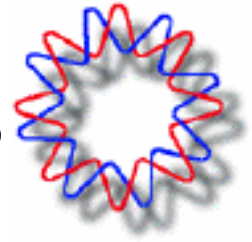




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Análisis de variables para el despliegue de la
toxina Cry3Aa en el fago filamentoso M13**

TESIS

**Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias**

PRESENTA

Ing. Fernando Zúñiga Navarrete

Director de Tesis

Dr. Mario Soberón Chávez

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.

ÍNDICE

Índice general.....	1
Abreviaturas.....	2
Resumen.....	3
Introducción	
Antecedentes generales.....	4
Estructura de las toxinas Cry.....	5
Mecanismo de acción	6-8
La toxina Cry3Aa.....	8,9
Despliegue en fagos (Phage display).....	9-12
Despliegue en fagos de toxinas Cry.....	12-14
Hipótesis.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.....	15
Materiales y métodos	
Cepas y vectores utilizados.....	16, 17
Purificación de la toxina Cry3Aa.....	17, 18
Obtención de un suero anti-Cry3Aa.....	18
Aislamiento del gen de la toxina Cry3Aa.....	18, 19
Construcción de vectores pCADS3A y pCANTAB3A.....	19, 20
Producción y purificación de fagos ayudadores.....	20, 21
Ensayos de despliegue.....	21
Western blot.....	22
Rescate de biblioteca de anticuerpos de llama desplegada en fagos.....	22
Tamizaje de la biblioteca de anticuerpos desplegados en fagos.....	23
ELISA monoclonal.....	23, 24
Resultados y discusión	
Producción de un suero policlonal anti-Cry3Aa.....	25-26
Construcción de fagémidos para el despliegue de la toxina Cry3Aa.....	26-30
Aislamiento del gen de la toxina Cry3Aa.....	26, 27
Construcción de fagémidos.....	28-30
Ensayos de despliegue de la toxina Cry3Aa.....	30-36
Análisis del efecto de la cepa de <i>E. coli</i> y del fagémido.....	30-32
Análisis del efecto de la vía de translocación de proteínas.....	32-34
Análisis del efecto del fago ayudador.....	34-36
Tamizaje de biblioteca de anticuerpos de llama.....	36-42
Conclusiones.....	43
Perspectivas.....	43
Bibliografía.....	44-48

Abreviaturas

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

dNTP's Difosfato de deoxirribonucleótidos (deoxyribonucleotide triphosphate).

Taq Polimerasa Polimerasa de *Thermus aquaticus*

LB Caldo Luria (Luria broth)

x-gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

ADN Ácido desoxirribonucleico

OPD Orto phenil diamina.

PVDF Fluoruro de polivinildieno.

ELISA Ensayo por inmunoabsorción acoplado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

IgG Inmunoglobulina G

RESUMEN

La bacteria *Bacillus thuringiensis* sintetiza inclusiones de proteínas denominadas toxinas Cry que poseen actividad tóxica contra diferentes órdenes de insectos entre lo tóxicas a diversos insectos importantes para la agricultura y la salud humana. Debido a su especificidad e inocuidad al ambiente, estas proteínas son una valiosa alternativa sobre los pesticidas químicos.

La toxina Cry3Aa, debido a su actividad contra insectos coleópteros es potencialmente útil para el control de plagas de este orden; sin embargo no ha sido tan estudiada como las toxinas Cry1A's y su toxicidad es baja hacia coleópteros comparada con la toxicidad de las toxinas Cry1A's hacia lepidópteros. Debido a esto se ha buscado aumentar, mediante distintas estrategias, tanto su toxicidad como su espectro de acción. El despliegue en fagos es una de las estrategias exploradas para alcanzar estos objetivos, pero ha presentado dificultades como son la obtención de bajos niveles de despliegue o disminución de la toxicidad de la proteína desplegada.

En este trabajo se probaron dos alternativas tratando de superar dichas dificultades: la utilización de un fago "phaberge" para aumentar el nivel de despliegue y la redirección de la proteína de fusión hacia la vía SRP de transporte de proteínas para mejorar la calidad del plegamiento.

La utilización del fago phaberge que impide la producción de pIII en una cepa no supresora aumentó el nivel de despliegue de la toxina Cry3Aa comparado con la utilización de un fago M13 nativo, sin embargo, no hubo ningún efecto evidente sobre el despliegue al utilizar el péptido señal DsbA para la vía SRP, en sustitución del péptido PelB para la vía Sec.

Por otra parte, con el objetivo de obtener una herramienta que pueda ser utilizada en la evaluación de la calidad del plegamiento de la toxina desplegada en base a su capacidad para unirse a receptores y en el estudio del modo de acción de la toxina Cry3Aa, se tamizó una biblioteca de anticuerpos de llama (*Lama glama*) desplegados en fagos y se aisló un anticuerpo seleccionado contra el asa I del dominio II de la toxina Cry3Aa.

Tanto el anticuerpo como la toxina desplegada podrán utilizarse para la búsqueda de proteínas más tóxicas y en el estudio de los receptores naturales en los intestinos de los insectos susceptibles.

Antecedentes

Bacillus thuringiensis es una bacteria gram-positiva formadora de esporas que sintetiza inclusiones cristalinas durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento. Inicialmente se catalogó como un patógeno de insectos y su capacidad insecticida se debe a los cristales que produce (Schnepf *et. al.*, 1998).

Las inclusiones (Figura 1) están compuestas de proteínas denominadas toxinas Cry, las cuales son tóxicas a diversos órdenes de insectos de entre los cuales algunos tienen importancia económica ya que pueden ser plagas para ciertos cultivos o funcionar como vectores de enfermedades que afectan al ser humano. Debido a su especificidad e inocuidad al ambiente las toxinas Cry son una valiosa alternativa sobre los pesticidas químicos comúnmente utilizados para controlar a los insectos perniciosos.

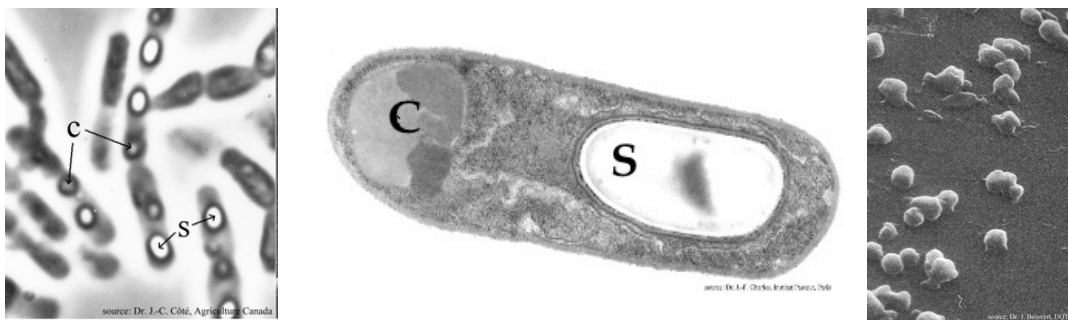


Figura 1. *Bacillus thuringiensis*, sus esporas y cristales. En la fotografía de la izquierda tomada por medio de un microscopio óptico se muestran las células vegetativas de la bacteria *B. thuringiensis* variedad *israelensis* y se pueden distinguir las esporas de apariencia brillante señaladas con la letra "S" y los cristales de apariencia opaca y señalados con la letra "C". La fotografía del centro fue tomada mediante un microscopio electrónico de transmisión y muestra a una célula vegetativa de *B. thuringiensis* variedad *israelensis*. La fotografía de la derecha fue tomada por medio de un microscopio electrónico de barrido y en ella se muestran los cristales producidos por la bacteria *B. thuringiensis* variedad *israelensis* (modificadas de Boisvert y Lacoursière, 2004)

Se han identificado cepas de *B. thuringiensis* de muestras de suelo, superficies de plantas, insectos muertos y granos almacenados, las cuales producen proteínas con especificidad contra diferentes órdenes de insectos (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera o Mallophaga y Acari), así como a otros invertebrados (Nematelmintos, Platelminetos y Sarcomastigoforos) (Bravo, 1997).

Estructura de las toxinas Cry

A la fecha se han resuelto las estructuras de 7 toxinas Cry por medio de cristalografía de rayos X: Cry1Aa (Grochulski, *et. al.*, 1995), Cry1Ac (Derbyshire *et. al.*, 2001), Cry2Aa (Morse *et. al.*, 2001), Cry3Aa (Li *et. al.*, 1991), Cry3Ba (Galitsky *et. al.*, 2001), Cry4Aa (Boonserm *et. al.*, 2006) y Cry4Ba (Boonserm *et. al.*, 2005). A pesar de que estas toxinas son diferentes en su secuencia de aminoácidos ya que comparten entre el 20 y el 40% de identidad y en su especificidad ya que son tóxicas a diferentes órdenes de insectos (Boonserm *et. al.*, 2005) todas tienen una estructura similar consistente de tres dominios.

Los dominios se describieron originalmente en la toxina Cry3Aa que fue la primera para la que se obtuvo la estructura tridimensional (Li *et. al.*, 1991) pero los análisis del resto de las estructuras posteriormente obtenidas confirman que el plegamiento está conservado entre la familia de toxinas Cry (Parker y Feil, 2005).

El dominio I consiste de 7 α -hélices (α -1, α -2, α -3, α -4, α -5, α -6, α -7), 6 de las cuales rodean a una central la α -5, el dominio II consiste de tres láminas β que adoptan una forma de prisma triangular unidas por asas (loops) hipervariables y el extremo C-terminal (Dominio III) está constituido de dos hojas β antiparalelas formando un β -sandwich (Li *et al.*, 1991) (Figura 2).

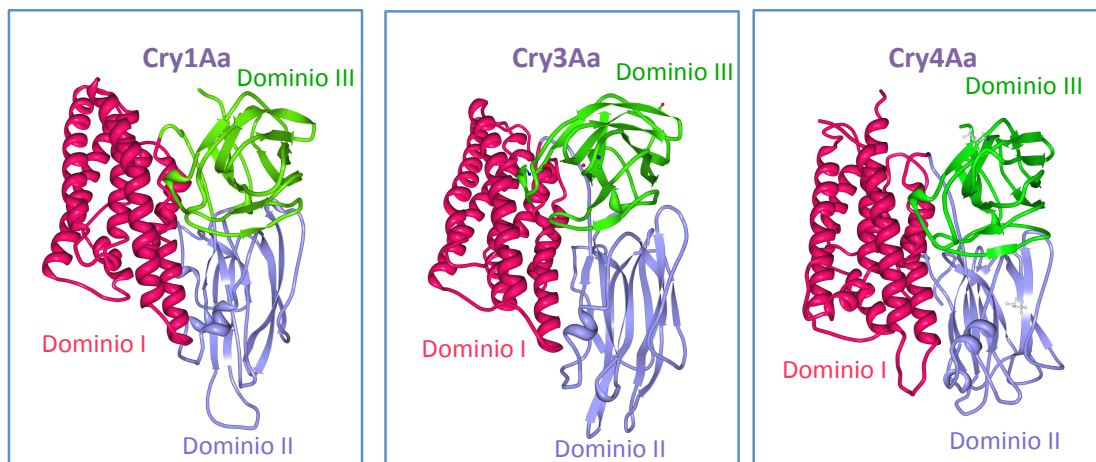


Figura 2. Estructura tridimensional de tres toxinas Cry. Se muestran las estructuras de tres toxinas Cry con diferente especificidad y estructura similar: la toxina Cry1Aa (código del Protein Data Bank, 1CIY) específica contra insectos lepidópteros, la toxina Cry3Aa (código del PDB, 1DLC) específica contra insectos coleópteros y la toxina Cry4Aa (código del PDB, 1I5P) específica contra insectos dípteros. Las estructuras fueron modeladas a partir de los datos de secuencia obtenidos del PDB utilizando el programa PDB Protein Workshop 3.9. Los dominios se muestran con diferentes colores: en rojo el dominio I, en azul el dominio II y en verde el dominio III.

Mecanismo de acción de las toxinas Cry

Para ejercer su actividad, las toxinas Cry primero deben cambiar de un estado cristalino inerte a la forma citotóxica, lo cual es un proceso de múltiples pasos. En primer lugar las inclusiones cristalinas deben ser ingeridas por una larva susceptible, una vez en el intestino los cristales se solubilizan y se libera la denominada protoxina. Las proteasas intestinales reconocen sitios de corte en la protoxina y se produce la forma activa de la toxina que es capaz de unirse a receptores en el epitelio del intestino medio de la larva. Cierta número de subunidades (probablemente 3) forman entonces un oligómero que sufre cambios de conformación hasta transformarse en un poro capaz de insertarse en la membrana de las células intestinales. El poro provoca la lisis celular y la muerte de la larva.

El descubrimiento de los receptores de las toxinas Cry ha evidenciado su importancia para el mecanismo de acción y específicamente para las toxinas Cry1A's se han descrito cuatro receptores diferentes: una proteína de tipo caderina (cadherin-like protein Bt-R1), una aminopeptidasa anclada por glicofosfatidilinositol (GPI-APN), una fosfatasa alcalina anclada por GPI (GPI-ALP) y un glicoconjugado de 270kDa (Figura 3).

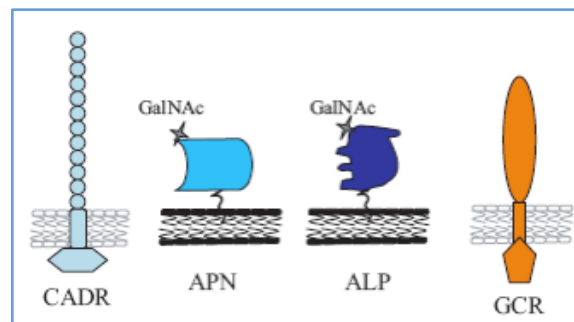


Figura 3. Representación de las moléculas receptoras para las toxinas Cry1A. CADR, caderina; APN, aminopeptidasa N; ALP, fosfatasa alcalina; GRC, glicoconjugado de 270kDa. De Bravo *et al.*, 2007

Las caderinas son proteínas transmembranales con un dominio citoplásmico y un dominio extracelular constituido de varios segmentos repetidos, 12 en el caso de Bt-R1, que tienen regiones de unión a calcio, secuencias de interacción con integrinas y de unión a caderinas (Vadlamudi *et al.*, 1995). La APN y la ALP son enzimas que ayudan a la digestión de proteínas provenientes de la dieta de los insectos y están ancladas a la membrana por GPI e incluidas selectivamente en balsas lipídicas. Las balsas lipídicas son consideradas como micro-dominios espacialmente diferenciados pertenecientes a las membranas celulares enriquecidos en glicolípidos, colesterol y proteínas ancladas por GPI (Zhuang *et al.*, 2002)

El mecanismo de acción tipo “ping-pong” de la toxina Cry1Ab se ha descrito con mayor detalle en el lepidóptero *M. sexta* e incluye los siguientes pasos: el insecto debe ingerir los cristales que contienen a la toxina Cry1Ab para posteriormente solubilizarse en el intestino, a continuación la protoxina se activa por proteasas intestinales al serle removidas regiones de los extremos amino y carboxilo y una vez activa la toxina se une a los receptores APN y ALP. El dominio II de la toxina se une inicialmente con el receptor APN que se encuentra presente en alta abundancia pero que presenta baja afinidad por la toxina, a esta primera interacción le sigue la unión al receptor de alta afinidad Bt-R1 que provoca el corte de la hélice α -1 y la consecuente formación del oligómero. El oligómero gana afinidad por la APN pero permanece unido a la Bt-R1 y este complejo permite la inserción del oligómero en la membrana apical y la formación de poros (Pacheco *et. al.*, 2009).



