1A en los lepidópteros *Bombyx mori* (Yaoi *et al.*, 1997), *Heliiothis virescens* (Gill *et al.*, 1995), *Lymantria dispar* (Valaitis *et al.*, 1995), *M. sexta* (Knight *et al.*, 1994) y *Plutella xylostella* (Luo *et al*, 1997) es una aminopeptidasa tipo N de 120 KDa. En el caso de *M. sexta* se ha reportado una aminopeptidasa de 107 KDa como la proteína de unión para la toxina Cry1C. Existe otro reporte en donde observan que la proteína de unión para la toxina Cry1Ab en *M. sexta* es una caderina de 210 KDa (Vadlamudi *et al*, 1995).

Mediante mutagénesis dirigida en los residuos 365 a 368 del loop 2 del dominio II de la toxina Cry1Ab; se demostró la importancia de este dominio en la unión de la toxina a su receptor, ya que las mutantes disminuyeron hasta 600 veces su toxicidad debido a una disminución en la unión (Rajamohan *et al*, 1996). También se ha propuesto que el dominio III está involucrado en el reconocimiento del receptor. R. de Maagd *et al* (1996) analizaron una toxina híbrido de Cry1Ab (no tóxica) y Cry1C (tóxica) para *Spodoptera exigua*, en

donde los dominios I y II provenían de la toxina Cry1Ab y el dominio III de la proteína Cry1C, observando que la proteína híbrida era altamente tóxica para este lepidóptero mostrando 10 veces mayor actividad que la toxina Cry1C. También han observado, mediante ensayos de unión con toxinas marcadas con I^{125} y VMMA del insecto susceptible, que al hacer intercambio de dominios entre las toxinas Cry1Ac (tóxica para *M. sexta*) y Cry1C (menos tóxica para *M. sexta*) la toxina híbrida formada por los dominios I y II de Cry1C y el dominio III de Cry1Ac se unía en regiones específicas para Cry1Ac en VMMA de *M. sexta* (de Maagd, 1999).

Como se mencionó las toxinas Cry tienen una interacción altamente específica con su receptor localizado en las membranas del epitelio intestinal de larvas susceptibles. Por el contrario, las toxinas Cyt poseen una actividad citolítica en diferentes tipos celulares de invertebrados y vertebrados incluyendo eritrocitos humanos. Los estudios realizados con esta toxina no han reportado ningún receptor, esto indica un mecanismo de acción completamente diferente al de las toxinas Cry. Se ha demostrado que las toxinas Cyt también actúan a nivel de membrana por lo que se propone un mecanismo similar al de un detergente (Thomas y Ellar, 1983).

Existen evidencias que sugieren que hay una interacción sinérgica entre las toxinas Cry y la toxina Cyt de *B. thuringiensis var. israelensis*, una cepa tóxica a larvas de dípteros, ya que al hacer ensayos de toxicidad con mosquitos utilizando juntas las toxinas Cry y Cyt presentan una actividad 10 veces mayor que la observada al analizar cada una de las toxinas por separado (Chilcott y Ellar, 1988, Delécluse *et al.* 1993).

Oligomerización.- Después de que las toxinas Cry se unen a su receptor se insertan rápida e irreversiblemente a la membrana de las células epiteliales del intestino medio (Wolfesberguer *et al.*, 1986, Van Rie *et al.*, 1989). Y posteriormente forman poros de 0.5 a 1 nm de diámetro (Knowles y Ellar, 1987). A través de análisis de protección osmótica y de estudios de actividad formadora de poro en bicapas lipídicas para las diferentes proteínas Cry (Slatin *et al.*, 1990., Schwartz *et al.*, 1993., Grochulski *et al.*, 1995., Lorence *et al.*, 1995) hacen suponer que las toxinas Cry forman oligómeros de 4 a 6 monómeros (Knowles y Ellar, 1987, Schwartz *et al.*, 1997). Recientemente Güereca y Bravo (1999) observaron, mediante análisis de cromatografía de exclusión y en electroforesis en geles de poli(acrilamida) no desnaturalizantes, que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1C y Cry1D se encuentran como una mezcla de monómeros y agregados de más de 10 monómeros, mientras que la toxina Cry3A se encuentra como monómero a pH 10 y agregada a pH

neutro, sugiriendo que la oligomerización de la toxina ocurre después de la inserción a la membrana.

Inserción a la membrana.- Existen dos modelos de inserción a la membrana para las proteínas Cry. Ambos modelos proponen que la unión de la toxina a su receptor dispara un cambio conformacional de la toxina, el cual permite que el dominio I se inserte a la membrana. El modelo del abrecartas propone que al unirse la toxina al receptor induce un cambio conformacional en el dominio I para que las α -hélices 5 y 6 queden expuestas y se inserten en la membrana sin participación posterior de ninguno de los otros dominios (Knowles, 1994).

El modelo de la sombrilla al igual que el anterior modelo propone que la unión de la toxina al receptor dispara un cambio conformacional el cual permite que las α -hélices 4 y 5 se inserten en la membrana como una horquilla mientras que el resto de las hélices se abren quedando su cara hidrofóbica hacia la membrana de una manera similar a una sombrilla (Knowles, 1994).

El modelo de sombrilla es el modelo que hasta el momento se apoya con mayor número de evidencias experimentales. Una de estas evidencias experimentales fue aportada por Swartz *et al* (1997) que estudiaron la actividad formadora de poro en la proteína Cry1Aa, en donde introdujeron residuos de cisteínas en sitios específicos del dominio I con el propósito de formar puentes disulfuro entre algunas hélices y eliminar el movimiento de las α -hélice 4 y 5, además observaron que estas toxinas mutadas a diferencia de la toxina silvestre, podían formar poro en bicapas lipídicas planas sólo en presencia de algún agente reductor, lo cual sugiere que las α -hélices 4 y 5 deben mantener flexibilidad en su estructura para poderse insertar en la membrana. También observaron que en mutantes de la misma toxina en donde habían introducido un puente disulfuro entre el dominio I y el dominio II tampoco había actividad en ausencia del agente reductor, mientras que al adicionar el agente reductor se reanudaba su actividad formadora de poro. Indicando que también se necesita un movimiento que separe los dominios I y II durante la inserción.

Una evidencia que apoya indirectamente el modelo de sombrilla fue aportada por Aronson *et al* (1995) que al analizar diferentes mutantes en la α -hélice 6 observaron que esta hélice podía aceptar diversas sustituciones sin que la toxina perdiera su actividad en *M. sexta*, *Heliothis virescens* y *Trichoplusia ni* a diferencia de la toxinas en las cuales se han obtenido mutantes en las α -hélices 4 y 5. Estos experimentos apoyan indirectamente la hipótesis de que las α -hélices 4 y 5 son las hélices que se insertan en la membrana.

Recientemente se aportaron más evidencias apoyando el modelo de sombrilla. Gazit y colaboradores (1998) utilizaron péptidos sintéticos de las diferentes α -hélices del dominio I marcados con un colorante fluorescente y observaron que las α -hélices 4 y 5 se insertan a la membrana mientras que las α -hélices 2, 3, 6 y 7 se mantienen unidas a la superficie de la membrana.

Estas evidencias apoyan la hipótesis de que tanto el dominio I como el resto de la molécula sufre cambios estructurales para poder insertarse a la membrana.

Actividad formadora de poro.- Después de que las toxinas Cry se unen a su receptor en las células del epitelio intestinal, se insertan en la membrana y destruyen el balance osmótico de la membrana provocando cambios en la permeabilidad. Estos cambios son causados por la formación de canales iónicos por donde entra agua y iones dando como resultado el hinchamiento de la célula y finalmente la citólisis.

La actividad formadora de poro de las δ -endotoxinas se ha estudiado a través de diferentes técnicas. Harvey y Wolfesberger (1979) utilizaron intestinos completos de insectos susceptibles estudiando la corriente de corto circuito a través de un voltage fijo. Carrol y Ellar (1993) emplearon el hinchamiento de vesículas de microvellosidad apical de intestino para estudiar el mecanismo de acción de las δ -endotoxinas mediante un sistema que mide la dispersión de la luz. También se han empleado células de cultivo de tejidos de líneas celulares provenientes de diferentes insectos susceptibles (Knowles y Ellar 1987, Schwartz *et al*, 1991), liposomas de fosfolípidos sintéticos (English *et al*, 1991, Gazit y Shai 1993) y bicapas lipídicas planas (Lorence *et al*, 1995, Gazit y Shai 1995).

Al observar similitud entre toxinas que se insertan en la membrana y forman poros como la colicina A, la toxina diftérica y las toxinas Cry; se propuso al dominio I como la estructura que se inserta en la membrana y forma el poro (Knowles, 1994, Rajamohan *et al*. 1998). Ya que como se mencionó anteriormente este dominio está formado por 7 α -hélices y tres de ellas son lo suficientemente largas para atravesar la membrana (Li *et al*., 1991., Grochulski *et al*, 1995).

Las primeras evidencias que sugerían que el dominio I está involucrado en la formación de poro, se obtuvieron mediante mutagénesis en diferentes sitios de este dominio. Wu y Aronson (1992) obtuvieron mutantes en la α -hélice 5 observando que estas toxinas mutantes perdían la toxicidad pero conservaban su capacidad de unirse al receptor de los insectos susceptibles. Posteriormente, crearon una serie de mutantes en el dominio I de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac en el "loop" dentre la α -hélice 2 y 3 observando una

disminución drástica de la toxicidad hacia *M. sexta*, sin que perdiera la capacidad de unirse al receptor. Varios grupos han estudiado la actividad de los canales iónicos que forman las toxinas Cry en bicapas lipídicas. El dominio I de la toxina Cry1Ac (Walters *et al.*, 1993) y el dominio I de la toxina Cry3Bb (Von Tersch *et al.*, 1994) aislados son capaces de formar poros en bicapas lipídicas de diferentes composiciones y encontraron que los canales formados son selectivos a cationes.

También se han realizado estudios con el péptido de la α -hélice 5 de las toxinas Cry1Ac y Cry3A observando que esta también forma poros en bicapas lipídicas (Cuming *et al.*, 1994., Gazit *et al.*, 1994), también han observado que los canales formados por la α -hélice 5 son más pequeños que los que forma la toxina completa. Se ha observado que la α -hélice 5 posee actividad hemolítica lo cual no se observa con la toxina completa (Gazit y Shai, 1993). Cuando se analiza la α -hélice 7 aislada no forma poros en bicapas sintéticas pero en presencia de la α -hélice 5 hay una mejor interacción con la membrana que cuando esta última se adiciona sola (Gazit y Shai 1995).

También se ha reportado el efecto del pH en la actividad formadora de poro de las toxinas Cry. Schwartz *et al* 1993) observaron que la proteína Cry1C a pH 9.5 en bicapas de diferentes composiciones selectivos a cationes. Mientras que a pH 6 ésta proteína formaba canales selectivos a aniones.

Posteriormente Uemura *et al* (1992) utilizó un colorante fluorescente sensible al potencial eléctrico para medir los cambios de potencial de membrana provocados por la toxina Cry1Aa en VMMA del lepidóptero *Bombix mori*, observado que la toxina aumentó la permeabilidad de la membrana a cationes monovalentes y divalentes. Posteriormente Lorence *et al* (1995) utilizando el método propuesto por Uemura, con VMMA del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, observaron que las toxinas Cry1C y Cry1D aumento la permeabilidad de la membrana hacia cationes monovalentes sin ser realmente selectiva.

Análisis filogenético.

En 1997 se realizó un análisis filogenético de la secuencia primaria de las proteínas Cry (Bravo, 1997). Este estudio se hizo calculando la distancia genética entre las secuencias y estimando la filogenia de los datos de la matriz de distancias a partir del alineamiento múltiple de las diferentes secuencias de las toxinas Cry, utilizando el programa FITCH y

Máxima parsimonia. El análisis filogenético se realizó 100 veces para obtener un árbol consenso.

El análisis filogenético de las secuencias de la protoxina muestra un árbol en donde algunas clases de protoxinas forman grupos independientes. El árbol filogenético de la toxina presenta una topología diferente al árbol de la protoxina observándose tres grupos bien definidos. Es importante mencionar que la principal diferencia entre las secuencias de la protoxina y la toxina es el gran extremo carboxilo terminal de la protoxina el cual es mayor de 500 residuos. Este fragmento es muy conservado en algunas de las secuencias de las protoxinas. Se cree que este fragmento está involucrado en la formación del cristal ya que esta fracción de la protoxina es rica en cisteínas. Sin embargo en algunas toxinas este fragmento está ausente o es muy pequeño.

