



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Análisis de los cambios conformacionales
de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*
durante la inserción en membrana**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

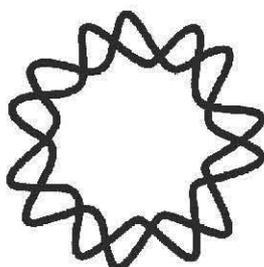
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

BIOL. LUIS ENRIQUE ZAVALA ROMERO

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ**

Cuernavaca, Morelos. 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico este trabajo:

A mi madre, la Sra. María Concepción Romero y a mi padre, el Sr. Telésforo Zavala. Ambos son un gran ejemplo a seguir para mí y me han enseñado con base en sus acciones, a ser perseverante, a fijarme nuevas metas y a cumplir con mis objetivos. Muchas gracias por todas las enseñanzas, los consejos y sobre todo por brindarme su cariño y apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida. Este logro es suyo, ya que sin su respaldo nunca hubiera podido alcanzar esta meta. Los quiero mucho.

A mis hermanos: Víctor, José, Jorge y Cecilia, de quienes siempre estoy aprendiendo tantas cosas buenas. Son uno de mis principales motores para seguir adelante. Les agradezco por estar siempre a mi lado y brindarme su cariño en todo momento. Saben que los quiero mucho.

Agradezco:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a su dependencia, el Instituto de Biotecnología, por haberme brindado la preparación académica, formación, espacio y los recursos necesarios para poder llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Liliana Pardo, por todo el apoyo, la asesoría tanto experimental como teórica, el tiempo dedicado al desarrollo de este proyecto, las discusiones enriquecedoras en el aspecto académico, y sobre todo por la amistad, consejos y paciencia que me brindó a lo largo de este periodo de tiempo.

A la Dra. Alejandra Bravo, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo. Le agradezco mucho por todo el apoyo que me ha brindado durante mi estancia en él y por la asesoría, aportaciones y el tiempo dedicados para el desarrollo y conclusión de este trabajo. La admiro mucho y es un ejemplo a seguir para mí.

Al Dr. Mario Soberón por sus sugerencias y aportaciones que enriquecieron en gran medida el desarrollo del proyecto y ayudaron a la conclusión de este trabajo.

A mis padres, Telésforo Zavala y María Concepción Romero. A mis hermanos, Victor, José, Jorge y Cecilia. Gracias por brindarme su apoyo incondicional y cariño en todo momento. Son lo mas preciado que tengo en la vida y los quiero mucho.

A la Dra. Helena Porta, Dra. Isabel Gómez, Dra. Claudia Rodríguez y Dr. Carlos Garay, por las sugerencias y ayuda en la parte experimental brindadas.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Gloria Saab y Dr. Takuya Nishigaki, por sus valiosas recomendaciones que enriquecieron este trabajo y por haberme acompañado durante el desarrollo del proyecto.

A los integrantes de mi jurado de examen: Dra. Adriana Valdez, Dra. Carmen Beltrán, Dra. Cinthia Núñez, y Dr. Victor Bustamante, por darse un espacio en su tiempo para revisar la estructura de esta tesis y emitir sus críticas a la redacción.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y del IBT, por todos los buenos momentos que compartimos día a día.

A Graciela Dominguez, Biol. Jorge Sánchez, Biol. Lizbeth Cabrera y Sergio Blancas, por el valioso apoyo técnico y administrativo proporcionado.

A los integrantes de la Unidad de Docencia del IBT: Ing. Jalil Saab, Lic. Antonio Bolaños y Gloria Villa, por brindarme las facilidades para realizar los diversos tramites administrativos de forma eficiente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) por las becas otorgadas para realizar mis estudios de posgrado.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Alejandra Bravo, del Departamento de Microbiología Molecular en el Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Liliana Pardo López y contó con el financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA-UNAM, donativo IN218409), y del Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACyT, donativo 81679-Q y dos años de beca de maestría).

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> y sus toxinas bioinsecticidas Cry	1
1.1.1 Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
1.1.2. Características de las toxinas producidas por <i>B.thuringiensis</i>	2
1.1.3. Clasificación y nomenclatura de las δ -endotoxinas de Bt	4
1.1.4. Estructura de las proteínas Cry de tres dominios	5
1.1.5. Mecanismo de acción de las proteínas Cry	8
1.1.5.1. Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry	10
1.1.5.2. Unión al receptor	10
1.1.5.3. Formación del oligómero prepore	12
1.1.5.4. Inserción en la membrana	14
1.1.5.5. Citólisis	15
1.2. Fluorescencia, marco teórico	16
1.2.1 Conceptos básicos de fluorescencia	16
1.2.1.1. Diagrama de Jablonski	16
1.2.1.2. Características de la emisión de la fluorescencia	18
1.2.2. Fluoróforos	19
1.2.2.1. Fluoróforos intrínsecos	19
1.2.2.2. Fluoróforos extrínsecos	21
1.2.2.3. Fotoestabilidad de los fluoróforos	22
1.2.3. Efectos del solvente y del ambiente	22
1.2.3.1. Efectos de la polaridad del solvente	22
1.2.4. Apagado de la fluorescencia	24
1.2.4.1. Apagadores de la fluorescencia y algunos mecanismos de apagado	25
1.2.4.2. Teoría del apagado colisional	26
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	29
2.1. Modelos de inserción en la membrana de la toxina Cry1Ab de <i>B. thuringiensis</i>	29

3. HIPOTESIS	33
4. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo general	33
4.2 Objetivos particulares	33
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	34
6. METODOLOGÍA	35
6.1. Construcción de mutantes sitio dirigidas de la toxina Cry1Ab	35
6.2. Expresión de las toxinas Cry1Ab mutantes en la cepa acristalífera de <i>B. thuringiensis</i> (Bt 407-) y purificación a partir de dicha cepa	38
6.3. Evaluación de la toxicidad de las mutantes construidas de la toxina Cry1Ab sobre larvas de <i>M. sexta</i>	39
6.4. Marcaje de la toxina Cry1Ab con fluoróforos	40
6.5. Medición de la fluorescencia intrínseca de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcadas con fluoróforos	42
6.6. Inserción del monómero de la toxina Cry1Ab en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina	42
6.7. Inserción del monómero de la toxina Cry1Ab en BBMV's de <i>M. sexta</i> y formación del oligómero de la toxina	43
6.8. Ensayos de apagado dinámico de la fluorescencia	43
6.8.1. Apagado dinámico con apagadores solubles en ambientes polares	43
6.8.2. Apagado dinámico con apagadores anclados a la membrana lipídica	44
7. MATERIALES	46
7.1. Cepas utilizadas	46
7.2. Medios de cultivo	46
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
8.1. Construcción de mutantes sitio dirigidas de la toxina Cry1Ab, expresión en <i>B. thuringiensis</i> y evaluación de la toxicidad sobre larvas de <i>M. sexta</i>	48
8.2. Expresión y purificación de la toxina Cry1Ab	49
8.3. Marcaje en cisteínas del monómero de la toxina Cry1Ab	54

8.4. Análisis de la fluorescencia intrínseca del monómero de la toxina Cry1Ab	57
8.5. Análisis de la inserción de la toxina Cry1Ab en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina	58
8.5.1. Inserción del monómero de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350, en SUV de PC	58
8.5.2. Apagado de la fluorescencia extrínseca del monómero de la toxina Cry1Ab marcado con Alexa Fluor-350 e insertado en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina	60
8.6. Análisis de la inserción de la toxina Cry1Ab en membranas lipídicas aisladas del intestino medio de larvas de <i>M. sexta</i>	64
8.6.1. Inserción de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS o Alexa Fluor-350, en BBMV's de <i>M. sexta</i>	64
8.6.2. Apagado dinámico de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab, en solución e insertada en BBMV's de <i>M. sexta</i>	64
8.6.2.1. Apagado con yoduro de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350, en solución o insertada en BBMV's de <i>M. sexta</i>	67
8.6.2.2. Apagado con yoduro de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350, en presencia del receptor caderina o ALP	69
8.6.2.3. Apagado con acrilamida de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS ,en solución e insertada en BBMV's de <i>M. sexta</i>	70
8.6.3. Apagado de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS e insertada en BBMV's de <i>M. sexta</i> suplementadas con 16:0-5 Doxyl PC	71
9. CONCLUSIONES	73
10. PERSPECTIVAS	75
11. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	76
11.1. Fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos	76
11.2. Reacción de PCR mutagénico	76
11.3. Preparación de las células electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5α	77
11.4. Transformación de las células electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5α	78
11.5. Secuenciación	78

11.6. Preparación de las células electrocompetentes de <i>B. thuringiensis</i>	78
11.7. Transformación de las células de <i>B. thuringiensis</i> 407-	79
11.8. Expresión y purificación de la protoxina Cry1Ab a partir de cultivos de <i>B. thuringiensis</i>	79
11.9. Cuantificación de la proteína mediante el método de Bradford o usando el equipo Nanodrop 2000	80
11.10. Bioensayos sobre larvas de <i>Manduca sexta</i>	81
11.11. Activación enzimática y purificación de la toxina monomérica Cry1Ab mediante cromatografía de intercambio aniónico	81
11.12. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)	83
11.13. Marcaje de la toxina Cry1Ab	84
11.14. Preparación de los liposomas o PC-SUV (Small Unilamellar Vesicles of Phosphatidyl Choline)	85
11.15. Inserción de la toxina Cry1Ab en SUV's de PC	85
11.16. Extracción del intestino medio de larvas de <i>M. sexta</i>	86
11.17. Elaboración de BBMV's con membranas del intestino medio de larvas de <i>M. sexta</i>	87
11.18. Cuantificación de la proteína mediante el método de Lowry	88
11.19. Obtención del oligómero de la toxina Cry1Ab insertado en la membrana lipídica (BBMV's de <i>M. sexta</i>)	88
11.20. Western blot	89
11.21. Unión de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350 al receptor caderina o ALP	90
11.22. Ensayos de apagado dinámico de la fluorescencia con yoduro o acrilamida	90
11.23. Preparación de BBMV's de <i>M. sexta</i> suplementadas con 16:0-5 Doxyl PC	91
11.24. Apagado de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS e insertada en BBMV's de <i>M. sexta</i> suplementadas con 16:0-5 Doxyl PC	92
11.25. Medición de los espectros de emisión de la fluorescencia de las toxinas Cry1Ab	93
12. ANEXOS	93
12.1. Publicación en revista arbitrada	93
13. BIBLIOGRAFÍA	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Microfotografía de una cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopio electrónico de transmisión	2
Figura. 1.2. Estructura tridimensional de algunas proteínas insecticidas producidas por Bt	3
Figura 1.3. Filograma de identidad entre las secuencias conocidas de genes Cry de tres dominios	6
Figura 1.4. Estructura primaria y terciaria de las toxinas Cry	7
Figura 1.5. Representación esquematizada del modo de acción propuesto en nuestro laboratorio para las toxinas Cry1A	9
Figura 1.6. Longitud relativa de las protoxinas Cry y posición de los sitios de corte proteolítico	10
Figura 1.7. Moléculas que funcionan como receptor de las proteínas Cry1A	11
Figura 1.8. Estructura de algunos fluoróforos	16
Figura 1.9. Diagrama de Jablonski	17
Figura 1.10. Algunos fluoróforos intrínsecos y bioquímicos	20
Figura 1.11. Espectros de absorción y de emisión de los aminoácidos fluorescentes en agua, a pH7	21
Figura 1.12. Comparación de la fotoestabilidad de anticuerpos marcados sobre cortes fijados de tejidos celulares	22
Figura 1.13. Diagrama de Jablonski para el efecto del solvente en la fluorescencia	23
Figura 1.14. Espectro de emisión del DNS en solventes de polaridad creciente	24
Figura 1.15. Diagrama de Jablonski representando el apagado colisional	27
Figura 1.16. Comparación del apagado dinámico y estático	28
Figura 2.1. Modelos de inserción de la toxina Cry1Ab en la membrana	30

Figura 2.2. Ensayos de medición de las corrientes iónicas sobre bicapas lipídicas planas, inducidas por preparaciones de monómero u oligómero de la toxina Cry1Ab	31
Figura 2.3. Modelo propuesto en nuestro laboratorio para los cambios conformacionales que sufre la toxina Cry1Ab durante su inserción en la membrana lipídica	32
Figura. 5.1. Estrategia general seguida para el análisis de los cambios conformacionales que sufre la toxina Cry1Ab al insertarse en la membrana lipídica	34
Figura. 6.1. Ubicación de los residuos mutagenizados en un modelo de la estructura 3D del monómero de la toxina Cry1Ab	35
Figura 6.2. Estructura secundaria del monómero de la toxina Cry1Ab	36
Figura 6.3. Estrategia general para la obtención de las mutantes de la toxina Cry1Ab	37
Figura 6.4. Vector pHT315Ab	38
Figura 6.5. Fotografía de una caja de plástico utilizada para evaluar el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab sobre las larvas de <i>M. sexta</i>	39
Figura 6.6. Estructura química de las marcas reactivas de los fluoróforos utilizados para el marcaje en cisteínas de las mutantes de la toxina Cry1Ab	40
Figura 6.7. Espectros de absorción y de emisión normalizados de la marca Alexa Fluor-350 acoplada a un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, a pH 8	41
Figura 6.8. Esquema general de los experimentos de apagado dinámico de la fluorescencia de la toxina Cry1Ab, usando apagadores solubles en agua	44
Figura 6.9. A) Estructura del 1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, o 16:0-5 Doxyl PC. B) Esquema general de los experimentos de apagado dinámico de la fluorescencia de la toxina Cry1Ab, usando apagadores acoplados a los ácidos grasos de la membrana	45
Figura 8.1. Modelo de la estructura tridimensional del monómero de la toxina Cry1Ab que muestra la localización de los 7 residuos utilizados para el marcaje sitio específico con fluoróforos	50

Figura 8.2. Cromatogramas obtenidos durante la purificación de los monómeros de las toxinas Cry1Ab silvestre y de las mutantes, mediante cromatografía de intercambio aniónico, utilizando el equipo de FPLC AKTA y la columna Mono Q (GE,Healthcare)	52
Figura 8.3. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación del monómero de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes, mediante cromatografía de intercambio aniónico	53
Figura 8.4. SDS-PAGE de los monómeros de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes utilizadas para el marcaje en cisteínas con los fluoróforos 1,5-IAEDANS y Alexa Fluor-350	54
Figura 8.5. SDS-PAGE de los monómeros de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcados con 1,5-IAEDANS o Alexa Fluor-350	56
Figura 8.6. Análisis de la inserción en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina (PC) del monómero de la toxina Cry1Ab silvestre y de la mutante S364C marcada con Alexa Fluor-350	60
Figura 8.7. Análisis del apagado de la fluorescencia extrínseca del monómero de la mutante S364C marcada con Alexa Fluor-350 e insertado en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina	61
Figura 8.8. Efecto de la polaridad del solvente sobre el espectro de emisión de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS y del Alexa Fluor-350	63
Figura 8.9. Apagado de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS y del Alexa Fluor-350 en solución, utilizando KI o acrilamida	63
Figura 8.10. Análisis de la inserción de la toxina Cry1Ab en BBMVs de <i>M. sexta</i>	65
Figura 8.11. Curvas de Stern-Volmer para el apagado de la fluorescencia extrínseca de las mutantes de la toxina Cry1Ab en solución e insertada en membranas lipídicas aisladas del intestino medio de larvas de <i>M. sexta</i> (BBMV's)	66
Figura 8.12. Curvas de Stern-Volmer para el apagado con ioduro de la fluorescencia extrínseca de las mutantes S324C y S364C de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350, en presencia o ausencia de los receptores	70

Figura 8.13. Apagado de la fluorescencia extrínseca de las mutantes T122C, V171C y S364C de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS e insertadas en BBMV's de *M. sexta* suplementadas con 16:0-5 Doxy PC 72

Figura 9.1. Localización hipotética de los residuos T122, V171, G183, S324, S364, K490 y N547 dentro de la estructura de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana lipídica, de acuerdo al modelo de inserción de sombrilla 74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Parámetros de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos en agua, a pH neutro	20
Tabla 6.1. Mutantes puntales de la toxina Cry1Ab	35
Tabla 6.2. Propiedades del espectro de absorción y emisión de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS disuelto en varios solventes	41
Tabla 8.1. Lista de mutantes puntuales la toxina Cry1Ab construidas y su efecto tóxico (dosis letal media, LC ₅₀) sobre larvas de <i>M. sexta</i>	48
Tabla 8.2. Estequiometría de marcaje de los monómeros de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcados con Alexa Fluor-350 o 1,5-IAEDANS	55
Tabla 8.3. $\lambda_{\max \text{ em}}$ de la fluorescencia intrínseca de los monómeros de la toxina Cry1Ab marcados con 1,5-IAEDANS o Alexa Fluor-350	57
Tabla 8.4. Condiciones experimentales para la inserción del monómero de la toxina Cry1Ab en bicapas lipídicas sintéticas (SUV's de PC)	59
Tabla 8.5. $\lambda_{\max \text{ em}}$ y K_D de la fluorescencia extrínseca de los monómeros de la toxina Cry1Ab marcados con Alexa Fluor-350	67
Tabla 8.6. K_D y $\lambda_{\max \text{ em}}$ de la fluorescencia extrínseca de los monómeros de la toxina Cry1Ab marcados con 1,5-IAEDANS	71
Tabla 11.1. Fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos	76
Tabla 11.2. Reacción de PCR mutagénico	76
Tabla 11.3. Reacción de PCR mutagénico. Parámetros del ciclaje térmico	77
Tabla 11.4. Reactivos para la elaboración del gel de acrilamida	83
Tabla 11.5. Mezcla de reacción para el apagado de la fluorescencia utilizando acrilamida como apagador dinámico (250 μ l de volumen final)	91
Tabla 11.6. Mezcla de reacción para el apagado de la fluorescencia utilizando KI como apagador dinámico (250 μ l de volumen final)	91
Tabla 11.7. Parámetros de lectura en el espectrofluorómetro para los fluoróforos utilizados	93

ABREVIATURAS

1,5-IAEDANS	ácido 5-(2-((2-Iodo-1-oxoetil) amino) etilamino)-1-naftalensulfónico
16:0-5 Doxyl PC	(1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
ALP	fosfatasa alcalina
Amp²⁰⁰	ampicilina a una concentración final de 200 µg/ml
APN	aminopeptidasa N
BBMV's	vesículas de la microvellosidad apical del intestino medio de las larvas de los insectos blanco.
BHI	medio de infusión cerebro-corazón
BSA	albúmina sérica bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bt-R1	<i>Bacillus thuringiensis</i> -receptor 1
CADR	receptor caderina
CDR	región determinante de complementariedad del anticuerpo
DNTp	desoxinucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
ε	coeficiente de extinción molar.
EDTA	ácido etilendiaminotetra-acético
Eri¹⁵	eritromicina a una concentración final de 15 µg/ml
F	intensidad de fluorescencia en presencia del apagador.
F₀	intensidad de fluorescencia en ausencia del apagador.
GPI	glicosilfosfatidilinositol
h	hora
HCT	medio mínimo de esporulación de hidrolizado de triptona caseína
K_{SV}	constante de Stern-Volmer para el apagado de la fluorescencia.
K_D	constante de Stern-Volmer para el apagado dinámico de la fluorescencia.
I_{max em}	intensidad de máxima emisión de la fluorescencia.
λ_{max em}	longitud de onda en la que se observa la máxima intensidad de emisión de la fluorescencia.
LC₅₀	concentración letal 50. Dosis de toxina administrada (en ng/cm ² de dieta) con la cual se observa una mortalidad de 50% de los insectos durante un periodo de tiempo dado.
MTSES	etilsulfonato de metanetiosulfonato
φ	rendimiento cuántico de la fluorescencia
PBS	buffer de fosfatos
PC	fosfatidilcolina
[Q]	concentración del apagador.
SUV	vesículas unilamelares pequeñas
TFP	toxinas formadoras de poro
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	revoluciones por minuto
scFv73	anticuerpo que mimetiza el sitio de unión del Bt-R1 para las toxinas Cry1A
T4PNK	cinasa de polinucleótidos T4

RESUMEN

Las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* son toxinas formadoras de poro con actividad insecticida muy específica. Estas toxinas se utilizan ampliamente como biopesticidas para el control de poblaciones de insectos plaga en cultivos agrícolas y en el control de algunos mosquitos que son vectores de enfermedades humanas. Su mecanismo de acción involucra la unión a diferentes receptores situados sobre la membrana de las células del intestino medio de sus insectos blanco y la formación de oligómeros que se insertan en la membrana lipídica, formando poros que rompen el equilibrio osmótico y lisan a las células intestinales, matando al insecto por inanición y septicemia.

La determinación de la estructura del poro que forman las toxinas Cry en la membrana lipídica es importante para comprender mejor su mecanismo de acción. Una hipótesis propone que la horquilla formada por las hélices α -4 y α -5 del dominio I de la toxina Cry se inserta en la membrana, mientras que el resto de las hélices del dominio I se extienden en la superficie de la bicapa, adoptando una conformación similar a la de una sombrilla. Sin embargo, una segunda hipótesis propone que los tres dominios de la toxina se insertan dentro de la membrana sin llevar a cabo grandes cambios conformacionales.

Para identificar a las regiones dentro de la estructura de la toxina insertada en la membrana lipídica que permanecen expuestas al solvente acuoso, o bien, a aquellas que se insertan dentro de la bicapa lipídica, en este trabajo construimos siete mutantes con cisteína única de la toxina Cry1Ab, ubicadas en los tres dominios estructurales de la toxina: T122C, V171C, G183C, S324C, S364C, K490C y N547C. Todas conservaron su toxicidad hacia larvas de *Manduca sexta*. Posteriormente, marcamos a las mutantes en el residuo de cisteína con fluoróforos que muestran una diferente respuesta a la polaridad del solvente (1,5-IAEDANS o Alexa Fluor-350), y realizamos ensayos de apagado dinámico de la fluorescencia extrínseca de las toxinas en solución e insertadas en la membrana (en BBMV's elaboradas con membranas del intestino medio de larvas de *Manduca sexta*), usando apagadores solubles en ambientes polares (ioduro de potasio o acrilamida), o bien, un apagador acoplado a la membrana lipídica (16:0-5 Doxyl PC).

El análisis del apagado y de los cambios en la fluorescencia extrínseca de las mutantes de la toxina Cry1Ab construidas, indica que los dominios II y III de la toxina permanecen fuera de la membrana y solo una región discreta del dominio I se inserta dentro de la bicapa lipídica, apoyando el modelo de inserción de sombrilla.

1. INTRODUCCIÓN

El control de los insectos plaga en la industria agrícola y de los insectos que son vectores de enfermedades de importancia para los humanos se lleva a cabo principalmente mediante el uso de insecticidas químicos. Sin embargo, el uso de esos pesticidas químicos ha generado varios problemas secundarios, como la contaminación ambiental y el incremento en los efectos sobre la salud humana, causando enfermedades como el cáncer y varios desordenes en el sistema inmune. Otra de las desventajas que muestran dichos insecticidas es la selección de poblaciones de insectos resistentes causado el surgimiento de plagas secundarias, y por otra parte, muestran un efecto tóxico sobre organismos no plaga o benéficos para los ecosistemas [1]. Aunque los insecticidas microbianos se han propuesto como sustitutos de los insecticidas químicos, su uso es limitado debido a que muchos microbios muestran un espectro de actividad reducido que les permite matar solamente a ciertas especies de insectos. Por otra parte, presentan poca persistencia en el ambiente y requieren de prácticas de aplicación precisas, ya que algunos de esos patógenos son específicos solamente para los estadios larvarios tempranos de los insectos, o bien, son sensibles a la irradiación de la luz solar (principalmente a la luz UV) [2].

Entre los diferentes agentes de control biológico, las bacterias patógenas de insectos han sido de las alternativas más estudiadas. Aún cuando diversas bacterias infectan y matan insectos, *Bacillus thuringiensis* (Bt) es la más utilizada de manera comercial y actualmente abarca aproximadamente el 2 % del mercado total de insecticidas [3].

1.1. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas bioinsecticidas Cry

1.1.1. Características generales de *Bacillus thuringiensis*

Clasificación taxonómica de *B. thuringiensis*:

Reino:	Eubacteria
Filum:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacilliales
Familia:	Bacillaceae
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>B. thuringiensis</i>

B. thuringiensis es una bacteria Gram-positiva, ubicua ya que se ha aislado de diversos sistemas como el suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos y telarañas [4]. Es aerobia estricta y está relacionada morfológicamente con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* [5] (Fig. 1.1).

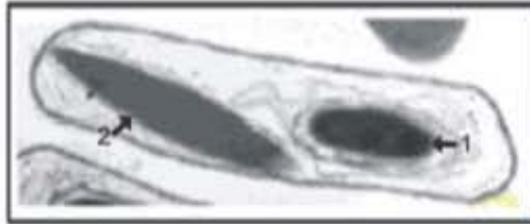


Figura 1.1 Microfotografía de una cepa de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión. Se observa la espora elíptica (1) y el cristal proteico parasporal con forma bipiramidal (2).

Presenta dos fases principales durante su ciclo de vida:

1) Fase de crecimiento vegetativo: las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 minutos, dependiendo del medio de cultivo.

2) Fase de esporulación: es una etapa de diferenciación de bacteria a espora que consta de siete estadios y comienza cuando la bacteria crece en un medio con una cantidad limitada de nutrientes [6]. Durante esta fase, Bt produce cristales parasporales dentro de la célula madre con propiedades insecticidas. Dichos cristales son de naturaleza proteica (se estima que hasta el 30 % de la proteína celular puede estar contenida en estas inclusiones) y están compuestos en su mayoría de una o más proteínas cristalinas (Cry) y citolíticas (Cyt), también llamadas δ -endotoxinas.

1.1.2. Características de las toxinas producidas por *B. thuringiensis*

Existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt (Fig.1.2). Estas toxinas son altamente específicas hacia sus insectos blanco e inocuas para los humanos, vertebrados y plantas. Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros, nemátodos, gusanos planos y protozoarios [4]. Estas características, aunadas al hecho de que son biodegradables, hacen que Bt constituya una alternativa viable para el control de insectos plaga en la agricultura y de algunos vectores que transmiten enfermedades humanas de gran importancia médica [7].

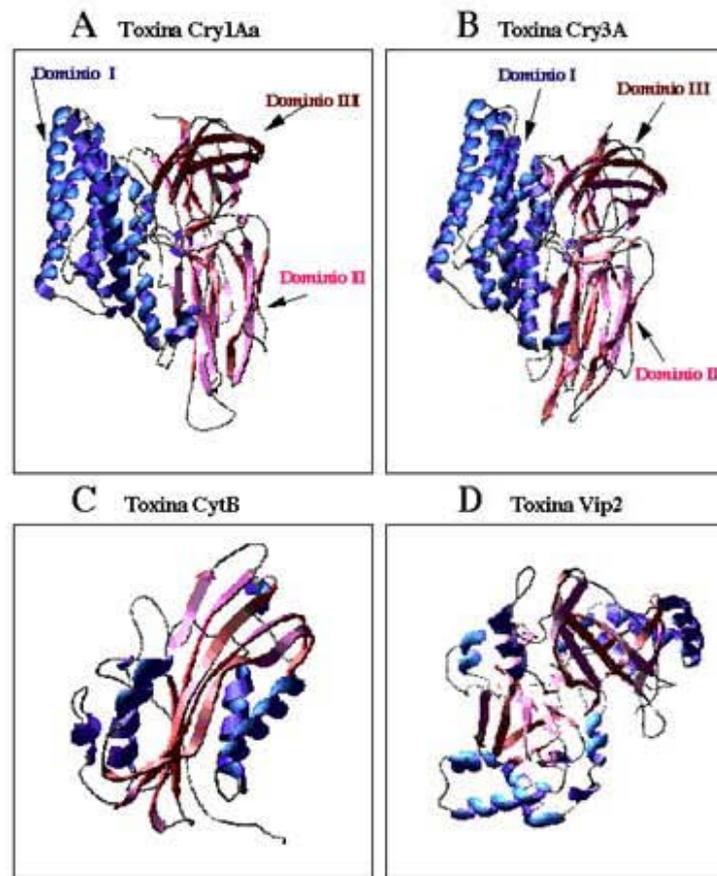


Figura 1.2. Estructura tridimensional de algunas proteínas insecticidas producidas por Bt. A) toxina Cry1Aa, B) toxina Cry3A, C) toxina CytB, D) toxina Vip2.

La definición de proteínas Cry es cualquier proteína parasporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable experimentalmente, o bien, cualquier proteína que muestre similitud significativa en la secuencia respecto a las proteínas Cry conocidas [8].

Las proteínas Cyt denotan a las proteínas parasporales de Bt que muestren actividad hemolítica o bien, proteínas que presenten similitud significativa con la secuencia de las proteínas Cyt conocidas [8]. Se ha reportado que las proteínas Cyt potencian sinérgicamente la actividad de las proteínas Cry en las cepas de Bt que matan insectos dípteros. Además, abaten la resistencia mostrada por algunos mosquitos hacia las toxinas Cry11 y Cry4. Se ha reportado que la toxina Cyt1Ac puede funcionar como receptor para estas toxinas Cry dentro del intestino de los mosquitos [9].

Las toxinas Cry y Cyt de Bt pertenecen a una clase de toxinas bacterianas conocidas como toxinas formadoras de poro (TFP), las cuales no poseen gran similitud a nivel de secuencia de aminoácidos, pero en cambio, muestran un mecanismo de acción similar. Por lo general, las toxinas son secretadas como proteínas solubles al agua, se unen a un receptor o lípidos específicos y sufren cambios conformacionales para poder

insertarse en las membranas celulares de su huésped y formar un poro [10]. Hay dos grupos principales de TFP:

- a) Las α -TFP: las cuales se insertan en la membrana formando un poro transmembranal constituido por regiones de α -hélice altamente hidrofóbicas. Agrupan a toxinas como las colicinas, la exotoxina A y la toxina de la difteria [10].
- b) Las β -TFP: las cuales se insertan dentro de la membrana mediante la formación de un β -barril compuesto por asas de láminas beta de cada monómero. Comprenden toxinas como la aerolisina, α -toxina, α -hemolisina o ántrax, que producen poros heptaméricos, y las toxinas dependientes de colesterol, como la perfringolisina O [10].

Además de las δ -endotoxinas, *Bt* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a sus organismos blanco con mayor eficiencia. Entre estos factores de virulencia se encuentran: fosfolipasas [11], proteasas [12], quitinasas, α -exotoxinas o exotoxinas termolábiles [13], las β -exotoxinas (tóxicas para mamíferos, ya que funcionan como análogos de ATP, compitiendo la unión de este último a la RNA polimerasa dependiente de DNA, e impidiendo la transcripción [14-16]), y las proteínas VIP, que son proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento y son secretadas al medio extracelular [17]. Las proteínas VIP se han cristalizado y contienen un dominio semejante al sitio activo de proteínas con actividad de ribosilación de ADP (Fig. 1.2.D). Se propone que estos factores ayudan a la bacteria durante la infección del insecto y en algunos casos se ha reportado que la mezcla esporas/cristales mata más eficientemente que los cristales por sí solos.

1.1.3. Clasificación y nomenclatura de las δ -endotoxinas de *Bt*

Las toxinas Cry se clasifican por su secuencia primaria de aminoácidos. Se han agrupado más de 500 secuencias diferentes de genes *cry* en 69 grupos (Cry1-Cry69) [8, 18]. Cada grupo muestra diferentes especificidades hacia ciertos tipos de insectos y se ha sugerido que la gran diversidad de los genes *cry* se generó, en parte, por la coevolución de dichos genes con las diferentes especies de insectos blanco. Esto sugiere que en la naturaleza podría haber una distribución de los genes *cry* directamente relacionada con la distribución de diferentes especies de insectos [19]. La lista actualizada con los miembros de las toxinas Cry se puede encontrar en la siguiente dirección de internet: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.

Las secuencias de genes *cry* han sido divididas en 4 familias de proteínas sin relación filogenética entre ellas, las cuales pueden tener diferentes modos de acción: la familia de toxinas Cry de tres dominios (3D), la familia de toxinas Cry que matan a

mosquitos (Mtx), la familia de proteínas parecidas a las toxinas binarias (Bin) y la familia de toxinas Cyt [2].

La familia de proteínas Cry de tres dominios es la más grande. Está formada de por lo menos 40 grupos y más de 200 secuencias genéticas diferentes. En la Figura 1.3 se muestra un filograma de identidad entre dichas proteínas. Las líneas verticales representan los límites de identidad que marcan las diferentes categorías en la nomenclatura. El número arábigo se designa con la primera fila que corresponde hasta **45 % de identidad**. La segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de **45 a 78 %**. La tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de **78 a 95 %**. La última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando **más del 95 %** de identidad [8].

1.1.4. Estructura de las proteínas Cry de tres dominios

Los miembros de la familia de proteínas Cry de tres dominios comprenden el grupo más grande de proteínas Cry y son moléculas globulares que contienen tres dominios estructurales unidos por enlaces sencillos. Una característica particular de los miembros de esta familia es la presencia de protoxinas con dos longitudes diferentes [20]. Un grupo mayoritario de protoxinas es de aproximadamente el doble de largo en comparación con el resto de las protoxinas (Fig. 1.4a). La extensión C-terminal encontrada en las protoxinas más largas es dispensable para la toxicidad y se cree que juega un papel en la formación de los cuerpos de inclusión cristalinos dentro de las bacterias [20]. Esta región C-terminal es procesada por las proteasas del intestino de la larva originando con esto a las toxinas de aproximadamente 60-70 kDa, en la mayoría de las toxinas Cry de tres dominios.

La mayoría de las toxinas Cry tienen 5 bloques altamente conservados que se localizan en las regiones de contacto entre los tres dominios o en regiones internas de los dominios I y III [8], por lo que se ha propuesto que las toxinas Cry que contienen estas regiones conservadas tienen estructuras tridimensionales y mecanismos de acción semejantes [20] (Fig. 1.4).

El **dominio I** de la toxina se sitúa hacia el lado N-terminal. Está constituido por un grupo de 7 α -hélices antiparalelas y anfipáticas, seis de las cuales forman un ramillete que rodea a la hélice α -5, la cual corresponde a la primera de las 5 regiones conservadas. Exceptuando a las hélices α 1 (~20 Å), α 2a (~14 Å) y α 2b (~ 21 Å), las α -hélices restantes tienen una longitud de más de 30 Å, por lo cual son de tamaño suficiente para atravesar la membrana. Este dominio es responsable de la inserción en la membrana y de la formación del poro (Fig. 1.4b, 1.4c).

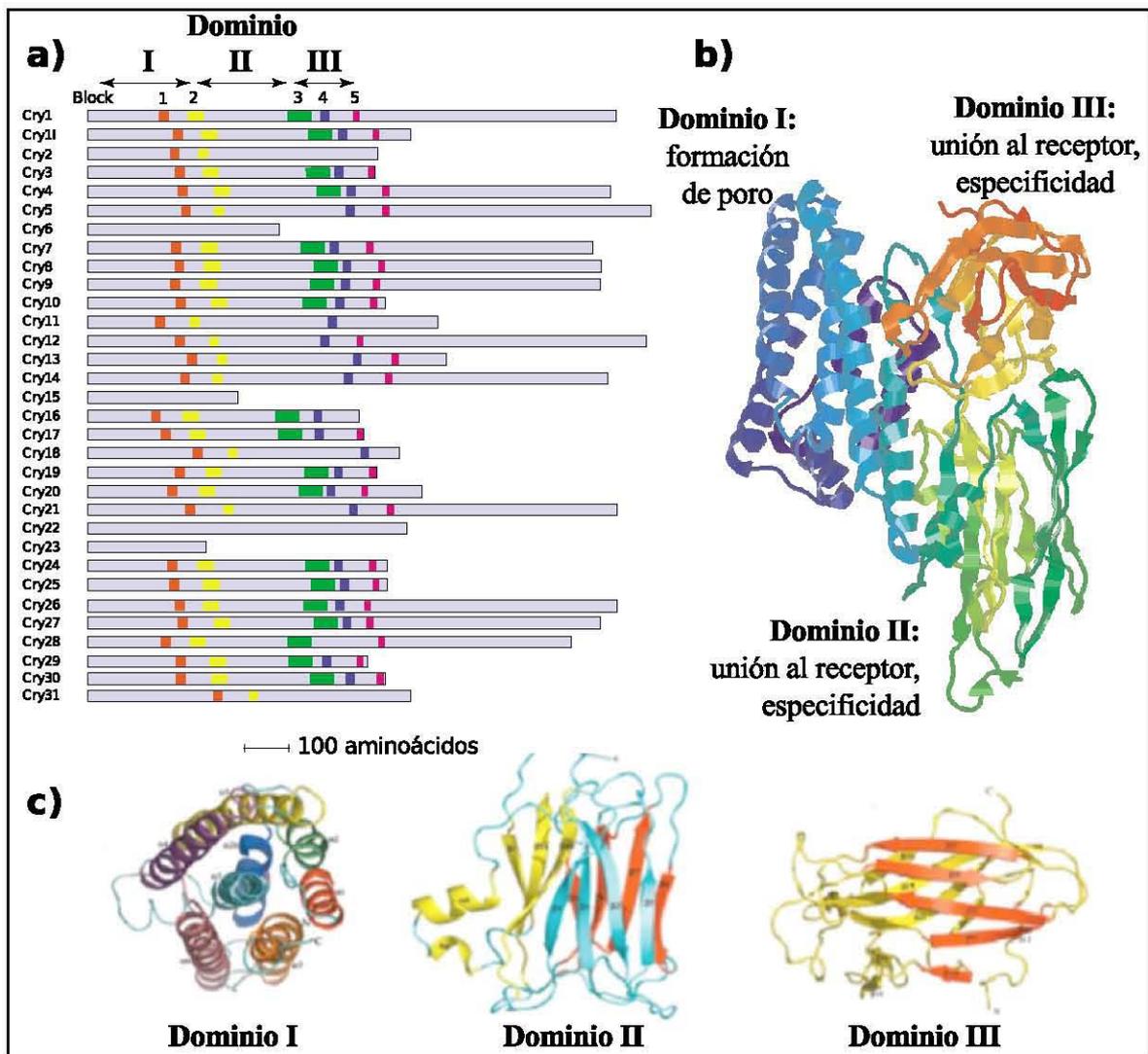


Figura 1.4. Estructura primaria y terciaria de las toxinas Cry. a) Longitud relativa de algunas protoxinas Cry en las cuales se señalan los cinco bloques conservados, si es que los presentan [14, 20]. b) Estructura terciaria de la toxina Cry1Aa activada, mostrando los tres dominios estructurales. El dominio I (en azul) está involucrado en la inserción en la membrana y la formación del poro. El dominio II (en verde) y el III (en naranja-amarillo) participan en el reconocimiento del receptor y en la unión a la membrana del insecto blanco [20]. c) Dominios funcionales de las toxinas Cry mostrados por separado.

El **dominio II** es el menos conservado en secuencia y estructura terciaria entre las toxinas Cry de 3 dominios. Está formado por tres láminas β plegadas y por tres asas expuestas. En las asas de estas láminas β se observa la mayor diferencia estructural y éstas juegan un papel fundamental en la especificidad de la toxina [21], debido a que dichas asas interactúan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio [22] (Fig. 1.4b y 1.4c).

El **dominio III** está formado por dos láminas β plegadas antiparalelas. La lámina exterior es accesible al solvente y la interior se encuentra de cara a los otros dominios (Fig. 1.4b y 1.4c). Se ha propuesto que este dominio protege a la toxina de la acción

proteolítica de las enzimas digestivas [23] y que la interacción entre los dominios I y III es importante para la estabilidad e integridad de la protoxina [24]. También está involucrado en la especificidad de la toxina, ya que el intercambio del dominio III entre diferentes toxinas provoca cambios en su especificidad [25]. Además, dicho dominio muestra similitudes estructurales con otras proteínas de unión a carbohidratos como es el dominio de la 1,4- β -glucanasa C, la galactosa oxidasa, la sialidasa, la β -glucuronidasa y el dominio de unión a los carbohidratos de la Xylanasa U y de la β -galactosidasa, sugiriendo así que los motivos con carbohidratos pueden jugar un papel muy importante en el modo de acción y unión al receptor de las toxinas Cry de tres dominios [26].

Mediante la comparación filogenética se ha sugerido que el dominio I y II coevolucionaron, mientras que el dominio III evolucionó de forma independiente [19]. Dicha evolución independiente de los dominios estructurales y el intercambio del dominio III entre diferentes toxinas ha generado proteínas con modos de acción similares pero con especificidades diferentes [19, 20].

Hasta ahora se han resuelto por cristalografía de rayos X las estructuras terciarias de siete diferentes proteínas Cry de tres dominios: Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea [24, 27-32]. Cuando se comparan sus secuencias, estas toxinas sólo comparten aproximadamente un 10 % de identidad, sin embargo, la estructura terciaria está conservada, lo que sugiere que podrían tener mecanismos de acción similares [33].

1.1.5. Mecanismo de acción de las proteínas Cry

El modo de acción de las toxinas Cry ha sido caracterizado principalmente en lepidópteros. En estos insectos las toxinas Cry actúan principalmente mediante la lisis de las células epiteliales del intestino medio del insecto blanco, debido a la formación de poros en la membrana celular apical de las microvellosidades de las células del intestino de la larva [7, 20, 34].

Por otra parte, se ha sugerido que la toxicidad puede estar relacionada con la muerte celular mediada por cinasas de proteínas (pKA), la cual es iniciada después de la unión de la toxina al receptor caderina [35]. Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha demostrado que esto no es del todo correcto, ya que existen toxinas Cry1A mutantes que carecen de la hélice α -1, las cuales no requieren de la interacción con el receptor caderina para matar al insecto y que son capaces de formar poros oligoméricos en la membrana celular del huésped. Además, estas mutantes son capaces de matar a insectos resistentes a la toxina Cry, los cuales carecen del receptor caderina debido a una mutación en su genoma [36].

Un tercer modelo de acción sugiere que después de la ruptura de la membrana ocasionada por las toxinas Cry, se requiere de otras bacterias para causar la muerte del insecto por septicemia [37].

El mecanismo de acción para las proteínas Cry se ha dividido en varios pasos principales: solubilización del cristal, procesamiento de las protoxinas, unión en “ping pong” a sus receptores [38, 39], formación del prepore, inserción en la membrana lipídica, formación de poro y citólisis (Fig. 1.5).

Los síntomas que presentan las larvas de insectos susceptibles que ingieren los cristales y esporas de Bt son: parálisis casi inmediata de la motilidad del intestino y después de 1 o 2 días la detención de la ingesta de alimento, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte por inanición y septicemia [40].

Estudios histopatológicos han mostrado que las células columnares del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente y en particular, la microvellosidad apical, la cual se destruye en su totalidad [41, 42]. Los efectos en el otro tipo de células de las que está constituido el intestino medio de los lepidópteros, las células caliciformes, son más lentos, pero en este caso también se ha observado citólisis [43, 44].