Figura 4. Mecanismo de acción de las toxinas Cry1A's en lepidópteros: 1) solubilización del cristal, 2) activación proteolítica de la toxina, 3) unión del monómero de la toxina a los receptores de baja afinidad y alta abundancia APN y ALP, 4) unión del monómero al receptor de alta afinidad caderina y corte de la hélice α -1, 5) oligomerización, 6) unión del oligómero a los receptores APN y ALP, 7) formación de poro e inserción en la membrana de las células intestinales, 8) lisis celular (Modificado de Pacheco *et. al.*, 2009 por el mismo autor).

La participación de los receptores en el mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha comprobado con el descubrimiento de mutaciones en dichos receptores. Por ejemplo mutaciones en alelos de la caderina se han asociado a la resistencia a las toxinas Cry en poblaciones del insecto *Pectinophora gossypiella* obtenidas del campo (Morin *et al.*, 2003), la falta de expresión de la APN1 de *Spodoptera exigua* en poblaciones también obtenidas del campo se relaciona con su

resistencia a la toxina Cry1Ca (Herrero *et al.*, 2005) y se ha descrito una relación entre bajos niveles de expresión de ALP con la resistencia de *Heliothis virescens* YHD2 a la toxina Cry1Ac (Jurat-Fuentes y Adang, 2004).

Los reportes anteriores son evidencia de que el mecanismo más frecuente de resistencia de insectos a las toxinas Cry son defectos en la interacción toxina-receptor (Gómez *et al.*, 2007) y de la relevancia del estudio de dichas interacciones.

La toxina Cry 3Aa

La subespecie *tenebrionis* de la bacteria *B. thuringiensis* produce una inclusión cristalina compuesta en forma minoritaria por la protoxina Cry3Aa completa de 644 residuos aminoácidos (72kDa) y en forma mayoritaria por una versión 57 residuos más corta (67kDa) resultado del procesamiento de la forma de 72kDa por parte de las proteasas de la bacteria (Höfte *et al.*, 1987). Las inclusiones cristalinas compuestas de Cry3Aa se solubilizan en condiciones alcalinas (pH>10) o ácidas (pH<4) (Koller *et al.*, 1992) y la protoxina soluble precipita en condiciones de pH neutro.

La toxina Cry3Aa es tóxica para los insectos coleópteros y por ello potencialmente útil contra plagas de importancia económica como son *Leptinotarsa decemlineata* (plaga de papa), *Chrysomela scripta* (plaga del algodón).

Cuando la protoxina soluble de 67kDa se activó *in vivo* por las diferentes proteasas de los intestinos de las larvas de *L. decemlineata* se detectaron dos formas de la toxina activa, una forma de 55kDa y otra de 49kDa. Cuando se activó *in vitro* utilizando un extracto de jugo gástrico de *Pieris brassicae* se detectó principalmente un fragmento de 55kDa, lo que indica que el fragmento tóxico generado puede variar con la especie de insecto estudiada (Carroll *et al.*, 1997).

Hasta ahora se han reportado tres receptores de la toxina Cry3Aa en coleópteros. Se identificó a una ADAM10 metaloproteasa de *L. decemlineata* que se une a la toxina a través del asa 1 del dominio II y dicha interacción favorece la formación de la estructura oligomérica de la toxina (Rausell *et al.*, 2007). En *Tenebrio molitor* se reportó una proteína tipo caderina que presenta homología de secuencia con diferentes caderinas de insectos lepidópteros, se demostró que la región del repetido 12 se une a la toxina Cry3Aa, que dicha interacción promueve la formación del oligómero y que las larvas con la expresión de esta caderina disminuida mediante RNA de interferencia desarrollaron tolerancia a la toxina (Fabrick *et al.*, 2009).

En *Diabrotica virgifera virgifera* también se reportó una caderina, pero en este caso es el fragmento correspondiente a los repetidos 8 a 10 (CR8-10) el que es capaz de unirse a la toxina Cry3Aa con alta afinidad (Kd = 11.8nM) y de potenciar su toxicidad contra *L. decemlineata* (Park Y. *et al.*, 2009).

El inconveniente para la utilización de la toxina Cry3Aa como agente de biocontrol es que se necesitan concentraciones altas para matar a sus insectos blanco. La concentración letal 50 (LC₅₀) de Cry3Aa contra uno de los insectos más susceptibles a su efecto, la *L. decemlineata* es de 2.7µg/cm² (Wu *et al.*, 2000) mientras que la LC₅₀ de la toxina Cry1Ab contra *M. sexta* es de 0.5-1.7ng/cm². Es por esto que los estudios que se han hecho para conocer su funcionamiento también son dedicados a mejorar su actividad, sin embargo se ha tenido poco éxito.

Se han utilizado diferentes estrategias para mejorar a la toxina Cry3Aa, por ejemplo, mediante ingeniería de proteínas se incluyó un sitio de reconocimiento para quimotripsina/ catepsina G en el dominio I, lo cual aparentemente facilitó su procesamiento y la toxina se volvió aproximadamente tres veces más activa contra *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Walters *et al.*, 2007).

La estrategia más exitosa para el mejoramiento de la toxina ha sido la mutación sitio-dirigida con la que se comprobó que las asas 1 y 3 del dominio II son importantes para la interacción con receptores y para que la toxina se inserte en la membrana (Wu y Dean, 1996). Con este antecedente y mediante dos cambios de aminoácidos en el asa 1 de la toxina se incrementó la toxicidad 11 veces contra *T. molitor* (Wu *et al.*, 2000), el inconveniente de esta metodología es el tiempo necesario para generar las mutantes y la necesidad de un conocimiento previo de las regiones a las cuales dirigir las mutaciones. La herramienta conocida como despliegue en fagos (phage display) podría ayudar a superar estas dificultades ya que permite la rápida producción y selección de variantes de una proteína.

Despliegue en fagos (Phage display)

El despliegue en fagos es una herramienta descrita por Smith en 1985 y consiste en la fusión de secuencias de ADN exógeno al genoma de un virus bacteriófago (“fago”), de tal forma que las proteínas codificadas por el ADN exógeno se expresen en fusión con una de las proteínas de cubierta del fago (Mullen *et al.*, 2006).

Los fagos infectan a las bacterias adhiriéndose al *pilus* que es un arreglo helicoidal de subunidades proteínicas que se extiende hacia el exterior de la pared celular y utilizan a la bacteria huésped para que sintetice los elementos necesarios para su replicación (Figura 5). Pueden ser virulentos (causando lisis) o temperados (sin provocar la lisis) (Nicola *et al.*, 2006).

Las cepas M13, f1 y fd de fagos filamentosos consisten de un ADN de cadena simple que codifica para 11 genes empacados en una cápside. Un fago viable expresa alrededor de 2700 copias de la proteína del gen 8 (g8p o pVIII, de 50 aa) y de 3 a 5 copias de la proteína de adsorción (g3p o pIII, de 406 aa), localizada en un extremo del fago y codificada por el gen III

(g3). Las proteínas recombinantes usualmente se expresan en fusión con la proteína pIII, aunque también se ha utilizado pVIII y pIX (Azzazy *et al.*, 2002).

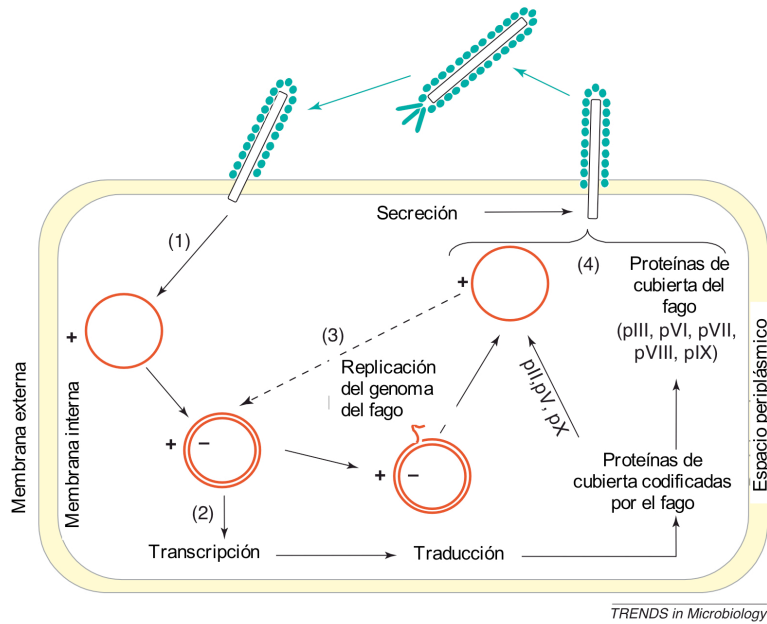


Figura 5. Ciclo de los fagos filamentosos en *Escherichia coli*. 1) Unión a *E. coli* por medio de pIII, 2) producción de proteínas del virus, 3) replicación del genoma del fago 4) ensamblaje de los viriones. (Modificado de Mullen *et al.*, 2006).

El poder de la técnica de despliegue en fagos radica en que: i) Mantiene un vínculo físico entre la proteína desplegada y la secuencia de ADN que la codifica; y ii) Las bibliotecas así construidas pueden contener miles de millones de péptidos o proteínas distintos.

Las bibliotecas se pueden construir utilizando vectores basados en la secuencia del fago Ff (vectores de fago) o utilizando fagémidos, que son híbridos de fago y plásmido pero a nivel de ADN (preparación del ADN, clonación y eficiencia de transfección) es más fácil trabajar con fagémidos que con fagos. Los fagémidos se diseñan con el origen de replicación (*ori*) del fago, el origen de replicación de plásmido de *E. coli*, la fusión del gen de la proteína de interés y el gen III o el gen VIII, un sitio de clonación múltiple y un gen de resistencia a antibiótico; sin embargo, carecen de los genes que codifican las proteínas estructurales y no estructurales requeridas para producir un fago completo. Los fagémidos pueden crecer como plásmidos en *E. coli* y empacarse como ADN recombinante de fago con la ayuda de un fago ayudador (*helper*), el cual provee los componentes necesarios para el ensamblaje del fago (Mullen *et al.*, 2006). Los fagos ayudadores son fagos Ff con varias modificaciones: contienen un origen de replicación adicional, usualmente tienen genes de resistencia a antibióticos y su señal para empacarse es defectuosa.

Cuando una bacteria es infectada con un fago ayudador, la señal de empaquetado defectuosa no previene la producción de partículas de fago sino el empaquetado del ADN del fago en las partículas. Por otra parte, cuando una bacteria es infectada con el fagémido y el ayudador a la vez, es el ADN del fagémido (que contiene una señal de empacamiento óptima) el que se empaqueta en lugar del ADN del fago (Chasteen *et al.*, 2006).

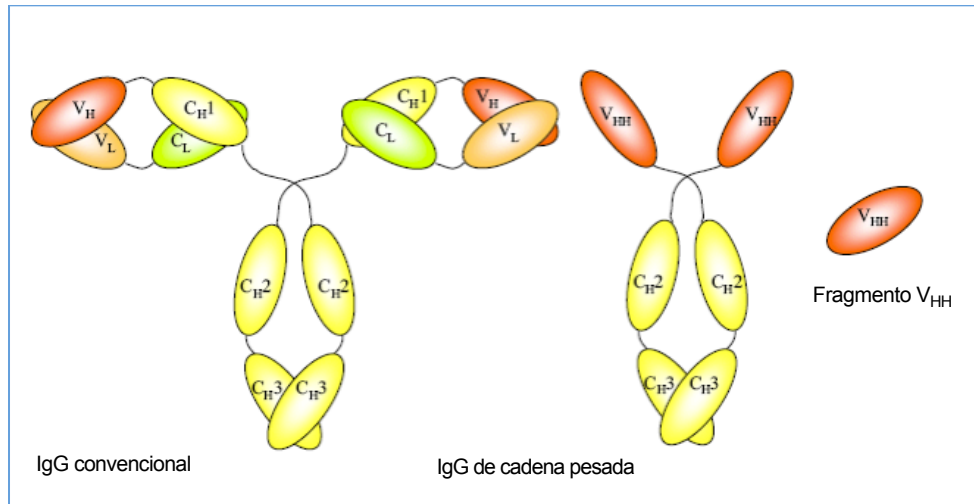


Figura 6. Comparación entre los IgGs convencionales, los IgG's de cadena pesada y los denominados fragmentos V_{HH} obtenidos de camélidos (Modificado de Joosten *et al.*, 2003).

Una modificación interesante al sistema de despliegue en fagos se dió debido al descubrimiento en 1993 (Hammers-Casterman *et al.*, 1993) de una nueva clase de anticuerpos IgG en camelidos. Estos anticuerpos carecen de cadenas ligeras, por lo que son llamados "heavy chain" IgGs o HCAb (heavy-chain antibody; Figura 6). Los HCAbs tienen pesos moleculares de alrededor de 95kDa, a diferencia de los aproximadamente 160kDa de los IgGs convencionales y sus dominios de unión están formados solamente por los dominios variables de cadena pesada denominados V_{HHS} (Figura 6). En estos anticuerpos el primer dominio constante (C_{H1}) es eliminado durante el procesamiento del RNA mensajero y al dominio variable (V_{HH}) le sigue la región de bisagra y los dominios C_{H2} y C_{H3}. A pesar de que los HCAbs carecen de cadenas ligeras poseen un auténtico repertorio de unión a antígeno y comprenden el fragmento más pequeño disponible con capacidad de unión a antígeno con afinidades comparables a los fragmentos scFv (single-chain antibody fragment) y Fab (Fragment antigen binding). Los V_{HHS} se pueden obtener tratando con proteasas HCAbs de camélidos para remover los dominios C_{H2} y C_{H3} o por clonación de genes de V_{HHS} de camélidos resultando V_{HHS} recombinantes.

La utilización de V_{HHS} para el despliegue en fagos es más simple y eficiente en comparación con Fabs o scFvs ya que solo es necesario clonar y expresar un dominio para obtener un fragmento con función de unión a antígeno (Joosten *et al.*, 2003).