Al hacer el análisis filogenético del extremo carboxilo terminal de la protoxina se observó que este árbol filogenético era similar al obtenido con la protoxina completa, indicando que la diferencia observada entre el árbol de la protoxina y la toxina se debe principalmente al fragmento carboxilo terminal.

El análisis evolutivo también se realizó para cada uno de los dominios que poseen las toxinas Cry. El árbol filogenético del dominio I está formado por tres ramas y cada una agrupa dominios I de toxinas con especificidad semejante (Fig. 4). La primera rama, agrupa dominios I de toxinas específicas para lepidópteros, como las toxinas Cry1. Estos datos sugieren que todos los dominios I de toxinas específicas para lepidópteros evolucionaron de un ancestro común. En la segunda rama se encuentran los dominios I de toxinas activas en coleópteros (Cry3, Cry7 y Cry8) y toxinas con actividad dual (coleópteros-lepidópteros) Cry1B y Cry1I, y en la tercera rama están las toxinas específicas para dípteros (Cry4, Cry10y Cry11) y nemátodos Cry5, Cry12 y Cry13 (Bravo, 1997).

Observando la divergencia de los diferentes dominios I de las proteínas Cry y las diferencias intestinales de cada orden de insectos, se propone que distintos tipos de dominios I, es decir, que diferentes tipos de canales iónicos fueron seleccionados en la evolución para actuar en diferentes condiciones intestinales de los distintos insectos blanco.

El análisis filogenético del dominio II sugiere que este dominio es probablemente el resultado de diferentes eventos evolutivos ya que algunas secuencias muestran distancias infinitas y no se pueden agrupar en el mismo árbol quedando distribuidos en tres árboles

diferentes. El primer árbol filogenético está compuesto por los dominios II de las toxinas Cry2 y Cry11. El segundo árbol filogenético posee los dominios II de las toxinas específicas para nemátodos (Cry5, Cry12 y Cry13). En el tercer árbol filogenético se encuentran los dominios II del resto de las toxinas específicas para coleópteros, lepidópteros y dípteros, en donde cada orden se encuentra en una rama diferente.

El análisis filogenético del dominio III mostró la distribución de las secuencias en dos árboles diferentes. El dominio III de las toxinas Cry2 y Cry11 presentan distancias infinitas del resto de las toxinas Cry sugiriendo un origen muy diferente. La topología del árbol filogenético del resto de los dominios III es muy distinta a la topología de los árboles obtenidos con los dominios I y II. Las secuencias de los dominios III de las toxinas específicas para coleópteros se encuentran distribuidas en todo el árbol en diferentes ramas. Los dominios III de las toxinas activas en lepidópteros presentan un arreglo más homogéneo. En el caso de las toxinas con actividad dual se propone que presentaron intercambio de dominios III. Estas toxinas poseen dominio I y dominio II que comparten alta similitud con toxinas específicas para coleópteros, pero presentan dominios III muy semejantes a toxinas específicas para lepidópteros. Estos datos pueden sugerir que hubo intercambio de dominios entre toxinas para lepidópteros y toxinas para coleópteros lo cual dio origen a toxinas con actividad dual. El análisis filogenético de las toxinas Cry mostró que la gran variabilidad en la actividad biocida que existe dentro la familia es el resultado de dos eventos evolutivos. Uno la evolución independiente de los dominios funcionales y dos, el intercambio de dominios dentro de diferentes toxinas. Lo cual generó toxinas con un modo de acción similar pero con diferente especificidad (Bravo, 1997).

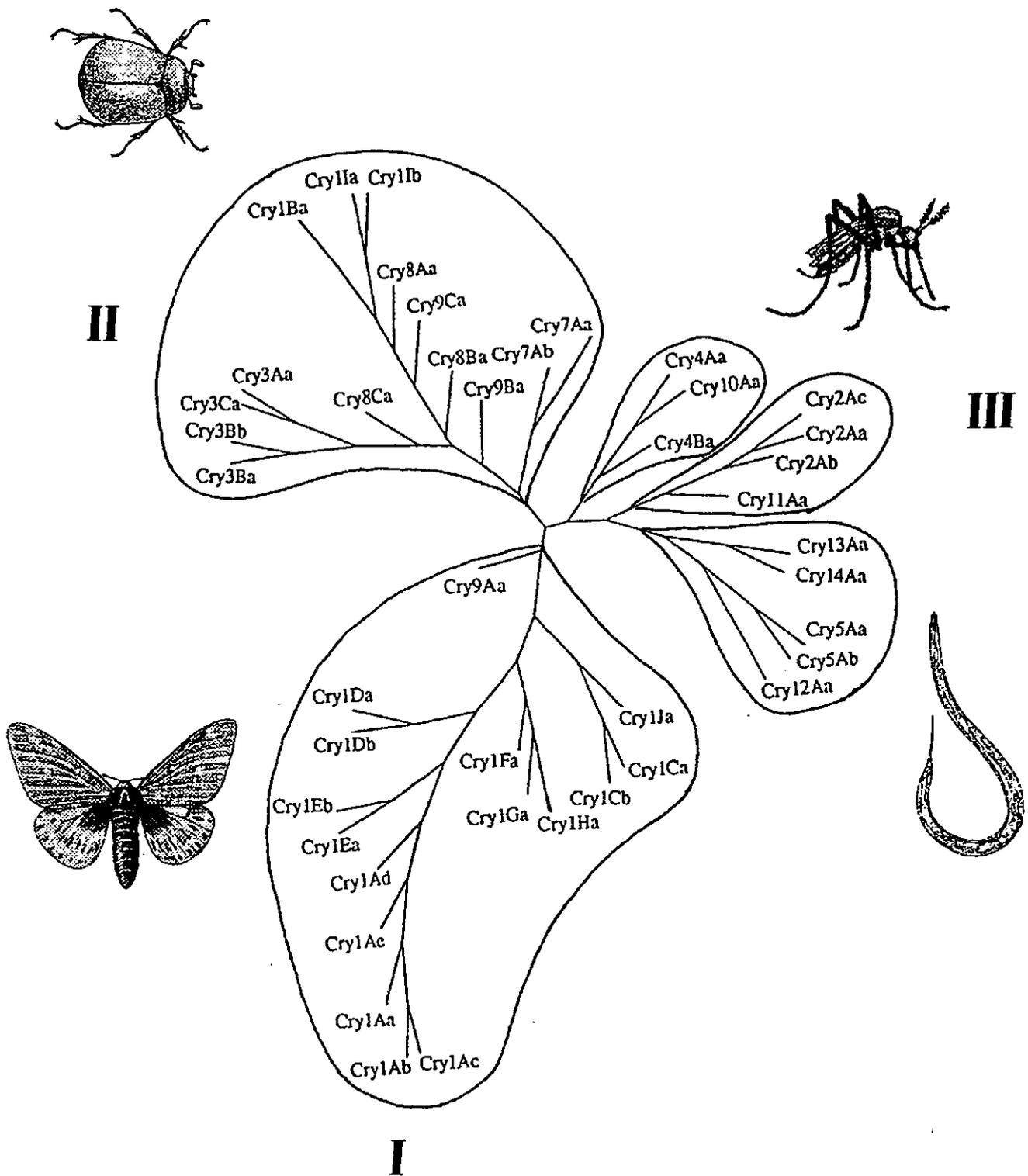


Figura 4. Un análisis filogenético mostró que el árbol del dominio I de diferentes proteínas Cry está formado por 3 ramas y cada rama agrupa dominios I con especificidad semejante. En la rama I se agrupan las toxinas específicas para lepidópteros, en la rama II se encuentran las toxinas activas en coleópteros y la rama III está formada por las toxinas para dípteros y nemátodos. Tomado de Bravo (1997).

3. HIPOTESIS

La actividad formadora de poro de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry3A es dependiente del pH.

4. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el modo de acción de las toxinas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis* tóxicas a lepidópteros y coleópteros.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Estudiar el efecto del pH en la actividad formadora de poro de las diferentes toxinas Cry.
- 2.- Medir los cambios de potencial de membrana en VMMA del lepidóptero *M. sexta* y el coleóptero *T. molitor*, producidos por las diferentes toxinas Cry (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac para *M. sexta* y Cry3A para *T. molitor*).
- 3.- Comparar la selectividad iónica de las diferentes toxinas Cry en diferentes pH.

5. MATERIALES Y METODOS.

Cepas bacterianas y toxinas empleadas.- Las cepas que se emplearon en este proyecto fueron: *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* en donde sé clonó el gen de la toxina Cry1Aa. *B. thuringiensis* variedad *berliner* que tiene el gen que codifica para la toxina Cry1Ab, *B. thuringiensis* variedad *kurstaki* HD73 que produce únicamente la toxina Cry1Ac y la cepa *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* que produce la toxina Cry3A.

Condiciones de crecimiento.- Las cepas de *B. thuringiensis* se crecieron en medio SP sólido, a una temperatura de 30°C hasta una esporulación del 99% del cultivo.

MEDIO SP

Caldo nutritivo	8 gr
KCl	1 gr
MnCl ₂	1000μl
FeSO ₄	2000μl
CaCl ₂	1000μl
Agar	15 gr

Stock MnCl₂. 0.198 gr en 100 ml de agua MilliQ

Stock FeSO₄·7H₂O. 1.83 gr en 50 ml de agua MilliQ y 1.4 ml de H₂SO₄ concentrado

Stock CaCl₂. 4.90 gr en 50 ml de agua MilliQ

Se disolvieron todos los compuestos orgánicos en 500 ml de agua MilliQ y de adicionaron los compuestos orgánicos. Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH, se esterilizó y distribuyó en cajas de petri.

Purificación y activación de las toxinas.- Cuando el cultivo había esporulado, se recuperaron las esporas y los cristales de las placas de medio de cultivo adicionándole 5 ml de agua estéril a la placa y levantando el crecimiento con una pipeta serológica de 5 ml. A la mezcla de esporas y cristales se le adicionó un volumen de 10 ml de agua y se

centrifugó 10 min a 10,000 rpm en un rotor JA -20 en una centrifuga Beckman modelo J2-HS. Después, se lavaron 3 veces con NaCl 1 M y la pastilla final se diluyó en un buffer de tris - HCl 20 mM, Tritón 1% y NaCl 300 mM pH 7.2.

Purificación de cristales.- La muestra de esporas y cristales se cargó en un gradiente de sacarosa discontinuo en agua (84%, 79%, 72%, 67%) y se centrifugó en una ultracentrifuga Beckman L-80 por 1 h a 23,000 rpm en un rotor SW28 a 16°C.

Las bandas que se obtuvieron en la centrifugación se separaron con una pipeta pasteur y se diluyeron con agua para posteriormente lavar 3 veces con agua a 10,000 r.p.m. por 10 min en un rotor JA - 20, en una centrifuga Beckman modelo J2-HS, para eliminar los restos de sacarosa.

Solubilización.- Las muestras obtenidas de la centrifugación se diluyeron con agua, la pureza se revisó al microscopio con contraste de fases. Se seleccionaron las muestras que presentaron una mayor concentración de cristales.

Los cristales se solubilizaron en un buffer de Na₂CO₃ 50 mM, 20 mM DTT pH 10.2 por 3.5 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente se centrifugó la muestra a 14,000 rpm por 15 min en una microcentrifuga Eppendorf 5415C.

Activación.- La proteína solubilizada se activó con un tratamiento con tripsina 1:20 (p/p) por 2 h a 37°C.

Una vez activada la toxina se paso por una columna de intercambio iónico (DEAE - sefarosa) Se adicionaron 7 ml de resina en 15 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.5. Se esperó una hora a que la resina sedimentara para eliminar el alcohol, en el que se encuentra la resina. Posteriormente se agregaron 7 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.5 y se desgasificó, después se cargo la resina en la columna, se esperó a que la resina se compactara y se tapo la columna sin dejar burbujas. Posteriormente, la columna se equilibró con 20 volúmenes de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM pH 8.5, después se cargó la toxina y se pasaron 10 volúmenes de un gradiente continuo de NaCl de 50 a 500 mM. La toxina eluyó en un rango de concentración de 200 a 300 mM de NaCl.

Insectos empleados.- Los insectos que se utilizaron fueron larvas del quinto estadio del lepidóptero *Manduca sexta*, el gusano comudo del tabaco, una plaga de los cultivos del tabaco las cuales se obtuvieron del laboratorio del Dr. Jorge Ibarra del CINVESTAV

Irapuato y larvas del coleóptero *Tenebrio molitor*, una plaga del alimento para animales, donadas por la Dra. Inmaculada García, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia.

