



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Papel de los triptofanos en el mecanismo de acción de la
toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
Carlos Cristopher Padilla Delgado

Directora de Tesis
Dra. Alejandra Bravo de la Parra



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

m 345386



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Papel de los triptofanos en el mecanismo de acción de la toxina CryIAb de Bacillus thuringiensis".

realizado por Carlos Christopher Padilla Delgado

con número de cuenta 09618518 -6 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Directora de Tesis
Propietario Dra. Alejandra Bravo de la Parra

Propietario Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Propietario Dra. Isabel Gómez Gómez

Suplente Dr. Guillermo Goset Lagarda

Suplente Quim. Viviana Escobar Sánchez

Alejandra Bravo de la Parra

Lorenzo Segovia Forcella

Isabel Gómez Gómez

Guillermo Goset Lagarda

Viviana Escobar Sánchez

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

"Papel de los triptofanos en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab de Bacillus thuringiensis".

El presente trabajo se realizo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Microbiología Molecular en el laboratorio de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra.

*A mis padres por impulsarme día con día para lograr una pequeña gran meta,
apoyándome en todo momento, esto es de ustedes, simplemente GRACIAS,
PA, MA, los quiero mucho.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alejandra Bravo por permitirme laborar en su grupo de trabajo, siendo un gran ejemplo a seguir, gracias Ale.

A la Dra. Patricia Joseph y Dr. Jose Luis Puente por apoyarme en los momentos difíciles en mi estancia del taller de Macromoléculas

A los miembros del jurado en la revisión de esta tesis: Dra. Bravo, Dra. Gómez, Dr. Segovia, Dr. Gosset y Quim. Viviana Escobar, gracias por sus aportaciones.

A mi hermano, Luis Antonio “negus”, por darme su apoyo en todo momento, ayudándome en lo que hiciera falta, osease, siempre, gracias negro. Te quiero.

En esta última etapa, a mi pequeña familia, Diana por aguantarme y a mi pequeñín, Alancito, por darme gran felicidad día con día.

A lo largo de toda la carrera, mis amigos Fernando Rodríguez y Abrahan Hernández con los que comparto una amistad mas allá de las aulas.

A mis valis, Memo, Edwin, Nancy, con los que la diversión nunca falta.

A todos aquellos que me han brindado también su amistad mas allá del ambiente académico, y que estuvieron en momentos muy difíciles de mi vida, América, Wendoli, Omar, Wendy, Elsa, David, Yamel, Sybyl, Nubia, Tecui, Rocia.

A una gran parte de mi generación, son únicos, Neto, Miguelón, Rafa, Ale, Nan, Fa, Nayeli, Tona, Chely, Dianita, son a today a todos aquellos con los que de una u otra forma fueron parte de esta etapa de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, Claudita, Luisa, Ivan, Idalia, Nuria, Jorge, Lupe, Osvaldo, Sabino, Nancy, Omar, Dres, Isa, Liliana, Gus, Carlos, Juan Miranda y al Dr. Mario Soberón, quienes han aportado información valiosa en toda mi estancia y sobre todo momentos muy divertidos que ayudan a mantener un ambiente más que agradable para laborar ahí.

Al Cheko, Alex, Chela y Liz por por ayudarme a ser dependiente de ustedes.

A mis compañeros que ya no están en el laboratorio pero que también me mostraron una parte de su persona, María, Claudia Morera y Juan Conde.

A la UNAM por brindarme esta maravillosa oportunidad de formarme académicamente, y que gracias a ello conseguí además múltiples caminos para desarrollarme como ser humano y tener la dicha de compartir este espacio con mucha gente supervaliosa.

A todos simplemente, *GRACIAS, MIL, MIL, GRACIAS.*

CONTENIDO

Introducción	1
Características generales. <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
Clasificación de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
Estructura de las toxinas Cry	4
Mecanismo de acción de las proteínas Cry	5
-Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry	6
-Unión al receptor	7
-Inserción en la membrana y formación de poro	9
Antecedentes particulares	10
El Triptofano y su función en las proteínas.....	10
Efecto de la luz ultravioleta sobre las proteínas insecticidas de Bt	13
Hipotesis	15
Objetivos	15
Materiales y metodos	16
Cepas	16
Crecimiento de las cepas	16
Purificación de las toxinas	17
Determinación de concentración de proteína	17
Electroforesis de Proteínas	17
Bioensayos de toxicidad.....	18
Ensayo de solubilidad (Producción de Protoxina)	18
Activación con tripsina (Producción de la Toxina)	18
Purificación de las vesículas de la microvellosidad apical media (VMMA) a partir de intestinos de <i>Manduca sexta</i>	19
Western Blot	20
Marcaje de las toxinas con biotina para la realización de ensayos de unión	20
Ensayo de unión en solución	21
Ensayos de competencia.....	21
Oligomerización de la toxina en presencia del anticuerpo scFv73.....	21
Ensayos de formación de poro	21
Irradiación solar	22
Resultados	23
Producción de cristales de toxina Cry1Ab silvestre y mutantes.....	23
Purificación de las toxinas	24
Análisis de toxicidad de las mutantes.....	25
Activación con tripsina (Toxina)	26
Marcaje de las toxinas con biotina	28
Ensayo de unión	29
Ensayos de competencia	30

Oligomerización de la toxina en presencia del anticuerpo scFv73	30
Ensayos de formación de poro	32
Exposición a luz ultravioleta	33
<i>Discusión</i>	36
<i>Conclusiones</i>	40
<i>Referencias</i>	41

"Papel de los triptofanos en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*".

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales intereses a nivel mundial en la producción de alimentos y en la salud humana, es el control de plagas de insectos, que afectan la agricultura y de vectores de enfermedades de importancia en la salud pública (Bravo, *et al.*, 2005). Se estima que anualmente un 28% de la producción de alimentos en el mundo es afectada por plagas de insectos ya sea en el campo o durante su almacenamiento. Hasta los últimos años el control de estas plagas se ha basado principalmente en el uso de insecticidas químicos; lo que ha provocado una serie de efectos no deseados en el medio ambiente como son: la acumulación de químicos carcinogénicos en los ecosistemas, la contaminación del agua, el desarrollo de resistencia por parte de los insectos y sobre todo la destrucción indiscriminada de otras especies benéficas que afectan el entorno natural en general, en conjunto, todos estos factores han originado la búsqueda de alternativas que no dañen al medio ambiente (Rajamohan, *et al.*, 1998).

Una alternativa con menor impacto en los ecosistemas para el control de plagas de diversos cultivos es el uso de bioinsecticidas como control biológico, definido como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente y/o sus productos para reducir los efectos de insectos plaga en conjunto (Karamanlidou, *et al.*, 1991 y Badii, *et al.*, 1996). Ignoffo y Hink, citados por Badii en 1996, reportan la existencia de más de 1500 especies de microorganismos entomopatógenos con potencial para el control microbiano de insectos, en relación a su diversidad se señalan: hongos, virus, protozoarios y bacterias, en donde éstas últimas son las de mayor importancia. Sin embargo, su uso a nivel mundial, es en apenas unos pocos millones de hectáreas de cultivos y bosques cada año. Los bioinsecticidas representan una alternativa potencial sobre los insecticidas químicos particularmente cuando la resistencia de los insectos o los efectos no deseados en el medio ambiente están asociados con el uso de químicos. Los insecticidas químicos han dominado el mercado de control de plagas desde 1960 ya que presentan un gran número de ventajas entre las que se incluyen: su bajo costo de producción, un amplio espectro de especies blanco y su fácil aplicación (Bishop, 1994). Mientras que los bioinsecticidas cuentan con un pequeño segmento dentro del mercado (≈5%), a pesar de que en áreas específicas ofrecen una alternativa ambientalmente segura de bajo costo con respecto a los químicos. Sin embargo, en otras áreas los bioinsecticidas tienen altos costos comerciales, tienen baja eficacia en comparación con los insecticidas químicos, los productos tienen limitada persistencia y su espectro de insectos blanco es reducido (Bravo, *et al.*, 2005).

La ingeniería genética está investigando varios de estos problemas con el objetivo de resolverlos sin perder las características benéficas de estos

insecticidas biológicos (Bishop, 1994), además la generación de plantas transgénicas que produzcan las proteínas de interés está ganando mucho terreno, siendo una de las metas principales la sustitución de insecticidas químicos pero asegurando que el uso de esta tecnología no sea dañina al ambiente, no alterando la diversidad genética de las especies silvestres (Bravo, *et al.*, 2005).

Entre los diferentes agentes de control biológico, las bacterias patógenas de insectos han sido de las alternativas más estudiadas. Aún cuando diversas bacterias infectan y matan insectos, *Bacillus thuringiensis* es el agente de control biológico comercialmente más probado y utilizado sobre algunas plagas de insectos. Por ejemplo, en Estados Unidos y Canadá del 80-100% del control de plagas en los bosques recae en el uso de *B. thuringiensis*, aunque el éxito de la aplicación depende del tiempo apropiado, condiciones ambientales y altas dosis de las aplicaciones del rociado (Bravo, *et al.*, 2005).

Características generales. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta. Durante su ciclo de vida presenta dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición y la fase de esporulación, la cual es un programa de diferenciación de bacteria a espora. El programa de diferenciación consta de siete estadios, se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes, como fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, lo que da como resultado la formación de una célula quiescente altamente resistente a la desecación, la falta de nutrientes y exposición a la luz ultravioleta. Este programa de diferenciación involucra la regulación de muchos genes en el tiempo y en el espacio a través de la utilización de múltiples factores que se expresan a diferentes tiempos (Soberón y Bravo, 2001).

Durante la fase de esporulación Bt produce inclusiones cristalinas de naturaleza proteica con propiedades insecticidas (fig. 1). Por su acumulación en forma de cristales, estas proteínas son designadas como proteínas Cry o bien δ -endotoxinas (dentro de las cuales también se encuentran las proteínas Cyt) (Yamamoto and Dean, 2000). Se han reportado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios, por lo que se han utilizado como bioinsecticidas comerciales contra larvas de insectos plaga que afectan la agricultura y áreas forestales, así como para el control de insectos vectores de patógenos del ser humano. Su éxito de utilización radica en su alta especificidad hacia el insecto blanco y su inocuidad para mamíferos, otros vertebrados, plantas e inclusive otros insectos benéficos (Schnepf *et al.*, 1998).

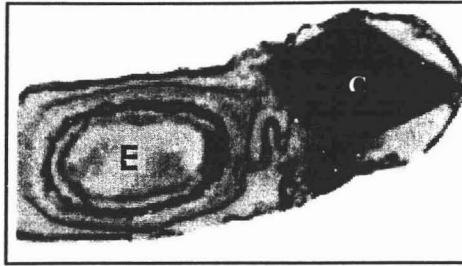


Fig. 1. Micrografía de *Bacillus thuringiensis*, donde se muestra la endoespora (E) y el cristal (C) que contiene las proteínas insecticidas.

Además de las δ -endotoxinas, *B. thuringiensis* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a sus blancos con mayor eficiencia, entre los que se encuentran: fosfolipasas, proteasas, quitinasas, α -exotoxinas o exotoxinas termolábiles, las β -exotoxinas, las cuales son toxinas que funcionan como análogos de ATP y las proteínas "VIP" (proteínas insecticidas vegetativas), que son proteínas de aproximadamente 80 kDa, producidas en la fase vegetativa del crecimiento, son secretadas al medio extracelular y son activas contra una gran variedad de lepidópteros (de Maagd et al., 2003).

Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

Las δ -endotoxinas se dividen en 2 superfamilias: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. A la fecha las proteínas Cry están agrupadas en 40 subgrupos con más de 200 miembros y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. La definición de proteínas Cry es un poco amplia: cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo blanco, verificable por medio de bioensayos ó cualquier proteína que tenga similitud en la secuencia con las proteínas Cry (Bravo, et al., 2005). Las toxinas Cry son una familia de proteínas de 70 y hasta 140 kDa, forman cristales y son tóxicas contra una amplia variedad de insectos. La familia de las toxinas Cyt incluye proteínas de 25 a 30 kDa, también forman cuerpos paraesporales y son activas contra dípteros (Li, et al., 2001).

Originalmente la clasificación de las toxinas Cry se basó en la identidad de secuencia y en el orden de insecto contra el que son específicos. Al ir creciendo el número de secuencias reportadas se decidió que la nueva nomenclatura de las δ -endotoxinas se basara exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria. En esta nueva nomenclatura se incluye el nombre Cry más un nombre compuesto por cuatro categorías. Dentro éstas categorías, el número arábigo se designa con la primera fila que corresponde hasta 45% de identidad; la segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45 a 78%; la tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 a 95%; la

última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más de 95% de identidad (Crickmore, *et al.*, 1998).

Cada grupo muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos. El grupo más grande de proteínas Cry lo forma la familia Cry de 3 dominios, que contiene 30 subgrupos de proteínas. El resto de las proteínas Cry se agrupan en pequeños conjuntos de 4-5 toxinas. Un grupo tiene homología con las toxinas binarias de *Bacillus sphaericus*, y otro con las toxinas Mtx también de *B.sphaericus* (de Maagd, *et al.*, 2003)

Estructura de las toxinas Cry

Las toxinas Cry de tres dominios son proteínas globulares y los dominios correspondientes muestran el mismo plegamiento entre toxinas. La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de las proteínas Cry3A, Cry1Aa y Cry3Bb1 al igual que de la protoxina Cry2A ha revelado que estas moléculas están organizadas en tres dominios estructurales distinguibles entre sí, cada uno constituido por cerca de 200 aminoácidos (fig. 2), (Li, *et al.*, 1991; Grochulski, *et al.*, 1995; 2001; Morse *et al.*, 2001).