Una vez construidas las bibliotecas estas se pueden usar para seleccionar y purificar fagos específicos que contengan secuencias con determinadas características y estudiar las interacciones proteína-ligando, los sitios de unión de receptores y anticuerpos, y para mejorar la afinidad de proteínas por sus ligandos (Azzazy *et al.*, 2002).

Despliegue en fagos de toxinas Cry

El propósito de desplegar en fagos a las toxinas Cry es construir bibliotecas de variantes de entre las que se puedan seleccionar toxinas con actividad incrementada, con diferente especificidad o que maten a los insectos que hayan desarrollado resistencia a las toxinas Cry, sin embargo se ha encontrado que el despliegue de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac en fagos como M13, λ y T7 presenta inconvenientes (Kasman *et al.*, 1998; Vilchez *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2006).

La toxina Cry1Ac desplegada en el fago M13 retuvo actividad tóxica contra larvas de *M. sexta*, sin embargo presentó inespecificidad en la unión *in vitro* a receptores, lo que sugiere posibles defectos en la estructura de la toxina desplegada (Kasman *et al.*, 1998). En otro caso, la toxina Cry1Ac desplegada en el fago λ retuvo la capacidad de unión al receptor APN de *M. sexta* pero su actividad tóxica disminuyó aproximadamente 20 veces (Vilchez *et al.*, 2004) y en un estudio diferente la toxina Cry1Ac desplegada en el fago T7 retuvo la actividad tóxica y la capacidad de unión a receptores (Pacheco *et al.*, 2006) pero una desventaja de los sistemas que utilizan a los fagos λ y T7 es que las partículas virales deben ser empacadas *in vitro* con una eficiencia máxima de entre 10^7 a 10^8 partículas de fagos recombinantes por cada $1\mu\text{g}$ de ADN, lo que impide construir bibliotecas del tamaño de las obtenidas con sistemas que utilizan al fago M13 (10^9 - 10^{12} variantes).

Existen varias razones por las que el despliegue de proteínas puede resultar defectuoso, por ejemplo la proteína puede agregarse en el periplasma o el citoplasma, la proteína puede ser incompatible con el transporte hacia el periplasma o la fusión entre la proteína de fago y la proteína a desplegar puede ser inestable y degradarse.

Respecto a los problemas de agregación y de transporte de las proteínas de fusión hacia el periplasma se ha especulado que el plegamiento prematuro en el citoplasma puede ocasionar agregación o un transporte ineficiente hacia el periplasma y un bajo nivel de despliegue, es decir que los fagos se ensamblen sin la proteína de fusión y la causa se puede atribuir a la vía utilizada para dicho transporte (Stainer *et al.*, 2006).

En bacterias Gram-negativas existen principalmente tres vías de transporte de polipéptidos desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico: la vía Sec que consiste en un complejo enzimático formado por varias proteínas de membrana y transporta polipéptidos de forma post-traduccional a través de la membrana del citoplasma, la vía SRP en la que un complejo formado por RNA y proteínas reconoce a su sustrato que son las preproteínas asociadas aún al ribosoma por la presencia de una señal hidrofóbica y transporta el polipéptido naciente de forma cotraduccional (Fekkes y Driessen, 1999) y la vía Tat que debe su nombre la secuencia de dos argininas (twin-arginine motif, S-R-R-x-F-L-K) en los sustratos que reconoce y cuya principal característica es transportar proteínas plegadas a través de la membrana del citoplasma (Müller, 2004).

La mayoría de los sistemas de despliegue en fagos utilizan el transporte de las proteínas de fusión por la vía Sec, sin embargo esta vía no transporta proteínas que se pliegan en el citoplasma e impide su despliegue, por lo que para resolver este problema se utilizó un péptido señal que dirige a la proteína de fusión hacia la vía SRP, lo que incrementó el despliegue funcional de una manera no relacionada con el aumento de la traducción probando que esta metodología puede ser útil para proteínas difíciles de desplegar (Stainer et al, 2006) (Figura 7).

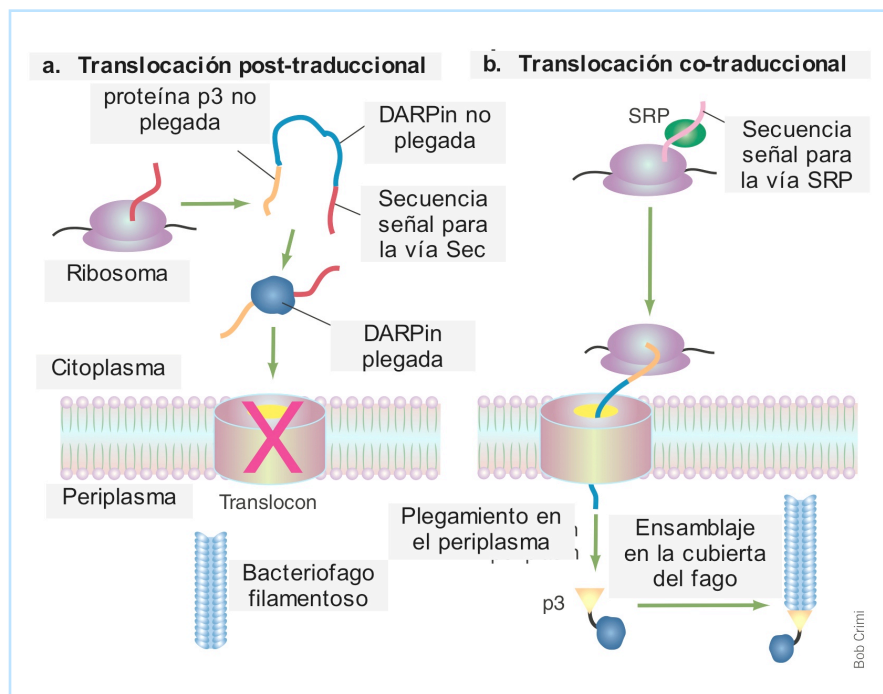


Figura 7. Diferencias entre las vías Sec de translocación post-traduccional (a) y SRP de translocación co-traduccional (b) (de Huber & Beckwith, 2006).

Otro aspecto a considerar para incrementar la eficiencia del despliegue es que en los sistemas en los que se utilizan fagémidos y fagos ayudadores (como el sistema del fago M13) es que la proteína III nativa y la proteína de fusión compiten por la incorporación en los fagos, por lo que se han utilizado fagos modificados que codifican para proteínas III defectuosas, sensibles a proteólisis o mutantes como en el caso de el sistema del fago phaberge.

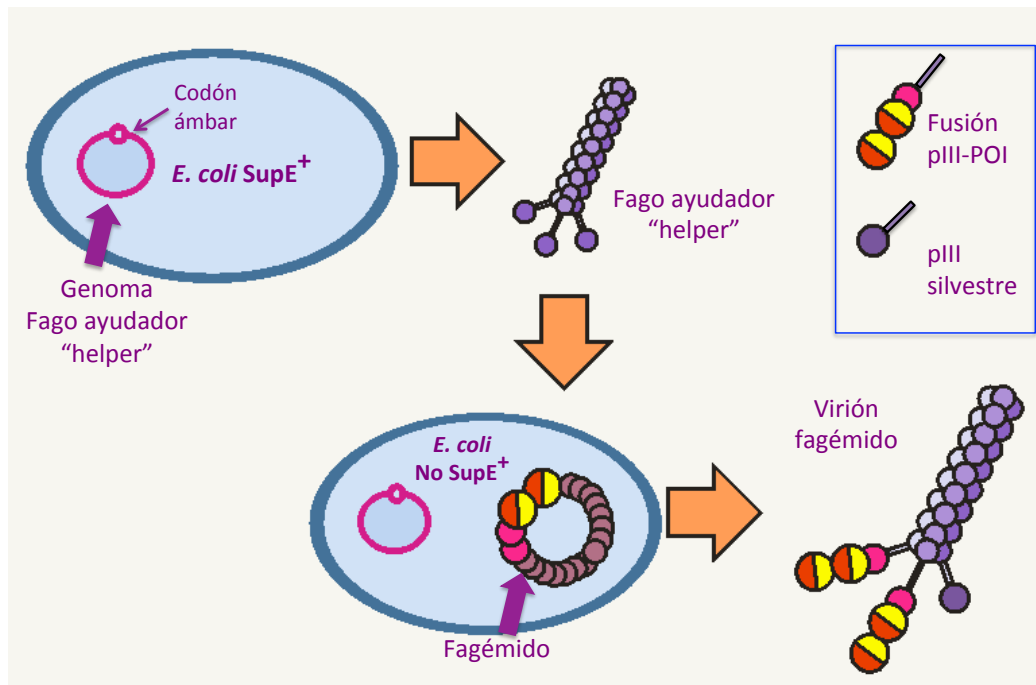


Figura 8. Funcionamiento del fago phaberge. Solo el vector fagémido (y no el helper) codifica para una proteína III funcional que puede ser incorporada en los viriones. (Modificado de Soltes *et al.*, 2003)

El fago phaberge tiene una mutación condicional (codón ámbar) en el gen III que permite la producción de la pIII nativa en una cepa bacteriana supresora ($SupE^+$) manteniendo la infectividad del fago e impide la producción de pIII en una cepa no supresora ($No SupE^+$) que contiene al fagémido, de tal manera que cuando la cepa no supresora es infectada con el ayudador, este producirá las proteínas estructurales excepto pIII, aumentando así la eficiencia del despliegue, ya que toda la pIII producida en la cepa no supresora será la fusión con la proteína de interés (pIII-POI) codificada en el fagémido (Soltes *et al.*, 2003) (Figura 8).

Ya que se ha probado que las toxinas Cry resultan difíciles de desplegar en fagos conservando sus características como actividad biológica y unión a receptores, en el presente trabajo se analiza si la utilización la vía SRP para el transporte de la proteína de fusión y del fago phaberge son suficientes para desplegar a la toxina Cry3Aa en la cápside del fago M13.

Hipótesis

Utilizar el sistema de translocación de proteínas por la vía SRP y un fago ayudador tipo Phaberge, permite desplegar en su conformación funcional a la toxina Cry3Aa en el fago filamentoso M13.

Objetivo general

Desplegar la toxina Cry3Aa en su forma funcional en la cápside del fago M13.

Objetivos particulares

1. Generar un suero policlonal capaz de detectar a la toxina Cry3Aa.
2. Clonar el gen de la toxina Cry3Aa en un vector fagémido.
3. Desplegar la toxina Cry3Aa en la cápside del fago M13.
4. Comparar el nivel de despliegue obtenido utilizando el fagémido que contiene la secuencia señal para la vía Sec contra el que contiene la secuencia para la vía SRP.
5. Comparar el nivel de despliegue obtenido con el fago phaberge contra el fago VCSM13.
6. Analizar la funcionalidad de la toxina Cry3Aa desplegada.
7. Buscar un anticuerpo que mimetice al receptor de la toxina Cry3Aa mediante el tamizaje de una biblioteca de anticuerpos de llama desplegados en fagos.

Materiales y métodos

Cepas y vectores utilizados

Bacillus thuringiensis variedad *tenebrionis* que contiene al gen *cry3Aa* para producir la toxina Cry3Aa.

Escherichia coli DH5 α *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA* *glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*. Posee una alta eficiencia de transformación.

Escherichia coli MRF' Δ ((*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac*. Esta cepa fue producida para permitir la clonación de ADN metilado con alta eficiencia y representación.

Escherichia coli HB2151 Cepa no supresora para expresión in vivo de proteínas unidas a Myc -tag. Comúnmente utilizada en despliegue en fagos.

Bacteriofago VCSM13 bacteriofago de Stratagen derivado del bacteriofago M13.

Bacteriofago Phaberge derivado del fago M13, posee un codón ambar al inicio del gen *pIII*.

TOPO-3Aa. Plásmido derivado de pCR[®]2.1TOPO[®] en el que se clonó el gen que codifica para la toxina Cry3Aa.

pCANTAB 5E/PelB-Cry1Ac-pIII. Fagémido derivado del pCANTAB5E que contiene al gen que codifica para la toxina Cry1Ac en fusión con el gen de la proteína III del fago M13 separados por un sitio de corte para la enzima tripsina. Antes de la región que codifica para la fusión entre la toxina y la pIII está la secuencia del péptido señal PelB que permite la translocación de la proteína de fusión al periplasma de la célula y después de la fusión se encuentra un E-tag y un codón ámbar. Contiene los orígenes de replicación de la bacteria *Escherichia coli* y el fago filamentoso M13 y el gen de resistencia a ampicilina.

pCADS. Fagémido derivado del pCANTAB 5E/PelB-Cry1Ac-pIII. Antes de la secuencia que codifica para la fusión entre la toxina y la pIII está la secuencia del péptido señal DsbA que permite la translocación de la proteína de fusión al periplasma de la célula.

pCANTAB3A. Fagémido derivado del pCADS que contiene al gen que codifica para la toxina Cry3Aa en fusión con la el gen de la proteína III del fago M13 separados por un sitio de corte para la enzima tripsina. Antes de la fusión toxina-pIII se encuentra la secuencia del péptido señal PelB que permite la translocación de la fusión 3Aa-pIII al periplasma de la célula. El codón ambar ubicado inmediatamente después del gen de la toxina Cry1Ac en pCADS se eliminó en este fagémido.

pCADS3A. Fagémido derivado del pCADS que contiene al gen que codifica para la toxina Cry3Aa en fusión con la el gen de la proteína III del fago M13 separados por un sitio de corte para la enzima tripsina. Antes de la fusión toxina-pIII se encuentra el péptido señal DsbA que permite la translocación de la fusión al periplasma de la célula por medio de la vía SRP. El codón ambar ubicado después de la toxina Cry1Ac en pCADS se eliminó.

pCADS-Cyt1A. Fagémido derivado del pCADS que contiene al gen que codifica para la toxina Cyt1A en fusión con la el gen de la proteína III del fago M13 separados por un sitio de corte para la enzima tripsina. Antes de la fusión toxina-pIII se encuentra el péptido señal DsbA que permite la translocación de la fusión al periplasma de la célula por medio de la vía SRP. El codón ámbar ubicado después de la toxina Cry1Ac en pCADS se eliminó.

Purificación de la toxina Cry3Aa

Para la obtención de cristales de la toxina Cry3Aa se creció la cepa *Bacillus thuringiensis* variedad *tenebrionis* en medio SP hasta alcanzar la esporulación del cultivo (aproximadamente 72 horas). El cultivo se recuperó y se lavó con solución TET (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, Tritón 0.05%, pH 7.5), se resuspendió en amortiguador TTN (Tris 20mM, NaCl 300mM, Tritón X-100 0.1%, pH 7.2) y se sonicó tres veces a 20W durante 1 minuto cada una con 1 minuto a -20°C entre ellas, después de lo cual se separaron las inclusiones cristalinas de los restos celulares mediante centrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa al 84%, 74%, 72% y 67% (w/v). La banda correspondiente a los cristales se recuperó y lavó con amortiguador TET.