Purificación de vesículas de la microvellosidad apical del epitelio del intestino

medio.- La purificación de las vesículas se realizó siguiendo el método de Wolfesberger (1987). La muestra (3 gr de intestinos de *M. sexta*) se colocó en un homogeneizador de vidrio estéril inmerso en hielo, se diluye 1:10 p/v con una solución fría de manitol 300 mM, tris-HCl 17 mM, EGTA 5mM, DTT 2 mM, pH 7.4. Los inhibidores de proteasas que se emplearon fueron: PMSF 0.1 mM, leupeptina 100 µg/ml, pepstatina 5 µg/ml, inhibidor de la tripsina de soya 1µg/ml y sulfato de neomicina 30 µg/ ml (buffer A). Se dieron 9 golpes con el embolo de teflón a 2250 rpm. Se agregó un volumen igual de una solución de MgCl₂ 24 mM (buffer B), se agitó suavemente e incubó en hielo 15 min. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4500 rpm en una centrifuga Beckman J2-HS en un rotor JA-20 a 4°C. La pastilla se descartó y el sobrenadante se centrifugó 30 min a 30,000 g en el mismo rotor a 4°C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en la mitad del volumen del buffer A y la mitad del volumen del buffer B. Se centrifugó nuevamente a 4500 rpm por 15 min, y después a 30,000 g, en el equipo antes descrito. La pastilla de la última centrifugación se resuspendió en el buffer A diluido 1:1 con agua milliQ y se colocó en el homogeneizador y se dieron 3 golpes a 2250 rpm para eliminar la formación de agregados. Esta muestra constituyó las VMMA. Posteriormente se dializó contra 1000 volúmenes de una solución de KCl 150 mM, EGTA 2 mM, EDTA 0.5 mM, HEPES-HCl 10 mM, pH 8 por 12 horas a 4°C. Esto con la finalidad de cargar las vesículas con KCl.

Las vesículas de *T. molitor* se purificaron con el método de Wolfesberger (1987) modificado por Reuveni y Dunn (1991). Un gramo de tejido se colocó en un homogeneizador estéril inmerso en hielo, se adicionaron 5 ml de una solución fría de manitol 200 mM, ácido ascórbico 10 mM, EGTA 5 mM, leupeptina 0.2 mM, PMSF 0.03% (p/v), PVPP 1% (p/v), DTT 2 mM, HEPES 10 mM, MES 10 mM, pH 7.4 (buffer A). La muestra se homogeneizó por 10 s a 3000 rpm. Se adicionó un volumen igual de una solución de MgCl₂ 24 mM y se incubó 10 min en hielo. El homogeneizado se centrifugó 10 min a 4500 rpm a 4°C en un rotor JA-20 en una centrifuga Beckman J2-HS. El sobrenadante se centrifugó a 30,000 g, en el equipo antes descrito, por 30 min en el

mismo rotor, esta muestra constituyó las VMMA. La pastilla se resuspendió en el buffer A y se dializó contra 1000 volúmenes en un buffer de KCl 150 mM, EGTA 2 mM, EDTA 0.5 mM, HEPES-HCl 10 mM, pH 8 por 12 horas a 4°C. La calidad de las vesículas se analizó midiendo la concentración de proteína y la actividad de marcadores enzimáticos: la actividad de la fosfatasa alcalina, por ser un marcador específico de la microvellosidad apical del intestino medio y por presentar orientación en la membrana, y la actividad de la citocromo C oxidasa, para cuantificar la contaminación de membrana mitocondrial.

Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry modificado.-

Se tomó una muestra de 5 y 10 µl, de Homogeneizado o VMMA, y se llevó a un volumen de 1000 µl. Se agregó 3ml de la solución AB+C (apéndice) 100: 1. Se incubó 1 h a temperatura ambiente y se agregaron 300 µl de folin diluido 1:1 con agua, se incubó 45 min a temperatura ambiente. La actividad se midió en un espectrofotómetro Pharmacia LKB-Ultrospec II a 625 nm a la par con la curva estándar (ver apéndice).

Actividad enzimática de la aminopeptidasa.-En una celda de poliestireno de 1 ml se mezclaron 400 µl de agua mQ, 200 µl de tris-HCl 1 M pH8, 250 µl de NaCl 1M y 5 µl de muestra (homogeneizado o de VMMA). Se adicionaron 100 µl de una solución de L-leucina-p-nitroanilida 10 mM, la celda se agitó invirtiéndola y se siguió la cinética de la reacción por 2, 4 y 6 minutos en un espectrofotómetro Pharmacia LKB-Ultrospec II midiendo la absorbancia a 405 nm.

Con los datos de absorbancia se calculó la actividad enzimática específica considerando que $E_{405\text{ nm}} = 104\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina.- Se solubilizó 1 mg/ml de p-nitrofenolfosfato en una solución de 0.5 mM de MgCl₂ y 100 mM de Tris-HCl a pH 9.5 (solución 1). Nuevamente se solubilizó 1 mg/ml de p-nitrofenolfosfato en la solución 1 adicionándole 0.02% de Tritón, este buffer constituyó la solución 2.

En una celda de poliestireno de 1 ml se adicionaron 500 µl de la solución 1 y se dispersaron 20 µg de muestra (homogeneizado o VMMA). La celda se agitó invirtiéndola y la reacción se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Simultáneamente se hizo lo mismo con la solución 2. La reacción se detuvo con 500 µl de EDTA pH 8. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Pharmacia LKB-Ultrospec II a 405 nm.

Con los datos de absorbancia, se calculó la actividad enzimática específica considerando la cantidad de proteína necesaria para transformar 1 nmol de p-nitrofenol fosfato en un minuto.

La actividad de fosfatasa alcalina se calculó en presencia y ausencia de tritón X-100 para calcular la proporción de vesículas con orientación positiva (fosfatasa mirando hacia el exterior).

Actividad de la citocromo C oxidasa.- Se disolvió 1 mg/ml de citocromo C de corazón de caballo ácido modificado en una solución de ascorbato 100 mM, tris - HCl 20 mM, pH 7.4. Se dializó el citocromo C contra 1000 volúmenes de tris - HCl pH 7.4 por 12 horas a 4°C, esto con la finalidad de disminuir el exceso de agente reductor. En una celda de poliestireno de 1 ml se colocó 900 µl de un buffer de KCl 100 mM, tris - HCl y 0.02% de tritón X -100 pH 7.4 después se adicionaron 20 µg de proteína de VMMA y la celda se agitó invirtiéndola, se adicionó 100 µl de la solución de citocromo C reducido y se agitó invirtiendo. Se siguió la oxidación del citocromo C a 550-540 nm durante 1 min en un espectrofotómetro de onda dual Sim Amico DW - 2000.

Finalmente se calculó la actividad enzimática específica a partir de la gráfica de la cinética obtenida considerando que una unidad de actividad se define como la cantidad de mg de proteína necesarios para oxidar una mol de cotocromo C reducido en un minuto. Para verificar que la señal se debió a la actividad de la citocromo C oxidasa se repitió el análisis adicionando 10 µl de una solución de KCN 0.2M ó 10 µl de una solución de azida de sodio 2 M.

Determinación del potencial de membrana.- Esta determinación se realizó siguiendo la metodología descrita por Lorence *et al* (1995). Los cambios de potencial de membrana se registraron como cambios en la fluorescencia del colorante 3,3'dipropiltiodicarbocianina (diS-C3(5)), un colorante cargado positivamente y sensible al potencial de membrana. Este colorante puede detectar cambios continuos de potencial de membrana con una resolución de segundos (Waggoner, 1979).

Los ensayos de fluorescencia se hicieron en un microfluorómetro Hansatech de cámara redonda con agitación. Se utilizó como fuente de luz una lámpara Scchott KL1500 electronic. La longitud de onda requerida para la excitación del colorante se obtuvo con un filtro de interferencia que sólo deja pasar la longitud de onda de 620 nm. La señal de

la fluorescencia se recogió con un fotodiodo conectado al filtro de emisión de la cianina, el cual sólo deja pasar la longitud de onda de 670 nm. La señal captada se amplificó con un amplificador Hansatech y se registró con un registrador Kipp & Zonen Holland.

Los experimentos de fluorescencia se realizaron en un volumen de 900µl de buffer de cloruro de metilglucamina 150 mM, HEPES 10 mM, para pH 6 a 8, MES para pH 4.5 a 5 y CHES para pH 9 a 10 a 25°C con agitación constante. Posteriormente se adicionó la cianina a una concentración de 1.2 µM. Después se adicionaron 10 µg de proteína de VMMA para *M. sexta* y 20 µg para *T. molitor* y se esperó por 8 min para las VMMA de *M. sexta* y 3 min para las VMMA de *T. molitor* para que la fluorescencia llegara al equilibrio. Para las curvas de calibración se adicionó 1 µl de valinomicina, un ionóforo específico de K⁺, a una concentración de 1.2 µM y para los ensayos de actividad formadora de poro se adicionó la toxina a una concentración de 100 nM. Subsecuentemente se hicieron adiciones crecientes de KCl, asumiendo que la concentración interna de K⁺ era de 150 mM. En este sistema la hiperpolarización se observa como una entrada del colorante a las VMMA y por lo tanto una disminución de la fluorescencia de la cianina mientras que la depolarización se ve como el efecto opuesto (ver Fig. 5)

El potencial de reposo de la membrana (E_m) de las VMMA y el potencial de equilibrio (E_K) para cada una de las adiciones de potasio se calcularon a partir de la curva de calibración con valinomicina, utilizando la ecuación de Nernst (1); se graficó el E_K en contra de los cambios de fluorescencia. Al extrapolar a cero la fluorescencia ("y") se obtuvo el valor de E_m.

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_o} \quad 1)$$

Actividad formadora de poro.- La actividad formadora de poro se registró siguiendo el mismo procedimiento antes descrito pero adicionando la toxina de interés en el lugar de la valinomicina. En este caso los parámetros que nos interesaron fueron la hiperpolarización que provocó cada toxina y los cambios de permeabilidad medidos como pendiente en la gráfica de E_K y los cambios de fluorescencia.