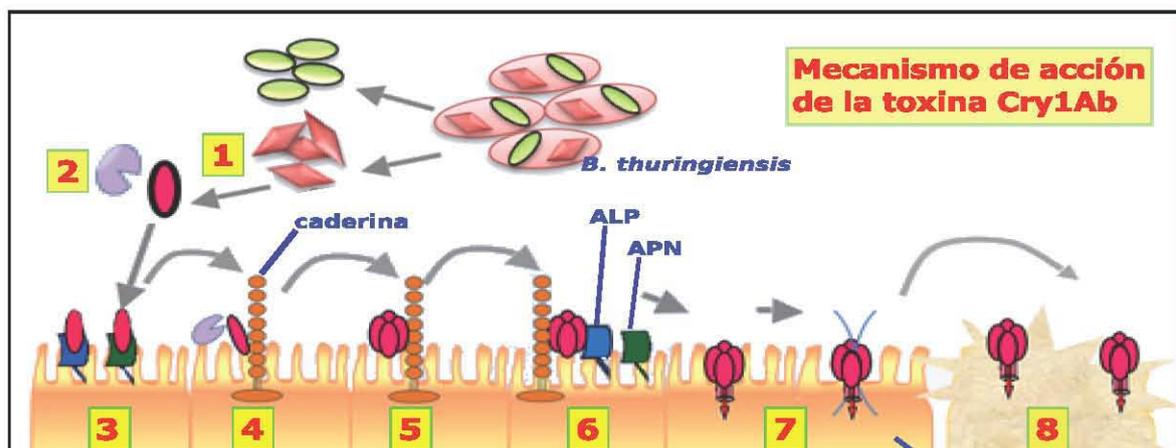


Figura 1.5. Representación esquematizada del modo de acción propuesto en nuestro laboratorio para las toxinas Cry1A. Una vez que la larva del insecto susceptible ingiere el cristal proteico, éste se solubiliza en el ambiente alcalino y reductor del intestino de la larva, liberando a la protoxina con un tamaño de 130 kDa (1). La protoxina es procesada por algunas proteasas específicas presentes en el jugo gástrico del intestino del insecto, liberando el fragmento tóxico de 60 kDa (2). La toxina se une con baja afinidad (100 nM) a los receptores abundantes APN y ALP (3) situados sobre las microvellosidades del epitelio intestinal y posteriormente se une con una mayor afinidad al receptor menos abundante caderina (1 nM) (4). Esta unión favorece un cambio conformacional en la toxina, el corte proteolítico de la hélice α -1 del dominio I de la toxina (4) y la formación del oligómero prepórico de ~250 kDa (5). El oligómero adquiere una mayor afinidad de unión hacia los receptores APN o ALP (0.75 nM) situados en las balsas lipídicas membranales (6). La unión al segundo receptor ocasiona cambios conformacionales en el oligómero que facilitan su inserción en la membrana, la formación del canal iónico lítico y la disrupción del potencial de membrana (7), ocasionando en última instancia la muerte del insecto por inanición y septicemia (8). Modificado de [2].

1.1.5.1. Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry

Los cristales producidos por Bt se solubilizan a pH alcalino liberando a la protoxina [45]. Además, se requiere un medio ambiente reductor para romper los puentes disulfuro que son abundantes en la mitad C-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa [46].

La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos liberando el fragmento tóxico resistente a las proteasas.

Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas Cry se da por el corte de un péptido N-terminal (25-30 residuos de aminoácidos en las toxinas Cry1A, 58 residuos para la Cry3A y 49 para la Cry2Aa) y de aproximadamente la mitad de la proteína restante en el lado C-terminal en el caso de las protoxinas Cry más largas. La posición del sitio de procesamiento en el extremo C-terminal no es constante [47-49]. La Figura 1.6 muestra una representación esquemática de la estructura de algunas protoxinas Cry y sus sitios correspondientes de corte proteolítico.

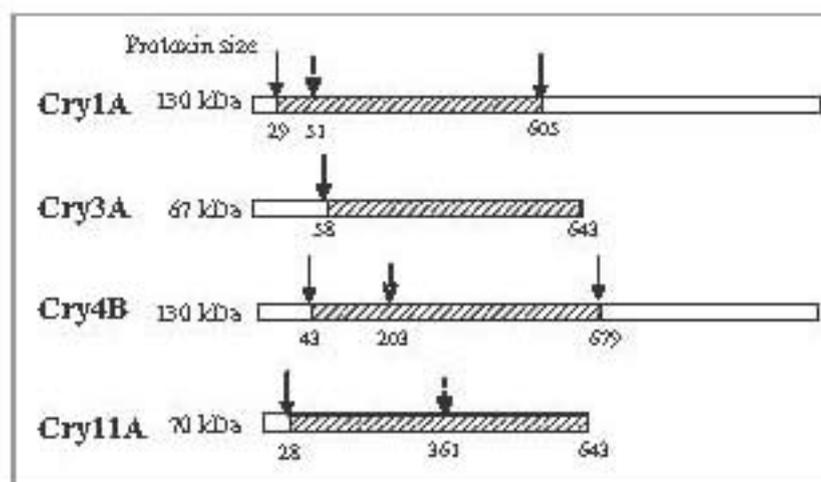


Figura 1.6. Longitud relativa de las protoxinas Cry y posición de los sitios de corte proteolítico [50]. Las flechas muestran los sitios de corte en la porción amino y carboxilo terminales de la toxina activada. Las flechas punteadas muestra los sitios intramoleculares de corte. El corte de la Cry 1A en el residuo 51 ocasiona la pérdida de la hélice α -1 y la formación del preporo. El corte de la Cry4B da como resultado dos fragmentos de 18 y 46 kDa, mientras que el de la Cry11A resulta en dos fragmentos de 34 y 32 kDa.

1.1.5.2. Unión al receptor

Después de ser activadas, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad apical de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles. La unión a estos sitios es muy específica y es una etapa determinante en la toxicidad [51].

Los estudios de competencia homóloga han mostrado que la cinética de unión de las toxinas Cry a las BBMVs de los insectos susceptibles es bifásica, compuesto de un

paso reversible y otro irreversible [51, 52]. La interacción inicial entre la toxina y su sitio de unión (unión reversible) es necesaria para la toxicidad pero no es suficiente. Los eventos posteriores tales como la unión irreversible y la inserción en la membrana parecen estar más correlacionados con la toxicidad.

Algunas mutaciones en la toxina afectan la etapa inicial de la interacción con el receptor (unión reversible) produciendo proteínas con menor afinidad y con menor toxicidad. Otras mutaciones causan cambios en la segunda etapa de la interacción con el receptor (la unión irreversible) conduciendo también a una baja toxicidad [52, 53].

La mutagénesis del dominio II ha generado toxinas con mejores parámetros de unión que resultaron ser más tóxicas. Se ha determinado que las cuatro regiones prominentes en esta interacción en el dominio II son: el asa de la α -hélice 8 y el asa 1 (entre $\beta 2$ y $\beta 3$), 2 (entre $\beta 6$ y $\beta 7$) y 3 (entre $\beta 10$ y $\beta 11$). El dominio III también participa en la determinación de la especificidad y se ha visto que el intercambio del dominio III entre diferentes toxinas puede generar un cambio en la especificidad de las toxinas hacia sus insectos blanco.

Para la mayoría de las toxinas Cry1 estudiadas, se ha encontrado que las moléculas a las que se unen con alta afinidad son glicoproteínas de entre 63 y 220 kDa [53-57]. Se propone que la interacción inicial es la existente entre la toxina y el carbohidrato del receptor, mientras que la unión irreversible se asocia con una interacción proteína-proteína y la inserción en la membrana.

Algunas de las proteínas de unión descritas para las toxinas Cry1A en diferentes insectos lepidópteros son: a) una proteína parecida a la caderina (CADR), b) una aminopeptidasa-N (APN) anclada a glicosilfosfatidil inositol (GPI), c) una fosfatasa alcalina (ALP) anclada a GPI y d) un glicoconjugado de 270 kDa [58-61] (Fig. 1.7).

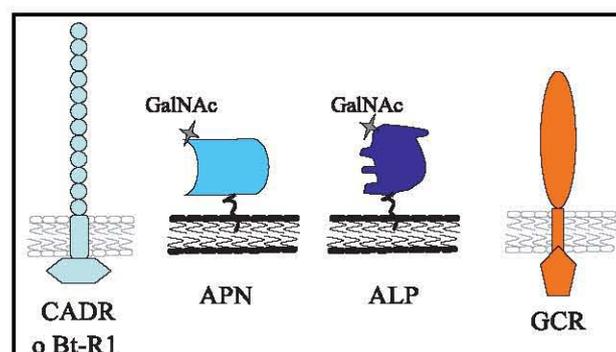


Figura 1.7. Moléculas que funcionan como receptor de las proteínas Cry1A [50]. CADR: receptor caderina, APN: aminopeptidasa N, ALP: fosfatasa alcalina y GCR: receptor glicoconjugado de 270 kDa.

El mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha descrito principalmente en insectos lepidópteros, utilizando como modelo de estudio a las larvas de *Manduca sexta*. En este insecto se han reportado varias moléculas que funcionan como receptores para las toxinas Cry1A, entre las cuales se tiene a una caderina (CADR, también conocida como Bt-R1), una APN y una ALP (estas dos últimas ancladas a GPI). Las caderinas son proteínas transmembranales con un dominio citoplásmico y un dominio extracelular que cuenta con varias repeticiones de caderina. El ectodominio contiene sitios de unión a calcio, de interacción con la integrina y de unión a la caderina. Experimentos de unión en tiempo real muestran que la afinidad de unión de las toxinas monoméricas Cry1A con el receptor Bt-R1 está en orden de 1 nM [58, 62, 63], mientras que con la APN y ALP está en el orden de 100 nM [39, 63].

La interacción de las toxinas Cry1A con el receptor Bt-R1 es muy compleja e involucra por lo menos a tres epítopos de unión dentro de las dos moléculas. Usando una librería sintética de anticuerpos desplegados en fagos, se caracterizó el anticuerpo scFv73 que une al asa 2 del dominio II (asa $\beta 6 - \beta 7$) de las toxinas Cry1A [64, 65]. Dicho anticuerpo inhibe la unión de las toxinas Cry1A hacia el Bt-R1 pero no así hacia la APN. El análisis de la secuencia de la región CDR3H del scFv73 condujo a la identificación de un epítipo de 8 aminoácidos en la repetición CADR7 dentro del Bt-R1 (869 HITDTNNK 876) el cual está involucrado en la unión de la toxina con el asa 2 del dominio II de las toxinas Cry1A [64, 65]. Además, se ha identificado otro epítipo de unión en la repetición CADR 11 dentro del Bt-R1 (1331 IPLPASILTVTV 1342) el cual interactúa con el asa $\alpha 8$ del dominio II (asa $\alpha 8a - \alpha 8b$) y el asa 2 de la toxina Cry1Ab [66]. Finalmente, una tercera región involucrada en la interacción con la toxina Cry1Ab se encuentra dentro de la repetición CADR 12 del Bt-R1 (residuos 1363-1464) [67].

Basados en el uso de anticuerpos monoclonales que compiten la unión de Cry1A con la APN de *Bombix mori*, los epítopos interactuantes Cry1Aa-APN han sido recientemente mapeados dentro de los residuos de la $\beta 16$ del dominio III (508 STLRVN 513) y de la $\beta 22$ (582 VFTLSAHV 589) [68].

Cabe destacar que el mecanismo más frecuente de la resistencia hacia las toxinas Cry involucra cambios en las regiones del receptor de unión a la toxina [69].

1.1.5.3. Formación del oligómero preporo

Algunas toxinas TFP forman una estructura oligomérica antes de su inserción en la membrana. En el caso de la toxina Cry1Ab, la unión de esta toxina al Bt-R1 de *M. sexta* promueve un corte proteolítico adicional en el extremo N-terminal de la toxina, eliminando a la hélice α -1 y facilitando la formación de una estructura oligomérica pre-

poro, la cual es importante para la inserción dentro de la membrana y para la toxicidad [70, 71].

La incubación *in vitro* de la protoxina Cry1Ab junto con el anticuerpo de cadena simple scFv73, que mimetiza al receptor CADR, o con los peptídicos de unión a la toxina del receptor Bt-R1 (repetidos CADR 7, CADR11 y CADR12), y el tratamiento con el jugo gástrico de *M. sexta*, dan como resultado preparaciones de toxina con la formación de un oligómero de ~250 kDa que carece de la hélice α -1 del dominio I [66, 70]. Se ha reportado que las estructuras oligoméricas de Cry1Ab y Cry1Ac incrementan su afinidad de unión hacia el receptor APN en 100 a 200 veces en comparación con el monómero, mostrando una constante de disociación aparente de 0.75 nM a 1 nM [66, 72]. El oligómero en contraste con el monómero de 60 kDa, es competente para su inserción en la membrana, como se observó en experimentos basados en la medición de la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano de la toxina Cry1Ab, y también mediante el análisis de la permeabilidad en membranas, usando bicapas lipídicas sintéticas planas [71].

La actividad de poro de la estructura oligomérica de la toxina Cry1Ab analizada en bicapas lipídicas sintéticas reveló diferentes características cinéticas en relación a la actividad de poro de la toxina monomérica Cry1Ab, como son:

1) Al utilizar preparaciones puras de toxina en su forma oligomérica se requirió de una menor cantidad de toxina para observar la formación de poro (hasta 20 veces menos), en relación a la gran cantidad de de toxina Cry1Ab monomérica necesaria para observar la formación de poro (>100 nM).

2) Las cinéticas fueron diferentes el oligómero de la toxina Cry1Ab mostró canales estables que tienen una gran probabilidad de apertura en contraste con la toxina monomérica que muestra patrones inestables de apertura [71].

La formación de estructuras oligoméricas Cry ha sido demostrada para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry3, Cry4Ba y Cry11Aa [70, 71, 73]. En todos los casos, las muestras de toxinas Cry que contienen estructuras oligoméricas se correlacionan con una gran actividad de poro, en contraste con las muestras monoméricas que muestran una actividad deficiente de formación de poro, apoyando a la hipótesis de que la formación del oligómero es un paso necesario en el mecanismo de acción de las toxinas Cry [50].

La estructura de la toxina Cry4Ba asociada a la membrana ha sido analizada por microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en ingles) y por cristalografía electrónica. Los estudios de AFM indican que la toxina se inserta en la membrana adoptando preferencialmente una estructura parecida a un poro con simetría tetra-radial,

sugiriendo que los tetrámeros constituyen el estado preferencial de oligomerización de esta toxina [74]. Sin embargo, las estructuras de proyección calculadas a partir de los análisis por cristalografía electrónica a una resolución de 17 Å de cristales en dos dimensiones de la toxina Cry4Ba, muestran una organización de trímero [75]. De manera similar, el análisis mediante AFM de la estructura de la toxina Cry1Aa insertada dentro de membranas monocapa sugiere que los poros están compuestos de cuatro subunidades rodeando una depresión central de 1.5 nm de diámetro [76], y los análisis por cristalografía electrónica de la toxina Cry1AbMod asociada a la membrana muestran que esta adopta una organización de trímero [77].

1.1.5.4. Inserción en la membrana

Se ha reportado que las toxinas Cry en forma de oligómero se insertan en microdominios de membrana conocidos como balsas lipídicas o "lipid rafts" y se ha encontrado que la integridad de esos microdominios es esencial para la actividad de formación de poro *in vitro* de la toxina Cry1Ab [78]. El receptor Bt-R1 está localizado dentro de la membrana soluble, en contraste con los receptores APN y ALP, los cuales están unidos a la membrana mediante GPI y están posicionados preferencialmente dentro de las balsas lipídicas.

Otras toxinas formadoras de poro también interactúan con receptores localizados dentro de las balsas lipídicas y se ha visto que dicha interacción es un paso clave para la oligomerización e inserción dentro de la membrana de diversas TFP [79]. Se ha propuesto que algunas TFP pueden desplegarse parcialmente para facilitar la inserción en la membrana y la formación del canal. En el caso de las TFP que son activas contra células de mamíferos, el desplegamiento es ocasionado por el pH ácido presente en la superficie membranal (que presenta un pH que puede ser hasta 2 unidades menor respecto al pH extracelular) y dentro de los compartimentos ácidos membranales, después de que se lleva a cabo la internalización celular de las toxinas [10].

El análisis de desplegamiento de estructura de las toxinas Cry1Ab a diferentes pH demostró que las toxinas Cry se despliegan parcialmente en pHs alcalinos y están muy compactas en pHs ácidos [80]. Interesantemente los insectos lepidópteros y dípteros muestran un pH básico (de hasta 11 unidades) dentro del lumen del intestino medio [81]. Además, se ha reportado que existe un cambio conformacional después de la interacción del oligómero con la APN, el cual facilita la inserción en la membrana [72]. En el oligómero insertado en la membrana, solo el dominio I está protegido de la desnaturalización por calor, sugiriendo que este puede estar insertado dentro de la membrana en contraste con los dominios II y III que quedarían fuera de la membrana [80].

1.1.5.5. Citólisis

Se ha propuesto que las proteínas Cry causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH y por citólisis osmótica [82].

Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto causa a su vez que se pierda la diferencia de potencial de membrana y la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, la redistribución de los cationes entre el lumen intestinal y el citoplasma, la alcalinización del citoplasma celular y finalmente la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células columnares y caliciformes se destruyen, las esporas de *Bt* tienen acceso a la hemolinfa, medio en el que pueden proliferar [83]. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia [83].

1.2. Fluorescencia, marco teórico

1.2.1. Conceptos básicos de fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión de luz, en el cual las moléculas se excitan mediante la absorción de radiación electromagnética, pasando a un estado de mayor energía. Posteriormente, las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Por lo general, la luz emitida tiene una longitud de onda mas larga (menor energía), que la de la radiación absorbida. Una característica importante de la fluorescencia es su alta sensibilidad de detección, la cual con frecuencia es de uno a tres órdenes de magnitud mayor que la de la espectroscopía de absorción [84].

La fluorescencia típicamente se produce a partir de moléculas aromáticas. En la Figura 1.8 se muestran algunas sustancias fluorescentes (fluoróforos).

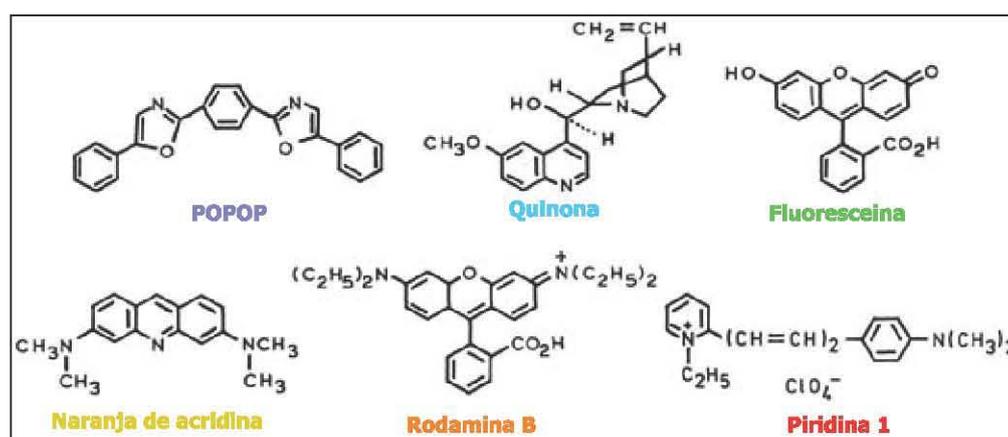


Figura 1.8. Estructura de algunos fluoróforos [84].

1.2.1.1. Diagrama de Jablonski

Los procesos que ocurren entre la absorción energética y la emisión de la fluorescencia a partir de una molécula, se ilustran por lo general en el diagrama de Jablonski (nombrado así en honor a Alexander Jablonski, padre de la espectroscopía de fluorescencia). Estos diagramas son usados en una variedad de formas para ilustrar varios de los procesos moleculares que pueden ocurrir en los estados excitados [85, 86].

En la Figura 1.9 se muestra el típico diagrama de Jablonski. Los estados singuletes basal, primero y segundo, son descritos por S_0 , S_1 y S_2 , respectivamente. En cada uno de esos niveles de energía electrónica los fluoróforos pueden existir en varios subniveles de energía vibracional (representados por 0, 1, 2, etc). Las transiciones entre los estados energéticos se muestran como líneas verticales para ilustrar la naturaleza instantánea de la absorción de la luz. Dichas transiciones ocurren en aproximadamente

10^{-15} s, un tiempo demasiado corto para que haya un desplazamiento significativo del núcleo (principio de Franck-Condon) [84].

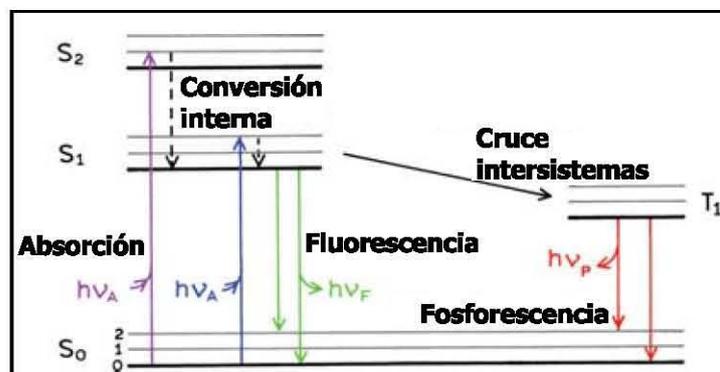


Figura 1.9. Diagrama de Jablonski [84]. S: estado singulete. T: estado triplete. $h\nu_A$ y $h\nu_F$: absorción y emisión de energía en forma de fotones, respectivamente.

En base a la Figura anterior, se puede definir a la fluorescencia como la emisión de la luz que se da a partir de los estados singulete excitados [84].

Después de la absorción de la luz, usualmente ocurren varios procesos:

- Un fluoróforo se excita para pasar a un nivel vibracional S₁ o S₂ (Fig. 1.9). En los estados singuletes excitados, el electrón en el orbital excitado está apareado, esto es, que posee una orientación de giro opuesto al segundo electrón en el orbital del estado basal S₀ [84].

- Por lo general, las moléculas en las fases condensadas se relajan de forma rápida hacia el subnivel vibracional de menor energía de S₁. Este proceso se llama conversión interna y generalmente ocurre dentro de 10^{-12} s o menos [84].

- El tiempo de vida de un fluoróforo (τ) es el tiempo promedio entre su excitación y su retorno al estado basal. Ya que los tiempos de vida de la fluorescencia son por lo general de 10^{-8} s, la conversión interna generalmente se completa antes de la emisión. De esta forma, la emisión de la fluorescencia se da a partir de un estado excitado térmicamente equilibrado, que es el estado vibracional de menor energía de S₁ [84].

- El regreso al estado basal por lo general ocurre hacia el subnivel vibracional de mayor energía de S₀, el cual posteriormente alcanza de forma rápida el equilibrio térmico (en 10^{-12} s) para situarse en el subnivel vibracional de menor energía dentro de S₀ (Fig. 1.9) [84].

Las moléculas en el estado S₁ también pueden llevar a cabo una conversión en el giro hacia el primer estado triplete T₁. La emisión a partir de dicho estado (T₁) se llama fosforescencia, y generalmente esta desplazada hacia longitudes de onda más largas (de

menor energía) en relación a las de la fluorescencia. La conversión de S_1 a T_1 se llama cruce intersistemas. Ya que la transición del estado T_1 hacia el estado singulete basal es poco probable, las constantes de velocidad para la emisión a partir del estado triplete son varios ordenes de magnitud mas pequeños que los de la fluorescencia.

Las moléculas que contienen átomos pesados como el bromo y el yodo por lo general son fosforescentes. Esto se debe a que dichos átomos facilitan el cruce intersistemas y por lo tanto aumentan los rendimientos cuánticos de la fosforescencia [84].

1.2.1.2. Características de la emisión de la fluorescencia

Los datos en espectroscopía de fluorescencia generalmente son presentados como espectros de emisión. Un espectro de emisión de la fluorescencia es una gráfica de la intensidad de fluorescencia contra la longitud de onda (en nanómetros) o bien, contra el número de ondas (en cm^{-1}) [84].

El fenómeno de fluorescencia muestra varias características generales (aunque se conocen algunas excepciones, poco frecuentes), entre las cuales tenemos a las siguientes:

Corrimiento de Stokes. Al examinar el diagrama de Jablonski (Fig. 1.9) se puede observar que la energía de emisión de la fluorescencia es típicamente menor que la de absorción. Así, la fluorescencia por lo general ocurre a menores energías, o mayores longitudes de onda (fenómeno conocido como corrimiento de Stokes). La pérdida energética entre la excitación y la emisión se observa de manera universal para las moléculas fluorescentes en solución. Una causa común del corrimiento de Stokes es el rápido decaimiento hacia el subnivel vibracional mas bajo de S_1 . Además, los fluoróforos por lo general decaen hacia los subniveles vibracionales mas altos de S_0 (Fig. 1.9), resultando en la pérdida adicional posterior de energía de excitación mediante termalización del exceso de energía vibracional dentro del estado S_0 . Aunado a esos efectos, los fluoróforos pueden mostrar corrimientos de Stokes adicionales debido a los efectos del solvente, a las reacciones en el estado excitado, a la formación de complejos y/o a la transferencia de energía [84, 87] .

Regla de Kasha. Después de la excitación hacia niveles electrónicos y vibracionales mayores, el exceso de energía se disipa rápidamente, dejando al fluoróforo en el subnivel vibracional mas bajo de S_1 . Esta relajación ocurre en 10^{-12} s, y probablemente resulta de la fuerte sobreposición de numerosos estados con energías muy similares. Debido a esta rápida relajación, los espectros de emisión generalmente son independientes de la longitud de onda de excitación (regla de Kasha). Cabe destacar que existen algunas excepciones, a dicha regla, como en el caso de algunos fluoróforos

que presentan dos estados de ionización, cada uno de los cuales posee diferentes espectros de emisión y excitación. Además, se sabe que algunas moléculas pueden emitir a partir del nivel S_2 , aunque dicha emisión es rara y generalmente no se observa en las moléculas biológicas [84, 88].

Regla de espejo. Una consecuencia interesante de la emisión hacia los subniveles vibracionales de mayor energía en el estado basal (S_0) es que el espectro de emisión por lo general es una imagen en espejo del espectro de absorción de la transición $S_0 \rightarrow S_1$. Esta similitud ocurre debido a que la excitación electrónica no afecta demasiado la geometría nuclear. De esta forma, el espacio entre los niveles energéticos vibracionales del estado excitado es similar a los del estado basal y como resultado, las estructuras vibracionales observadas en los espectros de absorción y de emisión son similares [84, 89].

Tiempo de vida y rendimiento cuántico de la fluorescencia: Son unas de las características más importantes de un fluoróforo. El rendimiento cuántico es el número de fotones emitidos en relación al número de fotones absorbidos. Las sustancias con los rendimientos cuánticos más grandes, cercanas a la unidad, como las rodaminas, muestran las emisiones más brillantes. El tiempo de vida también es importante, ya que determina el tiempo promedio en el que el fluoróforo permanece en el estado excitado y es el tiempo disponible para que el fluoróforo interactúe con otras moléculas o difunda en su ambiente, y de esta forma proporcione la consiguiente información con su emisión [84].

1.2.2. Fluoróforos

Los fluoróforos se pueden dividir en dos grupos principales, intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos son aquellos que se encuentran de manera natural en la muestra. Estos incluyen a los aminoácidos aromáticos, al NADH, las flavinas, los derivados del pirroxidil, etc. Los fluoróforos extrínsecos son agregados a la muestra para proveer de fluorescencia cuando no existe, o para cambiar las propiedades espectrales de la muestra. Los fluoróforos extrínsecos incluyen al dansilo, a la fluoresceína, la rodamina, etc [84].

1.2.2.1. Fluoróforos intrínsecos

La fluorescencia intrínseca de las proteínas se debe a los aminoácidos aromáticos como el triptófano, la tirosina y la fenilalanina (Fig. 1.10) [90-92]. Los grupos indol de los triptófanos son la fuente dominante de absorción de luz UV y de la emisión de las proteínas. La tirosina tiene un rendimiento cuántico similar al triptófano (Tabla 1.1), pero su espectro de emisión está distribuido de forma más estrecha en la escala de longitudes de onda (Fig. 1.11). Esto da la impresión de un mayor rendimiento cuántico para la

tirosina. En las proteínas nativas la emisión de la tirosina se encuentra a menudo apagada, lo que se puede deber a su interacción con la cadena peptídica o a una transferencia de energía hacia el triptófano. La desnaturalización de las proteínas frecuentemente origina un incremento en la emisión de la tirosina. De forma similar a como sucede para el caso del fenol, el Pk_A de la tirosina disminuye dramáticamente después de su excitación, favoreciendo que ocurra la ionización del estado excitado. La emisión de la fenilalanina se observa solo cuando la muestra proteica carece de residuos de triptófano y de tirosina, lo cual ocurre raramente [84].

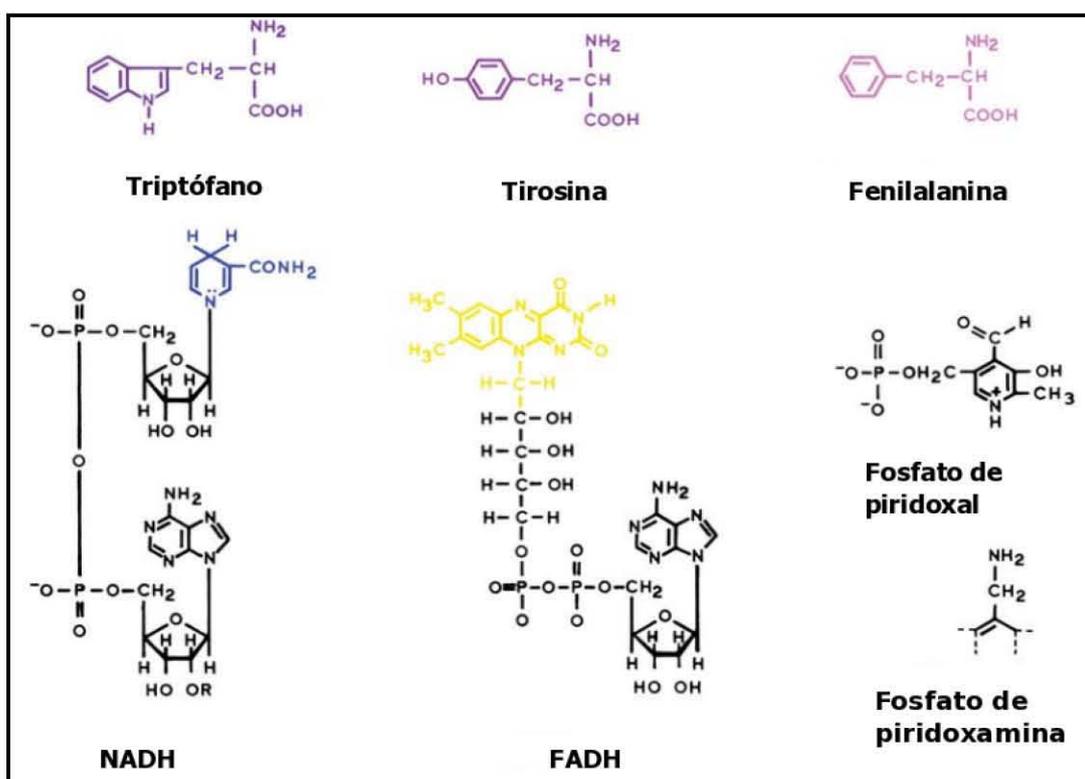


Figura 1.10. Algunos fluoróforos intrínsecos y bioquímicos. R representa a un hidrógeno en el NADH, y a un grupo fosfato en el NADPH [84].

Tabla 1.1. Parámetros de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos en agua, a pH neutro [90]					
Aminoácido	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Ancho de banda (nm)	Rendimiento cuántico	Tiempo de vida (ns)
Fenilalanina	260	282	-	0.02	6.8
Tirosina	275	304	34	0.14	3.6
Triptófano	295	353	60	0.13	3.1 (media)

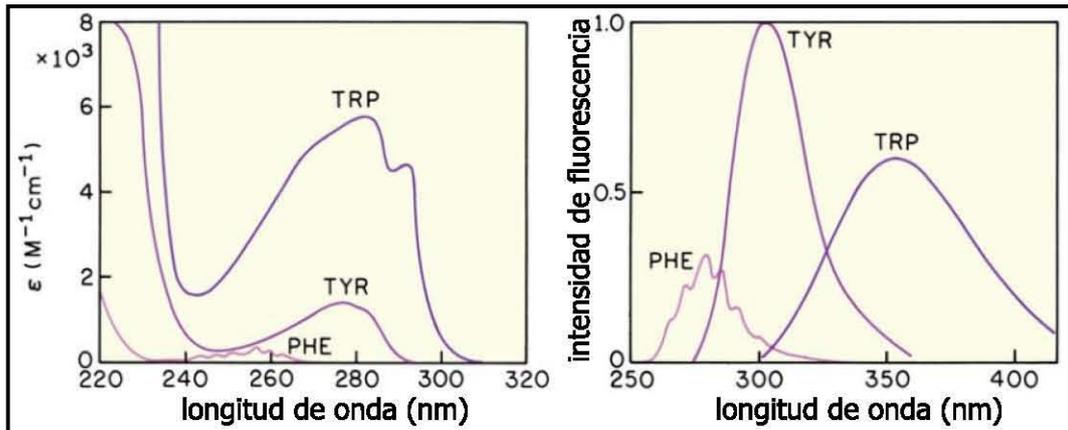


Figura 1.11. Espectros de absorción y de emisión de los aminoácidos fluorescentes en agua, a pH 7.
 ϵ : coeficiente de extinción molar [84].

La emisión del triptófano es altamente sensible a su ambiente local, por lo que comúnmente se utiliza como un grupo reportero de los cambios conformacionales de las proteínas. Los cambios en el espectro de emisión de la proteína reflejan el promedio de la exposición de los residuos de triptófano a la fase acuosa. Los tiempos de vida media de los residuos de triptófano van de 1 a 6 ns y su fluorescencia es susceptible a ser apagada por yoduro, acrilamida y por puentes disulfuro muy cercanos. Los residuos de triptófano también pueden ser apagados por grupos deficientes de electrones muy cercanos como el $-\text{NH}_3^+$ $-\text{CO}_2\text{H}$, y residuos protonados de histidina. La presencia de múltiples residuos de triptófano en las proteínas, cada uno en un ambiente diferente, es una de las causas del decaimiento multiexponencial en su intensidad de fluorescencia [84].

1.2.2.2. Fluoróforos extrínsecos

Por lo general, las moléculas de interés no son fluorescentes, o bien, la fluorescencia intrínseca no es adecuada para la condición experimental deseada. Por ejemplo, el DNA y los lípidos están esencialmente desprovistos de fluorescencia intrínseca. En aquellos casos se puede obtener una fluorescencia significativa marcando a la molécula con sondas útiles. Para el caso de las proteínas, por lo general es deseable marcarlas con cromóforos con longitudes de onda de excitación y de emisión mayores a las de los aminoácidos aromáticos, de tal forma que posteriormente, la proteína marcada puede ser estudiada en presencia de otras proteínas no marcadas [84].

Reactivos para el marcaje de proteínas

Actualmente se dispone de un gran número de fluoróforos para el marcaje covalente y no covalente de las proteínas [93]. Las marcas covalentes pueden tener una variedad de grupos reactivos para su reacción con aminas, sulfidrilos o bien, con las cadenas laterales de las histidinas. Se cuenta con una gran variedad de derivados reactivos, incluyendo iodoacetamidas, isotiocianatos, y maleimidias. Las iodoacetamidas y

maleimidadas se usan para el marcaje de los grupos sulfidrilos, mientras que los isotiocianatos, N-hidroxisuccinimida y los cloruros sulfonados se usan para el marcaje de aminas [94].

Las principales características a tomar en cuenta para la selección de las marcas fluorescentes son que posea un gran rendimiento cuántico, coeficiente de extinción y fotoestabilidad [84].

1.2.2.3. Fotoestabilidad de los fluoróforos

Al ser sometidos a una iluminación continua, la mayoría de los fluoróforos muestran un fotoblanqueo, especialmente cuando se usan para microscopía de fluorescencia, en donde las intensidades de luz son muy altas [84]. En la Figura 1.12 se muestra una comparación en la fotoestabilidad de algunos fluoróforos.

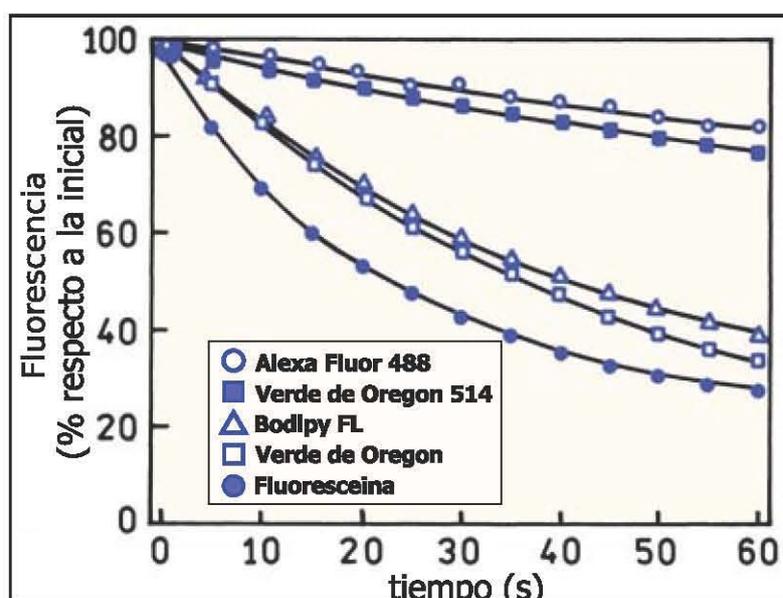


Figura 1.12. Comparación de la fotoestabilidad de anticuerpos marcados sobre cortes fijados de tejidos celulares. Las intensidades fueron medidas usando un microscopio de fluorescencia [93].

1.2.3. Efectos del solvente y del ambiente

La polaridad del solvente y el ambiente local influyen en las propiedades del espectro de emisión de los fluoróforos. Los efectos de la polaridad del solvente son una de las causas más importantes del corrimiento de Stokes [84].

1.2.3.1. Efectos de la polaridad del solvente

La emisión de los fluoróforos generalmente ocurre a longitudes de onda mayores a aquellas en las que se lleva a cabo la absorción. Esta pérdida de energía se debe a una variedad de procesos dinámicos que ocurren después de la absorción de la luz. Cuando el fluoróforo absorbe energía, pasa hacia un estado excitado de mayor energía, por lo general hacia un subnivel vibracional dentro del estado singulete S_1 . Si el fluoróforo

excitado alcanza el segundo estado singulete (S_2), decae en aproximadamente 10^{-12} segundos hacia el estado S_1 , debido a la conversión interna, y el exceso de energía vibracional se disipa hacia el solvente. Posteriormente, los efectos del solvente disminuyen aun más los niveles de la energía de emisión del fluoróforo, debido a que las moléculas polares del solvente estabilizan al estado excitado (Fig. 1.13) [84].

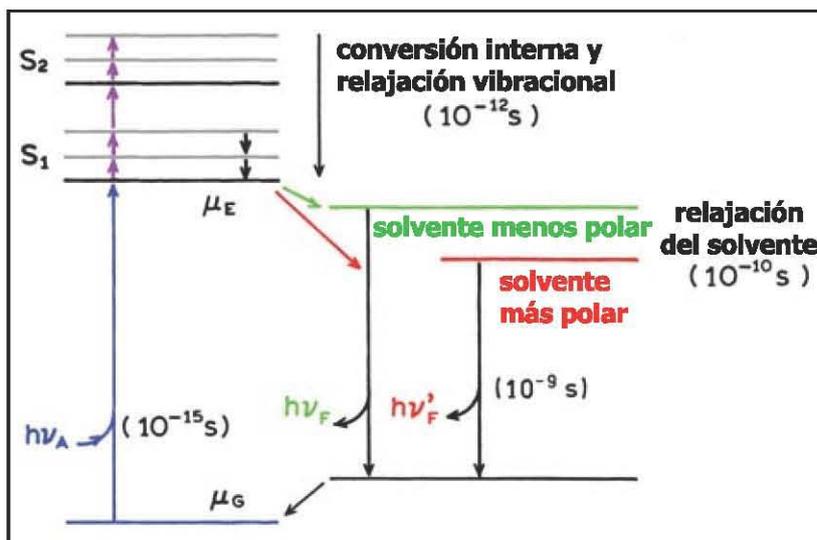


Figura 1.13. Diagrama de Jablonski para el efecto del solvente en la fluorescencia [84]. μ_G y μ_E : momento dipolar del fluoróforo en el estado basal y excitado, respectivamente. $h\nu_A$ y $h\nu'_F$: absorción y emisión de energía en forma de fotones, respectivamente.

Típicamente, el fluoróforo presenta un mayor momento dipolar en el estado excitado (μ_E), que en el estado basal (μ_G). Después de la excitación, los dipolos del solvente pueden reorientarse o relajarse alrededor de μ_E , bajando con esto la energía del estado excitado. Conforme se incrementa la polaridad del solvente, este efecto aumenta, resultando en la emisión a longitudes de onda mayores y de menor energía (Fig. 1.13). De manera general, los fluoróforos que son moléculas polares muestran una gran sensibilidad a la polaridad del solvente. Los que son moléculas no polares, como los hidrocarburos aromáticos no sustituidos, presentan una menor sensibilidad a la polaridad del solvente [84].

Los tiempos de vida de la fluorescencia (1-10 ns) usualmente son mayores que el tiempo requerido para la relajación del solvente. Para los solventes fluidos a temperatura ambiente, la relajación del solvente ocurre entre 10 a 100 ps. Por esta razón, el espectro de emisión de los fluoróforos es representativo del estado de relajación del solvente. Por otra parte, el espectro de absorción es mucho menos sensible a la polaridad del solvente, debido a que la absorción de la luz ocurre en aproximadamente entre 10^{-15} segundos, un tiempo demasiado corto para el movimiento de las moléculas del solvente o del fluoróforo. Así, el espectro de absorción es menos sensible a la polaridad del solvente

debido a que la molécula está expuesta al mismo ambiente local en los estados basal y excitado [84].

La polaridad del solvente puede tener un efecto drástico en el espectro de emisión. En la Figura 1.14 se muestra el espectro de emisión del 4-dimetilamino-4'-nitrostilbeno (DNS) en solventes de polaridad creciente. Se puede ver el cambio de $\lambda_{\text{max em}}$ de 450 nm en hexano, a 600 nm en acetato de etilo, y a 700 nm en n-butanol [84].

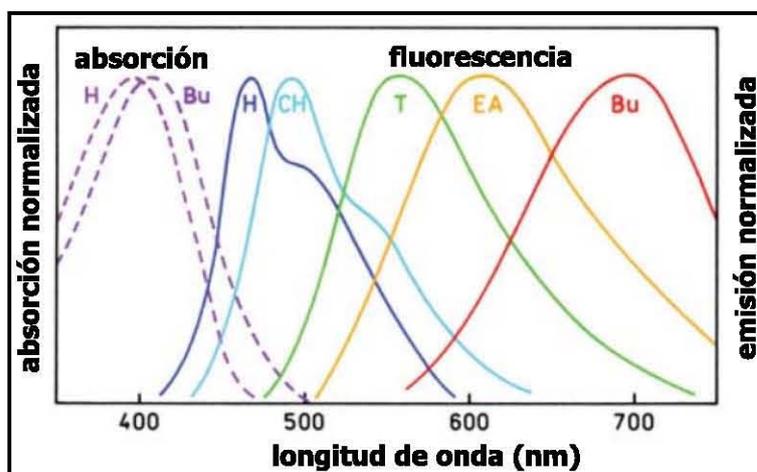


Figura 1.14. Espectro de emisión del DNS en solventes de polaridad creciente. H, hexano; CH, ciclohexano; T, tolueno; EA, acetato de etilo; Bu, n-butanol [84].

