



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“Participación de la autofagia en la respuesta de defensa a la toxina Cry1Ab  
de *Bacillus thuringiensis* en larvas de *Manduca sexta*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
GLADYS EDITH JIMÉNEZ NOPALA

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. HELENA PORTA DUCOING  
Instituto de Biotecnología- UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN  
Instituto de Biotecnología- UNAM  
DRA. ROSA NAVARRO GONZÁLEZ  
Instituto de Biotecnología- UNAM

México, D.F. Junio, 2013



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.

El presente trabajo se llevó a cabo el  
Departamento de Microbiología Molecular  
Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México

1. Datos del alumno  
Gladys  
Edith  
Jiménez  
Nopala  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Posgrado en Ciencias Bioquímicas  
Instituto de Biotecnología  
51102319-8
2. Datos del tutor  
Dra.  
Helena  
Porta  
Ducoing
3. Datos del sinodal 1 (Presidente)  
Dr.  
Federico  
Sánchez  
Rodríguez
4. Datos del sinodal 2 (Secretario)  
Dr.  
Mario  
Ernesto  
Cruz  
Muñoz
5. Datos del sinodal 3 (Vocal 1)  
Dra.  
Ana  
María  
Cevallos  
Gaos
6. Datos del sinodal 4 (Vocal 2)  
Dra.  
Liliana  
Pardo  
López
7. Datos del sinodal 5 (Vocal 3)  
Dr.  
Enrique  
Salas  
Vidal

8. Datos del Comité Tutor

Dra.  
Susana  
Castro  
Obregón

9. Datos del Comité Tutor

Dra.  
Rosa  
Navarro  
González

10. Datos del trabajo escrito

Participación de la autofagia en la respuesta de defensa a la toxina Cry1Ab de  
*Bacillus thuringiensis* en larvas de *Manduca sexta*

p. 79

2013



*Dedicado a mis padres*





## **Financiamiento:**

La realización de esta tesis fue financiada por proyectos de investigación, becas de mantenimiento y apoyo de tesis de las siguientes instituciones:

- El consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 179333).
- Dirección General de Asuntos del Personal Académico / Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN218610).
- Programa de Posgrado de Ciencias Bioquímicas - Universidad Nacional Autónoma de México.

## Índice:

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS EN EL ANEXO 1.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
LA TOXINA FORMADORA DE PORO CRY1AB DE BACILLUS THURINGIENSIS.....	6
Existen dos teorías del mecanismo de acción de las proteínas Cry. ....	7
GENERALIDADES DE LAS TOXINAS FORMADORAS DE PORO.....	9
RESPUESTAS CELULARES INDUCIDAS POR LAS TFP.....	11
LA AUTOFAGIA ES PARTE DE LA RESPUESTA CELULAR A LAS TFP .....	11
GENERALIDADES DE LA AUTOFAGIA EN MAMÍFEROS.....	12
LA MACROAUTOFAGIA.....	13
Complejos proteicos que participan en la autofagia en mamíferos .....	15
Origen de la membrana del Autofagosoma.....	15
La iniciación de la formación del autofagosoma.....	16
La elongación y la maduración del autofagosoma.....	22
LA PROTEÍNA LC3-II ES EL MARCADOR CARACTERÍSTICO DE LA AUTOFAGIA .....	24
LA AUTOFAGIA COMO RESPUESTA DE DEFENSA ANTE LAS INFECCIONES BACTERIANAS Y LA PRODUCCIÓN DE TFP .....	27
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>28</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>31</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>32</b>
ESPORULACIÓN DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> .....	32
PURIFICACIÓN DE CRISTALES DE CRY1AB.....	32
BIOENSAYO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DE LA TOXINA.....	34
BIOENSAYO .....	34
WESTERN-BLOT .....	35
SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>ATG8</i> CON RNAI .....	36

ANÁLISIS DEL MRNA: ENSAYO DE RT-PCR .....	37
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	38
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
OBTENCIÓN DE TOXINA CRY1AB PARA LA INTOXICACIÓN DE LARVAS DE <i>M. SEXTA</i> .....	39
ANÁLISIS DE PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA ATG8 EN RESPUESTA A DOSIS CRECIENTES DE LA TOXINA CRY1AB .....	42
ANÁLISIS DE PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA ATG8 EN RESPUESTA A UNA DOSIS BAJA DE CRY1AB .....	46
SE REQUIERE DE LA TOXICIDAD DE CRY1AB PARA EL PROCESAMIENTO DE ATG8-PE.....	50
EL SILENCIAMIENTO DE ATG8 INCREMENTA LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS LARVAS DE <i>M. SEXTA</i> A LA TOXINA CRY1AB.....	52
LOS NIVELES DE PROTEÍNA ATG8 DISMINUYEN POR EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN ATG8 EN LARVAS DE <i>M. SEXTA</i>	
.....	53
EL SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>ATG8</i> NO AFECTA EL DESARROLLO DE LARVAS DE <i>M. SEXTA</i> .....	56
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>64</b>
LA SUBUNIDAD A DE LA PROTEÍNA ATG16L SE INDUCE ANTE LA INTOXICACIÓN CON CRY1AB EN LARVAS DE <i>M. SEXTA</i> .....	64
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>68</b>

## Índice de figuras

FIGURA 1: MECANISMO DE ACCIÓN GENERAL QUE SIGUEN LAS TFP PARA MATAR A SU CÉLULA BLANCO. ....	10
FIGURA 2: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA MACROAUTOFAGIA. PASOS DEL PROCESO DE LA MACROAUTOFAGIA QUE OCURREN CUANDO ES ACTIVADA. ....	14
FIGURA 3: VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PI3K DE CLASE I .....	17
FIGURA 4: ESQUEMA DE LOS COMPLEJOS PROTEICOS EN CONDICIONES DE INANICIÓN. ....	19
FIGURA 5: SEÑALIZACIÓN MOLECULAR DURANTE LA NUCLEACIÓN DEL PROCESO DE AUTOFAGIA. ....	21
FIGURA 6: SEÑALIZACIÓN MOLECULAR DURANTE LA NUCLEACIÓN Y MADURACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA EN EL PROCESO DE AUTOFAGIA. ....	24
FIGURA 7: ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS ATG8 DE <i>M. SEXTA</i> Y <i>B. MORI</i> Y LC3 DE HUMANO. ....	29
FIGURA 8: ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES CEPAS DE BT QUE EXPRESAN LAS PROTEÍNAS CRY1Ab, R99E Y E129K POR PCR. ....	40
FIGURA 9: ANÁLISIS DE LA PUREZA DE LAS PROTEÍNAS UTILIZADAS EN LOS BIOENSAYOS: CRY1Ab, R99E Y E129K. ....	41
FIGURA 10: ANÁLISIS DE LA ACUMULACIÓN RELATIVA DE ATG8-PE DURANTE LA INTOXICACIÓN CON CRY1Ab A DIFERENTES DOSIS.....	43
FIGURA 11: ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE LA LIPIDACIÓN DE ATG8-PE DURANTE LA INTOXICACIÓN CON CRY1Ab A DIFERENTES DOSIS (LC <sub>10</sub> , LC <sub>50</sub> Y LC <sub>90</sub> ). ....	45
FIGURA 12: ANÁLISIS DE LA ACUMULACIÓN RELATIVA DE ATG8-PE DURANTE LA INTOXICACIÓN CON UNA DOSIS BAJA DE CRY1Ab. ....	47
FIGURA 13: NORMALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE ATG8-PE/RP53. ....	48
FIGURA 14: LIPIDACIÓN DE ATG8 EN LARVAS INTOXICADAS CON CRY1Ab (LC <sub>10</sub> ). ....	49
FIGURA 15: ANÁLISIS DEL PROCESAMIENTO DE ATG8-PE CON TOXINAS INACTIVAS. ....	51
FIGURA 16: ANÁLISIS DE LA MORTALIDAD DE LARVAS SILENCIADAS CON DSRNA <i>ATG8</i> . ....	53
FIGURA 17: ANÁLISIS DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ATG8 A LAS 24H. ....	54
FIGURA 18: ANÁLISIS DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ATG8 A LOS 7 DÍAS. ....	55
FIGURA 19: LARVAS DE <i>M. SEXTA</i> CON 12 DÍAS DE EDAD. ....	56
FIGURA 20: LARVAS DE <i>M. SEXTA</i> CON 22 DÍAS DE EDAD. ....	57

## Índice de tablas

TABLA 1: SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	37
---	----

## Índice de figuras en el Anexo 1

FIGURA A 1: INDUCCIÓN DE LA ISOFORMA ALFA DE ATG16L1. ....	65
FIGURA A 2: INDUCCIÓN DE LA ISOFORMA ALFA DE ATG16L1 EN LARVAS INTOXICADAS CON CRY1AB (LC <sub>10</sub> ). ....	66

## Resumen

Las Toxinas Formadoras de Poro (TFP) las producen algunas bacterias para obtener nutrientes perforando la membrana celular de la célula blanco ocasionando, desbalance de iones y la muerte celular. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* forman parte de este grupo de toxinas que son activas en células del epitelio intestinal de larvas de insectos y actúan específicamente en contra de plagas agrícolas y de mosquitos vectores de enfermedades humanas.

La formación del poro que provocan las TFP desencadena un conjunto de señales intracelulares que participan en la defensa de la célula. Sin embargo, precisamente son estas vías las que utilizan las bacterias que producen TFP para invadir exitosamente las células blanco. No obstante, a dosis bajas de la toxina, la célula puede desencadenar una serie de mecanismos de defensa que le permiten sobrevivir a ella y/o a todo el organismo. Dentro de estos mecanismos de defensa se encuentra la autofagia que es un proceso catabólico que puede eliminar proteínas, lípidos, DNA, o RNA dañado o peligroso para la célula. Los objetivos de este proyecto fueron determinar si el proceso de autofagia se induce en respuesta a la intoxicación con la toxina Cry1Ab en las células del intestino medio de las larvas de *M. sexta*, y segundo, si durante la intoxicación con una dosis baja de la toxina, la inducción de este proceso protege a las larvas.

En base a los experimentos realizados en este proyecto se pudo llegar a la conclusión de que la toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* induce a la autofagia en las larvas de *M. sexta*, y que también para que este proceso se incremente se requiere de la actividad formadora de poros de la toxina Cry1Ab otra conclusión importante de este trabajo fue que el silenciamiento del gen *atg8* vuelve más susceptibles las larvas de *M. sexta* cuando son intoxicadas con Cry1Ab.

## Introducción

Las bacterias patógenas han desarrollado un conjunto de herramientas que afectan funciones celulares importantes de su blanco, lo que les permite manipular el comportamiento de las células para su propio beneficio. Las primeras herramientas de las que se valían estas bacterias para atacar a su blanco que se identificaron, fueron las toxinas, ya que estas son proteínas solubles secretadas por el patógeno en el medio extracelular. De las toxinas bacteriana conocidas, el grupo más estudiado es el de las toxinas formadoras de poros (TFP) (Iacovache, *et al.*, 2008; Bischofberger, *et al.*, 2009).

### La toxina formadora de poro Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, considerada ubicua, ya que se ha aislado de muchas partes del mundo y de muy diversos hábitats, como el suelo, el agua, las hojas de las plantas, los insectos muertos, y las telarañas. Durante su ciclo de vida, Bt presenta dos fases principales: la fase de crecimiento vegetativo en donde la bacteria se duplica por bipartición cada 30-90 min dependiendo del medio de cultivo, y la fase de esporulación la cual se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes. La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempos muy prolongados, en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios, como el intestino de una larva, puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo (Schnepf, *et al.*, 1998).

Durante la esporulación, Bt forma un cuerpo para-esporal de naturaleza proteica conocido como cristal, el cual tiene propiedades insecticidas, ya que está constituido por proteínas de tipo  $\delta$ -endotoxinas y sus principales componente son las proteínas Cry (del inglés Crystal) (Zhang, *et al.*, 2006).

Los cristales producidos por Bt, son ingeridos por las larvas de insectos susceptibles. Los síntomas que se observan en las larvas de insectos susceptibles cuando ingieren los cristales de Bt incluyen: el cese de la ingesta, la parálisis del intestino, el vómito, la diarrea, la parálisis total y finalmente la muerte.

### **Existen dos teorías del mecanismo de acción de las proteínas Cry.**

El mecanismo principal de acción de la toxina es local y se desencadena cuando la toxina entra en contacto con las células epiteliales del intestino de larvas de diversos insectos. Se ha demostrado que después de ser activadas, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles: lepidópteros, coleópteros y dípteros (Bravo, *et. al.*, 1992).

Se han propuesto dos teorías de cómo se produce el daño intestinal.

La primera teoría propone un modelo en el que la toxina Cry interactúa secuencialmente con sus receptores en la membrana celular, lo cual permite su subsecuente oligomerización e inserción en la membrana. Una vez que la bacteria es ingerida por el insecto, los cristales producidos por Bt se solubilizan a pH alcalino (pH >9.5) liberando a la "protoxina". La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos liberando el fragmento tóxico. Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas Cry1 se da por el corte de los primeros veintiocho residuos del extremo N-terminal en un sitio conservado (Bravo, *et. al.*, 1992) y de los últimos 500 residuos del extremo C-terminal, quedando de esta forma un fragmento resistente a proteasas de entre 55 y 65 kDa que se le denomina "toxina". La posición del sitio de procesamiento en el extremo C-terminal no es constante sino que se localiza en la región 609 a 630 (Pigott & Ellar, 2007).



La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de las proteínas Cry3A y Cry1Aa (Grochulski, *et. al.*, 1995), ha revelado que estas moléculas están organizadas en tres dominios. El dominio I está constituido por un ramillete de siete  $\alpha$ -hélices anfipáticas donde seis de ellas rodean a la  $\alpha$ -hélice 5. El dominio II está formado por tres láminas  $\beta$ -antiparalelas que terminan en asas ("loops 1, 2 y 3 ") en el vértice de la molécula formando un prisma. El dominio III está compuesto de dos hojas  $\beta$ -plegadas arregladas una sobre otra (Pigott & Ellar, 2007).

Posteriormente, las toxinas se unen por medio del dominio II y III al receptor caderina, lo cual causa un cambio conformacional en la toxina que permite el corte de la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I. Este corte induce la oligomerización de la toxina y aumenta su afinidad por otros receptores, que son la Aminopeptidasa N (APN) o la Fosfatasa Alcalina (ALP membranar), que son proteínas ancladas a la membrana por glicosilfosfatidil-inositol. La unión a estos receptores dirige al oligómero a balsas lipídicas en la membrana y permite su inserción formando un poro lítico en las células. Estos poros son permeables a moléculas pequeñas como iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares. Su presencia en la membrana plasmática altera los gradientes iónicos transmembranales y puede llevar a la lisis celular debido al influjo masivo de agua (Pigott & Ellar, 2007; Vachon *et al.*, 2012).

La segunda teoría sugiere otro modelo en el que la unión de la toxina al receptor caderina en la membrana plasmática inicia una cascada de señalización dependiente de  $Mg^{2+}$  que promueve la activación de las proteínas G, las adenilato ciclasas y la acumulación de Adenosín monofosfato cíclico (cAMP), así como la activación de la proteína cinasa A. Lo cual conduce a la desestabilización del citoesqueleto y de los canales iónicos, así como a la muerte celular (Zhang, *et. al.*, 2006).

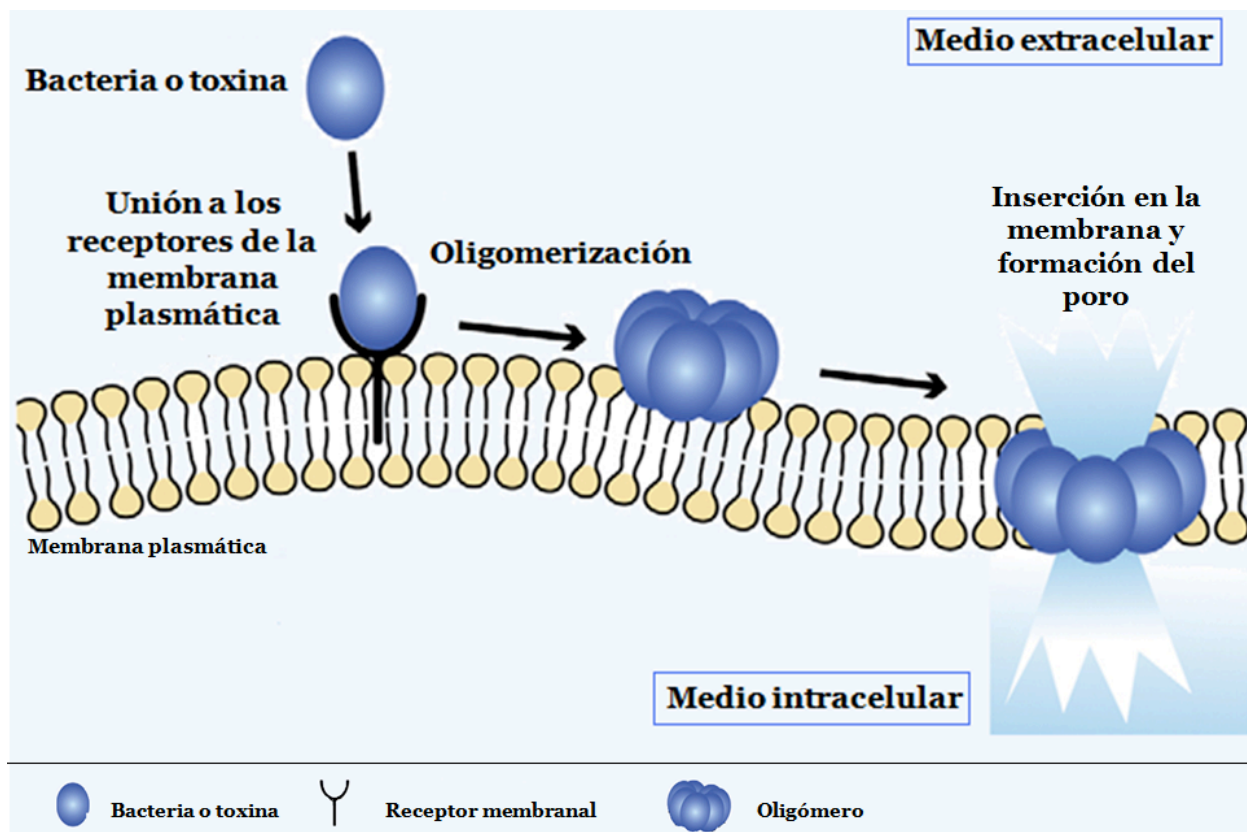
Ambos modelos tienen evidencias a favor que se han basado en técnicas experimentales distintas, así como puntos débiles. Recientemente Vachon y colaboradores (2012) hicieron una crítica seria a ambos modelos, y concluyeron que en el primer modelo no se demostró con rigor la existencia de un pre-poro u oligómero, y

en el segundo modelo pasa por alto que las toxinas Cry son toxinas formadoras de poro y que su actividad depende de esto.

## **Generalidades de las Toxinas Formadoras de Poro**

Las toxinas Cry forman parte del grupo de las toxinas formadoras de poro (TFP). Las TFP las secretan las bacterias patógenas para matar a su blanco. La mayoría de las TFP perforan la membrana plasmática de su célula blanco ocasionando su muerte básicamente por el desbalance de iones (Bischofberger, *et al.*, 2009).