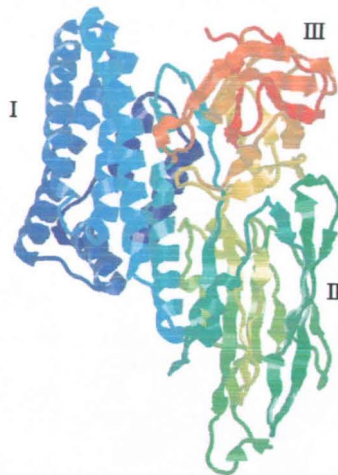


Fig. 6. Estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa. Se observan los tres dominios estructurales. El Dominio I (en azul) está involucrado en la inserción a la membrana y la formación de poro. El Dominio II (en verde) y el Dominio III (en rojo y amarillo), están involucrados en el reconocimiento y unión al receptor tomada de De Maagd, R., Bravo, A. y Crickmore, N. (2001).

El dominio I está constituido por seis hélices α antiparalelas y anfipáticas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$), éstas hélices forman un ramillete que rodea a una séptima, hélice $\alpha 5$ la cual es muy hidrofóbica. A excepción de las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2a$, $\alpha 2b$, las α hélices restantes tienen longitud de más de 30 Å, por lo cual son de tamaño suficiente para atravesar la membrana. Estos datos, junto con algunos obtenidos por experimentos de mutagénesis y el análisis de la interacción de péptidos sintéticos con membranas artificiales sugieren que se trata del dominio que forma el poro iónico (Aronson y Shai, 2001). El dominio II está formado por tres láminas plegadas β -antiparalelas que terminan en asas ("loops 1, 2 y 3 ") en el vértice de la molécula formando un prisma. Se ha demostrado que el dominio II juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina, donde las asas varían en tamaño y constituyen regiones hipervariables entre las diferentes toxinas que interaccionan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio de los insectos. El dominio III está compuesto de dos láminas β -plegadas antiparalelas, arregladas en forma de emparedado una sobre otra, por lo que la lámina del exterior es accesible al solvente, mientras que la interior se encuentra de cara a los otros dominios. Se ha propuesto que este dominio protege a la toxina de la acción proteolítica prematura por parte de las enzimas digestivas y que la interacción entre los dominios I y II es importante para la estabilidad e integridad de la protoxina. Por otro lado, también se ha reportado que este dominio está involucrado en la especificidad de la toxina (Schnepf *et al.*, 1998; Van Rie, 2000).

Mecanismo de acción de las proteínas Cry

Aunque el mecanismo de acción detallado aún no se ha descrito completamente, una cantidad importante de información se ha generado al respecto en los últimos años, ya que entender el mecanismo de acción de las toxinas de Bt y el desarrollo de resistencia de los insectos susceptibles es fundamental para un uso racional de estas toxinas en el control de plagas. Es importante mencionar que la mayor parte de la información se ha obtenido de insectos del orden Lepidóptera por la facilidad que representa su tamaño para su manejo y mantenimiento en el laboratorio.

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de Bt son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte por inanición y septicemia. Los estudios histopatológicos han mostrado que las células columnares del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente y en particular, la microvellosidad apical, la cual se destruye en su totalidad (Bravo, *et al.*, 1992). En general el mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de varios pasos que involucran: solubilización del cristal, procesamiento de las protoxinas, unión al receptor, inserción en la membrana, agregación, formación de poro y lisis celular (fig. 3), (Schnepf, *et al.*, 1998; Soberón y Bravo, 2001).

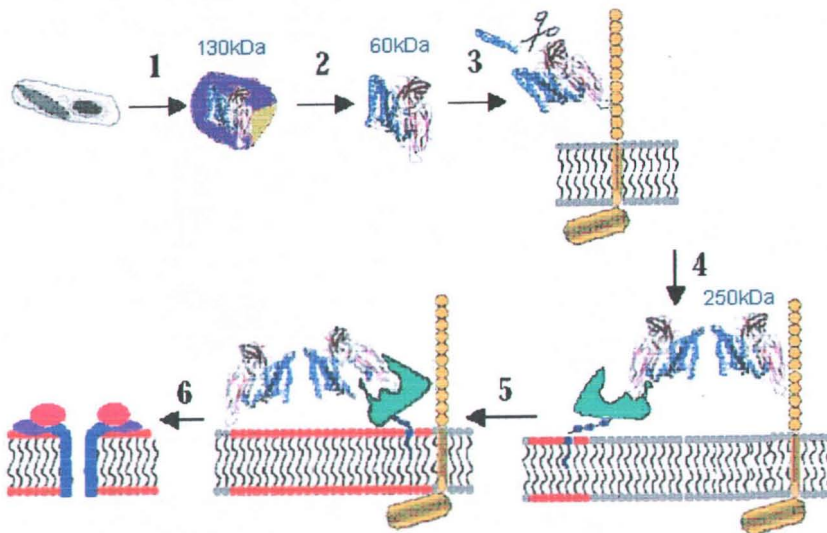


Fig. 3. Mecanismo de acción de las toxinas Cry1) Solubilización; 2) Activación proteolítica; 3) Unión a caderina y corte de hélice α -1; 4) Formación de oligómero; 5) Unión a APN; y 6) Formación de poro.

Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry

El blanco primario de las toxinas Cry es la membrana del intestino medio de los insectos en estado larvario. Muchas proteínas Cry son insolubles en condiciones neutras o ligeramente ácidas lográndose solubilizar únicamente en pH alcalino y bajo condiciones reductoras debido a que la mayoría de ellas contienen en la mitad del carboxilo terminal varios residuos de cisteína que forman puentes disulfuro, los cuales proporcionan estabilidad al cristal (Knowles, 1994). Con el rompimiento estos puentes las proteínas insecticidas producidas por Bt son liberadas de los cristales como "protoxinas" de 130 kDa en el caso particular de las toxinas Cry1. Al tiempo en que se solubilizan las protoxinas, estas son activadas por la acción de las proteasas intestinales. En el caso de las Cry1, el fragmento resultante de la activación resulta en una proteína de alrededor 60 kDa. La digestión proteolítica se realiza mayoritariamente en la zona C-terminal (500 aminoácidos en las toxinas Cry1), y en menor tamaño en la N-terminal (aproximadamente 30 aminoácidos). Las condiciones en que se da esta activación son importantes ya que dependiendo de la activación se pueden obtener toxinas con diferente actividad (Miranda *et al.*, 2002).

Dado que el extremo carboxilo de la protoxina no es esencial para la toxicidad y como contiene varios residuos de cisteína, esta región podría estar involucrada en la cristalización de la protoxina y podría también estar protegiendo a la toxina de digestión proteolítica prematura. De esta forma al originarse un fragmento

resistente a proteasas de entre 55 y 65 kDa que se le denomina "toxina", esta es capaz de unir a los receptores presentes en la microvellosidad apical del intestino medio y muestra actividad insecticida (Soberón y Bravo, 2001).

Unión al receptor

La unión de las toxinas Cry a la membrana epitelial de las células columnares del intestino medio se realiza a través de receptores o sitios de unión específicos para cada una de ellas (Hofmann *et al.* 1988). Se han hecho importantes esfuerzos dirigidos a la identificación, purificación y caracterización de los receptores de las proteínas Cry. Se ha encontrado que para la mayoría de las toxinas Cry1 estudiadas, las moléculas a las que se unen con alta afinidad son glicoproteínas de entre 63 y 220 kDa (Soberón y Bravo, 2001).

Las proteínas de unión reportadas para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1C son miembros de la familia de las aminopeptidasas-N (APN) que son proteínas de membrana con peso molecular cercano a 120 kDa. La aminopeptidasa N está anclada a la membrana mediante un grupo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), y el resto de la proteína correspondiente al extremo N-terminal es extracelular (Knight *et al.*, 1995). Además se encuentra selectivamente incluida en microdominios de membrana designados como "rafts" o balsas, cuya característica es una composición lipídica diferente y su distribución espacial en las membranas celulares y las cuales se ha descrito, funcionan como sitios de unión o entrada para diferentes toxinas bacterianas (de Maagd *et al.*, 2003, Zhuang, *et al.*, 2001). Por ejemplo, en el caso de toxinas formadoras de poro, la asociación de sus receptores con microdominios de membrana es un paso crucial para su oligomerización e inserción en la membrana (de Maagd *et al.*, 2003). Recientemente se ha demostrado que la APN de *Manduca sexta* y *Heliothis virescens* está localizada en microdominios de membrana y que la integridad de los mismos es esencial para la actividad de formación de poro de las toxinas Cry1A (Zhuang, *et al.*, 2001).

Por otro lado, en los lepidópteros *M. sexta*, *B. mori* y *H. virescens* se describió que las toxinas Cry1A se unen a un miembro de la familia de las caderinas (caderina E de aprox. 210 kDa) (Vadlamudi *et al.*, 1995). La caderina E ó Bt-R₁ representa un nuevo tipo de caderina en insectos con un 20-40% de identidad con proteínas miembros de la superfamilia de las caderinas; se sabe que se expresa específicamente en el epitelio del intestino medio durante el crecimiento y desarrollo de las larvas de *M. sexta*, pero no se ha descrito su función (Candas, *et al.*, 2002), es una proteína transmembranal con un ectodominio de 11 ó 12 módulos de secuencias repetidas; un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático (Candas, *et al.*, 2002). Esta proteína une al monómero de las toxinas Cry1A con una K_D de 1 nM, similar a la K_D de la toxina a vesículas de microvellosidad apical (VMMA). Por otro lado, la afinidad de unión de la toxina monomérica a la APN es del orden de 100 nM, lo cual sugiere que la unión a Bt-R₁ es el primer evento de la interacción de las toxinas Cry1A con la membrana. La interacción con Bt-R₁ es necesaria para la

activación de la toxina, ya que su unión en forma de monómero a esta proteína induce el corte de la hélice α -1, lo cual conduce a la oligomerización de la toxina por la exposición de regiones hidrofóbicas y, como consecuencia, se favorece la formación de una estructura prepore formada de 4 subunidades considerada como intermediario importante en la formación del poro (Gómez, *et al.*, 2002).

Finalmente, estudios de inmunoprecipitación realizados en el laboratorio, demostraron que la unión inicial de la toxina es a la caderina, que tiene mayor afinidad por el monómero ($K_D=1$ nM) y posteriormente a la APN y que el oligómero interactúa preferentemente con la APN. Este dato está de acuerdo con el incremento de 200 veces en la afinidad de unión del oligómero de Cry1Ab por la APN ($K_D= 0.75$ nM) a diferencia de la afinidad de APN por el monómero ($K_D= 165$ nM) (Bravo, *et al.*, 2004). A la fecha se propone la participación secuencial de estas dos moléculas receptoras localizadas en las células blanco que interactúan con diferentes estructuras de las toxinas Cry (monómero u oligómero) involucradas en la toxicidad sobre el insecto (de Maagd, *et al.*, 2003; Bravo, *et al.*, 2004).

Inserción en la membrana y formación de poro

La fase irreversible de la unión de las proteínas Cry a la membrana se considera como una evidencia de que las proteínas Cry se insertan en la membrana, para luego causar la destrucción del tejido intestinal de las larvas de insectos susceptibles (Soberón y Bravo, 2001).

Se propone que la unión de la toxina al receptor puede provocar un cambio conformacional que hace a la toxina competente para insertarse en la membrana. El siguiente paso involucra la formación del poro en la membrana (Soberón, *et al.*, 2000; Gómez, *et al.*, 2002).

Con base en el conocimiento que se tiene acerca de la inserción de otras toxinas bacterianas formadoras de poro, se han propuesto dos modelos posibles de la inserción de toxinas Cry en la membrana. Un primer modelo (modelo del abrecartas), propuesto por Hodgman y Ellar, sugiere que las hélices hidrofóbicas α -5 y α -6 sobresalen de la toxina insertándose como un abrecartas en la membrana como consecuencia de un cambio conformacional disparado por el receptor mientras que el resto de la toxina permanece fuera de la membrana o unida al receptor (Hodgman y Ellar, 1990). El otro modelo (modelo de paraguas) plantea también que después de la unión con el receptor, se inserta la región α 4- α 5, mientras que el resto de las hélices se aplanan sobre la superficie de la bicapa lipídica exponiendo hacia ella su cara hidrofóbica quedando de esta manera la molécula en forma parecida a un paraguas. Actualmente es mayor la acumulación de evidencias que respaldan este último modelo (Miranda, *et al.*, 2002).

Las proteínas Cry forman poros con un diámetro interior de 6 a 10 Å. El tamaño de estos poros y la aparición frecuente de múltiples estados de conductancia en los estudios de la actividad de las proteínas Cry en bicapas lipídicas

planas se han considerado como evidencias de la formación de diversos estados de agregación de las δ -endotoxinas. Se propone que se requieren cuatro toxinas Cry para formar un poro en donde las hélices 4 y 5 se encuentran insertadas en la membrana. Al ser poco selectivos, los poros permiten el paso de diferentes solutos de alto peso molecular, ocasionando un desbalance osmótico (Soberón y Bravo, 2001).

