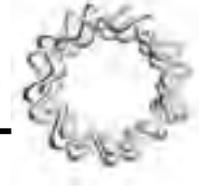




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



“PAPEL DEL DOMINIO III DE LA TOXINA Cry1Ab DE *Bacillus thuringiensis* EN LA INTERACCIÓN CON LOS RECEPTORES DE *Manduca sexta*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
Biol. Iván Arenas Sosa

Jurado de examen:

Presidente	Dra. Susana López Charretón
Secretario	Dr. Mario Soberón Chávez
Vocal	Dr. Humberto Lanz Mendoza
Suplente	Dr. Ernesto Méndez Salinas
Suplente	Dr. Ernesto Ortiz Suri



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres Rosa Maria Sosa Osorio y Mario Arenas Anrrubio que en cada momento de mi vida han estado a mi lado para apoyarme en los momentos buenos y malos. Gracias por darme el regalo más maravilloso de la naturaleza que es mi vida.

A mi hermano Omar Arenas Sosa y a su esposa Alejandra castillo quien sin dudarlo han estado luchando y apoyándome día con día para alcanzar cada uno de mis sueños y con quien he pasado momentos maravillosos. Gracias de todo corazón y espero que sus sueños se cumplan.

A mis queridos abuelos Antonia Anrrubio y Eusebio Triana por todo su cariño...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Mario Soberón Chávez por darme la oportunidad de pertenecer a este grupo de trabajo, por el tiempo y la dedicación para dirigir esta tesis y por todo el apoyo para realizar este trabajo. Muchas gracias doctor.

Agradezco profundamente a la Dra. Isabel Gómez Gómez quien me ha sumergido en este mundo de la ciencia, quien me ha enseñado que todo se puede siempre y cuando se tenga dedicación y paciencia. Por compartir conmigo este proyecto y sobre todo compartir sus conocimientos para enriquecer este trabajo

A la Dra. Alejandra Bravo por cada uno de sus comentarios, apoyo y discusiones para enriquecer este trabajo.

A los Dres. Lorenzo Segovia y Baltasar Becerril por haber formado parte de mi comité tutorial de maestría, todas las discusiones y sugerencias aportaron algo en este trabajo.

A los Dres. Susana López, Ernesto Suri, Ernesto Méndez, Humberto Lanz por revisar este trabajo y darme sus sugerencias para mejorar este escrito.

Al Dres. Liliana Pardo, Carlos Garay y Juan Miranda, por todos sus comentarios y sugerencias a este trabajo y por su grandiosa amistad.

Al Biol. Jorge Sánchez por compartir toda su experiencia tanto en lo laboral como en lo persona y por todos los consejos en lo que se refiere a las toxinas Cry. Gracias por tu amistad.

Al Sr. Oswaldo López por dejarme aprender cada día un poco más sobre biología molecular y por cada consejo que me diste, de verdad te lo agradezco.

A la Biol. Idalia López Gorostieta por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por darme ánimos cuando caía en la desesperación cuando las cosas no salían como esperaba, por dejarme entrar en tu vida y darme un poco de amor, pero sobre todo por compartir esta aventura conmigo y por regalarme un pedacito de tu corazón. Te quiero.

A Graciela Domínguez por su apoyo en la parte administrativa.

A Lizbeth Cabrera por su apoyo con los insectos ocupados en este trabajo y por ofrecerme tu amistad. Gracias por tus consejos.

A mis compañeros del laboratorio Luisa, Teresa Fernández, Teresa Martínez, Sabino, Nancy, Claudia, Christopher y Nuria con quien comparto mi trabajo y amistad.

A Sergio Blancas y Alejandro Uribe por todo el apoyo técnico recibido en este trabajo y por ofrecerme su amistad.

Gracias a toda la gente que brinda el apoyo administrativo en nuestro instituto, en especial a Gloria y Maribel.

A mis hermanos Filiberto, Alberto, Sergio, Ismael, Carlos, Juan que aunque no son de sangre siempre están a mi lado dándome ánimos para seguir adelante.

Finalmente agradezco a CONACYT la Beca-Crédito, No. de registro 181210 que permitió realizar mis estudios de maestría.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DR. MARIO SOBERÓN CHAVEZ

Índice

Lista de abreviaturas	9
Resumen	10
Introducción	11
Características generales.....	12
Clasificación de las toxinas Cry.....	12
Estructura de las toxinas Cry.....	14
Dominio I.....	14
Dominio II.....	17
Dominio III.....	18
Mecanismo de acción de las toxinas Cry.....	19
Solubilización y activación proteolítica.....	21
Unión al receptor e inserción en la membrana.....	21
Receptores de las toxinas Cry.....	22
Antecedentes particulares.....	24
Hipótesis	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Materiales y métodos	29
Cepas.....	29
Vectores.....	29
Purificación de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Aa.....	30
Purificación de cristales por gradiente de sacaros.....	30
Solubilización de cristales.....	31
Determinación de concentración de proteínas por el método de Bradford.....	31
Activación con tripsina.....	32
Crecimiento de las bibliotecas.....	32
Rescate de las bibliotecas en fagos M13.....	33
Selección en inmunotubos.....	33

Selección negativa en presencia de la toxina Cry1Ac.....	34
Rescate de fagos individuales.....	35
Ensayo de ELISA monoclonal.....	35
Producción de fragmentos de anticuerpos scFv.....	36
Purificación de anticuerpos scFv por cromatografía de afinidad.....	37
Inmunoblot.....	37
Experimentos de unión a ligando.....	37
Bioensayos.....	38
Análisis de clonas individuales por patrón de restricción (fingerprinting).....	38
Activación de la toxina Cry1Ab en presencia de los anticuerpos scFv.....	39
Purificación de oligómero.....	40
ELISA monoclonal con oligómero purificado.....	40
Resultados.....	41
Purificación de cristales y activación de las toxinas.....	41
Selección de anticuerpos que reconozcan a la toxina Cry1Ab.....	42
Determinación de la especificidad de los anticuerpos.....	45
Ensayo de toxicidad en presencia de fago-anticuerpo.....	47
Selección de anticuerpos en presencia de la toxina Cry1Ac como competidor.....	48
Análisis de fago-anticuerpos monoclonales después de las rondas de selección.....	49
Análisis del patrón de restricción (fingerprinting).....	51
Determinación de la especificidad de los anticuerpos seleccionados.....	52
Ensayos de competencia con las toxinas Cry1Ab y sus receptores en <i>M. sexta</i>	53
Reconocimiento de los fago-anticuerpos anti-dominio III al oligómero y monómero.....	55
Caracterización del efecto " <i>in vivo</i> " de los anticuerpos anti-dominio III.....	57

Activación de toxina Cry1Ab en presencia de anticuerpos scFv purificados.....	58
Discusión.....	61
Conclusiones.....	65
Perspectivas.....	65
Bibliografía	66

Resumen

Las proteínas producidas por *Bacillus thuringiensis* son una alternativa para el control de diferentes ordenes de insectos plaga e insectos vectores de enfermedades. Estas toxinas son altamente específicas y hasta la fecha se ha demostrado que la especificidad y toxicidad depende de la interacción con proteínas receptoras en el intestino medio del insecto blanco, por lo que el estudio de los sitios de interacción entre las toxinas y sus receptores es importante para entender acerca del mecanismo de acción de estas toxinas, para su mejor aprovechamiento.

En el caso de la toxina Cry1Ab ya han sido caracterizadas las regiones de interacción entre las asas 2, 3 y $\alpha 8$ del dominio II y el receptor caderina del lepidóptero *Manduca sexta*, sin embargo, no se han determinado si existen regiones del dominio III que interaccionen con los receptores de este insecto.

En este trabajo haciendo uso de la técnica de despliegue en fago logramos obtener anticuerpos scFv que reconocen el dominio III de la toxina Cry1Ab tomando como herramientas dos bibliotecas de anticuerpos inmunes contra la toxina Cry1Ab (una obtenida del bazo y una de la médula ósea). Tres de estos anticuerpos denominados como M15, M21 y M22 presentaron la capacidad de inhibir la interacción de la toxina Cry1Ab con el receptor aminopeptidasa, mientras que no inhibieron la interacción con el receptor caderina. Estos anticuerpos también presentaron la capacidad de neutralizar el efecto tóxico en larvas de *M. sexta* y en particular el anticuerpo M22 no presenta la capacidad de inducir la oligomerización a diferencia de los anticuerpos que reconocen al dominio II como el anticuerpo scFv73. El anticuerpo M22 reconoce un epítoto que se encuentra expuesto tanto en el monómero como en el oligómero. Estos resultados sugieren que el papel del dominio III de la toxina Cry1Ab es el responsable de la interacción con el receptor aminopeptidasa.

Introducción

Características Generales

Bacillus thuringiensis (Bt) es el nombre que designa a una familia de bacterias que tiene como principal característica la producción de cristales proteicos durante su periodo de esporulación. Bt es miembro del grupo de *Bacillus cereus*, *B. anthracis* y *B. mycooides*, la característica que lo distingue son sus propiedades entomopatógenas (Helgason *et al.*, 2000). El primer reporte sobre estas bacterias se llevó a cabo en Japón, donde se aisló a partir de larvas de gusano de seda (Ishiwata, 1901). Diez años después fue descubierta otra cepa en Alemania, aislada de larvas de gusano de maíz. Esta cepa fue descubierta en la provincia de Thuringia, por lo que se le nombró *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915).

Bt es una bacteria aerobia Gram positiva, formadora de esporas y cristales durante la fase estacionaria de su crecimiento. Sus principales nichos los constituyen el suelo, follaje de algunas plantas y el intestino de algunos insectos. Inicialmente fue reconocida como patógeno de insectos y esta actividad fue atribuida a los cristales que produce. Estas observaciones llevaron al desarrollo de bioinsecticidas para el control de ciertas especies de insectos pertenecientes a diferentes órdenes (Lepidópteros, Dípteros y Coleópteros), y recientemente se han encontrado cepas activas contra algunos otros órdenes (Hymenópteros, Homópteros, Orthópteros y Mallophagos) y contra nemátodos, ácaros y protozoarios (Feitelson, 1993, Crickmore *et al.*, 1998).

La actividad entomopatógena de Bt se debe a los cristales que produce, los cuales están constituidos por proteínas denominadas toxinas Cry y Cyt. Las toxinas Cry se caracterizan por ser altamente selectivas para los insectos blanco y hasta la fecha se han aislados más de 300 diferentes genes de toxinas Cry, los cuales constituyen un arsenal importante para el control de una amplia variedad de insectos plaga y de insectos vectores de enfermedades humanas. Por estas razones, las toxinas producidas por Bt son una alternativa para el reemplazo de los

insecticidas químicos, evitándose así el daño al ecosistema y el desarrollo de resistencia de los insectos a estas sustancias químicas (Feitelson, 1993).

Clasificación de las toxinas Cry

Las proteínas Cry comprenden 40 subgrupos con más de 300 miembros. El criterio para incluir una toxina en la clasificación es: tener una identidad en la secuencia de aminoácidos con una o varias toxinas que se encuentran en la nomenclatura o ser una proteína paraspoidal de Bt que exhibe alguna actividad pesticida o algún efecto tóxico verificable experimentalmente hacia algún insecto (Crickmore *et al.*, 1998).

La clasificación de las proteínas Cry está basada en la identidad de la secuencia de aminoácidos. La nomenclatura es jerárquica y se definieron cuatro categorías de acuerdo al porcentaje de identidad entre las secuencias. Las líneas verticales presentes en la figura 1 representan los límites en identidad que dividen las diferentes categorías en la nomenclatura. El número arábigo designa la primera fila y 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 del 95 % de identidad. Es importante señalar que al hacer el análisis filogenético algunos grupos de secuencias mostraron tener distancias infinitas, lo que indicaba que estas secuencias eran muy diferentes y por lo tanto fueron tratadas como grupos independientes. Este es el caso de las toxinas Cyt, Cry6, Cry15 y Cry22 (Crickmore *et al.*, 1998).

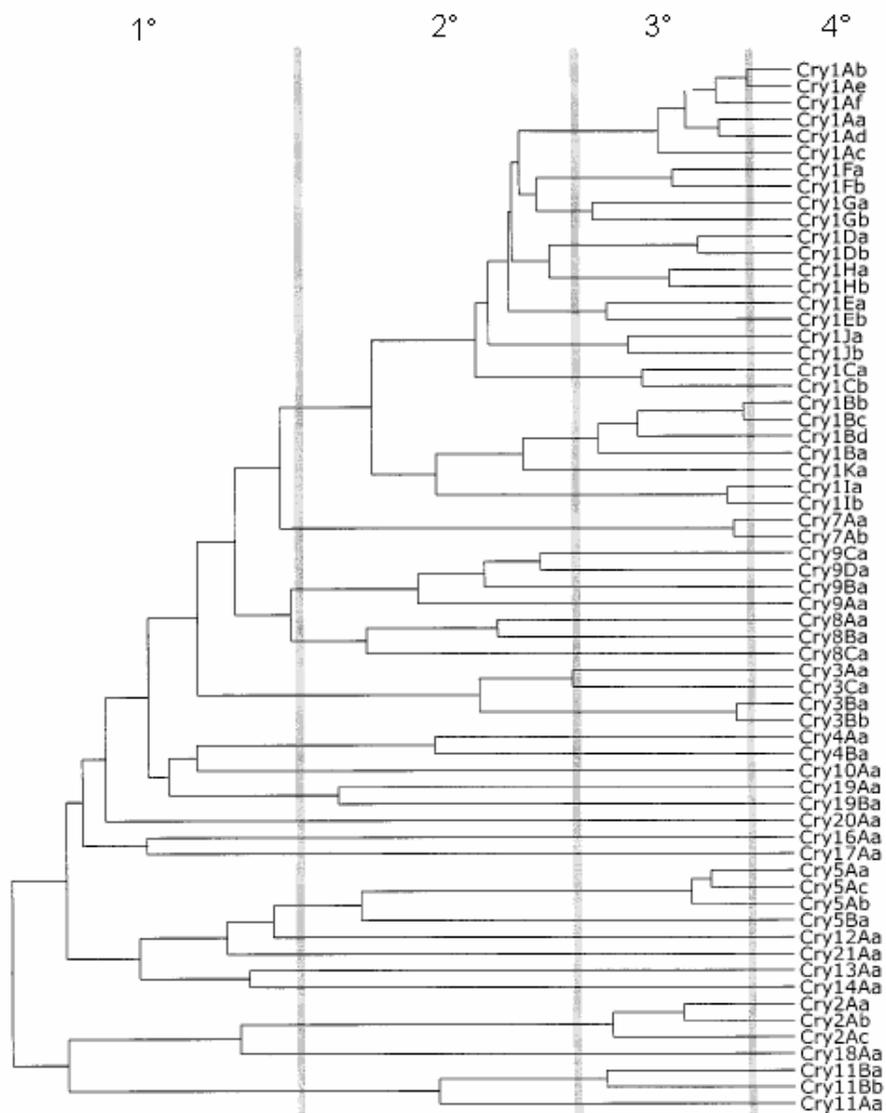


Figura 1. Árbol filogenético de las toxinas Cry. Las líneas verticales marcan las cuatro categorías utilizadas para la clasificación de las toxinas Cry (tomado de Crickmore *et al.*, 1998).

Estructura de las toxinas Cry

A la fecha se han reportado las estructuras tridimensionales de seis toxinas Cry. Las toxinas Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995) específica para lepidópteros, las toxinas Cry3Aa (Li *et al.*, 1991) y Cry3Bb1 (Galitsky *et al.*, 2001) específicas para coleópteros, la toxina Cry2Aa con actividad dual para dípteros-lepidópteros (Morse *et al.*, 2001) y la toxina Cry4Ba específica para dípteros (Boonserm *et al.*, 2005).

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre múltiples toxinas Cry ha indicado la existencia de cinco bloques altamente conservados que se localizan en las regiones centrales y de contacto entre los dominios, lo cual hace suponer que la estructura tridimensional está muy conservada (Höfte y Whiteley, 1989). Las estructuras cristalográficas de las toxinas reportadas hasta el momento apoyan esta teoría pues muestran una topología muy similar compuesta por tres dominios (Figura 2) (Boonserm *et al.*, 2005).

Dominio I

La parte amino terminal del fragmento tóxico comprende seis hélices anfipáticas (α -1, 2, 3, 4, 6 y 7) con una hélice central hidrofóbica (α 5) las cuales constituyen el dominio I (Figura 3) (Grochulski *et al.*, 1995). Este dominio es el responsable de la inserción en la membrana y formación de poro en el epitelio intestinal del insecto blanco. Además, este dominio presenta similitud estructural con otras toxinas bacterianas formadoras de poros como la colicina 1a y N, hemolisina E, el dominio de translocación en membrana de difteria y la exotoxina de *Psuedomona*. El dominio formador de poro de la colicina A consiste de dos hélices centrales (α 8 y α 9) rodeada por ocho hélices α antiparalelas (Parker and Pattus, 1993). La formación de poro en la colicina A se lleva a cabo por la inserción en la membrana de las hélices hidrofóbicas α 8 y α 9 (Duche *et al.*, 1994). Así mismo, la toxina de difteria entra a la membrana por medio de un asa localizada entre hélices hidrofóbicas, seguido por un cambio conformacional inducido por pH

(Zhan *et al.*, 1994). Por analogía a estos mecanismo, se ha propuesto el modelo de inserción de las toxinas Cry denominado como el modelo de sombrilla, en el cual las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ son capaces de iniciar la formación de poro (Li *et al.*, 1991).