Las TFP comparten algunos aspectos de su mecanismo de acción: se unen a receptores específicos localizados en la membrana celular de la célula blanco; posteriormente, algunas proteasas de la célula blanco las cortan específicamente y así se activan los monómeros de la toxina que se agregan en estructuras oligoméricas que son capaces de insertarse en la membrana para formar poros que permiten el paso de iones. La formación del poro desencadena señales intracelulares que participan en la defensa de la célula y/o son utilizados por la bacteria para invadir exitosamente las células blanco (Bischofberger, *et al.*, 2009). La actividad de formación de poro de las TFP induce la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que produce cambios en la concentración citoplasmática de los iones,  $Ca^{2+}$  y  $K^+$ , y consecuentemente cambios en la presión osmótica. Estudios recientes demostraron que altas concentraciones de TFP destruyen las células blanco. Sin embargo, a concentraciones subcitofíticas de TFP, las células pueden desencadenar las vías de señalización y los mecanismos de defensa destinados a restablecer la integridad de la membrana plasmática y la homeostasis de los iones, que permiten la supervivencia de la célula o del organismo e interesantemente estas vías no requieren la síntesis de proteínas (Aroian & Van der Goot, 2007) (Fig. 1).



**Figura 1: Mecanismo de acción general que siguen las TFP para matar a su célula blanco.**

Las TFP tienen un mecanismo de acción general para matar a su célula blanco, en el que comparten algunos aspectos una vez que son ingeridos por el organismo blanco: requieren de la interacción con los receptores ubicados en la membrana plasmática de su célula blanco, posteriormente se ensamblan para formar un oligómero y así poder insertarse en la membrana y formar el poro para inducir la muerte celular por citólisis osmótica (tomado y modificado de Bischofberger, *et al.*, 2009).

## **Respuestas celulares inducidas por las TFP**

Las células del organismo blanco responden a la formación del poro desencadenando un conjunto de señales intracelulares que participan en la defensa de la célula y que la bacteria puede utilizar para invadir exitosamente las células blanco (Aroian and van der Goot, 2007). Los principales mecanismos de defensa de la célula que se han observado ante el ataque de las TFP a dosis bajas, incluyen: la apoptosis (Wiles *et al.*, 2008), la piroptosis (Timmer *et al.*, 2009; Shoma *et al.*, 2008), la oncosis (Zhang *et al.*, 2006) y a la autofagia (Gonzales *et al.*, 2011).

### **La autofagia es parte de la respuesta celular a las TFP**

Se ha observado que en la levadura durante la inanición, las células entran en un estado quiescente y que la autofagia forma parte de la respuesta que permite la sobrevivencia de la célula (Smets, *et al.*, 2010; Yang & Klionsky, 2010).

Actualmente se conoce que en respuesta a las TFP la síntesis de proteínas se detiene por completo, los componentes citosólicos se reciclan por la autofagia y la energía se almacena en gotas de lípidos (Gonzalez *et al.*, 2011). El proceso de autofagia también se activa en el caso de invasión por patógenos como un mecanismo de defensa del sistema inmune (Deretic, 2006).

En base a lo anterior y así como la inanición representa un estado de estrés para la célula, se ha planteado la idea de que cuando las células de mamífero entran en contacto con las TFP, esto constituye un estímulo similar que es capaz de inducir la autofagia, debido a la formación de poros en la membrana, lo que conlleva a un consumo mínimo de energía mientras la membrana plasmática se repara.

Por otro lado algunas TFP estudiadas inducen el proceso de autofagia e sus organismos blanco como mecanismo de defensa, por lo tanto, también es posible que la TFP Cry1Ab de Bt desencadene este proceso en larvas de *M. sexta*. Se ha propuesto que la toxina Cry1Ab en dosis subletales induce este proceso. Hasta el

momento no se ha reportado si en las células del intestino medio de lepidópteros, la autofagia se induce en respuesta a la intoxicación con las toxinas Cry. Es por ello que decidimos realizar el primer estudio *in vivo*, para determinar si la autofagia se induce ante la intoxicación con estas proteínas en *M. sexta*.

A continuación se describe el proceso de autofagia para un mejor entendimiento de cómo ayuda a la supervivencia de la célula.

### **Generalidades de la autofagia en mamíferos**

Las células eucariotas tienen dos grandes sistemas de degradación de proteínas, la autofagia y el proteasoma. La degradación de proteínas mediada por el proteasoma tiene una selectividad alta ya que generalmente reconoce solo sustratos que son ubiquitinados. En contraste, la autofagia, es un proceso catabólico que no sigue un patrón simple, ya que la degradación de las proteínas y de los componentes celulares requiere de la formación de autofagosomas y de la acción de las enzimas del lisosoma. La autofagia es un proceso regulado en respuesta al estrés extracelular y el intracelular y las señales tales como la inanición, la disminución de los factores de crecimiento y el estrés ante la invasión de los patógenos (Mizushima & Komatsu, 2011).

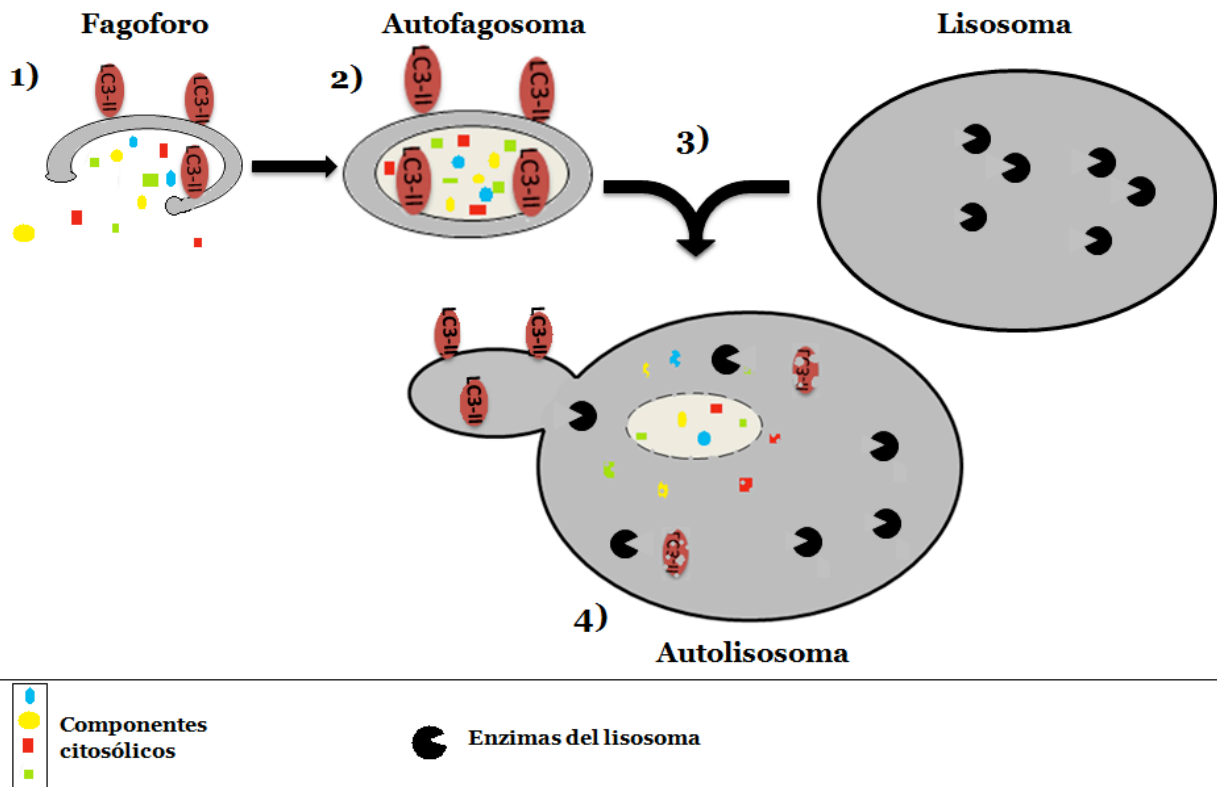
Dentro de las funciones de la autofagia se encuentran: 1) el mantenimiento de los procesos celulares básicos, 2) la remoción de los agregados de las proteínas mal plegadas, 3) la eliminación de los organelos dañados, tales como las mitocondrias, los ribosomas, los peroxisomas y el RE, 4) proveer los nutrientes durante los periodos de inanición, 5) actuar como un mecanismo de defensa (la degradación de los patógenos intracelulares), 6) participa durante el desarrollo embrionario ya que balancea las fuentes de la energía en los periodos críticos y 7) es un componente de las respuestas celulares ante el estrés (Orenstein, *et al.*, 2010).

La autofagia es un término general para todas las vías por las cuales el material citoplasmático se descarga en el interior del lisosoma en animales o en el interior de la vacuola en plantas y levaduras. Se han descrito diferentes tipos de autofagia, dependiendo de los mecanismos que medien la liberación de la carga al lisosoma o la vacuola para su degradación. Estos tres tipos de autofagia son: la autofagia mediada por chaperonas (CMA por sus siglas en inglés), la Microautofagia y la Macroautofagia, (Fig. 2). Estas tres vías autofágicas contribuyen a la degradación, la regulación del tipo de carga que se va a degradar, así como los mecanismos que contribuyen a la selección de la carga (Orenstein, *et al.*, 2010). En la actualidad estos procesos solo se han descrito en levaduras y células de mamífero, pero en plantas aun no se sabe si están conservados los tres tipos de autofagia. A continuación solo se describe detalladamente el proceso de la Macroautofagia por ser el tema de este proyecto.

### **La Macroautofagia**

La Macroautofagia es un proceso catabólico que puede eliminar las proteínas, los lípidos, el DNA, o el RNA dañados o peligrosos para la célula. Mediante este proceso también se eliminan los restos del citoplasma, de los organelos y de los microorganismos invasores. Este proceso lo llevan a cabo los lisosomas que contienen las hidrolasas ácidas como las peptidasas, las lipasas y las nucleasas que degradan para su reutilización las macromoléculas a sus unidades básicas.

La Macroautofagia involucra la formación *de novo* de una vacuola que se invagina, rodea la carga y que al cerrarse forma una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma que transporta la carga para su degradación hasta el lisosoma. Esta es la principal característica que distingue al proceso de la Macroautofagia de la Microautofagia y de la Autofagia Mediada por las Chaperonas. A continuación nos referiremos al proceso de Macroautofagia como autofagia, y su análisis en respuesta a la intoxicación con las toxinas Cry que es el tema central de este proyecto (Fig. 2).



**Figura 2: Representación esquemática de la macroautofagia. Pasos del proceso de la macroautofagia que ocurren cuando es activada.**

1) Los componentes citosólicos son encerrados en una porción de membrana, llamada fagoforo. 2) Posteriormente se cierra y forma una estructura de doble membrana que es el autofagosoma. 3) La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma, formando una estructura llamada autolisosoma. 4) La membrana interna que encierra los componentes citosólicos son liberados dentro del autolisosoma y son degradados por las enzimas del lisosoma (tomado y modificado de Mizushima, *et al.*, 2008).

En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado más de 30 genes que participan en la autofagia y que se conocen como “Autophagic related genes” (Atg), de los cuales al menos 18 están conservados en los mamíferos, (Obara & Ohsumi 2011; Mizushima, *et al.*, 2011). La nomenclatura de las proteínas y de los genes en humanos

cambia en algunos casos y en otros se conserva la nomenclatura de las levaduras; en la sección siguiente se mencionara primero el nombre descrito para humanos seguido del nombre utilizado en levadura.

En los insectos que llevan a cabo la metamorfosis durante su desarrollo, la autofagia es uno de los mecanismo encargados de eliminar los órganos y los tejidos que son útiles solamente en las etapas embrionarias y larvarias (Tetammenti, *et al.*, 2011). Muchos de estos genes involucrados en la autofagia tanto de la levadura como en los humanos también están presentes en *Drosophila melanogaster* (Melendez & Neufeld, 2008); en los lepidóptero *Bombix mori* (Zhang *et al.*, 2009) y *M. sexta* y en otros insectos como en el mosquito *Aedes aegypti* (Porta, resultados no publicados).

### **Complejos proteicos que participan en la autofagia en mamíferos**

La biosíntesis de los autofagosomas se divide en tres procesos principales: la iniciación, la elongación y la maduración. En estas etapas participan 5 subgrupos de proteínas Atg relacionados con la fase del proceso en el cual participan: 1) el complejo de la cinasa ULK1/Atg1, participa en la iniciación; 2) el sistema de conjugación Atg12 participa en la iniciación; 3) el complejo de la PI3 cinasa de clase III/Vps34 con beclina-1/Atg6, participa en la iniciación y en la elongación; 4) el complejo Atg9 con WIPI-1/Atg18, participa en la elongación; y, 5) el sistema de conjugación LC3/Atg8, participa en la elongación y en la maduración del autofagosoma. Estos últimos 4 complejos convergen en una región membranal específica para iniciar, elongar y madurar el autofagosoma (Wirawan, *et al.*, 2011).

### **Origen de la membrana del Autofagosoma**

Durante la inanición y otros tipos de estreses la autofagia se induce importantemente y por consiguiente el número autofagosomas aumenta. Estos autofagosomas se generan cerca o en el Retículo Endoplásmico (RE) (Mizushima, *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no queda claro si la membrana del RE se utiliza



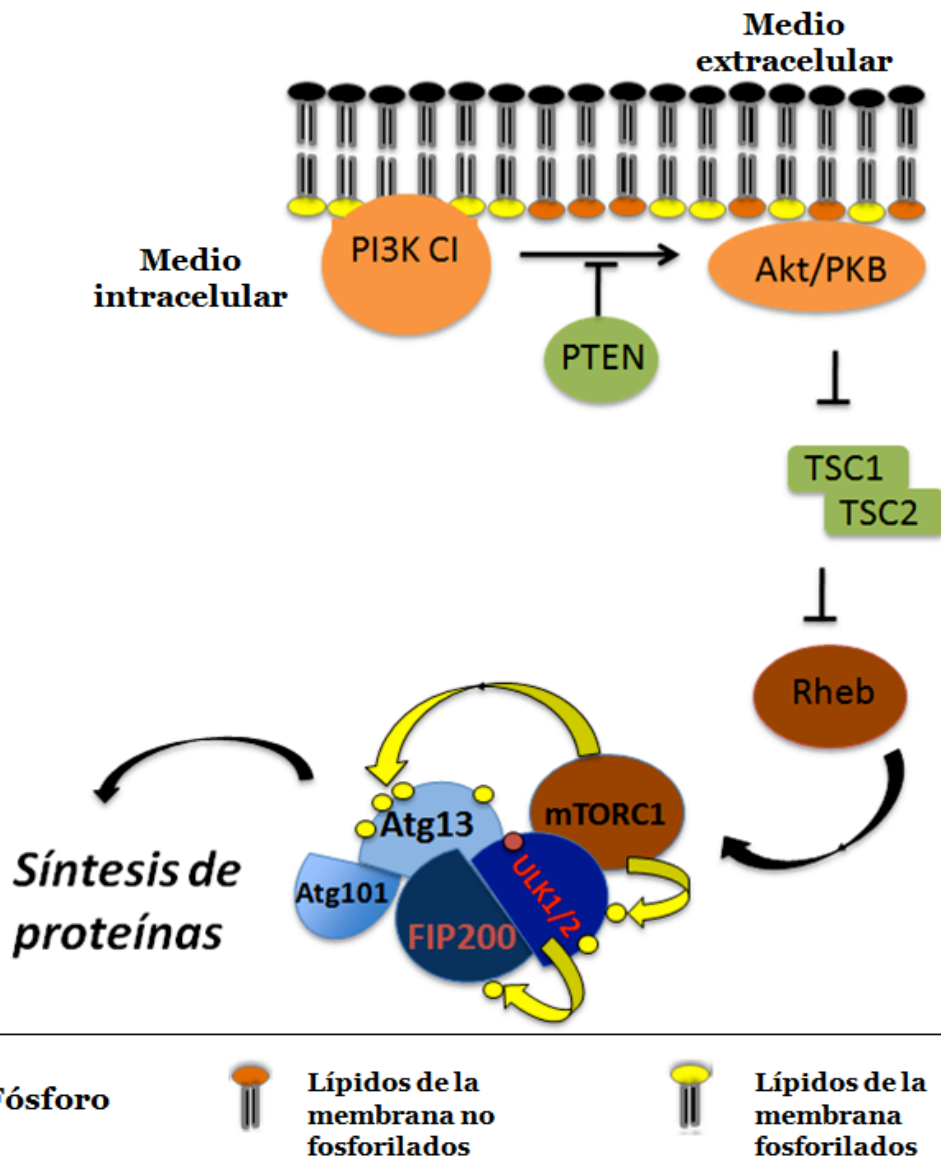
directamente para la formación de los autofagosomas. Estudios recientes sugieren que las membranas derivan del complejo de Golgi, las mitocondrias, y de la membrana plasmática también puede contribuir a la formación de los autofagosomas (Mizushima, *et. al.*, 2011; Ravikumar, *et. al.*, 2010). Por lo tanto, la formación de estos autofagosomas probablemente implique procesos múltiples y complejos, debido a que la célula se encuentra en un estado quiescente en el que se detiene la síntesis de macromoléculas para hacer un consumo mínimo de energía.

### **La iniciación de la formación del autofagosoma**

La inducción del proceso de autofagia está estrechamente controlado por un complejo mecanismo regulatorio que involucra la activación de diversas señales, incluyendo cambios en los niveles de los nutrientes, los factores de crecimiento, las hormonas, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, los niveles de ATP, la hipoxia, la acumulación de proteínas mal plegadas, entre otras cosas. Muchas de estas señales convergen a nivel del mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). mTORC1/TOR está formado por: mTOR, la proteína regulatoria asociada a mTORC1/TOR (raptor: regulatory associated protein of mTOR), proteína con dominio DEP que interactúa con mTORC1 (Deptor: DEP-domaincontaining mTOR-interacting protein), sustrato de Akt/PKB rico en prolinas de 40 kDa (PRAS40: proline- rich AKT substrate 40 kDa) y G $\beta$ L (G-protein  $\beta$ -subunit-like protein) (Wirawan E., *et al.*, 2011).

En condiciones ricas de nutrientes y cuando los aminoácidos y factores de crecimiento están presentes se inhibe la señalización del proceso de autofagia, por lo que PI3K de clase 1(class I phosphatidylinositol-3-kinase) recluta a Akt/PKB unido a los lípidos de la membrana plasmática que están fosforilados. Akt/PKB a su vez inhibe a TSC1 y TSC2, los cuales forman un heterodímero estable, los cuales también regulan a la proteína G pequeña Rheb. La inhibición de TSC1/2 también inhibe Rheb, por lo que mTORC1/TOR se encuentra activo, y el proceso de autofagia se encuentra inactivo. mTORC1/TOR regula una gran variedad de respuestas celulares, tales como el crecimiento celular, la proliferación, la síntesis de proteínas y la autofagia. Cuando

mTORC1 se activa, ULK1 o ULK2 (uncoordinated-51 (unc-51)-like kinase 1 or 2) y Atg13 se fosforilan y se unen al complejo ULK/Atg1, el cual a su vez se une a mTORC1. Esto inhibe el proceso de autofagia. El complejo ULK/Atg1 está compuesto por ULK1 o ULK2, Atg13, proteínas FIP200/Atg17 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa) y Atg101 (Wirawan E., *et al.*, 2011) (Fig. 3).