El estudio de los efectos del solvente se puede utilizar para determinar la polaridad del sitio al cual se une un fluoróforo dentro de alguna macromolécula. Esto se realiza mediante la medición de los espectros de emisión y/o los rendimientos cuánticos del fluoróforo unido a la macromolécula, y su comparación con los espectros de emisión y el rendimiento cuántico del fluoróforo disuelto en varios solventes con diferentes polaridades [84].

1.2.4. Apagado de la fluorescencia

El apagado de la fluorescencia se refiere a cualquier proceso que disminuye la intensidad de la fluorescencia de una muestra. Una variedad de interacciones moleculares pueden dar lugar al apagado, entre las que se incluyen las reacciones en el estado excitado, los rearrreglos moleculares, la transferencia de energía, la formación de complejos en el estado basal, y el apagado colisional [84]. Adicionalmente, se puede llegar a observar un apagado aparente debido a las propiedades ópticas de la muestra, por ejemplo, las densidades ópticas altas o la turbidez pueden originar una disminución en la intensidad de la fluorescencia. Este último tipo trivial de apagado provee de poca información molecular [84].

En base a las interacciones moleculares que lo originan, hay dos tipos de apagado de la fluorescencia: 1) el apagado dinámico o colisional y 2) el apagado estático. Para que ambos sucedan se requiere que haya un contacto molecular entre el fluoróforo y el apagador. En el caso del apagado colisional, el apagador debe difundir hacia el fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado y al entrar en contacto, el fluoróforo regresa hacia el estado basal, sin la emisión de fotones. Para el caso del apagado estático se requiere de la formación de un complejo no fluorescente entre el apagador y el fluoróforo en el estado basal. Por lo general, el apagado ocurre sin ningún cambio permanente en las moléculas, es decir, sin fotorreacción alguna [84].

El requerimiento del contacto molecular para que suceda el apagado nos brinda numerosas aplicaciones. Así, las mediciones del apagado pueden revelar la accesibilidad de los fluoróforos a los apagadores. Por ejemplo, para el caso de un fluoróforo unido a una proteína o a una membrana: si la proteína o la membrana es impermeable al apagador, y el fluoróforo se localiza en el interior de la macromolécula, no se podrá realizar el apagado colisional, ni el estático. Por esta razón, los estudios de apagado se pueden usar para revelar la localización de los fluoróforos en las proteínas o membranas, así como la permeabilidad de los apagadores hacia ellos [84].

El apagado de la fluorescencia también se puede usar para obtener el coeficiente de difusión de los apagadores a distancias moderadamente largas, en comparación con el tamaño de las proteínas y de las membranas. Esto difiere con el fenómeno de relajación del solvente, en el cual los cambios en el espectro de emisión se deben principalmente a la reorientación de la capa de moléculas del solvente inmediatamente adyacente al fluoróforo [84].

1.2.4.1. Apagadores de la fluorescencia y algunos mecanismos de apagado

Una amplia variedad de sustancias pueden actuar como apagadores de la fluorescencia. Uno de los apagadores colisionales mejor conocidos es el oxígeno molecular, el cual es capaz de apagar a casi todos los fluoróforos [95]. De esta forma, dependiendo de la muestra que sea el objeto de investigación, generalmente es necesario eliminar el oxígeno disuelto para poder obtener mediciones confiables de los rendimientos de la fluorescencia o de los tiempos de vida. El mecanismo más probable por el cual el oxígeno realiza el apagado es que el oxígeno paramagnético ocasiona que el fluoróforo lleve a cabo un cruce intersistemas hacia el estado triplete. En soluciones fluidas, los tripletes (de vida larga) se apagan por completo, de tal manera que no se observa fosforescencia [84].

Las aminas aromáticas y alifáticas también son apagadores efectivos de muchos hidrocarburos aromáticos no sustituidos. Por ejemplo, la dietilanilina apaga efectivamente

la fluorescencia del antraceno mediante la formación de un complejo de transferencia de carga en el estado excitado, de forma tal que el antraceno en el estado excitado acepta un electrón de la amina [96]. En solventes no polares la fluorescencia del complejo de transferencia de carga en el estado excitado (exciplex) se observa frecuentemente, y uno puede considerar este proceso como una reacción en el estado excitado más que apagado. Por otra parte, en solventes polares, la emisión del exciplex a menudo se apaga, de tal forma que la interacción entre el fluoróforo y la amina parece ser la de un apagado simple.

Al usar átomos pesados como el yoduro y el bromuro se observa otro tipo de apagado, el cual se puede originar debido al cruce intersistemas hacia un estado triplete excitado, promovido por el acoplamiento órbita-giro del fluoróforo excitado y del halógeno [97]. Posteriormente, ya que la emisión a partir del estado triplete es muy lenta, la emisión del triplete es apagada por otros procesos. Probablemente el mecanismo de apagado es diferente para las sustancias que contienen cloro. El indol, el carbazol y sus derivados son sensibles únicamente al apagado por hidrocarburos clorados y por secuestradores de electrones [98], como los protones, la histidina, la cisteína, el NO_3^- , el fumarato, Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , y Mn^{2+} . El apagado por esas sustancias probablemente involucra la donación de un electrón del fluoróforo hacia el apagador. Además, el indol, el triptófano y sus derivados son apagados por acrilamida, succimidina, dicloroacetamida, dimetilformamida, hidrocloreto de piridinio, imidazol, ácido clorhídrico, metionina, Eu^{3+} , Ag^+ , y Cs^+ . Los apagadores de la fluorescencia de las proteínas se han resumido en diferentes revisiones [99-101]. Así, actualmente se cuenta con una gran variedad de apagadores para realizar estudios de apagado de fluorescencia de las proteínas, especialmente para determinar la accesibilidad al solvente de los residuos de triptófano y la permeabilidad de los apagadores a las proteínas.

La realización del apagado depende de las propiedades químicas del fluoróforo y el apagador. Gracias a que una gran variedad de sustancias pueden actuar como apagadores de la fluorescencia, frecuentemente uno puede escoger entre diferentes combinaciones de fluoróforo-apagador, dependiendo del problema experimental. Es importante hacer notar que no todos los fluoróforos se apagan con las sustancias mencionadas. Este hecho, ocasionalmente permite el apagado selectivo de un cierto fluoróforo [84].

1.2.4.2. Teoría del apagado colisional

El apagado colisional de la fluorescencia está descrito por la ecuación de Stern-Volmer:

$$F_0 / F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

En esta ecuación, F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del apagador, respectivamente; K_q es la constante de apagado bimolecular; τ_0 es el tiempo de vida del fluoróforo en ausencia del apagador, y $[Q]$ es la concentración del apagador. La constante de apagado de Stern-Volmer está dada por $K_D = K_q \tau_0$. Si se sabe que el apagado es dinámico, la constante de Stern-Volmer puede ser representada por K_D . De otra forma, esta constante debe ser descrita como K_{sv} [84].

El apagado colisional se ilustra en el diagrama modificado de Jablonski de la Figura 1.15.

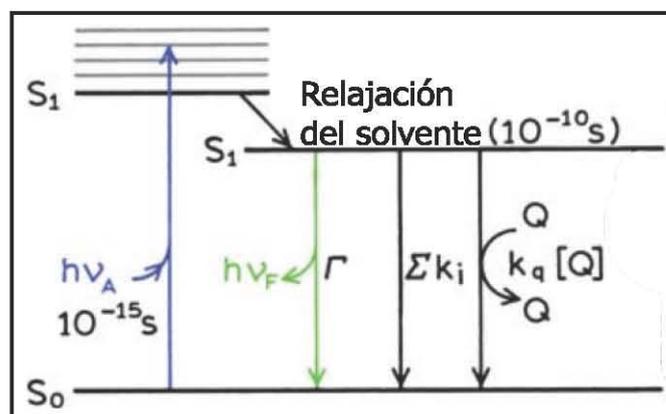


Figura 1.15. Diagrama de Jablonski representando el apagado colisional. El término Σki se usa para representar las vías de decaimiento no radiativo hacia el estado basal, además del apagado y el FRET. Γ : velocidad de decaimiento radiativo. $h\nu_A$ y $h\nu_F$: absorción y emisión de energía en forma de fotones, respectivamente. k_q = constante de apagado bimolecular [84].

Los datos de apagado son usualmente presentados como gráficos de F_0/F contra la $[Q]$. Esto se debe a que se espera que F_0/F sea linealmente dependiente de la concentración de apagador. Una gráfica de F_0/F contra $[Q]$ produce un intercepto de uno sobre el eje "y", y una pendiente igual a la constante de apagado de Stern-Volmer (K_D , Figura 1.16). Es necesario hacer notar que K_D^{-1} es la concentración de apagador a la cual $F_0/F = 2$, o bien, a la cual se apaga el 50 % de la intensidad de fluorescencia. Una curva lineal de Stern-Volmer generalmente indica que solo existe una clase de fluoróforos, todos ellos accesibles al apagador. Si se encuentran presentes dos poblaciones de fluoróforos, y una clase de ellos no está accesible al apagador, entonces las curvas de Stern-Volmer se desvían de la linearidad hacia el eje x. Esto frecuentemente se observa para el apagado de la fluorescencia de los triptófanos presentes en las proteínas, utilizando apagadores cargados o polares, los cuales no son capaces de penetrar al interior hidrofóbico de las proteínas, y solo los residuos de triptófano situados en la superficie de la proteína son apagados [84].

Es importante resaltar que la observación de una curva lineal de Stern-Volmer no necesariamente prueba que haya ocurrido el apagado colisional, ya que el apagado estático también produce curvas lineales de Stern-Volmer. El apagado dinámico y el estático se pueden diferenciar por su distinta dependencia a la temperatura y viscosidad, y también por mediciones de la vida media de los fluoróforos. Las temperaturas mas altas favorecen que la difusión ocurra de forma más rápida y con ello, un aumento del apagado colisional (Fig. 1.16). Por otra parte, un aumento en la temperatura generalmente ocasiona que los complejos unidos débilmente se disocien, y de esta manera que disminuya el apagado estático (Figura 1.16) [84].

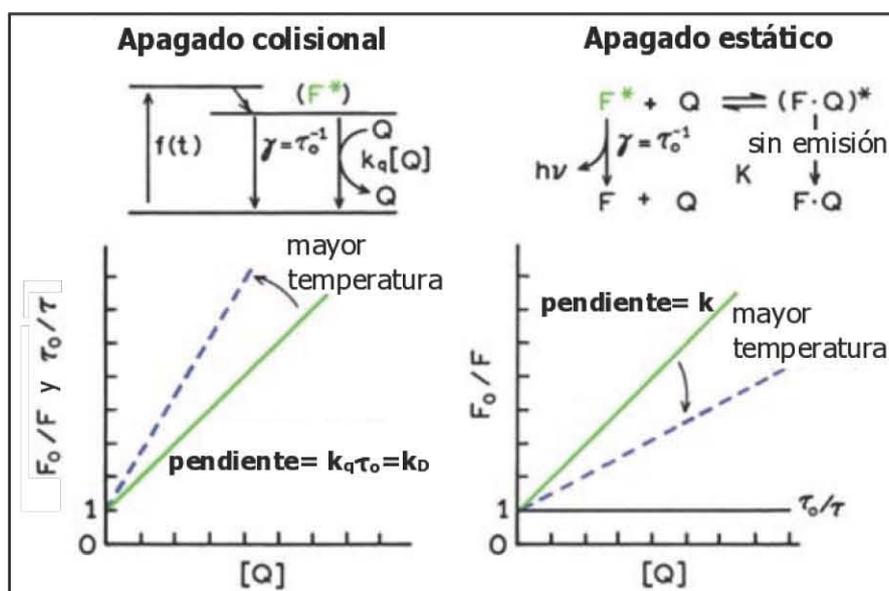


Figura 1.16. Comparación del apagado dinámico y estático [84]. F y F^* : fluoróforo en el estado basal y excitado, respectivamente. Q: apagador. $f(t)$: función de excitación constante. γ : velocidad de decaimiento en ausencia del apagador. F_0 y F: Intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia del apagador, respectivamente. τ_0 y τ : tiempo de vida del fluoróforo en el estado excitado en ausencia y presencia del apagador, respectivamente. k_q : constante de apagado bimolecular. k_D : constante de Stern-Volmer de apagado dinámico.

Cabe señalar que, dependiendo de las propiedades de los apagadores utilizados (como el tamaño, carga, etc.), el grado de apagado puede verse afectado por las características del ambiente que rodea al fluoróforo. Por ejemplo, se ha observado que la unión de los fluoróforos a ciertas zonas de las proteínas puede ocasionar una disminución diferencial en el apagado colisional con apagadores disueltos en solventes polares, dependiendo de la exposición de la zona de la proteína al solvente y de las cargas de los residuos de aminoácidos cercanos. La carga electrónica de los apagadores también puede tener un efecto dramático sobre el grado de apagado. Se puede esperar que estos efectos se presenten en los apagadores con carga como el yoduro, y que no se observen en apagadores neutrales como la acrilamida y el oxígeno [84].

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1. Modelos de inserción en la membrana de la toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis*

Se han propuesto tres modelos posibles para la inserción de las toxinas Cry en la membrana (Fig. 2.1):

1) El modelo del abrecartas propone que las hélices α -5 y α -6 se insertan en la membrana como consecuencia de un cambio conformacional disparado por el receptor, sin mayor participación de las hélices y dominios restantes [46].

2) El modelo de sombrilla plantea que, después de la unión con el receptor, la región de la toxina compuesta por las hélices α 4- α 5 se inserta en la membrana, mientras que el resto de las hélices se aplanan sobre la superficie de la bicapa lipídica exponiendo hacia ella su cara hidrofóbica, quedando la molécula en forma de sombrilla [46, 102-105].

En un reporte previo, en el cual se formaron puentes disulfuro de manera artificial dentro de algunas hélices del dominio I de la toxina Cry1Aa, se observó que las hélices α 4 y α 5 necesitan conservar cierta flexibilidad en su estructura para la inserción y formación eficiente del poro de la toxina en la membrana lipídica [106]. En este mismo estudio se demostró que un prerrequisito para la formación del poro es la separación del dominio I del resto de la molécula, ya que una mutante con un puente disulfuro en la interface del dominio I-II fue incapaz de formar poros en su estado oxidado [106].

Otro dato que refuerza el modelo de sombrilla se obtuvo con la mutante no tóxica D136C (ubicada en la hélice α -4 de la toxina Cry1Aa), que perdió la capacidad de formación de poro, y en la cual se demostró que si se reconstituye la carga negativa de este residuo utilizando etilsulfonato de metanetiosulfonato (MTSES por sus siglas en inglés, el cual es un compuesto con carga negativa que reacciona con el grupo tiol presente en la cisteína confiriéndole una carga negativa), se restaura la capacidad de dicha mutante para formar poros en membranas lipídicas artificiales [104]. Este dato, junto con los obtenidos mediante una serie de experimentos de mutagénesis de los aminoácidos de la hélice α -4 de la toxina Cry1Aa, sugieren que la cara hidrofílica de la hélice α -4 se sitúa hacia el lumen del poro formado por la toxina y podría jugar un papel importante en el paso de los iones a través de dicho poro [105, 107].

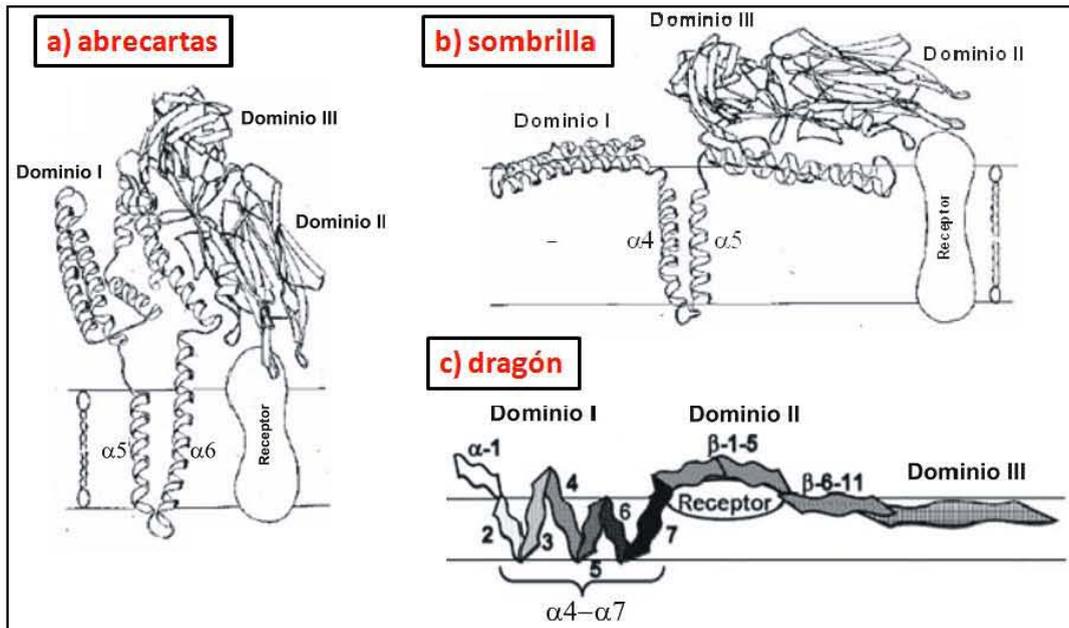


Figura 2.1. Modelos de inserción de la toxina Cry1Ab en la membrana. Modificado de [46, 108].

3) Finalmente, el modelo de dragón sugiere que la mayor parte de la toxina (a excepción de la hélice α -1 y las láminas β 1-5 del dominio II) se inserta dentro de la membrana adoptando una conformación extendida a lo largo de dicha membrana [108].

Recientemente, mediante experimentos basados en el marcaje de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab con 1,5-IAEDANS (fluoróforo sensible a la polaridad del ambiente) y el seguimiento de los cambios en la fluorescencia extrínseca durante la inserción de la toxina en la membrana lipídica, otro grupo ha sugerido que todos los dominios de la toxina se insertan en la membrana [109].

Por otra parte, en nuestro laboratorio también se han analizado los cambios conformacionales que presenta la toxina Cry1Ab durante su inserción en la membrana, mediante el uso de diferentes técnicas como:

1) Medición y apagado de la fluorescencia intrínseca del monómero y oligómero de la toxina Cry1Ab [71].

2) Ensayos de susceptibilidad de los diferentes dominios del oligómero de la toxina Cry1Ab insertada en membranas lipídicas, a la desnaturalización por temperatura o por agentes caotrópicos como la urea [80] y ensayos de susceptibilidad a la degradación por proteasas.

3) Mutagénesis sitio dirigida dentro del dominio I de la toxina Cry1Ab [110, 111].

4) Técnicas de electrofisiología y medición de la conductancia del monómero y del oligómero de la toxina Cry1Ab sobre bicapas lipídicas sintéticas planas [71].

Dentro de dichos estudios, en 2004, Rausell, *et al* , midieron la fluorescencia intrínseca de la toxina Cry1Ab (dada por los 9 triptófanos que posee la toxina, siete localizados en el dominio I y dos en el dominio II) y realizaron ensayos de apagado de dicha fluorescencia, utilizando apagadores solubles en solventes polares, como el ioduro de potasio (KI), o bien, apagadores acoplados a lípidos de la membrana (lípidos brominados) [71]. En dicho trabajo, se utilizó la toxina Cry1Ab en sus formas de a) monómero en solución, b) oligómero en solución, y c) oligómero insertado en membrana, y se reportó que la toxina monomérica en solución muestra un 54 % de Trp expuestos al solvente, mientras que en el oligómero de la toxina en solución sólo el 27 % de los triptófanos están expuestos al solvente, indicando que algunos de los Trp se sitúan en los contactos proteína-proteína dados entre los monómeros de la toxina oligomérica. Por el contrario, se observó que cuando el oligómero se inserta en la membrana, ningún Trp queda expuesto al solvente, indicando que la mayoría de dichos residuos se situaron preferencialmente en la interface lípido-agua, ya sea cerca de la cabeza polar de los lípidos de fosfatidilcolina, o bien, cerca de la posición del carbono 6 y 7 del ácido graso. En este mismo estudio, mediante el análisis de las conductancias que muestra la toxina insertada en bicapas lipídicas, se demostró que el oligómero, a diferencia del monómero, es capaz de interactuar eficientemente con las membranas lipídicas y formar poros con conductancias estables, ya que más del 90 % de la estructura oligomérica se insertó en la membrana lipídica, en contraste con la estructura monomérica en la cual sólo el 5 % lo hizo, formando poros con conductancias inestables (Fig. 2.2) [71].

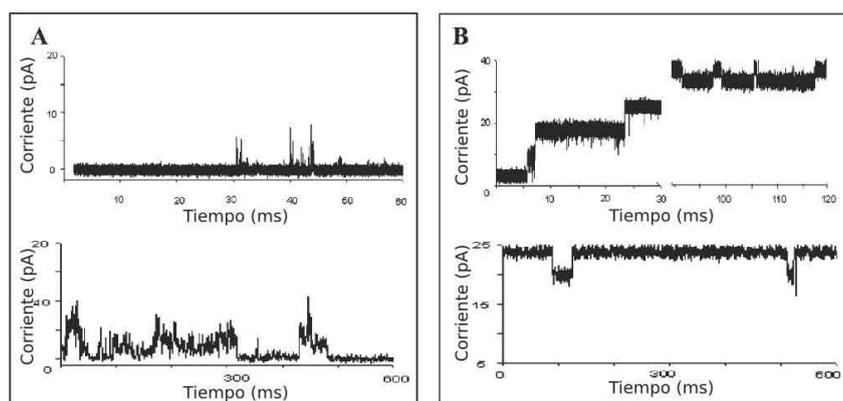


Figura 2.2. Ensayos de medición de las corrientes iónicas sobre bicapas lipídicas planas, inducidas por preparaciones de monómero u oligómero la toxina Cry1Ab [71]. El monómero induce corrientes macroscópicas con transiciones muy inestables mostrando múltiples canales o estados de subconductancia (A), por el contrario, el oligómero forma canales estables (B).

De los análisis anteriores, en conjunto con la observación de que algunas mutantes dentro la hélice α -3 del dominio I de la toxina Cry1Ab (R99E y Y107E) pierden la capacidad para formar estructuras oligoméricas y la toxicidad hacia las larvas de *M. sexta* [110], en nuestro laboratorio se ha propuesto un modelo general para la

inserción de la toxina en la membrana lipídica. En dicho modelo, la formación del oligómero de la toxina se da por la interacción de las hélices α del dominio I, posteriormente, el pH alcalino presente en el intestino de las larvas de lepidópteros, favorece que la toxina oligomérica adopte una estructura más flexible (“molten globule state”), la cual es capaz de formar un poro en la membrana celular mediante la inserción de al menos una parte del dominio I en la bicapa, quedando los dominios II y III fuera de dicha membrana (Fig. 2.3). Sin embargo, aún quedan muchas incógnitas respecto al posicionamiento de los diferentes dominios de la toxina Cry1Ab en la estructura de la toxina insertada en la membrana lipídica y faltan más estudios para determinar cuáles son las regiones de la toxina oligomérica que se insertan en la membrana y cuáles son las que quedan expuestas al solvente.

La determinación de la estructura de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana es importante para entender por completo su mecanismo de acción, y en un futuro nos podría ayudar a diseñar toxinas Cry con mayor actividad de poro y mayor toxicidad. Por los problemas que representa purificar y cristalizar una proteína oligomérica insertada en la membrana, decidimos elaborar un modelo de inserción mediante el uso de estudios de espectroscopia de fluorescencia, ya que ésta es una técnica relativamente fácil de utilizar y aporta datos contundentes en cuanto a los cambios conformacionales de las proteínas.

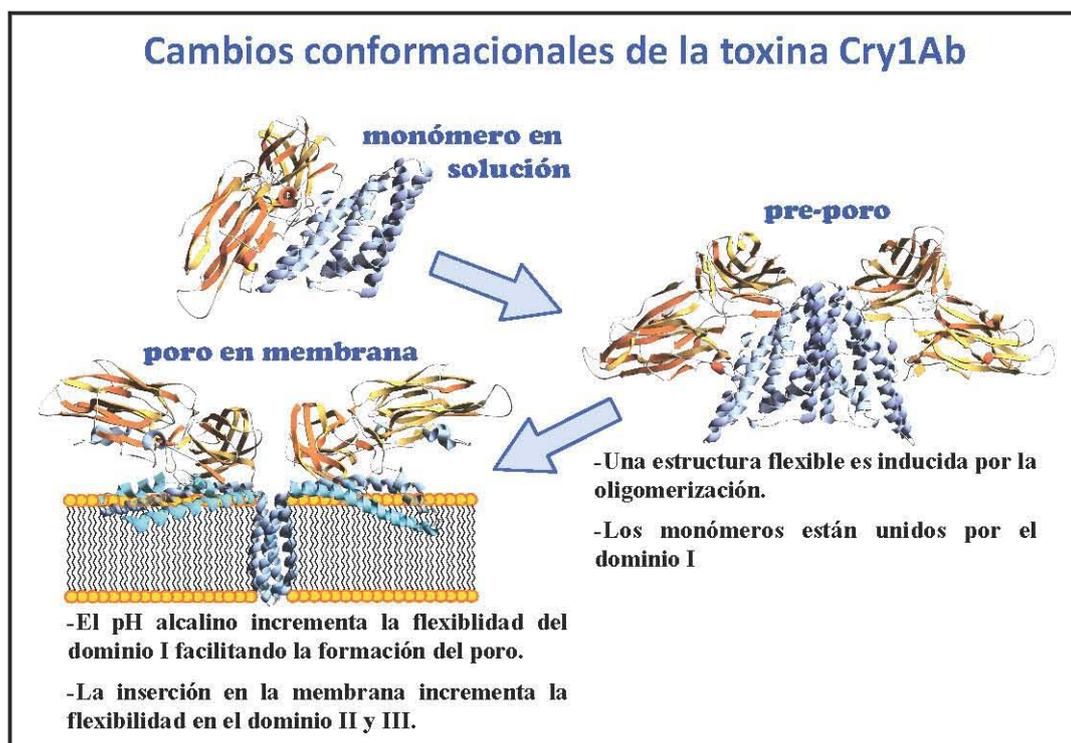


Figura 2.3. Modelo propuesto en nuestro laboratorio para los cambios conformacionales que sufre la toxina Cry1Ab durante su inserción en la membrana lipídica.

3. HIPÓTESIS

El oligómero de la toxina Cry1Ab se inserta en la membrana lipídica utilizando una región discreta del dominio I y el resto de la toxina permanece fuera de la bicapa.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Analizar la inserción de la toxina Cry1Ab en la membrana y definir las regiones de la toxina insertada que pueden estar expuestas al solvente o en contacto con los lípidos de la membrana.

4.2. Objetivos particulares

- 1) Construir diferentes mutantes sitio dirigidas de la toxina Cry1Ab ubicadas en los tres dominios de la toxina.
- 2) Expresar las mutantes construidas de la toxina Cry1Ab en la cepa acristalífera de *Bacillus thuringiensis* (Bt 407-) y purificarlas a partir de dicha cepa bacteriana.
- 3) Evaluar la toxicidad de las mutantes obtenidas mediante bioensayos, utilizando larvas de *Manduca sexta*.
- 4) Marcar con fluoróforos en las diferentes regiones de la toxina Cry1Ab previamente mutagenizadas.
- 5) Realizar ensayos de medición de la fluorescencia intrínseca del monómero en solución de las toxinas mutantes marcadas.
- 6) Realizar ensayos de inserción en membrana de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcadas con fluoróforos, utilizando BBMV's de *M. sexta*, vesículas unilamelares de fosfatidilcolina, o BBMV's suplementadas con lípidos doxylados (16:0-5 Doxyl PC).
- 7) Realizar ensayos de apagado dinámico de la fluorescencia con apagadores solubles en agua (KI o acrilamida), o bien, con apagadores acoplados a los ácidos grasos de la membrana (16:0-5 Doxyl PC), utilizando a la toxina Cry1Ab en solución, unida al receptor, o insertada en la bicapa lipídica.
- 8) Obtener un modelo de los cambios conformacionales que sufrió la toxina Cry1Ab al insertarse en la membrana lipídica.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

En la siguiente Figura se muestra un esquema general de la estrategia experimental:

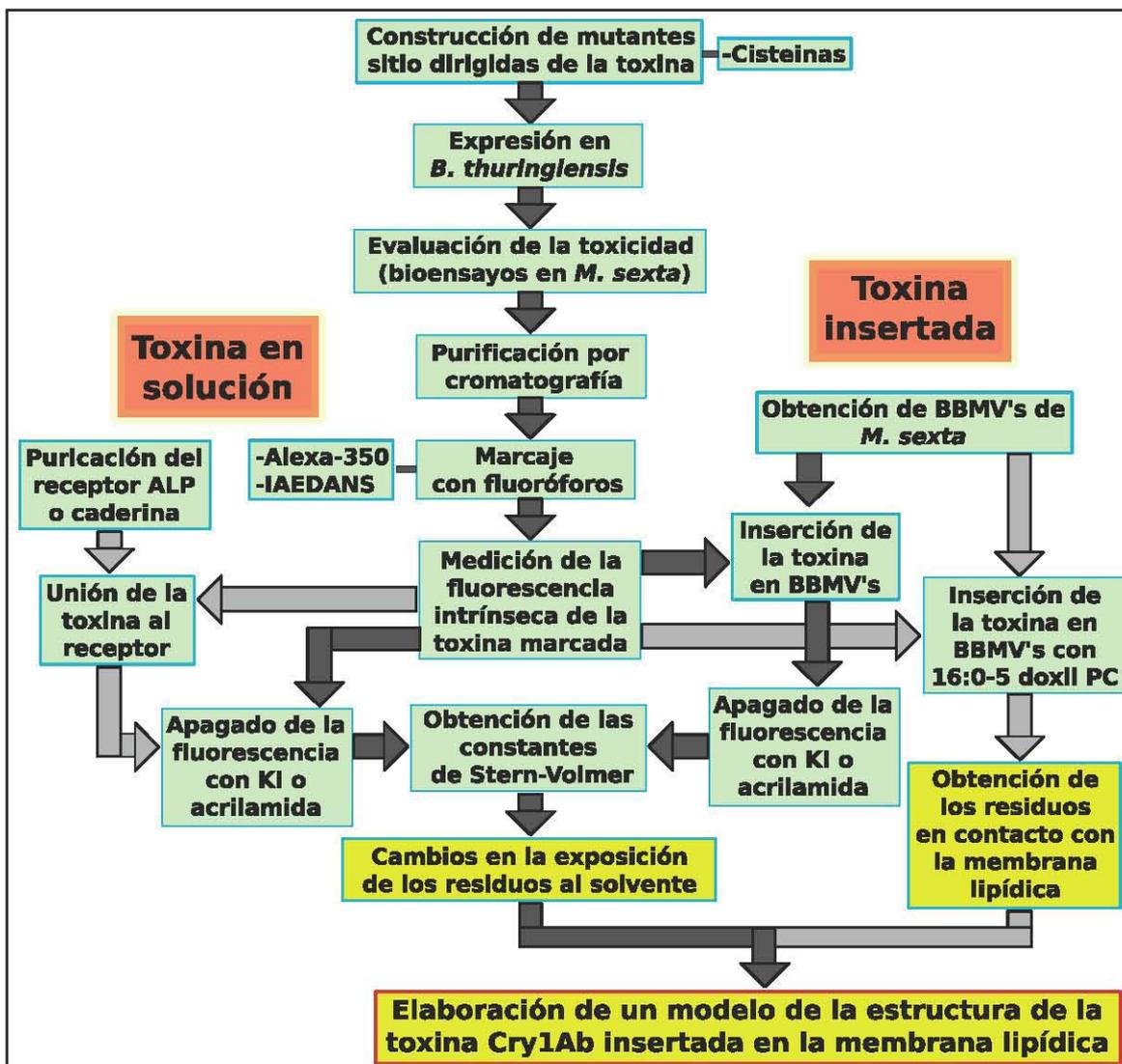


Figura. 5.1. Estrategia general seguida para el análisis de los cambios conformacionales que sufre la toxina Cry1Ab al insertarse en la membrana lipídica.

6. METODOLOGÍA

6.1. Construcción de mutantes sitio dirigidas de la toxina Cry1Ab

Para poder marcar con fluoróforos a la toxina Cry1Ab en diferentes posiciones específicas, y aprovechando el hecho de que el monómero de la toxina no posee cisteínas dentro de su secuencia de aminoácidos, realizamos una mutagénesis sitio dirigida sustituyendo por cisteínas aminoácidos ubicados dentro de los tres dominios estructurales de la toxina. Las posiciones mutagenizadas se enlistan en la Tabla 6.1 y se ilustran en las Figuras 6.1 y 6.2.

Tabla 6.1. Mutantes puntales de la toxina Cry1Ab			
Mutación	Ubicación en la toxina Cry1Ab		Secuencia del oligonucleótido mutagénico utilizado
	Región	Dom.	
T122C	loop α 3- α 4	I	GAG TGG GAA GCA GAT CCT TGT AAT CCA GCA TTA AGA GAA G
V171C	mitad de α 5		GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA TGC TTG AGA GAT GTT TCA GTG
G183C	loop α 5- α 6		GTG TTT GGA CAA AGG TGG TGT TTT GAT GCC GCG ACT ATC
S324C	final de β 3	II	CAT CAA ATA ATG GCT TGC CCT GTA GGG TTC TCG
S364C	lámina β 6		GTG TAT AGA ACA TTA TCG TGC ACT TTA TAT AGA AGA CC
K490C	loop β 14- β 15	III	T GGA ACT TCT GTC GTT TGC GGA CCA GGA TTT ACA G
N547C	lámina β 19		ATT GAC GGA AGA CCT ATT TGT CAG GGG AAT TTC TCA G

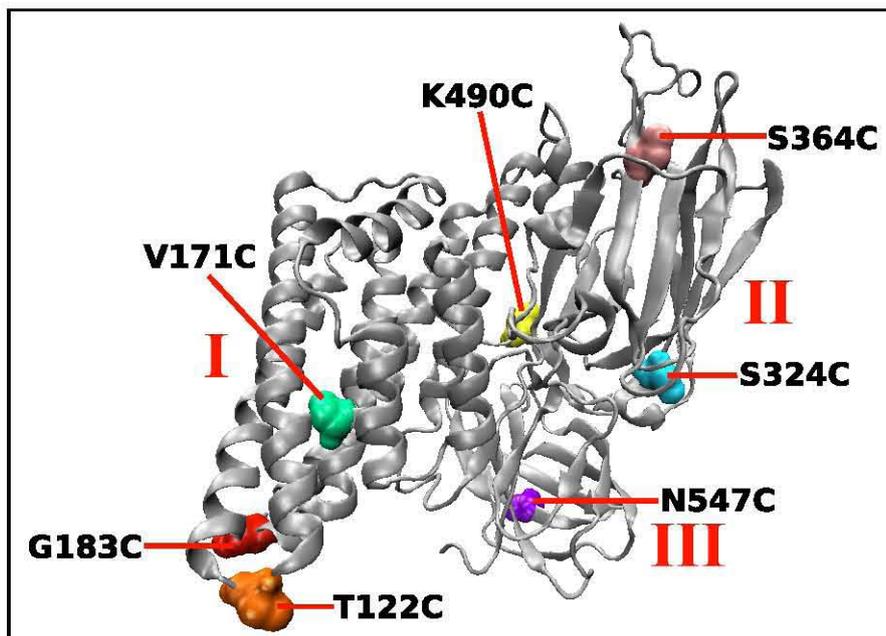


Figura. 6.1. Ubicación de los residuos mutagenizados en un modelo de la estructura 3D del monómero de la toxina Cry1Ab.

Cry1Ab						
1	<u>MDNNPNINE</u> C	IPYN <u>CL</u> SNPE	VEVLGGERIE	TGYT <u>PIDISL</u>	<u>SLTQFLLSEF</u>	50
	<u>α2a</u>		<u>α2b</u>	<u>α3</u>		
51	VPGAGFVLGL	VDII <u>W</u> GIFGP	<u>SQWDAFLVQI</u>	<u>EQLINQRIEE</u>	<u>FARNQAI</u> SRL	100
	<u>α3</u>		<u>α4</u>			
101	EGLSNLYQIY	AESFRE <u>WEAD</u>	<u>PTNPALREEM</u>	<u>RIQFNDMNSA</u>	<u>LTTAIPLFAV</u>	150
			122			
	<u>α5</u>			<u>α6</u>		
151	QNYQVPLLSV	YVQAANLHLS	<u>VLRDVS</u> VFGQ	<u>RWGFDAATIN</u>	<u>SRYNDLTRLI</u>	200
			171	183		
	<u>α6</u>		<u>α7a</u>	<u>α7b</u>	<u>α7c</u>	
201	GNYTDHAVRW	YNTGLERVWG	PDSRDWIRYN	<u>QFRRELT</u> LTV	LDIVSLF <u>PNY</u>	250
	<u>β1a></u>	<u>β1b></u>	<u>α8a</u>	<u>α8</u>		
251	DSRTYPIRTV	SQLTREIYTN	<u>PVLENFDGSF</u>	RGSA <u>Q</u> GIEGS	IRSPHLM <u>DIL</u>	300
	<u>β2 ></u>	<u>β3 ></u>	<u>β4 ></u>		<u>β5</u>	
301	NSITIIYTD <u>AH</u>	RGEYY <u>W</u> SGHQ	<u>IMAS</u> PVGFSG	<u>PEFTF</u> PLYGT	MGNAAP <u>Q</u> QRI	350
			324			
	<u>></u>	<u>β6 ></u>	<u>β7</u>	<u>></u>	<u>β8</u>	
351	VAQLGQGVYR	<u>TLSS</u> TLYRRP	FNIGIN <u>Q</u> QL	<u>SVLDGTEFAY</u>	<u>GTSSNLPSAV</u>	400
		364				
	<u>></u>	<u>β9 ></u>	<u>α</u>	<u>β10 ></u>		
401	YRKS <u>G</u> TVDSL	DEIPPQNNV	<u>PPRQ</u> GFSHRL	<u>SHVSMF</u> RSGF	SNSSVSI <u>I</u> RA	450
	<u>β11 ></u>	<u>β12></u>	<u>β13a ></u>	<u>β13b ></u>	<u>β14></u>	
451	PMFSW <u>I</u> HRSA	EFNNIIPSSQ	<u>ITQI</u> PLTKST	<u>NLGS</u> GTSV <u>V</u> K	GPGFTGG <u>DIL</u>	500
				490		
	<u>></u>	<u>β16 ></u>	<u>β17 ></u>	<u>β18 ></u>	<u>β19</u>	
501	RRTSP <u>G</u> QIST	LRVNITAPLS	<u>QRYR</u> VRIRYA	<u>STTN</u> LQFHTS	<u>IDGRP</u> IN <u>Q</u> GN	550
					547	
	<u>></u>	<u>β20 ></u>	<u>β21></u>	<u>β22 ></u>		
551	FSATMSSGSN	LQSGSFRTV <u>G</u>	<u>F</u> TT <u>PF</u> NFSNG	<u>SSV</u> FTLSAHV	FNSGNEVY <u>ID</u>	600
	<u>β23 ></u>					
601	<u>R</u> IEFVPAEVT	FEAEYDLERA	OKAVNELF <u>T</u> S	SNQIGLKT <u>D</u> V	TDYHIDQVSN	650
651	LVE <u>CL</u> SDEF <u>C</u>	LDEKKE <u>L</u> SEK	VKHAKRLS <u>D</u> E	RNLLQDPNFR	GINRQLDRGW	700
701	RGSTDITI <u>Q</u> G	GDDVFKE <u>N</u> YV	TLLGTFDE <u>C</u> Y	PTYLYQKIDE	SKLKAYTRYQ	750
751	LRGYIEDS <u>Q</u> D	LEIYLIRYNA	KHETVNV <u>P</u> GT	GSLWPLSAPS	PIGKCAHSH	800
801	HFSLDIDV <u>G</u> C	TDLNEDLG <u>V</u> W	VIFKIKTQ <u>D</u> G	HARLGNLEFL	EEKPLVGEAL	850
851	ARVKRAEK <u>K</u> W	RDKREKLE <u>W</u> E	TNIVYKEA <u>K</u> E	SVDALFVNSQ	YDRLQADTNI	900
901	AMIHAADK <u>R</u> V	HSIREAYL <u>P</u> E	LSVIPGVN <u>A</u> A	IFEELEGRIF	TAFSLYDARN	950
951	VIKNGDFN <u>N</u> G	LS <u>C</u> WNVK <u>G</u> HV	DVEEQNN <u>H</u> RS	VLVPEWEA <u>E</u>	VSQEV <u>R</u> V <u>C</u> PG	1000
1001	RGYILRV <u>T</u> AY	KEGYGEG <u>C</u> VT	IHEIENNT <u>D</u> E	LKFSN <u>C</u> VEE <u>E</u>	VYPNNTV <u>T</u> CN	1050
1051	DYTATQEE <u>E</u> YE	GTYT <u>S</u> RNRGY	DGAYESN <u>S</u> SV	PADYASAY <u>E</u> E	KAYTDGRRDN	1100
1101	PCESNR <u>G</u> YGD	YTPLPAGY <u>V</u> T	KELEYFP <u>P</u> ETD	KVWIEIG <u>E</u> TE	GTFIVDS <u>V</u> EL	1150
1151	<u>LLMEE</u>					

Figura 6.2. Estructura secundaria del monómero de la toxina Cry1Ab. Los extremos N- y C- terminal de la protoxina que se eliminan durante el proceso de activación enzimática se muestran subrayados. En negrita se señalan los residuos de la alfa-hélice o hebra-beta correspondiente [24, 27]. El fragmento tóxico se muestra sin subrayar. Las posiciones seleccionados para realizar la mutagénesis sitio dirigida y los residuos de cisteína localizados en los extremos N- y C- terminal de la protoxina se muestran remarcados.

La construcción de las mutantes sitio dirigidas sencillas y dobles se realizó mediante la técnica de PCR mutagénico (Fig. 6.3), utilizando el equipo comercial de mutagénesis sitio dirigida QuickChange® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene, para lo cual se utilizaron como primers los oligonucleótidos mutagénicos correspondientes (Invitrogen, Tabla 6.1), previamente fosforilados, y como templado se utilizó al plásmido pHT315Ab [112] (ver protocolos). Este plásmido contiene la secuencia completa que codifica para la protoxina Cry1Ab (con número de acceso M13898) [47], bajo el promotor P2 de *B. thuringiensis* y como marcador de selección confiere resistencia a ampicilina a las células de *E. coli*, y a eritromicina a las células de *B. thuringiensis* (Fig. 6.4).

Posteriormente, se transformaron las cepas electrocompetentes de *E. coli* DH5α con el producto del PCR mutagénico (2 µl) previamente digerido con la enzima Dpn1, la cual corta el ADN parental metilado. Se seleccionaron 5 colonias aisladas por mutante, a partir de las cuales se purificó el ADN plasmídico mediante el Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega y se mandó a secuenciar en la Unidad de Biosíntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, para verificar que se hubiera incorporado la mutación deseada (ver Fig. 6.3 y protocolos).