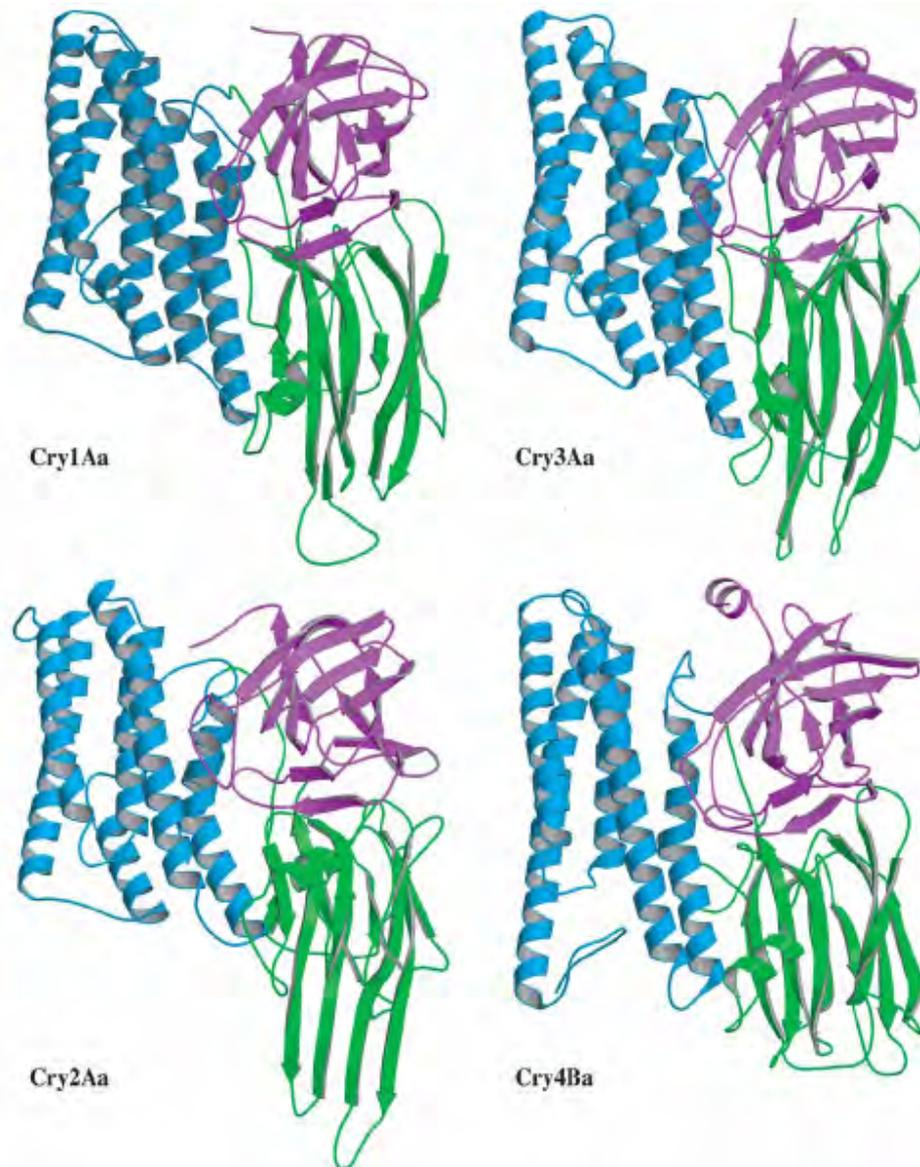


Figura 2. Estructura cristalográfica de las toxinas Cry2Aa, Cry4Ba, Cry1Aa y Cry3Aa. El dominio I se muestra en azul, el dominio II se muestra en color verde y el dominio III se muestra en color violeta (tomada de Boonserm *et al.*, 2005).

Experimentos realizados mediante la creación de puentes disulfuro dentro del dominio I y entre los dominios I y II apoyan al modelo descrito anteriormente, en el que las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se insertan en la membrana, mientras que el resto de la toxina queda fuera de la membrana en forma de sombrilla (Schwartz *et al.*, 1997). Sin embargo, el análisis estructural de este trabajo abre la posibilidad de que la unión de los puentes disulfuro insertados bloquee la habilidad de estas proteínas para penetrar a la membrana.

Por otro lado, se ha propuesto otro mecanismo de inserción denominado abrecartas, el cual se basa en la similitud de la inserción de la colicina A. Este modelos propone que las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ son las que se insertan en la membrana, mientras que las demás hélices del dominio I no sufren cambio alguno (Hodgman y Ellar, 1990).

El dominio I es capaz de insertarse en vesículas de fosfolípidos, no obstante su actividad de formación de poro es diferente comparada con la de la toxina completa (Von Tersch *et al.*, 1994).

Experimentos con péptidos sintéticos han demostrado que las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ son capaces de insertarse en membranas lípidicas, lo cual es evidencia importante de la función de éste dominio y apoya el modelo de sombrilla (Gazit y Shai, 1995).

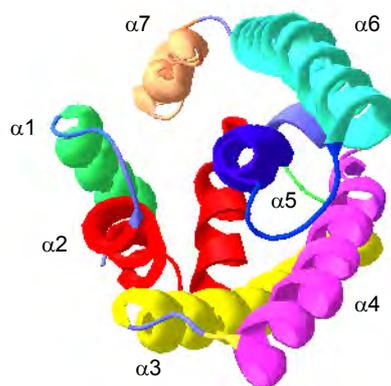


Figura 3. Estructura cristalográfica del dominio 1 de la toxina Cry1Aa (tomada y editado de Grochulski *et al.*, 1995).

Dominio II

El dominio II esta conformado por tres láminas β antiparalelas acomodadas en forma de prisma bipiramidal (figura 4). Las dos primeras láminas están constituidas por cuatro hojas β mientras que la tercera lámina tiene sólo tres hojas. Las láminas se encuentran unidas por asas (asa 1, 2, 3 y $\alpha 8$) y es en estas regiones donde se observa la mayor variabilidad entre las toxinas Cry. Este arreglo de asas es similar en estructura a los sitios de unión al antígeno en las inmunoglobulinas, por lo que originalmente se propusieron como candidatos de sitio de unión a los receptores y por lo tanto, responsables de la especificidad en las toxinas Cry.

Mutaciones en las asas 2 y 3 del dominio II de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac afectan tanto la toxicidad como la unión a vesículas de membrana de la microvellosidad apical del intestino medio (VMMA) de *Manduca sexta*, *Heliothis virescens* y *Lymantria dispar* demostrando así la importancia de éstas regiones (Rajamohan *et al.*, 1996a; Rajamohan *et al.*, 1996b; Lee *et al.*, 2000). Por otro lado, mutaciones en el asa $\alpha 8$ del dominio II de la toxina Cry1Ac mostraron reducción de toxicidad y unión a VMMA de *M. sexta* y *L. dispar* lo cual demuestra que aquellas regiones que unen las láminas β de dominio II son importantes en la interacción con el receptor (Lee *et al.*, 2001).

Algunas mutaciones pueden mejorar la unión y toxicidad en algunos insectos, tal es el caso de una mutante triple de la toxina Cry1Ab (N372A, A282G y L283S), localizadas en las asas 2 y $\alpha 8$, que muestra un incremento de 18 veces en la unión a VMMA y 36 veces en la toxicidad contra el lepidóptero *L. dispar* (Rajamohan *et al.*, 1996). Experimentos de esta naturaleza aportan información acerca de la interacción toxina-receptor y pueden permitirnos la construcción de toxinas más potentes y eficaces, para un mejor uso de las toxinas.

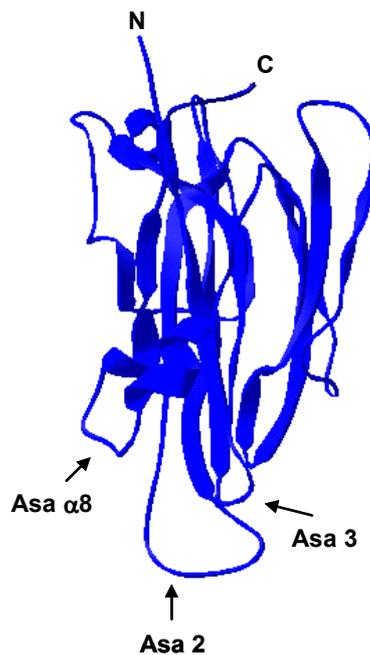


Figura 4. Estructura cristalográfica del dominio II de la toxina Cry1Aa (tomada y editado de Grochulski *et al.*, 1995).

Dominio III

El dominio III está constituido por dos láminas β antiparalelas, arregladas en forma de emparedado (figura 5). Se propone que este dominio juega un papel importante en la especificidad de la toxina. El papel de dominio III en la unión con el receptor ha sido explorada por muchos grupos. La construcción de quimeras entre diferentes toxinas ha demostrado que este dominio juega un papel importante en la especificidad (De Maag *et al.*, 1996). Mutaciones en el dominio III de la toxina Cry1Ac (N506D, Q509E y Y513A) redujeron la capacidad de unión a VMMA de *M. sexta* y afectaron la actividad de formación de poro (Burton *et al.*, 1999). En el caso particular de la toxina Cry1Ac, la unión a su receptor natural (aminopeptidasa), es inhibida por la N-Acetilgalactosamina (GalNAc), sugiriendo que la toxina reconoce este azúcar dentro del receptor. La caracterización de una mutante triple en el dominio III de la toxina Cry1Ac (N506D, Q509E y Y513A) ha

demostrado que el sitio de reconocimiento para GalNAc se encuentra localizado en el dominio III, ya que en ensayos de competencia heteróloga la unión de esta mutante no es inhibida por GalNAc (Burton *et al.*, 1999). La estructura tridimensional de la toxina Cry1Ac en presencia del azúcar demostró que estos residuos son importantes para el reconocimiento de la GalNAc y por lo tanto, este dominio juega un papel importante en el mecanismo de acción de las toxinas Cry (Li *et al.*, 2001). En el caso de la toxina Cry1Aa, se han reportado dos regiones en el dominio III que interactúan directamente con la aminopeptidasa de *B. mori* (Atsumi *et al.*, 2005).

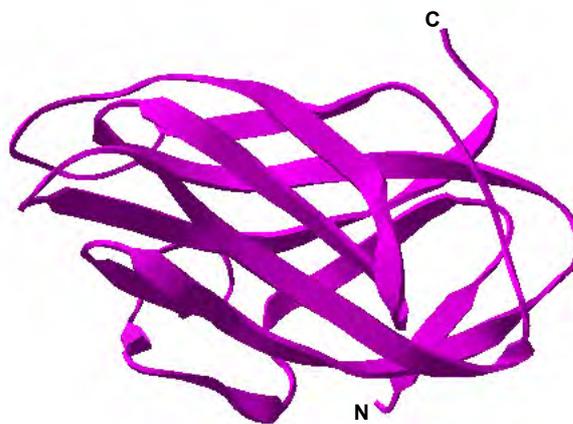


Figura 5. Estructura cristalográfica del dominio III de Cry1Aa (tomada y editado de Grochulski *et al.*, 1995).

Mecanismo de acción de las toxinas Cry

El mecanismo de acción de las proteínas Cry1A de Bt en *M. sexta* involucra varios pasos posteriores a la ingestión del cristal. El primer paso involucra la solubilización del cristal (protoxina de aproximadamente 130 kDa) y activación de la protoxina por proteasas presentes en el intestino del insecto (toxina activa de 55-65 kDa). El segundo paso, involucra la unión de la toxina a la caderina (Bt-R₁) localizada en la membrana apical de células del intestino. Esta interacción dispara la formación de un oligómero que pierde afinidad por el primer receptor y se une

al receptor aminopeptidasa. La aminopeptidasa lleva la toxina a microdominios de membrana en donde se favorece la inserción para formar canales iónicos o poros que permiten la salida de iones y el ingreso de agua, provocando la muerte del insecto. El diagrama se muestra en la figura 6 (Schnepf *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2004).

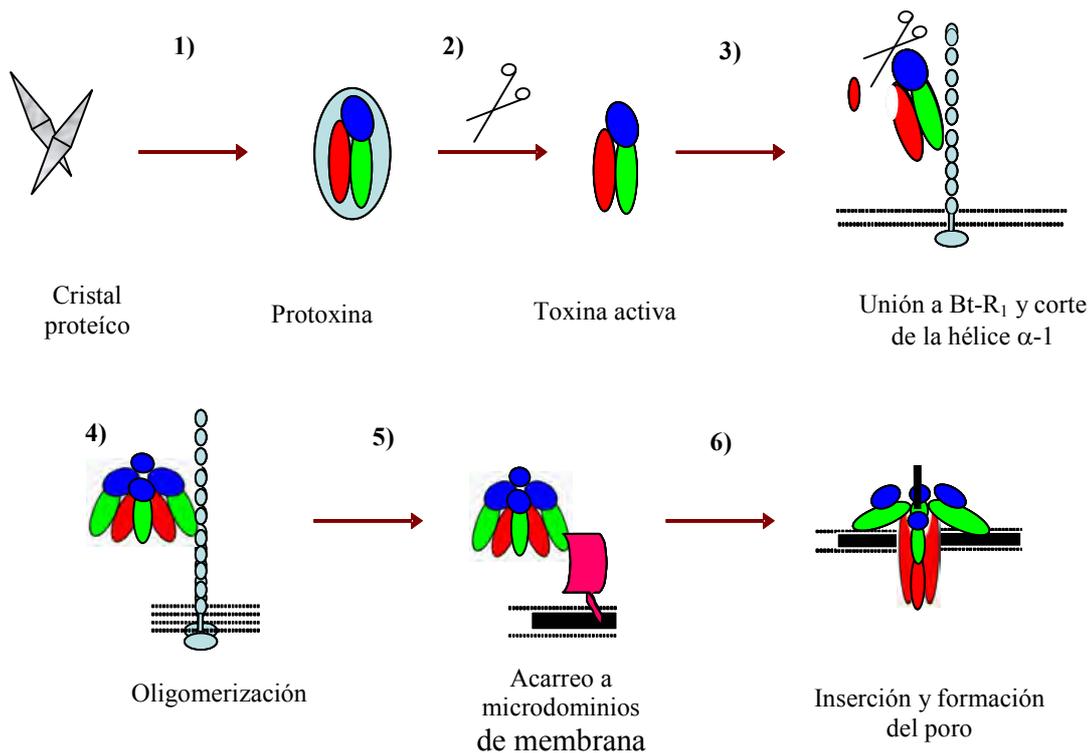


Figura 6. Mecanismo de acción propuesto en insectos lepidópteros para las toxinas Cry. 1) El cristal después de ser ingerido es solubilizado liberando las protoxinas. 2) La protoxina es procesada por proteasas presentes en el intestino, liberando una toxina activa. 3) La unión de la toxina al receptor Bt-R₁ promueve el corte de la hélice α1. 4) El corte de la hélice α1 promueve la oligomerización. 5) El oligómero pierde afinidad por Bt-R₁ y adquiere una mayor afinidad por su receptor aminopeptidasa. 6) La aminopeptidasa acarrea el oligómero a microdominios de membrana, donde se realiza la inserción y formación de poro.

Solubilización y activación proteolítica

Una vez que el insecto ingiere el cristal producido por Bt, la solubilización del cristal depende del pH del intestino del insecto. En el caso de lepidópteros y dípteros es alcalino, mientras que los coleópteros presentan un pH que va de neutral a ligeramente ácido (Dow, 1986). La región amino terminal de las protoxinas presenta muchos residuos de cisteína que forman puentes disulfuro en los cristales, por lo tanto, la reducción de éstos es un paso necesario para la solubilización de las proteínas Cry (Du *et al.*, 1994).

La activación proteolítica de las proteínas Cry es un paso determinante en la toxicidad, pues se ha demostrado que un mal procesamiento disminuye la susceptibilidad de algunos insectos (Oppert *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 1998). Además del pH, lepidópteros y coleópteros difieren en las proteasas presentes su intestino. Las serinproteasas se encuentran principalmente en el intestino de lepidópteros y dípteros, mientras que las cisteinproteasas y asparticoproteasas son abundantes en el intestino de coleópteros (Terra y Ferreira, 1994). Se ha reportado que el aumento en la degradación de la toxinas Cry1C está asociada con la pérdida de sensibilidad de larvas de *Spodoptera littorales* (Keller *et al.*, 1996). Otro ejemplo, es la baja toxicidad de la toxina Cry1Ab en larvas de *S. frugiperda* debido a la rápida degradación de la toxina en el intestino del insecto (Miranda *et al.*, 2001).