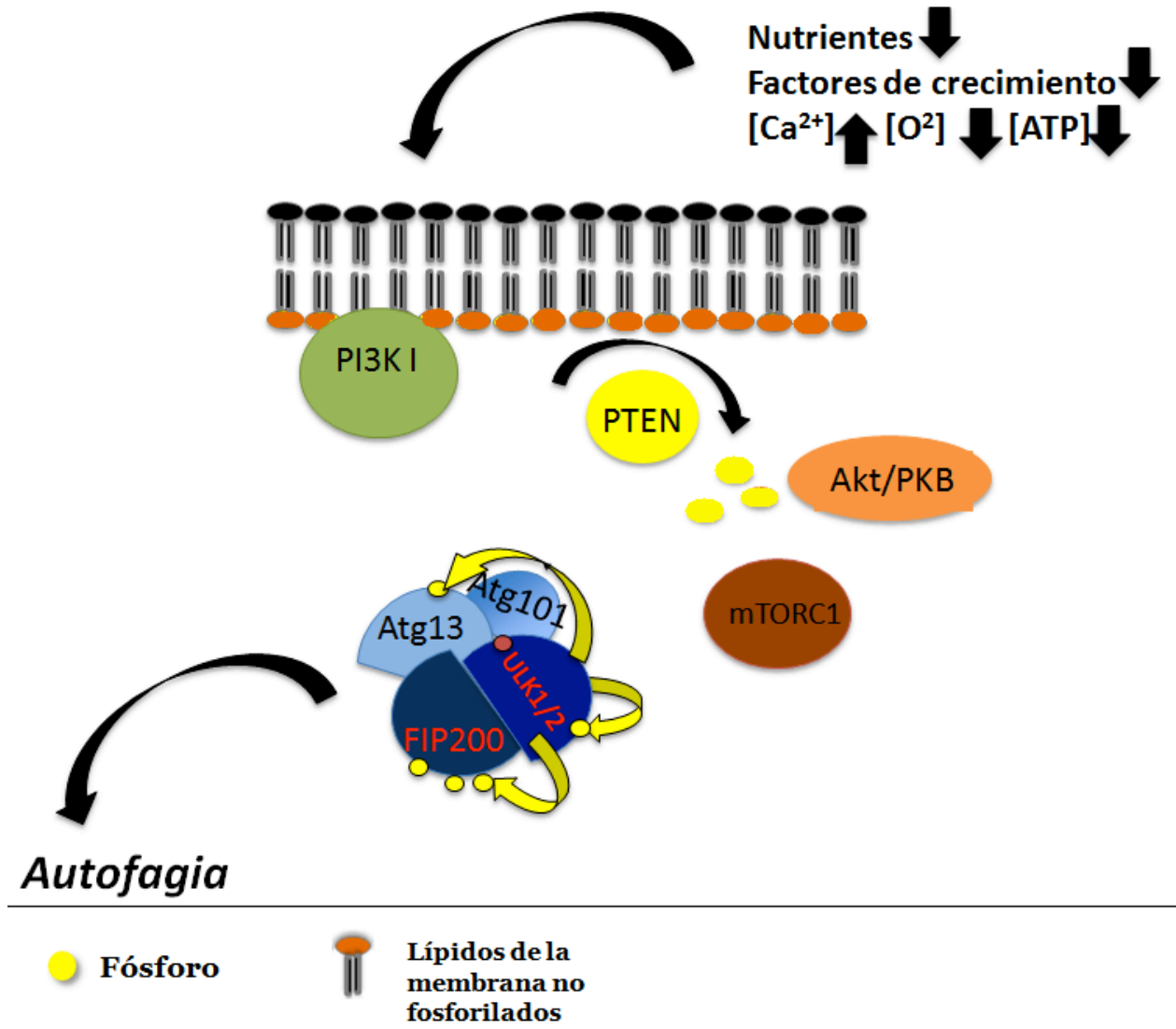
**Figura 3: Vía de señalización de PI3K de clase I**

Cuando la célula se encuentra en un medio rico en nutrientes y condiciones favorables el complejo mTOR inhibe el proceso de la autofagia, funcionando como

un regulador negativo de este proceso. En esta vía PI3K de clase 1 recluta a Akt/PKB uniéndolo a los lípidos de la membrana plasmática que están fosforilados. Akt/PKB a su vez inhibe a TSC1 y TSC2, y esto inhibe la función de la proteína G pequeña Rheb. Esto permite que el complejo mTORC1/TOR se encuentre activo, y el proceso de autofagia se encuentre inactivo. Las flechas amarillas indican los lugares donde están ocurriendo fosforilaciones (tomado y modificado de Knowles, *et al.*, 2009).

Bajo condiciones de inanición o cualquier otra señal que active el proceso de la autofagia, la proteína PTEN desfosforila los lípidos de la membrana plasmática e inhibe a Akt/PKB, por lo que el heterodímero TSC1/2 se activa, y a su vez activa a Rheb que inactiva a mTORC1/TOR. Cuando mTORC1 se inactiva, se disocia del complejo ULK/Atg1, promoviendo la actividad de ULK/Atg1 y la hiperfosforilación de FIP200/Atg17 (Fig. 4). El rol exacto del complejo ULK/Atg1 no ha sido completamente descubierto. Sin embargo recientes datos demuestran que está involucrado en la propia localización de otro importante complejo inductor de la autofagia, que es el complejo PI3K de clase 3 (phosphatidylinositol-3-kinase class-III). En condiciones ricas de nutrientes el PI3K C3 se une al citoesqueleto. Esta interacción la regula Ambra1 (activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy 1), la cual se une tanto a PI3K C3 como al complejo motor de microtúbulos asociados a Dineina. Durante la privación de nutrientes, ULK1 fosforila a Ambra1, con lo que se libera tanto Ambra1 como al complejo PI3K C3 de los microtúbulos y con esto se permite que PI3K C3 se relocalice en el retículo endoplásmico, al cual se considera como el principal organelo que contribuye a la formación de la membrana de los autofagosomas. En levaduras, el complejo Atg1 (ortólogo de ULK1) está implicado en la regulación de la localización del complejo de proteínas de clasificación vacuolar 34 (homóloga de PI3K C3), el cual tiene como blanco a Atg13 que más tarde será el sitio de formación del Autofagosoma, llamado “Sitio de ensamblaje del Fagóforo” (PAS: phagophore assembly site) o Preautofagosoma. En adición, ULK1 tiene un papel importante en la regulación del tráfico de mAtg9, que es una proteína transmembranal encargada de expandir la

membrana, que se recicla entre la red Trans-Golgi (TGN) y los compartimientos endosomales en condiciones basales (Mizushima, N., *et al.*, 2011) (Fig. 4).



**Figura 4: Esquema de los complejos proteicos en condiciones de inanición.**

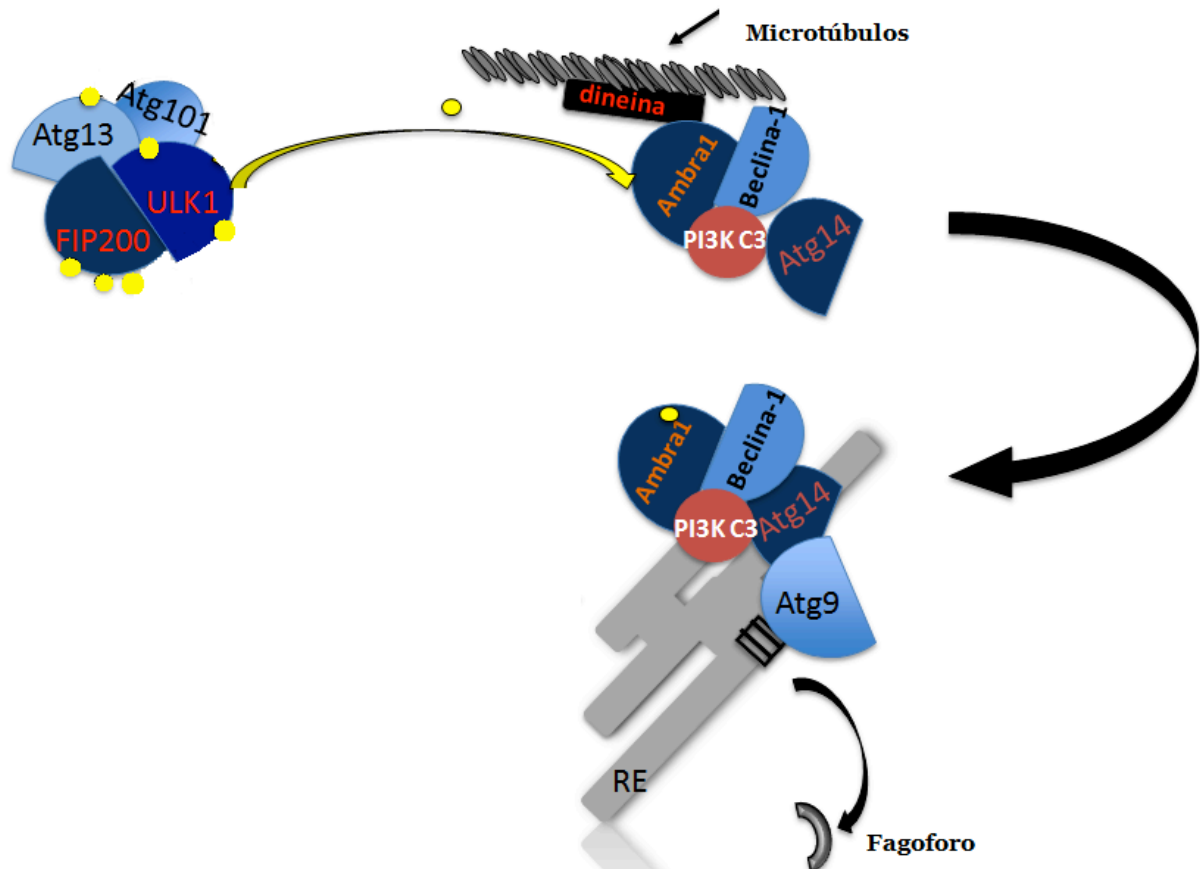
Cuando la célula es sometida a algún tipo de estrés como la inanición o cualquier otra señal que active el proceso de la autofagia, la proteína PTEN desfosforila los lípidos de la membrana plasmática, esto libera a Akt/PKB y la inhibe, por lo que el heterodímero TSC1/2 se activa, y a su vez activa a Rheb que inactiva a mTORC1/TOR. Cuando mTORC1 se inactiva, se disocia del complejo ULK/Atg1,

promoviendo la actividad de ULK/Atg1 y la hiperfosforilación de FIP200/Atg17. Las flechas amarillas indican los lugares donde están ocurriendo fosforilaciones (tomado y modificado de Knowles, *et al.*, 2009).

Durante la privación de nutrientes, en levadura Atg9 se recluta para el crecimiento del Autofagosoma, ya que es la que transporta los lípidos necesarios para el alargamiento de la membrana (Webber & Tooze, *et al.*, 2010). En levadura después de la inanición, y la depleción de Atg1, el reciclaje de Atg9 hacia el PAS se restringe. En mamíferos, se encontró que existe un reciclaje de Atg9m desde el TGN hasta la periferia del endosoma durante la inanición (Webber & Tooze, *et al.*, 2010; Mari, *et al.*, 2010)

Después de que se induce la autofagia, se procede a la formación de los autofagosomas. La biosíntesis de autofagosomas puede estar dividida en tres procesos principales: la nucleación de la vesícula, la elongación y la maduración.

PI3K C3, p150, Ambra1 y la proteína que interacciona con Bcl-2 (Beclina-1/Bcl-2-interacting protein) forman el centro del complejo PI3K C3, el cual promueve la unión de Atg14L. Dentro de este complejo, Beclina-1/Atg6 constituye una plataforma para la unión de varios factores que regulan la actividad cinasa de PI3K C3. PI3K C3 genera fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P), el cual recluta más proteínas Atg en el sitio de formación del Autofagosoma, un proceso llamado nucleación del Autofagosoma (Wirawan, *et al.*, 2011) (Fig. 5).



● Fósforo

**Figura 5: Señalización molecular durante la nucleación del proceso de autofagia.**

Esquema de complejos proteicos durante la nucleación del proceso de autofagia. Durante la privación de nutrientes y después de que el complejo ULK (ULK1, Atg13, FIP200 y Atg101) es activado, este fosforila a Ambra1, con lo que se libera tanto Ambra1 como al complejo PI3K C3 de los microtúbulos y con esto se permite que PI3K C3 se relocalice en el retículo endoplásmico. ULK1 también regula el tráfico de mAtg9, encargada de expandir la membrana del Fagoforo. RE: retículo endoplasmico. Las flechas amarillas indican los lugares donde están ocurriendo fosforilaciones (tomado y modificado de Wirawan, *et al.*, 2011; Webber & Tooze, 2010).

## La elongación y la maduración del autofagosoma

Dos sistemas de conjugación tipo ubiquitinación participan en la expansión de la membrana del autofagosoma.

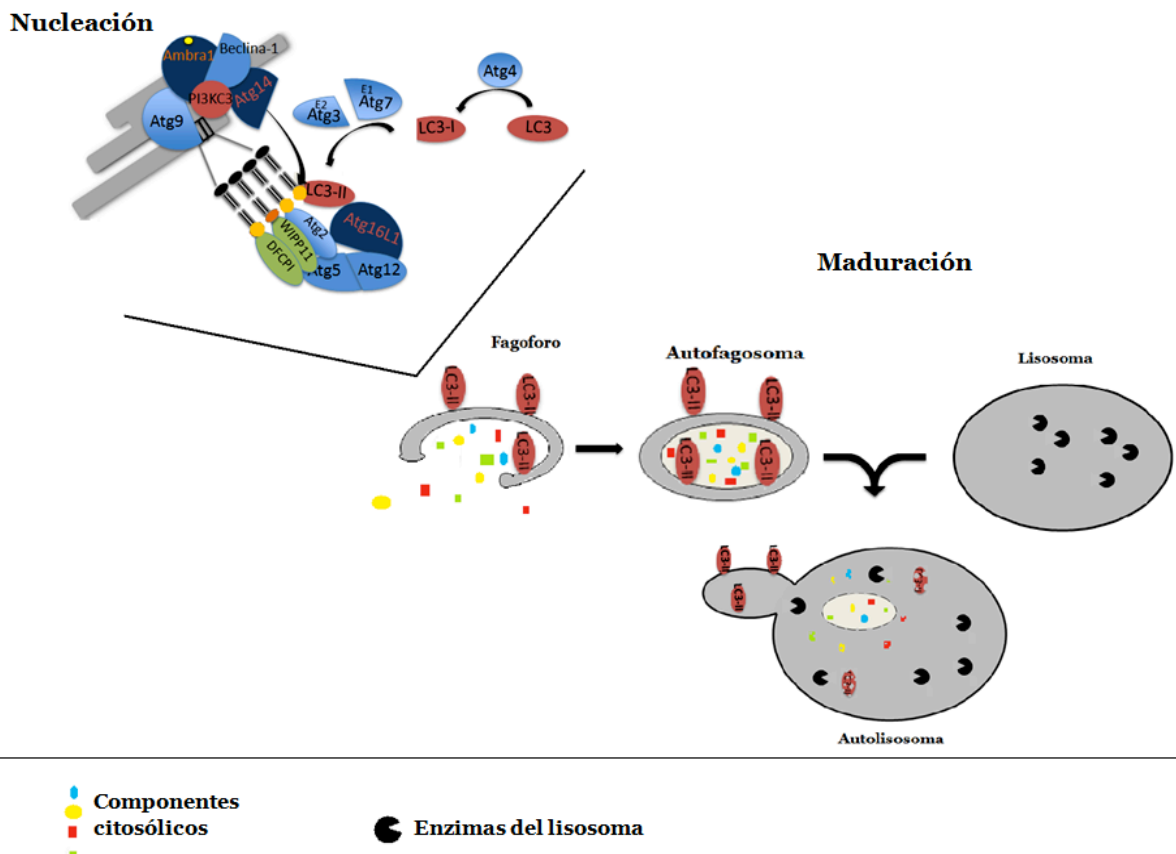
En el primer sistema Atg12 se activa por Atg7, la cual es una enzima homóloga a E1 activadora de ubiquitinas. Atg7 se encarga de activar a Atg12 en un proceso dependiente de ATP. Luego Atg12 se transfiere a Atg10 por Atg3. Atg3 es una proteína conjugadora análoga a la enzima E2 que conjuga ubiquitina. Posteriormente, Atg12 se une covalentemente a Atg5. Las proteínas conjugadas Atg12-Atg5 también interactúan con Atg16L para formar un trímero, el cual consecuentemente se homodimeriza para formar un gran complejo multimérico. Este complejo Atg16L se asocia transitoriamente con la membrana externa del autofagosoma en crecimiento, esto determina la curvatura de la estructura (Mizushima, *et al.*, 2008).

El complejo Atg16L también actúa como una enzima tipo E3 ligasa, que permite la segunda conjugación en la que se lipida a la proteína LC3-I, para así poder completar la formación del autofagosoma. Esta segunda conjugación tipo ubiquitinación involucra la lipidación de LC3-I (microtubule-associated light chain-3), que se requiere para la formación de la membrana del autofagosoma; su homólogo en levadura es Atg8 (Autophagy-related protein 8). Esta proteína posteriormente se corta por Atg4, una cistein-proteasa, con lo que se expone una glicina de la región C-terminal. Después de la acción combinada de Atg7, Atg3 (enzima tipo E2) y el complejo ATG16L1 (E3-ligasa), LC3-I finalmente se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) para producir LC3-PE, llamado LC3-II (Atg8-PE en levaduras). En contraste con LC3-I, LC3-II se localiza específicamente en la membrana del Autofagosoma, por lo que es ideal como un marcador específico del proceso de autofagia (Wirawan, *et al.*, 2011; He & Klionsky, 2009).

Al finalizar la formación de la vesícula, Atg4 elimina LC3-II de la membrana externa del autofagosoma en un proceso llamado desconjugación. Sin embargo, LC3-II

permanece asociado con la membrana interna del autofagosoma y se degrada parcialmente después de la fusión con el lisosoma (He & Klionsky, 2009).

Una vez que la formación del autofagosoma se completa, esta estructura se dirige a los lisosomas a través de los microtúbulos. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma liberando al autofagosoma, que ahora solo consta de la membrana interna, en el lumen lisosomal (cuerpo autofágico). Una vez que el cuerpo autofágico entra al lisosoma, se desintegra su membrana interna liberando la carga, la cual es degradada por las hidrolasas lisosomales. Posteriormente, los transportadores de flujo lisosomal, por ejemplo, Atg22 en levadura (ortólogo en mamíferos aún no identificado), median la liberación de los aminoácidos, los ácidos grasos y los nucleósidos resultante, los cuales también son devueltos al citosol (Wirawan, *et al.*, 2011; He & Klionsky, 2009). (Fig. 6).





### **Figura 6: Señalización molecular durante la nucleación y maduración del autofagosoma en el proceso de autofagia.**

Durante los últimos pasos de la autofagia PI3K C3, Ambra1 y Beclina-1 promueven la unión de Atg14L. PI3K C3 genera fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P), el cual recluta más proteínas Atg en el sitio de nucleación del autofagosoma. Una vez que se agrupan las proteínas que participan en este proceso, primero se forma el complejo trimérico Atg12-Atg5-Atg16 que se asocia transitoriamente con la membrana externa del autofagosoma en crecimiento, esto determina la curvatura de la estructura. Posteriormente ocurre la lipidación de LC3-I con fosfatidiletanolamina (PE) para producir LC3-II que se localiza específicamente en la membrana interna y externa del Autofagosoma. Todo esto se lleva a cabo con la ayuda de las proteínas Atg4, Atg7, Atg3 y el complejo Atg12-Atg5-Atg16. LC3-II se requiere para el crecimiento del autofagosoma que está en formación. Una vez que la formación del autofagosoma se completa, esta estructura se dirige a los lisosomas a través de los microtúbulos. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma liberando la membrana interna que encierra los componentes citosólicos dentro del autolisosoma. Posteriormente se desintegra su membrana interna liberando la carga, la cual es degradada por las hidrolasas lisosomales para así reciclar las macromoléculas (tomado y modificado de Wirawan, *et al.*, 2011; Webber & Tooze, 2010).