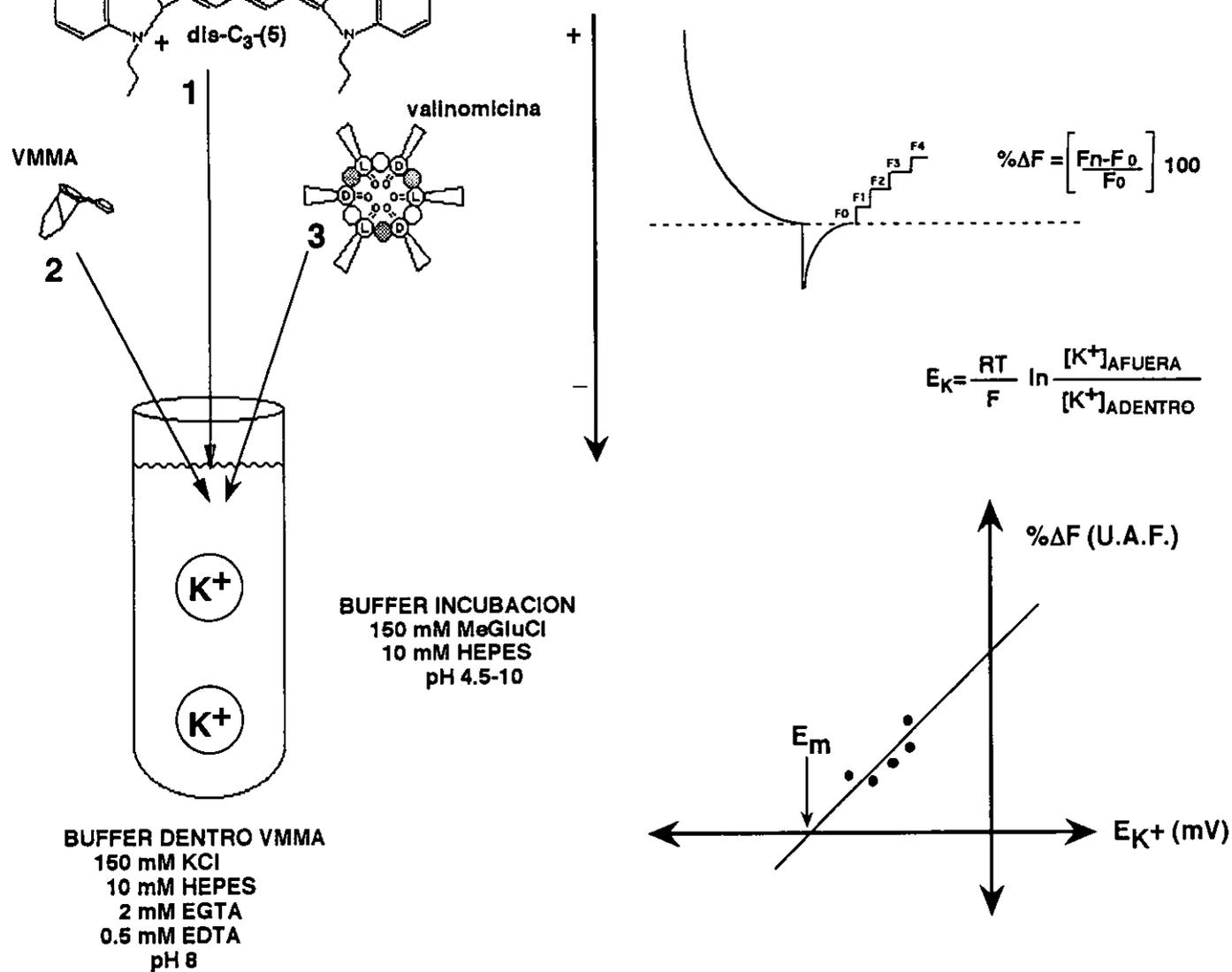


Figura 5. Esquema de los ensayos de fluorescencia para determinar el potencial de membrana de *M. sexta* y *T. molitor*. Los experimentos se realizaron en un volumen de 900 μl de buffer de cloruro de metilglucamina 150 mM, HEPES 10 mM, para pH 6 a 8, CHES, para pH 4.5 a 5 y MES para pH 9 y 10, a 25 °C con agitación constante. Posteriormente se adicionó la cianina a una concentración final de 1.2 μM, después se adicionaron 10 μg de proteína de membrana para *M. sexta* y 30 μg para *T. molitor* y se esperó a que el colorante alcanzara el equilibrio por 8 min para *M. sexta* y 3 min para *T. molitor*. Enseguida se adicionó la valinomicina, para las curvas de calibración con valinomicina, a una concentración final de 1.2 μM, la cual provocó una hiperpolarización y se observó como una disminución de la fluorescencia. Posteriormente se hicieron adiciones crecientes de KCl 3 M, que provocaron depolarizaciones y se observó como un aumento en la fluorescencia. El potencial de membrana se obtuvo al graficar los valores del potencial de equilibrio del potasio (E_K) en contra de los cambios de fluorescencia observados para cada una de las adiciones de KCl y extrapolar la fluorescencia ("y") a cero. La actividad formadora de poro de las toxinas se analizó con este mismo sistema pero se adicionó toxina en el lugar de la valinomicina.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Purificación de vesículas de microvellosidad apical de intestino medio del lepidóptero *M. sexta* y del coleóptero *T. molitor*.

La pureza de las VMMA tanto de *M. sexta* como de *T. molitor* se revisó por el análisis de tres marcadores enzimáticos. La actividad enzimática de la aminopeptidasa, por ser el receptor de las toxinas Cry1A, la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina por ser un marcador específico de la microvellosidad apical del intestino medio y por presentar orientación en la membrana y la actividad de la citocromo C oxidasa para cuantificar la contaminación con membrana mitocondrial.

Se obtuvieron tres lotes de VMMA de *M. sexta*. En dos de los lotes la aminopeptidasa se enriqueció 5 veces comparado con el homogeneizado (ver Tabla II) mientras que para el tercer lote la aminopeptidasa se enriqueció 11 veces. Esto nos indicó que existía una buena proporción de receptor para las proteínas Cry1A en las VMMA ya que en anteriores trabajos se reportaron valores similares para la actividad de la aminopeptidasa en vesículas de *M. sexta* (Wolfesberger 1987, Van-Rie 1989).

Al medir la actividad específica de la fosfatasa alcalina se encontró que los dos primeros lotes tenían 90% de las vesículas con orientación positiva (mirando hacia afuera) y en el tercer lote se obtuvieron el 96% de las vesículas con la fosfatasa alcalina mirando hacia afuera, indicando que además de presentar el receptor, éste se encontraba hacia el exterior de las VMMA.

En cuanto a la actividad de citocromo C oxidasa, en ninguno de los lotes se observó actividad, por lo que nuestro sistema no presentó contaminación con membrana mitocondrial.

El enriquecimiento de la aminopeptidasa, el porcentaje de la fosfatasa alcalina y la ausencia de actividad de citocromo C oxidasa en las VMMA de *M. sexta* obtenidas en este trabajo presentan una buena correlación con valores observados anteriormente en otros trabajos para membranas de *M. sexta* y para otros insectos (Wolfesberger *et al*, 1987, Van-Rie *et al*, 1989, Lorence *et al*, 1995). Por lo que esto indicó que se habían obtenido VMMA de buena calidad para emplearlas en los ensayos de actividad formadora de poro.

TABLA II.**MARCADORES ENZIMÁTICOS DE LOS LOTES EMPLEADOS EN LOS ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD FORMADORA DE PORO.**

Lote	Aminopeptidasa actividad específica (nmol/min/mg proteína)		Fosfatasa alcalina Actividad específica (nmol/min/mg proteína)		Citocromo C oxidasa Actividad específica (nmol/min/mg proteína)	
	HOM.	VMMA	c/tVMMA	s/tVMMA	HOMG.	VMMA
1	9±1	46±8	347±19	314±69	70±6	ND
2	77±10	420±60	336±10	303±76	110±15	ND
3	49±2	548±70	229±16	219±55	63±3	ND

Las actividades de los marcadores enzimáticos se midieron como se describe en materiales y métodos. No se detectó actividad (ND). Tratadas con tritón (c/t), tratadas sin tritón (s/t). La actividad de la fosfatasa alcalina se midió en presencia y ausencia de tritón para ver el porcentaje de VMMA que presentaban la fosfatasa alcalina hacia el exterior. El enriquecimiento de la aminopeptidasa se obtuvo al comparar la actividad observada en las vesículas con la actividad del homogenizado. Los valores son el promedio de 3 repeticiones ± la desviación estándar.

La purificación de estos lotes de VMMA se realizó en presencia de DTT. Al revisar minuciosamente el método de purificación de VMMA descrito por Wolfesberger se observó que no incluía DTT en el buffer de purificación. Wolfesberger (1987) y Van Rie (1989) obtenían 7 y 10 veces, respectivamente, de enriquecimiento de la actividad de la fosfatasa alcalina, comparado con el homogenado. En el laboratorio en el método utilizado para purificar vesículas incluía DTT y las VMMA que obteníamos con éste buffer sólo presentaban 2 veces de enriquecimiento de fosfatasa alcalina, por lo que posteriormente se realizó un experimento en donde se eliminó el DTT y se variaron las concentraciones de MgCl₂ de 24 mM hasta 96 mM. Las vesículas de mejor calidad, de acuerdo a los marcadores enzimáticos, se observaron con el buffer que contenía DTT y con 36 mM de MgCl₂, seguido por la purificación realizada con el buffer sin DTT y con 24 mM de MgCl₂, como lo describe Wolfesberguer (1987) (Tabla III). Observando que las

VMMA purificadas con 36 mM de $MgCl_2$ y con DTT, tenía un enriquecimiento de aminopeptidasa y la fosfatasa alcalina, de 12 y 17 veces, respectivamente. Mientras que las VMMA purificadas con 24 mM de $MgCl_2$ y sin DTT tenían un enriquecimiento de aminopeptidasa de 7 veces y de fosfatasa alcalina de 11 veces. Con base en estos resultados se podrían hacer ensayos de actividad formadora de poro con las toxinas Cry1A y comparar en cual de los dos lotes se observa una mayor actividad.

TABLA III.
EFFECTO DEL DTT Y LA CONCENTRACIÓN DE $MgCl_2$ EN LA PURIFICACIÓN DE LAS VMMA DE *Manduca sexta*.

	Aminopeptidasa actividad específica (nmol/min/mg proteína)		Fosfatasa alcalina Actividad específica (nmol/min/mg proteína)		CitocromoC oxidasa Actividad específica (nmol/min/mg proteína)	
	HOM	VMMA	HOM	VMMA	HOM	VMMA
Sin DTT+24 mM $MgCl_2$	49±3	359±19	285±5	3128±71	396±10	ND
Con DTT+24 mM $MgCl_2$	55±4	294±26	172±8	688±10	415±3	ND
CON DTT+36 mM $MgCl_2$	29±3	355±16	266±28	4460±60	400±26	ND
CON DTT+48 mM $MgCl_2$	54±3	169±29	314±12	1835±62	70±12	ND
CON DTT+96 mM $MgCl_2$	68±3	235±15	295±10	2010±14	327±7	ND

La purificación de las VMMA y las actividades enzimáticas se realizaron como se describe en los materiales y métodos. El enriquecimiento de la aminopeptidasa y la fosfatasa alcalina se realizó comparando la actividad específica de las VMMA contra la actividad específica que se observó en el homogeneizado. (ND) No se detectó actividad. Cada valor es el promedio de tres mediciones ± la desviación estándar.

En el caso del coleóptero *T. molitor* solo se revisó la actividad de la fosfatasa alcalina y la actividad de la citocromo C oxidasa, ya que hasta el momento se desconoce el receptor para las proteínas Cry que son tóxicas para este orden de insectos. Los valores observados para la actividad de la fosfatasa alcalina indicaron que existía 100% de VMMA con orientación positiva, ya que la actividad específica observada en presencia de tritón fue de 51 nmol/min/mg de proteína y en ausencia de tritón la actividad detectada fue de 49 nmol/min/mg de proteína. No se observó actividad de citocromo C oxidasa en las VMMA. La actividad de los marcadores enzimáticos indicaron que las VMMA tenían valores similares a los reportados anteriormente en la purificación de VMMA de otros insectos (Wolfesberger *et al*, 1987, Reuveni y Dunn 1991).

Efecto del pH en el espectro de emisión del colorante diS-C3(5).

El pH del lumen intestinal es característico para cada orden de insectos. En el caso del lepidóptero *Manduca sexta* es de 10 a 11 (Hennigan *et al*, 1993, Azuma *et al*, 1995) y para el lepidóptero *Trichoplusia ni* es de 8 (Broadway, 1989). En el caso del coleóptero *Tenebrio molitor* el pH del lumen intestinal es de 5 (Knowles, 1994).

Con la intención de trabajar lo más cercano a las condiciones fisiológicas de cada insecto, se revisó el espectro de emisión del colorante diS-C3(5) en un rango de pH de 6 a 10. Observándose la máxima fluorescencia para los pH 6 y 7 (Fig. 6), mientras que a pH 8 hubo una disminución del 20% y para los pH 9 y 10 la fluorescencia disminuyó 30%.

En cuanto al pico máximo de emisión de la cianina se observó a 670 nm en todos los casos. Lo cual nos indicó que no hubo corrimiento del pico máximo y el colorante se podía utilizar en los pH seleccionados, haciendo correcciones correspondientes a la eficiencia cuántica observada para cada pH.