Unión al receptor e inserción en la membrana

Una vez que las toxinas son activadas, éstas son capaces de unirse al receptor Bt-R₁. La unión de la toxina con Bt-R₁ promueve el corte de la hélice 1 y la exposición de residuos hidrofóbicos que conllevan a la formación de oligómeros de aproximadamente 250 kDa (Gómez *et al.*, 2002). Una vez formado el oligómero, éste pierde afinidad por Bt-R₁ y aumenta su afinidad por el receptor APN. El receptor APN arrastra la toxina hacia microdominios de membrana, donde

se lleva a cabo la inserción de la toxina y la formación de poros que provocan un desbalance osmótico llevando al insecto a la muerte (Zhuang *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2004).

Receptores de las toxinas Cry

El principal determinante de la especificidad de las toxinas Cry es la interacción con receptores específicos en el intestino del insecto susceptible (Jenkins y Dean, 2000). La identificación de receptores es fundamental para determinar las bases moleculares de la acción de las toxinas Cry y poder manejar la resistencia de insectos que en muchos casos se ha demostrado que correlaciona con defectos en la unión con el receptor (Ferré y Van Rie, 2002).

La proteína de unión para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac en *M. sexta* es una caderina con un peso aproximado de 210 kDa (Bt-R₁) (Vadlamudi *et al.*, 1995). Esta proteína es miembro de una gran familia de proteínas transmembranales dependientes de calcio que son responsables de mantener la integridad de contactos entre célula y célula en organismos multicelulares (Angst *et al.*, 2001). Está constituida por un ectodominio con 12 módulos, un péptido señal (amino terminal), un dominio transmembranal y por último un dominio citoplasmático, además contiene sitios de unión a calcio, secuencias de interacción con integrinas y secuencias de unión a caderinas (Dorsch *et al.*, 2002). En el caso de *B. mori* se ha reportado que la proteína de unión para las toxinas Cry también es una caderina de aproximadamente 175 kDa (Bt-R₁₇₅) (Nagamatsu *et al.*, 1999).

La unión a las caderinas es un paso importante en el mecanismo de acción de las toxinas Cry, la expresión del receptor Bt-R₁₇₅ de *B. mori* en células Sf9 de *S. frugiperda* confiere sensibilidad a la toxina Cry1Aa sugiriendo que este receptor es importante para la toxicidad y susceptibilidad (Nagamatsu *et al.*, 1999). Sin embargo, la expresión de Bt-R₁ y Bt-R₁₇₅ en otros tipos de células requiere de una alta concentración de toxina para causar lisis en una pequeña proporción de las mismas (Tsuda *et al.*, 2003), sugiriendo que algunos factores (otros receptores

proteasas, pH, etc.) propios del insecto pueden contribuir a la toxicidad (Hua *et al.*, 2004). La toxina Cry1Aa puede lisar células intestinales de *B. mori*, sin embargo, su efecto tóxico disminuye al preincubar las células con un antisuero anti-Bt-R₁₇₅ (Hara *et al.*, 2003). La disrupción del gene de caderina por la inserción de un retrotrasposon resulta en un nivel de resistencia del 40 al 80 % a la toxina Cry1Ac en larvas de *H. virescens* YHD2 (Gahan *et al.*, 2001). Por otro lado, el aislamiento de un anticuerpo que reconoce a la toxina Cry1Ab (denominado como scFv73) que tiene la característica de mimetizar al receptor Bt-R₁ e inhibir la interacción de la toxina con este receptor, mostró reducción en la toxicidad de la toxina Cry1Ab en bioensayos con larvas de *M. sexta*, demostrando que la participación de Bt-R₁ es esencial para la toxicidad (Gómez *et al.*, 2001). Todos estos datos demuestran que las caderinas juegan un papel importante en la toxicidad de las toxinas Cry.

En *M. sexta* se ha reportado a la aminopeptidasa N (APN) de aproximadamente 120 kDa como receptor de las toxinas Cry1, mientras que en *H. virescens* la toxina Cry1Ac reconoce dos proteínas, una de 120 kDa y otra de 170 kDa, ambas identificadas como aminopeptidasas (Gill *et al.*, 1995). Las aminopeptidasas son proteínas glicosiladas ancladas a la membrana por un enlace glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) y localizadas en regiones denominadas "microdominios de membrana o rafts" (Knight *et al.*, 1994). Mutantes de la toxina Cry1Ac afectadas en la unión con APN presentan niveles de toxicidad similares a la toxina silvestre en larvas de *M. sexta* (Burton *et al.*, 1999), mientras que la expresión de este receptor en sistemas heterólogos no resulta en sensibilidad a las toxinas Cry1 probablemente esto se debe a una mala glicosilación en la expresión de la proteína (Denolf *et al.*, 1997). Estos datos sugieren que el papel de APN no es esencial para la toxicidad de las proteínas Cry. Sin embargo, reportes recientes demuestran lo contrario. La reducción de la expresión de APN utilizando el silenciamiento de genes por dsRNA *in vivo*, disminuye la toxicidad de Cry1C en *Spodoptera litura* (Rajagopal *et al.*, 2002) y la expresión heteróloga de la APN de *M. sexta* en el intestino de *Drosophila melanogaster* resulta en un incremento en la sensibilidad a la toxina Cry1Ac lo cual habla de la importancia de estas proteínas

de membrana (Gill *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha reportado que la incorporación de APN a bicapas lipídicas aumenta la actividad de formación de poro de la toxina Cry1Aa (Schwartz *et al.*, 1997), y experimentos con membranas del intestino medio *M. sexta* rasuradas con fosfolipasa C (que cortan la unión de GPI) demostraron que el corte de APN previene la localización del oligómero de Cry1Ab en microdominios de membranas y esto atenúa la inserción en la membrana aunque se encuentre el receptor Bt-R₁ (Bravo *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que el receptor APN juega un papel importante en el mecanismo de acción de las toxinas Cry.

Recientemente, mediante un análisis proteómico fue identificada una nueva proteína capaz de unir a la toxina Cry1Ac, el análisis bioquímico determinó que se trata de una fosfatasa alcalina (ALP) de aproximadamente 65 kDa en larvas de *M. sexta* (McNall y Adang, 2003). La interacción específica entre Cry1Ac y ALP bajo condiciones nativas resulta en la inhibición de la actividad de fosfatasa alcalina en *M. sexta* (Sangadala *et al.*, 1994) y *H. virescens* (English y Readdy, 1989), sin embargo, no se ha demostrado que la disminución de actividad de ALP este involucrada con la intoxicación por las toxinas Cry. Por otro lado, el análisis comparativo de larvas de *H. virescens* (YHD2) resistentes a la toxina Cry1Ac y larvas susceptibles, ha demostrado que la resistencia correlaciona con la ausencia de la proteína ALP, lo que sugiere que esta proteína puede tener un papel funcional en la toxicidad de las proteínas Cry (Jurat-Fuentes y Adang, 2004). Por otro lado, también en dípteros fue reportada una proteína de 65 kDa con actividad de fosfatasa alcalina como receptor funcional de la toxina Cry11A en el intestino de *Aedes aegypti* (Fernández *et al.*, 2006).

Antecedentes particulares

El desarrollo de resistencia de insectos a las toxinas Cry, es la mayor preocupación para el uso de Bt en el control biológico de plagas. Los receptores son las moléculas determinantes de la efectividad de estas toxinas y se han

realizado estudios exhaustivos en la identificación y caracterización de los mismos. Algunos mecanismos de resistencia en poblaciones de insectos se han caracterizado y el mecanismo seleccionado con mayor frecuencia afecta la interacción de la toxina con el receptor (Ferré y Van Rie, 2002; Griffiths y Aroian *et al.*, 2005). Por lo tanto, la identificación de epítopes involucrados en la interacción toxina-receptor nos provee las bases moleculares de la especificidad de insectos y permite hacer un estudio más profundo sobre la resistencia de los mismos en la naturaleza, lo cual, permitirá hacer un uso racional de las toxinas. Algunos epítopes de unión ya han sido mapeados para algunas toxinas. Los dominios II y III son las regiones más variables entre las toxinas Cry y se han sometido a estudios por mutagénesis para conocer su papel en el reconocimiento al receptor (Rajamhojan *et al.*, 1996; Jenkis *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; 2001). Sin embargo, estos estudios únicamente dan referencia a regiones de la toxina que pueden interaccionar con los receptores y no dan información sobre los epítopes dentro del receptor que son reconocidos por la toxina, por lo que se necesitan otras técnicas que permitan tener ambos epítopes de interacción.

En un intento por mapear estas regiones en nuestro grupo se aisló un anticuerpo scFv (scFv73) mediante la tecnología de despliegue en fagos, capaz de inhibir la interacción de la toxina Cry1Ab con el receptor Bt-R₁ y además tiene la particularidad de inhibir el efecto tóxico de la toxina en larvas de *M. sexta* (Gómez *et al.*, 2001). El análisis de las secuencias de aminoácidos y las regiones determinantes de complementariedad (CDR's) permitió mapear una región de 8 aminoácidos en Bt-R₁ (⁸⁶⁹HITDTNNK⁸⁷⁶) que interacciona directamente con el asa 2 del dominio II de la toxina Cry1Ab (Gómez *et al.*, 2002a). Por otro lado, mediante la expresión de péptidos truncados de Bt-R₁ y su capacidad de unir a las toxinas Cry1A, se logró identificar una región de 69 aminoácidos como sitio de unión de estas toxinas (Dorsch *et al.*, 2002). La caracterización de esta región mediante experimentos de competencia utilizando péptidos sintéticos de las asas 2 y α8 demostró que el asa α8 interacciona directamente con una región de 12 aminoácidos (¹³³¹IPLPASILTVTV¹³⁴²) en el receptor Bt-R₁ (Gómez *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha reportado en la caderina de *H. virescens* un región de 40 aminoácidos que interaccionan directamente con el asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ac, mutaciones puntuales en los residuos Leu¹⁴²⁵ y Phe¹⁴²⁹ en esta región abaten completamente la unión de la toxina (Xie *et al.*, 2005).

La mayoría de los epítopes mencionados con anterioridad involucran regiones del dominio II y al receptor caderina, sin embargo, se conoce poco sobre la interacción de otras regiones de la toxina con los receptores. En el caso particular de la toxina Cry1Ac se ha demostrado que el dominio III de esta toxina reconoce el azúcar N-acetilgalactosamina en el receptor APN en *M. sexta* y *H. virescens* (Garczyński *et al.*, 1991; Luo *et al.*, 1997). Estudios de cristalografía de rayos X de la toxina Cry1Aa han demostrado que la cavidad de reconocimiento al azúcar que se encuentra en Cry1Ac, no se encuentra en las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa. Por otro lado, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre las toxinas Cry1A, han mostrado que los aminoácidos responsables del reconocimiento al azúcar solo se encuentran en la toxina Cry1Ac, pero no en la toxina Cry1Aa y Cry1Ab. Aunado a esto, la unión de la toxina Cry1Aa y Cry1Ab a APN de *M. sexta* y *H. virescens* no es inhibida por la preincubación con N-acetilgalactosamina como ocurre con la toxina Cry1Ac (Lou *et al.*, 1997; Masson *et al.*, 1995). Estos resultados demuestran que el azúcar N-acetilgalactosamina no es esencial para la interacción de estas toxinas con el receptor APN, lo que sugiere que las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab tienen sitios alternativos para unirse a este receptor.

Mediante el análisis de la unión de la toxina Cry1Aa con diferentes fragmentos de aminopeptidasa de *B. mori* se demostró que la región que comprende los aminoácidos ¹³⁵I-P¹⁹⁸ de la aminopeptidasa es necesaria para la unión de la toxina Cry1Aa (Yaoi *et al.*, 1999). Recientemente, fueron reportadas dos regiones en el dominio III de la toxina Cry1Aa (⁵⁰⁸STLRVN⁵¹³ y ⁵⁸²VFTLSAHV⁵⁸⁹) como responsables de la unión de esta toxina con la región reportada anteriormente (¹³⁵I-P¹⁹⁸) en la aminopeptidasa de *B. mori*, sin embargo, no se demostró que estas regiones estén involucrados en la toxicidad (Atsumi *et*

al.,2005). Nosotros proponemos analizar la interacción del dominio III de Cry1Ab con los receptores de *M. sexta*.

Estudios de interacción proteína-proteína mediante la técnica de despliegue en fago han dado resultados prometedores en diferentes investigaciones. En el caso particular de las toxinas Cry, se han realizado estudios de interacción toxina-receptor dando como resultado la identificación de regiones importantes tanto en la toxina como en el receptor, por lo que es una herramienta muy importante para este tipo de estudios.

En nuestro grupo estamos interesados en identificar anticuerpos que reconozcan específicamente al dominio III de la toxina Cry1Ab y estudiar su papel funcional en la unión de este dominio con los receptores de *M. sexta*. En un trabajo previo, en nuestro laboratorio construimos repertorios de anticuerpos scFv a partir de un conejo inmunizado con la toxina Cry1Ab, con la intención de obtener una variedad de anticuerpos que reconozcan a la toxina y que nos permitan estudiar la interacción toxina-receptor. De estos experimentos, se lograron obtener dos repertorios inmunes a partir de la médula de ósea y del bazo del conejo (Arenas, 2003). En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio utilizando como herramienta la biblioteca de médula ósea, fueron seleccionados cinco anticuerpos scFv (L3-1, L3-2, L3-3, L3-6 y L3-9) que tienen la particularidad de reconocer específicamente el asa 3 del dominio II de Cry1Ab. Estos anticuerpos son capaces de inhibir el efecto tóxico de Cry1Ab en bioensayos con larvas de *M. sexta* y su caracterización llevó a la identificación de la región en Bt-R₁ que es reconocida por el asa 3 de Cry1Ab (Benítez, 2003). Estos resultados muestran que es posible aislar anticuerpos que reconozcan específicamente determinadas regiones de la toxina y por lo tanto, son herramientas poderosas para los objetivos de este trabajo.

Hipótesis

- Anticuerpos que reconocen al dominio III de la toxina Cry1Ab afectan la unión al receptor (es) y la toxicidad.

Objetivo general

-Estudiar la interacción de entre el dominio III de la toxina Cry1Ab y sus receptores en *Manduca sexta*.

Objetivos particulares

- Aislar anticuerpos scFv a partir de bibliotecas inmunes que reconozcan específicamente el dominio III de la toxina Cry1Ab.
- Caracterización de anticuerpos capaces de inhibir la interacción de la toxina con sus receptores.

Materiales y métodos

Cepas

Las cepas utilizadas para la realización de este trabajo fueron:

- *Bacillus thuringiensis* 407, que contiene el plásmido pHT315 (resistente a eritromicina) del gene de la proteína Cry1Ab.
- *Bacillus thuringiensis* HD-1, que contiene el gene de la toxina Cry1Aa.
- *Bacillus thuringiensis* HD73, que produce la toxina Cry1Ac.
- *Escherichia coli* TG1, cepa supresora que no presenta resistencia a ningún antibiótico y se utilizó para la expresión de fragmentos de anticuerpos en fagos.
- *Escherichia coli* BL21, cepa de expresión de péptidos del sistema pET (Novagene) presenta resistencia a cloranfenicol (34 µg/ml).

Vectores

- pSyn1: Vector derivado del vector pHEN 2. Presenta un sitio de clonación múltiple seguido por un tag de c-myc y un tag de histinas, contiene un gene que confiere resistencia a ampicilina y otro a kanamicina. Presenta un origen de replicación para *E. coli* y otro para el fago M13.
- pSyn2: Es un vector derivado del vector pHEN 1. Este presenta un sitio de clonación múltiple seguido de un tag de c-myc que permite el reconocimiento por ELISA del fragmento de anticuerpo. A continuación se encuentra un codón de paro ámbar al que sigue la proteína III del fago filamentoso M13. Esta disposición permite que el fragmento de anticuerpo clonado pueda ser expresado como fago-anticuerpo en el fago M13 asociado a la proteína III. Al igual que el pSyn1 posee un gen que le confiere resistencia a ampicilina y un péptido señal que permite el paso de la fusión del citoplasma al periplasma celular. Además presenta un origen de replicación para *E. coli* y otro para el fago M13.
- pET32b: (Novagen), presenta un sitio de clonación múltiple seguido de un tag de histidinas que permite la purificación del anticuerpo mediante cromatografía

de afinidad en una columna de Ni-agarosa, además presenta un origen de replicación para *E. coli* y un cassette de resistencia a ampicilina.

Purificación de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Aa

Las cepas de Bt que expresan las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa fueron cultivadas en cajas con medio de esporulación SP (para 1 litro: 8 g de caldo nutritivo, 0.25 g de MgSO₄, 1 g de KCl, 1 ml de MnCl₂ 10 mM, 2 ml de FeSO₄ en H₂SO₄ 1 N y 1 ml de CaCl₂ 0.5 M ajustado a pH 7) suplementado con eritromicina (10 µg/ml). En el caso de la toxina Cry1Ac no se utilizó el antibiótico. Cada una de las cepas fue sembrada en medio líquido (SP) e incubadas a 29°C por 72 horas con agitación constante (Lereclus *et al.*, 1995). Al completarse la esporulación, los cristales fueron purificados por centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (Thomas y Ellar, 1983).