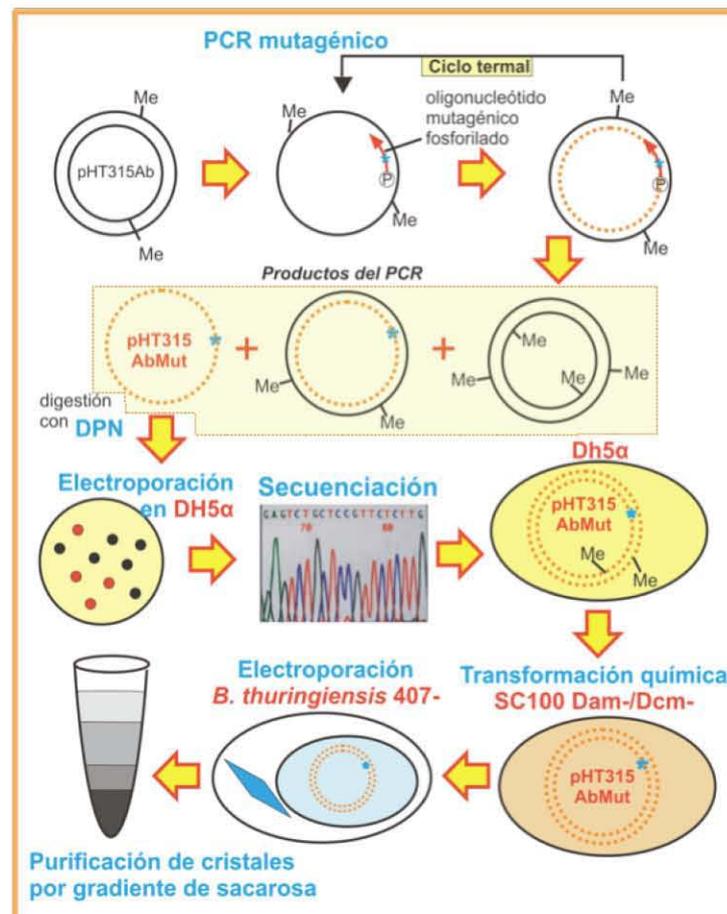


Figura 6.3. Estrategia general para la obtención de las mutantes de la toxina Cry1Ab.

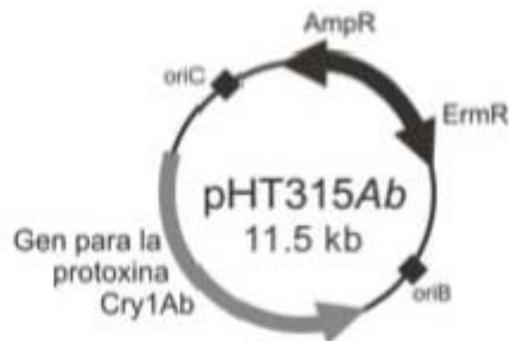


Figura 6.4. Estructura del vector pHT315Ab.

6.2. Expresión de las toxinas Cry1Ab mutantes en la cepa acristalífera de *B. thuringiensis* (Bt 407-) y purificación a partir de dicha cepa

El ADN plasmídico (plásmido pHT315Abmut, que contiene el gen que codifica para la protoxina Cry1Ab mutante correspondiente) purificado a partir de las cepas de *E. coli*, fue utilizado para transformar a la cepa acristalífera electrocompetente de *B. thuringiensis* (Bt 407-).

Para la expresión de las toxinas Cry1Ab mutantes, las cepas transformadas de *Bt* se crecieron en medio de esporulación HCTERi¹⁶ sólido durante 48-72 h. Posteriormente se observó la producción del cristal proteico paraesporal de la protoxina con ayuda del microscopio óptico y se verificó la expresión e integridad de la protoxina mediante SDS-PAGE al 10 %, para observar la banda correspondiente a la protoxina Cry1Ab de ~130 kDa.

La obtención de la protoxina soluble se realizó mediante lavados de los cultivos bacterianos esporulados (cuya biomasa está constituida en su mayoría por una mezcla de esporas bacterianas y cristales proteicos) y solubilización de la protoxina en un buffer alcalino (ver protocolos). El monómero de la toxina Cry1Ab se obtuvo mediante la activación enzimática de la protoxina con tripsina y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico, utilizando una columna Mono Q (GE Healthcare) y el equipo AKTA FPLC System de Amsterdam Biosciences.

6.3. Evaluación de la toxicidad de las mutantes construidas de la toxina Cry1Ab sobre larvas de *M. sexta*

En nuestro laboratorio se utiliza al insecto lepidóptero *M. sexta* como modelo de estudio para el análisis de los diferentes aspectos del mecanismo de acción de las toxinas Cry1Ab. El análisis del efecto tóxico de las mutantes se hace mediante bioensayos, en los cuales se alimentan larvas del primer instar de desarrollo de *M. sexta* con dosis determinadas de toxina (ver Fig. 6.5 y protocolos).

Para comprobar que las diferentes mutantes de la toxina Cry1Ab construidas conservaban su actividad tóxica, se realizaron bioensayos en los cuales se alimentaron por separado las larvas de *M. sexta* del primer instar de desarrollo criadas en nuestro laboratorio, con cada una de las mutantes construidas de la toxina Cry1Ab. Las dosis de espora-cristal utilizadas para los bioensayos de cada mutante fueron las siguientes: 0.25ng/cm², 1ng/cm², 10ng/cm², 50ng/cm², 200ng/cm². Las unidades de la dosis (ng/cm²) representan a los nanogramos de toxina con los que se infecta cada centímetro cuadrado de la superficie de la dieta artificial del insecto.

Finalmente, transcurridos 7 días, se contabilizó la mortalidad de las larvas y se obtuvo la LC₅₀, utilizando el programa Probit POLO (ver protocolos).



Figura 6.5. Fotografía de una caja de plástico utilizada para evaluar el efecto tóxico de la toxina Cry1Ab sobre las larvas de *M. sexta*. Cada uno de los pozos se llena con dieta artificial hasta la mitad. Sobre la superficie de la dieta se deposita una dosis determinada de toxina Cry1Ab y se coloca una larva de *M. sexta* del primer instar de desarrollo. Transcurridos 7 días, se cuantifica la mortalidad de las larvas.

6.4. Marcaje de la toxina Cry1Ab con fluoróforos

Para el marcaje de la toxina Cry1Ab en las regiones mutagenizadas por cisteínas, utilizamos las marcas reactivas de los fluoróforos 1,5-IAEDANS y Alexa Fluor-350 C₅-maleimida (ver Fig. 6.6 y protocolos).

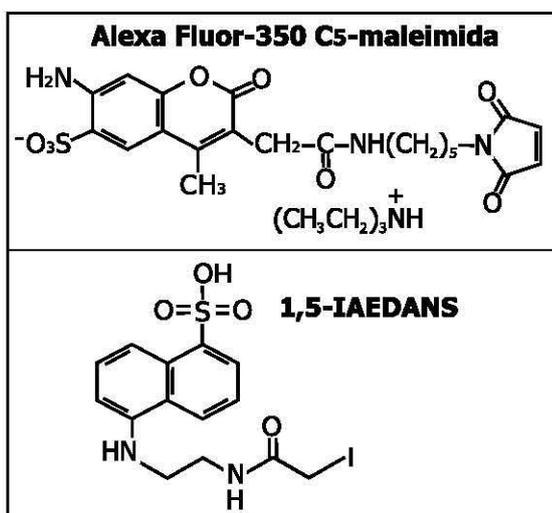


Figura 6.6. Estructura química de las marcas reactivas de los fluoróforos utilizados para el marcaje en cisteínas de las mutantes de la toxina Cry1Ab.

***Alexa Fluor-350:** es un derivado sulfonado de la coumarina que fluoresce en azul. Pertenece a la familia de fluoróforos Alexa Fluor (Molecular Probes®, Invitrogen), los cuales producen conjugados proteicos fotoestables con gran rendimiento cuántico y una emisión de la fluorescencia poco sensible a los cambios en el pH o a la polaridad del ambiente en el que se encuentre (Fig. 8.8.B).

Su fluorescencia no es susceptible a ser apagada con acrilamida, pero en cambio, es eficientemente apagada con yoduro, con una K_D efectiva de 29 M^{-1} (Fig. 8.9).

La marca reactiva del fluoróforo Alexa Fluor-350 posee un motivo maleimida que reacciona eficientemente con el grupo tiol de la cisteína para formar enlaces covalentes tioeter que dan lugar a conjugados estables de proteína marcada (Fig. 6.6).

Las proteínas marcadas con este fluoróforo muestran un pico máximo de absorción y de emisión de la fluorescencia de aproximadamente 346 y 442 nm, respectivamente (Fig. 6.7).

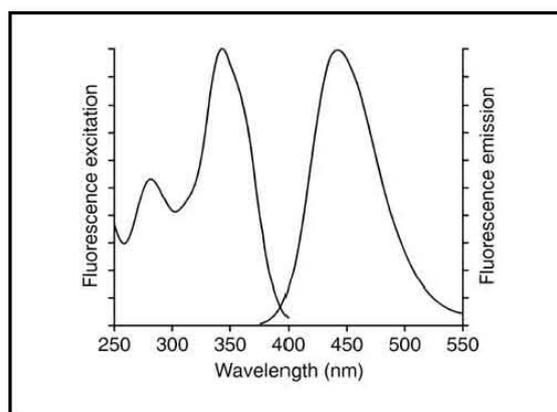


Figura 6.7. Espectros de absorción y de emisión normalizados de la marca Alexa Fluor-350 acoplada a un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, a pH 8 [119].

***1,5-IAEDANS:** es un fluoróforo derivado del naftaleno. Su espectro de emisión de la fluorescencia es sensible a la polaridad del solvente y presenta varios cambios en su λ máxima de emisión ($\lambda_{\text{max em}}$) e intensidad de fluorescencia, los cuales están determinados por el grado de solvatación acuosa, mostrando un bajo rendimiento cuántico (ϕ) y coeficiente de absorción molar (ϵ) cuando está inmerso en agua o en solventes muy polares, y un rendimiento cuántico mucho mayor cuando se encuentra inmerso en ambientes apolares o hidrofóbicos [113] (Tabla 6.2, Fig. 8.8.A). Debido a esta propiedad, el marcaje de las cisteínas de la toxina Cry1Ab con este fluoróforo permite detectar cambios referentes a la ubicación en un ambiente polar o no polar de cada uno de los residuos marcados.

La fluorescencia del 1,5-IAEDANS no es susceptible al apagado con yoduro, pero sí con acrilamida, mostrando una K_D efectiva de 10.1 M^{-1} (Fig. 8.9).

Tabla 6.2. Propiedades del espectro de absorción y emisión de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS disuelto en varios solventes (tomada de Hudson E. & Webber G., 1973)				
Solvente	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$10^{-3} \epsilon$ ($\text{cm}^2 \text{mM}^{-1}$)	$\lambda_{\text{max em}}$ (nm)	ϕ
agua	336	6.1	520	0.27
etanol (20 %)-agua	337	6.3	510	0.40
etanol (40 %)-agua	338	6.5	500	0.47
etanol (60 %)-agua	338	6.6	493	0.56
etanol (80 %)-agua	339	6.8	485	0.66
Etanol	340	6.9	460	0.69
Propilenglicol	340	6.7	485	0.72
Dimetilformamida	341	8.1	448	0.82
Dioxano	339	7.4	452	

Cabe señalar que la mayoría de la regiones que se seleccionaron para el marcaje se encuentran expuestas dentro de la estructura monomérica de la toxina Cry1Aa (toxina con 95 % de identidad con respecto a la Cry1Ab, Fig. 1.3) por lo que dichas posiciones fueron susceptibles al marcaje con los fluoróforos (Fig. 8.1).

6.5. Medición de la fluorescencia intrínseca de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcadas con fluoróforos

De experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se ha obtenido que las muestras que contienen monómero puro en solución de la toxina Cry1Ab silvestre, presentan un pico máximo de emisión de la fluorescencia intrínseca con una $\lambda_{\max \text{ em}} = 336 \pm 1.4 \text{ nm}$ (dada por los triptófanos de la proteína) [71].

Partiendo de lo anterior, para comprobar que las toxinas mutantes marcadas presentaban propiedades estructurales similares a las de la toxina Cry1Ab silvestre, realizamos mediciones de los espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca del monómero en solución de las mutantes, excitando a 295 nm y haciendo un barrido de la emisión de la fluorescencia de 300 a 400 nm para obtener las $\lambda_{\max \text{ em}}$, de la fluorescencia intrínseca de las toxinas mutantes y compararlas con la de la toxina silvestre.

6.6. Inserción del monómero de la toxina Cry1Ab en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina

Los liposomas (SUV's, small unilamellar vesicles, por sus siglas en inglés) de fosfatidilcolina juegan un papel parecido al de la membrana de las células epiteliales del intestino del insecto, proporcionando un ambiente hidrofóbico en el cual se pueda insertar la toxina Cry1Ab.

Para analizar los cambios conformacionales que sufre la toxina Cry1Ab al insertarse en membranas sintéticas, se incubó a la toxina monomérica marcada en presencia de SUV de fosfatidilcolina. La toxina insertada en la membrana se obtuvo ultracentrifugando la mezcla anterior (ver protocolos) y separando el pellet del sobrenadante. En este caso, el pellet estaba compuesto de las membranas lipídicas de fosfatidilcolina con la toxina que se insertó o se asoció a ellas; por el contrario, en el sobrenadante permaneció la toxina que no se insertó en la membrana.

Para obtener el porcentaje de inserción de la toxina en las membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina, se midieron las intensidades máximas de fluorescencia intrínseca de la toxina presente en el pellet y en el sobrenadante, y dichas medidas se utilizaron para estimar la relación de toxina Cry1Ab insertada en las membranas lipídicas.

6.7. Inserción del monómero de la toxina Cry1Ab en BBMV's de *M. sexta* y formación del oligómero de la toxina

Las vesículas elaboradas a partir de membranas aisladas del intestino medio de las larvas de *M. sexta* (BBMV's) presentan la composición lipídica y los receptores de la toxina Cry1Ab necesarios para favorecer los cambios conformacionales requeridos para su oligomerización e inserción dentro de la membrana lipídica. Por esta razón, para la obtención del oligómero de las mutantes de la toxina Cry1Ab insertado en la membrana lipídica, realizamos ensayos de inserción de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcadas con fluoróforos, directamente sobre BBMV's elaboradas con membranas del intestino medio de larvas de *M. sexta* de 3er instar de desarrollo.

Para la inserción, se incubaron por separado los monómeros de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcados con fluoróforos, en buffer de carbonatos 50 mM pH 9 y en presencia de las BBMV's. La toxina insertada en la membrana, se obtuvo centrifugando la mezcla anterior (ver protocolos) y separando el pellet del sobrenadante. En este caso, el pellet estaba compuesto por las membranas lipídicas de *M. sexta* y el oligómero de la toxina que se insertó en ellas; por el contrario, en el sobrenadante permaneció la toxina que no se insertó en la membrana.

Finalmente, la formación del oligómero insertado en las membranas lipídicas se verificó mediante western-blot del pellet membranal obtenido, usando un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab.

6.8. Ensayos de apagado dinámico de la fluorescencia

Los ensayos de apagado dinámico de la fluorescencia se realizaron utilizando apagadores solubles en agua, para obtener los cambios en la exposición al solvente acuoso de los residuos marcados de la toxina Cry1Ab en solución, respecto a la toxina insertada en la membrana lipídica, o bien, apagadores anclados a los ácidos grasos de la membrana lipídica, para identificar a las regiones de la toxina insertada que se encuentran en contacto con la bicapa.

6.8.1. Apagado dinámico con apagadores solubles en ambientes polares

Estos ensayos de apagado dinámico se hicieron utilizando a la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS o con Alexa Fluor-350, en forma de: monómero en solución y oligómero insertado en membranas aisladas del intestino medio de larvas de *M. sexta* (BBMV's). Adicionalmente, para algunas mutantes de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa fluor-350 se realizaron ensayos de apagado dinámico de la fluorescencia extrínseca del monómero unido a los receptores fosfatasa alcalina o al repetido de caderina 7-12 (Fig. 6.8).

Los apagadores de la fluorescencia usados en los ensayos anteriores fueron yoduro (KI) para el Alexa Fluor-350 y acrilamida para el 1,5-IAEDANS, ambos solubles en agua (Fig. 6.8).

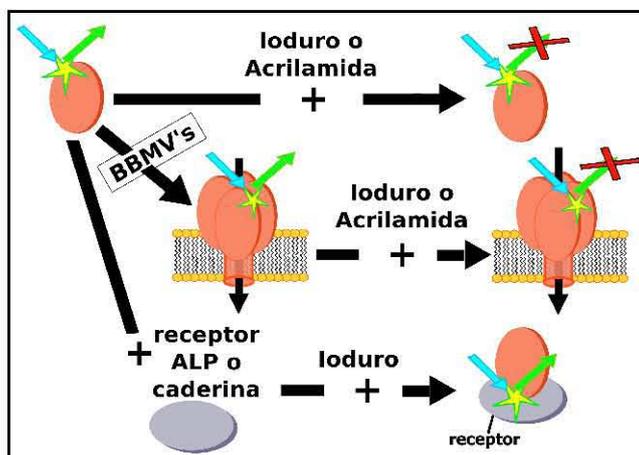


Figura 6.8. Esquema general de los experimentos de apagado dinámico de la fluorescencia de la toxina Cry1Ab, usando apagadores solubles en agua.

De los ensayos anteriores de apagado se obtuvo la constante de Stern-Volmer para el apagado dinámico de la fluorescencia (K_D), la cual resulta de la pendiente de la curva que se obtiene al graficar F_0/F contra la $[Q]$ (ver sección 1.2.4.2), en donde:

- F_0 : intensidad de fluorescencia en ausencia del apagador
- F : intensidad de fluorescencia en presencia del apagador
- $[Q]$: concentración de apagador (yoduro o acrilamida)

Ya que el apagado dinámico de la fluorescencia depende del contacto físico entre el apagador y el fluoróforo, en este caso, la K_D constituye un indicativo del nivel de accesibilidad del fluoróforo a los apagadores, o bien, de la exposición al solvente acuoso de los fluoróforos anclados en las diferentes regiones de la estructura de la toxina Cry1Ab en solución, unida al receptor, o insertada en la membrana lipídica.

6.8.2. Apagado dinámico con apagadores anclados a la membrana lipídica

Para identificar a las regiones de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana que están en contacto con la bicapa lipídica, se incubaron algunas de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS, en presencia de BBMV's elaboradas con membranas del intestino medio de larvas de *M. sexta* del tercer instar de desarrollo, o bien, con BBMV's suplementadas con 16:0-5 Doxyl PC (1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina, Avanti® polar lipids, Fig. 6.9). En este caso el grupo nitróxido, anclado a la cadena lateral del ácido graso, funciona como apagador colisional de la

fluorescencia del 1,5-IAEDANS, de forma tal que solo los residuos que se insertan dentro de la bicapa lipídica y entran en contacto con dicho grupo muestran un apagado de la fluorescencia (Fig. 6.9.B).

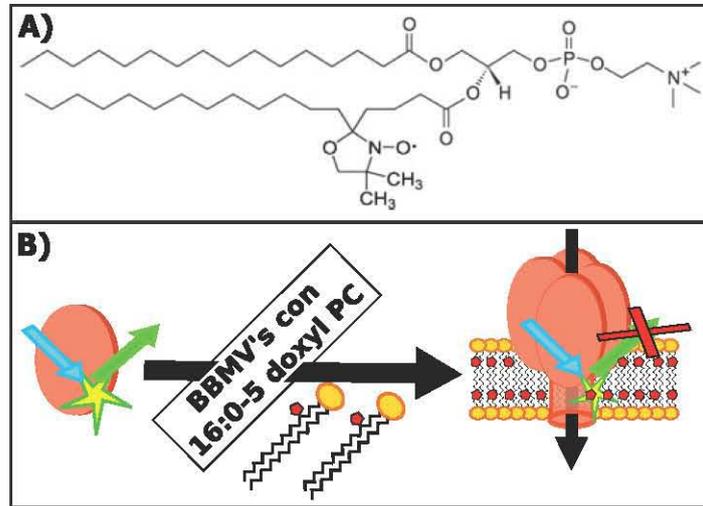


Figura 6.9. A) Estructura del 1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina, o 16:0-5 Doxyl PC. B) Esquema general de los experimentos de apagado dinámico de la fluorescencia de la toxina Cry1Ab, usando apagadores acoplados a los ácidos grasos de la membrana.

La toxina insertada en la membrana lipídica se obtuvo centrifugando las mezclas anteriores y recuperando los pellets membranales, para finalmente obtener el porcentaje de apagado de la fluorescencia mediante la siguiente relación: $[1 - (F/F_0)] * 100$, en donde F y F₀ corresponden a la intensidad máxima de fluorescencia de la toxina insertada en las membranas (BBMV's), con o sin el apagador (16:0-5 Doxyl PC), respectivamente.

7. MATERIALES

7.1. Cepas utilizadas

***Bt-407⁺ Cry1Ab:** Ceba de *B. thuringiensis* que contiene el plásmido pHT315Ab que codifica para la protoxina Cry1Ab.

***Bt-407⁻:** Es una cepa de *B. thuringiensis* acristalífera, derivada de la línea silvestre de *B. thuringiensis* 407+, que no contiene plásmido que codifique para la protoxina Cry, por lo que no produce cristal proteico.

***DH5 α :** Ceba competente de *E. coli* utilizada para sobre expresar los plásmidos pHT315Ab.

Genotipo: F- Φ 80/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk, mk⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^- (Invitrogen).

7.2. Medios de cultivo

Medio LB (Luria Bertani)

Bacto-peptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar	15 g

Aforar a 1 litro con agua destilada y ajustar el pH a 7 con NaOH. Y en el caso del medio sólido, agregar el agar al final.

Esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq y una vez frío el medio, agregar el antibiótico correspondiente: ampicilina a una concentración final de 200 μ g/ml (LBAm²⁰⁰) ó bien, eritromicina a una concentración final de 15 μ g/ml (LBEr¹⁵).

Medio mínimo de esporulación HCT (de hidrolizado de caseína triptona)

Bacto-triptona	2.5 g
Bacto-casaminoácidos	1 g
Bacto-agar	7.5 g

Aforar a 446 ml con agua destilada. Después, ajustar el pH a 7.25 con KOH 5 M. En el caso del medio sólido agregar el agar al final. Esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq. Una vez frío el medio, agregar las siguientes soluciones previamente esterilizadas.

Solución I

KH_2PO_4 6.8 g
Disolver en 100 ml de agua destilada
-Agregar 25 ml

Solución II

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.23 g
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0169 g
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14 g
Disolver en 100 ml de agua destilada
-Agregar 0.5 ml

Solución III

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g
 H_2SO_4 1N 10 ml
Disolver en 100 ml de agua destilada
-Agregar 5 ml

Solución IV

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.47 g
Disolver en 100 ml de agua destilada
-Agregar 15 ml

Glucosa al 10 % p/v

-Agregar 15 ml

Por último agregar eritromicina a una concentración final de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (HCTEri¹⁵) en el caso de ser necesario.

Medio BHI (Brain Heart Infusion)

Bacto-BHI dihidratado 37 g

Aforar a 1 L con agua destilada. Esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Construcción de mutantes sitio dirigidas de la toxina Cry1Ab, expresión en *B. thuringiensis* y evaluación de la toxicidad sobre larvas de *M. sexta*

Se construyeron 7 mutantes sitio dirigidas por cisteína de la toxina Cry1Ab. Se eligió la estrategia de inserción de cisteínas en la toxina debido a que el monómero de la toxina Cry1Ab carece de cisteínas dentro de su secuencia de aminoácidos, facilitando de esta manera la inserción específica de cisteínas en la zona que se desee dentro de la toxina Cry1Ab.

La Tabla 8.1 muestra la lista de las mutantes construidas y su toxicidad expresada como la dosis letal media sobre larvas de *M. sexta* del primer instar de desarrollo (LC_{50} , obtenida mediante bioensayos, como se menciona en la metodología). Como se observa en la Tabla, la mayoría de las toxinas mutantes muestran una LC_{50} dentro del mismo rango de toxicidad que el de la toxina Cry1Ab silvestre. Esto nos hace suponer que los diferentes cambios insertados no afectaron de manera significativa la estructura tridimensional de la toxina Cry1Ab, así como a los diferentes pasos de su mecanismo de acción y por lo tanto, los datos obtenidos a partir de los ensayos de marcaje sitio-específico, inserción en membranas lipídicas y apagado de la fluorescencia de dichas toxinas serán útiles para analizar los cambios conformacionales que sufre la toxina Cry1Ab silvestre durante su inserción en la membrana lipídica.

Dominio	Toxina	LC_{50} ng/cm ² *
	Cry1Ab wt	2.6 (1.8 - 3.7)
I	T122C	2.9 (1.8 - 4.8)
	V171C	5.8 (3.7 - 8.6)
	G183C	2.9 (1.6 - 5.5)
II	S324C	6.0 (3.0 -10.1)
	S364C	3.6 (1.4 - 10.2)
III	K490C	6.6 (1.6 - 18.2)
	N547C	5.2 (1.5 - 16.2)

*entre paréntesis los límites de confianza al 95 %

Todas las mutantes de la toxina Cry1Ab se expresaron en forma de cristales proteicos bipiramidales parasporales y presentan el tamaño esperado para la protoxina (~130 kDa). Lo anterior sugiere que las mutaciones puntuales insertadas no afectaron la expresión proteica ni la susceptibilidad de la toxina a ser degradada por proteasas propias de *B. thuringiensis*, como se ha reportado previamente para algunas otras mutantes de las toxinas Cry1Ab [110]. Del mismo modo, las mutantes no mostraron anomalías en el proceso de activación de la toxina, liberando el fragmento tóxico esperado de aproximadamente 60 kDa (mutantes T122C, V171C, G183C, S324C, S364C, K490C y N547C), como se muestra mas adelante (Fig. 8.3 y 8.4).

8.2. Expresión y purificación de la toxina Cry1Ab

Para el análisis de la inserción de la toxina Cry1Ab en la membrana, trabajamos con tres mutantes situadas dentro del dominio I de la toxina (T122C, V171C y G183C), dos dentro del dominio II (S324C y S364C) y dos dentro del dominio III (K490C y N547C, ver Tabla 6.1 y Fig. 6.1, 6.2 y 8.1).

Las marcas reactivas de los fluoróforos que utilizamos para el marcaje sitio específico en la cisteína insertada dentro del monómero de la toxina Cry1Ab fueron el 1,5-IAEDANS y el Alexa Fluor-350 C₅-maleimida (Fig. 6.6). Como control negativo de marcaje en cisteínas incluimos al monómero de la toxina Cry1Ab silvestre, ya que este no posee residuos de cisteína dentro de su secuencia de aminoácidos (Fig. 6.2).

Para el marcaje sitio específico en cisteínas de las mutantes de la toxina Cry1Ab construidas, era necesario que el monómero de la toxina estuviera correctamente activado enzimáticamente (con tripsina) y purificado, ya que en los extremos N- y C-terminal de la protoxina se encuentran once residuos de cisteína (dos en el N-terminal y nueve en el C-terminal) que también podrían reaccionar con las marcas reactivas (Fig. 6.2).

De esta forma, como se menciona en la sección de protocolos, las protoxinas de las mutantes fueron expresadas en *B. thuringiensis* y los cristales proteicos parasporales correspondientes fueron purificados a partir de dicha cepa. Las protoxinas fueron solubilizadas en buffer carbonatos 100 mM, 0.2 % de β -mercaptoetanol, pH 10.5. Para obtener el monómero de la toxina Cry1Ab, las protoxinas solubles fueron activadas, mediante su procesamiento enzimático con tripsina (en una relación en masa de 1:50 de tripsina-protoxina).

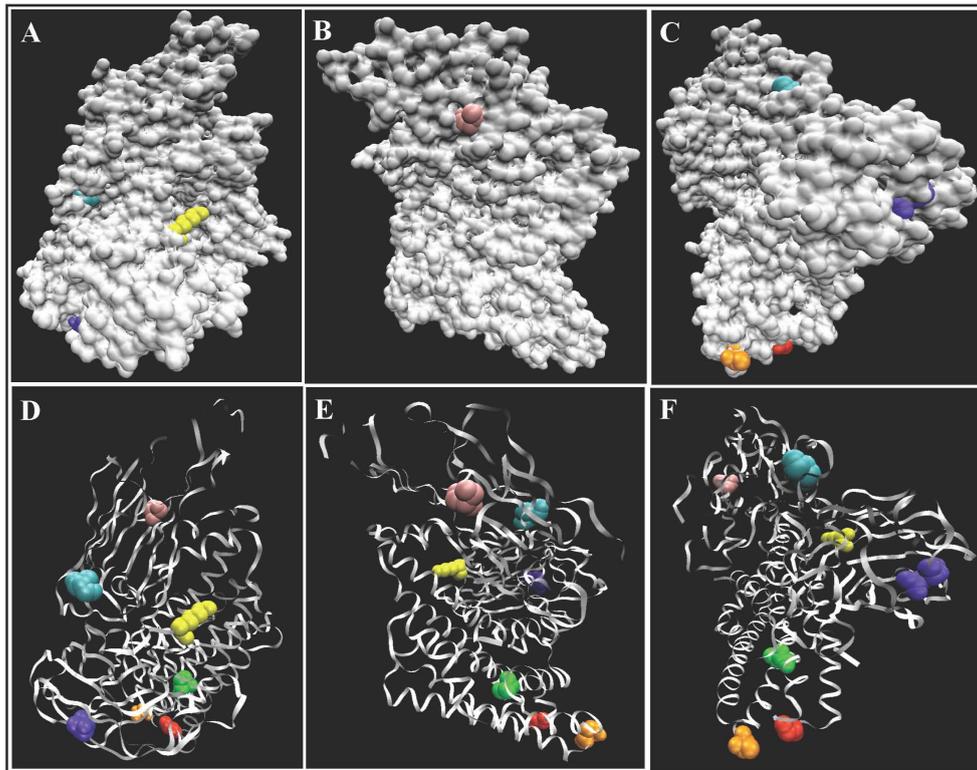


Figura 8.1. Modelo de la estructura tridimensional del monómero de la toxina Cry1Ab que muestra la localización de los 7 residuos utilizados para el marcaje sitio específico con fluoróforos. La Figura se realizó utilizando las coordenadas de la estructura cristalográfica reportada para el monómero de la toxina Cry1Aa (con la cual la toxina Cry1Ab comparte mas de un 95 % de identidad). Los paneles A, B y C muestran la exposición al solvente de los residuos marcados; en D, E y F se muestra su localización dentro la representación en cintas de la estructura tridimensional de la toxina Cry1Ab. A, B y C poseen la misma orientación que D, E y F, respectivamente. Los residuos representados son: T122C (naranja), V171C (verde), G183C (rojo), S324C (cían), S364C (rosa), K490C (amarillo) y N547C (morado).

Posteriormente, aprovechando que hay una gran diferencia en los puntos isoeléctricos (pI) del monómero de la toxina Cry1Ab ($pI = 7.61$) y de la tripsina ($pI = 10.5$), los monómeros se purificaron mediante cromatografía de intercambio aniónico, utilizando la columna Mono Q y el equipo de PFLC, AKTA (Amersham Biosciences). Esto se hizo con la finalidad de eliminar la tripsina y los restos peptídicos resultantes del procesamiento enzimático de los extremos N- y C-terminal.

La Figura 8.2 muestra algunos ejemplos de los cromatogramas obtenidos durante la purificación del monómero de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes. Las fracciones colectadas en la elusión del monómero durante la cromatografía de intercambio aniónico (de 1.5 ml cada una, marcadas en los cromatogramas con un círculo, Fig. 8.2) se corrieron en un gel de SDS-PAGE al 12 % (Fig. 8.3), con el fin de verificar el grado de pureza del monómero en cada una de ellas y decidir que fracciones se utilizarían para el marcaje posterior de la toxina.

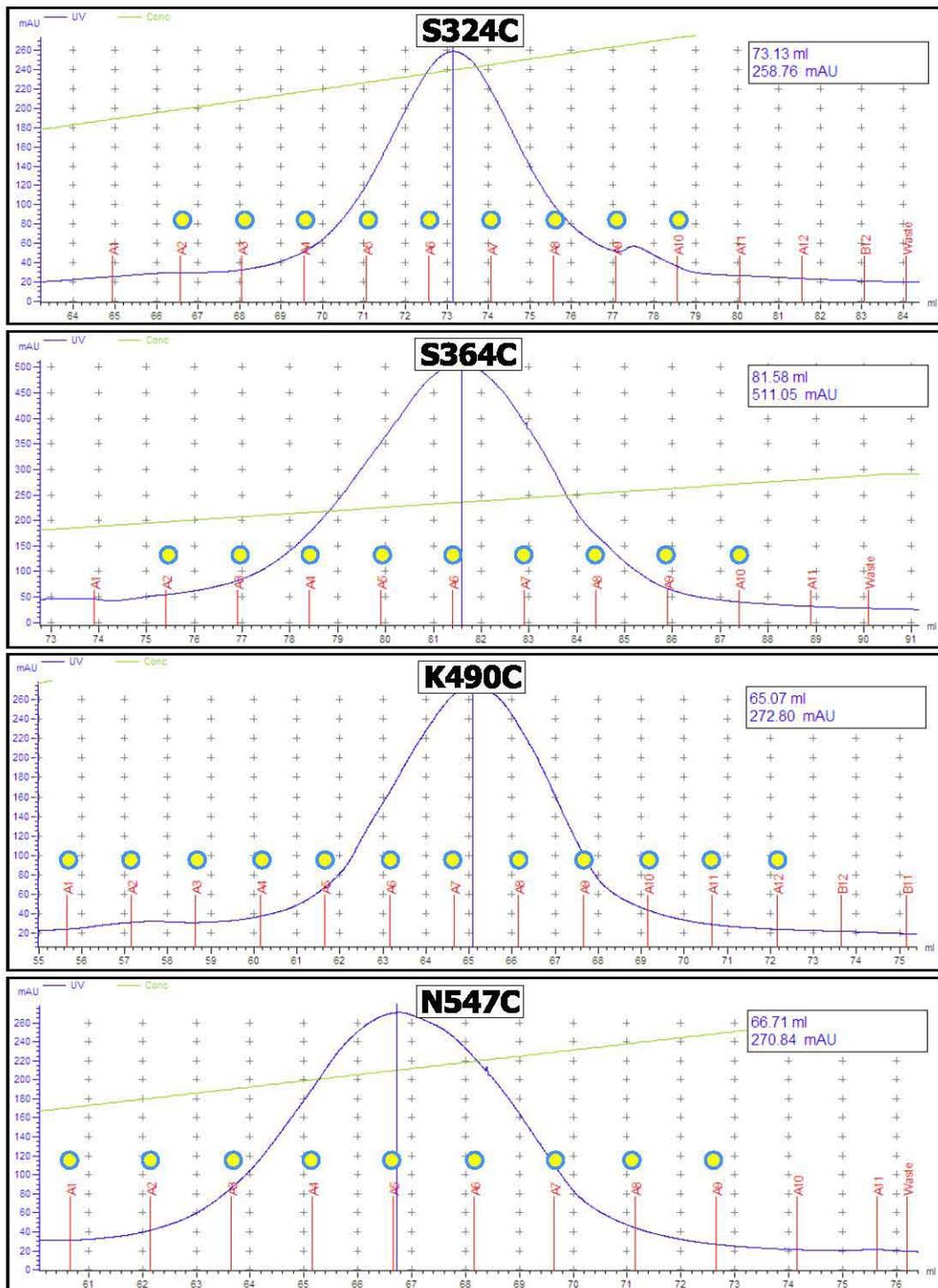


Figura 8.2. Cromatogramas obtenidos durante la purificación de los monómeros de las toxinas Cry1Ab silvestre y de las mutantes, mediante cromatografía de intercambio aniónico, utilizando el equipo de FPLC AKTA y la columna Mono Q (GE, Healthcare). Se graficaron las unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm (mAU, en azul), contra el volumen de los buffers de unión y elusión utilizados durante la cromatografía (ml). En verde claro se muestra el porcentaje del gradiente lineal de buffer de elusión usado durante la cromatografía. Las fracciones recolectadas se indican con líneas verticales. En general todos los cromatogramas mostraron el mismo comportamiento por lo que se muestra el cromatograma completo de la toxina Cry1Ab silvestre y en el caso de las mutantes solo se muestra el pico de elusión correspondiente a la toxina monomérica.

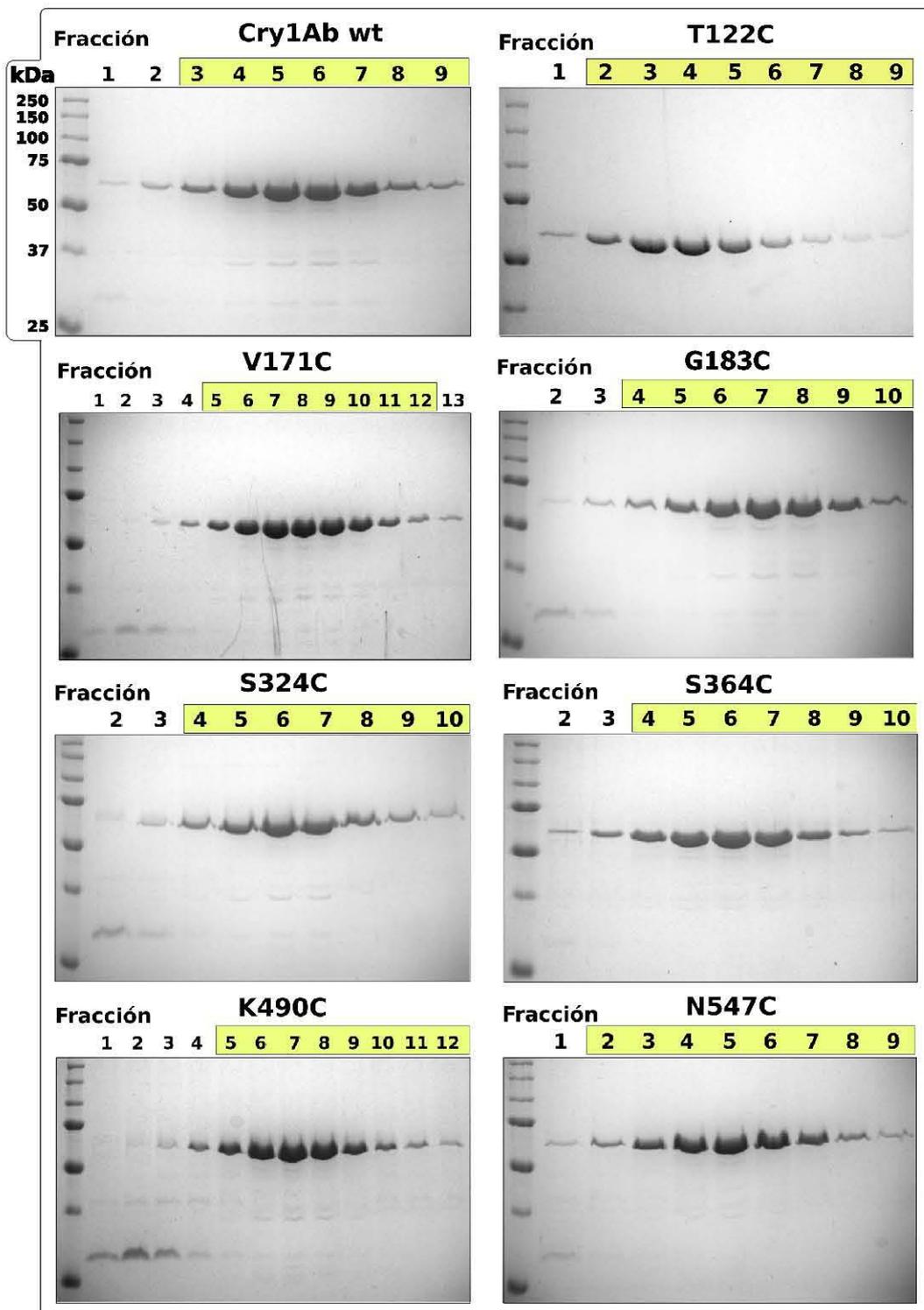


Figura 8.3. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación del monómero de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes, mediante cromatografía de intercambio aniónico. Se cargaron de 10 a 25 μ l de cada fracción (el mismo volumen para cada toxina) en geles de SDS-PAGE al 12 %, los cuales se tiñeron con azul de coomasie. El recuadro en la parte superior de cada gel indica a aquellas fracciones que se juntaron, concentraron y dializaron contra buffer PBS para su uso posterior en el marcaje específico en cisteínas de la toxina.

Finalmente, las fracciones seleccionadas (marcadas con un recuadro en la parte superior de los geles de SDS-PAGE, Fig. 8.3), se juntaron, concentraron y dializaron contra buffer PBS para su uso posterior en la reacción de marcaje. En la Figura 8.4 se muestran geles de SDS-PAGE al 12 % con los monómeros purificados de las mutantes de la toxina Cry1Ab que fueron utilizados para el marcaje en cisteínas.

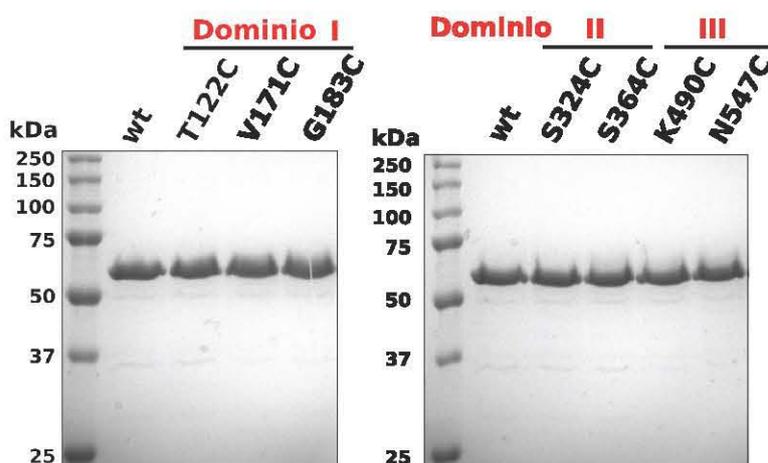


Figura 8.4. SDS-PAGE de los monómeros de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes utilizadas para el marcaje en cisteínas con los fluoróforos 1,5-IAEDANS y Alexa Fluor-350. Se cargaron 5 μ g de los monómeros purificados por cromatografía de intercambio aniónico, en geles de SDS-PAGE al 12 % que se tiñeron con azul de coomasie.

8.3. Marcaje en cisteínas del monómero de la toxina Cry1Ab

La reacción de marcaje sitio específico con fluoróforos en cisteínas del monómero de las toxinas mutantes se realizó como se describe en la sección de protocolos. Para tal fin utilizamos dos fluoróforos diferentes (marcas reactivas):

1) **1,5-IAEDANS**, cuyo rendimiento cuántico y espectro de emisión de la fluorescencia muestra una gran sensibilidad a la polaridad del ambiente en el que se encuentra el fluoróforo, modificando su $\lambda_{\text{max em}}$ e $I_{\text{max em}}$ (Tabla 6.2 y Fig. 8.8).

2) **Alexa Fluor-350 C₅-maleimida**, que tiene un gran rendimiento cuántico y cuyo espectro de emisión de la fluorescencia es relativamente poco sensible a la polaridad del ambiente en el que se encuentra el fluoróforo (Fig. 8.8).

Cabe destacar que ambos fluoróforos muestran una sensibilidad diferencial hacia el apagado colisional con KI o acrilamida (Fig. 8.9).