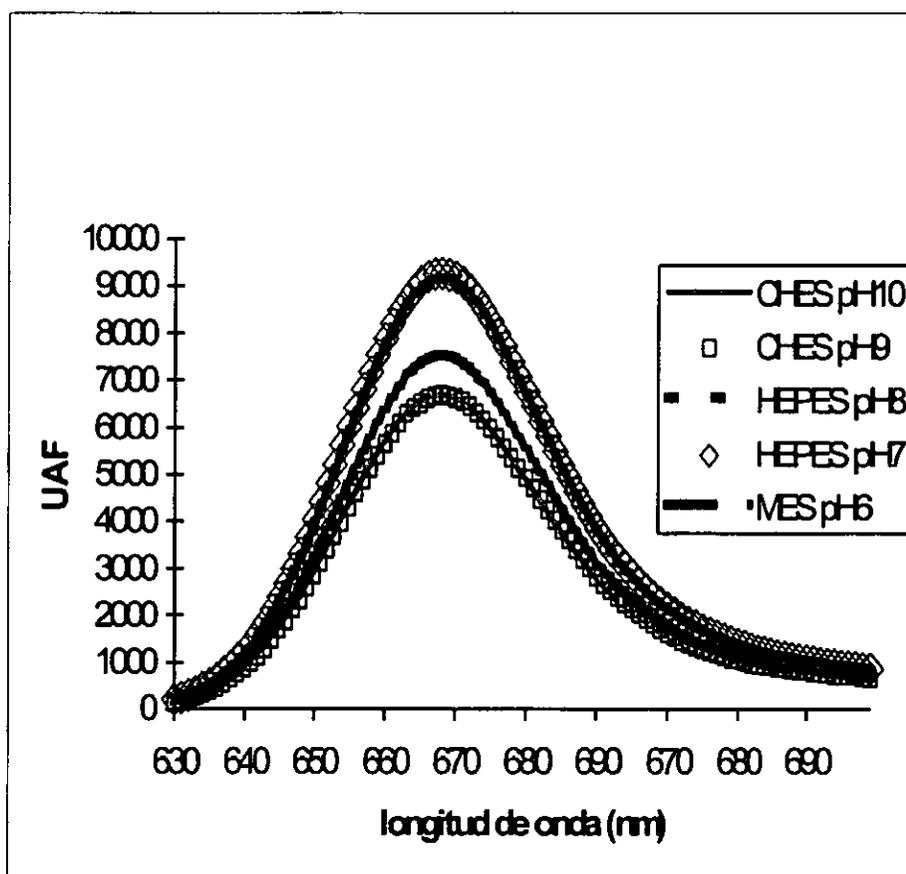


Figura 6. Espectro de emisión de la cianina diS-C3(5) a pH 6, 7, 8, 9 y 10. La emisión máxima de fluorescencia se obtuvo a pH 6 y 7 y la mínima se observó a pH 10 y 9.

Efecto del pH en las curvas de calibración con valinomicina en las VMMA de *M. sexta* y *T. molitor*.

Se sabe que los colorantes fluorescentes con carga positiva, como las cianinas, son sensibles a cambios en el potencial de membrana de las células, organelos o vesículas. También se conoce que los cambios de fluorescencia dependen de la estructura del colorante y de las condiciones del experimento (Waggoner 1979). Tomando en cuenta lo anterior se decidió analizar los cambios de fluorescencia en las curvas de calibración con

valinomicina de las membranas del lepidóptero *M. sexta* y del coleóptero *T. molitor* en un rango de pH de 5 a 10.

En *M. sexta* observamos que en las curvas de calibración con valinomicina existían cambios en la fluorescencia dependientes del pH. Es decir los cambios de fluorescencia para cada una de las adiciones de KCl 3M fueron diferentes. Los cambios de fluorescencia en la curva de calibración a pH 8 fueron 1.2 veces más grandes que a pH 7 y 9, a pH 10 fueron 1.5 veces más pequeños que a pH 8 (ver Fig 7).

$$pH8 > pH7 = pH9 > 10$$

Estas diferencias se tomaron en cuenta para normalizar el efecto de las toxinas Cry a los diferentes pH que se emplearon en este trabajo. En el caso del pH 6 no fue posible realizar las curvas de calibración ya que no se observaron cambios de fluorescencia al adicionar la valinomicina ni al hacer las adiciones crecientes de KCl.

En las VMMA del coleóptero *T. molitor* a pH 5 se observó una curva de calibración 1.2 veces mayor que a pH 7. A pH 6.5 la curva de calibración fue una vez mayor que a pH 7, mientras que a pH 8 y 10 se observó una curva 1.5 veces mayor que a pH 7.

$$pH 8 = pH10 > pH5 > pH6.5 > pH7$$

Cambios de potencial de reposo de la membrana dependientes del pH.

El potencial de membrana se puede entender como el potencial de difusión de los iones que permean la membrana de una célula. Si una célula fuera permeable a un solo ion entonces el potencial de membrana sería igual al potencial de equilibrio de ese ion, pero la mayoría de las células son permeables para más de un ion (Hille, 1992, Sperelakis 1995)

Al analizar el potencial de membrana en el lepidóptero *M. sexta* en un rango de pH de 7 a 10 observamos que cuando el pH intravesicular se mantuvo en 8, el potencial de membrana E_m varió dependiendo del pH extravesicular, es decir cuando existió un gradiente de pH a través de la membrana. En estas condiciones el potencial de membrana (E_m) se acercó más al potencial de equilibrio del potasio cuando el medio extravesicular se volvió más alcalino. Por otra parte, en estudios similares con VMMA del coleóptero *T. molitor* demostramos que en presencia de un gradiente de pH el E_m se mantuvo constante cuando el pH exterior va de 6.5 a 10 (-93 ± 3 mV) mientras que de pH

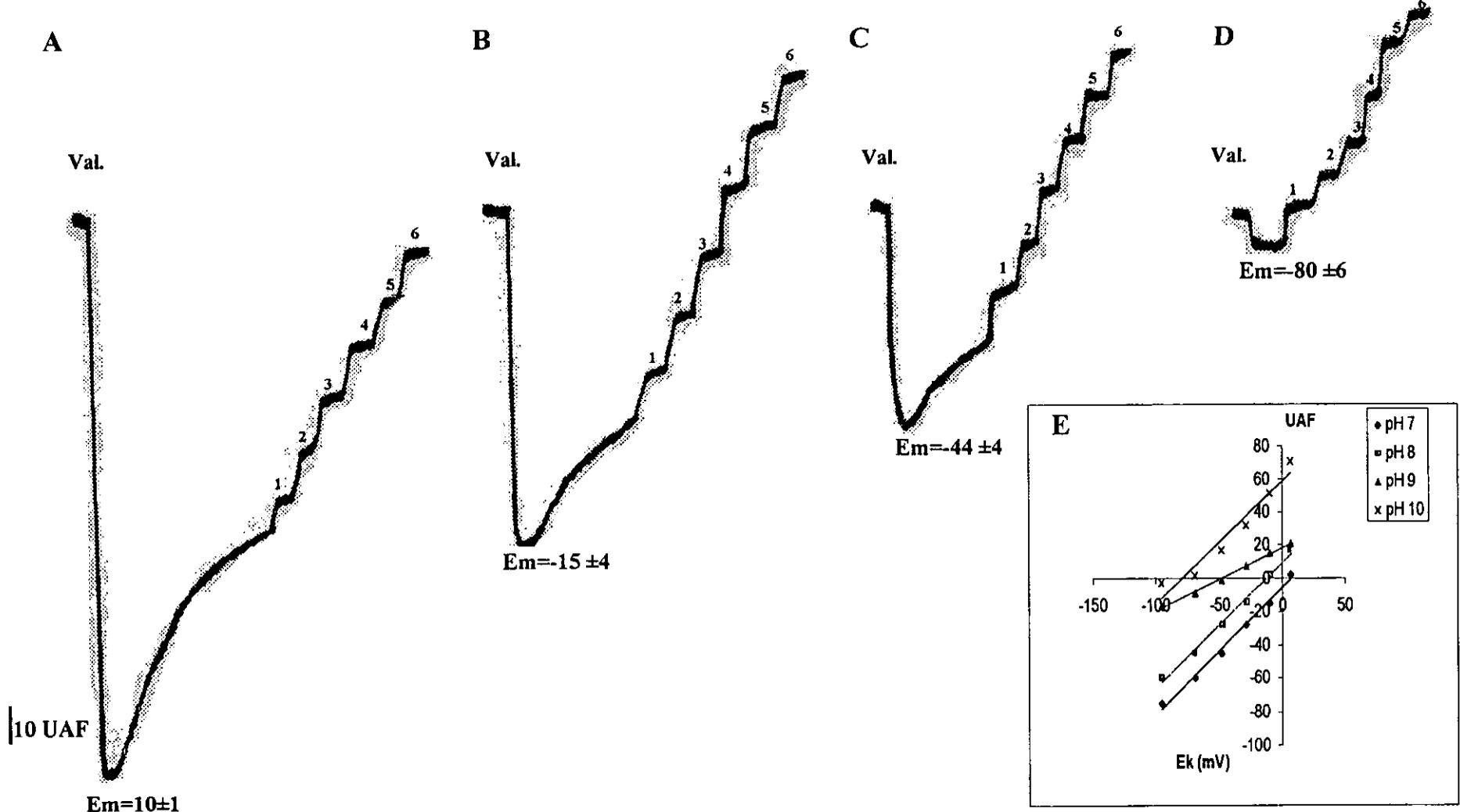


Figura 7. Efecto del pH en las curvas de calibración con valinomicina en membranas de *M. sexta*. A) Curva de calibración a pH 7, B) pH 8, C) pH 9, D) pH 10 y E) Gráfica a partir de los valores de potencial de equilibrio del potasio (E_K) y los cambios de fluorescencia para cada una de las adiciones de KCl. Las membranas se colocaron en 900 μ l de buffer (ver materiales y métodos) después se adicionó 1 μ l de la cianina a una concentración de 1.2 μ M y se esperaron 8 min a que el colorante alcanzara el equilibrio, posteriormente se adicionó la valinomicina (concentración final 1.2 μ M, que provocó una hiperpolarización, la cual se observa como una disminución de la fluorescencia y después se hicieron adiciones crecientes de KCl 3M, que provocó una depolarización y se observa como un aumento en la fluorescencia. Los números indican las adiciones de KCl, 1=0.3 mM, 2= 3 mM, 3= 10 mM, 4=23 mM, 5=100mM, 6=199 mM. Val. Indica la adición de valinomicina. Em indica el potencial de reposo de la membrana calculado en cada pH.

6.5 a 4.5 el Em cambió hasta alcanzar el potencial de equilibrio del potasio en la condición de pH 4.5 en el exterior (-149 ± 4 mV) (ver Tabla III y Fig. 7E).

En ambos insectos se observó que el potencial de reposo se acercó más al potencial de equilibrio del potasio al trabajar más cerca del pH fisiológico.

Estos resultados nos podrían sugerir que tanto en lepidópteros como en coleópteros podrían existir canales de potasio o una permeabilidad a protones (H^+) sensible a pH.

TABLA III.
EFFECTO DEL pH EN EL POTENCIAL DE REPOSO DE LA MEMBRANA EN VMMA DE *Manduca sexta* Y *Tenebrio molitor*.

pH extravesicular	Em (mV) <i>Manduca sexta</i>	Em(mV) <i>Tenebrio molitor</i>
4.5	ND	-149 ± 4
5.5	ND	-131 ± 2
6.5	ND	-92 ± 0.5
7	ND	-90 ± 4
8	-74 ± 6	-91 ± 2
9	-82 ± 4	-91 ± 4
10	-133 ± 6	-97 ± 2

Los valores del potencial de reposo de la membrana se obtuvieron de las curvas de calibración con valinomicina, descrito en materiales y métodos. El potencial de equilibrio para el K^+ (E_K) para *M. sexta* fue de -157 mV y para *T. molitor* fue -148 ± 5 mV. ND = No determinado. Em = Potencial de reposo de la membrana. El pH intravesicular se mantuvo en 8 en todos los casos.

Para definir si la sensibilidad al pH estaba dada por los canales de K^+ ó por la permeabilidad a H^+ ; en VMMA *M. sexta*, se eliminó el gradiente de pH en el sistema, y se trabajó en un rango de pH de 8 a 10 en ambos lados de la membrana observando que el E_m se mantenía constante al eliminar el gradiente de pH a través de la membrana (Tabla IV), con lo cual se demuestra que los canales de potasio no son sensibles al pH y que existe un transporte de H^+ que esta involucrado en el potencial de reposo de la membrana este podría ser el transporte pasivo de protones reportado por Gringorten (1999).

TABLA IV. ELIMINACIÓN DEL GRADIENTE DE pH EN VMMA DE <i>M. sexta</i>.		
pH interno	pH externo	E_m (mV)
8	8	-74±6
9	9	-77±3
10	10	-79±5

Los valores del potencial de reposo de la membrana se obtuvieron de las curvas de calibración con valinomicina, descrito en materiales y métodos. E_m = Potencial de reposo de la membrana. E_k = Potencial de equilibrio del potasio (-154±4). Los valores de $E_m \pm$ desviación estándar. El valor de $n=3$.