Los cristales se solubilizaron en amortiguador alcalino (50mM Na₂CO₃, pH 10.2) a 37°C por 12 horas y la concentración de se midió por el método de Bradford utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Para obtener a la toxina en su forma activa el pH del sobrenadante anterior se ajustó a 9.0 con 50mM de Tris-HCl pH 8 y la protoxina se digirió con quimotripsina (Sigma) en una proporción 2:1 w/w enzima:sustrato durante 12 horas a 37°C. La digestión se detuvo por adición de PMSF hasta una concentración final de 1mM y el producto de la digestión se analizó en geles de acrilamida-SDS al 10%.

Obtención del suero policlonal anti-Cry3Aa.

Se inmunizó a un conejo de la variedad Nueva Zelanda por vía subcutánea con la toxina Cry3Aa obtenida después del proceso de solubilización y activación con quimotripsina. Se realizaron tres inmunizaciones con intervalos de 15 días con 1 mg de la toxina activada mezclada con adyuvante incompleto. Aproximadamente una semana después de la tercera inmunización se extrajo la sangre del conejo y el suero se separó de las células mediante centrifugación, se tituló y almacenó a -20°C hasta su utilización.

Aislamiento del gen de la toxina Cry3Aa

El gen que codifica para la toxina Cry3Aa se aisló mediante amplificación del ADN total obtenido de la cepa *Bacillus thuringiensis* variedad *tenebrionis*. Para extraer el ADN total utilizado como templado se tomó una asada de una caja de cultivo de *Bt tenebrionis* y se resuspendió en 50µL de agua, la suspensión se mezcló y se sometió a congelación a -70°C por 20 minutos seguida de una incubación en agua en ebullición por 5 minutos. La mezcla de PCR consistió de 5µL de buffer, 5µL de MgCl₂, 20pmol del iniciador 3Aup: GAG AGA GAG AGA GAG AGA GAG GCC CAG CCG GCC AAA GAT GTC ATT CAA AAA GGC, que introdujo el sitio de restricción *Sfi*I (región subrayada), 20pmol del iniciador 3Alo: GAG AGA GAG AGA GAG AGA GAG CCG CCG CAT TCA CTG GAA TAA ATT CAA TTT TGT C con el que se introdujo el sitio de restricción *Not*I (región subrayada), 5µL de dNTPs (10mM c/u), 2µL de templado, 2.5U de Taq ADN polimerasa (todos los reactivos de Altaenzymes) y se ajustó a un volumen de 50µL con agua. El ciclo de PCR inició con una desnaturalización de 94°C por 3 minutos seguido de 30

ciclos consistentes en 94°C 1 minuto; 55°C 1 minuto; 72°C 1.45 minutos y los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. Una vez aislado, el gen se clonó en el vector pCR®2.1TOPO® (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante dando lugar a la construcción TOPO-3Aa.

Construcción de vectores pCANTAB3A y pCADS3A

pCANTAB3A

La construcción TOPO-3A que contiene al gen de la toxina Cry3Aa, y el fagémido pCANTAB 5E/PelB-Cry1Ac-pIII se digirieron inicialmente con la enzima *SfiI*, mezclando 30µL de ADN, 5µL de buffer 2, 5µL de albúmina sérica bovina (BSA 10x) y 50U de enzima *SfiI* (Todos los reactivos de New England Biolabs) en un volumen total de 50µL. Se incubó a 50°C por 3 horas y los fragmentos resultantes se purificaron con el kit MinElute™ PCR purification de QIAGEN para limpieza de productos de PCR obteniendo un volumen de 30µL. Los vectores cortados con *SfiI* se digirieron con la enzima *NotI* mezclando 5µL de BSA 10x, 5µL de buffer 3 y 25U de enzima *NotI* (NEB), se incubaron por 5 horas a 37°C y se resolvieron en un gel de agarosa al 1%. Del gel se cortaron las bandas correspondientes al gen de la toxina Cry3Aa obtenida del vector TOPO3A y el vector sin la toxina Cry1Ac obtenido del la construcción pCANTAB 5E/PelB-Cry1Ac-pIII y se limpiaron con el kit MinElute™ Gel extraction de QIAGEN.

El gen de la toxina Cry3Aa y el vector pCANTAB 5E/PelB-Cry1Ac-pIII sin la toxina Cry1Ac se cuantificaron en un gel de agarosa al 1% y se mezclaron aproximadamente 50ng del vector con aproximadamente 40ng del gen de la toxina Cry3Aa, 5µL de buffer de ligación 10x y 20U de T4 ADN ligasa (Fermentas) en un volumen total de 50µL. La mezcla se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y el ADN se purificó con el kit para limpieza de productos de PCR (QIAGEN) y se utilizó para transformar células de *E coli* DH5α electrocompetentes.

Finalmente el codón ámbar presente en el vector pCANTAB5E/PelB-Cry1Ac-pIII se eliminó mediante una mutación puntual realizando el cambio T4150-C mediante el kit Quick Change de Stratagen siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez confirmada la presencia del gen de Cry3Aa en el vector y la eliminación del codón ámbar mediante secuenciación, el fagémido pCADS3A se utilizó para transformar células competentes de calcio de la cepa no supresora de *E. coli* HB2151.

pCADS3A

El gen de la toxina Cry3Aa se clonó en el vector pCADS siguiendo el mismo procedimiento seguido para la construcción del vector pCANTAB3A resultando un nuevo vector que tiene la secuencia señal DsbA seguida del gen de la toxina Cry3Aa en fusión con el gel de la proteína III del fago M13. Finalmente se realizó una mutación puntual como en el caso anterior para eliminar el codón ambar de este fagémido. Una vez la secuencia fue confirmada el vector se transformó en la cepa de *E. coli* HB2151

Producción y purificación de fagos ayudadores.

Para obtener a los fagos ayudadores, 5mL de un cultivo de las bacterias XL1-Blue MRF' ó HB2151 se incubaron hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 medida a 600nm, se infectaron con un exceso de fagos 1:20 bacterias:fagos de las cepas de fagos VCSM13 (Invitrogen) ó Phaberge (Soltes *et. al.*, 2003) respectivamente. Los cultivos se incubaron a 37°C sin agitación durante 30 minutos y con agitación por 30 minutos a la misma temperatura, las células se recuperaron por centrifugación a 5,000rpm durante 10 minutos, se resuspendieron en 50mL de medio 2xTY conteniendo 15µg/mL de tetraciclina y 70µg/mL de kanamicina en el caso de XL1-Blue-M13 y solo 70µg/mL de kanamicina en el caso de HB2151-Phaberge . Los cultivos infectados se incubaron durante 12-14 horas a 30°C al cabo de las cuales se recuperaron los sobrenadantes por centrifugación a 8,000rpm durante 10 minutos, se les agregó 1/5 de volumen de Polietilenglicol-NaCl y se precipitaron durante 12 horas a 4°C. El precipitado se recuperó mediante centrifugación a 8,000 rpm durante 40 minutos a 4°C, se resuspendió en 500 - 1,000µL de PBS 1X y se incubó a 70°C por 20 minutos. Los fagos solubilizados se filtraron a través de una membrana con poros de 0.45µm, al filtrado se adicionó glicerol al 80% hasta una concentración final de 15% de glicerol en volumen y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Titulación de fagos ayudadores por unidades formadoras de placas

Para titular a los fagos ayudadores M13 y Phaberge primero se realizaron diluciones seriadas. Se tomaron 10µL de la muestra inicial y se diluyeron en 990µL de medio LB, se tomaron 10µL de esta nueva solución, se diluyeron en 990µL de medio LB y así sucesivamente hasta alcanzar un factor de dilución de 10⁻¹². Con una gota de 10µL de las últimas tres o cuatro diluciones se infectó por triplicado de cada dilución a un césped de células de *E. coli* XL1-Blue MRF' o HB2151.

Para formar el césped de células, la cepa se creció hasta una densidad óptica de 0.6 medida a 600nm, cuando alcanzó la densidad óptica se agregaron 300µL del cultivo a 3.5mL de medio TOP-Agarosa (Bacto triptona 10mg/mL, extracto de levadura 5mg/mL, NaCl 5mg/mL, agarosa 6mg/mL) y la mezcla se decantó sobre una caja de Petri con medio LB sólido sin antibiótico. Se determinó el título de fagos contando la cantidad de placas de crecimiento retardado en cada gota de cada dilución de fagos y utilizando la relación:

$$\text{Ufp/mL} = (\text{Numero de placas/mL}) * (\text{factor de dilución})$$

Ensayos de despliegue de la toxina Cry3Aa

Un volumen de 5mL de medio 2xTY-Ampicilina (100µg/mL)-Glucosa 2% se inoculó con 50µL de un cultivo de células que contenían al fagémido y se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 leída a 600nm, se adicionó el fago ayudador phaberge ó M13 a una razón de 1:20 (células:fagos) y se incubó durante 30 minutos a 37°C sin agitación y 30 minutos a 37°C con agitación. El cultivo se centrifugó a 4,000rpm durante 10 minutos para separar las células del medio de cultivo, el sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en 50mL de medio 2xTY con ampicilina (100µg/mL) y kanamincina (50µg/mL) y el nuevo cultivo se incubó a 30°C con agitación durante 12-14 horas. Los fagos se purificaron de igual manera que los fagos ayudadores y posteriormente se titularon por conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc).

Para obtener el número de ufc se realizaron diluciones sucesivas de la siguiente manera: se agregaron 10µL de la solución de fagos a 990µL de medio LB, se mezclaron y se transfirieron 10µL de esta solución a 990 µL de medio LB y así sucesivamente hasta alcanzar una dilución de 1×10^{-12} . De las últimas tres o cuatro diluciones se tomaron 10µL, se agregaron a 990µL de un cultivo de XL1-Blue MRF' a una densidad óptica de 0.6 leída a 600nm (para el cálculo final se consideró esta dilución, es decir, 10^{-2} sería 10^{-4}) y las células con fagos se incubaron durante 30 minutos a 37°C sin agitación y 30 minutos a la misma temperatura con agitación. Se tomaron 10µL de cada cultivo, se sembraron por triplicado en forma de gota en una caja de Petri con medio LB sólido adicionado con 100µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 12 horas. Al cabo de la incubación se contaron las colonias y se obtuvo el número de transformantes con la relación:

$$\text{Ufc/mL} = (\text{Numero de colonias/mL}) * (\text{factor de dilusión})$$

Western blot

Para detectar la presencia de la proteína de fusión pIII-Cry3Aa se resolvieron 25-30µL de la solución de fagos desplegando la toxina en un gel de acrilamida SDS al 8% y se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon de Millipore). La membrana se bloqueó durante 1 hora con una solución al 5% de leche descremada disuelta en amortiguador de fosfatos con Tween 20 al 0.1% (PBST), una vez bloqueada se incubó con una solución 1:8,000 del suero anti-Cry3Aa en PBST con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% durante 1 hora, se incubó con una solución 1:20,000 del anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa en PBST y se reveló con luminol Visualizer de Millipore.

Rescate de biblioteca de anticuerpos de llama desplegada en fagos

Se inocularon volúmenes de 50mL de medio 2xTY adicionado con 200µg/mL de ampicilina, 15µg/mL de tetraciclina y 1% de glucosa con 50µL de la biblioteca de anticuerpos, se incubaron a 37°C/250rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.7 medida a 600nm y se infectaron con el fago ayudador M13 a una relación 1:20 (bacterias:fagos). La mezcla de bacterias y fagos se incubó a 37°C sin agitación por 45 minutos y después a 37°C con una agitación de 250rpm por 45 minutos. Las células infectadas se recuperaron por centrifugación a 2,500g por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en aproximadamente 20mL de medio 2xTY con 200µg/mL de ampicilina, 5µg/mL de tetraciclina, 70µg/mL de kanamicina, se separaron en 2 matraces con 100mL de medio cada uno y se incubaron durante aproximadamente 12 horas a 30°C con agitación. Para recuperar los fagos, los cultivos se centrifugaron a 8,500g por 10 minutos a 4°C, los sobrenadantes se recuperaron, se les agregó 1/5 de volumen de PEG-NaCl y se incubaron durante 12-14 horas a 4°C. El precipitado se centrifugó a 8,500g por 40 minutos a 4°C y el sobrenadante se desechó. La pastilla resultante se solubilizó en PBS 1x (30% del volumen de PEG inicial), se le agregó PEG (15% del volumen total obtenido) e incubó por 4h a 4°C. La mezcla se centrifugó a 8,500 g por 40 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla resultante se resuspendió en 10mL de PBS 1X, se incubó a 70°C por 20 minutos y se centrifugó a 1,300g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante, se tituló y utilizó en la selección de la biblioteca.

Tamizaje de la biblioteca

Se inmovilizaron 100ng de proteína en un inmunotubo durante 12 horas a 4°C después de lo cual se retiró el excedente mediante tres lavados con PBS 1x. Para disminuir uniones inespecíficas se saturó el inmunotubo con leche descremada al 1% por 2 horas a 4°C y se retiró el excedente con tres lavados con PBS 1x. Al inmunotubo tratado de la manera antes descrita se le agregaron 1×10^{11} unidades de fagos desplegando los anticuerpos en 500µL de PBS 1X, se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación y 90 minutos sin agitación, el sobrenadante se desechó, y el tubo se lavó 20 veces con PBS-Tween 0.1% y 20 veces con PBS 1x.

Se agregó 1 mL de bacterias *E. coli* XL1-Blue crecidas a hasta una densidad óptica de 0.7-1.0 medida a 600nm para infectar con los fagos unidos al tubo y se incubó a 37°C por 30 minutos sin agitación y por 30 minutos a 37°C con agitación.

Se sembraron 1µL y 100µL del cultivo total en cajas con 2xTY adicionado con 200µg/mL de ampicilina, 15µg/mL de tetraciclina y 1% de glucosa para obtener el título de salida de la selección y se sembró el resto del cultivo en dos cajas de 20 x 20cm con el mismo medio. Después de incubar durante 12 horas se recuperaron las células, se resuspendieron en 2mL de 2xTY con 200µg/mL de ampicilina, 15µg/mL de tetraciclina y glicerol al 15% y se almacenaron -70°C hasta su uso.

ELISA monoclonal

En cajas de cultivo de 96 pozos se colocaron 100µL de medio 2xTY con 100µg/mL de ampicilina y glucosa al 1%, cada pozo se inoculó con una de las clonas obtenidas de la selección y las cajas se incubaron durante 12 horas. 200µL de medio fresco con la misma composición antes mencionada se inocularon con 2µL del precultivo de pozos de ELISA, los cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante 1 hora, se les agregaron 25µL de una solución de 1×10^9 pfu's de fagos M13 en medio 2xTY y se incubaron durante 30 minutos sin agitación a 37°C y 1 hora a la misma temperatura con agitación. El paquete celular se recuperó por centrifugación durante 10 minutos a 1800g y el sobrenadante se desechó. Las células se resuspendieron en 200µL de 2xTY y se incubaron durante 12 horas a 30 °C con agitación.