Datos del laboratorio también demostraron que el oligómero se inserta eficientemente a vesículas sintéticas de membrana contrario a lo que sucede con el monómero, esto sugiere que el oligómero es un intermediario durante la inserción de la toxina a membranas (Rausell, *et al.*, 2004).

Por lo tanto, se propone que una vez que se forma el oligómero, éste es acarreado por la APN hacia los microdominios de membrana, se inserta en la membrana de las células epiteliales del intestino y forma poro (Bravo, *et al.*, 2004). De esta manera las proteínas Cry causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH y por citólisis osmótica. Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto causa a su vez que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que el efecto más devastador de este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que esto interfiere con el metabolismo celular normal, que tiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células columnares y caliciformes se destruyen, las esporas de *Bt* tienen acceso a la hemolinfa, medio en el que proliferan. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia (Soberón y Bravo, 2001).

ANTECEDENTES PARTICULARES

El triptofano y su función en las proteínas

Los aminoácidos toman diferentes papeles en la estructura y función de las proteínas de membrana, clasificados de acuerdo a sus propiedades y la posible función en las proteínas de membrana (Yeagle, 1992). El triptofano (Trp ó W, fig. 4) es un aminoácido muy especial, ya que es el residuo con mayor área superficial, se compone de dos anillos, un anillo bencénico que es altamente hidrofóbico y un anillo indólico que tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno (Uttamkumar, S. *et al.*, 2000) y está altamente conservado en un plano evolutivo.

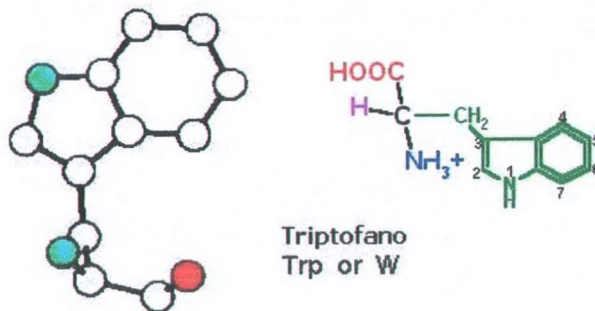


Fig. 4. Estructura del Triptofano

En proteínas solubles, los residuos triptofano tienden a situarse en el interior de la proteína. En proteínas de membrana este residuo a menudo se encuentra en la región límite de la bicapa y el agua, cerca de la cabeza polar del lípido. Estructuralmente, el triptofano juega un papel fundamental en muchas proteínas y en la interacción de estas con otras moléculas, además, se propone que los residuos de Trp pueden conferir estabilidad térmica a una proteína y que pueden estabilizar estructuras cuaternarias y ayudar en procesos de plegamiento debido a la interacción polar entre el centro del anillo aromático y los grupos polares y se propone que cumplen la función de posicionar a la proteína dentro de la membrana (Yeagle, 1992).

En conjunto con la tirosina y la fenilalanina, el triptofano tiene electrones deslocalizados participando en los enlaces π lo que les permite absorber radiación electromagnética, cada uno de ellos con una absorción a una longitud de onda particular, 257 nm (Phe), 274nm (Tyr) y 285 nm (Trp), (fig.5), y posteriormente emitir fluorescencia. Por esta razón, el Trp es el componente principal de la

fluorescencia registrado en las proteínas, y como el anillo indólico es altamente sensible a la polaridad de los solventes, es posible determinar la polaridad del ambiente que lo rodea. Otra característica importante es que la fluorescencia puede ser anulada por algunas sustancias apagadoras (quenchers), tales como yoduros, oxígeno, acrilamida, succinimida, entre otras. Esta sensibilidad se atribuye a la facilidad con que el anillo indólico dona electrones cuando se encuentra en su estado excitado. Es esta propiedad lo que permite determinar la exposición o accesibilidad al solvente de los residuos de Trp en una proteína ya sea soluble o insertada en membrana.

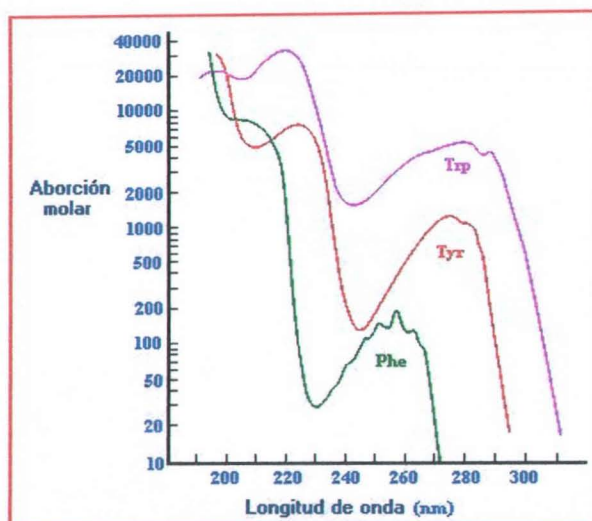


Fig.5. Espectros de absorción de los aminoácidos aromáticos.

Cabe aclarar que el triptofano y la cisteína son aminoácidos raros, que junto con metionina constituyen en promedio aproximadamente el 5% de aminoácidos en una proteína, ya que estos valores pueden variar en su composición, por ejemplo, proteínas que residen en la bicapa lipídica están enriquecidas en aminoácidos hidrofóbicos (Lodish *et al.*, 2000).

Los residuos aromáticos tienen un papel único en el plegamiento y en el sitio de unión de muchas proteínas. Experimentos realizados en la toxina Cry1Ab de Bt en los que el residuo F371 se reemplazó por Cys, Val, Ser, Leu, Tyr y Trp mostraron que la toxicidad de Cry1Ab hacia *M. sexta* está correlacionada con el tamaño e hidrofobicidad del aminoácido de esta posición, ya que no se afectó el grado de unión irreversible (inserción) hacia las VMMA y toxicidad cuando se cambió por Tyr y Trp, por lo tanto es esencial tener un residuo hidrofóbico aromático en la posición

371 para la inserción de la toxina Cry1Ab en la membrana de *M. sexta* (Rajamohan, *et al.*, 1996).

Otro estudio realizado en la toxina Cyt2Aa2 de *B. thuringiensis* subs. *darmstadiensis* que contiene tres residuos triptofano en las posiciones 132, 154 y 157, demuestra que los dos primeros son residuos críticos para mantener el plegamiento y función de la toxina y no pueden ser remplazados por ningún otro aminoácido, no así el W157, el cual puede ser sustituido pero sólo por otro aminoácido aromático. Cabe mencionar que los Trp 154 y 157 están conservados en todas las toxinas Cyt y que todos los triptofanos están localizados en la superficie de la molécula y pueden jugar un papel en interacciones intermoleculares durante la formación del cristal o interactuar con la membrana durante la formación del poro (Promdonkoy *et al.*, 2004).

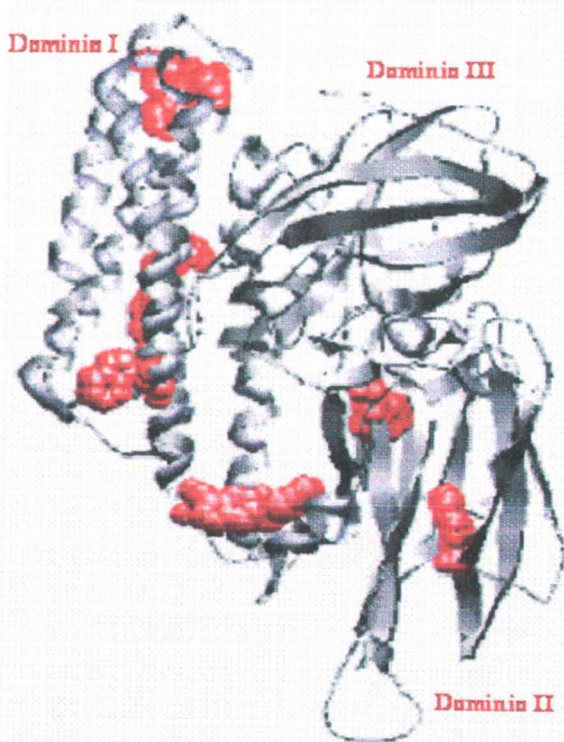


Fig.6. Proteína Cry1Aa donde se muestran los dominios estructurales y los triptofanos (en rojo).

La proteína Cry1Ab posee dentro de su secuencia nueve triptofanos, siete de los cuales están localizados en el Dominio I, el cual se propone se inserta en la membrana, y dos triptofanos en el Dominio II (fig. 6). Por lo cual, se han hecho estudios estructurales midiendo la fluorescencia del Trp en esta proteína, donde las

estrategias principales consisten en monitorear la fluorescencia con algún apagador en solución como yoduro o con apagadores incorporados en la membrana como grupos bromilo, incubando a la proteína en forma monomérica u oligomérica con membranas lipídicas, con lo cual se pudo determinar que cuando la toxina esta en forma de monómero tiene el 54% de Trp expuestos al solvente, y en el oligómero solo el 27%, lo que indica que algunos Trp se esconden en el contacto proteína-proteína. Y cuando el oligómero se inserta en la membrana, ningún Trp queda expuesto, y se encontro que estos se localizan preferencialmente en la interface lípido-agua (Rausell *et al.*, 2004).

Efecto de la luz ultravioleta sobre las proteínas insecticidas de Bt

Es bien conocido que la radiación ultravioleta (UV) puede reducir o aún eliminar la actividad biológica de proteínas y enzimas (Neves-Petersen, *et al.*, 2002). En este caso particular, la luz solar inactiva las preparaciones insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en el campo, lo cual ha afectado y limitado su uso y economía como bioinsecticida (Griego y Spence, 1978; Pozsgay, *et al.*, 1987).

La luz UV es una pequeña porción de la radiación proveniente del sol pero con un gran impacto biológico, y esta definida como toda radiación entre los 100 y 400 nm, dividida a su vez en tres categorías, UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) y UVC (100-280 nm). El daño a sistemas biológicos por radiación UV se debe principalmente a la absorción por los ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas de importancia biológica. La absorción de luz UV de la mayoría de las proteínas esta comprendida en la región entre los 240-300 nm. La responsabilidad de esta absorción se debe a dos aminoácidos aromáticos, el triptofano y la tirosina que absorben a una longitud de onda 280-290 nm y de esta manera se pueden formar estados excitados y provocar radicales vía fotoionización. En la presencia de oxígeno la transferencia de energía del estado excitado del Trp hacia el oxígeno ocurre produciendo el estado simple (1O_2) del oxígeno molecular (O_2). Este estado tiene ambos electrones en el mismo orbital molecular, y de esta manera reacciona con el triptofano y da como resultado la formación de productos derivado de este, Kinurenina + 3 α -hidroxipirrolindol, que son especies muy reactivas, los cuales son agentes que juegan un papel importante en las respuestas fotobiológicas, debido a que son mejores generadores del mismo oxígeno en estado simple, es decir, se convierten en intensificadores de la foto-oxidación de las proteínas a través de su exposición a la luz UV. Las manifestaciones de este proceso de foto-oxidación en las proteínas son extensas, entre las cuales están: un incremento en la susceptibilidad de proteínas oxidadas hacia enzimas proteolíticas; alteraciones en sus propiedades llevándolas a desnaturalización; cambios en la conformación, incrementos en hidrofobicidad, alteración de sus propiedades ópticas; y cambios en la unión de cofactores o iones metálicos (Davies y Truscott, 2001; Pozsgay *et al.*, 1987).

Se han realizado diversos estudios donde consideran la longitud de onda de la luz responsable de la inactivación, y la producción de posibles foto-censores

intrínsecos, como los Trp (Pusztal *et al.*, 1991; Saxena *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la irradiación, utilizando un simulador solar, da como resultado la destrucción del 35% de residuos triptofanos en cristales de Bt, detectado por la técnica de espectroscopia Raman, subsecuentemente confirmando por un análisis de aminoácidos donde encontraron que se pierde alrededor del 30-40% de la cadena lateral del anillo, lo que trae como consecuencia el daño a las proteínas del cristal y su posterior pérdida de toxicidad (Pozsgay *et al.*, 1987; Pusztal *et al.*, 1991).

Otra teoría relacionada con la inactivación por luz UV consiste el rompimiento residuos involucrados en puentes disulfuro, y que el daño a las proteínas se debe principalmente a que los residuos triptofano están típicamente localizados como vecinos espaciales a éstos puentes, ya que la exposición a la luz UV de los Trp produce un cambio en la energía que desbarata los puentes, lo cual tiende a alterar la actividad y estabilidad biológica (Neves-Petersen, *et al.*, 2002). El futuro de los bioinsecticidas de Bt depende del éxito en incrementar la resistencia de esporas y toxinas del estrés del medio ambiente, incluyendo la luz solar.

Previamente, en un estudio realizado en el laboratorio por Hernández, G. (tesis de maestría), se ha podido establecer que es posible cambiar los residuos de triptofano de la proteína Cry1Ab expresada en *Escherichia coli* por otro aminoácido aromático, la fenilalanina, en algunas posiciones dentro del Dominio I (W65F, W73F, W117F, W182F, W210F y W219F) sin que la toxicidad se vea afectada de manera importante. Mientras que los cambios de los residuos W226F, W316F y W455F resultaron en proteínas de menor peso molecular o proteínas insolubles.