### **La proteína LC3-II es el marcador característico de la autofagia**

De todas las proteínas que participan en la autofagia LC3-II es la única que se asocia específicamente con la membrana interna del autofagosoma. La proteína LC3-I es una proteína pequeña de 16-18 kDa soluble que se distribuye ubicuamente en los tejidos y en los cultivos celulares de mamíferos en condiciones ricas de nutrientes y es el marcador específico ideal para estudiar el proceso de autofagia. Para monitorear este proceso se observa la conversión de LC3-I a LC3-II mediante *immunoblot* ya que la cantidad de LC3-II correlaciona claramente con el número de autofagosomas y por

consiguiente un aumento en la relación entre la LC3-II y la LC3-I indica un incremento de la autofagia en un momento dado. Basados en la importancia del procesamiento de LC3 para que se lleve a cabo la formación de los autofagosomas, existen anticuerpos ampliamente utilizados en la técnica de western-blot para monitorear la autofagia. LC3-I y LC3-II se pueden distinguir fácilmente en base a su movilidad diferencial en geles de acrilamida SDS-PAGE, ya que a pesar de un aumento en el peso molecular de LC3-II, esta proteína migra más rápidamente en los geles de acrilamida SDS-PAGE en comparación con LC3-I, y esto se debe probablemente a la mayor hidrofobicidad asociada al grupo PE (Mizushima & Yoshimori, 2007). Cabe señalar que LC3 se expresa como tres isoformas en células de mamífero, LC3A, LC3B y LC3C, pero sólo LC3B-II se correlaciona con el aumento de los niveles de vesículas autofágicas, y por lo tanto, se recomienda el uso de anticuerpos anti-LC3B-II para el análisis, el cual reconoce de los aminoácidos 25 a 74 de la proteína LC3B-II (Kimura, *et al.*, 2007).

Sin embargo la LC3-II se degrada una vez que el autofagosoma se fusiona al lisosoma. Así que para complementar los resultados de el *immunoblot*, en cultivos celulares se emplean inhibidores de proteasas del lisosoma como la pepstatina A o se modifica el pH ácido a básico empleando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  con lo cual se inhibe la degradación del contenido del lisosoma y se facilita la detección de LC3-II (Mizushima & Yoshimori, 2007). Otra de las herramientas utilizadas para monitorear la inducción y la maduración del autofagosoma es el uso de los plásmidos que llevan a la proteína GFP o RFP fusionada a LC3-II. En este sistema se mide el recambio de LC3-II ya que las proteínas LC3-II fusionadas a GFP se degradan en el lisosoma, mientras que las proteínas LC3-II fusionadas a RFP no son degradadas. Esta es una herramienta útil para estudiar la autofagia en células en cultivo (Kimura, *et al.*, 2007).

Por otro lado la autofagia se descubrió utilizando microscopia electrónica hace más de 50 años, herramienta que sigue siendo útil para observar la formación de autofagosomas y corroborar su identidad inmunolocalizando LC3-II en su membrana (Eskelinen, *et al.*, 2011). La microscopia electrónica se ha utilizado recientemente para identificar regiones del retículo endoplásmico que probablemente sean el origen de los

autofagosomas en células de mamífero (Hayashi-Nishino, *et. al.*, 2009; Yla-Anttila, *et. al.*, 2009a). La ME caracteriza cualitativamente estructuras de la autofagia, como lo son los autofagosomas, los cuales son estructuras de doble membrana que contienen en su interior la carga citoplasmática morfológicamente intacta, o autolisosomas, que son estructuras con una sola membrana que contienen la carga citoplasmática parcialmente degradada. Sin embargo, esta subclasificación del proceso de autofagia requiere de mucha experiencia para poder identificar las características estructurales de los autofagosomas o autolisosomas, lo cual no siempre es fácil y en ocasiones conduce a la identificación errónea de estas estructuras (Eskelinen, 2008).

Tal vez la mayor crítica a la microscopía electrónica para analizar la autofagia es que no es objetivamente cuantitativa. Se han hecho algunos esfuerzos para cuantificar la autofagia por ME, por ejemplo, midiendo la relación de autofagosomas y autolisosomas (Yla-Anttila, *et. al.*, 2009b), pero de nuevo, esto depende de la experiencia de quien lo realiza para identificar las estructuras autofágicas. Así, mientras ME sigue siendo una herramienta importante para tener un enfoque cualitativo y poder monitorear la autofagia, se necesitan de técnicas adicionales en conjunto con ME para cuantificar los niveles del flujo de la autofagia.

En adición a la microscopía electrónica, estudios anteriores de la autofagia se basaron en gran medida en la tinción celular y microscopía de fluorescencia. En particular, la sobre-expresión de GFP-LC3, en la que la GFP (proteína verde fluorescente) se expresa como una proteína fusionada en el extremo amino de LC3, esto se utilizó ampliamente para medir la autofagia (Kadowaki & Karim, 2009). Estos estudios se limitaron, sin embargo, por varias cuestiones: (a) contar estructuras marcadas con GFP-positivas con el fin de cuantificar los niveles relativos de la autofagia es una tarea laboriosa y podría decirse que subjetiva, incluso utilizando algún software especializado; (b) la sobreexpresión de la GFP-LC3 puede originar la formación de agregados de proteína independientes de la autofagia; (c) procedimientos de transfección utilizados para introducir GFP-LC3 exógena, se ha demostrado que inducen la autofagia; (d) la GFP-LC3 es sensible a pH ácido y pierde su fluorescencia

una vez que los autofagosomas se fusionan con los lisosomas, lo que resulta en la incapacidad de mirar las etapas finales de la autofagia (Kuma, *et al.*, 2007; Kimura, *et al.*, 2007). Por estas razones, se prefiere la detección de la proteína endógena LC3B-II por inmunofluorescencia. Al igual que con la medición de el procesamiento de LC3B-II por Western blot, esto debe ir acompañado de controles que muestran los niveles de los autofagosomas con LC3-II positivos en células en las cuales se ha inducido la autofagia por medio de reguladores críticos de este proceso.

### **La autofagia como respuesta de defensa ante las infecciones bacterianas y la producción de TFP**

Con respecto a infecciones bacterianas, se ha reportado que durante la infección con *Listeria monocytogenes* se induce la autofagia la cual controla el crecimiento de la bacteria. *L. monocytogenes* produce la TFP listeriolisina O y su expresión se requiere para inducir autofagia (Yano, *et al.*, 2008). Se ha reportado que la TFP citolisina de *Vibrio cholera* modula la autofagia de células CHO y CaCO-2 como un mecanismo de defensa contra esta toxina y que la inhibición de la autofagia impide la supervivencia de las células CaCO-2 a la intoxicación de esta toxina (Gutiérrez, *et al.*, 2007).

Otro ejemplo la participación de la autofagia en respuesta a una TFP es el de la toxina del cólera, en donde utilizando células HeLa se demostró que la membrana plasmática contribuye a la formación de los autofagosomas. En estos procesos participan la proteína Clatrina y la proteína Atg16L1 (Ravikumar, 2010).

## Antecedentes

El proceso de autofagia se encuentra conservado desde levaduras hasta mamíferos. Con base en los genomas descritos para los Lepidópteros se conocen homólogos de la mayoría de los genes *Atg* que se regulan durante la metamorfosis y la inanición (*Tettamanti et al., 2011*). *Bombyx mori*, es un lepidóptero del cual ya se ha secuenciado completamente su genoma y en el cual se han identificado los homólogos de los genes *Atg* descritos en levadura. Con respecto a *M. sexta* que es el insecto modelo que estudiamos en este proyecto, los antecedentes que se conocen del proceso de autofagia en este insecto indican la presencia de vesículas autofágicas durante el desarrollo de la larva en células de los músculos intersegmentales (Franzetti, E., *et. al*, 2012). Aunque en *M. sexta* su genoma no se tiene completamente secuenciado, se cuentan con los bancos de EST en donde se realizó una búsqueda que mostró la existencia de varios transcritos *Atg* que incluyen a el gen *atg8/LC3*. Nuestros resultados preliminares indicaron que este gen se expresa en el intestino de *M. sexta* en condiciones basales y en la respuesta a la intoxicación con Cry1Ab (datos no publicados).

Así pues utilizando la secuencia de la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (LC3) de humano (*Atg8* en levadura) que es un marcador de autofagia comúnmente usado para seguir este proceso, se hizo una búsqueda en la base de datos del NCBI, usando el programa BLAST y se encontró la correspondiente proteína del lepidóptero *B. mori* (*Atg8*). Con la secuencia de DNA del gene *atg8* se exploró la base de datos de EST de *M. sexta* y se encontró EST (IC7130AfEcon1682) con alta identidad a *atg8* de *B. mori*.

Se analizó el porcentaje de identidad entre la proteína *Atg8* de *M. sexta* con otros organismos y se confirmó que estas proteínas están muy conservadas entre los