En este trabajo también observamos que las membranas de *M. sexta* y de *T. molitor* poseen una permeabilidad basal al K^+ (Fig. 8 y Fig. 9). La permeabilidad basal al potasio en membranas de intestino de lepidópteros ya se había observado anteriormente en *Bombix mori* (Uemura *et al*, 1992), *M. sexta* (Carrol y Ellar, 1993), *S. frugiperda* y *T. ni*

(Lorence *et al*, 1995 y 1997). Lo que nosotros observamos es que esta permeabilidad basal a K^+ aumenta al aumentar el pH del medio extravésicular. Existe una correlación entre el pH del lumen intestinal y el aumento de la permeabilidad basal del K^+ en los insectos que empleamos ya que el pH del lumen intestinal en *M. sexta* es de 10 (Hennigan *et al*, 1993, Azuma *et al*, 1995) y en *T. molitor* es de 5 (Koller *et al*, 1992). Esto podría sugerir que dentro del rango de pH fisiológico las proteínas funcionan óptimamente y al alejarse de este rango la actividad disminuye. Un ejemplo sería el trabajo de Hennigan *et al* (1993) quienes analizaron el transporte de alanina, fenilalanina y leucina en VMMA de *M. sexta* a través de una técnica de filtración rápida, observando que el transporte de estos aminoácidos se da en un rango amplio de pH pero la velocidad máxima de transporte lo observan a pH 10, el pH que posee este lepidóptero en su lumen intestinal de este lepidóptero. Otro ejemplo podría ser el trabajo de Koller *et al* (1992) en el cual observaron que las proteasas intestinales del coleóptero *Chrysomela scripta* presentan su máxima actividad proteolítica a pH 4, el pH que se encuentra en el intestino de este coleóptero. A pesar de que el transporte de aminoácidos, en *M. sexta*, las proteasas intrínsecas del intestino de *C. scripta* y el transporte basal de potasio observado en este trabajo, son sistemas diferentes, se debe enfatizar en que todos ellos están constituidos por proteínas y que la gran mayoría de proteínas se ven afectadas por el pH, teniendo un rango óptimo para su funcionamiento.

Efecto del pH en la actividad formadora de poro de las toxinas Cry.

Existen evidencias que sugieren que el pH influye en la actividad formadora de poro de algunas toxinas bacterianas. En la colicina E1, una toxina producida por *Escherichia coli*, se facilita su inserción en la membrana solamente a pH bajo (Chak *et al*, 1998). En la α -toxina de *Staphylococcus aureus* la acidificación del medio aumenta la actividad del canal formado por esta toxina (Vécsey-Semjén *et al*. 1996). También se ha observado que la proteína VacA, una toxina secretada por *Helicobacter pylori* forma canales al ponerla en un medio con pH ácido (Iwamoto *et al*, 1999).

En el laboratorio, se han realizado experimentos con las toxinas Cry1C y Cry1D en VMMA del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, observando que ambas toxinas son activas a pH 8 (Lorence *et al*, 1995). También se analizaron las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en VMMA del lepidóptero *Trichoplusia ni*, observando que estas toxinas son

activas a pH 8 (Lorence *et al*, 1997). Cuando se realizaron experimentos con las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac en VMMA del lepidóptero *M.sexta* a pH 8, se observó una actividad formadora de poro muy pequeña para las tres toxinas. Sin embargo, cuando estas toxinas se ensayaron a pH 10 la actividad formadora de poro aumento en los tres casos (ver Tabla V. y Fig. 8). La toxina Cry1Aa aumento su actividad 5 veces, la toxina Cry1Ab aumento 25 veces y la toxina Cry1Ac aumento 5.8 veces.

TABLA V.
ACTIVIDAD FORMADORA DE PORO DE DIFERENTES PROTEÍNAS CRY EN VMMA DE *M. sexta* EN DIFERENTES pH.

pH	Cry1Aa n=3	Cry1Ab n=3	Cry1Ac n=3
8	0.06±0.009	0.03±0.003	0.09±0.005
10	0.3±0.008	0.75±0.03	0.53±0.03

Los datos representan el promedio del valor de la pendiente de la actividad formadora de poro ± y la desviación estándar. Los valores de las pendientes de las toxinas Cry se obtuvieron a partir de los trazos de la figura 8.

Resultados preliminares demostraron que también la actividad de la toxina Cry3A es dependiente de pH, ya que observamos que esta toxina presenta actividad a pH 4.5 mientras que a pH 5, 6 y 7 su actividad desaparece (Fig.9).

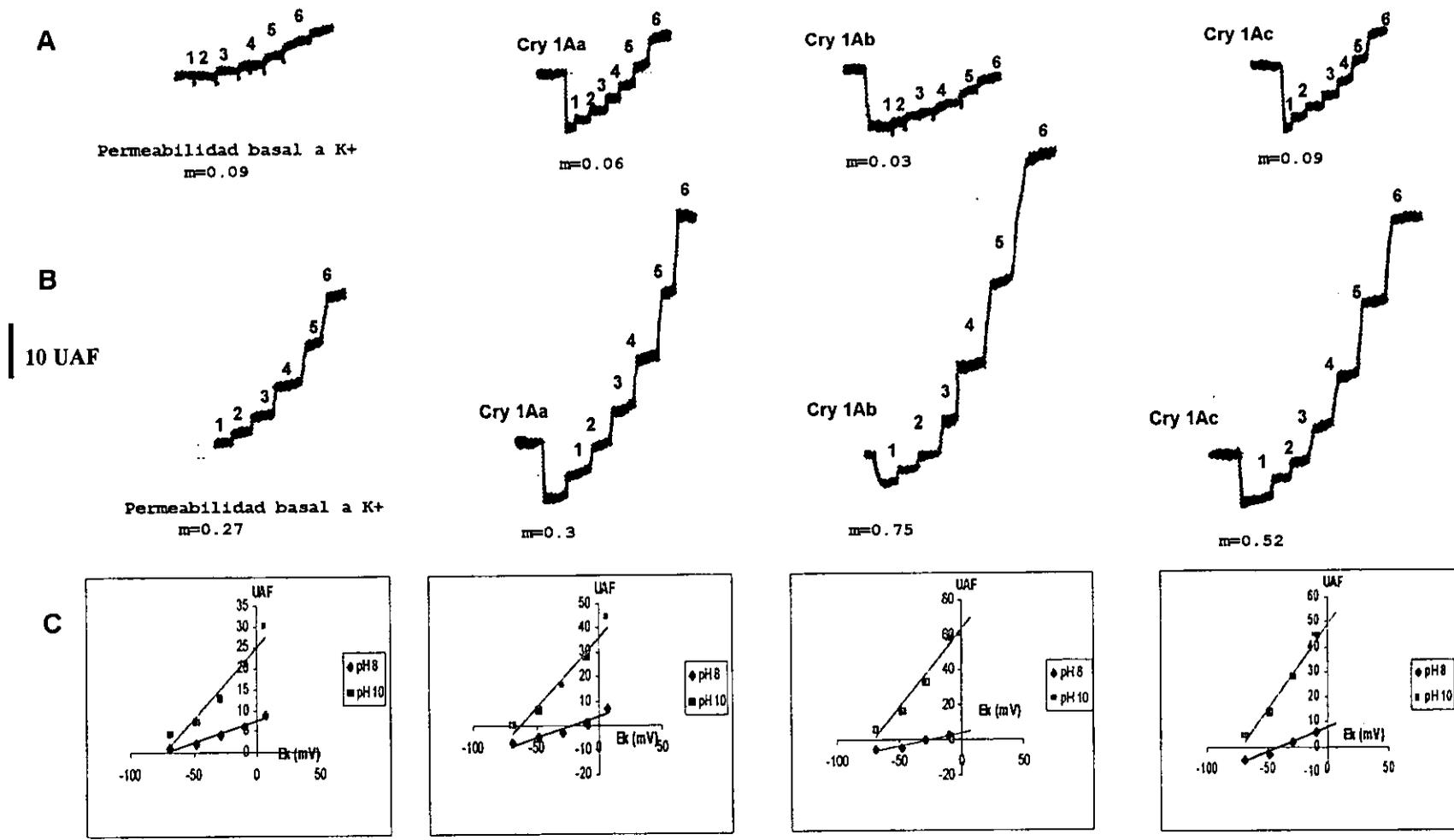


Figura 8. Efecto del pH en la actividad formadora de poro de tres toxinas Cry1A en VMMA de *M. sexta*. La toxina se adicionó a una concentración de 100 nM, la cual produce una hiperpolarización que se observa como una disminución de la fluorescencia. Los números indican las adiciones crecientes de KCl, 1=0.47 mM, 2=9 mM, 3=26 mM, 4=58 mM, 5=122 mM, 6=244 mM. Cada adición provoca una depolarización que se observa como un aumento de la fluorescencia, A) trazos a pH 8 y B) pH 10, C) gráficas obtenidas a partir de los datos de potencial de equilibrio del potasio y de los cambios de fluorescencia para cada una de las adiciones. Al valor de la pendiente (m) de cada toxina se le restó la "m" de la permeabilidad intrínseca. La línea vertical representa 10 unidades arbitrarias de fluorescencia.

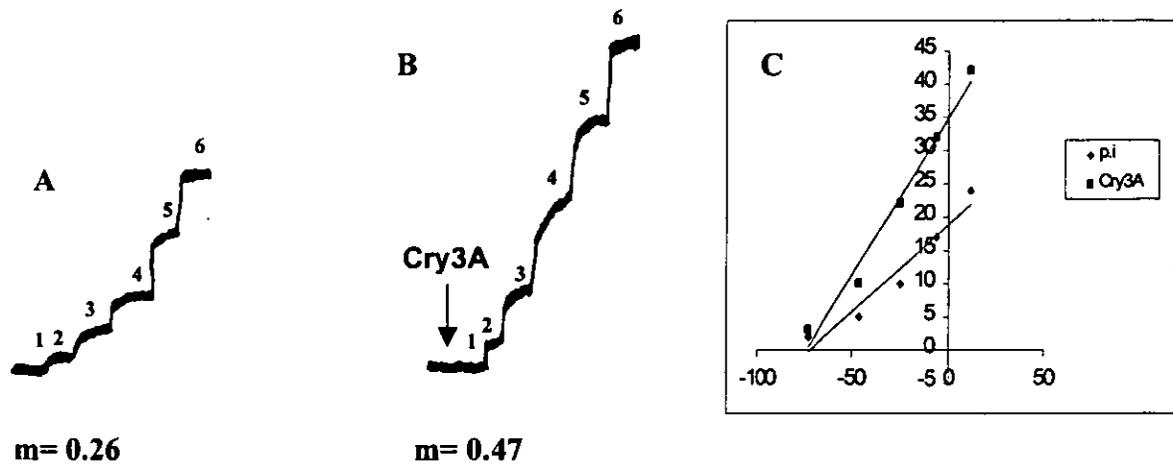


Figura 9. Efecto del pH en la actividad formadora de poro de la toxina Cry3A en VMMA del coleóptero *Tenebrio molitor*. A) Permeabilidad basa al K^+ , B) Actividad de la toxina Cry3A a pH 4.5, C) gráfica obtenida apartir de los datos de E_K y de los cambios de fluorescencia para cada una de las adiciones. El ensayo se realizó con 30 mg de proteína de membrana. La flecha indica la adición 100 nM de la toxina Cry3A. Los números indican las adiciones crecientes de KCl 3M, 1= 0.41 mM, 2= 9 mM, 3= 25 mM, 4= 57 mM, 5= 122 mM y 6= 244 mM. El valor del E_K fue de -148 ± 3 mV y el E_m fue de -145 ± 8 mV, (p.i) permeabilidad intrínseca a K^+

Existen estudios con células CF-1 (línea celular proveniente de larvas neonatas del lepidóptero *Choristoneura fumifera*) en donde se ha observado que al reducir el pH de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, antes de adicionarlas a un tapete de células se inhibe su actividad. Observando que este efecto inhibitorio es reversible al alcalinizar el pH de la toxina a 10.5. También observaron que era poco probable que el efecto inhibitorio ocurriera por agregación o por precipitación de las toxinas (Gringorten *et al*, 1990 y 1992).

El aumento de la actividad formadora de poro de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac al aumentar el pH extravesicular de 8 a 10, correlaciona perfectamente con el pH del lumen intestinal observado en *M. sexta* (Dow, 1992), ya que este insecto posee un lumen

intestinal con pH 10. La actividad formadora de poro dependiente de pH se podría deber a que las proteínas Cry o el receptor de estas presentan cambios conformacionales adecuados para la unión, inserción y actividad de estas. Existen reportes en donde sugieren que las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac sufren cambios conformacionales dependientes de pH (Venugopal *et al*, 1992, Feng y Bechtel, 1994).

Esto podría sugerir que existen sitios específicos de las toxinas Cry que sensan el pH del medio, lo cual ya se ha observado para otras toxinas, tales como las colicinas E1 y E7 (Chak *et al*, 1998, Merril *et al*, 1997).