Por lo anterior, con la finalidad de establecer la importancia de este residuo aromático se decidió expresar las mutantes en *B. thuringiensis* que incluyeran cambios conservativos de W por F y no conservativos de W por C en cada uno de los triptofanos por separado para tratar de entender más la relación estructura-función de la proteína Cry1Ab y estudiar en particular el papel de los triptofanos en la toxicidad de esta proteína. El aminoácido elegido para realizar estos cambios es la cisteína, debido a que es un residuo polar, es muy reactivo y es posible emplearlo para hacer estudios de fluorescencia marcando los residuos de cisteína con algún fluoróforo externo.

En general se pretende tener una toxina con el menor número de triptofanos pero que siga siendo tóxica. La fenilalanina tiene una estructura muy similar a la del Trp, lo que permitirá reestablecer el espacio que estaba ocupando el Trp, además de que la F no absorbe tanto la luz UV como el W, que le daría a la proteína una protección intrínseca adicional al daño ocasionado por esta radiación.

HIPOTESIS

Si los **triptofanos** tienen un papel estructural que ayuda a dar estabilidad y mantener la estructura terciaria del monómero o del oligómero de la toxina **Cry1Ab** de *Bacillus thuringiensis*, entonces al realizar **mutaciones** sencillas que cambien estos residuos se podría **afectar la estructura y por lo tanto la toxicidad**.

Si los triptofanos son uno de los blancos afectados durante la irradiación con luz UV, mutantes carentes de algún Trp que conserven su actividad tóxica podrían ser más resistentes a la irradiación UV.

OBJETIVOS

- Expresión de mutantes sencillas de triptofano por fenilalanina y cisteína en la proteína Cry1Ab de *B. thuringiensis* y análisis de su estabilidad proteolítica.
- Caracterizar las mutantes sencillas de triptofano expresadas en *B. thuringiensis* en cada uno de los eventos del mecanismo de acción: Unión, oligomerización y toxicidad.
- Caracterizar el efecto de la irradiación con UV en las mutantes que conserven actividad insecticida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas.

Se utilizaron durante el desarrollo de este trabajo las siguientes cepas de *Bacillus thuringiensis*.

**Bacillus thuringiensis* que contiene el gene de la proteína Cry1Ab en el plásmido pHT315 con resistencia a eritromicina.

Además se utilizaron las siguientes variantes de la toxina Cry1Ab con las mutaciones que se especifican, expresadas en *Bacillus thuringiensis*:

* W 65 C	* W 65 F
* W 73 C	* W 73 F
* W 117 C	* W 117 F
* W 182 C	* W 182 F
* W 210 C	* W 210 F
* W 219 C	* W 219 F
* W 226 C	* W 226 F
* W 316 C	* W 316 F
* W 455 C	* W 455 F

Crecimiento de las cepas

La cepa silvestre al igual que las cepas que expresan las versiones mutantes de Cry1Ab se cultivan en medio de esporulación SP ó HCT sólido con 10 µg/µl del antibiótico durante 12 h a 30°C y posteriormente son transferidas al medio líquido (250 ml) adecuado (SP o HCT con antibiótico) para su crecimiento durante 72 o 96 hrs. con agitación de 250 rpm a 30°C, hasta que por observación al microscopio notamos esporulación completa del cultivo y la producción de los cristales correspondientes.

Medio SP	1L
Caldo nutritivo	8g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25g
KCl	1g
Solución I: MnCl ₂ 10 mM	1ml
Mezclar, ajustar el pH a 7 y esterilizar. Al momento de inocular complementar con:	
Solución II: FeSO ₄ en H ₂ SO ₄ 1N	2ml
Solución III: CaCl ₂ ·H ₂ O 0.5M	1ml
Medio HCT	1L
Bacto-Triptona	5g
Casa-aminoácidos	2g

Solución I: KH_2PO_4 (6.8g en 100 ml)	50 ml
Solución II: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.23g	
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.169g	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4g, todo en 100ml	1ml
Solución III: $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ (0.2g en 100ml de H_2SO_4 1N)	10ml
Solución IV: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.47g en 100ml)	10ml
Glucosa 10%	30ml

Disolver la Bacto-Triptona y los casa-aminoácidos, ajustar el pH a 7.25 y esterilizar. Al momento de inocular agregar las soluciones I-IV y la glucosa previamente esterilizadas.

Purificación de las toxinas

Para obtener los cristales de la proteína Cry1Ab de la cepa silvestre y mutantes primero se recupera el paquete celular que contiene la mezcla de esporas-cristales por centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos, posteriormente se lavan exhaustivamente, mínimo tres veces, con buffer de lavado (NaCl 0.5 M, EDTA 0.01M pH 8) que ayudará a inactivar las proteasas producidas por Bt, centrifugando a 10,000 rpm por 10 minutos en cada lavado. Se repite este último procedimiento con una solución de PMSF 1mM. Posteriormente se purifican los cristales mediante centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (Sigma) de 84, 79, 72 y 67% complementado con buffer TTN (NaCl 10 mM, Tris-HCl 50 mM y Tritón X-100 al 0.01%, pH 7.2), colocando las soluciones de mayor concentración en el fondo del tubo y por último la muestra de esporas-cristales previamente sonicada dando tres pulsos de 50 seg. por un minuto de descanso a 4°C. Finalmente se centrifuga a 23,000 rpm por 20 min a 15°C. Las fracciones que contienen los cristales identificados mediante su observación al microscopio se colectan por separado y se lavan exhaustivamente con agua mili-Q mas Tritón X-100 al 0.01%, centrifugando a 10,000 rpm por 10 minutos para eliminar la sacarosa. Los cristales purificados se resuspenden para su conservación en Tris-HCl 50 mM pH 8 suplementado con PMSF 1 mM y se almacenan a 4°C.

Determinación de concentración de proteína

La cuantificación de la concentración de proteína se realiza por el método Bradford (Bradford, 1976). Se toma una alícuota de la muestra a determinar concentración y se lleva a un volumen final de 800 μl con agua destilada y se le adicionan 200 μl del reactivo de Bradford (Protein assay, Bio-Rad) después de mezclar muy bien se mide la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman coulter). La curva de referencia se prepara con albúmina sérica bovina (BSA).

Electroforesis de Proteínas

las proteínas obtenidas de la purificación de las distintas variantes se analiza en geles de acrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (30% acrilamida, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% APS y TEMED). Las muestras previamente hervidas durante 4 min con mezcla lítica se aplican en el gel, el cual se corre a un voltaje constante de 8 mV hasta que pase el gel concentrador, entonces se incrementa el voltaje a 16 mV hasta que el frente de corrida llegue al final del gel. El gel se enjuaga con agua destilada por 5 min y se tiñe con azul de Coomassie (Bio-Rad) para visualizar las proteínas.

<u>Mezcla Lítica (4X)</u>	10ml
Glicerol conc.	4ml
Tris-HCl (0.5M pH 6.8)	5ml
SDS (dodecil sulfato de sodio)	0.4g
B-mercaptoetanol	1ml
Azul de bromofenol	0.05mg

Bioensayos de toxicidad

Los bioensayos se realizaron utilizando la técnica de contaminación de superficie utilizando larvas de *Manduca sexta* del primer estadio de crecimiento. En placas de 24 pozos (Corning), con una superficie aproximada de 2 cm², se coloca la dieta artificial aproximadamente a la mitad de su capacidad. Las cajas se incubaron con luz ultravioleta durante 15 min para eliminar contaminación por bacterias. Posteriormente se aplican las concentraciones de toxina (desde 5 hasta 500 ng/cm²) preparadas en agua milli-Q en un volumen final de 35 µl. Se dejan secar muy bien y se colocan entonces las larvas. Las cajas se sellan con plástico (Kleen Pack de Kimberly Clark) y se dejan crecer durante 7 días a temperatura ambiente, al término de los cuales se cuantifican las larvas muertas y se calcula el porcentaje de mortalidad con respecto al control negativo que es solamente agua aplicada sobre la superficie de la dieta.

Ensayo de solubilidad (Producción de Protoxina)

Los cristales purificados y cuantificados se solubilizan en una solución de carbonatos 1X (NaCO₃ 0.1M + NaHCO₃ 0.1M) pH 10.5 en presencia de 0.2% de β-mercaptoetanol durante 2 hrs a 37°C con agitación suave. Se recupera el sobrenadante mediante centrifugación a 10,000 rpm por 10 min, y se determina la concentración de protoxina mediante el método Bradford. La protoxina soluble se analiza en un gel de acrilamida al 10%-SDS (SDS-PAGE), el cual se tiñe con azul de Coomassie, el peso molecular de la protoxina se espera de 130 kDa.

Activación con tripsina (Producción de la Toxina)

Se toma una concentración conocida de protoxina a la cual se añade Tris-HCl 1 M pH 8 (1:4 v/v) para bajar el pH de la solución a un pH≈8.3. La activación se realiza con proporción de 1:50 tripsina/toxina a 37°C durante 1 h con agitación suave, al final se detiene la reacción agregando PMSF 1 mM concentración final. Se recupera el sobrenadante centrifugando a 14,000 rpm por 10 min para eliminar agregados no solubles y se determina la concentración de toxina mediante el método Bradford. Los sobrenadantes se analizan en gel SDS-PAGE, el cual se tiñe con azul de Coomassie, el peso esperado de la toxina es entre 55 y 65 kDa.

Purificación de las vesículas de la microvellosidad apical media (VMMA) a partir de intestinos de *Manduca sexta*.

Se realizó la disección de larvas de *M. sexta* de 5° instar para extraer el intestino medio. Las larvas se mantienen en hielo para su disección. Después de fijar cada uno de los extremos de la larva sobre una base de disección se realiza un corte longitudinal para dejar expuesto el intestino. Se eliminan los 3 primeros segmentos de cada extremo y la porción media se extrae cuidadosamente. Se realiza un segundo corte longitudinal en esta porción para eliminar el bolo alimenticio junto con la membrana peritrófica. El tejido se lava exhaustivamente en la solución de disección (Manitol 300 mM, Tris-HCl 17 mM, EGTA 5 mM, DTT 2 mM, HEPES 10 mM y PMSF 0.1 mM, 50 µl de leupeptina 10mg/ml y 50 µl de pepstatina 100mg/ml, ajustado a pH 7.4 en 100 ml). El tejido se recupera en un tubo inmerso en hielo seco y los intestinos se conservan a -70°C hasta su uso.

La purificación de las VMMA's se realizó de acuerdo con el protocolo reportado previamente por Wolfersberg et al., (1987). Se descongelan en hielo los intestinos y se toman 3 g de tejido. La muestra se coloca en el homogeneizador previamente sumergido en hielo y se agregan 30 ml de solución I (manitol 300 mM, Tris-HCl 17 mM, EGTA 5 mM, DTT 2 mM, HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, leupeptina 100 mg/ml, pepstatina 100 mg/ml y neomicina 100 mg/ml ajustado a un pH de 7.4). Se coloca el émbolo de teflón en el taladro y se dan 9 golpes suaves a 2,250 rpm. Agregar 30 ml de la solución II (MgCl₂ 24 mM) por las paredes del homogeneizador suavemente. Se cubre con parafilm la boca del homogeneizador y se mezcla suavemente por inversión. Incubar en hielo durante 15 min agitando por inversión 3 o 4 veces.

Centrifugar a 4,500 rpm por 15 minutos a 4° C, descartar la pastilla. Cambiar el sobrenadante a otro tubo limpio y centrifugar a 16,000 rpm por 30 min a 4°C, se desecha ahora el sobrenadante. La pastilla se resuspende en medio volumen de la solución I fría y medio volumen de la solución II. Repetir los pasos de centrifugación de la misma forma ya descrita. Resuspender la pastilla final en la solución I diluida con agua destilada 1:1 (1 ml); dar tres golpes a 2,250 rpm utilizando nuevamente el homogeneizador. Finalmente dializar la preparación en 1000 volúmenes de una solución: KCl 150 mM y HEPES 10 mM ajustada a pH de 8 durante 12 h a 4°C.

Western Blot

Las muestras a analizar se separan mediante SDS-PAGE. Se transfieren las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa, la transferencia se comprueba tiñéndola con rojo de ponceau (0.5% en ácido acético 2%). A continuación se bloquea con leche descremada al 5% en PBS durante 1 hora. Se lava la membrana 5 veces con PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T). Se incuba con el anticuerpo primario anti-Cry1Ab a la dilución apropiada durante 1 h y se lava 5 veces con PBS-T para incubar con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa por 1 h. Lavar 5 veces con PBS-T y una vez con PBS. Revelar usando los reactivos de quimioluminiscencia.

Marcaje de las toxinas con biotina para la realización de ensayos de unión

Para realizar el marcaje se toma una concentración conocida de toxina soluble y mezcla con éster de biotina (Amersham) en una relación de 0.5 mg de proteína/20 µl de reactivo. La mezcla se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. El éster de biotina reacciona con los residuos de lisina y con el amino terminal de la proteína.

Durante la incubación de la toxina con la biotina se preparan columnas con aproximadamente 1 ml de Sephadex G25 (Sigma) en PBS 1X, las cuales se lavan con aproximadamente 20 ml de PBS 1X y se centrifugan por 2 min a 2,000 rpm para eliminar el exceso de PBS.

La toxina incubada se coloca en las columnas (máximo 200 µl por columna) y se centrifugan 2 min a 2,000 rpm, para separar la toxina marcada de la biotina libre. Las proteínas se cuantifican por el método Bradford y la marca se analiza mediante *Western blot*. Primeramente las toxinas marcadas se corren en un gel de acrilamida desnaturalizante al 9%, utilizando marcador de peso molecular biotinado (Bio-Rad). Posteriormente las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (ECL-Amersham Pharmacia Biotech) en buffer de transferencia (Tris (base) 3g, Glicina 14.4g, metanol absoluto 200ml, todo en 1L) por 1 h a 350 mA.