diferentes organismos analizados, obteniendo un 99% de identidad entre *M. sexta* y *B. mori*, y un 90% de identidad entre *M. sexta* y humano.

```

M. sexta MKFQYKEEHSFEKRRKTEGEKIRRKYPDRVPVIVEKAPKARLGDLDDKKKYLVPSDLTVGQF 60
B. mori  MKFQYKEEHSFEKRRKAEGEKIRRKYPDRVPVIVEKAPKARLGDLDDKKKYLVPSDLTVGQF 60
humano   MKFVYKEEHPFEKRRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARIGDLDDKKKYLVPSDLTVGQF 60
          ***  *****_*****:;*****:*****:*****:*****:*****:*****
M. sexta YFLIRKRIHLRPEDALFFFVNNVIPPTSATMGSLYQEHHDDEFFLYIAFSDENVYGF- 117
B. mori  YFLIRKRIHLRPEDALFFFVNNVIPPTSATMGSLYQEHHDDEFFLYIAFSDENVYGN- 117
humano   YFLIRKRIHLRAEDALFFFVNNVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDESIVYGL- 117
          *****_*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

**Figura 7: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Atg8 de *M. sexta* y *B. mori* y LC3 de humano.**

Se analizó el porcentaje de identidad entre las proteínas Atg8 de *M. sexta* y *B. mori* y la proteína LC3 de humano mediante un triple alineamiento con las secuencias de los aminoácidos, obteniendo un 99% de identidad entre *M. sexta* y *B. mori*, y un 90% de identidad entre *M. sexta* y humano. (.) representa aminoácidos del mismo tamaño; (: ) representa los cambios de aminoácidos que son sinónimos; (\*) representan los aminoácidos que son iguales en las tres secuencias. El alineamiento se hizo con ClustalW2 en [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk).

Analizar el papel que juega la autofagia en *M. sexta* ante la intoxicación a bajas concentraciones de la toxina Cry fue uno de nuestros objetivos ya que se ha propuesto que el mecanismo de acción de la toxina de Bt es similar al de otras TFP. Hasta el momento no se ha reportado si en las células del intestino medio de lepidópteros, la autofagia se induce en respuesta a la intoxicación con las toxinas Cry, pero La función de este proceso podría estar involucrada con la supervivencia del organismo.

Un conocimiento más profundo de los procesos que regulan la respuesta a la intoxicación puede contribuir a un diseño de estrategias adecuadas para el uso de las toxinas Cry como bioinsecticidas, así como la posibilidad de incrementar su toxicidad.

La evidencia experimental muestra que las TFP desencadenan la señalización y los mecanismos de defensa a partir de que se forma el poro y se movilizan iones a través de la membrana plasmática de la célula. Para demostrar si la autofagia desencadenada por la Cry1Ab depende de la actividad de la toxina y la formación del poro, contamos con mutantes de Cry1Ab no tóxicos como la mutante R99E y la mutante E129K, las cuales se ha demostrado que son incapaces de formar poros en la membrana plasmática (Rodríguez-Almazán, *et al.*, 2009). Estas herramientas fueron muy útiles para definir si al igual que con otras TFP, se requería del poro para que Cry1Ab indujera la autofagia.

## Hipótesis

Si la autofagia desempeña un papel relevante en la supervivencia de las larvas de *M. sexta* cuando se intoxican con concentraciones subletales de la toxina Cry1Ab, entonces la inhibición de la autofagia, silenciando el gen *atg8*, provocará mayor sensibilidad de la larva *M. sexta* a la toxina Cry1Ab.

## Objetivo general

Determinar si la autofagia se induce en respuesta a la intoxicación con la toxina Cry1Ab en las células del intestino medio de las larvas de *M. sexta* y si está involucrada en la supervivencia del organismo.

## Objetivos particulares

- Analizar el cambio de la proteína Atg8 a su forma conjugada Atg8-PE, como marcador del proceso de autofagia, a diferentes dosis de la toxina Cry1Ab en intestinos de larvas de *M. sexta*.
- Estudiar el papel del gen *atg8* en las larvas de *M. sexta*, durante la respuesta a la intoxicación con Cry1Ab por medio del silenciamiento específico del gen por dsRNA.
- Analizar si la autofagia se induce con mutantes de la Cry1Ab como la mutante R99E y la E129K. Estas mutantes no matan a las larvas de *M. sexta*.



## Metodología

### Esporulación de *Bacillus thuringiensis*

Para obtener los cristales de Cry1Ab, E129K y R99E se estría una caja de cada cepa en medio sólido LB (Peptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) y eritromicina (10 µg/ml) a partir de un glicerol con la cepa de Cry1Ab/pHT315 de *Bacillus thuringiensis*. Se incuba a 30°C, durante una noche para promover el crecimiento. Posteriormente, se toma una colonia aislada y se estría en medio sólido HCT (Bactotripton 5 mg/ml y casaminoácidos 2 mg/ml, pH 7.25) con eritromicina 10 µg/ml; este medio se adiciona con: Solución I (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 68 mg/ml), Solución II (Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12.3 mg/ml; MnSO<sub>4</sub> 0.17 mg/ml; ZnSO<sub>4</sub> 14 mg/ml), Solución III Fe(SO<sub>4</sub>) 2 mg/ml; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, Solución IV CaCl<sub>2</sub> 14.7 mg/ml y Glucosa 10%. Se incuba a 30°C por 3 días para permitir la esporulación de las bacterias y la producción de los cristales de la toxina Cry1Ab.

Después de transcurridos los tres días de esporulación, se analizan los cultivos al microscopio y se verifica que haya cristales, los cuales tienen una forma romboide muy característica. Posteriormente, los cristales se recuperan para purificarlos.

### Purificación de cristales de Cry1Ab

Para recuperar los cristales, el cultivo se colecta en 10 ml de agua raspando la caja, se centrifuga a 11,000 x *g* durante 10 min, y se lava con agua 3 veces. Posteriormente la pastilla se resuspende en 30 ml de NaCl 0.3M, EDTA (Ethylenediamine tetra acetic acid) 0.01 M, pH 8 y se centrifuga a 11,000 x *g* durante 10 min; con esta solución se lava 3 veces. Por último se lava la pastilla 3 veces centrifugando a 11,000 x *g* durante 10 min, en una solución de PMSF (Phenylmethylsulphonyl Fluoride) 1 mM.

Posteriormente, se resuspende la pastilla en buffer TTN (TTN: 20 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl, Tritón X-100 al 0.1% (Invitrogen)). Esta muestra será utilizada para la purificación de cristales por gradiente de sacarosa, por lo que se resuspende en un máximo de 12 ml de buffer. La muestra se sónica dando 3 pulsos de 50 s a 20 watts con 1min de descanso en hielo entre cada sonicación. A continuación se colocan 2 ml de la muestra sonicada en cada columna preparada con los gradientes discontinuos de sacarosa y centrifugar a 23,000 x *g*, 20 min. a 15°C en la ultracentrífuga, en donde cada gradiente está compuesto por distintas concentraciones de sacarosa para separar los componentes de la muestra y purificar los cristales que contienen a la protoxina Cry1Ab. Las concentraciones de sacarosa utilizadas para formar el gradiente son: 84%, 79%, 72% y 67% adicionados con 400 ul de Tritón X-100 0.1% (Invitrogen), 2 ml Tris-HCl 1 M, pH 8 y 80 ul de NaCl 5 M en cada concentración.

Después de centrifugar se forman fracciones entre las diferentes concentraciones de sacarosa del gradiente. Se recuperan las tres fracciones y observan al microscopio para quedarse con la fracción que contiene los cristales. Generalmente la fracción de la parte superior contienen los cristales más limpios. La fracción recuperada que contiene los cristales se lava 3 veces con 30 ml de H<sub>2</sub>O MQ + tritón 0.01% (Invitrogen) y se centrifugar a 11,000 x *g*. Se resuspende la pastilla en Tris 50 mM pH 8, PMSF 1 mM y se guardan los cristales a 4°C.

## **Solubilización de cristales purificados**

### **(Obtención de protoxina)**

De los cristales purificados como se indica anteriormente, se toman 200 µl (1 mg/ml) y se resuspenden en 200 µl de buffer de carbonatos 5X pH 10.5 con 0.02% de β-mercaptoetanol. Se Incuba 1 h a 37°C y se centrifugar a 14,000 x *g* durante 10-14 min. Posteriormente, se recupera el sobrenadante, que es donde se encuentra la protoxina soluble purificada.

La proteína concentrada se cuantifica con el reactivo Quick Start Bradford Protein Assay kit 1 (Bio-Rad, Hercules, CA). Para revisar la pureza e identidad de los cristales se resuelven en un gel de acrilamida 10% SDS-PAGE y se identifican por western-blot utilizando anticuerpos anti-Cry1Ab (producido previamente en el laboratorio).

### **Bioensayo para determinar la concentración letal media de la toxina**

Para determinar la cantidad, en ng, de proteína que corresponde a una concentración letal (LC) baja, media y alta se realizan bioensayos con cinco concentraciones aproximadas (0.2, 0.4, 1, 2 y 3.6 ng/cm<sup>2</sup>), además de un control al cual no se le pone toxina. En una caja de 24 pozos se contamina la dieta con cada concentración, y posteriormente se colocan larvas neonatas de *M. sexta* que permanecen ahí durante 7 días. Cada concentración se prueba por triplicado. Al término del bioensayo se contabilizan las larvas muertas de cada una de las tres cajas. Estos datos se analizan en un programa (Polo-Plus) que utiliza la función inversa a la función de probabilidad acumulada para interpretar las curvas de dosis-respuesta, y así transfórmalas a rectas. Los datos obtenidos de este programa nos dieron las cantidad probable de proteína que corresponde a LC<sub>10</sub>=0.16 ng/cm<sup>2</sup>, LC<sub>50</sub>=0.8 ng/cm<sup>2</sup>, LC<sub>90</sub>=3.7 ng/cm<sup>2</sup> las cuales fueron utilizadas en los experimentos posteriores.

### **Bioensayo**

Los bioensayos se realizaron con el procedimiento de contaminación de dieta. Este ensayo consiste en contaminar la dieta de los insectos superficialmente con la dosis establecida de toxina Cry1Ab. Se utilizan cajas con 24 pozos. En cada pozo (2 cm<sup>2</sup>) se aplica lo correspondiente a cada LC de proteína soluble en un volumen total de 35 µl. Después de que la superficie está completamente seca, se coloca una sola larva de primer instar en cada pozo. Se utilizan 48 larvas para cada tiempo de la cinética establecida (0, 2, 4, 6, 12 y 24 h) a una dosis LC<sub>10</sub>; lo mismo para una dosis LC<sub>50</sub> y una

LC<sub>90</sub>. También se ponen 24 larvas durante 7 días como controles para analizar el porcentaje de mortalidad (Porta, *et al.*, 2011).

El cese de ingesta de alimento y movimiento fueron considerados como mortalidad, ya que estos signos están relacionados con la intoxicación por Cry1Ab.

### **Western-blot**

Después de terminado el bioensayo de la cinética de intoxicación, se extraen los intestinos de las larvas intoxicadas. Estos intestinos se mantienen en 100 ul de solución CellLytic M Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich) adicionada con inhibidores de proteasas 1 X (Complete Protease Inhibitor Cocktail, una tableta por cada 50 ml de buffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany); después el tejido se homogeniza y se centrifuga a 12,000 x g durante 10 min; se retira el sobrenadante que es donde se encuentra la proteína total extraída de los intestinos de larvas de *M. sexta*. La proteína extraída se cuantifica con el reactivo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA), y 50 ug se resuelven en por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) con urea 6 M-acrilamida 13.5 %. Después del gel SDS-PAGE, las proteínas son electrotransferidas en una membrana PVDF Millipore, Bedford, MA). El bloqueo de la membrana se hace con PBS 1 X, 2.5 % de leche y 0.1% tween por 1 h. Las proteínas Atg8 y Atg8-PE se detectan utilizando el anticuerpo policlonal, hecho en conejo contra la proteína GABARAP y las proteínas utilizadas como controles constitutivos rpS3 se detectan utilizando el anticuerpo anti-rpS3 de *M. sexta* (Aviva Systems Biology), que fueron diluidos 1:1000 en PBS, 0.1% tween, por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incuban por 1 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo HRP-conjugated goat anti-rabbit, diluido 1:10,000 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Finalmente la membrana se lava dos veces por 5 min con PBS, 0.1% tween, y una vez con PBS por 7 min La señal se detecta usando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce, Rockford, Il) y se expone ente un film Hyperfilm

ECL (Healthcare, UK). Los marcadores moleculares usados en todos los geles SDS-PAGE son azules pre-teñidos (Bio-Rad, Hercules, CA).

### **Silenciamiento del gen *atg8* con RNAi**

El silenciamiento de la expresión del gen *atg8*, se lleva a cabo como se describió previamente en Soberón, *et al.*, 2008, por la alimentación de larvas de *M. sexta* neonatas con dsRNA. Para el silenciamiento de la expresión del gen *atg8*, se extrajo el ARNm de larvas de *M. sexta* de primer instar utilizando la solución TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el cDNA fue sintetizado como se describe más abajo. Este cDNA se utilizó como molde para amplificar el producto de PCR utilizando los oligonucleótidos T7-Atg8-F y T7-Atg8-R para el gen *atg8*. Finalmente, el dsRNA se sintetizó por transcripción con la T7 polimerasa como se describe en (Porta & Lizardi, 1995). El dsRNA final es de 218 bp, para *atg8*, y corresponde a la región del gen. Las larvas de *M. sexta* se alimentaron con 4 µg de dsRNA suspendido en un 1 µl de agua. Después de la ingestión del dsRNA, las larvas fueron alimentadas durante 12 h con dieta normal. Estas larvas se utilizaron en bioensayos como se describe anteriormente para determinar su susceptibilidad a Cry1Ab y para llevar a cabo el análisis del mRNA por RT-PCR para confirmar el silenciamiento del gen *atg8*. Las larvas utilizadas como control se alimentaron con 1 ul de agua. Para los bioensayos, las larvas previamente alimentadas con dsRNA, se transfirieron a la dieta contaminada con la proteína Cry1Ab como se describe arriba. Para la detección de *atg8* por RT-PCR, el tejido del intestino medio de las larvas de primer instar se disecan y se extrae el RNA total de cada individuo como se describe abajo. El gen *atg8* se amplificó por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos T7-Atg8-F/T7-Atg8-R (secuencia indicada abajo). La acumulación del mRNA de la proteína ribosomal 3 (rpS3) se usa como control de expresión constitutiva. Los oligonucleótidos de rpS3 se diseñaron basados en una secuencia de cDNA, que amplifican un producto de 268 pb de rpS3 de *M. sexta*.

Oligonucleótido	Secuencia
T7-Atg8-F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGA AAT TCC AAT ACA AAG AAG AAC
T7-Atg8-R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CAG GCC GAA GAT GGA TGC
rpS3-F	CAT CCG CGA GTT GAC TTC GGT CGT C
rpS3-R	GCA ACC GCG CGC TTC AGA CTC C

**Tabla 1: Secuencia de oligonucleótidos.**

Secuencia de los oligonucleótidos usados para amplificar el producto deseado de los genes *atg8* y *spr3*.