Purificación de cristales por gradiente de sacarosa

El cultivo celular obtenido fue recuperado por centrifugación (10,000 rpm, 10 minutos) y la biomasa resultante resuspendida en 30 ml de solución de NaCl 500 mM y EDTA 10 mM pH 8; el proceso se repitió cinco veces más tratando de eliminar lo mejor posible las esporas. La pastilla obtenida fue resuspendida en H₂O y PMSF a una concentración final 1 mM, nuevamente fue centrifugada (10,000 rpm, 10 minutos) y el lavado fue repetido dos veces más. La pastilla recuperada fue resuspendida en 5 ml de solución amortiguadora TTN (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, pH 7.2) y sonicada dando tres pulsos de 50 segundos a 20 watts x 1 minuto de descanso.

Para el gradiente discontinuo de sacarosa, previamente fueron preparadas diferentes densidades de sacarosa (67, 72, 79 y 89%) complementada con NaCl 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8 y tritón al 0.01%. De cada una de las densidades fueron dispuestos 6 ml en tubos para ultracentrífuga (Beckman) colocando las

densidades de mayor a menor. Por último, fueron colocados 5 ml de la mezcla espora-cristal sonicada previamente, en cada uno de los gradientes.

Los gradientes fueron centrifugados por 20 minutos a 23,000 rpm a 15°C y las fracciones obtenidas fueron recuperadas por separado y lavadas 3 veces con agua y Tritón X-100 al 0.01% (centrifugando por 10 minutos a 10,000 rpm en cada lavado).

La pastilla obtenida en cada una de las fracciones fue resuspendida en una solución amortiguadora de Tris-HCl 1 M, pH 8 y la presencia de los cristales en las fracciones obtenidas se determinó mediante observación al microscopio óptico. Finalmente las fracciones que contenían los cristales fueron almacenadas en alícuotas de 500 µl agregando fenilmetilsulfonyl fluoruro (PMSF) a una concentración final de 1 mM. Las alícuotas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso posterior (Thomas y Ellar, 1983).

Solubilización de cristales

Se tomó una de las alícuotas de cristales purificados por centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa y fue centrifugada (14,000 rpm, 10 minutos). Posteriormente, los cristales fueron resuspendidos en 500 µl de solución amortiguadora de carbonatos (Na_2CO_3 0.1 M, NaHCO_3 0.1 M, pH 10.5 y 2-mercaptoetanol al 0.02%) y fueron incubados a 37°C por 2 horas con agitación suave. Pasado el tiempo de incubación, la muestra fue centrifugada por 10 minutos a 10,000 rpm. El sobrenadante que contiene la protoxina se recuperó y fue determinada la concentración.

Determinación de concentración de proteínas por el método de Bradford

La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Para ello fue colocada una muestra de la solución a determinar la concentración de proteína y fue llevada a

un volumen final de 800 μ l con H₂O, después fueron adicionados 200 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad). La curva de referencia fue realizada con albúmina sérica bovina (BSA).

Activación con tripsina

De la protoxina obtenida fueron tomados 100 μ g y se le agregaron 250 μ l de Tris-HCl 1M, pH 8, para bajar el pH de la solución aproximadamente a 8.5; posteriormente, fue agregada tripsina a un proporción 1:50 (concentración proteína-proteína) e incubada a 37°C por 2 horas con agitación suave. Pasado el tiempo de incubación, la digestión fue detenida agregando PMSF a una concentración final de 1 mM. Las muestras fueron centrifugadas (14,000 rpm por 10 minutos) y la toxina contenida en el sobrenadante se recuperó. La concentración de la toxina fue determinada por el método de Bradford y el proceso de activación se verificó en un gel de acrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) al 10%.

Crecimiento de las bibliotecas

De cada una de las bibliotecas (bazo y médula ósea) recuperadas en *E. coli*, fueron tomados 50 μ l y transferidos a 50 ml de medio 2xTY (para 1 L: 10 g de Extracto de levadura, 5 g de NaCl y 16 g de triptona) suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) y glucosa al 1%, los cultivos fueron incubados a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica requerida se tomaron 10 ml de cada cultivo y fueron infectados con el fago ayudador (VCS-M13) en una multiplicidad de infección de 1:20 (bacterias:partículas de fago). La infección se realizó a 37°C sin agitación por 30 minutos. Pasado el tiempo de infección los cultivos fueron recuperados por centrifugación (5,000 rpm, 10 minutos) y el paquete celular de cada uno fue

resuspendido en 30 ml de medio 2xTY (ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml), y la resuspensión fue vertida dentro de un matraz con 270 ml del mismo medio y por último se incubó a 30°C durante 12 horas (Nissim *et al.*, 1994).

Rescate de las bibliotecas en fagos M13

Los cultivos del día anterior fueron recuperados por centrifugación (8,700 rpm, 10 minutos), el paquete celular se desecha y el sobrenadante de cada cultivo fue recuperado. A cada uno de los sobrenadantes se les agregó 1/5 (v/v) de PEG/NaCl (20% de polietilenglicol 8000, 2.5 M de NaCl), fueron mezclados muy bien y posteriormente incubados por 1 hora a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, la mezcla fue centrifugada a 8,800 rpm por 30 minutos y la pastilla obtenida resuspendida en 40 ml de agua, después fueron agregados 8 ml de PEG/NaCl y nuevamente fueron mezclados e incubados a 4°C por 20 minutos. Por último, para recuperar los fagos y eliminar el exceso de PEG/NaCl, la mezcla fue centrifugada a 5,000 rpm, por 10 minutos y la pastilla obtenida resuspendida en 2 ml de PBS. Una vez que los fagos fueron resuspendidos fueron filtrados con una membrana de 0.45 µm y mediante diluciones seriadas fue calculado el título de fagos recuperados (Nissim *et al.*, 1994)

Selección en inmunotubos

La toxina Cry1Ab o Cry1Ac activada con tripsina fue inmovilizada en inmunotubos (NUNC, Wiesbaden, Germany) en una solución de bicarbonato 50 mM, pH 9.6 incubando por 12 horas a 4°C. Al día siguiente, el inmunotubo fue lavado 3 veces con PBS y bloqueado con PBS + leche descremada al 2% (MPBS) por 2 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, el tubo se lavó 3 veces con PBS y después fueron agregados 10^{10} a 10^{11} fagos en 4 ml de MPBS e incubados a temperatura ambiente con rotación continua por 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación el inmunotubo fue dejado en reposo durante 90 minutos. Para remover

aquellos fagos que no reconocen a la toxina del inmunotubo se lavó 20 veces con PBS + Tween 20 0.1% (PBS-t) y después 20 veces con PBS para remover el detergente. Los fagos que presentaron afinidad por la toxina, fueron eluidos mediante un lavado con 1 ml de trietilamina (SIGMA) (700 μ l de trietilamina 7.18 M en 50 ml de H₂O) por 10 minutos. La reacción fue neutralizada inmediatamente con 500 μ l de Tris-HCl 1M, pH 7.4 y los fagos eluidos fueron colectados en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Los fagos que reconocieron a la toxina, fueron amplificados infectando 5 ml de un cultivo de la cepa TG1 de *E. coli* (con una densidad óptica de 0.5 a 600 nm) incubando a 37°C por 30 minutos. Una vez terminada la infección fueron tomados 10 μ l de células infectadas para realizar diluciones seriadas que fueron plateadas en medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina y glucosa al 1% e incubadas a 30°C por 12 horas. Al día siguiente las colonias resistentes a ampicilina fueron contadas y fue determinado el título de fagos eluidos.

El resto de las células infectadas fue recuperada por centrifugación (5,000 rpm, 10 minutos) y el paquete celular fue resuspendido en 1 ml de medio 2xTY (líquido) para ser plateado en cajas petri (de 245mm x 245mm CORNING*) con medio sólido 2xTY con 100 μ g/ml de ampicilina y glucosa al 1% e incubado a 30°C por 12 horas. Al día siguiente, las colonias fueron colectadas en tubos eppendorf con medio 2xTY y glicerol al 15 % para su conservación a -70°C (Nissim *et al.*, 1994).

Selección negativa en presencia de la toxina Cry1Ac

Para esta selección se siguió el protocolo mencionado anteriormente, inmovilizando 50 μ g/ml de toxina Cry1Ab en cada inmunotubo para cada uno de los repertorios. A diferencia del protocolo anterior, los fagos de cada repertorio fueron previamente incubados con 25 μ g/ml de toxina Cry1Ac por 1 hora a temperatura ambiente antes de ponerse en contacto con la toxina Cry1Ab en el

inmunotubo. Posteriormente se recuperan los fagos de cada repertorio que reconocen a la toxina Cry1Ab para su posterior caracterización.

Rescate de fagos individuales

Para el rescate de fagos individuales 5 ml de medio 2xTY (100 µg/ml de ampicilina y glucosa 2%) fueron inoculados con cada una de las clonas seleccionadas de la cuarta ronda de selección e incubadas a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Después el cultivo fue infectado con 2×10^9 UFP/ml del fago ayudador (VCS M13) e incubado a 37°C con agitación moderada (200 rpm) por 1 hora. Pasado el tiempo de incubación fueron tomados 5 ml y transferidos a un matraz con 50 ml de medio 2xTY con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) sin glucosa. El cultivo fue incubado a 30°C por 12 horas y al día siguiente los fagos fueron precipitados con 1/5 de volumen de PEG/NaCl como se indica en el protocolo de "Rescate de la biblioteca en fagos M13" referido anteriormente (Nissim *et al.*, 1994).

Ensayo de ELISA monoclonal

Las toxinas fueron unidas a cajas de 96 pozos (Costar) 5 µg de toxina/pozo en una solución amortiguadora de Na₂CO₃ 50 mM, pH 9.6 incubando a 4°C por 12 horas. Posteriormente, la placa se lavó 3 veces con PBS y fue bloqueada con 100 µl de PBS + leche descremada 2% (MPBS) incubado por 2 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación la placa se lavó 3 veces con PBS para eliminar el exceso de MPBS y los fagos obtenidos de cada una de las selecciones fueron incubados por 90 minutos a 37°C. Posteriormente, la placa fue lavada 3 veces con PBS+Tween 0.01% (PBS-T2) para eliminar el exceso de fagos, y 3 veces con PBS para quitar el exceso de detergente. Una vez que fue lavada la placa, fueron agregados 100 µl/pozo del anticuerpo primario anti-M13 (amersham farmacia biotech) a una dilución de 1:1000 en MPBS por cada pozo y se incubó por 90 minutos a 37°C.

Nuevamente, la placa fue lavada 3 veces con PBS-T2 y 3 veces con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Para la detección del anticuerpo primario fueron agregados 100 μ l/pozo de anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (dilución de 1:1000) y se incubó durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente, la placa fue lavada 3 veces con PBS-T2 y 3 veces con PBS. Por último, para revelar el ensayo, fueron agregados 100 μ l/pozo de una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, pH 5 con o-Phenylene-diamine (1,2-benzenediamine) 0.44 mg/ml y la reacción fue incubada por 20 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 μ l de ácido sulfúrico 2 N y la absorbancia fue leída a una longitud de onda de 495 nm.

Producción de fragmentos de anticuerpos scFv

Cada uno de los anticuerpos seleccionados fueron subclonado al vector de expresión pET32b y para cada una de las clonas se preparó un precultivo en medio 2xTY con ampicilina (50 μ g/ml) y glucosa al 2%. Al día siguiente fue tomado 1 ml del cultivo y fue transferido a un matraz con 100 ml de medio 2xTY con ampicilina y glucosa al 0.1% e incubado a 37°C (con agitación) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica necesaria, se indujo la expresión de los anticuerpos con IPTG (isopropil-b-D-tiogalactopiranosico) a una concentración final de 1 mM durante los tiempos necesarios para cada clona de manera particular. Posteriormente, el cultivo fue recuperado por centrifugación (15,000 rpm, 15 minutos) y el paquete celular fue resuspendido en 3 ml de solución amortiguadora PPB (200 mg/ml de sacarosa, 1 mM de EDTA y 30 mM de Tris-HCl, pH 8) y fue incubado por 20 minutos en hielo y las muestras fueron centrifugadas a 15,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue colectado y el paquete celular fue resuspendido en 3 ml de MgSO₄ 5 mM, se dejó incubar 20 minutos en hielo y fue centrifugado nuevamente (15,000 rpm por 15 minutos) y el sobrenadante fue colectado. Cada uno de los sobrenadantes recuperado en cada paso fue sometido a diálisis con PBS durante 12 horas a 4°C.

Purificación de anticuerpos scFv por cromatografía de afinidad

Una columna empacada con Niquel-agarosa (Qiagene) fue equilibrada con 5 ml de una solución de PBS con imidazol 25 mM, posteriormente se tomaron las muestras dializadas fueron pasadas por la columna, después se lavó con 10 ml de PBS e imidazol 30 mM para eliminar todas las impurezas. Para eluir los anticuerpos unidos a la columna se utilizaron 2 ml de una solución de imidazol 250 mM en PBS. Por último, la columna fue regenerada con imidazol 500 mM en PBS, de tal manera que queda lista para una siguiente muestra.

Inmunoblot

Una vez que se obtuvieron los anticuerpos solubles, fueron tomados 20 μ l de cada una de las muestras y separadas en un gel de acrilamida al 15%. Después las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (ECL-Amershan) por 30 minutos a 350 mA en una cámara de transferencia semi-seca. Terminada la transferencia, se procedió a bloquear la membrana con leche descremada al 5% en PBS-Tween (PBS + Tween al 0.05%) por 2 horas, después la membrana fue sometida a cinco lavados con PBS-Tween e incubada por 1 hora con un anticuerpo acoplado a peroxidasa (anti-his tag) a una dilución de 1:5000 en PBS-Tween al 0.05%. El exceso de anticuerpo fue desechado mediante 5 lavados con PBS-Tween al 0.05%. Por último, la membrana fue incubada con el sustrato del módulo Super Signal Chemiluminiscent Substrate (Pierce) y la señal emitida fue detectada en películas para quimioluminiscencia.

Experimentos de unión a ligando

Las proteínas de 100 μ g de VMMA's de *M. sexta* fueron separadas en un gel de acrilamida al 9% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (ECL-Amershan). La membrana fue lavada con PBS-Tween 20 0.1% y bloqueada por

una hora con BSA 0.2% en PBS-Tween 0.1%. La membrana nuevamente fue lavada con PBS-Tween 20 0.1% y fue incubada durante dos horas con toxina Cry1Ab marcada con biotina (10 nM) en una solución con BSA 0.1% y PBS-Tween 20 0.1%. La toxina fue preincubada (en los casos que así se indique) con excesos de fago-anticuerpo (1×10^{10} y 1×10^{12}), terminando el tiempo de incubación la membrana se lavó con PBS-Tween 20 0.1% y se incubó durante una hora con estreptavidina acoplada a peroxidasa. Por último, se lavó nuevamente con PBS-Tween 20 0.1% y dos veces con PBS antes de detectar la unión con los reactivo de quimioluminiscencia (Pierce).

Bioensayos

Para la realización de los bioensayos se utilizó la técnica de contaminación de superficie con larvas de *M. sexta* de primer estadio de crecimiento. En placas de 24 pozos se pone la dieta hasta llenar la mitad del pozo que tiene una capacidad para 4 ml de dieta. Una vez que se secan, se agrega la dosis de toxina que se desea probar en un volumen final de 35 μ l con H₂O, se dejan secar por algunos minutos en la campana de extracción hasta que las cajas quedan completamente secas y se coloca una larva en cada pozo. Después de 5 días se cuentan las larvas muertas y se calcula el porcentaje de mortalidad con respecto al control que consiste solamente de agua con las que se prepararon las diluciones de la toxina.

Análisis de clonas individuales por patrón de restricción (fingerprinting)

El DNA de cada una de las clonas fue purificado con el estuche de Wizard (Promega). Este DNA fue utilizado como templado para que los genes de anticuerpos fueran amplificados mediante PCR utilizando los oligos HH1-4 y HH10 específicos para anticuerpos de conejo que amplifican los genes de los anticuerpos clonados (Hawlich *et al.*, 2000). Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 94°C durante un 1 minuto 30 segundos, 60°C por 2 minutos, 72°C por dos

minutos y se corrieron 30 ciclos. Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *A/* I (Biolabs) que tiene la característica de hacer cortes múltiples dentro de una secuencia de DNA. La reacción de restricción se realizó a 50°C por 2 horas a 37°C sin agitación, pasado el tiempo de incubación la enzima fue inactivada a 65°C por 20 minutos. Los patrones de restricción de las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 2%.