Como se mencionó anteriormente, en la reacción de marcaje se incluyó también al monómero de la toxina Cry1Ab silvestre, como control negativo de marcaje. Las estequiometrías de marcaje obtenidas para cada una de las mutantes se muestran en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Estequiometría de marcaje de los monómeros de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcados con Alexa Fluor-350 o 1,5-IAEDANS			
Dominio.	Toxina	Estequiometría de marcaje *	
		1,5-IAEDANS	Alexa Fluor-350
	Cry1Ab wt	0.16	0.11
I	T122C	0.84 ± 0.05	0.94 ± 0.02
	V171C	0.24 ± 0.09	1.00 ± 0.03
	G183C	ND	0.87
II	S324C	0.72 ± 0.1	0.84 ± 0.04
	S364C	0.72 ± 0.09	0.37 ± 0.08
III	K490C	0.75 ± 0.08	1.02 ± 0.02
	N547C	0.61 ± 0.06	1.06 ± 0.01

* media ± SEM, n= 3

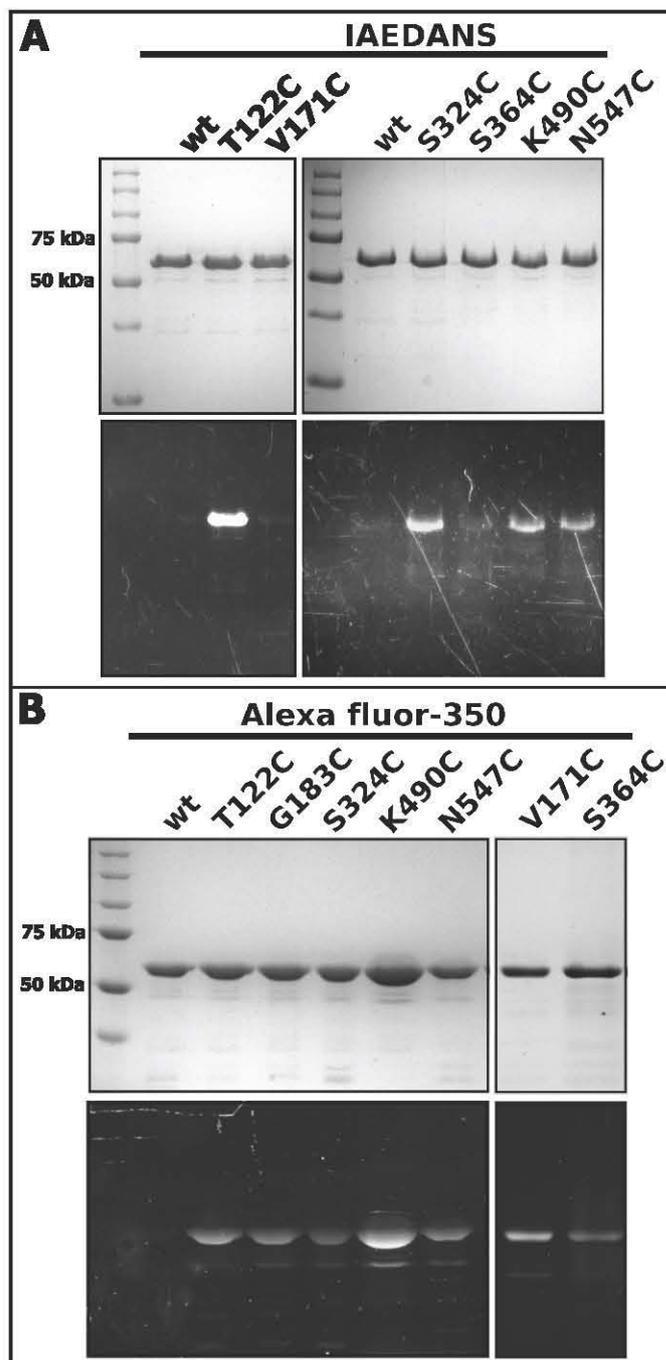
En las diferentes ocasiones en las que marcamos los monómeros de la toxina Cry1Ab con 1,5-IAEDANS o con Alexa Fluor-350, se observaron estequiometrías de marcaje similares. Pensamos que la marca que se observa en el monómero de la toxina Cry1Ab silvestre es fluoróforo unido de forma inespecífica a la proteína (uniones no covalentes, como por ejemplo mediante atracciones electrostáticas). Otra posibilidad es que podría haber una pequeña fracción de fragmentos peptídicos provenientes del procesamiento enzimático del extremo N- o C- terminal de la protoxina que no fueron eliminados por completo durante la cromatografía de intercambio aniónico, o bien, que una pequeña población de monómeros de la toxina no se hayan procesado enzimáticamente por completo.

Cabe señalar que al marcar a la mutante V171C con 1,5-IAEDANS obtuvimos una estequiometría de marcaje muy baja. Existen reportes previos en los que esta mutante ha sido marcada de manera eficiente con 1,5-IAEDANS y Acrilodan [109], pero en nuestras manos no fue factible obtener un buen marcaje para dicha posición. Pensamos que esto se debe a que el residuo se encuentra en un núcleo hidrofóbico dentro del dominio I de la toxina Cry1Ab, de forma que está poco accesible a la marca, como se puede observar en la estructura tridimensional del monómero de la toxina Cry1A (Figura 8.1). Por tal motivo, para realizar el marcaje de esta mutante y de la S364C con Alexa Fluor-350 C₅-maleimida, previo al marcaje, desnaturalizamos parcialmente el monómero de la toxina mediante la adición de 6M de urea (de manera similar a como se ha reportado anteriormente [80]), para facilitar con ello la accesibilidad de la marca reactiva a la cisteína de estas mutantes.

Con el fin de corroborar que los monómeros de la toxina estaban marcados, hicimos migrar a las proteínas marcadas con 1,5-IAEDANS o con Alexa Fluor-350 en un gel de SDS-PAGE al 12 % y excitamos a las proteínas dentro del gel con luz UV,

utilizando un transiluminador (Gel Doc XR System, Bio-Rad), de manera similar a como se ha reportado previamente para otras proteínas marcadas con fluoróforos [114, 115].

Como se observa en la Figura 8.5.A, en el marcaje con 1,5-IAEDANS, los monómeros de la toxinas T122C, S324C, K490C y N547C, muestran una emisión significativa de la fluorescencia (en color verde, ya que su $\lambda_{\text{max em}} = \sim 490$ nm en ambientes polares), aún en las condiciones desnaturizantes del gel.



Para el caso de la mutante S364C marcada con 1,5-IAEDANS se observa una reducida emisión de la fluorescencia (Fig. 8.5.A), lo cual pudiera deberse a que en las condiciones desnaturizantes del SDS-PAGE este residuo se localiza en un ambiente local muy polar (ya sea que se expone demasiado al solvente, o bien que se encuentra rodeado por residuos de aminoácidos altamente polares), disminuyendo considerablemente el rendimiento cuántico y la fluorescencia del 1,5-IAEDANS, ya que el espectro de emisión de este fluoróforo es muy sensible a cambios en la polaridad del ambiente en el que se encuentra (Fig. 8.8.A).

Figura 8.5. SDS-PAGE de los monómeros de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcados con 1,5-IAEDANS o Alexa Fluor-350. Se cargaron 3 μg de los monómeros marcados contenidos en buffer carbonatos 50 mM, pH 9, en geles de SDS-PAGE al 12 %, posteriormente se observaron en el transiluminador (Gel Doc XR System, Bio-Rad) excitando con luz UV (parte inferior) y finalmente se tñieron con azul de coomassie (parte superior).

Finalmente, en el caso del monómero de la toxina V171C marcada con 1,5-IAEDANS, la baja señal de fluorescencia observada en el gel de SDS-PAGE (Fig. 8.5.A) podría deberse al bajo grado de marcaje obtenido para dicho residuo (Tabla 8.2).

Por otra parte, para el caso de los monómeros de la toxina Cry1Ab marcados con Alexa Fluor-350, las 7 mutantes marcadas mostraron una emisión significativa de la fluorescencia (en color azul ya que su $\lambda_{\max \text{ em}} = \sim 442 \text{ nm}$) (Fig. 8.5.B).

8.4. Análisis de la fluorescencia intrínseca del monómero la toxina Cry1Ab

Con el fin de evaluar si los fluoróforos unidos a la toxina Cry1Ab podrían afectar su estructura tridimensional, realizamos un análisis de la fluorescencia intrínseca de las mutantes marcadas y de la toxina Cry1Ab silvestre. Para esto, obtuvimos los espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca del monómero en solución de las mutantes marcadas, y los comparamos con el espectro de emisión del monómero de la toxina Cry1Ab silvestre.

Como se observa en la Tabla 8.3, las toxinas marcadas mostraron longitudes máximas de emisión ($\lambda_{\max \text{ em}}$) de la fluorescencia intrínseca similares a la reportadas previamente para el monómero de la toxina Cry1Ab silvestre (336 ± 1.4) [71], por lo que pensamos que, en general, la unión covalente del Alexa Fluor-350 o del 1,5-IAEDANS a las diferentes toxinas mutantes no afectó de manera significativa la estructura tridimensional del monómero en solución. Un caso a destacar es el de la mutante K490C marcada con Alexa Fluor-350, la cual mostró una $\lambda_{\max \text{ em}} = 331 \pm 1$.

Tabla 8.3. $\lambda_{\max \text{ em}}$ de la fluorescencia intrínseca de los monómeros de la toxina Cry1Ab marcados con 1,5-IAEDANS o Alexa Fluor-350		
Toxina	$\lambda_{\max \text{ em}}$ (nm) de las toxinas marcadas *	
	1,5-IAEDANS	Alexa Fluor-350
Cry1Ab wt	337 ± 1	
T122C	338 ± 1	337 ± 1
V171C	337 ± 1	337 ± 2
G183C	N.D.	337 ± 1
S324C	337 ± 1	336 ± 0
S364C	337 ± 1	337 ± 2
K490C	335 ± 2	331 ± 1
N547C	336 ± 1	335 ± 1

* media ± SEM, n=3

Pensamos que las diferencias observadas en la λ_{max} em de la fluorescencia intrínseca se deben a que podría estar sucediendo FRET (transferencia de energía) a diferentes grados, entre alguno(s) de los 9 triptófanos que posee la toxina Cry1Ab y los fluoróforos unidos a ella en las diferentes regiones, afectando de esta manera el espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca del monómero de la toxina.

8.5. Análisis de la inserción de la toxina Cry1Ab en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina

8.5.1. Inserción del monómero de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350, en SUV de PC

En un reporte previo se analizaron los cambios conformacionales que sufren las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa al insertarse en membranas lipídicas, mediante el uso de técnicas fluorométricas [109]. Para ello, se construyeron distintas mutantes sitio dirigidas, insertando cisteínas dentro de los tres dominios estructurales de las toxinas Cry1Ab y Cry1Aa (cuya secuencia de aminoácidos presenta más del 95 % de identidad con la de la toxina Cry1Ab [8], Fig. 1.3), y posteriormente se marcó en cisteínas a las mutantes con fluoróforos sensibles a la polaridad del ambiente (1,5-IAEDANS o Acridolán). Posteriormente, se analizaron los cambios en la fluorescencia extrínseca del monómero de las toxinas marcadas, durante su inserción en la membrana lipídica, y con base a dichos cambios propusieron un modelo de inserción para las toxinas Cry1A, según el cual los tres dominios del monómero de la toxina se insertan dentro de la bicapa lipídica [109].

Cabe destacar que para el análisis anterior se utilizó una gran cantidad de lípidos durante los ensayos de inserción de la toxina en membranas lipídicas sintéticas (relación 1:100 en masa de proteína-lípidos) y los experimentos se realizaron a pH 7.5. Estas condiciones son diferentes a las usadas en nuestro laboratorio, que generalmente son: relación 1:15 en masa, de proteína-lípidos, y pH 10.5, que es el pH presente dentro del intestino de los insectos susceptibles a estas toxinas y con el cual se favorece un aumento en la flexibilidad y cambios conformacionales de la estructura de la toxina Cry1Ab, y se observa una mayor actividad de formación de poro del oligómero cuando se analiza por ensayos de flujo de corriente en bicapas lipídicas sintéticas planas. Es importante mencionar que aunque estas condiciones corresponden a la inserción del oligómero en membranas lipídicas sintéticas, decidimos utilizar las mismas condiciones para la inserción del monómero, aunque previamente se ha observado que la inserción y conductancia del monómero en estas membranas es menor (Fig. 2.2), respecto a la observada con la estructura oligomérica [71].

Tomando en cuenta lo mencionado, y con el fin de analizar si la relación proteína-lípido y los cambios en el pH podrían influir en la tasa de inserción del monómero de la

toxina Cry1Ab en membranas lipídicas sintéticas, o en la estructuración de la toxina dentro de la bicapa lipídica, como un primer acercamiento realizamos ensayos de inserción del monómero de la toxina Cry1Ab en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina (SUV's PC) bajo 4 condiciones experimentales, variando la cantidad de lípidos (relación 1:15 o 1:100) y el pH (7.5 o 10.5) en los cuales se incubaba la toxina durante los ensayos de inserción en la membrana (Tabla 8.4). Estos análisis de inserción se realizaron solamente con el monómero de la toxina Cry1Ab silvestre y el de la mutante S364C marcada con Alexa Fluor-350. Los ensayos se describen con mayor detalle en la parte de protocolos.

Tabla 8.4. Condiciones experimentales para la inserción del monómero de la toxina Cry1Ab en bicapas lipídicas sintéticas (SUV's de PC)			
Toxina	pH	Relación proteína-lípidos (masa:masa)	Condición
2 µg	7.5	1: 15	1
		1:100	2
	10.5	1: 15	3
		1:100	4

En la Figura 8.6 se muestra el porcentaje de inserción de la toxina Cry1Ab wt y de la mutante S364C marcada con Alexa Fluor-350 en las membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina. Este resultado concuerda con reportes previos que señalan que su inserción en dichas membranas es poco eficiente [71].

Aun con la baja eficiencia de inserción del monómero en la membrana, fue factible realizar los ensayos posteriores de apagado de la fluorescencia extrínseca.

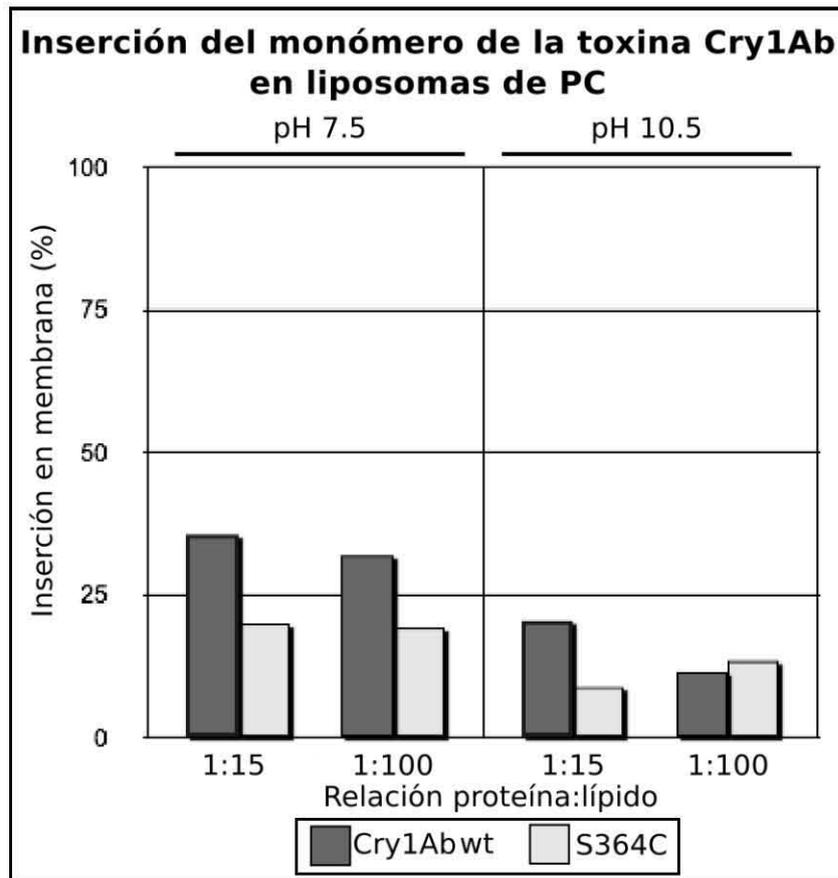


Figura 8.6. Análisis de la inserción en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina (PC) del monómero de la toxina Cry1Ab silvestre y de la mutante S364C marcada con Alexa Fluor-350.

8.5.2. Apagado de la fluorescencia extrínseca del monómero de la toxina Cry1Ab marcado con Alexa Fluor-350 e insertado en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina

Una vez que obtuvimos al monómero de la toxina S364C marcado con Alexa Fluor-350 e insertado en las membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina (SUV's de PC), realizamos los experimentos de apagado de la fluorescencia utilizando 500 mM de ioduro de potasio (apagador soluble en ambientes polares). Esta cantidad de ioduro es suficiente para apagar la mayor parte de la fluorescencia extrínseca de la toxina marcada (en caso de que el residuo marcado esté accesible al solvente acuoso).

Como se observa en la Figura 8.7, en las 4 condiciones experimentales de inserción de la toxina en la membrana lipídica que se probaron, al agregar 500 mM de KI hubo un gran porcentaje de apagado de la fluorescencia extrínseca de la mutante S364C.

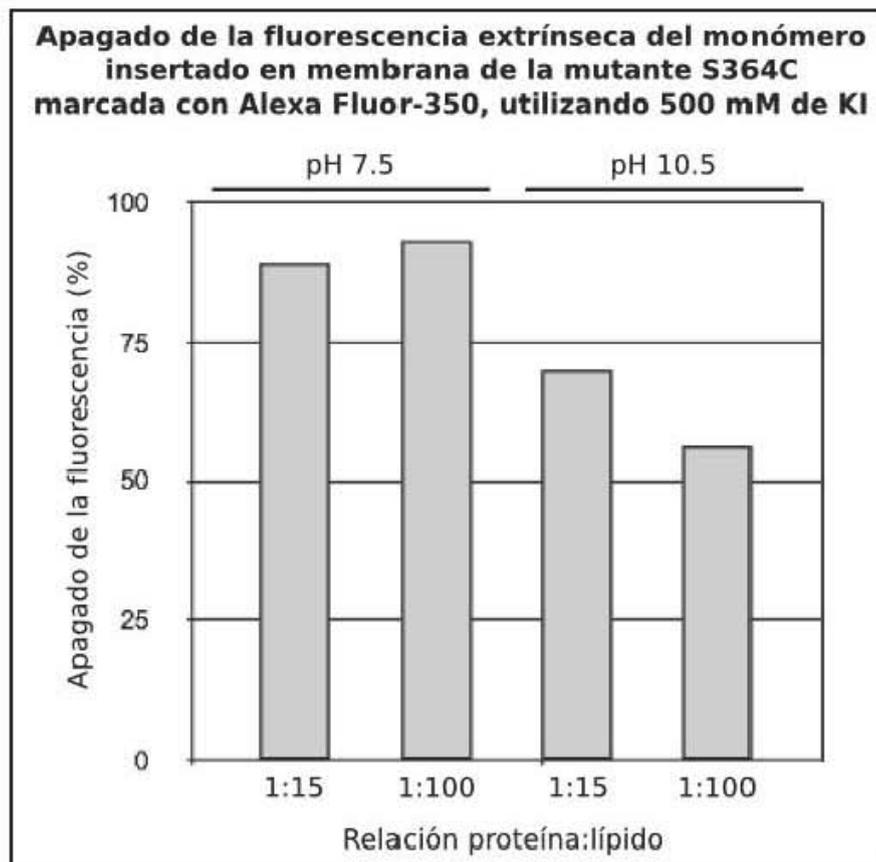


Figura 8.7. Análisis del apagado de la fluorescencia extrínseca del monómero de la mutante S364C marcada con Alexa Fluor-350 e insertado en membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina. Se incubó a la toxina en presencia de SUV's de fosfatidilcolina, durante 1 h a 37°C. Para obtener la toxina insertada en membrana, la mezcla anterior se centrifugó a 90,000 rpm (312,530 g) durante 1 h y se recuperó el pellet lipídico. Para el análisis de apagado de la fluorescencia se agregaron 0mM y 500mM de ioduro de potasio a la toxina insertada en membrana y se obtuvo el porcentaje de apagado de la fluorescencia del Alexa Fluor-350 unido a la toxina S364C.

De esta forma, los datos de la inserción de la toxina Cry1Ab en SUV's de PC y del apagado de la fluorescencia extrínseca del monómero de la mutante S364C marcada con Alexa Fluor-350, nos permitieron concluir principalmente dos cosas:

1. El monómero de la toxina Cry1Ab se inserta con poca eficiencia en las membranas lipídicas sintéticas de fosfatidilcolina (concordando con reportes previos de nuestro laboratorio [71]). Pensamos que esto se debe a que en este sistema *in vitro* no se encuentran presentes los receptores membranales, proteasas intestinales y los lípidos idóneos, que favorezcan la unión e inducción de los cambios conformacionales en la estructura de la toxina Cry1Ab necesarios para su oligomerización e inserción eficiente en la membrana lipídica (ver sección 1.5). Con base estos resultados, fue que decidimos realizar los ensayos posteriores de inserción y apagado de la fluorescencia extrínseca de las demás mutantes marcadas, directamente sobre membranas aisladas del intestino medio de las larvas del insecto *M. sexta* (BBMV's), ya que es en estas membranas sobre las cuales la toxina lleva a cabo su mecanismo de acción *in vivo* (ver sección 1.5).

2. Para el caso de la toxina monomérica insertada (o "asociada") en las membranas sintéticas de fosfatidilcolina, el residuo en la posición 364 (ubicado en el dominio II de la toxina) permanece accesible al solvente. Ya que en este sistema no están presentes los receptores para la toxina, ni las proteasas necesarias para el corte de la hélice α -1 de la toxina y su oligomerización e inserción en la membrana lipídica, pensamos que la toxina Cry1Ab solo se asoció de forma superficial a la membrana (ya que no sufrió los cambios conformacionales ocasionados por su unión al receptor y necesarios para su inserción correcta en la membrana lipídica), y fue por ello que observamos un porcentaje elevado de apagado de la fluorescencia de la mutante S364C asociada a las membranas lipídicas (Figura 8.7).

Tomando en cuenta lo mencionado, este resultado contradice al modelo de inserción de la toxina en la membrana lipídica que propone que toda la toxina se inserta dentro de la bicapa para formar los poros líticos [109]. Es importante mencionar que los autores que propusieron dicho modelo, analizaron también la inserción en membranas lipídicas sintéticas de la mutante S364C marcada con 1,5-IAEDANS, pero basaron sus conclusiones en una interpretación errónea de los cambios en la intensidad y longitud de onda de máxima emisión de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS, durante la inserción de la toxina monomérica en la membrana lipídica, ya que la intensidad de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS disminuye en ambientes polares y aumenta en no polares (Fig. 8.8.A), y ellos afirman lo contrario en su publicación.

Además, en dicho estudio se realizaron experimentos de apagado de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1A marcada con 1,5-IAEDANS en diferentes residuos ubicados dentro de sus tres dominios estructurales, e insertada en membranas lipídicas sintéticas, utilizando yoduro como apagador colisional, y debido a que no observaron apagado de la fluorescencia extrínseca para ninguno de los residuos marcados en la toxina insertada en la membrana lipídica, concluyeron que todas las regiones analizadas se insertaron dentro de la bicapa lipídica [109], pero en realidad el yoduro no es un buen apagador colisional de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS, siendo por esta razón que no observaron apagado alguno y por lo cual concluyeron de forma errónea respecto a las regiones de la toxina que se insertan en la bicapa (Fig. 8.9.A). Por otra parte, en dicho reporte no se usaron apagadores de la fluorescencia anclados a la membrana lipídica, mediante los cuales se hubiera podido asegurar que ciertos residuos de la toxina Cry1Ab insertada en membrana estaban efectivamente situados dentro y en contacto con la bicapa lipídica. En la Figura 6.9.A se muestra un ejemplo de este tipo de apagador.

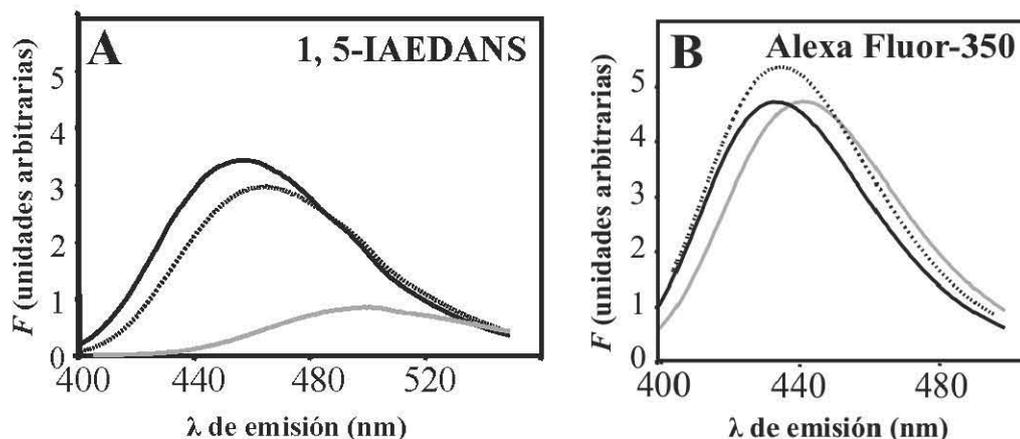


Figura 8.8. Efecto de la polaridad del solvente sobre el espectro de emisión de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS y del Alexa Fluor-350. Cada uno de los fluoróforos se diluyó por separado en PBS a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se incubó con 10 excesos molares de β -mercaptoetanol, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron 10 μg de cada fluoróforo disuelto en PBS y se diluyeron en 3 solventes con constantes dieléctricas diferentes (etanol= 24, metanol= 32.6 y PBS= 78.5, a 25 $^{\circ}\text{C}$), hasta una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (A) Los espectros de emisión de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS se obtuvieron excitando las muestras con luz de $\lambda=336$ nm (PBS, línea gris), $\lambda=338$ nm (metanol, línea punteada) o $\lambda=340$ nm (etanol, línea negra) y haciendo un escan de emisión de la fluorescencia de 400 nm a 550 nm, de forma similar a como se ha reportado previamente [113]. (B) Los espectros de emisión de la fluorescencia del Alexa Fluor-350 se obtuvieron excitando las muestras con luz de $\lambda=346$ nm y haciendo un escan de emisión de la fluorescencia de 400 nm a 500 nm.

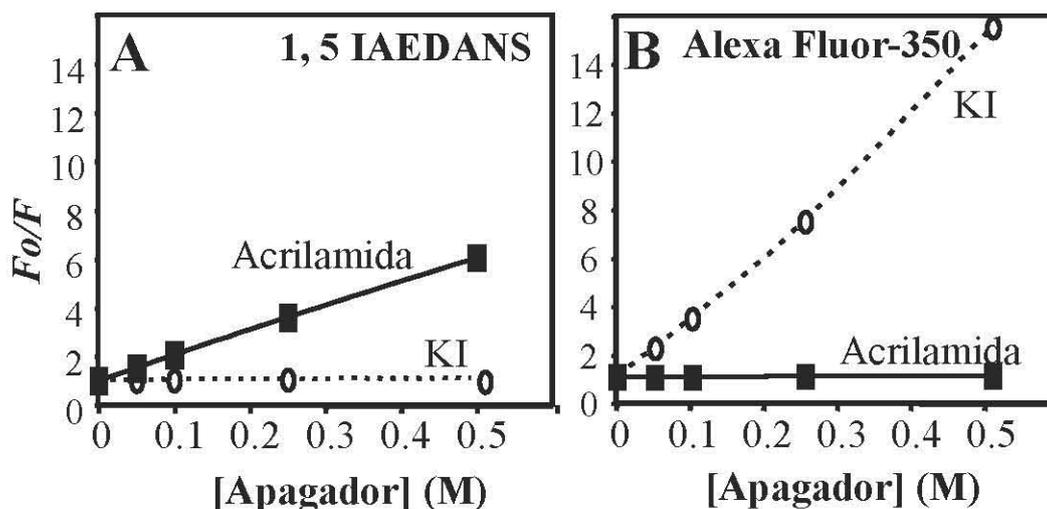


Figura 8.9. Apagado de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS y del Alexa Fluor-350 en solución, utilizando KI o acrilamida. Cada uno de los fluoróforos se resuspendió en PBS a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se incubó con 10 excesos molares de β -mercaptoetanol, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se tomaron 10 μg del 1,5-IAEDANS, se diluyeron en PBS hasta una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se le agregaron, 0.05 M, 0.1 M, 0.25 M y 0.5 M de KI (O) o acrilamida (■). (A) Los espectros de emisión de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS se obtuvieron excitando las muestras con luz de $\lambda=336$ nm y haciendo un escan de emisión de la fluorescencia de 450 nm a 520 nm. (B) Los espectros de emisión de la fluorescencia del Alexa Fluor-350 se obtuvieron excitando las muestras con $\lambda=346$ nm y haciendo un escan de emisión de la fluorescencia de 410 nm a 470 nm. Finalmente, se graficó F_0/F (intensidad máxima de fluorescencia en ausencia del apagador, sobre la intensidad máxima de fluorescencia en presencia del apagador) contra la concentración de apagador correspondiente.

8.6. Análisis de la inserción de la toxina Cry1Ab en membranas lipídicas aisladas del intestino medio de larvas de *M. sexta*

8.6.1. Inserción de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS o Alexa Fluor-350, en BBMVs de *M. sexta*

Como se mencionó anteriormente, para analizar la inserción en membrana de la toxina Cry1Ab decidimos utilizar membranas aisladas del intestino de larvas de *M. sexta* (usando BBMVs del intestino medio de larvas de este insecto del tercer instar de desarrollo), debido a que en ellas se encuentran presentes los receptores, proteasas y lípidos idóneos para favorecer la eliminación de la hélice $\alpha 1$ y los cambios conformacionales en la estructura de la toxina Cry1Ab necesarios para su interacción eficiente, oligomerización e inserción correcta en la membrana lipídica.

Para el análisis de inserción, utilizamos 4 de las 7 mutantes marcadas con 1,5-IAEDANS: T122C, S324C, K490C y N547C, debido a que fueron aquellas con las que se obtuvo el mejor marcaje (Fig. 8.5.A y Tabla 8.2), y las 7 mutantes marcadas con Alexa Fluor-350: T122C, V171C, G183C, S324C, S364C, K490C y N547C (Fig. 8.5.B).

La inserción de los monómeros de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcados con fluoróforos se realizó incubando a la toxina en presencia de las BBMVs de *M. sexta*, en una relación en masa proteica de 1:5 (toxina-BBMVs). Estos ensayos se realizaron a pH 9, con el fin de simular al máximo las condiciones alcalinas presentes en el intestino medio de los insectos blanco de esta toxina. Se eligió trabajar a pH 9 y no a pH 10.5 (el cual se ha reportado que es el presente en el intestino medio de las larvas de *M. sexta*), ya que tanto el rendimiento cuántico como el tiempo de vida media del 1,5-IAEDANS comienzan a decaer de forma significativa a $\text{pH} \geq 10$ [113]. Los ensayos de inserción en BBMVs se describen con mayor detalle en la sección de protocolos.

La inserción del monómero de las mutantes marcadas, en las membranas del intestino medio de las larvas de *M. sexta* (BBMVs) favoreció la formación de la estructura oligomérica de aproximadamente 250 kDa de la toxina Cry1Ab (Fig. 8.10).

8.6.2. Apagado dinámico de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab, en solución e insertada en BBMVs de *M. sexta*

Con el fin de identificar a las regiones dentro de la estructura de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana lipídica que permanecen expuestas al solvente, o bien, a aquellas que se insertan dentro de la bicapa lipídica, realizamos ensayos de apagado dinámico de la fluorescencia extrínseca de las mutantes marcadas en solución (disueltas en buffer carbonatos 50 mM, pH 9), y comparamos estos datos con el apagado dinámico de las mutantes insertadas en la membrana lipídica (en BBMVs de *M. sexta* del 3er instar de desarrollo).

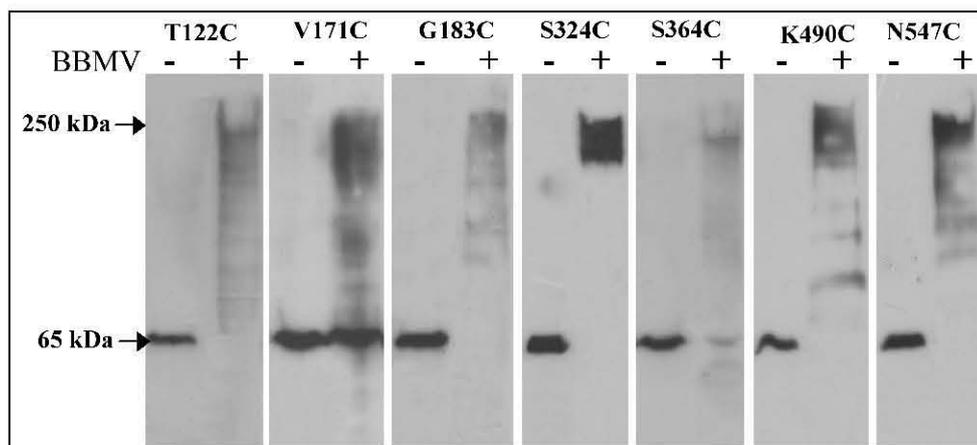


Figura 8.10. Análisis de la inserción de la toxina Cry1Ab en BBMVs de *M. sexta*. Los monómeros de las mutantes de la toxina Cry1Ab marcados con Alexa Fluor-350 se incubaron junto con las BBMVs de *M. sexta*, en una relación en masa proteica de 1:5 (30-50 μ g de toxina con 150-250 μ g de BBMVs), durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave, en un volumen final de 500 μ l. Para obtener a la toxina Cry1Ab insertada en membrana, la mezcla anterior se centrifugó durante 30 minutos a 50,000 rpm (96,460 g) y 4 °C, después de lo cual se eliminó el sobrenadante y el pellet membranoso con la toxina insertada se resuspendió en 1.1 ml de buffer carbonatos 50 mM, pH 9. Posteriormente, una fracción de las mezclas con las toxinas insertadas en la membrana lipídica (15-30 μ l) se cargó y separó en geles de SDS-PAGE al 8 %, se electrotransferieron a una membrana de polivinilideno fluoruro y finalmente la toxina fue detectada mediante Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal Anti-Cry1Ab. La incubación del monómero de la toxina de aproximadamente 65 kDa en presencia de las BBMVs elaboradas con membranas del intestino medio de larvas de *M. sexta* favoreció la formación de la estructura oligomérica de la toxina de aproximadamente 250 kDa.

Los apagadores colisionales de la fluorescencia que utilizamos fueron acrilamida, para el 1,5-IAEDANS y ioduro de potasio, para el Alexa Fluor-350. Ambos apagadores son solubles en agua, por lo que son de gran utilidad para detectar aquellos residuos que se encuentran accesibles al solvente en la toxina en solución o insertada en la membrana lipídica.

Se utilizaron diferentes concentraciones de acrilamida (0 mM, 10 mM, 100 mM, 200 mM), o ioduro (0 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM y 500 mM) para obtener las curvas y constantes de Stern-Volmer de apagado dinámico de la fluorescencia (K_D), correspondientes a cada una de las mutantes en solución e insertadas en la membrana. En la Figura 8.11 se muestran las curvas de Stern-Volmer obtenidas para apagado de la fluorescencia.

La K_D , que en este caso constituye un indicativo de la exposición al solvente de los fluoróforos anclados en las diferentes regiones de la estructura de la toxina en solución o insertada en membrana, se obtuvo de la pendiente de la recta que resulta de graficar F_0/F (intensidad máxima de la fluorescencia en ausencia de apagador sobre la intensidad máxima de la fluorescencia en presencia del apagador) contra la concentración de apagador correspondiente. A mayor exposición de un residuo al

solvente, mayor es la K_D . Los ensayos de apagado se describen con mayor detalle en la sección de protocolos.

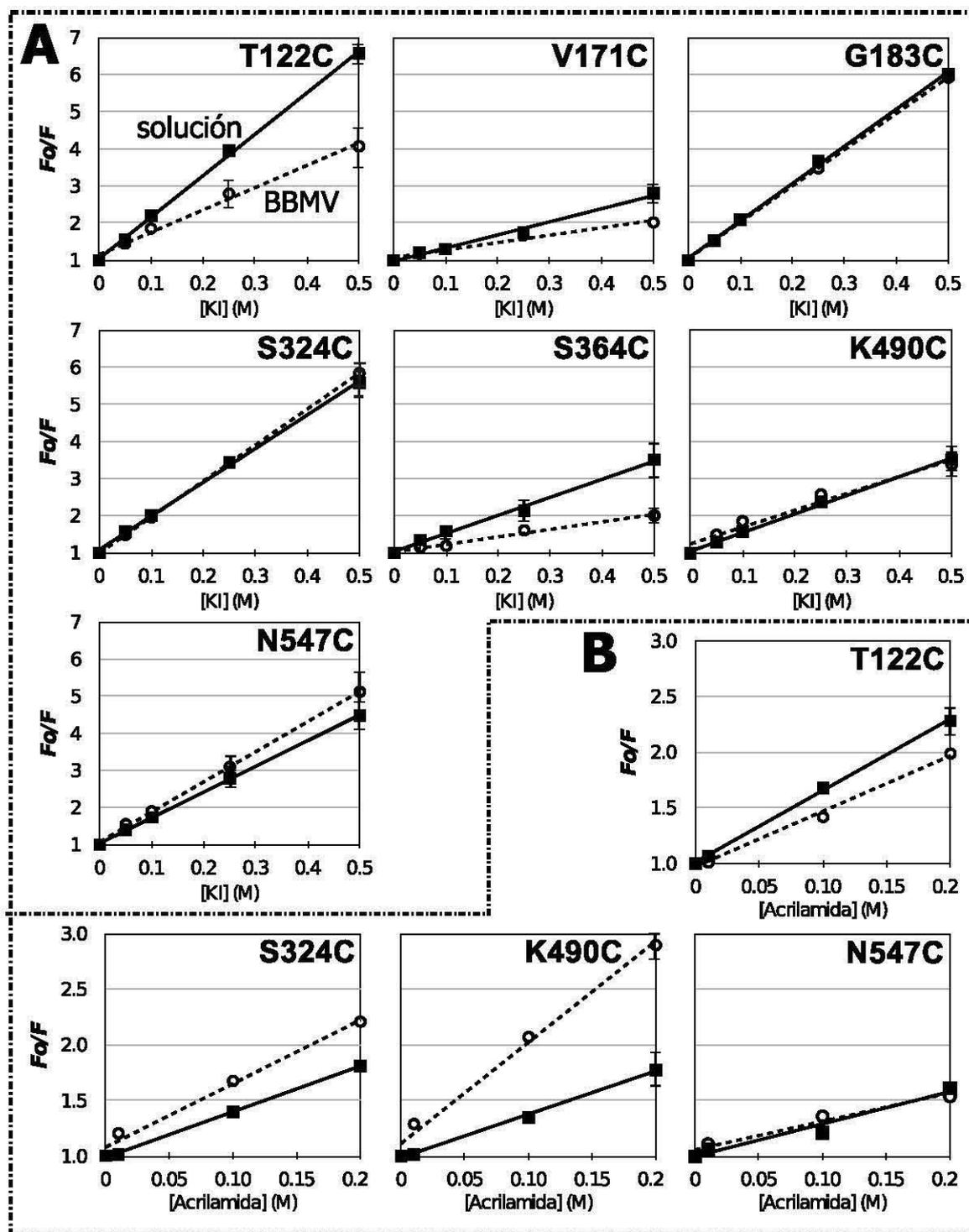


Figura 8.11. Curvas de Stern-Volmer para el apagado de la fluorescencia extrínseca de las mutantes de la toxina Cry1Ab en solución e insertada en membranas lipídicas aisladas del intestino medio de larvas de *M. sexta* (BBMV's). A) Apagado con yoduro de la fluorescencia de las mutantes marcadas con Alexa Fluor-350. B) Apagado con acrilamida de la fluorescencia de las mutantes marcadas con 1,5-IAEDANS. Líneas continuas: toxina en solución. Líneas punteadas: toxina insertada en BBMVs de *M. sexta*.

En las Tablas 8.5 y 8.6 se muestran la longitud máxima de emisión de la fluorescencia extrínseca ($\lambda_{\max \text{ em}}$) y la K_D correspondiente a cada una de las toxinas marcadas, tanto en solución, como insertadas en BBMVs de *M. sexta*.

Dom.	Mutante	$\lambda_{\max \text{ em}}$ (nm) *		K_D *		Cambio en la exposición al solvente al insertar en BBMVs
		solución	BBMV's	solución	BBMV's	
I	T122C	439 ± 1	437 ± 2	11.2 ± 0.3	6.0 ± 0.6	Se oculta
	V171C	433 ± 2	430 ± 2	3.5 ± 0.3	2.0 ± 0.1	Se oculta
	G183C	438 ± 1	437 ± 2	10.0 ± 0.3	9.8 ± 0.3	No hay cambio
II	S324C	438 ± 1	437 ± 2	9.1 ± 0.2	9.7 ± 0.3	No hay cambio
	S364C	433 ± 2	433 ± 2	4.8 ± 0.6	2.0 ± 0.1	Se oculta
III	K490C	438 ± 1	439 ± 2	5.0 ± 0.5	5.3 ± 0.4	No hay cambio
	N547C	438 ± 1	441 ± 2	7.0 ± 0.6	8.1 ± 0.7	No hay cambio

* media ± SEM, n= 3

8.6.2.1. Apagado con yoduro de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350, en solución o insertada en BBMVs de *M. sexta*

Residuos del dominio I de la toxina Cry1Ab:

Para el caso del apagado con yoduro de las toxinas marcadas con Alexa Fluor-350, encontramos que dos de las mutantes localizadas en el dominio I (V171C y T122C), mostraron una menor susceptibilidad al apagado con yoduro cuando se insertaron en la membrana lipídica, respecto a su apagado en solución, sugiriendo que esos residuos se ocultan dentro del ambiente membranal (Fig. 8.11.A). La K_D efectiva con yoduro para esas mutantes fue mucho menor en la toxina insertada en membrana, respecto a la toxina en solución (Tabla 8.5) y sus $\lambda_{\max \text{ em}}$ mostraron un corrimiento de 2-3 nm hacia el azul (Tabla 8.5), apoyando la idea de que estos residuos se trasladan hacia un ambiente más hidrofóbico cuando la toxina se inserta en la membrana.

Estos resultados concuerdan con el modelo de sombrilla propuesto para la inserción de la toxina en la membrana (Fig. 2.1.b) [46, 102-105], en la que el residuo T122 situado en el loop entre la hélice α -3 y la α -4 (ver Figuras 6.1 y 6.2) podría ubicarse justo sobre la membrana lipídica (en la interfase lípido-agua), o a una mayor profundidad, tal vez mirando hacia el lumen del poro formado por la estructura oligomérica de la toxina Cry1Ab (ver Figura 9.1), posición en la cual podría seguir expuesto al solvente pero en un grado menor respecto a como se encuentra en la estructura tridimensional del monómero de la toxina en solución (Fig. 8.11.A).