Previamente, se adhirieron aproximadamente 2µg de la toxina Cry3Aa en los pozos de una placa de ELISA durante 12 horas a 4°C. Los pozos se lavaron 3 veces con PBS 1x y se bloquearon con 200µL de PBS-leche al 2% durante 2 horas a 37°C, se lavaron 3 veces con PBS 1x,

se les agregó 50 μ L del sobrenadante de cultivo de fagos y 50 μ L de PBS-Tween (0.5%) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron incubaciones de 1 hora con el anticuerpo anti-M13 (dilución 1:5,000 en PBST) y con el anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa (1:10,000) (Sta. Cruz Biotechnology) y finalmente la unión se reveló con 100 μ L de una solución del reactivo orto feenil diamina (OPD, Sigma) en buffer de fosfato de sodio (0.1M, pH 5), la reacción se detuvo con 50 μ L de H₂SO₄ 1N y se tomaron las lecturas de la absorbancia a 490 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de un suero anti-Cry3Aa

Las toxinas Cry se producen como inclusiones parasporales constituidas de cristales de proteínas, para ejercer su actividad tóxica los cristales se solubilizan y la protoxina soluble se activa cuando las proteasas de los intestinos de los insectos le remueven los extremos de las regiones amino y carboxilo.

La activación *in vivo* de la forma soluble de 67kDa de la toxina Cry3Aa por las proteasas del intestino de las larvas de *L. decemlineata* genera fragmentos de 55 y 49 kDa y polipéptidos de 11 y 8kDa, aparentemente los fragmentos de 55 y 49kDa son los responsables del efecto tóxico (Carroll *et. al.*, 1997). La toxina Cry3Aa activada *in vitro* con la proteasa quimotripsina se considera como la más parecida a la forma activa obtenida *in vivo* ya que se demostró que el fragmento de 49kDa que genera retiene actividad tóxica contra larvas de *L. decemlineata* y actividad de formación de poro en vesículas de membrana de la microvellosidad apical de intestinos del mismo insecto (Rausell *et. al.*, 2004).

La quimotripsina genera un fragmento de 49kDa y péptidos asociados de 11 y 8kDa que no pueden ser separados mediante cromatografía de intercambio iónico y solo se separan en geles de acrilamida desnaturizantes (Carroll y Ellar, 1989), aparentemente la activación con quimotripsina procede vía un intermediario de 55kDa que permanece en la mezcla como remanente de una activación incompleta.

El presente trabajo se enfocó en el despliegue de la forma activa de la toxina Cry3Aa y dado que no se contaba con ningún anticuerpo para detectarla fue necesaria la producción de un suero capaz de detectar esta forma de la toxina. Con este propósito se inmunizó a un conejo de la variedad Nueva Zelanda con la toxina previamente activada según la metodología descrita en materiales y métodos.

El suero se recuperó después de verificar que era capaz de reconocer a la toxina Cry3Aa. Para titularlo se resolvió a la forma activa de la toxina Cry3Aa en un gel preparativo y se utilizaron diluciones seriadas del suero para realizar un ensayo de Western blot el cual mostró un claro reconocimiento de la toxina activa y de la protoxina remanente de una activación incompleta al utilizar una dilución 1:20,000 (Figura 9). El suero es capaz de detectar tanto a la toxina como a la protoxina ya que las regiones removidas de la protoxina durante la activación son muy pequeñas, lo que permite que la mayoría de los epítopes reconocidos puedan encontrarse en las dos formas de la toxina.

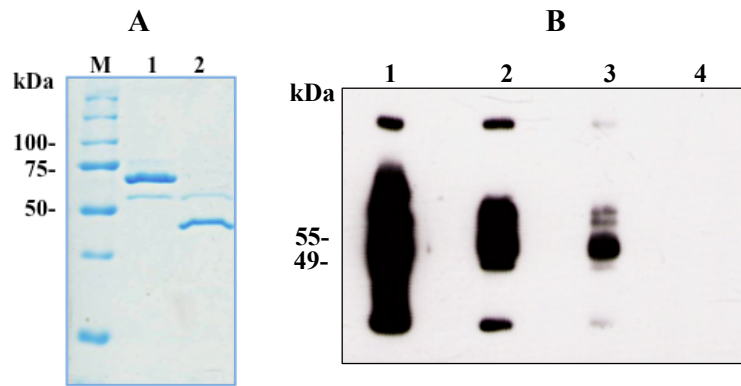


Figura 9. A. Después de la purificación de los cristales de protoxina Cry3Aa y su solubilización en buffer de carbonatos la proteína resultante de aproximadamente 67kDa se resolvió en un gel al 10% de acrilamida-SDS (1). La protoxina soluble se activo mediante digestión con quimotripsina en una proporción 2:1 proteasa:protoxina resultando en un fragmento mayoritario de 49 kDa y uno minoritario de 55 kDa (2). B) Para titular el suero policlonal anti-Cry3Aa se resolvieron 10 µg de la toxina activada en un gel preparativo de acrilamida al 8%, se transfirió a una membrana de PVDF y se realizó un ensayo de Western blot utilizando como anticuerpo diluciones seriadas del suero obtenido con el orden: 1. 1:5,000, 2. 1:10,000, 3. 1:20,000, 4. 1:40,000.

Para comprobar la especificidad del suero para reconocer a la toxina Cry3Aa en ensayos de Western blot se probó si era capaz de detectar a la toxina Cry1Ab que es específica contra insectos lepidópteros y con la que la toxina Cry3Aa comparte aproximadamente un 36% de identidad de secuencia y si detectaba a la quimotripsina que fue utilizada para producir la forma activa de la toxina Cry3Aa. Se utilizó la dilución 1:20,000 y no se detectó reconocimiento de la toxina Cry1Ab ni de la quimotripsina mientras que tanto la protoxina y la toxina activada Cry3Aa fueron claramente detectadas (Figura 10).

Construcción de fagémidos para el despliegue de la toxina Cry3Aa.

Aislamiento del gen de la toxina Cry3Aa

Para aislar al gen de la toxina Cry3Aa se extrajo ADN genómico de la bacteria *Bacillus thuringiensis* variedad *tenebrionis* el cual se utilizó como templado para amplificar el gen con los iniciadores 3Aup y 3Alow que contienen sitios de restricción para las enzimas *SfiI* y *NotI*. El producto de PCR de 1.8kb (Figura 13 A) así obtenido se purificó con el kit MinElute™ PCR purificación de QIAGEN y se insertó en el vector pCR®2.1TOPO® de Invitrogen.

Con la construcción denominada TOPO-3A se transformaron células electrocompetentes de la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* y la inserción se probó inicialmente por PCR de colonia utilizando los iniciadores 3Aup y 3Alow. Se purificó el ADN de los plásmidos de las colonias en las que se detectó el fragmento de 1.8kb utilizando el kit QUIAPrep Spin de QIAGEN (Figura 11 A) y se analizó por restricción con la enzima *EcoRI*, obteniéndose el patrón de restricción esperado compuesto de los fragmentos de 3,900, 237, 832 y 675pb (Figura 11 B).

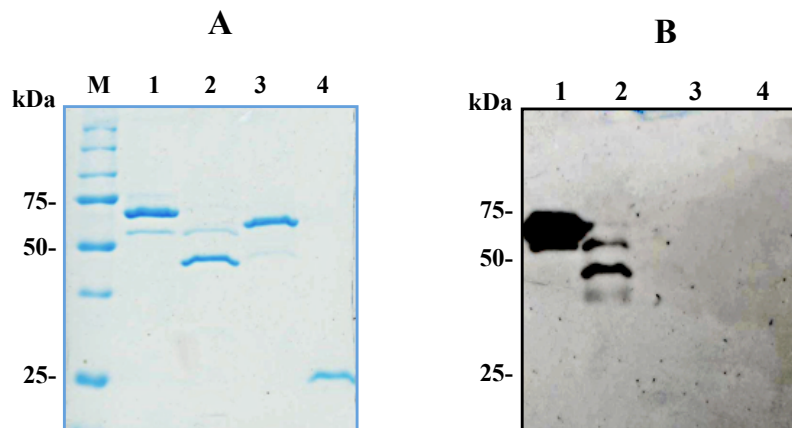


Figura 10. Prueba de especificidad del suero anti-Cry3Aa. A) La protoxina (carril 1) y la toxina Cry3Aa (carril 2), así como la toxina Cry1Ab (carril 3) y la proteasa quimotripsina (carril 4) se resolvieron en un gel al 10% de acrilamida-SDS y se tiñó con colorante azul de Coomassie. B. Se resolvieron las mismas proteínas que en A, se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó un Western blot según lo especificado en materiales y métodos utilizando el suero anti-Cry3Aa producido en el presente trabajo diluido en una proporción 1:10,000 en PBST 0.1%.

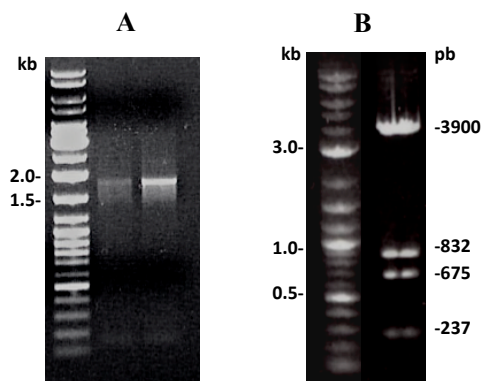


Figura 11. Aislamiento y clonación del gen de la toxina Cry3Aa. A. El aislamiento del gen de la toxina Cry3Aa de aproximadamente 1.8kb se realizó mediante PCR y se comprobó resolviendo los productos de la reacción en gel de agarosa al 1%. B. La clonación del gen de la toxina Cry3A en el vector TOPO se probó inicialmente por digestión de la construcción con la enzima *EcoRI*.

Construcción de fagémidos

Para evaluar el efecto de la vía de translocación de proteínas al periplasma de la célula sobre el despliegue de la toxina Cry3Aa se utilizaron dos fagémidos, el vector pCADS3A que contiene el péptido señal DsbA que dirige la translocación hacia la vía SRP y el vector pCANTAB3A que contiene el péptido señal PelB que dirige la translocación hacia la vía Sec (Tabla 1, Figura 12).

Tabla 1. Resumen de los fagémidos utilizados.

Construcción	Péptido señal	Toxina	Codón ámbar
pCANTAB5E/PelB/	PelB	Cry1Ac	sí
pCANTAB3A	PelB	Cry3Aa	no
pCADS	DsbA	Cry1Ac	sí
pCADS3A	DsbA	Cry3Aa	no

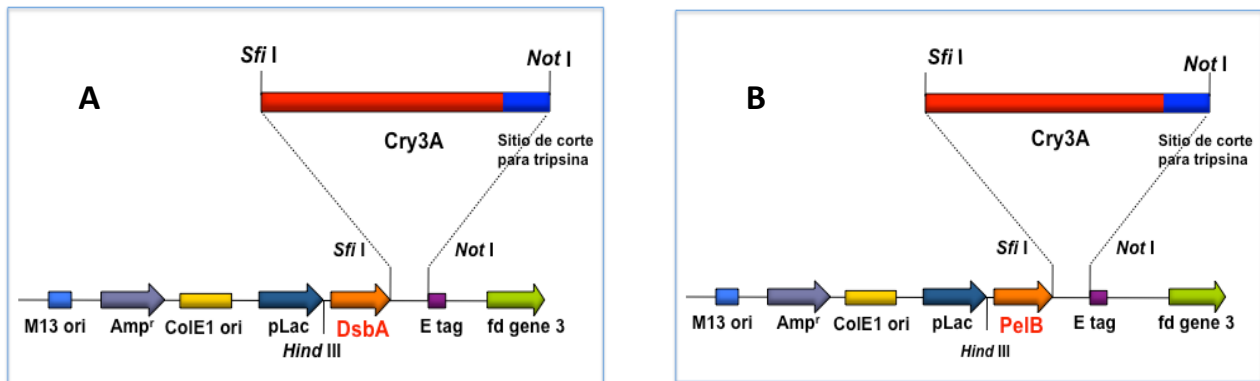


Figura 12. Vectores fagémidos utilizados para el despliegue de la toxina Cry3Aa en la cápside del fago M13. El vector pCADS3A contiene al péptido señal DsbA que dirige a las proteínas hacia la vía SRP de translocación precediendo a la toxina Cry3Aa (A) y el vector pCANTAB3A posee al péptido señal PelB para la vía Sec de translocación (B).

Para construir el vector denominado pCADS3A que contiene la secuencia señal DsbA precedida por el gen de la toxina Cry3Aa que se encuentra en fusión con el gen de la proteína III del fago M13 se partió del vector denominado pCADS (materiales y métodos) que contiene al gen de la toxina Cry1Ac en fusión con la pIII del fago.

El gen de la toxina Cry1Ac se separó del vector mediante digestión con las enzimas *SfiI* y *NotI* lo que generó fragmentos de aproximadamente 4.5kb y 1.8kb correspondientes al vector con la secuencia señal y al gen de la toxina Cry1Ac respectivamente. Para obtener el gen de la toxina Cry3Aa se digirió al vector TOPO-3A con las enzimas anteriores lo que resultó en fragmentos de aproximadamente 3.9 y 1.8kb correspondientes al vector y al gen de la toxina Cry3Aa.

El vector pCADS sin el gen de Cry1Ac y el gen de la toxina Cry3Aa se purificaron, se cuantificaron en gel de agarosa (Figura 13 A) y ligaron para posteriormente transformar células electrocompetentes de la cepa DH5- α de *E. coli* con el producto de ligación resultante.

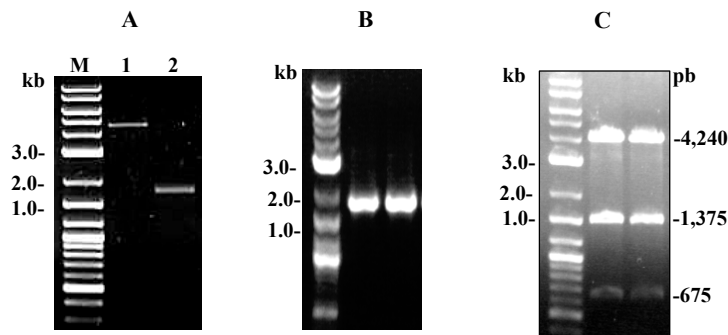


Figura 13. Construcción del vector fagémido pCADS3A. A) Los productos resultantes de la digestión de los vectores pCADS y TOPO-3A con las enzimas *SfiI* y *NotI*, el vector sin la toxina Cry1Ac (carril 1) y el gen de la toxina Cry3Aa (carril 2) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. B) La presencia del gen de la toxina Cry3Aa en el vector pCAD se verificó mediante PCR. C) La clonación del gen de la toxina Cry3Aa también se probó por digestión con la enzima *EcoRI*.