Secuencias de oligos

El oligo HH1-4 es una mezcla de cuatro diferentes oligos:

HH1 5' CAG TCG STG RAG GAG TCC GRG GG 3'

HH2 5' CAT TCG TTG GAG GAG TCC GGG GG 3'

HH3 5' CAG CAG CTG GAG CAS TCC GGA GG 3'

HH4 5' CAG GAG CAG CTG AAG GAG TCC GGG GG 3'

La secuencia del oligo HH10 es la siguiente:

HH10 5' TTT GAC GAC CAC CTC GGT CCC TCC GCC G 3'

Degeneraciones de oligos: S=G/C; R=G/A; K=G/T; M=A/C

Activación de la toxina Cry1Ab en presencia de los anticuerpos scFv

Los cristales de la toxina Cry1Ab fueron cuantificados al igual que los fragmentos de anticuerpos de cada una de las clonas. La relación en concentración para la activación fue de 1:1 para las clonas seleccionadas y 1:4 para el anticuerpo scFv73 que se ha demostrado promueve la oligomerización (concentración toxina/anticuerpo). Las mezclas antígeno/anticuerpo fueron colocadas en un tubo eppendorf de 1.5 ml en 100 µl de buffer carbonatos pH 10.5 (para su solubilización) y jugo gástrico de *M. sexta* al 5%. La reacción se incubó por 1 hora a 37°C con agitación suave y una vez terminado el proceso, las proteasas fueron inactivadas agregando PMSF a una concentración final de 1mM. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas 20 minutos a 14,000 rpm a 4°C y se recupero el el sobrenadante. Cada una de las muestra se verificó por inmunoblot.

Purificación de oligómero

Después de la activación de la toxina Cry1Ab en presencia del anticuerpo scFv 73 se verificó la presencia de oligómero por inmunoblot. Posteriormente, el oligómero fue purificado con una columna Superdex HR 10/30 (Amersham Pharmacia Bitech, Sweden) por FPLC de exclusión molecular.

ELISA monoclonal con oligómero purificado

En ensayo fue realizado de la misma manera que se mencionó anteriormente (Ensayo de ELISA monoclonal) a diferencia de que se tomó el oligómero y el monómero purificado (5 nM de cada uno); el título de los fago-anticuerpos ocupado fue de 1×10^{12} unidades formadores de colonias (UFC).

Resultados

Purificación de cristales y activación de las toxinas

A lo largo de este trabajo, se utilizaron las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac purificadas y activadas con tripsina. Cada una de las cepas productoras de estas toxinas fue sembrada por separado en medio líquido SP e incubadas a 29°C hasta esporular completamente. Los cristales fueron purificados por centrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa y fueron solubilizados para liberar las protoxina, que posteriormente fueron activadas mediante proteólisis con tripsina comercial. El resultado de cada uno de los procesamientos fue verificado mediante la separación en un gel de acrilamida (figura 7).

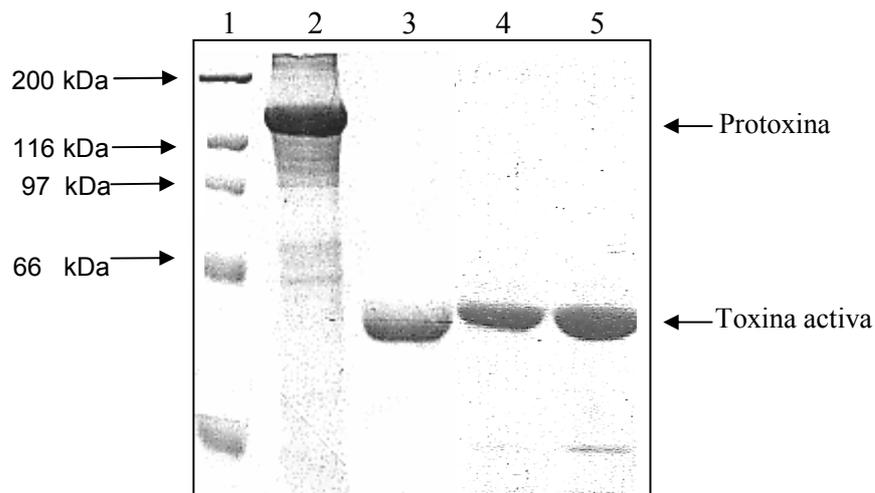


Figura 7. Gel de acrilamida que muestra el procesamiento de las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Aa. Las proteínas son solubilizadas con solución amortiguadora alcalina pH 10.5 y posteriormente las proteínas solubles fue digerida con tripsina comercial. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: solubilización de Cry1Ab; Carril 3-5: Activación de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Aa respectivamente.

Como se muestra en la figura 7 los cristales fueron solubilizados dando como resultado una protoxina de aproximadamente 130 kDa (carril 2). La solubilización de los cristales de las toxinas Cry1Ac y Cry1Aa mostró el mismo patrón que la toxina Cry1Ab (datos no mostrados). La activación de las protoxinas con tripsina dio como resultado un fragmento de aproximadamente 65 kDa que es resistente al procesamiento proteolítico (carriles 3-5). Una vez que las toxinas fueron procesadas, fueron almacenadas a 4°C para evitar su degradación y para ser utilizadas en los estudios posteriores de este trabajo.

Selección de anticuerpos que reconozcan a la toxina Cry1Ab

En un primer intento para aislar anticuerpos que reconozcan específicamente el dominio III de la toxina Cry1Ab, nosotros utilizamos únicamente la biblioteca obtenida del bazo del conejo inmunizado con la toxina Cry1Ab (Arenas, 2003). Con este repertorio fueron realizadas 4 rondas de selección tomando como antígeno a la toxina Cry1Ab inmovilizada en inmunotubos. Los fagos-anticuerpos que no fueron capaces de reconocer a la toxina fueron eliminados mediante lavados y aquellos que unieron a la toxina fueron recuperados mediante un tratamiento alcalino con trietilamida. En la primera y segunda ronda de selección fueron ocupados 50 µg/ml de toxina Cry1Ab activada con tripsina y las posteriores rondas de selección fueron realizadas con 25 µg/ml con la finalidad de obtener fagos que expresen anticuerpos con mayor afinidad hacia la toxina. Los fagos eluidos en cada una de las rondas de selección fueron utilizados para infectar *E. coli* y determinar los títulos de fago-anticuerpos obtenidos (Tabla 1).

Tabla 1. Títulos de fago-anticuerpos obtenidos después de 4 rondas de selección.

Ronda de selección	Concentración de toxina Cry1Ab	Título de fago de entrada (UFC ^a)	Título de fago de salida (UFC ^a)
Primera	50 µg/ml	1x10 ¹⁰	1x10 ⁵
Segunda	50 µg/ml	1x10 ¹¹	2x10 ⁷
Tercera	25 µg/ml	1x10 ¹¹	4x10 ⁷
Cuarta	25 µg/ml	1x10 ¹¹	2x10 ⁶

^a Unidades formadoras de colonias.

Los títulos obtenidos después de cada ronda de selección fueron buenos tomando en consideración que los títulos de entrada fueron de 1x10¹⁰-1x10¹¹ UFC.

Después de las cuatro rondas de selección, aislamos 30 colonias al azar de las rondas 3 y 4. En trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio con este tipo de bibliotecas han mostrado que después de varias rondas de selección, algunas clonas tienden a sufrir deleciones de los genes correspondientes a los anticuerpos que originalmente estaban clonados (datos no publicados). Por esa razón, nosotros verificamos la presencia de genes de anticuerpos en cada una de las clonas seleccionadas. Para ello, purificamos el plásmido de cada una de las clonas y este se utilizó como templado para realizar un PCR utilizando oligos específicos que amplifican las regiones los anticuerpos de conejo que se encuentran clonados en el vector como se refiere en materiales y métodos. El porcentaje de clonas que presentan genes de anticuerpos clonados en cada una de las rondas de selección se muestran en la figura 8.

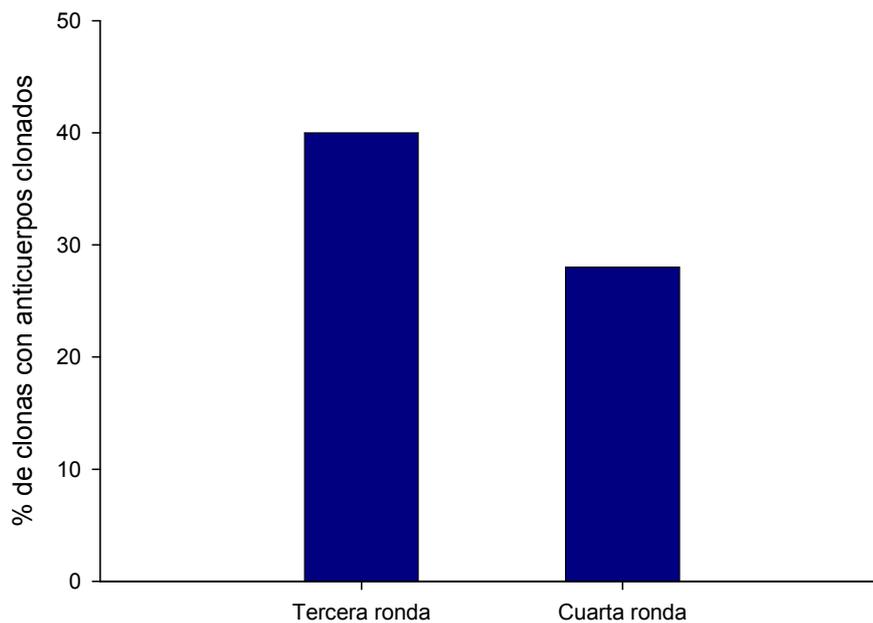


Figura 8. Porcentaje de clonas en base a 30 clonas seleccionadas en cada onda de selección que dieron el producto esperado en la reacción de PCR utilizando oligos específicos para anticuerpos de conejo.

Los resultados obtenidos del análisis sugieren que en el proceso de selección fueron seleccionadas dos poblaciones de fagos, por un lado, una población de fagos que no contiene los genes de anticuerpos y otra que si los contiene. En el caso de la tercera ronda únicamente un 40% de las clonas presentaron genes de anticuerpos clonados, mientras que en la cuarta ronda únicamente se observó un 28% de clonas positivas. En un trabajo anterior sobre la caracterización de esta biblioteca se encontró que las clonas de la biblioteca original antes de las rondas de selección, presentaban insertos de genes clonados en su totalidad (Arenas, 2003). Estos resultados muestran que en algunas clonas los genes fueron deletados, sin embargo, se obtuvieron algunas que conservan los genes de anticuerpos clonados.

De las clonas que dieron positivo en el análisis anterior fueron tomadas al azar 5 clonas de la tercera ronda (numeradas del 1 al 5) y cinco de la ronda 4 (numeradas del 6 al 10) para su posterior caracterización.

Determinación de la especificidad de los anticuerpos

Para determinar si alguno de los anticuerpos seleccionados tienen la capacidad de reconocer exclusivamente al dominio III de la toxina Cry1Ab, analizamos la interacción de estos utilizando como antígenos a las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Aa mediante ELISA. Estas tres toxinas presentan alta identidad en la secuencia de aminoácidos de algunos de sus dominios (Figura 9-A). El dominio I de las tres toxinas presenta la misma secuencia, con excepción de seis aminoácidos distintos entre las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab, tres diferentes entre las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac y tres aminoácidos diferentes entre las toxinas Cry1Ac y Cry1Ab. En contraste, la secuencia del dominio II de la toxina Cry1Aa tan sólo exhibe un 45% de identidad con la secuencia del dominio II de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac y el dominio II de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac es idéntico con excepción de sólo dos aminoácidos. El dominio III de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab son idénticos y solo exhiben un 38% de identidad con el dominio el dominio III de la toxina Cry1Ac. Las características de homología que presentan estas toxinas nos permite la identificación de anticuerpos que reconozcan específicamente al dominio III de la toxina Cry1Ab, pues los anticuerpos de nuestro interés deberán reconocer preferentemente a las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab, pero no a la toxina Cry1Ac. Los resultados del ELISA con los anticuerpos seleccionados se muestran en la figura 9.

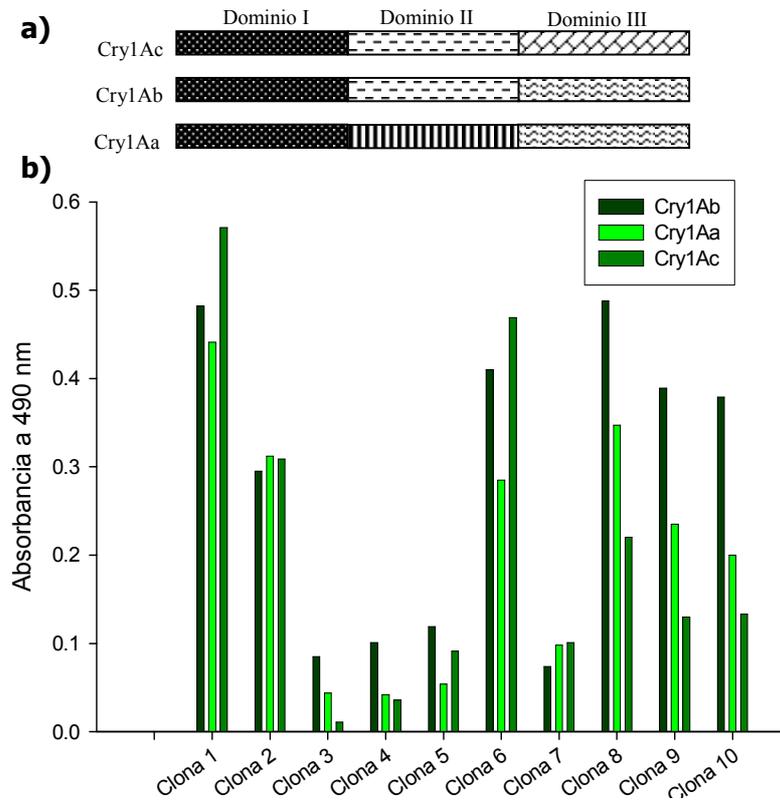


Figura 9. A) Representación esquemática de la similitud entre las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac. B) Experimento de ELISA en donde se inmovilizaron 5μ por pozo de cada toxina y se verificó el reconocimiento a estas toxinas con 1×10^9 UFC por cada uno de los fago-anticuerpos.

Este experimento mostró que los fago-anticuerpos seleccionados en las diferentes rondas de selección tienen la capacidad de reconocer a las tres toxinas y ninguno de ellos tiene la capacidad de reconocer únicamente a las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa como nosotros esperaríamos, lo que sugiere que probablemente ninguno de estos anticuerpos es específico para el dominio III de la toxina Cry1Ab. Estos fago-anticuerpos probablemente reconocen al dominio I de las tres toxinas, que es la región donde se encuentra una alta identidad en la secuencia de aminoácidos.

Ensayo de toxicidad en presencia de fago-anticuerpo

A pesar de que no se lograron obtener anticuerpos que reconocieran específicamente al dominio III de la toxina Cry1Ab, decidimos verificar si alguno de estos anticuerpos tenía la capacidad de neutralizar el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab en larvas de *M. sexta*. Para este experimento se realizó un bioensayo con larvas de *M. sexta*. La toxina Cry1Ab ocupada en este experimento fue preincubada en presencia o ausencia de cada uno de los fago-anticuerpos por una hora y posteriormente, larvas de *M. sexta* en placas de 24 pozos (una larva por pozo) fueron alimentadas con esta solución. Después de 7 días fueron cuantificadas las larvas sobrevivientes y se calculó el porcentaje de mortalidad. Los resultados se muestran en la figura 10.

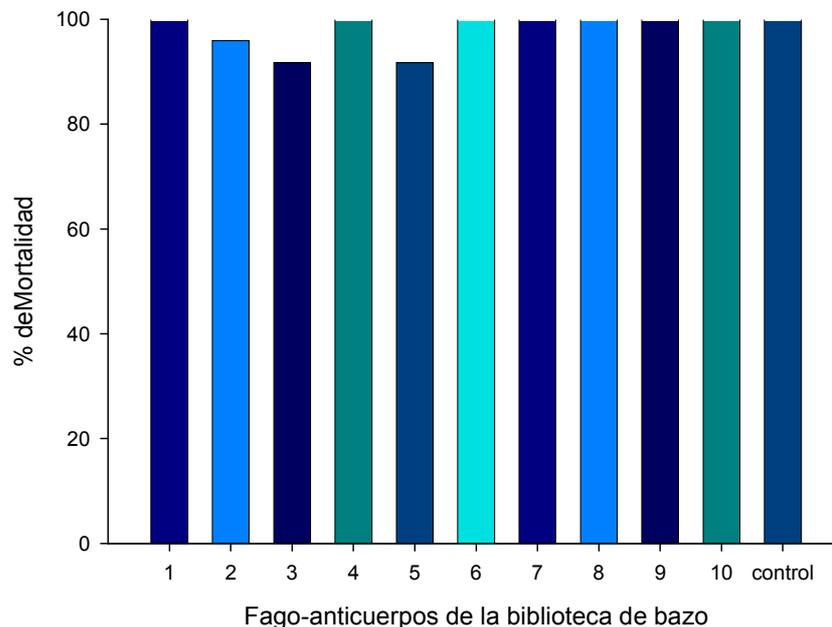


Figura 10. Bioensayo con larvas de *M. sexta*. Las larvas fueron alimentadas con 10 ng/cm² de toxina Cry1Ab y se utilizó 1x10⁹ UFC de fago-anticuerpos de cada una de las clonas. El experimento control fue la toxina Cry1Ab sin competidor.

Como se muestra en la figura 10, ninguno de los fago-anticuerpos seleccionados tiene la capacidad de inhibir la acción tóxica de la toxina Cry1Ab en larvas de *M. sexta*. Estos resultados nos llevaron a plantear una nueva estrategia para aislar los anticuerpos de nuestro interés, es decir, anticuerpos capaces de reconocer al dominio III de la toxina Cry1Ab.