Por otra parte, el residuo V171 (situado cerca del final de la hélice α 5) pasaría del ambiente hidrofóbico presente en el interior de la proteína, como lo muestra la K_D y

$\lambda_{\text{max em}}$ en solución de la mutante V171C marcada con Alexa Fluor-350 (Fig. 8.11.A, Tabla 8.5), a un ambiente menos polar, debido a su inserción en la membrana y al contacto con las cadenas lipídicas de los ácidos grasos de la bicapa, quedando inaccesible al apagado colisional por el yoduro (Fig. 8.11.A, Tabla 8.5).

En el caso del apagado con yoduro del residuo G183C marcado con Alexa Fluor-350, ubicado en el loop entre las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ del dominio I, las curvas de Stern-Volmer fueron similares tanto para la toxina en solución, como para la insertada en la membrana lipídica, sugiriendo que este residuo permanece expuesto al solvente aun en la toxina insertada en la bicapa (Fig 8.11.A). Este dato muestra además que no todo el dominio I de la toxina se inserta dentro de la membrana y concuerda también con el modelo de inserción en la membrana de sombrilla [46, 102-105], en el cual el loop entre las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ se localiza sobre la bicapa lipídica después de que la horquilla conformada por las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se inserta en ella (Fig. 9.1).

Residuos de los dominios II y III de la toxina Cry1Ab

Las mutantes S324C (dominio II de la toxina Cry1Ab), K490C y N547C (dominio III) mostraron curvas y constantes de de apagado de Stern-Volmer similares para la toxina en solución e insertada en membrana (Fig. 8.11.A, Tabla 8.5). Esto indica que dichas posiciones permanecen expuestas al solvente en la estructura de la toxina insertada en la membrana lipídica y no interactúan con la bicapa.

Los resultados obtenidos con el apagado dinámico de la fluorescencia extrínseca de la mutantes S324C, K490C y N547C insertadas en la membrana concuerdan con algunos reportes previos, en los que se hicieron análisis de FRET de los residuos del triptófano de la toxina Cry1Ab hacia el fluoróforo ANS en el oligómero de la toxina insertado en bicapas lipídicas sintéticas, los cuales también indican que los dominios II y III de la toxina permanecen expuestos al solvente después de la inserción de esta toxina en la membrana lipídica [80]. Adicionalmente, en 2006, Pardo-López *et al.*, mediante técnicas de espectroscopía de fluorescencia y apagado dinámico de la fluorescencia intrínseca de la toxina Cry1Ac insertada en bicapas lipídicas artificiales, propusieron que el residuo W545 del dominio III del oligómero de esta toxina, permanece expuesto al solvente después de su inserción en la membrana lipídica [72].

Solo la mutante S364C (dominio II) insertada en la membrana lipídica mostró un menor apagado, respecto a la toxina en solución (Fig. 8.11.A, Tabla 8.5). El análisis detallado de dicho residuo se describe a continuación.

8.6.2.2. Apagado con yoduro de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350, en presencia del receptor caderina o ALP

Como se observa en la Figura 8.11.A, el residuo en la posición 364 (mutante S364C), localizado en el dominio II de la toxina Cry1Ab, muestra una disminución en su exposición al solvente cuando la toxina se inserta en la membrana, sugiriendo que dicho residuo podría insertarse dentro de la bicapa lipídica. Sin embargo, cabe destacar que este residuo se localiza al final de la hoja $\beta 6$ del dominio II, muy cerca del loop-2 (Figura 6.1), el cual es una región muy importante para los contactos proteicos con los receptores caderina, aminopeptidasa-N (APN) y fosfatasa alcalina (ALP) [7, 38], por lo que la disminución en el apagado con yoduro de esta mutante insertada en la membrana lipídica podría estar dada también por la unión directa (interacción proteína-proteína) de esta región de la toxina con los receptores contenidos en las BBMV's de *M. sexta*, o bien, por su internalización dentro de la estructura de la proteína debido a los cambios conformacionales que experimenta la toxina Cry1Ab durante la formación del poro lítico.

Con el fin de descartar cualquiera de las posibilidades mencionadas, los receptores caderina y ALP puros fueron incubados con las mutantes S364C y S324C (otra mutante del dominio II, incluida como control) marcadas con Alexa Fluor-350, en presencia de 10 excesos en masa de un fragmento de caderina que contiene los epítopes de unión a la toxina (repetido 7-12), o bien, con 20 excesos de ALP de *M. sexta*, y analizamos el apagado de la fluorescencia del Alexa Fluor-350 con yoduro, en presencia o ausencia de dichos receptores.

Como se observa en la Figura 8.12, la unión de la mutante S364C marcada con Alexa Fluor-350 al fragmento de caderina (Fig. 8.12) o a al receptor fosfatasa alcalina (Fig. 8.12.B), dio como resultado una disminución en el apagado de la fluorescencia por parte del yoduro. Para el caso de la otra mutante del dominio II, S324C, la unión a ambos receptores no afectó el grado de apagado (Fig. 8.12). Esto parece indicar que la disminución en la exposición al solvente del residuo S364C se debe a la interacción con los receptores, mas que a su inserción dentro de la membrana lipídica.

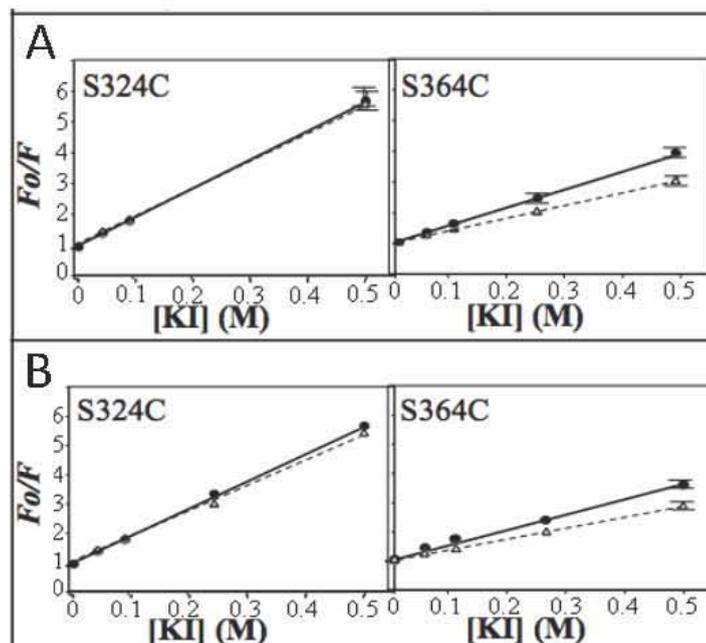


Figura 8.12. Curvas de Stern-Volmer para el apagado con ioduro de la fluorescencia extrínseca de las mutantes S324C y S364C de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350, en presencia o ausencia de los receptores. Se muestra el apagado con ioduro de las mutantes, en ausencia (línea continua), o presencia (línea punteada), de 10 excesos en masa del repetido 7-12 de caderina (panel A), o de 20 excesos en masa del receptor fosfatasa alcalina (panel B).

Cabe señalar que la disminución en la exposición al solvente del residuo 364 puede deberse al impedimento estérico causado por la interacción directa proteína-proteína entre la toxina y el receptor, o bien, por su traslado al interior de la proteína debido a un cambio conformacional en la toxina, desencadenado por su unión al receptor.

8.6.2.3. Apagado con acrilamida de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS, en solución e insertada en BBMVs de *M. sexta*

Como se mencionó, para el caso de las mutantes marcadas con 1,5-IAEDANS, solo analizamos la inserción y apagado de aquellas que mostraron la mayor emisión de fluorescencia: T122C, S324C, K490C y N547C (Fig. 8.5.A). En este caso utilizamos acrilamida como apagador, la cual es una molécula sin carga capaz de penetrar ligeramente al interior de la proteína, pero no al interior hidrofóbico de la membrana lipídica [116, 117].

El análisis del apagado de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS con acrilamida, reafirmó que la posición 122 (mutante T122C) disminuye su exposición al solvente cuando la toxina se inserta en la membrana lipídica (Fig. 8.11.B, Tabla 8.5 y 8.6).

Los residuos 324 (mutante S324C), 490 y 547 (mutantes K490C y N547C) permanecen expuestos al solvente. De hecho, los residuos S324C y K490C mostraron una mayor susceptibilidad al apagado con acrilamida cuando la toxina se inserta en la

membrana lipídica, mostrando valores mas altos de K_D (Tabla 8.6). Esto podría deberse a que esos residuos aumentan su exposición al solvente cuando la toxina se inserta dentro de la bicapa lipídica, o bien, que las regiones de la toxina insertada en la membrana en las cuales se encuentran dichos residuos, presenten una mayor flexibilidad, facilitando con esto que la acrilamida pueda acceder a ellos. Este comportamiento concuerda también con el modelo de sombrilla para la inserción de la toxina en la membrana y con reportes previos obtenidos en nuestro laboratorio en los que se propone que los dominios II y III permanecen fuera de la bicapa lipídica cuando el oligómero de la toxina se inserta en la membrana, a la vez que adquieren un mayor grado flexibilidad [80].

Dom.	Toxina	$\lambda_{\max em}$ (nm) *		K_D *		Cambio en la exposición al solvente al insertar en BBMVs
		solución	BBMV's	solución	BBMV's	
I	T122C	493 ± 1	488 ± 2	6.4 ± 0.4	4.8 ± 0.3	Se oculta
II	S324C	490 ± 1	490 ± 1	4.2 ± 0.2	5.7 ± 0.3	No hay cambio
III	K490C	490 ± 1	492 ± 2	3.8 ± 0.4	8.9 ± 0.5	Se expone más
	N547C	488 ± 3	475 ± 4	2.7 ± 0.5	2.4 ± 0.5	No hay cambio

* media ± SEM, n= 3

8.6.3. Apagado de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS e insertada en BBMVs de *M. sexta* suplementadas con 16:0-5 Doxyl PC

Para evaluar la hipótesis de que la disminución en la exposición al solvente presentada por las mutantes T122C y V171C, después de la inserción de la toxina en la membrana, se debía a que dichos residuos se sitúan al interior de la bicapa y en contacto con los lípidos de la membrana, y que por el contrario, la disminución en la exposición al solvente presentada por la mutante S364C no se debía a su inserción dentro de la bicapa, incubamos a las mutantes T122C, V171C y S364C marcadas con 1,5-IAEDANS, en presencia de BBMVs suplementadas con 16:0-5 Doxyl PC (ácido graso en el que el grupo apagador -nitroxido- se encuentra acoplado a una de las cadenas lipídicas, ver sección 6.8.2). Ya que el 16:0-5 Doxyl PC funciona como apagador colisional acoplado a los lípidos de la membrana, la comparación del grado de apagado presentado por cada una de las mutantes puede proporcionar información acerca de la localización de los residuos marcados, dentro de la bicapa lipídica. Como se observa en la Figura 8.13, la presencia del 16:0-5 Doxyl PC en las BBMVs indujo un apagado de la fluorescencia de las mutantes T122C y V171C del dominio I marcadas con 1,5-IAEDANS, del 34% y 12%, respectivamente, indicando que dichos residuos se insertan dentro de la bicapa lipídica.

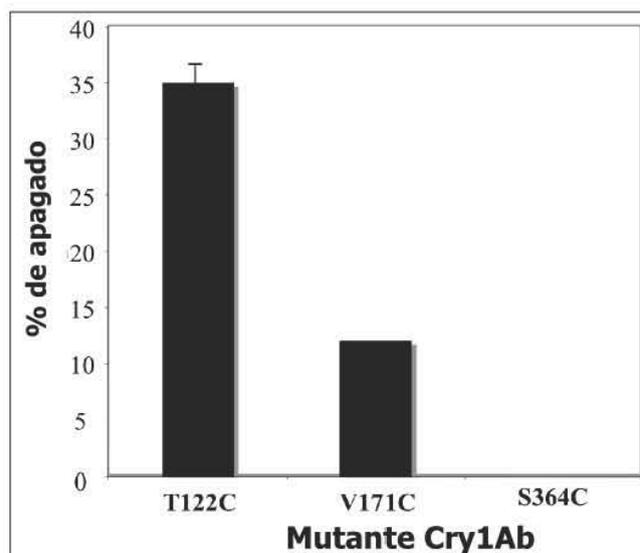


Figura 8.13. Apagado de la fluorescencia extrínseca de las mutantes T122C, V171C y S364C de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS e insertadas en BBMV's de *M. sexta* suplementadas con 16:0-5 Doxyl PC. Las toxinas marcadas con 1,5-IAEDANS se incubaron en BBMV's con y sin 16:0-5 Doxyl PC. El porcentaje de apagado se obtuvo mediante la siguiente fórmula: $[1 - (F/F_0)] * 100$, en donde F y F_0 son las intensidades máximas de fluorescencia observadas en presencia o ausencia del apagador (16:0-5 Doxyl PC).

Cabe señalar que el bajo apagado observado para la mutante V171C se podría deber a que dicho residuo no se encuentra a la profundidad de la membrana en la cual esta acoplado el grupo apagador -nitroxido- del 16:0-5 Doxyl PC. Por lo que, se podrían realizar experimentos adicionales incubando a las mutantes T122C y V171C marcadas, en presencia de BBMV's suplementadas con otros fosfolípidos que posean el grupo apagador -nitroxido- acoplado en diferentes posiciones de la cadena del ácido graso, como el 16:0-7, 16:0-10, 16:0-12, 16:0-14 o 16:0-16 Doxyl PC, para poder establecer a mayor detalle la profundidad dentro de la bicapa a la cual se localizan estos residuos en la estructura de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana [84].

Por otra parte, la fluorescencia de la mutante S364C (dominio II) marcada con 1,5-IAEDANS no mostró apagado al incubarla en presencia de las BBMV's de *M. sexta* suplementadas con 16:0-5 Doxyl PC, sugiriendo que este residuo no interacciona con la bicapa lipídica en la estructura de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana (Fig. 8.13).

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se observó que la unión del monómero de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes puntuales construidas de esta toxina, a las membranas aisladas del intestino medio de *M. sexta* (BBMV's), favorece la formación de una estructura oligomérica de aproximadamente 250 kDa, la cual permanece asociada a la membrana lipídica (BBMV's). Este resultado apoya la hipótesis de que la formación del oligómero de esta toxina es importante para su inserción eficiente en la membrana y concuerda con lo observado para el caso de otras toxinas formadoras de poro (TFP) producidas por otras bacterias, en las cuales la unión de dichas toxinas a su receptor propicia la formación de una estructura oligomérica prepore y su inserción en la membrana lipídica. Además, indica que la inserción de la toxina Cry1Ab en estas membranas constituye un buen modelo para el estudio de los cambios conformacionales que sufre la toxina en estas condiciones.

En cuanto al análisis de la estructura de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana lipídica, se puede concluir:

Para el caso de los residuos analizados dentro del dominio I observamos que, tras la inserción de la toxina Cry1Ab en la membrana lipídica, el residuo que se ubicó en un ambiente más hidrofóbico fue el V171 (ubicado cerca del final de la hélice α -5), sugiriendo que dicha región se inserta dentro de la bicapa lipídica. El residuo T122 (ubicado en el loop entre las hélices α 3- α 4) disminuyó su exposición al solvente, pero aún así fue susceptible en cierto grado al apagado con yoduro o acrilamida (apagadores solubles en agua) lo que parece indicar que este residuo se ubica en la interfase superior lípido-agua, quizá en contacto con las cabezas polares de los lípidos de la bicapa, o incluso a una mayor profundidad dentro de la bicapa. El residuo G183 no sufrió cambios en su exposición al solvente indicando que permanece fuera de la bicapa lipídica, lo que sugiere que no todo el dominio I de la toxina se inserta dentro de la membrana.

De los residuos analizados dentro de los dominios II y III, solo el S364 (dominio II) disminuyó su exposición al solvente tras la inserción de la toxina Cry1Ab en la membrana. La disminución en la exposición al solvente de este residuo se debe al contacto proteína-proteína de esta región de la toxina con los receptores membranales de la toxina Cry1Ab o bien, a que se traslada ligeramente al interior de la proteína debido a los cambios conformacionales que experimenta la toxina durante su interacción con el receptor o durante su inserción en la membrana lipídica. Los residuos S324 (dominio II), K490 y N547 (dominio III) permanecieron expuestos al solvente, indicando que en la estructura de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana lipídica, estas regiones dentro de los dominios II y III permanecen fuera de la membrana, contrario a lo que se ha

señalado en algunos reportes previos que indican que estos dominios de la toxina también se insertan dentro de la bicapa [109].

En la Figura 8.12 se muestra la ubicación hipotética de los residuos en la posición 122, 171, 183, 324, 364, 490 y 547 de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana lipídica, de acuerdo al modelo de inserción de sombrilla [46, 102-105], en el que solo una región discreta del dominio I de la toxina se inserta dentro de la bicapa (Fig. 2.2). Dicha ubicación concuerda con los resultados experimentales obtenidos en este trabajo.

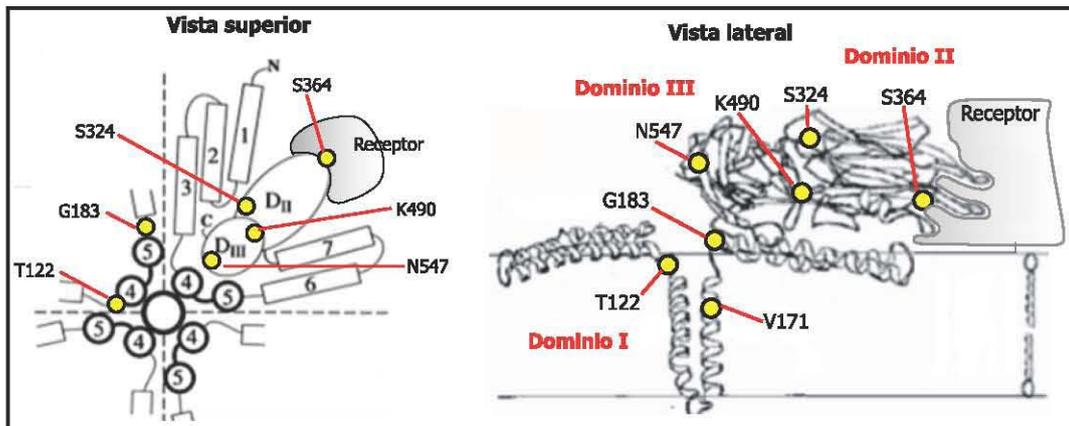


Figura 9.1. Localización hipotética de los residuos T122, V171, G183, S324, S364, K490 y N547 dentro de la estructura de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana lipídica, de acuerdo al modelo de inserción de sombrilla.

Finalmente, cabe resaltar que en este trabajo pudimos estandarizar las condiciones necesarias para la purificación y el marcaje sitio específico con fluoróforos en cualquier parte de la estructura de la toxina Cry1Ab, lo cual facilitará en gran medida los futuros análisis fluorométricos de los cambios conformacionales en la estructura de esta u otras toxinas de la familia de proteínas Cry, al oligomerizar e insertarse en la membrana lipídica.

10. PERSPECTIVAS

Dentro de los análisis fluorométricos adicionales que se pueden realizar a futuro para refinar el modelo de la toxina Cry1Ab insertada en membrana, están el marcaje sitio-específico y el apagado de la fluorescencia de un mayor número de residuos dentro de la toxina Cry1Ab, al igual que algunos experimentos de FRET inter e intramonomérico de la toxina Cry1Ab insertada en la membrana lipídica. De la misma manera, se puede realizar el apagado de la fluorescencia extrínseca de un mayor número de residuos de la toxina Cry1Ab insertada en membranas lipídicas, mediante el uso de apagadores acoplados en distintas zonas de la cadena carbonada de los ácidos grasos de la membrana, para poder determinar con mayor detalle las profundidades a las cuales se insertan ciertos residuos dentro de la bicapa lipídica [84].

Para los experimentos de FRET intramolecular se puede aprovechar el hecho de que la toxina Cry1Ab posee solamente 3 residuos de lisina a lo largo de toda su secuencia primaria, por lo que es factible construir mutantes dobles de esta toxina en las cuales se reemplacen dos de estas lisinas por arginina de tal manera que solo permanezca un residuo de lisina que pueda ser utilizado para el marcaje específico. A este respecto hemos avanzado en la construcción de dos mutantes dobles: K478 (K403R +K490R) y K490 (K403R +K478R) y planeamos construir una mutante triple sin lisinas (K403R+K478R+K490R) para posteriormente insertar de nuevo pares de residuos lisina-cisteína en cualquier zona de la toxina, los cuales se podrán usar para el marcaje diferencial con los fluoróforos necesarios para los experimentos de FRET (fluoróforos asociados a maleimida para marcar a la cisteína y fluoróforos asociados a succimidil éster para la lisina). De esta forma se podrán medir con mayor precisión los cambios conformacionales que sufre la toxina al oligomerizar e insertarse en la membrana lipídica y se podrá refinar el modelo de inserción.

11. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

11.1. Fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos

La fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos en el extremo 5' se realizó para facilitar la actividad las ligasas de ADN. Para tal fin se utilizó a la T4 polinucleótido cinasa (T4PNK), la cual cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP al grupo 5'-OH del ADN monohebra o dúplex y ARN.

La mezcla de reacción en un volumen final de 50 µl se muestra en la Tabla 11.1.

Tabla 11.1. Fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos Mezcla de reacción (50 µl volumen final)	
H ₂ O miliQ	Aforar a 50 µl
Buffer A para la T4PNK (10x)	5 µl
Oligonucleótido mutagénico	300 pmol
Enzima T4PNK	1 µl (10 U/µl)

En un tubo eppendorf, los componentes se agregaron y mezclaron de manera suave con ayuda de la micropipeta, se dio un breve "spin", se incubó la mezcla a 37 °C durante 30 minutos y finalmente la reacción se paró inactivando a la enzima mediante choque térmico, incubando 20 minutos a 60 °C.

11.2. Reacción de PCR mutagénico

La reacción del PCR mutagénico se realizó utilizando el QuickChange® XL Multi Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene. La mezcla de reacción y los parámetros del ciclaje térmico utilizados para el PCR se muestran en las Tablas 11.2 y 11.3.

Tabla 11.2. Reacción de PCR mutagénico Mezcla de reacción (25 µl volumen final)	
H ₂ O miliQ	Aforar a 25 µl
Buffer de reacción (10x)	2.5 µl
Quick solution	0.75 µl
dNTP mix	1 µl
ds-ADN templado (plásmido pHT315Ab)	100 ng
Oligonucleótido mutagénico fosforilado	125 ng
Mezcla enzimática QuickChange®	1 µl (2.5 U/µl)

Tabla 11.3. Reacción de PCR mutagénico			
Parámetros del ciclaje térmico			
Segmento	Ciclos	Temp.	Duración
I	1	95 °C	1 min
II	35	95 °C	1 min
		55 °C	1 min
		65 °C	15 min
III	1	72 °C	7 min
IV	1	4 °C	2 min

Finalmente, para eliminar el ADN plasmídico metilado utilizado como templado, se agregó 1µl (10 U/µl) de la enzima de restricción Dpn1, por cada 25 µl del producto de PCR y se incubó la mezcla a 37 °C durante 90 minutos.

11.3. Preparación de las células electrocompetentes de *E. coli* DH5α

En condiciones de esterilidad:

Se creció un cultivo de las células de *E. coli* en 30 ml de medio líquido YENB.

Se inoculó 1 litro del mismo medio con 10 ml del cultivo anterior y se crecieron las células a 37 °C y 250 rpm hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de 0.6.

El cultivo anterior se incubó durante 5 minutos en hielo y se transfirió a 4 botellas de plástico de 250 ml estériles y frías, para posteriormente centrifugar a 4000 rpm (1940 g) y 4 °C en un rotor de ángulo libre JS 7.5, usando una centrifuga Beckman J2-HS.

Se eliminó por completo el sobrenadante, se lavó el pellet en 100 ml de agua estéril fría y se centrifugó una vez más en las condiciones mencionadas anteriormente. Se eliminó de nuevo el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 20 ml de glicerol estéril frío al 10 % y se centrifugó en las condiciones anteriores.

Finalmente las células fueron resuspendidas en 2 a 3 ml de glicerol estéril frío al 10 % y se hicieron alícuotas de 40 µl que fueron colocadas en tubos eppendorf estériles de 0.5 ml cada una. Las alícuotas se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

11.4. Transformación de las células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α

En esterilidad, se tomó una alícuota de las células electrocompetentes de *E. coli* y se incubaron en hielo hasta descongelarse. Se le agregaron 2 μ l del producto del PCR mutagénico, previamente digerido con la enzima Dpn1, se mezcló muy bien y se transfirió a una cubeta de electroporación fría de 0.1 cm (Gene Pulser® Cuvette de Bio-Rad). Se electroporó a 400 Ω , 25 μ F y 1.6 V en el equipo Gene Pulser™ de Bio-Rad.

Para la recuperación, se agregó 1 ml de medio LB a las células electroporadas y se incubaron durante 1 h a 37 °C y 250 rpm.

Posteriormente, se tomaron 100 μ l de la suspensión celular anterior y se plaquearon sobre una caja de LB Eri¹⁵ sólido con ayuda de un asa metálica. Finalmente, las cajas se incubaron a 30 °C durante 12 h para obtener colonias celulares aisladas.

11.5. Secuenciación

Para la secuenciación se tomaron 5 colonias aisladas por cada mutante construida, a partir de las cuales se purificó el ADN plasmídico mediante el Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega y se mandó a secuenciar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, para verificar que el plásmido pHT315Ab de alguna de dichas colonias hubiera incorporado la mutación puntual o doble deseada.

11.6. Preparación de las células electrocompetentes de *B. thuringiensis*

En condiciones de esterilidad:

Se creció la cepa 407⁻ de *B. thuringiensis* en una caja de LB sólido a 30 °C por 12 h.

Se tomó una asada grande del cultivo anterior y se inocularon 100 ml de medio BHI estéril con ella. El cultivo se incubó a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600 nm} = 0.6.

Posteriormente, el cultivo fue transferido a 2 tubos falcon estériles fríos de 50 ml y se centrifugó a 5000 rpm (3210 g) y 4 °C, durante 10 minutos. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 ml de buffer EB frío y estéril.

La suspensión celular se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se eliminó de nuevo el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 3 ml de buffer EB estéril frío y con esta suspensión se hicieron alícuotas de 400 µl en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml. Las alícuotas se guardaron a -70 °C hasta su uso.

Buffer EB: 0.625 M de sacarosa, 1 mM de MgCl₂. Disolver en agua destilada y esterilizar durante 20 min a 15 lb/sq.

11.7. Transformación de las células de *B. thuringiensis* 407-

En condiciones de esterilidad, a 350 µl de las células electrocompetentes de *Bt* 407-, se les agregaron 15 µl (aproximadamente 1000 ng) del plásmido pHT315Abmut, purificado a partir de las cepas de *E. coli* DH5α. La mezcla anterior se incubó en hielo por 5 minutos.

Posteriormente se transfirió la mezcla a una cubeta para electroporación fría de 0.4 cm (Gene Pulser® Cuvette de Bio-Rad) y se electroporó a 1000 Ω, 25 µF y 2.5 V utilizando el Gene Pulser™ de Bio-Rad.

Para la recuperación, se transfirió la suspensión celular a tubos falcon estériles de 15 ml y se agregaron 500 µl de medio BHI estéril. Se incubó a 30 °C y 250 rpm durante una hora.

Posteriormente, se tomaron 500 µl de la suspensión celular anterior y se platearon sobre una caja de LB^{Eri}¹⁵, Finalmente, se incubaron a 30 °C durante 12 h para obtener colonias aisladas transformadas con el plásmido pHT315Abmut correspondiente a cada una de las mutantes.

11.8. Expresión y purificación de la protoxina Cry1Ab a partir de cultivos de *B. thuringiensis*

Para purificación de la protoxina expresada por las cepas de *B. thuringiensis* transformadas con el plásmido pHT315Abmut correspondiente, ó con el pHT315Ab se hizo lo siguiente:

*Las células de *Bt* que expresan cada una de las toxinas Cry1Ab mutantes se crecieron en LB^{Eri}¹⁵ sólido durante 12 h a 30 °C.

*A partir del cultivo anterior se inocularon de 10 cajas de HC^{Eri}¹⁵ sólido, las cuales posteriormente se incubaron a 30 °C durante 48-76 h, hasta que la mayoría de las células entraron a la fase de esporulación y se observara la producción del cristal proteico parasporal con ayuda del microscopio óptico.

*El cultivo anterior se recuperó con ayuda de un asa bacteriológica y se resuspendió en 30 ml de NaCl 0.3 M, 10 mM EDTA, pH 8. Se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm (12,860 g) y 4 °C. Este lavado se repitió 3 veces y se eliminó el sobrenadante.

*El pellet con la biomasa celular se resuspendió en 30 ml de H₂O, 1 mM PMSF. Se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm (12,860 g) y 4 °C. Este lavado se repitió 3 veces y se eliminó el sobrenadante. El pellet se recuperó y se resuspendió en 10 ml de H₂O, 1 mM PMSF, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford y se guardó a 4 °C hasta su uso. Esta mezcla está enriquecida de cristales proteicos formados por la protoxina Cry1Ab.

Para obtener la protoxina en su forma soluble:

*Se tomaron 20 mg totales de proteína de la mezcla obtenida en el paso anterior y se centrifugaron durante 15 minutos a 10,000 rpm (12,860 g) y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 9 ml de buffer carbonatos (0.1 M NaCO₃, 0.1 M NaHCO₃) pH 10.5, con β-mercaptoetanol al 0.2 % v/v final y se incubó durante 2 h a 37 °C y 600 rpm.

*La mezcla anterior se centrifugó durante 20 minutos a 11,000 rpm (15,560 g) y 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, el cual contiene a la protoxina solubilizada, se cuantificó la concentración de protoxina soluble por el método de Bradford y se guardó a 4 °C hasta su uso.

11.9. Cuantificación de la proteína mediante el método de Bradford o usando el equipo Nanodrop 2000

En un tubo se colocaron 795 µl de agua destilada y 5 µl de la muestra a cuantificar. La muestra se homogenizó mediante agitación y se le agregaron 200 µl del reactivo de Bradford 5x (Bio-Rad). Se incubó durante 5 min y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultraspec II) a una λ de 595 nm. Para obtener el valor de concentración proteica, el valor de absorbancia se interpoló a una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) que abarca un rango de concentraciones de 1 a 10 µg/ml.

Alternativamente, para la cuantificación del monómero purificado por cromatografía de intercambio aniónico se utilizó el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) utilizando el coeficiente de extinción (82280 M⁻¹cm⁻¹) y el peso molecular (64388.3 Da) teóricos del monómero de la toxina Cry1Ab (obtenidos mediante el servidor web ExPASy).

11.10. Bioensayos sobre larvas de *M. sexta*

Para determinar el efecto tóxico de las mutantes de la toxina Cry1Ab que se construyeron, se realizaron bioensayos empleando diferentes dosis de mezclas de espora-cristal de cada una de las mutantes (0.25 ng/cm², 1 ng/cm², 10 ng/cm², 50 ng/cm², 200 ng/cm²). Las unidades de la dosis (ng/cm²) representan a los nanogramos de toxina con los que se infecta cada centímetro cuadrado de la superficie de la dieta del insecto.

Los bioensayos se realizaron en placas de plástico Cell Wells, Corning®, con 24 pozos de 2 cm², cada uno de los cuales se llenaron con dieta artificial hasta aproximadamente la mitad (Fig. 6.5). Una vez que la dieta estaba seca, se depositó la dosis correspondiente de espora-cristal sobre la superficie de la dieta en cada pozo y las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con el fin de que el buffer con el que se administró la toxina se evaporara.

Posteriormente se colocó una larva de *M. sexta* de primer instar de desarrollo en cada pozo y la caja se selló por completo con plástico film (Reynolds®). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente con un fotoperiodo de luz-obscuridad de 16:8 h, durante 7 días, después de los cuales se cuantificó y registró la mortalidad en cada una de las cajas.

Los bioensayos se hicieron por triplicado para cada una de las mutantes construidas.

La concentración letal media (LC₅₀), dosis a la cual se observa una mortalidad del 50 % de las larvas después un periodo de 7 días, se estimó utilizando el análisis de Probit (Polo-PCLeOra Software).

11.11. Activación enzimática y purificación de la toxina monomérica Cry1Ab mediante cromatografía de intercambio aniónico

Para la activación de la protoxina Cry1Ab se hizo lo siguiente:

- 1) Se tomaron 15-20 mg de protoxina solubilizada y se agregó Tris-HCl pH 8 (330 mM, concentración final), con el fin de ajustar el pH aproximadamente a 8 u 8.5, rango en el cual la tripsina tiene una actividad óptima.

- 2) A la mezcla anterior se le agregó la tripsina en una relación en peso de 1:50, tripsina:proteína, y se incubó durante 90 minutos a 37 °C y 600 rpm. Posteriormente, la actividad de la enzima fue detenida mediante la adición de PMSF a una concentración

final de 1 mM, después de lo cual se centrifugó durante 30 minutos a 11,000 rpm (15,560 g) y 4 °C.

3) Se recuperó el sobrenadante que contenía a la toxina soluble, se cuantificó la concentración proteica por el método de Bradford y se verificó la efectividad de la activación mediante SDS-PAGE en un gel al 10 %.

*En caso de que la toxina no se hubiera procesado enzimáticamente por completo, se repitió el protocolo de activación, a partir del paso número 2 (agregando esta vez la tripsina en una relación 1:100). La toxina activada se guardó a 4 °C hasta su uso.

La purificación de la toxina monomérica Cry1Ab se realizó por cromatografía de intercambio aniónico utilizando el AKTA FPLC System de Amersham Biosciences, para lo cual:

1) Preparación de las muestras:

*Las muestras de toxina monomérica obtenidas de la activación enzimática con tripsina se concentraron hasta un volumen de 0.5-1 ml, con ayuda de tubos Amicon de corte de 30 kDa (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, Millipore), centrifugando varias veces en un rotor de ángulo fijo a 7380 rpm (7000 g) y 4 °C, durante 10-15 minutos.

*El concentrado se llevó a un volumen de 2 ml con el buffer de corrida de la cromatografía (50 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 8) y se centrifugó durante 20 minutos a 13,000 rpm (17950 g) y 4°C.

2) Purificación:

*La muestra se inyectó al equipo de FPLC (AKTA) y se inició la cromatografía de intercambio aniónico con los siguientes parámetros:

-columna: MonoQ (GE, Healthcare).

-buffer de corrida o de unión: 50 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 8.5

-buffer de elusión: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.5.

-flujo: 0.25 ml/min para el cargado de la muestra y 1 ml/min para el resto de la corrida.

-gradiente: de 0 a 50 % del buffer de elusión, en 50 minutos.

-fracciones: se recolectaron varias fracciones de 1.5 ml c/u a partir del 30 % del gradiente de concentración del buffer de elusión.

Se cargaron 10-25 μ l de cada una de las fracciones recolectadas (el mismo volumen para cada toxina) en un gel de SDS-PAGE al 12 %, que se tiñó con azul de coomasie. En base a dicho gel se seleccionaron las fracciones de la cromatografía que contuvieran al monómero puro en mayor abundancia y pureza, y se concentraron con ayuda de tubos Amicon de corte de 30 kDa, centrifugando de la misma forma que se mencionó anteriormente, hasta obtener un volumen de 500 μ l.

Finamente, se cambió el buffer salino en el cual estaba contenido el monómero pasando 5 ml de PBS a través de los tubos Amicon de corte de 30 kDa, centrifugando de la misma forma que se mencionó anteriormente y quedándonos con un volumen final de 300-500 μ l. Se estimó la concentración proteica usando el equipo Nanodrop 2000 y se guardó la toxina a 4 °C hasta su uso.

11.12. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para el análisis de las proteínas Cry1Ab purificadas se utilizó la electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para lo cual, agregamos a las muestras el buffer de Laemmli 4x (0.125 M de tris/HCl, 4 % de SDS, 20 % de glicerol, 10 % de β -mercaptoetanol y azul de bromofenol), hasta una relación final de 1x. Posteriormente las muestras se hirvieron por 5 minutos y se cargaron en geles de poliacrilamida al 8, 10 o 12 % con un gel de alineamiento al 5 %, como se describe por Laemmli [118]. Se utilizaron como estándares de peso molecular los marcadores de Bio-Rad (Precision Plus Protein All Blue Standards, número de catálogo 161-0373).

Los geles se corrieron a 10 mA hasta que las muestras se alinearon en el frente de corrida y a partir de ese punto se aumentó el amperaje a 20 mA, hasta que el frente de corrida de las muestras salió del gel.

Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomasie durante 90 minutos (Bio-Rad).

	gel concentrador	gel separador		
		8%	10%	12%
H ₂ O miliQ	1.4 ml	2.3 ml	2 ml	1.7 ml
acrilamida: bis-acrilamida (30:0.8 p/v)	330 μ l	1.3 ml	1.7 ml	2.0 ml
tris 1 M pH 6.8	250 μ l	-	-	-
tris 1.5 M pH 8.8	-	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml
SDS 10 %	20 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
APS 10 %	20 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	2 μ l	3 μ l	2 μ l	3 μ l

11.13. Marcaje de la toxina Cry1Ab

Para el marcaje específico en las cisteínas de la toxina Cry1Ab con el fluoróforo Alexa Fluor-350 o 1,5-IAEDANS, se hizo lo siguiente:

Se tomaron de 400-600 µg de toxina monomérica pura, contenida en buffer PBS pH 7.2 (a una concentración aproximada de 1 µg/µl) y se añadió DTT hasta una concentración final de 3 mM. Se incubó durante 10 minutos a 37 °C y 600 rpm.

El DTT se eliminó rápidamente mediante cromatografía de exclusión molecular, cargando la muestra en una columna pequeña empacada con Sephadex G-25 y centrifugando durante 2 minutos a 2000 rpm (720 g) y 4 °C, en un rotor de ángulo libre

La parte eluida de la columna se recolectó y se estimó la concentración usando el equipo Nanodrop 2000.

Posteriormente, se agregó EDTA hasta una concentración final de 1 mM. Se agregó la marca reactiva (Alexa fluor-350 C₅-maleimida o 1,5-IAEDANS) disuelta en agua (stock a 5 µg/µl), en un exceso molar 10 veces superior respecto a la cantidad de toxina.

La reacción de unión covalente se llevo a cavo incubando la mezcla anterior durante 2 h a temperatura ambiente, con agitación y en oscuridad.

Para eliminar por completo las especies reactivas de marca libre, se agregó β-mercaptoetanol al 0.2 % v/v final, o bien DTT a una concentración final de 5 mM.

La marca no unida covalentemente a la toxina se eliminó mediante cromatografía de exclusión molecular, cargando la muestra en una pequeña columna empacada con Sephadex G-25 y centrifugando durante 2 minutos a 2000 rpm (720 g) y 4 °C, en un rotor de ángulo libre. Este paso se repitió 2-3 veces para eliminar la mayor cantidad de marca libre.

Posteriormente, el pH del buffer en el que se encontraban las proteínas marcadas se cambió a pH 9 mediante la adición de 1/10 de volumen de buffer carbonatos 0.5 M, pH 9. Se estimó la concentración de proteína marcada pura mediante el método de Bradford y se calculó la estequiometría de marcaje, utilizando la siguiente formula: $(Ax / \epsilon) * [\text{peso molecular de la proteína} / (\text{mg/ml de proteína})] = \text{moles de marca} / \text{moles de proteína}$

En donde:

-Ax: valor de absorbancia de la marca a la longitud de onda de máxima absorción (a 346 nm, para el caso del Alexa Fluor-350 y 336 nm para el 1,5-IAEDANS)

- ϵ : Coeficiente de extinción de la marca a la longitud de onda de máxima absorción ($19\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, para el caso del Alexa Fluor-350 y $5700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el 1,5-IAEDANS).

11.14. Preparación de los liposomas o PC-SUV (Small Unilamellar Vesicles of Phosphatidyl Choline)

Se disolvió la L- α -Fosfatidilcolina de huevo de pollo (Avanti® Polar Lipids) en cloroformo, hasta una concentración de 10 mg/ml.

Se tomaron 100 μl del stock anterior y se esparcieron sobre la superficie interna de un pequeño tubo de ensayo de vidrio, girando el tubo y procurando la formación de una película lipídica adherida a la pared de vidrio mediante la evaporación lenta del cloroformo, para lo cual se aplicó una corriente suave de nitrógeno en el tubo.

Para eliminar por completo el solvente en condiciones no oxidativas, la película lipídica se secó al vacío durante 12 h en un Speed Vac SVC100 (Savant).

Para hidratar los lípidos se agregaron 1.3 ml de buffer 10 mM CHES, 150 mM KCl, pH 9, al tubo (quedando los lípidos a una concentración final de 1 μM), se eliminó el oxígeno aplicando una corriente suave de nitrógeno y se tapó el tubo. Se giró suavemente el tubo de vidrio durante 5-10 minutos y la mezcla se "vortexeó" 2-4 veces de manera breve, hasta que se obtuvo una solución homogénea de vesículas multilaminares, con aspecto turbio y de color blanco.

Para formar las SUV's, la mezcla anterior se sonicó dando de 3 a 5 pulsos de 1 minuto de duración en un sonicador de baño (Branson 1200), con intervalos de 1 minuto entre cada pulso durante los cuales se mantuvo la mezcla a 4 °C. Esto se hizo hasta obtener una solución semitraslúcida (aproximadamente 3 pulsos).

Los liposomas se guardaron en alícuotas de 0.5 ml a 4 °C, hasta por 3 días.

11.15. Inserción de la toxina Cry1Ab en SUV's de PC

Para analizar los cambios conformacionales que sufre la toxina Cry1Ab al insertarse en la membrana, el monómero de la toxina Cry1Ab en solución se incubó en presencia de liposomas de fosfatidilcolina, durante 1 h a 37 °C y agitación a 600 rpm.

Para los ensayos de inserción en membrana a diferentes relaciones de proteína-lípidos y pHs diferentes, las mezclas de reacción fueron las siguientes:

Se mezclaron 2 μg de monómero con:

***A pH ≈7.5**

40 µl de lípidos +

245 µl de PBS 1x

Volumen final de 300 µl

264 µl de lípidos +

120 µl de PBS 1x

Volumen final de 400 µl

***A pH 10.5**

40 µl de lípidos +

60 µl de buffer Carbonatos 5x +

185 µl de H₂O

Volumen final de 300 µl

*** 264 µl de lípidos +**

60 µl de buffer carbonatos +

60 µl de H₂O

Volumen final de 400 µl

Adicionalmente se incluyó un blanco en el que solo se incubaron los lípidos con los buffers en los volúmenes correspondientes pero sin añadir toxina.

Posteriormente, la mezcla lípido-toxina se transfirió a tubos de policarbonato de 7 x 20 mm (Beckman) y se centrifugó durante 1 h a 90,000 rpm (312,530 g) y 4 °C en una ultracentrífuga OPTIMA™(Beckman), utilizando el rotor TLA100. Finalmente, con ayuda de una micropipeta, se recuperaron por separado el pellet membranal (que contenía a la toxina insertada en membrana) y el sobrenadante, en el cual permaneció la toxina no insertada. El pellet se resuspendió en 200 µl de PBS para los posteriores ensayos fluorométricos.

Finalmente se obtuvieron las intensidades máximas de la fluorescencia intrínseca (triptófanos, excitando a 295 nm y haciendo un escan de la emisión de 300-400 nm) de la toxina Cry1Ab en el pellet o el sobrenadante, y se obtuvo el porcentaje de inserción.