La inserción se confirmó inicialmente por PCR de colonia y dos de las clonas en las que se detectó el inserto de 1.8kb (Figura 13 B) se analizaron por restricción con la enzima *EcoRI*. Una vez que se comprobó que los plásmidos digeridos generaban el patrón consistente en los fragmentos de 4,240, 1,375 y 675pb (Figura 13 C) el ADN de estas clonas se secuenció con los iniciadores 3Aup y 3Alow comprobando que la secuencia era la correcta.

Por último, debido a que el vector pCADS contiene un codón ámbar que se mantuvo en la anterior construcción como el codón 602-ámbar, y ya que este impediría la traducción de la proteína de fusión en una cepa no supresora, se eliminó por medio de una mutación puntual utilizando el kit QuikChange de Stratagene. El cambio de base (T 4150 - C) y la presencia de la secuencia señal DsbA precediendo al gen de Cry3Aa se comprobó por secuenciación con los iniciadores externos JKS2 (TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC) y AW1 (GAA TTT TCT GTA TGA GG) y la construcción resultante se denominó pCADS3A (Figura 12).

De manera similar a la construcción antes descrita, el vector pCANTAB 5E/PelB-Cry1Ac-pIII (Materiales y métodos) se digirió con las enzimas *Sfi*I y *Not*I para liberar al gen de la toxina Cry1Ac en cuyo lugar se insertó el gen de la toxina Cry3Aa procedente de la digestión del vector TOPO-3A. La inserción se probó inicialmente por PCR de colonia y en dos de las colonias en las que se detectó el fragmento de 1.8kb se comprobó la presencia del gen de Cry3Aa y de la secuencia señal PelB mediante secuenciación con los iniciadores externos JKS2 y AW1. El codón ámbar presente en el vector pCANTAB5E se eliminó mediante mutagénesis sitio dirigida para que los dos fagémidos pudieran expresarse en la cepa no supresora HB2151 de *E. coli* dando lugar a la construcción pCANTAB3A (Figura 12).

Ensayos de despliegue de la toxina Cry3Aa

Análisis del efecto de la cepa de *E. coli* y del fagémido

Para evaluar en primer lugar la capacidad del fagémido para desplegar la toxina Cry3Aa se utilizó al fago ayudador phaberge para infectar a dos cepas de *E. coli*, XL1-Blue MRF' que es una cepa supresora y cuya maquinaria de traducción no reconoce al codón ámbar del fago phaberge como un codón de paro y por otra parte a la cepa HB2151 que en oposición con la primera es no supresora por lo que traduce al codón ámbar como una señal de paro y por lo tanto no permite la producción de la proteína III del fago ayudador phaberge. Para este ensayo las cepas de *E. coli* solamente contenían al vector pCADS3A y el resultado indicaría por una parte si utilizando este vector era posible el despliegue de la toxina Cry3Aa y por otra parte cuál era la cepa de *E. coli* idónea para realizar el despliegue.

Las dos cepas conteniendo al vector pCADS se cultivaron inicialmente en medio 2xTY conteniendo ampicilina y cuando alcanzaron una densidad óptica de 0.6 medida a 600nm se infectaron con el fago phaberge. El cultivo infectado se utilizó como inóculo para iniciar un nuevo cultivo en medio 2xTY conteniendo ampicilina y kanamicina, este cultivo se incubó a 30°C durante aproximadamente 12 horas al cabo de las cuales los fagos producidos se recuperaron mediante precipitación con polietilenglicol-NaCl. Los fagos purificados se titularon y cantidades equivalentes de estos se analizaron resolviéndolas en un gel de acrilamida, las proteínas resueltas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF y esta se analizó mediante un ensayo de Western blot utilizando el suero anti-Cry3Aa.

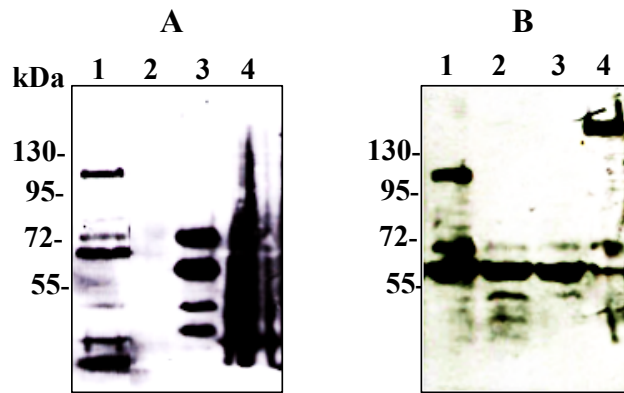


Figura 14. La toxina Cry3Aa puede desplegarse utilizando la cepa HB2151 pero no la cepa XL1-Blue. Los fagos se resolvieron en un gel al 8% de acrilamida-SDS, según el orden: A) HB2151/pCADS3A (carril 1), fago phaberge (carril 2), toxina Cry3Aa (carril 3), XL1-Blue/pCADS3Aa (carril 4). B) HB2151/pCADS3A (carril 1), HB2151/pCAD-prototoxina Cyt1A (carril 2), HB2151 sin vector (carril 3), fago phaberge (carril 4), se transfirieron a PVDF y se analizaron por Western blot. La banda ubicada entre 95 y 130kDa en los carriles A1 y B1 corresponde a la talla esperada de la proteína de fusión pIII-Cry3Aa de aproximadamente 110kDa.

La figura 14 muestra el resultado de este experimento, se observa una banda de peso superior a los 100kDa, en el carril que corresponde a la condición en la que se utilizó la cepa HB2151 (A1, B1) y que no es visible en el carril correspondiente a la cepa XL1-Blue (A4). La banda es consistente con el peso molecular esperado para la fusión de aproximadamente 110kDa entre la toxina Cry3Aa y la proteína III del fago lo que indicó en primer lugar que el fagémido es capaz de producir dicha fusión y por otra parte que el despliegue es posible cuando se utiliza la cepa HB2151 en oposición a cuando se utiliza la cepa XL1-Blue.

Este resultado fue consistente con lo esperado ya que al ser la cepa HB2151 no supresora permitiría la producción de la fusión Cry3Aa-pIII codificada por el fagémido e impediría la producción de la proteína III del fago silvestre, lo que se reflejaría en un aumento en la eficiencia del despliegue de la toxina. El que la fusión no sea visible cuando se utiliza la cepa XL1-Blue puede deberse a que al ser esta una cepa supresora, la proteína III del fago silvestre no tiene restricciones para su producción y sería mayor que la de la fusión codificada en el fagémido lo que resultaría en una baja eficiencia de despliegue. Cabe la posibilidad sin embargo, de que el despliegue sea posible utilizando la cepa XL1-Blue, pero de una manera tan ineficiente que la cantidad de copias desplegadas de la toxina no sean detectables mediante Western blot.

Para probar que la banda de aproximadamente 110kDa no se trataba de un artefacto se realizó un nuevo ensayo de despliegue en el que se probaron tres condiciones: la primera consistente en la cepa HB2151 conteniendo al fagémido pCADS3A, condición en la que se detectó

un despliegue positivo en el ensayo anterior, la segunda consistente en la cepa HB2151 conteniendo al fagémido pCADS-Cyt1A, empleado para desplegar a la toxina Cyt1A en fusión con la pIII del fago M13 y la tercera condición consistente en la cepa HB2151 carente de vector fagémido.

El resultado mostrado en la figura 14B, confirmó que la banda de aproximadamente 110kDa corresponde con la fusión entre la toxina Cry3Aa y la pIII del fago, ya que no se observa en la condición en la que se utilizó al fagémido pCADS-Cyt1A lo cual indica que no se trata de un artefacto generado por el fagémido y que la detección de la fusión con el suero anti-Cry3Aa es específica, ya que la fusión entre la toxina Cyt1A y la pIII no se detecta. Esta banda tampoco se detectó cuando se infectó a la cepa HB2151 carente de fagémido, lo cual confirma que no se trata de un artefacto debido a contaminantes provenientes de la bacteria.

Las bandas observadas en la región entre los 72 y los 55kDa presentes en todos los ensayos de despliegue y que en los carriles correspondientes al fago ayudador (carriles A2 y B4) parecen tener una menor intensidad que en los que se observa la fusión (A1, B1) posiblemente debido a la presencia de una menor cantidad de fagos en estas muestras coinciden con la migración reportada de la proteína III del fago M13 en otros trabajos (Gailus *et al.*, 1994, Thie *et al.*, 2008, Stainer *et al.*, 2006).

Análisis del efecto de la vía de translocación de proteínas.

La primera comparación del efecto de la utilización de diferentes vías de translocación de proteínas sobre la eficiencia del despliegue en fagos demostró que ciertas proteínas refractarias al despliegue pueden desplegarse exitosamente o incrementar su nivel de despliegue utilizando la vía SRP (Steiner *et al.*, 2006) en lugar de la vía Sec comúnmente utilizada. Dado que intentos previos para realizar despliegue en fagos de toxinas Cry mostraron la dificultad para desplegar una toxina completa en el fago M13 (Marzari *et al.*, 1997) en el presente trabajo se decidió analizar si la deficiencia del despliegue se debía a un incorrecto plegamiento de la toxina debido a la vía mediante la cual se transporta al periplasma en el que los fagos son ensamblados y con este propósito se utilizaron dos vectores fagémidos, el vector pCANTAB3A y el vector pCADS3A.

El vector pCANTAB3A posee el péptido señal PelB derivado del gen *pelB* que codifica para la enzima peptidato liasa B en *Erwinia carotovora* (Lei *et al.*, 1987) y que utiliza la vía Sec en la cual los polipéptidos sintetizados se transportan de manera post-traduccional a través de la membrana del citoplasma hacia el espacio periplásmico por medio del translocón Sec.

El vector pCAD3A, con el que se demostró en la sección anterior que es posible el despliegue de la toxina Cry3Aa posee el péptido señal DsbA que dirige a las proteínas hacia la vía SRP de translocación de proteínas.

Esta vía está relacionada con la vía SRP que dirige proteínas a la membrana del retículo endoplásmico en eucariontes y tiene la característica de transportar de manera cotraduccional, ya que las proteínas se transportan al mismo tiempo que se sintetizan por los ribosomas (Valent Q, 2001).

Se utilizó la cepa HB2151 para el despliegue utilizando los dos vectores y nuevamente las combinaciones cepa-vector se ensayaron en paralelo y los fagos purificados se titularon por unidades formadoras de colonias.

En la preparación de fagos recuperada del despliegue con el sistema pCAD3A-Phaberge se obtuvo un título de 1.7×10^{10} ufc's y la preparación de pCANTAB3A-Phaberge un título de 2×10^{10} ufc's. Una vez determinados los títulos correspondientes a cada sistema se resolvieron cantidades equivalentes de fagos en un gel al 8% de acrilamida, el cual se transfirió a PVDF y el despliegue se analizó por medio de Western-blot (Figura 15).

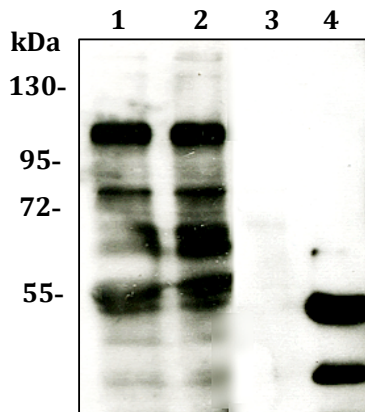


Figura 15. Aparentemente la vía de translocación de proteínas no tiene influencia sobre la eficacia del despliegue de la toxina Cry3Aa. Se analizaron cantidades equivalentes de fagos desplegados con ambos sistemas, 5×10^8 ufc's con el sistema pCAD3A (carril 1) y 5.4×10^8 ufc's con el sistema pCANTAB3A (carril 2). El carril 3 corresponde al fago ayudador phaberge (1.89×10^{12} ufp's) y el carril 4 a la toxina Cry3Aa ($0.25 \mu\text{g}$)

Cuando se analizó el despliegue obtenido utilizando los dos sistemas mediante Western blot no se encontró diferencia en los rendimientos obtenidos, lo cual indica que a diferencia de otras proteínas (Steiner *et al.*, 2006) la vía de translocación aparentemente no es un factor determinante en el rendimiento del despliegue de la toxina Cry3Aa.

La independencia de la vía de translocación para el despliegue se ha observado en otro tipo de proteínas como los fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla (scFv's) (Thie *et al.*, 2008) y esto puede deberse a que estas proteínas son incapaces de plegarse en el ambiente reductor del citoplasma (Biocca *et al.*, 1995), por lo que el riesgo que un plegamiento defectuoso prematuro es bajo.

La toxina Cry3Aa por su parte es excepcional entre las proteínas Cry ya que es soluble en ambientes alcalinos o ácidos y no en ambientes neutros (Bernhard 1986; Koller *et al.*, 1992;) lo que podría evitar su precipitación tanto en el citoplasma como en el periplasma, lo que tendría como consecuencia una mayor facilidad para un adecuado plegamiento y eficaz despliegue en el fago M13. Otras toxinas como la Cry1Ac que es soluble en ambientes reductores podrían transportarse al periplasma y obtener conformaciones defectuosas lo que explicaría su dificultad para retener sus propiedades como la unión a receptores (Kasman *et al.*, 1998).

El que la eficiencia del despliegue de ciertas proteínas no tenga una relación directa con la vía de transporte utilizada refuerza la hipótesis de que esta dependencia está más relacionada con las características de la proteína a desplegar que con las de la vía.

Análisis del efecto del fago ayudador en el despliegue de la toxina Cry3Aa

A pesar de que los parámetros para la realización del despliegue en fagos aún son susceptibles de mejoras en varios aspectos se ha demostrado que cuando se realiza el despliegue de una proteína en fusión con la proteína III del fago M13 la utilización de un fago ayudador con deficiencias en la producción de la proteína III puede incrementar el nivel de despliegue de la proteína de interés (Rondot *et al.*, 2001). La explicación radica en que cuando se realiza la infección con un fago plenamente capaz de expresar su proteína III nativa se da una competencia entre la pIII nativa y la fusión pIII-proteína de interés, lo que puede generar viriones con bajo número de copias desplegadas de la fusión ó totalmente ensamblados con la pIII nativa.

El despliegue multivalente, en el que múltiples copias de la fusión pIII-POI son desplegadas en un virión puede presentar inconvenientes como la reducción de la infectividad y consecuentemente la disminución en la producción de fagos, sin embargo es deseable ya que se ha demostrado que incrementa la posibilidad de aislar clones de interés de entre una biblioteca de variantes (Rondot *et al.*, 2001) por lo que la conveniencia de disponer de un fago ayudador con deficiencias en la producción de pIII puede ser mayor que las desventajas.

El inconveniente es que en fagos en los que se eliminó la secuencia completa de la proteína III o solo fragmentos de esta también se disminuyó o perdió la función de otros genes del fago, lo que redujo su capacidad para infectar y su viabilidad (Dueñas *et al.*, 1994).