Selección de anticuerpos en presencia de la toxina Cry1Ac como competidor

Para aislar los anticuerpos de nuestro interés, fue planteada la idea de trabajar tanto con la biblioteca de médula ósea, como con la biblioteca de bazo, pues existe la posibilidad de que algunos anticuerpos pudiesen estar representados en uno de los dos repertorios, por lo tanto, la posibilidad de aislar los anticuerpos de nuestro interés se podría incrementar.

En los experimentos anteriores la selección fue realizada utilizando como antígeno exclusivamente a la toxina Cry1Ab, sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos. La identidad entre la toxina Cry1Ab y Cry1Ac en el dominio III es del 38% y esta característica puede permitirnos realizar una selección más restringida, utilizando estas dos toxinas como antígenos. En primer lugar, los fago-anticuerpos de cada uno de los repertorios fueron amplificados después de dos rondas de selección con la toxina Cry1Ab y fueron sometidos a una tercera ronda de selección utilizando como antígeno a la toxina Cry1Ac. A diferencia de las rondas de selección anteriores, en esta ocasión fueron recuperados los fago-anticuerpos que no reconocieron a la toxina pegada en el inmunotubo (tabla 2).

Tabla 3. Títulos obtenidos de la selección con la toxina Cry1Ac.

Repertorio	Concentración de toxina Cry1Ac	Título de entrada (UFC ^a /ml)	Título de salida (UFC ^a /ml)
Bazo	50 µg/ml	1x10 ¹⁰	2x10 ⁶
Médula ósea	50 µg/ml	1x10 ¹⁰	2x10 ⁵

UFC: Unidades formadores de colonias

Después de la ronda de selección con la toxina Cry1Ac, cada uno de los repertorios fue amplificado, titulado y sometido a una nueva ronda de selección. En esta última ronda, se realizó una selección por competencia en donde los repertorios de fago-anticuerpos fueron preincubados por una hora con toxina Cry1Ac en solución (25 µg/ml) y posteriormente, fueron agregados a un inmunotubo con toxina Cry1Ab inmovilizada, los fagos que unieron a la toxina Cry1Ac y no a la toxina Cry1Ab fueron desechados mediante lavados y aquellos que únicamente reconocieron a la toxina Cry1Ab fueron recuperados. Los títulos obtenidos con esta estrategia se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Títulos obtenidos de la selección con la toxina Cry1Ac (en solución) y Cry1Ab (inmovilizada).

Repertorio	Concentración de toxina Cry1Ab	Concentración de toxina Cry1Ac	Título de entrada (UFC/ml)	Título de Salida (UFC/ml)
Bazo	50 µg/ml	25 µg/ml	1×10^{11}	5×10^5
Médula ósea	50 µg/ml	25 µg/ml	1×10^{11}	1.1×10^6

Análisis de fago-anticuerpos monoclonales después de las rondas de selección

Para determinar la presencia de genes de anticuerpos en las clonas después de la última ronda de selección y para determinar su variabilidad, fueron seleccionados al azar 25 clonas de cada uno de los repertorios. Cada una de ellas fue cultivada en medio LB y se purificó el ADN que posteriormente fue utilizado como templado para realizar un PCR con oligos específicos para anticuerpos de conejo, los productos obtenidos se muestran en la figura 11.

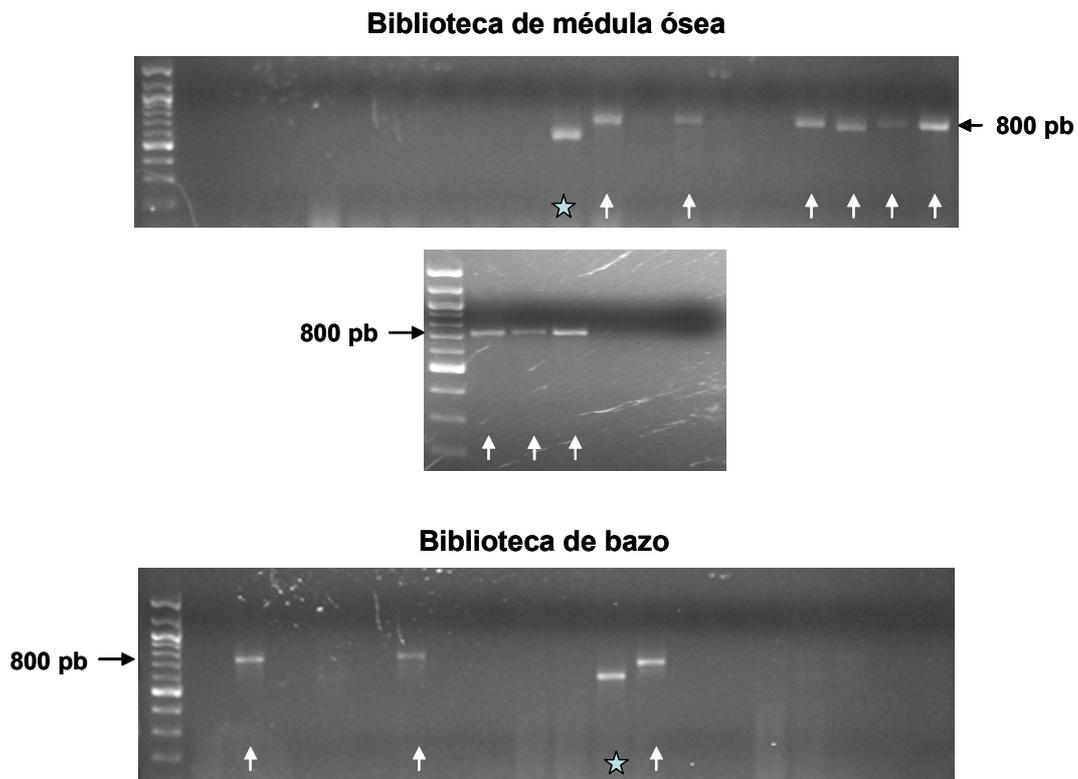


Figura 11. Productos de PCR obtenidos del PCR con oligos específicos para anticuerpos de conejo con cada uno de los repertorios. Las flechas indican las clonas que presentaron el producto esperado (aprox. 800 pb) y las estrellas presentan productos de menor tamaño.

Como se muestra en la figura 11, únicamente presentaron el producto esperado (aproximadamente 800 pb) 10 clonas de la biblioteca de bazo (figura 11A señaladas con flechas) y 3 clonas de la biblioteca de médula ósea (figura 11B señaladas con flechas). Tanto en la biblioteca de médula como en la biblioteca de bazo, fueron obtenidos productos de menor tamaño posiblemente debido a pequeñas deleciones del gene (señaladas con estrellas), de igual manera se obtuvieron clonas que no presentaron el producto esperado, por lo que esas clonas fueron descartadas del análisis.

Análisis del patrón de restricción (fingerprinting)

Para verificar la variabilidad entre las clonas que contienen genes scFv completos los productos de PCR de cada una fueron tomados y sometidos a una digestión con la enzima de restricción *A**lu* I. Los patrones de restricción diferentes fueron analizados en un gel de agarosa al 2% (figura 12).

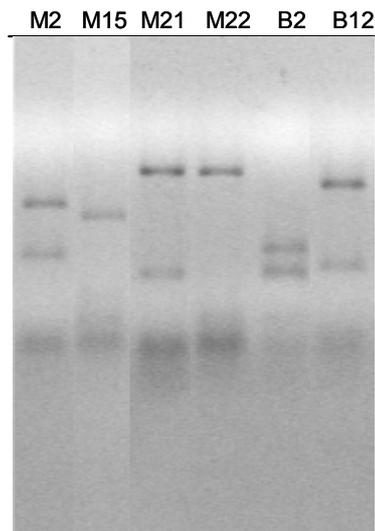


Figura 12. Gel de agarosa al 2% que muestra los diferentes patrones de restricción de las clonas M2, M15, M21 y M22 de la biblioteca de médula ósea y las clonas B2 y B12 de la biblioteca de bazo obtenidos de la digestión con al enzima *A**lu* I.

Dentro de las 13 colonias totales seleccionadas solo fueron obtenidos 6 patrones de restricción diferentes. En las clonas del repertorio de médula ósea se encontraron 4 diferentes patrones de restricción, las clonas con estos patrones fueron denominadas como M2, M15, M21 y M22. En el caso del repertorio de bazo se obtuvieron 2 patrones de restricción y las clonas que representaron estos patrones fueron denominadas como B2 y B12.

Determinación de la especificidad de los anticuerpos seleccionados

Para determinar cuál es el dominio de la toxina Cry1Ab que reconocen las clonas seleccionadas, los fago-anticuerpos fueron purificados y posteriormente fueron titulados para realizar un ensayo de ELISA con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac como antígenos. Como se mencionó anteriormente las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac comparten una alta identidad en los dominios I y II, sin embargo, el dominio III de las dos toxinas es diferente. Para este experimento se utilizó como control negativo el fago M13 silvestre (Figura 13).

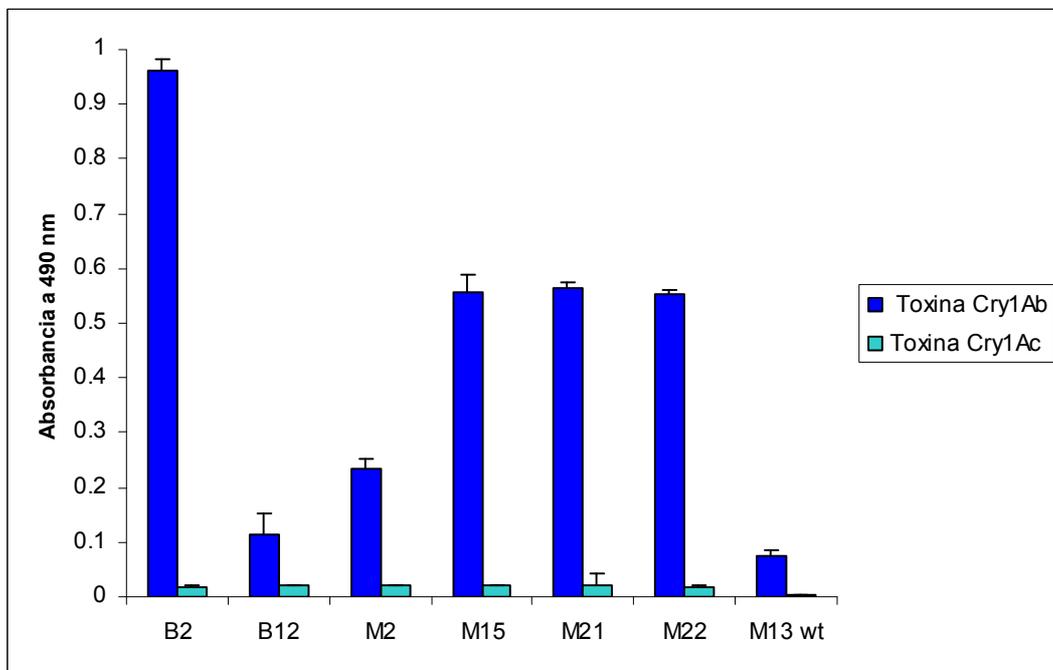


Figura 13. ELISA monoclonal tomando como antígeno 5 μg / pozo de las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa, el título de cada uno de los fago-anticuerpo fue de 1×10^9 UFC, al igual que del fago M13 silvestre. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estandar ($n=3$).

Los resultados obtenidos en el ELISA muestran que los anticuerpos seleccionados presentan un alto reconocimiento hacia a la toxina Cry1Ab, mientras que el reconocimiento hacia la toxina Cry1Ac es menor. La clona B12, presenta un bajo reconocimiento hacia la toxina Cry1Ab, casi de la misma magnitud que el fago M13 silvestre, lo cual sugiere que la capacidad de reconocimiento por la toxina Cry1Ab es baja. En cambio las clonas B2, M2, M15, M21 y M22, presentan una mayor absorbancia en cuanto al reconocimiento a la toxina Cry1Ab que en el reconocimiento a la toxina Cry1Ac, lo que sugiere que estos anticuerpos podrian reconocer al dominio III de la toxina Cry1Ab.

Ensayos de competencia con las toxinas Cry1Ab y sus receptores en *M. sexta*

En estudios anteriores se ha demostrado que anticuerpos que reconocen específicamente al asa 2 y 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab tienen la capacidad de inhibir la unión con el receptor Bt-R₁ de *M. sexta* y además tienen la capacidad de inhibir el efecto tóxico in vivo. Para determinar si alguno de los anticuerpos anti dominio III presentaba la capacidad de competir la unión de la toxina con alguno de sus receptores (APN ó BT-R₁) fue realizado un ensayo de unión a ligando. Para este experimento fueron purificadas vesículas de microvellosidad media apical (VMMA's) de intestinos de *M. sexta*. Las proteínas presentes en las VMMA's fueron separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente esta membrana fue incubada con toxina Cry1Ab marcada con bitina en presencia de diferentes títulos de cada uno de los fago-anticuerpos seleccionados, para analizar el desplazamiento en la unión. Los resultados se muestran en la figura 14.

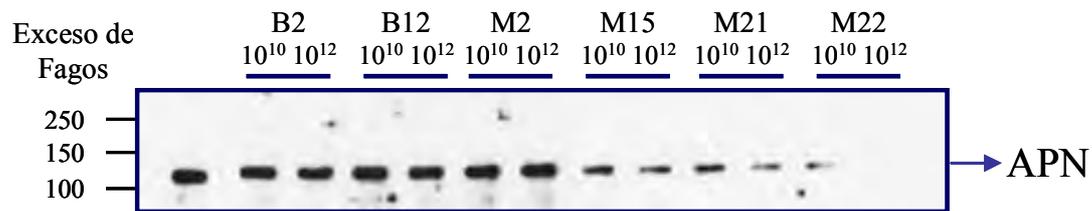


Figura 14. Experimento de unión a ligando. Competencia de unión entre la toxina Cry1Ab y el receptor aminopeptidasa en presencia de cada uno de los fago-anticuerpos. La concentración de toxina ocupada fue de 10 nM y los títulos de cada uno de los fago-anticuerpos fue de 1×10^{10} y 1×10^{12} UFC; en el carril 1 se presenta la unión de la toxina en ausencia de competidor.

La figura anterior muestra que algunos de los fago-anticuerpos tienen la capacidad de inhibir la interacción con el receptor. La unión de la toxina Cry1Ab con APN en ausencia de competidor es clara (carril 1) al igual que en presencia de los fago-anticuerpos B2, B12 y M15 que no tiene la capacidad de competir la unión. Según muestra este experimento los anticuerpos M15 y M21 compiten la unión, pero no tan eficientemente como el fago-anticuerpo M22 que desplaza la unión completamente cuando se utiliza 1×10^{12} UFC como competidor. Estos resultados sugieren que regiones específicas del dominio III son importante para la interacción con el receptor aminopeptidasa en *M. sexta*.

Para determinar si alguno de estos anticuerpos tenía la capacidad de desplazar la unión de la toxina únicamente con APN ó también con el receptor Bt-R₁ se montó un experimento de unión a ligando utilizando en lugar de proteínas de VMMA´s un fragmento del receptor caderina (Bt-R₁) expresado y purificado a partir de cultivos de *E. coli*. Este fragmento contiene los tres sitios de interacción del asa 2,3 y $\alpha 8$ reportados para la toxina Cry1Ab. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15.

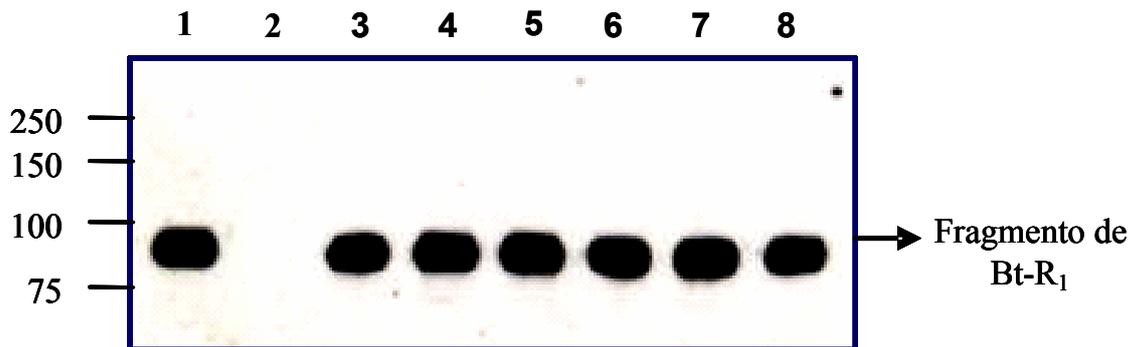


Figura 15. Experimentos de unión a ligando con un fragmento de Bt-R₁. El carril 1 muestra la unión de la toxina Cry1Ab sin competidor y el carril 2 muestra únicamente a Bt-R₁ sin toxina, el carril 2-8: unión de la toxina en presencia de B2, B12, M2, M15, M21 y M22 respectivamente. Se utilizó 1×10^{12} UFC de cada uno de los fago-anticuerpos.