11.16. Extracción del intestino medio de larvas de *M. sexta*

Para extraer el intestino medio de *M. sexta*, (que contiene a los receptores, proteasas y la composición lipídica membranal idóneos para favorecer la unión e inserción de la toxina Cry1Ab en la membrana), se envolvieron las larvas de tercer instar de desarrollo de *M. sexta* en papel aluminio y se incubaron a 4 °C, colocándolas sobre hielo durante 20 minutos. Posteriormente se fijó cada larva a una tabla de disección por ambos extremos con ayuda de un par de alfileres y se hizo un corte longitudinal a lo largo de la línea media de la larva, excepto en los 3 segmentos finales de ambos extremos de la larva.

Se separó el intestino medio de las larvas con ayuda de pinzas de punta redondeada, se vació el contenido alimenticio de éste y se enjuagó el tejido en el buffer 1. Se realizaron cuatro lavados con el mismo buffer en un tubo de centrifuga, agitando e invirtiendo el tubo hasta que el tejido sedimentara y eliminando el sobrenadante.

Se centrifugaron los intestinos a 5000 rpm (3210 g) durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se pesó el pellet. Posteriormente el pellet con los intestinos se resuspendió en el buffer 1, diluido al 50 % con agua desionizada, en una relación 1:1 en peso/volumen y se hicieron alícuotas de 1 ml c/u que se depositaron en microviales. Finalmente, los intestinos se guardaron a -70 °C, hasta su uso.

-Buffer 1: 300 mM de D-manitol, 17 mM de Tris-HCl, pH 7.4.

11.17. Elaboración de BBMV's con membranas del intestino medio de larvas de *M. sexta*

Para la elaboración de las BBMV's (Brush-Border Membrane Vesicles) del intestino medio de *M. sexta*, se descongelaron los intestinos sobre una palangana con hielo. Posteriormente se colocaron en un homogenizador de vidrio estéril inmerso en hielo y se diluyeron con el buffer 1 frío, en una relación 1:10 en peso/volumen. Se colocó el émbolo de teflón estéril del homogenizador en un taladro Black & Decker U-114 tipo FV y se dieron 9 golpes a 2250 rpm. Se agregó un volumen igual de una solución de MgCl₂ 24 mM, se agitó suavemente y se colocó en hielo durante 15 minutos.

La mezcla anterior se centrifugó durante 15 minutos a 4500 rpm (1590 g) y 4 °C (en un rotor Beckman de ángulo fijo JA-20). El sobrenadante se recuperó y transfirió a otro tubo estéril y se centrifugó durante 30 minutos a 16,000 rpm (20,070 g) y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1/2 volumen del buffer 1 frío y 1/2 volumen de la solución de MgCl₂ 24 mM. Se centrifugo de nuevo de la misma forma que en el paso anterior y se eliminó el sobrenadante.

El pellet membranal obtenido en el paso anterior se resuspendió con el buffer 1 frío, diluido al 50 % con agua desionizada y se dieron tres golpes a 2250 rpm usando el equipo descrito anteriormente.

Finalmente, se cuantificó la proteína presente en las BBMV's mediante el ensayo de Lowry y se hicieron alícuotas de 100 µl c/u, las cuales se guardaron a -70 °C hasta su uso.

-Buffer 1: 300 mM de manitol, 17 mM de Tris-HCl, pH 7.4.

11.18. Cuantificación de la proteína mediante el método de Lowry

La cuantificación de la proteína presente en las BBMVs se hizo utilizando el “DC Protein Assay” de Bio-Rad y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente se hizo lo siguiente:

Se obtuvo la “solución 1”, mezclando 1 ml de la “solución A” con 20 µl de la “solución S” (provistas con el kit).

Se colocaron 5 µl de la muestra a cuantificar (BBMV's) en un tubo de 1.5 ml y se adicionaron 125 µl de la solución 1. La mezcla se agitó con ayuda del Vortex y se incubó durante 15 minutos a TA, después de lo cual se adicionó 1 ml de la “solución B”, se agitó de nuevo con el Vortex y se incubó durante otros 15 minutos. La mezcla se transfirió a una celda para espectrofotómetro y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultraspec II) a una λ de 750 nm.

Para obtener el valor de concentración proteica, el valor de absorbancia se interpoló a una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA).

-**Solución A**: solución alcalina de tartrato de sodio.

-**Solución B**: reactivo de Folin diluido.

-**Solución S**: dodecil sulfato de sodio.

11.19. Obtención del oligómero de la toxina Cry1Ab insertado en la membrana lipídica (BBMV's de *M. sexta*)

Para analizar los cambios conformacionales que sufre la toxina Cry1Ab al insertarse en las membranas lipídicas aisladas del intestino medio de *M. sexta* (BBMV's), se hizo lo siguiente:

Se descongelaron las BBMVs de *M. sexta*, se transfirieron a tubos de policarbonato de 7 x 20 mm (Beckman) y se centrifugaron durante 15 minutos a 20,000 rpm (15,430 g) y 4 °C, en una ultracentrífuga OPTIMA™ (Beckman), utilizando el rotor TLA 100. Se recuperó el pellet membranal y se resuspendió en buffer carbonatos 50 mM, pH 9.

Para la reacción de inserción de la toxina en la membrana, se mezcló la toxina marcada (30-50 µg) con las BBMVs de *M. sexta*, en una relación en masa proteica de 1:5 (toxina-BBMVs). La reacción se llevó a un volumen final de 500 µl, aforando con buffer carbonatos y la mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con

agitación suave. Posteriormente la reacción se paró mediante la adición de PMSF a una concentración final de 1 mM. Adicionalmente, se incluyó un blanco en el que solo se incubaron los lípidos con el buffer carbonatos en el volumen correspondientes, pero sin añadir toxina.

Para obtener el oligómero de la toxina insertado en la membrana lipídica, la mezcla anterior se centrifugó durante 30 minutos a 50,000 rpm (96,460 g) y 4 °C, después de lo cual se eliminó el sobrenadante y el pellet membranoso con el oligómero de la toxina Cry1Ab insertado se resuspendió en 1.1 ml de buffer carbonatos 50 mM pH 9. Posteriormente, usamos 1 ml de la mezcla anterior para los análisis de apagado de la fluorescencia, usando 200 µl de la mezcla por cada concentración de apagador, como se explica mas adelante, y el resto de la muestra se utilizó para la detección del oligómero de la toxina Cry1Ab mediante Western blot.

11.20. Western blot

Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 8 %, a 10 mA durante 30 minutos aproximadamente y a 20 mA durante 2 h.

Posteriormente las proteínas se electrotransferieron a una membrana de Polivinilideno fluoruro (Millipore, Immobilon™-P, Transfer Membranas, USA) a 350 mA durante 1 h en una cámara de transferencia (TE22, Hoefer Scientific Instruments) a temperatura ambiente. La membrana se bloqueó durante 90 minutos con PBS 1X, Tween-20 al 0.05 % y leche descremada al 5 %, después de lo cual se lavó dos veces con agua estéril y dos veces con PBS-Tween 20 al 0.05 %.

La membrana se incubó con el anticuerpo primario policlonal (Anti Cry1Ab en una relación 1:30,000) durante 90 minutos, se lavó dos veces con agua estéril y dos veces con PBS-Tween 20 al 0.05 %.

Para la inmunodetección de las proteínas, la membrana se incubó durante 1 h con el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (en una relación 1:45000). Se lavó dos veces con PBS-Tween 20 al 0.05 % y dos veces más con PBS.

Finalmente, para revelar con los reactivos luminiscentes, la membrana se incubó con el sustrato del Kit SuperSignal (SuperSignal® Chemiluminescent Substrate, Pierce) y la señal emitida se detectó con una película fotográfica para quimioluminiscencia (Hyperfilm™, Amsterdam Biosciences).

11.21. Unión de la toxina Cry1Ab marcada con Alexa Fluor-350 al receptor caderina o ALP

El fragmento de caderina con el repetido 7-12 (≈ 67 kDa) que contiene los sitios de unión para la toxina Cry1Ab, previamente clonado en el vector pET22b, se purificó mediante una columna de afinidad de níquel, como se ha reportado previamente [110]. El receptor ALP (≈ 65 kDa) se purificó mediante cromatografía de afinidad usando una matriz de agarosa-ácido L-histidil-diazo-benzilfosfónico (Sigma) como se ha descrito previamente [39].

Para los experimentos de unión de la toxina al fragmento de caderina o al receptor ALP. Se mezclaron $12 \mu\text{g}$ del monómero de la toxina Cry1Ab marcado con Alexa Fluor-350 en presencia o ausencia de 10 o 20 excesos (en masa) del fragmento de caderina o ALP, respectivamente. La reacción se llevó a un volumen final de 1.1 ml, aforando con buffer carbonatos 50 mM, pH 9 y se incubó durante 30 minutos a TA.

Finalmente, cada una de las mezclas anteriores se dividieron en 5 tubos de 200 μl que se utilizaron para el apagado con yoduro.

11.22. Ensayos de apagado dinámico de la fluorescencia con yoduro o acrilamida

Para los ensayos de apagado de la fluorescencia con yoduro o acrilamida (apagadores dinámicos de la fluorescencia solubles en ambientes polares, Tablas 11.5 y 11.6), las muestras se trataron con diferentes concentraciones de apagador.

Para los ensayos de apagado con KI, se añadió KCl a la reacción, con el fin de que la fuerza iónica total en las diferentes muestras permaneciera constante y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, para prevenir la formación de I_2 reactivo, el cual puede penetrar en las regiones no polares de las proteínas y de las membranas.

Posteriormente, se midieron los espectros de emisión y se graficó la razón F_0/F contra la concentración de apagador, para obtener la constante de Stern Volmer para el apagado dinámico de la fluorescencia (K_D).

Tabla 11.5. Mezcla de reacción para el apagado de la fluorescencia utilizando acrilamida como apagador dinámico (250 µl de volumen final)				
Muestra agregar →	200 µl			
[acrilamida] stock 4 M agregar →	0 mM	10 mM	100 mM	200 mM
	0 µl	0.63 µl	6.25 µl	12.25 µl
H ₂ O miliQ agregar →	50 µl	49.4 µl	43.8 µl	37.5 µl

Tabla 11.6. Mezcla de reacción para el apagado de la fluorescencia utilizando KI como apagador dinámico (250 µl de volumen final)					
muestra, agregar →	200 µl				
[Na ₂ S ₂ O ₃] Stock 0.4M, agregar →	800 mM				
	5 µl				
PBS, agregar →	13.75 µl				
[KCl] Stock 4M, agregar →	500 mM	450 mM	400 mM	250 mM	0 mM
	31.25 µl	28.13 µl	25 µl	15.62 µl	0 µl
[KI] Stock 4M, agregar →	0 mM	50 mM	100 mM	250 mM	500 mM
	0 µl	3.125 µl	6.25 µl	15.62 µl	31.25 µl

11.23. Preparación de BBMV's de *M. sexta* suplementadas con 16:0-5 Doxyl PC

Para la preparación de las BBMV's que contenían el apagador anclado a la membrana, se elaboraron liposomas (SUV's) de los ácidos grasos que contenían el apagador acoplado a una de las cadenas carbonadas, para lo cual se tomó 1 mg de 1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (16:0-5 Doxyl PC, Avanti® Polar Lipids) disuelto en cloroformo y se secó mediante evaporación con una corriente de argón sobre las paredes de un tubo de ensayo, procurando la formación de una fina película lipídica adherida a la pared de vidrio.

Para eliminar por completo el solvente en condiciones no oxidativas, los lípidos se secaron al vacío durante 12 h en un Speed Vac SVC100 (Savant) y posteriormente se hidrataron con 1.16 ml de buffer carbonatos 50 mM, pH 9, para obtener una concentración final de 1 mM. El resto del protocolo se realizó de la misma forma que para la elaboración de las SUV's de PC. (ver sección 11.14).

Posteriormente, se mezclaron 20 μ l de las SUV's de 16:0-5 Doxyl PC 1 mM, por cada 30 μ g de BBMV's, y la mezcla anterior se sonicó, dando 5 pulsos de un minuto de duración c/u en un sonicador de baño (Branson 1200), con intervalos de 1 minuto entre cada pulso, durante los cuales se mantuvo la mezcla a 4 °C. Esto se hizo hasta obtener una solución semitraslúcida.

11.24. Apagado de la fluorescencia extrínseca de la toxina Cry1Ab marcada con 1,5-IAEDANS e insertada en BBMV's de *M. sexta* suplementadas con 16:0-5 doxyl PC

Para analizar que regiones de la toxina Cry1Ab que se insertan dentro de la membrana lipídica y están en contacto con ella, se hizo lo siguiente:

Se incubaron 20 μ g de la toxina marcada con 1,5-IAEDANS, en presencia de las BBMV's de *M. sexta* con o sin apagador (16:0-5 Doxyl PC), en una relación en masa proteica de 1:5 (toxina-BBMV's). La reacción de inserción se llevó a un volumen final de 100 μ l en buffer carbonatos 50 mM, pH 9 y la mezcla se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, después de lo cual se paró la reacción mediante la adición de PMSF a una concentración final de 1 mM. Adicionalmente, se incluyó un blanco en el que solo se incubaron los lípidos correspondientes en el buffer carbonatos.

Para obtener a la toxina insertada en la membrana lipídica, la mezcla anterior se centrifugó durante 30 minutos a 50,000 rpm (96,460 g) y 4 °C, después de lo cual se eliminó el sobrenadante y el pellet membranal con la toxina Cry1Ab insertada se resuspendió en 230 μ l de buffer carbonatos 50 mM pH 9. La mezcla anterior se utilizó para realizar las lecturas en el espectrofluorómetro y obtener las intensidades máximas de emisión de la fluorescencia extrínseca de la toxina en presencia o ausencia del apagador anclado a la membrana (16:0-5 Doxyl PC).

Finalmente se obtuvo el porcentaje de apagado de la fluorescencia extrínseca mediante la siguiente fórmula: $[1-(F/F_0)]*100$, en donde F y F_0 son las intensidades máximas de fluorescencia observadas en presencia o ausencia del apagador (16:0-5 Doxyl PC).

11.25. Medición de los espectros de emisión de la fluorescencia de las toxinas Cry1Ab

Para los ensayos de medición de la fluorescencia se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia Amicon Bowman (Urbana, IL).

Fluoróforo	λ excitación (nm)	lectura del espectro de emisión (nm)
Triptófanos	295	300-400
Alexa Fluor-350	346	410-470
1,5-IAEDANS	336	420-520

Todas las medidas se realizaron con una celda de cuarzo de 4mm x 10mm (Bio-Rad) a 22 °C. Los resultados obtenidos son un promedio de tres mediciones independientes y los espectros fueron corregidos restándoles los espectros de emisión de los blancos (los mismos componentes de la muestra a excepción de la toxina, toxina marcada o el fluoróforo en solución, según corresponda).

12. ANEXOS

12.1. Publicación en revista arbitrada

Los experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis contribuyeron con el desarrollo del siguiente artículo científico:

Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Remain Exposed to the Solvent after Insertion of Part of Domain I into the Membrane*[§]

Received for publication, November 12, 2010, and in revised form, March 18, 2011. Published, JBC Papers in Press, April 4, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.202994

Luis Enrique Zavala¹, Liliana Pardo-López¹, Pablo Emiliano Cantón, Isabel Gómez, Mario Soberón, and Alejandra Bravo²

From the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico

Bacillus thuringiensis produces insecticidal proteins named Cry toxins, that are used commercially for the control of economically important insect pests. These are pore-forming toxins that interact with different receptors in the insect gut, forming pores in the apical membrane causing cell burst and insect death. Elucidation of the structure of the membrane-inserted toxin is important to fully understand its mechanism of action. One hypothesis proposed that the hairpin of α -helices 4–5 of domain I inserts into the phospholipid bilayer, whereas the rest of helices of domain I are spread on the membrane surface in an umbrella-like conformation. However, a second hypothesis proposed that the three domains of the Cry toxin insert into the bilayer without major conformational changes. In this work we constructed single Cys Cry1Ab mutants that remain active against *Manduca sexta* larvae and labeled them with different fluorescent probes that have different responses to solvent polarity. Different soluble quenchers as well as a membrane-bound quencher were used to compare the properties of the soluble and brush border membrane-inserted forms of Cry1Ab toxin. The fluorescence and quenching analysis presented here, revealed that domains II and III of the toxin remain in the surface of the membrane and only a discrete region of domain I is inserted into the lipid bilayer, supporting the umbrella model of toxin insertion.

Bacillus thuringiensis (Bt)³ is an entomopathogenic bacterium that produces insecticidal δ -endotoxins proteins (named Cry toxins) during its sporulation phase as parasporal bodies. These proteins have been used commercially for many years for the control of insect pests in agriculture and human-disease vectors, because they are highly specific to insects, innocuous to vertebrates and plants, and biodegradable (1–3).

Most of the Cry proteins are produced as crystalline inclusions of 130 or 70 kDa protoxins. Protoxins are solubilized in the larval gut lumen and activated by midgut proteases in both terminal ends to yield activated monomeric 60-kDa toxins with a three domain structure (1–3). Domain I is a seven α -helix bundle implicated in oligomerization and in membrane channel formation. Domain II consists of a beta-prism of three antiparallel β -sheets packed around a hydrophobic core and domain III is a β -sandwich of two antiparallel β -sheets. Domains II and III are important for interaction with toxin receptors and thus have important roles in insect specificity (1–3).

The mechanism of action of Cry toxins involves several steps and interactions with different receptors that depend on the oligomeric state of the toxin in a ping-pong binding mechanism (3–5). The activated monomeric toxins bind to highly abundant low affinity receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, such as aminopeptidase N (APN) and alkaline phosphatase (ALP), localizing the toxin in the brush border microvilli. Specifically, loop 3 of domain II and β -16 of domain III are involved in this first interaction (4, 5). After this, the toxin binds to low abundant cadherin receptor, in a high affinity and complex interaction involving participation of loop 2, loop 3, and loop α -8 of domain II the toxin. Binding with cadherin facilitates additional protease cleavage of the N-terminal end of the toxin eliminating helix α -1 of domain I (6). This cleavage induces assembly of an oligomeric form of the toxin. The conformational changes in toxin oligomers results in 100-fold increased binding affinity to APN and ALP receptors, through loop 2 (3–6). After the oligomers bind to these receptors they insert into membrane microdomains, creating pores in the apical membrane of midgut cells causing osmotic shock, bursting off the midgut cells and finally ending with the death of the insect (7, 8).

The insertion of the toxin into the membrane is one of the less characterized steps in the mechanism of action of Cry toxins and elucidation of the structure of the membrane-inserted toxin is important to fully understand its mechanism of action. The hypothesis is that interaction of toxin oligomer with the APN and ALP receptor proteins triggers a conformational change that is necessary for the insertion of the toxin into the membrane (9). Previous studies demonstrated that separation of domains I and II is a necessary step for pore formation in black lipid bilayers (10). In addition, several studies performed with single point mutations in the different helices of domain I

* This work was supported in part through Grants IN206209-3 and IN218409 from DGAPA/UNAM and CONACyT Grants 128883 and 81679-Q.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. S1 and Tables S1 and S2.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Apdo. postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico. Tel.: 52-777-3291635; Fax: 52-777-3291624; E-mail: bravo@ibt.unam.mx.

³ The abbreviations used are: Bt, *Bacillus thuringiensis*; BBMV, brush border membrane vesicles; 1,5-IAEDANS, 5-(2-((2-iodo-1-oxoethyl) amino) ethylamino)-1-naphthalenesulfonic acid; ANS, 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid; PFT, pore-forming toxin; 5-doxyl-PC, 1-palmitoyl-2-stearoyl-(5-doxyl)-sn-glycero-3-phosphocholine; ALP, alkaline phosphatase.

Insertion of Cry1Ab into the Membrane

of Cry1A toxins, supported that helices α -3, α -4, and α -5 are important for toxicity and pore formation, without affecting their binding interaction with toxin receptors (11–15). The helix α -3 participates in the oligomerization process (13), and it is proposed that the hydrophobic hairpin formed by helices α -4 and α -5 inserts into the phospholipid bilayer whereas the rest of amphipathic helices of domain I, excluding helix α -1, are spread on the membrane surface in an umbrella-like conformation (10, 16–19). It was shown that the hydrophilic face of helix α -4 is facing the lumen of the pore, by *in situ* restoration of a negative charge of mutant D136C, that resulted in restitution of ionic conductance to the levels of the wild-type Cry1Aa toxin (16).

In 2001, an alternative model was proposed based in data of the activation energy of denaturation of Cry3Aa toxin when it is bound to the membrane (20). In this model the authors proposed that the conformation of the toxin do not change upon insertion into the membrane and that the three domains of Cry3Aa inserted into the bilayer without further conformational changes, with the exception of the first three α -helices (20). In 2008, a study that involved the analysis of several single cysteine (Cys) Cry1A mutants labeled with fluorescent dyes, such as 1,5-IAEDANS, or acrylodan, also concluded that all domains of the toxin insert into the membrane (21). These data contradicted previous studies that had shown that some regions of domains II and III of Cry1A toxins remain in the surface of the membrane (9, 19, 22). Quenching analysis of tryptophan (Trp) fluorescence of the membrane-inserted Cry1Ac oligomer, showed that Trp-545, located in domain III, remains exposed to the solvent (9). In addition, fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis of Trp residues to 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid dye (ANS) in membrane-bound Cry1Ab oligomer, indicated that domains II and III were located in the surface of the membrane, in contrast to domain I that was inserted into the membrane (22). It is important to mention that most of the pore forming toxins, such as anthrax toxin, aerolysin, α -hemolysin, and CDC toxins, that kill different cell types, behave in a similar way, since only a small part of these proteins inserts into the lipid bilayer, while the rest of the protein remains outside of the membrane (23). Recently, a three-dimensional structure model of the Cry4Aa pre-pore, and the pore oligomer was presented (24). In this model the authors suggested that domains II and III of Cry4Aa toxin remain in the surface in the membrane bound oligomer and only the hairpin formed by helices α -4 and α -5 of domain I is involved in the insertion into the lipid bilayer (24).

The aim of this work was to understand how Cry toxins insert into the membrane. We isolated several mutants with single Cys residues in the three domains of Cry1Ab toxin and analyzed their insertion into the membrane using fluorescence spectroscopy and quenching analysis with different soluble quenchers as well as a membrane-bound quencher to compare the properties of the soluble and membrane-inserted forms of Cry1Ab toxin. Three mutants are located in domain I, two in domain II, and two in domain III. Among the mutants located in domain I, one mutant (V171C) is located in helix α -5, that corresponds to the region involved in membrane insertion according to Tavecharenkool *et al.* (24). Our results indicate that domains II

and III of the toxin remained exposed to the solvent in the surface of the membrane and only a discrete region of domain I was inserted into the lipid bilayer.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Site-directed Mutagenesis—Plasmid pHT315 (25) containing cry1Ab gene was used as template for site-directed mutagenesis with QuickChange mutagenesis kit from Stratagene (La Jolla, CA), following the manufacturer's instructions. Mutagenic oligonucleotides used to construct all mutants were: **T122C**, GAGTGGGAAGCAGATCCTTGTAAATCCAGCATTAAGA-GAAG; **V171C**, GCTGCAAATTTACATTTATCATGCTT-GAGAGATGTTTCAGTG; **G183C**, GTGTTTGGACAAAAG-GTGGTGTTTTGTATGCCCGACTATC; **S324C**, CAT-CAAA TAATGGCTTGCCCTGTAGGGTTCTCG; **S364C**, GTGTATAGAACATTATCGTGCACCTTTATATAGAAG-ACC; **K490C**, TGGAACCTCTGTGCTTTGCGGACCAGG-ATTTACAG, and **N547C**, ATTGACGGAAAGACCTATT-TGTCAGGGGAATTTCTCAG.

Purification and Activation of Cry1Ab Toxins—The acrylamidiferous *Bt* strain 407⁻ (25) was transformed with wild-type pHT315-cry1Ab or the same plasmid containing cry1Ab mutant genes. *Bt* transformant strains were grown for 3 days at 30 °C in HCT sporulation medium (26) supplemented with 10 μ g/ml erythromycin.

After sporulation, crystals were purified by sucrose gradients as described (26). Protoxins were solubilized 2 h at 37 °C in alkaline buffer: 100 mM Na₂CO₃, 0.2% of β -mercaptoethanol, pH 10.5 and activated with trypsin (1:50 trypsin/protoxin, w/w) for 2 h at 37 °C, after this incubation 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) was added to stop proteolysis and the pH was equilibrated by adding same volume of 1 M Tris-HCl, pH 8.5. Activated proteins were then purified by anion exchange chromatography Mono Q-Sepharose fast flow from GE Healthcare (Little Chalfont, UK) in an AKTA FPLC System from Amsterdam Biosciences, using a 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.5 buffer, and a linear NaCl concentration gradient from 50 to 300 mM. The samples were reduced by adding 1 mM EDTA and 3 mM dithiothreitol to minimize the oxidation of the thiol group of Cys residues, concentrated up to 1 μ g per μ l and buffer was changed to PBS by using Amicon 30,000 MWCO centrifuge filters from Millipore (Hayward, CA). Protein concentration was determined by the Bradford assay using bovine serum albumin as standard.

Toxicity Bioassays—Bioassays were performed with *Manduca sexta* neonate larvae by the surface contamination method. Different doses of spore/crystal suspensions (from 0.1 to 200 ng/cm²) were applied onto the diet surface contained in 24-well polystyrene plates (Cell Wells; Corning Glass Works, Corning, New York). A total of 24 larvae per plaque, were fed with the different toxin doses in quadruplicate. The plates were incubated at 28 °C with 65 \pm 5% relative humidity and a light: dark photoperiod of 16:8 h. Mortality was recorded after 7 days and the 50% lethal concentration (LC₅₀) was analyzed with Probit LeOra software.

Labeling Mutant Proteins with Fluorescent Dyes—To reduce the disulfide bonds and improve the labeling of the Cys residues introduced into the mutant toxins, the pure protein samples

Insertion of Cry1Ab into the Membrane

(400–600 μg), were incubated in PBS containing 3 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA for 10 min at 37 °C. The dithiothreitol was then removed by filtration centrifugation (27) in Sephadex G-25 columns (1 cm^3), equilibrated with PBS pH 7, and proteins were incubated 2 h in dark at 37 °C with 10-fold molar excess of the probes at 600 rpm agitation. Two different probes were used to label the Cry1Ab mutants, the 5-(2-((2-iodo-1-oxoethyl) amino) ethylamino)-1-naphthalenesulfonic acid (1,5-IAEDANS) or Alexa Fluor-350 from Molecular Probes. Unbound label was removed by filtration centrifugation, using Sephadex G-50 columns equilibrated with PBS pH 7. Finally, the pH of labeled proteins was changed to pH 9 by adding 1/10 of the volume of 500 mM Na_2CO_3 , pH 9. The efficiency of labeling was measured using the molar extinction coefficient of each probe and Equation 1,

$$\frac{A_x}{\epsilon} \times \frac{\text{MW protein}}{\text{mg protein/ml}} = \frac{\text{mol dye}}{\text{mol protein}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where A_x corresponds to the maximum wavelength of dye absorbance that in the case of Alexa Fluor-350 corresponds to 346 nm, and in the case of 1,5-IAEDANS corresponds to 336 nm and ϵ , corresponds to the molar extinction coefficient of the dye, that for Alexa Fluor-350 is $19,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 346 nm, and for 1,5-IAEDANS is $5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 336 nm.

Purity of the proteins was analyzed on SDS-PAGE 12% acrylamide. The labeling of the proteins was visualized by excitation of the SDS-PAGE gel with UV light transilluminator and analyzed in a Gel Doc XR System (Bio-Rad) as reported (28).

Preparation of Brush Border Membrane Vesicles (BBMV) and BBMV Containing Membrane-bound Quencher 5-Doxyl-PC—Insect midgut tissue of third instar *M. sexta* larvae were dissected and used to prepare BBMV by differential precipitation using MgCl_2 in absence of protease inhibitors (29). The BBMV were finally suspended in 50 mM Na_2CO_3 , pH 9 and stored at -70°C until use. Concentration of protein in the BBMV was analyzed by using the Lowry DC protein assay (Bio-Rad). For preparation of BBMV containing the membrane-bound quencher, 1 mg of 1-palmitoyl-2-stearoyl-(5-doxyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (5-doxyl-PC) lipid (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) was dried by argon flow evaporation followed by overnight storage under vacuum to remove residual chloroform. The lipid was hydrated in 1.16 ml of 50 mM Na_2CO_3 , pH 9 buffer to have a final concentration of 1 mM, and subjected to sonication five times for 1 min each time in a Branson-1200 bath sonicator (Danbury, CT). Finally, for each 30 μg of BBMV we added 20 μl of 5-doxyl-PC lipid, and the mixture was sonicated four times as described above.

Steady State Fluorescence Quenching Measurements—Experiments were carried out in an Aminco Bowman Luminescence Spectrometer (Urbana, IL). All measurements were made in a (4×10 mm) quartz cuvette at 22 °C. The excitation and emission slits were 4 nm. The excitation wavelength was 346 nm for Alexa Fluor-350 and 336 nm for 1,5-IAEDANS, and the emission spectrum was recorded from 420 to 540 nm for 1,5-IAEDANS or from 400 to 500 nm for Alexa Fluor 350. The spectra were an average of three to four scans and were also corrected for background and dilution.

Fluorescent quenching experiments were performed with potassium iodide (KI) for Alexa Fluor-350-labeled proteins or with acrylamide for 1,5-IAEDANS-labeled proteins. Small-volume aliquots of 4 M KI or 4 M acrylamide stock solutions, prepared in the protein buffer were added to the samples and gently stirred. The emission spectra were recorded to check the effect on fluorescence intensity and λ_{max} . As control in the KI quenching assays, KCl was added so that the total salt (KI+KCl) concentration remained constant and equal to the highest concentration of KI used. Sodium thiosulfate (800 mM) was added to KI solutions to avoid the formation of I_3^- . Effective Stern-Volmer constants (K_{SV}) were obtained from the fluorescent data according to the Stern-Volmer equation for dynamic quenching (30),

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{Eq. 2})$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities in absence and presence of the quencher, respectively. The value for K_{SV} was obtained from the Stern-Volmer plots, calculating the slope of F_0/F versus concentration of quencher. The value for K_{SV} can be considered to be a reliable reflection of the bimolecular collisional constant for collisional quenching, since $K_{SV} = k_q \cdot t_0$, where k_q is the bimolecular collisional constant and t_0 is the lifetime constant in the absence of quencher.

The quenching data with 5-doxyl-PC are presented as % quenching efficiency defined as the ratio of the fluorescence in the presence of the quencher to that without (F_0) quencher as follows, $([DF_0 - DF] \times 100)/DF_0$ where DF_0 and DF are the changes in fluorescence intensity upon binding of 1,5-IAEDANS-labeled Cry1Ab proteins to BBMV and to BBMV-5-doxyl-PC containing the membrane bound quencher, respectively.

Insertion of Cry1Ab Mutant Toxin into the BBMV—We incubated 30 μg of each labeled protein with 150 μg of BBMV isolated from *M. sexta* larvae in 50 mM Na_2CO_3 , pH 9 for 1 h at 25 °C, the reaction was stopped with 1 mM PMSF and the inserted toxin into the BBMV was recovered by centrifugation 30 min at 50,000 rpm at 4 °C. The pellet was suspended in 1.1 ml of 50 mM Na_2CO_3 buffer pH 9. We used 1 ml of inserted toxin for the quenching assays, using 200 μl of this sample per quencher concentration as explained above and the rest of the sample was used for Western blot analysis. Laemmli sample buffer $4\times$ (0.125 M Tris/HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.01% bromphenol blue) was added to the samples, boiled 5 min, loaded into 10% SDS-PAGE and electrotransferred to polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Amersham Biosciences). The mutant proteins were revealed by Western blot assay using rabbit anti-Cry1Ab polyclonal antibody (1:30,000) and secondary anti-rabbit antibody (1:30,000) conjugated with horseradish peroxidase. The final blots were visualized using luminol (Amersham Biosciences).

Purification of Cadherin Fragment and ALP Receptor—A fragment of cadherin protein containing the toxin binding sites CR7-CR12 that was previously cloned into pET22b vector was purified with nickel affinity columns as previously reported (13). ALP receptor was purified by affinity chromatography using L-histidyl-diazo-benzylphosphonic acid agarose (Sigma) as described previously (5).

Insertion of Cry1Ab into the Membrane

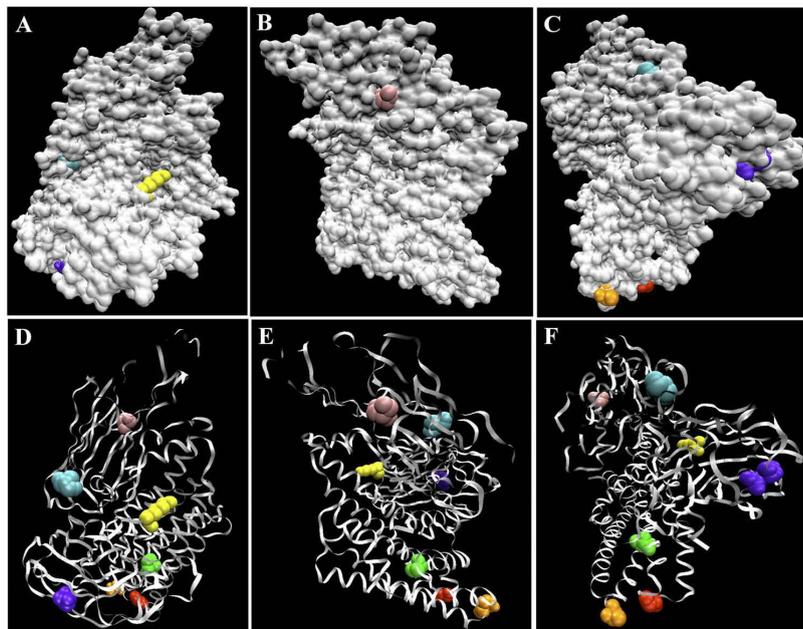


FIGURE 1. Location of mutated residues in a model of the three-dimensional structure of the Cry1Ab toxin based in the coordinates of the closely related Cry1Aa toxin. Panels A, B, and C show exposition of the labeled residues to the solvent, and panels D, E, and F show their corresponding location within a ribbon representation of the three-dimensional structure of Cry1Ab. Panels A and D have the same orientation, similarly panels B and E have same orientation and finally panels C and F represent the same orientation of the toxin. Color code: T122C, orange; V171C, green; G183C, red; S324C, cyan; S364C, pink; K490C, yellow; and N547C, violet.

RESULTS

Expression and Purification of Cry1Ab Mutants—To analyze the insertion of Cry1Ab toxin into *M. sexta* larvae BBMV, we introduced single cysteine substitutions in several regions of the three domains of this protein. We took advantage that Cry1Ab toxin does not contain any Cys residue in its structure to produce these single Cys toxins, with the aim of labeling these residues with different fluorescent probes, that either have a strong response to solvent polarity or that could be quenched with negative charged water soluble quenchers as iodide (I^-). Three domain I mutants (T122C, V171C, and G183C), two domain II mutants (S324C and S364C), and two domain III mutants (K490C and N547C) were constructed. Fig. 1 shows the location of these residues in the three-dimensional Cry1Ab structure model based in the coordinates of the closely related Cry1Aa toxin. In this figure we show an analysis of the exposition of these residues to the solvent. All residues were located in exposed regions of the protein with exception of Val-171 that is located in helix α -5 at the center of Domain I and is buried in the three-dimensional structure (green color in Fig. 1, which is not visible in panels A, B, and C). The other mutants were located in surface-exposed locations: T122C is located in the loop between helices α 3- α 4; G183C in the loop between helices α 5- α 6; S324C in loop of strands β 3- β 4 of domain II; S364C in strand β 6 of domain II; K490C is located in loop between strands β 14- β 15 of domain III and finally, N547C is found in middle of strand β 19 of domain III. The location of all of these residues in the three-dimensional structure of Cry1Ab,

suggests that all residues, with exception of V171C, would be accessible for the labeling reaction with the fluorescent dyes. After mutagenesis, plasmids were sequenced and transformed into an acrySTALLIFEROUS Bt strain. The crystalline inclusions produced by all these Bt strain were bipyramidal, similar to the crystal inclusions produced in the wild-type strain. The crystal inclusions were solubilized, activated with trypsin and purified as described under "Experimental Procedures." The trypsin activated proteins of all mutants produced a 65 kDa protein similar to the Cry1Ab toxin, which were recognized by several monoclonal and polyclonal Cry1Ab specific antibodies (data not shown), suggesting that these mutations did not cause major structural disturbance in the Cry1Ab toxin.

Toxicity Effects of Single Cys Mutants Isolated in Cry1Ab Toxin—We determined the effect of the different Cys substitutions in the toxicity of Cry1Ab against *M. sexta* larvae. Supplemental Table S1 shows the LC₅₀ lethal values obtained with the different mutants. All mutants were active against *M. sexta* larvae showing similar toxicity as the wild type Cry1Ab protein, because 95% confidential limits overlapped. These data confirmed that the single Cys mutants isolated in this work did not affect significantly the three-dimensional structure of the toxin.

Characterization of Fluorescent Probes—The fluorescent probes used in this study were 1,5-IAEDANS and Alexa Fluor-350. The 1,5-IAEDANS was previously used in a related study where the insertion of Cry1Aa and Cry1Ab toxins into the membrane, was analyzed (21). Nair and Dean (21) argued that 1,5-IAEDANS fluorophore has a high dipole moment and

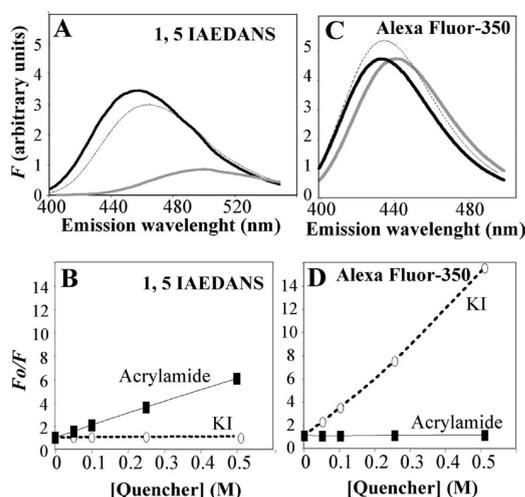


FIGURE 2. Characterization of 1,5-IAEDANS and Alexa Fluor-350 fluorescent dyes. Panels A and C show the emission spectra of 1,5-IAEDANS (panel A) and Alexa Fluor 350 (panel C) in different solvents. Solid line, ethanol; dotted line, methanol; and gray line, water-soluble phosphate buffer. Panels B and D show the Stern-Volmer plots of 1,5-IAEDANS (panel B) and Alexa Fluor 350 (panel D) after quenching with KI (dotted line, ○) or by acrylamide (solid line, ■).

hence increased quantum yield of emission in an aqueous environments, that gets quenched inside the membrane vesicles (21). However, we found that the properties of 1,5-IAEDANS were mistaken since, in the contrary, 1,5-IAEDANS is a naphthalene derivative that is quite dependent upon environment and severe changes in fluorescence intensity are determined by degree of aqueous solvation, showing low quantum yield in water and polar solvents, and much higher quantum yield in apolar or hydrophobic environments (31, 32). Thus, the fluorescence intensity of 1,5-IAEDANS should increase when inserted into in hydrophobic environment of the membrane. To confirm this, we analyzed the fluorescence of 1,5-IAEDANS in different solvents with different polarity. Fig. 2A shows the emission spectra of 1,5-IAEDANS in different solvents, showing much higher fluorescence intensity in methanol and ethanol than in water soluble phosphate buffer with a correlative important wavelength shift in emission in the different solvents (Fig. 2A). It was reported that quantum yield of 1,5-IAEDANS changes from 0.27 in water with λ_{max} of emission 520, to 0.69 in ethanol with a λ_{max} of emission of 460 nm (31). Also, we analyzed the susceptibility of quenching 1,5-IAEDANS by two different soluble quenchers such as KI and acrylamide. Fig. 2B shows that the fluorescence of 1,5-IAEDANS is not susceptible to be quenched at all by KI, but it was efficiently quenched by acrylamide showing an effective K_{SV} of 10.1 M^{-1} (Fig. 2B).

In this work, we also used Alexa Fluor-350 maleimide probe that is a sulfonate coumarin derivative that reacts with thiol groups of proteins (33–35), showing an optimal excitation at 346 nm and a bright blue fluorescent emission. The fluorescent emission of this dye is independent of pH, and is not sensitive to changes in solvent polarity (33–35). Fig. 2C show that fluorescence intensity did not change in the different solvents and the maximum wavelength of emission showed a shift of only 7 nm

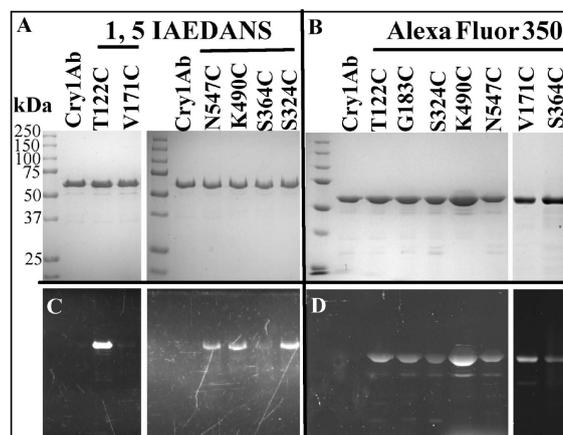


FIGURE 3. Analysis of labeled mutants in SDS-PAGE. Panels A and B show wild-type toxin and labeled proteins after trypsin digestion and purification by anion exchange chromatography. Proteins were loaded in SDS-PAGE stained with Coomassie Blue. Panels C and D show the visualization of the purified labeled proteins in the SDS-PAGE by excitation with UV light transilluminator. Panels A and C show the mutant proteins labeled with 1,5-IAEDANS and panels B and D show the mutant proteins labeled with Alexa Fluor 350. Molecular weight markers used were precision pre-stained plus standards, all blue (Bio-Rad).

between ethanol and water. In contrast to 1,5-IAEDANS, the Alexa Fluor 350 was efficiently quenched by KI with an effective K_{SV} of 29.0 M^{-1} , while acrylamide showed no effect (Fig. 2D).