### **Análisis del mRNA: Ensayo de RT-PCR**

El RNA total extraído de células intestinales de las larvas de *M. sexta* que fueron intoxicadas con toxina Cry1Ab se usa para la síntesis de cDNA. 2 µg del RNA total y 500 µg de oligonucleótido dT, se calientan por 5 min a 65°C. Los tubos se colocan en hielo y se agrega 1 µl de dNTP's (10 mM), 2 µl de DTT (0.1 M) y 4 µl de buffer 5X. Las reacciones se incuban a 42°C por 2 min y finalmente se agrega 1 µl (200 unidades/µl) de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). La síntesis complementaria de cDNA se realiza a 37°C por 50 min. La reacción se detiene a 70°C por 15 min.

Un volumen de 2 µl de la reacción de cDNA de cadena sencilla se usa para una reacción de PCR en 50 µl. Se agregan 5 µl de buffer 10X, 1.5 µl de MgSO<sub>4</sub> (50 mM), 1 µl de dNTP's, 1 µl de cada oligonucleótido, T7-Atg8-F y T7Atg8-R, y 1 µl de Taq DNA polimerasa para amplificar el cDNA de *atg8*. Una alícuota de 5 µl de producto de PCR se analiza en un gel de electroforesis de agarosa y se observa tiñendo con Bromuro de Etidio. La acumulación de mRNA de *rpS3* se usa como control de expresión constitutiva. Los oligonucleótidos de *rpS3* se designaron basados en una secuencia de cDNA (Accesion Number: U12708).

## **Análisis estadístico**

La mortalidad de las larvas en el ensayo de silenciamiento se analizó estadísticamente con ANOVA seguido de Tukey para comparar, con el programa Prism5.

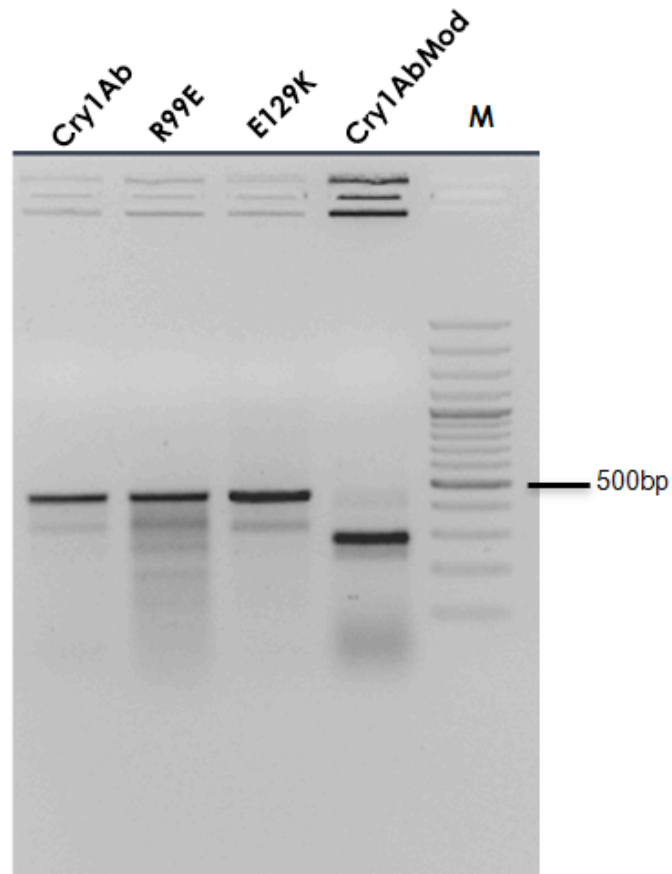
## Resultados

### Obtención de toxina Cry1Ab para la intoxicación de larvas de *M. sexta*

El objetivo de este proyecto fue estudiar si en las larvas de *M. sexta* se inducía la autofagia como una respuesta de defensa a la intoxicación con la toxina Cry1Ab producida por la bacteria entomopatógena *B. thuringiensis*.

Lo primero que se hizo para poder desarrollar los objetivos planteados fue obtener las proteínas con las que se realizarían los bioensayos de intoxicación. Primeramente se crecieron las cepas de *Bacillus thuringiensis* que expresan tanto la proteína Cry1Ab como las toxinas inactivas R99E y E129K. Para comprobar la identidad del gen de la toxina presente en estas cepas se hizo un PCR de colonia con los oligonucleótidos proAbcortro-F y  $\alpha$ 3-R (materiales y métodos), los cuales amplifican desde el promotor hasta una región 300 bp río abajo en el gen de la toxina Cry1Ab silvestre o de sus mutantes, lo que amplifica un fragmento de 500 bp (Fig. 8). Como control de tamaño del producto de PCR también se amplificó con los mismo oligonucleótidos el producto de PCR correspondiente al gen de la toxina Cry1Ab-Modificada a la que le falta parte de la región 5' y por lo tanto tiene un tamaño menor (344 bp). Esta proteína es una toxina activa la cual no requiere de la interacción con el receptor cadherina, ya que por ingeniería genética fue procesada para que al momento de ser liberada en el intestino de las larvas formara el oligómero y se insertara en la membrana.





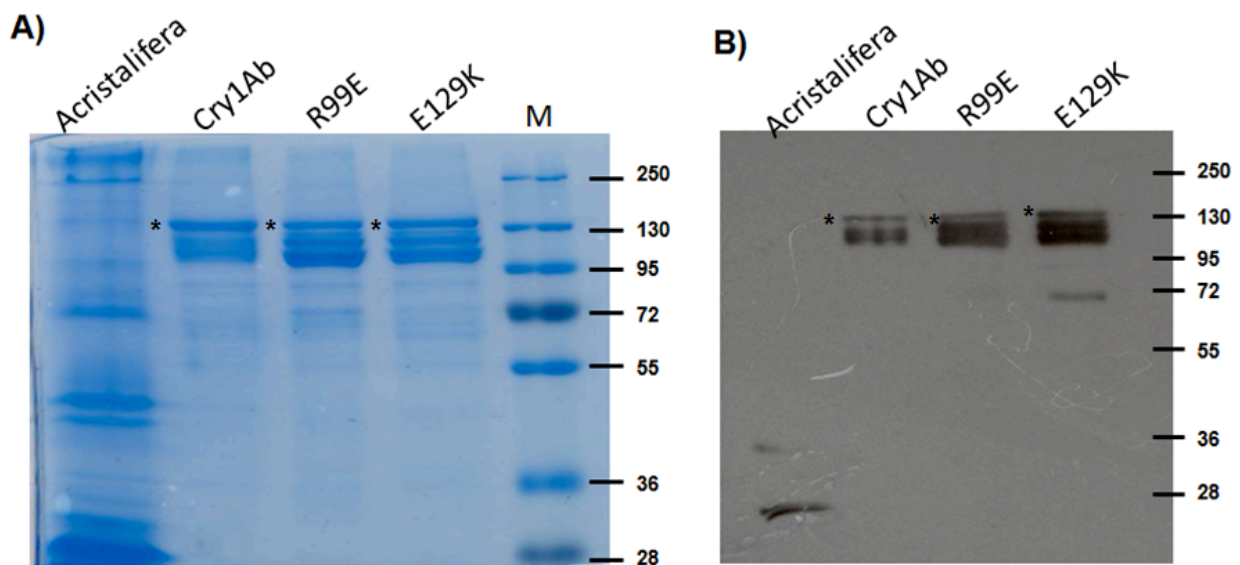
**Figura 8: Análisis de las diferentes cepas de Bt que expresan las proteínas Cry1Ab, R99E y E129K por PCR.**

El análisis de las diferentes cepas de Bt que expresan las proteínas Cry1Ab, R99E y E129K se realizó mediante un PCR de colonia. El tamaño del fragmento de PCR que se amplificó de estas proteínas es de 500 bp. Se utilizó como control de tamaño a la proteína Cry1AbMod, la cual es de menor tamaño (344 bp). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los cuatro fragmentos fueron: proAbcortro-F y  $\alpha$ 3-R. Gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Etidio. M: marcador molecular de 100 bp.

Los productos de PCR que se muestran en el gel anterior se purificaron y se secuenciaron para comprobar las mutaciones (Fig. 8).

Posteriormente, se obtuvieron los cristales de la toxina Cry1Ab silvestre y de las mutantes R99E y E129K. Los cristales se purificaron y solubilizaron, y la integridad de las diferentes toxinas se analizó por medio de un gel de acrilamida desnaturizante y western-blot (Fig. 9). Como control para el análisis de las proteínas se utilizó una muestra de la cepa acristalifera, la cual es una cepa de Bt que tiene la capacidad de esporular pero no forma los cristales que contiene a las toxina Cry, de ahí su nombre de “acristalifera”; esta cepa contiene componentes proteínicos que se pueden observar en el gel de acrilamida desnaturizante, pero al no expresar a las proteínas Cry, en el western-blot no se detecta ninguna banda.

Con las toxinas activa (Cry1Ab) y las inactivas (R99E y E129K), se llevó a cabo la intoxicación de las larvas, tal como se indicó en Materiales y Métodos.



**Figura 9. Análisis de la pureza de las proteínas utilizadas en los bioensayos: Cry1Ab, R99E y E129K.**

Las proteínas utilizadas en los bioensayos fueron purificadas por medio de un gradiente de sacarosa y posteriormente se analizó su pureza y correspondencia. A)

Protoxina solubilizada, obtenida del cultivo de Bt después de la esporulación. Gel de acrilamida 10% SDS-PAGE. Teñido con azul de Coomassie. B) Western-blot 1er anticuerpo Anti-Cry1Ab 1:30,000; 2do anticuerpo goat anti-rabbit 1:30,000 con 3% leche. La banda de 130 kDa, señalada con un asterisco (\*) corresponde al tamaño de la protoxina de Cry1Ab.

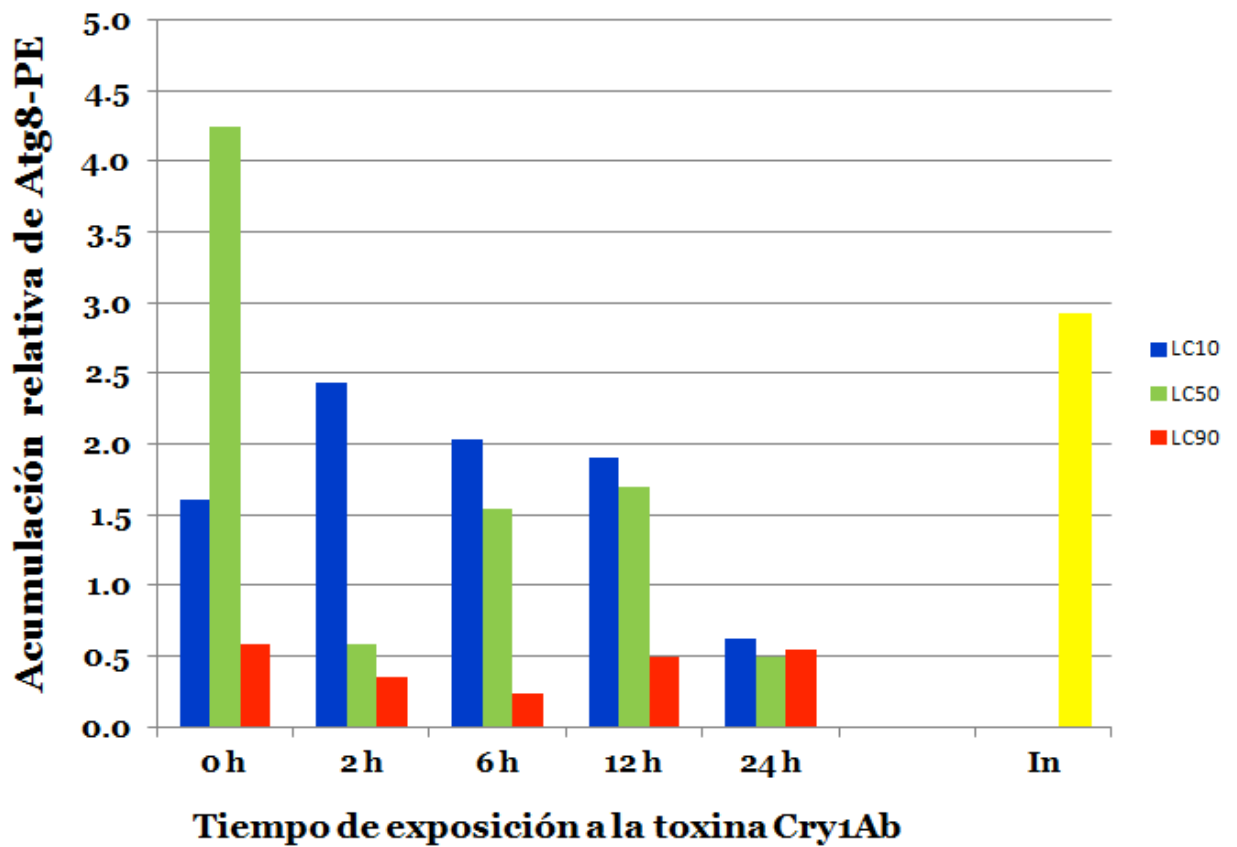
## **Análisis de procesamiento de la proteína Atg8 en respuesta a dosis crecientes de la toxina Cry1Ab**

El primer acercamiento que hicimos para analizar el procesamiento de la proteína Atg8 a su forma lipídica Atg8-PE, fue realizar experimentos de dosis-respuesta y tiempo, en donde larvas neonatas se alimentaron con una LC<sub>10</sub> (0.16 ng/cm<sup>2</sup>), LC<sub>50</sub> (0.8 ng/cm<sup>2</sup>) y LC<sub>90</sub> (3.7 ng/cm<sup>2</sup>) durante 0, 2, 6, 12 y 24 h, para cada concentración. Se utilizaron 24 larvas por cada tiempo en cada concentración. Se utilizaron tres diferentes concentraciones de toxinas para saber ante cuál de ellas las células del epitelio intestinal de las larvas podían activar el proceso de autofagia.

Al terminar el tiempo de cada bioensayo se extrajeron los intestinos de las 24 larvas intoxicadas en cada concentración, y se obtuvo la proteína total. Estas proteínas se resolvieron en un gel de acrilamida al 15% y se analizaron mediante western-blot utilizando el anticuerpo que reconoce a la proteína Atg8 de *M. sexta*, y se analizó el procesamiento de Atg8 en respuesta a la toxina Cry1Ab. Como control de carga se emplearon los anticuerpos contra la proteína ribosomal S3 (rpS3). Este experimento se realizó una vez.

Posteriormente, se realizó una cuantificación densitométrica de las bandas de cada western-blot de Atg8-PE y rpS3 de cada condición utilizando el programa ImageJ; hay que tener presente que para que se considere que el proceso de la autofagia se está induciendo, Atg8-PE debe ser mayor que Atg8 (Fig. 10). El valor, en píxeles, de cada banda correspondiente a Atg8-PE se dividió entre el valor, en píxeles, de cada banda de rpS3 correspondiente, para obtener la relación Atg8-PE/rpS3; se hizo de igual

manera para cada tiempo y para cada concentración con la que se intoxicó a las larvas, LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> (Fig. 10).



**Figura 10: Análisis de la acumulación relativa de Atg8-PE durante la intoxicación con Cry1Ab a diferentes dosis.**

Se analizó la acumulación de la proteína lipídada Atg8-PE durante la intoxicación con tres diferentes dosis de Cry1Ab (LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub>) y a diferentes tiempos (0, 2, 6, 12 y 24 h). Para obtener los valores de los niveles de acumulación de Atg8-PE debidos a la intoxicación, se hizo una cuantificación desintométrica de las bandas de Atg8-PE y rpS3 utilizando el programa ImageJ, y posteriormente se graficaron los valores de la relación Atg8-PE/rpS3. Este experimento se realizó una vez.

En la gráfica se puede observar que la acumulación relativa de Atg8-PE en respuesta a una LC<sub>10</sub> de la toxina Cry1Ab, se incrementa con respecto al tiempo a las 2, las 6 y a las 12 h decayendo abajo del valor del control después de 24 h de intoxicación (Fig. 10; barras Azules). La figura 11-A muestra la imagen del WB sobre la cual se calculó la acumulación de Atg8-PE.

En respuesta a una LC<sub>50</sub> los resultados fueron inesperados ya que observamos una expresión muy elevada al tiempo 0, el cual disminuye considerablemente a las 2 h, aumentando entre las 6 y las 12 h, decayendo abajo de los valores del control después de 24 h de intoxicación. Estos valores son menores comparando con la LC<sub>10</sub> (Fig. 10 Barras Verdes). La figura 11-B muestra la imagen del WB sobre la cual se calculó la acumulación de Atg8-PE.

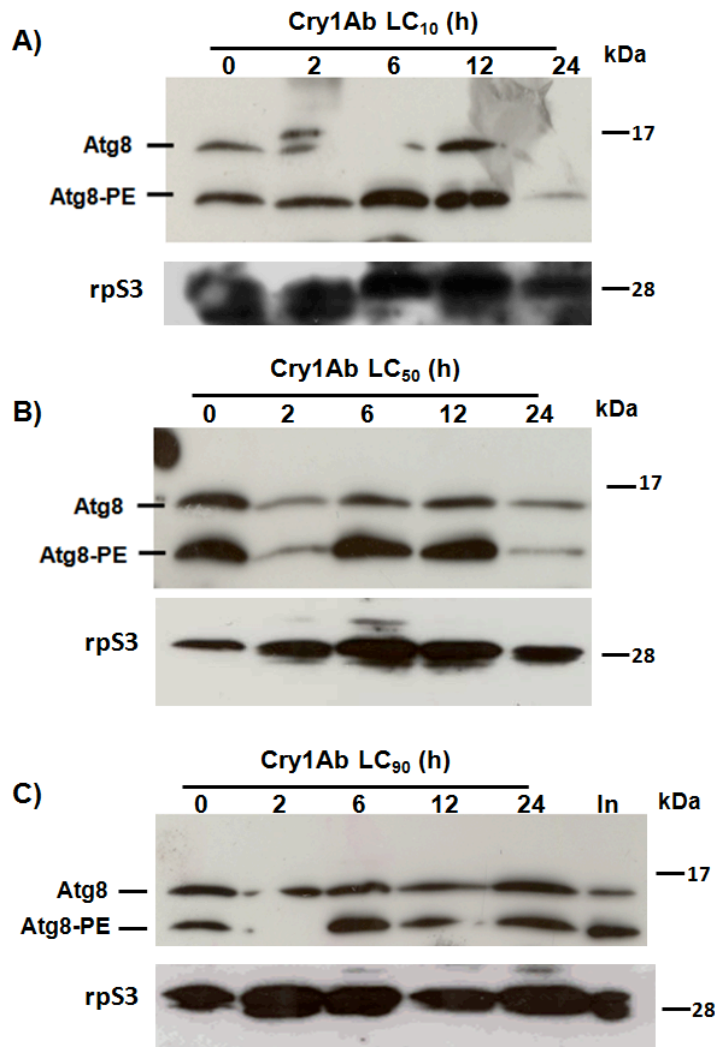
La expresión de Atg8-PE en respuesta a un dosis LC<sub>90</sub> de la toxina Cry1Ab, muestra que el cociente básicamente no cambia a lo largo de este experimento y son los más bajos comparando con la LC<sub>10</sub> y la LC<sub>50</sub> (Fig. 10; barras Rojas). La figura 11-C muestra la imagen del WB sobre la cual se calculó la acumulación de ATG8-PE.

En todos estos bioensayos, como control positivo, se incluyó un bioensayo con larvas neonatas mantenidas en ayuno durante 6 h (Fig. 10; barra amarilla). La figura 11-C muestra la imagen del WB sobre la cual se calculó la acumulación de ATG8-PE.

Es importante observar que en el tiempo 0 h en todas las concentraciones estudiadas, el nivel de procesamiento de Atg8-PE fue muy alto comparado con el tiempo de 2 h de intoxicación, además de que variaba mucho entre los tres diferentes grupos analizados (LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub>), considerando que eran larvas de la misma edad en las mismas condiciones. La elevada y variada lipidación de Atg8-PE en los controles puede deberse a que todos los experimentos se hicieron con las larvas recién nacidas, por lo que cabe la posibilidad de que estuvieran autofágicas por tener hambre y/o como parte del proceso de adaptación al medio ambiente fuera de su huevo.

Dos observaciones importantes se deducen del experimento anterior: la primera es que las larvas de *M. sexta* son capaces de responder induciendo el procesamiento

de Atg8-PE ante la intoxicación con Cry1Ab a una dosis subletal LC<sub>10</sub> y a tiempos cortos, y la segunda es que las larvas de *M. sexta* recién nacidas presentan niveles elevados de Atg8-PE probablemente inducido por inanición o por el estrés relacionado al nacimiento.



**Figura 11: Análisis de la inducción de la lipidación de Atg8-PE durante la intoxicación con Cry1Ab a diferentes dosis (LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub>).**

Para determinar la concentración y el tiempo en el que se induce el proceso de autofagia en *M. sexta* se realizó un análisis de la inducción de la lipidación de Atg8-PE durante la intoxicación mediante western-blot. En este análisis se intoxicaron larvas con tres concentraciones diferentes de toxina. A) Análisis de la lipidación de

la proteína Atg8-PE en larvas neonatas intoxicadas con una LC<sub>10</sub> de Cry1Ab durante 0, 2, 6, 12 y 24 h. B) Análisis de la lipidación de la proteína Atg8-PE en larvas neonatas intoxicadas con una LC<sub>50</sub> de Cry1Ab durante 0, 2, 6, 12 y 24 h. C) Análisis de la lipidación de la proteína Atg8-PE en larvas neonatas intoxicadas con una LC<sub>90</sub> de Cry1Ab durante 0, 2, 6, 12 y 24 h. En los tres experimentos se utilizó la proteína rpS3 como control de carga. Como control positivo del proceso de autofagia se utilizaron extractos de proteína de intestinos de *M. sexta* neonatas que estuvieron 6 horas en inanición al nacer (In). Cada experimento se realizó una vez.

### **Análisis de procesamiento de la proteína Atg8 en respuesta a una dosis baja de Cry1Ab**

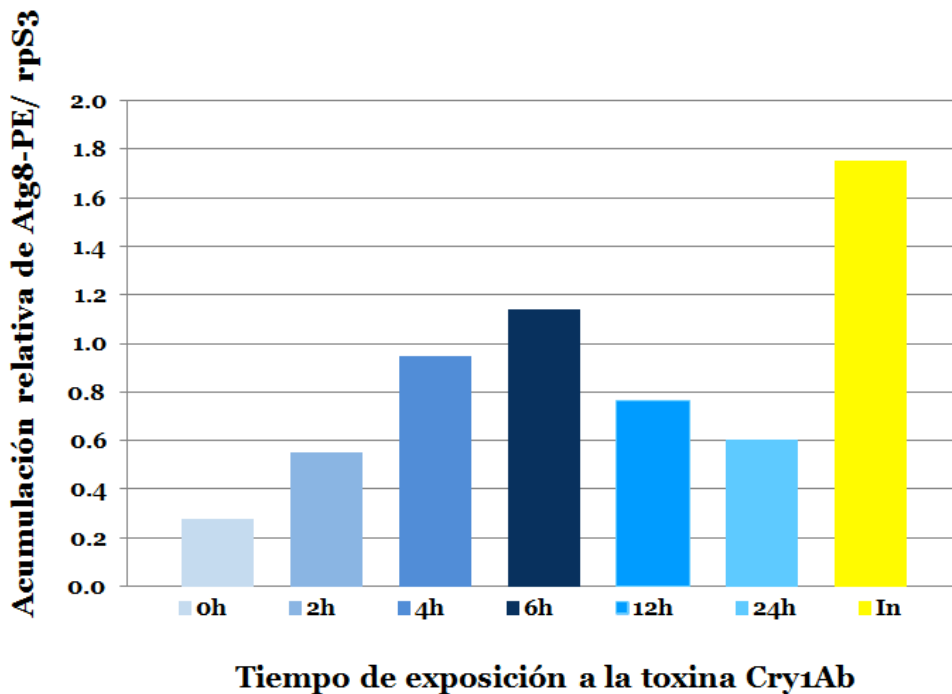
Para evitar la inanición o el estrés debido al nacimiento de las larvas, éstas se alimentaron con una dieta normal durante 24 h, y posteriormente se cambiaron a dieta contaminada con la toxina.

Así, se llevó a cabo el siguiente bioensayo: un grupo de larvas de *M. sexta*, se intoxicaron con una LC<sub>10</sub> de Cry1Ab, y otro grupo de larvas control alimentadas con dieta normal. Se extrajeron los intestinos de cada larva después de 0, 2, 4, 6, 12 y 24 h para cada grupo.

La lipidación de Atg8-PE se analizó en extractos de proteína de los intestinos colectados. Estas proteínas se resolvieron en un gel de acrilamida al 15% y se analizaron mediante western-blot utilizando el anticuerpo experimental contra la proteína Atg8 de *M. sexta* y se analizó el procesamiento de Atg8 en respuesta a la toxina Cry1Ab. Como control de carga se emplearon los anticuerpos contra la proteína rpS3. La cuantificación densitométrica se realizó en los western-blot con el programa ImageJ, de las bandas Atg8-PE y de las bandas rpS3 en cada tiempo, tanto en la condición de larvas intoxicadas con Cry1Ab (LC<sub>10</sub>) como en la condición de larvas control alimentadas con dieta normal.

Se obtuvo el cociente de los valores obtenidos en pixeles de cada banda de Atg8-PE entre el valor de la banda rpS3 correspondiente a cada tiempo (Fig. 14). Posteriormente, para obtener el valor que corresponde a la respuesta a la toxina al cociente Atg8-PE/rpS3 de Cry1Ab (LC<sub>10</sub>) se le restó el valor del cociente Atg8-PE/rpS3 basal. Esto se hizo individualmente para cada tiempo. Los datos obtenidos se graficaron (Fig. 13).

En el análisis de estos datos se puede observar que en las larvas intoxicadas la lipidación de Atg8-PE va en aumento a partir de las 2 hasta las 6 h, y a partir de las 12 h disminuye.



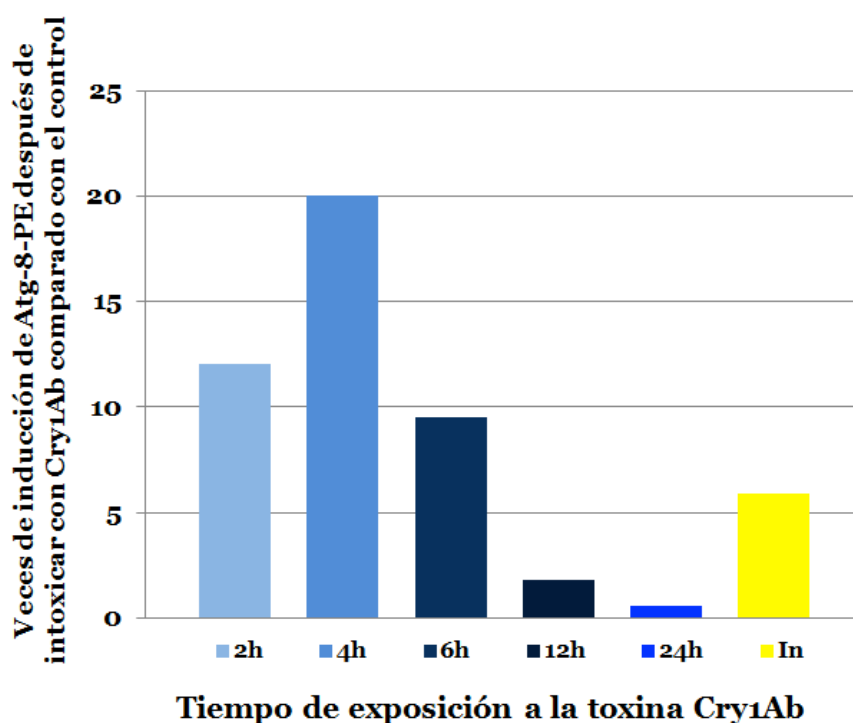
**Figura 12: Análisis de la acumulación relativa de Atg8-PE durante la intoxicación con una dosis baja de Cry1Ab.**

Se analizó la acumulación de la proteína lipídada Atg8-PE durante la intoxicación con una dosis baja de Cry1Ab (LC<sub>10</sub>) a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 12 y 24 h). Para obtener los valores de los niveles de acumulación de Atg8-PE debidos a la intoxicación, se hizo una cuantificación desintométrica de las bandas de Atg8-PE y



rpS3 utilizando el programa ImageJ, y posteriormente se graficaron los valores de la relación Atg8-PE/rpS3. Este experimento se realizó una vez.

La grafica anterior se basa en los datos obtenidos de la cuantificación desintométrica de las bandas de los western-blot que se muestran en la figura 14. Posteriormente se normalizaron los datos para obtener el numero de veces que se induce la lipidación de Atg8-PE después de la intoxicación con Cry1Ab (LC<sub>10</sub>) (Fig. 13). En este análisis es donde se observa que transcurridas 4 horas de intoxicación la inducción de la lipidación de Atg8-PE tiene su mayor actividad.

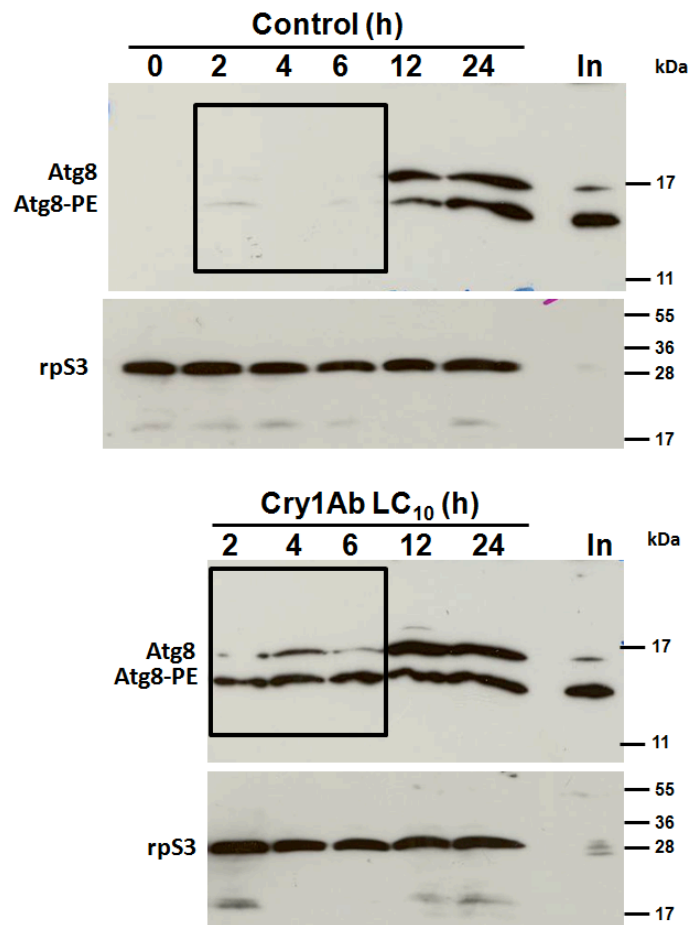