La figura 15 muestra que ninguno de los fago-anticuerpos fue capaz de desplazar la unión de la toxina con el fragmento del receptor Bt-R₁. Estos resultados sugieren que los regiones del dominio III que reconocen los fago-anticuerpo M15, M21 y M22 son importantes en la interacción con el receptor aminopeptidasa, sin embargo, no son importantes en la interacción con el receptor Bt-R₁ como se ha demostrado en el caso del dominio II de esta toxina.

Reconocimiento de los fago-anticuerpos anti-dominio III al oligómero y monómero

En el mecanismo de acción de las toxinas Cry en lepidópteros se ha propuesto que el oligómero es la forma de la toxina que se une directamente al receptor aminopeptidasa (Bravo *et al.*, 2004). Para determinar si la región que reconocen los fago-anticuerpos seleccionados se encuentra expuesta tanto en el oligómero como en el monómero se montó un ensayo de ELISA utilizando como antígenos el oligómero y el monómero purificados (figura 16).

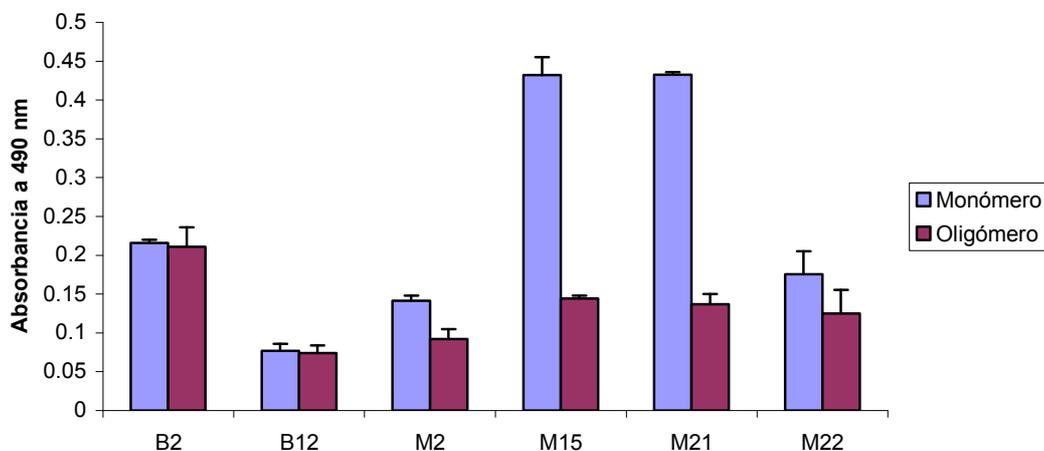


Figura 16. ELISA monoclonal utilizando como antígenos al monómero o al oligómero purificados de la toxina Cry1Ab; Se utilizaron de cada uno de los fago-anticuerpos 1×10^{12} UFC y 5 nM de toxina. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estandar ($n=3$).

Como se muestra en la figura 16 los fago-anticuerpos B2, B12, M2 reconocen de igual manera al oligómero y monómero de la toxina. Las clonas M15 y M21 muestran un mayor reconocimiento hacia al monómero que hacia el oligómero, sin embargo, reconocen también al oligómero aunque con menor intensidad. El fago-anticuerpo M22 que fue el más eficiente para inhibir la interacción de la toxina con el receptor aminopeptidasa reconoce a las dos entidades, este resultado sugiere que las regiones que reconocen estos fago-anticuerpos en la toxina pueden estar expuestas en el oligómero y que estas regiones son importantes en la interacción con este receptor, lo que correlaciona con la propuesta de que el oligómero interacciona con la aminopeptidasa en *M. sexta* y probablemente es el dominio III el responsable en esta interacción.

Caracterización del efecto "in vivo" de los anticuerpos anti-dominio III

Para determinar qué tan importante es en la toxicidad la unión de la toxina con el receptor aminopeptidasa, analizamos el efecto de la toxina en larvas del primer estadio de desarrollo de *M. sexta* mediante un bioensayo. En este experimento la toxina Cry1Ab fue previamente incubada con los fago-anticuerpos M15, M21 y M22 que encontramos son capaces de inhibir la interacción toxina-receptor en experimentos de unión a ligando y posteriormente esta solución fue mezclada con dieta de donde fueron alimentadas las larvas. Posteriormente, se verificó si alguno de los anticuerpos tenía la capacidad de inhibir el efecto tóxico de la toxina en *M. sexta* (figura 16).

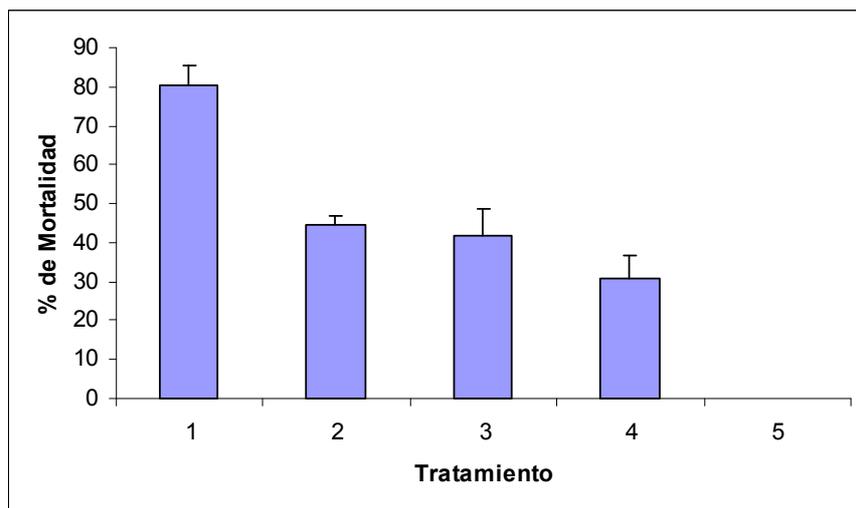


Figura 17. Porcentaje de mortalidad en larvas de *M. sexta* en presencia o ausencia de fago-anticuerpos. 1) Toxina Cry1Ab sin competidor, 2) Toxina Cry1Ab preincubada con el fago-anticuerpo M15, 3) Toxina Cry1Ab preincubada con el fago-anticuerpo M21, 4) Toxina Cry1Ab preincubada con el fago-anticuerpo M22, 5) H₂O. En este ensayo se utilizaron 10 ng/cm² de toxina Cry1Ab y 1x10⁹ UFC de cada uno de los fago-anticuerpos y se utilizaron 24 larvas por experimento. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estandas (n=3).

Los resultados obtenidos en el bioensayo muestran que los fago-anticuerpos anti-dominio III tienen la capacidad de disminuir la toxicidad *in vivo* cuando la toxina Cry1Ab es previamente incubada con ellos. Los resultados obtenidos en este experimento correlacionan con los resultados obtenidos en el experimento de unión a ligando, pues el anticuerpo que inhibe de manera más eficiente la unión de la toxina con APN es el M22 y también es el que inhibe de mejor manera el efecto tóxico de Cry1Ab. Estos resultados sugieren que la unión entre la toxina y aminopeptidasa es un paso importante en la toxicidad y por lo tanto, en el mecanismo de acción de estas toxinas.

Activación de toxina Cry1Ab en presencia de anticuerpos scFv purificados

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la activación de la toxina Cry1Ab con jugo gástrico en presencia de anticuerpos que mimetizan al receptor Bt-R₁ (específicamente aquellos que reconocen el asa 2 del dominio II) son capaces de promover la oligomerización (Gómez *et al.*, 2002). Para determinar si los anticuerpos anti-dominio III son capaces de promover la oligomerización fue realizado un experimento de activación. Para purificar los fragmentos de anticuerpos scFv los genes correspondientes a cada anticuerpos fueron subclonados al vector pET32b que facilita su expresión y purificación mediante una columna de afinidad con níquel (Figura 18a). La activación fue realizada mediante la incubación de cristales purificados de la toxina Cry1Ab con cada uno de los anticuerpos por separado, en una solución amortiguadora de carbonatos pH 9.5 y jugo gástrico. Pasado el tiempo de incubación las proteasas fueron inhibidas con PMSF a una concentración final de 1 mM. El resultado de la reacción fue verificado por inmunoblot (figura 18b). La clona M15 no fue incluida en este análisis porque presenta una delección en el péptido de unión (Gly₄-Ser)₃ de los genes de anticuerpos, por lo que se dificulta el análisis de la secuencia.

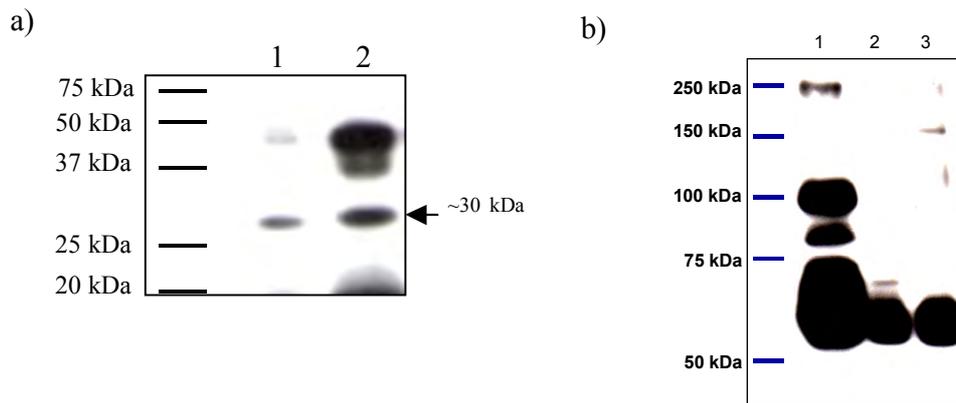


Figura 17. a) Inmunoblot de la purificación de los anticuerpos M21 (carril 1) y M22 (carril 2) de aproximadamente 30 kDa; b) Inmunoblot de la activación de toxina Cry1Ab en presencia de anticuerpos scFv. Carril 1: Activación con el anticuerpo scFv73, carril 2: activación con el anticuerpo M21, carril 3: activación con el anticuerpo M22.

En la figura 17a se muestran los anticuerpos M21 y M22 después de ser purificados. Como se muestra en la figura 17b, la activación de toxina con anticuerpos solubles mostró que el anticuerpo scFv73 promueve una alta producción de oligómero de aproximadamente 250 kDa (carril 1), mientras que el anticuerpo M21 no la promueve (carril 2). El anticuerpo M22 promueve parcialmente la oligomerización, sin embargo, no con la eficiencia que el anticuerpo scFv73. Esto sugiere que el dominio III de la toxina Cry1Ab o los epítopes que reconocen estos anticuerpos en este dominio no están involucrados en la oligomerización, pero sí en la unión de la toxina con el receptor aminopeptidasa y en la toxicidad en larvas de *M. sexta*.

De cada una de las clonas se aisló el DNA correspondiente a los genes de los anticuerpos y posteriormente estos fueron enviados a secuenciar. El análisis de la secuencia de aminoácidos permitió la identificación de las regiones determinantes de complementariedad (CDR's) de cada uno de los anticuerpos (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad.

Secuencia de los CDR's de la cadena pesada de los anticuerpos			
Anticuerpo	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
M21	VAATWIC	GPTTVTL	DSGTFYMPSYFNL
M22	TASGILLQ	GWPTTVT	DSGTFYMPSYFNL
Secuencia de los CDR's de la cadena ligera de los anticuerpos			
Anticuerpo	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
M21	EDIFSSL	HRASTLA	DAATYYCQATYYLSSANL
M22	EDIFSSL	HRASTLA	DAATYYCQATYYLSSANL

La secuencia de los CDR's mostró que estos anticuerpos presentan la misma secuencia de aminoácidos en los CDR's de la cadena ligera e identidad en el CDR-H2 y el CDR-H3 de la cadena pesada, sin embargo, el CDR-H1 es diferente. Estas secuencias ayudaran en estudios posteriores para la determinación de los epítopes que reconocen estos anticuerpos en el dominio III, mediante experimentos como ensayos de competencia en ELISA con péptidos sintéticos correspondientes a los CDR's de los anticuerpos y con péptidos sintéticos correspondientes a las regiones reportadas como sitios de interacción del dominio III de la toxina Cry1Aa con la caderina de *B. mori*. Así se podrán determinar las regiones de interacción en la toxina Cry1Ab que interacciona con el receptor y cuales son las regiones del receptor que interaccionan directamente con el dominio III. Todos los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la interacción del dominio III de la toxina Cry1Ab con el receptor aminopeptidasa es un factor indispensable para su toxicidad en larvas de *M. sexta*.

Discusión

En insectos susceptibles la especificidad de las toxinas Cry correlaciona con el reconocimiento a receptores en el intestino de los insectos blanco, como son la caderina (Bt-R₁), aminopeptidasa (APN) y la fosfatasa alcalina que se encuentran en lípidos de diferentes especies de insectos.

Estas proteínas unen diferencialmente a toxinas Cry1A y son importantes como receptores mediadores de toxicidad. La identificación de regiones específicas de las toxinas involucradas en la interacción con el receptor puede proveer información acerca del mecanismo de especificidad en insectos y el mecanismo de acción de estas.

En *M. sexta* hay dos proteínas que han sido caracterizadas como proteínas de unión a toxinas Cry1A. La proteína Bt-R₁, de aproximadamente 210 kDa, ha sido la más caracterizada en los últimos años y se han logrado identificar tres regiones que se unen específicamente al asa 2, 3 y α 8 (Gómez *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2005). La proteína APN de aproximadamente 120 kDa ha sido la menos caracterizada en ese sentido y recientemente, se han unido esfuerzos para determinar el papel de este receptor (Garczyski *et al.*, 1991).

Anteriormente, se sugería que el papel del dominio III era la conservación de la integridad de las toxinas, protegiéndola de posteriores proteólisis. Sin embargo, estudios posteriores con toxinas quiméricas y algunas mutantes demostraron que este dominio también se encuentra involucrado en la especificidad de las toxinas Cry. En el caso particular de la toxina Cry1Ac mutaciones en el dominio III (S503A y S504A) provocan la reducción de la toxicidad con la correspondiente disminución en la unión a VMMA's en *M. sexta* (Aronson *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha demostrado que el dominio III de esta toxina Cry1Ac reconoce el azúcar N-acetilgalactosamina en la aminopeptidasa de *M. sexta* y de *H. virescens* (Garczyski *et al.*, 1991; Luo *et al.*, 1997).

Experimentos de competencia con este azúcar utilizando las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa que presentan únicamente el 38% de identidad en el dominio III con la

toxina Cry1Ac mostró que la unión de estas toxinas a VMMA's de *M. sexta* no es inhibida lo que sugiere que los epítopes de unión con el receptor son diferentes (Lou *et al.*, 1997; Masson *et al.*, 1995). También se han construido toxinas híbridas en donde se intercambió el dominio III entre las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac. Las proteínas que tienen el dominio III de la toxina Cry1Aa se unen a una proteína de 210 kDa, mientras que las que tienen el dominio III de Cry1Ac se unen a una proteína de 120 kDa en *L. dispar* (Lee *et al.*, 1995). El intercambio de dominios también ha sugerido un papel muy importante de este dominio en la unión a los receptores de *Spodoptera exigua* (de Maagd *et al.*, 1996).

Trabajos posteriores utilizando anticuerpos monoclonales aislados de un conejo inmunizado con la toxina Cry1Aa que inhiben la unión de la toxina con el receptor aminopeptidasa llevó al mapeo de dos epítopes en el dominio III de la toxina responsables de la interacción con el receptor (⁵⁰⁸STLRVN⁵¹³ y ⁵⁸²VFTLSAHV⁵⁸⁹) estos resultados muestran que existen regiones del dominio III de la toxina Cry1Aa que interaccionan directamente con la aminopeptidasa, sin embargo, en este trabajo no se demostró efecto en la toxicidad y no se ha realizado un estudio de este tipo en la toxina Cry1Ab y sus receptores en *M. sexta* (Atsumi *et al.*, 2005). Para esto, aislamos anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos inmunes contra la toxina Cry1Ab (biblioteca de bazo y médula ósea) que reconocen el dominio III de la toxina Cry1Ab con la finalidad de obtener anticuerpos capaces de competir la unión de la toxina con los receptores de *M. sexta* para estudiar esta interacción. Esta selección se desarrolló por dos estrategias, la primera implicó realizar rondas de selección utilizando únicamente a la toxina Cry1Ab como antígeno y fue utilizada la biblioteca de bazo. Los resultados obtenidos no fueron positivos, pues no logramos aislar anticuerpos de interés sin embargo, es importante señalar que al intentar caracterizar los anticuerpos obtenidos por esta estrategia se observó que en algunas clonas los genes fueron deletados o perdidos conforme se realizaron las rondas de selección, lo cual limitó de manera considerable el objetivo de este trabajo.