La transferencia se verifica tiñendo la membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau 0.5% en ácido acético 2%. Después de eliminar el exceso de colorante con agua corriente, la membrana lava 10 min con PBS 1X y posteriormente se bloquea con una solución Tween 20 al 2% en PBS 1X durante 20 min con agitación constante. Se realizan 2 lavados con Tween 20 al 0.1% en PBS 1X por 10 minutos cada uno y posteriormente la membrana se incuba por 1 h con estreptavidina acoplada a peroxidasa (Amersham Life Science) 1:4000 v/v con Tween-20 0.1% en PBS 1X. Se lava 2 veces con Tween 20 al 0.1% en PBS 1X por 10 min cada uno y una vez mas con PBS 1X.

Finalmente, la membrana se incuba con luminol del módulo Super Signal Chemiluminiscent Substrate (Pierce) con agitación constante durante 1 min y la señal se imprime en películas para quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotech).

Ensayo de unión en solución

Para el experimento se incuban 10 μg de VMMA's de *Manduca sexta* con 10 nM de la toxina marcada con biotina en un volumen final de 100 μl de buffer de unión (BSA 0.1% Tween 20 0.1% en PBS 1X). La mezcla se incuba durante 1 h a temperatura ambiente al término de la cual se centrifugan las muestras a 14,000 rpm durante 10 min. Se hacen 2 lavados con 100 μl de buffer de unión eliminando el sobrenadante, al final la pastilla se resuspende en 15 μl de PBS más mezcla lítica 1X y se separan las proteínas en un gel desnaturizante al 9% para ser transferidas a membrana de nitrocelulosa.

Después de la transferencia la membrana se procesa de la misma forma descrita previamente.

Ensayos de competencia

El procedimiento es el mismo realizado para el ensayo de unión, la diferencia consiste en que además de la toxina marcada con biotina se agregan diferentes concentraciones (50X, 100X, 500X y 1000X) de toxina no marcada ("fria") como competidor y se continua con el mismo proceso de unión. La toxina no marcada compete con la toxina biotinada en la unión a las vesículas, esperando observar una menor cantidad de toxina marcada conforme aumentamos la concentración del competidor.

Oligomerización de la toxina en presencia del anticuerpo scFv73

Se toman 10 μg de cristales purificados y se mezclan con el anticuerpo scFv73 en proporción 1:4 m/m llevando a 200 μl de volumen final con buffer de solubilización (buffer carbonatos 1X + 0.02% mercaptoetanol), agregar 2 μl de jugo gástrico de *M. sexta* e incubar durante 1 h 37°C con agitación suave. Se detiene la proteólisis con PMSF 1 mM concentración final y se recupera el sobrenadante centrifugando 20 min a 14,000 rpm a 4°C y se analizan los sobrenadantes mediante western blot con anti-Cry1Ab.

Ensayos de formación de poro

Se ponen 0.9 ml de buffer de cloruro de metil-glucamina 150 mM y HEPES 10 mM a pH 8. Se adiciona 1 μl de colorante 3,3'-dipropiltiodicarbocianina (diS-C3(5)). La celda se coloca en el espectrofotómetro (AMINCO- Bownman). Se le adicionan 10 μg de VMMA's. Se adiciona la muestra a los 75 segundos, que puede ser 1 μl de valinomicina (ionóforo específico para potasio, que nos indica si la preparación de VMMA's esta correctamente cargada con potasio) o bien de la toxina en una concentración final de 50 nM. Para realizar los registros de cambio de potencial se hacen adiciones crecientes de KCl 3 M cada 30 segundos. El análisis de los datos se realiza graficando el cambio de fluorescencia (ΔF , la excitación se realiza a 620 nm y se observa la emisión a 670 nm) contra el potencial de potasio (K^+) aplicado en cada

adición de KCl, el cual se calcula haciendo uso de la ecuación de Nerst. La pendiente de esta curva esta relacionada con la permeabilidad a K^+ .

Irradiación solar

La irradiación solar se realiza en un simulador solar (Oriel, Stamford,CT) con una combinación de filtros de luz elegidos para transmitir el espectro solar adecuado. La exposición se realiza colocando 50 μ l del cristal en suspensión (~1mg/ml) en un lámina delgada tipo cubreobjetos y se deja secar. La muestra con el cristal seco se coloca en la fuente de luz solar del simulador y es irradiada por 24 horas. Se realiza a una temperatura de 27°C.

RESULTADOS

Producción de los cristales de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes de Triptofano.

La toxina Cry1Ab posee dentro de su secuencia nueve triptofanos, localizados como se muestran en la tabla I.

Tabla I. Localización de los triptofanos en la toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis*

	Posición	Localización	
1	65	Entre la hélice $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$	Dominio I
2	73	Dentro de la hélice $\alpha 2b$	Dominio I
3	117	Dentro de la hélice $\alpha 3$	Dominio I
4	182	Entre las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$	Dominio I
5	210	Dentro de la hélice $\alpha 6$	Dominio I
6	219	Entre la hélice $\alpha 6$ y $\alpha 7$	Dominio I
7	226	Dentro de la hélice $\alpha 7$	Dominio I
8	316	Dentro de la hoja $\beta 3$	Dominio II
9	455	Dentro de la hoja $\beta 11$	Dominio II

Se trabajo con mutantes puntuales en cada uno de los triptofanos antes señalados realizando cambios por dos tipos de aminoácidos, fenilalanina (cambio conservativo) y por cisteina (cambio no conservativo) con la finalidad de estudiar el papel de cada triptofano en la estructura y modo de acción de la toxina Cry1Ab. Las mutantes fueron construidas en el laboratorio por la Dra. Maria Eugenia Nuñez, Dr. Gustavo de la Riva, M. en C. Georgina Hernández y el técnico Oswaldo López.

Cada una de las cepas mutantes, y la cepa silvestre, se crecieron en medio de esporulación, hasta que por observación al microscopio óptico se confirmó la esporulación de las bacterias y la producción de los cristales proteicos. Se recuperaron cristales de tipo bipiramidal de diferente tamaño dependiendo de la mutante analizada, los tamaños registrados se resumen en la tabla II.

Tabla II. Producción del cristal en las cepas mutantes

Cepa	Producción de cristal	Cepa	Producción de cristal
W65F	Grande	W65C	Ausente
W73F	Grande	W73C	Grande
W117F	Grande	W117C	Ausente
W182F	Grande	W182C	Grande
W210F	Grande	W210C	Grande
W219F	Grande	W219C	Grande
W226F	Grande	W226C	Ausente
W316F	Muy grande	W316C	Chico
W455F	Grande	W455C	Chico
Wt1Ab	Grande		

El cambio de los triptofanos por fenilalanina no tuvo efecto en la producción y tamaño de los cristales a excepción de la mutante W316F en donde los cristales eran más grandes que los de la cepa silvestre; por el contrario, los cambios por cisteína de los residuos 316 y 455 produjeron un cristal de menor tamaño con respecto a la cepa silvestre y resalta que el cambio de los triptofanos 65, 117 y 226 por cisteína afecta severamente la producción de cristal. Por lo cual su papel dentro de la toxina debe ser de importancia en mantener la estructura.

Purificación de las toxinas

De las cepas en las cuales se logró la producción de los cristales correspondientes se procedió con la purificación de los mismos mediante gradiente discontinuo de sacarosa (Thomas y Ellar, 1983.). Las proteínas purificadas fueron:

- | | |
|-----------|---------------|
| * W 65 F | * Cry1Ab (Wt) |
| * W 73 F | * W 73 C |
| * W 117 F | * W 182 C |
| * W 182 F | * W 210 C |
| * W 210 F | * W 219 C |
| * W 219 F | * W 316 C |
| * W 226 F | * W 455 C |
| * W 316 F | |
| * W 455 F | |

Las fracciones que contenían los cristales purificados de cada una de las cepas mutantes y de la silvestre, se analizaron en geles de acrilamida en condiciones

desnaturalizantes (SDS-PAGE) para analizar la presencia de una banda de 130 kDa correspondiente con el peso molecular de la protoxina (Figura 7A y B).

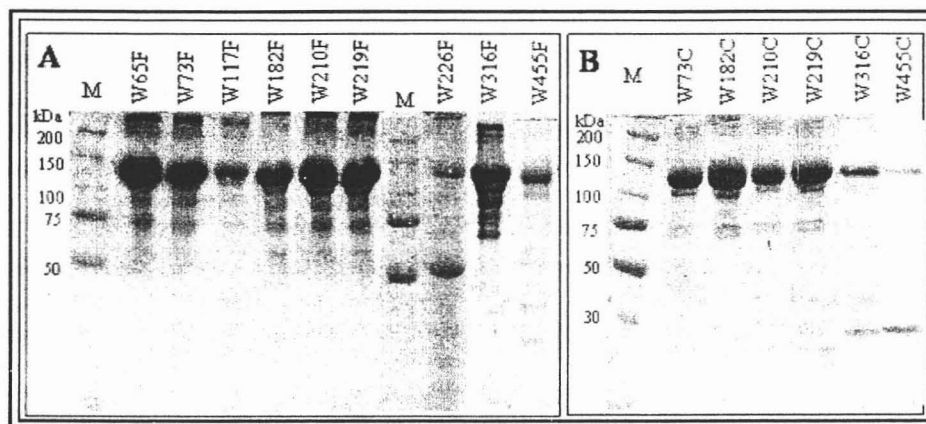


Fig. 7. SDS-PAGE al 10 % que muestra la banda correspondiente a la proteína de 130 kDa. Se analizaron 10 μ g de proteína. **A)** Mutantes por fenilalanina **B)** Mutantes por cisteína. Los números a un costado del gel indican el marcador de peso molecular (All blue- BioRad).

En general, en todas las mutantes notamos la presencia de la proteína de 130 kDa, lo que nos indica que las mutaciones no afectan la estabilidad de la protoxina. Sin embargo, las cepas W316C y W455C mostraron una menor producción de esta proteína, lo cual puede estar asociado con el tamaño del cristal acorde a lo observado al microscopio, que indicó un porcentaje menor con respecto a la cepa silvestre. En la cepa W226F también se ve una banda de menor intensidad, sin embargo, se nota la aparición de una banda alrededor de los 50 kDa, lo que indica que esta proteína tuvo un proceso de degradación.

Análisis de toxicidad de las mutantes

Los cristales purificados se probaron en bioensayos con larvas de *M. sexta*, de primer estadio de desarrollo, para determinar el efecto de las mutaciones en la actividad tóxica de la proteína Cry1Ab. Se determinó la dosis letal media (LC_{50}) probando a los insectos con 6 concentraciones de cristales de las diferentes toxinas, analizando los datos de mortalidad cuantificados después de 7 días con el programa Probit. Los resultados se muestran en la tabla III. En cada ensayo se colocó un control positivo (cepa silvestre) y un control negativo (H_2O).

Tabla III. Determinación de la LC₅₀ de las distintas cepas mutantes.

Cepa	LC ₅₀ *(ng/cm ²)	Cepa	LC ₅₀ *(ng/cm ²)
Silvestre	2.3 (1.2-3.5)		
W65F	11.47 (3.5-26.8)	W65C	ND
W73F	0.65 (0.2-1.6)	W73C	4.4 (2.2-7.2)
W117F	4.9 (3.5-6.6)	W117C	ND
W182F	3.1 (1.6-5.0)	W182C	4.0 (2.3-6.2)
W210F	1.5 (0.9-2.5)	W210C	4.2 (1.9-7.3)
W219F	1.0 (0.2-1.8)	W219C	17.8 (10.8-27.2)
W226F	2.5 (2.18-3.13)	W226C	ND
W316F	35.4 (22.7-52.5)	W316C	82.7 (34.5-235)
W455F	1.6 (0.5-2.8)	W455C	17.6 (7.5-35.1)

*Representa el valor obtenido de bioensayos realizados por triplicado con 6 diferentes concentraciones de las toxinas (2, 10, 50, 100, 300 y 500 ng/ cm²).

()= Límites de confianza

ND= No determinado

Los resultados anteriores indican que las cepas mutantes W65F y W316F tienen menor toxicidad que la cepa silvestre, ya que tienen una disminución en su actividad tóxica (4 y 12 veces menos respectivamente). Las cepas restantes con cambios conservativos por fenilalanina muestran toxicidad similar a la silvestre. De manera similar, cuando se realizaron cambios no conservativos de Trp por Cys algunas cepas muestran toxicidad similar a la cepa silvestre (W73C, W182C, W210C). Sin embargo, las cepas W219C, W316C y W455C muestran una disminución en su actividad tóxica (6, 30 y 6 veces menos respectivamente).

Con las mutantes en las que se observó un efecto en la disminución en toxicidad (W65F, W316F, W219C, W316C y W455C), se continuó el análisis para determinar en que paso del mecanismo de acción están alteradas estas proteínas.