El fago phaberge utilizado en este trabajo, a diferencia de fagos anteriormente utilizados suprime de manera condicional la producción de la proteína III. El sistema consiste en una mutación puntual condicional que permite el ensamblaje de un virión con la pIII completa en una cepa supresora y evita la producción de la pIII nativa en una cepa no supresora (Soltes *et al.*, 2003)

Para evaluar la influencia del fago ayudador sobre el despliegue de la toxina Cry3Aa se compararon los niveles de despliegue obtenidas al utilizar las combinaciones de los fagémidos pCADS3A y pCANTAB3A y los fagos ayudadores VCSM13 y phaberge mediante Western blot.

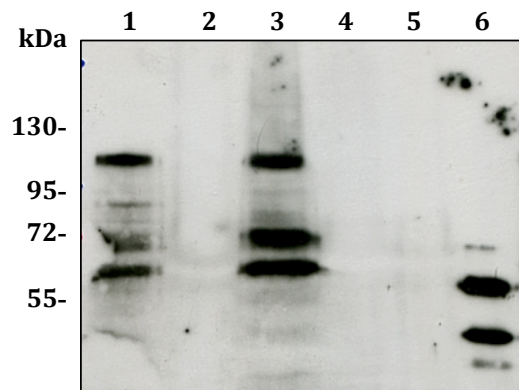


Figura 16. Gracias a la utilización del fago phaberge se puede desplegar la toxina Cry3Aa en el fago M13. Se resolvieron volúmenes equivalentes de fagos (30 μ L) de todas las preparaciones según el orden: 1.pCADS3A-Phaberge (5×10^8 ufc's), 2.pCADS3A-M13 (6×10^{10} ufc's), 3.pCANTAB3A-Phaberge (5.4×10^8 ufc's), 4.pCANTAB3A-M13 (3×10^{11} ufc's). El carril 5 corresponde a el fago ayudador phaberge (1.5×10^{12} ufp's) y el 6 a la toxina Cry3Aa (0.25 μ g).

La infección con el fago M13 produjo títulos de fagos de entre 10^{12} y 10^{13} ufc's/mL, mientras que al infectar con el fago phaberge se obtuvieron títulos de entre 10^8 y 10^9 ufc's/mL y una vez determinados los títulos de fagos para realizar la comparación mediante Western blot se resolvieron cantidades equivalentes de fagos obtenidos de la infección con el fago M13 y con el fago phaberge.

En los ensayos en los que se utilizó el fago phaberge tanto en combinación con el péptido señal PelB como con DsbA se detectó la fusión pIII-Cry3Aa pero no se detectó en los ensayos en los que se utilizó el fago M13 como ayudador. La pIII nativa se detectó en todos los casos pero fue menos visible en las preparaciones obtenidas de la infección con el fago VCSM13 que en las obtenidas de la infección con phaberge (Figura 16). Al resolver una cantidad mayor de fagos obtenidos con el ayudador M13 la proteína pIII fue más evidente pero no fue posible detectar la fusión pIII-Cry3Aa.

A pesar de que en los ensayos en los que se utilizó el ayudador M13 se obtuvieron títulos más altos que en los que se utilizó el phaberge, solo con este último se logró la detección de la proteína de fusión. Lo anterior es posiblemente debido a la diferencia en el nivel de despliegue obtenido entre los dos fagos ayudadores, ya que si bien podría ser posible el despliegue de la toxina Cry3Aa utilizando el ayudador M13 el bajo número de copias obtenidas ó la alta cantidad de fagos que no despliegan la toxina podría dificultar la detección de la fusión. Es posible también que los fagos que no despliegan la fusión tengan una mayor capacidad para infectar a otras bacterias teniendo como consecuencia una sobreproducción de fagos nativos, lo que a su vez impediría la proliferación de fagos que portan la proteína de fusión.

Por otra parte, es posible que el título de los fagos portadores de la fusión sea subestimado debido a que estos tienen una menor capacidad de infección debido al impedimento estérico originado por portar la toxina en fusión con la pIII, cuya función es precisamente adherirse al pili microbiano y permitir la infección. Si la mayoría de las copias de la proteína III del fago se encuentran fusionadas a la toxina la capacidad de infección del fago puede estar muy disminuida lo cual también explicaría la aparente mayor cantidad de pIII nativa detectada en los ensayos en los que se utilizó el fago phaberge.

Tamizaje de biblioteca de anticuerpos de llama

Debido a la necesidad de contar con una herramienta que nos permita el estudio de las interacciones de la toxina Cry3Aa con sus receptores y también contar con un método para evaluar la funcionalidad de la toxina desplegada (además de los bioensayos de toxicidad contra un insecto susceptible debido a que la disponibilidad de estos es limitada) y a que no se cuenta con un receptor clonado de la toxina Cry3Aa, se inició el tamizaje de una biblioteca de anticuerpos de llama desplegados en el fago M13 (Amaro I, 2007) con el objetivo de obtener anticuerpos que tuvieran afinidad por el asa I del dominio II de la toxina Cry3Aa y que fueran capaces de mimetizar al receptor de la toxina. Se utilizó esta estrategia debido a las características de dichos anticuerpos como son el tamaño, su estabilidad (Harmsen y De Haard, 2007) y a los resultados obtenidos previamente con estrategias similares (Gómez *et. al.*, 2001; Fernández *et. al.*, 2006).

Se comenzó con la amplificación de la biblioteca, después de lo cual se realizaron dos rondas de selección utilizando la toxina Cry3Aa (purificada empleando una columna de intercambio iónico Superdex, Pharmacia) y una tercera ronda empleando un péptido sintético biotinilado correspondiente a la secuencia del asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa según lo descrito en materiales y métodos y con las condiciones resumidas en la tabla 2. Se utilizó esta

región de la proteína debido a su probada importancia para la toxicidad (Wu *et al.*, 2000) y para el reconocimiento de receptores como la ADAM-10 metaloproteasa (Ochoa-Campuzano *et al.*, 2007).

Después de un ciclo de selección y de secuenciar varias de las clonas recuperadas se observó que la mayoría poseían secuencias truncas, por lo que se decidió plantear un nuevo esquema de selección para asegurar la calidad de las clonas seleccionadas.

La biblioteca original se amplificó para obtener fagos que se utilizaron para realizar una primera ronda de selección contra la toxina completa, todas las clonas seleccionadas se mezclaron y se preparó un cultivo a partir del cual se recuperó ADN plasmídico, este ADN fue utilizado como templado para amplificar mediante PCR los fragmentos codificantes de los anticuerpos de llama y el ADN obtenido de PCR que se comprobó era del tamaño esperado (~ 500pb) se digirió con las enzimas de restricción *SfiI* y *NotI* eliminando aproximadamente 100pb de los extremos de los genes. Por otra parte, el fagémido pSyn2 también fue digerido con las enzimas mencionadas de tal manera que los genes de anticuerpos pudieran clonarse en el vector (Figura 17).

El producto de ligación fue electrotransformado en la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' y el resultante de la transformación se sembró nuevamente en cajas de 20x20cm con medio 2xTY para recuperar colonias aisladas. Los resultados de las cantidades de colonias obtenidos entre cada ronda de reclonación se resumen en la tabla 2.

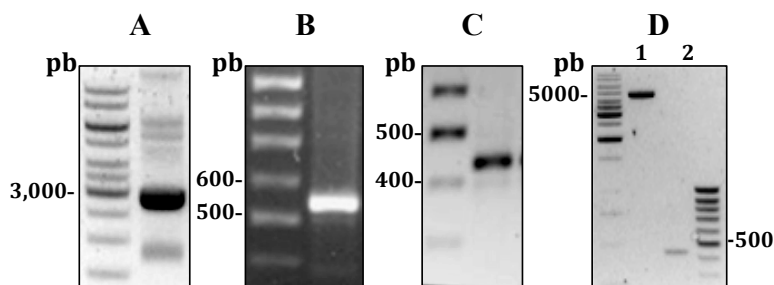


Figura 17. Obtención de los genes de anticuerpos para la reclonación de la biblioteca. A) Obtención de plásmidos del homogenado resultante de la selección. B) PCR para obtener los genes de anticuerpos. C) Productos de PCR digeridos con las enzimas *SfiI* y *NotI*. D) Vector pSyn2 (1) y genes de anticuerpos (2) utilizados en la reacción de ligación.

Tabla 2. Resumen de las rondas de selección que incluyeron la reclonación de la biblioteca después de cada ronda

Ronda	Saturante	Toxina	Título de entrada (ufc/mL)	Título de salida (antes de reclonación) (ufc/mL)	Título de salida (después de reclonación) (ufc/mL)
Primera	Leche 1%	80µg	1×10^{11}	1.5×10^9	1×10^9
Segunda	BSA 1%	80µg	1×10^{11}	5.6×10^5	5.69×10^4
Tercera	Leche 1%	Biotina-péptido 1µg	1×10^{11}	1.2×10^3	

Después de la primera ronda la cantidad de clonas se redujo de 1×10^{11} a 1.5×10^9 ufc's, quedando aquellas que tenían cierta afinidad tanto por la toxina como por el saturante, estas últimas, se eliminaron durante la segunda ronda de selección, en la que se logró una importante reducción de la cantidad de clonas seleccionadas, resultando un título de salida de 5.6×10^5 ufc's, sin embargo, un problema durante esta etapa fue la disminución de la eficiencia de transformación ya que al reclonar, el título de colonias obtenidas bajó de 5.6×10^5 ufc's/mL hasta 5×10^4 ufc's/mL, por lo que es muy probable que una significativa cantidad de clonas se hayan perdido debido a la reclonación y probablemente la variabilidad disminuyó por esta misma razón.

Para la tercera ronda de selección se utilizó el péptido sintético con la secuencia H-NHRFQPGYYGNDSFN-NH₂, correspondiente al asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa, por lo que se esperaba una disminución importante de la cantidad de clonas seleccionadas debido al buscado aumento de especificidad, sin embargo, la cantidad de clonas obtenidas fue de 1.2×10^4 ufc's/mL.

Inicialmente para probar la capacidad de las clonas para reconocer específicamente al antígeno contra el cual se seleccionaron se realizaron ensayos de ELISA monoclonal según lo descrito en materiales y métodos. Las clonas que presentaron valores de absorbancia mayores de 0.4, señalada en la figura 18 con una línea roja discontinua se analizaron de forma paralela por PCR de colonia para comprobar la integridad del gen de anticuerpo que portaban y con una prueba de inducción para determinar si eran o no capaces de producir anticuerpo (Figura 19).

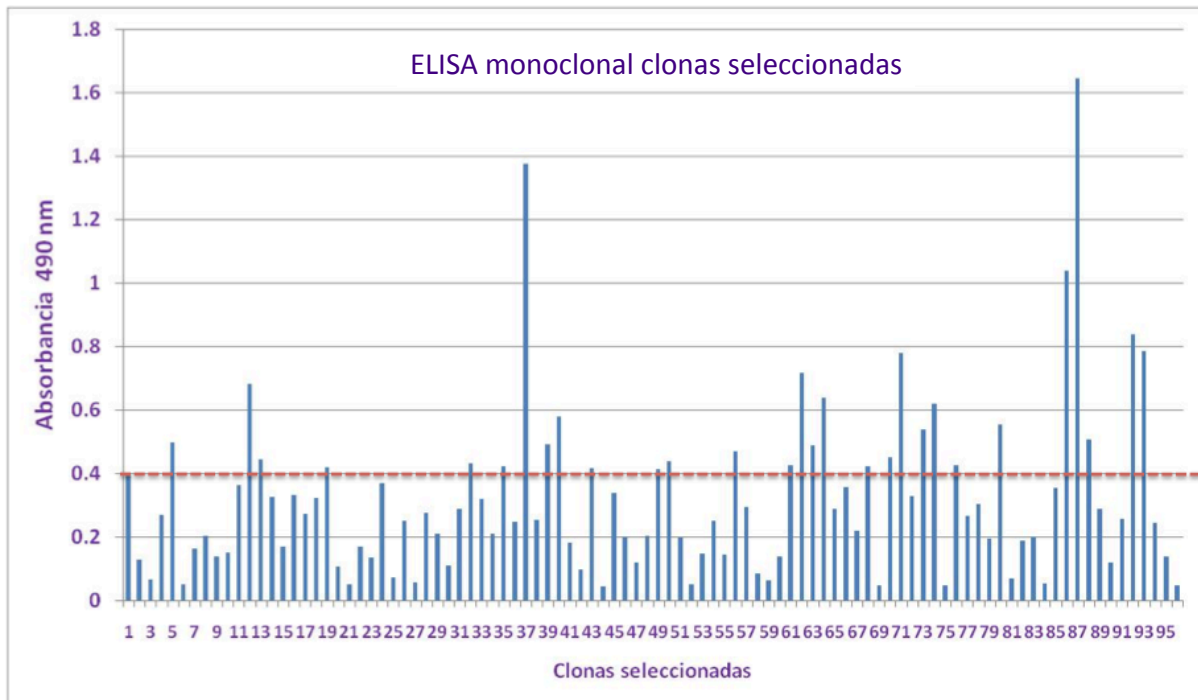


Figura 18. Gráfica de absorbancias obtenidas del ELISA monoclonal de las clonas seleccionadas resultado de la tercera ronda.

Para la prueba de expresión de los anticuerpos las clonas seleccionadas se cultivaron en placas de cultivo durante 4 horas a 37°C con agitación, se indujo la producción de anticuerpo mediante la adición de IPTG hasta una concentración de 1mM y se incubaron durante 12 horas a 30°C con agitación. Al cabo de la incubación se tomaron 20µL de cultivo total de cada clona, se resolvieron en geles de acrilamida y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF. Se realizó Western-blot con las membranas utilizando un anticuerpo anti-c-myc producido en ratón y este se detectó con un anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa, por último los resultados de la prueba de inducción se compararon con los obtenidos de la PCR de colonia.