**Figura 13: Normalización de la expresión relativa de Atg8-PE/rpS3.**

Para normalizar los datos, los valores de cada tiempo se dividieron entre el valor de la relación Atg8-PE/rpS3 0 h, que es el control inicial sin toxina. De esta manera se obtuvo el número de veces que se induce la lipidación de Atg8-PE después de la intoxicación con Cry1Ab (LC<sub>10</sub>) con respecto al control sin toxina. Este experimento se realizó una vez.

Con base en este análisis podemos decir que hay un incremento de Atg8-PE en las larvas intoxicadas entre las 2 y las 6 h. Posteriormente, entre las 12 y las 24 h se observó una disminución de Atg8-PE. Esta disminución podría estar relacionada a que entre las 12 y las 24 h después de nacidas las larvas tenían 2 días de edad y estaban cambiando en un estado quiescente relacionado al cambio de 1° al 2° instar.

En resumen, estos resultados indican que en las larvas de *M. sexta* se indujo el proceso de autofagia en respuesta a una dosis subletal de la toxina Cry1Ab desde las 2 a las 6 h observándose un máximo a las 4 h.



**Figura 14: Lipidación de Atg8 en larvas intoxicadas con Cry1Ab (LC<sub>10</sub>).**

A) Análisis del procesamiento de la proteína Atg8-PE, mediante Western-blot, en larvas neonatas control alimentadas con dieta normal sin toxina durante 0, 2, 4, 6,

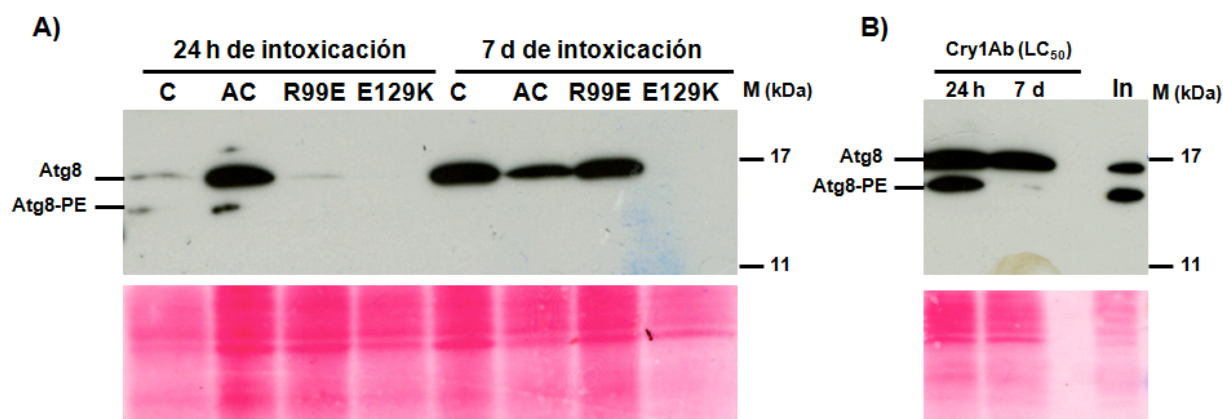
12 y 24 h. B) Análisis del procesamiento de la proteína Atg8-PE, mediante Western-blot, en larvas neonatas alimentadas con dieta contaminada con Cry1Ab (LC<sub>10</sub>) durante 0, 2, 4, 6, 12 y 24 h. Se analizaron 100 µg de proteína total por condición. Mediante western-blot se detectaron a Atg8 y Atg8-PE usando anti-GABARAP de *M. sexta*, y anti-rpS3 para detectar la proteína constitutiva rpS3. Se usaron como control extractos de proteína de intestinos de *M. sexta* neonatas que estuvieron 6 horas de ayuno (In). Este experimento se realizó una vez.

## **Se requiere de la toxicidad de Cry1Ab para el procesamiento de Atg8-PE**

Como se mencionó en la introducción, la toxicidad de las TFPs depende de la formación del poro en la membrana celular.

Para demostrar si la autofagia desencadenada por la toxina Cry1Ab depende de la formación del poro, probamos toxinas inactivas, a las que se les cambio un aminoácido en diferentes posiciones a cada una, afectando la toxicidad de la proteína. Las toxinas inactivas R99E y E129K son proteínas incapaces de formar el poro en la membrana, por lo que no son tóxicas. Su nombre se refiere a él aminoácido y la posición presente en la toxina tipo silvestre y seguido por él aminoácido presente en la proteína mutada.

Con estas toxinas inactivas, R99E y E129K, se realizaron bioensayos utilizando el doble de la cantidad correspondiente a la LC<sub>50</sub> de la toxina silvestre Cry1Ab. En este experimento se hicieron análisis del efecto de las toxinas inactivas en los intestinos de las larvas a dos tiempos diferentes de intoxicación, que fueron a las 24 h a y a los siete días después de haber intoxicado dichas larvas. En este experimento se alimentaron larvas de *M. sexta* con la cepa acristalifera de Bt para analizar si sus demás compuestos proteínicos tienen algún efecto en la inducción de la lipidación de Atg8 a Atg8-PE. Este experimento tuvo dos repeticiones biológicas, en las cuales los resultados fueron los mismos.



**Figura 15: Análisis del procesamiento de Atg8-PE con toxinas inactivas.**

A) Mediante western-blot se analizó la lipidación de Atg8-PE en larvas de *M. sexta* control alimentadas con dieta sin toxina, en larvas alimentadas con la cepa acristalífera (AC.) y en larvas intoxicadas con las toxinas inactivas R99E y E129K (doble de LC<sub>50</sub>), durante 24 h y 7 días. B) Análisis de la lipidación de Atg8-PE, mediante western-blot en larvas de *M. sexta* intoxicadas con la toxina activa Cry1Ab (LC<sub>50</sub>) durante 24 h y 7 días. Se usaron como control extractos de proteína de intestinos de *M. sexta* neonatas que estuvieron 6 horas en Ayuno (In). Se analizaron 100 µg de proteína total por condición. Mediante western-blot se detecto Atg8 y Atg8-PE usando anti-GABARAP de *M. sexta*. Como control de carga se utilizó la tinción de Ponsseau.

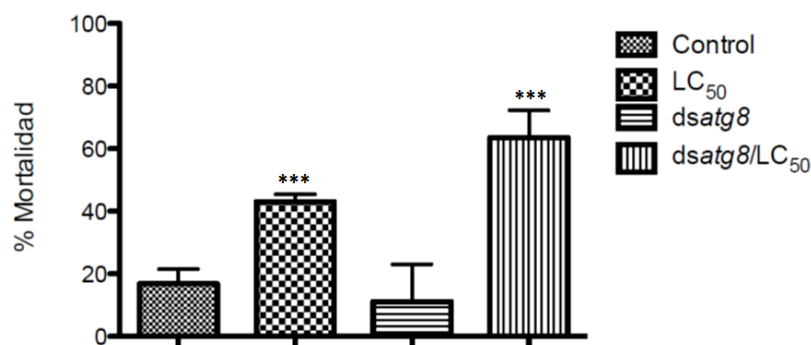
Los resultados mostraron que las toxinas inactivas son incapaces de inducir la lipidación de Atg8-PE comparado con la intoxicación con la toxina activa. Cuando se intoxicó a las larvas con la cepa acristalífera, se observó lipidación de Atg8-PE a las 24 h, aunque esto no es significativo, ya que para que se considere que el proceso de la autofagia se está induciendo, Atg8-PE debe ser mayor que Atg8. Estos nos indicaron que las toxinas inactivas no son capaces de inducir la autofagia, y en caso de la cepa

acristalifera, los demás componentes proteínicos de Bt parecen tener algún papel en la inducción de la autofagia pero a un nivel basal (Fig. 15).

Con base en estas observaciones se dedujo que se requiere de la toxina activa para que se induzca la autofagia.

### **El silenciamiento de *atg8* incrementa la susceptibilidad de las larvas de *M. sexta* a la toxina Cry1Ab**

Para probar la hipótesis de este proyecto, analizamos si la autofagia tiene un papel en la supervivencia de las larvas de *M. sexta* ante la intoxicación con Cry1Ab. Para esto se llevó a cabo el silenciamiento del gen *atg8* como se indica en los Métodos. Veinticuatro horas después de la ingesta del dsRNA, las larvas se alimentaron con dieta contaminada con una LC<sub>50</sub> (0.8 ng/cm<sup>2</sup>) de toxina Cry1Ab durante 9 días. Como control se emplearon larvas no silenciadas. Este experimento se hizo por triplicado, y se muestra resultados representativos. Al término del bioensayo de mortalidad se analizaron tanto las poblaciones de larvas silenciadas como las no silenciadas. Los resultados obtenidos del análisis de los bioensayos nos indican que el silenciamiento de *atg8* incrementa la susceptibilidad de las larvas de *M. sexta* a la toxina Cry1Ab ya que el porcentaje de mortalidad aumentó más de un 20% por lo que se puede deducir en principio que la expresión de este gen contribuye a la supervivencia de las larvas cuando son intoxicadas con Cry1Ab (Fig. 16).



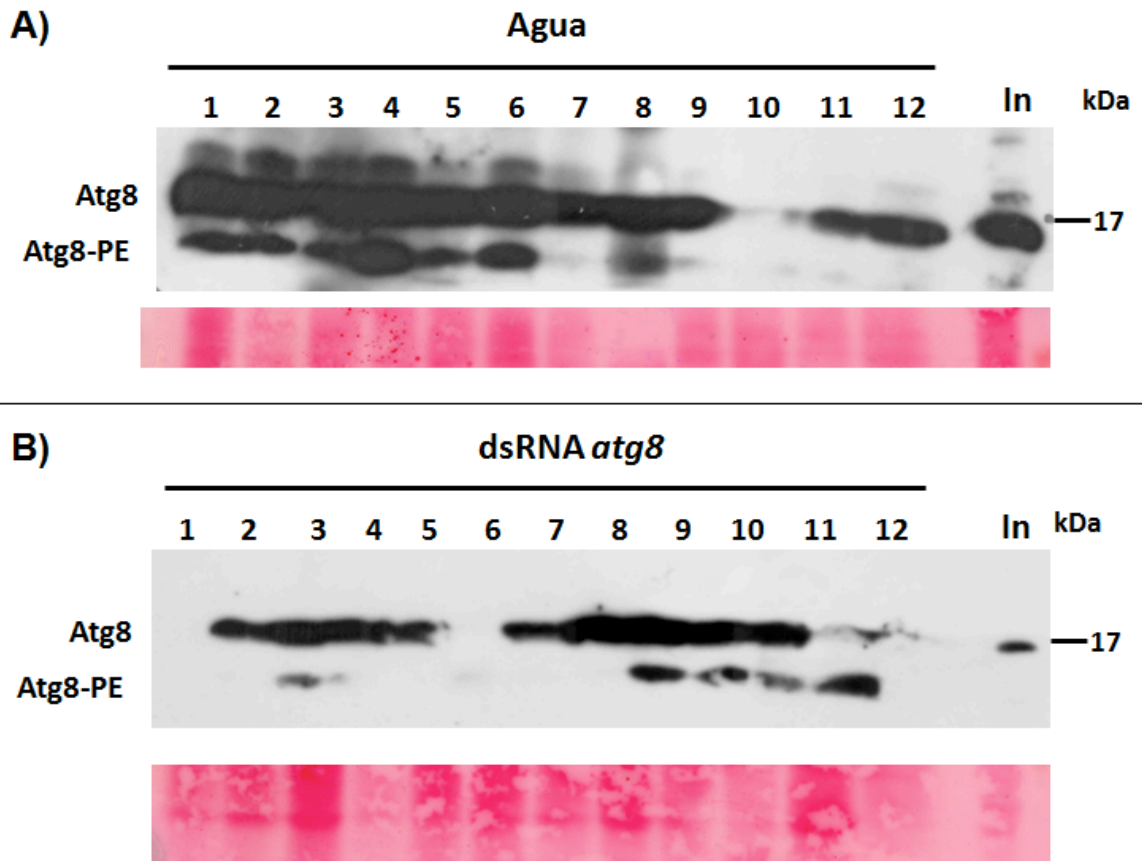
### **Figura 16: Análisis de la mortalidad de larvas silenciadas con dsRNA *atg8*.**

Las larvas control y las larvas de *M. sexta* en las cuales se silenció el gen de *atg8* con dsRNA, se intoxicaron contaminando la superficie de la dieta con 0.8 ng/cm<sup>2</sup> de la toxina Cry1Ab (LC<sub>50</sub>). Cada columna representa el promedio de 72 individuos de un experimento representativo de 5 replicas biológicas. Las barras representan el promedio +/- la desviación estándar. El porcentaje de mortalidad se analizó con ANOVA de una vía y con la prueba posterior de Tukey, \*\*\* indica la diferencia significativa  $p < 0.05$ .

### **Los niveles de proteína Atg8 disminuyen por efecto del silenciamiento del gen *atg8* en larvas de *M. sexta***

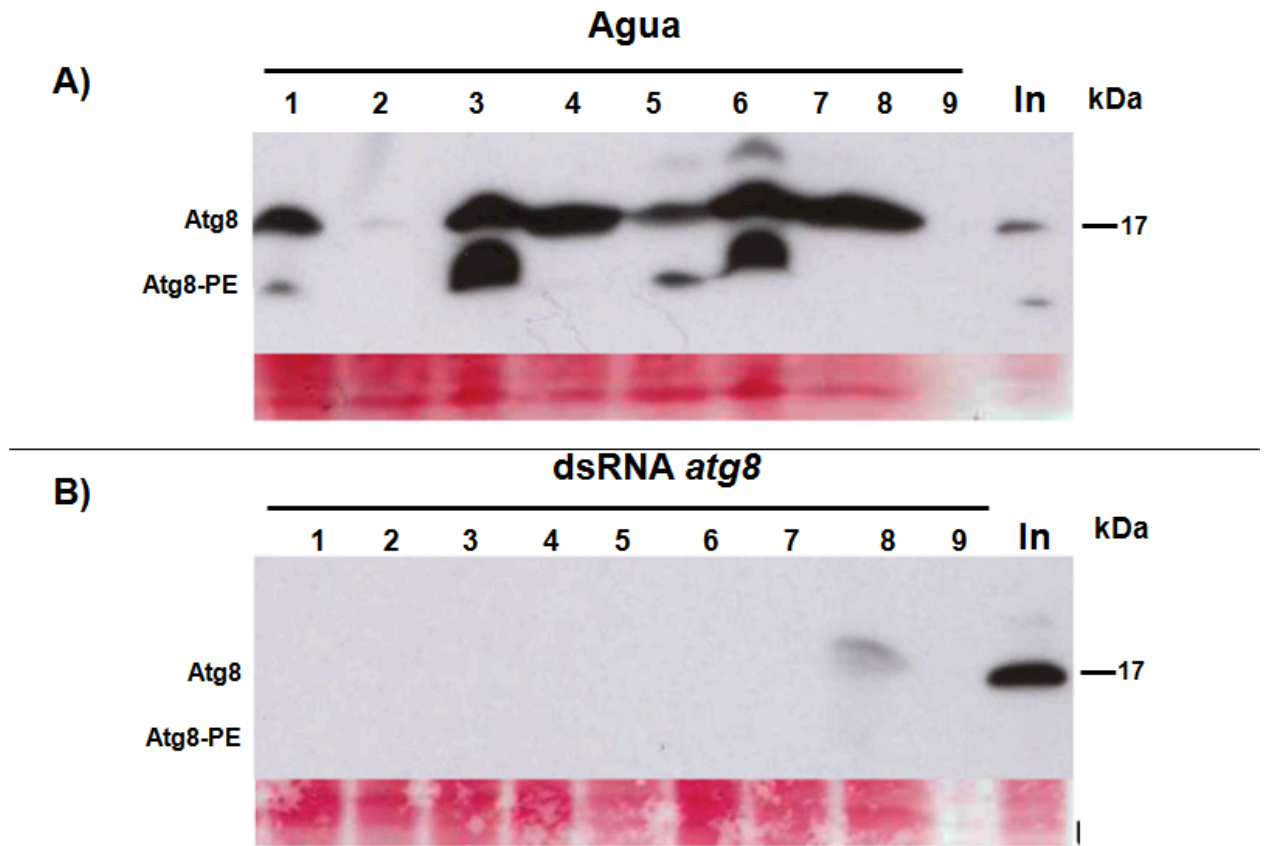
Para confirmar que el gen *atg8* se silenció en los experimentos anteriores, se analizó la existencia de la proteína Atg8 en las larvas silenciadas con el dsRNA *atg8*. Se extrajeron los intestinos de las larvas silenciadas y no silenciadas después de 24 horas y 7 días de alimentar a las larvas con el dsRNA. Se extrajo la proteína total de estos intestinos para observar la desaparición de la proteína Atg8 por western-blot. Se analizó la existencia de Atg8/Atg8-PE individualmente en cada larva durante 24 h y 7 días. Los resultados mostraron que a las 24 h sólo dos larvas de las que se alimentaron con dsRNA *atg8* (1 y 6) tenían silenciado el gen *atg8* (fig. 17 B), y a los 7 días Atg8/Atg8-PE ya no se observa en las larvas que fueron alimentadas con dsRNA *atg8* (Fig. 18 B). En las larvas control alimentadas con agua se observó Atg8/Atg8-PE en la mayoría de las larvas analizadas (Fig. 17 A y 18 A).

Nuestros resultados indican que las proteínas Atg8/Atg8-PE son muy estables. Pero a pesar de esa estabilidad en los bioensayos se pudo observar un 30% de aumento en la mortalidad de las larvas silenciadas e intoxicadas durante 24 h con Cry1Ab (Fig. 16).



**Figura 17: Análisis de la inhibición de la expresión de la proteína Atg8 a las 24h.**

Análisis por western-blot de la inhibición de la expresión de Atg8/Atg8-PE en los intestinos de las larvas alimentadas con A) agua y B) con dsRNA *atg8* para el silenciamiento después de 24 h. Los números indican larvas individuales analizadas. Se empleó el anticuerpo primario anti-LC3-B 1:1,500 TBST, O.N. 4°C; El anticuerpo secundario goat-anti rabbit 1:15,00 en 5% de leche descremada-TBST, durante 1 hora. Las larvas de *M. sexta* alimentadas con dsRNA no expresan Atg8 -Atg8-PE. Inanición (In). Este experimento se realizó una vez.



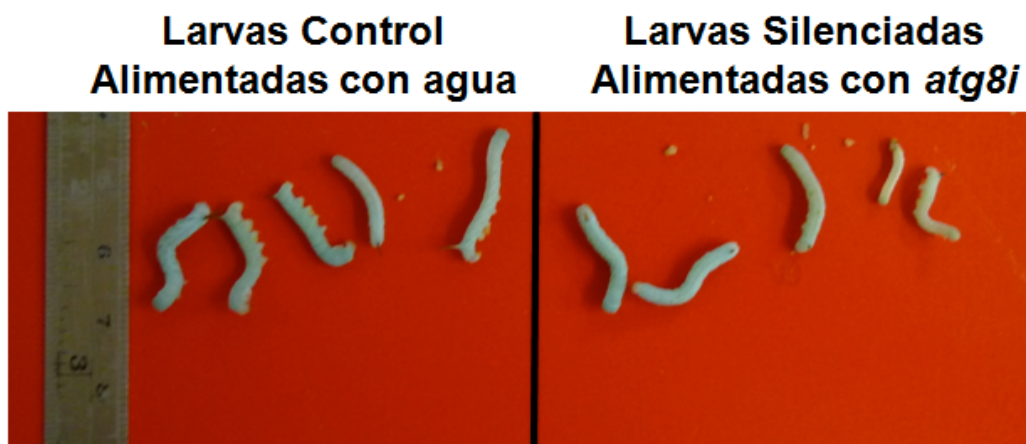
**Figura 18: Análisis de la inhibición de la expresión de la proteína Atg8 a los 7 días.**

Análisis por western-blot de la inhibición de la expresión de Atg8/Atg8-PE en los intestinos de las larvas alimentadas A) con agua y B) con dsRNA de *atg8* después de 7 días. Los números indican larvas individuales analizadas. Se empleó el anticuerpo primario anti-LC3-B 1:1,500 TBST, O.N. 4°C; El anticuerpo secundario goat-anti rabbit 1:15,00 5% de leche descremada-TBST, durante 1 hora. Las larvas de *M. sexta* alimentadas con dsRNA no expresan Atg8 -Atg8-PE. Inanición (In). Este experimento se realizó una vez.



## **El silenciamiento del gen *atg8* no afecta el desarrollo de larvas de *M. sexta***

Una observación importante cuando se silencia un gen en un organismo, es analizar el efecto que tendrá en el desarrollo. De manera simultánea al bioensayo del silenciamiento se siguió el desarrollo de las larvas a las que se les silencio el gen *atg8* así como también el de las larvas que se alimentaron con agua como control negativo. El desarrollo de ambos tipos de larvas se siguió desde el día de su nacimiento hasta el día en que eclosionaron de la pupa para pasar al estado adulto. Es importante mencionar que en este experimento es mencionar que las larvas se alimentaron una sola vez con el dsRNA. Los resultados indicaron que tanto las larvas alimentadas con dsRNA como las larvas control se desarrollaron de modo similar en el mismo tiempo. Esto nos indica que el silenciamiento temporal del gen *atg8* no interfiere con el desarrollo de las larvas de *M. sexta* (Fig. 19 y 20).



**Figura 19: Larvas de *M. sexta* con 12 días de edad.**

Del lado izquierdo se muestran las larvas que fueron alimentadas con agua, para utilizarlas como control. Del lado derecho se muestran las larvas alimentadas con dsRNA de *atg8*.



**Figura 20: Larvas de *M. sexta* con 22 días de edad.**

Arriba se muestran las larvas que fueron alimentadas con dsRNA de *atg8*. Abajo se muestran las larvas alimentadas con agua, para utilizarlas como control.

## Discusión

En los últimos años, el conocimiento de los mecanismos de acción de numerosas toxinas bacterianas se ha incrementado enormemente. Estos estudios han contribuido al descubrimiento de la participación de importantes respuestas celulares dentro de estas, la autofagia participa en la eliminación de ciertos patógenos intracelulares, sin embargo, otros microorganismos utilizan a la autofagia para sobrevivir y replicarse dentro de los compartimientos intracelulares específicos. Por otro lado, se ha reportado la inducción de la autofagia para mitigar los efectos del daño provocado en las membranas celulares por algunas TFP.

En el presente trabajo se estudió la participación de la autofagia en respuesta al daño celular provocado por la TFP Cry1Ab de *B. thuringiensis* en los intestinos de las larvas de *M. sexta*.

Uno de los objetivos de este proyecto fue el analizar si el proceso de autofagia se activaba en las células del intestino de larvas de *M. sexta* alimentadas con Cry1Ab. Se ha reportado que a dosis subletales de TFP se inducen los mecanismos celulares relacionados a la supervivencia de las células y organismos. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que relaciona a la autofagia con la respuesta a la intoxicación con la TFP Cry1Ab. Para llevar a cabo este estudio, primero analizamos la viabilidad de las larvas expuestas a diferentes dosis de toxina a diferentes tiempos de intoxicación. Nuestras observaciones indicaron que en las larvas de *M. sexta* se induce la autofagia a una concentración subletal ( $LC_{10}$ ) de la toxina Cry1Ab, y en las primeras dos horas de intoxicación, y que a concentraciones más altas, la respuesta es menor ( $LC_{50}$ ) o básicamente no responde ( $LC_{90}$ ). Esta observación indicaría que hay un umbral de la inducción de la autofagia en respuesta a la toxina ya que a dosis más altas el organismo no fue capaz de inducir la autofagia.

También pudimos observar que las larvas de *M. sexta* presentaron niveles altos de autofagia basal. Al nacer las larvas de *M. sexta* buscan inmediatamente alimento y son voraces. Por lo tanto los niveles elevados de autofagia en los controles indican un

estado de inanición. Nuestros resultados nos permiten sugerir que las larvas de *M. sexta* responden a concentraciones subletales de Cry1Ab induciendo autofagia como se ha propuesto para otras toxinas (Bischofberger, M., *et. al.*, 2009) y también en relación a la inanición.

Durante el desarrollo larvario, el proceso de autofagia desempeña un papel importante en la eliminación de tejidos. Durante el tiempo en el que se lleva a cabo nuestro estudio de autofagia las larvas continuaron su desarrollo. Debido a esto, para observar el nivel de la participación de la autofagia durante el desarrollo de las larvas en nuestros experimentos, se hizo el mismo análisis del nivel de lipidación de Atg8-PE en larvas control alimentadas sin toxina. Así pudimos separar los cambios en el aumento de la lipidación de Atg8-PE dependiente de la toxina de los cambios en el nivel de lipidación de Atg8-PE inducidos por variables como el desarrollo de la larva o debido a algún tipo de estrés, que son factores que activan el proceso de autofagia a un nivel basal.

En investigaciones anteriores se ha observado que las TFP son capaces de inducir autofagia como parte de una respuesta de supervivencia, como la citolisina (TFP) de *Vibrio cholerae* en células de mamífero (CHO y CaCO-2) en donde tiene un papel protector (Gutierrez, M. *et al.*; 2007).

Para estudiar más a fondo el papel de la autofagia en la supervivencia de *M. sexta* a la intoxicación con Cry1Ab, se silenció el gen *atg8* con dsRNA. Los resultados indicaron que las larvas se vuelven aproximadamente 30% más susceptibles, a la toxina cuando se silencia el gen *atg8*. En estos bioensayos se silenció durante 24 h previas a la intoxicación con la toxina.