Activación con tripsina (Toxina)

Las diferentes toxinas fueron solubilizadas en buffer de carbonatos pH 10.5 y se notó el mismo proceso de degradación observado en la fig. 7. Posteriormente se continuó con la activación proteolítica de las toxinas, se realizó *in vitro* utilizando tripsina en una relación de 1:50 (m/m) para establecer el procesamiento y determinar la estabilidad de las mutantes (fig. 8). Esta digestión se realiza para ver

si estas tienen deficiencias en su plegamiento, que se sabe, puede realizar tres cortes en la protoxina en relación a la proporción de proteasa/protoxina, de acuerdo con este reporte en el cual se analizó la secuencia del amino terminal, a tres diferentes proporciones, el primer corte que se realiza es en el α -2a con una proporción 1:1000, produciendo un fragmento tóxico de 65 kDa, el segundo corte utilizando 1:100 corta entre las hélices α 2a y α 2b produciendo un fragmento de 58 kD y el tercer corte se da probablemente en el dominio II en proporción 1:10, produciendo dos fragmentos de aproximadamente 30 kD (Miranda, *et al.*, 2001).

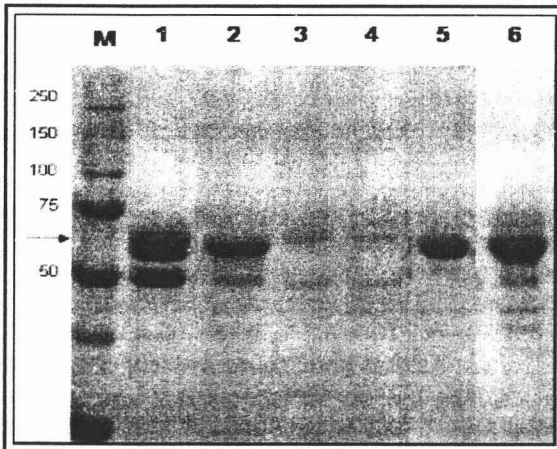


Fig. 8. SDS-PAGE al 10 % del procesamiento con tripsina para liberar la proteína de 65 kDa después de 1 hora de digestión (proteasa/protoxina 1:50 m/m), teñido con azul de Coomassie. Se analizaron 10 μ g de proteína. M, marcador de peso molecular (All blue- BioRad); carril 1, W65F; 2, W219C; 3, W316C; 4, W455C; 5, W316F; 6, Cry1Ab.

Como notamos en la figura 3, la mutante W65F tiene un procesamiento diferente en comparación con la toxina silvestre. Observamos un patrón de bandeos muy particular, donde se distinguen diferentes cortes, dando algunas bandas de mayor tamaño al esperado de 65 kDa. Una explicación a este resultado es que la proteína W65F es menos susceptible a tripsinación y no llega a procesarse completamente utilizando tripsina 1:50 por dos horas. Al utilizar una concentración mayor de tripsina (1:20, fig. 9) se logró un mejor procesamiento. Las mutantes W316C y W455C muestran una banda principal de menor intensidad, sugiriendo que el proceso con tripsina degradó a estas proteínas, al parecer son más sensibles a proteólisis y esto se encuentra relacionado con una producción de cristal más pequeño. El resto de las mutantes no parece tener ningún problema y se procesaron de forma similar a la cepa silvestre.

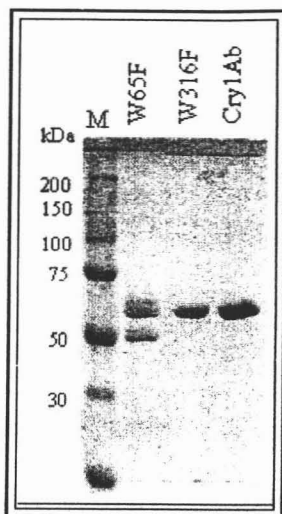


Fig. 9. SDS-PAGE al 10 % del procesamiento con tripsina para liberar la proteína de 65 kDa después de 1 hora de digestión (proteasa/protoxina 1:20 m/m), teñido con azul de Coomassie. Se analizaron 10 μ g de proteína. M, marcador de peso molecular (All blue- BioRad).

Marcaje de las toxinas con biotina

Para poder estudiar la unión de las toxinas mutantes a las membranas de *M. sexta*, las proteínas fueron marcadas con biotina (como se indica en materiales y métodos).

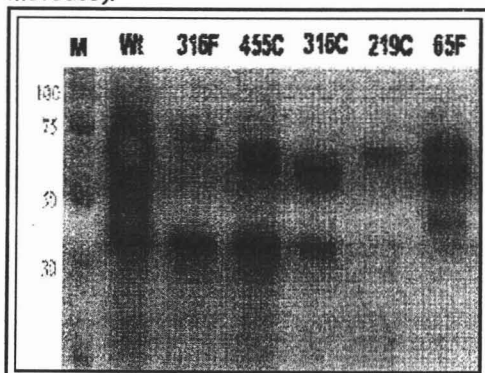


Fig.10. Western-blot, de las toxinas mutantes y silvestre biotiniladas. M, marcador de peso molecular (All blue- BioRad); Wt, cepa silvestre. Empleando SDS-PAGE al 9%.

En la figura 10 observamos varias bandas que han sido marcadas, debido a que la biotina se une a las lisinas presentes en la mezcla de proteínas, pero la proteína de interés es la correspondiente a la banda de 65 kDa, ya que se

demostrado en estudios previos que esta forma de la proteína es la que presenta unión a VMMA de *M. sexta*. Una vez que se han marcado las toxinas se analizó la unión con las vesículas de microvellosidad apical.

Ensayo de unión.

En este experimento, las vesículas de la microvellosidad apical (VMMA) de larvas de *M. sexta* se ponen en contacto con la toxina marcada para probar si las mutantes que tienen disminuida su toxicidad se deba a que no son capaces de unirse al receptor en la membrana. Luego de la incubación y realizar los respectivos lavados para eliminar la toxina marcada que no se unió, se detecta la señal de la toxina biotinilada utilizando la estreptavidina acoplada a peroxidasa (ver materiales y métodos) que tiene una gran afinidad por la biotina presente en la toxina, y de esta manera analizamos si las toxinas fueron capaces de unirse a VMMA de *M. sexta* (fig. 11).

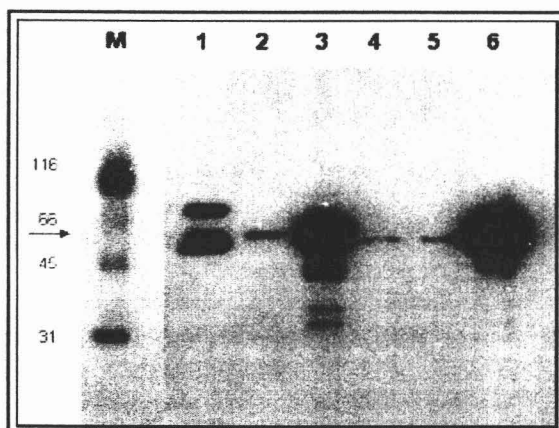


Fig. 11. Unión de las toxinas con membranas de microvellosidad apical de *M. sexta*. Las toxinas marcadas fueron incubadas con 10 μ g de vesículas. Después de 1 hora de incubación, la toxina no unida fue removida y las vesículas que contienen a la toxina unida fueron sometidas a SDS y detectadas con estreptavidina acoplada a peroxidasa. M, marcador de peso molecular biotinado (Bio-Rad); carril 1, W65F; 2, W219C; 3, W316C; 4, W316F; 5, W455C; 6, Wt Cry1Ab.

Como observamos en la figura 11, todas las toxinas mutantes se unen a las vesículas, sin embargo se observa que tres de ellas: W219C, W455C y W316F presentan una disminución marcada en su capacidad de unión con respecto a la toxina silvestre, ya que observamos una banda de menor intensidad. No así el caso de la mutante W316C que muestra un comportamiento muy similar a la cepa silvestre, y por último, la mutante W65F tiene una unión intermedia entre ambas, resaltando una

banda por encima de los 65 kDa, que corresponde en parte al tipo de procesamiento proteolítico incompleto experimentado anteriormente (fig. 8).

Cabe hacer la aclaración que este ensayo es cualitativo, y no muestra información acerca de la afinidad de unión al receptor, por lo cual es importante realizar un ensayo de competencia heteróloga con la toxina silvestre para poder establecer con más herramientas si es que realmente estas mutantes están afectadas en esta parte del mecanismo de acción. Además de determinar si la unión de las toxinas es realmente específica.

Ensayos de competencia

Se realizó un ensayo de competencia heteróloga que representa un ensayo de unión cuantitativa. En este ensayo la toxina silvestre biotinada de Cry1Ab se une al receptor localizado en las VMMA de *M. sexta* en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de las proteínas mutantes (no marcadas, toxina fría). De esta manera la toxina no marcada compite con la toxina biotinada en la unión a las vesículas, esperando observar una menor cantidad de toxina marcada conforme aumentamos la concentración del competidor.

La figura 12 muestra que las mutantes W316F y W455F prácticamente no compiten con la toxina marcada y no se unen a las VMVA de *M. sexta*, aún a un alto exceso de la toxina (1000 veces) a diferencia de la mutante W65F que compite de una manera eficiente, similar a la toxina silvestre, mientras que las demás mutantes analizadas (W219C y W316C) requieren mayores concentraciones de toxina para competir la unión de la toxina marcada. Con lo cual podemos proponer que las mutantes W455C y W316F están muy afectadas en la unión en relación a la toxina silvestre de Cry1Ab. Las cepas mutantes W219C y W316C se unen débilmente pero logran desplazar un poco a la toxina marcada a concentraciones altas. Por último la cepa W65F fue la única capaz de desplazar a la toxina silvestre marcada, lo que indica que tiene una afinidad similar a la silvestre, como lo representa el control de la proteína Cry1Ab al competir contra ella misma.

Oligomerización de las toxinas

Estudios recientes en nuestro grupo de trabajo han demostrado que la interacción con el receptor caderina es un paso importante para una activación correcta de las toxinas Cry1A. El contacto entre este receptor y la toxina Cry1Ab favorece el corte proteolítico de la hélice $\alpha 1$ del Dominio I lo cual provoca la oligomerización de 4 subunidades del monómero de la toxina, esta entidad es la que presenta capacidad de inserción en la membrana y por lo tanto la responsable de la formación del poro. El anticuerpo scFv73, se utiliza como modelo del receptor para activar las toxinas Cry1A (Gómez, *et al*, 2001). La importancia de este experimento radica en que la formación de un oligómero de aproximadamente 250 kDa a partir de monómeros de toxina es un paso previo para la inserción y la formación de un poro

activo en la membrana (Rausell, *et al.*, 2004). El resultado de este ensayo se refleja en la figura 13.

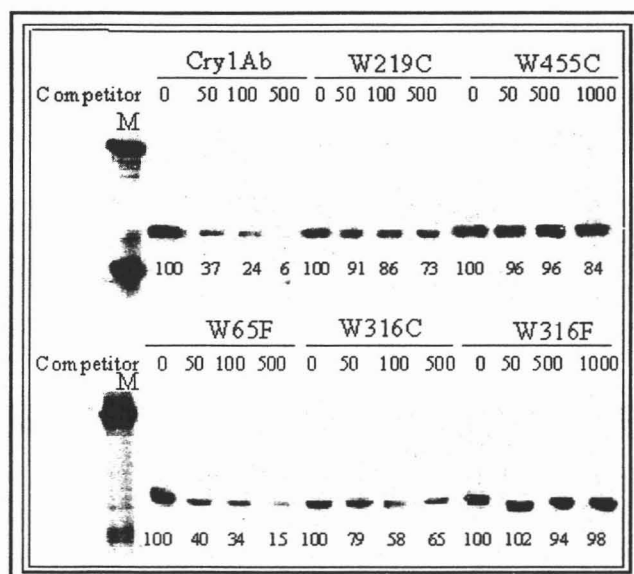


Fig. 12. Competencia heteróloga de las toxina Cry1Ab contra las mutantes en membranas de microvellosidad apical de *M. sexta*. La toxina marcada (Cry1Ab) y las toxinas no marcadas (frías) como competidor a diferentes concentraciones (50X, 100X, 500X y 1000X), fueron incubadas con 10 μ g de vesículas por 1 hora, la toxina no unida fue removida y las vesículas fueron sometidas a SDS y detectadas con estreptavidina acoplada a peroxidasa. M, marcador de peso molecular biotinado (Bio-Rad). Los números debajo de la bandas indican el porcentaje de unión de toxina marcada de Cry1Ab silvestre.

Como notamos en la figura 13, todas las cepas mutantes son capaces de formar el oligómero esperado, como resulta con nuestro control, la cepa silvestre de Cry1Ab y la única diferencia notable, es la formación de un agregado de mayor peso molecular encontrado en la mutante W316F, que puede ser de gran importancia y que le impida insertarse adecuadamente en la membrana y no tenga una apropiada formación de poro, siendo este el siguiente ensayo con el que se podrá corroborar este resultado. Con lo que se continuó con estudios de formación de poro.

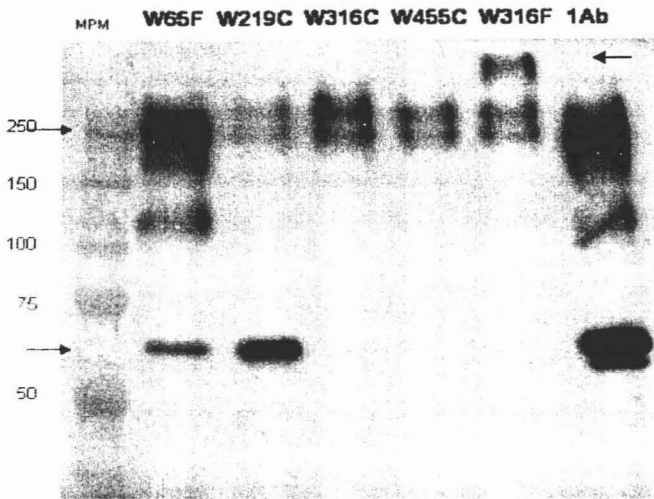


Fig. 13. Formación de oligómero en las toxinas mutantes tras la incubación con el anticuerpo scFv73, y analizando 5 μ l en SDS-PAGE al 8%, posteriormente transferido a membrana de nitrocelulosa para su detección por Western-blot, con anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab. La banda de 65 kDa corresponde a la formación del monómero y la de 250 kDa al oligómero. MPM, marcador de peso molecular (All blue- BioRad).