Labeling Cry1Ab Mutants with Fluorescent Probes—Cry1Ab mutants were independently labeled with 1,5-IAEDANS or with Alexa Fluor-350 and the efficiency of labeling was measured using the molar extinction coefficient of each probe as described under “Experimental Procedures.” In general we found a lower stoichiometry of labeling when proteins were labeled with 1,5-IAEDANS probe, showing values of 0.6–0.8 mol of 1,5-IAEDANS per mol of toxin. Only mutant V171C located in domain I showed less efficiency of labeling (0.24 mol per mol of toxin). Because V171C may be less accessible to the solvent we opened the structure of Cry1Ab with 6 M urea as was previously described (22, 36) to facilitate the access of the reagent to this partially buried cysteine. We then labeled this mutant with Alexa Fluor-350. The efficiency of labeling with Alexa Fluor-350 was 0.8 to 1.0 mol of Alexa Fluor-350 per mol of monomeric toxins (supplemental Table S2). Fig. 3, A and B shows the SDS-PAGE of labeled proteins with 1,5-IAEDANS or Alexa Fluor-350, respectively, stained with Coomassie Brilliant Blue dye. All proteins showed similar size to the unlabeled wild-type Cry1Ab toxin. The labeling of the toxins was also analyzed directly on the SDS-PAGE, visualizing the labeled protein by excitation with UV light transilluminator (Fig. 3, C and D). When the proteins were labeled with 1,5-IAEDANS, mutants V171C and S364C showed low fluorescence in the SDS-PAGE. In the case of V171C this could be due to the low efficiency of labeling with the dye as shown in supplemental Table S2). In the case of mutants S364C and S324C, both of them showed a similar ratio of labeling (0.7 mol of 1,5-IAEDANS per mol of toxin), but their difference in fluorescence intensity observed in the denaturant SDS-PAGE, was quite significant (Fig. 3C). This

Insertion of Cry1Ab into the Membrane

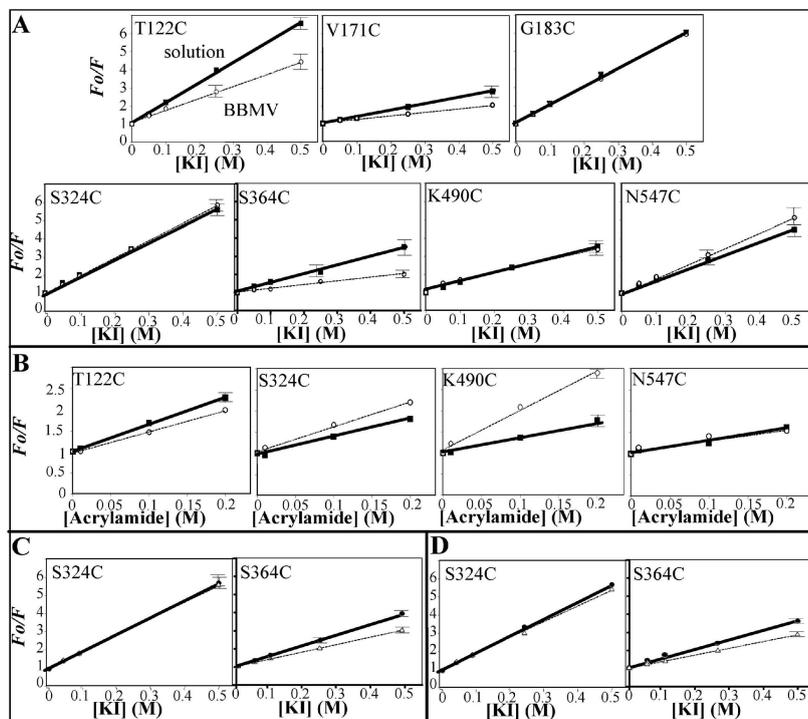


FIGURE 4. Stern-Volmer plots of labeled mutant toxins in solution and in the membrane-inserted state or after interaction with cadherin or ALP receptors. *Panel A*, Alexa Fluor 350-labeled proteins quenched with I^- . *Panel B*, 1,5-IAEDANS-labeled proteins quenched with acrylamide. Quenching of the fluorescence of labeled mutant toxins was analyzed in solution (solid lines and \blacksquare) and in the membrane-inserted state after insertion into BBMV (dotted lines and \circ). *Panels C and D*, analysis of quenching protection by the interaction with protein receptors of Cry1Ab. The quenching with KI was analyzed in mutants S364C and S324C labeled with Alexa Fluor-350, in the absence or in the presence of 10-fold excess of a purified cadherin fragment containing the toxin binding sites (*panel C*) or with 20-fold excess of the purified ALP receptor (*panel D*). Solid lines and \bullet , show the result of KI quenching in absence of receptor protein and dotted lines and Δ , show the result of KI quenching in presence of receptor.

could be explained by the highly sensitive response to the environment of the 1,5-IAEDANS in a polar environment where this dye is severely quenched (Fig. 2A), suggesting that residue S364C is highly exposed to a polar environment after SDS-PAGE electrophoresis.

Analysis of the Insertion of Cry1Ab-labeled Mutants into Brush Border Membrane Vesicles (BBMV)—We isolated BBMV from 3rd instar *M. sexta* larvae and analyzed the insertion of toxin mutants. The interaction of Cry1Ab proteins with the membrane was first assayed by Western blot, showing that labeled mutants have a monomeric structure in solution, but after interaction with BBMV, all of them formed oligomeric structures that were resolved as protein bands of 250 kDa molecular size in SDS-PAGE as previously described (3) (supplemental Fig. S1).

To analyze the interaction of Cry1Ab with the *M. sexta* BBMV vesicles, the fluorescence of the labeled single Cys proteins with the two different probes was analyzed, first in the soluble state and then compared after membrane association. To determine the degree of solvent exposure of each labeled residue, we used I^- or acrylamide, as quenchers for Alexa Fluor 350 or 1,5-IAEDANS fluorescence, respectively. Both quenchers yielded linear Stern-Volmer plots (Fig. 4). The apparent

dynamic quenching constants K_{SV} derived from the slopes of these plots are presented in Table 1.

In the case of quenching with I^- of Alexa Fluor-350-labeled mutant toxins, we found that V171C and T122C mutants, located in domain I, showed a lower susceptibility to be quenched by I^- when they were inserted into the membrane than in solution, suggesting that these residues were buried into the membrane environment (Fig. 4A). As expected, the effective K_{SV} for I^- quenching of these toxins was much lower in the membrane inserted state than in solution, showing a blue shift in λ_{max} of 3 nm (Table 1), supporting a more hydrophobic environment for these residues when the toxins are inserted into the membrane. In contrast, residue G183C also located in domain I, showed similar Stern-Volmer plots in solution and in the membrane inserted state, suggesting that this residue remains exposed to the solvent even in the membrane associated protein (Fig. 4A). Regarding domains II and III mutants, we found no changes in the quenching of Alexa Fluor-350 by I^- with the exception of domain II S364C mutant (Fig. 4A). The fact that mutants S324C, K490C, and N547C showed similar Stern-Volmer plots in solution and in the membrane-inserted state, allow us to conclude that all these positions remain exposed to the solvent upon membrane interaction and do not

TABLE 1

Fluorescent properties of single cysteine mutants labeled with Alexa Fluor 350 probe quenched with KI or labeled with 1,5-IAEDANS probe quenched with acrylamide

Apparent dynamic quenching constants K_{SV} derived from the slopes of the Stern Volmer plots performed with KI or acrylamide as quenchers. Changes in λ_{max} of emission and K_{SV} were analyzed when the proteins were in solution or in the BBMVs membrane-inserted state.

Toxin	Probe-Quencher	λ_{max} of emission		K_{SV}		Change after BBMVs insertion
		Solution	BBMV	Solution	BBMV	
		<i>nm</i>	<i>nm</i>	<i>M⁻¹</i>	<i>M⁻¹</i>	
T122C	Alexa Fluor 350-KI	439 ± 1	437 ± 2	11.2 ± 0.3	6.0 ± 0.6	Buried
V171C	Alexa Fluor 350-KI	433 ± 2	430 ± 2	3.5 ± 0.3	2.0 ± 0.1	Buried
G183C	Alexa Fluor 350-KI	438 ± 1	437 ± 2	10.0 ± 0.3	9.8 ± 0.3	No change
S324C	Alexa Fluor 350-KI	438 ± 1	437 ± 2	9.1 ± 0.2	9.7 ± 0.3	No change
S364C	Alexa Fluor 350-KI	433 ± 2	433 ± 2	4.8 ± 0.6	2.0 ± 0.1	Buried
K490C	Alexa Fluor 350-KI	438 ± 1	439 ± 2	5.0 ± 0.5	5.3 ± 0.4	No change
N547C	Alexa Fluor 350-KI	438 ± 1	441 ± 2	7 ± 0.6	8.1 ± 0.7	No change
T122C	1,5-IAEDANS-acrylamide	493 ± 1	488 ± 2	6.4 ± 0.4	4.8 ± 0.3	Buried
S324C	1,5-IAEDANS-acrylamide	490 ± 1	490 ± 1	4.2 ± 0.2	5.7 ± 0.3	No change
K490C	1,5-IAEDANS-acrylamide	490 ± 1	492 ± 2	3.8 ± 0.4	8.9 ± 0.5	More exposed
N547C	1,5-IAEDANS-acrylamide	488 ± 3	475 ± 4	2.7 ± 0.5	2.4 ± 0.5	No change

interact with the membrane bilayer. Mutant N547C located in domain III, showed a slightly higher value in the dynamic quenching constant K_{SV} , suggesting that this residue increased its exposure to the solvent when it is inserted into the membrane.

Regarding to the single Cys mutants that were labeled with 1,5-IAEDANS, we only analyzed those that showed high fluorescent emission. We used the neutral acrylamide quencher, that is able to penetrate into the interior of the protein but not into the hydrophobic core of membrane bilayer (37). The acrylamide quenching analysis of 1,5-IAEDANS, confirmed that the T122C residue has a buried position when the toxin is interacting with the membrane (Fig. 4B and Table 1). In contrast domain II and III residues S324C, K490C, and N547C, remained exposed to the solvent. In fact residues S324C and K490C showed higher quenching when the toxin is inserted into the membrane, showing higher values of the K_{SV} dynamic quenching constant (Table 1), suggesting that these residues are more accessible to the solvent when the toxin is inserted into the membrane.

Mutant S364C is located at the end of strand β -6 of domain II and Fig. 4A shows that this residue showed lower quenching when the toxin is inserted into the membrane, suggesting that this residue may be also buried into the lipid bilayer when the protein is inserted into the membrane. Nevertheless, It is important to mention, that this residue is close to loop II, that plays an important role on protein contacts with cadherin, APN, and ALP receptors (4–7). We incubated S364C mutant labeled with Alexa Fluor-350, with 10-fold excess of a purified cadherin fragment or 20-fold pure *M. sexta* ALP, and analyzed its quenching with KI in the presence and absence of these receptor molecules. As control, we made same incubations with Alexa Fluor-350 labeled S324C mutant. We found that when mutant S364C was bound to cadherin fragment or to ALP, the quenching with KI was reduced, in contrast with the other mutant located in domain II, mutant S324C that was quenched similarly, independently if it is bound to the cadherin receptor molecule (Fig. 4C), and showed a slight change after interaction with ALP (Fig. 4D).

Additional support for the close proximity of the Val-171 and Thr-122 residues to the membrane lipids when the toxin is inserted into the membrane, come from data on quenching

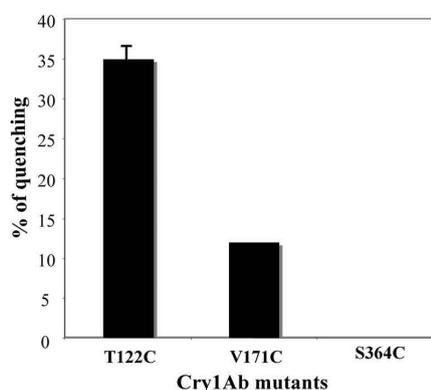


FIGURE 5. Quenching of V171C, T122C, and S364C labeled with 1,5-IAEDANS inserted in the BBMVs in the presence of 5-doxyl-PC membrane-bound quencher. Quenching efficiencies were calculated from fluorescence of 1,5-IAEDANS-labeled toxins in BBMVs with and without the lipid-bound quencher ($n = 3$).

V171C or T122C 1,5-IAEDANS-labeled proteins with BBMVs containing 5-doxyl-PC. Because 5-doxyl-PC lipid is membrane-bound quencher, comparison of its quenching ability yields information about the relative location of the 1,5-IAEDANS-labeled residues within the bilayer. Fig. 5 shows that the presence of 5-doxyl-PC in the BBMVs induced a significant quenching of the fluorescence of the V171C and T122C mutants labeled with 1,5-IAEDANS. In contrast, 1,5-IAEDANS-labeled S364C was not quenched at all by 5-doxyl-PC showing that this residue does not interact with the lipid bilayer (Fig. 5).

DISCUSSION

Cry1Ab protoxins must go through several structural changes before reaching their functional pore-forming state. These steps include solubilization of the crystal and processing of the protoxin by midgut proteases; binding of monomer to toxin receptors; oligomer formation and insertion into the membrane, to form the membrane active pore. Different Cry toxins, active against different insect orders, also form oligomeric structures after interaction with their protein receptors (9, 13–15, 26, 38). The Cry oligomer is a highly stable structure

Insertion of Cry1Ab into the Membrane

since it is resistant to SDS treatment and boiling suggesting a strong interaction between monomers (39). It was previously shown that the Cry1A oligomeric structure is a functional structure that is able to interact with the membrane lipid bilayer, forming stable pores, in contrast to the monomer that has marginal interaction with the liposomes (39). In this work, we showed that binding of monomeric Cry1Ab mutant toxins to BBMV resulted in the formation of a 250 kDa structure, that remained associated with BBMV (supplemental Fig. S1), supporting that oligomer formation is important for membrane insertion of Cry1Ab toxin.

In the case of other pore-forming toxins (PFT) produced by other bacteria, an oligomeric pre-pore structure is also produced after receptor binding and the oligomeric structures of these toxins represents a toxin intermediate before insertion into the membrane (23). Regarding membrane insertion of these PFT, it has been documented that insertion into the membrane involves only small regions of these proteins (23). There are several examples of PFT that span the membrane bilayer by forming β -barrel structure, named β -PFT. Other PFT insert clusters of α -helices, and are named α -PFT. In most of the β -PFT, the insertion into the membrane, involves a subtle conformational change, where only a small part of the protein is located in the lipid environment, while the rest of the protein remain outside of the membrane (23). In several β -PFT, the structural region that inserts into the membrane, represents a small-unstructured loop motive in the soluble protein that refolds to form a transmembrane β -strand, that will be part of the β -barrel pore (23). In other cases such as the CDC toxin-family, important conformational changes from α -helix to β -strand, have been documented (23, 36). In contrast, α -PFTs, like colicins, have a dynamic structure that involved the insertion of preformed α -helices into the membrane (23). Also, in the case of α -PFT cytolysin A from *Staphylococcus aureus*, a conformational change must undergo to form the transmembrane pore, which is composed of 12 monomers, where only amphipathic α -helix A1 and part α -helix F1 penetrate the lipid bilayer (40).

Nair and Dean (21) reported that all domains of Cry1A toxin insert into the membrane, based in fluorescent studies of single Cys mutants labeled with 1,5-IAEDANS and acrylodan (21). However, their conclusions reached by the analysis of fluorescent changes of Cry1Ab mutants labeled with 1,5-IAEDANS were incorrect, because 1,5-IAEDANS is highly sensitive to polar environment, showing much higher fluorescence in hydrophobic environments, and this dye is not quenched by KI (Fig. 2) (31, 32). The misinterpretations of their data drove these authors to incorrect conclusions. In fact, the analysis of the data of Nair and Dean (21), in view of our observations on the quenching of 1,5-IAEDANS upon exposure to the solvent (Fig. 2), indicates that most of domain II and domain III residues analyzed by them, remained exposed to the solvent, since most of the Cys mutants analyzed by them showed reduced fluorescence intensities when inserted into the membrane, indicating higher exposure to the solvent (21). In addition, we show that 1,5-IAEDANS fluorescence is not susceptible to be quenched by KI, indicating that their KI quenching analysis of 1,5-IAEDANS-labeled mutants were not conclusive.

The most reliable way to determine changes on the exposition to the solvent, of a particular residue labeled with a fluorescent probe, is the use of soluble hydrophilic collisional quenchers (30). In this work, we incubated Cry1Ab toxin with BBMV at pH 9 since we have previously reported that alkaline pH enhanced Cry1Ab membrane insertion and pore formation, by facilitating a molten globe intermediate which is consistent with the alkaline pH found in lepidopteran midgut lumen (26, 39). Here we demonstrate that interaction of all Cys mutant proteins of Cry1Ab with BBMV resulted in the formation of the 250 kDa oligomeric structure (supplemental Fig. S1).

Our data indicate that only a small region of domain I is involved in membrane insertion and that domain II and III remain in the surface during pore formation. We report here that residue Gly-183, located in the loop between α 5 and α 6 of domain I, remains exposed to the solvent upon membrane insertion. These data indicated that not all domain I inserts into the membrane, supporting the umbrella insertion model, which proposed that only the hairpin conformed by helices α -4 and α -5 is inserted into the lipid bilayer (10, 16–19). Other reports have also supported the umbrella model of toxin insertion. Residue Trp-545 of Cry1Ac toxin, that is located in domain III, remained exposed into the solvent after membrane insertion as shown by the analysis of W545A mutant (9). FRET analysis between tryptophan residues of domain I and ANS, showed that domain I moves apart from domain II and III upon membrane insertion (22). Finally, pore formation activity of biotin labeled single Cys Cry1Aa mutants, showed that binding of streptavidin protein to biotin-labeled residues located in the loop between helices α -4 and α -5, affected pore formation activity, confirming that this hairpin is important for pore formation (19).

Our analysis indicated that three residues, two in domain I (Val-171 and Thr-122) and one in domain II (Ser-364) were less exposed to the solvent upon toxin membrane insertion. To further analyze if the change in solvent exposure of these residues was due to membrane insertion, quenching by 5-doxyl-PC lipid incorporated to BBMV was analyzed. The 5-doxyl-PC phospholipid used as quencher of fluorescence is a good ruler for probing membrane insertion of peptides labeled with 1,5-IAEDANS, because it acts over a short distance, without drastically perturbing the membrane. Experiments with 5-doxyl-PC-labeled phospholipids further demonstrated that Val-171 and Thr-122 residues interact with the lipid bilayer in contrast to Ser-364 residue that was not quenched in BBMV containing this quencher lipid suggesting that it remains in the surface, out side of the lipid core. Furthermore, we show here that interaction with cadherin and ALP receptors that are present in the BBMV affected the interaction of S364C with the KI collisional quencher indicating that this residue is less exposed to the solvent upon membrane insertion due to protein-protein interaction with BBMV receptor molecules.

Our results support the umbrella model of toxin insertion and are in agreement with a recently three-dimensional structure model of the Cry4Aa pre-pore oligomer that shows that the loop formed by helices α -4 and α -5 of domain I is the region that inserts into the lipid bilayer (24). We agree that the precise structure of the toxin in its membrane-inserted state still

remains to be solved; nevertheless, it is clear that only discrete regions of domain I insert into the membrane and that domains II and III remain exposed to the solvent.

Acknowledgment—We thank Lizbeth Cabrera for technical assistance.

REFERENCES

- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., and Schnepf, H. E. (2003) *Annu. Rev. Genet.* **37**, 409–433
- Soberón, M., Gill, S. S., and Bravo, A. (2009) *Cell Mol. Life Sci.* **66**, 1337–1349
- Bravo, A., Gill, S. S., and Soberón, M. (2010) in *Insect Control* (Gilbert, L. L., and Gill, S. S., ed) pp. 248–281, Elsevier
- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, L., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S. S., Bravo, A., and Soberón, M. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 32750–32757
- Arenas, L., Bravo, A., Soberón, M., and Gómez, I. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 12497–12503
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S., and Soberón, M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta.* **1667**, 38–46
- Bravo, A., Gill, S. S., and Soberón, M. (2005) *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 4, pp. 175–206, Elsevier
- Zhuang, M., Oltean, D. L., Gómez, I., Pullikuth, A. K., Soberón, M., Bravo, A., and Gill, S. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13863–13872
- Pardo-López, L., Gómez, I., Rausell, C., Sanchez, J., Soberón, M., and Bravo, A. (2006) *Biochemistry* **45**, 10329–10336
- Schwartz, J. L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Préfontaine, G., Brousseau, R., and Masson, L. (1997) *FEBS Lett.* **410**, 397–402
- Girard, F., Vachon, V., Préfontaine, G., Marceau, L., Su, Y., Larouche, G., Vincent, C., Scharf, J. L., Masson, L., and Laprade, R. (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2566–2572
- Vachon, V., Préfontaine, G., Coux, F., Rang, C., Marceau, L., Masson, L., Brousseau, R., Frutos, R., Schwartz, J. L., and Laprade, R. (2002) *Biochemistry* **41**, 6178–6184
- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Damián-Almazán, J. Y., Gill, S. S., Soberón, M., and Bravo, A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 21222–21229
- Rodríguez-Almazán, C., Zavala, L. E., Muñoz-Garay, C., Jiménez-Juárez, N., Pacheco, S., Masson, L., Soberón, M., and Bravo, A. (2009) *PLoS ONE* **4**, e5545
- Kumar, A. S., and Aronson, A. I. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 6103–6107
- Vachon, V., Préfontaine, G., Rang, C., Coux, F., Juteau, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., Frutos, R., Laprade, R., and Masson, L. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6123–6130
- Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M. S., and Shai, Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12289–12294
- Gerber, D., and Shai, Y. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 23602–23607
- Girard, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Schwartz, J. L., Masson, L., and Laprade, R. (2009) *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 575–580
- Loseva, O. I., Tiktopulo, E. I., Vasiliev, V. D., Nikulin, A. D., Dobritsa, A. P., and Potekhin, S. A. (2001) *Biochemistry* **40**, 14143–14151
- Nair, M. S., and Dean, D. H. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 26324–26331
- Rausell, C., Pardo-López, L., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Morera, C., Soberón, M., and Bravo, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 55168–55175
- Parker, M. W., and Feil, S. C. (2005) *Progress Biophys. Mol. Biol.* **88**, 91–142
- Tavecharoenkool, T., Angsuthanasombat, Ch., and Kantchanawarin, Ch. (2010) *PMC. Biophys.* **3**, 1–16
- Arantes, O., and Lereclus, D. (1991) *Gene* **108**, 115–119
- Muñoz-Garay, C., Portugal, L., Pardo-López, L., Jiménez-Juárez, N., Arenas, L., Gómez, I., Sánchez-López, R., Arroyo, R., Holzenburg, A., Savva, C. G., Soberón, M., and Bravo, A. (2009) *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 2229–2237
- Penefsky, H. S. (1979) *Methods. Enzymol.* **56**, 527–530
- Shahrokh, Z., Verkman, A. S., and Shohet, S. B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12082–12089
- Wolfersberger, M., Lüthy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F. V., Gior-dana, B., and Hanzot, G. M. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* **86**, 301–308
- Lakowicz, J. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York
- Hudson, E. N., and Weber, G. (1973) *Biochemistry* **12**, 4154–4161
- Spruijt, R. B., Wolfs, C. J., Verver, J. W., and Hemminga, M. A. (1996) *Biochemistry* **35**, 10383–10391
- Huang, S., Wang, H., Carroll, C. A., Hayes, S. J., Weintraub, S. T., and Serwer, P. (2004) *Electrophoresis* **25**, 779–784
- Cobb, B. A., and Petrash, J. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6664–6672
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M. K., Millard, P. J., Mao, F., Leung, W. Y., and Haugland, R. P. (1999) *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1179–1188
- Ramachandran, R., Tweten, R. K., and Johnson, A. E. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 697–705
- Caputo, G. A., and London, E. (2003) *Biochemistry* **42**, 3265–3274
- Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Darszon, A., de Maagd, R. A., Bakker, P., Soberón, M., and Bravo, A. (2006) *J. Membr. Biol.* **212**, 61–68
- Rausell, C., Muñoz-Garay, C., Miranda-CassoLuengo, R., Gómez, I., Rudiño-Piñera, E., Soberón, M., and Bravo, A. (2004) *Biochemistry* **43**, 166–174
- Mueller, M., Grauschopf, U., Maier, T., Glockshuber, R., and Ban, N. (2009) *Nature.* **459**, 726–730

Supplemental Materials

Table 1-SM. Toxicity of Cry1Ab wild type and single Cys mutants against *Manduca sexta* larvae.

Toxin	LC ₅₀ ng/cm ² (95% fiducial limits)	Location of single Cys residue
Cry1Ab wt	2.6 (1.8-3.7)	-
T122C	2.9 (1.8-4.8)	Domain I, loop helices α3-α4
V171C	5.8 (3.7-8.6)	Domain I, middle of helix α5
G183C	2.9 (1.6-5.5)	Domain I, loop helices α5-α6
S324C	6.0 (3.0-10.1)	Domain II, loop strands β3-β4
S364C	3.6 (1.4-10.2)	Domain II, end of strand β6
K490C	6.6 (1.6-18.2)	Domain III, loop strands β14-β15
N547C	5.2 (1.5-16.2)	Domain III, middle of strand β19

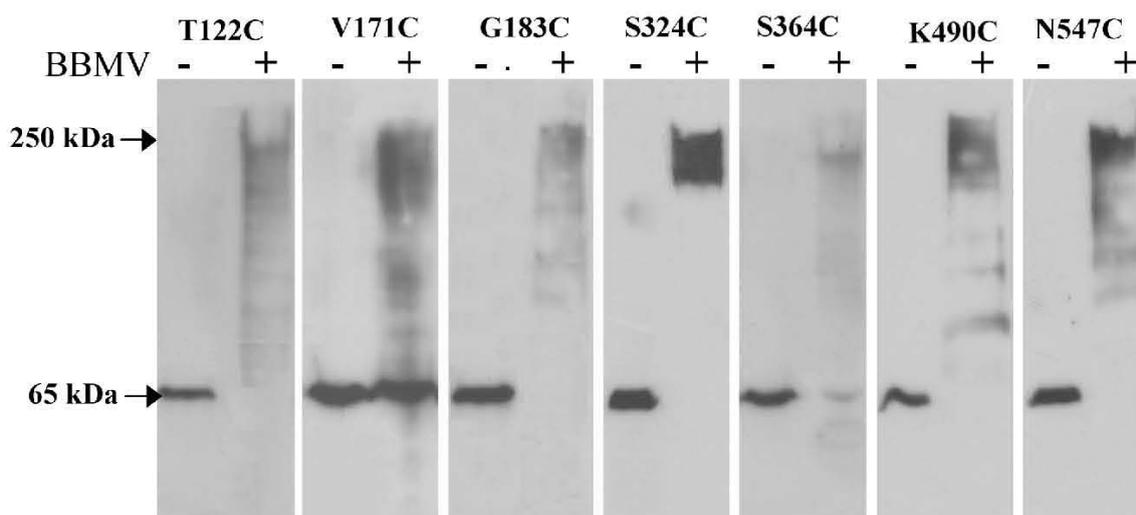
Table 2-SM. Stoichiometry of labeling when single Cys proteins were labeled with 1,5 IAEDANS or with Alexa Fluor-350 probes.

Toxin	1,5-IAEDANS ^a	Alexa Fluor-350 ^a
T122C	0.84 ± 0.05	0.94 ± 0.02
G183C	ND	0.87
V171C	0.24 ± 0.09	1.00 ± 0.03
S324C	0.72 ± 0.1	0.84 ± 0.04
S364C	0.72 ± 0.09	0.37 ± 0.08
K490C	0.75 ± 0.08	1.02 ± 0.02
N547C	0.61 ± 0.06	1.06 ± 0.01

^aresults are presented in mol of fluorescent probe per mol of Cry1Ab toxin
ND, not determined.

Figure 1-SM. Western blot analysis of soluble and membrane associated proteins.

Mutant proteins were analyzed by Western blot after loading in SDS-PAGE using polyclonal anti-Cry1Ab antibody and a secondary goat-anti-rabbit-HRP antibody. The monomeric 65 kDa structure is observed in solution but after interaction with BBMV the membrane pellet showed that proteins form oligomeric structures that are observed as 250 kDa bands.



13. BIBLIOGRAFÍA

1. Devine GJ, Furlong MJ. 2007. **Insecticide use: contexts and ecological consequences.** Agr Hum Values. 24: 281-306.
2. Bravo A, *et al.* 2011. ***Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide.** Insect Biochem Mol Biol. 41: 423-431.
3. Raymond B, *et al.* 2010. ***Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?.** Trends Microbiol. 18: 189-194.
4. Feitelson JS. 1993. **The *Bacillus thuringiensis* family tree.** *in*: L Kim (ed). **Advanced engineered pesticides.** Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 63-71.
5. Helgason E, *et al.* 2000. ***Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One species on the basis of genetic evidence.** Appl Environ Microbiol. 66: 2627-2630.
6. Bechtel DB, Bulla LA Jr. 1976. **Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*.** J Bacteriol. 127: 1472-1481.
7. Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2005. ***Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use.** Comp Mol Insect Science. Elsevier BV. 175-206.
8. Crickmore N, *et al.* 1998. **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins.** Microbiol Mol Biol Rev. 807-813. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.
9. Pérez C, *et al.* 2005. ***Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor.** Proc Natl Acad Sci. 102: 18303–18308.
10. Parker MW, Feil SC. 2005. **Pore-forming protein toxins: from structure to function.** Progr Biophys & Mol Biol. 88: 91–142.
11. Zhang MY, *et al.* 1993. **Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis*: reduced expression of flagellin and phospholipases.** Infect Immunol. 61: 4947-4954.
12. Lövgren A, *et al.* 1990. **Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*.** Mol Microbiol. 4: 2137-2146.
13. Schnepf HE, Whiteley HR. 1985. **Protein toxins of *Bacilli*.** *in*: Hoch JA, Setlow P (ed). **Molecular biology of microbial differentiation.** American Society for Microbiol. Washintong DC. 209-216
14. Schnepf E, *et al.* 1998. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** Microbiol Mol Biol Rev. 62: 775-806.
15. Levinson BL. 1990. **High-performance liquid chromatography analysis of two beta-exotoxins produced by some *Bacillus thuringiensis* strains.** *in*: Hickie LA, Fitch WL (ed). **Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*.** American Chemical Society. Washington DC. 115-136
16. Sebesta K & Horská K. 1968. **Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*.** Biochim Biophys Acta. 169: 281-282.
17. Estruch JJ, *et al.* 1996. **Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects.** Proc Natl Acad Sci. USA. 93: 5389-5394.
18. Crickmore N, *et al.* 2010. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.** http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.

19. Bravo A. 1997. **Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains.** J Bacteriol. 179: 2793–2801.
20. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. 2001. **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world.** Trends in Genet. 17: 193–199.
21. Dean DH, *et al.* 1996. **Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis: a minireview.** Gene. 179: 111-117.
22. Bravo A, Jansens S, Peferoen M. 1992. **Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects.** J Invertebr Pathol. 60: 237-247.
23. Dai SM, Gill SS. 1993. ***In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp, *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases.** Insect Biochem Mol Biol. 23: 273–283.
24. Li J, Carrol J, Ellar DJ. 1991. **Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution.** Nature. 353: 815–821.
25. Bosch D, *et al.* 1994. **Recombinant *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins with new properties for resistance management.** Biotechnology. 12: 915–918.
26. de Maagd RA, *et al.* 2003. **Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria.** Ann Rev Genet. 37: 409–433.
27. Grochulski P, *et al.* 1995. ***Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation.** J Mol Biol. 254: 447–464.
28. Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM. 2001. **Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope.** Structure. 9: 409–17.
29. Galitsky N, *et al.* 2001. **Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin CryBb1 of *Bacillus thuringiensis*.** Acta Cryst. D57: 1101–1109.
30. Boonserm P, *et al.* 2005. **Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications.** J Mol Biol. 348: 363–382.
31. Boonserm P, *et al.* 2006. **Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution.** J Bacteriol. 188: 3391–3401.
32. Guo S, *et al.* 2009. **Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*.** J Struct Biol. 168: 259-266.
33. Miranda R, *et al.* 2002. **Mecanismo de acción de las toxinas Cry.** TIP. 5(1): 5-13.
34. Aronson AI, Shai Y. 2001. **Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action.** FEMS Microbiol Lett. 195: 1–8.
35. Zhang X, *et al.* 2006. **A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*.** Proc Natl Acad Sci. 103: 9897–9902.
36. Soberón M, *et al.* 2007. **Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance.** Science. 318: 1640-1641.
37. Broderinck NA, Raffa KF, Handelsman J. 2006. **Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity.** Proc Natl Acan Sci. USA. 103: 15196-15199.
38. Pacheco S, *et al.* 2009. **Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Ab toxin is involved in a "ping-pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors.** J Biol Chem. 284: 32750-32757.

39. Arenas I, *et al.* 2010. **Role of Alkaline Phosphatase from *Manduca sexta* in the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Ab Toxin.** J Biol Chem. 285(17): 12497-12503.
40. Aronson AI, Beckman W, Dunn P. 1986. ***Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens.** Microbiol Rev. 50:1-24.
41. Ebersold HR, *et al.* 1978. **The action of the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study.** Experientia. 34: 1672.
42. Percy J, Fast PG. 1983. ***Bacillus thuringiensis* cristal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells.** J Invertebr Pathol. 41: 86-98.
43. Bravo A, *et al.* 1992. **Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes.** J Invertebr Pathol. 60: 247-254.
44. Gupta BL, *et al.* 1985. **Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions and electrogenic K⁺-transporting ephitelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta* *in vitro*.** J Cell Sci. 74: 137-152.
45. Gringorten JL, *et al.* 1992. **Supression of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin activity by low alkaline pH.** J Invertebr Pathol. 60: 47-52.
46. Knowles BH. 1994. **Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins.** Advan Insect Physiol. 24: 275-308.
47. Wabiko H, Raymond KC, Bulla AL Jr. 1986. ***Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis.** DNA. 5: 305-314.
48. Martens JWM, *et al.* 1995. **Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b) protoxin.** Mol Gen Genet. 247: 482-487.
49. Strizhov N, *et al.* 1996. **Mapping of the entomocidal fragment of *Spodoptera*-specific *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC.** Mol Gen Genet. 253: 11-19.
50. Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.** Toxicon. 49: 423-435.
51. Van Rie J, *et al.* 1989. **Specificity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins.** Eur J Biochem. 186: 239-247.
52. Jenkins JL, *et al.* 2000. **Bivalent secuential binding model of *Bacillus thuringiensis* toxin to *Gypsy moth* aminopeptidase N receptor.** J Biol Chem. 275: 14423-14431.
53. Haider MZ, Ellar DJ. 1989. **Functional mapping of an entomocidal d-endotoxin. Single aminoacid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity on the protein.** J Mol Biol. 208: 183-194.
54. Oddou P, Hartmann H, Geiser M. 1991. **Identification and characterization of *Heliotis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins.** Eur J Biochem. 202: 676-680.
55. Garczynski SF, Crim JW, Adang MJ. 1991. **Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin by protein blot analysis.** Appl Environ Microbiol. 57: 2816-2820.

56. Knowles BH, Knight PJK, Ellar DJ. 1991. **N-acetyl-D-galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis***. Proc R Soc Lond B. 245: 31-35.
57. Indrasith LS, Hori H. 1992. **Isolation and partial characterization of binding proteins for immobilized delta endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombix mori*, and the common cutworm, *Spodoptera lituria***. Comp Biochem Physiol. 102: 605-610.
58. Vadlamudi RK, *et al.* 1995. **Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis***. J Biol Chem. 270: 5490–5494.
59. Knight P, Crickmore N, Ellar DJ. 1994. **The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N**. Mol Microbiol. 11: 429–436.
60. Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2004. **Characterization of a Cry1 Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae**. Eur J Biochem. 271: 3127–3135.
61. Valaitis AP, *et al.* 2001. **Isolation and partial characterization of Gypsy moth BTR-270 an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1 A toxins with high affinity**. Arch Ins Biochem Physiol. 46: 186–200.
62. Jenkins JL, Dean DH. 2000. **Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods**. *in*: Setlow JK (ed). Genetic Engineering: Principles and Methods. New York, Plenum Press. p.33.
63. Pigott CR, Ellar DJ. 2007. **Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity**. Microbiol Mol Biol Rev. 71: 255e281.
64. Gómez I, *et al.* 2001. **Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1 A toxin interaction using phage display**. J Biol Chem. 276: 28906–28912.
65. Gómez I, *et al.* 2002a. **Hydropathic complementarity determines interaction of epitope 869HITDTNKN876 in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1 A toxins**. J Biol Chem. 277: 30137–30143.
66. Gómez I, *et al.* 2003. **Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1 Ab toxin specificity: Two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cy1 Ab toxin**. Biochem. 42: 10482–10489.
67. Hua G, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2004. **Bt-R1 a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* binding and cytotoxicity**. J Biol Chem. 279: 28051–28056.
68. Atsumi S, *et al.* 2005. **Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type I binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1 Aa toxin**. Appl Environ Microbiol. 71: 3966–3977.
69. Ferré J, Van Rie J. 2002. **Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis***. Annu Rev Entomol. 47: 501–533.
70. Gómez I, *et al.* 2002b. **Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Ab toxin**. FEBS Lett. 513: 242–246.
71. Rausell C, *et al.* 2004a. **Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate**. Biochem. 43: 166–174.

72. Pardo-Lopez L, *et al.* 2006. **Structural changes of the Cry1 Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-Acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion.** Biochem. 45: 10329-10336.
73. Munoz-Garay C, *et al.* 2006. **Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different Cry toxins.** J Memb Biol. 212: 61-68.
74. Puntheeranurak T, *et al.* 2005. **Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes.** Ultramicroscopy. 105: 115–124.
75. Ounjai P, *et al.* 2007. **Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba d-endotoxin complex revealed by electron crystallography: Implications for toxin-pore formation.** Bioch & Biophys Res Commun. 361: 890–895.
76. Vie V, *et al.* 2001. **Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin.** J Membr Biol. 180: 195–203.
77. Muñoz GC, *et al.* 2009. **Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects.** Biochim Biophys Acta. 178 (10): 2229-2237.
78. Zhuang M, *et al.* 2002. ***Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation.** J Biol Chem. 277: 13863–13872.
79. Cabiaux V, Wolff Ch, Ruyschaert JM. 1997. **Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxins virulence.** Int J Biol Macromol. 21: 285–298.
80. Rausell C, *et al.* 2004b. **Unfolding events in the watersoluble monomeric Cry1 Ab toxin during transition to oligomeric pre-pore and membrane inserted pore channel.** J Biol Chem. 279: 55168–55175.
81. Dow JAT. 1992. **pH gradients in lepidopteran midgut.** J Exp Biol. 172: 355-375.
82. Knowles BH, Ellar DJ. 1987. **Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity.** Biochim Biophys Acta. 924: 509-518.
83. Soberón M, Bravo A. 2001. ***Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas.** *in:* Martínez RE, Martínez RJE (ed). **Microbios.** UNAM.
84. Lakowicz JR. 2006. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Springer. 3a Ed. USA.
85. Szudy J, ed. 1998. **Born 100 years ago: Aleksander Jablonski (1898–1980).** Uniwersytet Mikolaja Kopernika, Torun, Poland.
86. Acta Physica Polonica. 1978. Polska Akademia Nauk Instytut Fizyki. Europhys J. Vol. A65(6).
87. Stokes GG. 1852. **On the change of refrangibility of light.** Phil Trans R Soc, London. 142: 463–562.
88. Kasha M. 1950. **Characterization of electronic transitions in complex molecules.** Disc Faraday Soc. 9: 14–19.
89. Birks JB. 1970. **Photophysics of aromatic molecules.** John Wiley & Sons, New York.
90. Demchenko AP. 1981. **Ultraviolet spectroscopy of proteins.** Springer-Verlag, New York.
91. Longworth JW. 1971. **Luminescence of polypeptides and proteins.** *In:* Steiner RF, Welnyrb I (ed). **Excited states of proteins and nucleic acids.** Plenum Press, New York. 319–484
92. Permyakov EA. 1993. **Luminescent spectroscopy of proteins.** CRC Press, London.

93. Haugland RP. 1996. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. 9th ed. Molecular Probes Inc, Eugene, OR.
94. Waggoner A. 1995. **Covalent labeling of proteins and nucleic acids with fluorophores**. *Methods Enzymol.* 246: 362–373.
95. Kautsky H. 1939. **Quenching of luminescence by oxygen**. *Trans Faraday Soc.* 35: 216–219.
96. Knibbe H, Rehm D, Weller A. 1968. **Intermediates and kinetics of fluorescence quenching by electron transfer**. *Ber Bunsenges Phys Chem.* 72: 257–263.
97. Kasha M. 1952. **Collisional perturbation of spin-orbital coupling and the mechanism of fluorescence quenching: a visual demonstration of the perturbation**. *J Chem Phys.* 20: 71–74.
98. Steiner RF, Kirby EP. 1969. **The interaction of the ground and excited states of indole derivatives with electron scavengers**. *J Phys Chem.* 73: 4130–4135.
99. Eftink MR, Ghiron C. 1981. **Fluorescence quenching studies with proteins**. *Anal Biochem.* 114: 199–227.
100. Eftink MR. 1991. **Fluorescence quenching reactions: probing biological macromolecular structures**. *in: Dewey TG (ed). Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York. 1–41.
101. Eftink MR. 1991. **Fluorescence quenching: theory and applications**. *In Lakowicz JR (ed). Topics in fluorescence spectroscopy, Vol. 2: Principles*. Plenum Press, New York. 53–126.
102. Gazit E & Shai Y. 1995. **The Assembly and Organization of the $\alpha 5$ and $\alpha 7$ Helices from the Pore-forming Domain of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin**. *J Biol Chem.* 270(6): 2571-2578.
103. Gazit E, *et al.* 1998. **The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an “umbrella-like” structure of the pore**. *Biophysics.* 95: 12289-12294.
104. Masson L, *et al.* 1999. **Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa Toxin Lines the Lumen of the Ion Channel**. *J Biol Chem.* 274(45): 31996-32000.
105. Girard F, *et al.* 2008. **Cysteine Scanning Mutagenesis of $\alpha 4$, a Putative Pore-Lining Helix of the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Cry1Aa**. *Appl Environ Microbiol.* 74(9): 2565-2572.
106. Schwartz JL, *et al.* 1997. **Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering**. *FEBS Lett.* 410: 397-402.
107. Vachon V, *et al.* 2004. **Helix 4 Mutants of the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Cry1Aa Display Altered Pore-Forming Abilities**. *Appl Environ Microbiol.* 70(10): 6123-6130.
108. Tomimoto K, Hayakawa T & Hori H. 2006. **Pronase digestion of brush border membrane-bound Cry1Aa showed that almost whole single molecule of activated Cry1Aa penetrated into the membrane**. *Comp Biochem Physiol.* 144(4): 413-422.
109. Nair MS, Dean DH. 2008. **All domains of Cry1A toxins insert into insect brush border membranes**. *J Biol Chem.* 203(39): 26324-26331.
110. Jimenez-Juarez N, *et al.* 2007. ***Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae**. *J Biol Chem.* 282(29): 21222-21229.
111. Rodriguez-Almazan C, *et al.* 2009. **Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: demonstration of the role of oligomerization in toxicity**. *PLoS ONE.* 4, e5545.

112. Arantes O & Lereclus D. 1991. **Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis***. *Gene*. 108:115-19.
113. Hudson EN & Weber G. 1973. **Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents**. *Biochem*. 12(21): 4154-4161.
114. Pelish TM & McClain MS. 2009. **Dominant-negative Inhibitors of the *Clostridium perfringens* ϵ -Toxin**. *J Biol Chem*. 284(43): 29446–29453.
115. Shahrokh S, Verkman AS & Shoet SB. 1991. **Distance between Skeletal Protein 4.1 and the Erythrocyte Membrane Bilayer Measured by Resonance Energy Transfer**. *J Biol Chem*. 266(18): 12082-12089.
116. Phillips SR, Wilson LJ & Borkman RF. 1986. **Acrylamide and iodide fluorescence quenching as a structural probe of tryptophan microenvironment in bovine lens crystallins**. *Curr Eye Res*. 5(8): 611-619.
117. Caputo GA & London E. 2003. **Using a Novel Dual Fluorescence Quenching Assay for Measurement of Tryptophan Depth within Lipid Bilayers To Determine Hydrophobic α -Helix Locations within Membranes**. *Biochem*. 42(11): 3265-3274.
118. Laemli UK. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*. 227: 680-685.
119. Johnson I & Spence T (ed). 2010. **Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling**. 11 ed. <http://www.invitrogen.com>.