Selectividad iónica de la toxina Cry1Ac en función del pH.

En anteriores trabajos sé había reportado que los canales formados por las toxinas Cry presentaban cierta selectividad a cationes sin ser completamente selectivos al K^+ . Al observar que la toxina Cry1Ac presentaba mayor actividad a pH 10 que a pH 8, se decidió analizar si había algún cambio en la selectividad ionica de esta toxina ante cambios de pH.

La selectividad iónica se calcula apartir del cociente de la pendiente estimada de los datos de fluorescencia obtenidos al hacer las adiciones crecientes de los diferentes iones analizados y la pendiente obtenida de la permeabilidad del potasio.

La selectividad iónica de la toxina Cry1Ac en las VMMA de *M. sexta* a pH 8 fue $Cs^+ > Li^+ > K^+ = Na^+ > Rb^+$ mientras que a pH de 10 los cambios fueron mínimos ya que el ion con mayor selectividad fue el $Li^+ > Na^+ > K^+ = Cs^+ > Rb^+$ (ver Tabla VI).

**TABLA VI.
EFECTO DEL pH EN LA SELECTIVIDAD IONICA DE LA TOXINA
Cry1Ac EN VMMA DE *M. sexta***

Ion	PH8 Mx/mK ⁺	pH10 mx/mK ⁺
K ⁺	1±0.03	1±0.06
Na ⁺	0.97±0.02	1.3±0.1
Cs ⁺	1.8±0.01	1±0.02
Li ⁺	1.3±0.09	2.3±0.2
Rb ⁺	0.9±0.08	0.6±0.06

La selectividad ionica se calculó del cociente de la pendiente obtenida de los datos de fluorescencia obtenidos al hacer las adiciones crecientes de los diferentes iones analizados y la pendiente obtenida de la permeabilidad del potasio. Para cada experimento n = 3.

En trabajos anteriores se reportó que la permeabilidad inducida por las toxinas Cry1C y Cry1D en VMMA de *Spodoptera frugiperda* (Lorence *et al*, 1995) es selectiva a cationes sin presentar una mayor selectividad para el K⁺, observando los mismos resultados para la toxina Cry1Ac en VMMA de *T. ni* (Lorence *et al*, 1997). La selectividad iónica inducida por la toxina Cry1Ac correlaciona con la selectividad observada en otros trabajos para estas proteínas ya que no es muy diferente para los cationes monovalentes que empleamos. Al comparar la selectividad ionica de las toxinas Cry con la selectividad observada para canales específicos de potasio, en donde este ion es 10,000 veces más permeable que el Na⁺ (Doyle *et al*, 1998) se observa que la selectividad de las toxinas Cry es realmente muy baja.

La toxina Cry1Ac no presentó un cambio en la selectividad iónica a pH 8 y a pH 10 en VMMA de *M. sexta* pero observamos que presenta la misma relación observada para esta misma toxina en VMMA de otros lepidópteros como *T. ni* (Lorence *et al*, 1997) y también se ha observado la misma relación en cuanto a selectividad en membranas de *M. sexta* por otros autores (Henningan *et al*, 1993). Esto puede deberse a que la

proteína Cry1Ac es tóxica para lepidópteros los cuales poseen características intestinales muy similares, como la composición iónica y los tipos celulares que conforman el epitelio intestinal (Sacchi y Wolfesberger, 1996., Dow, 1992). La mayor diferencia observada dentro de este orden es el pH del lumen intestinal. De esta manera se puede sugerir que la principal divergencia que se puede observar dentro de las toxinas Cry específicas para lepidópteros es la actividad a diferentes pH.

Ensayos de unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en VMMA.

Existe una gran cantidad de estudios relacionados con el análisis de las proteínas de unión para las proteínas Cry. En el caso del lepidóptero *M. sexta* existen evidencias que muestran que las proteínas de unión para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac son miembros de la familia de las aminopeptidasas tipo N con un peso molecular cercano a 120 KDa. También se ha reportado que existe unión a una proteína de 210 KDa que se ha identificado como perteneciente a la familia de las caderinas (Knigth *et al*, 1994, Sagandala *et al*, 1994, Denolf *et al*, 1996)

Se probó la unión de las toxinas Cry1A en VMMA de *M. sexta* mediante ensayos de tipo "ligand blot". Los resultados de este experimento demostraron que las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac se unen a una proteína de 120 KDa, lo cual concuerda con el peso molecular reportado para la proteína de unión para ambas toxinas en *M. sexta*. Sin embargo datos previos de nuestro laboratorio muestran con ensayos de "ligand blot" que la toxina Cry1Ab se une a dos proteínas, una de 120 y otra de 210 KDa en VMMA de *M. sexta*, observando que la banda de 120 KDa es mayor y más intensa que la banda de 210 KDa (Flores *et al*, 1997). La ausencia de la banda de 210 KDa en nuestros resultados podría deberse a que es muy tenue ya que la banda de 120 KDa es también más tenue que la observada en resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio.

Como control negativo se utilizó la toxina Cry3A, una proteína específica para coleópteros por lo que se esperaba que no hubiera unión de la toxina en las VMMA de *M. sexta*, pero se encontró que la toxina Cry3A se une a 6 proteínas distintas de 120, 84, 78, 70, 50 y 18 KDa. Sin embargo esta proteína no es tóxica para este lepidóptero (Fig. 10).

Adicionalmente, Bravo *et al*, (1992) observaron en cortes de tejido de *M. sexta* que había unión de la toxina Cry3A encontrando que la unión sólo se daba en la matriz

peritrófica. También se ha observado unión de la toxina Cry1Aa en VMMA de *T. molitor* (Nagamatsu, et al., 1998) en este caso sólo se observa unión en dos proteínas, una de 137 y otra de 107 KDa.

La unión de la toxina Cry3A a VMMA de *M. sexta* se podría explicar como unión inespecífica. Esto nos sugiere que la especificidad de las toxinas Cry no se puede basar sólo en la existencia de sitios de unión ya que en este trabajó la unión de la toxina Cry3A a membranas de intestino medio de *M. sexta* podría deberse a la presencia de proteínas de matriz peritrófica en la muestra.

Para demostrar la existencia de competencia homóloga entre la toxina Cry3A y la toxina Cry1Ab en membranas de *M. sexta* se podrían hacer ensayos de competencia homóloga utilizando toxina marcada con I^{125} e ir incrementando la concentración de competidor homólogo, es decir de toxina Cry3A sin marcar.

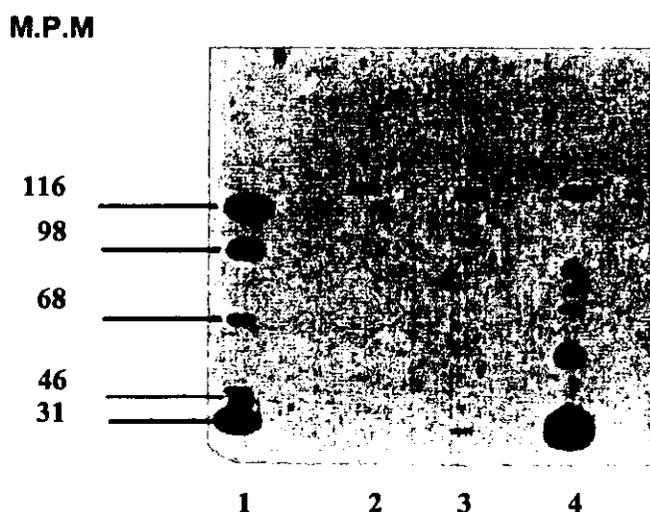


Figura 10. Ensayo de "ligand blot" en VMMA de *M. sexta*. Las membranas se purificaron como se describe en los métodos. Cien μ g de proteína de membrana de *M. sexta* se aplicaron en un gel de 9% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente cada carril por separado se expuso a una concentración de 20 nM de toxina biotinilada. Después la membrana se trató con estreptavidina acoplada a peroxidasa y se reveló con luminol. Carril 1, marcadores de peso molecular (M.P.M). Carril 2, toxina Cry1Ac. Carril 3, toxina Cry1Ab. Carril 4, toxina Cry3A.

7. CONCLUSIONES.

1. - En las membranas del lepidóptero *Manduca sexta* y del coleóptero *Tenebrio molitor* el pH influye en el potencial de reposo, cuando existe un gradiente de pH a través de la membrana.
2. - En este trabajo se observó que la actividad formadora de poro de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac y Cry3A es dependiente del pH. Es decir, la actividad de estas toxinas es mayor cuanto más cercano se trabaja al pH fisiológico de su insecto blanco.
3. - La selectividad iónica de la toxina Cry1Ac es similar a pH 8 y a pH 10 en VMMA de *Manduca sexta*.
4. - La capacidad de las toxinas Cry3A de unirse a proteínas presentes en VMMA de *M. sexta* no es sinónimo de toxicidad.

8. APÉNDICE.

SOLUCIONES PARA LOWRY

SOLUCION AB

2g Na_2CO_3

1g SDS

0.4g NaOH

0.16g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

para 100 ml

SOLUCION C

0.25g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

para 50 ml

CURVA ESTANDAR DE BSA

De una solución de BSA de 10mg/ml se toman 10 μl y se llevan a 1 ml con agua. Para obtener una solución 0.1 mg/ml.

BSA 0.1 mg/ml (μl)	H_2O (μl)
0	1000
50	950
100	900
200	800
400	600

9. REFERENCIAS.

1. Abdul-Rahuf y Ellar, D.J. (1999). Toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* CryIC toxin active against both lepidoptera and diptera. *J. Invert. Pathol.* 73:52-58.
2. Aronson, I.A., Hans, E.S., McGaughey, W. Y Johnson, D. (1991). The solubility of inclusion protein from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 981-986.
3. Aronson, I.A. (1993). The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. *Mol. Microbiol.* 7(4):489-496.
4. Azuma, M., Harvey, W.R., Wieczorek, H. (1995). Stoichiometry of K⁺/H⁺ antiport helps to explain extracellular pH 11 in a model epithelium. *FEBS Lett* 361(2-3):153-156.
5. Barnes, D.R. (1985). *Zoología de los invetrebrados*. Ed. Interamericana. México. D.F.
6. Belfiore, C.J., Vandlamudi, R.J., Osman, Y.A. y Bulla, L.A. Jr. (1994). A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringienis* subsp. *tenebrionis*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 200:359-364.
7. Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J. Ellis, D.J., Roberts, G.M., Pauli, S., Rodgers, P., Burges, H.D. (1997). Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. *J. Invert. Pathol.* 70:59-68.
8. Bravo, A., Jansens, S y Peferoen, M. (1992). Inmunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertb. Pathol.* 60:237-246.

9. Bravo, A. (1997). Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179:2793-2801.
10. Brodway, R.M. (1989). Characterization and ecological implications of midgut proteolytic activity in larval *Pieris rapae* and *Trichoplusia ni*. *J. Chem. Ecol.* 15:2001-2113.
11. Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J., Derbyshire D.J. (1999). N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287(5):1011-22
12. Carrol, J. y Ellar, D.J. (1993). An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem* 214:771-778.
13. Chak, K.F., Hsieh, S.Y., Liao, C.C. y Kan, L. (1998). Change of thermal stability of colicin E7 triggered by acidic pH suggests the existence of unfolded intermediate during the membrane-translocation phase. *Proteins* 32(1):17-25
14. Chestukhina, G.C., Kostina, L.I., Mikhailova, A.L., Tyurin, S.A., Klepikova, F.S. y Stepanov, V.M. (1982). The main features of *Bacillus thuringiensis* δ - endotoxins molecular structure. *Arch. Microbiol.* 132:159-162.
15. Chilcott, C.N. y Ellar., D.J. (1988). Comparative study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2551-2558.
16. Choma, C., Surewicz., W.K., Carey, P.R., Poszgay, M., Raynor, T. y Kaplan, H. (1990). Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis* structural implications. *Eur. J. Biochem.* 189:523-527.
17. Clements, A. (1992). Larval nutrition, excretion and respiration. *The biology of the mosquitoes.* University Press. Cambridge. Pp. 101-123.