Ensayos de formación de poro

Una vez que las protoxinas son activadas se continúa con la medición de formación de poro, en el cual al poner en contacto las VMMA con la toxina se produce un cambio de potencial de membrana provocado por el movimiento de iones a través de la membrana debido a la formación de poros. Este cambio de potencial se puede medir a través de cambios en la fluorescencia del colorante diS-C3(5), que tiene una carga positiva deslocalizada, debido a esto puede distribuirse en la membrana hasta alcanzar su equilibrio de acuerdo al potencial de membrana, teniendo por además la característica de apagar su señal fluorescente cuando esta dentro de la membrana y es fluorescente cuando esta fuera de esta.

Las vesículas son cargadas con una concentración alta de KCl y al ser puestas con la toxina activada se ocasiona una hiperpolarización, se incrementa la carga negativa adentro de las vesículas debido a la salida de los iones de potasio, posteriormente al ir adicionando cantidades crecientes de KCl en el exterior se producen repolarización parciales de las vesículas, lo cual es registrable a través de los cambios de fluorescencia.

El potencial de equilibrio de potasio (E_k) para cada un de las adiciones de potasio (K) se calculan utilizando la ecuación de Nerst:

$$E_k = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_{ext}}{[K]_{int}}$$

Donde R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura en $^{\circ}\text{Kelvin}$ y F es la constante de Faraday y $[K]$ indica la concentración en el interior y el exterior de las membranas. Los valores de E_k se grafican contra los cambios de fluorescencia.

La actividad de formación de poro fue realizada empleando estructuras oligoméricas de las mutantes de Trp. La figura 14 muestra el efecto de las toxinas en inducir la permeabilidad a K^+ en las VMMA de *M. sexta*, a través de los cambios de fluorescencia producidos cuando se agregan concentraciones crecientes de KCl. En el panel A observamos que a una concentración de 50 nM la toxina silvestre de Cry1Ab produce una rápida hiperpolarización (indicado con una flecha) al compararse con el control, en el cual se agregó la misma cantidad de buffer, pero sin toxina, lo cual podemos ver como un cambio en la pendiente. Este efecto es debido a que los iones de potasio salen desde dentro de las vesículas a través de la permeabilidad ocasionada por la apertura de canales realizada por el efecto de la toxina Cry. En este ensayo después de agregar toxina oligomerizada se agregan diferentes concentraciones de KCl en el exterior. Cada vez que se agrega KCl el K^+ entra a la vesícula por el poro que la toxina ocasionó, cambiando el potencial de membrana y provocando así cambio en la localización del colorante con el consecuente incremento de la fluorescencia. La pendiente de la gráfica ΔF (cambios de fluorescencia) contra E_k (potencial de equilibrio) nos habla de la permeabilidad de K^+ . En el panel A se ve que la pendiente producida por la toxina ($m= 0.076$) es debida a este fenómeno en comparación a la pendiente del control ($m= -0.001$) donde no se puso toxina y solo se adicióno KCl.

En los paneles B y C observamos la adición de la misma concentración de toxina, pero de los oligómeros mutantes de Cry1Ab, las mutantes W65F, W219C, W316C Y W455C muestran una permeabilidad a K^+ muy similar a la toxina silvestre, y solo la mutante W316F tiene una leve disminución ($m=0.048$) en la permeabilidad a K^+ en relación a la toxina silvestre.

Exposición a luz ultravioleta

De las cepas que muestran actividad tóxica, se envió cristal purificado de las mutantes de triptofano por cisteína a la Dra. Carey (en Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, EUA), los cuales fueron irradiados con luz UV con un aparato que simula la luz solar.

Se enviaron las siguientes proteínas:

- W 73 C
- W 182 C
- W 219 C
- W 316 C
- W 316 F
- Wt Cry1Ab

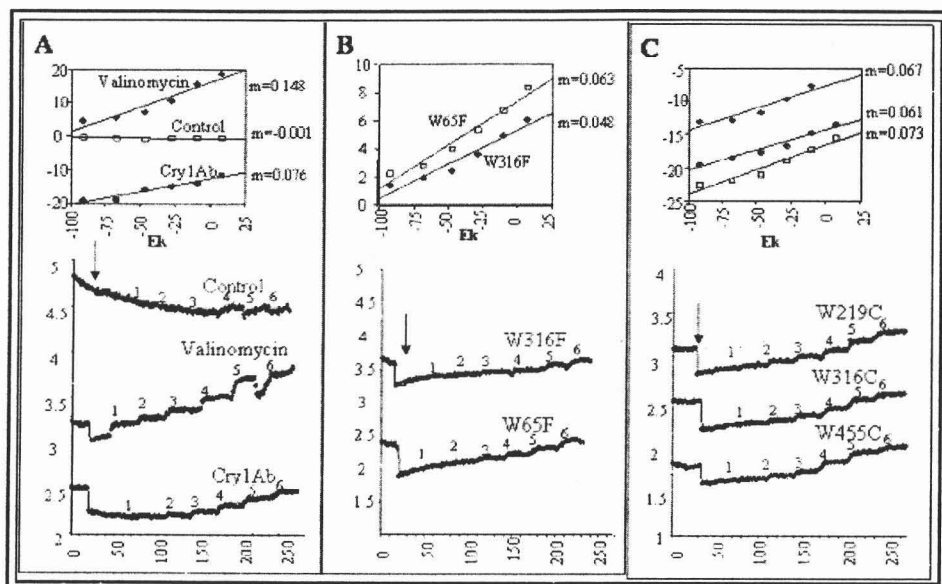


Fig. 14. Formación poro. En la parte inferior se registra la fluorescencia del colorante diSC3(5) al ir adicionando cantidades crecientes de KCl en el exterior produciendo repolarización parciales de las vesículas en presencia de oligómeros de las diferentes toxinas. Los números sobre los trazos indican las adiciones de KCl en ml: 1)3; 2)6; 3)12; 4)24; 5)48; 6)96. En la parte superior se grafican los cambios de fluorescencia (Δ) contra el potencial de equilibrio del potasio (Ek). UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia.

Los resultados preliminares de los bioensayos realizados con estos cristales irradiados se muestran en la tabla IV. La mutante W73C es la menos afectada dado que la LC_{50} no disminuye tan significativamente, sólo el doble de la dosis letal media inicial, a diferencia de las cepas restantes, en las cuales el daño ocasionado por la luz ultravioleta fue realmente notable en algunas mutantes como W219C y W316C dando LC_{50} muy altas (>500 ng/cm²). La toxina silvestre y W182C también se vieron afectadas en su toxicidad ya que esta disminuye cerca de 10 y 11.5 veces respectivamente veces en comparación a su toxicidad normal.

Tabla IV. Determinación de LC_{50} toxinas irradiadas con luz UV

Cepa	LC_{50} (ng/cm ²) Noirradiada	LC_{50} (ng/cm ²) irradiada
Wt	2.3	23.5
W73C	4.4	9
W182C	4.0	52
W219C	17.8	523
W316C	82.7	6845
W316F	35.4	57.2

Por último, se resume en la tabla V los resultados obtenidos del análisis y caracterización de las variantes mutantes de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*.

Tabla V. Resumen del análisis de las toxinas mutantes de Cry1Ab

Mutante	Produccion De cristal	LC50 (ng/cm ²)	Luz UV LC50 (ng/cm ²)	Activacion Tripsina	Compe tencia	Oligomero	Poros
W65F	Grande	11.47	ND	+/-	+++	+	+
W73F	Grande	0.65	ND	+	ND	ND	ND
W117F	Grande	4.9	ND	+	ND	ND	ND
W182F	Grande	3.13	ND	+	ND	ND	ND
W210F	Grande	1.5	ND	+	ND	ND	ND
W219F	Grande	1.0	ND	+	ND	ND	ND
W226F	Grande	2.50	ND	+	ND	ND	ND
W316F	Muygrande	35.43	57.2	+	----	+/-	+
W455F	Grande	1.61	ND	+	ND	ND	ND
W65C	Aucente	ND	ND	ND	ND	ND	ND
W73C	Grande	4.4	9	+	ND	ND	ND
W117C	Aucente	ND	ND	ND	ND	ND	ND
W182C	Grande	4.04	52	+	ND	ND	ND
W210C	Grande	4.2	ND	+	ND	ND	ND
W219C	Grande	17.83	523	+	+++	+	+
W226C	Aucente	ND	ND	ND	ND	ND	ND
W316C	Chico	82.69	6845	+/-	+++	+	+
W455C	Chico	17.6	ND	+/-	+++	+	+
Wt1Ab	Grande	2.3	23.5	+	++++	+	+

DISCUSIÓN

Los residuos de Trp tienen un papel muy importante en las proteínas. En la mayoría de las familias de proteínas estos residuos se localizan en posiciones ampliamente conservados, y se ha observado que tienden a situarse en el interior de la proteína. En proteínas de membrana este residuo a menudo se encuentra en la región límite de la bicapa y el agua, cerca de la cabeza polar del lípido. Estructuralmente, el triptofano juega un papel fundamental en muchas proteínas y en la interacción de estas con otras moléculas, además, se propone que los residuos de triptofano pueden conferir estabilidad térmica a una proteína y que pueden estabilizar estructuras cuaternarias y ayudar en procesos de plegamiento debido a la interacción polar entre el centro del anillo aromático y los grupos polares y se propone que cumplen la función de posicionar a la proteína dentro de la membrana (Yeagle, 1992). En la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* se encuentran nueve triptofanos, ocho de estos están ampliamente conservados en toda la familia Cry de tres dominios, lo cual sugiere que tengan un papel importante en la actividad tóxica. Siendo el triptofano 219 el único que no se encuentra conservado en la familia de proteínas Cry de tres dominios, ya que este residuo solo se localiza en las toxinas Cry1A.

Para analizar el papel de cada triptofano en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab se realizaron mutaciones con cambios conservativos (por fenilalanina) y no conservativos (por cisteína) en cada uno de los Trp presentes en esta proteína, y tras la caracterización de las versiones mutantes de la toxina Cry1Ab se encontraron varios puntos importantes.

Primero, todos los cambios conservativos realizados por Phe producen cristales bipiramidales. Mientras que los cambios no conservativos por Cys realizados muestran que algunas de estas mutantes, W65C, W117C y W226C no producen inclusiones cristalinas, esto nos hace sugerir que estos son residuos pueden estar jugando un papel importante en interacciones intermoleculares para mantener el plegamiento estructural en la formación del cristal que favorece la configuración del mismo durante su producción y que pueden ser sustituidos, pero solo por otro aminoácido aromático, como la fenilalanina. Por lo tanto su papel dentro de la estructura debe ser de importancia para la correcta estructuración de la protoxina.

Además encontramos que el tamaño de los cristales de las mutantes W316C y W455C fue muy pequeño, lo cual también puede indicar que estos cambios también afectan de cierta manera la estabilidad de estas proteínas pues al ser sometidas a condiciones de desnaturalización (SDS-PAGE), así como el calor, no soportaron adecuadamente el procesamiento. El resto de las toxinas mutantes con cambios no conservativos muestran una producción similar a la toxina silvestre

Existe poca información en la literatura donde se reporten sustituciones de Trp en las toxinas Cry. Se ha visto que el cambio de W210 por Cys en Cry1Ac no afecta la producción de protoxina o su toxicidad (Aronson, *et al*, 1995), y cuando se sustituyó el residuo W117 por Ala en Cry1A se encontraron resultados similares (Hussain, *et al*, 1996), siendo el cambio del W226 por Ala en Cry1Ab el único que resulto en una inestabilidad estructural, ya que no se detecto producción de protoxina (Alcantara, *et al*, 2001).

En lo que respecta a la actividad tóxica de las mutantes de W encontramos que siete de las nueve sustituciones de Trp por Phe (73, 117, 182, 210, 219, 226 y 455) y solo tres de Trp por Cys (73, 182 y 210) muestran toxicidad similar a la toxina silvestre contra larvas de *Manduca sexta*. A diferencia de esto, los residuos Trp encontrados en las posiciones 65 y 316 parece ser que tienen un papel muy importante, debido a que los cambios conservativos por Phe resultaron en proteínas con una baja actividad toxica, y cuando se realizaron los cambios no conservativos por Cys resultó en que no se producía cristal cuando se sustituía el Trp en la posición 65 y el Trp 316 resulta con un cristal muy pequeño y escaso, lo que se refleja en una disminución de la toxicidad (30 veces mayor que la LC50 de la toxina silvestre). Un efecto parecido se observa con el residuo 455, cuando es sustituido por Cys observamos una disminución alta de toxicidad. Estos tres residuos Trp están escondidos en centros hidrofóbicos del dominio I (W65) y dominio II (W316 y W455), indicando que puedan ser importantes para el mantenimiento de interacciones hidrofóbicas dentro de la toxina y la correcta estructuración de la proteína. Adicionalmente, las sustituciones del residuo W219 y W455 por Cys sugieren que se necesita un aminoácido aromático en estas posiciones, debido a que la actividad fue afectada (6 veces menos activas en ambos casos) cuando se realizo un cambio no conservativo pero se vieron inalteradas cuando se cambiaron por Phe.