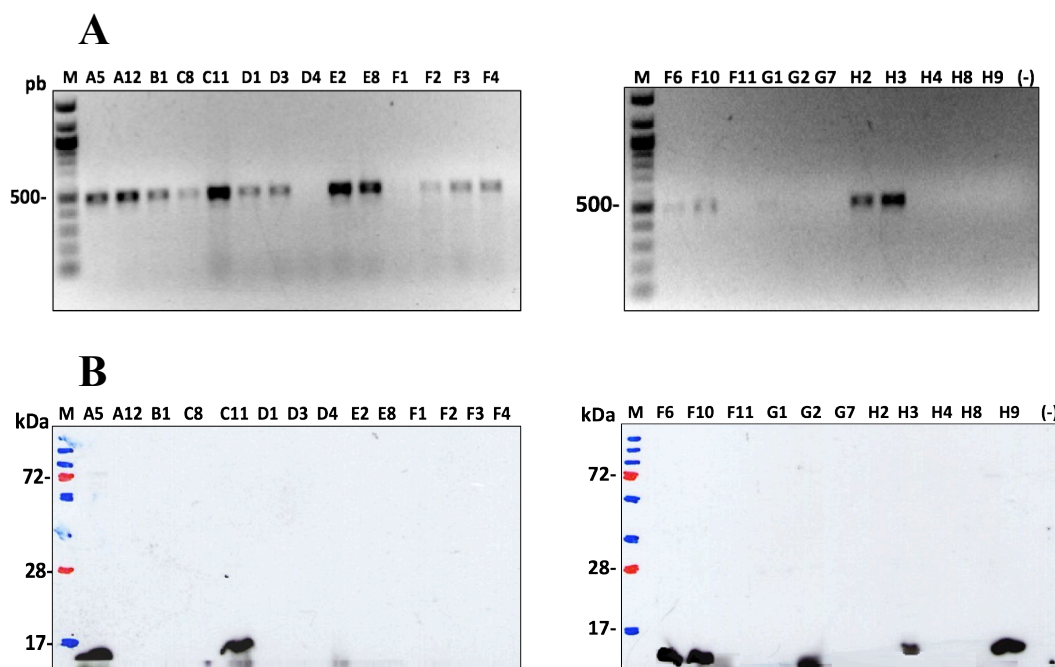


Figura 19 Análisis de las clonas seleccionadas. A) La mayoría de las clonas poseen el gen de anticuerpo de aproximadamente 500pb, sin embargo solo unas pocas son capaces de producir el anticuerpo en forma soluble de poco menos de 17kDa (B). Las clonas fueron denominadas por la posición en las placas de ELISA.

La PCR de colonia mostró que la mayoría de las clonas analizadas poseían el gen de anticuerpo del tamaño esperado, aproximadamente 500pb y que no había fragmentos de menor tamaño (a diferencia de lo sucedido con el primer intento de selección antes mencionado) lo que indicó que la estrategia de reclonación entre cada ronda de selección resultó favorable. La prueba de inducción por otra parte, se realizó con la cepa XL1-Blue MRF' en la que fue construida originalmente la biblioteca y al no ser esta una cepa supresora se esperaba mayormente la producción de la proteína de fusión pIII-anticuerpo y quizá una cantidad baja del anticuerpo soluble, ambos sin embargo detectables con un anticuerpo anti-histidinas.

Inesperadamente, al realizar los ensayos de Western blot se logró la detección mayormente del anticuerpo en su forma soluble de un tamaño ligeramente inferior a los 17kDa y en una cantidad inferior, por lo que se necesitó la sobreexposición de las placas fotográficas utilizadas, también se detectó la fusión de pIII-anticuerpo de aproximadamente 63kDa.

La comparación entre los resultados de la PCR de colonia y el Western blot reveló que aunque la mayoría de las clonas poseen el gen del anticuerpo solo unas pocas son capaces de producirlo, es decir, aunque durante la selección la estrategia de reclonación entre cada ronda

disminuyó el problema de obtención de clonas con secuencias truncas muchas de las clonas pierden la capacidad de producción del anticuerpo durante la selección

Es posible que aquellas en las que no se logra la detección codifiquen para un anticuerpo poco estable ó susceptible a degradación, por lo que se decidió tomar como referencia el ensayo de Western-blot, se continuó trabajando con las clonas que producían anticuerpo y se obtuvieron sus secuencias. Tras compararlas no se encontraron diferencias entre ellas lo que es indicador de la pérdida de variabilidad consecuencia de la selección a la que la biblioteca fue sometida.

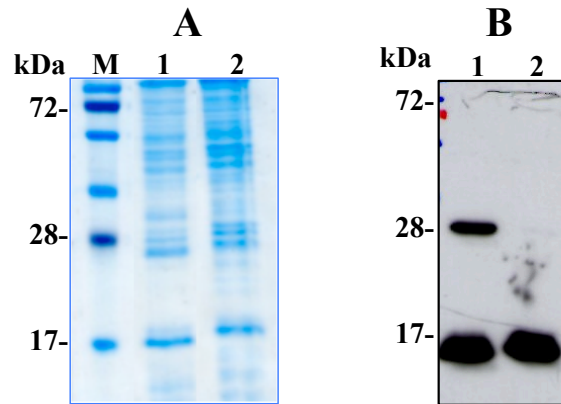


Figura 20. Análisis de la producción de los anticuerpos seleccionados. (A) Gel de acrilamida teñido con colorante de Coomassie mostrando la producción de los anticuerpos solubles A5 y C11 (1 y 2). (B) Después de ser purificados mediante IMAC los anticuerpos se se detectaron en un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo anti-histidinas.

Ya que todas las clonas seleccionadas tenían la misma secuencia se eligió arbitrariamente a la clona A5 y a la C11 mostradas en la figura 19B para caracterizarlas. Sus secuencias se reclonaron en el vector pSyn1 y las construcciones se transformaron en la cepa de *E. coli* ER2566 para obtener los anticuerpos de forma soluble y unidos a una etiqueta de histidinas lo que permitió su purificación mediante IMAC. La purificación se probó mediante tinción con colorante de Coomassie y Western-blot (Figura 20) y se observó que además de la proteína esperada de aproximadamente 17kDa se obtuvo una proteína de peso molecular mayor de 28kDa también detectada por el anticuerpo anti-histidinas, posiblemente un dímero del anticuerpo.

Finalmente se realizó una comparación de las secuencias de los anticuerpos A5 y C11 contra las secuencias del servidor IMGT la cual reveló una alta similitud con la cadena pesada de anticuerpos humanos pero baja similitud con anticuerpos de llama, sin embargo, al localizar los CDR's de nuestra secuencia se encontró que el CDR3 resultó anormalmente largo para un anticuerpo humano pero consistente con lo reportado para anticuerpos de llama (Muyldermans

et. al., 1994), de modo que posiblemente el proceso de selección tuvo como consecuencia el alejamiento de la similitud con anticuerpos de llama ganando en el proceso afinidad por la toxina Cry3Aa. En conclusión, hasta el momento se ha tenido éxito en el aislamiento de un anticuerpo con afinidad por el asa 1 de la toxina Cry3Aa a partir de una biblioteca de anticuerpos de llama desplegados en fagos.

Los pasos siguientes consistirán en probar sus capacidades para mimetizar al receptor natural de la toxina, como son el unirse de manera específica al asa para el cual fue seleccionado y promover la formación de oligómero de la toxina.

CONCLUSIONES

Mediante la utilización del fago phaberge es posible el despliegue de la toxina Cry3Aa en la cápside del fago filamentoso M13.

La utilización del fago phaberge incrementa el nivel de despliegue de la toxina Cry3Aa con respecto al fago M13.

El péptido señal utilizado no fue determinante para el despliegue de la toxina Cry3Aa en el fago M13.

Mediante el tamizaje de una biblioteca de anticuerpos de llama desplegados en fagos fue posible encontrar un anticuerpo que muestra afinidad por el loop 1 del asa II de la toxina Cry3Aa.

PERSPECTIVAS

Analizar la actividad biológica de la toxina desplegada mediante bioensayos contra *Leptinotarsa decemlineata* y *Tenebrio molitor*.

Analizar otras clonas obtenidas de la selección de anticuerpos desplegados en fagos.

Analizar la capacidad del anticuerpo seleccionado para mimetizar al receptor de la toxina Cry3Aa.

REFERENCIAS

- Amaro Estrada I, (2007) Construcción y caracterización de una biblioteca de fragmentos variables de anticuerpos de cadena pesada de *Lama glama* desplegados en fagos. Tesis de maestría IBT, UNAM.
- Atsumi S, Mizuno E, Hara H, Nakanishi K, Kitami M, Miura N, *et al* (2005). Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type I binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Applied Environmental Microbiology* 71:3966-77.
- Azzazy H, Highsmith W (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry* 35:425-445.
- Bravo A (1997) Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *Journal of bacteriology* 179:2793-2801
- Bernhard K (1986). Studies on the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *FEMS Microbiololgy Letters*. 33: 261-265.
- Biocca S (1995) Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria. *BioTechnology* 3, 1110-1115.
- Boisvert, Jacques, Lacoursière, Jean O (2004). *Le Bacillus thuringiensis israelensis et le contrôle des insectes piqueurs au Québec*, Québec, ministère de l'Environnement, Envirodoq no ENV/2004/0278, 101 p., document préparé par l'Université du Québec à Trois-Rivières pour le ministère de l'Environnement du Québec.
- Boonserm P, Davis P, Ellar D, Li J (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology* 348:363-382.
- Boonserm P, Min Mo, Chanan Angsuthanasombat, Julien Lescar (2006). Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution. *Journal of Bacteriology* 188:3391-3401.
- Carroll J., Li J, Ellar D (1989) Proteolytic processing of a coleopteran-specific δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochemical Journal* 261: 99-105
- Carroll J, Convents D, Van Damme J, Boets A, Van Rie J, Ellar D J (1997) Intramolecular Proteolytic Cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin may facilitate Its coleopteran toxicity. *Journal of Invertebrate Pathology* 70: 41-49
- Chasteen L, Ayriss J, Pavlik P, Bradbury M (2006). Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Research* 34:e145.
- Derbyshire D, Ellar D, Li J (2001). Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N- acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallographica Section D* 57:1938-1944

Dueñas M & Borrebaeck C A (1995) Novel helper phage design: intergenic region affects the assembly of bacteriophages and the size of antibody libraries. *FEMS Microbiology Letters* 125: 317-321.

Fabrick J, Oppert C, Lorenzen M D, Morris K, Oppert B, Jurat-Fuentes J L (2009) A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 18401-18410

Fekkes P y Driessen A (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 63: 161-173

Fernandez L, Aimanova K, Gill S, Bravo A, Soberón M (2006) A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *The Biochemical Journal* 394: 77-84

Gailus V, Rasched I (1994) The adsorption protein of bacteriophage fd and its neighbour minor coat protein build a structural entity. *European Journal of Biochemistry* 222:927-931.

Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft J R, Pangborn W, English L, (2001) Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D* 57: 1101-1109.

Gómez I, Oltean D, Gill S, Bravo A, Soberón M (2001) Mapping the epitope in cadherin like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 28906-28912.

Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*. 513: 242-246

Gómez I, Pardo-López L, Muñoz-Garay C, Fernandez L E, Pérez C, Sánchez J, Soberón M, Bravo A (2007) Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28:169-173

Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz, J-L, Brousseau R, Cygler M (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology* 254: 447-464

Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa E B, Bendahman N and Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363:446- 448

Harmsen M y De Haard H (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77:13-22

Herrero S, Gechev T, Bakker P, Moar W, de Maagd R (2005). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 6:96.

Höfte H, Seurinck J, Van Houtven A, Vaeck M (1987). Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera. *Nucleic Acids Research* 17: 7183

- Huber D, Beckwith J (2006) Phage display extends its reach. *Nature Biotechnology* 24: 793-794.
- Jenkins J L, Dean DH, (2000). Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. In: Setlow J K (Ed.), Genetic Engineering: Principles and Methods. *Plenum Press*, New York, p. 33.
- Joosten V., Lokman C., Van den Hondel C, Punt P. (2003). The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microbial Cell Factories* 2:1
- Jurat-Fuentes J, Adang M (2004). Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry* 271:3127-35.
- Kasman L M, Lukowiak A A, Garcynski S F, McNall R J, Youngman P, Adang M J (1998) Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. *Applied Environmental Microbiology* 64:2995-3003
- Koller C N, Bauer L S, Hollingworth R M (1992). Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native δ -endotoxin crystals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 184, 692-699.
- Lei S P, Lin H C, Wang S S, Callaway J, Wilcox G, (1987) Characterisation of the *E. carotovora pelB* gene and its product pectate lyase. *Journal of Bacteriology*. 169:4379-4383
- Li J, Carrol J, Ellar D J (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815-821
- Morin S, Biggs RW, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, *et al.* (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:5004-9.
- Morse R J, Yamamoto T, Stroud R M (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor-binding epitope. *Structure* 9: 409-417.
- Mullen L, Nair S, Ward J, Rycroft A, Henderson B (2006) Phage display in the study of infectious diseases. *TRENDS in Microbiology* 14:141-146.
- Müller M (2005) Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* 156:131-136.
- Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA, Hamers R (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of pre-state specific antigen. *Journal of Biological Chemistry* 279:51965-51972
- Nicola K, Evans T, Fineran P, Salmond G (2006) Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends in Biotechnology* 25:7-15

- Ochoa-Campuzano C, Real M, Martínez-Ramírez A, Bravo A, Rausell C (2007) An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362: 437-442
- Oltean D I, Pullikuth A K, Lee H-K, Gill SS (1999) Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor A from *Heliothis virescens* and cloning of the corresponding cDNA. *Applied Environmental Microbiology* 65:4760-6.
- Pacheco S, Gómez I, Sato R, Bravo A, Soberón M (2006). Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage. *Journal of invertebrate Pathology* 92:45-49
- Parker M, Feil S (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88:91-142
- Park Y, Abdullah M A, Taylor M D, Rahman K, Adang M J (2009). Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3086-3092
- Rausell C, Ochoa-Campuzano C, Martínez-Ramírez A, Bravo A, Real M (2007) A membrane associated metalloprotease cleaves Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin reducing pore formation in Colorado potato beetle brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 2293-2299
- Rondot S, Koch J, Breitling F, Dübel S (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnology*. 19: 75-78.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler D R, Dean D H (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:775-806
- Smith G (1985) Filamentous fusion phage-novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1351-1317
- Soltes G, Barker H, Marmai K, Pun E, Yuen A, Wiersma E (2003) A new helper phage and phagemid vector system improves viral display of antibody Fab fragments and avoids propagation of insert-less virions. *Journal of Immunological methods* 274:233-244
- Steiner Daniel, Forrer P, Stumpp M, Plückthun A (2006). Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nature Biotechnology* 24:823-831
- Thie H, Schirrmann T, Paschke M, Dübel S, Hust M (2008) SRP and Sec pathway leader peptides for antibody phage display and antibody fragment production in *E. coli*. *New Biotechnology* 25: 49-54.
- Vadlamudi R K, Weber E, Ji I, Ji T H, Bulla Jr. L A (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 5490-5494.
- Valent Quido A (2001) Signal recognition particle mediated protein targeting in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 17-31, .

Vilchez S, Jacoby J, Ellar D (2004) Display of biologically functional insecticidal toxin on the surface of λ -phage. *Applied Environmental Microbiology* 70:6587-6594.

Walters F, Stacy C, Lee M, Palekar N, Chen J (2008) An Engineered Chymotrypsin/Cathepsin G site in Domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against western corn rootworm larvae. *Applied and Environmental Microbiology* 74:367-374

Wu Sheng-Jiun, Dean D (1996) Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII δ -endotoxin. *Journal of Molecular Biology* 255:628-640.

Wu Sheng-Jiun, Kollerb N, Millerc D, Bauer L , Dean D (2000) Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. *FEBS Letters* 473:227-232

Zhuang M, Oltean D, Gómez I, Pullikuth AK, Soberón M, Bravo A, Gill S (2002) *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *Journal of Biological Chemistry* 277: 13863-13872.