18. Crickmore, N. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(3):807-13.
19. Cumings, C.E., Armstrong, E.G., Hodgman, T.C. y Ellar, D.J. (1994). Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Mol. Membran. Biol.* 11:87-92.
20. de Maagd, R.A., Kwa, H., van der Klei, Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, J.W. y Bosch, D. (1996). Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein on ligand blots. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543.
21. de Maagd, R.A., Bakker, P., Staykov, N., Dukiandjiev, S., Stiekema, W., Bosch, D. (1999). Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III amino acid residues involved in insect specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10):4369-74.
22. Delécluse, A., Poncet, S., Klier, A. Y Rapoport, G. (1993) Expression of *cryIVA* and *cryIVB* genes, independently or combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3922-3927.
23. Denolf, P., Hendricks, K., Seuryneck, J., Vandamme, J., Jansens, S., Peferoen, M. y Van Rie, J. (1996). Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding protein. SIP 29th Annual Meeting and III International Colloquium on *Bacillus thuringiensis*. Córdoba, España, 1-6 septiembre. *Abstracts*, p.20-21.
24. Dow, J.A., (1992). pH gradients in lepidopteran midgut. *J.Exp. biol.* 172:335-375.
25. Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Mackinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* 280: 69-77.

26. English, L.H., Readdy, T.L. y Bastian, A.E. (1991). Delta-endotoxin induce leakage of $^{86}\text{R-K}^+$ and H_2O from phospholipid vesicles is catalized by reconstituted midgut membrane. *Insect. Bioche.* 21:177-184.
27. Ellar, D.J (1990). Pathogenicity determinants of entomopathogenic bacteria. En "5th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control". (Ed. D. Oinnoek), pp. 298-302. Society for Invertebrate pathology, Adelaide, Australia.
28. Fast, G.P. (1966). A comparative study of the phospholipids and fatty acids of some insects. *Lipids.* 1(3):209-216.
29. Faust, R.M. y Bulla, A.L (1982). Bacterial and their toxins as insecticides. "Microbial and viral pesticides". Kurstaki, E. (ed.) Marcel Deker, Inc., New York, pp. 75-205.
30. Feitelson, J.S., Payne. J. y Kim, L. (1992). *Bacillus thuringiensis*. Insect and beyond. *Bio/Technology.* 10, 271-275.
31. Fendelman, F., Dulleman, A.C., Waalwijk, C. (1995). Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2601-2605.
32. Feng, Q. Y Bechtel, W.J. (1994). pH induced conformational transitions of Cry1A(a), Cry1Ac and CryIIIA δ -endotoxins in *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry.* 33:8521-8526.
33. Flores, H. Soberón, X., Sanchez, J. y Bravo, A. (1997). Isolated domain II and III from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBBS Lett.* 414:313-318.
34. Gazit, E. y Shai, Y. (1993). Structural characterization, membrane interaction, and specific assembly within phospholipid membranes of hydrophobic segments from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* cytolytic toxin. *Biochem.* 32:12363-12371.

35. Gazit, E., Bach, D., Kerr, I.D., Sansom, M.S.P., Chejanovsky, N. y Shai, Y. (1994). The α -5 segment of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin: *in vitro* activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochem. J.* 304:895-902.
36. Gazit, E. y Shai, Y. (1995). The assembly and organization of the α 5 and α 7 helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* 270:2571-2578.
37. Gazit, E., La Roca, P., Sansom, P.M. y Shai, Y. (1998). The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:12289-12294.
38. Gill, S.S., Cowles, E.A. y Francis, V. (1995). Identification, isolation and cloning of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Bio. Chem.* 279:27277-27282.
39. González, J.M Jr, Dulmage, H.T, Carlton, B.C. (1981). Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid.* 5(3):352-65.
40. Gringorten, J.L., Witt, D.P., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. y Van Frankenhuyzen, K. (1990). An invitro system for testing *Bacillus thuringiensis* toxins: The lawn assay. *J. Invert. Pathol.* 56:237-242.
41. Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. y Van Frankenhuyzen, K. (1992). Supression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invert. Pathol.* 60:47-52.
42. Gringorten, J.L. (1999). Ion regulation in the larval lepidopteran midgut and the response to *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin.
<http://www.chemsoc.org/chempest/html/4B-0028.html>

43. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R y Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254:447-464.
44. Güereca, L. y Bravo, A. (1999). The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochim. Biophys. Acta.*1429(2):342-350.
45. Haider, M.Z., Ellar, D.J. (1989a). Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin. Single aminoacid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity on the protein. *L. Mol. Biol.* 208:183-194.
46. Harvey, W.R. y Wolfesberger, M.G. (1979). Mechanism of inhibition of active potassium transport in isolated midgut of *Manduca sexta* by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J. Exp. Biol.* 83:293-304.
47. Hennigan, B.B., Wolfersberger, M.G., Harvey, W.R. (1993) Neutral amino acid symport in larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane vesicles deduced from cation-dependent uptake of leucine, alanine, and phenylalanine. *Biochim. Biophys. Acta.*1148(2):216-22
48. Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Sianauer, Assoc., Sunderland, Ma. USA. p. 24.
49. Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S. y Van Mellaert, H. (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc Natl Acad Sci.* 85(21):7844-8.
50. Höfte, H, y Whiteley, H.R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.

51. Iwamoto, H, Czajkowsky, D.M, Cove, T.L, Szabo, G, Shao, Z. (1999). VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett* . 30;450(1-2):101-4.
52. Jarret, P. (1985). Potency factors in the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *aizawi* and the significance of plasmids in their control. *J. Appl. Bac.* 58:437-448.
53. Jenkin, H.M., McMeans, E., Anderson, E.L. y Yang, K.T. (1976). Phospholipid composition of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* cell in logarithmic and stationary growth phases. *Lipids*. 11(9):697-704
54. Johnson, D.E. y Felton, G.W. (1996). Potencial influence of midgut pH and redox potential on protein utilization in insect herbivores. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32:85-105.
55. Knigh, P.J.K., Crickmore, N. Y Ellar, D.J. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11:429-436.
56. Knowles, B.H. y Ellar, D.J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with diferent insect especificity. *Biochem. Biophys. Acta.* 924:509-518.
57. Knowles, B.H., Nicholls, C.N., Armstrong, G., Tester, M. y Ellar, D.J. (1990b). Broad spectrum cytolytic toxins made bay *Bacillus thuringiensis*. "Invertebrate Pathology and Microbial Control". (Ed. D. Pinnok), pp. 283-287. Society for Invertebrate pathology, Adelaide. Australia.
58. Knowles, B.H., White, P.J., Nicholls, C.N. y Ellar, D.J. (1992). A broad espectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var *kyushuensis*. *Proc. Roy.Soc. Lond. B.* 248:1-7.

59. Knowles, B.H. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* 24:275-308.
60. Koller, C.N., Bauer, L.S., Hollingworth, M.R. (1992). Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var *san diego* native δ -endotoxin crystal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:692-699.
61. Krieg, A. y Miltenberger, D.H (1984). Bioinsecticides: *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Biotechnol. Processes.* 3:273-290.
62. Lee, M.K., You, T.H., Gould, F.L., Dean, D.H. (1999). Identification of residues in domain III of bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. *Appl Environ Microbiol.* 65(10):4513-20
63. Li, J., Carrol, J y Ellar, D.J. (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* 353:815-821.
64. Li, J., Koni, P.A., Ellar, D.J. (1996). Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications. *J Mol Biol.* 257(1):129-52.
65. Liang, Y., Patel, S.S., Dean, D.H., (1995). Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* 270(42):24719-24.
66. Lorence, A. Darson, A., Díaz, C., Liévano, A., Quintero, R. y Bravo, A. (1995) δ -endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Letters.* 360:217-222.
67. Lorence, A. Darson, A. y Bravo, A. (1997). Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thurignesis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Letters.* 414:303-307.

68. Luo, K., Tabashnik, E.B y Adang, J.M., (1997) Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1024-1027.
69. Martin, W.A.P. y Travers, S.R. (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2437-2442.
70. Merrill, A.R., Steer, B.A., Prentice, G.A., Weller, M.J y Szabo, A.G. (1997). Identification of chameleon-like pH-sensitive segment within the colicin E1 channel domain that may serve as the pH-activate trigger for membrane bilayer association. *Biochemistry* 36:6874-6884.
71. Mohammed, S.I., Johnson, D.E. y Aronson, A.I. (1996). Altered binding of the Cry1Ac toxin to larval membranes but not to the toxin-binding protein in *Plodia interpunctella* selected for resistance to different *Bacillus thuringiensis* isolated. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(11):4168-73
72. Nagamatsu, Y., Toda, S., Yamaguchi, F., Ogo, M., Kogure, M., Nakamura, M., Shibata, Y., Katsumoto, T. (1998). Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(4):718-26
73. Rajamohan, F., Hussain, R.A., Cotrill, J.A., Goulde, F. Y Dean, D.H. (1996). Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 271:2390-2396.
74. Rajamohan, F., Kyong, L.M. y Dean, D.H (1998). *Bacillus thuringiensis* Insecticidal protein: Molecular mode of action. *Progress. Acid. Res. Mol. Biol.* 60: 1-27.

75. Reuveni, M, Dunn, P.E (1991). Differential inhibition by *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin of leucine and aspartic acid uptake into BBMV from midgut of *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181(3):1089-93.
76. Sacchi, V.F. y Wolfesberger, M. G. (1996). Aminoacid absorption. En "Biology of the insect midgut". Chapman Hall. A, Londres, pp. 265-289.
77. Sagandala, S., Walters, F.W., English, L.H. y Adang, M.J. (1994). A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(c). toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* 269: 10088-10092.
78. Sanchis, V. y Ellar, D.J. (1993). Identification and partial purification of a *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. *FEBS Lett.* 1;316(3):264-8.
79. Schnepf, E., Crickmore, N. Van Rie, J. Lereclus, D., Baum, J. Feitelson, J, Zeigler, D.R. and Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microb. and Mol. Biol. Reviews.* 62(3):775-806
80. Schwartz, J., Garneau, L., Masson, L. y Brousseau, R. (1991). Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 1065:250-260.
81. Schwartz, J., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. Rousseau, E. (1993). Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132:53-62.
82. Schwartz, J.L., Potvin, L., Chen, X.J., Brousseau, R., Laprade, R. y Dean, D.H. (1997). Single-site mutation in the conserved alternatin-arginine region affect ionic channels formed by Cry1Aa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3978-3984.

83. Slatin, S.L., Abram, C.K. y English, L. (1990). Delta endotoxins form cation- selective channels in planar bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169:765-772.
84. Sperelakis, N. (1995). *Cell physiology*. Academic Press. New York. Second edition. p 18.
85. Tomas, W.E. y Ellar, D.J. (1983). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal δ -endotoxin. *FEBBS Lett.* 154:362-368.
86. Uemura, T., Ihara, H., Wadano, A. y Himeno, M., (1992). Fluorometric assay change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:1976-1979.
87. Valaitis, A.P., Lee, M.K., Rahamojan, F. Y Dean, H.D. (1995). Brush border membrane aminopeptidase-N in the midguth of the gypsy moth serves as receptor for the Cry1A(c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25, 1143-1151.
88. Van-Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J.Biochem.* 186:239-247.
89. Van-Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.D. y Van Mellaert, H. (1990). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247: 72-74.
90. Vadlamudi, R.K., Weber, E, Ji, I., Ji, T.H., Bulla, L.A. Jr. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494.
91. Vecsey-Semjen, B, Mollby, R, van der Goot F.G. (1996). Partial C-terminal unfolding is required for channel formation by staphylococcal alpha-toxin. *J. Biol. Chem.* 271(15):8655-60

92. Venugopal, V.M., Wolfesberger, G.M. y Wallace, B.A. (1992). Effects of pH on conformational properties related to the toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1159(2):185-192.
93. Von Terch, M.A., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. y English, L.H. (1994). Membrane permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIII_{B2} and CryIII₂ domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3711-3717.
94. Waggoner, A.S. (1979). Dye Indicators of membrane potential. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8:47-68.
95. Walters, F.S., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. y English, L.H. (1993). Ion channel activity of the N-terminal fragments from Cry1A(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:921-926.
96. Whiteley, F.S y Schnepf, H.R (1986). The molecular biology of paraesporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 549-576.
97. Wolfesberger, M.G., Lüthy, P., Maurer, A., Parentu, P., Sacchi, V.F., Giordana, B. y Hanozet, G.M. (1987). Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86A (2):301-308.
98. Wolfesberger, M.G. (1990). The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for toxins. *Experientia* 46:475-477.
99. Wu, D. y Aronson, A. (1992) Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* 267:2311-2317.

100. Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T. y Sato, R. (1997). Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* 246:652-657.
101. Yu, C.C., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G. y Struch, J.J. (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:532-536.