El residuo W219 resulta particularmente interesante debido a que este Trp se encuentra localizado en un asa del dominio I que conecta las hélices $\alpha 6$ y $\alpha 7$, y esta en una posición que lo coloca muy expuesto al solvente en la estructura tridimensional del monómero de la toxina Cry1Aa (fig 15), otras toxinas Cry presentan aminoácidos cargados como arginina o ácido glutámico. Esta posición se encuentra en el mismo lado del dominio I en donde se localizan los residuos A92, F148 y Y153. A estos tres residuos se les ha relacionado previamente con la inserción a membrana, debido a que mutaciones que introducían cargas negativas en estos residuos presentan la misma afinidad de unión que la toxina silvestre pero están afectadas en la unión irreversible a VMMA y en la formación de poro (Hussain, *et al*, 1996; Chen, *et al*, 1995) por lo que se sugiere que el dominio no se inserta en la membrana. Se ha propuesto que este lado de la toxina se orienta a la membrana celular y puede participar directamente en la inserción del dominio I. El hecho de que se requiera un residuo aromático en la posición 219 de la toxina Cry1Ab para su

actividad insecticida y que este ampliamente expuesto al solvente puede indicar que este aminoácido puede ser importante para el contacto de la toxina con la membrana y su posterior inserción. Sin embargo nuestros resultados indican que esta toxina W219C esta afectada en unión y no en la formación de poro. Al analizar la estructura de Cry1Aa se puede ver que este residuo esta muy cerca del asa α -8 del dominio II, el cual es muy importante para el contacto con el receptor (Gómez, et al, 2004). Por lo cual es posible que el cambio W219C pudiera afectar la orientación de esta región y por lo tanto afectar la unión.

Aunque en estos momentos no es posible hacer una clara conclusión si es que el W219 esta directamente relacionado con el contacto con el receptor o si el cambio por Cys afecta la estructura del asa α -8 en su conformación lo cual resulta en una disminución de la unión.

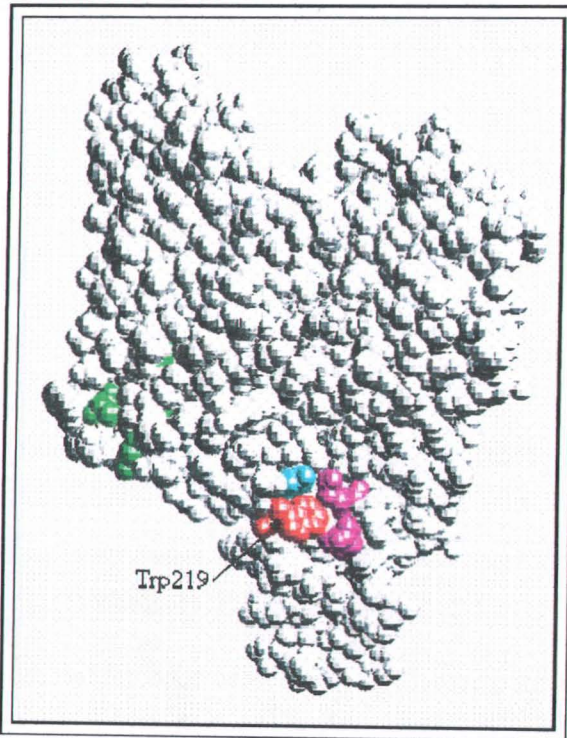


Fig. 15. Estructura tridimensional de la proteína Cry1Aa. En verde: Ala92, Leu148, y Tyr153; en Rojo: Trp219; en Azul: Tyr229; en Rosa: Gln285 y glu288.

Las mutantes W316F y W455C fueron las menos eficientes al competir con la toxina marcada de Cry1Ab la unión a VMMA lo cual indica que estas cepas mutantes están también afectadas en unión a los receptores. Estos dos residuos están prácticamente ocultos dentro del dominio II que esta considerado un dominio

importante de unión de las toxinas Cry, por lo cual es muy probable que los residuos Trp localizados en el interior del dominio II tengan un papel importante en mantener la estructura de este dominio, lo cual puede explicar su efecto en la unión al receptor y la formación de oligómero. Si analizamos datos de diversas proteínas que tienen como blanco la membrana, como es el caso de la Cry4B de *B. thuringiensis*, la α -hemolisina, y una proteína de superficie del bacteriófago M13 (Promdonkoy, *et al.*, 2004) se ha visto que los Trp juegan un papel estructural importante. Estos residuos se encuentran usualmente sobre o muy cerca de la interfase membrana-agua. Shiffer, *et al.*, (1992) sugiere que los residuos triptofano pueden tener un papel muy importante en facilitar la translocación de proteínas a través de la membrana actuando como determinantes en la orientación de las proteínas, que pueden servir como anclas en el lado periplásmico de la membrana pues los residuos Trp no están alineados al azar, sino que se encuentran correctamente posicionados para formar puentes de hidrógeno con las cabezas polares de los lípidos, mientras que los anillos hidrofóbicos están inmersos en la parte lípida de la bicapa.

Es importante mencionar en esta parte que todas las mutantes afectadas en unión a VMMA (fig. 11) producen menos cantidad de estructura oligomérica (fig.13.) debido a su baja capacidad de unión, puesto que la interacción con el receptor es importante para la formación de oligómero. Sin embargo, si estas mutantes son probadas con la misma concentración de oligómero encontramos que mantienen la misma capacidad de inducir formación de poro como la toxina silvestre (fig.14), a excepción de la mutante W316F que muestra una disminución en la formación de poro. Esto puede estar correlacionado con la alteración en la formación de oligómero observada para esta mutante (fig.13), ya que se genera un agregado de mayor peso molecular, que puede ser de gran importancia y sea uno o el motivo principal por el cual esta mutante tiene afectada su toxicidad, tal vez tenga una conformación diferente que le impida insertarse adecuadamente en la membrana y no tenga una apropiada formación de poro.

Finalmente las toxinas irradiadas con luz ultravioleta muestran una disminución muy notable en su toxicidad (tabla IV), a excepción de la cepa W73C dado que su dosis letal media es la menos afectada. Esto nos puede indicar que aparentemente la cepa W73C puede proteger el efecto de la radiación ultravioleta, dando así una muestra de lo que se puede obtener al realizar este tipo metodología, con la cual se puedan generar mutantes con resistencia a la luz UV, lo cual tendría un gran impacto sobre los bioinsecticidas ya que se alargaría su tiempo de vida al ser aplicados en el campo, el cual es uno de las principales adversidades que tienen estos plagicidas.

Aunque se necesitan más estudios para llegar a este fin, entendiendo con mayor detalle el mecanismo de acción de estas toxinas es posible generar bioinsecticidas cada vez más eficientes sin poner en riesgo el entorno donde sea aplicado.

CONCLUSIONES

1. Las toxinas mutantes W65C, W117C y W226C no producen cristal proteico.
2. Las toxinas mutantes W316C y W455C se ven afectadas en producción de cristal.
3. Las variantes restantes de la toxina Cry1Ab por cisteina y por fenilalanina no tienen afectada su toxicidad a excepción de las cepas W65F, W316F, W219C, W316C y W455C.
4. La mutante W65F esta afectada en procesamiento proteolítico.
5. La mutante W316F esta afectada en oligomerización.
6. Las mutantes W219C y W455C están afectadas en unión a membrana.
7. La mutante W73C parece dar cierta protección a la luz Ultravioleta.

REFERENCIAS

- Aronson, A. I. and Shai, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:1-8.
- Bishop, D. H. L. 1994. Biopesticides. *Curr. Opin. Biotech.* 5:307-311.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Bravo, A., Soberón, M. and Gill, S.S. 2005. *Bacillus thuringiensis*: Mecanismos and use. Elsevier BV.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde., J., Sánchez, J., Miranda, R., Gill, S., Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Acta.* 1667: 38-46.
- Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bac.* 179: 2793-2801.
- Bravo, A., Jansens, S. and Peferoen, M. 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invert. Pathol.* 60:237-246.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S. and Peferoen, M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invert. Pathol.* 60:247-253.
- Candas, M., Francis, B. R., Griko, N. B., Midboe, E. G., Bulla, L. A. Jr. 2002. Proteolytic cleavage of the developmentally important cadherin Bt-R₁ in the midgut epithelium of *Manduca sexta*. *Biochemistry.* 41(46): 13717-24.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-13.
- Davies, M. and Truscott, R. 2001. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *J. Photochem. Photobiol.* 63: 114-125
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., and Schepf, E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37:409-33.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genet.* 17(4): 193-199
- Gómez, I., Sánchez, J. Miranda, R., Bravo, A. and Soberón, M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates Proteolytic cleavage of helix α -1 in domin I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters.* 513: 242-6.

- Gomez, I., Oltean, D. I., Gill, S., Bravo, A., Soberon, M. 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins interaction using phage display. *J Biol Chem* 276:28906-28912.
- Griego, V. M., Spence, K. D. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:906-910
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R., and Cygler, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254:447-464.
- Hernández, G. 2002. Determinación del papel de los triptofanos en el mecanismo de acción de la proteína Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de maestría, UNAM.
- Hodgman, T. C. and Ellar, D. J. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by compilational analysis. *DNA Seq.* 1:97-106.
- Hofmann, C., Lüthy, P., Hütter, R. and Pliska, V. 1988. Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* 173:85-91.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., van Rie, J., Jansens, S. and Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of the target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:7844-7848.
- Knigh, P. J., Knowles, B. and Ellar, D. 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) toxin. *J. Biol. Chem.* 270:17765-17770.
- Knowles, B. H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24:275-308.
- Li, J., Derbyshire, D. J., Promdonkoy, B. and Ellar, D. J. 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem Soc. Trans.* 29:571-577.
- Li, J., Carrol, J. and Ellar, D. J. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815-821
- Lodish, H., Berck, A., Baltimore, D., Matsudaira, P. y Darnell, J. Biología molecular y celular. Cuarta edición, Editorial médica panamericana.
- Miranda, R., Gomez, I., Soberón, M., y Bravo, A. 2002. Mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 5(1):5-13.
- Miranda, R., Zamudio, F., and Bravo, A. 2001. Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:1155-1163.
- Morse, R. J., Yamamoto, T. and Stroud, R. M. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure.* 9:409-417.

- Neves-Petersen, M.T., Gryczynski, Z., Fojan, P., Petersen, E., and Pedersen, S. 2002. High probability of disrupting a disulphide bridge mediated by an endogenous excited tryptophan residue. *Protein Science*. 11: 588-600
- Promdonkoy, B., Pathaichindachote, W., Chewawiwat, N., y Panyim, S. 2004. Trp 132, Trp 154, and Trp 157 are essential for folding and activity of a Cyt toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 317: 744-748
- Pusztai, M., Fast, P., Kaplan, H., Carey, P. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* 273: 1215-1227
- Rajamohan, F., Alcantara, E., Lee, M. K., Chen, X. J., Curtiss, A. And Dean, D. H. 1995 Single amino acid changes in Domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bact.* 177(9):2276-2282.
- Rajamohan, F., Cotrill, J. A., Gould, F. and 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(5):2390-2396.
- Rajamohan, F., Hussain, S. A., Cotrill, J. A., Gould, F. and Dean, D. H. 1996 Mutations at domain II, loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ab δ -endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J. Biol. Chem.* 271(41)25220-25226.
- Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J. A., Curtiss, A. And Dean, D. H. 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14338-14343.
- Rajamohan, F., Lee, M. K. and Dean, D. H. 1998 *Bacillus thuringiensis* Insecticidal proteins: Molecular mode of action. *Prog. Nucl. Ac. Res.* 60:1-27.
- Rausell C, Garcia-Robles I, Sanchez J, Munoz-Garay C, Martinez-Ramirez AC, Real MD, Bravo A. 2004. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochem. Biophys Acta.* 1660(1-2):99-105.
- Rausell, C., Muñoz-Garay C., Miranda-CassoLuengo R, Gomez, I., Rudino-Pinera E, Soberon M, Bravo, A. 2004. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry.* 43(1):166-74.
- 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. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.
- Soberón, M. y Bravo. A. 2001. Capitulo 12: *Bacillus thuringiensis*: y sus toxinas insecticidas. En *Microbios en línea* (Editores: Martínez, E. y Martínez, J.). Coordinación de la investigación científica, UNAM. pp 221-235.
- Soberón, M. Perez, R.V. Nunez-Valdez, M.E. Lorence, A. Gomez, I. Sanchez, J. Bravo, A. 2000. Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for

- pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin *FEMS Microbiol Lett* 191:221-225.
- Uttamkumar, S. Pal, D., Chakrabarti, P. 2000. Environment of tryptophan side chains in proteins. *Proteins* 38: 288-300.
- Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, T. H., and Bulla Jr, L. A. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494.
- Van Rie, J. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:463-469.
- Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F. V., Giordana, B. and Hanzett, 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:301-308.
- Yamamoto, T. and Dean, D. H. 2000. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. *Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field application.* 81-100.
- Yeagle, Philip. 1992. The structure of biological membranes. CRC Press, Inc. pp 615.