En una segunda estrategia se utilizó el repertorio de bazo y médula ósea para aumentar la probabilidad de seleccionar los anticuerpos de interés y como antígeno fueron utilizadas las toxinas Cry1Ab y la toxina Cry1Ac. Los resultados obtenidos fueron positivos. El análisis de patrón de restricción por digestión mostró la obtención de 4 clonas diferentes de la biblioteca de médula ósea (M2, M15, M21 y M22) y 2 de la biblioteca de bazo (B2 y B12). El análisis mediante ELISA mostró que estos anticuerpos probablemente reconocen el dominio III de la toxina Cry1Ab, pues no reconocen a la toxina Cry1Ac, por otro lado, El experimento de unión a ligando en presencia de fago-anticuerpos mostró claramente que tres de los anticuerpos (M15, M21 y M22) reconocen epítopes importante en la unión de la toxina con el receptor APN y el bioensayo en presencia de ellos, demostró su importancia también en la toxicidad. El reconocimiento de los anticuerpos al monómero y oligómero mostró por un lado que los epítopes que reconocen los anticuerpos M15, M21 pueden estar expuestos en el oligómero como en el monómero sin embargo, presentan un mayor reconocimiento hacia el monómero y que los epítopes que reconoce el anticuerpo M22 se encuentran expuestos tanto en oligómero como en el monómero, lo que sugiere que tanto el oligómero como el monómero pueden ser capaces de unirse a APN por la regiones que son mimetizadas por los anticuerpos y que la toxina Cry1Ab no sufre cambios conformacionales importantes en el dominio III cuando se lleva a cabo la transición de monómero a oligómero.

Los experimentos de activación de la toxina Cry1Ab con anticuerpo soluble mostraron que los anticuerpos anti-dominio III no facilitan de manera eficiente la formación de oligómero. Se ha demostrado que anticuerpos que unen regiones del dominio II, específicamente el asa 2, 3 y $\alpha 8$ promueven la oligomerización (Gómez *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2003). La probabilidad de que este anticuerpo reconozca un sitio dentro del dominio II se descarta con el resultado obtenido en la competencia de unión con Bt-R₁, pues el fragmento ocupado en este ensayo comprende los tres sitios de unión a las asas del I dominio II de la toxina Cry1Ab y no existe competencia de unión con esos sitios en presencia del anticuerpo.

La alta identidad en el dominio III de la toxina Cry1Aa y Cry1Ab y la estrategia que se siguió para mapear los epítopes de interacción de la toxina Cry1Aa con la APN de *B. mori* sugiere que probablemente estos epítopes pueden ser los mismos en la interacción del dominio III de la toxina Cry1Ab con la aminopeptidasa, sin embargo, no se descartan otros sitio de interacción (Atsumí *et al.*, 2005).

En el mecanismo de acción propuesto para las toxinas Cry1A en lepidópteros implica que después de que la toxina se une a Bt-R₁, ésta expone regiones hidrofóbicas que promueven la oligomerización de la toxina. Una vez que la toxina se oligomeriza esta es capaz de unirse al receptor aminopeptidasa disociándose de Bt-R₁. Posteriormente, la aminopeptidasa arrastra al oligómero a microdominios de membrana en donde se lleva a cabo la inserción de la toxina y la formación de poro. Se ha demostrado que el primer contacto de la toxina con el receptor Bt-R₁ es por el dominio II (específicamente las asas 2, 3 y α8) y que este contacto es indispensable para la oligomerización. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el siguiente contacto después de la oligomerización es entre el dominio III de la toxina Cry1Ab y el receptor de aminopeptidasa y que esta unión es indispensable para que la toxina tenga su efecto tóxico en el insecto.

Conclusiones

- Se logró la selección de 6 diferentes anticuerpos que reconocen al dominio III de la toxina Cry1Ab, los anticuerpos B2 y B12 de la biblioteca de bazo y los anticuerpos M2, M15, M21 y M22 de la biblioteca de médula ósea.
- De los anticuerpos seleccionados únicamente el M15 y M21 presentan un reconocimiento diferencial entre el oligómero y el monómero, mientras que los demás no presentan distinción.
- Los anticuerpos M15 y M21 son capaces de inhibir la unión entre la toxina Cry1Ab y la APN de *M. sexta*, sin embargo, la inhibición es mayor con el anticuerpo M22.
- Los anticuerpos M15, M21 y M22 fueron capaces de inhibir el efecto tóxico de Cry1Ab en bioensayo con larvas de *M. sexta*.
- El dominio III de la toxina Cry1Ab es importante en la interacción con el receptor APN de *M. sexta* y esta interacción es importante para la toxicidad.

Perspectivas

- Realizar ensayo de competencia con péptidos sintéticos de la región mapeada en la toxina Cry1Aa como sitio de interacción con la APN de *B. mori* y determinar si es la misma en *M. sexta*.
- Analizar las secuencias de los CDR's de los anticuerpos M21 y M22 mediante alineamientos con APN de *Manduca sexta* y determinar las regiones importantes en el receptor.

Bibliografía

- Angst, B. D., Marcozzi, C. Y Magee, A. I.** 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. 114 (4): 629-41.
- Arenas Sosa, Ivan.** "Construcción de herramientas moleculares para el estudio del mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*". Dirección: Isabel Gómez Gómez. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias Biológicas, UAEM. 2003.
- Aronson, A. I., Wu, D. y Zhang, C.** 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* 177(14):4059-65.
- Atsumi, S., Mizuno, E., Hara, H., Nakanishi, K., Kitami, M., Miura, N., Tabuoki, H., Watanabe, A. y Sato, R.** Location of the *Bombix mori* Aminopeptidase N type 1 Binding Site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (7): 3966-3977.
- Benítez Hernández, Itzel.** "Aislamiento de anticuerpos monoclonales que reconocen el asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*". Dirección: Isabel Gómez Gómez. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 2003.
- Berliner, E.** 1915. Die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. *Z. Gesamte Getreidewes.* 3, 63-73.
- Blalock, J. E.** 1995. Genetic origins of protein shape and interaction rules. *Nature Med.* 1, 876 878.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J. y Li, J.** 2005. Crystal Structure of Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications. *J. Mol. Biol.* 348, 363-382.
- Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S. y Soberón, M.** 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta.* 17;1667(1):38-46.

- Bravo, A., Sánchez, J., Koskoura, T. y Crickmore, N.** 2002. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J. Biol. Chem.* 277, 23985- 23987.
- Burton, S., Ellar, D., Li, J. y Derbyshire, D.** 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insects receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287, 1011-1022.
- Cabiaux, V., Wolff, Ch. y Ruyschaert, J. M.** 1997. Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxins virulence. *Int. J. Biol. Macromol.* 21, 285-298.
- Crickmore, N., Zeigler D. R., Fetitelson, J., Schnepf, E., Van Rie. J., Lereclus, D., Baum, J., y Dean, D. H.** 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (3):807-13.
- De Maagd, R., Klei, H., Bakker, P., Stiekema, W. y Bosch, D.** 1996. Different Domains of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins Can Bind to Insect Midgut Membrane Proteins on Ligand Blots. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (8), 2753-2757.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. Y Van Rie, J.** 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xilostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 248 (3): 748-61.
- Dorsch, J. A., Candas, M., Griko, N. B. Maat, W. S., Midboe, E. G., Vadlamudi, R. K. y Bulla, L. A.** 2002. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32 (9):1025-36.
- Derbyshire, D. J. y Ellar, D. J.** 2001. Crystalization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallog. Set. D*, 57, 1938-44.
- Dow, J. A. T.** 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect. Physiol.*19, 1025-1036.

- Duche, D., Baty, D., Chartier, M., Letellier, L.** 1994. Unfolding of colicin A during its translocation through the *Escherichia coli* envelope as demonstrated by disulfide bond engineering. *J. Biol. Chem.* 269 (40): 24820-5.
- Du, C., Matin, A. W. y Nickerson, K. W.** 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystal. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3847-3853.
- English, L. J. Y Readdy, T. L.** 1989. Delta endotoxin inhibits a phosphatase in midgut epithelial membranes of *Heliothis virescens*. *Insec. Biochem.* 19: 145-152.
- Feitelson, J.** 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. p 63-71 En: L.Kim (ed) Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Ferre, J. Y Van Rie, J.** 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annv. Rev. Entomol.* 47: 501-33.
- Gahan, L., Gould, F. y Heckle, D.** 2001. Identification of a Gene Associated whit Bt Resitance in *Heliothis virescens*. *Science.* 293, 857-860.
- Galitzky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, JR., Pangborn, W. y English, L.** 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 57 (Pt 8), 1101-9.
- Garczynski SF, Crim JW, Adang MJ.** 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(10): 2816-20.
- Gazit, E. y Shai, Y.** 1995. The Assembly and Organization of the α 5 and α 7 Helices from the Pore-forming Domain of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins. *J. Biol. Chem.* 70 (6), 2571-2578.
- Gill, M. y Ellar, J. D.** 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a function in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect. Mol. Biol.* 11, 619-625.

- Gill, S. S., Cowles, E. A. y Francis, V.** 1995. Identification, Isolation, and Cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of lepidopteran insects *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 270, 27277-27282.
- Gómez, I., Dean, D. H., Bravo, A. y Soberón M.** 2003. Molecular Basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin Specificity: Two Structural Determinants in the *Manduca sexta* Bt-R₁ Receptor Interact with Loops α 8 and 2 in Domain II of Cry1Ab toxin. *Biochem.* 42, 10482-10489.
- Gómez, I., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A. y Soberón, M.** 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *Biol. Chem.* 273 (31), 28906-12.
- Gómez, I., Miranda-Rios, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A. y Soberón, M.** 2002. Hydrophobic Complementary Determines Interaction of Epitope ⁸⁶⁹HITDTNNK⁸⁷⁶ in *Manduca sexta* Bt-R₁ Receptor with Loop 2 of Domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxins. *J. Biol. Chem.* 277 (33), 30137-30143.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. y Soberón, M.** 2002 (b). Cadherin-like Receptor Binding Facilitates cleavage of helix α 1 in Domain I and Oligomer pre-pore Formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *FEBS Letters.* 513, 242- 246.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai Carey, M., Schwartz, J., Brousseau, R. y Cygler, M.** 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254, 447-464.
- Griffitts, S. J. y Aroian, V. R.** 2005. Many roads to resistance: How invertebrates adapt to Bt toxin. *BioEssays.* 27, 614-624.
- Hara, H., Atsumi, S., Yaoi, K., Higurashi, S., Miura, N., Tabunoki, H. y Shato, R.** 2003. A cadherin-like protein function as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombix mori* larvae, *FEBS Lett.* 538, 29-34.

- Hawlich, H., Vilsendorf, Z., Bautsch, W., Klos, A. y Köhl, J.** 2000. Guinea pig C3 specific rabbit single chain Fv antibodies from bone marrow, spleen and blood derived phage libraries. *J. Immunol. Meth.* 236, 117-131.
- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, L., Kolso.** 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*: one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (6):2627-30.
- Hodgman, T. C. Y Ellar, D. J.** 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins determined by computational analysis. *DNA seq.* 1 (2): 97 106.
- Höfte, H. y Whiteley, H.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.
- Hua, G., Jurat-fuentes, J. L. y Adang, M. J.** 2004. Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R(1a) cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin in *Drosophila* S2 cells. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34, 193-202.
- Ishitawa, S.** 1901. On a severe flacherie (sotto disease). *Dainiho Sanshi Kaiho* 114, 1-5.
- Jenkins, J. L. Y Dean, D.** 2000. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. *Genetic eng. (NY).* 22: 33 54.
- Jenkins, J. L., Lee, M. K., Valaitis, A. P., Curtiss, A. y Dean, D. H.** 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 14423-14431.
- Jurat-fuentes, J. L., Gahan, L. J., Goold, F. L., Heckel, D. G. Y Adang, M. G.** 2004. The HevCaLP protein Mediates Binding Specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* Toxin in *Heliothis virescens*. *Biochem.* 43 (44): 14299-305.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E. y Regev, A.** 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensibility of

advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 26, 365-373.

Knight, P., Cricmore, N. y Ellar D. J. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11: 798-806.

Knowles, B. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* 24, 275-308.

Lee, M. K., Jenkins, J. L., You, T., Curtiss, A., Adang, M. y Dean, D. 2001. Mutation at the arginine residues in $\alpha 8$ loop of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *FEBS Letter.* 497, 108 -112.

Lee, M. K., Rajamohan, F., Jenkins, J. L., Curtiss, A. y Dean, D. H. 2000. Role of two arginine residues in domain II, loop 2 of Cry1Ab and Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 38, 289-298.

Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M. y Chaufaux, J. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. *Bio/technol.* 13, 67-71.

Li, J., Carroll, J. y Ellar, D. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815-821.

Li, J., Derbshire, D. J., Promdonkoy, B. y Ellar, D. J. 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted form. *Biochem. Soc. Trans.* 29 (4): 571-7.

Lee, M. K., Young, B. A. y Dean, D. H. 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216(1):306 12.

Luo, K., Sangadala, S., Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R. y Adang, M. J. 1997. The heliothis virescens 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor

- A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem Mol Biol.* 27(8-9):735-43.
- Masson, L., Lu, Y. J., Mazza, A., Brousseau, R. y Adang MJ.** 1995. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* 270 (35): 20309-15.
- McNall, R. J. y Adang, M. J.** 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 33 (10): 999-1010.
- Miranda, R., Zamudio, F. y 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 (12), 1155-1163.
- Morse, J., Yamamoto, T. y Stroud, M. R.** 2001. Structure of Cry2Aa Suggests an Unexpected Receptor Binding Epitope. *Structure.* 9, 409-417.
- Nagamatsu, Y., Koike, T., Sasaki, K., Yoshimoto, A. y Furukawa, Y.** 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal. *FEBS Lett.* 460, 385-390.
- Nissim, A., Hoogenboom, H., Tomlinson, I., Flynn, G., Midgley, D. y Winter, G.** 1994. Antibody fragments from a "single plot" phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* 13, 692-698.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Jonson, D. y McGaughey, W. H.** 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Biol. Chem.* 272, 23473-23476.
- Parker, M. W. Y Pattus, F.** 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxin. *Trends Biochem.Sci.* 18 (10):391-5.
- Rajagopal, R., Silvakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P. y Bhatnagar, R. K.** 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 46849-46851.

- Rajamohan, F., Hussain, S., Cotrill, J., Gould, F. y Dean, D.** 1996a. 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. J. Chem.* 271 (41), 25220-25226.
- Rajamohan, F., Cotrill, J. A., Gould, F. y Dean, D. H.** 1996b. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 271, 2390-2396.
- Rausell, C., Muñoz-garay, C., Gómez, I., Miranda-cassoluengo, Rudiño-piñera, E., Soberón, M. y Bravo, A.** 2004. Tryptophan spectroscopy studies and back lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry.* 43, 166-174.
- Rosenberger, C. M. y Brumell, J. H.** 2000. Finlay, Microbial pathogenesis: lipid rafts as a pathogen portals. *Curr. Biol.* 10, 823-825.
- Sangadala, S., Walters, F. W., English, L. H. y Adang, M. J.** 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+$ - K^+ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 10088-10092.
- Shao, Z., Cui, y., Liu, X., Yi, H. y Ji, J.** 1998. Processing of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effect of protease inhibitor. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 73-81.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. y Dean D.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806.
- Schwartz, J., Garneau, L., Masson, L., Brousseau, R. y Rousseau, E.** 1993. Lepidopteran-specific δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132, 53-62.

- Schwartz, J., Yiang-Jiang, L., Söhnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L. y Adang, J. M.** 1997. Ion Channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEMS Letter*. 412, 270-276.
- Terra, W., Ferreira, C.** 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. B* 109, 1-69.
- Thomas, W y Ellar, D.** 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal δ -Endotoxin. *FEMS Letter*. 154, 362-268.
- Tsuda, Y., Nakatani, F., Hashimoto, K., Ikawa, S., Matura, C., Fukada, K., Sugimoto, M. y Himeno, M.** 2003. Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of *Bombix mori* (silkworm). *J. Biochem.* 369, 697-703.
- Vadlamudi, R. K., Ji, T. H. y Bulla, L. A.** 1993. A Specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* 268, 12334-12340.
- Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I., Ji, T. H. y Bulla, L. A.** 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494.
- Von-Tersch, M. A., Slatin, S. L. Kulesza, C. A. y English, L. H.** 1994. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3711-3717.
- Yaoi, K., Nakanishi, k., Kadotani, T., Imamura, M., Koizumi, N., Iwahana, H., y Sato, R.** *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin-binding region of *Bombix mori* aminopeptidase N. *FEBS*. 463: 221-224.
- Xie, R., Zhuang, M., Ross, L. S., Gómez, I., Oltean, D. I., Bravo, A., Soberón, M. y Gill, S. S.** 2005. Single Amino Acid Mutation in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* Affect Its toxin Binding Ability to Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* 280, 9: 8416-8425.

- Zhan, H., Choe, S., Huynh, P. D., Finkelstein, A., Eisenberg, D. Y Collier, R. J.** 1994. Dynamic transition of the transmembrane domain of diphtheria toxin: disulfide and fluorescence proximity studies. *Biochemistry*. 33 (37): 11254-63.
- Zhuang, M., Oltean, D. I., Gómez, I., Pullikuth, A. K., Soberón, M., Bravo, A. y Gill, S. S.** 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipids rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* 277, 13863-13872.