Para corroborar el silenciamiento de *atg8*, seguimos la desaparición de la proteína Atg8/Atg8-PE a diferentes tiempos después de silenciar y observamos que hasta el 7° día después de silenciar Atg8/Atg8-PE desaparece. Este dato nos está indicando que la proteína Atg8 es muy estable. Así que se sería muy importante

estudiar que tanto se incrementa la susceptibilidad a la toxina una vez que se agotó la poza de Atg8. Nuestra hipótesis es que se volverán muy sensibles.

El proceso de autofagia es una vía evolutiva conservada y además de su papel en el desarrollo también es importante para la supervivencia de los organismos. El silenciamiento del gen *atg8* incrementó el porcentaje de mortalidad de las larvas cuando estas son intoxicadas con Cry1AB. Por lo tanto sugerimos que, como en otros organismos, la autofagia tiene un papel en la supervivencia ante la intoxicación con la toxina formadora de poros Cry1Ab de *B. thuringiensis*.

Aún falta saber si el proceso de autofagia tiene un rol más importante en la respuesta ante el ataque de las toxinas Cry, como podría ser la eliminación de la toxina por medio de los autofagosomas, o la reparación de la membrana que ha sufrido daños moderados a causa de la formación de los poros por la TFP.

Una idea interesante que surgió durante el desarrollo del proyecto fue conocer un poco acerca del origen de la membrana con la que se están formando los autofagosomas. Previamente se reportó que en respuesta a infecciones con la toxina del cólera en células HeLa, la membrana plasmática contribuye a la formación de los autofagosomas y que en estos procesos participan la proteína clatrina y la proteína Atg16L1 (Ravikumar, *et al.*, 2010). Existe la posibilidad de que la membrana plasmática esté contribuyendo a la formación del autofagosoma en un intento de las células intestinales de las larvas por eliminar el poro, formado por la toxina que se encuentra insertado en la membrana plasmática. Con esta idea en mente se analizó la participación de la proteína Atg16, en la formación del autofagosoma. Analizamos la acumulación de esta proteína por western-blot con anticuerpos anti-Atg16 de humano. Los datos obtenidos de estos experimentos (mostrados en el Anexo I) indicaron que la isoforma  $\alpha$  de Atg16 se indujo en respuesta a la intoxicación con Cry1Ab. Sin embargo esta inducción se observó las 24 h después de intoxicar. No analizamos el papel de clatrina. Sin embargo la acumulación de otra proteína que participa en la formación del autofagosoma en respuesta a la intoxicación con Cry1Ab apoya los resultados obtenidos con Atg8-PE.

Otro de los objetivos de este proyecto, fue estudiar si se requiera de la toxina activa para inducir la autofagia. Para esto se utilizaron toxinas inactivas que no son capaces de formar poros en la membrana plasmática de sus células blanco. Nuestras observaciones indicaron que en efecto se necesita de la toxina activa para que la célula inicie una repuesta y se lleve a cabo la lipidación de Atg8-PE. En investigaciones anteriores, se ha demostrado que se requiere de la formación de poro para la activación de la autofagia (Gonzalez, M. *et. al.*, 2011). En este trabajo mostramos que la actividad de la toxina la cual se entiende como la capacidad de formar poros en la membrana, es indispensable para la activación de la autofagia en un organismo susceptible como *M. sexta*. La importancia de nuestro resultado radica en ser el primer estudio *in vivo* del proceso de autofagia empleando un organismo como las larvas de *M. sexta*.

El descubrimiento de una relación entre la autofagia y el daño celular inducido por Cry1Ab es importante por dos razones, principalmente: En primer lugar, ayuda a develar los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de la infección por *B. thuringiensis* y probablemente este conocimiento permita un mejor diseño de toxinas y segundo, el modelo de *M. sexta* puede se usado para investigar el papel de la autofagia como una respuesta de supervivencia celular.

## Conclusiones

- La toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* induce a la autofagia en las larvas de *M. sexta*.
- La autofagia se induce en las en las primeras 6 horas de intoxicación con Cry1Ab y a una dosis subletal (LC<sub>10</sub>).
- Para que la autofagia se incremente se requiere de la actividad formadora de poros de la toxina Cry1Ab.
- El silenciamiento del gen *atg8* vuelve más susceptibles las larvas de *M. sexta* cuando son intoxicadas con Cry1Ab.
- El silenciamiento temporal del gen *atg8* no afecta el desarrollo de las larvas de *M. sexta*.
- La proteína Atg8 se requiere para que la autofagia se lleve a cabo en células intestinales de larvas de *M. Sexta* cuando son intoxicadas con Cry1Ab.

## Perspectivas

1. Analizar si la toxina se está eliminando mediante el proceso de autofagia.
2. Analizar si el daño a la membrana plasmática ocasionado por las TFP se repara mediante el proceso de autofagia.
3. Analizar la lipidación de Atg8-PE a lo largo del desarrollo para saber en que momento la autofagia funciona como parte del desarrollo del organismo y así poder compararlos con los niveles de lipidación Atg8 debidos a la toxina Cry1Ab.
4. Analizar si las larvas de *M. sexta* se vuelven más susceptibles a la toxina Cry1AB cuando se terminan las reservas de la proteínas Atg8 después de haber sido silenciado el gen de dicha proteína.

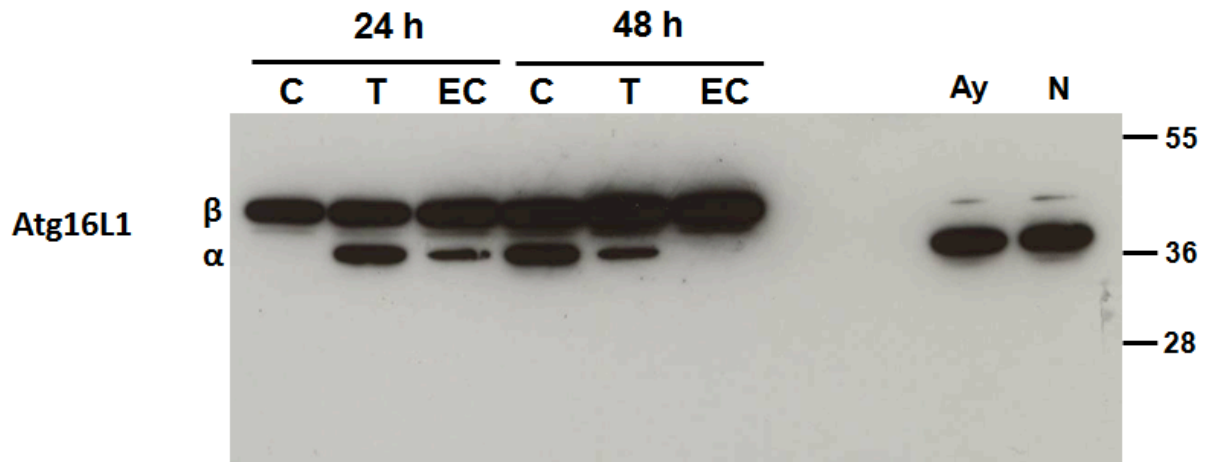


## **Anexo I**

### **La subunidad $\alpha$ de la proteína Atg16L se induce ante la intoxicación con Cry1Ab en larvas de *M. sexta***

Durante la formación del autofagosoma la proteína Atg16L1 es esencial en el paso de la nucleación. Debido a la importancia de esta proteína decidimos analizar su inducción en los intestinos de las larvas de *M. sexta* cuando son intoxicadas con Cry1Ab y así soportar los datos obtenidos del análisis la lipidación de Atg8. Este análisis es interesante ya que existe la posibilidad de que la membrana plasmática esté contribuyendo a la formación del autofagosoma en un intento de las células intestinales de las larvas por eliminar el poro formado por la toxina que se encuentra insertado en la membrana plasmática (Moreoau & Rubinsztein, 2012; Moreau, *et al.*, 2012).

Para analizar la participación de Atg16L1, primero se analizó si esta proteína se inducía en respuesta a la intoxicación con Cry1Ab, por lo que se hizo un ensayo con larvas neonatas intoxicadas con una LC<sub>50</sub> de toxina durante 24 horas. Posteriormente, se extrajeron los intestinos de estas larvas y se extrajo la proteína total, la cual se analizó por western-blot para detectar la proteína Atg16L1 con el anticuerpo anti-Atg16L1 de humano (Abcam). Como control negativo se utilizaron larvas que no fueron intoxicadas con Cry1Ab, y como control positivo se utilizaron larvas neonatas mantenidas en ayuno durante 4 horas (Fig. A 1).

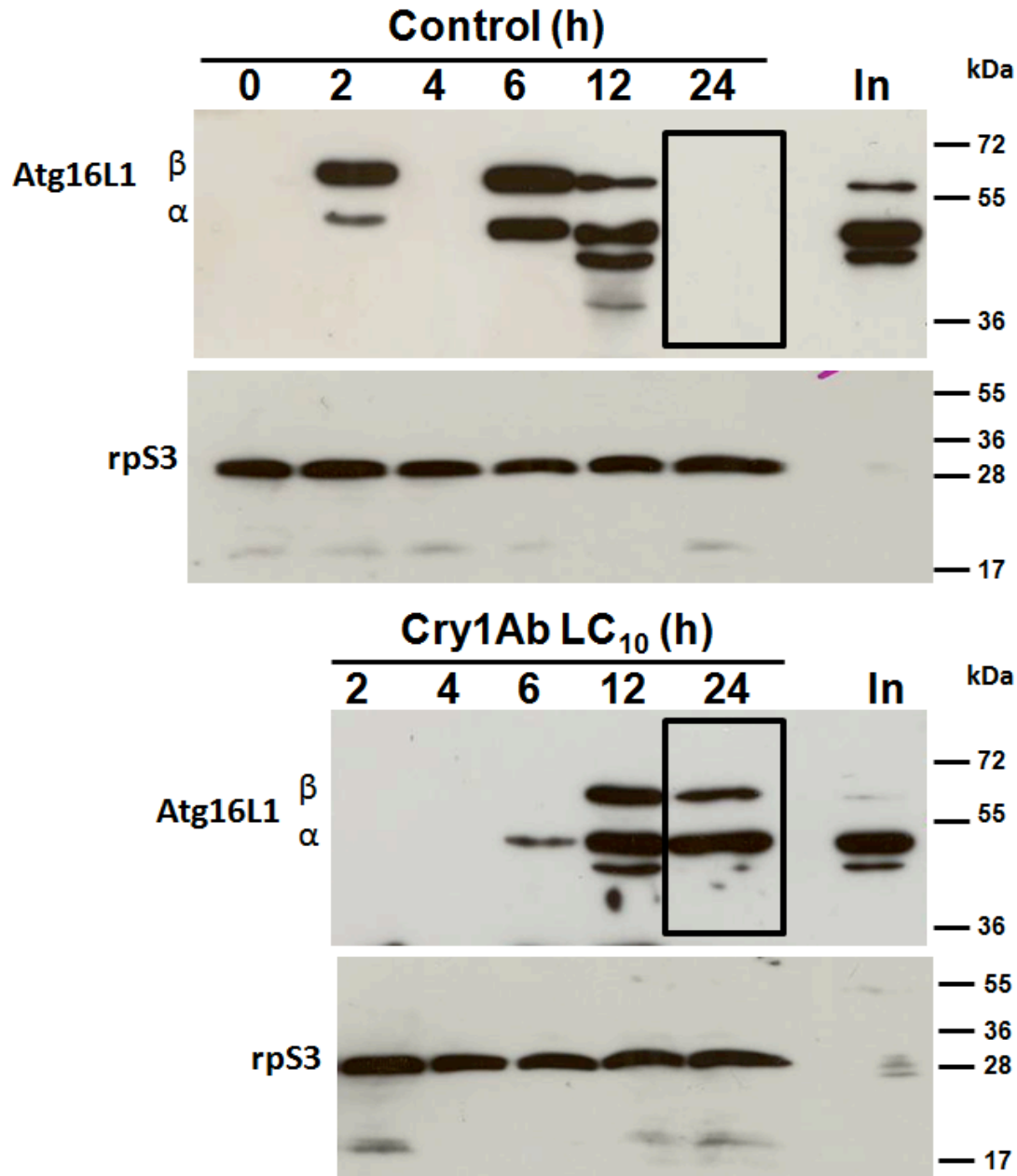


**Figura A 1: Inducción de la isoforma alfa de Atg16L1.**

Análisis de la inducción de la isoforma  $\alpha$  de la proteína Atg16L1 ante la intoxicación con la toxina purificada Cry1Ab (T) y la Espora-cristal (EC) durante 24 y 48 h en larvas neonatas de *M. sexta* por Western-blot. Control:C ; Ayuno: Ay; Larvas alimentadas (N).

De la proteína Atg16L1 se conocen varias isoformas y se sabe que la subunidad  $\alpha$  se induce ante un estrés y participa en el proceso de autofagia. Este experimento nos dio la primera idea de que la isoforma  $\alpha$  de la proteína Atg16L1 se induce ante la intoxicación con Cry1Ab (Fig. A 1).

Basados en los resultados del primer experimento con Atg16L1, se realizó un segundo análisis de la inducción de la isoforma  $\alpha$ . Esta vez se hizo a una concentración baja, LC<sub>10</sub>, y durante 0, 2, 4, 6, 12 y 24 h (Fig. A 2).



**Figura A 2:** Inducción de la isoforma alfa de Atg16L1 en larvas intoxicadas con Cry1Ab (LC<sub>10</sub>).

A) Análisis de la inducción de la isoforma alfa de la proteína Atg16L1 en larvas control que fueron alimentadas con dieta sin toxina a diferentes tiempo: 0, 2, 4, 6, 12 y 24 h. B). Análisis de la inducción de la isoforma  $\alpha$  de la proteína Atg16L1 ante la intoxicación con Cry1Ab (LC<sub>10</sub>) a diferentes tiempos. Se analizaron 100  $\mu$ g de

proteína total por condición. Mediante western-blot se detectó Atg16L1 usando anti-Atg16L1 (Abcam) y anti-rpS3 (Aviva) para detectar la proteína constitutiva rpS3. Se usaron como control extractos de proteína de intestinos de *M. sexta* neonatas que estuvieron 6 horas en Inanición (In).

Los resultados muestran la inducción de la isoforma  $\alpha$  de la proteína Atg16L1 a una LC<sub>10</sub> hasta las 24 h. Esta proteína se indujo más tarde que el procesamiento de Atg8 a Atg8-PE (Fig. 2A).

## Bibliografía

- Aroian, R. & van der Goot, F. G. (2007). Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Curr Opin Microbiol* 10, 57-61.
- Bischofberger, M., Gonzalez, M. R. & van der Goot, F. G. (2009). Membrane injury by pore-forming proteins. *Curr Opin Cell Biol* 21, 589-595.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S. & Peferoen, M. (1992). Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes. *J Invertebr Pathol* 60, 247-254.
- Deretic, V. (2006). Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol* 18, 375-382.
- Eskelinen, E. L. (2008). To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy* 4, 257-260.
- Eskelinen, E. L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A. L. & Seglen, P. O. (2011). Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy* 7, 935-956.
- Franzetti, E., Huang, Z. J., Shi, Y. X. & other authors (2012). Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis* 17, 305-324.
- Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Frêche, B., Ho, S., Parton, R. G. & van der Goot, F. G. (2011). Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell Microbiol* 13, 1026-1043.
- 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. *J Mol Biol* 254, 447-464.
- Gutierrez, M. G., Saka, H. A., Chinen, I., Zoppino, F. C., Yoshimori, T., Bocco, J. L. & Colombo, M. I. (2007). Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1829-1834.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. & Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11, 1433-1437.

- He, C. & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93.
- Iacovache, I., van der Goot, F. G. & Pernot, L. (2008). Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1611-1623.
- Kadowaki, M. & Karim, M. R. (2009). Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy. *Methods Enzymol* 452, 199-213.
- Kimura, S., Noda, T. & Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3, 452-460.
- Knowles, M. A., Platt, F. M., Ross, R. L. & Hurst, C. D. (2009). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28, 305-316.
- Kuma, A., Matsui, M. & Mizushima, N. (2007). LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* 3, 323-328.
- Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D. J. & Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J Cell Biol* 190, 1005-1022.
- Meléndez, A. & Neufeld, T. P. (2008). The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 135, 2347-2360.
- Mizushima, N. & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542-545.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Mizushima, N. & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728-741.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 107-132.
- Moreau, K., Ravikumar, B., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. (2012). Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *J Cell Biol* 196, 483-496.

- Moreau, K. & Rubinsztein, D. C. (2012). The plasma membrane as a control center for autophagy. *Autophagy* 8.
- Obara, K. & Ohsumi, Y. (2011). PtdIns 3-Kinase Orchestrates Autophagosome Formation in Yeast. *J Lipids* 2011, 498768.
- Orenstein, S. J. & Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol* 21, 719-726.
- Pigott, C. R. & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 255-281.
- Helena Porta & Lizardi M.P. (1995). An allosteric ribozyme. *BIO/TECHNOLOGY*. 13:161-164.
- Porta, H., Jiménez, G., Córdoba, E., León, P., Soberón, M. & Bravo A. (2011). Tobacco plants expressing the Cry1AbMod toxin suppress tolerance to Cry1Ab toxin of *Manduca sexta* cadherin-silenced larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 1-7.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12, 747-757.
- Rodríguez-Almazán, C., Zavala, L., Muñoz-Garay, C., Jiménez-Juárez, N., Pacheco, S., Masson, L., Soberón, M. & Bravo, A. (2009). Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: demonstration of the role of oligomerization in toxicity. *PLoS One* 4, e5545.
- 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. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 775-806.
- Shoma, S., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Nomura, T., Hara, H., Uchiyama, R., Daim, S. & Mitsuyama, M. (2008). Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1alpha and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infect Immun* 76, 1547-1557.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C. & Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 56, 1-32.
- Tettamanti, G., Cao, Y., Feng, Q., Grimaldi, A. & Eguileor, M. d. (2011). Autophagy in lepidoptera: more than old wine in new bottle. *ISJ* 8, 5-14.

- Timmer, A. M., Timmer, J. C., Pence, M. A., Hsu, L. C., Ghochani, M., Frey, T. G., Karin, M., Salvesen, G. S. & Nizet, V. (2009). Streptolysin O promotes group A Streptococcus immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J Biol Chem* 284, 862-871.
- Vachon, V., Laprade, R. & Schwartz, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J Invertebr Pathol* 111, 1-12.
- Webber, J. L. & Tooze, S. A. (2010). New insights into the function of Atg9. *FEBS Lett* 584, 1319-1326.
- Wiles, T. J., Dhakal, B. K., Eto, D. S. & Mulvey, M. A. (2008). Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol Biol Cell* 19, 1427-1438.
- Wirawan, E., Berghe, T. V., Lippens, S., Agostinis, P. & Vandenabeele, P. (2011). Autophagy: for better or for worse. *Cell Res*.
- Yang, Z. & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22, 124-131.
- Yano, T., Mita, S., Ohmori, H. & other authors (2008). Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol* 9, 908-916.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. & Eskelinen, E. L. (2009a). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5, 1180-1185.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. & Eskelinen, E. L. (2009b). Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Methods Enzymol* 452, 143-164.
- Zhang, S., Cheng, H., Gao, Y., Wang, G., Liang, G. & Wu, K. (2009). Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem Mol Biol* 39, 421-429.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R. & Bulla, L. A. (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9897-9902.